

Aus der Abteilung für Funktionswerkstoffe
der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. J. Groll

Analyse der Osteoklastendifferenzierung auf elektrochemisch abgeschiedenen strontiumdotierten Struvitschichten



Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Katharina Wimmer
aus St. Georgen

Würzburg, Dezember 2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Torsten Blunk
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.09.2019
Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	vi
1 Einleitung und Problemstellung	1
2 Grundlagen	5
2.1 Bildung und Funktion von Knochenzellen	5
2.1.1 Osteoblasten und Osteozyten	6
2.1.2 Osteoklasten	8
2.2 Bedeutung von Magnesiumphosphaten als Knochenersatzmaterialien .	13
2.3 Einfluss von Strontium auf Knochengewebe	16
3 Materialien und Methoden	21
3.1 Geräteverzeichnis	21
3.2 Materialien	23
3.3 Herstellung strontiumdotierter Struvitschichten	27
3.3.1 Vorbereitung der Titanplättchen	27
3.3.2 Elektrochemische Abscheidung auf Titan	27
3.4 Kultivierung von RAW 264.7 und MG-63 Zellen	30
3.5 Zellbiologische Untersuchung von Osteoklasten	31
3.5.1 Versuchsansatz von RAW 264.7 Zellen	31
3.5.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellaktivität	32
3.5.3 Aktivität der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase	33
3.5.4 Färbung Tartrat-resistenter saurer Phosphatase	34
3.5.5 Aktindarstellung mittels Immunfluoreszenz	35
3.5.6 Rasterelektronenmikroskopie	36
3.5.7 PCR zum Nachweis osteoklastärer Gene	36

3.6	Zellbiologische Untersuchung von Osteoblasten	38
3.6.1	Versuchsansatz von MG-63 Zellen	38
3.6.2	Zellzahl und zelluläre Aktivität	39
4	Ergebnisse	41
4.1	Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten unter dem Einfluss von Strontium	41
4.1.1	Wirkung von Strontium auf Zellzahl und Zellaktivität	41
4.1.2	Aktivität Tartrat-resistenter saurer Phosphatase	47
4.1.3	Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase	48
4.1.4	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Aktin	53
4.1.5	Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Zellmorphologie	56
4.1.6	Nachweis osteoklastenspezifischer Gene mittels PCR	59
4.2	Untersuchungen zur Wirkung von Strontium auf MG-63 Zellen	62
4.2.1	Zellwachstum unter dem Einfluss von Strontium	62
4.2.2	Zellaktivität und Aktivität pro Zelle	63
5	Diskussion	67
5.1	Wirkung von Strontium auf RAW 264.7 Zellen	68
5.1.1	Bewertung der Osteoklastendifferenzierung anhand mikroskopischer Methoden	68
5.1.2	Beurteilung von Differenzierungsvorgängen auf transkriptioneller Ebene	74
5.1.3	Analyse der Aktivität Tartrat-resistenter saurer Phosphatase	77
5.1.4	Proliferationsverhalten und zelluläre Aktivität	80
5.1.5	Einfluss der verschiedenen Strontiumdotierungen auf osteoklastäre Zellen	84
5.2	Wirkung von Strontium auf MG-63 Zellen	87
6	Zusammenfassung und Ausblick	91
	Literaturverzeichnis	107
	Anhang	109

Abkürzungsverzeichnis

ATP(ase)	Adenosintriphosphat(ase)
a.u.	Arbitrary units
Bcl6	B-cell lymphoma 6
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
CA II	Carboanhydrase II
CaSR	Calcium-sensing receptor
CATK	Kathepsin K
CD	Cluster of differentiation
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyt/macrophage
CPC	Calciumphosphat-Zement
CTR	Calcitoninrezeptor
DC-STAMP	Dendritic cell-specific transmembrane protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
(c)DNA	(Komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FBS	Fetal bovine serum
FGF(R)	Fibroblast growth factor (receptor)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-protein coupled receptor
IKK	Inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase
IL	Interleukin
IRF8	Interferon regulatory factor 8
JNK	C-Jun N-terminal kinases
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor

MMP	Matrixmetalloprotease
MPC	Magnesiumphosphat-Zement
MSC	Mesenchymal stem cell
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat-)Dehydrogenase
NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells 1
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OCIF	Osteoclastogenesis inhibitory factor
OCP	Osteoklasten-Progenitorzelle
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositid-3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
pNP(P)	Para-Nitrophenol (-phenylphosphat)
PS	Polystyrol
PTH(rP)	Parathormon (related protein)
RANK(L)	Receptor activator of nuclear factor-kappaB (ligand)
REM	Rasterelektronenmikroskopie
(m)RNA	(Messenger) Ribonukleinsäure
SZL	Sealing zone-like structures
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF	Tumor necrosis factor
TPO	Thyreoperoxidase
TRAF	TNF-receptor associated factors
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Abbildungsverzeichnis

2.1	Differenzierungsschritte zum aktiven Osteoklasten	8
2.2	Regulation der Osteoklastogenese	9
2.3	Schematischer Aufbau eines aktiven Osteoklasten	11
2.4	Wirkung von Strontium auf Osteoklasten und Osteoblasten	18
3.1	Versuchsordnung zur elektrochemischen Abscheidung	28
4.1	Zahl und Aktivität von RAW 264.7 Zellen auf Sr6, Sr45 und Sr186	43
4.2	Zellzahl und -aktivität von RAW 264.7 auf Sr212, Sr290, Sr371 und Sr487	45
4.3	Aktivität pro RAW 264.7 Zelle auf strontiumhaltigen Oberflächen	46
4.4	TRAP-Aktivität von RAW 264.7 Zellen unter dem Einfluss von Strontium	47
4.5	TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen auf Glas	49
4.6	TRAP-Färbung von RAW 264.7 auf Sr6, Sr45 und Sr186	50
4.7	TRAP-Färbung von RAW 264.7 auf Sr212, Sr290, Sr371 und Sr487	51
4.8	TRAP-Übersichtsaufnahmen von RAW 264.7 Zellen	52
4.9	Fluoreszenzmarkierung von RAW 264.7 Zellen auf Sr6, Sr45 und Sr186	54
4.10	Fluoreszenzmarkierung von RAW 264.7 auf Sr212, Sr290, Sr371 und Sr487	55
4.11	REM-Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen auf Glas	56
4.12	REM-Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen auf strontiumhaltigen Oberflächen	58
4.13	Agarose-Gelelektrophorese für GAPDH von RAW 264.7 Zellen	59
4.14	CATK-Expression von RAW 264.7 Zellen	60
4.15	CTR2-Expression von RAW 264.7 Zellen	61
4.16	Zellzahl von MG63 Zellen auf Sr45, Sr186, Sr290 und Sr487	62
4.17	Zellaktivität von MG63 Zellen bei Strontiumzusatz	64
A.1	TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen an Tag 11	109
A.2	TRAP-Übersichtsaufnahmen von RAW 264.7 Zellen an Tag 4, 7, 11	111
A.3	REM-Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen an Tag 11	111
A.4	Fluoreszenzmikroskopische Aktindarstellung von RAW 264.7 an Tag 11	112
A.5	Mittlerer Strontium-Massengehalt in den Beschichtungen	112

Tabellenverzeichnis

3.1	Verzeichnis der verwendeten Geräte	21
3.2	Materialien zur Plättchenbeschichtung	23
3.3	Medien, Lösungen und Chemikalien für die Zellkultur	24
3.4	Eingesetzte Primer bei der PCR	25
3.5	Verwendete Kits	26
3.6	Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur	26
3.7	Übersicht über Strontiumgehalt und Beschichtungsparameter	29
3.8	Parameter der DNA-Amplifikation im Thermocycler	37

Kapitel 1

Einleitung und Problemstellung

Implantate finden in Zahnheilkunde, Orthopädie und Unfallchirurgie vielfach Anwendung bei der Therapie degenerativer, traumatischer oder entzündlicher Erkrankungen des Knochens, wodurch bereits häufig sehr gute Heilungserfolge erzielt werden. In vielen Fällen kommen dabei Endoprothesen aus Kobalt- oder Titanlegierungen zum Einsatz. Der Grund hierfür liegt in der guten Biokompatibilität bei gleichzeitig günstigen Materialeigenschaften, die eine große dynamische und statische Stabilität gewährleisten. Die als Makrostruktur bezeichnete äußere Form der Prothese zielt auf eine bestmögliche Formanpassung für die jeweilige klinische Anforderung ab. Die Mikrostruktur beschreibt die Oberflächenbeschaffenheit der Prothese, die beispielsweise durch Sandstrahlen aufgeraut oder das Aufbringen einer Beschichtung modifiziert werden kann und für die erfolgreiche Osteointegration von entscheidender Bedeutung ist [1]. Weite Verbreitung in der klinischen Anwendung haben dabei Beschichtungen mit Calciumphosphaten wie Tri- und Tetracalciumphosphat sowie insbesondere Hydroxylapatit. Die erste Endoprothese mit Hydroxylapatit-Beschichtung wurde 1985 von *Furlong* erfolgreich in der Klinik eingeführt [2]. Weiterführende Studien wiesen dadurch eine Verbesserung der Osteointegration sowie eine erhöhte Stabilität im Langzeitverlauf nach. Positive Effekte durch Hydroxylapatit bezüglich der periprothetischen Knochenneubildung konnten experimentell außerdem bei osteokataboler Stoffwechsellage, wie es beispielsweise bei Osteoporose der Fall ist, gezeigt werden [3, 4]. Als Standardverfahren zur industriellen Hydroxylapatit-Beschichtung von medizinisch verwendeten Metalloberflächen hat sich hierbei die seit den 80er Jahren angewandte Plasmaspritztechnik etabliert. Da diese gewisse Nachteile aufweist, wurde als alternatives Beschichtungsverfahren die elektrochemische Abscheidung entwickelt, welche in der vorliegenden Arbeit Verwendung findet. Im Gegen-

satz zum Plasmaspritzen erfolgt die Abscheidung bei Umgebungstemperatur, sodass das Problem hitzebedingter Veränderungen der Beschichtungen umgangen wird. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Plasmaspritztechnik liegt in der Möglichkeit besonders dünne und gleichmäßige Schichten im μm -Bereich aufzubringen. Dies erlaubt eine schnellere osteoklastäre Resorption, sodass bereits nach kurzer Zeit neu gebildetes Knochengewebe zur Stabilisierung des Implantats beiträgt. Zudem stellen sich homogene, dünne Schichten als stabiler dar, was seltener zu Delamination und damit einhergehendem Implantatversagen führt [5]. Weiterhin weisen elektrochemisch abgeschiedene Schichten eine dem natürlichen Knochen ähnliche mikroporöse, kristalline Struktur auf, was eine signifikante Oberflächenvergrößerung zur Folge hat. Diese wirkt sich positiv auf die Adhäsion von Bestandteilen der Knochenmatrix an das Implantat aus [6].

Durch Modifikation des Elektrolyten und Anpassung der Abscheidungsparameter konnten Verfahren etabliert werden, die es ermöglichen nicht nur Calciumphosphate, sondern auch Magnesiumphosphate elektrochemisch abzuscheiden [7]. Grundlage dieser Bestrebung waren Erkenntnisse aus der Verwendung von Magnesiumphosphatbasierten Knochenzementen. Diese zeichnen sich im Vergleich zu Calciumphosphatzementen durch erhöhte Löslichkeit und beschleunigte Resorption aus [8, 9]. Der Zusatz von Metallionensalzen zum Elektrolyten ermöglicht außerdem die Integration biologisch aktiver Spurenelemente in die abgeschiedenen Schichten. Motivation hierfür sind – trotz bereits verbesserter Osteointegration und Langzeitstabilität – weiterhin bestehende Probleme mit periprothetischen Infektionen. Ein verbreiteter Ansatz diese zu minimieren liegt darin, Oberflächen mit antimikrobieller Silber-, Kupfer-, Zink- oder Selendotierung zu entwickeln [10]. Die Versorgung osteoporotischer Patienten stellt ebenfalls eine große klinische Herausforderung dar, da aufgrund der osteokatabolen Situation Prothesen häufig nur sehr langsam oder ungenügend in den Knochen einwachsen. Eine mögliche Konsequenz ist eine spätere aseptische Lockerung der Prothese, was wiederum eine Explantation zur Folge haben kann. Ansätze zur Förderung der Osteoblastenaktivität bestehen in der Verwendung von Calciumphosphat-Zementen als Träger von Wachstumsfaktoren. Bisherige Studien liefern zwar vielversprechende Ergebnisse [11, 12], dennoch bestehen Schwierigkeiten bei Sterilisierbarkeit und Lagerung. Auch die damit verbundenen hohen Kosten sind ein zusätzlicher Grund, der gegen den breiten klinischen Einsatz von Wachstumsfaktoren spricht. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Zugabe von biologisch aktiven Ionen, welche bezüglich Handhabung und Kosteneffizienz deutliche Vorteile bieten.

Funktionell erwies sich die Zugabe von Kupfer bereits als vielversprechend, da sowohl Aktivität als auch Proliferation von Osteoblasten hierdurch deutlich gesteigert wurden [13]. Einen alternativen Ansatz zur Verbesserung der Integration von Implantaten in osteoporotisches Knochengewebe bietet die Verwendung von Strontium. Strontiumionen zeigten in zahlreichen Studien einen inhibierenden Effekt auf Osteoklasten [14–16], was Anlass für die Entwicklung strontiumhaltiger Beschichtungen lieferte [17]. *Meininger et al.* optimierten hierzu das Verfahren der elektrochemischen Abscheidung von Struvit auf Titan und etablierten Parameter zur zuverlässigen Dotierung mit unterschiedlichen Mengen Strontium [18].

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden für vorliegende Arbeit sieben verschiedene strontiumsubstituierte Struvitschichten hergestellt, die zwischen 6 μg und 487 μg Strontium pro Probe enthielten. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der unterschiedlichen Strontiumdotierungen auf das Verhalten osteoklastärer Zellen zu evaluieren. Hierfür wurden RAW 264.7 Zellen zur Osteoklastendifferenzierung angeregt und diese mittels spezifischer Färbungen, Rasterelektronenmikroskopie sowie auf genetischer Ebene mittels PCR analysiert. Die Ermittlung von Zellzahl und Zellaktivität ermöglichte eine Einschätzung der Zellproliferation.

Eine weitere vielfach beschriebene Strontiumwirkung besteht in der zusätzlichen Stimulation von Osteoblasten [16, 19]. Andere Studien zweifeln diesen Effekt jedoch an und berichten von osteoblasteninhibierendem Einfluss durch Strontium [20]. Im Rahmen dieser Kontroverse soll die vorliegende Arbeit hierzu ebenfalls einen Beitrag leisten, sodass zusätzlich die Kultivierung von osteoblastären MG-63 Zellen auf strontiumdotierten Struvitschichten erfolgte. Dabei wurde der Einfluss von Strontium auf osteoblastäre Zellen anhand von Zellzahl und Zellaktivität untersucht.

Kapitel 2

Grundlagen

2.1 Bildung und Funktion von Knochenzellen

Der menschliche Knochen hat nicht nur im Wachstumsalter, sondern zeitlebens eine Vielzahl von Aufgaben zu erfüllen. Hierzu zählt die Bildung des Skelettsystems, das Stabilität bei gleichzeitiger Beweglichkeit ermöglicht sowie Schutzfunktion für innere Organe erfüllt. Des Weiteren stellt die Knochenmasse einen wichtigen Speicher für Mineralien wie Calcium, Magnesium, Phosphat und Bikarbonat dar und ist maßgeblich an deren Homöostase beteiligt [21]. Um den wechselnden Anforderungen bezüglich Stabilität und Funktionalität gerecht zu werden sowie zur Reparatur von Mikroschäden, unterliegt der Knochen einem ständigen Umbau. Dieser als Remodelling bezeichnete Prozess ist durch das aufeinander abgestimmte Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten charakterisiert, den Knochensubstanz bildenden beziehungsweise resorbierenden Zellen. Dabei kommt es an definierten Stellen – den *bone multicellular units* – durch einwandernde Osteoklasten zum Knochenabbau, während Osteoblasten neues Knochenmaterial produzieren. Jährlich werden somit etwa 10 % der gesamten Knochenmasse erneuert. Dies gewährleistet eine belastungsabhängige Anpassung der Mikroarchitektur, um größtmögliche Stabilität bei möglichst geringer Masse zu erlangen [22]. Die enorme Bedeutung einer genau abgestimmten Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität zeigt sich dabei im Falle einer pathologischen Dysbalance. Bei Osteoporose überwiegt der Knochenabbau, was zu Knochenschmerzen sowie gesteigertem Frakturrisiko führt. Eine erhöhte Osteoklastentätigkeit tritt aber auch bei rheumatoider Arthritis, Hyperparathyreoidismus, Multiplem Myelom oder Knochenmetastasen auf, wohingegen eine fehlende Osteoklastenaktivität in der seltenen Erbkrankheit Osteopetrose resultiert [21, 23, 24].

2.1.1 Osteoblasten und Osteozyten

Osteoblasten sowie Chondrozyten und Adipozyten leiten sich von mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese sind multipotente Progenitorzellen, die die Oberflächenproteine *cluster of differentiation* (CD) 105, CD73 und CD90 exprimieren [25]. Für die Differenzierung von Osteoblasten ausgehend von mesenchymalen Stammzellen spielt der Transkriptionsfaktor Runx2 eine zentrale Rolle. *In vitro* Versuche mit Knockout-Mäusen belegen, dass eine homozygote Mutation von Runx2 in einem völligen Fehlen der Ossifikation resultiert, während die Entwicklung der Chondrozyten weitgehend unbeeinflusst bleibt. Dies zeigte sich in der Ausbildung eines rein knorpeligen Skeletts, sodass es bei Runx2 defizienten Mäusen zum raschen postnatalen Tod infolge von Atemstillstand kam [26, 27]. Ähnlich essentiell für eine erfolgreiche Osteoblastogenese ist der Runx2 nachgeschaltete Transkriptionsfaktor Osterix, was sich ebenfalls anhand von Versuchen mit Knockout-Mäusen nachweisen ließ [28]. Die übergeordnete Stimulation von Expression und Aktivität der Transkriptionsfaktoren wird vornehmlich über die beiden Wachstumsfaktoren Wnt und *bone morphogenetic protein* (BMP) vermittelt. Die Glykoproteine der Wnt-Familie führen durch Bindung an ihre osteoblastenständigen Rezeptoren über intrazelluläre Signalkaskaden zu einer Hypophosphorylierung von β -Catenin, was zu dessen Stabilisierung und Akkumulation führt. Nach Translokation in den Zellkern kommt es zur Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren, was schließlich die Osteoblastogenese stimuliert. BMP führt durch Bindung an seine zellulären Rezeptoren zu einer Aktivierung von R-Smad-Proteinen. Diese bilden Komplexe mit Smad4 und stimulieren über Runx2-Aktivierung oder durch direkte Transkriptionssteigerung Gene der Osteoblastogenese [25, 29]. Zur Hemmung der Osteoblastogenese spielt auf transkriptioneller Ebene der Notch-Signalweg eine bedeutende Rolle. Dabei wird der Transmembranrezeptor Notch nach Interaktion mit seinem Liganden proteolytisch gespalten, woraufhin das entstandene Spaltprodukt die Transkription von Hey- und Hes-Genen aktiviert, welche Runx2 inhibieren [30].

Die Bildung von Knochenmatrix durch reife Osteoblasten beruht insbesondere auf der Synthese von Kollagen Typ I und Alkalischer Phosphatase, die eine wichtige Rolle bei der Mineralisation spielt. Weitere Bestandteile der organischen Knochenmatrix wie Osteocalcin, Glykoproteine, *bone sialo protein* und Osteopontin werden ebenfalls von Osteoblasten sezerniert [22]. Auf transkriptioneller Ebene wird die Osteoblastentätigkeit entscheidend von Runx2 stimuliert. Dieses regt die Expression

von Osteocalcin und von Genen für die Synthese extrazellulärer Knochenmatrix an, wodurch die Knochenneubildung gefördert wird [31]. Auf hormoneller Ebene greift Leptin hemmend in die Osteoblastentätigkeit ein. Das von Adipozyten gebildete Hormon bindet an hypothalamische Rezeptoren und vermittelt seine Wirkung über diesen zentralen Weg. Ein Fehlen von Leptin oder dessen Rezeptor führt zu gesteigertem Appetit, Adipositas und einer zugleich signifikant erhöhten Knochenmasse [32, 33]. Eine weitere wichtige Funktion der Osteoblasten liegt neben der Bildung von Knochensubstanz in der Regulation der Osteoklastentätigkeit durch die Produktion von *receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand* (RANKL) und Osteoprotegerin (OPG), was in Kapitel 2.1.2 näher ausgeführt wird.

Nach einer mittleren Lebensdauer von etwa drei Monaten können Osteoblasten zu Osteozyten transformieren, die mit etwa 95% die größte Population aller Knochenzellen darstellen. Durch die Überlagerung mit Knochenmatrix, die von umliegenden aktiven Osteoblasten produziert wird, kommt es zur Einbettung der Osteozyten ins Osteoid. Dabei nimmt die Anzahl an Zellorganellen sowie das Zellvolumen schrittweise ab. Weiterhin finden morphologische Veränderungen statt, sodass sich Osteozyten schließlich durch eine Vielzahl zytoplasmatischer Zellfortsätze auszeichnen. Diese bilden ein dichtes Netzwerk im gesamten Knochen und stehen so mit benachbarten Osteozyten und Osteoblasten in engem Kontakt [34]. Auf dieser starken Zellvernetzung basieren wichtige regulatorische Funktionen von Osteozyten. So kommt es durch die osteozytäre Expression des Proteins Sclerostin zur Hemmung des Wnt-Signalwegs, was zu einer Verminderung der Osteoblastogenese und zu vermehrter Apoptose von Osteoblasten führt. Dadurch schützen Osteozyten vor unkontrollierter Knochenneubildung und nehmen zudem auch indirekt Einfluss auf die Osteoklastogenese. Die Sclerostinbildung wird wiederum hormonell reguliert und unterliegt dem hemmenden Einfluss von Parathormon (PTH) [22]. Darüber hinaus wird angenommen, dass apoptotische Osteozyten durch bisher unbekanntes Signalwege Osteoblasten zur RANKL-Expression stimulieren, um die Knochenresorption in ihrer Umgebung anzuregen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass viable Osteozyten selbst RANKL produzieren und so direkt Einfluss auf die Osteoklastogenese nehmen [35].

2.1.2 Osteoklasten

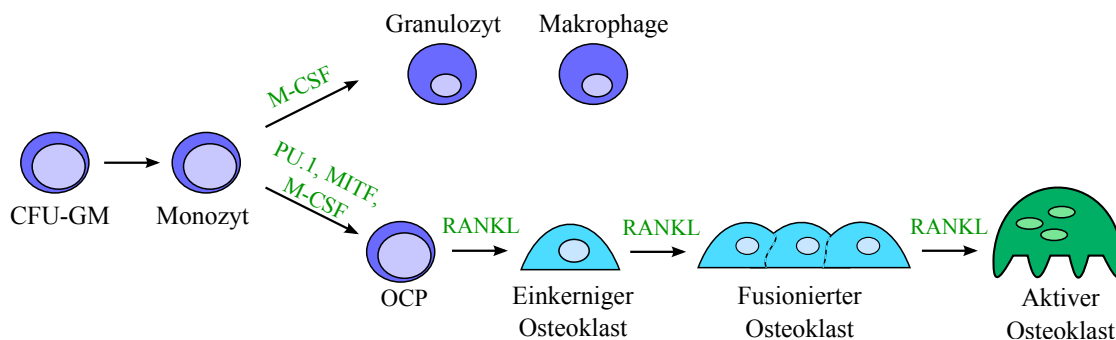


Abb. 2.1: Ausgehend von gemeinsamen granulozytär-monozytären Progenitorzellen entwickeln sich im Knochenmark unter dem Einfluss verschiedener Faktoren Granulozyten und Makrophagen sowie Osteoklasten-Progenitorzellen. Die weitere Differenzierung zum reifen aktiven Osteoklasten unterliegt maßgeblich der Stimulation durch RANKL. Abbildung nach [36, 37].

Osteoklasten leiten sich im Gegensatz zu Osteoblasten von hämatopoetischen pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks ab. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Differenzierung von Osteoklasten innerhalb der myeloischen Reihe. Diese bilden sich ausgehend von granulozytär-monozytären Progenitorzellen (CFU-GM) in mehreren Differenzierungsschritten durch Proliferation und Fusion einkerniger Osteoklasten-Progenitorzellen (OCP) zu multinukleären Vorläuferzellen. Auch Granulozyten, Monozyten und Makrophagen besitzen gleiche myeloische Ursprungszellen [38]. *Udagawa et al.* zeigten, dass für reife Monozyten und Makrophagen *in vitro* die Differenzierung zu Osteoklasten noch möglich ist, wobei direkter zellulärer Kontakt zu Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks essentiell ist [39]. Diese Beobachtungen deuten auf das Vorhandensein bestimmter zellulärer Faktoren hin, die einen entscheidenden Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung ausüben. In der frühen Osteoklastogenese wurden die beiden Transkriptionsfaktoren PU.1 und *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) identifiziert, die CFU-GM zur weiteren Differenzierung im Knochenmark anregen [37]. Die Bildung des löslichen Wachstumsfaktors *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) durch aktivierte T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Endothelzellen sowie Fibroblasten spielt für die Ausbildung von Makrophagen und Osteoklasten eine entscheidende Rolle. Durch Bindung an seinen membranständigen Rezeptor werden Signalkaskaden aktiviert, die für das Überleben und Ausreifen notwendig sind [40]. Darüber hinaus induziert M-CSF die Expression von *receptor activator of nuclear factor-kappaB* (RANK) auf Osteoklasten-Vorläuferzellen [35].

Das Zytokin RANKL aus der *tumor necrosis factor* (TNF)-Familie gilt als wichtigster Faktor für eine erfolgreiche Osteoklastogenese. RANKL wird von Osteoblasten, Stromazellen des Knochenmarks, aktivierten T- und B-Lymphozyten sowie von Fibroblasten als membranständiger Faktor exprimiert, was die Notwendigkeit des direkten zellulären Kontakts erklärt. Durch Interaktion mit seinem Rezeptor RANK, der auf Osteoklastenvorläufern bis hin zu reifen Osteoklasten nachgewiesen wurde, werden die verschiedenen Differenzierungsschritte positiv moduliert. Als RANKL-Gegenspieler ist OPG, ein von Osteoblasten gebildetes lösliches Glykoprotein, von entscheidender Bedeutung. Die Komplexbildung von RANKL mit OPG hemmt dabei die Bindung an RANK. Dies verhindert die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden, die über Transkriptionsregulation den Prozess der Osteoklastendifferenzierung aktivieren können [40–43].

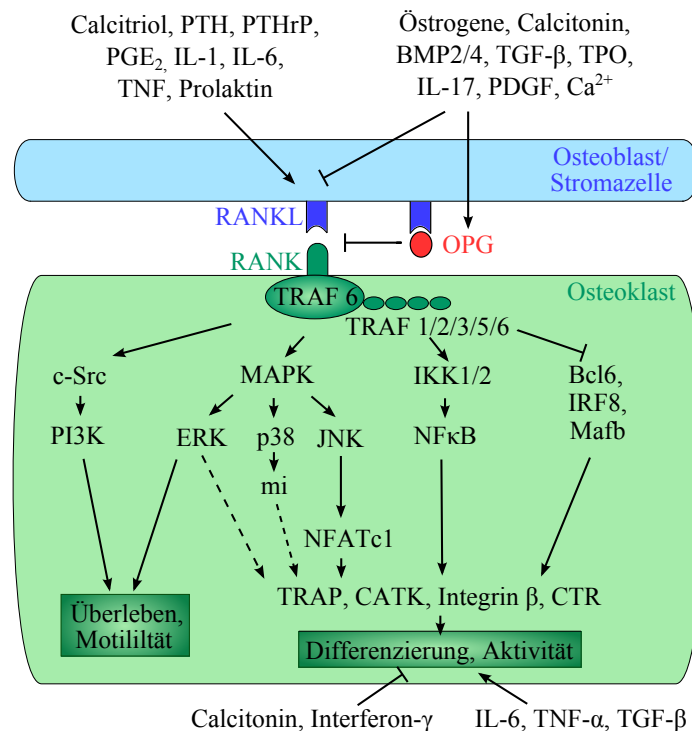


Abb. 2.2: Die Regulation der Osteoklastogenese unterliegt in besonderem Maße der Interaktion von RANKL mit seinem Rezeptor RANK, wodurch eine Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden induziert wird. Das von Osteoblasten gebildete OPG hemmt die Bindung zwischen RANKL und RANK. Sowohl RANKL- als auch OPG-Synthese unterliegen einer übergeordneten Regulation durch Hormone und Zytokine. Des Weiteren sind verschiedene Faktoren bekannt, die Osteoklasten direkt stimulieren beziehungsweise hemmen. Abbildung nach [37, 44].

Wie in Abbildung 2.2 dargestellt unterliegt die Bildung von RANKL und OPG einer übergeordneten Regulation durch Hormone, Zytokine und humorale Faktoren. Durch Bindung an ihre membranständigen Rezeptoren induzieren sie eine vermehrte Produktion von RANKL beziehungsweise OPG. Bekannt für eine Steigerung der mRNA-Expression von RANKL sind Calcitriol, PTH, *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Interleukin 1 (IL-1), IL-6, TNF- α , Prolaktin und Corticosteroide. Im Gegensatz dazu bewirken Östrogene, Calcitonin, BMP2/4, *transforming growth factor beta* (TGF- β), Thyreoperoxidase (TPO), IL-17, *platelet-derived growth factor* (PDGF) und Calcium eine vermehrte OPG-Freisetzung beziehungsweise verminderte RANKL-Expression [44–47]. Darüber hinaus existieren weitere Mediatoren, die die Osteoklastenentwicklung unabhängig vom RANKL/RANK/OPG-System beeinflussen. Durch Bindung an ihre auf Osteoklasten exprimierten Rezeptoren werden Signalkaskaden zur Differenzierung und Aktivierung in Gang gesetzt. Inflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-6 wirken stimulierend, wohingegen Calcitonin und Interferon- γ einen hemmenden Einfluss auf Osteoklasten zeigen [22, 35]. Bei der Aktivierung von RANK durch seinen Liganden RANKL kommt es initial zu einer Trimerisierung des Rezeptors. Die darauf folgende Bindung von TNF-Rezeptor-assoziierten zytoplasmatischen Faktoren (TRAF 1/2/3/5/6) an den zytoplasmatischen C-Terminus von RANK führt zur Stimulation verschiedener intrazellulärer Signalwege [44]. Über c-Src vermittelte Aktivierung von Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K) sowie *extracellular-signal regulated kinase* (ERK)-Signalwege wird eine zytoskelettale Reorganisation mit damit verbundener Motilität sowie das Überleben von Osteoklasten induziert. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B) über die Proteinkinasen *inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase* (IKK) 1/2 sowie die Stimulation von Signalkaskaden über p38, *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) und ERK führen schließlich zur Expression osteoklastenspezifischer Gene. Diese kodieren unter anderem für die Proteine Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), Kathepsin K (CATK), Integrin β 3, Calcitoninrezeptor (CTR) und *dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP). Darüber hinaus sind Transkriptionsfaktoren wie *B-cell lymphoma 6* (Bcl6), *Interferon regulatory factor 8* (IRF8) und MafB bekannt, die hemmend auf die Osteoklastogenese einwirken [37, 44, 48].

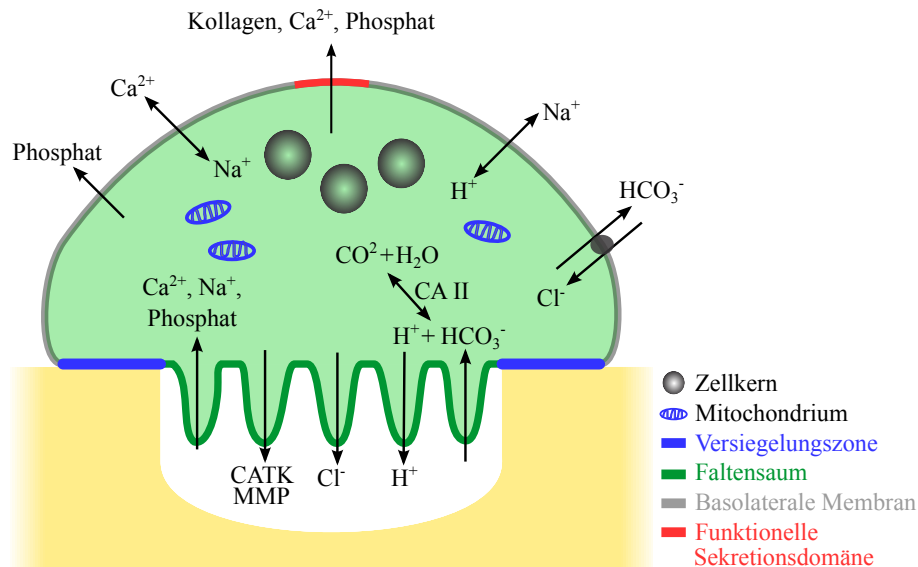


Abb. 2.3: Aktive Osteoklasten weisen als polarisierte Zellen unterschiedlich strukturierte Plasmamembranabschnitte auf. Die feste Anheftung an die Knochenmatrix erfolgt über die Versiegelungszone, die Resorption über den Faltensaum. Durch Sekretion von HCl in die Resorptionslücke wird mineralische Knochensubstanz resorbiert, CATK und MMP degradieren organische Materialien. Weitere Ionenflüsse insbesondere über die basolaterale Membran gewährleisten ein Ionengleichgewicht zwischen Intra- und Extrazellulärraum, während resorbiertes Kollagen, Calcium und Phosphat über die funktionelle Sekretionsdomäne apikal abgegeben werden. Abbildung nach [49, 50].

Die Synthese osteoklastentypischer Proteine wird damit in einem komplex regulierten System gesteuert, das sich an die aktuellen Anforderungen anpasst. Die Fusion mehrerer einkerniger OCP zu mehrkernigen Osteoklasten wird über Oberflächenmoleküle wie E-Cadherin und *macrophage fusion receptor* vermittelt. Von maßgeblicher Bedeutung ist zudem DC-STAMP, ein Transmembranprotein, das auch von dendritischen Zellen exprimiert wird. Dessen entscheidende Rolle für die Zell-Zellfusion wurde in Experimenten mit Knockout-Mäusen deutlich, in denen eine komplette Aufhebung der Zellfusion zu beobachten war. Darüber hinaus trat eine deutlich herabgesetzte Resorptionstätigkeit auf, was ein Indiz für die Bedeutung der Zell-Zellfusion zur Aufnahme der Osteoklastenaktivität darstellt [51]. Zur Aufnahme der osteoklastären Resorptionstätigkeit ist die Anheftung an mineralisierte Knochenmatrix initiale Voraussetzung. Dabei bilden sich an der knochen-zugewandten Plasmamembran durch intrazelluläre strukturelle Veränderungen des Zytoskeletts ringförmig angeordnete Podosome aus, die aus F-Aktin sowie den

Proteinen Vinculin und Talin bestehen. Vermittelt über Integrine und das Protein CD44 kommt es zur Verbindung zwischen Zytoskelett und Extrazellulärmatrix. Die anschließende Ausbildung eines dichten F-Aktinrings stellt den engen Kontakt der Plasmamembran zum Knochen her. Dieser Bereich ist als Versiegelungszone bekannt, die ringförmig ein abgeschlossenes Kompartiment zwischen Plasmamembran und Knochenmatrix umgibt, welches als Resorptions-Lakune bezeichnet wird. C-Src-abhängige Polarisations-signale vermitteln weitere strukturelle Veränderungen, wobei es zur Auffaltung der innerhalb der Versiegelungszone gelegenen basalen Plasmamembran kommt, was der Oberflächenvergrößerung dient. In diesem Bereich des sogenannten Faltensaums kann schließlich der Knochenabbau erfolgen, was in Abbildung 2.3 vereinfacht dargestellt ist [40, 49, 50]. Die Auflösung von Hydroxylapatit und anderen Knochenmineralien erfolgt durch Ansäuerung der Resorptionslakune. Dies geschieht einerseits durch die Fusion saurer, zytoplasmatischer Vesikel mit der basalen Membran. Andererseits gelangen Protonen über in der basalen Membran eingelagerte H^+ -Adenosin-triphosphatasen (ATPasen) sowie Chloridionen vermittelt durch Cl^- -Kanäle in die Lakune. Die entstehende Salzsäure kann bei einem pH-Wert von etwa 4,5 mineralisierte Knochensubstanz auflösen. Dabei werden durch die Aktivität intrazellulärer Carboanhydrase II (CA II) ständig Protonen generiert sowie der intrazelluläre pH-Wert durch Cl^-/HCO_3^- -Austauscher an der basolateralen Plasmamembran aufrechterhalten. Eine Vielzahl an Mitochondrien sichert dabei die Versorgung mit ATP [37, 40, 49, 50]. Auch der Abbau organischer Knochenmaterialien erfolgt an der basalen Plasmamembran. Durch Exozytose wird aus Vesikeln das lytische Enzym CATK freigesetzt, welches Kollagen I im sauren Milieu spaltet. Matrixmetalloproteasen (MMP), insbesondere MMP9 und MMP14, scheinen initial ebenfalls am Kollagenabbau beteiligt zu sein [49]. Die Aufnahme der entstandenen Abbauprodukte wie Calcium, Phosphat, Bikarbonat sowie Kollagenfragmenten erfolgt in einem spezialisierten Bereich der basalen Membran. Die anschließende Transzytose in Vesikeln bis zur apikalen Membran wird über Mikrotubuli gewährleistet, um dort die Abbauprodukte in den Extrazellulärraum abzugeben. Dieser als funktionelle Sekretionsdomäne bekannte Plasmamembranabschnitt ist ultrastrukturell durch ein dichtes Mikrotubulinetzwerk gekennzeichnet. Darüber hinaus existieren vesikelunabhängige Transzytosewege und in der basolateralen Membran lokalisierte Transporter und Kanäle, die Ionen in den Extrazellulärraum abgeben können [49]. Für das Protein TRAP sind zwei Isoformen bekannt, wobei TRAP5a von Makrophagen und dendritischen Zellen, TRAP5b vor allem von Osteoklasten sezerniert wird.

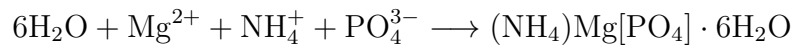
Für beide Isoformen konnten zwei enzymatische Aktivitäten nachgewiesen werden, denen in den verschiedenen Zelltypen spezifische Aufgaben zukommen. Zum einen fungiert es in Osteoklasten bei saurem pH als Phosphatase, die die Hydrolyse von Phosphoproteinen wie Osteopontin sowie Osteonektin katalysiert. Zum anderen ist es bei neutralem pH-Wert zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies fähig. Diese sind für den Abbau von Kollagen und anderen Bestandteilen der Knochenmatrix in zytologischen transzytotischen Vesikeln von Osteoklasten von Bedeutung. Darüber hinaus kommt TRAP eine wichtige regulatorische Rolle im Skelett- und Immunsystem zu. Studien mit Knockout-Mäusen belegen die Bedeutung für Kollagensynthese, Osteoblastenregulation sowie Reifung dendritischer Zellen [52–54]. Neben der Knochenresorption kommt Osteoklasten auch eine wichtige regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel zu. Dabei wird angenommen, dass Osteoklasten Faktoren produzieren, die direkten Einfluss auf die Osteoblastenaktivität nehmen. Zu den stimulierenden Klastokinen zählen Sphingosin-1-phosphat, BMP6, Wnt 10b und Ephrin B2, während Semaphorin 4D hemmend auf die Differenzierung von Osteoblasten wirkt [35].

Während die Lebensdauer von Osteoklasten *in vivo* noch nicht abschließend geklärt ist, konnten *in vitro* bisher mehrere Resorptionszyklen beobachtet werden, bevor nach etwa zwei Wochen die Apoptose eintritt. Als apoptosestimulierende Mediatoren für Osteoklasten sind Bisphosphonate, Östrogene sowie TGF- β bekannt, die Erforschung ihrer detaillierten Wirkungsweise steht allerdings noch aus [38].

2.2 Bedeutung von Magnesiumphosphaten als Knochenersatzmaterialien

Magnesiumphosphate sind im menschlichen Körper in unterschiedlichen Formen in verschiedenen pathologisch mineralisierten Geweben vorzufinden. So wurde beispielsweise in Nieren- und Harnsteinen infektiöser Genese als Hauptbestandteil Struvit ($(\text{NH}_4)\text{Mg}[\text{PO}_4] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) identifiziert. Als verursachende Pathogene sind dabei Urease-positive Bakterien bekannt, wobei es sich vorwiegend um *Proteus*, *Morganella* und *Providencia spp.* handelt. Durch die Urease-vermittelte enzymatische Hydrolyse von Harnsäure bildet sich unter anderem Ammoniak, woraus wiederum Ammoniumionen entstehen können [55].

Durch Reaktion mit vorhandenen Ionen wie Mg^{2+} und PO_4^{3-} entsteht gemäß nachfolgender Gleichung Struvit [55]:



Eine weitere Aggregation sowie das schnelle Wachstum der Kristalle werden durch ein alkalisches Milieu begünstigt. Darüber hinaus hat der Citratgehalt im Urin maßgeblichen Einfluss auf die Entstehung von Struvitsteinen, indem durch Komplexierung von Citrat mit Magnesium die Kristallisation gehemmt wird [55]. Newberyit ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) wurde ebenfalls in Nieren- und Harnsteinen nachgewiesen, Whitlockit (β -Tricalcium-Magnesiumphosphat) als Bestandteil von Zahnstein und in Steinen der Speicheldrüsen [56]. Magnesiumionen hingegen kommt im menschlichen Körper eine wichtige physiologische Rolle zu. Die größte Menge an Magnesium befindet sich in gebundener Form im Knochen, nur ein kleiner Anteil sind freie Ionen, die an der Zellproliferation, Zell-Matrix-Interaktion und dem Vitamin D-Metabolismus beteiligt sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Magnesiummangel als Risikofaktor für die Entstehung von Osteoporose in Frage kommt [57].

Ausgehend von dieser Bedeutung rückte Magnesium zunehmend in das Interesse der Forschung bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien. Ein möglicher Ansatzpunkt besteht darin, die etablierten Calciumphosphat-Zemente (CPC) wie Hydroxylapatit und Bruschiit durch Zusatz von Magnesiumionen zu optimieren (Mg-CPC). Dies führte zu einer Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften in Form von erhöhter Stabilität im Syntheseprozess [58]. Darüber hinaus zeigte sich auf Mg-CPC verglichen mit CPC erhöhte Proliferation und Adhäsion von Osteoblasten, was auf eine gute Biokompatibilität hinweist. *In vivo* wurde zudem eine Magnesium-induzierte Knochenneubildung und beschleunigte Zementresorption beobachtet [57]. Daneben kommt der Weiterentwicklung reiner Magnesiumphosphat-Zemente (MPC), die bereits um 1940 von *Prosen* entdeckt wurden, eine immer größere Bedeutung zu. MPC entstehen durch die Reaktion der Basiskomponente Magnesiumoxid mit sauren Ammoniumphosphaten wie Diammoniumhydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) oder Ammoniumdihydrogenphosphat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) [59]. Günstige Eigenschaften wie schnelles Aushärten, gute Adhäsion, sowie rasch einsetzende mechanische Belastbarkeit machen MPC bereits seit Jahren zu gefragten Materialien im Bauwesen – beispielsweise bei der Reparatur von Straßen oder Bodenbelägen [60]. Ihr Einsatz im medizinischen Bereich als Knochenersatzmaterialien wird aufgrund

dieser positiven Charakteristika ebenfalls intensiv erforscht. Von besonderem Interesse sind dabei Struvitzemente, die aus Farringtonit ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) und Diammoniumhydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) entstehen. Ein großer Vorteil gegenüber vielen anderen Zementen ist ihre Fähigkeit bei neutralem pH-Wert bereits innerhalb von 3-10 Minuten abzubinden, was günstig für die klinische Anwendung im biologischen Milieu ist. Zudem weisen sie eine hohe Druckfestigkeit auf und können aufgrund ihrer guten Löslichkeit *in vivo* innerhalb von mehreren Monaten passiv resorbiert und durch körpereigenes Hartgewebe ersetzt werden [8]. Auch die aktive Resorption von Struvitzementen durch Osteoklasten ist gegenüber CPC beschleunigt [61]. *In vivo* bestätigte sich im Tiermodell die gute Resorption von Struvitzementen, die nach Implantation in die Muskulatur nach drei Monaten deutlich degradiert waren. Die dabei stattfindende Ausbildung von Mikroporen gilt als gute Ausgangssituation für das Einwachsen neuen Knochens und den späteren Ersatz durch belastbares körpereigenes Knochengewebe [62]. Weiterhin gelang es die Viskosität der Zemente durch Zusatz von Diammoniumcitrat herabzusetzen. Daraus resultiert eine bessere Einspritzbarkeit, was für minimalinvasive klinische Anwendungen von grundlegender Bedeutung ist [8]. In mikrobiologischen Untersuchungen erwiesen sich Struvit und andere MPC als Materialien mit intrinsischen antimikrobiellen Eigenschaften. Ihre bakteriostatische bis bakterizide Wirkung gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* machen MPC somit besonders für zahnmedizinische Anwendungen zu vielversprechenden Materialien [9]. Neben guten Materialeigenschaften ist für den erfolgreichen klinischen Einsatz eine gute Biokompatibilität von großer Bedeutung. Hierzu konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten auf den MPC Newberyit und Cattiit keine signifikant erhöhte Freisetzung von Laktatdehydrogenase im Vergleich zu CPC wie Hydroxylapatit und Bruschiit aufwiesen, sodass die Zytotoxizität als relativ gering eingestuft werden kann. Auch die Expression von Markern der Osteoblastendifferenzierung ließ sich bestätigen [56]. Für ammoniumhaltige MPC dagegen bestand die Annahme, dass ihre Biokompatibilität durch die Freisetzung von Ammonium beeinträchtigt werden könnte [59], was jedoch inzwischen mehrfach widerlegt wurde. So zeigten *in vitro*-Untersuchungen auf Struvitzementen mehr Wachstum sowie eine deutlich höhere Aktivität der Osteoblasten verglichen mit dem Verhalten auf CPC. Obwohl die Expression osteoblastenspezifischer Proteine etwas geringer als auf CPC ausfiel, kann die Biokompatibilität von Struvit dennoch als gleichwertig oder gar verbessert angesehen werden [63]. Darüber hinaus ließ sich auch kein Hinweis auf Zytotoxizität

gegen Osteoklasten finden [61]. Weitere Studien belegen, dass MPC keine intrinsische Toxizität aufweisen und weder DNA-Schäden noch Genmutationen induzieren. Auch *in vivo* fanden sich keine Anhaltspunkte für entzündliches Geschehen oder Nekrosen [62].

Ein noch relativ neues Einsatzgebiet von Magnesiumphosphaten liegt in der Entwicklung magnesiumhaltiger Schichten auf metallischen Implantaten. *Ibasco et al.* entwickelten eine Methode, um Titanoberflächen mit Magnesium zu besputtern, um diese als Ausgangsschicht für die weitere Abscheidung bioaktiver Schichten zu nutzen. Dazu wurden Magnesium-besputterte Titanproben bei 37°C in verschiedene Phosphatlösungen eingebracht, sodass die gelösten Ionen mit der Magnesiumschicht reagierten und stabile Präzipitate bildeten. Bei Immersion in Ammoniumphosphat-Lösung entstanden dabei gleichmäßige Struvitschichten [64]. Die direkte Beschichtung von Titanoberflächen mit Struvit bei neutralem pH-Wert gelang mittels elektrochemischer Abscheidung. Unter Verwendung von Magnesiumsalzen und Ammoniumionen im Elektrolyten kam es zur raschen Ausbildung von Präzipitaten, die als reines Struvit identifiziert werden konnten [65]. Durch Modifikation der Beschichtungsparameter war es möglich in nur 15 Minuten bei Temperaturen zwischen 23–50 °C eine dichte Struvitschicht abzulagern [7].

2.3 Einfluss von Strontium auf Knochengewebe

Das Erdalkalimetall Strontium liegt in natürlicher Form als Mischung seiner vier stabilen Isotope (^{84}Sr , ^{86}Sr , ^{87}Sr , ^{88}Sr) stets in gebundener Form vor. Lediglich die Isotope ^{85}Sr , ^{89}Sr und ^{90}Sr sind radioaktiv und werden zum Teil für diagnostische und therapeutische Zwecke in der Medizin genutzt. In den Körperflüssigkeiten liegt Strontium – genau wie Calcium und Magnesium – als divalentes Kation vor, sodass für Strontium und Calcium ähnliche Transportwege zur Resorption und Ausscheidung existieren. Täglich werden insbesondere über pflanzliche Nahrung etwa 2–4 mg Strontium aufgenommen, die fäkal und renal ausgeschieden werden. Die daraus resultierende durchschnittliche Menge an Strontium im menschlichen Körper wird für einen 70 kg schweren Mann mit 0,32 g angegeben, weshalb Strontium als Spurenelement bezeichnet wird. Der überwiegende Anteil befindet sich hierbei im Knochen, wo es neben Calcium und Magnesium in sehr geringen Mengen eingelagert wird [15].

In der Medizin liegt die Bedeutung von Strontium in der Verwendung als Therapeutikum bei Osteoporose. Den Grundstein für den pharmakologischen Einsatz stellte die Beobachtung dar, dass die orale Aufnahme von Strontiumlactat zu erhöhter Calciumkonzentration im Knochen führt. Weitere Studien zeigten, dass Strontiumlactat Knochenschmerzen bei Osteoporosepatienten mildert sowie eine radiologisch erkennbare Verbesserung der Knochenstruktur bewirkt [15]. Dieser anti-osteoporotische Effekt tritt jedoch nur bei der Aufnahme moderater Strontiummengen auf. Bei Ratten, die täglich $87,5 \mu\text{mol}$ Strontium aufnahmen, kam es zu einer Steigerung der ossären Calciumkonzentration, wohingegen die 10-fache Menge zu deren Erniedrigung führte [66]. Das heute therapeutisch gebräuchliche Strontiumranelat ist die Verbindung einer organischen Säure mit zwei stabilen Strontiumatomen. Verschiedene Studien lieferten vielversprechende Ergebnisse für den Einsatz als Arzneimittel bei Osteoporose, da es sowohl die Knochenbildung stimuliert als auch die Knochenresorption hemmt [14]. Im Rahmen mehrerer randomisierter kontrollierter Studien gelang der Nachweis von verminderten Hüft- und Wirbelkörperfrakturen sowie erhöhter Knochendichte bei Patientinnen mit postmenopausaler Osteoporose, was schließlich zur Zulassung und zum klinischen Einsatz von Strontiumranelat führte [67, 68].

Die beobachteten Effekte werden auf die osteoanabolen und antiresorptiven Eigenschaften divalenter Strontiumionen zurückgeführt, sodass es zur Hemmung der Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten sowie zur Stimulation von Osteoblasten kommt. Eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion spielen nach momentanem Kenntnisstand G-Protein gekoppelte *calcium-sensing receptors* (CaSR), die hauptsächlich auf den Hauptzellen der Nebenschilddrüse lokalisiert sind, zudem aber auch auf Osteoblasten und Osteoklasten exprimiert werden [23]. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten kann neben Ca^{2+} auch Sr^{2+} mit etwas niedrigerer Affinität an CaSR binden, was über eine Aktivierung von Phospholipase $\text{C}\beta$ und Inositol-1,4,5-triphosphat einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bewirkt. Dies führt nachfolgend zur Stimulation der in Abbildung 2.4 gezeigten intrazellulären Signalwege. Differenzierung, Aktivitätssteigerung und verlängertes Überleben von Osteoblasten scheinen dabei über ERK1/2-*mitogen-activated protein kinases* (MAPK), Wnt- sowie Akt-vermittelte Signalwege gefördert zu werden. Darüber hinaus wird durch Interaktion von Sr^{2+} mit CaSR die osteoblastäre OPG-Expression gefördert und die RANKL-Expression gehemmt, was in einer verminderten Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität resultiert. Die direkte Osteoklastenhemmung durch

Strontium wird über NFκB und Proteinkinase C (PKC) vermittelt und führt zu reduzierter Differenzierung sowie gesteigerter Apoptose. Die Wirkung von Strontium auf Knochenzellen erfolgt allerdings nicht ausschließlich über CaSR, wie Studien mit CaSR-Knockout-Mäusen belegen. Dabei wurden unter dem Einfluss von Strontium weiterhin gesteigerte Osteoblastenproliferation sowie verminderte Apoptoseraten beobachtet. Hierbei scheint eine calcineurinabhängige Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T-cells* (NFATc1) seine Translokation in den Zellkern und Transkriptionsaktivität zu steigern. Weiterhin sind möglicherweise *fibroblast growth factor receptor* (FGFR) und *G-protein coupled receptor* (GPCR 61) sowie eine gesteigerte PGE₂-Produktion an der strontiumvermittelten Wirkung auf Osteoblastendifferenzierung und -proliferation beteiligt [16, 19].

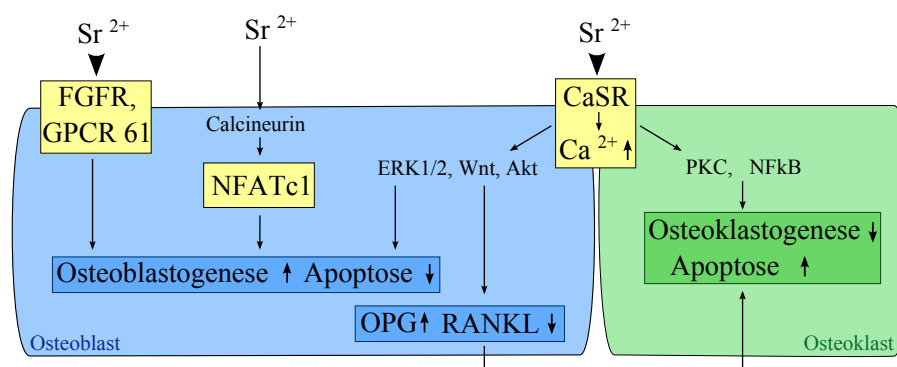


Abb. 2.4: Die anti-osteoporotische Wirkung von Sr²⁺ erfolgt maßgeblich über CaSR, die über Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege zur Hemmung von Osteoklasten sowie zur Aktivierung von Osteoblasten führt. Die strontiumabhängige Wirkung auf Osteoblasten wird zudem über NFATc1 sowie FGFR und GPCR 61 moduliert. Abbildung nach [16].

Die allgemein angenommene aktivierende Wirkung von Strontium auf Osteoblasten wird allerdings kontrovers diskutiert. *Wornham et al.* berichten, dass sowohl Strontiumranelat als auch Strontiumchlorid die Mineralisation von Knochenmatrix in konzentrationsabhängiger Stärke deutlich hemmt. Zudem kam es zu vermehrter Freisetzung von Laktatdehydrogenase, welche als Marker für erhöhte Zellmorbidity und -mortalität angesehen werden kann [20]. Auch der Einsatz von Strontium in Form von oral appliziertem Strontiumranelat zur Osteoporosetherapie ist Gegenstand von Diskussionen. Nachdem sich Hinweise auf ein erhöhtes Risiko kardialer und thromboembolischer Ereignisse ergaben, wurde die Indikationsstellung angepasst.

Dabei besteht eine Empfehlung nur noch bei schwerer Osteoporose unter Berücksichtigung von Kontraindikationen. Dennoch wird Strontiumranelat als sehr wirksames Medikament eingestuft, das insbesondere das Risiko für das Auftreten von Hüft- und Wirbelkörperfrakturen reduziert [69]. Aus diesem Grund gibt es neuere Bestrebungen die anti-osteoporotische Wirkung von Strontium bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien zu nutzen. Dazu wurden strontiumsubstituierte Calciumphosphate und Titanimplantate entwickelt, um die Effekte lokal verfügbaren Strontiums auf Knochenzellen zu untersuchen. Dabei ist die Datenlage zum momentanen Zeitpunkt nicht eindeutig, da beispielsweise *Roy et al.* im Vergleich zu Kontrolloberflächen eine vermehrte Ausbildung von ostoklastären Resorptionslaken jedoch keine signifikant beeinflussbare Osteoklastendifferenzierung beobachteten [70]. Andere Studien hingegen berichten unter dem Einfluss von Strontium von gesteigerter Osteoblastogenese und Osteoblastenaktivität bei zugleich verminderter Osteoklastogenese [17, 71, 72]. Auf elektrochemisch abgeschiedenen Oberflächen zeigte sich durch Strontiumzusatz eine gesteigerte osteoblastäre Proliferation, sodass diese Methode ebenfalls vielversprechende Ansätze für die Modifikation von Implantatoberflächen bietet [73].

Auch in vorliegender Arbeit wurde die Methode der elektrochemischen Abscheidung genutzt, um Titanoberflächen mit dem Magnesiumphosphat Struvit zu beschichten und verschiedene Mengen Strontium in die Oberflächen einzulagern. Dabei wurden sieben verschiedene Strontiumdotierungen zwischen 6 μg und 487 μg Strontium pro Probe hergestellt. Auf diesen Schichten erfolgte die Kultivierung osteoklastärer RAW 264.7 Zellen sowie osteoblastärer MG63 Zellen, um den Einfluss unterschiedlicher Mengen Strontium im Substrat auf das zelluläre Verhalten zu untersuchen. Im Zentrum dieser Arbeit stand dabei die Analyse von Differenzierungsverhalten und Aktivität osteoklastärer Zellen. Dies wurde mittels Bestimmung von Zellzahl und zellulärer Aktivität untersucht. Zudem kamen sowohl verschiedene mikroskopische Darstellungen der Zellmorphologie als auch Untersuchungen auf transkriptioneller Ebene zum Einsatz. Zur zusätzlichen Einschätzung des Strontiumeinflusses auf osteoblastäre Zellen erfolgte die Ermittlung von Zellzahl und Zellaktivität von MG63 Zellen, sodass diese Arbeit einen neuen Beitrag zur bereits thematisierten Kontroverse bezüglich der Wirkung von Strontium auf osteoblastäre Knochenzellen liefert.

Kapitel 3

Materialien und Methoden

3.1 Geräteverzeichnis

Tabelle 3.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte.

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Analysenwaage	Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt	
Analysenwaage	Ohaus GmbH, Giessen	Explorer
Autoklav	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim	Varioclav 400E
Autoklav	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim	Varioclav 500E
Bio Doc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen	
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois	AF 100
Elektrophoresenetzgerät	Consort bab, Turnhout, Belgien	Power Supply EV 265
ELISA Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Spectrafluor plus
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen	Axio Imager.M1
Gefrierschrank -80°C	Telstar Lifesciences, Woerden, Niederlande	Igloo VIP Insulation 570L
Heizblock	Eppendorf Vertrieb DE GmbH, Wesseling-Berzdorf	ThermoMixer 5436
Inkubator	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold	Hera cell 150i
Kühl-Gefrierkombination	Bosch GmbH, München	

Labormikroskop	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar	DMIL
Lichtmikroskop	Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar	Leitz DMRD
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen	C-MAG HS 7
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen	Combimag-RCO
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen	Combimag-RCT
Magnetrührer	IKA-Werke GmbH & Co.KG, Staufen	Combimag-RET
Microplate Reader	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim	Infinite M200
Mikrozentrifuge	VWR International GmbH, Darmstadt	MiniStar silverline
Multimeter	Tektronix GmbH Keithley Instru- ments, Germering	2700E
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim	inoLab Multi pH Level 1
Potentiostat/Galvanostat	Bank Elektronik Intelligent Con- trols GmbH, Pohlheim	
Rasterelektronenmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen	Crossbeam 340
Reinstwasseranlage	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co.KG, Göttingen	arium pro VFTOC
Reinstwasseranlage	USF Pure Lap GmbH, Ramsbach-Baumbach	
Rollenmischer	Karl Hecht GmbH & Co.KG, Sondheim/Rhön	RM5, Assistent 348
Sandstrahlgerät	Renfert GmbH, Hilzingen	Basic quattro No. 2954
Stereomikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen	SteREO Discovery.V20
Sterilbank	Heraeus GmbH & Co.KG, Hanau	Lamin Air HB 2472
Sterilbank	Integra Biosciences GmbH, Fernwald	Nuaire Labgard
Stickstoffbehälter	Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf	
Thermocycler	Thermo Hybaid GmbH, Garching	PCR Express

Thermostat	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe	C 10
Tischzentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen	EBA 20
Ultraschallbad	Elektronik GmbH & Co.KG, Berlin	Bandelin Sonorex
Vortexer	Heidolph GmbH & Co. KG, Kehlheim	
Wasserbad	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach	
Zellzähler	Roche GmbH, Mannheim	Casy 1, Schärfe System
Zentrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz	Heraeus Multifuge X3
Zentrifuge	Thermo Electron LED GmbH, Osterode am Harz	Megastar 1.6R

3.2 Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen wurden in Analysequalität bezogen.

Tabelle 3.2: Materialien zur Plättchenbeschichtung.

Material	Hersteller
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ammoniumdihydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$)	Merck KGaA, Darmstadt
Extran MA05	Merck KGaA, Darmstadt
Korox Strahlsand 50 (Al_2O_3)	BEGO Bremer Goldschlägerei Wilh. Herbst GmbH & Co.KG, Bremen
Magnesiumoxid (MgO)	Merck KGaA, Darmstadt
Salpetersäure 65 % (HNO_3)	Merck KGaA, Darmstadt
Strontiumnitrat ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Tabelle 3.3: Medien, Lösungen und Chemikalien für die Zellkultur.

Material	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Albumin, bovine (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform (CHCl ₃)	VWR International GmbH, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dinatriumphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbeccos Modified Eagles Medium 30-2002 (DMEM)	ATCC, Manassas, Virginia
Dulbeccos Modified Eagle Medium, high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ethylenediaminetetraacetic acid tetraso- dium salt dihydrate (EDTA-Na ₂ -Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol 99 %	Walter CMP GmbH & Co. KG, Kiel
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glutardialdehyd-Lösung 25 %	Merck KGaA, Darmstadt
Hämatoxylinlösung GILL Nr.3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hepes Buffer Solution (1M)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Hexamethyldisilazan (HMDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hoechst 33342	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	VWR International GmbH, Darmstadt
Isoton	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumhydroxid 20 % (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumtartrat dibasisch Dihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Schuchardt OHG, Hohenbrunn
Penicillin-Streptomycin-Glutamin (100X)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
peqGOLD 100bp DNA Ladder	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD TriFast	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
pegGREEN	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
p-Nitrophenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RANKL/TRANCE	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
TRIS (Trizma base), Primary Standard and Buffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypan blue solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Tabelle 3.4: Alle für diese Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH, Ulm bezogen.

Primer	Sequenz	T_A^1
GAPDH for	5'-caa ggt cat cca tga caa ctt tg-3'	58 °C
GAPDH rev	5'-gtc cac cac cct gtt gct gta g-3'	58 °C
CATK for	5'-gat act gga cac cca ctg gga-3'	53 °C
CATK rev	5'-cat tct cag aca cac aat cca c-3'	53 °C
CTR2 for	5'-gca atg ctt tca ctc ctg afa aac-3'	57 °C
CTR2 rev	5'-cag taa aca cag cca cga caa tga g-3'	57 °C

¹ T_A = Annealing-Temperatur.

Tabelle 3.5: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
Leukocyte acid phosphatase (TRAP) Kit 387A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
peqGOLD cDNA Synthesis Kit H Plus	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD Micro Spin Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
KAPA2G Fast Ready Mix with Dye	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Tabelle 3.6: Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien in der Zellkultur.

Gegenstand	Hersteller/Vertrieb
Casy cups	Roche GmbH, Mannheim
Combitips 1/2,5/5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Handschuhe, puderfrei	Meditrade GmbH, Kiefersfelden
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Multiwellplatten 24/96 Wells	Thermo Fischer Scientific Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Pipetten Pipetman Classic	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipetten Reference	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 20/200/1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg
Pipettierhilfe acu-jet pro	Brand GmbH, Wertheim
Polypropylen Röhrchen Cellstar 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reagiergefäß Safe Seal 1,5/2,0 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg
Serologische Pipette Cellstar 2/5/10/20 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Spritze 10 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Spritzenfilter Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg
Wägeschalen aus PS	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zellkulturflasche 75 cm ²	Corning Inc., Corning, USA
Zellschaber	SPL Life Sciences, Pocheon, Korea

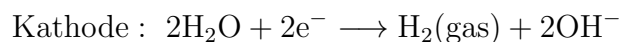
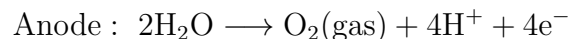
3.3 Herstellung strontiumdotierter Struvitschichten

3.3.1 Vorbereitung der Titanplättchen

Die als Beschichtungsgrundlage für die Untersuchungen genutzten Titanplättchen (*commercially pure*-Titan, Grad 2) wurden von der Feinmechanikwerkstatt der *FMZ Würzburg* mit einem Durchmesser von 15,5 mm und einer Dicke von 1 mm angefertigt. Vor der Beschichtung der Plättchen war eine Probenvorbereitung nötig, die sich aus einer ersten Reinigung, dem anschließenden Sandstrahlen und einer zweiten Reinigung zusammensetzte. Für den ersten Reinigungszyklus wurden die Titanplättchen in einem Becherglas überlappungsfrei ausgelegt und in vier Schritten mit Aceton, Extran 5 %, Reinstwasser und erneuertem Reinstwasser für jeweils 10 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Ziel dieser Behandlung war es, auf den Herstellungsprozess zurückzuführende Verunreinigungen zu entfernen. Das darauf folgende Sandstrahlen erfolgte unter Verwendung von Aluminiumoxid-Strahlsand mit einer Korngröße von 50 μm . Um die Oberfläche aufzurauen und damit die Anhaftung der Beschichtung zu verbessern, wurden die Plättchen gleichmäßig für 10 Sekunden mit einem Arbeitsabstand von 2 cm behandelt. Zur Beseitigung von Rückständen des Sandstrahlens wurden die Titanplättchen in drei Arbeitsschritten mit Extran 5 % sowie zweimal Reinstwasser für je 10 Minuten im Ultraschallbad gereinigt.

3.3.2 Elektrochemische Abscheidung auf Titan

Die Beschichtung der so vorbereiteten Titanplättchen mit strontiumdotiertem Struvit erfolgte mittels elektrochemischer kathodischer Abscheidung, welcher eine Potenzialdifferenz innerhalb eines Elektrolyten zugrunde liegt. Die im Elektrolyten gelösten Ionen fungieren als Ladungsträger, wodurch sich ein Stromfluss zwischen Anode und Kathode ausbildet. Dabei kommt es an der Anode zur Oxidation, an der Kathode zur Reduktion von Wasser gemäß den nachfolgenden Gleichungen [7]:



Durch die Entstehung von Hydroxidionen an der Kathode kommt es zur Hydroxylierung der Titanoberfläche. Dies ermöglicht die Interaktion mit im Elektrolyten enthaltenen positiv geladenen Ionen, was initial zur Bildung heterogener Nukleatio-

nen führt. Die anschließende Entstehung homogener Nukleationen beruht ebenfalls auf der Zunahme an Hydroxidionen in Kathodennähe, wodurch es dort zu einer lokalen pH-Wert-Erhöhung kommt. Die hierdurch herabgesetzte Löslichkeit der Ionen begünstigt somit ihre Abscheidung auf Titan [5, 74, 75]. Der für die Struvitbeschichtung benötigte Basiselektrolyt setzte sich bei einem Volumen von einem Liter aus den folgenden Komponenten zusammen [76]:

3,8334 g	<i>Diammoniumhydrogenphosphat</i>
6,6 ml	<i>Salpetersäure</i>
2,0150 g	<i>Magnesiumoxid</i>
1000 ml	<i>Reinstwasser</i>

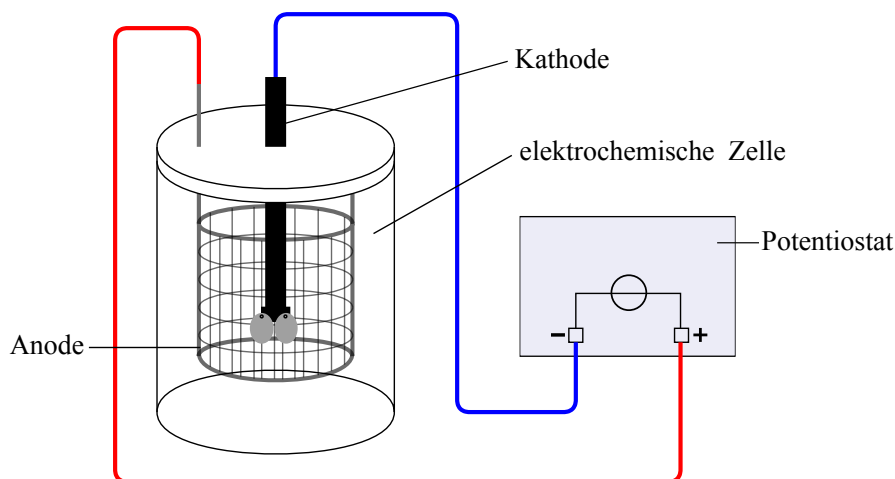


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung zur elektrochemischen Beschichtung von Titanplättchen. In die elektrolytgefüllte doppelwandige Zelle wurde die Kathode mit vier daran befestigten Titanplättchen eingebracht. Als Anode diente ein engmaschiges, zylindrisches Platinnetz, das sich – wie auch die Kathode – frei hängend im Elektrolyten befand. Über einen Potentiostaten wurde eine konstante Spannung von 100 mV angelegt. Abbildung nach [7].

Die Elektrolytlösung wurde in eine doppelwandige elektrochemische Zelle gefüllt und durch einen Thermostaten konstant auf 30 °C gehalten. Als Anode diente ein engmaschiges Platinnetz, das die Polymethylmethacrylat-ummantelte Titankathode im Abstand von etwa 3 cm ringförmig umgibt.² An der Kathode (Arbeitselektrode)

²Anode und Kathode wurden von der Feinmechanikwerkstatt der *FMZ Würzburg* angefertigt.

wurden vier Titanplättchen angeschraubt. Anode und Kathode wurden wie in Abbildung 3.1 gezeigt in die Elektrolytlösung eingebracht. Für die Abscheidung der gelösten Ionen auf den Titanplättchen wurde eine konstante Spannung von 100 mV unter Verwendung eines Potentiostaten angelegt. Bei gepulstem Strom der Stärke 40 mA und einer Beschichtungszeit von 15 Minuten wurde eine gleichmäßig dünne Struvitschicht auf den Titanplättchen abgeschieden. Die Modulation des Stroms bestand aus einer Sequenz von 5000 ms konstantem Stromfluss, gefolgt von einer Unterbrechung von 1000 ms. Eine ebensolche Schicht konnte alternativ bei ungepulstem Stromfluss von 50 mA bei 15 Minuten Beschichtungszeit hergestellt werden. Zur Dotierung der Struvitschicht mit Strontium wurde dem Elektrolyten Strontiumnitrat ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$) zugesetzt. Tabelle 3.7 zeigt die verwendeten Strontiumkonzentrationen mit dazugehörigen Beschichtungsparametern [76, 77].

Tabelle 3.7: Übersicht über die mittels Massenspektrometrie bestimmten Strontiummengen pro Plättchen sowie die dazugehörigen Parameter des Beschichtungsprozesses [76, 77]. Dabei wurden die Menge an Strontiumnitrat im Elektrolyten, Stromstärke und Beschichtungsdauer variiert. Zur Benennung der untersuchten Schichten wird im Folgenden die aufgeführte Bezeichnung verwendet.

Bezeichnung	Sr-Menge/Plättchen [μg]	$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ [g/l]	Stromstärke [mA]	Dauer [min]
Sr6	$5,57 \pm 0,53$	0,02706	50, ungepulst	15
Sr45	$45,2 \pm 2,9$	0,2706	50, ungepulst	15
Sr186	186 ± 34	2,706	50, ungepulst	15
Sr212	212 ± 91	2,706	75, gepulst	15
Sr290	290 ± 49	2,706	60, gepulst	25
Sr371	371 ± 47	5,412	40, gepulst	20
Sr487	487 ± 52	5,412	75, gepulst	15

Nach Beendigung des Beschichtungsprozesses wurden die Plättchen zügig aus dem Elektrolyten entnommen und vorsichtig mit Reinstwasser gespült, da sich ohne Stromfluss im Elektrolyten rasch ein saurer pH-Wert einstellt, der die Ablösung der Schichten begünstigt.

3.4 Kultivierung von RAW 264.7 und MG-63 Zellen

Bei den verwendeten monozytären RAW 264.7 Zellen handelt es sich um eine murine Monozytenzelllinie, die von *ATCC* bezogen wurde. Die gefroren gelieferten Zellen wurden längerfristig in flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt. Zum Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstoffbehälter entnommen und bei 37°C zügig im Wasserbad erwärmt. Zunächst erfolgte die Zugabe von 9,0 ml DMEM Kulturmedium, das sich aus folgenden Komponenten zusammensetzt:

Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)
Fetal bovine serum (FBS) 10 %
Penicillin-Streptomycin 1 %

Im Anschluss wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das gewonnene Zellpellet in 1,0 ml Kulturmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zusammen mit 20 ml DMEM in eine Zellkulturflasche überführt und bei 37°C inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums wurde in regelmäßigen Abständen von 2–4 Tagen durchgeführt, um konstantes Zellwachstum und Zellaktivität in Kultur zu gewährleisten. Zur Subkultivierung der Zellen wurde nach Absaugen des Kulturmediums 10 ml frisches Medium zugegeben und mithilfe eines Zellschabers die adhärennten RAW-Zellen abgelöst. Je nach benötigter Zellmenge wurde 0,5–2 ml Zellsuspension mit 20 ml frischem Medium in neue Kulturflaschen überführt. Die Zellen wurden nur bis zu einer maximalen Passage von 20 verwendet. Um die Differenzierung zu Osteoklasten zu induzieren wurde zum Kulturmedium 50 ng/ml *receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand*-Lösung (RANKL-Lösung) zugegeben. Diese wurde aus dem von *R&D Systems* bezogenen RANKL, bovinem Albumin und phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer), welche sich wie folgt zusammensetzt, hergestellt.

8,0 g *Natriumchlorid*
0,2 g *Kaliumhydrogenphosphat*
2,8 g *Dinatriumhydrogenphosphat*
0,2 g *Kaliumchlorid*
1000 ml *Reinstwasser*

Zum Einfrieren von RAW 264.7 Zellen wurden diese zuerst abgelöst und mit DMEM versetzt für 5 Minuten bei 1000 U/min und $4-6^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das dabei gewonne-

ne Pellet wurde mit Kulturmedium resuspendiert und in Dimethylsulfoxid und FBS auf Eis aufgenommen. Im Anschluss wurden die Zellen in einem Kryoröhrchen für 24-72 Stunden auf -80°C abgekühlt, bevor sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Die osteoblastäre Zelllinie MG-63 wurde ebenfalls von *ATCC* bezogen. Dabei handelt es sich um humane Osteosarkomzellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie. Auftauen und Einfrieren von MG-63 Zellen erfolgte gemäß des für RAW 264.7 Zellen beschriebenen Vorgehens. Das verwendete Kulturmedium wurde hierbei aus folgenden Komponenten hergestellt:

DMEM (high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate)

FBS 10 %

Hepes-Buffer 1 %

Penicillin-Streptomycin 1 %

Ebenso wurden die Zellen bei 37°C inkubiert und das Kulturmedium im Abstand von 2–3 Tagen erneuert. Um MG-63 Zellen zu subkultivieren wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums zweimal vorsichtig mit PBS-Puffer gespült und zum Ablösen mit 1 ml Accutase für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes Beklopfen der Kulturflasche wurden die adhärierenden Zellen gelöst und vereinzelt und mit 1 ml DMEM die Wirkung der Accutase gestoppt. In eine neue Kulturflasche mit 20 ml DMEM wurden 0,2–0,5 μl der Zellsuspension überführt.

3.5 Zellbiologische Untersuchung von Osteoklasten

3.5.1 Versuchsansatz von RAW 264.7 Zellen

Für die Untersuchungen zur Osteoklastendifferenzierung unter dem Einfluss von Strontium wurden RAW 264.7 Zellen auf die beschichteten Titanplättchen ausgesät, die zuvor für 60 Minuten in 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend luftgetrocknet wurden. Es wurden von jeder Oberflächenspezifikation drei Parallelansätze angelegt. Dazu wurde das Medium einer konfluent bewachsenen Kulturflasche abgesaugt und die Zellen mittels Zellschaber in 10 ml frischem Medium abgelöst. Die zur Aussaat angestrebte Zellzahl von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro ml Kulturmedium wurde mittels eines *Casy 1* Zellzählers ermittelt, wozu 0,1 ml der bereiteten Zellsuspension

mit 10 ml Isoton versetzt wurden. Bei der Messung wird die Zellsuspension in Isoton über eine elektrolytgefüllte Kapillare unter geringer Spannung gleichmäßig eingesogen. Während ihrer Passage durch die Kapillare ersetzen die Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe unterschiedliche Mengen Elektrolytlösung. Da intakte Zellen als Isolatoren betrachtet werden, kommt es dadurch zu einer Zunahme des Widerstands. Somit können Zellgröße und Zahl intakter Zellen in die Auswertung einbezogen werden, wozu aus zwei Messungen automatisch ein Mittelwert generiert wird [78]. Nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 37°C erfolgte die Zugabe von 50 ng RANKL pro ml DMEM, um die Differenzierung zu Osteoklasten zu induzieren. Die Versuchsreihen erstreckten sich jeweils über die Dauer von zwei Wochen, wobei das Kulturmedium alle 2–4 Tage erneuert wurde. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurden die in diesem Kapitel beschriebenen Versuche mit Ausnahme von PCR und Rasterelektronenmikroskopie (REM) jeweils in zwei zeitlich voneinander getrennten Versuchsansätzen durchgeführt.

3.5.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellaktivität

Um die Aktivität der Zellen bei Kultivierung auf strontiumdotierter Struvitbeschichtung zu ermitteln, wurden WST-1 Tests durchgeführt. WST-1 Reagenz ist ein chemisch stabiles Tetrazoliumsalz von hellroter Farbe, das zum gelblichen Formazan reduziert wird. Die Reduktion erfolgt größtenteils an der Zelloberfläche durch Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Dehydrogenase (NADH) beziehungsweise Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Dehydrogenase (NADPH) sowie durch das mitochondriale Enzym Succinat-Dehydrogenase und ist folglich nur in viablen Zellen möglich. Somit kann der photometrisch detektierbare Farbumschlag als Maß für die allgemeine zelluläre Aktivität betrachtet werden [79].

Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils an den Messtagen 3, 6, 10 und 13 mit einer Mischung aus WST-1 Reagenz und DMEM im Verhältnis 1:10 bedeckt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Blindwert wurde zusätzlich reine Mischlösung inkubiert. Um die Umsetzung von WST-1 zu stoppen wurden die Überstände abgenommen und in eine frische 24-Wellplatte überführt. Die Substratoberflächen wurden mit PBS bedeckt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Daraufhin wurde aus jedem Well 2 x 200 µl des Überstandes entnommen und in je ein Well einer 96-Wellplatte transferiert. Die photometrische Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm, die Referenzwellenlänge betrug 620 nm. Anschließend wur-

de die Zellzahl anhand derselben Proben bestimmt. Dazu wurden die Proben nach Abziehen von PBS noch zweimalig mit PBS gewaschen. Um die Zellen abzulösen wurde jede Probe mit 500 μ l Accutase + Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzt und 40 Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Accutasetätigkeit wurden anschließend jeweils 500 μ l DMEM zugegeben. Durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen zusätzlich mechanisch gelöst und vermischt. Die maschinelle Zellzählung erfolgte mittels eines *Casy 1* Zellzählers, wozu 0,1 ml der bereiteten Zellsuspension mit 10 ml Isoton versetzt wurden. Um eine eventuelle Verfälschung der maschinellen Messergebnisse durch abgelöste Beschichtungspartikel festzustellen, wurde in regelmäßigen Abständen stichprobenartig die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer überprüft. Hierzu wurden 20 μ l der gelösten Zellsuspension mit 20 μ l Trypanblau in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden 25 μ l dieser Mischung in die zuvor mit Wasser und Ethanol gereinigte Zählkammer pipettiert. Die Auszählung erfolgte mikroskopisch anhand von vier Großquadraten. Für die statistische Auswertung der einzelnen Messreihen wurden für jede Probe an drei Plättchen Zellzahl und Zellaktivität bestimmt. Daraus wurden mittels Microsoft excel jeweils Mittelwert und Standardabweichung berechnet und auf den Wert für Titan am ersten Messtag normiert. Es erfolgte eine einfaktorielles Varianzanalyse mit anschließendem Tukey-Test mithilfe der Software inerSTAT-a v.1.3 von Mario H. Vargas.

3.5.3 Aktivität der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Zur Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung erfolgte die Ermittlung der Aktivität intrazellulärer Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP). Die photometrische Messung beruht hierbei auf der TRAP-vermittelten Hydrolyse von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol (pNP), sodass die dabei entstehende Farbänderung als Absorption bei $\lambda=405$ nm detektiert werden kann [80].

Vor Beginn der Versuchsdurchführung wurden nachfolgend aufgeführte Lösungen jeweils neu angesetzt:

Acetat-Tartrat-Puffer:

100 mM *Natriumacetat*

50 mM *Natriumtartrat*

Lysepuffer:

10 ml *PBS-Puffer*

0,1 ml *Triton X-100*

Substratpuffer:

10 ml *Acetat-Tartrat-Puffer*

7,6 mM *p-Nitrophenylphosphat*

Stopp-Lösung:

100 ml *Reinstwasser*

3 M *NaOH*

Die Proben wurden an den Messtagen 4, 7, 11 und 14 nach Abziehen des Kulturmediums gründlich mit PBS gewaschen. Zur Zell-Lyse wurden die Proben mit 300 μ l Lysepuffer pro Well bedeckt und eine Stunde auf Eis inkubiert. 50 μ l dieses Lysats wurden zusammen mit 150 μ l Substratpuffer in eine 96-Wellplatte überführt und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 50 μ l Stopp-Lösung zugegeben. Zur Absorptionsmessung bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm wurde eine Kalibrierkurve aus 10–200 μ M pNP-Lösung in Acetat-Tartrat-Puffer erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte über Mittelwerte und Standardabweichungen analog zum unter 3.5.2 beschriebenen Vorgehen.

3.5.4 Färbung Tartrat-resistenter saurer Phosphatase

Der lichtmikroskopische Nachweis differenzierter Osteoklasten auf den zu untersuchenden Proben erfolgte über Anfärbung des Enzyms TRAP innerhalb der Zellen. Das Färbeprinzip beruht dabei auf der Hydrolyse von Naphthol AS-BI Phosphorsäure-Lösung durch TRAP und der anschließenden Verbindung mit Fast Garnet GBC, wodurch unlösliche, violette bis dunkelrote Granula entstehen [81].

Die Osteoklasten auf den verschiedenen Proben wurden jeweils nach 4, 7, 11 und 14 Tagen in Kultur angefärbt, wozu das Kit 387A von *Sigma Aldrich* verwendet wurde. Die Fixierlösung, die sich wie folgt zusammensetzt, wurde dabei für die Dauer der Versuche bei 4°C gelagert.

25 ml *Citratlösung*

65 ml *Aceton*

8 ml *Formaldehyd 37%*

Die Färbelösung wurde hingegen gemäß nachstehender Vorschrift vor jedem Gebrauch frisch angesetzt und auf 37°C vortemperiert.

33 µl	<i>Fast Garnet GBC Standardlösung</i>
33 µl	<i>Natriumnitrit-Lösung</i>
3 ml	<i>Reinstwasser 37°C</i>
33 µl	<i>Naphthol AS-BI Phosphorsäure-Lösung</i>
133 µl	<i>Acetatlösung</i>
66 µl	<i>Tartratlösung</i>

Die Zellen wurden für 30 Sekunden mit Fixierlösung bedeckt und im Anschluss eine Stunde mit Färbelösung bei 37°C inkubiert. Durch den Zusatz von Tartratlösung zur Färbelösung konnte sichergestellt werden, dass nur Zellen, die das Enzym Tartratresistente saure Phosphatase aufweisen, angefärbt wurden. Anschließend wurden die Zellen gründlich in Reinstwasser gewaschen und 2 Minuten in Hämatoxylinlösung GILL Nr. 3 gegengefärbt, sodass sich die Zellkerne durch Spülen mit alkalischem Leitungswasser blau färbten. Vor der mikroskopischen Betrachtung wurden die Proben 30 Minuten luftgetrocknet.

3.5.5 Aktindarstellung mittels Immunfluoreszenz

Eine weitere Möglichkeit zum lichtmikroskopischen Nachweis differenzierter Osteoklasten ist die Darstellung des Aktin-Zytoskeletts. Da es sich bei Aktin um einen üblichen Bestandteil des zellulären Zytoskeletts handelt, ist der alleinige Nachweis kein spezifisches Kriterium für Osteoklasten. Das Vorhandensein ringförmiger Aktinstrukturen stellt jedoch das morphologische Korrelat für die Ausbildung der Versiegelungszone und einer beginnenden Osteoklastentätigkeit dar. Aktin wurde über Phalloidin markiert, dem Gift aus *Amanita phalloides*, da sich dieses spezifisch in F-Aktinstränge einlagert. Durch Kopplung von Phalloidin an einen Fluoreszenzfarbstoff lässt sich Aktin fluoreszenzmikroskopisch nachweisen. Zur zusätzlichen Darstellung von Zellkernen wurde Hoechst 33342 eingesetzt, das an doppelsträngige DNA bindet und blau fluoresziert.

Phalloidinfärbungen wurden ebenfalls an Tag 4, 7, 11 und 14 nach Zellaussaat durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen der Proben mit PBS-Puffer für je 2 Minuten wurden diese zur Fixierung 5 Minuten in 2%igem Paraformaldehyd in PBS auf Eis

gestellt. Nach zwei weiteren Waschschritten zu je 2 Minuten wurden die Proben 5 Minuten mit 0,2%igem Triton X-100 in PBS versetzt und nach erneut zwei Waschszyklen in eine feuchte Kammer gelegt. Darin erfolgte unter Bedeckung mit 200 μ l 1%igem Phalloidin in PBS pro Well für 30 Minuten die lichtgeschützte Inkubation. Im Anschluss wurden die Proben für 7 Minuten mit 5 Tropfen Hoechst pro Well gegengefärbt, wobei zuvor und danach je zweimal für 2 Minuten mit PBS gewaschen wurde. Die Entwässerung erfolgte 1 Minute in 96%igem Ethanol, sodass die Proben nach 30-minütigem, lichtgeschütztem Trocknen mikroskopiert werden konnten.

3.5.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die Probenvorbereitung für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bestand aus zweimaligem Waschen der Proben in PBS-Puffer und anschließender Fixierung mittels 60%igem Glutaraldehyd für 15 Minuten auf Eis. Für die Entwässerung der Präparate wurden die Proben jeweils zweimal für je 10 Minuten mit PBS (auf Eis), 70%igem, 90%igem und 100%igem Ethanol (jeweils bei Raumtemperatur) sowie zweimal für 15 Minuten mit Hexamethyldisilazan überschichtet. Die damit fixierten Zellen wurden 30 Minuten luftgetrocknet und konnten im Anschluss ohne weitere Behandlung mikroskopiert werden. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in einem *Zeiss Crossbeam 340* bei einer Spannung von 1,0 kV mit 200- bis 2000-facher Vergrößerung angefertigt.

3.5.7 PCR zum Nachweis osteoklastärer Gene

Ein weiterer Nachweis der Osteoklastendifferenzierung erfolgte durch Bestimmung der Aktivität spezifischer Gene im zeitlichen Verlauf. Nachgewiesen wurden dabei Kathepsin K (CATK) und Calcitoninrezeptor 2 (CTR2), welche als Marker für eine erfolgreiche Osteoklastenentwicklung angesehen werden [82]. Als Positivkontrolle diente das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein Enzym der Glykolyse.

Der erste Schritt des angewandten Nachweisverfahrens bestand in der RNA-Extraktion aus der zu untersuchenden Probe. Diese erfolgte gemäß der Vorschrift des verwendeten peqGOLD TriFast³, wobei pro Well 0,5 ml TriFast eingesetzt wurden. Die hierbei erhaltene, in 1%igem Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser gelöste RNA

³peqGOLD TriFastTM v0314_D.

wurde im Anschluss aufgereinigt, um DNA-Reste und Beschichtungspartikel zu entfernen. Dazu wurde das peqGOLD Micro Spin Total RNA Kit verwendet.⁴ Jeder Probe wurden 100 μl DEPC-Wasser, 350 μl RNA Lysis Buffer T und 250 μl 99%iger Ethanol zugegeben und gründlich vermischt. In einer RNA-Säule wurde die Probe kurz zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und im Anschluss drei Waschschrte sowie Trocknung nach Anweisung im Kit durchgeführt. Die abschließende Elution erfolgte mit 14 μl DEPC-Wasser. Die gewonnene RNA wurde daraufhin mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben, um diese in der PCR einzusetzen. Die Durchführung der cDNA-Synthese orientierte sich am Protokoll des verwendeten Kits,⁵ wobei 1 μg RNA pro Probe und oligo (dT)₁₈-Primer eingesetzt wurden. Anhand einer photometrischen Bestimmung der DNA-Konzentration wurde durch Verdünnung mit DEPC-Wasser eine DNA-Konzentration von 250 ng/ μl eingestellt. Für die PCR wurden in einem PCR-Tube für jede Probe 24 μl des nachfolgend aufgeführten Mastermixes vorgelegt. Diesem wurde 1 μl des aus der cDNA gewonnenen DNA-Templates mit einer DNA-Konzentration von 250 ng/ μl beigefügt. Die nachfolgend angegebenen Mengen des Mastermix beziehen sich dabei auf eine Probe.

12,5 μl 2x *KAPA2G Fast Ready Mix with Dye*
 2,5 μl *Forward Primer* 10 μM
 2,5 μl *Reverse Primer* 10 μM
 9,5 μl *DEPC-Wasser*

Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNA im Thermocycler nach Tabelle 3.8 amplifiziert. Dabei betrug die Zahl der Zyklen für GAPDH und CATK 25, für CTR2 35. Zudem war die Annealing-Temperatur primerabhängig mit 58 °C für GAPDH, 53 °C für CATK sowie 57 °C für CTR2.

Tabelle 3.8: Parameter der DNA-Amplifikation im Thermocycler.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiales Denaturieren	95 °C	3 Min.	1
Denaturieren	95 °C	15 Sek.	25/35
Annealing	primerabhängig	15 Sek.	
Elongation	72 °C	10 Sek.	
Finale Elongation	72 °C	3 Min.	1

⁴peqGOLD Micro Spin Total RNA Kit, Arbeitsanleitung v0314_D, Protokoll C.

⁵peqGOLD cDNA Synthesis Kit H Plus, Instruction Manual v0314_E, RT-PCR Protokoll.

Zur Visualisierung des amplifizierten Genabschnittes wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde in einem ersten Schritt TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer wie folgt hergestellt:

10,8 g	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)</i>
0,83 g	<i>EDTA-Na₂-Salz</i>
5,5 g	<i>Borsäure</i>
1000 ml	<i>Reinstwasser</i>

Aus TBE-Puffer und Agarose wurde anschließend ein 2%iges Gel gegossen, dem pEq-GREEN als DNA-Farbstoff zugefügt wurde. Nach 30-minütiger Aushärtung wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer eingelegt. In die Taschen wurden jeweils 10 µl des PCR-Produkts pipettiert, als Marker diente eine 100 bp DNA-Ladder. Bei einer Spannung von 170 V und einer Laufzeit von 45–60 Minuten trennten sich die Banden auf und konnten mittels UV-Licht visualisiert werden. Eine Grauwertanalyse der Banden ermöglichte die quantitative Erfassung der Genexpression, wozu die ermittelten Grauwerte auf die entsprechenden Werte für GAPDH normiert wurden.⁶

3.6 Zellbiologische Untersuchung von Osteoblasten

3.6.1 Versuchsansatz von MG-63 Zellen

Zur Aussaat von MG-63 Zellen auf desinfizierte, beschichtete Titanplättchen wurde das Medium einer konfluent bewachsenen Kulturflasche abgezogen, zweimal mit PBS gespült und mit 1 ml Accutase für 5 Minuten inkubiert. Die dabei abgelösten Zellen wurden mit 10 ml DMEM versetzt und die Zellzahl der Suspension mittels *Casy1* Zellzähler bestimmt. Zur Aussaat wurde eine Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ Zellen pro ml Kulturmedium eingestellt. Die Versuchsansätze mit Osteoblasten waren über 10 Tage angelegt, wobei im Abstand von 2–3 Tagen das Kulturmedium erneuert wurde. Pro Beschichtungsspezifikation wurden drei Parallelansätze untersucht. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden auch diese Versuche in zwei zeitlich getrennten Ansätzen durchgeführt.

⁶Verwendete Software: GelAnalyzer, vs. 2010a, I. Lazar.

3.6.2 Zellzahl und zelluläre Aktivität

Da die Enzyme NADH, NADPH und Succinat-Dehydrogenase neben osteoklastären auch von osteoblastären Zellen exprimiert werden, eignet sich WST-1 Reagenz auch zur Ermittlung der zellulären Aktivität von MG-63 Zellen.

Die Zellaktivität wurde an den Tagen 3, 5, 7 und 10 bestimmt, wobei die Durchführung dem bereits beschriebenen Vorgehen unter 3.5.2 entspricht. Auch die Ermittlung der Zellzahl erfolgte analog zum Vorgehen mit RAW 264.7 Zellen, Unterschiede bestanden lediglich in der Verwendung von Accutase ohne EDTA-Zusatz und einer verkürzten Inkubationszeit von 10 Minuten. Zur statistischen Auswertung wurde ebenfalls wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben vorgegangen.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Differenzierung und Aktivität von Osteoklasten unter dem Einfluss von Strontium

Im nachfolgenden Kapitel wird der Einfluss einer Dotierung von Struvitoberflächen zwischen $6\ \mu\text{g}$ und $487\ \mu\text{g}$ Strontium pro Probe auf das Verhalten osteoklastärer Zellen dargestellt. Dabei wurde die Differenzierung von RAW 264.7 Zellen zu Osteoklasten mittels zytochemischer Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP), fluoreszenzmikroskopischer Darstellung von Aktin, rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (REM) sowie TRAP-Aktivität und PCR untersucht. Die Ergebnisse aus der Bestimmung von Zellzahl und WST-Aktivität lieferten insbesondere Informationen hinsichtlich zellulärer Proliferation und Aktivität.

4.1.1 Wirkung von Strontium auf Zellzahl und Zellaktivität

Zur Beurteilung des Zellwachstums auf den verschiedenen strontiumdotierten Struvitschichten wurden nach Zugabe von $50\ \text{ng}$ *Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand* (RANKL) pro $1\ \mu\text{l}$ Kulturmedium sowohl Zellzahl als auch zelluläre Aktivität ermittelt.

Proben mit $6\ \mu\text{g}$, $45\ \mu\text{g}$ und $186\ \mu\text{g}$ Strontium wurden initial untersucht, wobei Titan und Struvit als Referenzoberflächen dienten. In einer ersten Messreihe, dargestellt in den Abbildungen 4.1 (a) und (c), war auf Titan von Tag 3 auf Tag 6 ein sehr starker Rückgang der Zellzahl um annähernd 90 % zu beobachten. Erst im weiteren zeitlichen Verlauf stieg die Zahl der Zellen wieder an, blieb jedoch bis Tag 13 unterhalb

des Ausgangsniveaus. Auf Struvit lag die Zellzahl an Tag 3 verglichen mit Titan noch etwas niedriger, nahm aber bis Tag 6 stark zu, sodass sie mehr als das Dreifache des ersten Messtages betrug. Erst an Tag 10 kam es auch auf Struvit zu einem deutlichem Rückgang der Zellzahl um rund 70 %. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes stieg die Zahl wieder deutlich an, sodass diese etwa doppelt so hoch lag als an Tag 3. Die Zellaktivität auf Titan nahm einen mit der Zellzahl vergleichbaren zeitlichen Verlauf, allerdings in weniger ausgeprägter Form. Auf Struvit lag die zelluläre Aktivität an Tag 3 deutlich über derjenigen auf Titan, das Aktivitätsmaximum war an Tag 6 zu beobachten. Durch den Zusatz einer geringen Menge Strontium von 6 μg pro Probe konnten an den Messtagen bezüglich Zellzahl und -aktivität kaum signifikante Unterschiede zu undotiertem Struvit festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ähnelte der zeitliche Verlauf von Zahl und Aktivität der Zellen für die beiden höheren Dotierungen dem Wachstum auf Titan mit einem deutlichen Rückgang von Tag 3 zu Tag 6. Die darauf folgende Zunahme war auf diesen Proben aber nur schwach ausgeprägt, sodass im Mittel niedrigere Werte als an Tag 3 vorlagen. Im direkten Vergleich zeigten die drei Strontiumkonzentrationen an Tag 6 einen nennenswerten Zusammenhang: Je höher die Strontiummenge in den Beschichtungen lag, desto weniger Zellwachstum und zelluläre Aktivität konnte beobachtet werden. So betrug die Zellzahl an diesem Messtag auf Sr6 im Mittel noch 86 % des Wertes auf reinem Struvit, auf Sr45 15 % und auf Sr186 nur noch 3 %. Auch an Tag 10 blieb dieser Trend in schwächerer Ausprägung bestehen. Am letzten Messtag betrug die Zellzahl auf Sr45 und Sr186 bezogen auf Struvit nur etwa ein Drittel, die Zellaktivität lag bei maximal 50 %.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde eine unabhängige zweite Messreihe angelegt, die in den Abbildungen 4.1 (b) und (d) dargestellt ist. Auf Titan ähnelte der zeitliche Verlauf des Zellwachstums dem der ersten Messreihe, wobei die Zunahme der Zellzahl ab Tag 6 stärker ausgeprägt verlief. Auf Struvit kam es erneut zu einem Anstieg der Zellzahl bis Tag 6, der zuvor beobachtete zwischenzeitliche Rückgang an Tag 10 blieb dabei allerdings aus. Die Beobachtungen zur Zellaktivität auf Titan und Struvit kultivierter Zellen zeigten wiederum einen weitgehend der Zellzahl entsprechenden Verlauf. Bei Zusatz von 186 μg Strontium fiel an Tag 3 eine sehr hohe Zellzahl und Zellaktivität auf, was sich im ersten Ansatz nicht gezeigt hatte. An den weiteren Messtagen konnte jedoch – trotz relativ großer Streuung der Messwerte – die bereits beschriebene Tendenz von sinkender Zellzahl und Zellaktivität bei steigender Strontiummenge beobachtet werden.

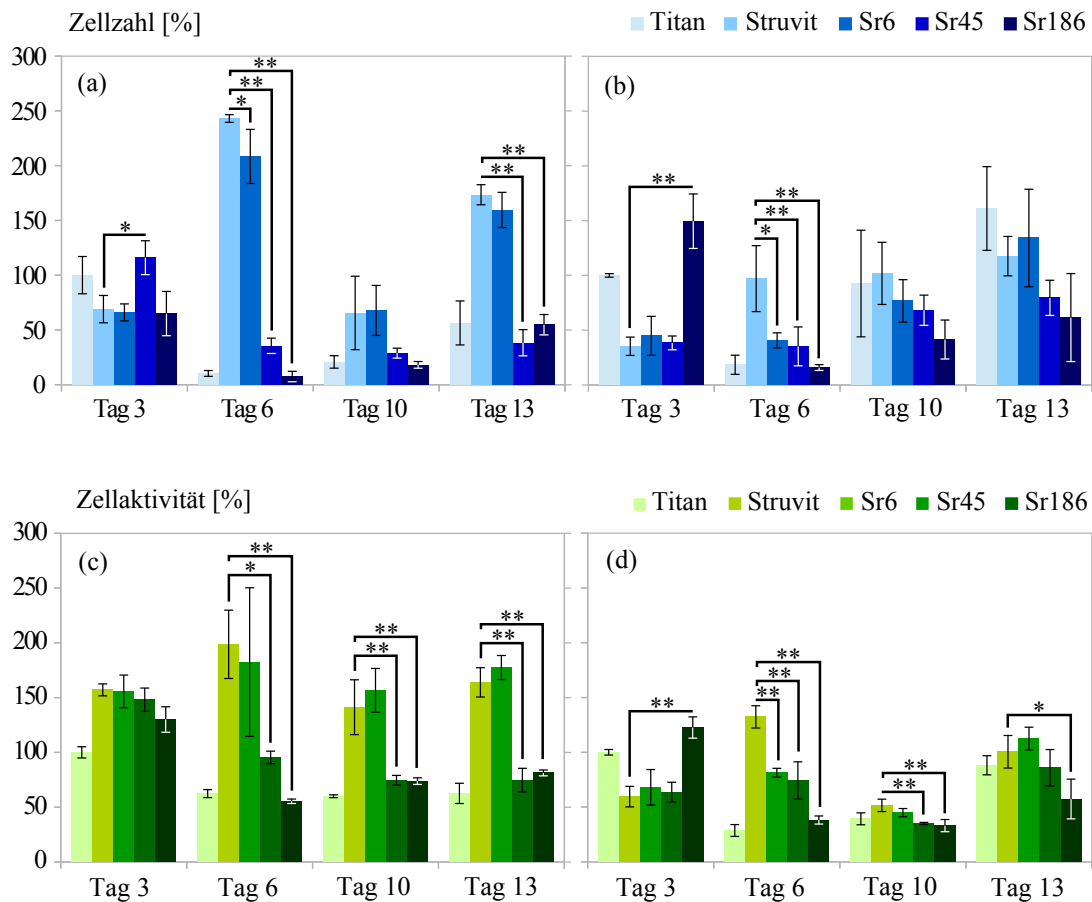


Abb. 4.1: Diagramme (a) und (b) zeigen die Zellzahl von RAW 264.7 Zellen auf den Proben Sr6, Sr45 und Sr186. In der ersten Messreihe (a) wurde ab Tag 6 eine Tendenz von sinkenden Zellzahlen bei steigender Strontiummenge sichtbar. Auch in der zweiten Messreihe (b) konnte dieser Zusammenhang in etwas geringerer Ausprägung beobachtet werden. Die Zellaktivität wird in den Diagrammen (c) für Messreihe 1 und (d) für Messreihe 2 dargestellt, wobei diese tendenziell dem Zellwachstum entsprach. Signifikante Unterschiede gegenüber Struvit sind mit *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ gekennzeichnet.

Für die Untersuchung der vier höheren Strontiumdotierungen Sr212, Sr290, Sr371 und Sr487 wurden wiederum die beiden Kontrollen Titan und Struvit mitgeführt. In einer ersten Messreihe, Abbildungen 4.2 (a) und (c), zeigte sich für Titan ein weitgehend mit den bisherigen Ergebnissen vergleichbarer Verlauf von Zellzahl und -aktivität über die Messdauer. Bei Kultivierung der Zellen auf Struvit kam es nun jedoch bereits von Tag 3 auf Tag 6 zu einem starken Rückgang der Zellzahl um mehr als 70 %. Bis zum Ende der Messreihe stieg die Zellzahl zwar wieder an, überschritt

dabei allerdings den Ausgangswert nur geringfügig. Zudem waren dabei im Gegensatz zu den bisherigen Messreihen konstant niedrigere Zellzahlen als auf Titan zu verzeichnen. Auch die zelluläre Aktivität lag ab Tag 6 bei im Mittel etwas niedrigeren Werten als auf Titan. Strontiumdotierte Proben wiesen am ersten Messtag Zellzahlen auf, welche im Bereich der Kontrolloberflächen lagen. Lediglich auf Sr487 war die Zellzahl gegenüber Struvit signifikant erhöht, die zelluläre Aktivität war dementsprechend ebenfalls vergleichsweise hoch. Zudem zeigten auch Zellen auf Struvit und Sr371 gegenüber den restlichen Oberflächen vermehrte Zellaktivität. Bis Tag 6 kam es auf allen vier strontiumdotierten Proben zu einem ausgeprägten Rückgang von Zellzahl sowie Zellaktivität um mindestens 80 % beziehungsweise 50 %. Verglichen mit dem Verhalten der Zellen auf Struvit konnten an diesem Messtag jedoch keine signifikanten Unterschiede verzeichnet werden; diese bestanden erst an Tag 10 für Sr290 und Sr371. Bis Tag 13 war im weiteren Verlauf eine Zunahme der Zellaktivität zu beobachten, die Unterschiede zwischen den verschiedenen Strontiumdotierungen und undotiertem Struvit waren jedoch nicht signifikant. Auch hinsichtlich der Zellzahl ließ sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes ein Anstieg auf allen vier Oberflächen verzeichnen, der für die verschiedenen Strontiumdotierungen variierte. Während auf Sr212 mit Struvit vergleichbare mittlere Zellzahlen vorlagen, waren diese auf Sr290 am letzten Messtag bezogen auf Struvit etwas reduziert. Eine weitere Erhöhung der Strontiummenge insbesondere auf 487 μg Strontium führte dagegen zu einer Zunahme an Zellen, sodass die Zellzahl im Mittel um fast 70 % höher lag als auf Struvit.

In der zweiten Messreihe in Abbildung 4.2 (b) und (d) zeichnete sich auf Titan und Struvit ein weitgehend der ersten Messreihe entsprechendes Zellwachstum ab, wobei an Tag 3 erneut die meisten Zellen auf Sr487 detektiert wurden. Bis Tag 6 kam es wiederum auf allen strontiumdotierten Proben zu einer Abnahme der Zellzahl, die besonders auf Sr371 sowie Sr487 deutlich ausgeprägt war. Ab Tag 10 zeichnete sich mit vermehrtem Strontiumzusatz ein Trend hin zu steigenden Zellzahlen ab. Während dieser Zusammenhang an Tag 10 noch gering ausgeprägt war, betrug die Zellzahl an Tag 13 auf Sr371 im Mittel etwa das Doppelte, auf Sr487 sogar mehr als das Dreifache der beiden geringeren Strontiummengen. Die Zellaktivität nahm erneut auf allen Proben bis Tag 10 ab und wies an diesem Messtag zwischen den verschiedenen Oberflächen keine nennenswerten Differenzen auf. Bis Tag 13 stieg die Aktivität der Zellen auf allen Oberflächen wieder leicht an, wobei diese auf Sr371 und Sr487 gegenüber Sr212 und Sr290 im Mittel um etwa ein Viertel erhöht war.

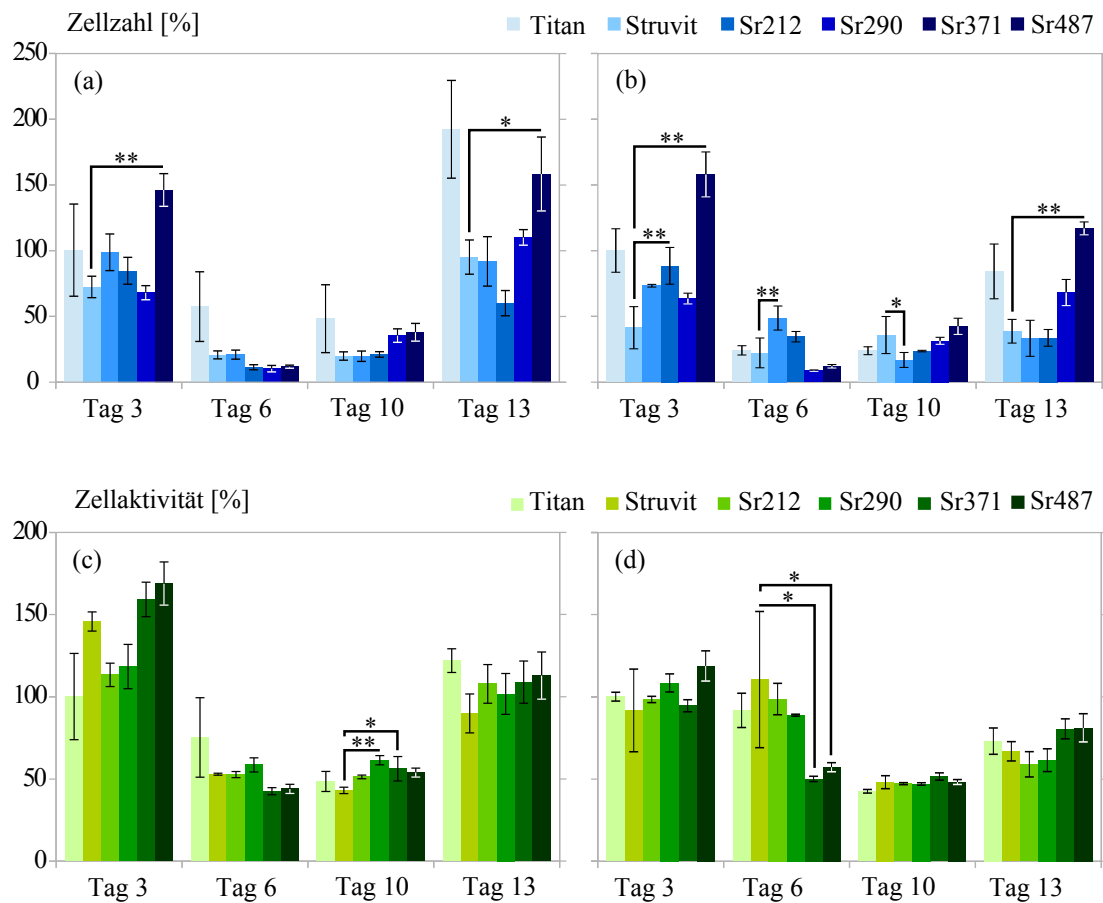


Abb. 4.2: Bei Zusatz von 212 μg , 290 μg , 371 μg beziehungsweise 487 μg Strontium pro Probe wurde für die Zellzahl von RAW 264.7 Zellen sowohl in Messreihe 1 (a) als auch in Messreihe 2 (b) eine Tendenz ersichtlich, wonach hohe Strontiummengen von 371 μg und 487 μg ab Tag 10 zu einem Anstieg der Zellzahl führten. Für die Zellaktivität in der ersten (c) und zweiten Messreihe (d) waren bis zum Ende der Messungen zwischen den verschiedenen Beschichtungen nur geringfügige Unterschiede zu verzeichnen. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$.

Zur Beurteilung der Aktivität der Einzelzellen in Abbildung 4.3 wurde der Quotient aus mittlerer Zellaktivität und Zellzahl (vgl. Abb. 4.1 und 4.2) gebildet. Auf Titan zeigte sich für alle Messreihen ein zeitlicher Verlauf mit niedriger Einzelzellaktivität an Tag 3 und einem Aktivitätsmaximum an Tag 6. Im Gegensatz dazu wiesen Zellen auf Struvit am ersten Messtag eine deutlich höhere Aktivität auf – besonders ausgeprägt zeigte sich dies in der zweiten Messreihe (Abb. 4.3 (b)). Über die weiteren Tage verhielt sich die Einzelzellaktivität auf Struvit relativ inhomogen, bis Tag 13 nahm diese jedoch tendenziell ab.

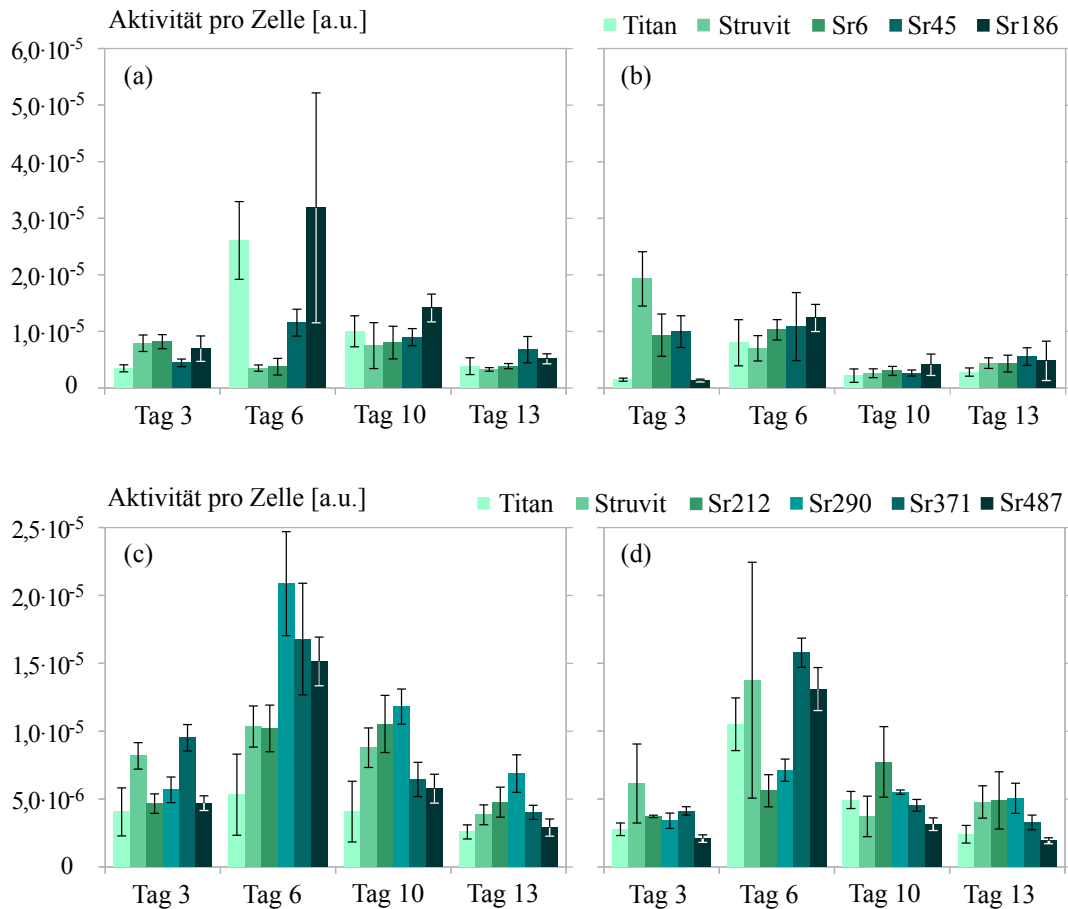


Abb. 4.3: Die Aktivität pro Zelle von RAW 264.7 Zellen auf Sr6, Sr45 und Sr186 von (a) erster und (b) zweiter Messreihe stellte sich insbesondere an Tag 3 und Tag 6 relativ variabel dar. Durch den Zusatz höherer Mengen Strontium in den Beschichtungen in einer (c) ersten und (d) zweiten Messreihe kam es auf allen strontiumdotierten Oberflächen bis Tag 6 zu einem Anstieg der Einzelzellaktivität. Im weiteren Verlauf sank diese wieder ab, wobei tendenziell mit steigender Dotierkonzentration niedrigere Aktivitätswerte pro Zelle zu beobachten waren.

Wie in Abb. 4.3 (a) ersichtlich zeigte sich in der ersten Messreihe bei einer geringen Dotierkonzentration von $6 \mu\text{g}$ Strontium pro Plättchen an allen Messtagen eine mit reinem Struvit vergleichbare Einzelzellaktivität. Bei höherer Dotierung verringerte sich diese an Tag 3 leicht, wobei auf Sr186 eine höhere Einzelzellaktivität als auf Sr45 nachgewiesen wurde. Ab Tag 6 dagegen lag die Einzelzellaktivität sowohl auf Sr45 als auch auf Sr186 im Mittel über derjenigen von reinem Struvit. Davon abweichend stellte sich an Tag 3 der zweiten Messreihe (vgl. Abb. 4.3 (b)) auf allen drei Strontiumdotierungen eine Aktivitätsminderung dar, die auf Sr186 besonders

deutlich ausgeprägt war. An den weiteren Tagen waren bedingt durch die verhältnismäßig große Streuung der Einzelmessungen kaum Unterschiede zwischen den drei Strontiumdotierungen festzustellen.

Bei der Untersuchung der vier höheren Strontiumkonzentrationen Sr212, Sr290, Sr371 und Sr487, dargestellt in Abbildung 4.3 (c) und (d), zeigten sich jeweils am ersten Messtag niedrigere Einzelzellaktivitäten als auf Struvit. Lediglich Sr371 der ersten Messreihe bildete hiervon eine Ausnahme mit einer im Mittel leicht erhöhten Aktivität pro Zelle. Bis Tag 6 kam es in beiden Messreihen zu einem Anstieg der Einzelzellaktivitäten; das Ausmaß der Aktivitätszunahme auf den jeweiligen Beschichtungen variierte jedoch deutlich. Bis zum letzten Messtag sank die Aktivität der Einzelzellen schließlich wieder deutlich ab. Dabei zeigte sich insbesondere an Tag 10 und Tag 13 in beiden Messreihen eine schwache Tendenz von niedrigerer Einzelzellaktivität bei steigender Strontiummenge in der Beschichtung.

4.1.2 Aktivität Tartrat-resistenter saurer Phosphatase

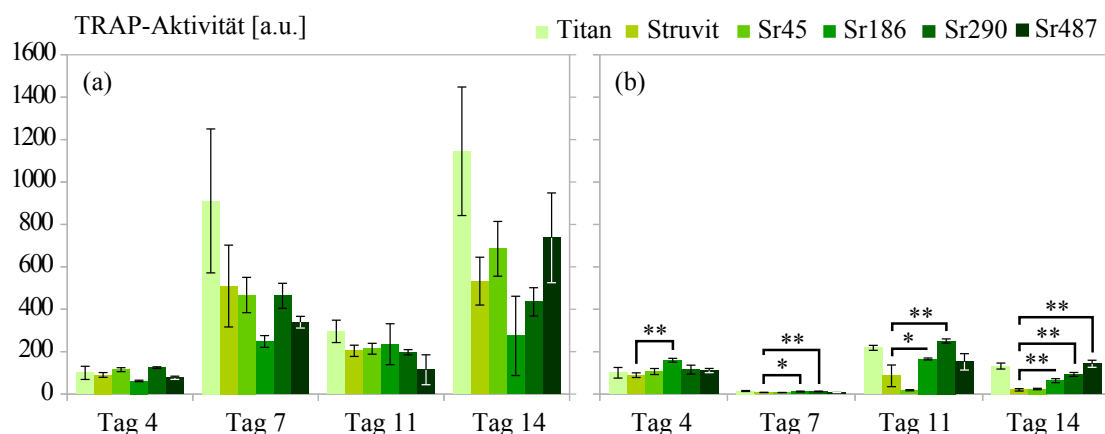


Abb. 4.4: Ermittlung der intrazellulären TRAP-Aktivität von RAW 264.7 Zellen auf Titan und Struvit sowie den strontiumdotierten Proben Sr45, Sr186, Sr290 und Sr487. Eine erste Messreihe (a) ergab eine deutlich fluktuierende TRAP-Aktivität im zeitlichen Verlauf. Lediglich die Aktivität auf Sr186 blieb nach initialem Aktivitätsanstieg relativ konstant und zeigte im Schnitt die geringsten Werte. In einer zweiten Messreihe (b) fiel die TRAP-Aktivität von Tag 4 zu Tag 7 stark ab. Bis Tag 14 nahm diese wieder deutlich zu, wobei sich mit erhöhter Strontiumdotierung eine vermehrte TRAP-Aktivität darstellte. Signifikante Unterschiede zu reinem Struvit sind mit $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$ markiert.

Die Bestimmung der enzymatischen TRAP-Aktivität osteoklastärer Zellen erfolgte auf vier Struvitbeschichtungen mit unterschiedlichen Strontiumdotierungen sowie den Kontrolloberflächen Titan und Struvit. In einer ersten Messreihe (Abb. 4.4 (a)) wurden auf Titan starke Schwankungen der TRAP-Aktivität beobachtet, wobei die höchsten Werte an den Tagen 7 und 14 vorlagen. Auch auf Struvit zeigten sich diese Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Dabei war die TRAP-Aktivität gegenüber Titan insbesondere an Tag 14 deutlich reduziert. Bei Dotierung der Struvitbeschichtung mit unterschiedlichen Mengen Strontium stieg die TRAP-Aktivität von Tag 4 auf Tag 7 ebenfalls bei allen Proben stark an. Auf Sr45 und Sr290 konnten dabei jeweils vergleichbare mittlere Aktivitätswerte festgestellt werden, die zudem über denjenigen auf Sr186 und Sr487 lagen. Während an Tag 11 aufgrund großer Streuung der Einzelmessungen kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben nachgewiesen werden konnten, nahm die TRAP-Aktivität bis Tag 14 in unterschiedlichem Maße zu. Dabei lagen die höchsten TRAP-Aktivitätswerte innerhalb des Messzeitraumes bei Zellen auf Sr45 sowie Sr487 vor, die geringste TRAP-Aktivität stellte sich auf Sr186 dar. Dennoch waren gegenüber undotiertem Struvit keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

In der zweiten Messreihe stellten sich einige abweichende Befunde dar, wie aus Abbildung 4.4 (b) ersichtlich ist. Dabei kam es auf Titan und Struvit in den ersten Tagen zu einer deutlichen Verminderung der TRAP-Aktivität, erst zu Tag 11 stieg diese wieder an. Auf Struvit lag die mittlere TRAP-Aktivität erneut durchweg niedriger als auf Titan, wobei der relative Unterschied im Verlauf der Messtage zunahm. Bei der strontiumdotierten Probe Sr45 entsprach die TRAP-Aktivität an allen Mess Tagen weitgehend den Werten auf undotiertem Struvit. Auf Sr186 war diese dagegen bereits an Tag 4 gegenüber Struvit signifikant erhöht, was im Verlauf der weiteren Messtage bestehen blieb. Darüber hinaus zeigte sich am letzten Messtag ein signifikanter Zusammenhang von zunehmender TRAP-Aktivität mit steigendem Strontiumgehalt in der Beschichtung.

4.1.3 Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Bei der Anfärbung intrazellulärer Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP) zeigten sich auf Glas bereits an Tag 4 nach RANKL-Zugabe, dargestellt in Abbildung 4.5 (b), zahlreiche morphologisch ausdifferenziert erscheinende Osteoklasten mit einer Größe von bis zu 150 μm . Diese wiesen ein hellvioletttes Zytoplasma auf,

was als TRAP-positives Kriterium zu bewerten ist. Zudem enthielten sie mindestens 3 Zellkerne, die in einer oder mehreren Ansammlungen entweder zentral oder randständig angeordnet waren. Die ebenfalls zahlreich vorhandenen dunkelviolettfärbten Zellen ohne sichtbares Zytoplasma sind als mononukleäre Vorläuferzellen einzustufen. Daneben zeigten sich verschiedene Zwischenstadien mit hellvioletter Zytoplasmasaum, die jedoch keine abgrenzbaren Zellkerne aufwiesen. Bis Tag 14 (Abb. 4.5 (c)) blieb dieses Zellbild auf Glas weitgehend erhalten, wobei die Zahl undifferenzierter Vorläuferzellen etwas abnahm und die Größe differenzierter Osteoklasten auf bis zu 400 μm anstieg. Als Kontrolle dienten RAW 264.7 Zellen, die ohne Zugabe von RANKL kultiviert wurden. Wie aus Abbildung 4.5 (a) ersichtlich ist, zeigten sich diese als blasse, rötlich-braune Zellen von etwa 10 μm Durchmesser, die in ihrer ursprünglichen Morphologie verblieben.

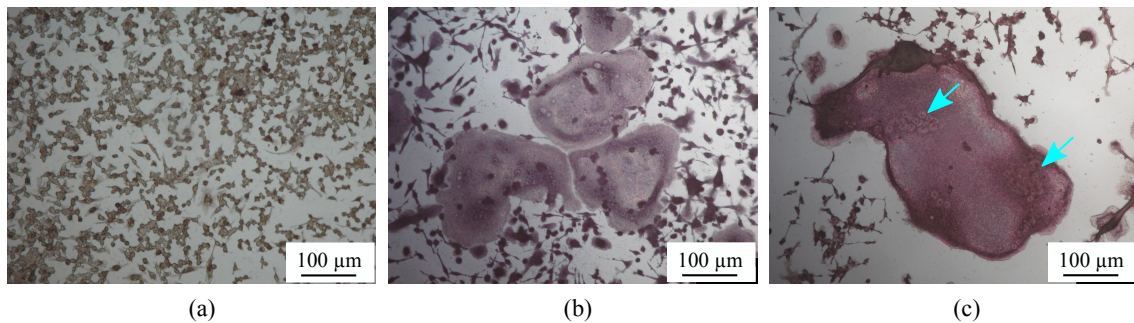


Abb. 4.5: Zytochemische TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen auf Glas. Ohne das Vorhandensein von RANKL verblieben die Zellen über alle Tage in ihrer ursprünglichen Morphologie (a). Durch die Zugabe von RANKL stellten sich an Tag 4 (b) bis 14 (c) Osteoklasten als polynukleäre Zellen mit TRAP-positivem, violett gefärbten Zytoplasma dar. Die besonders an Tag 4 zahlreich vorhandenen dunkelvioletten Zellen lassen sich als osteoklastäre Vorläuferzellen einordnen. (Pfeile markieren beispielhaft Zellkernansammlungen.)

Wie in Abbildung 4.6 gezeigt, waren bei Kultivierung von RAW 264.7 Zellen auf Titan und Struvit an Tag 4 und 7 nach RANKL-Zugabe neben zahlreichen mononukleären Vorläuferzellen einzelne TRAP-positive Zellen zu erkennen. Ab Tag 11 konnten erste Osteoklasten identifiziert werden,¹ deren Zahl und Größe bis Tag 14 zunahm. Dabei betrug der Durchmesser von Osteoklasten auf Titan maximal 100 μm , auf Struvit zeigten sich einzelne Osteoklasten mit bis zu 200 μm . Im Gegensatz zu Glas waren sämtliche Kerne als zentralständige Konglomerate angeordnet.

¹Abbildung zu Tag 11 im Anhang.

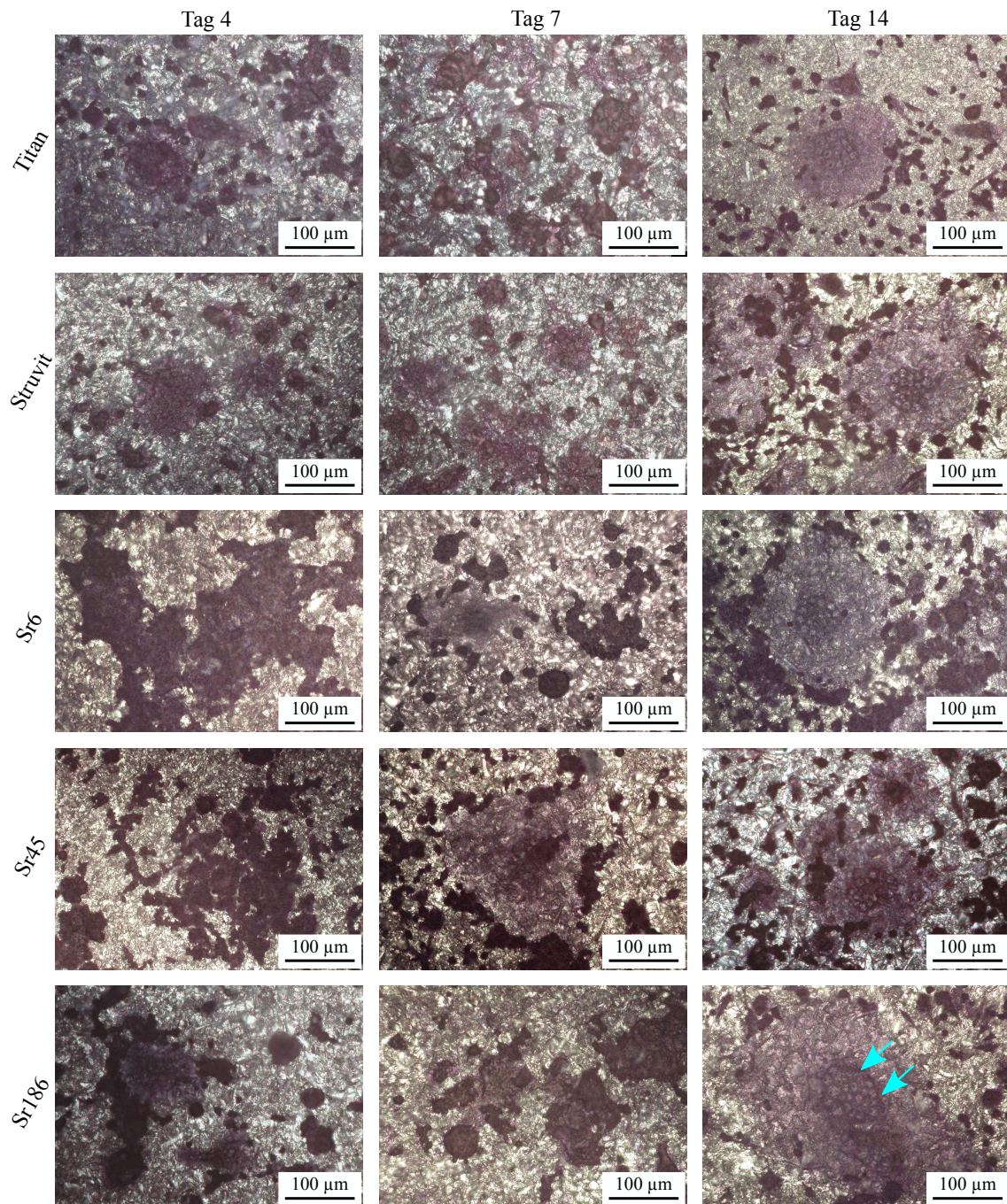


Abb. 4.6: TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen an den Tagen 4, 7 und 14 nach Anregung zur Osteoklastendifferenzierung mittels RANKL. Bei Kultivierung auf Titan, Struvit und Sr186 ließen sich bereits an Tag 4 fusionierte Vorläuferzellen nachweisen, die bis Tag 11 zu Osteoklasten mit deutlich violetter, TRAP-positivem Zytoplasma differenzierten. Auf Sr6 und Sr45 waren an Tag 4 dagegen nur mononukleäre Vorläuferzellen zu erkennen. Hier erfolgte der Osteoklastennachweis mittels TRAP-Färbung jedoch bereits ab Tag 7. (Die zentralständige Ansammlung von Zellkernen ist exemplarisch durch Pfeile markiert.)

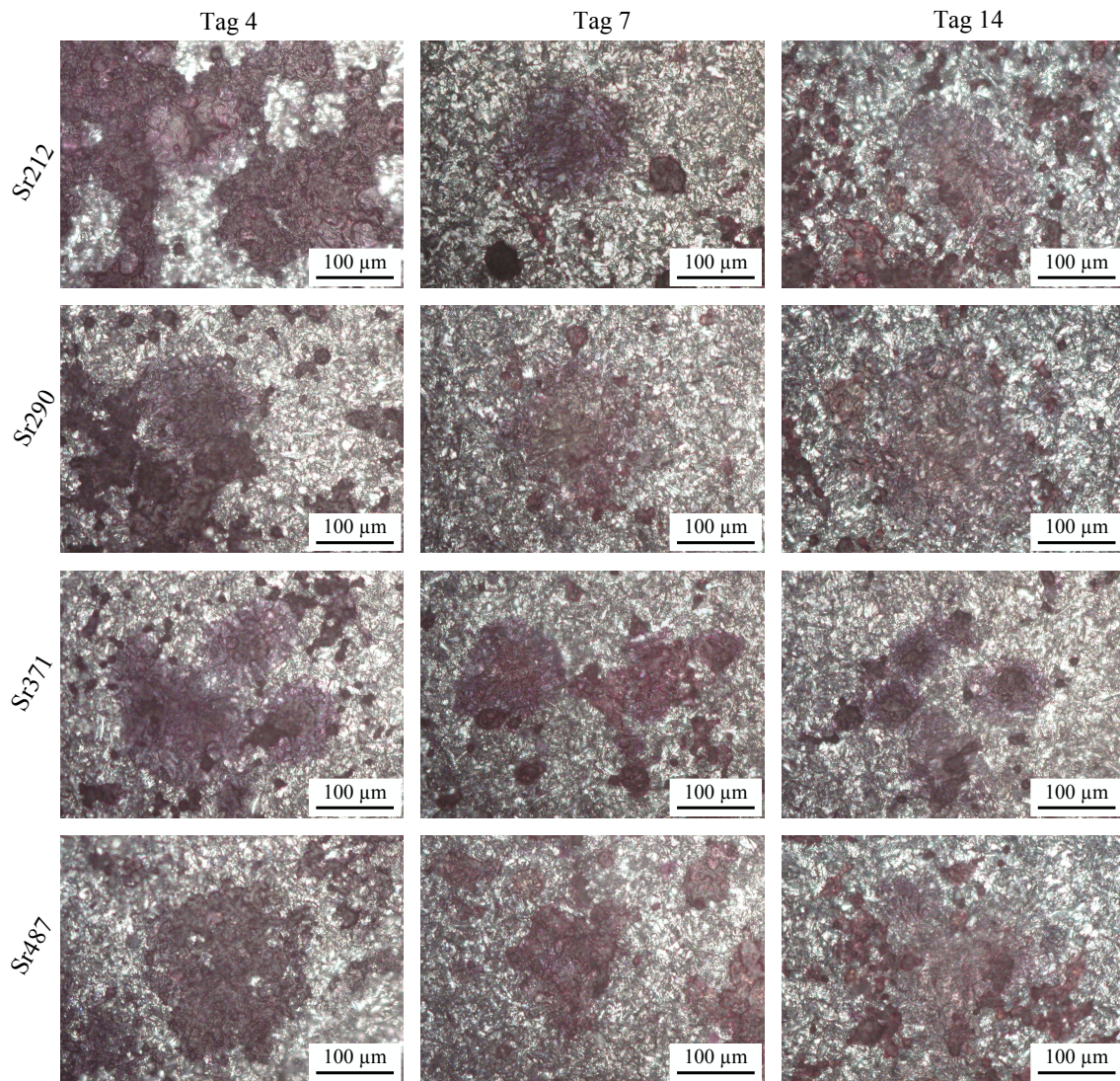


Abb. 4.7: TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen 4, 7 und 14 Tage nach RANKL-Zugabe, kultiviert auf Sr212, Sr290, Sr371 und Sr487. Dabei konnten mit Ausnahme von Sr487 bereits an Tag 4 fusionierte Vorläuferzellen nachgewiesen werden. Über den Versuchszeitraum stieg die Größe dieser Zellstrukturen auf bis zu 150 μm an, ausdifferenzierte mehrkernige Osteoklasten konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt sicher identifiziert werden.

Ein Einfluss auf die Osteoklastendifferenzierung durch Dotierung der Proben mit Sr6, Sr45 und Sr186 (Abb. 4.6) wurde bereits mittels TRAP-Färbung deutlich. Auf den Proben Sr6 und Sr45 waren an Tag 4 lediglich dunkelviolette Vorläuferzellen sichtbar, die zum Teil konfluierende Ansammlungen bildeten. Dennoch zeigten sich zu diesem Zeitpunkt noch keine eindeutigen Hinweise für die Ausbildung organisierter Zellfusionen oder Osteoklasten. Ab Tag 7 waren jedoch insbesondere auf Sr45 erste mehrkernige Osteoklasten mit bis zu 100 μm Durchmesser vorhanden. Im

weiteren zeitlichen Verlauf nahm deren Anzahl stetig zu, sodass sich ab Tag 11 morphologisch vollständig differenzierte, TRAP-positive Osteoklasten darstellten. Auf Sr186 waren schon am ersten Messtag einige TRAP-positive Zwischenstadien nachweisbar, die bis Tag 11 zu mehrkernigen Osteoklasten ausdifferenzierten.

Bei Dotierung mit höheren Mengen Strontium, dargestellt in Abbildung 4.7, ließen sich auf den Proben Sr212, Sr290 und Sr371 bereits an Tag 4 nach RANKL-Zugabe osteoklastäre Zellfusionen mit hellvioletterem Zytoplasma nachweisen. Dabei dominierten jedoch insbesondere auf Sr212 dichte und stark konfluierende Ansammlungen mononukleärer Vorläuferzellen. Auf Sr487 zeigten sich an Tag 4 zwar organisiert erscheinende mononukleäre Vorläuferzellen, mittels TRAP-Färbung wurden allerdings keine Zellfusionen nachgewiesen. An Tag 7 waren auf allen vier Proben osteoklastäre, TRAP-positive Zellstrukturen mit einem Durchmesser von bis zu 150 μm erkennbar. Die Zahl mononukleärer Einzelzellen nahm dabei deutlich ab. Auch an Tag 11 und 14 stellte sich ein weitgehend vergleichbares Zellbild dar, der sichere Osteoklastennachweis unter dem Kriterium der Mehrkernigkeit konnte allerdings nicht zweifelsfrei erbracht werden.

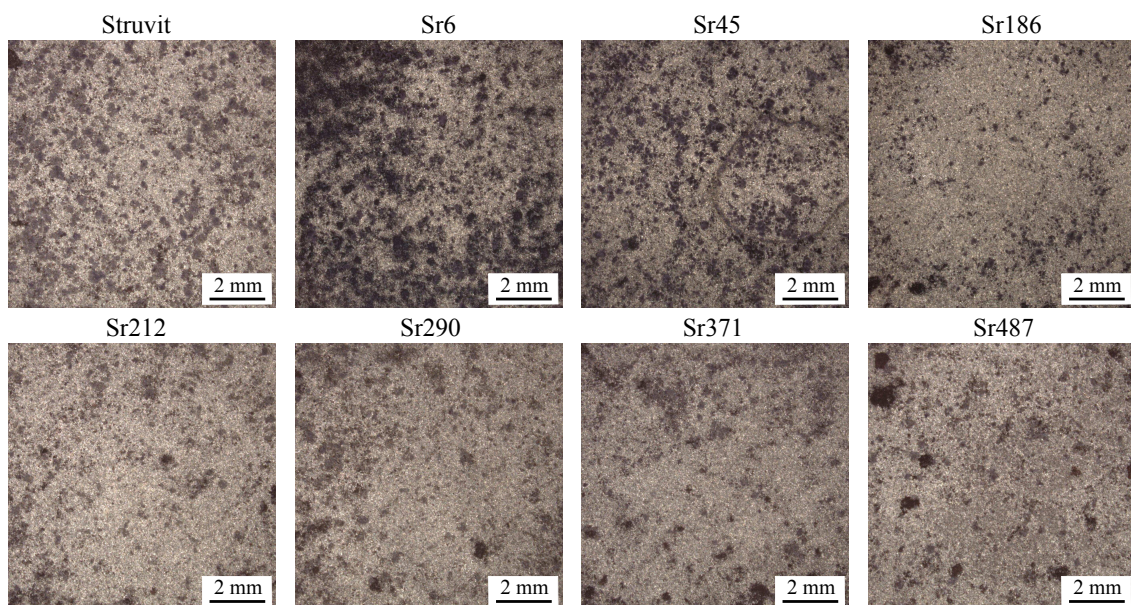


Abb. 4.8: TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen kultiviert auf Struvit, Sr6, Sr45, Sr186, Sr212, Sr290, Sr371, Sr487 an Tag 14 nach RANKL-Zugabe. Bei Zusatz von 6 μg Strontium waren mehr TRAP-positive Zellen nachweisbar als auf reinem Struvit. Durch Erhöhung der Strontiummenge bis 186 μg nahm deren Zahl deutlich ab. Eine weitere Steigerung des Strontiumzusatzes blieb jedoch ohne weiteren Einfluss.

Zur Abschätzung der Menge TRAP-positiver Zellen wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt, die in Abbildung 4.8 für Tag 14 gezeigt sind.² Nachdem an Tag 4 auf den Proben nur spärlich Zellen nachweisbar waren, zeigte sich ab Tag 7 eine deutliche Zunahme TRAP-gefärbter Zellen. Bei Kultivierung auf Struvit konnten zahlreiche, homogen verteilte Zellen einheitlicher Größe nachgewiesen werden, was sich bis Tag 14 nicht wesentlich veränderte. Auf unbeschichtetem Titan waren über den gesamten Beobachtungszeitraum weniger Zellen anfärbbar. Neben zahlreichen kleineren waren zudem große TRAP-positive Zellstrukturen von bis zu 100 μm erkennbar. Durch Dotierung mit einer geringen Strontiummenge von 6 μg zeigte sich ab Tag 7 verglichen mit reinem Struvit eine erhöhte Anfärbbarkeit, die an Tag 14 am stärksten ausgeprägt war. Die Verteilung der Zellen war dabei etwas ungleichmäßiger, die Einzelzellgröße erschien leicht erhöht. Eine weitere Steigerung der Strontiummenge in den Beschichtungen auf 45 μg und 186 μg Strontium führte zu einer sukzessiven, reproduzierbaren Abnahme TRAP-positiver Zellen. Auch die Größe der einzelnen Zellen war augenscheinlich reduziert. Bei Zusatz von 212 μg , 290 μg , 371 μg beziehungsweise 487 μg Strontium war kein weiterer Rückgang TRAP-positiver Zellen zu verzeichnen, insgesamt erschien die mittlere Zellzahl insbesondere an Tag 14 bezogen auf Sr186 sogar etwas erhöht. Zudem waren keine eindeutigen Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben zu erkennen.

4.1.4 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Aktin

Nachdem mittels TRAP-Färbung bereits ein Einfluss der Strontiumdotierung auf die Osteoklastogenese zu beobachten war, wurde dieser mittels fluoreszenzmikroskopischer Darstellung von Phalloidin-markiertem Aktin weitergehend untersucht. Wie aus Abbildung 4.9 ersichtlich ist, konnten auf Titan und Struvit bereits am vierten Tag nach RANKL-Zugabe Zellen mit vollständig ausgebildetem Aktinring nachgewiesen werden. Mittels Kernfärbung ließ sich zeigen, dass diese das Kriterium der Mehrkernigkeit erfüllten, wobei besonders große Osteoklasten häufig mehrere Kernkomplexe aufwiesen. Im Laufe des zweiwöchigen Beobachtungszeitraums war eine Zunahme der Zellgröße zu beobachten, sodass Zelldurchmesser von bis zu 300 μm an Tag 14 keine Seltenheit darstellten. Hervorzuheben ist zudem, dass die Osteoklasten augenscheinlich auf Struvitbeschichtungen im Vergleich zu Titanoberflächen über alle Messtage hinweg im Schnitt einen größeren Durchmesser aufwiesen.

²Abbildungen zu Tag 4, 7 und 11 im Anhang.

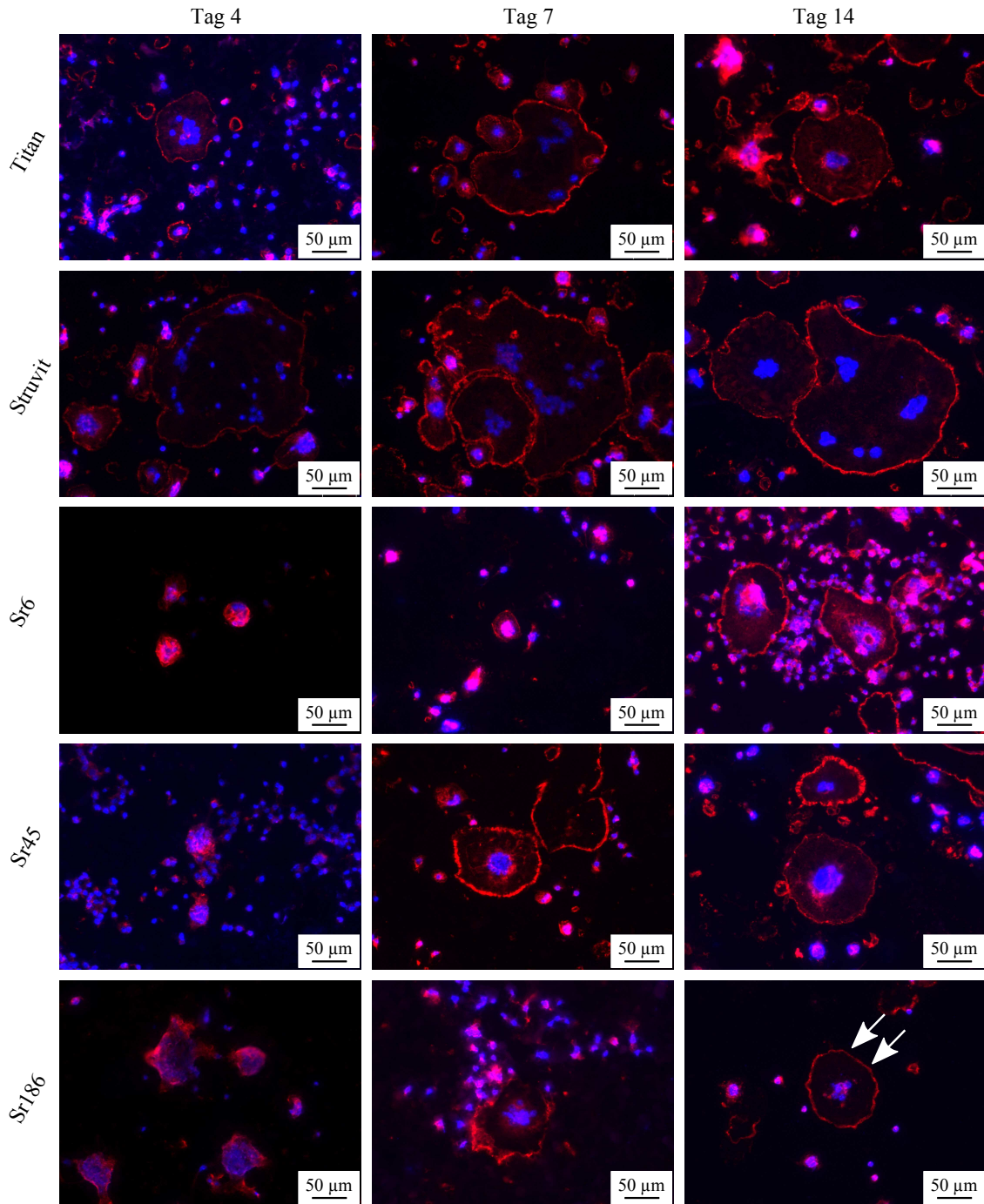


Abb. 4.9: Fluoreszenzmikroskopische Overlay-Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen mit Phalloidin-markiertem Aktin (rot) und Hoechst-gefärbten Zellkernen (blau). Auf Titan und Struvit waren bereits ab Tag 4 vollständig ausgebildete Aktinringe nachweisbar. Durch Dotierung mit Strontium kam es zu einer verzögerten Ausbildung, sodass auf Sr45 und Sr186 ab Tag 7 Aktinringe detektierbar waren. Auf Sr6 war dagegen erst ab Tag 11 eine morphologisch komplette Ostoklastogenese zu beobachten. (Pfeile zeigen beispielhaft einen Aktinring.)

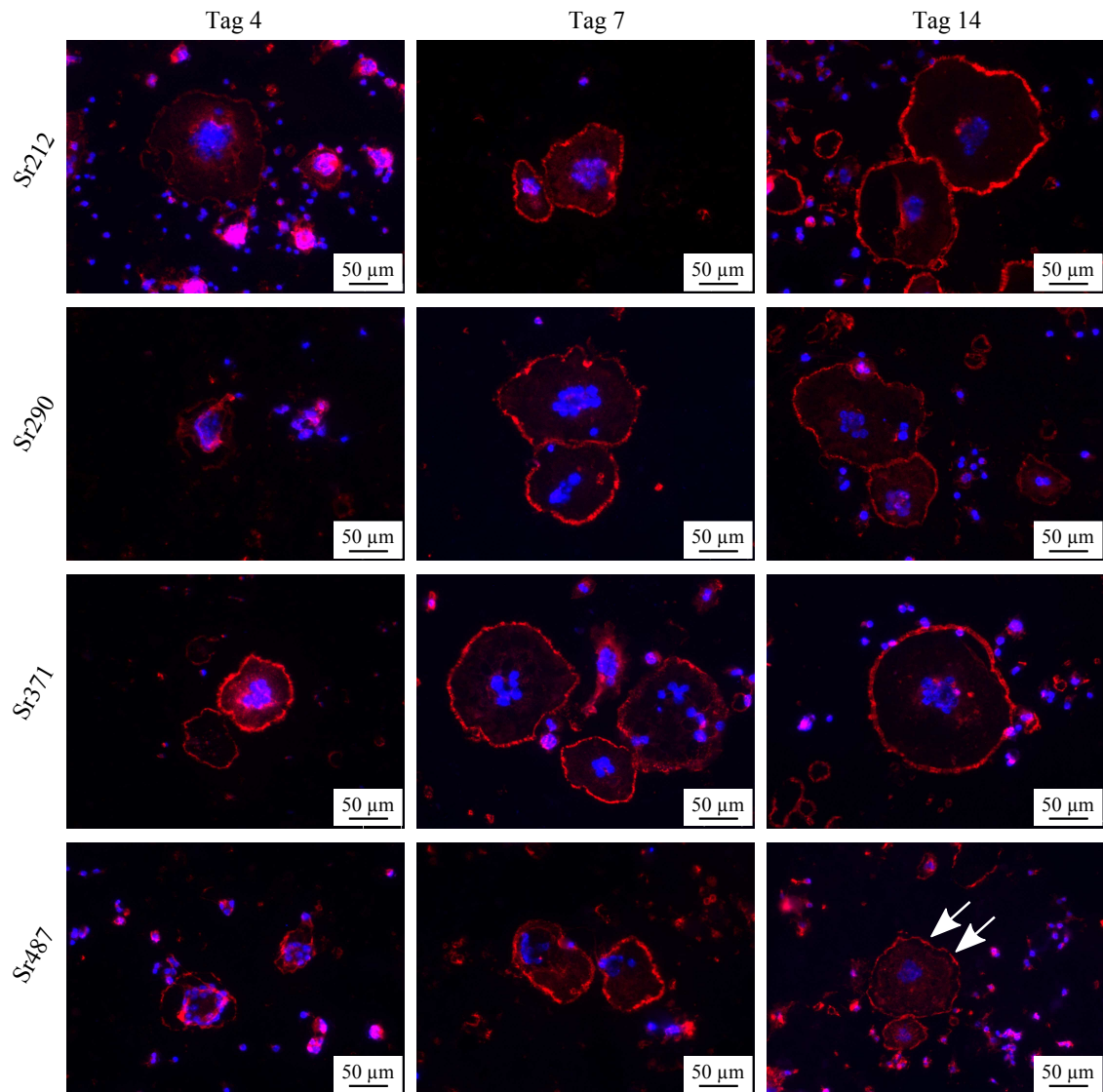


Abb. 4.10: Bei Fluoreszenzmarkierung von Aktin (rot) und Zellkernen (blau) bei RAW 264.7 Zellen waren ab Tag 4 auf Sr212 und Sr371 mehrkernige Zellen mit gut ausgebildeten Aktinringen vorhanden. Bei Sr290 und Sr487 waren die vorhandenen Aktinringe an Tag 4 noch nicht vollständig organisiert. Zudem waren auf Sr487 die nachweisbaren Osteoklasten verglichen mit den drei übrigen Strontiumdotierungen im Schnitt von geringerer Größe und Zahl. (Pfeile zeigen beispielhaft einen Aktinring.)

Bei Zusatz von 6 μg , 45 μg sowie 186 μg Strontium pro Probe konnte fluoreszenzmikroskopisch eine verlangsamte Osteoklastenentwicklung beobachtet werden. Am ausgeprägtesten stellte sich dieser Effekt auf Sr6 dar. Dort zeigten sich an Tag 4 und 7 zwar bereits Zellen, die aufgrund ihrer Größe als fusionierte Vorläuferzellen zu betrachten sind; vollständig entwickelte Aktinringe waren jedoch noch nicht

vorhanden. Erst ab Tag 11 konnten Zellen mit einem Durchmesser von mehr als 50 μm mit eindeutig ausgebildetem Aktinring nachgewiesen werden.³ Bei Kultivierung auf Sr45 und Sr186 konnte eine erfolgreiche Osteoklastogenese bereits ab Tag 7 bestätigt werden. Allerdings waren bei Dotierung mit 186 μg Strontium vollständig intakte Ringe erst an Tag 14 zu erkennen.

Bei Erhöhung der Strontiummenge auf 212 μg , 290 μg , 371 μg und 487 μg pro Probe, dargestellt in Abbildung 4.10, war im Gegensatz zu den drei geringeren Strontiumdotierungen keine ausgeprägte Verzögerung in der Ausbildung von Aktinringen zu beobachten. Während auf Sr212 und Sr371 bereits an Tag 4 intakte Aktinringe vorhanden waren, zeigten sich diese auf Sr290 und Sr487 noch weniger gut entwickelt. Die größten Durchmesser lagen mit etwa 150 μm auf Sr212 vor. An den weiteren Messtagen waren die Aktinringe auf allen vier Proben von vergleichbarer Größe und erreichten dabei Durchmesser von bis zu 300 μm . Einzige Ausnahme stellten die Zellen auf Sr487 dar. Die beobachteten Aktinringe waren kleiner als 200 μm und zudem in geringer Zahl vorhanden.

4.1.5 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Zellmorphologie

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchungen ermöglichten es, die Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie zu untersuchen und Erkenntnisse über den Kontakt zwischen Zellen und Oberflächen zu erlangen.

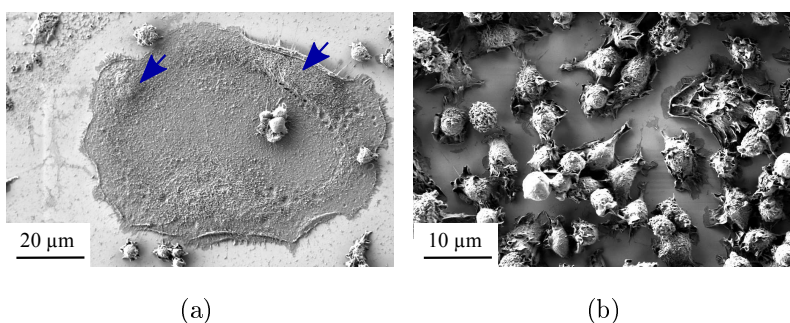


Abb. 4.11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen (a) eines differenzierten Osteoklasten 14 Tage nach Zugabe von RANKL sowie (b) von undifferenzierten mononukleären Zellen ohne RANKL-Zugabe 14 Tage nach Aussaat auf Glas. (Pfeile markieren Zellkern-Ansammlungen.)

³Abbildung zu Tag 11 im Anhang.

Auf Glas (Abb. 4.11) zeigten sich nach Zugabe von RANKL bereits ab Tag 4 morphologisch vollständig differenziert erscheinende Osteoklasten mit einem Durchmesser von bis zu 500 μm . Dabei waren mehrere Zellkerne erkennbar, die teils randständig angeordnet waren, teils eine zentral gelegene Ansammlung bildeten. Optisch stellte sich ein enger Kontakt zur glatten Glasoberfläche dar, der über flach auslaufende Zellfortsätze gewährleistet wurde. Ohne die Zugabe von RANKL verblieben die Zellen über den gesamten Versuchszeitraum in ihrer mononukleären Ausgangsform und wiesen eine kugelige Gestalt mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5-8 μm auf. Über zytoplasmatische Zellfortsätze war auch hier der Kontakt zur Glasoberfläche hergestellt.

Auf den Kontrolloberflächen Titan und Struvit (Abb. 4.12) konnte mittels REM das Vorhandensein zahlreicher Zellen nachgewiesen werden. Dabei waren sowohl kleine mononukleäre Zellen erkennbar – wie sie auch auf Glas ohne RANKL-Zusatz vorzufinden waren – als auch größere osteoklastäre Zellen mit bis zu 200 μm Durchmesser. Viele dieser Osteoklasten wiesen eine gewölbte, rundliche Form auf. Besonders große Zellen, die vermehrt an Tag 11 und 14 auftraten,⁴ waren dagegen sehr flach und unregelmäßig lappenartig konfiguriert. Der Kontakt zum Untergrund erschien aber in jeder Morphologie ähnlich eng wie auf Glas zu sein. Darüber hinaus zeigten sich halbkugelige Zellen mit einer Größe von 10–20 μm , bei denen es sich vermutlich um fusionierte Osteoklastenvorläufer handelt. Bei Dotierung der Beschichtungen mit 45 μg beziehungsweise 186 μg Strontium pro Probe waren zahlreiche Osteoklasten vorhanden, die morphologisch denjenigen auf Titan und Struvit ähnelten. Der Kontakt zur Beschichtung erschien auch hier gut ausgeprägt zu sein. Ab Tag 7 wiesen die vorhandenen Osteoklasten jedoch verglichen mit den Kontrolloberflächen eine im Allgemeinen etwas geringere Größe sowie unregelmäßigere Zellränder auf. Darüber hinaus zeigten einige Osteoklasten Löcher und Risse in der Plasmamembran. Zudem konnten auch auf diesen Proben reichlich Zellen verschiedener Vorläuferstadien festgestellt werden. Zellen auf Sr290 und Sr487 zeigten häufig ungewöhnliche Formen und waren zudem teils deutlich vom Untergrund abgelöst, sodass sich die Zellränder aufwölbten. Dies trat besonders stark ab Tag 7 auf und betraf fast ausschließlich Osteoklasten ab 40 μm Durchmesser. Kleinere Zellen, die als Vorläufer betrachtet werden können, entsprachen in ihrer Gestalt weitgehend dem morphologischen Bild auf den übrigen Probenoberflächen.

⁴REM-Aufnahmen zu Tag 11 im Anhang.

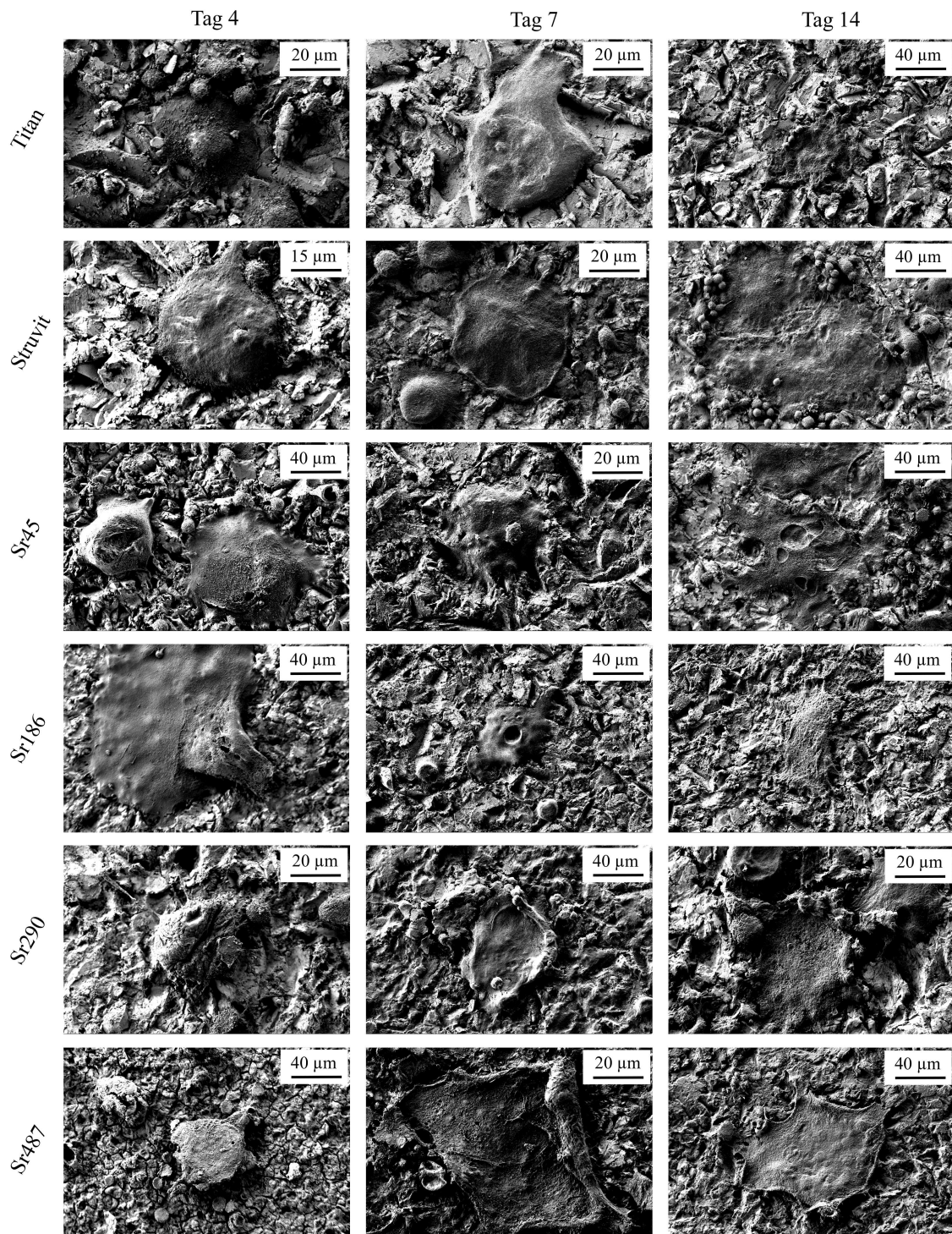


Abb. 4.12: REM-Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen an Tag 4, 7 und 14 zeigten auf allen untersuchten Oberflächen neben undifferenzierten mononukleären Zellen und fusionierten Vorläuferstadien das Vorhandensein osteoklastärer Zellen unterschiedlicher Morphologie. Dabei wiesen insbesondere Osteoklasten auf Sr290 und Sr487 ab einem Durchmesser von etwa 40 μm weniger festen Kontakt zur Probenoberfläche auf.

4.1.6 Nachweis osteoklastenspezifischer Gene mittels PCR

Um eine Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung auf transkriptioneller Ebene vorzunehmen, wurde eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese für Kathepsin K (CATK) sowie Calcitoninrezeptor 2 (CTR2) durchgeführt. Dabei wurden auf Sr45, Sr186, Sr290 und Sr487 kultivierte Zellen untersucht sowie die Kontrolloberflächen Polystyrol (PS), Titan und Struvit mitgeführt.

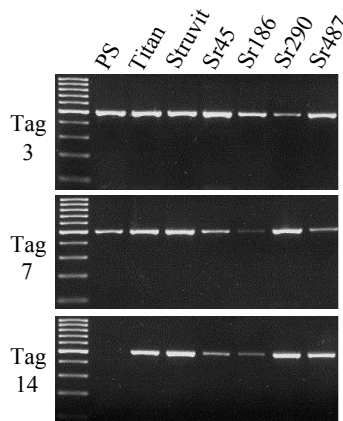


Abb. 4.13: Agarose-Gelelektrophorese des Haushaltsgens GAPDH von RAW 264.7 Zellen an den Tagen 3, 7 und 14. Die Zellen auf den Oberflächen PS, Titan, Struvit, Sr45, Sr186, Sr290 und Sr487 zeigten über alle Messtage nachweisbare GAPDH-Expression, einzige Ausnahme stellte PS an Tag 14 dar.

Der Nachweis von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit einer Länge von 496 bp diene zunächst zur Bestätigung einer erfolgreichen Durchführung der PCR und ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Dabei zeigte sich für Titan und Struvit in der Agarose-Gelelektrophorese eine über alle Messtage hinweg hohe GAPDH-Expression. Auf PS war der GAPDH-Nachweis nur bis Tag 7 positiv, dessen Fehlen an Tag 14 ist jedoch höchstwahrscheinlich auf einen RNA-Verlust in Folge der Reinigungsschritte zurückzuführen. Für die strontiumdotierten Proben stellten sich an den verschiedenen Messtagen zum Teil geringere Bandenintensitäten als für die Kontrolloberflächen dar, der Nachweis einer GAPDH-Expression war jedoch an allen Tagen möglich. Um die Unterschiede in der Expression von CATK und CTR2 auf den verschiedenen Oberflächen darzustellen, erfolgte eine Normierung der Bandenintensität von CATK sowie CTR2 auf den jeweiligen Wert für GAPDH, dargestellt in den Abbildungen 4.14 (b) sowie 4.15 (b).

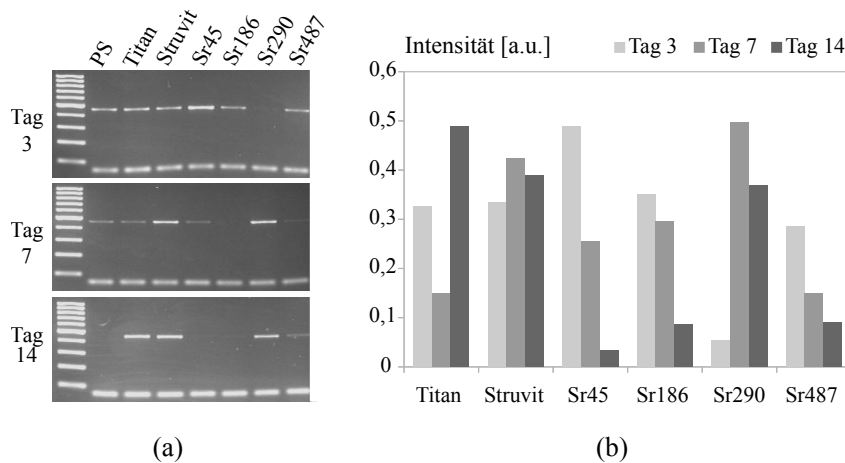


Abb. 4.14: (a) Anhand der Gelelektrophorese war eine Kathepsin CATK-Expression von RAW 264.7 Zellen bereits an Tag 3 auf allen Proben nachweisbar. (b) Nach Normierung der Bandenintensitäten auf GAPDH zeigte sich für die Zellen auf Sr45, Sr186 und Sr487 eine deutliche Abnahme der CATK-Expression von Tag 3 bis Tag 14.

Wie aus Abbildung 4.14 (a) ersichtlich, war CATK mit einer Länge von 463 bp bereits an Tag 3 auf allen Proben deutlich nachweisbar. Lediglich Sr290 bildete hiervon eine Ausnahme mit einer nur sehr schwach ausgeprägten Bande. Zum Vergleich der CATK-Expression im zeitlichen Verlauf wurde die Normierung auf GAPDH genutzt, die in Abbildung 4.14 (b) dargestellt ist. Dabei wird deutlich, dass Zellen auf Titan und Struvit CATK an Tag 3 in vergleichbarer Stärke exprimierten. Auf Titan kam es anschließend bis Tag 7 zu einem Rückgang mit erneutem Anstieg bis Tag 14; Zellen auf Struvit zeigten im zeitlichen Verlauf dagegen eine relativ gleichbleibende Genexpression. Bei einer Dotierung mit 45 μg Strontium war nach hoher CATK-Expression an Tag 3 eine stetige Abnahme bis Tag 14 zu verzeichnen, sodass an diesem Tag – wie auch anhand der Gelelektrophorese ersichtlich – kein sicherer CATK-Nachweis mehr möglich war. Die Genexpression auf Sr186 lag an Tag 3 bei etwas geringeren Werten als auf Sr45 und entsprach somit in etwa den Kontrolloberflächen. Auch hier ließ sich im Mittel eine bis Tag 14 sinkende Genexpression beobachten, allerdings bei einer an Tag 7 und 14 äußerst schwachen Bandenintensität. Auf Sr487 lag die CATK-Expression am ersten Tag noch etwas niedriger als auf Sr186, im weiteren Verlauf kam es auch hier zu einem stetigen Rückgang. Somit war am letzten Mess-tag die CATK-Expression von Zellen auf Sr45, Sr186 und Sr487 gegenüber reinem Struvit stark reduziert. Hiervon abweichend stellte sich die Dotierung mit 290 μg Strontium dar. Nach einer äußerst geringen Genexpression an Tag 3 stieg diese bis Tag 7 stark an, sodass trotz eines darauf folgenden Rückgangs an Tag 14 noch mit

Struvit vergleichbare CATK-Expression festzustellen war.

Die mRNA von CTR2 mit einer Länge von 363 bp war mittels Gelelektrophorese (Abb. 4.15 (a)) an Tag 3 auf PS, Titan, Struvit und Sr45 eindeutig detektierbar. Für Sr186 und Sr487 waren die Banden nur sehr schwach ausgeprägt, für Sr290 nicht nachweisbar. Auch bei Normierung der Bandenintensitäten auf GAPDH in Abbildung 4.15 (b) wird deutlich, dass Zellen auf Titan und Struvit an Tag 3 CTR2 in geringem Maße exprimierten. Bis Tag 7 kam es lediglich zu einer geringfügigen Zunahme, erst an Tag 14 war eine sehr hohe CTR2-Expression zu verzeichnen, was auch anhand der Gelelektrophorese deutlich wird. Bei Sr45 lag die Genexpression von CTR2 an Tag 3 zwar noch etwas höher als auf den Kontrolloberflächen, an Tag 14 wurde jedoch keine starke Zunahme, sondern vielmehr eine leichte Verminderung der Genexpression detektiert. Obwohl sich auf Sr290 wie auf den Kontrolloberflächen im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der CTR2-Expression darstellte, war diese jedoch so gering ausgeprägt, dass an Tag 14 eine mit Sr45 vergleichbare Genexpression vorlag. Diese war gegenüber Struvit herabgesetzt und lag im Mittel bei unter 25 %. Auf Sr186 beziehungsweise Sr487 kultivierte Zellen zeigten an Tag 3 nur eine minimale CTR2-Expression. Während diese auf Sr487 im weiteren Verlauf kaum variierte, war auf Sr186 anhand der in Abbildung 4.15 (a) abgebildeten Gelelektrophorese ab Tag 7 keine Expression von CTR2 mehr nachweisbar.

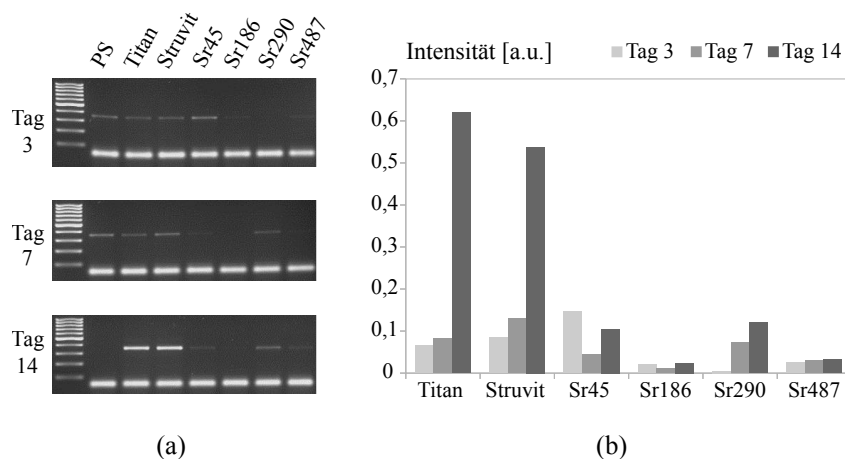


Abb. 4.15: (a) Mittels Gelelektrophorese ließ sich eine deutliche CTR2-Expression von RAW 264.7 Zellen an Tag 3 nur auf PS, Titan, Struvit und Sr45 nachweisen. (b) Durch Normierung der Bandenintensitäten auf GAPDH wird zudem ersichtlich, dass erst an Tag 14 auf Titan und reinem Struvit eine stark ausgeprägte Genexpression stattfand. Eine Dotierung mit Strontium reduzierte diese insbesondere an Tag 14.

4.2 Untersuchungen zur Wirkung von Strontium auf MG-63 Zellen

Da Osteoblasten neben Osteoklasten im Knochenstoffwechsel ebenfalls zahlreiche wichtige Funktionen ausüben (s. hierzu Abschnitt 2.1.1), war es von Interesse den Einfluss von Strontium auch auf osteoblastäre Zellen zu untersuchen. Dazu wurden MG-63 Zellen auf Struvitoberflächen kultiviert, die mit 45 μg , 186 μg , 290 μg sowie 487 μg Strontium dotiert waren. Die Auswirkung der verschiedenen Dotierkonzentrationen auf das Zellwachstum wurde anhand von Zellzahl und Zellaktivität untersucht. Als Kontrolloberflächen dienten analog zu den Versuchsreihen mit RAW 264.7 Zellen Titan und Struvit.

4.2.1 Zellwachstum unter dem Einfluss von Strontium

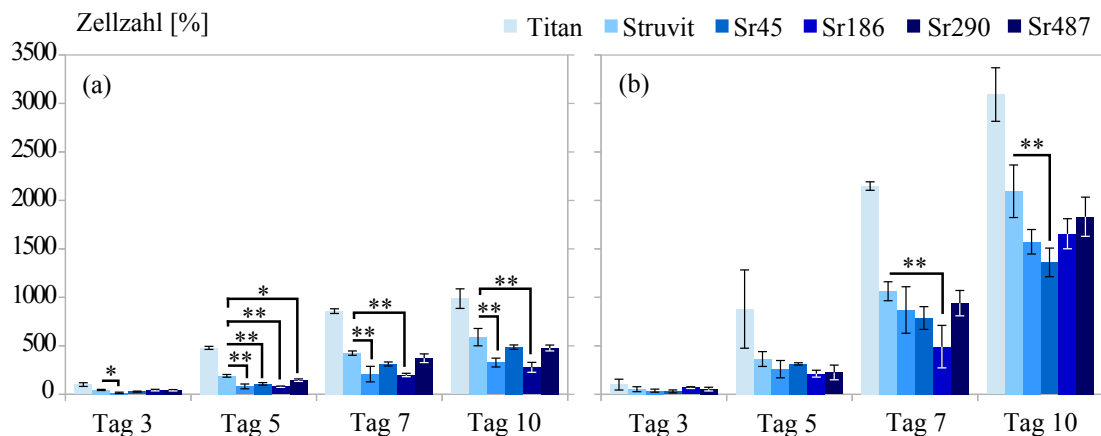


Abb. 4.16: Abbildung (a) zeigt in einer ersten Messreihe eine starke Zunahme der Zellzahl von MG-63 Zellen auf allen Proben im zeitlichen Verlauf. Am letzten Messtag wiesen Sr186 und Sr487 mit reinem Struvit vergleichbare Zellzahlen auf; die der übrigen beiden dotierten Oberflächen waren dagegen signifikant verringert. In Abbildung (b) lässt sich anhand eines unabhängigen zweiten Versuchsansatzes eine prinzipielle Reproduzierbarkeit ablesen, wobei die Steigerung des Zellwachstums noch um ein Vielfaches stärker ausgeprägt war. Am letzten Messtag lagen die niedrigsten mittleren Zellzahlen auf Sr186 vor. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen strontiumdotierten Oberflächen und undotierten Struvitoberflächen sind mit $* = p < 0,05$, $** = p < 0,01$ gekennzeichnet.

In einer ersten Messreihe, dargestellt in Abbildung 4.16 (a), zeigte sich im Verlauf von zehn Tagen auf allen Oberflächen ein kontinuierlicher Anstieg der mittleren Zellzahl. Die höchsten Absolutwerte waren dabei auf Titan zu verzeichnen, wo sich die Zellzahl vom ersten bis zum letzten Messtag etwa verzehnfachte. Auch auf Struvit kam es zu einem vergleichbaren Anstieg, wobei die Zellzahl bezogen auf Titan an jedem Messtag nur in etwa die Hälfte betrug. Bei Dotierung mit Strontium wies an Tag 3 lediglich Sr45 eine gegenüber Struvit signifikant verringerte Zellzahl auf. Im weiteren zeitlichen Verlauf zeigten die dotierten Proben eine im Vergleich zu Struvit verringerte Zellzahl, deren Wert an Tag 10 für Sr186 und Sr487 um rund 20 %, für Sr45 und Sr290 dagegen um etwa 50 % reduziert war.

In einem zweiten Versuchsansatz ließen sich diese Ergebnisse relativ gut reproduzieren, wie aus Abbildung 4.16 (b) ersichtlich wird. Der starke Zuwachs an Zellen auf den Kontrolloberflächen Titan und Struvit bis Tag 10 ließ sich erneut beobachten, wobei die Proliferation noch um ein Vielfaches stärker ausgeprägt war als in der ersten Messreihe. Auch die dotierten Struvitschichten wiesen einen vergleichbaren Anstieg der Zellzahl auf. Während diese an den beiden ersten Messtagen auf allen vier strontiumhaltigen Proben keine signifikanten Unterschiede zu reinem Struvit aufwies, zeigte sich an Tag 7 auf Sr290 eine im Mittel deutlich geringere Zellzahl als auf den übrigen Proben. An Tag 10 wies dagegen die Beschichtung mit 186 μg Strontium pro Probe die niedrigste mittlere Zellzahl auf.

4.2.2 Zellaktivität und Aktivität pro Zelle

Die metabolische Aktivität auf Titan und Struvit zeigte analog zur Zellzahl im zeitlichen Verlauf eine starke Zunahme. Diese fand in beiden Messreihen, dargestellt in den Abbildungen 4.17 (a) und (b), insbesondere von Tag 5 auf Tag 7 statt, wobei sich die Zellaktivität mindestens verdoppelte. Die Zellaktivität auf Struvit war dabei reproduzierbar über alle Messtage auf vergleichbarem beziehungsweise reduziertem Niveau gegenüber Titan. Eine Dotierung mit den verschiedenen Strontiumkonzentrationen zeigte an den ersten beiden Messtagen verglichen mit Struvit lediglich für Sr45 an Tag 3 einen signifikanten Unterschied in der Zellaktivität. Ab Tag 7 kam es wie auch auf den Kontrolloberflächen zu einer deutlichen Aktivitätszunahme. Diese war jedoch auf Sr45 sowie Sr290 weniger ausgeprägt als auf Struvit, sodass die mittlere Aktivität beider Messreihen am letzten Messtag gegenüber Struvit um etwa 30 % reduziert war. Zellen auf Sr186 wiesen dagegen an Tag 10 in beiden Messreihen keine signifikanten Unterschiede zu undotiertem Struvit auf. Auf Sr487 war die

stärkste Zunahme der Zellaktivität aller strontiumdotierten Oberflächen zu verzeichnen. Damit lag am letzten Messtag eine mit Struvit vergleichbare Aktivität vor, die in der ersten Messreihe im Mittel noch leicht über derjenigen von Struvit lag.

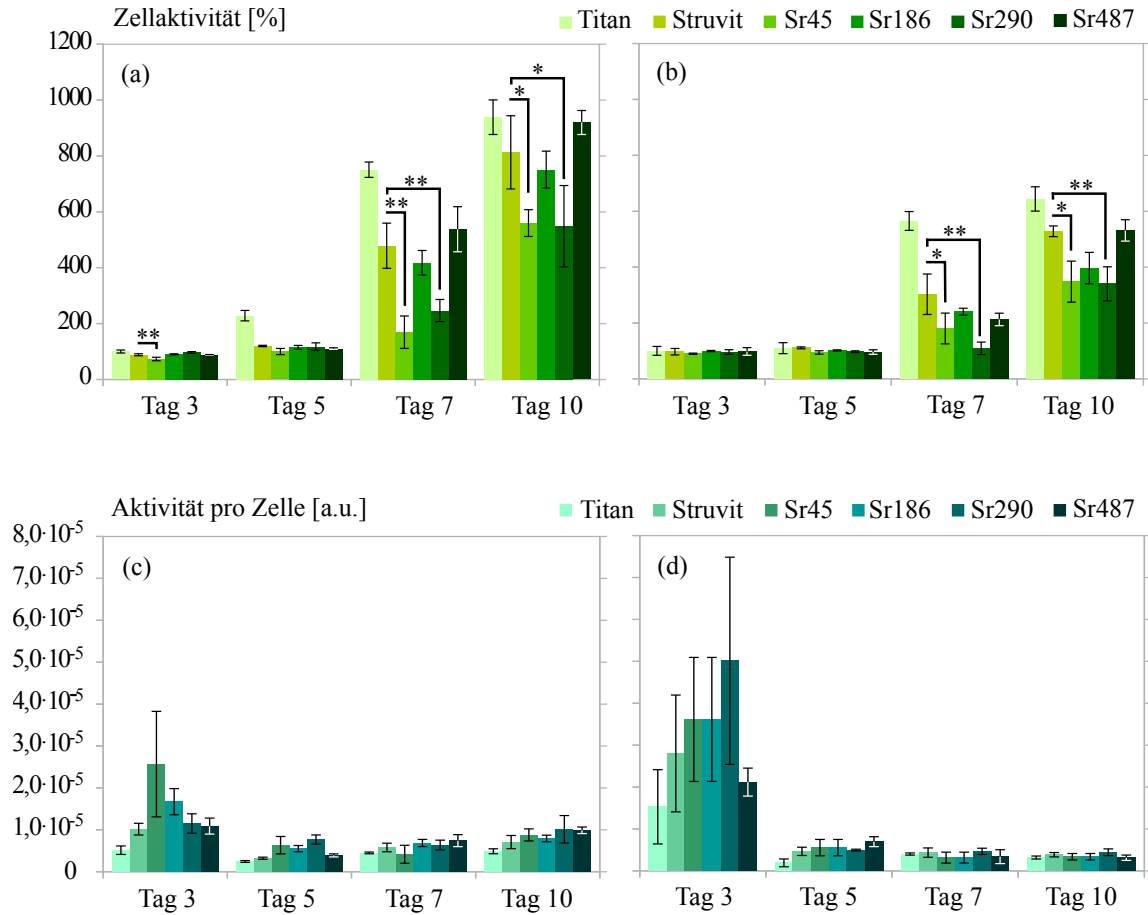


Abb. 4.17: Bei der Bestimmung der Zellaktivität von MG-63 Zellen in einer (a) ersten und (b) zweiten Messreihe zeigte sich über einen Zeitraum von 10 Tagen auf allen Schichten eine zunehmende Aktivität. An Tag 10 wiesen Zellen auf strontiumdotierten Oberflächen gegenüber reinem Struvit eine im Mittel um maximal 30 % verminderte Zellaktivität auf. Signifikante Unterschiede zu reinem Struvit sind mit $*$ = $p < 0,05$, $**$ = $p < 0,01$ markiert. Anhand der ermittelten Aktivität pro Zelle für Messreihe 1 (c) und Messreihe 2 (d) ist ersichtlich, dass die Einzelzellaktivität am ersten Messtag am höchsten lag. Im weiteren Verlauf war die Aktivität pro Zelle auf allen Schichten niedriger, zudem bestanden meist nur noch geringfügige Unterschiede zwischen den verschiedenen Schichten.

Zur Berücksichtigung der jeweiligen Zellzahl bei der Betrachtung der Zellaktivitäten wurde aus den entsprechenden Mittelwerten die Aktivität pro Zelle bestimmt, wie in den Abbildungen 4.17 (c) und (d) gezeigt. Die höchsten Einzelzellaktivitäten waren dabei bereits am ersten Messtag nachweisbar, welche allerdings nicht auf den Kontrolloberflächen, sondern bei Zusatz von Strontium vorlagen. Im weiteren Verlauf der Messtage waren die mittleren Aktivitätswerte pro Zelle auf den verschiedenen Oberflächen geringer, was in der zweiten Messreihe noch stärker ausgeprägt war. In beiden Messreihen bestanden jedoch von Tag 5 bis Tag 10 auf den untersuchten Schichten keine signifikanten Unterschiede in der Einzelzellaktivität gegenüber undotiertem Struvit.

Kapitel 5

Diskussion

Im Knochenstoffwechsel sind für Strontium bereits seit Jahren osteoanabole sowie antiresorptive Eigenschaften bekannt, worauf in Kapitel 2.3 näher eingegangen wird. Auf diesen Erkenntnissen beruht der Einsatz von oral appliziertem Strontiumranelat zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose [14, 23]. Die Verwendung von Strontiumranelat zur oralen medikamentösen Osteoporose-Therapie wird jedoch aktuell aufgrund von unklarer Nutzen-Risiko-Bewertung kontrovers diskutiert [69]. Vor diesem Hintergrund bestanden in den letzten Jahren zahlreiche Bestrebungen eine lokale anti-osteoporotische Wirkung von Strontium zu nutzen. Hierzu erfolgte die Entwicklung verschiedener strontiumsubstituierter mineralischer Oberflächen wie beispielsweise Hydroxylapatit und anderen Calciumphosphaten.

Meininger et al. etablierten erfolgreich ein Verfahren Titan mit dem Magnesiumphosphat Struvit mittels elektrochemisch gestützter Abscheidung zu beschichten. Durch Modifikation des Elektrolyten gelang es zudem variable Mengen an Strontium in die Struvitbeschichtung einzulagern [18]. Davon ausgehend erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Kultivierung von RAW 264.7 sowie MG-63 Zellen auf Struvitschichten mit sieben verschiedenen Strontiumdotierungen. Diese enthielten zwischen 6 μg und 487 μg Strontium pro Probe, entsprechend einem mittleren Massengehalt zwischen 0,09 % und 13,4 %.¹ Im Fokus der Arbeit stand dabei die Analyse von Osteoklastendifferenzierung und Proliferation, wohingegen das Verhalten osteoblastärer Zellen bei Strontiumzusatz nur orientierend untersucht wurde.

¹Die Berechnung basiert auf Daten von [76, 77]; s. Diagramm im Anhang.

5.1 Wirkung von Strontium auf RAW 264.7 Zellen

Um die Differenzierung monozytärer RAW 264.7 Zellen zu Osteoklasten anzuregen, wurden 50 ng *receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand* (RANKL) pro ml Kulturmedium zugegeben. Dies entspricht den Kultivierungsbedingungen gemäß *Großardt et al.*, wobei sich auch ohne zusätzliche Stimulation mit *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) eine erfolgreiche Osteoklastogenese nachweisen ließ [61]. Da M-CSF jedoch als unverzichtbarer Faktor für Proliferation und Osteoklastendifferenzierung beschrieben ist [83], scheint dies im Widerspruch zu früheren Erkenntnissen zu stehen. Inzwischen ist aber bekannt, dass RAW 264.7 Zellen die Fähigkeit besitzen, RANKL-abhängig selbst M-CSF zu produzieren. Deshalb kann auch ohne den exogenen Zusatz von M-CSF eine erfolgreiche Osteoklastogenese beobachtet werden [84]. Aus diesem Grund konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei den Untersuchungen zu Differenzierung und Proliferation von RAW 264.7 Zellen auf eine zusätzliche Supplementierung des Kulturmediums mit M-CSF verzichtet werden.

5.1.1 Bewertung der Osteoklastendifferenzierung anhand mikroskopischer Methoden

Zum Nachweis und zur Beurteilung einer erfolgreichen Fusionierung und Differenzierung mononukleärer RAW 264.7 Zellen zu multinukleären Osteoklasten kamen insbesondere die mikroskopischen Methoden der zytochemischen Färbung Tartratreisester saurer Phosphatase (TRAP), der fluoreszenzmikroskopischen Aktindarstellung sowie der Rasterelektronenmikroskopie (REM) zum Einsatz. Es erfolgt zunächst jeweils eine methodische Betrachtung der drei eingesetzten mikroskopischen Nachweisverfahren. Nachfolgend werden die Ergebnisse der drei Methoden für die untersuchten Kontrolloberflächen Glas, Titan und Struvit sowie die verschiedenen strontiumdotierten Struvitoberflächen diskutiert.

Für das mittels TRAP-Färbung visualisierbare zytoplasmatische Enzym TRAP sind zwei Isoformen bekannt, die beide im menschlichen Blut zirkulieren. Während TRAP 5a von Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert wird, wird TRAP 5b ausschließlich von Osteoklasten freigesetzt. Deshalb eignet sich TRAP 5b als Marker einer erfolgreichen Osteoklastogenese [53]. Die im verwendeten Kit als Substrat dienende Naphtol AS-BI Phosphorsäure wird dabei weitgehend selektiv durch die Isoform 5b hydrolysiert [85]. Aus diesem Grund kann für die durchgeführte Färbung

angenommen werden, dass es sich bei den violett gefärbten Zellen um TRAP 5b-positive und somit osteoklastäre Zellen handelt. Dies wird weiterhin dadurch unterstützt, dass Zellen ohne Zugabe von RANKL zum Kulturmedium im Gegensatz dazu eine bräunliche Färbung aufwiesen (vgl. Abb. 4.5 (a)). Bei Supplementierung des Mediums mit RANKL zeigten sich auf Glas hinsichtlich Morphologie und Anfärbbarkeit unterscheidbare Zellpopulationen, die verschiedenen Differenzierungsstadien entsprechen (vgl. Abb. 4.5 (b) und (c)). Große Zellen mit einem Durchmesser von etwa 50 μm bis 400 μm zeichneten sich durch hellviolett Zytosol aus und können aufgrund ihrer Größe und des Nachweises mehrerer Zellkerne nach morphologischen Kriterien als ausdifferenzierte Osteoklasten identifiziert werden. Bei den dunkelviolett gefärbten Einzelzellen, die einen Durchmesser von etwa 10 μm aufwiesen, handelt es sich dagegen wahrscheinlich um mononukleäre Vorläuferzellen. Darüber hinaus waren noch verschiedene fusionierte Zwischenstadien vorhanden, wobei sich diese durch den Nachweis von hellviolett Zytosol, jedoch ohne eindeutig identifizierbare Zellkerne auszeichnen. Da unter dem Einfluss von RANKL auch sämtliche Vorläuferzellen violett anfärbbar waren, lässt sich ableiten, dass nicht nur ausdifferenzierte Osteoklasten TRAP 5b sezernieren, sondern bereits auch deren Vorstufen. Hierzu zeigten *Halleen et al.*, dass sowohl aktive als auch inaktive Osteoklasten zur TRAP-Sekretion fähig sind [53]. Darüber hinaus wurden auch mononukleäre Zellen bereits als TRAP-positiv beschrieben [86].

Im Vergleich zu Glas erwies sich die Beurteilung der Osteoklastogenese auf den übrigen Proben als deutlich erschwert, was auf die Rauigkeit der Oberflächenstruktur zurückzuführen ist. Dadurch gestaltete sich bei der Betrachtung im Auflichtmikroskop insbesondere die exakte Unterscheidung zwischen vollständig differenzierten Osteoklasten und fusionierten Vorstufen als sehr schwierig, sodass als Kriterium für reife Osteoklasten eindeutig identifizierbare Zellkerne vorausgesetzt wurden. Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass vorhandene Zellkerne lediglich aufgrund ihrer schlechten optischen Abgrenzbarkeit zum Hintergrund der Probenoberfläche nicht erkennbar waren und Zellen aus diesem Grund falsch klassifiziert wurden. Somit erlaubt die TRAP-Färbung zwar eine erste Einschätzung der Osteoklastendifferenzierung, für eine detaillierte Analyse des Differenzierungsverhaltens ist diese Methode jedoch nur bedingt geeignet. Diese Problematik ist auch der Grund dafür, dass eine Ermittlung der Osteoklastenzahl ausgehend von TRAP-Färbungen in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet werden konnte.

Um eine genauere Einschätzung des Differenzierungsvorgangs von Osteoklasten vornehmen zu können, wurde des Weiteren Aktin fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Unter Verwendung fluoreszenzmarkierten Phalloidins stellt sich polymerisiertes F-Aktin rot dar, während sich Zellkerne mittels Hoechst-Färbung blau färben und somit die Mehrkernigkeit von Osteoklasten gezeigt werden kann. Für ringförmig angeordnetes F-Aktin sind in Abhängigkeit des Substrats zwei verschiedene Organisationsformen – Podosomen-Gürtel sowie Versiegelungszone – beschrieben. Podosomen stellen zylindrische Aktinstrukturen dar, die ausgehend von Aktin-Clustern sogenannte Podosomen-Gürtel oder *sealing zone-like structures* (SZL) in der Zellperipherie ausbilden. Diese weisen eine Dicke von etwa $0,5\ \mu\text{m}$ auf und entstehen in Zellen, welche auf nicht mineralisierten Oberflächen kultiviert wurden. Die Versiegelungszone hingegen ist mit etwa $4\ \mu\text{m}$ deutlich dicker und entsteht nur bei Zellen, die auf mineralisiertem Substrat kultiviert wurden. Im Gegensatz zu SZL liegt die Versiegelungszone zentraler und weist zudem einen geringeren Durchmesser auf. Darüber hinaus besitzen nur polarisierte Zellen eine Versiegelungszone, im nicht-polarisierten, migrierenden Zustand sind keine dieser charakteristischen Aktinstrukturen erkennbar [87–90]. Somit stellt sich die Frage nach der Einordnung der in vorliegender Arbeit beobachteten Aktinringe. Aufgrund der Dicke der Ringe von circa $2\text{--}4\ \mu\text{m}$ ist eher davon auszugehen, dass es sich um die Versiegelungszone handelt. Dem widerspricht die Tatsache, dass vergleichbar dicke Aktinringe auch auf den nicht-mineralisierten Oberflächen Glas und Titan zu beobachten waren und die Ringe auf allen Proben sehr peripher gelegen waren. Damit lässt sich für die beobachteten Aktinringe eine Charakterisierung nach obigen Kriterien nicht eindeutig vornehmen. Andere Publikationen kommen jedoch zu dem Schluss, dass eine strikte Trennung der beiden Organisationsformen von Aktin nur eingeschränkt möglich ist oder diese sogar äquivalent sein könnten. So besteht auch die Versiegelungszone aus einzelnen Podosomen, die sich von SZL lediglich durch größere Dichte sowie höheren Vernetzungsgrad unterscheidet [91]. Beobachtungen von *Fuller et al.* legen zudem nahe, dass sowohl die Ausbildung von Versiegelungszonen als auch die Ausbildung von SZL eine Aktivierung der osteoklastären Resorptionstätigkeit widerspiegelt [92], sodass für die Aktivität und Funktion von Osteoklasten Knochen nicht zwingend als Substrat notwendig ist [93]. Somit ist davon auszugehen, dass für Zellen mit Aktinringen in jedem Fall mittels Immunfluoreszenz der sichere Nachweis für reife Osteoklasten erbracht ist.

Mittels REM zeigten sich vollständig differenzierte Osteoklasten auf Glas als flach ausgebreitete Zellen, die über zahlreiche Zellfortsätze augenscheinlich fest am Untergrund adhärirten. Die als Randwall in der Zellperipherie imponierende Verdickung (vgl. Abb. 4.11) ist als Korrelat für die fluoreszenzmikroskopisch darstellbaren Aktinringe beschrieben [90]. Auf Titan und Struvit war demgegenüber eine veränderte Morphologie mit deutlich gewölbter Oberfläche zu erkennen (vgl. Abb. 4.12 Tag 4 und Tag 7). Dies steht in Einklang mit bisherigen Beobachtungen, bei denen sich Osteoklasten auf raueren Proben wie Dentin oder Bruschitzementen in vergleichbarer Form präsentierten [90, 94]. Einige der hier vorliegenden Osteoklasten zeigten auch die von *Roy et al.* beschriebenen charakteristischen zentralen Vorwölbungen der Plasmamembran, die als *blebs* bezeichnet werden [70]. Eine gute Adhäsion schien trotz Unebenheiten der Probenoberfläche auch hier über feine Zellfortsätze gewährleistet zu sein. An den Tagen 11 und 14 wiesen jedoch zahlreiche größere Osteoklasten eine hiervon abweichende flache Gestalt auf. Da eine solche Morphologie untypisch für diese Oberflächen ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um Artefakte im Zuge der Probenvorbereitung handelt. Möglicherweise wurde während der Waschschriffe der aufgewölbte Zellteil abgerissen und abgespült, sodass nur noch die fest anhaftende basal gelegene Plasmamembran verblieb. Zur Beurteilung der REM-Aufnahmen ist anzumerken, dass diese keine sichere Differenzierung zwischen reifen Osteoklasten und späten Stadien fusionierter Vorläuferzellen erlaubt. Es ist anzunehmen, dass sich diese morphologisch bereits stark ähneln, sodass – wie bereits erläutert – die fluoreszenzmikroskopische Aktindarstellung hierzu besser geeignet erscheint.

Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten TRAP-Färbungen zeigten sich auf den Kontrolloberflächen Glas, Titan sowie Struvit an allen Tagen TRAP-positive Zellen (vgl. Abb. 4.6). Dies entspricht lediglich zum Teil den Beobachtungen von *Großardt et al.*, da hierbei auf Struvitzementen kein Nachweis TRAP-positiver Zellen möglich war. Dabei wurde als Grund mangelnde Stabilität in der Kristallstruktur der Zemente angenommen [61]. Somit steht der erfolgreiche Nachweis auf elektrochemisch abgeschiedenen Struvitschichten nicht im Widerspruch zu bisherigen Ergebnissen, sondern zeigt einen methodischen Vorteil gegenüber Struvitzementen auf. Mittels Immunfluoreszenz und REM ließ sich auf Titan und Struvit ebenfalls an allen Tagen das Vorhandensein osteoklastärer Zellen aufzeigen, wobei bereits ab Tag 4 nach morphologischen Kriterien vollständig differenzierte Osteoklasten zu beobachten waren.

Demgegenüber zeigte sich die vollständige Differenzierung zu multinukleären Osteoklasten mittels TRAP-Färbung erst verspätet ab Tag 11, was jedoch auf die bereits aufgeführten Schwierigkeiten bei der Beurteilung dieser Methode zurückzuführen ist (s. Seite 69). Beim Vergleich der Aktinringe auf den Oberflächen Glas, Titan sowie Struvit fielen unterschiedlich große Durchmesser auf, die vermutlich auf Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit zurückzuführen sind. *Fuller et al.* zeigten, dass die Zellausbreitung auf glatten Proben erleichtert ist, was sich in der Ausbildung größerer Aktinringe manifestiert [92]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen waren auch in der hier vorliegenden Arbeit mittels TRAP-Färbung sowie Fluoreszenzmikroskopie auf Glas im Mittel größere Osteoklasten als auf Titan vorhanden (s. Abschnitt 4.1.3). Aktinringe auf Struvit kultivierter Osteoklasten wiesen gegenüber Titan im Mittel ebenfalls deutlich größere Durchmesser auf. Auf der Grundlage von REM-Aufnahmen ist jedoch davon auszugehen, dass Struvit gegenüber sandgestrahltem Titan eine rauere Oberfläche aufweist [61, 95]. Somit scheint die Rauigkeit der Proben nicht der einzige Faktor zu sein, der die Größe von Osteoklasten beeinflusst. Vielmehr steht vermutlich die Ausbildung größerer Aktinringe auf Struvit mit der hier vorliegenden kristallinen Struktur der Beschichtung in Verbindung, die sich förderlich auf die Ausbreitungstendenz von Osteoklasten auszuwirken scheint.

Durch Dotierung der Struvitschichten mit $6\ \mu\text{g}$ beziehungsweise $45\ \mu\text{g}$ Strontium konnte anhand der TRAP-Färbung (vgl. Abb. 4.6) anfänglich ein hemmender Einfluss festgestellt werden, da an Tag 4 noch keine Zellfusionen nachweisbar waren. Diese initiale Hemmung der Osteoklastogenese bestätigte sich auch bei der Visualisierung von Aktin, da an Tag 4 sowohl auf Sr6 als auch auf Sr45 noch keine Aktinringe als Zeichen reifer Osteoklasten vorhanden waren (vgl. Abb. 4.9). Auf Sr6 zeigten sich erst an Tag 11 vollständig ausgebildete Aktinringe, sodass auf dieser Oberfläche die Ausbildung von Osteoklasten noch weiter verzögert war als anhand der TRAP-Färbung angenommen. Auch auf Sr186 erwiesen sich Zellen, die an Tag 4 mittels TRAP-Färbung als Osteoklasten klassifiziert wurden, in der Fluoreszenzmikroskopie noch als mehrkernige Zellfusionen. Obwohl sich mittels REM (vgl. Abb. 4.12) hiervon abweichend bereits am ersten Messtag osteoklastäre Zellen nachweisen ließen, kann trotzdem angenommen werden, dass es bei Zusatz von Strontium in diesen Mengen zu einer Verzögerung der Osteoklastogenese um mindestens vier Tage kam. Der Grund hierfür liegt in der bereits beschriebenen mangelhaften elektronenmikroskopischen Differenzierbarkeit zwischen fusionierten Vorstufen und reifen osteoklastären Zellen

(s. Seite 71). Darüber hinaus zeigte sich anhand der TRAP-Übersichtsaufnahmen, dass mit Steigerung des Strontiumzusatzes auf bis zu 186 μg pro Probe die Menge TRAP-positiver Zellen abnahm (vgl. Abb. 4.8). Als Grund hierfür kommen grundsätzlich zwei Möglichkeiten in Betracht. Zum einen könnte mit steigender Strontiumdotierung eine Hemmung der Osteoklastogenese auch im gesamten Versuchszeitraum die weitere Ausbildung TRAP-positiver Zellen vermindern. Zum anderen könnte auf eine konzentrationsabhängige Förderung der Apoptose von Osteoklasten und anderen TRAP-positiven Vorläuferzellen geschlossen werden. Diese Annahme wird bei der näheren morphologischen Betrachtung der vorhandenen Zellen mittels REM unterstützt. Dabei zeigten sich im Verlauf der Messtage zunehmend Osteoklasten mit Löchern und Rissen, die gemäß *Xia et al.* als apoptotische Osteoklasten eingestuft werden können [94]. In Anbetracht der Tatsache, dass dies auf Titan und Struvit kaum zu beobachten war, kann daraus gefolgert werden, dass Strontium in diesen Konzentrationen die Apoptoserate fördert.

Bei einer Erhöhung der Dotierung auf 212 μg , 290 μg , 371 μg beziehungsweise 487 μg Strontium pro Probe konnten mittels TRAP-Färbung ab Tag 4 zwar Zellfusionen nachgewiesen werden, vollständig differenzierte Osteoklasten waren jedoch über den gesamten Versuchszeitraum nicht eindeutig identifizierbar (vgl. Abb. 4.7). Dagegen zeigten sich in der Immunfluoreszenz bereits am ersten Messtag auf allen vier Proben Aktinringe, die lediglich auf Sr290 und Sr487 noch nicht vollständig organisiert erschienen (vgl. Abb. 4.10). Diese mangelnde Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen aus TRAP-Färbung und fluoreszenzmarkierter Aktindarstellung ist erneut auf die bereits beschriebenen Schwierigkeiten bei der Beurteilung der TRAP-Färbung zurückzuführen (s. Seite 69). Es lässt sich somit beobachten, dass eine weitere Erhöhung des Strontiumzusatzes auf über 200 μg im Gegensatz zu niedrigeren Strontiumdotierungen die initiale Osteoklastogenese nicht nennenswert verzögerte. Anhand der Übersichtsaufnahmen für diese vier Strontiumdotierungen ist ersichtlich, dass die Zahl TRAP-positiver Zellen gegenüber Struvit in einem mit Sr186 vergleichbaren Maße reduziert war (vgl. Abb. 4.8). Dies lässt ebenfalls auf eine Steigerung der Apoptoserate schließen, was durch die REM-Aufnahmen unterstützt wird, da sich dort auf Sr290 beziehungsweise Sr487 im Verlauf vermehrt apoptotische Osteoklasten nachweisen ließen (vgl. Abb. 4.12). Zudem zeigten größere Osteoklasten ab Tag 7 vielfach deutlich aufgewölbte Zellränder (vgl. Abb. 4.12), sodass ein fester Kontakt zum Untergrund nicht mehr gewährleistet zu sein schien.

Ein Strontiumzusatz in diesen Mengen hemmt somit zwar nicht unmittelbar die Ausbildung osteoklastentypischer Strukturen, fördert jedoch ebenfalls die Apoptose von Osteoklasten. Darüber hinaus könnten die vorliegenden Ergebnisse aber auch Hinweis darauf sein, dass Strontium in diesen Konzentrationen eine Störung der zellulären Adhäsion sowie Ablösung vom Substrat bewirkt, was möglicherweise sekundär die Funktionsfähigkeit der Zellen beeinträchtigt.

Anhand der verschiedenen mikroskopischen Ergebnisse lässt sich damit zusammenfassen, dass Strontiumdotierungen unter 200 μg eine initiale Hemmung der Osteoklastogenese bewirken, die auf Sr6 am ausgeprägtesten ausfiel. Zudem ist bei diesen Dotierkonzentrationen mit steigender Strontiummenge eine vermehrte Apoptoserate anzunehmen. Demgegenüber scheinen Strontiummengen über 200 μg zwar geringeren direkten Einfluss auf die Osteoklastogenese zu nehmen, dafür aber ebenfalls pro-apoptotisch sowie anti-adhäsiv zu wirken.

5.1.2 Beurteilung von Differenzierungsvorgängen auf transkriptioneller Ebene

Um die Osteoklastendifferenzierung auch hinsichtlich der Expression osteoklastentypischer Gene beurteilen zu können, erfolgte der Nachweis von Kathepsin K (CATK) sowie Calcitoninrezeptor 2 (CTR2) mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese. Dabei diente der Nachweis von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) auf allen Proben über den gesamten Versuchszeitraum zur Kontrolle einer erfolgreichen Durchführung der PCR. Lediglich auf Polystyrol (PS) an Tag 14 konnte keine GAPDH-Expression gezeigt werden, was jedoch nicht als methodisches Problem zu betrachten ist. Stattdessen ist der fehlende GAPDH-Nachweis auf einen RNA-Verlust im Rahmen der Reinigungsschritte zurückzuführen, da ausgehend von dieser Probe in keinem Fall ein Gennachweis möglich war. Grundsätzlich liegt bei der Beurteilung dieser Methode die größte Schwierigkeit in der Abhängigkeit der absoluten Genexpression, die trotz definierter eingesetzter RNA-Menge Schwankungen unterliegt. Dies äußert sich in variabler Bandenhelligkeit und ist zum einen auf RNA-Verluste im Zuge der Reinigungsschritte zurückzuführen, zum anderen auf eine schwankende Effektivität der Reversen Transkriptase auf den verschiedenen Proben [96]. Durch Verwendung von GAPDH als Referenzgen und Normierung der Bandenintensitäten von CATK und CTR2 auf diejenigen von GAPDH wurde der Einfluss schwankender Genmengen ausgeglichen (vgl. Abb. 4.14 (b) und 4.15 (b)).

CATK ist ein proteolytisches Enzym zur Spaltung von Kollagen I [49] und wurde mittels PCR auf Titan und Struvit ab Tag 3 nachgewiesen (vgl. Abb. 4.14). Die auch an Tag 14 beobachtete starke CATK-Expression lässt dabei auf eine erfolgreiche Osteoklastendifferenzierung über den gesamten Beobachtungszeitraum schließen, was in Einklang mit den bisherigen Ergebnissen steht. Der vorübergehende Abfall der CATK-Expression auf Titan an Tag 7 ist dagegen nicht eindeutig einzuordnen, da sich mikroskopisch keine Hinweise für eine Abnahme der Osteoklastogenese ergaben. Es ist jedoch zu beachten, dass sich die Expression von CATK nicht nur auf reife Osteoklasten beschränkt, sondern auch durch Makrophagen, diverse multinukleäre Zellen sowie vermutlich durch Osteoklasten-Vorläuferzellen erfolgen kann, was die Beurteilung der CATK-Expression erschwert [97–99].

Die auf Sr45 und Sr186 anhand bisheriger Resultate angenommene initiale Hemmung der Osteoklastogenese scheint im Gegensatz zu der auf diesen Oberflächen vorhandenen hohen CATK-Expression an Tag 3 zu stehen. Es ist jedoch durchaus möglich, dass diese auf zahlreiche Vorläuferzellen zurückzuführen ist und das Vorhandensein vieler aktiver Osteoklasten lediglich suggeriert. Die im weiteren zeitlichen Verlauf beobachtete Abnahme der CATK-Expression ist anhand zweier potenzieller Ursachen zu begründen. Einerseits ist es möglich, dass die hier erhaltenen Intensitätswerte erneut vor allem die CATK-Expression der Vorläuferzellen abbilden, die zu einem späteren Zeitpunkt in geringerer Zahl vorhanden waren. Andererseits könnte dies ein Hinweis auf eine zusätzlich vorhandene spätere Hemmwirkung von Strontium auf die Osteoklastogenese sein. Unterstützt wird diese These durch die REM-Aufnahmen, auf denen sich gegenüber den Kontrolloberflächen vermehrt apoptotische Osteoklasten zeigten, sowie durch die beobachtete Abnahme TRAP-positiver Zellen in den Übersichtsaufnahmen (s. Seite 73). Bei einer Dotierung mit 290 µg Strontium exprimierten Zellen im Gegensatz zu den übrigen Proben am ersten Messtag kaum CATK. Erst bis Tag 7 kam es zu einem starken Anstieg, woraus abgeleitet werden kann, dass auf dieser Oberfläche in den ersten drei Tagen sowohl Vorläuferzellen als auch Osteoklasten noch wenig Differenzierungsaktivität aufwiesen. Dies steht im Widerspruch zu den Beobachtungen der fluoreszenzmikroskopischen Aktindarstellung, wo sich bereits am ersten Messtag eine beginnende Osteoklastendifferenzierung darstellte. Auch die beobachtete Zunahme abgelöster, apoptotischer Osteoklasten mittels REM steht nicht in Einklang mit den Ergebnissen der PCR. Ein eindeutiger Erklärungsansatz hierfür lässt sich schwer finden, es muss allerdings erneut auf die mögliche CATK-Expression durch Vorläuferzellen hingewiesen werden. Dabei könn-

te auch in diesem Fall weniger die Genexpression von reifen Osteoklasten sondern vielmehr von differenzierenden Vorstufen abgebildet worden sein. Zellen auf Sr487 wiesen wie auch auf den beiden Oberflächen Sr45 und Sr186 am ersten Messtag die höchste CATK-Expression auf, welche ebenfalls im zeitlichen Verlauf abnahm. Dies lässt erneut auf die beiden oben erläuterten Gründe schließen, wobei sich für eine Dotierung mit 487 μg Strontium mikroskopisch bereits deutliche Hinweise für eine im zeitlichen Verlauf zunehmende Apoptoseneigung differenzierter Osteoklasten gezeigt hatte (s. Seite 74).

Da die Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung vor dem Hintergrund der CATK-Expression durch sowohl Osteoklasten als auch deren Vorstadien erschwert war, erfolgte zusätzlich die Bestimmung der CTR2-Expression auf den verschiedenen Probenoberflächen. Durch die Bindung des Peptidhormons Calcitonin an seinen Rezeptor kommt es *in vivo* zu einer Hemmung der Knochenresorption und einer damit verbundenen Erhöhung des Serumcalciumspiegels [100]. Eine CTR-Expression war dabei auf monozytären Vorläuferzellen noch nicht nachweisbar, sondern erst im Zusammenhang mit der Fusion und Ausbildung multinukleärer Osteoklasten [101]. Zudem zeigte sich, dass CTR nur in Anwesenheit von RANKL exprimiert wird [102]. Somit dürfte die Bestimmung der CTR2-mRNA gegenüber CATK eine geeignetere Methode darstellen, um die Differenzierung zu reifen, multinukleären Osteoklasten zu beurteilen.

Auf den Kontrolloberflächen Titan und Struvit erfolgte am ersten Messtag der eindeutige Nachweis einer CTR2-Expression, welche bis zum letzten Messtag stark zunahm (vgl. Abb. 4.14). Dies deutet auf eine beständig zunehmende Osteoklastogenese im Verlauf der Messtage hin, die in Übereinstimmung mit den mikroskopischen Ergebnissen steht (vgl. Abb. 4.9). Auf Sr45 war am ersten Messtag ebenfalls ein eindeutiger Nachweis von CTR2-mRNA möglich, wohingegen die fluoreszenzmikroskopische Aktindarstellung an diesem Tag noch keine reifen Osteoklasten, sondern fusionierte Vorstufen zeigte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die detektierte CTR2-Expression in diesem Fall auf die vorhandenen Zellfusionen zurückzuführen ist. Bei einer Dotierung mit 186 μg , 290 μg beziehungsweise 487 μg Strontium ließ sich an Tag 3 dagegen kaum CTR2-Expression nachweisen. Darüber hinaus kam es auf keiner strontiumdotierten Oberfläche zu einem mit den Kontrolloberflächen vergleichbaren Anstieg der Genexpression bis Tag 14.

Diese Ergebnisse zeigen in der Zusammenschau somit eindeutig einen hemmenden Einfluss von Strontium auf die Expression osteoklastenspezifischer Gene über den gesamten Versuchszeitraum. Damit ergibt sich neben der anhand mikroskopischer Methoden ersichtlichen apoptotischen Wirkung von Strontium ein weiterer Nachweis für eine strontiuminduzierte Störung der Osteoklastendifferenzierung.

5.1.3 Analyse der Aktivität Tartrat-resistenter saurer Phosphatase

Darüber hinaus wurde zur Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung die photometrische Bestimmung der TRAP-Aktivität herangezogen. Das der Nachweismethode zugrundeliegende Enzym Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) wird sowohl intrazellulär gespeichert als auch in die Resorptionslakune sezerniert, wo es zum Abbau von Knochenmatrix beiträgt [52]. Für die photometrische Bestimmung der TRAP-Aktivität wurde eine Zell-Lyse durchgeführt, sodass intrazellulär gespeicherte TRAP freigesetzt wurde, welche detektiert werden konnte. Zuvor in die Resorptionslakune sezernierte, extrazelluläre TRAP wurde durch die Entfernung des Kulturmediums vor der Lyse nicht miterfasst. Wie bereits beschrieben wird intrazelluläre TRAP nicht nur in reifen Osteoklasten, sondern auch bereits in mononukleären Vorstufen gebildet (s. Seite 69). Daraus folgt, dass eine erhöhte TRAP-Aktivität nicht ohne Weiteres mit dem Vorhandensein aktiver, differenzierter Osteoklasten gleichzusetzen ist, sondern auch auf Vorläuferzellen zurückzuführen ist. Zudem entfällt bei der photometrischen Methode die Möglichkeit einer optischen Unterscheidung hinsichtlich morphologischer Kriterien wie dem der Mehrkernigkeit, sodass eine Beurteilung verglichen mit der TRAP-Färbung noch weiter erschwert ist. Da sowohl TRAP-Färbung als auch photometrisch bestimmte TRAP-Aktivität nur intrazellulär vorliegende TRAP detektieren, könnte prinzipiell von einer guten Vergleichbarkeit der beiden Methoden ausgegangen werden. Bei der Auswertung der photometrischen TRAP-Aktivität zeigte sich jedoch, dass undifferenzierte RAW 264.7 Zellen ohne RANKL-Zusatz vergleichbare, häufig sogar höhere TRAP-Werte aufwiesen als Zellen mit RANKL-versetztem Kulturmedium. Demgegenüber ließen sich mittels TRAP-Färbung eindeutige Unterschiede zwischen An- beziehungsweise Abwesenheit von RANKL erkennen (s. Abschnitt 4.1.3). Der Grund für die fehlende Übereinstimmung zwischen den beiden Methoden ist vermutlich im Einsatz zweier verschiedener Substrate zu sehen. Während für die Färbung Naphtol-ASBI-Phosphorsäure als Substrat diente, wurde für die photometrische Messung para-Nitrophenylphosphat

verwendet. Ersteres wird als sehr selektiv für die osteoklastenspezifische Isoform TRAP5b beschrieben, wohingegen letzteres als eher unspezifisch gilt und sowohl TRAP5a als auch TRAP5b detektiert [53, 80]. Daraus lässt sich folgern, dass die ermittelte TRAP-Aktivität zu einem beträchtlichen Teil auf die Isoform 5a zurückzuführen ist. Deshalb kann hohe TRAP-Aktivität zwar zunehmende Osteoklastendifferenzierung widerspiegeln, kann aber ebenso Ausdruck vieler monozytärer oder fusionierter Vorläuferzellen sein. An dieser Stelle sei jedoch auch auf Beispiele in der Literatur hingewiesen, die eine gute Korrelation zwischen TRAP-Färbung und photometrischer TRAP-Aktivität zeigen [103]. Dies ist dahingehend erstaunlich, da vergleichbare Methoden wie in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kamen. Diese Diskrepanz könnte auf einigen methodischen Unterschieden bei der Durchführung der TRAP-Aktivitätsmessung beruhen, eine abschließende Erklärung lässt sich aber nicht finden. Dennoch muss aufgrund der zuvor erläuterten Faktoren die Aussagekraft der photometrisch bestimmten TRAP-Aktivität als deutlich limitiert und der Färbung unterlegen eingestuft werden.

Vor diesem Hintergrund zeigte sich für die beiden durchgeführten Messreihen lediglich eine mangelhafte Reproduzierbarkeit. Als Ursache hierfür kann eine unterschiedliche Differenzierungsaktivität zum jeweiligen Messzeitpunkt in den beiden Messreihen angenommen werden. Davon ist grundsätzlich auszugehen, da sich die Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt der Aussaat mit großer Wahrscheinlichkeit in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befanden und Differenzierungsvorgänge deshalb unterschiedlich schnell und in variablem Ausmaß einsetzten. Dies legt insbesondere die Analyse der Kontrolloberflächen nahe, da sich dort in beiden Messreihen eine stark fluktuierende TRAP-Aktivität mit jeweils genau entgegengesetzten Verläufen zeigte. Zudem könnte diese These auch einen Erklärungsansatz dafür darstellen, dass das Ausmaß der TRAP-Aktivität zwischen den beiden Messreihen stark voneinander abweicht. Auf den Kontrolloberflächen Titan und Struvit war in Übereinstimmung mit der TRAP-Färbung bereits am ersten Messtag deutliche TRAP-Aktivität nachweisbar. Die mittels Photometrie beobachteten Schwankungen zwischen den einzelnen Messtagen lassen sich dagegen mittels Färbung schlecht verifizieren. Dies ist jedoch aus oben dargelegten Gründen grundsätzlich schwierig und erlaubt es deshalb kaum, die beiden Methoden in direkte Korrelation zu setzen. Die gegenüber Titan zumeist reduzierte TRAP-Aktivität auf Struvit lässt sich vor dem Hintergrund der übrigen Ergebnisse nicht sicher einordnen, da diese tendenziell eine

vermehrte Ausbildung von Osteoklasten und deren Vorstufen auf Struvit zeigten (s. Abschnitt 5.1.1). Es sei jedoch erneut darauf hingewiesen, dass eine niedrigere TRAP-Aktivität nicht zwangsläufig mit geringerer Osteoklastogenese gleichzusetzen ist. Durch den Zusatz von 45 µg Strontium pro Probe zeigten sich nur geringfügige Abweichungen zu undotiertem Struvit, sodass kein signifikanter Einfluss von Strontium gegenüber den Kontrolloberflächen beobachtet werden konnte. Dies steht im Widerspruch zu sämtlichen bisherigen Beobachtungen, die sowohl eine strontium-abhängige initiale Hemmung der Osteoklastendifferenzierung als auch eine reduzierte Osteoklastogenese im späteren Verlauf der Messtage gezeigt hatten. Auch eine höhere Dotierung mit 186 µg, 290 µg beziehungsweise 487 µg Strontium lässt mittels TRAP-Aktivitätsbestimmung keine validen Rückschlüsse auf das Differenzierungsverhalten der Zellen zu. Damit muss der Stellenwert der hier durchgeführten photometrischen TRAP-Bestimmung insgesamt als relativ gering eingestuft werden, sodass diese Methode bei der Beurteilung des Einflusses von Strontium auf die Osteoklastogenese kaum herangezogen werden kann.

Um die Aussagekraft der photometrischen TRAP-Aktivitätsbestimmung zu erhöhen und eine bessere Vergleichbarkeit mit der Methode der TRAP-Färbung zu erhalten, könnte eine Anpassung des Assays zur TRAP-Aktivitätsbestimmung nach *Janckila et al.* unter Verwendung von Naphtol-ASBI-Phosphat als Substrat vorgenommen werden [80, 85]. Darüber hinaus erscheint die Durchführung eines alternativen Verfahrens sinnvoll, um eine weitere aussagekräftige Methode zur Beurteilung der Osteoklastendifferenzierung heranziehen zu können. *Alatalo et al.* etablierten beispielsweise ein Immunoassay, das TRAP5b im Kulturmedium detektiert. Da mononukleäre Zellen zwar TRAP-positiv sind, jedoch kein TRAP5b sezernieren, eignet sich die Bestimmung der extrazellulären TRAP5b – wie auch von *Rissanen et al.* gezeigt – als guter Marker für die Zahl von Osteoklasten [104, 105]. Da davon ausgegangen wird, dass TRAP5b unabhängig von osteoklastärer Resorptionstätigkeit sezerniert wird, eignet es sich allerdings nur eingeschränkt als Marker für die Aktivität osteoklastärer Zellen [53]. Hierfür scheint die Bestimmung von sezerniertem *C-terminal cross-linked telopeptides of type I collagen* einen noch besser geeigneten Marker darzustellen [105]. Dennoch lässt sich extrazelluläre TRAP5b als sehr gutes Korrelat für die Resorptionstätigkeit einstufen, da es mit einer Erhöhung bei Knochenkrankungen wie Osteoporose einhergeht und zuverlässig auf das Frakturrisiko schließen lässt [53].

5.1.4 Proliferationsverhalten und zelluläre Aktivität

Bei der Beurteilung von Zellzahl und metabolischer Aktivität ist grundsätzlich zu berücksichtigen, dass es sich bei den untersuchten RAW 264.7 Zellen um eine heterogene Zellpopulation handelt, die von Differenzierungs- sowie Proliferationsvorgängen geprägt wird. Die Differenzierung als spezifisches Merkmal der Osteoklastogenese ist dabei gekennzeichnet durch die Fusion mononukleärer Vorläuferzellen zu multinukleären Osteoklasten (s. Abschnitt 2.1.2). Zudem findet aber auch wie in jeder Zellpopulation Proliferation statt, welche mit Zellteilung und Zellvermehrung einhergeht. Daraus folgt, dass eine abnehmende oder stagnierende Zellzahl als Ausdruck einer vermehrten Differenzierung mit Fusion zahlreicher Vorläuferzellen zu Osteoklasten gewertet werden kann; andererseits kann dies aber auch eine verringerte Zellproliferation oder erhöhte Apoptoserate darstellen. Dies ist grundsätzlich auch für die hier durchgeführte Zellzahlbestimmung mittels *Casy1* Zellzähler zu berücksichtigen, da Zellen ab einer Größe von 8 μm erfasst wurden. Somit setzt sich die ermittelte Zellzahl aus verschiedenen Differenzierungsstadien zusammen und kann nicht mit der Osteoklastenzahl gleichgesetzt werden. Zudem ist nicht auszuschließen, dass teilweise abgelöste Beschichtungspartikel bei der maschinellen Messung als Zellen eingestuft wurden. Zur Minimierung dieser möglichen Fehlerquelle erfolgte zusätzlich stichprobenartig die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer. Hierbei war ersichtlich, dass sich insgesamt nur wenige Beschichtungspartikel in der Zellsuspension befanden und die ermittelten Zellzahlen mit denjenigen der maschinellen Messungen gut übereinstimmten. Auch für die parallel dazu gemessene Zellaktivität ist die Trennung zwischen Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen kaum möglich, da WST-Reagenz von Enzymen, die alle viablen Zellen aufweisen, umgesetzt wird (s. Abschnitt 3.5.2). Die zudem ermittelte Einzelzellaktivität liefert dabei zusätzliche Informationen bezüglich des Energiebedarfs einzelner Zellen. Da jedoch eine hohe Aktivität pro Zelle sowohl bei differenzierten, aktiven Osteoklasten als auch bei Apoptosevorgängen zu beobachten ist [106], ist zur Beurteilung des zellulären Verhaltens häufig die Berücksichtigung der zuvor erläuterten Ergebnisse anhand mikroskopischer Methoden erforderlich (s. Abschnitt 5.1.1).

Der auf Titan zu beobachtende meist sehr starke initiale Rückgang der Zellzahl (vgl. Abb. 4.1 und 4.2), könnte Ausdruck einer ausgeprägten Fusion zu multinukleären Osteoklasten sein. Diese Annahme wird unterstützt durch die dabei beobachtete Zunahme der Einzelzellaktivität (vgl. Abb. 4.3), da Osteoklasten bedingt

durch das Vorhandensein zahlreicher Mitochondrien typischerweise eine hohe Aktivität pro Zelle aufweisen. Auch die Fluoreszenzfärbung lässt auf eine ausgeprägte Osteoklastogenese in den ersten Tagen schließen, wie anhand von Abbildung 4.9 ersichtlich ist. Davon abweichend zeigte sich hingegen die CTR-Expression, die eine besonders starke Fusion und Osteoklastendifferenzierung gegen Ende des Beobachtungszeitraumes nahe legt. Dazu ist anzumerken, dass es sich für Färbungen, PCR und Zellzahlbestimmung jeweils um verschiedene Versuchsansätze handelte, sodass sich die Zellen bei Aussaat möglicherweise in unterschiedlichen Entwicklungsphasen befanden. Dies könnte folglich dazu führen, dass je nach Zellteilungsstadium Differenzierungsvorgänge unterschiedlich schnell einsetzten. Der Zeitpunkt der maximalen Osteoklastogenese ist somit nicht eindeutig festzulegen. Die im weiteren Verlauf beobachtete Zunahme der Zellzahl lässt sich vermutlich sowohl auf die Proliferation mononukleärer Zellen als auch insbesondere auf die steigende Zahl reifer Osteoklasten zurückführen (vgl. Abb. 4.9).

Zellen auf Struvit schienen bereits innerhalb der ersten drei Tage relativ stark zu fusionieren, wie die in allen Messreihen niedrigere mittlere Zellzahl an Tag 3 bezogen auf Titan nahelegt (vgl. Abb. 4.1 und 4.2). Hierfür spricht auch die im Mittel höhere Einzelzellaktivität auf Struvit verglichen mit Titan am ersten Messtag sowie der fluoreszenzmikroskopische Nachweis zahlreicher Osteoklasten auf Struvitoberflächen (vgl. Abb. 4.3 und 4.9). Im weiteren zeitlichen Verlauf kam es wie aus Abbildung 4.1 (a) und (b) ersichtlich, bis Tag 6 zu einer starken Zunahme der Zellzahl, die vermutlich vor allem auf vermehrte Zellproliferation zurückzuführen ist. Der anschließende Verlauf mit Abweichungen zwischen den beiden Messreihen kann als unterschiedlich ausgeprägtes Differenzierungs- und Proliferationsverhalten gewertet werden. Ein dabei zwischenzeitlich auftretender Rückgang der Zellzahl könnte zwar durch vermehrte Apoptose hervorgerufen werden, im Hinblick auf die Beobachtungen anhand der Färbungen ist jedoch eher von einer überwiegenden Zellfusion als Ursache rückläufiger Zellzahlen auszugehen. Ein hiervon abweichender zeitlicher Verlauf ist in Abbildung 4.2 (a) und (b) zu erkennen, wo es analog zu Titan von Tag 3 bis Tag 6 zu einem deutlichen Rückgang der Zellzahl kam. Hier scheint somit initial die Differenzierung zu Osteoklasten und nicht die Zellproliferation im Vordergrund zu stehen, was durch die zugehörige Phalloidin-färbung belegt wird. Die Beobachtung, dass meist niedrigere Zellzahlen als auf Titan vorlagen, ist unter Berücksichtigung der Färbungen auf die größere Zahl mehrkerniger Osteoklasten zurückzuführen. Der Grund für die beiden unterschiedlichen Verhaltensweisen von Zellen auf Struvit liegt

vermutlich darin begründet, dass zwei verschiedene Beschichtungsmodalitäten zum Einsatz kamen. Im ersten Fall erfolgte die Abscheidung bei ungepulstem Stromfluss von 50 mA, im zweiten Fall bei gepulstem Strom der Stärke 40 mA. Die weiteren Beschichtungsparameter waren identisch, ebenso die Zusammensetzung des Elektrolyten. Aus diesem Grund erscheint es zwar verwunderlich, dass solch geringfügige Änderungen für die beobachteten Unterschiede im Verhalten der Zellen verantwortlich sind. Dennoch könnte es dadurch zu minimalen strukturellen Unterschieden gekommen sein, die bereits Einfluss auf das Differenzierungs- und Proliferationsverhalten nehmen. Ein weiterer in Betracht zu ziehender Aspekt ist die Tatsache, dass im ersten Fall neue, im zweiten Fall zuvor gebrauchte Titanplättchen zum Einsatz kamen. Dadurch, dass die Plättchen aber in beiden Fällen gründlich nach oben aufgeführtem Schema behandelt wurden (s. Abschnitt 3.3.1) und auf Titan ein gut reproduzierbares Verhalten der Zellzahlen vorliegt (vgl. Abb. 4.1 und 4.2), kann dieser Faktor aller Wahrscheinlichkeit nach vernachlässigt werden. Eine mögliche Abweichung aufgrund von unterschiedlichen Versuchsansätzen – wie auf Seite 81 beschrieben – ist wegen der guten Übereinstimmung des Zellverhaltens auf Titan ebenfalls weitgehend auszuschließen.

Mit einer geringen Menge Strontium von 6 μg pro Probe zeigte sich am ersten Messtag eine mit reinem Struvit vergleichbare Zellzahl (vgl. Abb. 4.1). Zu diesem Zeitpunkt waren auf Sr6 im Gegensatz zu Struvit mikroskopisch jedoch noch keine vollständig differenzierten Osteoklasten nachweisbar (vgl. Abb. 4.9). Somit ist die gegenüber Titan leicht reduzierte Zellzahl nicht auf vermehrte Zellfusion, sondern vermutlich auf eine geringere Proliferationstätigkeit zurückzuführen. Da Zellzahl und -aktivität auch im weiteren Verlauf nur geringfügige Unterschiede zu reinem Struvit aufwiesen, ist anzunehmen, dass 6 μg Strontium pro Probe eine zu geringe Menge darstellt, um langfristig Einfluss auf RAW 264.7 Zellen zu nehmen. Dies lässt sich auch anhand der Färbungen nachvollziehen, da ab Tag 11 keine Hinweise mehr auf differenzierungshemmende Strontiumeffekte vorlagen. Allerdings wurde mittels Fluoreszenzfärbungen an Tag 7 noch keine erfolgreiche Osteoklastogenese beobachtet (vgl. Abb. 4.9), sodass die Dauer des hemmenden Strontiumeinflusses nicht genau ermittelt werden kann. Die an Tag 3 auf Sr45 und Sr186 beobachteten hohen Zellzahlen bei gleichzeitig niedriger Einzelzellaktivität lassen auf das Vorhandensein zahlreicher proliferierender mononukleärer Zellen schließen. Der darauf folgende meist sehr stark ausgeprägte Rückgang der Zellzahlen bis Tag 6 bei vergleichsweise

hoher Einzelzellaktivität (vgl. Abb. 4.1 und 4.3) kann als zunehmende Differenzierung zu Ostoklasten gewertet werden. Diese zeigte sich mittels Phalloidinfärbung ebenfalls zu diesem Zeitpunkt (vgl. Abb. 4.9) und fand somit gegenüber Titan und Struvit verspätet statt. Bereits anhand der in Abbildung 4.8 dargestellten TRAP-Übersichtsaufnahmen war mit steigender Strontiummenge bis 186 μg pro Probe eine optisch erkennbare Abnahme der Zelldichte sichtbar geworden. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in den gemessenen Zellzahlen wieder, da ab Tag 6 auf Sr6 verglichen mit Sr45 und Sr186 im Mittel die höchsten Zellzahlen und Aktivitätswerte vorlagen. Das niedrigste mittlere Zellwachstum war fast durchgehend auf Sr186 zu verzeichnen. Somit ist bei 45 μg beziehungsweise 186 μg Strontium pro Probe von einer konzentrationsabhängigen Hemmwirkung auf das Wachstum von RAW 264.7 Zellen auszugehen, die einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen umfasst. REM-Aufnahmen legen dabei nahe, dass die niedrigen Zellzahlen im späteren zeitlichen Verlauf vor allem auf eine gesteigerte Apoptose zurückzuführen sind. Eine weitere mögliche Ursache stellt eine strontiumabhängige Verminderung der Zellproliferation mit sinkenden Zahlen mononukleärer Zellen dar. Hinweis hierfür geben die Fluoreszenzfärbungen, wo sich insbesondere an Tag 14 mit zunehmender Strontiumdotierung weniger mononukleäre Zellen darstellten (vgl. Abb. 4.9). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass keine quantitative Auswertung der Färbungen stattfand und diese somit nur als orientierender Anhaltspunkt für die Bewertung herangezogen werden können. Darüber hinaus kann auch eine verminderte Osteoklastogenese, die aufgrund von reduzierter CTR2-Expression angenommen wurde, zum Rückgang von Zellzahl und Zellaktivität beitragen.

Auf den mit 212 μg , 290 μg beziehungsweise 371 μg Strontium dotierten Struvitschichten, dargestellt in Abbildung 4.2, lagen am ersten Messtag in beiden Messreihen mit Struvit vergleichbare respektive leicht erhöhte Zellzahlen vor, was für ähnliches Verhalten der Zellen auf diesen Schichten spricht. Dagegen zeigten sich auf Sr487 reproduzierbar deutlich höhere Zellzahlen. Dies lässt vermuten, dass auf dieser Oberfläche zu Beginn der Messungen noch deutlich mehr undifferenzierte mononukleäre Vorläuferzellen vorlagen als auf den übrigen Probenoberflächen. Unterstützt wird diese Annahme durch die vergleichsweise geringe Einzelzellaktivität an diesem Tag sowie die durchgeführten Färbungen, bei denen sich am ersten Tag noch verhältnismäßig wenige Osteoklasten nachweisen ließen. Der bis Tag 6 auf allen vier Proben deutliche Rückgang der Zellzahl entspricht vermutlich analog zu den Kontrolloberflä-

chen einer zunehmenden Osteoklastogenese mit Fusion zahlreicher Vorläuferzellen, was insbesondere auch die Darstellung fluoreszenzmarkierten Aktins nahelegt (vgl. Abb. 4.10). Auch die gegenüber Tag 3 erhöhten Einzelzellaktivitäten sprechen für das vermehrte Vorhandensein stoffwechselaktiver Osteoklasten. Unter Berücksichtigung der CTR2-Expression ist jedoch insgesamt von einer verminderten Osteoklastogenese im Vergleich zu Struvit auszugehen. Der bis zum letzten Messtag beobachtete Wiederanstieg von Zellzahl und Zellaktivität zeigte sich in beiden Messreihen mit zunehmender Strontiumdotierung in ausgeprägterem Maße. Da die korrespondierende Aktivität pro Zelle jedoch mit steigender Strontiummenge abnahm, ist eine vermehrte Proliferation mononukleärer Zellen bei abnehmender Zahl differenzierter Osteoklasten anzunehmen. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen der REM-Aufnahmen, wo sich im Verlauf der Messtage auf Sr290 sowie Sr487 zunehmend apoptotische Osteoklasten nachweisen ließen (vgl. Abb. 4.12). Auch die CTR2-Expression, die bis zum Ende des Versuchszeitraumes gegenüber derjenigen auf den Kontrolloberflächen deutlich vermindert war, legt eine Einschränkung der Osteoklastogenese für diese Strontiumdotierungen nahe. Die ebenso vorhandenen mononukleären Vorläuferzellen erschienen in REM-Aufnahmen morphologisch unverändert. Dies legt den Schluss nahe, dass diese Zellen im Rahmen der untersuchten Dotierkonzentrationen von Strontium weitgehend unbeeinflusst blieben.

5.1.5 Einfluss der verschiedenen Strontiumdotierungen auf osteoklastäre Zellen

Untersuchungen zur lokalen Wirkung von Strontium zeigten in vielen Studien übereinstimmend eine Hemmung der Osteoklastogenese und Knochenresorption, obwohl dabei unterschiedliche Verfahren und Oberflächen zur Kultivierung von Osteoklasten zum Einsatz kamen [17, 72, 107]. Auch in der Zusammenschau sämtlicher Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit lässt sich auf strontiumhaltigen Struvitoberflächen eine Hemmung der Osteoklastendifferenzierung im Vergleich zu reinem Struvit feststellen. Dabei waren zum Teil deutliche Unterschiede im zellulären Verhalten auf den verschiedenen Dotierkonzentrationen zu beobachten.

Trotz des geringen Massengehalts von etwa 0,094 %, zeigte die Probe Sr6 eine initiale Verzögerung der Osteoklastendifferenzierung (s. Abschnitt 5.1.1). Diese könnte unter anderem auf strontiumbedingte strukturelle Veränderungen der Beschichtung zurückzuführen sein. Darüber hinaus ist die Wirkung von Strontium prinzipiell auf

zwei weiteren Wegen möglich. Zum einen kann in der Beschichtung eingelagertes Strontium bei Aufnahme durch resorbierende Osteoklasten deren Resorptionstätigkeit und Lebensdauer beeinflussen. Zum anderen werden Strontiumionen ins Kulturmedium freigesetzt, die Aktivität, sowie Proliferations- und Differenzierungsvorgänge beeinflussen können. Aus Freisetzungsstudien mit *simulated body fluid* und *fetal calf serum* ist bekannt, dass innerhalb von 28 Tagen circa 40 % des eingelagerten Strontiums ins Medium übergehen [18]. Da dies für alle untersuchten Schichten weitgehend identisch war, kann vermutlich auch für Sr6 von vergleichbarer prozentualer Freisetzung ausgegangen werden. Da die Kultivierung von RAW 264.7 Zellen allerdings nur über einen Zeitraum von zwei Wochen erfolgte, ist eine etwas geringere Strontiumfreisetzung anzunehmen. Zudem ist zu beachten, dass für die Zellkultur in vorliegender Arbeit *Dulbeccos Modified Eagles Medium* (DMEM) zum Einsatz kam, was wahrscheinlich ebenfalls zu einer abweichenden Freisetzung beiträgt. Obwohl gemäß *Meininger et al.* davon auszugehen ist, dass über den gesamten Versuchszeitraum Strontium freigesetzt wurde [18], ließ sich kein Anhalt für eine Beeinflussung der Osteoklastogenese im weiteren zeitlichen Verlauf finden. Eine mögliche Erklärung könnte eine gute Adaptation der Zellen an Bedingungen mit geringen Strontiummengen sein. Belege hierfür lassen sich jedoch schwerlich heranziehen, da in vergleichbaren Publikationen höhere Strontiumkonzentrationen untersucht wurden. Zellen auf den Proben Sr45 (Strontiumgehalt 0,79 %) beziehungsweise Sr186 (Strontiumgehalt 4,6 %) zeigten ebenfalls einen verspäteten Beginn der Osteoklastendifferenzierung, was erneut auf die zuvor erläuterten Einflüsse zurückzuführen ist. Darüber hinaus spricht eine bis zum Ende des Versuchszeitraums deutlich verminderte CTR2-Expression sowie strontiumabhängige Abnahme der Zellzahl für eine anhaltende, konzentrationsabhängige Wirkung von Strontium. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von *Capuccini et al.*, die eine Korrelation zwischen steigendem Strontiumgehalt der Beschichtungen (0,5 %, 3 % und 7 %) und einer Abnahme von Proliferation und Differenzierung beobachteten [17]. Als Grund hierfür kann angenommen werden, dass die ins Kulturmedium freigesetzten Strontiummengen bereits hoch genug waren, um messbaren Einfluss auf die Osteoklastogenese und Zellproliferation zu nehmen und eine Adaptation der Zellen nicht mehr möglich war. Die beobachtete Zunahme apoptotischer Osteoklasten mittels REM beruht vermutlich auf der aktiven Strontiumaufnahme im Rahmen der osteoklastären Resorptionstätigkeit, da Vorläuferzellen mikroskopisch keine Zeichen gesteigerter Apoptose aufwiesen. Für die Proben Sr212 sowie Sr290 zeigte sich bei der Berechnung des Strontium-

Massengehalts in der Beschichtung, dass dieser im Mittel 4,7 % beziehungsweise 5,6 % betrug und somit nur relativ geringfügige Unterschiede zur Probe Sr186 vorlagen. Sr371 und Sr487 wiesen dagegen einen deutlich höheren mittleren Strontiumgehalt mit 13 % beziehungsweise 12 % auf. Dabei zeigte sich mit steigender Dotierkonzentration eine vermehrte Freisetzung von Strontium [18], sodass mehr Strontium im Kulturmedium vorliegt, das Einfluss auf die Osteoklastogenese nehmen kann. Zudem ist auch eine höhere absolute Menge an Strontium in den Beschichtungen vorhanden, sodass resorbierende Osteoklasten größere Strontiummengen aufnehmen können. Dies steht in Einklang mit den für diese Strontiumdotierungen vorliegenden Ergebnissen, wobei sich eine Zunahme der Apoptoserate sowie eine Hemmung der Osteoklastogenese über den gesamten Versuchszeitraum beobachten ließ. Bisherige Veröffentlichungen deuten darauf hin, dass die osteoklastäre Adhäsion durch Strontiumzusatz unbeeinflusst bleibt [108, 109]. Davon abweichend ist in dieser Arbeit – anhand der mittels REM nachweisbaren Zellmorphologie (vgl. Abb. 4.12) – bei höherer Strontiumdotierung von einer gestörten Zelladhäsion auszugehen. Eine Kultivierung von RAW 264.7 Zellen über mindestens drei Wochen hätte möglicherweise noch ausgeprägtere Befunde ergeben, da *Meininger et al.* zwischen Tag 14 und Tag 28 von einer deutlichen Steigerung der Strontiumfreisetzung berichten [18]. Das Vorhandensein differenzierter Osteoklasten bereits ab Tag 4 auf Oberflächen mit hoher Strontiumdotierung ist vermutlich auf eine veränderte Oberflächenstruktur zurückzuführen. So wurde gezeigt, dass Oberflächen mit höherem Strontiumzusatz nach Einlagerung in DMEM sehr glatt waren und kaum mehr Apatitkristalle aufwiesen [18]. Dies kann die Zellmigration erleichtern und damit initial die Fusion zu mehrkernigen osteoklastären Zellen begünstigen.

Insgesamt ist somit anhand der in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchungen ein konzentrationsabhängiger, hemmender Einfluss von Strontium auf die Osteoklastogenese festzustellen. Dies steht in Einklang mit bisherigen Veröffentlichungen, die ebenfalls von dosisabhängigen Effekten berichten [17, 20, 108]. Daraus lässt sich eine Hemmung der osteoklastären Resorptionstätigkeit ableiten, was bereits mehrfach gezeigt werden konnte [107, 109]. Für eine abschließende Beurteilung wären noch weiterführende Untersuchungen hilfreich, darunter beispielsweise die Bestimmung der Anzahl osteoklastärer Resorptionslakunen sowie der extrazellulären TRAP-Aktivität [53, 109].

5.2 Wirkung von Strontium auf MG-63 Zellen

Neben dem hemmenden Einfluss von Strontium auf osteoklastäre Zellen ist zudem eine stimulierende Wirkung auf Osteoblastogenese sowie Knochenneubildung bekannt [16, 19]. Diese osteoanabole Strontiumwirkung wurde inzwischen jedoch teilweise angezweifelt. *Wornham et al.* beispielsweise berichten stattdessen von einer Osteoblastenhemmung in Abhängigkeit der Strontiumkonzentration [20]. Vor dem Hintergrund dieser Diskussion leistet in vorliegender Arbeit die Bestimmung von Zellzahl und metabolischer Aktivität osteoblastärer MG-63 Zellen einen Beitrag zur Einschätzung des Proliferationsverhaltens auf den hier untersuchten strontiumdotierten Struvitoberflächen.

Auf Titan und Struvit ist eine hohe Proliferationsfähigkeit der osteoblastären Zellen anzunehmen, da bis zum Ende des Versuchszeitraums eine starke Zunahme von Zellzahl und Zellaktivität vorlag, wie in Abbildung 4.16 und 4.17 ersichtlich ist. Diese war bis Tag 7 deutlich stärker ausgeprägt als im weiteren Verlauf, woraus sich ableiten lässt, dass beide Oberflächen gute Bedingungen für eine rasch einsetzende Zellteilungsaktivität nach Aussaat aufwiesen. Eine gegenüber den restlichen Tagen besonders hohe Einzelzellaktivität an Tag 3 kann als Indiz für eine verstärkte Proliferation bereits in den ersten Tagen angesehen werden. Die im Verlauf abnehmende Einzelzellaktivität kann durch die flächige Bedeckung der gesamten Probenoberfläche begründet werden, die eine weitere Zellteilung in diesem Maße nicht mehr zuließ. Möglicherweise spiegelt der Rückgang der Einzelzellaktivität bei zugleich steigenden Zellzahlen jedoch auch Anpassungsvorgänge an die Oberfläche wider. Auf Struvit lagen an allen Messtagen verglichen mit Titan niedrigere Zellzahlen vor. Da aber die Zunahme im zeitlichen Verlauf noch stärker ausgeprägt war als auf Titan, kann nicht auf eine allgemeine Beeinträchtigung der Zellproliferation auf Struvitoberflächen geschlossen werden. Vielmehr ist anzunehmen, dass auf Struvit nach Aussaat zwar weniger Zellen unmittelbar adhärirten, die kristalline Oberflächenstruktur im weiteren Verlauf jedoch günstige Bedingungen für eine starke Zellproliferation bot. Eine weitere mögliche Erklärung ist in einer festeren Zelladhäsion auf kristallinen Strukturen zu sehen, sodass die Ablösung zur Bestimmung der Zellzahl erschwert war und systematisch niedrigere Zellzahlen detektiert wurden. Anhalt hierfür gibt auch die zugehörige Zellaktivität, die auf Struvit in deutlich geringerem Ausmaß herabgesetzt war als die entsprechende Zellzahl auf Titan. In einem zweiten Versuchsansatz zeigte sich bezüglich Zellzahl und Zellaktivität eine reproduzierbare Tendenz im zeitlichen Verlauf, die absolute Zellzahl war gegenüber der ersten Messreihe jedoch deutlich

erhöht bei gleichzeitig niedrigerer Zellaktivität. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich die Zellen in den verschiedenen Messreihen bei Aussaat in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befinden können (s. auch Seite 81). Die sich daraus ergebenden zeitlichen Unterschiede bezüglich einsetzender Proliferation und Zellaktivität können die beobachteten Differenzen zwischen den beiden Messreihen erklären.

Unter dem Einfluss von Strontium wurde in mehreren Studien *in vivo* eine Stimulation der osteoblastären Knochenneubildung beobachtet [110, 111]. Untersuchungen *in vitro* deuten darauf hin, dass verschiedene strontiumhaltige Oberflächen über eine vermehrte Expression osteoblastärer Marker die Knochenbildung fördern sowie zu früher Osteointegration beitragen [72, 107, 112]. Dabei berichten einige Gruppen von dosisabhängiger Wirkung auf Osteoblasten [17, 112, 113], wohingegen andere Ergebnisse nicht für eine direkte Korrelation mit der eingesetzten Strontiummenge sprechen [73]. Diese weithin angenommene osteoanabole Strontiumwirkung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Insbesondere ab Tag 7 zeigte sich eine gegenüber Struvit zum Teil deutlich reduzierte Zellzahl sowie Zellaktivität (vgl. Abb. 4.16 und 4.17), sodass diese Beobachtungen neben antiresorptiven Eigenschaften von Strontium zudem für eine Hemmung osteoblastärer Zellen durch Strontiumzugabe sprechen. Unterstützt wird diese These durch *Wornham et al.*, die durch Zusatz von Strontium eine Abnahme der Mineralisation sowie eine erhöhte Osteoblastenmortalität nachwiesen. Die ebenfalls untersuchte Osteoblastenzahl sowie -aktivität blieb jedoch – anders als in den hier durchgeführten Versuchen – durch Strontium unbeeinflusst [20]. Dennoch erscheint entgegen den Beobachtungen von *Wornham et al.* eine globale Beeinträchtigung der osteoblastären Zellfunktionen für alle Strontiumkonzentrationen unwahrscheinlich. Der Grund für diese Annahme ist eine mit den Kontrolloberflächen vergleichbare Einzelzellaktivität sowie eine zeit- und konzentrationsabhängige Proliferationshemmung auf den verschiedenen strontiumdotierten Oberflächen. Dabei waren an den ersten beiden Messtagen häufig mit Struvit vergleichbare Zellzahlen und Aktivitätswerte nachweisbar, sodass das Vorhandensein von Strontium in den vier untersuchten Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von MG-63 Zellen zu nehmen schien. Erst ab Tag 7 waren deutliche Unterschiede in der Zellproliferation auf reinem und strontiumdotiertem Struvit zu beobachten. Hierbei kam es insgesamt auf Sr45 und Sr290 am deutlichsten ausgeprägt zu einer Hemmung der osteoblastären Proliferation. Zellen auf Sr487 wiesen dagegen über den gesamten Versuchszeitraum weitgehend mit

Struvit vergleichbares Verhalten hinsichtlich Zellzahl und WST-Aktivität auf. In guter Übereinstimmung damit zeigten Untersuchungen von *Yang et al.* ebenfalls eine variable Wirkung in Abhängigkeit der Strontiummenge. Während für niedrigere Strontiumkonzentrationen gleichermaßen erst ab Tag 7 ein hemmender Einfluss auf die Proliferation vorlag, kam es bei hohen Konzentrationen zu stimulierenden Effekten [109]. Bei hoher Dotierung mit 487 μg Strontium wurde zwar in vorliegender Arbeit keine gegenüber reinem Struvit gesteigerte Proliferation beobachtet; dennoch war im Vergleich zu niedrigeren Konzentrationen keine signifikante Hemmwirkung mehr zu verzeichnen. Eine weitere Erhöhung der Strontiummenge hätte somit möglicherweise ebenso eine verstärkte Osteoblastenproliferation zur Folge.

Bedingt durch die verschiedenen in bisherigen Veröffentlichungen untersuchten Materialsysteme ist der direkte Vergleich der Ergebnisse zur Wirkung von Strontium auf osteoblastäre Zellen erschwert. So wurden neben unterschiedlichen Strontiumkonzentrationen auch diverse, nur teilweise mineralische Oberflächen untersucht. Da von einer materialspezifischen Strontium-Freisetzung auszugehen ist, kann dies das variable zelluläre Verhalten der bereits publizierten Ergebnisse erklären. Dennoch zeigte sich materialübergreifend eine gute Übereinstimmung zwischen den hier vorliegenden Resultaten und den Beobachtungen von *Yang et al.*, die dünne Calciumphosphatschichten mit Strontium dotierten [109]. Damit sind die vorliegenden Ergebnisse zur Wirkung von Strontium auf osteoblastäre Zellen als richtungsweisende Experimente zu betrachten, die jedoch nicht den Anspruch erheben eine detaillierte Einschätzung des osteoblastären Verhaltens vorzunehmen. Hierzu sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um eine genauere Charakterisierung von Osteoblasten auf strontiumdotierten Struvitschichten zu ermöglichen.

Kapitel 6

Zusammenfassung und Ausblick

Magnesiumphosphate stehen als Knochenersatzmaterialien zunehmend im Fokus aktueller Forschung, da sie sich durch besonders günstige Materialeigenschaften wie hohe Druckfestigkeit und gute Löslichkeit auszeichnen [8, 60]. Die Funktionalisierung mit inkorporierten Ionen ermöglicht eine Modifikation der Interaktion zwischen Implantat und umgebender Knochensubstanz. Dabei verspricht die Verwendung von Strontium eine Verbesserung der Osteointegration insbesondere bei der Behandlung osteoporotischer Patienten [14, 17]. Vor diesem Hintergrund wurden in vorliegender Arbeit die Auswirkungen einer Strontiumdotierung des Magnesiumphosphats Struvit auf das Wachstums- und Differenzierungsverhalten von Osteoklasten und Osteoblasten *in vitro* untersucht.

Mittels elektrochemischer Abscheidung erfolgte die Beschichtung von Titanproben mit strontiumdotiertem Struvit, wobei sieben verschiedene Dotierkonzentrationen zwischen 6 μg und 487 μg Strontium pro Probe hergestellt wurden (Sr6, Sr45, Sr186, Sr212, Sr290 und Sr487). Darauf wurden monozytäre RAW 264.7 Zellen kultiviert, die zur Osteoklastendifferenzierung angeregt wurden; die verwendeten osteoblastären Zellen entstammen der Zelllinie MG-63. Für die Untersuchung der Osteoklastendifferenzierung nach morphologischen Kriterien kamen die mikroskopischen Methoden der Färbung Tartrat-resistenter saurer Phosphatase (TRAP), der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung polymerisierten Aktins sowie der Rasterelektronenmikroskopie zum Einsatz. Auf genetischer Ebene erfolgte der Nachweis der osteoklastenspezifischen Gene Kathepsin K und Calcitoninrezeptor 2 mittels PCR. Lediglich die Ergebnisse aus der Bestimmung intrazellulärer TRAP-Aktivität lassen sich erschwert einordnen, da mit dieser Methode keine Abgrenzung zwischen reifen Osteo-

klasten und deren Vorstufen möglich war. Anhand der übrigen Methoden zeigte sich für die drei geringsten Strontiumdotierungen (Sr6, Sr45 und Sr186) eine Verzögerung der Osteoklastendifferenzierung um mindestens vier Tage. Auf Sr45 und Sr186 war darüber hinaus über den gesamten Versuchszeitraum auf transkriptioneller Ebene eine Störung der Osteoklastogenese zu beobachten. Zudem kam es in Abhängigkeit von steigenden Strontiumdotierungen insbesondere auf Sr186 zu einer Zunahme der Apoptoserate reifer Osteoklasten. Eine weitere Erhöhung des Strontiumzusatzes auf über 200 μg pro Probe führte dagegen nicht zu einer mikroskopisch nachweisbaren Verzögerung der initialen Osteoklastogenese. Dennoch war auf genetischer Ebene eine deutliche Hemmung der Markergene für Osteoklasten-Differenzierung über die Dauer des Versuchszeitraums zu beobachten, was eine antiresorptive Strontiumwirkung in diesen Konzentrationen nahe legt. Zudem bewirkte eine steigende Strontiumkonzentration eine vermehrte Apoptose sowie eine Störung der Zelladhäsion auf der Probenoberfläche. Die Beurteilung des Proliferationsverhaltens erfolgte anhand von Zellzahl und Zellaktivität, wobei sich durch den Zusatz von Strontium eine verminderte Zellproliferation gegenüber den Kontrolloberflächen darstellte. Es bestand jedoch quantitativ keine direkte Korrelation mit der vorhandenen Strontiummenge. Der Einfluss von Strontium auf Osteoblasten wurde orientierend anhand von Zellzahl und Zellaktivität untersucht, wobei tendenziell eine Hemmung der zellulären Proliferation beobachtet wurde. Dagegen führte eine hohe Dotierung mit 487 μg Strontium pro Probe zu keiner signifikanten Reduktion der Zellproliferation im Vergleich zu undotiertem Struvit.

Anhand der in dieser Arbeit diskutierten Ergebnisse konnte zellbiologisch gezeigt werden, dass das Magnesiumphosphat Struvit bei Funktionalisierung mit Strontium eine erfolgreiche Kultivierung sowohl osteoklastärer als auch osteoblastärer Zellen erlaubt. Aufgrund des hemmenden Einflusses von Strontium auf Differenzierung und Proliferation osteoklastärer Zellen ergeben sich vielversprechende klinische Anwendungsmöglichkeiten für Titanimplantate mit strontiumdotierter Struvitbeschichtung bei der Behandlung osteoporotischer Patienten. Dabei sind Dotierungen ab 186 μg Strontium pro Probe – entsprechend einem Massengehalt von etwa 5% – anzustreben, da diese ausgeprägtere inhibierende Effekte hervorriefen als die untersuchten niedrigeren Dotierungen. Die Dotierkonzentration mit den günstigsten Eigenschaften auf sowohl osteoklastäre als auch osteoblastäre Zellen ist unter vorliegenden Versuchsbedingungen 487 μg Strontium pro Probe, was einem mittleren Massenge-

halt von etwa 12% entspricht. Durch die Hemmung der Osteoklastentätigkeit bei gleichzeitigem Erhalt der Osteoblastenfunktion ist gegenüber dem Einsatz reiner Struvitbeschichtungen ein vorteilhafter klinischer Verlauf beim Knochenersatz im Rahmen einer bestehenden Osteoporose zu erwarten.

Zur weiterführenden Erforschung des Strontiumeinflusses auf Knochenzellen können sowohl künftige *in vitro*- als auch *in vivo*-Untersuchungen beitragen. Dabei ist insbesondere die Analyse des osteoklastären Resorptionsverhaltens sowie eine umfassende Untersuchung an osteoblastären Zellen von Interesse. *Yang et al.* beobachteten, dass eine Steigerung des Strontiumzusatzes eine verstärkte Osteoblastenproliferation zur Folge hat [109]. Deshalb wird für künftige Arbeiten vorgeschlagen, den Strontium-Massengehalt auch auf über 15% zu erhöhen. Zudem ist eine Verlängerung der Kulturdauer osteoklastärer Zellen auf drei Wochen zu empfehlen. Hierdurch sind ausgeprägtere Ergebnisse zu erwarten, da *Meininger et al.* in diesem Zeitraum von einer deutlichen Zunahme der freigesetzten Strontiummenge berichten [18].

Damit liefert diese Arbeit wichtige grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich des Verhaltens osteoklastärer und osteoblastärer Zellen auf elektrochemisch abgeschiedenen, strontiumdotierten Struvitschichten und unterstreicht das hohe Potential des untersuchten Materialsystems für die Entwicklung optimierter Knochenersatzmaterialien.

Literatur

- [1] A. Roth und K. Sander. »Makro- und Mikrostrukturierung bei zementfreien Hüft-TEP – Vor- und Nachteile«. In: *Fortbildung Osteologie 2*. Hrsg. von K.M. Peters und D.P. König. Steinkopff Verlag, 2008.
- [2] R. J. Furlong und J. F. Osborn. »Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings.« eng. In: *J Bone Joint Surg Br* 73.5 (1991), S. 741–745.
- [3] T. Hara, K. Hayashi, Y. Nakashima, T. Kanemaru und Y. Iwamoto. »The effect of hydroxyapatite coating on the bonding of bone to titanium implants in the femora of ovariectomised rats.« eng. In: *J Bone Joint Surg Br* 81.4 (1999), S. 705–709.
- [4] A. A. Kurth. »Hydroxylapatitbeschichtete Endoprothesen – experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrungen.« In: *Fortbildung Osteologie 2*. Hrsg. von K.M. Peters und D.P. König. Steinkopff Verlag, 2008.
- [5] C. Moseke, W. Braun und A. Ewald. »Electrochemically Deposited $\text{Ca}(\text{OH})_2$ Coatings as a Bactericidal and Osteointegrative Modification of Ti Implants.« In: *Advanced Engineering Materials* 11.3 (2009), B1–B6. ISSN: 1527-2648.
- [6] M. Shirkhazadeh. »Bioactive calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition«. In: *Journal of Materials Science Letters* 10 (1991), S. 1415–1417.
- [7] F. Wenninger. »Modifikation von Titanoberflächen mittels elektrochemischer Abscheidung von Magnesiumphosphaten«. Diss. Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, 2013.
- [8] C. Moseke, V. Saratsis und U. Gbureck. »Injectability and mechanical properties of magnesium phosphate cements.« eng. In: *J Mater Sci Mater Med* 22.12 (2011), S. 2591–2598.

- [9] G. Mestres, M. Abdolhosseini, W. Bowles, S-H. Huang, C. Aparicio, S-U. Gorr und M-P. Ginebra. »Antimicrobial properties and dentin bonding strength of magnesium phosphate cements.« eng. In: *Acta Biomater* 9.9 (2013), S. 8384–8393.
- [10] J. Gallo, M. Holinka und C. S. Moucha. »Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants.« eng. In: *Int J Mol Sci* 15.8 (2014), S. 13849–13880.
- [11] M. Sun, Y. Hu, R. Lu und D. Li. »[Preparation and osteogenic activity of combining calcium phosphate cement with bone morphogenetic protein composite as a bone graft material].« chi. In: *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 40.12 (2002), S. 932–935.
- [12] E. Tsiridis, A. Bhalla, Z. Ali, N. Gurav, M. Heliotis, S. Deb und L. DiSilvio. »Enhancing the osteoinductive properties of hydroxyapatite by the addition of human mesenchymal stem cells, and recombinant human osteogenic protein-1 (BMP-7) in vitro.« eng. In: *Injury* 37 Suppl 3 (2006), S25–S32.
- [13] A. Ewald, C. Käppel, E. Vorndran, C. Moseke, M. Gelinsky und U. Gbureck. »The effect of Cu(II)-loaded brushite scaffolds on growth and activity of osteoblastic cells.« eng. In: *J Biomed Mater Res A* 100.9 (2012), S. 2392–2400.
- [14] P. J. Meunier, D. O. Slosman, P. D. Delmas, J. L. Sebert, M. L. Brandi, C. Albanese, R. Lorenc, S. Pors-Nielsen, M. C. De Vernejoul, A. Roces und J. Y. Reginster. »Strontium ranelate: dose-dependent effects in established postmenopausal vertebral osteoporosis—a 2-year randomized placebo controlled trial.« eng. In: *J Clin Endocrinol Metab* 87.5 (2002), S. 2060–2066.
- [15] S. Pors Nielsen. »The biological role of strontium.« eng. In: *Bone* 35.3 (2004), S. 583–588.
- [16] Z. Saidak und P. J. Marie. »Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis.« eng. In: *Pharmacol Ther* 136.2 (2012), S. 216–226.
- [17] C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I. N. Mihailescu und A. Bigi. »Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response.« eng. In: *Acta Biomater* 4.6 (2008), S. 1885–1893.

- [18] M. Meininger, C. Wolf-Brandstetter, J. Zerweck, F. Wenninger, U. Gbureck, J. Groll und C. Moseke. »Electrochemically assisted deposition of strontium modified magnesium phosphate on titanium surfaces«. In: *Materials Science & Engineering C* (2016).
- [19] S. Peng, X. S. Liu, S. Huang, Z. Li, H. Pan, W. Zhen, K. D. K. Luk, X. E. Guo und W. W. Lu. »The cross-talk between osteoclasts and osteoblasts in response to strontium treatment: involvement of osteoprotegerin.« eng. In: *Bone* 49.6 (2011), S. 1290–1298.
- [20] D. P. Wornham, M. O. Hajjawi, I. R. Orriss und T. R. Arnett. »Strontium potently inhibits mineralisation in bone-forming primary rat osteoblast cultures and reduces numbers of osteoclasts in mouse marrow cultures.« eng. In: *Osteoporos Int* 25.10 (2014), S. 2477–2484.
- [21] G. A. Rodan. »Introduction to bone biology.« In: *Bone* 13.1 (1992), S3–S6.
- [22] P. Proff und P. Römer. »The molecular mechanism behind bone remodelling: a review.« eng. In: *Clin Oral Investig* 13.4 (2009), S. 355–362.
- [23] S. Das und J. C. Crockett. »Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment.« eng. In: *Drug Des Devel Ther* 7 (2013), S. 435–448.
- [24] D. K. Lam, G. K. B. Sándor, H. I. Holmes, R. P. Carmichael und C. M. L. Clokie. »Marble bone disease: a review of osteopetrosis and its oral health implications for dentists.« eng. In: *J Can Dent Assoc* 73.9 (2007), S. 839–843.
- [25] M. Fakhry, E. Hamade, B. Badran, R. Buchet und D. Magne. »Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts.« eng. In: *World J Stem Cells* 5.4 (2013), S. 136–148.
- [26] T. Komori, H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R. T. Bronson, Y. H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki und T. Kishimoto. »Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.« eng. In: *Cell* 89.5 (1997), S. 755–764.
- [27] F. Otto, A. P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K. C. Gilmour, I. R. Rosewell, G. W. Stamp, R. S. Beddington, S. Mundlos, B. R. Olsen, P. B. Selby und M. J. Owen. »*Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syn-

- drome, is essential for osteoblast differentiation and bone development.« eng. In: *Cell* 89.5 (1997), S. 765–771.
- [28] K. Nakashima, X. Zhou, G. Kunkel, Z. Zhang, J. M. Deng, R. R. Behringer und B. de Crombrughe. »The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.« eng. In: *Cell* 108.1 (2002), S. 17–29.
- [29] G. Chen, C. Deng und Y.-P. Li. »TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation.« eng. In: *Int J Biol Sci* 8.2 (2012), S. 272–288.
- [30] G. L. Lin und K. D. Hankenson. »Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation.« eng. In: *J Cell Biochem* 112.12 (2011), S. 3491–3501.
- [31] P. Ducy, T. Schinke und G. Karsenty. »The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance.« eng. In: *Science* 289.5484 (2000), S. 1501–1504.
- [32] P. Ducy, M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, A. F. Schilling, F. T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J. M. Rueger und G. Karsenty. »Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass.« eng. In: *Cell* 100.2 (2000), S. 197–207.
- [33] Q. Zhang, R. C. Riddle und T. L. Clemens. »Bone and the regulation of global energy balance.« eng. In: *J Intern Med* 277.6 (2015), S. 681–689.
- [34] T. A. Franz-Odenaal, B. K. Hall und P. E. Witten. »Buried alive: how osteoblasts become osteocytes.« eng. In: *Dev Dyn* 235.1 (2006), S. 176–190.
- [35] B. F. Boyce, E. Rosenberg, A. E. de Papp und L. T. Duong. »The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease.« eng. In: *Eur J Clin Invest* 42.12 (2012), S. 1332–1341.
- [36] T. Miyamoto. »Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion.« eng. In: *Keio J Med* 60.4 (2011), S. 101–105.
- [37] S. L. Teitelbaum und F. P. Ross. »Genetic regulation of osteoclast development and function.« eng. In: *Nat Rev Genet* 4.8 (2003), S. 638–649.
- [38] G. D. Roodman. »Regulation of osteoclast differentiation.« eng. In: *Ann N Y Acad Sci* 1068 (2006), S. 100–109.

- [39] N. Udagawa, N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T. J. Martin und T. Suda. »Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells.« eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 87.18 (1990), S. 7260–7264.
- [40] S. L. Teitelbaum. »Bone Resorption by Osteoclasts.« In: *Science* 289.5484 (2000), S. 1504–1508.
- [41] T. L. Burgess, Y. Qian, S. Kaufman, B. D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W. J. Boyle, C. R. Dunstan, S. Hu und D. L. Lacey. »The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts.« eng. In: *J Cell Biol* 145.3 (1999), S. 527–538.
- [42] D. L. Lacey, E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y. X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney und W. J. Boyle. »Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation.« eng. In: *Cell* 93.2 (1998), S. 165–176.
- [43] W. S. Simonet, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Lüthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee und W. J. Boyle. »Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.« eng. In: *Cell* 89.2 (1997), S. 309–319.
- [44] W. J. Boyle, W. S. Simonet und D. L. Lacey. »Osteoclast differentiation and activation.« eng. In: *Nature* 423.6937 (2003), S. 337–342.
- [45] T. J. Chambers. »Regulation of the differentiation and function of osteoclasts.« eng. In: *J Pathol* 192.1 (2000), S. 4–13.
- [46] L. C. Hofbauer, F. Gori, B. L. Riggs, D. L. Lacey, C. R. Dunstan, T. C. Spelsberg und S. Khosla. »Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis.« eng. In: *Endocrinology* 140.10 (1999), S. 4382–4389.

- [47] S. K. Lee und J. A. Lorenzo. »Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation.« eng. In: *Endocrinology* 140.8 (1999), S. 3552–3561.
- [48] N. Takahashi, N. Udawawa, M. Takami und T. Suda. »Cells of bone: osteoclast generation.« In: *Principles of Bone Biology*. Hrsg. von J. P. Bilezikian, L.G. Raisz und G.A. Rodan. Bd. 2. Academic Press, San Diego, 2002, S. 126–198.
- [49] H. K. Väänänen und T. Laitala-Leinonen. »Osteoclast lineage and function.« eng. In: *Arch Biochem Biophys* 473.2 (2008), S. 132–138.
- [50] K. Väänänen. »Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics.« eng. In: *Adv Drug Deliv Rev* 57.7 (2005), S. 959–971.
- [51] M. Yagi, T. Miyamoto, Y. Sawatani, K. Iwamoto, N. Hosogane, N. Fujita, K. Morita, K. Ninomiya, T. Suzuki, K. Miyamoto, Y. Oike, M. Takeya, Y. Toyama und T. Suda. »DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells.« eng. In: *J Exp Med* 202.3 (2005), S. 345–351.
- [52] G. Andersson, B. Ek-Rylander, K. Hollberg, J. Ljusberg-Sjölander, P. Lång, M. Norgård, Y. Wang und S.-J. Zhang. »TRACP as an osteopontin phosphatase.« eng. In: *J Bone Miner Res* 18.10 (2003), S. 1912–1915.
- [53] J. M. Halleen, S. L. Tiitinen, H. Ylipahkala, K. M. Fagerlund und H. K. Väänänen. »Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption.« eng. In: *Clin Lab* 52.9-10 (2006), S. 499–509.
- [54] A. R. Hayman. »Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy.« eng. In: *Autoimmunity* 41.3 (2008), S. 218–223.
- [55] R. Miano, S. Germani und G. Vespasiani. »Stones and urinary tract infections.« eng. In: *Urol Int* 79 Suppl 1 (2007), S. 32–36.
- [56] F. Tamimi, D. Le Nihouannen, D. C. Bassett, S. Ibasco, U. Gbureck, J. Knowles, A. Wright, A. Flynn, S. V. Komarova und J. E. Barralet. »Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions.« eng. In: *Acta Biomater* 7.6 (2011), S. 2678–2685.

- [57] J. Cabrejos-Azama, M. H. Alkhraisat, C. Rueda, J. Torres, L. Blanco und E. López-Cabarcos. »Magnesium substitution in brushite cements for enhanced bone tissue regeneration.« eng. In: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 43 (2014), S. 403–410.
- [58] S. Kannan, I.A.F. Lemos, H.J.G. Rocha und J.M.F. Ferreira. »Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ beta-tricalcium phosphate ratios.« In: *Journal of Solid State Chemistry* 178 (2005), S. 3190–3196.
- [59] G. Mestres und M.-P. Ginebra. »Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties.« eng. In: *Acta Biomater* 7.4 (2011), S. 1853–1861.
- [60] B. El-Jazairi. »Rapid repair of concrete pavings«. In: *Concrete* 16.9 (1982).
- [61] C. Grossardt, A. Ewald, L. M. Grover, J. E. Barralet und U. Gbureck. »Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells.« eng. In: *Tissue Eng Part A* 16.12 (2010), S. 3687–3695.
- [62] Y. Yu, J. Wang, C. Liu, B. Zhang, H. Chen, H. Guo, G. Zhong, W. Qu, S. Jiang und H. Huang. »Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement.« eng. In: *Colloids Surf B Biointerfaces* 76.2 (2010), S. 496–504.
- [63] A. Ewald, K. Helmschrott, G. Knebl, N. Mehrban, L. M. Grover und U. Gbureck. »Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein expression in osteoblastic cells.« eng. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 96.2 (2011), S. 326–332.
- [64] S. Ibasco, F. Tamimi, R. Meszaros, D. L. Nihouannen, S. Vengallatore, E. Harvey und J. E. Barralet. »Magnesium-sputtered titanium for the formation of bioactive coatings.« eng. In: *Acta Biomater* 5.6 (2009), S. 2338–2347.
- [65] C.-C. Wang, X.-D. Hao, G.-S. Guo und M.C.M. van Loosdrecht. »Formation of pure struvite at neutral pH by electrochemical deposition.« In: *Chemical engineering Journal* 159.1 (2010), S. 280–283.
- [66] T. Morohashi, T. Sano und S. Yamada. »Effects of strontium on calcium metabolism in rats. I. A distinction between the pharmacological and toxic doses.« eng. In: *Jpn J Pharmacol* 64.3 (1994), S. 155–162.

- [67] P. J. Meunier, C. Roux, E. Seeman, S. Ortolani, J. E. Badurski, T. D. Spector, J. Cannata, A. Balogh, E.-M. Lemmel, S. Pors-Nielsen, R. Rizzoli, H. K. Genant und J.-Y. Reginster. »The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis.« eng. In: *N Engl J Med* 350.5 (2004), S. 459–468.
- [68] J. Y. Reginster, E. Seeman, M. C. De Vernejoul, S. Adami, J. Compston, C. Phenekos, J. P. Devogelaer, M. D. Curiel, A. Sawicki, S. Goemaere, O. H. Sorensen, D. Felsenberg und P. J. Meunier. »Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study.« eng. In: *J Clin Endocrinol Metab* 90.5 (2005), S. 2816–2822.
- [69] J.-Y. Reginster, M.-L. Brandi, J. Cannata-Andía, C. Cooper, B. Cortet, J.-M. Feron, H. Genant, S. Palacios, J. D. Ringe und R. Rizzoli. »The position of strontium ranelate in today’s management of osteoporosis«. In: *Osteoporosis International* 26.6 (2015), S. 1667–1671. ISSN: 1433-2965.
- [70] M. Roy, G. Fielding, A. Bandyopadhyay und S. Bose. »Effects of Zinc and Strontium Substitution in Tricalcium Phosphate on Osteoclast Differentiation and Resorption.« eng. In: *Biomater Sci* 1.1 (2013).
- [71] G. Hulsart-Billström, W. Xia, E. Pankotai, M. Weszl, E. Carlsson, C. Forster-Horváth, S. Larsson, H. Engqvist und Z. Lacza. »Osteogenic potential of Sr-doped calcium phosphate hollow spheres in vitro and in vivo.« eng. In: *J Biomed Mater Res A* 101.8 (2013), S. 2322–2331.
- [72] J.-W. Park, Y.-J. Kim, J.-H. Jang und H. Song. »Positive modulation of osteogenesis- and osteoclastogenesis-related gene expression with strontium-containing microstructured Ti implants in rabbit cancellous bone.« eng. In: *J Biomed Mater Res A* 101.1 (2013), S. 298–306.
- [73] Y. Liang, H. Li, J. Xu, X. Li, M. Qi und M. Hu. »Morphology, composition, and bioactivity of strontium-doped brushite coatings deposited on titanium implants via electrochemical deposition.« eng. In: *Int J Mol Sci* 15.6 (2014), S. 9952–9962.
- [74] W. Braun und R. Thull. »Elektrochemische Abscheidung von Ca(OH)₂ auf Titan zur Unterstützung der Osteointegration«. In: *BIOmaterialien* 6.4 (2005), S. 269–274.

- [75] S. Rössler, A. Sewing, M. Stölzel, R. Born, D. Scharnweber, M. Dard und H. Worch. »Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature.« eng. In: *J Biomed Mater Res A* 64.4 (2003), S. 655–663.
- [76] J. Zerweck. »Elektrochemisch gestützte Abscheidung strontiumdotierter Magnesiumphosphatschichten auf Titan«. Diss. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2017.
- [77] J. Zerweck. *Unveröffentlichte Messdaten*. Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg, 2014–2017.
- [78] *CASY® Cell Counter + Analyser System Model TT. 2.3E*. Roche Innovatis AG. Krämersr. 22, D-72764 Reutlingen.
- [79] M. V. Berridge. »The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts«. In: *Biochemica* 4 (1996), S. 15–20.
- [80] A. J. Janckila, K. Takahashi, S. Z. Sun und L. T. Yam. »Naphthol-ASBI phosphate as a preferred substrate for tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b.« eng. In: *J Bone Miner Res* 16.4 (2001), S. 788–793.
- [81] M. Newa, K. H. Bhandari, L. Tang, R. Kalvapalle, M. Suresh und M. R. Doschak. »Antibody-mediated universal osteoclast targeting platform using calcitonin as a model drug.« eng. In: *Pharm Res* 28.5 (2011), S. 1131–1143.
- [82] H. Sakiyama, R. Masuda, N. Inoue, K. Yamamoto, K. Kuriwa, K. Nakagawa und K. Yoshida. »Establishment and characterization of macrophage-like cell lines expressing osteoclast-specific markers.« eng. In: *J Bone Miner Metab* 19.4 (2001), S. 220–227.
- [83] S. Tanaka, N. Takahashi, N. Udagawa, T. Tamura, T. Akatsu, E. R. Stanley, T. Kurokawa und T. Suda. »Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors.« eng. In: *J Clin Invest* 91.1 (1993), S. 257–263.
- [84] S. Islam, F. Hassan, G. Tumurkhuu, J. Dagvadorj, N. Koide, Y. Naiki, T. Yoshida und T. Yokochi. »Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells via augmented production of macrophage-colony-stimulating factor.« eng. In: *Microbiol Immunol* 52.12 (2008), S. 585–590.

- [85] A. J. Janckila, R. M. Simons und L. T. Yam. »Alternative immunoassay for tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b using the fluorogenic substrate naphthol ASBI-phosphate and heparin.« eng. In: *Clin Chim Acta* 347.1-2 (2004), S. 157–167.
- [86] D. C. Mangham, D. J. Scoones und M. T. Drayson. »Complement and the recruitment of mononuclear osteoclasts.« eng. In: *J Clin Pathol* 46.6 (1993), S. 517–521.
- [87] D. Georgess, I. Machuca-Gayet, A. Blangy und P. Jurdic. »Podosome organization drives osteoclast-mediated bone resorption.« eng. In: *Cell Adh Migr* 8.3 (2014), S. 191–204.
- [88] P. Jurdic, F. Saltel, A. Chabadel und O. Destaing. »Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model.« eng. In: *Eur J Cell Biol* 85.3-4 (2006), S. 195–202.
- [89] F. Saltel, A. Chabadel, E. Bonnelye und P. Jurdic. »Actin cytoskeletal organisation in osteoclasts: a model to decipher transmigration and matrix degradation.« eng. In: *Eur J Cell Biol* 87.8-9 (2008), S. 459–468.
- [90] F. Saltel, O. Destaing, F. Bard, D. Eichert und P. Jurdic. »Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts.« eng. In: *Mol Biol Cell* 15.12 (2004), S. 5231–5241.
- [91] C. Luxenburg, D. Geblinger, E. Klein, K. Anderson, D. Hanein, B. Geiger und L. Addadi. »The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly.« eng. In: *PLoS One* 2.1 (2007), e179.
- [92] K. Fuller, J. L. Ross, K. A. Szewczyk, R. Moss und T. J. Chambers. »Bone is not essential for osteoclast activation«. In: *PLoS One* 5.9 (2010), e12837.
- [93] S. Batsir, B. Geiger und Z. Kam. »Dynamics of the sealing zone in cultured osteoclasts«. In: *Cytoskeleton (Hoboken, N.j.)* 74.2 (2017), S. 72–81.
- [94] Z. Xia, L. M. Grover, Y. Huang, I. E. Adamopoulos, U. Gbureck, J. T. Triffitt, R. M. Shelton und J. E. Barralet. »In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line.« eng. In: *Biomaterials* 27.26 (2006), S. 4557–4565.

- [95] M. Yamada, T. Ueno, N. Tsukimura, T. Ikeda, K. Nakagawa, N. Hori, T. Suzuki und T. Ogawa. »Bone integration capability of nanopolymorphic crystalline hydroxyapatite coated on titanium implants.« eng. In: *Int J Nanomedicine* 7 (2012), S. 859–873.
- [96] T. Romanowski, A. Markiewicz, N. Bednarz und K. P. Bielawski. »[Housekeeping genes as a reference in quantitative real-time RT-PCR].« pol. In: *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61 (2007), S. 500–510.
- [97] F. Bühling, A. Reisenauer, A. Gerber, S. Krüger, E. Weber, D. Brömme, A. Roessner, S. Ansorge, T. Welte und C. Röcken. »Cathepsin K—a marker of macrophage differentiation?« eng. In: *J Pathol* 195.3 (2001), S. 375–382.
- [98] J. K. Park, A. Rosen, J. E. Saffitz, A. Asimaki, S. H. Litovsky, S. M. Mackey-Bojack und M. K. Halushka. »Expression of cathepsin K and tartrate-resistant acid phosphatase is not confined to osteoclasts but is a general feature of multinucleated giant cells: systematic analysis.« eng. In: *Rheumatology (Oxford)* 52.8 (2013), S. 1529–1533.
- [99] T. Goto, T. Yamaza und T. Tanaka. »Cathepsins in the osteoclast.« eng. In: *J Electron Microscop (Tokyo)* 52.6 (2003), S. 551–558.
- [100] M. Pondel. »Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond.« eng. In: *Int J Exp Pathol* 81.6 (2000), S. 405–422.
- [101] D. Naot und J. Cornish. »The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism.« eng. In: *Bone* 43.5 (2008), S. 813–818.
- [102] S. Granholm, P. Lundberg und U. H. Lerner. »Expression of the calcitonin receptor, calcitonin receptor-like receptor, and receptor activity modifying proteins during osteoclast differentiation.« eng. In: *J Cell Biochem* 104.3 (2008), S. 920–933.
- [103] Y. Masuda, J.-Y. Ueda, M. Tamura, H. Sakagami, M. Tomomura, A. Tomomura und Y. Shirataki. »Diverse biological activity of *Odontoglossum Harvengtense* 'Tutu' bulb extracts.« eng. In: *In Vivo* 25.3 (2011), S. 381–386.
- [104] S. L. Alatalo, J. M. Halleen, T. A. Hentunen, J. Mönkkönen und H. K. Väänänen. »Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium.« eng. In: *Clin Chem* 46.11 (2000), S. 1751–1754.

- [105] J. P. Rissanen, M. I. Suominen, Z. Peng und J. M. Halleen. »Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model.« eng. In: *Calcif Tissue Int* 82.2 (2008), S. 108–115.
- [106] T. R. Arnett und I. R. Orriss. »Metabolic properties of the osteoclast.« In: *Bone* (2017).
- [107] C. Huang, L. Li, X. Yu, Z. Gu und X. Zhang. »The inhibitory effect of strontium-doped calcium polyphosphate particles on cytokines from macrophages and osteoblasts leading to aseptic loosening in vitro.« eng. In: *Biomed Mater* 9.2 (2014), S. 025010.
- [108] R. Baron und Y. Tsouderos. »In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation.« eng. In: *Eur J Pharmacol* 450.1 (2002), S. 11–17.
- [109] L. Yang, S. Perez-Amodio, F. Y. F. Barrère-de Groot, V. Everts, C. A. van Blitterswijk und P. Habibovic. »The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts.« eng. In: *Biomaterials* 31.11 (2010), S. 2976–2989.
- [110] S. Ray, U. Thormann, U. Sommer, T. E. Khassawna, M. Hundgeburth, A. Henß, M. Rohnke, K. S. Lips, C. Heiss, S. Heinemann, T. Hanke, L. Dürselen, R. Schnettler und V. Alt. »Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats.« eng. In: *Injury* 47 Suppl 1 (2016), S52–S61.
- [111] U. Thormann, S. Ray, U. Sommer, T. Elkhassawna, T. Rehling, M. Hundgeburth, A. Henß, M. Rohnke, J. Janek, K. S. Lips, C. Heiss, G. Schlewitz, G. Szalay, M. Schumacher, M. Gelinsky, R. Schnettler und V. Alt. »Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats.« eng. In: *Biomaterials* 34.34 (2013), S. 8589–8598.
- [112] V. Offermanns, O. Z. Andersen, G. Falkensammer, I. H. Andersen, K. P. Almqvist, S. Sørensen, M. Sillassen, C. S. Jeppesen, M. Rasse, M. Foss und F. Kloss. »Enhanced osseointegration of endosseous implants by predictable sustained release properties of strontium.« eng. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 103.5 (2015), S. 1099–1106.

- [113] S. S. Singh, A. Roy, B. Lee, S. Parekh und P. N. Kumta. »Murine osteoblastic and osteoclastic differentiation on strontium releasing hydroxyapatite forming cements.« eng. In: *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 63 (2016), S. 429–438.

Anhang

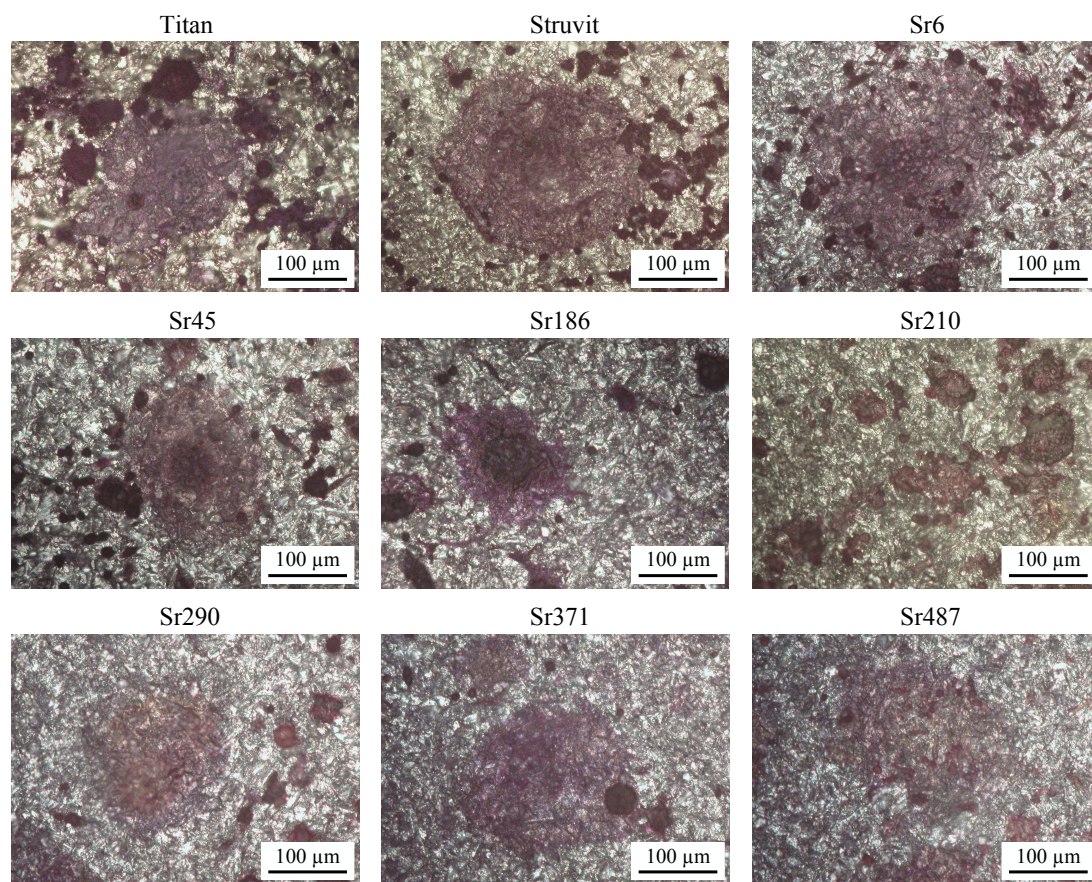
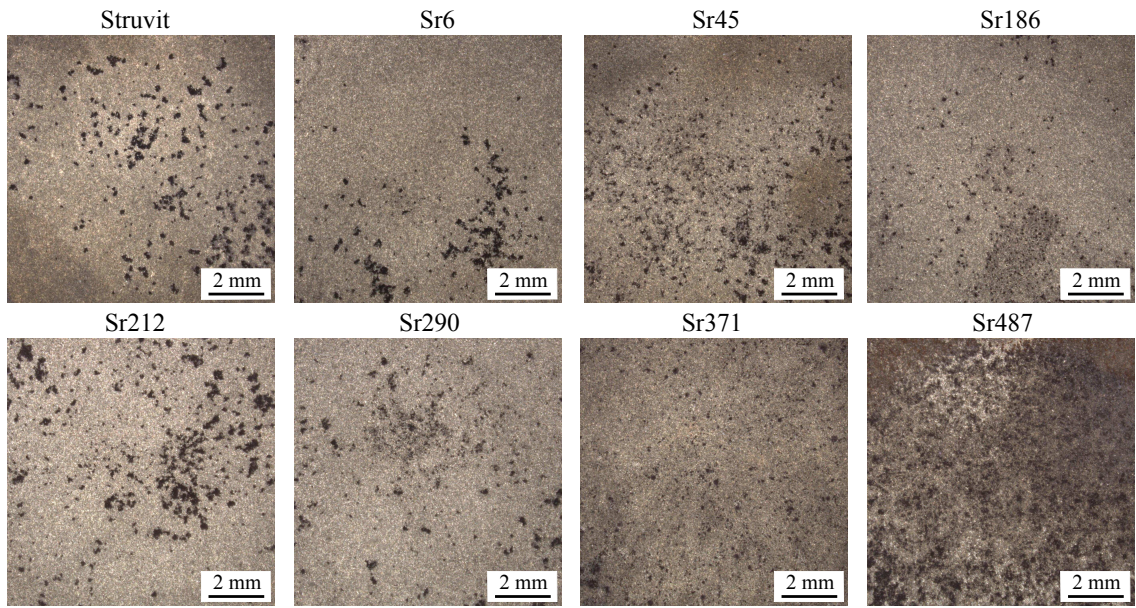
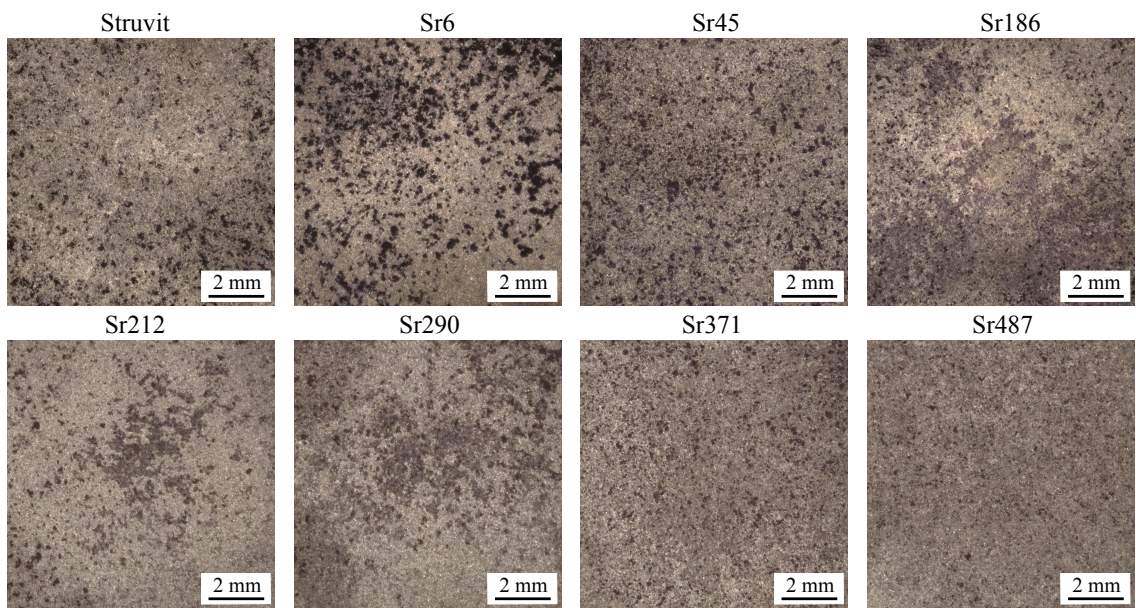


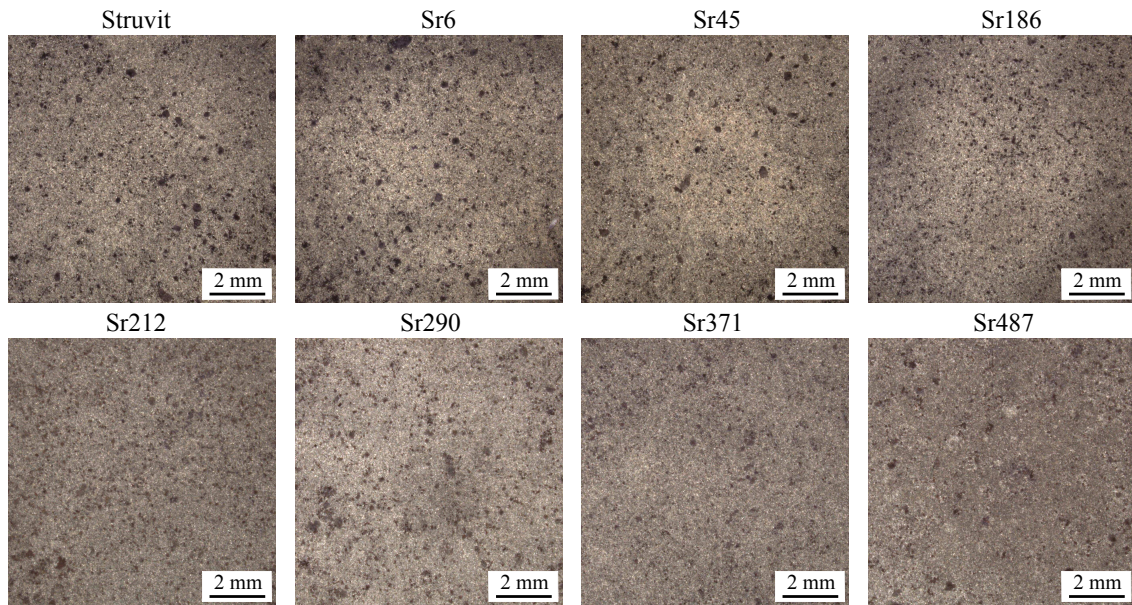
Abb. A.1: Färbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase von RAW 264.7 Zellen bei Kultivierung auf Titan, Struvit und verschiedenen strontiumdotierten Struvit-schichten an Tag 11.



(a) Tag 4



(b) Tag 7



(c) Tag 11

Abb. A.2: TRAP-Färbung von RAW 264.7 Zellen an den Tagen 4 (a), 7 (b) und 11 (c) nach RANKL-Zusatz.

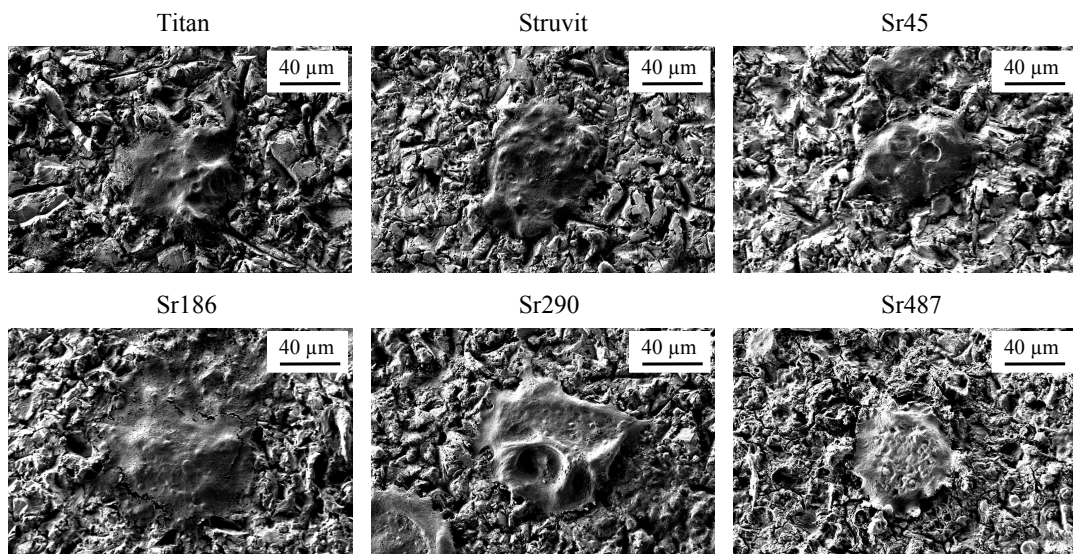


Abb. A.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen an Tag 11 nach RANKL-Zugabe auf Titan, Struvit, Sr45, Sr186, Sr290 und Sr487.

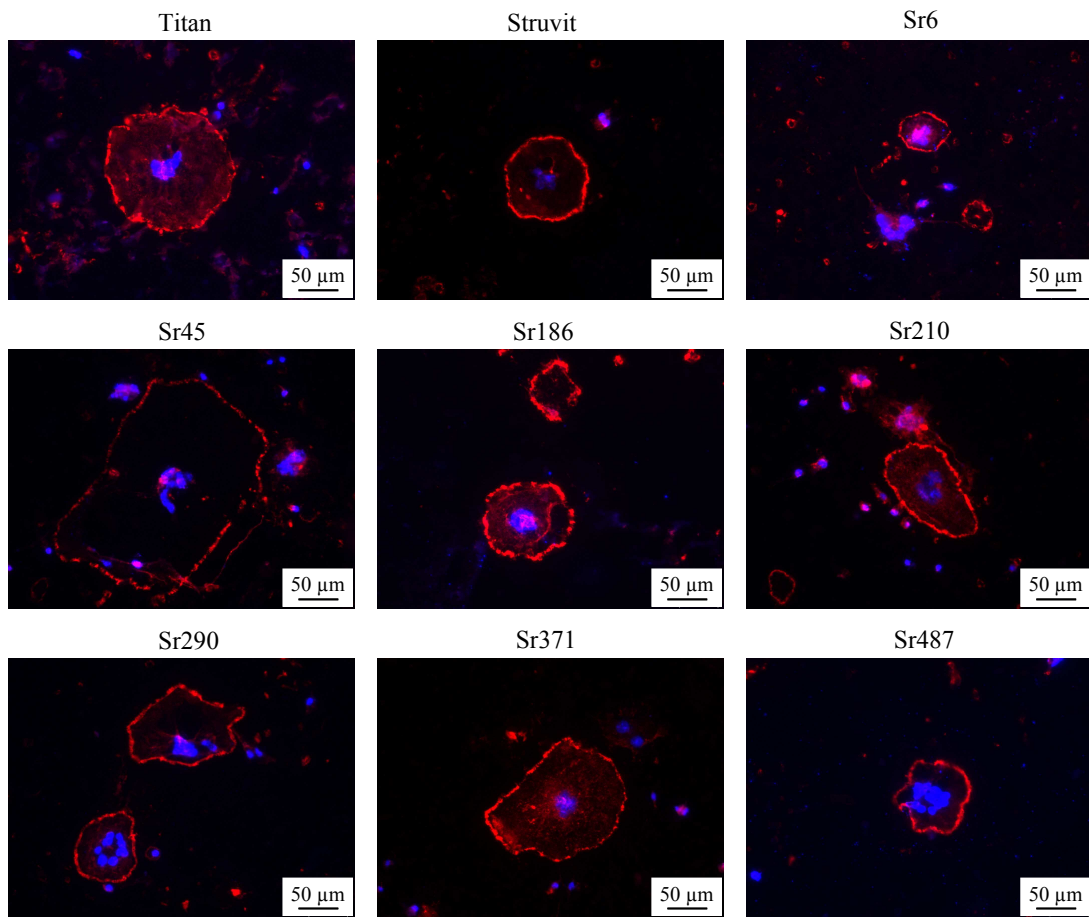


Abb. A.4: Overlay-Aufnahmen von RAW 264.7 Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Aktin (rot) und Hoechst-gefärbten Zellkernen (blau) an Tag 11.

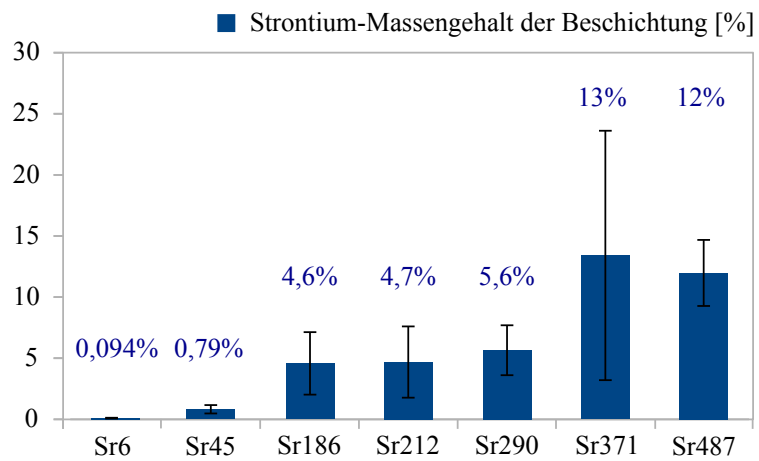


Abb. A.5: Mittlerer Strontium-Massengehalt in den verschiedenen Beschichtungen; der Berechnung zugrunde liegende Daten von [76, 77].

Danksagungen

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, die mich in jeglicher Form bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Zudem möchte ich mich besonders bedanken bei:

Prof. Dr. Jürgen Groll für die Aufnahme am Lehrstuhl,

Prof. Dr. Uwe Gbureck für die freundliche Überlassung der Promotionsarbeit,

Univ.-Prof. Dr. Torsten Blunk für die freundliche Übernahme des Koreferats,

Dr. Andrea Ewald für die kompetente und intensive Betreuung während der gesamten Dauer der Arbeit, von ersten Ratschlägen zur Versuchsdurchführung über Diskussion von Ergebnissen bis hin zu letzten Korrekturvorschlägen,

Dr. Claus Moseke für die Unterstützung bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen,

Dr. med. dent. Julia Zerweck für die Einarbeitung bei der Probenherstellung und die Bereitstellung von Messdaten und Arbeitsparametern.

meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, **Martina und Franz Wimmer**, für ihre uneingeschränkte Unterstützung über meinen gesamten Bildungsweg,

und nicht zuletzt meinem Freund, **Jan Hajer**, für seine Motivation und Unterstützung bei sämtlichen computerbezogenen Fragen.