Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg Direktor: Professor Dr. med. J. Eulert

Proliferation und Differenzierung

der

Zellkultursysteme hFOB 1.19 und C3H10T1/2 – BMP-2

unter dem Einfluß

Nichtsteroidaler Antiphlogistika

und

einzeitiger Radiatio

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Manuela Faltin

aus Bamberg

Würzburg, Juni 2003

Referent: Prof. Dr. med. J. Eulert

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Hendrich

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

28.01.2004

Die Promovendin ist Ärztin im Praktikum

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Heterotope Ossifikationen: Definition und Einteilung	1
Radiologische Diagnostik	2
Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Arcq	2
Einteilung heterotoper Ossifikationen nach DeLee et al.	3
Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Hamblen et al.	3
Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Rosendahl et al.	3
Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Brooker	4
Pathophysiologie heterotoper Ossifikationen	6
Klinische und zelluläre Aspekte heterotoper Ossifikationen	13
Prädisponierende und auslösende Faktoren	15
Alter und Geschlecht	15
Klinisch relevante Vorerkrankungen	15
Prothesentyp und Knochenzement	16
Operationstechnik	16
Aktueller Stand der Prophylaxe und Therapie heterotoper Ossifikationen	18
NSAK De l'action	18
Radialio	21
Operative intervention	22
Material und Methodik	23
Material: Puffer und Medien	23
PBS-Puffer	23
TEP (Trypsin – EDTA - PBS)	23
HEPES	24
Ascorbat	24
β -Glycerophosphat	24
DME-Medium: Proliferationsmedium fur Osteoblasten (hFOB 1.19)	25
DME-Medium: Proliferationsmedium für C3H1011/2 BCIb Medium: Differenzierungsmedium für Osteoblesten (bEOR 1.10)	26
BGJ0 – Medium. Differenzierungsmedium für Östeoblasten (nFOB 1.19)	27
Zell-Linien	28
Humane fetale Osteoblasten-Zell-Linie: hFOB 1.19	28
Murine Mesenchymale Progenitorzelle: C3H10T1/2 – BMP-2	29
NSAR-Substanzen	31
Dose-Response-Versuche	31
Indometacin	32
Meloxicam	32
Diclofenac	33
Plasma-Dosis-Versuche	33
Methoden	34
Zellkultivierung	34
Plattenbeimpfung	34
Dose-Response-Versuche	35
Plasma-Dosis-Versuche	35

	Zellzählung	38
	Test-Prinzip	38
	Durchführung	38
	Proteinbestimmung nach Bradford	39
	Test-Prinzip	39
	Durchführung	39
	Alkalisch Phosphatase	40
	Klinische Relevanz	40
	Test-Prinzin	40
	Durchführung	40
	Prolagen-C	42
	Klinische Relevanz	42
	Test-Prinzin	42
	Durchführung	42
		43
	Viinische Delevenz	44
	Test Drinzin	44
	Durahführung	44
	Durchrunnung Dussta slan din E	44
	Prostagiandin E ₂	45
	Kinnische Kelevanz	45
	Test-Prinzip	46
	Durchfunrung	46
	Calcium-Nachweis mittels Atomemissionspektrometrie (AES)	47
	Durchfuhrung	47
	Vorbereitung zur AES	47
	Qualitative Cytochemische Analytik	48
	Calcium-Nachweis: Farbung nach von Kossa	48
	Test-Prinzip	48
	Durchführung	48
	Adipocyten-Nachweis: Sudan III-Färbung	50
	Test-Prinzip	50
	Durchführung	50
	Chondrocyten-Nachweis: Alcian 8 G-Färbung	51
	Test-Prinzip	51
	Durchführung	51
	Bestrahlungs-Versuche	52
	Statistische Auswertung	52
Ergehi	nisse	53
Ligen		20
	Dose-Response-Versuche	
	Zell-Linie: hFOB 1.19	53
	Plasma-Dosis-Versuche	54
	Zell-Linie: hFOB 1.19	54
	Versuchsreihe: Diclofenac, Meloxicam, Indometacin I	54
	Zellzahl-Bestimmung	54
	Proteingehalt	55
	Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität	56
	Osteocalcin	57
	Prokollagen I	58
	Prostaglandin E ₂	59
	Calcium-Nachweis mittels Atomemissionspektrometrie (AES)	60
	Qualitativer Calcium-Nachweis mittels Färbung nach von Kossa	61

Versuchsreihe: Diclofenac, Meloxicam, Indometacin II	
	63
Zellzahl-Bestimmung	63
Proteingehalt	64
Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität	65
Prokollagen I	66
Calcium-Nachweis mittels Atomemissionspektrometrie (AES)	67
Qualitativer Calcium-Nachweis mittels Färbung nach von Kossa	68
Plasma-Dosis-Versuche	70
Zell-Linie: C3H10T1/2 – BMP-2	70
Versuchsreihe: Diclofenac, Meloxicam, Indometacin I	70
Zellzahl-Bestimmung	70
Proteingehalt	71
Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität	72
Osteocalcin	73
Prokollagen I	73
Prostaglandin E_2	74
Calcium-Nachweis mittels Atomemissionspektrometrie (AES)	75
Qualitativer Calcium-Nachweis mittels Färbung nach von Kossa	76
Nachweis adipocytärer Differenzierung mittels Sudan III-Färbung	78
Bestrahlung-Versuch	80
Zell-Linie: hFOB 1.19	80
Zell-Linie: C3H10T1/2 – BMP-2	80
Versuchsreihe: Radiatio I	80
Zellzahl-Bestimmung	80
Proteingehalt	82
Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität	83
Osteocalcin	84
Prokollagen I	85
Qualitativer Calcium-Nachweis mittels Färbung nach von Kossa	86
Nachweis adipocytärer Differenzierung mittels Sudan III-Färbung	88
Diskussion	90
Einfluss von NSAR auf Proliferation und Differenzierung der Zell-Linie hFOB 1.19	90
Einfluss von NSAR auf Proliferation und Differenzierung der Zell-Linie C3H10T1/2– BMP-2	94
Einfluss von Radiation auf Proliferation und Differenzierung der Zell-Linie	
C3H10T1/2– BMP-2	97
Zusammenfassung	99
Schlussfolgerung	103
Literaturverzeichnis	104
Danksagung	

Lebenslauf

Einleitung

Heterotope Ossifikationen: Definition und Einteilung

Heterotope Ossifikationen umfassen ein variables Spektrum von Knochenneubildungen im Weichteilgewebe außerhalb der originären Skelettanlage, die in nahezu allen Gewebsstrukturen auftreten können.

Bereits 1816 beschrieb Otto erstmalig eine traumatisch induzierte heterotope Ossifikation [16; 99; 106]. Es folgte jedoch erst in den letzten Jahrzehnten eine umfassende wissenschaftliche Bearbeitung dieses Krankheitsbildes, insbesondere unter klinisch - therapeutischen Gesichtspunkten sowie Fragen der osteologischen Grundlagenforschung.

Die unterschiedlichen primären Krankheitsbilder und Ursachenkomplexe, auf deren Fundament die Entwicklung heterotoper Ossifikationen beobachtet werden, lassen sich zum besseren Verständnis in drei Hauptgruppen gliedern [16; 106; 116].

So unterscheidet man heute die traumatische Form von der nichttraumatischen und neurologischen Form.

Als Ursache traumatischer Formen kommen ausgedehnte Frakturen, Muskelkontusionen sowie Operationen in Frage, wohingegen Rückenmarksverletzungen, Schädel-Hirn-Traumata und die erbliche Myositis ossificans progressiva für die neurologische Form heterotoper Ossifikationen verantwortlich gemacht werden.

Die Variante der Ossificatio non traumatica findet sich am häufigsten im Beckenbereich, der Oberschenkelmuskulatur sowie im Oberarmbereich, wobei differentialdiagnostisch Osteosarkome, Fibrosarkome oder Osteochondrome diskutiert werden sollten, da die Ursachenkomplexe der Ossificatio non traumatica bisher nicht befriedigend eruiert werden konnten [16; 106; 116].

Seit den 60er Jahren ist als Spätkomplikation der Hüft-Endoprothetik eine Zunahme von postoperativen ausgedehnten Ossifikationen zu beobachten, die als Subtyp der traumatisch induzierten HO zu werten sind, und in einem nicht unerheblichen Prozentsatz eine operative Intervention erfordern.

Auch im Bereich der Sportmedizin hat die Diskussion über Prophylaxe und Therapie heterotoper Ossifikationen in den letzten Jahren Einzug gehalten, da aufgrund unphysiologischer Weichteilbelastungen im Rahmen des Hochleistungssports ebenfalls eine Zunahme ektoper Knochenneubildungen beobachtet wird [16; 19].

Im Vordergrund des Interesses folgender Arbeit stehen die Auswirkungen der klinisch relevanten Präventionsmöglichkeiten, wie sie insbesondere nach der Implantation von Hüft-TEPs zum Einsatz kommen, auf Proliferation und Differenzierung humaner fetaler Osteoblastenzellen sowie mesenchymaler Vorläuferzellen in vitro.

Radiologische Diagnostik

Zur radiologischen Diagnostik heterotoper Ossifikationen insbesondere im Bereich der Beckenübersichtsaufnahmen wurden bisher mehr als 15 verschiedene Einteilungssysteme entwickelt.

Insbesondere im deutschsprachigen Raum findet die Klassifikation nach Arcq (1976) Anwendung, die ebenso wie die Gliederung von Hamblen (1971), Nollen (1973) und DeLee (1976) auf einer Einteilung in drei Grade basiert.

Grad I bezeichnet minimale Verknöcherungen, Grad II mittelgradige Ossifikationen und Grad III eine röntgenologisch darstellbare Ankylose.

Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Arcq

Grad 0:	Keine Ossifikation.	
Grad I:	Einzelne oder mehrere kleine Verkalkungsschatten, aber ohne Verbindung zwischen Pfanne und Trochanter bzw. Pfanne und innerem Anteil des Femurschaftes.	
Grad II:	Zunehmende Verkalkung mit regional kompletter Überbrückung zwischen beiden Prothesenteilen; Auch: Verkalkung rund um die gesamte Pfanne ohne volle Verbindung zwischen Pfanne und Schaftprothese.	
Grad III:	Vollständige Ummauerung der Prothese.	



Abb.1 Klassifikation heterotoper Ossifikationen nach Arcq

Einteilung heterotoper Ossifikationen nach DeLee et al.

Grad 0:	Keine Ossifikation.
Grad I:	Unter 50 % der Distanz zwischen Femur und Becken.
Grad II:	Über 50 % der Distanz zwischen Femur und Becken.
Grad III:	Überbrückende Ossifikation.

Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Hamblen et al.

Grad 0:	Keine Ossifikation.
Grad I:	< 1/3 der Fläche um das Hüftgelenk von Ossifikationen betroffen.
Grad II:	1/3 bis 2/3 der Fläche betroffen.
Grad III:	> 2/3 bis gesamte Fläche betroffen.

Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Rosendahl et al.

Grad 0:	Keine Ossifikation.
Grad I:	Minimale schwache Kalkschatten.
Grad II:	Verstreute Ossifikationsherde; oder kleine Exostosen an Acetabulum oder Trochanter.
Grad III:	Ausgedehnte ("widespread") Kalzifikation mit trabekulärer Struktur.

Im internationalen Schrifttum hat sich in den letzten Jahren jedoch weitestgehend die Klassifizierung nach Brooker (1973) durchgesetzt, der seine Einteilung auf vier Grade erweitert.

Einteilung heterotoper Ossifikationen nach Brooker			
Grad 0:	Keine Ossifikation.		
Grad I:	Knocheninseln innerhalb des periartikulären Weichteilmantels.		
Grad II:	Knöcherne Ausziehungen vom Os ileum und/oder Trochanter major (Knochenleiste), Abstand zu Pfanne oder Schaft > 1 cm.		
Grad III:	Knochenleiste, Abstand zu Pfanne oder Schaft < 1 cm.		
Grad IV:	Vollständige knöcherne Ummauerung; Ankylose.		

Nachteil dieses Einteilungssystems ist jedoch, dass sich keinerlei Rückschlüsse auf funktionelle Beeinträchtigungen ziehen lassen, und auch die Ausdehnung des Knochens nicht berücksichtigt wird, so dass sowohl große als auch kleine Ossifikationszonen als gleichwertig klassifiziert werden müssen.

Um eine exaktere Differenzierung der Knochenausdehnung zu ermöglichen, wird von Parkinson folgende Untergliederung beschrieben:



Abb. 2 Klassifikation heterotoper Ossifikationen nach Parkinson

Sind weniger als 1/3 des die Hüfte umgebenden Weichteilgewebes betroffen, wird die Ossifikation zusätzlich mit A bewertet, zwischen 1/3 und 2/3 mit B und bei mehr als 2/3 mit dem Zusatzgrad C.

Zur Beurteilung der Aussagefähigkeit einer Studie, müssen daher die Unterschiede innerhalb der angewandten Klassifizierungen bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Röntgenologisch lassen sich erste Befunde des Ossifikationsprozesses nach ca. 3 Wochen erheben, obgleich dieser unmittelbar postoperativ/posttraumatisch einsetzt und sein Maximum nach 32 - 48 Stunden erreicht [16; 43; 66; 117].

Im Frühstadium zeigen sich diese als unorganisierte, kalkdichte wolkige Strukturen mit irregulären scholligen Verkalkungsmustern, deren Durchmesser in der Regel 6 cm nicht überschreitet.

Mit zunehmender Ausreifung wird die HO strahlendichter, in sich lobuliert und zeigt eventuell eine zentrale Aufhellungszone.

Mit einer vollständigen Ausreifung der ektopen Osteoneoplasie ist jedoch erst nach üblicherweise 9 – 12 Monaten zu rechnen [16; 19].

Im Rahmen nicht-invasiver Bildgebung lassen sich mittels sonographischer Methoden ebenfalls beginnende Ossifikationsprozesse als gut abgrenzbare Raumforderungen mit hyperdensem Bild und dorsaler Schallauslöschung darstellen.

Die Vorteile der Sonographie liegen in der Möglichkeit der frühen Erfassung der Weichteilraumforderung, da die radiologische Nativ-Diagnostik erst nach einsetzender Mineralisation zu einem positiven Befund führt.

Grundsätzlich können durch szintigraphische Methoden ebenfalls frühe Entwicklungsphasen einer ektopen Ossifikation erfaßt werden. Das Bild ist jedoch für eine heterotope Ossifikation nicht spezifisch und erlaubt daher auch keine eindeutige Abgrenzung zu einem proliferierenden malignen Prozess.

Ergänzend lassen sich in frühen Entwicklungsphasen als wenig invasive Methoden CT und NMR zur Erfassung heterotoper Ossifikationen einsetzen [16; 34; 43].

Um Fehlinterpretationen insbesondere im Bereich der radiologischen Nativ - Diagnostik aufgrund intraoperativ verbliebener Knochenreste oder Exostosen als heterotope Ossifikationen zu vermeiden, ist es erforderlich, alle späteren Röntgenaufnahmen mit unmittelbar postoperativ erstellten Aufnahmen zu vergleichen.

Pathophysiologie heterotoper Ossifikationen

Die induzierenden Mechanismen zur Bildung ektoper Ossifikationen konnten zwar bisher nicht zufriedenstellend eruiert werden, dennoch konnten sich einige Hypothesen zu deren Entstehung manifestieren.

In der formalen Pathogenese wird die heterotope Ossifikation als Resultat einer mesenchymalen Metaplasie aufgefasst, wobei die initialen Stimuli der Osteoneogenese kontrovers diskutiert werden [16; 43; 116; 117; 118].

Grundsätzlich lassen sich bei ektopen Knochenneubildungen sämtliche Zellen der orthotopen Osteogenese nachweisen.

Von wesentlichem Interesse ist es daher, welche Zelltypen mit osteogener Potenz als Vorläuferzelle in Betracht kommen könnten.

Je nach Lokalisation der HO stehen heute unterschiedliche Zellpopulationen zur Diskussion, wobei neuere Forschungsansätze neben periartikulären Fibroblasten auch auf die Rolle von Endothelzellen der Gefäße und Perizyten als Precursorzellen ausgerichtet sind [16; 20; 22; 37].



Abb.3 Histogenese der Osteoblasten in der heterotopen Ossifikation (n. Bosse)

Nach Friedenstein und Owen sind zwei Zell-Linien mit osteogener Potenz für die Entstehung heterotoper Ossifikationen verantwortlich zu machen. Hierbei handelt es sich um determinierte (DOPC = Determined osteoblastic progenitor cells) und induzierbare Osteoprogenitorzellen (IOPC = Inducable osteoblastic progenitor cells) [16; 43; 48; 49; 116]. Seit den Untersuchungen von Friedenstein (1976) ist der extraossäre Fibroblast in Form der determinierten bzw. induzierbaren osteogenen Vorläuferzelle allgemein anerkannt.

Auf Friedensteins Ergebnissen basiert Owens Theorie über die Abstammung osteogener Zellen [48; 49; 100; 101].

Diese setzt sowohl die Existenz einer Bindegewebsstammzelle voraus, die u.a. zu einer Osteoprogenitorzelle differenzieren kann, als auch einer gemeinsamen Stammzelle, aus der

sich Chondro- und Osteoblasten entwickeln, was auch die Arbeiten von Caplan und Pechak (1987) bestätigen.

Als Stammzellen orthotoper Knochenentwicklung sind in erster Linie die determinierten Osteoprogenitorzellen des Knochenmarks zu werten, die sich aus adventitiellen, endothelialen oder endostalen Zellen ableiten.

Für die Entwicklung einer ektopen Ossifikation wird hingegen die induzierbare Osteoprogenitorzelle in Form von Mesenchymzellen diskutiert [48; 49].

DOPC sind nur im Knochenmark anzutreffen und besitzen die Fähigkeit, sich ohne stimulierenden Reiz auch an anderer Lokalisation in Osteoblasten umzuwandeln.

IOPC hingegen benötigen einen Stimulus, um osteogenetische Aktivität entfalten zu können, wobei nahezu jede Art von Trauma mit Gewebsschädigung als adäquater Stimulus gewertet werden kann [16; 19; 20; 48; 49; 100; 101].

Schematich lassen sich die an der Entstehung heterotoper Ossifikationen beteiligten Komponenten wie folgt darstellen:



Abb.4 Schematische Darstellung der an der Entstehung heterotoper Ossifikationen beteiligten Komponenten

Der Ossifikationsprozess beginnt unmittelbar postoperativ / posttraumatisch und erreicht nach 32 – 48 Stunden seinen Höhepunkt [103; 104; 116; 117; 118]. Durch die entstehenden Osteoblasten wird im periartikulären Weichteilgewebe Osteoid produziert, welches sich durch Mineralisation in Knochengewebe umwandelt und weder histologisch noch metabolisch von orthotopem Knochen zu differenzieren ist.

Im Frühstadium zeigt sich zunächst eine unorganisierte, wolkige Knochenstruktur mit deutlicher Zellaktivität, die sich im Endstadium zu lamellären Knochenstrukturen mit hämatopoetischem Knochenmark formiert [16; 31].

Einige Autoren vermuten, dass die intraoperative Versprengung von Knochenmarkspartikeln ("Bone dust") und damit auch von DOPC den Entstehungsprozess der heterotopen Ossifikationen auslöst [106].

Andere Studien hingegen machen die IOPC, die bereits am Ort der potentiellen Ossifikation anwesend sind und sich durch einen adäquaten Stimulus zu knochenbildenden Zellen differenzieren, hierfür verantwortlich.

Experimentelle Studien konnten eine Vielzahl von Regulatoren für das Wachstum und die Differenzierung von IOPC entschlüsseln, unter denen sich auch Substanzen wie Bone-Morphogenetic-Protein (BMP), Interleukin-1, Prostaglandine und weitere Wachstumsfaktoren befinden [16; 17; 18; 20; 21; 26; 52].

Aus der Gruppe der Prostaglandine, die ubiquitär als Transmitter fungieren, scheint insbesondere PGE_1 und PGE_2 eine wichtige Rolle bei der Entstehung heterotoper Ossifikationen zuzukommen [14; 16; 21; 60; 68].

PGE₂ erfüllt eine Aufgabe als Entzündungsmediator und trägt zur Schmerzentstehung und Knochenresorption bei.

Zum Einfluss von PGE₂ auf den Knochenmetabolismus finden sich zahlreiche Studien mit zum Teil kontrovers diskutierten Ergebnissen.

Nagai et al. [16; 94] beschrieben in ihren Studien eine Hemmung der Proliferation von Osteoblasten unter PGE ₂ – Wirkung.

Raisz und Martin [10; 107] registrierten induzierende Effekte von PGE₂ auf die osteoblastäre Differenzierung von Zell-Linien mit osteogener Potenz.

Hakeda et al. [16; 66] beobachteten an Zellkulturmodellen der Zell-Linie MC3T3-E1, dass niedrige PGE_2 – Konzentrationen zu einem Absinken der DNA-Synthese führten und zeitgleich zu einem Aktivitätsanstieg der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PGE₂ die Zellproliferation hemmt, die Expression zellspezifischer Differenzierungsparameter osteoblastärer Zellen stimuliert und die Differenzierung osteogener Zellen zu osteoblastären Linien induziert.

Vorläufersubstanz des PGE₂ ist die Arachidonsäure, die unter der Wirkung der Phospholipase A aus Linolsäure, einem Bestandteil von Körpermembranen, abgespalten wird.

In diesen Prozess greifen Substanzen wie Interleukin 1 ein, das zu einer Aktivierung der Phospholipase A und damit zur Entstehung von Entzündungsmediatoren führt, die an der Ätiologie heterotoper Ossifikationen beteiligt sind.

Arachidonat wird als Substrat der Cyclooxygenase (Prostaglandin-H 2-Synthetase) zu

Prostaglandin H_2 verstoffwechselt, das selbst wiederum durch die Cyclooxygenase zu PGE₂ katalysiert wird.

Dabei existieren zwei Isoformen der Cyclooxygenase:

COX I, die vor allem im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden konnte, und die induzierbare COX II, die während Entzündungsreaktionen von Makrophagen produziert wird [23; 35; 50].

Chrisman postuliert 1981, dass ein mechanisches Trauma oder eine Entzündung zu einer gesteigerten Freisetzung von Arachidonat aus geschädigten Körpermembranen führt, das von der COX als Substrat verstoffwechselt wird und somit einen entzündlichen Prozess durch gesteigerte Prostaglandinsynthese unterhält.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass die Gruppe der Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle in der Regulation der Osteogenese sowohl in der Phase der Replikation und Genexpression als auch der Proteinsynthese ossärer Zellen einnimmt [14; 16; 17; 18; 20; 21; 45; 46; 47; 83].

In erster Linie ist hier die Gruppe der Transforming Growth Factors zu nennen, zu der auch das Bone-Morphogenetic-Protein (BMP) gerechnet wird.

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur BMP, sondern auch Platelet-Derived Growth Factors (PDGF) und Transforming Growth Factor β chemotaktisch auf Fibroblasten wirken und möglicherweise eine Bedeutung in der Aggregation von Osteoprogenitorzellen aufweisen [16; 106].

Eine weitere Rolle dürften auch Wachstumsfaktoren wie Bone Derived Growth Factor (BDGF), Skelettal Growth Factor (SGF) oder Insulin Like Growth Factor (IGF) spielen, deren Wirkung bisher jedoch nicht eindeutig dokumentiert ist [93].

Mahy-Urist gelingt es 1988, mit Interleukin 1 und BMP in vitro heterotope Ossifikationen zu induzieren [16; 39].

Maier beschreibt 1990 eine Interleukin1-abhängige Aktivierung der COX II [66].

Um einen Zusammenhang zur Pathogenese heterotoper Ossifikationen herstellen zu können, erscheint es sinnvoll, die Funktionen obiger Substanzen differenzierter darzustellen.

Sowohl Interleukin 1 als auch PGE₂ tragen zur Knochenresorption bei und geben somit dem Osteoklasten Knochenmatrix und BMP zur Resorption frei.

Zudem erfolgt unter dem Einfluss der Prostaglandine eine Induktion von Osteoklastenprecursorzellen, was zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität und somit zu verstärkter Knochenresorption beiträgt. Die Funktion der Osteoklasten in der heterotopen Ossifikation wird an späterer Stelle detaillierter diskutiert werden.

In der Knochenmatrix abgelagert befindet sich das osteoinduktive Protein BMP, dessen Fähigkeit zur Knocheninduktion bereits 1965 von Urist diskutiert wird.

Man unterscheidet derzeit in diesem Zusammenhang drei Arten von BMP mit unterschiedlichen Molekulargewichten, wobei Typ 2 und 3 zur Gruppe der Transforming Growth Factors Beta (TGF β) zu rechnen ist [16; 66; 116].

Nach Alper erfolgt die Produktion des BMP, die mit steigendem Lebensalter sinkt, in der Niere, von wo aus es auf systemischem Wege in den Knochen gelangt und sich an Mineralsalze gebunden in der Matrix einlagert, wodurch es zu einer Inaktivierung kommt [66; 93]. Die Wirkung des BMP besteht in der Induktion der Mesenchymzellproliferation und Differenzierung, also in einem gesteigerten Wachstum von undifferenzierten Vorläuferzellen. BMP wirkt zudem chemotaktisch auf Osteoblasten und führt zu einer gesteigerten Angioneogenese [16; 21; 66; 93].

Eine Aktivierung des BMP erfolgt erst wieder durch Freisetzung aus der Knochenmatrix durch resorptive Vorgänge wie zum Beispiel unter dem Einfluss von Prostaglandinen oder Interleukin1. Die heterotope Ossifikation ist einerseits geprägt von dystoper proliferativer Knochenneubildung und synchroner Knochenresorption andererseits.

Für den Abbau sind wie auch im orthotopen Knochen osteoklastäre Zellen verantwortlich, deren Histogenese bei der heterotopen Ossifikation noch unvollständig geklärt ist.

Unter dem Einsatz von Antikörpern gegen Monozyten und Makrophagen, die als potentielle Vorläuferzellen der Osteoklasten diskutiert werden, gelingt es der Arbeitsgruppe um Bosse die Manifestation osteoklastärer Differenzierung erst zu einem relativ späten Zeitpunkt der heterotopen Ossifikation zu dokumentieren [16; 17; 18; 20; 21].

Bosse et al. kommen zu der Schlussfolgerung, dass der Osteoklast in der heterotopen Ossifikation lichtmikroskopisch, immunhistochemisch und histochemisch dem charakterisierten Osteoklasten des originären Knochens entspricht und sich histogenetisch von ortsständigen Makrophagen ableitet. Damit entspricht die Abstammung des Osteoklasten dem histogenetischen Konzept im orthotopen Knochen [16; 20; 21; 52].



Abb.5 Spektrum osteologischer Zellen der heterotopen Ossifikation (n. Bosse)

Die Histogenese der Osteoklasten scheint mit dem reifen Entwicklungsstadium der heterotopen Ossifikation zu korrelieren und zeigt Parallelen zum Knochenabbau im orthotopen Knochen. Es bestehen jedoch grundsätzliche Unterschiede bezüglich der übergeordneten Regulation des Knochenabbaus. Diese ist im orthotopen Knochen und bei der Kallusproliferation auf ein Gleichgewicht zwischen Knochenauf und –abbau im Sinne eines "bone remodelings" ausgerichtet. Die heterotope Ossifikation hingegen zeichnet sich in der Regel durch einen überstürzten ungeordneten Knochenabbau aus, der sogar bis zu einer vollständigen Lyse neugebildeter Knochenstrukturen in den Weichgewebsarealen führen kann [16; 20; 21; 52]. Eine mögliche Bedeutung der Gefäße in der Osteoneogenese wird bereits seit 1928 von Keith diskutiert.

Trueta stellt 1963 aufgrund der morphologischen Beziehung zwischen Gefäßendothelien und Osteoblasten die Hypothese auf, dass diese Endothelien als Osteoprogenitorzellen einzustufen sind [16].

Andere Autoren betonen die auffallende perivaskuläre Anordnung der Fibroblasten in der Osteoneogenese [16; 100; 101].

In Untersuchungen an Zellkulturen gelingt es der Arbeitsgruppe um Brighton zu zeigen, dass Perizyten die Fähigkeit besitzen, sich zu Osteoblasten zu transformieren [16; 22].

Zu diesem Schluss kommen auch die Arbeitsgruppen von Diaz-Flores und Sato, die dieser Fragestellung im Tierversuch nachgingen [16; 37].

Bestärkt werden diese Hypothesen durch die Beobachtungen von Brighton an den Frühphasen des Frakturkallus im Tierexperiment, der eine ausgeprägte Gefäßendothelproliferation in den Phasen der Knochenneubildung registrierte, und erstellte hierauf basierend die Theorie, dass Gefäßendothel über eine nicht unwesentliche osteogene Kapazität verfügt [16; 20; 22].



Abb.6 Hypothese zur Differenzierung von Endothelzellen und Perizyten zu Osteoblasten nach Bosse

Wesentliche Ergebnisse hierzu liefert die Arbeitsgruppe um Bosse mit Hilfe immunhistochemischen Untersuchungen zum Expressionsmuster der Proliferationsmarker PCNA (= Proliferating Cell Nuclear Antigen) und MIB 1 (= monoklonaler AK gegen das Ki-67-Antigen, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird und somit als Marker für proliferierende Zellen dient) [16; 21; 26].

Im Bereich der Osteogenesezonen finden diese überwiegend positiv markierte Gefäßendothelien umgeben ebenfalls positiv und Perizyten, von markierten Bindegewebszellen, womit die heterotope Ossifikation seitens der Proliferationskinetik der Gefäße als ein dynamischer Prozess einzuordnen ist.

Anhand morphologischer Gesichtspunkte gelingt es, eine Orientierung von Endothelzellen und Perizyten in Richtung Ossifikationszone nachzuweisen, die phänotypisch durch funktionellen Expressionsverlust und Transformation der gefäßassoziierten Lokalisation fließende Übergänge zum Präosteoblasten und Osteoblasten zeigen.

Mögliche Ursache hierfür könnte eine Änderung des Sauerstoffpartialdruckes spielen, wie Brighton und Hunt auch im Zellkulturmodell hierdurch die osteogene Kapazität von Perizyten durch beginnende Mineralisation nachweisen konnten [16; 22].

Zwar stehen bis heute weitere grundlegende Untersuchungen zur möglichen Funktion des Gefäßendothels und der Perizyten in der heterotopen Ossifikation aus, dennoch kann die vaskuläre Komponente als Teilaspekt im histogenetischen Komplex als gesichert gelten.

Die an der Entstehung heterotoper Ossifikationen nach heutigem Stand beteiligten Komponenten lassen sich wie folgt zusammenfassen (in Anlehnung an J.R. Sawyer et al.) [116]:



Abb. 7 In den Prozess der Entstehung Heterotoper Ossifikationen eingreifende Komponenten.

Klinische und zelluläre Aspekte heterotoper Ossifikationen

Das klinische Bild der HO umfasst ein breites Spektrum sowohl asymptomatischer Verläufe als auch ausgeprägt entzündlicher Veränderungen mit Schwellungen, Schmerzen und Rötungen der betroffenen Weichteilregion bis hin zur Ankylosierung der betroffenen Gelenke.

Die Veränderungen der klinisch-chemischen Parameter insbesondere des Markerenzyms Alkalische Phosphatase zeigen grundsätzlich unspezifische Verlaufsmuster, so dass zur Primärdiagnostik in der Regel konventionelle Röngenaufnahmen zum Einsatz kommen.

Um bereits Frühformen heterotoper Ossifikationen detektieren zu können, treten in neuerer Zeit die Drei-Phasen-Szintigraphie sowie kernspintomographische Methoden in den Vordergrund [16; 34].

Die histomorphologische Analyse ektoper Ossifikationen ergibt grundsätzlich ein reproduzierbares Wachstumsmuster, das durch knotige Knochenproliferation geprägt ist.

Knochenproliferate treten entweder solitär oder auch multipel auf und neigen bei Persistenz der Wachstumsstimuli (z.B. entzündliche Prozesse) in späteren Phasen zur Konfluenz.

In allen Phasen der Osteogenese zeigen sich peripher gelagerte Proliferationszonen, an denen sich histomorphologisch die Transformation von Osteoprogenitorzellen über Präosteoblasten bis hin zum Osteoblasten und Osteozyten nachvollziehen lassen [16; 18; 19].

Ackermann (1958) gelingt es schließlich den Aufbau heterotoper Ossifikationen reproduzierbar zu analysieren und prägt den Begriff der zonalen Gliederung mit *zentrifugaler* Ausreifung [16].

Der typische dreizonale Aufbau zeigt zentral ein fibröses Stroma, in den mittleren Abschnitten neugebildeten Faserknochen mit proliferierenden Osteoblasten und in der Außenzone reife Knochenformationen nach Art von Lamellenknochen.

Bei ursprünglicher Lokalisation zum Beispiel im Bereich der quergestreiften Muskulatur finden sich zudem Residuen von Muskelfasern und in variabler Ausprägung chondrale Ossifikationszonen.

Enzinger und Weiss beschreiben in Analogie zu Ackermann die *zenrtifugal* ausgerichtete Ausreifung der HO, gleichzeitig jedoch verweisen sie auf eine radiologisch nachvollziehbare von peripher nach zentral also **zentripetal** ausgerichtete Zunahme der Kalzifizierung [16].

Bosse et al.(1993) hingegen gelingt es anhand des Expressionsmusters der Proliferationsmarker PCNA und MIB 1 diese Hypothesen zu widerlegen und weist anhand obiger Untersuchungsergebnisse eine Ausreifung heterotoper Ossifikationen von peripher nach zentral, also *zentripetal* nach [16; 18; 21; 26;].

Sowohl in beginnenden als auch in fortgeschrittenen Phasen zeigen sich peripher gelegene Proliferationszonen, an denen sich bereits histomorphologisch-deskriptiv die Transformation von Osteoprogenitorzellen über Präosteoblasten bis zum Osteoblasten und Osteozyten nachvollziehen lässt [18; 21; 52].

Die Ausreifung erfolgt hierbei stets in Richtung der zentralen Knochenabschnitte, in deren Umgebung sich auch verstärkt Osteoklasten finden.

Durch den Einsatz oben genannter Proliferationsmarker gelingt es, ein sehr differenziertes Wachstumsmuster in der heterotopen Ossifikation mit einem Proliferationsmaximum stets in den marginalen Ossifikationsherden zu zeigen. Bereits in der nachgeschalteten Zone der beginnenden Mineralisation besteht eine deutliche Reduktion der Proliferationskinetik, die in den zentralen reifen Knochenzonen weiter abnimmt. In Analogie dazu zeigt die von-Kossa-Darstellung ebenfalls eine von peripher nach zentral verlaufende zunehmende Mineralisation als Ausdruck ipsidirektionaler Ausreifung.

Somit kann das von Ackermann postulierte gesonderte zentrifugale Wachstumsmuster heterotoper Ossifikationen nicht als Sonderform einer Osteoneogenese angesehen werden. Nach Bosse et al. (1993) resultiert diese Darstellung aus folgenden Zusammenhängen:

- 1. der multifokalen Entstehung der heterotopen Ossifikationen in einem geeigneten Milieu mit zeitlich versetztem Auftreten der einzelnen Knochenneubildungsherde und
- 2. durch den sich selbst limitierenden Prozess der Knochenneubildung.

Demzufolge ist es bei der Beurteilung des Gesamtbildes einer ektopen Osteoneoplasie nachvollziehbar, dass der Eindruck einer zonalen Gliederung mit von zentral nach peripher gerichteter Ausreifung entsteht, was jedoch zu einer Fehlinterpretation der Proliferationskinetik der Osteoneogenese und einer Verdrängung des Proliferationsmaximums aus der marginalen Randzone führen würde [16; 18; 20; 21].

Prädisponierende und auslösende Faktoren

Alter und Geschlecht

Der Einfluss des Patientenalters auf die Entstehung heterotoper Ossifikationen wird in diversen Studien sehr kontrovers diskutiert.

De Lee, Nollen, Holz, Riegler, Ritter und Schulze konnten keinen Zusammenhang zwischen Patientenalter und der Ausbildung ektoper Osteoneoplasien erkennen [16; 66; 70].

Untersuchungen von Hartwig und Hierton hingegen zeigten eine positive Korrelation zwischen dem Alter des Patienten beiderlei Geschlechts und dem Auftreten heterotoper Ossifikationen.

Ahrengart kommt in seiner Studie zu dem Ergebnis, dass diese Korrelation nur bei Frauen besteht, Lazansky hingegen fand eine Altersabhängigkeit nur bei Männern [2; 3; 4; 6; 16; 66; 70].

Arcq und Holz beobachteten vor allem in der Altersgruppe der 40- bis 50-jährigen Männer gehäuft das Auftreten heterotoper Ossifikationen.

Im Gegensatz dazu fanden Sodemann und Lazansky bei Frauen über 65 Jahren geringere Ossifikationen, was sich mit dem sinkenden Östrogenspiegel in dieser Altersgruppe erklären lässt [70].

Zahlreiche Studien belegen, dass das Auftreten ektoper Knochenneubildungen vermehrt bei Männern, insbesondere mit kräftigem Muskelmantel und körperlich aktiven Patienten beobachtet werden kann [16; 70].

Zudem konnte eruiert werden, dass männliche Patienten höhere Ossifikationsgrade ausprägen als ihre weiblichen Mitpatienten, was zum einen auf eine genetische Prädisposition und zum anderen auch auf die erhöhte intraoperative Traumatisierung aufgrund der größeren Muskelmasse und der damit verbundenen stärkeren Retraktion des Gewebes zurückgeführt werden kann.

Klinisch relevante Vorerkrankungen

Nolan et al. fand ein gehäuftes Auftreten heterotoper Ossifikationen nach Reoperationen, Umstellungsosteotomien, Prothesenwechsel-Operationen wie auch bei bereits bestehenden Ossifikationen nach kontralateralen Eingriffen.

Auf ein stark erhöhtes Ossifikationsrisiko mit 61,7 % verwies Finerman bei Patienten mit Morbus Bechterew (Spodylarthritis ancylosans) und Morbus Forrestier (diffuse idiopathische Hyperostose) [16; 43; 70].

Prädisponierend für die Entwicklung ektoper Knochenneubildungen sind nach Ayers und Goel die hypertrophen Formen der Coxarthrose mit ausgeprägter Osteophytenbildung sowie nach Ritter und Vaughan eine präoperative schlechte Beweglichkeit des betroffenen Gelenkes [70].

Nach Jowsey ist mit einem Anstieg der Wahrscheinlichkeit einer HO-Entwicklung für Patienten, die aufgrund einer Schenkelhalsfraktur mit einer Prothese versorgt wurden, nur dann zu rechnen, wenn es sich um eine dislozierte Fraktur handelt [70].

Patienten mit rheumatischer Polyarthritis bilden hingegen geringere Ossifikationen aus, was auf die antiinflammatorische Basistherapie zurückzuführen sein dürfte [16; 70].

Prothesentyp und Knochenzement

Die Fragestellung nach der Korrelation zwischen Prothesentyp und einer steigenden/sinkenden Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung heterotoper Ossifikation wird durchaus kontrovers diskutiert.

Ritter fand nach Implantation von Charnley-Prothesen in Verbindung mit einer PE-Pfanne, ebenso wie Hierton bei CAD-Prothesen signifikant mehr ektope Ossifikationen als bei anderen Typen.

Im Widerspruch dazu stehen die Untersuchungen von Hanslik, der deutlich seltener ektope Ossifikationen bei der Verwendung von Charnley-Prothesen beobachtet als bei anderen Prothesentypen [70].

Ebenso kontrovers wird auch über den Einsatz von Knochenzement im Hinblick auf die Entwicklung heterotoper Ossifikationen diskutiert.

Sowohl im Tierexperiment als auch in klinischen Untersuchungen ließ sich zeigen, dass der eingesetzte Knochenzement zwar eine starke Reaktion im Weichteilgewebe hervorruft, jedoch mangels fehlender Induktionspotenz, in keinem Fall Ossifikationen aufgetreten sind [70].

Auch in diesem Bereich lassen sich keine einheitlichen Studienergebnisse präsentieren, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weder durch zementierte noch durch zementfreie Implantation das HO-Risiko signifikant gesenkt werden kann.

Operationstechnik

In zahlreichen Studien wird das Operationstrauma und im Speziellen das Abmeißeln des Trochanter major und das Entfernen von Osteophyten als Risikofaktor gewertet.

Auch Zweiteingriffe sowie diverse Zugangswege wie nach Smith-Peterson und Watson-Jones werden als fördernde Faktoren eingestuft [16; 70].

Visuri et al. finden bei seitlichem Zugangsweg paraartikuläre Ossifikationen in einer Häufigkeit von 1,7 %, während bei einem vorderen Zugang nach Smith-Peterson ein Anstieg der Quote auf 45-90 % zu verzeichnen ist.

Coventry hingegen kommt zu dem Schluss, dass kein Zusammenhang zwischen operationstechnischen Verfahren und dem Auftreten heterotoper Ossifikationen erkennbar ist [31; 66].

Nach Patterson scheint der postoperative Heilungsprozess durchaus Auswirkungen auf die Ausbildung heterotoper Ossifikationen zu haben, da beim Auftreten großer Hämatome beziehungsweise starker Wundsekretion mit nachfolgendem Infekt in 41 % der Fälle schwere paraartikuläre Ossifikationen beobachtet wurden [16; 66].

Resümierend lässt sich festhalten, dass das Zusammenspiel der genannten Faktoren letztendlich bei entsprechend vorliegender Disposition zum Auftreten heterotoper Ossifikationen führen kann.

Als gesichert darf gelten, dass nach ipsi- oder kontralateralen Prothesen - Implantationen aufgetretene heterotope Ossifikationen ein höheres Risiko für die Ausbildung von Ossifikationen bei einem erneuten Eingriff darstellen.

Ebenso gilt dies für Patienten mit Morbus Bechterew, Morbus Forrestier und jene mit massiven osteophytären Anbauten bei hypertropher Coxarthrose [16; 43; 70].

Weiterhin darf als sichere Ursache das Operationstrauma, eine lange Operationsdauer, hoher intraoperativer Blutverlust und eine Bevorzugung des männliches Geschlechts gewertet werden [70].

Ein niedrigeres Risiko scheint jedoch bei rheumatischer Polyarthritis aufgrund der antiinflammatorischen Basistherapie und einer idiopathischen Hüftkopfnekrose aufgrund der gestörten Gefäßversorgung vorzuliegen.

Als sehr umstritten müssen jedoch Faktoren wie Altersabhängigkeit, Prothesentyp, Prothesenverankerung und der Zustand nach vorangegangenen Eingriffen am betreffenden Gelenk angesehen werden und sollten daher Gegenstand weiterer Studien bleiben.

Aktueller Stand der Prophylaxe und Therapie heterotoper Ossifikationen

Als international anerkannter Standard zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen steht heute die Applikation von NSAR sowie eine prä- bzw. postoperative einzeitige oder fraktionierte Radiatio zur Verfügung.

Im Vordergrund der vorliegenden Untersuchung steht die Frage, welchen Einfluss NSAR sowie eine einzeitige Radiatio auf Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und mesenchymalen Vorläuferzellen in vitro ausüben.

NSAR

Die Wirksamkeit von NSAR zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen ist Gegenstand zahlreicher Studien, wobei Indometacin das in diesem Zusammenhang am häufigsten angewandte und erforschte NSAR sein dürfte.

Prophylaktische Eigenschaften werden auch anderen NSAR wie Ibuprofen, Meloxicam, Diclofenac und den Diphosphonaten zugesprochen.

Die Gruppe der Diphosphonate wurde intensiv bezüglich ihrer prophylaktischen Wirkung auf ektope Knochenneubildungen untersucht. Sie verhindern zwar die Anlagerung von Hydroxylapatitkristallen, nicht jedoch die Bildung von Knochengrundsubstanz. Nach Absetzen der Medikation kommt es daher zu einer erneuten Osteogenese. Diphosphonate können offensichtlich den Prozess der Mineralisation hemmen, haben allerdings keinen nennenswerten Einfluss auf das endgültige Ausmaß einer heterotopen Ossifikation [16; 24; 43; 66; 106].

Ansatzweise lässt sich die Wirkung der NSAR auf die Prophylaxe heterotoper Ossifikationen unter Beachtung der Pathogenese erklären, da diese in das lokale Entzündungsgeschehen eingreifen. Angriffspunkt der NSAR stellen die durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren induzierbaren Cyclooxygenasen, insbesondere die Cyclooxygenase II dar, die das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese (PGE₂), bildet [23; 50; 90; 120].

Hierbei handelt es sich um ein membrangebundenes Enzym mit drei Domänen, von denen eine unter anderem auch als Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren fungiert.

Die einzelnen NSAR weisen dabei unterschiedliche Spezifitäten für die beiden Cyclooxygenasetypen auf, wobei die mRNA der COX I insbesondere im Gastrointestinaltrakt anzutreffen ist, und somit keine eindeutige Schlüsselrolle im Bereich der Entzündungsreaktionen spielen dürfte.

	COX II	COX I	Quotient *
Medikament	ED 50	ED 50	COX II / COX I
	(µg/ml)	(µg/ml)	
Indometacin	0,06	0,001	60
Ibuprofen	1,5	1,0	1,5
Acetylsalicylsäure	50	0,3	166
Diclofenac	0,35	0,5	0,7
Naproxen	1,3	2,2	0,6

Abb. 8 Vergleich: Pharmakologie der NSAR nach Mitchell/Meade

ED 50 = *Konzentration einer Substanz, bei der* 50 % *der Wirkung erreicht werden.*

* = Quotient, um wieviel höher/niedriger die Affinität einer Substanz zur COX I ist.

Acetylsalicylsäure zeigt zum Beispiel eine 166 mal höhere Affinität zu COX I als zu COX II, woraus sich auch eine Korrelation zu den häufig beobachteten gastrointestinalen Nebenwirkungen erkennen lässt [66].

Dennoch scheint ASS aufgrund der Wirkung auf den ersten Schritt der Prostaglandinsynthese via COX II (Prostaglandin H_2 - Synthetase) eine prophylaktische Wirkung zu entfalten.

Anstelle des PGH₂ als Endprodukt entsteht unter ASS-Wirkung nach Meade 15-Hydroxyeikosatetranoidsäure (HETE), das nach tierexperimentellen Studien von Lerner die Knochenresorption nicht beeinflusst und somit auch keine HO-Induktion initiiert [66; 81; 82]. Die unter ASS-Gabe entfallende Knochenresorption führt somit auch nicht zur Freisetzung von BMP aus dem Knochen, dem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung heterotoper Ossifikationen zukommt.

Hierin könnte eventuell eine Erklärung liegen, weshalb ASS trotz seiner schlechten Ratio dennoch eine eingeschränkt prophylaktische Wirkung entfaltet.

Die Ergebnisse der HOP I Studie in unserem Hause zeigten jedoch eine signifikant schlechtere Wirksamkeit von ASS im Vergleich zu Indometacin, trotz einer Dosierung im Höchstbereich (3 x 750 mg) [66].

Für Indometacin beträgt der Quotient COX II / COX I 60 : 1, Diclofenac, Meloxicam und Naproxen hingegen besitzen eine weitaus höhere Affinität zu COX II als COX I.

Erste Studien zur prophylaktischen Wirkung von Indometacin werden bereits 1977 von Almasbaak in einer Dosierung von 3 x 25 mg über einen Zeitraum von vier Wochen durchgeführt [66].

In zahlreichen weiteren Studien, die sich lediglich in Anwendungsdauer und Dosierung unterscheiden, wird in der Folgezeit ebenfalls die prophylaktische Wirkung insbesondere von Indometacin nachgewiesen [5; 16; 43; 66; 70; 72; 74; 76; 78; 80; 92; 95; 109; 110; 111; 117; 126; 127].

Schmidt fand in einer Doppel-Blind-Studie bei einer Gruppe von 102 Patienten in nur 13 % der Fälle das Auftreten heterotoper Ossifikationen (alle Grad I nach De Lee) nach Einsatz von 3 x 25 mg Indometacin über einen Zeitraum von sechs Wochen.

In der mit Placebo-behandelten Gruppe zeigten hingegen 73 % der Patienten ektope Ossifikationen, die in 48 % als Grad III (Ankylose) eingestuft wurden [66].

Auch andere Autoren kommen mit ihren Studien zu vergleichbaren Ergebnissen und sprechen somit den NSAR eine prophylaktische Wirkung gegenüber heterotopen Ossifikationen zu.

Trotz diverser Studien konnte der Wirkmechanismus von Indometacin bei der Beeinflussung von ektopen Ossifikationen nicht eindeutig geklärt werden.

Als gesichert darf jedoch gelten, dass diese Substanz wie auch die übrigen NSAR die COX II hemmt, die für die Produktion des PGE_2 benötigt wird [23; 50].

Diese Form der Prostaglandine wird in der Frühphase einer Frakturheilung und nach Traumen lokal aus der Muskulatur freigesetzt und löst primär durch Vasodilatation eine Entzündungsreaktion und somit eine Migration und Proliferation von Mesenchymzellen aus.

In diversen tierexperimentellen Studien ließ sich zudem eine direkte knocheninduktive Wirkung der Prostaglandine nachweisen, wodurch es nachfolgend zu Osteoblastendifferenzierung und Kallusneubildung kommt [16; 39; 66; 124].

Diese Befunde erklären somit auch die Beeinträchtigung der Knochenreparation und die von Ro und Sudmann im Tierversuch, sowie von Sudmann am Patienten beobachtete Verzögerung der Knochenbruchheilung nach Gabe von Prostaglandinsyntheseinhibitoren [16; 111;112; 124]. Allen fand bei Ratten eine positive Korrelation zwischen der Zahl von nicht ausgeheilten Frakturen und einer steigenden Indometacin-Dosis, obgleich dieser Effekt nur vorübergehend zu sein scheint, da alle Versuchstiere in einer Studie von Elves eine normales Ausheilen der Frakturen zeigten [8; 124].

Ein verzögertes Einwachsen von zementfreien Prothesen beim Menschen konnte bisher jedoch keine Studie belegen. Ebenso scheint auch kein erhöhtes Risiko von aseptischen Lockerungen oder Revisionen im Vergleich zu unbehandelten Patienten zu bestehen [43; 72; 73; 74; 78; 76; 77; 78; 117].

Der Nachteil einer Indometacin-Prophylaxe bezieht sich somit in erster Linie auf die GIT-Nebenwirkungen, die sich über die COX I - Wirkung erklären lassen, wodurch die Substanz eine erhebliche ulzerogene Potenz besitzt.

Durch den Einsatz von Antacida oder H_2 - Blockern, sowie die Applikation von Prostaglandinanaloga wie Misoprostol, lassen sich die beschriebenen gastrointestinalen Nebenwirkungen jedoch erheblich reduzieren [42].

Neuere Arbeiten zur Wirkung von NSAR wie Ibuprofen, Diclofenac und Naproxen zeigen recht kontroverse Untersuchungsergebnisse [66].

So weist Diclofenac den günstigsten COX II / COX I – Quotienten mit größerer Affinität zur COX II als COX I und dabei nach Indometacin die niedrigste ED 50 auf und müsste somit gut zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen geeignet sein.

Arbeiten von Waldenström und Reis finden in einem Therapie-Zeitraum von sechs Wochen mit Diclofenac 15 % bzw. 0 % Heterotope Ossifikationen, Reis dabei ohne klinisch signifikante Ossifikationen. Insofern konnten beide Studien dieselbe Wirksamkeit wie unter Indometacinprophylaxe nachweisen [66].

Studien zur Wirksamkeit von Ibuprofen liefern jedoch deutlich höhere Ossifikationswerte als für Indometacin oder Diclofenac. So berichten Autoren wie Sodemann über Werte von 17 %, Elmstedt 33,3 % und Ahrengart sogar 66,6 % heterotope Ossifikationen bei einer mit Ibuprofen durchgeführten Prophylaxe [2; 3; 4; 5; 66].

Grund hierfür könnte einerseits die wesentlich höhere ED 50 sein, andererseits ist die Ibuprofenwirkung an geschädigten Zellwänden um ca. das zehnfache verringert.

Wenn man also bei der Pathogenese heterotoper Ossifikationen eine Schädigung von Muskelzellen durch die intraoperativ ausgeübte mechanische Manipulation diskutiert, könnte auch hierin eine Erklärung für die geringere Ibuprofenwirkung liegen [66].

Interessant wäre in diesem Zusammenhang die in vitro-Testung der neuen Generation hochselektiver COX II-Inhibitoren, die uns vom Hersteller jedoch aus Wettbewerbsgründen für unsere Versuchsreihen nicht zur Verfügung gestellt werden konnten.

Als relativ spezifischen COX II-Inhibitor nehmen wir daher Meloxicam in unsere Studie auf.

Radiatio

Der Wirkmechanismus einer entweder präoperativ einzeitigen oder direkt postoperativ einzeitigen oder fraktionierten Radiatio beruht auf einer direkten DNA-Schädigung mitotisch stark aktiver Osteoprogenitorzellen, wodurch eine reguläre Transkription verhindert und somit auch die zelluläre Grundlage der heterotopen Ossifikation wirkungsvoll ausgeschaltet wird [16; 43; 117].

Die in vitro-Wirkung von gamma-Strahlung bei induziertem Knochenwachstum wird von Craven und Urist wie folgt beschrieben:

Die Knocheninduktion lässt sich in eine migratorisch-proliferative Phase der Mesenchymzellen innerhalb der ersten Woche und die anschließende Differenzierungsphase in der zweiten Woche gliedern.

Sinnvoll erscheint daher nur eine Bestrahlung innerhalb der ersten vier postoperativen Tage, um ein eventuelles Knochenwachstum suffizient supprimieren zu können, was auch in vivo von den meisten Autoren empfohlen wird [31; 117].

Die Wirkung der Strahlentherapie ist nach Craven und Urist in erster Linie auf eine Hemmung der Migration von Mesenchymzellen zurückzuführen. Nicht beeinflusst wird jedoch die Zytodifferenzierung, also die Ausbildung von Zellorganellen sowie die Osteoidproduktion [16].

Als erster berichtete Coventry 1981 [31] über eine Anwendung postoperativer Bestrahlung am Patienten und applizierte hierfür wie später auch Parkinson, Mc Lennen, Van der Werf und Brunner eine Gesamtdosis von 20 Gy, in 10 Fraktionen zu je 2 Gy.

Andere Autoren zeigten in der Folgezeit, dass eine Verringerung der Gesamtdosis auf 10 Gy (5 x 2 Gy) ebenso effektiv Ossifikationen verhindert.

Neuere Studien zeigen, dass eine single-dose Bestrahlung mit 7 Gy ebenso wirksam ist. In den Studien von Hedley, Konsky, Lo und Warren entwickelte keiner der Patienten klinisch signifikante Ossifikationen.

Lo geht davon aus, dass, bedingt durch den Verlust an biologischer Wirksamkeit durch die Fraktionierung, eine single-dose Bestrahlung mit 6 Gy biologisch einer fraktionierten 10 Gyund eine 8 Gy-Dosis einer fraktionierten 20 Gy-Therapie gleichwertig ist.

Die Quote signifikanter heterotoper Ossifikationen (Grad III-IV nach Brooker) schwanken je nach Studie sowohl für die fraktionierte als auch die single-dose-Therapie zwischen 0 und 30% [66].

Negative Auswirkungen der Radiatio auf das knöcherne Implantatlager sind bisher in vivo nicht beschrieben. Tierexperimentelle Untersuchungen weisen auf eine passagere Suppression des Einwachsverhaltens hin.

Die häufigste lokale Komplikation in diesem Zusammenhang stellt das Auftreten von Trochanterpseudarthrosen durch eine ausbleibende knöcherne Bruchheilung sowie eine Trochanterdislokation nach einer durchgeführten Trochanterosteotomie dar.

Coventry und Parkinson beschreiben nach einer fraktionierten 20 Gy -Therapie eine Pseudarthrosenquote von 11,5 % bzw. 43 %, während Ayers nach einer 10 Gy-Therapie 25 % und Pellegrini nach einer 8 Gy single-Dose Bestrahlung 40 % Pseudarthrosen fanden [31; 103; 104].

Als Gegenmaßnahme bietet sich eine Abschirmung der Implantatlager an, wobei jedoch zu beachten ist, dass bei der Ausgrenzung des Prothesenschaftes die Lokalisationsregion möglicher heterotoper Ossifikationen nur unzureichend bestrahlt wird und somit Therapieversager provoziert werden.

Strahlenschäden sind wegen der geringen Strahlendosen nicht zu erwarten, da aufgrund des oft fortgeschrittenen Alters des betroffen Patientenklientels kein genetisches Risiko mehr besteht und das somatische Risiko wegen der niedrigen applizierten Strahlendosis vernachlässigt werden kann.

Hinweise auf eventuell chronische Schäden oder ein strahleninduziertes Malignom sind in der Literatur nicht zu finden, so dass die oben beschriebene Radiatio als effektive und schonende Methode zur Prophylaxe paraartikulärer Ossifikationsprozesse eingesetzt werden kann [43; 66; 117].

Operative Intervention

Obgleich sporadisch von spontanen Rückbildungen klinisch relevanter heterotoper Ossifikationen berichtet wird, gilt die operative Intervention bisher als einzig effektive Therapiemöglichkeit.

Indikationen stellen starke Funktionseinschränkungen, Schmerzen, progrediente Tertiärschäden wie Kompressionen nervalen sowie vaskulärer Leitungsbahnen dar.

Ein operatives Eingreifen empfiehlt sich in der Regel nicht vor Ausreifung der heterotopen Ossifikation, die sich mittels 3-Phasen-Szintigraphie am verlässlichsten beurteilen lässt, also im Mittel nicht vor dem 9. - 12. postoperativen Monat.

Als ergänzende Parameter können, jedoch allenfalls unterstützend, normalisierte Serumwerte der alkalischen Phosphatase herangezogen werden, denen per se allein lediglich eine geringe Aussagekraft zukommt.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Vorgehensweisen wurden auch Ossifikationsentfernungen trotz einer deutlich vermehrten Speicherung in der Szintigraphie, also vor der vollständigen Ausreifung der Ossifikationsherde – zum Teil unter entsprechender Prophylaxe- mit guten, rezidivfreien Resultaten durchgeführt [57].

Nicht zuletzt aufgrund solcher Erkenntnisse sollte insbesondere bei drohenden Tertiärschäden diese Vorgehensweise angestrebt werden. Zudem kann die Ausbildung sekundärer Bindegewebskontrakturen und Atrophien durch frühzeitige adäquate Gelenksbeweglichkeit effizienter unterbunden werden. Als entscheidender Faktor auch zur Rezidivprophylaxe spielt die wesentlich einfachere und somit geringer gewebstraumatisierende Resezierbarkeit des unreifen Knochens eine große Rolle [57].

Risiken der operativen Intervention ergeben sich vor allem abhängig von der Lokalisation der ektopen Neubildung.

Während die lateral, oberhalb des Trochanter major typischerweise auftretenden Ossifikationen operativ gut zugänglich sind, können bei der Präparation von medialseitig gelegenen Ossifikationen eventuell Probleme aufgrund der entsprechenden anatomischen Strukturen auftreten.

Besonderes Augenmerk sollte jedoch in allen Fällen auf die vollständige Resektion der HO und eine anschließende konsequente Ossifikationsprophylaxe gerichtet werden, um das Risiko einer späteren Reankylosierung zu reduzieren.

Material und Methodik

Material: Puffer und Medien

PBS-Puffer

8,0 g	NaCl	Fa. Merck
0,2 g	KH ₂ PO ₄	Fa. Merck
2,8 g	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	Fa. Riedel de Häen
0,2 g	KCl	Fa. Merck

Die oben genannten Substanzen wurden ad 1000 ml Reinstwasser gelöst.

Der Einsatz des PBS-Puffers erfolgte zum Entfernen von Mediumresten sowohl aus Zellkultur-Flaschen und Kulturplatten als auch zum Waschen der Platten bei Zellzählung, Proteinbestimmung und im Bereich der cytochemischen Methodik.

TEP (Trypsin – EDTA – PBS)

90 ml	PBS
-------	-----

10 ml Trypsin

125 μl 0,5 M EDTA (Tetranatrium-Ethylendiamin-Tetraacetat-Hydrat; Fa. Gibco, pH 8,0)

Alle Substanzen wurden unter sterilen Bedingungen verarbeitet und ad 100 ml suspendiert.

Die Trypsin-EDTA-PBS-Lösung wurde zum Ablösen der Zell-Layer bei Kultivierung, Aussaat und Zellzählung eingesetzt.

HEPES

23,8 g1 Mol Stammlösung (MG 238,31; Fa. Roth) in 100 ml Reinstwasser lösen.4 g / 10 ml10 N NaOH zur pH-Einstellung auf pH 7,2.

Die fertige Lösung wurde steril filtriert, in sterile Röhrchen alliquotiert und bei – 20° C aufbewahrt.

5,0 ml dieser Lösung wurden je 500 ml Medium zugesetzt (= 10 mM).

Ascorbinsäure

125 mg Stammlösung (5 mg/ml; Fa. Merck) in 25 ml Reinstwasser lösen.

Die Lösung wurde steril filtriert, in 1,0 ml Eppendorfcups alliquotiert bei – 20° C aufbewahrt, und dem Medium in der Verdünnung 1 : 100 zugesetzt.

β-Glycerophosphat

5,4 g 1 M Stammlösung (MG: 216,0; Fa. Sigma) in 25 ml Reinstwasser lösen.

Die Lösung wurde steril filtriert, in 1,0 ml Eppendorfcups alliquotiert bei – 20°C aufbewahrt, und dem Medium in der Verdünnung 1 : 100 zugesetzt.

Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat wurden dem DMEM- und BGJ $_b$ -Medium zur Stimulierung der Differenzierung beider Zell-Linien zugesetzt.

DME-Medium: Proliferationsmedium für Osteoblasten (hFOB 1.19)

435 ml	Reinstwasser	
6,7 g	DMEM – Pulver	(Fa. Life Technologies)
	(Dulbecco's Modified Eagles	
	Medium:	
	w 4500 mg/l Glucose; w/o Na-	
	Pyruvat; w/o NaHCO ₃)	
1,9 g	NaHCO ₃	(Fa. Merck)
150 mg	Geneticin G – 418 Sulphate	(Fa. Life Technologies)
5,0 ml	L-Glutamin 200 mM	(Fa. Life Technologies)
5,0 ml	Penicillin - Streptomycin	(Fa. Life Technologies)
	10 000 IU/ml - 10 000 IU/ml	
5,0 ml	1 M Hepes	(Fa. Sigma)
1,5 ml	1 M HCl	
	pH 7,2 einstellen.	

Medium steril filtrieren.

50,0 ml	FCS zugeben.	(Fa. Life Technologies)
	(Inaktiviert durch 30 minütige	
	Inkubation bei 56 °C)	

Kurz vor Gebrauch: Zugabe von Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat je 1:100 zum Grundmedium.

DMEM:	Dulbecco's Modified Eagles Medium	
	w 4500 mg/l Glucose; w/o Na-Pyruvat; w/o NaHCO $_3$.	

FCS: Foetal Bovine Serum, origin South Amerika, Mycoplasma screened, performance tested, virus screened.

Die Versorgung der hFOB 1.19 –Zell-Linie erfolgte bis zur Konfluenz der Zellen (erster Mediumwechsel: Tag 4) mit DMEM–Proliferationsmedium für Osteoblasten. Ab Tag 4 wurde der Mediumwechsel ebenfalls im 4-Tages-Rhythmus, jedoch mit BGJ _b – Differenzierungsmedium durchgeführt.

DME-Medium: Proliferationsmedium für C3 H10 T 1/2

435 ml	Reinstwasser		
6,7 g	DMEM – Pulver	(Fa. Life Technologies)	
	(Dulbecco's Modifies Eagles Medium		
	w 4500 mg/l Glucose; w/o Na-		
	Pyruvat; w/o NaHCO ₃)		
1,9 g	NaHCO ₃	(Fa. Merck)	
1,0 ml	Puromycin	(Fa. Serva)	
5,0 ml	L-Glutamin 200 mM	(Fa. Life Technologies)	
5,0 ml	Penicillin - Streptomycin	(Fa. Life Technologies)	
	10 000 IU/ml - 10 000 IU/ml		
5,0 ml	1 M Hepes	(Fa. Sigma)	
1,5 ml	1 M HCl		
	pH 7,2 einstellen.		

Herstellung der Puromycin-Stammlösung:

2,5 mg/ml Reinstwasser

2,5 mg Puromycin wurden in 1 ml Reinstwasser gelöst, steril filtriert und, in 1ml Eppendorfcups alliquotiert, bei -20 °C aufbewahrt.

BGJ b -Medium: Differenzierungsmedium für Osteoblasten (hFOB 1.19)

750 ml	Reinstwasser	
21,3 g	BGJ _b –Pulver	(Fitton-Jackson Modification;
		Fa. Sigma)
3,5 g	NaHCO ₃	(Fa. Merck)
300 mg	Geneticin G – 418 Sulphate	(Fa. Life Technologies)
10 ml	Penicillin - Streptomycin	(Fa. Life Technologies)
	10 000 IU/ml – 10 000 IU/ml	
10 ml	L-Glutamin 200 mM	(Fa. Life Technologies)
10 ml	1 M Hepes	(Fa. Sigma)
3 ml	1 M HCl zur pH-Einstellung (pH 7,2)	

Medium steril filtrieren.

100 ml	FCS	(Fa. Life Technologies)
	(Inaktivierung durch 30 min. Inkubation bei	
	56 °C)	

Kurz vor Gebrauch: Zugabe von Ascorbinsäure und β-Glycerophosphat je 1:100 zum Grundmedium.

BGJ_b –Medium wurde ab dem Zeitpunkt der Konfluenz (erster Mediumwechsel: Tag 4) zur Unterstützung der Differenzierung der hFOB-Zell-Linie eingesetzt.

Zell-Linien

Humane fetale Osteoblasten-Zell-Linie: hFOB 1.19

Die Osteoblasten–Zellinie hFOB 1.19 (U.S. Patent-Nr. # 08,089,848) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Thomas Spelsberg, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich um einen Klon humaner, fetaler Osteoblasten, der durch eine temperatursensitive Mutante des SV-40 large T Antigens (tsA58) immortalisiert wurde.

Abstrahierend dargestellt, wurden humane fetale Primärkulturen mit oben genannter temperatursensitiver Mutante des SV-40 large T Antigens (tsA58) zusammen mit einem für eine Neomycin (G 418)-Resistenz codierenden Gen transfiziert.

Die einzelnen Neomycin-resistenten Kolonien wurden auf ihre positive Alkalische Phosphatase-Färbung untersucht und anschließend der Klon mit höchster AP-Aktivität, hFOB 1.19, bezüglich weiterer osteblastenspezifischer Marker charakterisiert.

Inkubation der hFOB 1.19 Zell-Linie bei der permissiven Temperatur von 33,5 °C führte zu rascher Zellteilung, wohingegen sich diese bei der restriktiven Temperatur von 39,5 °C gering hielt beziehungsweise vollständig ausblieb.

Durch Zugabe von Vitamin D_3 konnte dosisabhängig die Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie die Osteocalcin-Sekretion sowohl bei permissiver als auch restriktiver Temperatur gesteigert werden.

Die Behandlung des Klons mit 1-34 PTH führte zu einem Anstieg des cAMP-Levels.

Die Zell-Linie hFOB 1.19 zeigte postkonfluent eine programmierte Differenzierung bis hin zur Bildung mineralisierter Nodules, deren Nachweis durch die Färbung nach von Kossa erfolgte.

Dieser Zell-Klon zeigte in präkonfluenter Phase schnelle Proliferation der noch gering differenzierten Zellen, gefolgt von postkonfluenter Expression osteoblastenspezifischer Marker bis hin zur Mineralisierung extrazellulärer Matrix.

Immunhistologisch konnte bei postkonfluenten, differenzierten Zellen die Produktion von Osteopontin, Osteonektin, Bone Sialoprotein und Kollagen I nachgewiesen werden [56].

C3 H10 T1/2 - BMP-2

Die Zell-Linie wurde uns freundlicherweise von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Abt. Genetik, Braunschweig zur Verfügung gestellt.

Es handelt sich hierbei um eine mesenchymale Vorläuferzelle, die aus Mausembryonen isoliert und mit einem eukaryonten Vektor (myeloproliferative sarcoma virus long terminal repent (MPSV-LTR) = pMBC-2T-f1), welcher die cDNAs für die human bone morphogenic proteins BMP-2 und BMP-4 trägt, transfiziert wurde.

Es erfolgte mittels pBSpAC∆p eine Cotransfizierung mit einer Resistenz gegen Puromycin.

Puromycinresistente Stämme wurden subkultiviert und postkonfluent durch Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat zu osteoblastärer Differenzierung induziert.

Ursprünglich ist diese Zell-Linie, abhängig von der Zugabe von Wachstumsfaktoren in der Lage, zu Myocyten, Adipocyten oder Chondrocyten zu differenzieren.

Durch permanente Transfizierung der Gene für BMP-2 und BMP-4 war es möglich, die Differenzierung zu Osteoblasten, Adipocyten und Chondrocyten zu stimulieren und den ursprünglichen fibroblastären Charakter der Zelle zu eliminieren.

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung bis hin zur Mineralisierung wurden histochemische Parameter und genetische Analysen typischer osteoblastenspezifischer Markergene herangezogen.

Es erfolgte hierzu die Analyse des Parathyreoidhormonrezeptors sowie die Bestimmung von Alkalischer Phosphatase, Osteopontin, Osteonectin und Osteocalcin.

Für BMP-2 transfizierte Zellen konnte ein Anstieg des Parathyreoidhormons am zweiten postkonfluenten Tag mittels Parathyreoidhormonrezeptor-cross-linking sowie Northern-ELISA der Parathyreoidhormonrezeptor-mRNA registriert werden.

Bezüglich der Parathyreoidhormonrezeptor–mRNA zeigte sich bei BMP-4 transfizierten Zellen eine Regulierung erst zu späteren Zeitpunkten des Differenzierungszyklus.

Die mRNA-Expression für Kollagen Typ I betreffend, wurde für BMP-2/BMP-4 transfizierte Zellen eine zeitlich gegensätzliche Kinetik der Kollagen-Sekretion beobachtet.

Während BMP-2 transfizierte Zellen postkonfluent bis zum siebten Tag einen kontinuierlichen Anstieg der Kollagen-Sekretion zeigten, wurde diese bei BMP-4 transfizierten Zellen postkonfluent hochreguliert und fiel bis Tag sieben kontinuierlich ab.

Als weiterer Parameter wurde das Phosphosäureprotein Osteonectin analysiert, welches, außer in Knochenmatrix in hoher und in Knorpelgeweben in geringerer Konzentration, in anderen Gewebetypen nicht nachgewiesen werden konnte.

Die mRNA für die Synthese von Osteonectin wurde bereits von Beginn und bis zum Ende des Kultivierungszyklus hoch exprimiert, wobei zwischen BMP-2 und BMP-4 transfizierten Zellen kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden konnte.

Der Nachweis der mRNA-Expression erfolgte auch hier mittels Northern-ELISA.

Erst zu späteren Zeitpunkten des Entwicklungszyklus erfolgte die Sekretion des Phosphoglykoproteins Osteopontin und des Osteocalcins, wobei BMP-4 transfizierte Zellen einen niedrigeren Level als BMP-2 transfizierte Zellen erreichten.

Osteocalcin, das ausschließlich von Osteoblasten gebildet wird, konnte bei der Kultivierung von BMP-2 transfizierten Zellen in späten Differenzierungsphasen nachgewiesen werden, bei BMP-4 transfizierten Zellen jedoch kaum.

Fünf Tage nach Konfluenz konnte bei BMP-2 transfizierten Zellen ein Peak in der Aktivitätskurve der Alkalischen Phosphatase registriert werden, der bei BMP-4 transfizierten Zellen signifikant geringer ausfiel.

Zum Nachweis der Mineralisierung der extrazellulären Matrix diente die Färbung nach von Kossa, deren Auswertung eine stärkere Mineralisierung für BMP-2 transfizierte als für BMP-4 transfizierte Zellen zeigte.

Bei der Phänotypisierung der Zellen fand sich für BMP-4 transfizierte Zellen neben der ursprünglichen fibroblastären Struktur ab dem siebten Tag der Entwicklung eine Differenzierung zu Adipocyten, bei BMP-2 transfizierten Zellen gelegentlich auch eine Differenzierung zu Chondrocyten, welche mittels Alcianblau-Färbung nachgewiesen werden konnte [7; 10].
NSAR-Substanzen

Dose-Response-Versuch

Um die Toxizität der später im Rahmen der Plasma-Dosis-Versuche eingesetzten Medikamente in unterschiedlichen Dosierungen und deren Suspensionslösungen auf den Proliferations- und Differenzierungsverlauf der Zelle zu ermitteln, wurden im Vorfeld zunächst Dose-Response-Studien durchgeführt.

Als antiphlogistische Substanzen wurden Indometacin, Diclofenac und Meloxicam in diese Studie aufgenommen.

Indometacin

Der Ansatz von Stammlösung und Verdünnungsreihen orientierte sich an folgendem Schema: Indometacin-MG: 357,8 g/mol Verdünnungsreihe:

Stammlösung: 20 mM
 \rightarrow 10 ⁻⁴ M pro 5 µl in 1000 µl
Medium7,156 mg/ml
 \rightarrow 71,56 mg Indometacin in 10 ml Ethanol (reinst) lösen.1. Verdünnung: 10 ⁻⁵ M1 ml Stammlösung + 9 ml Ethanol2. Verdünnung: 10 ⁻⁶ M1 ml aus Verd. 1., + 9ml Ethanol3. Verdünnung: 10 ⁻⁷ M1 ml aus Verd. 2., + 9 ml Ethanol4. Verdünnung: 10 ⁻⁸ M1ml aus Verd. 3., + 9 ml EthanolKontrolle:

Meloxicam

Der Ansatz von Stammlösung und Verdünnungsreihen orientierte sich an folgendem Schema:

Meloxicam-MG: 351,40 g/mol Verdünnungsreihe:

Stammlösung: 20 mM	7,028 mg/ml
→ 10 ⁻⁴ M pro 5 µl in 1000 µl	→ 70,28 mg Substanz einwiegen;
Medium	→ 200 µl 2M NaOH zugeben;
	→ 2000 µl PBS zugeben;
	➔ Vortexen und zur vollständigen Lyse auf 40 °C
	erhitzen;
	→ 7800 µl PBS zugeben;
1.Verdünnung: 10 ⁻⁵ M	1 ml Stammlösung + 9 ml PBS
2.Verdünnung: 10^{-6} M	1 ml Verd. 1., + 9 ml PBS
3.Verdünnung: 10^{-7} M	1 ml Verd. 2., + 9 ml PBS
Kontrolle:	PBS

Diclofenac

Der Ansatz von Stammlösung und Verdünnungsreihen orientierte sich an folgendem Schema:

Diclofenac-MG: 318,1 g/mol Verdünnungsreihe:

Stammlösung: 20 mM → 10 ⁻⁴ M pro 5 µl in 1000 µl	6,362 mg/ml → 63,62 mg in 10 ml PBS lösen.
Medium	
1.Verdünnung: 10 ⁻⁵ M	1 ml Stammlösung + 9 ml PBS
2. Verdünnung: 10^{-6} M	1 ml Verdünnung 1., + 9 ml PBS
3. Verdünnung: 10^{-7} M	1 ml Verdünnung 2., + 9 ml PBS
4. Verdünnung: 10 ⁻⁸ M	1 ml Verdünnung 3., + 9 ml PBS
Kontrolle:	PBS

Die angegebenen Molaritäten bezogen sich auf Endmolaritäten im Medium nach Zugabe von 5 µl Medikamentenlösung pro 1000 µl Medium, entsprechend einer Verdünnung von 1:200.

Plasma-Dosis-Versuch

Entsprechend der Patienten-Plasmadosis von ca. 3*10⁻⁶ M erfolgte der Einsatz der NSAR im Rahmen der Hauptversuchsreihen in äquivalenter Konzentration.

Die nachfolgenden Angaben beziehen sich jeweils auf die Endmolarität in 1000 μ l Medium bei Zugabe von 5 μ l Substanzlösung (3*10⁻⁶ M) pro 1000 μ l Medium.

Die Versuchsreihen wurden mit Indometacin, Diclofenac und Meloxicam durchgeführt.

Ansatz-Schema:

Herstellung der Stammlösungen sowie der 10⁻⁵ M - Verdünnung erfolgt lt. Anleitung.

3*10 ⁻⁶ M - Verdünnung:	$3 \text{ ml } 10^{-5} \text{ M} - \text{Verdünnung} + 7 \text{ ml Solvens}$ $\Rightarrow 3*10^{-6} \text{ M}$
	Solvens: je Substanz lt. Anleitung

Methoden

Zellkultivierung

Ein Kryoröhrchen mit tiefgekühlten Zellen (flüssiger Stickstoff) wurde zunächst aufgetaut und 10 ml DME-Medium in ein 10 ml-Röhrchen vorgelegt.

1 ml dieses Mediums wurde in das Kryoröhrchen pipettieren, mit dem Zell-Layer suspendiert und die homogene Zellsuspension in das vorbereitete 10 ml-Röhrchen mit DME-Medium pipettiert.

Anschließend wurde das Röhrchen bei Raumtemperatur und 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Mediumüberstand gegen die Richtung des Pellets abpipettiert.

Dieser Schritt diente dazu, das Dimethylsulfoxid-FCS-Gemisch, das beim Einfrieren der Zellen zugegeben wurde, zu eluieren.

Nach diesem Waschvorgang wurden 5 ml DME-Medium aufpipettiert und die Zellen in kleinen Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 34 °C (hFOB 1.19) bzw. 37 °C (C3H10T1/2-BMP 2) und 5 %-iger CO $_2$ –Atmosphäre kultiviert.

Nach Konfluenz der Zellen erfolgte nach ca. 6 Stunden der erste Mediumwechsel.

Sobald die Zellkulturflaschen gut bewachsen waren, wurden die Zellen gewaschen, trypsiniert und in weitere Zellkulturflaschen subkultiviert.

Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die gewünschte Passage beziehungsweise die benötigte Zellmenge erreicht war.

Plattenbeimpfung

Die Zellkultivierung sowohl der Dose-Response-Versuche als auch der Plasma-Dosis-Versuche wurde jeweils in 24-well-Zellkulturplatten durchgeführt.

Der Versuchsansatz erfolgte mit je 5 Platten pro Messtag, bei einer geplanten Dauer der Versuchsreihen von je 36 Tagen, entsprechend 9 Messtagen.

Die Plattenbelegung wurde wie folgt durchgeführt:

Material:

je nach Belegung: 5 Zellkulturplatten (24-well- Platten) pro Messtag

- → 50 Platten incl. 5 Reserve-Platten
- → 10 große konfluente Zellkulturflaschen

Platte 1: Zellzahl

- Platte 2: Alkalische Phosphatase
- Platte 3: Bradford/Calciumbestimmung (Atomemissionsspektrometrie)
- Platte 4: Färbung nach von Kossa
- Platte 5: Sudan III Färbung/Alcianblau 8 G-Färbung

Dose – Response - Versuch

$10^{-4} M$	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	$10^{-7} M$	$10^{-8} M$	Kontrolle
	1	r	r		

Plasma – Dosis - Versuch

Kontrolle	Diclofenac	Meloxicam	Indometacin	

Die Kulturplatten wurden zur dauerhaften Adhärenz der Zellen zunächst mit je 1 ml 1 % Gelatinelösung beschichtet und für eine Stunde bei 34°C (hFOB1.19) beziehungsweise 37°C (C3 H10 T1/2-BMP-2) inkubiert.

Nach Absaugen der Gelatinelösung wurden die Platten mit je 500 µl PBS pro well gewaschen, um überschüssige Gelatinereste zu eluieren.

Anschließend wurde die benötigte Menge Zellsuspension erstellt.

Hierzu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und Mediumreste zweimal mit je 10 ml PBS eluiert.

Zum Ablösen der Zellen erfolgte die Zugabe von je 3 ml TEP pro Zellkulturflasche, dessen Reaktion nach vollständigem Trypsinieren der Zellen mit je 3 ml DME-Medium abgestoppt wurde.

Um eine homogene Zellsuspension zu erstellen, wurde der Inhalt aller Zellkulturflaschen in eine Flasche pipettiert und anschließend die benötigte Verdünnung erstellt.

Die Beimpfung der 24-well-Zellkulturplatten erfolgte mit je 1000 µl Zellsuspension (50000 Zellen/ml) pro well.

Die Zellkultivierung wurde in den vorliegenden Versuchsreihen bei der permissiven Temperatur von 34 °C (hFOB 1.19) bzw. 37 °C (C3H10T1/2-BMP 2) und 5 %-iger CO $_2$ – Atmosphäre durchgeführt.

Als Proliferationsmedium diente präkonfluent DME –Medium, welches mit 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung und 300 mg/1000 ml Geneticin G-418 Sulphat (Fa. Gibco, Eggenheim) supplementiert wurde. Postkonfluent erfolgte für die humane fetale Osteoblasten-Zelle (hFOB 1.19) der Mediumwechsel viertägig mit dem Differenzierungsmedium BGJ_b, welches mit je 1 % Ascorbat und β -Glycerophosphat versetzt wurde.

Für die Zell-Linie C3H10T1/2-BMP 2 entfiel der Wechsel auf BGJ_b-Medium.

Ersetzt wurde jeweils 100 % des Originalvolumens, was zwar eine geringere Expression der zellspezifischen Differenzierungsparameter zur Folge gehabt haben dürfte, jedoch aufgrund des Einsatzes der Nichtsteroidalen Antiphlogistika erforderlich war, um eine Akkumulierung von Metaboliten zu verhindern, und eine reproduzierbare NSAR-Dosis aufrechterhalten zu können.

Für die Bestimmung von Prolagen-C und Osteocalcin wurden an jedem Versuchstag pro Medikamentenkonzentration/Substanz je 2 mal 500 μ l der Überstände des Kulturmediums gewonnen und bis zum Ende der gesamten Versuchsreihe bei – 20 °C aufbewahrt.

Zeitplan:

Zell-Linie: hFOB 1.19

Zell-Linie: C3 H10 T1/2-BMP-2

Tag 0:	Aussaat: 50.000 Zellen/ml Medium: DMEM (1 ml) Medikamentenzugabe: 5µl	Tag 0:	Aussaat: 50.000 Zellen/ml Medium: DMEM (1 ml); Medikamentenzugabe: 5µl
Tag 4:	1.Messung Mediumwechsel auf BGJ b (1 ml) Medikamentenzugabe: 5 µl	Tag 4:	1.Messung Mediumwechsel: 1 ml DMEM Medikamentenzugabe: 5 μl
Tag 8:	2.Messung Mediumwechsel: 1 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 5 µl	Tag 8:	2.Messung Mediumwechsel: 1 ml DMEM Medikamentenzugabe: 5 µl
Tag 12:	3.Messung Mediumwechsel: 1 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 5 µl	Tag 12:	3.Messung Mediumwechsel: 1 ml DMEM Medikamentenzugabe: 5 µl
Tag 16:	4. Messung Mediumwechsel: 1 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 5 μl	Tag 16:	4. Messung Mediumwechsel: 1 ml DMEM Medikamentenzugabe: 5 μl
Tag 20:	5. Messung Mediumwechsel: 2 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 10 µl	Tag 20:	5. Messung Mediumwechsel: 2 ml DMEM Medikamentenzugabe: 10 µl
Tag 24:	6. Messung Mediumwechsel: 2 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 10 µl	Tag 24:	6. Messung Mediumwechsel: 2 ml DMEM Medikamentenzugabe: 10 μl
Tag 28:	7.Messung Mediumwechsel: 2 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 10 µl	Tag 28:	7.Messung Mediumwechsel: 2 ml DMEM Medikamentenzugabe: 10 µl
Tag 32:	8. Messung Mediumwechsel: 2 ml BGJ b Medikamentenzugabe: 10 µl	Tag 32:	8. Messung Mediumwechsel: 2 ml DMEM Medikamentenzugabe: 10 μl
Tag 36:	9. Messung	Tag 36:	9. Messung

Zellzählung

Testprinzip:

Die Zellzahlen wurden mit dem CASY 1-Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfe System GmbH, Reutlingen) ermittelt.

Zur Messung wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml Isoton III-Lösung (Coulter, Düsseldorf), einem schwachen Elektrolyten, suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine 150 µm Messkapillare definierter Geometrie gesaugt.

Die Messpore ist als Bohrung in einem Rubin positioniert, der in den Kapillarkörper eingegossen ist.

Während der Messung wird über zwei Platinelektroden eine Spannung an die Kapillarstrecke angelegt, wobei die elektrolytgefüllte Kapillare einen definierten elektrischen Widerstand darstellt.

Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine, ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung.

Da intakte Zellen als Isolator betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke, die als Maß für das Volumen der Zellen dient.

Mit einem Analog-Digital Bildwandler wird die Kapillarstrecke mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet, der gesamte Signalverlauf aufgezeichnet und das Integral des Mess-Signals errechnet (Pulsflächenanalyse).

Für die Zellzählung wurde ein Messbereich zwischen 0 und 30 μ m vorgewählt und das Messfenster für lebende Zellen, der Normalverteilung der Zellen entsprechend, zwischen 12 und 30 μ m festgelegt.

Es wurden automatisch vier Einzelmessungen pro Probe mit Volumina von je 200 µl und anschließender Mittelwertbildung durchgeführt.

Durch die Auswertesoftware CASYSTAT (Schärfe System, Reutlingen) wurde der Verdünnungsfaktor eingerechnet und die Zellzahl pro 1 ml angegeben.

Durchführung:

Zur Durchführung der Zellzahlbestimmung wurde zunächst das Medium abgesaugt, die Zell-Layer zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und je 500 µl TEP zupipettiert.

Nach fünfminütiger Inkubation wurden die Zell-Layer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer Eppendorf-Pipette in der zugegebenen Trypsinlösung homogenisiert und die vollständige Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert.

Durch Zugabe von 500 μ l DME-Medium pro well wurde die Wirkung des TEP abgestoppt, anschließend die Zellsuspension gut homogenisert und 100 μ l pro well in 10 ml vorgelegte Isoton III-Lösung pipettiert.

Nach mehrmaligem Schwenken der Probe erfolgte die Messung mit dem CASY-Zellzähler.

Proteinbestimmung nach Bradford

Testprinzip:

Das Nachweisverfahren beruht auf der Anlagerung von zweiwertigen Kupferionen in alkalischem Milieu an die Peptidbindungen der Proteine.

Im Bradfordreagenz (70 μ g Coomassie-Brillant-Blue G in 50 ml 60 % Ethanol, 100 ml 85 % Phosphorsäure ad 1000 ml Aqua dest.) werden die Cu⁺⁺-Ionen durch Tartrat komplex in Lösung gehalten.

Die Intensität der entstehenden violetten Farbe ist der Zahl der Peptidbindungen und damit der Proteinkonzentration proportional.

Das Extinktionsmaximum dieser Methode liegt bei 592 nm.

Durchführung:

Die zur Proteinbestimmung vorgesehenen wells der 24-well-Platte wurden zunächst abgesaugt, dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit je $300 \,\mu l$ PBS versehen.

Zur Lyse der Zellen wurden je 30 μ l 20 % NaOH zupipettiert, die Platte mit einer selbstklebenden Folie versiegelt und für eine Stunde bei 80° C inkubiert.

Nach einer 10-minütigen Abkühlphase wurden zum Abstoppen der Reaktion je 30 µl

20 % HCl zupipettiert und 100 µl des gemischten Lysats zu 400 µl Bradford-Reagenz gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Je zweimal 200 µl Lysat-Bradford-Gemisch wurden als Doppelbestimmung in eine 96-well-Platte überführt und die Probenextinktion bei einer Wellenlänge von 592 nm im ELISA-Reader (SLT, Crailsheim) bestimmt.

Der Proteingehalt wurde anhand einer mit BSA erstellten Eichkurve direkt vom Reader ermittelt, wobei Linearität nur im Messbereich zwischen 10 μ l/ml und 100 μ l/ml gegeben war.

Bei Übersteigen dieser Konzentrationen war eine Vorverdünnung der Proben mit PBS erforderlich.

Alkalische Phosphatase

Klinische Relevanz:

Die Alkalische Phosphatase ist ein Enzym, das beim Menschen in Form von drei gewebsspezifischen Isotypen auftritt. Dabei handelt es sich um die intestinale, placentale und die stammzelltypische Alkalische Phosphatase. Unabhängig hiervon existiert die nichtspezifische AP, die in einer speziellen Isoform ausschließlich in Osteoblasten und Odontoblasten gefunden und somit vereinfachend als osteoblasten-spezifisch angesehen werden kann.

Obgleich die Funktion der Alkalischen Phosphatase bis heute noch nicht vollständig erforscht werden konnte, geht man davon aus, dass die Abspaltung von Phosphatresten eine Rolle bei der Abscheidung von Hydroxylapatit spielt.

Innerhalb des osteoblastären Differenzierungszyklus wird dieses Enzym in der frühen Phase hoch exprimiert und fällt zu späteren Phasen hin ab.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann die Alkalische Phosphatase als früher Differenzierungsparameter angesehen werden.

Testprinzip:

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Umsatz von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol gemessen, dessen Farbänderung als Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt wurde.

Das entstehende 4-Nitrophenol liegt beim pH-Wert des Testansatzes (pH \sim 10) nahezu vollständig als gelb gefärbtes 4- Nitrophenolat vor.

Die Zunahme der Extinktion bei 405 nm pro Zeiteinheit ist der Enzymaktivität direkt proportional.

Die Alkalische Phosphatase katalysiert die Reaktion nach folgender Gleichung:

4-Nitrophenylphosphat + H_2O 4-Nitrophenolat + Phosphat

Durchführung:

Zur Durchführung der Bestimmung wurde zunächst das Medium aus den entsprechenden Kavitäten der 24-well-Platte abgesaugt und Mediumreste durch zweimalige Zugabe von je

1 ml Waschpuffer (150 mM NaCl = 8,766 g/l; 1 mM Trishydroxymethylaminoethan = 0,1211 g/l; pH 7,4) entfernt.

Nach Zugabe von je 500 μ l Lysierungspuffer (0,75 M 2-Amino-2methyl-1-Propanol = 7,19 g/l; 2 mg/ml p-Nitrophenylphosphat) wurde die Platte bei 37° C auf dem ELISA-Rüttler eine Stunde inkubiert.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden je 500 μ l 50 mM NaOH pro well zupipettiert, der Inhalt der Kavitäten durch mehrmaliges Aufziehen in einer Eppendorf-Pipette gut homogenisiert und anschließend zur Zentrifugation (5 Minuten; 11 000 rpm) in Eppendorfcups überführt.

Die Bestimmung der Extinktion erfolgte mit je zweimal 200 µl Überstand pro Cup in einer 96-well-Platte als Doppelbestimmung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde mit Hilfe einer Standard-Eichkurve (5; 10; 25; 100; 200 mM p-Nitrophenol) direkt im ELISA-Reader ermittelt.

Um die spezifische Aktivität der Alkalischen Phosphatase zu ermitteln, wurde der Substratumsatz pro Minute mit der zelluläre Proteinkonzentration, die nach der Bradford-Methode bestimmt wurde nach folgender Formel berechnet:

Alkalische Phosphataseaktivität [umol p - NP - P/min]	- Spezifische Alkalische Phosphatase [[]/mg]
Proteinmenge nach Bradford [mgProtein]	- Spezifische Arkansche Phosphatase [0/mg]

Prolagen-C

Klinische Relevanz:

Die von Osteoblasten gebildete Matrix enthält als vorherrschendes Protein Kollagen Typ I, das als hochmolekulares, lösliches Vorläufermolekül Prokollagen aus den Zellen sezerniert wird und extrazellulär proteolytisch in ein aminoterminales und ein carboxyterminales Fragment gespalten wird.

Die Bildung dieser Extensionspeptide (N- und C- terminale Prokollagen-Propeptide) erfolgt in stöchiometrischem Verhältnis. Während das N-terminale Fragment in die Matrix eingebaut wird, erscheint das C-terminale Fragment als lösliches Produkt in der Extrazellularflüssigkeit, wobei sich dessen Konzentration proportional zur Gesamtmenge des gebildeten Kollagens verhält.

Die quantitative Bestimmung des C-terminalen Propeptids (= CICP) erfolgte mit einem Sandwich –Enzymimmunoassay im Mikrotiterplattenformat (DPC Biermann, Bad Nauheim), dessen untere Nachweisgrenze bei 2 ng/ml liegt.

Testprinzip:

Verdünnte Proben, Standards und Kontrollen werden in anti-CICP (monoklonal, Maus)beschichtete Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert.

Während der ersten zweistündigen Inkubation bindet das CICP der Proben an die Bindungsstellen der an die Festphase gebundenen monoklonalen CICP-Antikörper.

Ungebundene Reaktionspartner werden im anschließenden Waschschritt entfernt.

In einem zweiten Inkubationsschritt bindet ein zweiter polyklonaler anti-CICP-Kaninchen-Antikörper an das Festphasen-gebundene CICP.

Nach dem Entfernen ungebundener Komponenten in einem weiteren Waschschritt, erfolgt die Zugabe von Enzymkonjugat (anti-Kaninchen-IgG (Ziege)-gekoppelt an Alkalische Phosphatase).

Dieses bindet im dritten Inkubationsschritt an den polyklonalen Kaninchen-anti-CICP-Antikörper und bildet einen Sandwich-Komplex.

Nicht gebundenes Enzymkonjugat wird in einem erneuten Waschschritt entfernt.

Nach Zugabe von p-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat wird das gebundene Enzym während einer 30minütigen Inkubation zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt.

Durch Zugabe von 1 N NaOH wird die enzymatische Reaktion abgestoppt und die Enzymaktivität im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt, wobei die gemessene optische Dichte der Konzentration an CICP direkt proportional ist.

Durchführung:

Die bei –20°C gelagerten Überstände aller Versuchstage wurden zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mittels Assaypuffer im Verhältnis 1:12 verdünnt.

Je 100 µl der mitgelieferten Standards (0; 1; 2; 5; 20; 80 ng/ml), Kontrollen (low/high) und verdünnten Proben wurden in Doppelbestimmung in die mit Maus-Anti-Human-Prokollagen-I-Propeptid-Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert.

Nach zweistündiger Inkubation wurden ungebundene Bestandteile durch dreimaliges Waschen mit je 300 µl Waschpuffer eliminiert und die Platte nach Zugabe von je 100 µl Kaninchen-Anti-Human-Prokollagen-I-Propeptid-Antikörper für 45 Minuten inkubiert.

Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Zugabe des Ziege-Anti-Kaninchen-Alkalische Phosphatase-Konjugats, das nach 45minütiger Reaktionszeit durch erneutes Waschen eliminiert wurde.

Als Substrat wurden nun je 100 μ l p-Nitrophenylphosphat zupipettiert und nach 30 Minuten die Reaktion der Alkalischen Phosphatase durch Zugabe von je 50 μ l 1N NaOH abgestoppt.

Nach Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 405 nm, erfolgte die Auswertung der Ergebnisse im ELISA-Reader anhand der Standardkurve (lineare Auftragung der optischen Dichte gegen die logarithmischen Standardkonzentrationen) in ng/ml.

Osteocalcin

Klinische Relevanz:

Osteocalcin, ein von Osteoblasten synthetisiertes und in die Knochenmatrix eingebautes Polypeptid, bildet den Hauptanteil des nicht-kollagenen Proteins im Knochen. Es handelt sich hierbei um ein aus 49 Aminosäuren aufgebautes Polypeptid, das an Position 17, 21 und 24 mit je einem Gammacarboxyglutaminsäurerest substituiert ist.

Die genaue biologische Funktion des Osteocalcins konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, man geht jedoch davon aus, dass für die Funktion des Osteocalcins die hohe Bindungsfähigkeit der drei Gammacarboxyglutaminsäurereste für Hydroxylapatit und Calcium verantwortlich ist.

Testprinzip:

Der Nachweis erfolgte durch einen Sandwich-Immunoradiometrischen Assay für das intakte Osteocalcin und das N-terminale Mittelfragment (Nichols Institute, Bad Nauheim).

Eingesetzt wurden zwei polyklonale Ziege-anti-Human-Osteocalcin-Antikörper, die affinitätschromatographisch gereinigt wurden.

Der erste Antikörper, welcher die Aminosäuresequenzen 20-36 erkennt, ist an einer Polystyrolkugel immobilisiert, der zweite Antikörper, für die Erkennung der Sequenzen 1-19, ist mit ¹²⁵ J radioaktiv markiert.

Die Osteocalcin-Probe wird zeitgleich sowohl mit den antikörperbeschichteten Polystyrolkugeln als auch mit dem radioaktiv markierten Antikörper inkubiert.

Das in der Probe enthaltene Osteocalcin bildet mit den beiden Antikörpern einen "Sandwich"-Komplex, dessen gebundene Radioaktivität dem Osteocalcingehalt der Probe direkt proportional ist.

Durchführung:

Zur Durchführung wurden je 10 µl Probe und Standards (0; 0,8; 2,2; 7,2; 21; 67 ng/ml) in

13 x 50 mm Polystyrolröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) pipettiert, 200 μ l des ¹²⁵J markierten Antikörpers zugegeben und im Vortexer gemischt.

Nach Zugabe je einer mit Antikörper beladenen Polystyrolkugel pro Röhrchen erfolgte eine dreistündige Inkubation des Testansatzes auf einem Horizontalschüttler bei 200 rpm.

Ungebundene Reaktionspartner wurden durch dreimaliges Waschen des Ansatzes mit je 2 ml PBS pro Röhrchen eluiert.

Zur Auswertung wurde die Radioaktivität der Proben und Standards durch einminütige Messungen in einem Gammacounter bestimmt, die Mittelwerte der Doppelbestimmungen berechnet und anschließend die Counts des 0 ng-Standards subtrahiert.

Mit Hilfe der Standards wurde eine doppellogarithmische Eichkurve erstellt, die innerhalb des Messbereichs linear verlief.

Zur Berechnung der Osteocalcin-Konzentration wurden die korrigierten Counts der Probe mit der Konzentration des nächst höheren Standards multipliziert und durch die korrigierten Counts des nächst höheren Standards dividiert.

Zur endgültigen Bestimmung der Messwerte wurde die niedrigste Osteocalcin-Konzentration, die innerhalb einer Messreihe ermittelt wurde von allen anderen Messwerten subtrahiert.

Prostaglandin E₂

Klinische Relevanz:

Prostaglandine sind hormonähnliche Substanzen (Gewebshormone bzw. Mediatoren), die in ihrer Struktur geringfügig variieren und chemische Derivate der Prostansäure sind.

Ausgangssubstrat der Prostaglandinbiosynthese ist die Arachidonsäure, die durch Phospholipase A_2 aus Membranlipiden freigesetzt und durch die Cyclooxygenase zu PGH₂ umgewandelt wird, dem gemeinsamen Präkursor aller physiologischen Prostaglandine, Prostacycline und Thromboxane.

Bisher sind mindestens fünf Gruppen mit zahlreichen Untergruppen bekannt.

Physiologisch wichtige Prostaglandine sind PGE₁, PGE₂, PGF_{2a} und PGI₂.

Effekte der Prostaglandine erstrecken sich u.a. auf die Wirkung der Katecholamine, den Tonus der glatten Muskulatur und das kardiovaskuläre System (blutdrucksenkende bzw. -Thrombozytenaggregation, steigernde Effekte), Hemmung der Drosselung der Magensaftsekretion, Steigerung der Synthese und Freisetzung bestimmter Gewebshormone endokriner und der Hormonsekretion Organe (Schilddrüse, Nebenschilddrüse. Nebennierenrinde, Ovar) sowie auf zytoprotektive Effekte.

Prostaglandine spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Fieber, Schmerzen und Entzündungsprozessen.

Die Prostaglandinsynthese wird durch viele physiologische Substanzen gefördert, die z.T. ihrerseits durch Prostaglandine vermehrt freigesetzt werden (z.B. Gewebehormone).

Zu den Prostaglandin-Antagonisten, insbesondere der Cyclooxygenase, gehören Nichtsteroidale Antiphlogistika und Kortikoide.

In vivo Studien haben gezeigt, dass Prostaglandine in pharmakologischen Dosen die Knochenbildung stimulieren können.

Man geht davon aus, dass endogene osteoblastäre Prostaglandine an der lokalen Regulation von knöchernen Umbauprozessen beteiligt sind, obgleich diese Hypothese durch in vitro Studien an Osteoblasten-Zellkulturen nicht bestätigt werden konnte.

In vitro zeigten Prostaglandine sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Effekte auf Proliferation, Kollagensynthese und Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

Abstrahierend dargestellt, konnte man durch in vitro Studien eruieren, dass endogenes Prostaglandin E $_2$ die Aktivität der Alkalischen Phosphatase down reguliert, die Proliferation der Osteoblasten, einem autokrinen Mediator vergleichbar, gering stimuliert, ohne jedoch auf die Mineralisation Einfluss zu nehmen.

Eine differenzierte Darstellung der Rolle der Prostaglandine im Knochenmetabolismus erfolgte bereits an früherer Stelle und kann dem Kapitel: *Pathophysiologie heterotoper Ossifikationen* entnommen werden.

Testprinzip:

Der Nachweis von Prostaglandin E₂ erfolgte durch einen kompetitiven Enzymimmunoassay (Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig).

Proben, Standards und Kontrollen werden zusammen mit PGE_2 –Enzymkonjugat gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase und Maus-anti-PGE₂ -Antikörper in Ziege-anti-Maus-IGgbeschichtete Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert.

Während der ersten Inkubation bindet der Maus-anti- PGE_2 -Antikörper an die Ziege-anti-Maus-IGg-beschichteten Kavitäten der Mikrotiterplatte, während das PGE_2 der Proben, Standards, Kontrollen und des PGE_2 -Enzymkonjugats um die Bindungsstellen am Mausanti- PGE_2 -Antikörper konkurrieren.

In einem zweiten Inkubationsschritt reagiert TMB-Substrat (3,3',5,5'tetramethylbenzidinhyrdogenperoxid in 20 % dimethylformamid) mit den gebundenen Bestandteilen des Testansatzes.

Nach Zugabe von 1 M H₂SO₄ wird die Extinktion bei 450 nm im ELISA-Reader bestimmt.

Die gemessenen Extinktionen sind der Prostaglandin E_2 -Konzentration der Proben, Standards und Kontrollen indirekt proportional.

Durchführung:

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Überstände aller Versuchstage wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und alle Reagenzien und Standards vorbereitet.

Nach Zugabe von verdünntem Assay-Puffer wurden je 50 μ l Probe und Standard in die entsprechenden Kavitäten der 96-well-Platte sowie je 50 μ l Maus-anti-PGE ₂ -Antikörper und PGE ₂ –Enzymkonjugat gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase pipettiert.

Nach einstündiger Inkubation auf einem Mikrotiterplatten-Rüttler wurden ungebundene Reaktionspartner im anschließenden Waschschritt entfernt.

Für eine weitere 30minütige Inkubation erfolgte die Zugabe von 150 µl Enzym-Substrat (TMB) zu allen Kavitäten.

Um eine Extinktionsmessung bei 450 nm im ELISA-Reader durchführen zu können, mussten zunächst je $100 \ \mu l \ 1M \ H_2SO_4$ zugesetzt werden.

Die Auswertung der gemessenen Ergebnisse erfolgte im ELISA-Reader anhand einer Standardkurve in pg/ml.

Calcium-Nachweis mittels Atomemissionsspektrometrie

Die quantitative Bestimmung der Calcium-Sekretion der Zellen erfolgte mittels Atomemissionsspektrometrie am Fraunhofer Institut für Silikatforschung Würzburg. Technische Daten zur Durchführung sowie physikalisch-chemische Grundlagen der Methodik können folgender Literaturstelle entnommen werden:

Boss, C.B.; Freeden, K.J.: Concepts, Instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Perkin Elmer [15].

Durchführung:

Die Probengewinnung zur AES erfolgte aus den wells, die zur Proteinbestimmung herangezogen wurden. Zunächst werden je nach Ansatzänderung zur Proteinbestimmung 40/ 50/ 80/ 90 μ l pro well verworfen und zu den verbliebenen 260 μ l Lysat pro well 40 μ l 5M HNO₃ zupipettiert und die Platte über Nacht auf dem Mikrotiterplatten-Rüttler Stufe 3 inkubiert.

Am nächsten Morgen wurden 1700 μ l 0,5 M HNO₃ zupipettiert, homogenisiert und die Lysate in 2 ml Eppendorfcups überführt und bis zur Bestimmung am Ende der Versuchsreihe bei – 20 °C aufbewahrt.

Vorbereitung zur AES:

Die gefrorenen Lysate in den Eppendorfcups wurden nach dem Auftauen 5 Minuten bei 11000 rpm zentrifugiert um mögliche Zellrückstände, die die Bestimmung beeinflussen könnten zu eliminieren.

Die so gewonnenen Überstände wurden wiederum in sterile Eppendorfcups pipettiert und an das Fraunhofer-Institut Würzburg zur Bestimmung der Calciumwerte mittels Atomemissionsspektrometrie übermittelt.

Qualitative Cytochemische Analytik

Calcium-Nachweis: Färbung nach von Kossa

Testprinzip:

Die Methode nach von Kossa dient zum qualitativen Nachweis der Kalzifizierung der Zellen während des gesamten Proliferations- und Differenzierungszyklus.

In Karbonaten und Phosphaten enthaltenes Kalzium wird gegen Silberionen ausgetauscht, die anschließend zu metallischem Silber reduziert werden.

Die Inkubation der Silberlösung erfolgt für eine Stunde im Dunkeln.

Durch Zugabe einer Reduktionslösung werden die wells entwickelt, das Ergebnis durch Zugabe einer Natriumthiosulfatlösung fixiert und anschließend fotografisch dokumentiert.

Calciumhaltige Zonen in den wells erscheinen als braun bis braunschwarz markierte Areale.

Durchführung:

Die jeweiligen wells wurden zweimal mit PBS gewaschen, um Mediumreste zu eluieren. Anschließend wurden die Zell-Layer durch Zugabe von absolutem Ethanol fixiert.

Nach fünfminütiger Inkubation wurde das Ethanol von den wells abgezogen und die Platte bis zur vollständigen Verdunstung des Alkohols bei Raumtemperatur getrocknet.

Um das in Karbonaten und Phosphaten enthaltene Calcium zu metallischem Silber zu reduzieren, wurden die entsprechenden Kavitäten mit 5 % Silbernitratlösung beschichtet und eine Stunde im Dunkeln inkubiert.

Anschließend wurde die Silbernitratlösung abpipettiert und die Kavitäten zweimal mit Aqua dest. gespült.

Zur Entwicklung erfolgte die Zugabe einer Reduktionslösung, die nach zweiminütiger Inkubation entfernt wurde.

Um Rückstände der Reduktionslösung zu eluieren, wurden vor Zugabe der 5 % Natriumthiosulfatlösung die Kavitäten mit Aqua dest. gespült.

Nach zweiminütiger Fixierung der Färbeergebnisse mit Natriumthiosulfat wurden die well erneut mit Aqua dest. gespült, bei Raumtemperatur getrocknet und die Ergebnisse anschließend fotografisch dokumentiert.

Die Herstellung der Färbelösungen erfolgte nach Originalanleitung, die Durchführung der Färbung in der Modifikation nach Herrn Dr. med. U. Nöth, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Universität Wüzburg.

Herstellen der Silbernitratlösung:

5g AgNO₃ in

100 ml Aqua dest. lösen.

Herstellen der Reduktionslösung:

- 5 g Natriumkarbonat in
- 75 ml Aqua dest. lösen und
- 25 ml Formol (~ 36 %) zusetzen.

Herstellen der Natriumthiosulfatlösung:

5g $Na_2 S_2 O_3$ in

100 ml Aqua dest. lösen

Adipocyten-Nachweis: Sudan III-Färbung

Testprinzip:

Um eine Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelle C3H10T1/2-BMP-2 zu Adipocyten zu erfassen, wurde eine allgemeine Lipiddarestellung mit der Sudan III-Methode durchgeführt.

Der Färbemechanismus beruht auf der besseren Löslichkeit des Farbstoffes in den Lipiden der Zellen als im Lösungsmittel, in dem er angeboten wird.

Lipide zeigten sich in unseren Versuchsreihen als intrazellulär liegende randständige Granula.

Durchführung:

Zur Herstellung der Farblösung wurden 0,5 g Oil red-O pro 100 ml 70 % Ethanol suspendiert und die Farblösung mehrere Stunden im Rückflußkühler erhitzt, um eine Lösung des Farbstoffes zu erreichen.

Vor Durchführung der Färbung wurden ungelöste Farbstoffpartikel durch mehrmalige Filtration in einem Faltenfilter entfernt, um mögliche Artefakte beim Färbevorgang zu verhindern.

Mediumreste wurden aus den entsprechenden wells mit PBS eluiert und die Zell-Layer anschließend mit 4 % Formalin zehn Minuten fixiert.

Zur Darstellung der Lipidgranula erfolgte die Zugabe der Farblösung, die bei Raumtemperatur 20 Minuten inkubierte.

Anschließend wurden die wells mit PBS gewaschen und bis zur fotografischen Dokumentation mit PBS bedeckt, um Veränderungen in der Zellmorphologie zu verhindern.

Ergebnis:

Lipide ließen sich als randständige, ringförmige, intrazellulär gelegene leuchtend rote Granula identifizieren.

Chondrocyten-Nachweis: Alcianblau 8 G-Färbung

Testprinzip:

Um eine Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelle C3H10T1/2-BMP-2 zu Chondrocyten zu erfassen, wurde eine Färbung mit dem wasserlöslichen Phthalocyaninderivat Alcianblau durchgeführt.

Die Methode zeichnet sich durch selektive Färbung saurer Mukopolysaccharide aus, ermöglicht jedoch keine Differenzierung zwischen Karboxyl- und Sulfatgruppen.

Saure Mukopolysaccharide treten leuchtend blau hervor.

Durchführung:

Die Herstellung von Farb- und Fixierlösung erfolgte nach abschließend angeführter Vorschrift.

Nach Entfernen von Mediumresten durch Spülen der entsprechenden Kavitäten mit PBS wurden die Zell-Layer für zehn Minuten mit gepuffertem Formol fixiert.

Anschließend wurden die Zellen mit Alcianblau-Färbelösung bedeckt und die verschlossene Platte 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Um überschüssigen Farbstoff zu eluieren, wurden die wells abschließend mit Aqua dest. gespült, bis sich keine Farbwolken mehr lösten.

Saure Mukopolysaccharide zeigten sich als leuchtend blaue Areale.

Auf eine Gegenfärbung mit einem Kernfarbstoff wurde zugunsten der besseren Auswertbarkeit der Ergebnisse verzichtet.

Die Ergebnisse der Färbung wurden fotografisch dokumentiert.

Die Durchführung erfolgte nach eigener Modifikation, um eine Adaptation der Methodik an das gewählte Zellkultursystem zu ermöglichen.

Herstellung des Fixiergemisches:

Formol-Cetylpyridin (Williams and Jackson)

4 % Formalin

0,5 % N-Cetylpyridiniumchlorid

Um eine Konservierung saurer Mukopolysaccharide durchzuführen, wurden dem 4 % Formalin

0,5 % N-Cetylpyridiniumchlorid zugesetzt.

Herstellung der Farbstofflösung: Alcianblau 8 G nach Gomori

5,0 g Kalium-Aluminiumsulfat KAl(SO₄)₂

0,5 g Alcianblau 8 G

100 ml Aqua dest.

Obige Substanzen wurden in Aqua dest. suspendiert und der Farbstoff einige Stunden darin gelöst. Anschließend wurden überschüssige Farbstoffpartikel durch mehrmalige Filtration in einem Faltenfilter extrahiert.

Auf eine Gegenfärbung mit einem Kernfarbstoff wurde zugunsten der besseren Auswertbarkeit der Ergebnisse bei allen Methoden im Bereich der cytochemischen Analytik verzichtet.

Bestrahlungs-Versuche

In der vorliegenden Studie kamen Bestrahlungsdosen von 1, 3, 5, 7 und 10 Gray zum Einsatz. Die Applikation erfolgte einzeitig präkonfluent sechs Stunden nach Aussaat der Zellen am Institut für Strahlentherapie der Universität Würzburg. Als Strahlungsquelle diente ein ⁶⁰Co-Strahler.

Zur Analyse der Proliferations- und Differenzierungsparameter wurden die, bereits im Rahmen der NSAR-Versuche etablierten Methoden unmodifiziert herangezogen.

Kombiniert wurden zur Radiatio innerhalb der Zellkultur-Platten jeweils die Dosen Kontrolle/1 Gray, 3 Gray/5 Gray, 7 Gray/10 Gray. Eine Abschirmung der wells erfolgte mittels Bleiplatten.

Statistische Auswertung

Die Auswertung der Statistikdaten wurde mit Hilfe des Programms SPSS Version 10.0.7 durchgeführt.

Als Globaltest zur Untersuchung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. In einem weiteren Schritt wurde eine explorative Posthoc-Analyse mit paarweisem Vergleich durchgeführt, um einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Substanz/Bestrahlungsdosen-Gruppe zu untersuchen.

Fand sich im Globaltest kein signifikanter Unterschied, so wurde auf einen Paarvergleich mittels post-hock-Analyse verzichtet.

Das Signifikanzniveau wurde bei p < 0.05 festgelegt.

Ergebnisse

Dose-Response-Versuche

Zell-Linie: hFOB 1.19

Um die Toxizität der später im Rahmen der Plasma-Dosis-Versuche eingesetzten Medikamente in unterschiedlichen Dosierungen und deren Suspensionslösungen auf den Proliferations- und Differenzierungsverlauf der Zelle zu ermitteln, wurden im Vorfeld zunächst Dose-Response-Studien durchgeführt, deren Ergebnisse an dieser Stelle jedoch nicht differenziert dargestellt werden können, da dies den Rahmen der Arbeit sprengen würde.

Um klinische Konsequenzen aus den gewonnenen Ergebnissen ziehen zu können, orientierte sich die eingesetze NSAR-Dosis an den Plasma-Dosen, wie sie an Patienten ermittelt werden, und wurden den Zellkulturbedingungen entsprechend adaptiert.

Plasma-Dosis-Versuche

Zell-Linie: hFOB 1.19

Versuchsreihe: Diclofenac, Meloxicam, Indometacin I

Zellzahlbestimmung

Zur Beurteilung der Proliferationsraten der Zell-Linie hFOB 1.19 erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen im 4-Tages-Rhythmus am CASY 1-Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfe System GmbH, Reutlingen).

Zu Versuchsbeginn starteten sowohl die Kontrollgruppe auf Polystyrol als auch die NSARbehandelten Zellen mit einer Zellzahl von 50 000 Zellen pro ml Zellsuspension.

Bis Tag 8 zeichnete sich kein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrolle und den NSARbehandelten Zellen ab. Während im weiteren Verlauf die Zellen unter dem Einfluss von Diclofenac wie auch die Kontrolle auf Polystyrol einen kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl zeigten, zeichnete sich ab Tag 12 für die mit Meloxicam und Indometacin behandelten Zellen eine nicht signifikante Reduktion der Proliferationsrate ab, die sich bis Tag 24 fortsetzte.

Ab Tag 12 ließ sich erkennen, dass sowohl der Einsatz von Indometacin als auch von Meloxicam die Proliferation der hFOB 1.19 – Zelle nicht signifikant reduzierte, wohingegen Diclofenac den Proliferationszyklus der Zelle kaum beeinflusste.

Dieser Trend war insbesondere zwischen Tag 12 und 20 zu erkennen, der sich jedoch zwischen Tag 20 und 24 aufgrund sinkender Zellzahlen bedingt durch das Absterben der Kultur reduzierte.



Abb. 8 Cell counts [counts /ml]

Proteingehalt

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Methode nach Bradford im 4-Tages-Rhythmus.

Von Versuchsbeginn bis Tag 16 zeigt sich für alle Zellen, sowohl die Kontrolle als auch die NSAR-behandelten Zellen ein kontinuierlicher Anstieg des Proteingehaltes.

Während bis Tag 24 die Kontrolle bis auf Werte von 695 mg/ml anstieg, erreichten die Zellen unter dem Einfluss von Indometacin Vergleichswerte von 844 mg/ml. Diclofenac- und Meloxicam- behandelte Zellkulturen zeigten nahezu synchrone Verlaufskurven und erreichten Maximalwerte von 735 mg/ml.



Abb.9 Protein - Content [mg/ml]

Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Ermittlung der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte im 4-Tages-Rhythmus nach zuvor bereits erläuterter Formel.

Die spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität zeigte für alle Zellkulturen zu frühen Differenzierungszeitpunkten einen steilen Anstieg. Während die Aktivität der Kontrolle auf Polystyrol zwischen Tag 8 und 12 nahezu ein steady-state erreichte, gefolgt von einem schwachen Aktivitätsverlust bis Versuchsende, konnte bei den NSAR-behandelten Zellkulturen bis Tag 12 ein weiterer kontinuierlicher Anstieg der spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität in fast äquivalenter Menge gemessen werden. Mit Erreichen später Differenzierungsphasen sank die Aktivität aller NSAR-behandelten Zellen ebenfalls auf ein nicht signifikant niedrigeres Niveau ab.

Bezüglich der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität zeigten die NSAR-behandelten Zellen nahezu synchrone Verlaufsprofile zu dem der Kontrolle, jedoch auf höherem Niveau, wobei Indometacin-behandelte Zellen geringere Maximalwerte erreichten als Diclofenac- und Meloxicam-behandelte Kulturen.



Abb. 10 Alcaline Phosphatase Activity [µmol/min/mg Protein]

Osteocalcin

Die Bestimmung der Osteocalcinwerte erfolgte mittels eines immunradiometrischen Assays aus den im 4-Tages-Rhythmus gwonnenen Zellkulturüberständen.

Von Versuchsbeginn bis Tag 20 zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Osteocalcin-Konzentration sowohl der Kontrolle als auch der NSAR-behandelten Zellen, jedoch auf nicht signifikant niedrigerem Niveau. Die stärkste Hemmung der Osteocalcinsynthese war zu Beginn unter dem Einfluss von Diclofenac und ab Tag 16 unter dem von Meloxicam zu verzeichnen.

Gegen Ende des Differenzierungszyklus zeigte sich ab Tag 20 für alle Zellkulturen ein steiler Anstieg der Osteocalcinsynthese, der für Diclofenac nicht signifikant höher lag als für die Kontrolle, gefolgt von Indometacin und Meloxicam



Abb. 11 Osteocalcin - Content [ng/ml]

Prokollagen I

Mittels eines Sandwich-ELISA wurde aus den im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zellkulturüberständen die Prokollagen I – Synthese der Osteoblasten ermittelt.

Es zeigte sich von Versuchsbeginn bis Tag 16 ein steiler kontinuierlicher Anstieg der Prokollagen I – Konzentration, während die Kurven für Indometacin und die Kontrollgruppe einen äquivalenten Verlauf zeigten, erreichten die mit Diclofenac und Meloxicam behandelten Zellen geringgradig höhere Werte, mit jedoch parallelem Kurvenverlauf. Zwischen Tag 16 und 20 stiegen die Konzentrationen für die Indometacin und

Zwischen Tag 16 und 20 stiegen die Konzentrationen für die Indometacin- und Kontrollgruppe weiter an, während unter dem Einfluss von Diclofenac und Meloxicam ein nicht signifikanter Rückgang der Prokollagen I-Synthese bis Versuchsende zu verzeichnen war.



Abb. 12 Procollagen – Content [ng/ml]

Prostaglandin E₂

Die Bestimmung der Prostaglandin E_2 -Konzentration erfolgte aus den im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zellkulturüberständen mittels eines Sandwich-ELISA.

Die Kontrollgruppe auf Polystyrol zeigte in frühen Differenzierungsphasen bis Tag 12 einen deutlichen Anstieg der PGE_2 – Konzentration, die zwar zwischen Tag 12 und Tag 16 kurzfristig absank, anschließend jedoch zu späteren Differenzierungszeitpunkten erneut steil anstieg.

Unter dem Einfluss von NSAR wiesen die Zellen eine signifikante Suppression der PGE_2 – Produktion auf, so dass hier nur minimale Werte im Bereich der unteren Nachweisgrenze ermittelt werden konnten und auch keine Anstiegstendenzen zu beobachten waren.



Abb. 13 Prostaglandin E₂ – Content [ng/ml]

Calciumbestimmung mittels Atomemissionsspektrometrie

Die Bestimmung der Calciumproduktion erfolgte mittels Atomemissionsspektrometrie aus im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zell-Lysaten am Fraunhofer-Institut Würzburg.

Die auf Polystyrol gezüchteten Zellen zeigten von Versuchsbeginn bis Tag 16 einen nahezu konstanten Basalwert, gefolgt von einem leichten Peak an Tag 16 und einem anschließenden Rückgang auf das Anfangsniveau bis Versuchsende.

Die Calciumproduktion der NSAR-behandelten Zellen entsprach bis Tag 8 dem Trend der Kontrolle, sank anschließend jedoch auf homogen niedrige Werte steil ab.

Da diese Werte mit der qualitativen Auswertung der Färbung nach von Kossa jedoch keineswegs korrelieren, muss dringend diskutiert werden, ob es sich in diesem Fall nicht um ein messtechnischen Problem gehandelt haben könnte, da auch die Ergebnisse der Kontrollgruppe mit früher gewonnenen Daten nicht vereinbar erscheinen.



Abb. 14 Calcium - Content [µg/ml]

Qualitativer Calciumnachweis mittels Färbung nach von Kossa

Die Kontrolle auf Polystyrol zeigte bereits an Tag 4 kleine Mineralisationszonen, die sich bis Tag 8 weiter verstärkten. Am 12. Versuchstag fanden sich bereits deutliche Nodules, die sich als schwarz-braune Mineralisationsherde darstellten, deren Kalzifikationsintensität bis Versuchsende stark zunahm.

Die NSAR-behandelten Zellen zeigten ebenfalls einen dem Zellzyklus entsprechenden Mineralisationsverlauf, der sich von dem der Kontrolle im Längsschnitt der Studie nur unwesentlich unterschied. Es stellten sich unter dem Einfluss der NSAR ebenfalls bereits an Tag 4 kleine Mineralisationszonen dar, die sich zum 8. Tag verstärkten und im weiteren Verlauf wie auch die Kontrolle kalzifizierte Nodules aufwiesen.

Innerhalb der NSAR schienen Diclofenac- und Indometacin-behandelte Zellen nicht signifikant stärkere Mineralisationstendenzen zu zeigen als Meloxicam-behandelte Zellen und die Kontrollgruppe, was sich bis Versuchsende jedoch nivellierte.

hFOB 1.19: Plasma-Dosis-Versuch Färbung nach von Kossa



Abb. 15 hFOB 1.19: Plasma-Dosis-Versuch – Färbung nach von Kossa

Versuchsreihe: Diclofenac, Meloxicam, Indometacin II

Da es sich bei der nun folgenden Versuchsreihe um einen Wiederholungsversuch handelte, musste aus ökonomischen Gründen auf die Bestimmung von Osteocalcin und Prostaglandin E_2 verzichtet werden.

Zellzahlbestimmung

Zur Beurteilung der Proliferationsraten der Zell-Linie hFOB 1.19 erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen im 4-Tages-Rhythmus am CASY 1-Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfe System GmbH, Reutlingen).

Von Versuchsbeginn an zeigten sowohl die NSAR-behandelten Zellen als auch die Kontrolle auf Polystyrol einen exponentiellen Anstieg der Zellzahl, der sich für die Kontrolle bis Tag 16 fortsetzte, gefolgt von einem Absinken der Proliferationsrate in späten Differenzierungsphasen.

Unter dem Einfluss der NSAR war bereits ab Tag 12 ein kontinuierlicher Rückgang der Proliferationsraten zu verzeichnen.



Abb. 17 Cell – Counts [counts/ml]

Proteingehalt

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Methode nach Bradford im 4-Tages-Rhythmus.

Bis zum 12. Versuchstag konnte ein kontinuierlicher steiler Anstieg der Proteinproduktion sowohl der Kontrolle als auch der NSAR-behandelten Zellkulturen mit parallelem Kurvenverlauf und nahezu identischen Proteinkonzentrationen registriert werden.

Zwischen Tag 12 und 16 erreichten die Werte ein konstantes Niveau, gefolgt von einem geringen Anstieg der Proteinkonzentration zu späten Differenzierungszeitpunkten, der unter dem Einfluss von Diclofenac nicht signifikant höher ausfiel als unter den sonstigen Kulturbedingungen.



Abb. 18 Protein - Content [mg/ml]

Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Ermittlung der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte im 4-Tages-Rhythmus nach zuvor bereits erläuterter Formel.

Bereits zu Beginn der Proliferationsphase wurden relativ hohe Werte für die Alkalische Phosphatase-Aktivität ermittelt, gefolgt von einem steilen Absinken der Aktivität zwischen Tag 4 und 8.

Im weiteren Verlauf konnte zwar ein leichter kontinuierlicher Anstieg registriert werden, wobei jedoch das anfänglich hohe Ausgangsniveau nicht mehr erreicht wurde.

Die NSAR-behandelten Kulturen zeigten ein mit der Kontrollgruppe vergleichbares Kurvenprofil. Im Vergleich zu Indometacin-behandelten Zellen und der Kontrolle wurden lediglich unter dem Einfluss von Diclofenac und Meloxicam zwischen Tag 12 und 20 nicht signifikant höhere Aktivitätswerte erreicht.



Abb. 19 Alcaline Phosphatase Acticity [µmol/min/min/mg Protein]

Prokollagen I

Mittels eines Sandwich-ELISA wurde aus den im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zellkulturüberständen die Prokollagen I – Synthese der Osteoblasten ermittelt.

Der Prokollagen-I-Gehalt aller Kulturen zeigte von Versuchsbeginn an bis Tag 16 einen kontinuierlichen Anstieg, der in späten Differenzierungsphasen gering abflachte.

Indometacin-behandelte Zellen erreichten zwar geringfügig niedrigere Maximalwerte als die Kontrolle, zeigten jedoch stets einen nahezu parallelen Kurvenverlauf sowohl zur Kontrolle als auch zu den anderen NSAR-behandelten Kulturen, die nur wenig höhere Werte erreichten als die Kontrolle, so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Zellen und der Kontrollgruppe registriert werden konnten.



Abb. 20 Procollagen – Content [ng/ml]
Calciumbestimmung mittels Atomemissionsspektrometrie

Die Bestimmung der Calciumproduktion erfolgte mittels Atomemissionsspektrometrie aus im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zell-Lysaten am Fraunhofer-Institut Würzburg.

Die Calciumproduktion der Kontrolle erreichte zu Versuchsbeginn relativ hohe Werte, sank zum 8.Tag steil ab und blieb konstant auf diesem Niveau bis Tag 12.

Zwischen Tag 16 und 20 war ein erneuter Anstieg zu verzeichnen, der jedoch bis Versuchsende wieder abflachte.

Bis Tag 8 zeigten Diclofenac- und Meloxicam-behandelte Zellen parallele Kurvenprofile, jedoch auf nicht signifikant niedrigerem Niveau.

Unter dem Einfluss von Meloxicam stieg von Tag 8 bis Tag 20 die Calciumproduktion kontinuierlich steil an und erreichte in der Endphase der Differenzierung signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe.

Ein vergleichbares Verlaufsprofil zeigte sich unter Diclofenac, mit höheren Werten zwischen Tag 8 und 12, jedoch niedrigeren End-und Maximalwerten.

Indometacin führte zu einer zunächst konstanteren Calciumproduktion bis Tag 12, der ebenfalls ein Kalzifizierungseinbruch folgte. Zwischen Tag 20 und 24 zeigte sich unter Indometacin ein zur Kontrolle identisches Verlaufsprofil.



Abb. 21 Calcium – Content [µg/ml]

Qualitativer Calciumnachweis mittels Färbung nach von Kossa

Die Kontrolle auf Polystyrol zeigte bereits in frühen Phasen kleine Mineralisationszonen, die sich im weiteren Differenzierungszyklus weiter verstärkten. Am 12. Versuchstag fanden sich bereits deutliche Nodules, die sich als schwarz-braune Mineralisationsherde darstellten, deren Kalzifikationsintensität bis Versuchsende stark zunahm.

Die NSAR-behandelten Zellen zeigten ebenfalls einen dem Zellzyklus entsprechenden Mineralisationsverlauf, der sich von dem der Kontrolle im Längsschnitt der Studie nur unwesentlich unterschied. Es stellten sich unter dem Einfluss der NSAR ebenfalls bereits an Tag 4 kleine Mineralisationszonen dar, die sich zum 8. Tag verstärkten und im weiteren Verlauf wie auch die Kontrolle kalzifizierte Nodules aufwiesen.

Innerhalb der NSAR scheinen Diclofenac- und Indometacin-behandelte Zellen nicht signifikant stärkere Mineralisationstendenzen zu zeigen als Meloxicam-behandelte Zellen und die Kontrollgruppe, was sich bis Versuchsende jedoch nivellierte.

hFOB 1.19: Plasma-Dosis-Versuch Färbung nach von Kossa



Abb. 22 hFOB 1.19: Plasma-Dosis-Versuch – Färbung nach von Kossa

Plasma-Dosis-Versuche

Zell-Linie: C3H10T1/2 – BMP-2

Versuchsreihe: Diclofenac, Meloxicam, Indometacin I

Zellzahlbestimmung

Als Proliferationsparameter diente auch in dieser Versuchsreihe die Ermittlung der Zellzahl im 4-Tages-Rhythmus am CASY 1-Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfe System GmbH, Reutlingen).

Zu Versuchsbeginn erfolgte die Aussaat der Zellen sowohl für die NSAR-behandelten wells als auch die Kontrolle auf Polystyrol mit einer Zelldichte von 50 000 Zellen pro ml Suspension.

Es war zunächst bis Tag 8 ein steiler Anstieg der Proliferation zu erkennen, gefolgt von einem Absinken bis Tag 12. Ab Tag 16 zeigte sich wieder ein flacher Anstieg der Zellzahlen für die Kontrolle und die Diclofenac-behandelten Kulturen, die sich bis Versuchsende relativ konstant hielten.

Unter Indometacin und Meloxicam stiegen die Proliferationsraten zwischen Tag 12 und 16 leicht an, flachten jedoch an Tag 20 nochmals ab. Bis Versuchsende erreichten Indometacinbehandelte Zellen mit der Kontrollgruppe vergleichbare Werte, im übrigen Verlauf jedoch deutlich niedrigere Zellzahlen.

Meloxicam-behandelte Kulturen erreichten außer am 20. Tag ein Verlaufsprofil wie es sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Diclofenac zu beobachten war, jedoch auf gering niedrigerem Niveau.



Abb. 23 Cell – Counts [counts/ml]

Proteingehalt

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Methode nach Bradford im 4-Tages-Rhythmus.

Sowohl für die Kontrolle als auch die NSAR-behandelten Kulturen konnte ein kontinuierlicher steiler Anstieg der Proteinkonzentrationen bis Tag 20 registriert werden. Die Kontrolle zeigte in späten Differenzierungsphasen ein Absinken der Proteinwerte auf ein nicht signifikant niedrigeres Niveau. Unter dem Einfluss von Meloxicam verlief die Proteinkurve parallel zu der der Kontrolle, jedoch auf wenig niedrigerem Maximalniveau. Indometacin- und Diclofenac-behandelte Zellen zeigten einen weiteren Anstieg der Proteinproduktion bis Tag 24, der bis Versuchsende abflachte, wobei unter Indometacin durchweg höhere Werte erreicht wurden als unter sonstigen Versuchsbedingungen.



Abb. 24 Protein – Content [mg/ml]

Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Ermittlung der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte im 4-Tages-Rhythmus nach zuvor bereits erläuterter Formel.

Das Verlaufsprofil der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität zeigte sowohl für die Kontrolle als auch die NSAR-behandelten Zellen bis Tag 12 einen steilen Anstieg, dem ein kontinuierliches Absinken der Aktivität bis Tag 20 folgte.

Während unter Meloxicam und Kontrollbedingungen die Aktivitäten zwischen Tag 20 und 28 nahezu konstant blieben, kam es unter Diclofenac und Indometacin zu einem weiteren Aktivitätsverlust.

Im Gesamtverlauf zeigte sich jedoch ein nahezu synchrones Kurvenprofil für NSARbehandelte Zellen und die Kontrollgruppe ohne signifikante Unterschiede im Aktivitätsniveau.



Abb. 25 Alcaline Phosphatase Activity [µmol/min/mg Protein]

Osteocalcin

Die Bestimmung der Osteocalcinwerte erfolgte mittels eines immunradiometrischen Assays aus den im 4-Tages-Rhythmus gwonnenen Zellkulturüberständen.

Von Versuchsbeginn bis Tag 12 stieg sowohl auf Polystyrol als auch unter NSAR-Einfluss die Osteocalcinproduktion kontinuierlich an und flachte bis Tag 20 leicht ab.

In der späten Differenzierungsphase zwischen Tag 20 und 28 konnte ein steiler Anstieg der Osteocalcin-Werte aller Zellkulturen registriert werden, wobei die Kontrolle auf Polystyrol signifikant höhere Maximalwerte erreichte als die NSAR-behandelten Zellen, die sonst ein nahezu paralleles Kurvenprofil jedoch auf niedrigerem Niveau zeigten.



Abb. 26 Osteocalcin – Content [ng/ml]

Prokollagen I

Auf die Bestimmung des Prokollagen I-Gehaltes musste bei der Zell-Linie C3H10T1/2 verzichtet werden, da zu diesem Zeitpunkt kein ELISA mit mausspezifischem Anti-Prokollagen I-Antikörper auf dem Markt erhältlich war.

Prostaglandin E₂

Die Bestimmung der Prostaglandin E_2 -Konzentration erfolgte aus den im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zellkulturüberständen mittels eines Sandwich-ELISA.

Für die Kontrolle auf Polystyrol konnte zu Versuchsbeginn ein hohes PGE_2 – Niveau registriert werden, das bis Tag 8 jedoch steil absank. Die PGE_2 – Produktion erreichte bis Tag 20 ein steady-state, dem sich ein leichter Anstieg an Tag 24 anschloss, gefolgt von einem steilen Absinken bis Tag 28.

Unter dem Einfluss von NSAR konnten nur sehr geringe PGE_2 –Konzentrationen ermittelt werden, die auch im Verlaufsprofil auf konstant niedrigem Niveau sistierten. Lediglich die Meloxicam-behandelten Kulturen zeigten an Tag 12 einen geringen Peak im PGE_2 – Kurvenprofil.

Signifikante Unterschiede der PGE_2 –Konzentrationen konnten außer zu Versuchsbeginn und an Tag 24 weder innerhalb der verschiedenen NSAR noch im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden.



Abb. 27 Prostaglandin E₂ - Content

Calciumbestimmung mittels Atomemissionsspektrometrie

Die Bestimmung der Calciumproduktion erfolgte mittels Atomemissionsspektrometrie aus im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zell-Lysaten am Fraunhofer-Institut Würzburg.

In frühen Differenzierungsphasen zeigten sich vergleichbare Calciumwerte sowohl für die Kontrolle als auch die NSAR-behandelten Zellen mit nicht signifikant höheren Werten unter Diclofenac und Indometacin.

Zwischen Tag 12 und 16 folgt ein steiler Sekretionsanstieg, der für Meloxicam und Indometacin signifikant geringer ausfiel als für Diclofenac und die Kontrolle.

Im späteren Differenzierungszyklus zeigten sich zwischen Tag 20 und 28 nahezu konstant hohe Calcium-Werte für alle Zellkulturbedingungen.

Im Gesamtverlauf konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe auf Polystyrol und den nichtsteroidalen Antiphlogistika registriert werden.



Abb. 28 Calcium-Content [µg/ml]

Qualitativer Calciumnachweis mittels Färbung nach von Kossa

Die Kontrolle auf Polystyrol zeigte an Tag 4 vereinzelt kleine Mineralisationszonen, die sich bis Tag 8 vergrößerten und an Intensität zunahmen.

Ab dem 12. Tag stellten sich größere Mineralisationsherde in Form von kalzifizierten schwarz-braunen Nodules dar, deren Mineralisationsintensität bis Versuchsende weiter anstieg.

Unter dem Einfluss von NSAR zeigte sich im Längsschnitt der Studie keine signifikanten Unterschiede in der Mineralisationstendenz der Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf Polystyrol. Lediglich unter dem Einfluss von Indometacin schienen die Zellen an Tag 24 und 28 unter einem gering stärkeren Mineralisationsreiz zu stehen.

Innerhalb der gewählten NSAR zeigten sich im Verlauf nur zum Teil geringe Mineralisationsunterschiede, die Mineralisationstendenz insgesamt war innerhalb der Versuchszeit von 28 Tagen jedoch durch keine der Substanzen signifikant verändert.

C3H10T1/2-BMP-2: Plasma-Dosis-Versuch Färbung nach v. Kossa

Kontrolle	Diclofenac	Meloxicam	Indometacin
Tag 4			
Tag 8			
Tag 12			
Tag 16			
Tag 20			
Tag 24			

Abb. 29 C3H10T1/2-BMP-2: Plasma-Dosis-Versuch – Färbung nach von Kossa

Nachweis adipocytärer Differenzierung mittels Sudan III – Färbung

Zu Versuchsbeginn zeigte sich in der vorliegenden Studie keine Differenzierung sowohl der Kontrolle als auch der NSAR-behandelten Kulturen zu Adipocyten. Erst ab dem 8. Tag stellten sich erste Lipideinlagerungen in Form leuchtend roter Granula dar, die im weiteren Differenzierungsverlauf zunahmen und Adipocytenherde bildeten.

Vergleichbare Ergebnisse fanden sich auch unter Indometacin, Diclofenac und Meloxicam.

Im Gesamtverlauf ließ sich eine Differenzierung der Zell-Linie zu Adipocyten registrieren, jedoch ohne signifikante Beeinflussung durch die gewählten Substanzen.



C3H10T1/2-BMP-2: Plasma-Dosis-Versuch Sudan-Färbung

Abb. 30 C3H10T1/2-BMP-2: Plasma-Dosis-Versuch – Sudan-Färbung

Bestrahlungs-Versuch

Zell-Linie: hFOB 1.19

Die Bestrahlungs-Versuche mit der Zell-Linie hFOB 1.19 wurden im Vorfeld dieser Untersuchungen von Herrn Dr. med. U. Nöth, Orthopädische Klinik König-Ludwig-Haus Universität Würzburg durchgeführt.

Zell-Linie: C3H10T1/2 – BMP-2

Versuchsreihe: Radiatio I

Zellzahlbestimmung

Als Proliferationsparameter diente auch in dieser Versuchsreihe die Ermittlung der Zellzahl im 4-Tages-Rhythmus am CASY 1-Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfe System GmbH, Reutlingen).

Vier Tage nach der präkonfluenten Bestrahlung zeigten die Kulturen parallele Verlaufskurven der Zellzahlen, den applizierten Strahlendosen entsprechend.

Bis Tag 8 folgte nun ein steiler Anstieg aller Proliferationsraten, der für 1 Gray-bestrahlte Zellen gering höhere Ergebnisse lieferte als für die Kontrollgruppe.

Bis zum 12. Tag stiegen die Werte für 3 und 5 Gray-bestrahlte Zellen weiter steil an, gefolgt von einem kontinuierlich flachen Absinken der Proliferationskurven bis Tag 24 und einem unwesentlichen erneuten Anstieg bis Versuchsende.

Unter einer Bestrahlung mit 7 und 10 Gray konnte ein nur geringer Anstieg der Proliferation bis Tag 28 registriert werden. Beide Kurven zeigten annähernd parallele Verläufe sowohl zueinander als auch zu den mit 3 und 5 Gray-bestrahlten Zellkulturen, auf jedoch deutlich niedrigerem Maximalniveau.

Sowohl für die Kontrolle als auch die 1 Gray-bestrahlten Zellen wurde an Tag 12 ein steiler Knick im Kurvenverlauf registriert, dem ein Anstieg bis Tag 16/20 folgte und ein weiterhin schwankender Verlauf bis Versuchsende.

Von Tag 8 bis Versuchsende zeigten sich unter 1 und 3 Gray Bestrahlung durchweg höhere Werte als unter Kontrollbedingungen, ebenso unter 5 Gray, jedoch nur bis Tag 16.

Der registrierte Einbruch der Zellzahlen für die Kontrolle und die 1 Gray-Gruppe lässt sich am ehesten auf ein Kultivierungs- bzw. Transportproblem zurückführen, da sich sowohl die Kontrolle als auch die 1 Gray-bestrahlten Zellen auf gemeinsamen Platten befanden und dieser Trend im Verlauf der gesamten Versuchsreihe auch nur bezüglich dieses Parameters so eindrücklich zu beobachten war.

Unabhängig davon erscheint ein derart ausgeprägter Proliferationsstimulus durch eine Dosis von 5 Gray eher unwahrscheinlich, was in einem weiteren Versuch zur rtPCR auch bestätigt werden konnte.



Abb. 31 Cell – Counts [counts/ml]

Proteingehalt

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte mit der Methode nach Bradford im 4-Tages-Rhythmus.

Von Versuchsbeginn bis Tag 24 stieg die Proteinproduktion sowohl der Kontrolle als auch der bestrahlten Zellen kontinuierlich an.

Bis zum 8. Tag zeigte sich zunächst kein deutlicher Unterschied zwischen den applizierten Strahlendosen. Erst an Tag 12 wurden niedrigere Werte für 7 und 10 Gray-bestrahlte Zellen registriert als unter den sonstigen Kulturbedingungen. Dieser Trend wurde am 12. Tag noch deutlicher und setzte sich für 10 Gray-bestrahlte Zellen bis Tag 20 fort. An Tag 24 konnte eine gering stärkere Proteinproduktion aller bestrahlten Zellen als unter Kontrollbedingungen registriert werden, gefolgt von einem Absinken aller Verlaufskurven bis Versuchsende.

Die ermittelten Werte unter 1 und 3 Gray lagen außer an Tag 12 während des gesamten Versuchsverlaufes gering über den für die Kontrolle registrierten Proteinkonzentrationen und zeigten annähernd parallele Kurvenverläufe.



Abb. 32 Protein - Content [mg/ml]

Spezifische Alkalische Phosphatase-Aktivität

Die Ermittlung der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität erfolgte im 4-Tages-Rhythmus nach zuvor bereits erläuterter Formel.

Von Versuchsbeginn bis Tag 16 zeigten die Zellen homogen niedrige Werte der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität.

Unter einer Dosis von 10 Gray kam es ab Tag 8 zu einem kontinuierlichen leichten Anstieg der Aktivität bis Tag 20 und einem erneuten steilen Anstieg zwischen Tag 24 und 28.

Im Längsschnitt konnten zu keinem Zeitpunkt weder zwischen den weiteren Strahlendosen noch im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Aktivitätsunterschiede registriert werden.



Abb. 33 Alcaline Phosphatase Activity [µmol/min/mg Protein]

Osteocalcin

Die Bestimmung der Osteocalcinwerte mittels eines immunradiometrischen Assays aus den im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zellkulturüberständen konnte aus messtechnischen Gründen leider nicht durchgeführt werden.

Prokollagen I

Auf die Bestimmung des Prokollagen I-Gehaltes musste bei dieser Zell-Linie verzichtet werden, da zu diesem Zeitpunkt kein ELISA mit mausspezifischem Anti-Prokollagen I-Antikörper auf dem Markt erhältlich war.

Calciumbestimmung mittels Atomemissionsspektrometrie

Die Bestimmung der Calciumproduktion erfolgte mittels Atomemissionsspektrometrie aus im 4-Tages-Rhythmus gewonnenen Zell-Lysaten am Fraunhofer-Institut Würzburg.

Zu Versuchsbeginn zeigten alle Zellen eine relativ homogen hohe Calciumproduktion, wobei jedoch die Werte unter Bestrahlung gering höher lagen als unter Kontrollbedingungen. Die Kontrolle zeigte bis Versuchsende einen leicht schwankenden Kurvenverlauf um den, an Tag 4 ermittelen Basalwert, der nur an Tag 8 und 16 deutlich überschritten wurde. Die höchsten Maximalwerte konnten für 7 und 10 Gray-bestrahlte Zellen an Tag 12 registriert werden, die sich in der Folgezeit jedoch denen der übrigen Strahlendosen wieder annäherten. Weitere deutliche Unterschiede in der Calciumproduktion der Zellen konnten unter den gewählten Bestrahlungsdosen zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.



Abb. 34 Calcium - Content [µg/ml]

Qualitativer Calciumnachweis mittels Färbung nach von Kossa

Die Kontrolle auf Polystyrol zeigte an Tag 4 beginnende Mineralisation, die bis Tag 12 an Intensität zunahm. Bis Versuchsende fanden sich große konfluierende Kalzifizierungsherde und schwarzbraun mineralisierte Nodules.

Unter der Wirkung von 1 Gray Strahlendosis fand sich ein ähnliches Kalzifizierungsbild wie unter Kontrollbedingungen. Die Mineralisation begann jedoch erst an Tag 8, bis Versuchsende fanden sich allerdings vergleichbare Ergebnisse.

Unter einer Dosis von 3 und 5 Gray zeigten die Zellen am 4. und 8. Tag eine deutlich geringere Mineralisation als unter Kontrollbedingungen. Dieser Unterschied fand sich jedoch nur zu Versuchsbeginn und bereits an Tag 12 fanden sich ebenfalls kalzifizierte Nodules.

Ein vergleichbares Kalzifizierungs-Verhalten zeigten die Zellen unter 7 und 10 Gray Radiatio.

Lediglich an Tag 16 und 20 schien unter 10 Gray Bestrahlung die Mineralisationstendenz der Zellen geringer ausgeprägt zu sein als unter den übrigen Kulturbedingungen. An Tag 24 und 28 stellten sich vergleichbare Mineralisationszonen dar, wobei der Eindruck entstand, dass die Dichte der Mineralisation unter 10 Gray geringer war, was jedoch auf die niedrigere Zellzahl unter dieser Strahlendosis zurückzuführen sein dürfte.

C3H10T1/2-BMP-2: Radiatio Färbung nach v. Kossa



Abb. 35 C3H10T1/2-BMP-2: – Färbung nach von Kossa

Nachweis von Adipocyten mittels Sudan III-Färbung

Die Kontrolle auf Polystyrol zeigte an Tag 4 keine Differenzierung zu Adipocyten. Ab Tag 8 ließen sich kleine leuchtend rote Lipidgranula erkennen. Im weiteren Verlauf ließen sich bis Versuchsende zunehmend konfluirende Herde von Adipocten nachweisen, deren Lipideinlagerungen sich als intrazellulär randständige rote Granula darstellten.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich unter 1, 3, 5 und 7 Gray Radiatio, unter 10 Gray fand sich jedoch eine geringere Differenzierungstendenz zu Adipocyten. Zudem entstand der Eindruck, dass es unter Strahlendosen von 7 und 10 Gray vermehrt zur Ausbildung anisozytotischer polynukleären Zellen mit meist auch großen Nukleoli kam.

C3H10T1/2-BMP-2: Radiatio Sudan-Färbung



Abb. 36 C3H10T1/2-BMP-2: Radiatio – Sudan-Färbung

Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkmechanismen der klinisch suffizient angewandten Therapieoptionen zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen in vitro im Zellkultursystem zu eruieren. Hierzu wurde der Einfluss von NSAR und einzeitiger Radiatio auf die Proliferation und Differenzierung von Zellkulturen analysiert.

Um klinisch realistische Voraussetzungen zu schaffen, erfolgte der Einsatz der NSAR Indometacin, Diclofenac und als relativ selektiver COX II-Inhibitor Meloxicam in Patienten-Plasma-Dosen. Hierzu wurden im Vorfeld im Rahmen von Dose-Response-Versuchen die Applikationsmodalitäten und Dosierungen der NSAR auf die gewählten Zellkultursysteme adaptiert. Ebenso wurden Strahlendosen gewählt, die je nach Regime auch therapeutisch zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen appliziert werden.

Die Wirkung der NSAR auf die Prophylaxe heterotoper Ossifikationen lässt sich ansatzweise unter Beachtung der Pathogenese und den Eingriff der Substanzgruppe in das lokale Entzündungsgeschehen erklären, wie zuvor bereits eingehend diskutiert.

Angriffspunkt der NSAR stellen die durch Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren induzierbaren Cyclooxygenasen, insbesondere die Cyclooxygenase II dar, die das Schlüsselenzym der Prostaglandinsynthese (PGE₂), bildet.

Der Wirkmechanismus einer entweder präoperativ einzeitigen oder direkt postoperativ einzeitigen oder fraktionierten Radiatio beruht auf einer direkten DNA-Schädigung mitotisch stark aktiver Osteoprogenitorzellen, wodurch eine reguläre Transkription verhindert und somit auch die zelluläre Grundlage der heterotopen Ossifikation wirkungsvoll ausgeschaltet wird.

Entscheidungskriterium zur Auswahl der eingesetzten Zellkulturmodelle hFOB 1.19 und C3H10T1/2 – BMP-2 bildeten die Hypothesen zur Entstehung heterotoper Ossifikationen. So kann die humane fetale Osteoblastenzell-Linie hFOB 1.19 in diesem Zusammenhang als determined osteoblastic progenitor cell und die murine mesenchymale Zell-Linie C3H10T1/2 –BMP-2 als inducable osteoblastic progenitor cell angesehen werden.

Einfluss von NSAR auf Proliferation und Differenzierung der Zell-Linie hFOB 1.19

Die Zell-Linie hFOB 1.19 bietet aufgrund ihres humanen Ursprungs und der reproduzierbaren Expression osteogener Marker wie Alkalische Phosphatase, Prokollagen I und Osteocalcin die Möglichkeit, den humanen in vivo Osteogeneseprozess in vitro im Zellkultursystem zu imitieren.

Die Zell-Linie hFOB 1.19 zeigt postkonfluent eine programmierte Differenzierung bis hin zur Bildung mineralisierter Nodules, deren Nachweis durch die Färbung nach von Kossa erfolgt.

Die präkonfluente Phase ist geprägt von schneller Proliferation der noch gering differenzierten Zellen und anschließender postkonfluenter Expression osteoblastenspezifischer Parameter.

In den vorliegenden Versuchsreihen zeigt sich ebenfalls in den frühen Phasen zunächst eine rasche Proliferation der Zellen bis zum 16. Versuchstag, während unter dem Einfluss von Diclofenac eine geringere Proliferationshemmung zu beobachten ist als unter Indometacin und Meloxicam.

Im Längsschnitt des Proliferationszyklus sind keine deutlich cytotoxischen oder signifikant inhibierenden Einflüsse der NSAR zu erkennen, was auch mit Beobachtungen der Dose-Response-Versuche in diesem Dosisbereich korreliert. Als früher Differenzierungsparameter dient die Bestimmung der spezifischen Alkalischen Phosphatase Aktivität, die während der frühen Phase der intramembranösen Differenzierung im Osteoblasten lokalisiert ist und später in Matrixvesikeln in den Extrazellularraum sezerniert wird, um in den initialen Ossifikationsprozess einzugreifen [16; 18; 20; 21].

In vorliegender Studie steigt die Aktivität der spezifischen Alkalischen Phosphatase in frühen Zyklusphasen kontinuierlich bis zum Erreichen eines Steady-state bis Tag 20 an, wobei auf Polystyrol eine geringere Expression der Alkalischen Phosphatase Aktivität zu verzeichnen ist als unter dem Einfluss der NSAR.

Dieser Effekt lässt sich durch eine Hemmung der Prostaglandin E_2 – Synthese durch die angewandten Substanzen erklären, da der Einfluss von endogenem PGE₂ zur Expressionshemmung der Alkalischen Phosphatase führt. Unter Prostaglandin E_2 - Blockade kommt es sukzessiv zu einem massiven Anstieg der Alkalischen Phosphatase Aktivität, wie dies auch Igarashi et al. [60] in ihren Zellkulturstudien zur Wirkung von Indometacin auf die osteogenen Funktionen der Zell-Linie MC3T3-E1 beobachten.

PGE₂ scheint also in diesem Zusammenhang als autokriner Mediator zur Regulation der Alkalischen Phosphatase Aktivität zu fungieren, dessen Wirkung über eine Regulation des 3'5'-cAMP-Spiegels und Stimulation des Adenylatcyclase-Systems, wie auch bereits in früheren Studien beobachtet, vermittelt wird [60; 68; 94]

Eine Expression der späten osteoblastären Differenzierungsparameter Prokollagen I und Osteocalcin findet sich in der vorliegenden Studie bereits von Versuchsbeginn an unter allen Kulturbedingungen.

Osteocalcin, das als Polypeptid in die Knochenmatrix eingebaut wird, bildet den Hauptanteil des nicht-kollagenen Proteins im Knochen. Die biologische Funktion des Osteocalcins ist bisher zwar noch umstritten, man geht jedoch davon aus, dass für die Funktion des Osteocalcins die hohe Bindungsfähigkeit der drei Gammacarboxyglutaminsäurereste für Hydroxylapatit und Calcium verantwortlich ist.

Auf Polystyrol findet sich in dieser Studie a priori eine nicht signifikant höhere Osteocalcin-Expression als unter dem Einfluss der NSAR. In den frühen Differenzierungsphasen beobachtet man zunächst einen kontinuierlichen Anstieg der Osteocalcinproduktion bis zum 20. Versuchstag, dem in der späten Differenzierung ein steiler Expressionsanstieg folgt, der unter dem Einfluss von Meloxicam und Indometacin nicht signifikant geringer ausfällt.

In einer Studie zur Rolle des PGE_2 in der Regulation der Osteocalcinsynthese am humanen Zellkultursystem beobachtet auch die Arbeitsgruppe um Evans [44] keine Effekte von Indometacin in vergleichsweise auch unsererseits gewählter Dosierung, auf die Osteocalcinsynthese, obgleich auch in dieser Dosierung die basale PGE_2 –Produktion suffizient blockiert und somit der inhibierende Effekt des PGE_2 auf die Osteocalcinproduktion reduziert wird, und folglich mit einem Anstieg der Osteocalcinwerte zu rechnen wäre.

Die von Osteoblasten gebildete extrazelluläre Matrix enthält als vorherrschendes Protein Kollagen Typ I, das als hochmolekulares, lösliches Vorläufermolekül Prokollagen von den Zellen sezerniert wird und extrazellulär proteolytisch in ein aminoterminales und ein carboxyterminales Fragment gespalten wird. Während das N-terminale Fragment in die Matrix eingebaut wird, erscheint das C-terminale Fragment als lösliches Produkt in der Extrazellularflüssigkeit und lässt sich enzymimmunometrisch nachweisen.

Unter den gewählten Kulturbedingungen zeigt die Osteoblastenzelle hFOB 1.19 eine kontinuierlich steigende Prokollagen I - Produktion, jedoch ohne signifikante Expressions-Steigerung in späten Differenzierungsphasen.

Kurzzeitig kann zwischen dem 12. und 20. Versuchstag unter dem Einfluss von Diclofenac und Meloxicam ein nicht signifikanter Anstieg der Prokollagen I-Sekretion registriert werden, der auf den verminderten PGE₂ –Spiegel zurückzuführen sein dürfte.

Kawaguchi et al. [68] konnten in einer Studie zur Rolle des PGE_2 in der Regulation der Kollagensynthese reifer Osteoblasten inhibierende Effekte des PGE_2 auf die Kollagenexpression registrieren. Kommt es nun zu sinkenden PGE_2 –Spiegeln, entfällt dieser inhibierende Effekt, wodurch sich der auch unsererseits beobachtete Anstieg des Prokollagengehaltes erklären ließe. Indometacin hingegen beeinflusst unter gegebenen Bedingungen die Prokollagen I-Sekretion nicht.

Diese Beobachtung korrespondiert auch mit den tierexperimentellen Studien von Törnkvist et al. [124; 125] zum Einfluss von Indometacin auf den Knochenmetabolismus an Ratten, die ebenfalls, auch unter dreiwöchiger Indometacingabe, keine inhibierenden Einflüsse auf die Kollagensynthese registrieren konnten.

Unter den gewählten Zellkulturbedingungen kann erstmals auch die aktive Synthese von Prostaglandinen durch die Zell-Linie hFOB 1.19 nachgewiesen werden.

Aus der Gruppe der Prostaglandine scheint insbesondere PGE_1 und PGE_2 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung heterotoper Ossifikationen zuzukommen.

Diese, posttraumatisch in der Frühphase freigesetzten Substanzen, lösen primär durch Vasodilatation eine Entzündungsreaktion und somit Migration und Proliferation von Mesenchymzellen aus [14;16; 21; 43; 48; 49; 60; 68; 100; 101; 116; 117; 118].

PGE₂ erfüllt hierbei eine Aufgabe als Entzündungsmediator, trägt zur Knochenresorption bei und setzt somit Knochenmatrix und BMP zur Resorption durch Osteoklasten frei. Hierdurch erfolgt sukzessiv eine Induktion von Osteoklastenprecursorzellen, was wiederum zu einer gesteigerten Osteoklastenaktivität und somit zu einer verstärkten Knochenresorption beiträgt, die als Grundvoraussetzung für die Entstehung heterotoper Ossifikationen zu werten ist.

In tierexperimentellen Studien lässt sich zudem eine direkte knocheninduktive Wirkung mit nachfolgender Osteoblastendifferenzierung der Prostaglandine nachweisen [107; 10; 16; 39].

In unserer Studie zeigt sich unter dem Einfluss der NSAR eine massive Suppression der Prostaglandinsynthese von Versuchsbeginn an, während zeitgleich die Kontrolle auf Polystyrol sowohl in frühen als auch in späten Differenzierungsphasen Expressionsmaxima zeigt.

Korrespondierend steigt unter der PGE_2 -Suppression die Expression der spezifischen Alkalischen Phosphatase-Aktivität an, wie zuvor bereits diskutierte Hypothesen zur Regulation der spezifischen Alkalischen Phosphatase Aktivität durch Prostaglandine auch bestätigen.

Diese Beobachtung unterstreicht, dass die in der vorgestellten Studie eingesetzten Medikamentendosen, die den klinisch angewandten entsprechen, auch in vitro im standardisierten humanen Osteoblastenmodell eine suffiziente, nachvollziehbare Hemmung der Cyclooxygenasen bewirken, und somit den in vivo Osteosyntheseprozess hinreichend imitieren.

Mittels Färbung nach von Kossa gelingt es, den in der Literatur beschriebenen Mineralisationsverlauf extrazellulärer Matrix der Zell-Linie hFOB 1.19 zu dokumentieren.

Es zeigen sich in der Färbung nach von Kossa bereits in frühen Differenzierungsphasen kleine Mineralisationsherde, deren Kalzifizierungstendenz im weiteren Verlauf zunimmt. Mit Erreichen der späten Differenzierungsphase lassen sich deutliche konfluierende braunschwarze Nodules als Zonen hoher Mineralisation darstellen. Die NSAR-behandelten Zellen zeigen ebenfalls einen, dem Zellzyklus entsprechenden Mineralisationsverlauf, der sich von dem der Kontrolle im Längsschnitt der Studie nur

unwesentlich unterscheidet. Es stellen sich unter dem Einfluss der NSAR ebenfalls bereits in frühen Phasen kleine Mineralisationszonen dar, die sich zum 8. Tag verstärken und im weiteren Verlauf wie auch die Kontrolle kalzifizierte Nodules aufweisen.

Innerhalb der NSAR scheinen phasenhaft Diclofenac- und Indometacin-behandelte Zellen nicht signifikant stärkere Mineralisationstendenzen zu zeigen als Meloxicam-behandelte Zellen und die Kontrollgruppe. Dieser Effekt nivelliert sich jedoch im Gesamtverlauf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Nichtsteroidale Antiphlogistika den Mineralisationsprozess der Zell-Linie hFOB 1.19 nicht signifikant beeinflussen.

In der quantitativen Calcium-Analyse mittels Atomemissionsspektrometrie erreicht die Kontrolle zu Versuchsbeginn relativ hohe Basalwerte, die bis zum 8.Tag steil absinken und bis zum 12. Tag konstant auf diesem Niveau sistieren.

In späteren Phasen ist ein erneuter Calciumanstieg zu verzeichnen, der jedoch zu späteren Differenzierungszeitpunkten wieder abflacht.

In frühen Phasen zeigen Diclofenac- und Meloxicam-behandelte Zellen parallele Kurvenprofile zur Kontrollgruppe, jedoch auf niedrigerem Niveau.

Unter dem Einfluss von Meloxicam steigt von Tag 8 bis Tag 20 die Calciumproduktion kontinuierlich steil an und erreicht signifikant höhere Werte als die Kontrollgruppe.

Ein vergleichbares Verlaufsprofil zeigt sich unter Diclofenac, mit höheren Werten zwischen Tag 8 und 12, jedoch niedrigeren End-und Maximalwerten.

Indometacin führt zu einer zunächst konstanteren Calciumproduktion in frühen Phasen, der ebenfalls ein Expressionseinbruch folgt. In späten Differenzierungsphasen zeigt sich unter Indometacin ein der Kontrolle identisches Verlaufsprofil.

Diese Beobachtungen, insbesondere der Indometacin-behandelten Zellen, werden auch durch die Untersuchungen von Igarashi et al. [60] bestätigt, die in Untersuchungen zur Rolle von endogenem PGE_2 in der Regulation osteoblastenspezifischer Leistungen der Zell-Linie MC3T3-E1 außer in sehr hohen Dosen keine inhibierenden Effekte von Indometacin auf die Akkumulation und Produktion von Calcium sowie die Mineralisation verzeichnen konnten.

Einfluss von NSAR auf Proliferation und Differenzierung der Zell-Linie C3H10T1/2-BMP-2

Im folgenden Zellkulturmodell handelt es sich um eine mesenchymale Vorläuferzelle, die aus Mausembryonen isoliert und mit einem eukaryonten Vektor, der die cDNA des human bone morphogenic protein BMP-2 trägt, transfiziert wurde.

Ursprünglich ist diese Zell-Linie unter Zugabe spezifischer Wachstumsfaktoren in der Lage, zu Myocyten, Adipocyten oder Chondrocyten zu differenzieren.

Durch permanente Transfizierung der Gene für BMP-2 war es möglich, die Differenzierung zu Osteoblasten, Adipocyten und Chondrocyten zu stimulieren und den ursprünglichen fibroblastären Charakter der Zelle zu eliminieren.

Durch postkonfluente Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat, wie dies auch in vorliegender Studie erfolgte, gelingt es, die murine mesenchymale Zell-Linie C3H10T1/2 – BMP-2 zu osteoblastärer Differenzierung zu induzieren, die somit in diesem Sinne als inducable osteoblastic progenitor cell (IOPC) angesehen werden kann.

Wie aus vorangegangenen Studie bekannt [7], findet sich auch in unseren Experimenten in den frühen Phasen des Zellzyklus zunächst ein steiler Proliferationsanstieg, gefolgt von einem Absinken der Proliferationskinetiken.

In späteren Phasen zeigt sich erneut ein flacher Proliferationsanstieg sowohl der Kontrolle als auch der Diclofenac-behandelten Kulturen mit Konstanz bis Versuchsende. Zeitgleich steigen unter Indometacin und Meloxicam die Proliferationsraten gering an, flachen jedoch in späteren Phasen erneut ab.

Bis Versuchsende erreichen Indometacin-behandelte Zellen mit der Kontrollgruppe vergleichbare Kinetiken, im übrigen Verlauf jedoch nicht signifikant niedrigere Zellzahlen.

Meloxicam-behandelte Kulturen erreichen außer am 20. Tag ein Verlaufsprofil, wie es sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Diclofenac zu beobachten ist, jedoch auf geringfügig niedrigerem Niveau.

Wie aus der Literatur bekannt, kommt es unter dem Einfluss Nichtsteroidaler Antiphlogistika zu einer Hemmung der Proliferationskinetik auch der gewählten Zell-Linie.

Die gewonnenen Daten zur Proliferationskinetik korrespondieren mit Untersuchungen von Moed B. R. et al. [92], die inhibierende Effekte nichtsteroidaler Antiphlogistika auf die Proliferation mesenchymaler Zellen und damit korrelierend verminderte Synthese osteogener und cartilaginärer Parameter und sinkendes remodeling Havers 'scher Systeme beschreiben.

Als früher Differenzierungsparameter wird auch für dieses Zellkulturmodell die Aktivität der spezifischen Alkalischen Phosphatase herangezogen.

Dem Differenzierungszyklus entsprechend, zeigt das Verlaufsprofil zu Beginn sowohl für die Kontrolle als auch die NSAR-behandelten Zellen einen steilen Aktivitätsanstieg, dem ein kontinuierlicher Expressionsverlust bis Tag 20 folgt.

Während unter Meloxicam und Kontrollbedingungen die Aktivitäten in späten Zyklusphasen nahezu konstant persistieren, ist unter Diclofenac und Indometacin ein weiterer Aktivitätsverlust zu verzeichnen.

Im Gesamtverlauf zeigt sich jedoch ein nahezu synchrones Verlaufsprofil für NSARbehandelte Zellen und die Kontrollgruppe ohne signifikante Unterschiede im Aktivitätsniveau.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die eingesetzten NSAR entweder die Cyclooxygenasen dieser Zell-Linie weniger stark beeinflussen als die der humanen

Osteoblastenzelle hFOB 1.19, oder PGE_2 an beschriebener Regulationsstelle nicht als induzierender autokriner Mediator der ALP-Aktivität fungiert.

Das ausschließlich von Osteoblasten exprimierte Osteocalcin konnte ebenfalls in Studien von Ahrens et al. [7] bei der Kultivierung der Zelle-Linie C3H10T1/2 unter BMP-2-Transfizierung in späten Differenzierungsphasen nachgewiesen werden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen wird als Parameter der späten osteogenen Differenzierung die Osteocalcin-Sekretion der Zell-Linie immunradiometrisch bestimmt.

Bereits in frühen Differenzierungsphasen steigt sowohl auf Polystyrol als auch unter NSAR-Einfluss die Osteocalcinproduktion kontinuierlich an und flacht bis Tag 20 leicht ab.

In der späten Differenzierungsphase kann ein steiler Anstieg der Osteocalcin-Werte aller Zellkulturen registriert werden, wobei die Kontrollgruppe deutlich höhere Maximalwerte erreicht als die NSAR-behandelten Zellen, die sonst ein nahezu paralleles Verlaufsprofil, jedoch auf niedrigerem Niveau, zeigen.

Anhand der gewonnenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass in vitro die Osteocalcin-Sekretion in frühen Differenzierungsphasen nahezu unbeeinflusst bleibt und erst in späteren Phasen des Zellzyklus einer signifikanten Suppression aufgrund bisher nicht reproduzierbarer Regulationsmechanismen unterliegt.

In unserer Studie kann bereits in frühen Phasen der Zelldifferenzierung eine hohe basale PGE₂–Sekretion nachgewiesen werden, der in späteren Phasen auch auf Polystyrol ein signifikanter Expressionseinbruch folgt. Erst in späteren Phasen kann ein erneuter Anstieg der PGE₂-Synthese registriert werden.

Unter dem Einfluss der NSAR ist von Versuchsbeginn an eine massive Suppression der Prostaglandinsynthese zu verzeichnen, während zeitgleich die Kontrolle auf Polystyrol sowohl in frühen als auch späten Differenzierungsphasen Expressionsmaxima zeigt.

Aufgrund der gewonnenen Daten scheint auch diese mesenchymale Progenitorzelle über ein, durch Prostaglandinsynthese-Inhibitoren regulierbares, Cyclooxygenase-Systeme zu verfügen. Entgegen der Beobachtungen im humanen Osteoblastenmodell findet sich hier kein direkter Zusammenhang zwischen Prostaglandinsynthese-Suppression und sukzessiver Regulation der Expression spezifischer alkalischer Phosphatase Aktivität.

Unter den beschriebenen Kulturbedingungen gelingt es, als Kriterium osteogener Differenzierung sowohl aktive Calciumsekretion als auch Mineralisation extrazellulärer Matrix der Zell-Linie C3H10T1/2 - BMP-2 nachzuweisen.

Die atomemissionsspektrometrisch gewonnenen Daten zeigen unter Kontrollbedingungen in frühen Phasen eine steil ansteigende Calciumproduktion der Zellen an, die in den folgenden Phasen signifikant sinkt. Parallel hierzu verhalten sich auch die Verlaufsprofile unter NSAR-Einfluß, mit jedoch deutlich niedrigeren Werten für Indometacin- und Meloxicam- als für Diclofenac-behandelte Kulturen.

Im späteren Differenzierungszyklus zeigen sich konstant hohe Calcium-Werte für alle Zellkulturbedingungen.

Im Gesamtverlauf der Studie wird die Calciumproduktion von den gewählten Substanzen nicht signifikant beeinflußt, wobei jedoch in mitlleren Differenzierungsphasen deutlich inhibierende Einflüsse von Indometacin und Meloxicam zu verzeichnen sind.

Zum Nachweis der Mineralisierung extrazellulärer Matrix und damit osteogener Differenzierung erfolgt der qualitative Calciumnachweis mittels Färbung nach von Kossa.

Bereits in frühen Phasen stellen sich für die Kontrolle auf Polystyrol vereinzelt kleine Mineralisationszonen dar, die bis Tag 8 expandieren und in der Folge an Intensität zunehmen. In späteren Differenzierungsphasen formieren sich größere Mineralisationsherde in Form kalzifizierter schwarz-brauner Nodules, deren Mineralisationsintensität bis Versuchsende weiter ansteigt.

Unter dem Einfluss von NSAR unterscheiden sich im Längsschnitt der Studie die Mineralisationstendenzen nicht signifikant von denen der Kontrollgruppe auf Polystyrol. Lediglich zu späten Differenzierungszeitpunkten scheint Indometacin einen gering stärkeren Mineralisationsreiz auf die Zellen auszuüben als Diclofenac und Meloxicam. Innerhalb der zeigen übrigen Verlauf nur gewählten NSAR sich im zum Teil geringe Mineralisationsunterschiede, die Mineralisationstendenz insgesamt ist innerhalb der Versuchszeit von 28 Tagen jedoch durch keine der Substanzen signifikant verändert.

Diese Beobachtungen lassen sich mit Untersuchungen von Törnkvist et al [124; 125] zum Einfluß von Indometacin auf den experimentellen Knochenmetabolismus von Ratten vereinbaren. So konnte auch diese Arbeitsgruppe keine Effekte von Indometacin auf die Mineralisation von demineralized-bone-matrix- Implantaten registrieren.

Da die Zell-Linie auch unter BMP-2-Transfizierung prinzipiell die Potenz zur Differenzierung zu Adipocyten und Chondrocyten besitzt, führen wir in dieser Untersuchung zum Nachweis von Adipocyten eine Sudan III-Färbung zur Darstellung von Lipidgranula durch.

Wie aus vorangegangenen Studien [7] bekannt, zeigt sich auch in der vorliegenden Studie in frühen Zyklusphasen keine Differenzierung der Kontrolle zu Adipocyten. Erst ab dem 8. Tag stellen sich erste Lipideinlagerungen in Form leuchtend roter Granula dar, die im weiteren Differenzierungsverlauf zunehmen und Adipocytenherde bilden.

Vergleichbare Ergebnisse finden sich auch unter Indometacin, Diclofenac und Meloxicam, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Differenzierungstendenz zu Adipocyten von den gewählten Substanzen in der angewandten Dosierung unbeeinflusst bleibt.

Eine Differenzierung zu Chondrocyten lässt sich mit Hilfe der Alcianblau 8 G-Färbung unter den gewählten Kulturbedingungen nicht nachweisen.

Unter Berücksichtigung aller gewonnenen Daten gelingt es in unserer Studie zu zeigen, dass die murine mesenchymale Progenitorzelle C3H10T1/2 unter BMP-2-Transfizierung und der Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat zu osteoblastärer Differenzierung induziert wird, osteogene Eigenschaften entwickelt und im Längsschnitt der Studie deutliche Mineralisationstendenz aufweist. Bezüglich der Expression osteogener Marker bleibt dieses Zellkultursystem von Nichtsteroidalen Antiphlogistika außer in der Spätphase der Osteocalcin- und mittleren Differenzierungsphase der Calcium-Sekretion nahezu unbeeinflusst.

Einfluss von Radiatio auf Proliferation und Differenzierung der Zell-Linie C3H10T1/2-BMP-2

Klinisch zu beobachtende Erfolge einer präoperativen oder direkt postoperativ einzeitigen oder fraktionierten Radiatio dürften nach heutigem Kenntnisstand auf direkter DNA-Schädigung mitotisch stark aktiver und daher relativ strahlensensibler pluripotenter mesenchymaler Progenitorzellen beruhen, wodurch eine reguläre Transkription verhindert und somit die osteogene Differenzierung als Grundlage heterotoper Ossifikationen wirkungsvoll ausgeschaltet wird.

Da nach Craven und Urist die Osteoinduktion in eine migratorisch-proliferative Phase innerhalb der ersten Woche und die anschließende Differenzierungsphase im Laufe der zweiten Woche gegliedert werden kann, sollte eine prophylaktische Bestrahlungstherapie darauf zielen, den initialen Schritt der Osteoidbildung suffizient zu durchbrechen, weshalb eine postoperative Radiatio innerhalb der ersten Tage nach beschriebener Mesenchymzell-Induktion erfolgen sollte.

In der vorliegenden Studie kommen Bestrahlungsdosen von 1, 3, 5, 7 und 10 Gray zum Einsatz. Die Applikation erfolgt einzeitig präkonfluent sechs Stunden nach Aussaat der Zellen am Institut für Strahlentherapie der Universität Würzburg. Als Strahlungsquelle dient ein ⁶⁰Co-Strahler.

In der frühen Proliferationsphase zeigen die Kulturen den applizierten Strahlendosen entsprechend parallele Verlaufskurven der Proliferationskinetiken, denen ein steiler Anstieg aller Proliferationsraten folgt, der für 1 Gray-bestrahlte Zellen nicht signifikant höhere Ergebnisse liefert als für die Kontrollgruppe.

Unter Bestrahlungsdosen von 7 und 10 Gray kann lediglich eine geringe Proliferation während des gesamten Proliferations- und Differenzierungszyklus registriert werden. Beide Kurven zeigen annähernd parallele Verläufe sowohl zueinander als auch zu den mit 3 und 5 Gray bestrahlten Zellkulturen, auf jedoch deutlich niedrigerem Maximalniveau.

Wie in einer Studie von Matsumura, S. et al. [88], kommt es auch in der vorliegenden Studie zu einer Induktion der Zellproliferation durch Strahlendosen von 1 und ebenso 3 Gray. Unter den gewählten Versuchsbedingungen lässt sich auch unter 5 Gray Bestrahlung noch ein Proliferationsreiz erkennen, der jedoch kritisch diskutiert werden muss, da sowohl in späteren Untersuchungen dieser nicht nachvollziehbar ist als auch in Matsumuras Experimenten unter 5 Gray ein deutlicher Proliferationsrückgang zu verzeichnen ist.

Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Daten schließen, dass Strahlendosen von 1, 3 und 5 Gray eine Induktion der Proliferationskinetik verursachen, höhere Dosen hingegen die Proliferation deutlich inhibieren und terminale Differenzierung initiieren.

Die Aktivität der spezifischen Alkalischen Phosphatase als früher Differenzierungsparameter steigt unter Kontrollbedingungen und low-dose Radiatio in frühen und mittleren Differenzierungsphasen nur geringfügig an.

Unter einer Dosis von 10 Gray kommt es bereits in frühen Phasen zu einem kontinuierlich leichten Anstieg der Aktivität bis Tag 20 und einer erneut steilen Expression zu späteren Differenzierungszeitpunkten.

So lassen sich bereits in frühen Phasen höhere Aktivitäten für high-dose bestrahlte Zellen registrieren als für die Kontrolle, denen in späten Phasen Expressionsmaxima der 10 Gray bestrahlten Zellen folgen. Konsequent niedrigere Aktivitätsmaxima können unter Kontrollbedingungen und low-dose Radiatio ermittelt werden.

Tendenziell korrelieren diese Ergebnisse mit Beobachtungen der Arbeitsgruppen um Matsumura [88] und Dare [33], die ebenfalls unter high-dose Radiatio (5/10 Gray) signifikant höhere Werte der ALPase-Aktivität verzeichnen konnten als unter Kontrollbedingungen, obgleich regulierend induzierende Mechanismen auch in der einschlägigen Literatur bisher nicht zu eruieren sind.

Mineralisationstendenzen lassen sich bereits in frühen Phasen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter high- und low-dose Bestrahlung mittels Färbung nach von Kossa nachweisen, obgleich der Mineralisationsbeginn unter Radiatio tendenziell später einsetzt.

In späten Differenzierungsphasen zeigen sich keine signifikanten Mineralisationsunterschiede für 3 und 5 Gray bestrahlte Zellen, so finden sich ebenfalls kalzifizierte Nodules wie auch unter Kontrollbedingungen.

Vergleichbare Ergebnisse liefern auch high-dose bestrahlte Zellen, obgleich die Dichte der Mineralisation unter 10 Gray Bestrahlung aufgrund niedrigerer Zellzahlen geringer erscheint. Auch atomemissionsspektrometrisch gewonnene Daten belegen eine Stimulation der aktiven Calciumsekretion bereits zu frühen Differenzierungszeitpunkten, insbesondere unter Dosen von 7 und 10 Gray. Korrelierende Ergebnisse unter 10 Gray Bestrahlung finden sich auch in Studien von Matsumura et al. [88].

Zu Versuchsbeginn läßt sich für alle Zellen eine relativ homogen hohe Calciumproduktion nachweisen, obgleich die Expressionsmaxima unter Bestrahlung gering höher liegen als unter Kontrollbedingungen.

Die Kontrolle zeigt bis Versuchsende einen leicht schwankenden Kurvenverlauf um den zu Beginn ermittelen Basalwert, der nur in mittleren Differenzierungsphasen deutlich überschritten wird.

Im weiteren Längsschnitt der Studie können keine signifikanten Einflüsse der gewählten Strahlendosen auf die aktive Calciumsekretion der Zell-Linie registriert werden.

Ursache hierfür dürfte eine Interaktion der Bestrahlung mit Matrixproteinen wie Osteopontin, Osteocalcin und Kollagen Typ I sein, die in den Kalzifizierungsprozess regulierend eingreifen [88].

Adipocytäre Differenzierung lässt sich wie auch in früheren Studien [7] unter allen Kulturbedingungen zu frühen Differenzierungszeitpunkten nicht nachweisen.

Erst ab Tag 8 lassen sich kleine Adipocytenansammlungen erkennen, deren Lipideinlagerungen sich als intrazellulär randständige rote Granula darstellen. In späteren Differenzierungsphasen formieren sich zunehmend konfluierende Adipocytenherde.

Ähnliche Ergebnisse lassen sich unter 1, 3, 5 und 7 Gray Radiatio darstellen, unter 10 Gray findet sich jedoch eine geringere Differenzierungstendenz zu Adipocyten.

Suspekt erscheint in der high-dose bestrahlten Gruppe die vermehrte Bildung megaloblastärer, polynukleärer Zellen, wodurch sich das Zellbild ausgeprägt anisozytotisch darstellt, was als Zeichen direkt schädigender Strahlenwirkung zu interpretieren sein dürfte.

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss Nichtsteroidaler Antiphlogistika und einzeitiger präkonfluenter Radiatio auf Proliferation und Differenzierung der Zellkulturmodelle hFOB 1.19 und C3H10T1/2 – BMP-2 zu analysieren, die klinisch zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen suffizient eingesetzt werden.

Um die klinisch zu beobachtenden Effekte der angewandten Prophylaxemethoden realistisch im Zellkultursystem analysieren zu können, erfolgte der Einsatz der Nichtsteroidalen Antiphlogistika Indometacin, Diclofenac und als relativ spezifischer COX II-Inhibitor Meloxicam in der üblichen Patienten-Plasma-Dosis nach Adaptation der Applikationsmodalitäten und Dosierungen auf die gewählten Zellkultursysteme.

Ebenso wurden Strahlendosen gewählt, die je nach Regime auch therapeutisch zur Prophylaxe heterotoper Ossifikationen appliziert werden.

Entscheidungskriterium zur Auswahl der eingesetzten Zellkulturmodelle hFOB 1.19 und C3H10T1/2 – BMP-2 bildeten die Hypothesen zur Entstehung heterotoper Ossifikationen.

So kann die humane fetale Osteoblastenzell-Linie hFOB 1.19 in diesem Zusammenhang als determined osteoblastic progenitor cell und die murine mesenchymale Zell-Linie C3H10T1/2 –BMP-2 als inducable osteoblastic progenitor cell angesehen werden.

Die Zell-Linie hFOB 1.19 bietet aufgrund ihres humanen Ursprungs und der reproduzierbaren Expression osteogener Marker die Möglichkeit, den humanen in vivo Osteogeneseprozess in vitro im Zellkultursystem zu imitieren.

Präkonfluent ist der Zellzyklus geprägt von schneller Proliferation und postkonfluent programmierter Differenzierung mit Expression osteoblastenspezifischer Parameter bis hin zur Mineralisation extrazellulärer Matrix.

Im Längsschnitt des Proliferationszyklus lassen sich in der vorliegenden Studie keine zytotoxischen oder signifikant inhibierenden Effekte der NSAR Diclofenac, Meloxicam und Indometacin auf die Proliferation erkennen.

In frühen Phasen osteogener Differenzierung steigt die Expression der spezifischen Alkalischen Phosphatase Aktivität kontinuierlich an. Unter dem Einfluss Nichtsteroidaler Antiphlogistika kann in der vorliegenden Studie eine gesteigerte Expression der spezifischen Alkalischen Phosphatase Aktivität nachgewiesen werden, die sich über eine Interaktion mit PGE₂ erklärt.

Anhand der vorliegenden Daten und früherer Studien am Zellkulturmodell [60] kann davon ausgegangen werden, dass PGE₂ in diesem Zusammenhang als autokriner Mediator zur Regulation der spezifischen alkalischen Phosphatase Aktivität fungiert, dessen Wirkung über Regulation des 3'5'cAMP- Spiegels und Stimulation des Adenylatcyclase-Systems vermittelt wird.

Zum Nachweis osteogener Differenzierung wird in vorliegender Studie als osteoblastenspezifischer Parameter später Differenzierungsphasen die Expression von Prokollagen I und Osteocalcin bestimmt.

A priori lässt sich in der vorliegenden Studie eine basale Osteocalcin-Sekretion nachweisen, der ein steiler Expressionsanstieg in späten Differenzierungsphasen folgt, der unter den eingesetzten NSAR nicht signifikant geringer ausfällt.

Auch in Studien der Arbeitsgruppe um Evans [44] am humanen Zellkultursystem konnten keine Effekte von Indometacin in der, vergleichsweise auch unsererseits gewählten Dosierung, auf die Synthese von Osteocalcin registriert werden, obgleich auch in diesem Dosisbereich die basale PGE₂ –Produktion suffizient blockiert und somit der inhibierende

Effekt des PGE₂ auf die Osteocalcinexpression reduziert wird, und folglich mit einem Anstieg des Osteocalcin unter Therapie mit NSAR zu rechnen wäre.

Die enzymimmunometrisch bestimmten Daten der Prokollagen I – Sekretion zeigen nur in späten Differenzierungsphasen unter Diclofenac und Meloxicam einen nicht signifikanten Anstieg der Prokollagen I – Sekretion, der auf verminderte PGE₂–Spiegel zurückzuführen ist.

Obgleich Indometacin ebenfalls dieser Substanzgruppe zuzurechnen ist, scheint unter gegebenen Bedingungen die Prokollagen I –Sekretion unbeeinflusst zu bleiben, wie dies auch korrespondierend in Studien von Törnkvist et al. [124; 125] bestätigt wird.

Unter den gewählten Kulturbedingungen kann erstmals die aktive Sekretion von Prostaglandinen durch die humane fetale Osteoblastenzelle hFOB 1.19 nachgewiesen werden. Entscheidend an der Entstehung heterotoper Ossifikationen sind insbesondere PGE_1 und PGE_2 beteiligt, die als Entzündungsmediatoren primär durch Vasodilatation eine Migration und Proliferation von Mesenchymzellen induzieren.

PGE₂ spielt in diesem Zusammenhang eine Schlüsselrolle zur Entstehung heterotoper Ossifikation, indem es Knochenresorption und damit Freisetzung von Knochenmatrix und BMP induziert. Korrespondierend hierzu erfolgt eine Steigerung der Osteoklastenaktivierung und somit erneute Knochenresorption, die sukzessiv eine Induktion von Osteoklastenprecursorzellen initiiert, was als Grundvoraussetzung heterotoper Ossifikationen zu werten ist [16; 18; 20; 21].

Tierexperimentell ließen sich zudem direkte knocheninduktive Wirkungen und nachfolgende Osteoblastendifferenzierung durch Prostaglandine nachweisen.

Unter den gewählten Kulturbedingungen zeigt sich eine massive Suppression der PGE_2 – Synthese durch die angewandten NSAR.

Wie aus Studien von Igarashi et al. [60] bekannt, zeigt sich auch in vorliegender Studie entgegen klinischer Ergebnisse sowohl der Mineralisationsprozess als auch die aktive Calciumsekretion der Zell-Linie hFOB 1.19 unter dem Einfluss Nichtsteroidaler Antiphlogistika unbeeinflusst.

Anhand der gewonnenen Daten scheint diese Hypothese auch auf die Wirkung von Diclofenac und Meloxicam übertragbar.

Um die Rolle der inducable osteoblastic progenitor cells (IOPC) bei der Entstehung heterotoper Ossifikationen zu eruieren, wurde das Zellkulturmodell C3H10T1/2 - BMP-2 gewählt.

Die Daten zur Proliferationskinetik zeigen deutlich niedrigere Proliferationsraten für NSARbehandelte Zellen als für die Kontrolle auf Polystyrol.

Diese Daten korrespondieren auch mit Untersuchungen von Moed et al. [92], die inhibierende Effekte Nichtsteroidaler Antiphlogistika auf die Proliferation mesenchymaler Zellen und damit korrelierend verminderte Synthese osteogener, cartilaginärer Parameter und sinkendes remodeling Haversscher Systeme beobachteten.

Im Längsschnitt der Studien zeigen sich als Parameter früher Differenzierung nahezu synchrone Verlaufsprofile der spezifischen Alkalischen Phosphatase Aktivität für NSARbehandelte Zellen und die Kontrollgruppe ohne signifikante Unterschiede im Aktivitätsniveau.

Anhand der gewonnenen Daten kann davon ausgegangen werden, dass in vitro die Osteocalcin-Sekretion als Parameter osteogener Differenzierung in frühen Differenzierungsphasen nahezu unbeeinflusst bleibt und erst in späteren Phasen des Zellzyklus einer signifikanten Suppression aufgrund bisher nicht reproduzierbarer Regulationsmechanismen unterliegt.
Unter dem Einfluss der NSAR ist bereits in frühen Phasen der Zelldifferenzierung eine massive Suppression der Prostaglandinsynthese zu verzeichnen, während zeitgleich die Kontrolle auf Polystyrol sowohl in frühen als auch späten Differenzierungsphasen Expressionsmaxima zeigt.

Anhand der zugrundeliegenden Daten scheint auch die mesenchymale Progenitorzelle C3H10T1/2 – BMP-2 über ein, durch Prostaglandinsynthese-Inhibitoren regulierbares, Cyclooxygenase-Systeme zu verfügen. Entgegen der Beobachtungen im humanen Osteoblastenmodell findet sich in diesem System kein direkter Zusammenhang zwischen Prostaglandinsynthese-Suppression und reflektorischer Regulation der Expression spezifischer alkalischer Phosphatase Aktivität.

Unter den beschriebenen Kulturbedingungen gelingt es, als Kriterium osteogener Differenzierung sowohl aktive Calciumsekretion als auch Mineralisation extrazellulärer Matrix der Zell-Linie C3H10T1/2 - BMP-2 nachzuweisen.

Im Gesamtverlauf der Studie ist keine signifikante Beeinflussung der Calciumproduktion durch die gewählten Substanzen zu erkennen, obgleich in mitlleren Differenzierungsphasen deutlich inhibierende Einflüsse von Indometacin und Meloxicam zu verzeichnen sind.

Innerhalb der gewählten NSAR zeigen sich im Studienlängsschnitt nur zum Teil geringe Mineralisationsunterschiede, die Mineralisationstendenz insgesamt ist innerhalb der Versuchszeit von 28 Tagen im Vergleich zur Kontrolle durch keine der Substanzen signifikant verändert.

Korrespondierend konnten auch in tierexperimentellen Studien [124; 125] keine Effekte von Indometacin auf die Mineralisation von demineralized-bone-matrix- Implantaten registriert werden.

Da die Zell-Linie auch unter BMP-2-Transfizierung prinzipiell die Potenz zur Differenzierung zu Adipocyten und Chondrocyten besitzt, führten wir in dieser Untersuchung zum Nachweis von Adipocyten eine Sudan III-Färbung durch.

Wie aus vorangegangenen Studien [7] bekannt, lässt sich auch in vorliegender Studie erst zu späteren Differenzierungszeitpunkten eine Differenzierung zu Adipocyten detektieren.

Vergleichbare Ergebnisse finden sich unter Indometacin, Diclofenac und Meloxicam, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Differenzierungstendenz zu Adipocyten von den gewählten Substanzen in der angewandten Dosierung unbeeinflusst bleibt.

Eine Differenzierung zu Chondrocyten lässt sich mit Hilfe der Alcianblau 8 G-Färbung unter den gewählten Kulturbedingungen nicht nachweisen.

Klinisch zu beobachtende Erfolge einer präoperativen oder direkt postoperativ einzeitigen oder fraktionierten Radiatio dürften nach heutigem Kenntnisstand auf direkte DNA-Schädigung mitotisch stark aktiver und daher relativ strahlensensibler pluripotenter mesenchymaler Progenitorzellen beruhen, wodurch eine reguläre Transkription verhindert und somit die osteogene Differenzierung als Grundlage heterotoper Ossifikationen wirkungsvoll ausgeschaltet wird.

In der vorliegenden Studie kommen Bestrahlungsdosen von 1, 3, 5, 7 und 10 Gray zum Einsatz, deren Applikation mittels eines 60 Co – Strahlers erfolgte.

Wie auch in Studien von Matsumura et al. [88] findet sich auch in dieser Studie eine Induktion der Zellproliferation unter Dosen von 1 und 3 Gray, ebenso auch unter 5 Gray.

Zusammenfassend lässt sich aus den gewonnenen Daten schließen, dass Strahlendosen von 1, 3 und 5 Gray eine Induktion der Proliferationskinetik verursachen, höhere Dosen hingegen die Proliferation deutlich inhibieren und terminale Differenzierung initiieren.

Die Aktivität der spezifischen Alkalischen Phosphatase wird am eindrücklichsten unter Bestrahlungsdosen von 10 Gray stimuliert.

So lassen sich bereits in frühen Phasen konsequent höhere Aktivitäten für high-dose bestrahlte Zellen registrieren als für die Kontrollgruppe und low-dose bestrahlte Zellen, denen in späten Phasen Expressionsmaxima der 10 Gray bestrahlten Zellen folgen.

Tendenziell korrelieren diese Ergebnisse mit Beobachtungen der Arbeitsgruppen um Matsumura [88] und Dare [33], obgleich regulierend induzierende Mechanismen auch in der einschlägigen Literatur bisher nicht zu eruieren waren.

Mineralisationstendenzen lassen sich bereits in frühen Phasen sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter high- und low-dose Bestrahlung nachweisen, obgleich der Mineralisationsbeginn unter Radiatio tendenziell später einsetzt.

In späten Differenzierungsphasen finden sich keine signifikanten Mineralisationsunterschiede für 3 und 5 Gray bestrahlte Zellen, so finden sich hier ebenfalls kalzifizierte Nodules wie auch unter Kontrollbedingungen.

Vergleichbare Ergebnisse liefern auch high-dose bestrahlte Zellen, wobei die Dichte der Mineralisation unter 10 Gray Bestrahlung aufgrund niedrigerer Zellzahlen geringer erscheint.

Auch atomemissionsspektrometrisch gewonnene Daten belegen eine Stimulation der aktiven Calciumsekretion zu frühen Differenzierungszeitpunkten insbesondere unter Dosen von 7 und 10 Gray. Korrespondierende Ergebnisse unter 10 Gray Bestrahlung finden sich auch in Studien von Matsumura et al. [88].

Im weiteren Längsschnitt der Studie können keine signifikanten Einflüsse der gewählten Strahlendosen auf die aktive Calciumsekretion der Zell-Linie registriert werden.

Ursache hierfür dürfte eine Interaktion der Bestrahlung mit Matrixproteinen wie Osteopontin, Osteocalcin und Kollagen Typ I sein, die in den Kalzifizierungsprozess regulierend eingreifen, was jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben sollte .

Schlussfolgerung

Die Auswahl der Zellkulturmodelle hFOB 1.19 und C3H10T1/2 – BMP-2 erfolgte basierend auf den Hypothesen zur Entstehung heterotoper Ossifikationen.

So kann die humane fetale Osteoblastenzell-Linie hFOB 1.19 in diesem Zusammenhang als determined osteoblastic progenitor cell und die murine mesenchymale Zell-Linie C3H10T1/2–BMP-2 als inducable osteoblastic progenitor cell angesehen werden.

Die Zell-Linie hFOB 1.19 bietet aufgrund ihres humanen Ursprungs und der reproduzierbaren Expression osteogener Marker wie Alkalische Phosphatase, Prokollagen I und Osteocalcin die Möglichkeit, den humanen in vivo Osteogeneseprozess in vitro im Zellkultursystem zu imitieren.

In der vorliegenden Studie gelingt es, im Rahmen der NSAR-Versuche die Schlüsselrolle des PGE₂ sowohl im Knochenmetabolismus als auch bei der Entstehung heterotoper Ossifikationen, sowie dessen Mediatorfunktion in der Regulation osteoblastenspezifischer Differenzierungsparameter im Zellkulturmodell zu demonstrieren, obgleich der Nachweis der kalzifizierungsinhibierenden Wirkung Nichtsteroidaler Antiphlogistika, wie auch in der einschlägigen Literatur, am Zellkultursystem weiterhin aussteht.

Unter Berücksichtigung aller gewonnenen Daten kann in dieser Studie dokumentiert werden, dass die murine mesenchymale Progenitorzelle C3H10T1/2 unter BMP-2-Transfizierung und der Zugabe von Ascorbat und β -Glycerophosphat zu osteoblastärer Differenzierung induziert wird, osteogene Eigenschaften entwickelt und im Längsschnitt der Studie deutliche Mineralisationstendenz aufweist.

Da unter den vorgestellten Zellkulturbedingungen Teilaspekte zur Wirkung der angewandten Prophylaxemethoden NSAR und Radiatio, insbesondere im Hinblick auf die klinisch zu beobachtende Reduzierung der Kalzifizierung, nur zum Teil eruiert werden konnten, sollten zukünftige Forschungsansätze einerseits mögliche Einflüsse von Cytokinen und Wachstumsfaktoren berücksichtigen, andererseits die Interaktionen molekularbiologisch auf RNA-Ebene analysieren, was inzwischen Gegenstand unserer aktuellen Studien ist.

Literaturverzeichnis

- Ahlgren, S-A.; Dahlström, J.A.; Ohlin, P.; Stigsson, L.: Extopic bone after hip replacement. Acta orthopaedica Scandinavica. 55: 589-592 (1984)
- 2. Ahrengart, L.: Periarticular heterotopic ossification after total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research.263: 49-58 (1991)
- Ahrengart, L.: Periarticular heterotopic ossification after total hip arthroplasty. Clinical orthopaedics. 263: 49-58 (1991)
- Ahrengart, L.; Lindgren, U.: Heterotopic bone after hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research.293: 153-159 (1993)
- 5. Ahrengart, L.; Lindgren, U.; Reinholt, F.P.: Comparative study of the effects of Radiation, Indometacin, Prednisolone and Ethane-1-Hydroxy-1,1-Diphosphonate (EHDP) in the prevention of ectopic bone formation. Clinical Orthopaedics and Related Research.229: 265-273 (1988)
- 6. Ahrenhart, L.; Lindrgen, U.: Functional significance of heterotopic bone formation after total hip arthroplasty. Journal of Arthroplasty. 4: 125-131 (1989)
- Ahrens, A.; Ankenbauer, T.; Schröder, D.; Hollnagel, A.; Mayer, H.; Gross, G.: Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages.
 DNA and Cell Biology. Vol. 12, No. 10: 871-880 (1993)
- Allen, H.L; Wase, A.; Bear, W.T.: Indometacin and Aspirin: Effect of nonsteroidal antiinflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. Acta orthopaedica Scandinavica. 51: 595-600 (1980)
- 9. Amano, S.; Hanazawa, S.; Hirose, K.; Ohmori, Y.; Kitano, S.: Stimulatory effect on bone resorption of interleukin-I-like cytokine produced by an osteoblast-rich population of mouse calvarial cells. Calcified Tissue International. 43: 88-91 (1988)
- Asahina, I.; Sampath, T.K.; Hauschka, P.V.: Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic and/or adipocyte differentiation of clonal murine target cells. Experimental Cell Research. 222: 38-47 (1996)

- Ayers, D.C.; Mc Collister, C.; Parkinson, J.R. : The prevention of heterotopic ossification in high-risk patients by low-dose radiation therapy after total hip arthroplasty. Journal of Bone and Joint Surgery. Vol. 68-A, No. 9: 1423-1430 (1986)
- Ayers, D.C.; Pellegrini, V.D.; Mc Collister Evarts, C.:
 Prevention of heterotopic ossification in high-risk patients by radiation therapy. Clinical Orthopaedics and Related Research. 263: 87-93 (1991)
- Barushka, O.; Yaakobi, T.; Oron, U.: Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. Journal of Bone. Vol. 16, No. 1: 47-55 (1995)
- Bennett, A.; Harvey, W.: Prostaglandins in orthopaedics. Journal of Bone and Joint Surgery. Vol. 63-B, No. 2: 152-154 (1981)
- Boss, C.B.; Freeden, K.J.: Concepts, Instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry. Perkin Elmer.
- Bosse, A. :
 Klinik, Differentialdiagnose und Histogenese der heterotopen Ossifikation.
 Veröffentlichungen aus der Pathology. Vol. 146 (1997)
- Bosse, A.; Kresse, H.; Schwarz, K.; Müller. K-M.: Immunhistochemical characterization of the small proteoglycans decorin and proteoglycan-100 in heterotopic ossification. Calcified Tissue International. 54: 119-124 (1994)
- Bosse, A.; Sprockhoff, SD.; Müller, K-M.; Jones, DB.: Distribution of osteocalcin, osteonectin and alkaline phosphatase in different stages of heterotopic ossification. Path. Res. Pract. 189: 657 (1993)
- Bosse, A.; Wanner, KF.; Weber, A.; Müller, K-M.: Morphological and clinical aspects of heterotopic ossification in sports. International Journal of Sports Medicine. 15: 325-329 (1994)
- Bosse, A.; Wulf, M.; Müller, K-M.:
 Pericytes and vascular endothelial cells as potential osteoprogenitor cells.
 Journal of Bone and Mineral. 25: 30 (1994)

- Bosse, A.; Wulf, M.; Wiethege, T.; Voss, B.; Müller, K-M.: Kollagene und Wachstumsfaktoren in der heterotopen Ossifikation. Erfahrungen mit der nicht-radioaktiven In-situ-Hybridisierung.. Pathologe. 15: 216-225 (1994)
- Brighton, CT.; Lorich, DG.; Kupcha, R.: The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell. Clinical Orthopaedics and Related Research. 249: 113-121 (1989)
- Brune, K.; Hinz, B.:
 Zum aktuellen Stand der Zyklooxygenase-Forschung.
 Deutsches Ärzteblatt 95. Heft 7 (1998)
- Brunner, R.; Morscher, E.; Hünig, R.: Para-articular ossification in total hip replacement: An indication for irradiation therapy. Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery. 106: 102-107 (1987)
- 25. Catravas, G.N.; Wientroub, S.; Weiss, J.F.; Reddi H.A.: Influence of whole body irradiation and local shielding on matrix-induced endochondral bone differentiation. Calcified Tissue International. 46: 38-45 (1990)
- 26. Cattoretti, G.; Becker, MHG.; Key, G.; Duchrow, M.; Schlüter, C.; Galle, J.; Gerdes, J.: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. Journal of Pathology. 168: 357-363 (1992)
- 27. Centrella, M.; Lorenzo, J.A.; Sousa, S.L.: Interleukin-I in combination with transforming growth factor produces enhanced bone resorption in vitro. Journal of Endocrinology. Vol.123, No. 5: 2194-2200 (1988)
- 28. Chow, J.W.M.; Lean, J.M.; Abe, T.; Chambers, T.J.: The anabolic effect of 12 β-oestradiol on the trabecular bone of adult rats is suppressed by Indometacin. Journal of Endocrinology. Vol.133: 189-195 (1992)
- 29. Collin, P.; Nefussi, J.R.; Wetterwald, A.; Nicolas, V.; Boy-Levefre, M-L.; Fleisch, H.; Forrest, N.:
 Expression of collagen, osteocalcin and bone alcaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture.
 Calcified Tissue International. 50: 175-183 (1992)

- Cornish, J.; Callon, K.; King, A.; Edgar, S.; Reid, I.R.: The effect of leukemia inhibitory factor on bone in vivo. Journal of Endocrinology. Vol. 132, No.3: 1359-1366 (1993)
- 31. Coventry, M.B.; Scanlon, P.W.: The use of radiation to discourage ectopic bone. Journal of Bone and Joint Surgery. Vol. 63-A, No. 2: 201-208 (1981)
- 32. Damoulis, P.D.; Hauschka, P.V.: Cytokines induce nitric oxide production in mouse osteoblasts. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 201, No. 2: 924-931 (1994)
- 33. Dare, A.; Hachisu, R.; Yamaguchi, A.; Yokose, S.; Yoshiki, S.; Okono, T.: Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells.
 J. Dent. Res. 76 (2): 658-664 (1997)
- 34. De Smet, AA.; Norris, MA.; Fisher, DR.: Magnetic resonance imaging of myositis ossificans : Analysis of seven cases. Skeletal Radiol. 21: 503-507 (1992)
- 35. Degner, F.; Türck, D.; Pairet, M.: Meloxicam-Pharmakologische Eigenschaften, Pharmakokinetik und klinische Daten. Prous Science. Vol. 34, Suppl. I/D (1998)
- 36. Dekel, S.; Lenthall,G.; Francis, M.J.O.:
 Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture.
 Journal of Bone and Joint Surgery. Vol.63-B, No. 2: 185-189 (1981)
- Diaz-Flores, L.; Guttierez, R.; Lopez-Alonso, A. :
 Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis.
 Clinical Orthopaedics and Related Research. 275: 280-286 (1992)
- 38. Dorheim, M-A.; Sullivan, M.; Dandapani, V.; Wu, X.; Hudson, J.; Segarini, P.R.; Rosen, D.M.; Aulthouse, A.L.; Gimble, J.M.: Osteoblastic gene expression during adipogenesis in Hemopoietic supporting murine bone marrow stromal cells. Journal of Cellular Physiology. 1545: 317-328 (1993)
- 39. Ekelund, A.; Brosjö, O.; Nilsson, S.O.:
 Experimental induction of heterotopic bone.
 Clinical Orthopaedics and Related Research.263: 102-112 (1991)

- 40. Elves, M.W.; Bayley, I.; Roylance, P.J.: The effect of Indometacin upon experimental fractures in ths rat. Acta orthopaedica Scandinavica. 53: 35-41 (1982)
- Entrella, E.; Casinchino, S.; Mc Carthy, Th.:
 Differential Actions of prostaglandins in separate cell formations from fetal rat bone.
 Journal of Endocrinology. Vol. 135, No.4: 1611-1620 (1994)
- 42. Eular : Arthotec/ Arthotec forte. Europäische Rheumaliga. 3. Auflage (1997)
- 43. Eulert, J.; Knelles, D.; Barthel, Th.: Heterotope Ossifikationen. Orthopäde. 26: 399-406 (1997)
- 44. Evans, D.B.; Thavarajah, M.; Kanis, J.A.: Involvement of prostaglandin E2 in the inhibition of osteocalcin synthesis by human osteoblast-like cells in response to cytokines and systemic hormones. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 167, No. 1: 194-202 (1990)
- 45. Franchimont, N. ; Durant, D.; Canalis, E.: Interleukin-6 with its soluble receptor regulate the expression of Insulin-like growth factor binding Proetin-5 in osteoeblast cultures. Journal of Endocrinology. Vol. 138, No.8: 3380-3386 (1997)
- 46. Franchimont, N. ; Durant, D.; Canalis, E.: Interleukin-6 with its soluble receptor cause a marked induction of collagenase 3 expression in rat osteoeblast cultures. Journal of Biological Chemistry . Vol. 272, No. 18: 12144-12150 (1997)
- 47. Franchimont, N.; Gangji, V.: Interleukin-6 with its soluble receptor enhances the expression of Insulin-like growth factor-I in osteoeblasts. Journal of Endocrinology. Vol. 138, No.12: 5248-5255 (1997)
- 48. Friedenstein, AJ.: Determined and inducible osteogenic precursor cells. CIBA Foundation symposia, Vol. 11: 169-185 (1972)
- 49. Friedenstein, AJ.: Precursor cells of mechanocytes. Int. Rev. Cytol. 47: 327-360 (1976)

- 50. Frölich, J.C.: Eine neue Generation von Antirheumatika. Deutsches Ärztblatt. Heft 47 (1996)
- 51. Fukayama, S.; Boama, T.J.; Goad, D.L.; Voelkel, E.F.; Tashjian, A.H.: Human parathyroid hormone (PTH)-related protein and human PTH: Comparative biological activities on human bone cells and bone resorption. Journal of Endocrinology. Vol.123, No. 6: 2841-2848 (1988)
- 52. Garcia, H.; Bosse, A.; Roessner, A.; Vollmer, E.; Wuisman, P.; Althoff, J.; Böcker, W.:
 Zur Topographie der nicht-kollagenen ossären Strukturproteine in Ossifikationszonen.
 Verh. Dtsch. Ges. Path 73: 539 (1989)
- 53. Garland, D.E.:
 A clinical perspective on common forms of acquired heterotopic ossification. Clinical Orthopaedics and Related Research.263: 13-29 (1991)
- 54. Gonzales, E.; de la Cruz, C.; de Nicolas, R.;Egido, J.; Herrero-Beaumont, G.: Long-term effect of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the production of cytokines and other inflammatory mediators by blood cells of patients with osteoarthritis. Agents Actions. 41: 171-178 (1994)
- 55. Güngör, T.; Hedlund, T.; Hulth, A.; Johnell, O.: The effect od irradiation on osteoclasts with or without transplantation of haemopoietic cells. Acta orthopaedica Scandinavica. 53: 333-337 (1982)
- 56. Harris, S.A.; Enger, R.J.; Riggs, B.L.; Spelsberg, T.: Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. Journal of Bone and Mineral Research. Vol. 10, No. 2: 178-186 (1995)
- 57. Hart, H.: Ergebnisse der operativen Entfernung heterotoper Ossifikationen an verschiedenen Gelenken.
 Dissertation aus der Medizinischen Fakultät der Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. (1999)
- 58. Hirano, H.; Urist, M.R.: Induced bone development in transplants of fresh human pseudomaligna heterotopic ossification tissue in athymic nude mice. Clinical Orthopaedics and Related Research.263: 113-120 (1991)

- 59. Hiura, K.; Sumitani, K.; Kawata, T.; Higashino, K.; Okawa, M.; Sato, T.; Hakeda, Y.; Humegawa, M.:
 Mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1) at different stages of differentiation have opposite effects on osteclastic cell formation. Journal of Endocrinology. Vol.125, No. 3: 1630-1637 (1991)
- 60. Igarashi, K.; Hirafuji, M.; Adachi, H.; Shinoda, H.; Mitani, H.:
 Role of endogenous PGE₂ in osteoblastic functions of a clonal osteoblast-like cell, MC3T3-E1.
 Prostaglndins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 50: 169-172 (1994)
- 61. Izbicka, E.; Dunstan, C.R.; Adams, R.; Mundy, G.R.: Mitogenic lectin Concanavalin A induces calvarial bone formation in vivo via Indometacin-sensitive pathway. Calcified Tissue International. 60: 204-209 (1997)
- 62. Jasty, M.; Schutzer, S.; Tepper, J.; Willett, C.; Stracher, M.A.; Harris, W.H.: Radiation-blocking shields to localize periarticular radiation precisely for prevention of heterotopic bone formation around uncemented total hip arthroplasties. Clinical Orthopaedics and Related Research.257: 138-145 (1990)
- 63. Jikko, A.; Aoba, T.; Murakami, H.; Takano, Y.; Iwamoto, M.; Kato, Y.: Characterisation of the mineralisation process in cultures of rabbit growth plate chondrocytes. Developmental Biology. 156: 372-380 (1993)
- Kaji, H.; Sugimoto, T.; Kanatani, M.; Chihara, K.: High extracellular calcium stimulates osteoclast-like cell formation and bone-resorbing activity in the presence of osteoblastic cells. Journal of Bone and Mineral Research. Vol. 11, No.7: 912-920 (1996)
- Kanatani, M.; Sugimoto, T.; Fukase, M.; Chihara, K.:
 Effect of 1, 25- Dihydroxyvitamin D₃ on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells by modulating the release of local regulators from monocytes.
 Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 190, No. 2: 529-535 (1993)
- 66. Karrer, A.: Vergleich verschiedener Methoden zur Prophylaxe von heterotopen Ossifikationennach Hüft-Totalendoprothesen. Dissertation aus der Medizinischen Fakultät der Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. (1997)

- Katagiri, T.; Yamaguchi, A.; Ikeda, T.; Yoshiki, S.; Wozney, J.M.; Rosen, V.; Wang, E.A.; Tanaka, H.; Omura, S.; Suda, T.: The non-osteogenic mouse pluripotent cell line C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 172, No. 1: 295-299 (1990)
- 68. Kawaguchi, H.; Pilbeam, C.C.; Harrison, J.R.; Raisz, L.G.: The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism. Clinical Orthopaedics and Related Research. 313: 36-46 (1995)
- 69. Kelly, K.A.; Gimble, J.M.:
 1, 25-Dihydroxy vitamin D₃ inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. Journal of Endocrinology. Vol. 139, No. 5: 2622-2629 (1998)
- 70. Kempa, B.: Ätiologie, Klinik und Prophylaxe der paraartikulären Ossifikationen, dargestellt an der zementfreien Zweymüller Hüftendoprothese. Dissertation aus der Medizinischen Fakultät der Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg. (1996)
- Kennedy, W.E.; Gruen, T.A.; Chessin, H.; Gasparini, G.; Thompson, W.: Radiation therapy to prevent heterotopic ossification after cementless total hip arthroplasty.
 Clinical Orthopaedics and Related Research.262: 185-191 (1991)
- Kjaersgaard-Andersen, P.; Steinke, K.S.; Hougaard, K.; Sojbjerg, J.O.; Jensen, J.: Heterotopic bone formation following hip arthroplasty. Acta orthopaedica Scandinavica. 62 (3): 219-225 (1991)
- 73. Klaersgaard-Andersen, P.; Pedersen, P.; Kristensen, S.S.; Schmidt, S.A.; Pedersen, N.W.:
 Serum alkaline phosphatase as an indicator of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty.
 Clinical Orthopaedics and Related Research. 234: 102-109 (1988)
- 74. Klaersgaard-Andersen, P.; Ritter, M.A.: Short-term treatment with nonsteroidal antiinflammatory medications to prevent heterotopic bone formation after total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research. 279: 157-162 (1992)
- 75. Klaersgaard-Andersen, P.; Schmidt, S.A.: Total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research.263: 78-86 (1991)

- Klaersgaard-Andersen, P.; Schmidt, S.A.:
 Indometacin for prevention of ectopic ossification after hip arthroplasty.
 Acta orthopaedica Scandinavica. 57: 12-14 (1986)
- 77. Klaersgaard-Andersen, P.; Sletgard, J.; Gjerloff, C.; Lund, F.: Heterotopic bone formation after noncemented total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research.252: 156-162 (1990)
- Knelles, D.; Barthel, Th.; Karrer, A.; Kraus, U.; Eulert, J.; Kölbl, O.:
 Prevention of heterotopic ossification after total hip replacement.
 Journal of Bone and Joint Surgery. Vol. 97-B, No. 4: 596-602 (1997)
- 79. Krane, S.M.: Is collagenase (matrix metalloproteinase-1) necessary for bone and other connective tissue remodeling?. Clinical Orthopaedics and Related Research. 313: 47-53 (1995)
- Kühne, J.-H.; Schidlo, C.; Jansson, V.:
 Medikamentöse Prophylaxe und operative Therapie heterotoper Ossifikationen. Orthopädische Praxis 32, 12: 827-834 (1996)
- 81. Lerner, U.H.; Hänström, L.; Sjöström, S.:
 Stimulation of bone resorption and cell proliferation in vitro by human gingival fibroblasts from patients with periodontal disease.
 Journal of Bone and Mineral. 10: 225-242 (1990)
- 82. Lerner, U.H.; Ransjö, M.; Ljunggren, Ö.: Bradykinin stimulates production of prostaglandin E₂ and prostacyclin in murine osteoblasts. Journal of Bone and Mineral. 5: 139-154 (1989)
- 83. Li, Y-P.; Stashenko, P.: Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-*a* and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter. Journal of Immunology. Vol. 148, No. 3: 788-794 (1992)
- 84. Ljunggren, Ö.; Lerner, U.H.: Evidence for BK₁ bradykinin-receptor-mediated prostaglandin formation in osteoblasts and subsequent enhancement of bone resorption. British Journal of Pharmacology. 101: 382-386 (1990)
- 85. Lorenzo, J.A.; Sousa, S.L.; Centrella, M.: Interleukin-1 in combination with transforming growth factor-a producesenhanced bone resorption in vitro. Journal of Endocrinology. Vol. 123: 2194-2200 (1988)

- 86. Lorenzo, J.A.; Sousa, S.L.; Centrella, M.: Interleukin-I in combination with transforming growth factor-*a* produces enhanced bone resorption in vitro. Journal of Endocrinology. Vol.123, No. 5: 2194-2200 (1988)
- Maloney, W.J.; Jasty, M.; Willett, C.; Mulroy, R.D.; Harris, W.H.: Prophylaxis for heterotopic bone formation after total hip arthroplasty using low-dose radiation in high-risk patients. Clinical Orthopaedics and Related Research.280: 230-234 (1992)
- Matsumura, S.; Jikko, A.; Hiranuma, H.; Deguchi, A.; Fuchihata, H.: Effect of X-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. Calcified Tissue International. 59: 307-308 (1996)
- Mc Carthy, T.L.; Centrella, M.; Raisz, L.G.; Canalis, E.: Prostaglandin E₂ stimulates insulin-like growth factor I synthesis in osteoblastenriched cultures from fetal rat bone. Journal of Endocrinology. Vol.126, No. 5: 2895-2900 (1991)
- 90. Mitchell, J.A.; Akarasereenont, P.; Thiemermann, C.; Flower, R.J.; Vane, J.R.: Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol 90: 11693-11697 (1994)
- 91. Miyaura, C.; Pilbeam, C.C.; Tamura, T.; Ohsugi, Y.; Koishihara, Y.; Kubodera, N.; Kawaguchi, H.; Tai, H.; Raisz, L.G.; Suda, T.: Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in Interleukin-6-induced osteoclast formation. Journal of Endocrinology. Vol. 138, No.6: 2372-2379 (1997)
- Moed, B.R.; Resnick, R.B.; Fakhouri, A.J.; Nallamothu, B.; Wagner, R.A.:
 Effect of two nonsteroidal antiinflammatory drugs on heterotopic bone formation in a rabbit model.
 Journal of Arthroplasty. Vol. 9, No. 1: 81-87 (1994)
- 93. Mohan, S.; Baylink, D.J.: Bone growth factors. Clinical Orthopaedics and Related Research.263: 30-48 (1991)
- 94. Nagai, M.: The effects of prostaglandin E₂ on DNA and collagen Synthesis in Osteoblasts in vitro. Calcified Tissue International. 44: 411-420 (1989)

- 95. Nilsson, O.S.; Bauer, H.C.F.; Brosjö, O.; Törnkvist, H.: Influence of Indometacin on induced heterotopic bone formation in rats. Clinical Orthopaedics and Related Research. 207: 239-245 (1986) 96. Nilsson, O.S.; Persson, P-E.; Ekelund, A.: Heterotopic new bone formation causes resorption of the inductive bone matrix. Clinical Orthopaedics and Related Research. 257: 280-285 (1990) 97. Ogata, T.: Fluid flow induces enhancement of the Egr-1 mRNA in osteoblst-like cells: Involvement of Tyrosine kinase and serum. Journal of Cellular Physiology. Vol.170: 27-34 (1997) 98. Onoe, Y.; Miyaura, C.; Kiminakayashiki, T.; Nagai, Y.; Noguchi, K.; Chen, Q-R.; Seo, H.; Ohta, H.; Nozawa, S.; Kudo, I.; Suda, T.: IL-13 and IL-14 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxyenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. Journal of Immunology. 156: 758-764. (1996) 99. Otto: Cited by Binnie (1903) On myositis ossificans traumatica. Ann. Surg. 38: 423-440 100. Owen, M.: Histogenesis of bone cells. Calcified Tissue Research. 25: 205-207 (1978) 101. Owen, M.: The origin of bone cells in the postnatal organism. Arthritis Rheum. 23: 1073-1080 (1980) 102. Pairet, M.; van Ryn, J.; Schierok, H.; Mauz, A.; Trummlitz, G.; Engelhardt, G.: Differential inhibition of cyclooxygenases-1 and -2 by Meloxicam and its 4'-isomer. Inflammation Research. 47 (6): 270-276 (1998)
- Parkinson, J.R.; Ayers, D.C.; Mc Collister, C.: The prevention of heterotopic ossification in high-risk patients by low-dose radiation therapy after total hip arthroplasty. Journal of Bone and Joint Surgery. Vol. 68-A, No. 9: 1423-1430 (1986)
- 104. Pellegrini, V.D.; Konski, A.A.; Gastel, J.A.; Rubin, P.; Mc Collister Evarts, C.: Prevention of heterotopic ossification with irradiation after total hip arthroplasty. Journal of Bone and Joint Surgery. Vol. 74-A, No. 2: 186-200 (1992)

- 105. Perry, H.M.; Skogen, W.; Chappel, J.; Kahn, A.J.; Willner, G.; Teitelbaum, S.L.: Partial characterization of a parathyroid hormine-stimulated resorption factor(s) from osteoblast-like cells. Journal of Endocrinology. Vol.125, No. 4: 2075-2082 (1989)
- Puzas, J.E.; Miller, M.D.; Rosier, R.N.: Pathologic bone formation. Clinical Orthopaedics and Related Research. 245: 269-281 (1989)
- 107. Raisz, L.G.; Fall, P.M.: Biphasic effects of prostaglandin E₂ on bone formation in cultured fetal rat calvariae: Interaction with cortisol. Journal of Endocrinology. Vol.126, No. 3: 1630-1637 (1990)
- 108. Ren, W.; Dziak, R.:
 Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation. Calcified Tissue International. 49: 197-201 (1991)
- 109. Ritter, M.A.; Gioe, T.J.: The effect of Indometacin on para-articular ectopic ossification following total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research. 167: 113-117 (1982)
- 110. Ritter, M.A.; Sieber, J.M.: Prophylactic Indometacin for the prevention of heterotopic bone formation following total hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research.196: 217-225 (1985)
- 111. Ro, J.; Langeland, N.; Sander, J.:
 Effect of Indometacin on collagen metabolism of rat fracture callus in vitro. Acta orthopaedica Scandinavica. 49: 323-328 (1978)
- 112. Ro, J.; Sudmann, E.; Marton, P.F.: Effect of Indometacin on fracture healing in rats. Acta orthopaedica Scandinavica. 47: 588-599 (1976)
- 113. Rodan, G.A.: Introduction to bone biology. Journal of Bone. 13: S3-S6 (1992)
- Rosendahl, S.; Christoffersen, J.K.; Norgaard, M.: Para-articular ossification following hip replacement. Acta orthopaedica Scandinavica. 48: 400-404 (1977)

- Sato, K.; Urist, MR.: Induced regeneration of calvaria by bone morphogenetic protein (BMP) in dogs. Clinical Orthopaedics and Related Research. 197: 301-311 (1985)
- Sawyer, J.R.; Myers, M.A.; Rosier, R.N.; Puzas, J.E.: Heterotopic ossification: Clinical and cellular aspects. Calcified Tissue International. 49: 208-215 (1991)
- Sell. S.; Gaissmaier, C.; Esenwein, S.; Willms, R.; Martini, F.; Jany, R.; Bruhn, G.; Küsswetter, W.:
 Prävention heterotoper Ossifikationen nach Hüftgelenkersatz durch fraktionierte Radiatio-klinische, funktionelle und radiologische Ergebnisse.
 Orthopädische Praxis. 32, 12: 835-839 (1996)
- Sell. S.; Gaissmaier, C.; Fritz, J.; Herr, G.; Esenwein, S.; Küsswetter, W.; Volkmann, R.; Wittkowski, K.M.; Rodemann, H.P.: Different behavior of human osteoblast-like cells isolated from normal and heterotopic bone in vitro. Calcified Tissue International. 62: 51-59 (1998)
- 119. Shigemi, S.: ATP and adenosin act as a mitogen for osteoblast-like cells (MC3T3-E1). Calcified Tissue International. 58: 109-113 (1996)
- Stichtenoth, D.O.; Wagner, B.; Frölich, J.:
 Effects of Meloxicam and Indometacin oncyclooxygenase pathways in healthy volunteers.
 Journal of Investigative Medicine. Vol. 45, No. 2: 44-49 (1997)
- Sudo, H.; Kodama, H-A.; Amagai, Y.; Yamamoto, S.; Kasai, S.: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborne mouse calvaria. Journal of Cell Biology. Vol 96: 191-198 (1983)
- Tai, H.; Miyaura, C.; Pilbeam, C.C.; Tamura, T.; Ohsugi, Y.; Koishihara, Y.; Kubodera, N.; Kawaguchi, H.; Raisz, L.G.; Suda, T.: Transcriptional induction of cyclooxygenase-2 in osteoblasts is involved in Interleukin-6-induced osteoclast formation. Journal of Endocrinology. Vol. 138, No.6: 2372-2379 (1997)
- 123. Tatakis, D.N.: Human platelet factor 4 is a direct inhibitor of human osteoblast-like osteosarcoma cell growth. Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 187, No. 1: 287-293 (1992)

- 124. Törnkvist, H.; Bauer, H.; Nillson, O.: Influence of Indometacin on experimental bone metabolism in rats. Clinical Orthopaedics and Related Research.193: 264-270 (1985)
- 125. Törnkvist,H.; Lindholm, T.S.; Netz,P.; Strömberg, L.;Lindholm,T.C.: Effect of Ibuprofen and Indometacin on bone metabolism reflected in bone strength. Clinical Orthopaedics and Related Research.187: 255-259 (1984)
- 126. Tözün, R.; Pinar, H.; Yesiller, E.; Hamzaoglu, A.: Indometacin in the prevention of heterotopic ossification after total hip arthoplasty. Journal of Arthroplasty. Vol. 7 No. 1 : 57-61 (1992)
- 127. Trancik, Th.; Mills, W.; Vinson, N.: The effect of Indometacin, Aspirin and Ibuprofen on bone ingrowth into a porouscoated implant. Clinical Orthopaedics and Related Research. 249: 113-121 (1989)
- 128. Varghese, S.; Ramsby, M.L.; Jeffrey, J.J.; Canalis, R.: Basic fibroblast growth factor stimulates expression of interstitial collagenase and inhibitors of metalloproteinases in rat bone cells. Journal of Endocrinology. Vol. 136, No.5: 2156-2162 (1995)
- 129. Wientroub, S.; Reddi, A.H.: Influence of irradiation on the osteoinductive potential of demineralized bone matrix. Calcified Tissue International. 42: 255-260 (1988)
- 130. Wientroub, S.; Weiss, J.F.; Catravas, G.N.; Reddi, A.H.: Influence of whole body irradiation and local shielding on matrix-induced endochondral bone differentiation. Calcified Tissue International. 46: 38-45 (1990)
- 131. Yamazaki, R.; Kawai, S.; Matsuzaki, T.; Kaneda, N.; Hashimoto, S.; Yokokura, T.; Okamoto, R.; Koshino, T.; Mizushima, Y.: Aceclofenac blocks prostaglandin E₂ production its intracellular conversion into cyclooxygenase inhibitors. European Journal of Pharmakology. 329: 181-187 (1997)
- 132. Zaman, G.; Suswillo, R.F.L.; Cheng, M.Z.; Tavares, L.A.; Lanyon, L.E.: Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone derived cells in culture. Journal of Bone and Mineral Research. Vol. 12, No. 5: 769-777 (1997)

Danksagung

An dieser Stelle sei Herrn Prof. Dr. med. J. Eulert für die freundliche Überlassung der Thematik herzlich gedankt.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. med. Th. Barthel, Herrn Dr. med. U. Nöth sowie Herrn PD Dr. med. Ch. Hendrich für die engagierte Betreuung der Arbeit und Einarbeitung in die Methodik sowie die großzügige Bereitstellung der finanziellen Mittel sowie Herrn PD Dr. med. Ch. Hendrich für die Übernahme des Korreferates. Herrn Dr. med. S. Kirschner für die hilfreiche Unterstützung bei der Auswertung der Statistik-Daten.

Herrn Prof. Dr.-Ing. R. Thull sei für die freundliche Aufnahme im Zellbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität Würzburg und die Bereitstellung der Gerätschaften gedankt. Besondere Anerkennung verdient die beispiellose Hilfsbereitschaft und motivierende Unterstützung sowie der persönliche Einsatz seiner MTLA Frau U. Rummel bei allen auftretenden Schwierigkeiten.

Dem Instiut für Strahlentherapie der Universität Würzburg, insbesondere Herrn Dr. med. O. Kölbl sei für die Bereitstellung des Kobaltstrahlers sowie die reibungslose Abwicklung der Bestrahlungsversuche herzlich gedankt.

Lebenslauf

Name:	Manuela Faltin
Geburtsdatum:	12.01.1974
Geburtsort:	Bamberg
Familienstand:	Ledig
Schulische Ausbildung:	1980 - 84: Grundschule Kaulbergschule, Bamberg 1984 - 93: Franz-Ludwig-Gymnasium, Bamberg
Abitur:	1993
Berufsqualifizierende Ausbildung:	1993 - 95: Ausbildung zur Medizinisch-Technischen-Laboratoriumsassistentin
Studium:	1995: Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der Julius-Maximilians- Universität Würzburg
	1997: Ärztliche Vorprüfung
	1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	2002: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ärztin im Praktikum:	Seit 01.11.2002 an der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg

Würzburg, Juni 2003

M. Faltin