

Benedikt Widholz  
Dr. med.

## **Evaluation der osteogenen Eigenschaften des bioaktiven Borosilikatglases 0106-B1 in-vitro und in-vivo.**

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Arash Moghaddam-Alvandi

Die Behandlung von Critical-Size-Bone-Defekten und Pseudarthrosen stellen nach wie vor eine große Herausforderung für die klinische Orthopädie und Unfallchirurgie sowie das Bone-Tissue-Engineering dar. Sowohl die Heilung von Knochendefekten als auch die Osteogenese im Bone-Tissue-Engineering-Ansatz spiegelt die embryonale Knochenentwicklung wider und ist in hohem Maße von einer suffizienten Angiogenese und der daraus resultierenden Gefäß- und Nährstoffversorgung abhängig.

Ein Ansatz zur Therapie liegt in der Verwendung von bioaktiven Materialien, die die Angiogenese fördern können, wie etwa das neue bioaktive Borosilikatglas 0106-B1.

Ziel dieser Arbeit war es die Fragestellung zu beantworten, ob 0106-B1, in-vivo sowie in-vitro, über die Freisetzung von Bor eine vermehrte Expression des Gens Vascular-Endothelial-Growth-Factor-A bewirkt und somit die Angiogenese fördern und dadurch die Osteogenese verstärken kann.

Es wurden mesenchymale Stromazellen von zehn Spendern unter Zellkulturbedingungen isoliert. Mit dem Ziel der Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde anschließend untersucht, ob sich die stark ausgeprägte Varianz von Messergebnissen aus Zellpopulationen individueller Spender durch ein Poolingverfahren, unter Einbezug einer homogenen Menge von Zellen aller Spender, reduzieren lässt, ohne dabei zu starken Einfluss auf die osteogene Differenzierung zu nehmen.

Um in-vitro den direkten Einfluss durch Kontakt mit den bioaktiven Gläsern mit der Auswirkung der in das Zellkulturmedium freigesetzten Ionen auf mesenchymale Stromazellen zu vergleichen, wurden 0,1, 1 und 10 Milligramm pro Milliliter bioaktiven Glases je eines Glastyps entweder direkt den mesenchymalen Stromazellen im Medium zugesetzt oder lediglich 24 Stunden mit bioaktivem Glas inkubiertes Zellkulturmedium ohne feste Bestandteile addiert.

Zur Analyse der Auswirkungen auf die osteogene Differenzierung in-vivo wurden dreidimensionale Glaskonstrukte jeden Glastyps mit mesenchymalen Stromazellen besiedelt und je zwei dreidimensionale Glaskonstrukte unbesiedelt belassen. Diese wurden ektop in immundefiziente Mäuse implantiert. Vor der Implantation und nach der Explantation wurden die Konstrukte mit einem Mikrocomputertomographen auf ihre geometrischen Eigenschaften analysiert. Anschließend erfolgte eine histologische Aufarbeitung der Konstrukte, mit Analyse der histomorphometrischen Eigenschaften des Gewebes sowie der Genexpression.

Es konnte gezeigt werden, dass ein Poolingverfahren die osteogene Differenzierung unter in-vitro-Bedingungen nicht negativ beeinflusst, während die Varianz der Messergebnisse reduziert wird. Somit konnten die Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse verbessert werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Poolingverfahren für mesenchymale Stromazellen

geeignet ist, um die Auswirkung von Störvariablen auf Experimente des Tissue-Engineerings zu verringern.

In-vitro konnte gezeigt werden, dass die Proliferation, Viabilität, Vitalität, Zellzahl und osteogene Differenzierung durch beide bioaktiven Gläser etwa gleich gefördert wurde. Bei einer Konzentration von 10 mg/ml induzierten beide Gläser eine zunehmende Reduktion der Zellzahl und osteogenen Differenzierungsfähigkeit, bis unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe. Die pH-Veränderungen durch Kontakt der bioaktiven Gläser mit Zellkulturmedium waren dabei in beiden Untersuchungsgruppen und Ansätzen ähnlich stark ausgeprägt.

Im in-vivo-Teil der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass mit mesenchymalen Stromazellen besiedelte dreidimensionale Konstrukte beider bioaktiven Gläser zur Bildung von Osteoid im ektopen Mausmodell führten. Dabei konnte unter Einsatz des neuen bioaktiven Glases 0106-B1 sowohl quantitativ mehr als auch qualitativ reiferes Osteoid beobachtet werden. Die Analyse der Genexpression zeigte zudem ein höheres Expressionsniveau von Genen, die mit weiter fortgeschritten osteogen differenzierten Osteoprogenitorzellen assoziiert werden, sowie eine vermehrte Aktivität von Osteoklasten und ähnlichen, resorbierenden Zellen. Zudem zeigte das neue bioaktive Glas eine schnelle Resorptions- bzw. Umbaukinematik, mit Ersatz durch Osteoidgewebe. Schlussendlich konnte eine signifikant erhöhte Expression von Vascular-Endothelial-Growth-Factor-A in der 0106-B1-Gruppe festgestellt werden. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die bereits bekannten proangiogenen Eigenschaften von 0106-B1, durch Freisetzung von Bor, zu einer verbesserten osteogenen Differenzierung bei ektopter Implantation im Mausmodell führten.

Weitere Untersuchungen des Poolingansatzes sollten sich unter anderem darauf konzentrieren, welchen Einfluss einzelne Zellpopulationen individueller Spender auf den Gesamtpool, insbesondere bei längerer Expansion, nehmen. Ebenso sollte eruiert werden, welchen Effekt verschiedene Variationen in der Zusammensetzung des Zellpools verursachen, beispielsweise eine veränderte Spenderzahl.

Die gegenüber dem aktuellen Goldstandard unter den bioaktiven Gläsern 45S5 vorteiligen Ergebnisse durch Verwendung des neuen bioaktiven Glases 0106-B1, machen dieses zu einem vielversprechenden Kandidaten für weitere Untersuchungen. Daher sollte in Folgearbeiten untersucht werden, ob sich ähnliche Ergebnisse in einem orthotopen Knochendefektmodell erzielen lassen und somit dem Problem der unzureichenden Gefäßversorgung von größeren Knochendefekten und Pseudarthrosen, durch Angriff an diesem entscheidenden Mechanismus, entgegengewirkt werden kann.