

Sebastian Wilkesmann

Dr. med.

Der Einfluss von Mangan als Supplement in mesoporösen bioaktiven Glasnanopartikeln auf die Vitalität und osteogene Differenzierung mesenchymaler Stromazellen in vitro

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Fabian Westhauser

Die Anwendung bioaktiver Gläser stellt einen vielversprechenden Ansatz zur Therapie von Knochendefekten kritischer Größe, zu deren Abheilung das körpereigene Regenerationspotenzial nicht ausreicht, dar. Dies ist zum einen in ihrer Fähigkeit, eine feste Bindung sowohl zu Knochen- als auch Weichteilgewebe einzugehen, begründet. Zum anderen können sie über direkten Glas-Zell-Kontakt oder ionische Dissoziationsprodukte Differenzierungsreize für Vorläuferzellen, die an der Regeneration des Knochendefekts beteiligt sind, setzen. Durch Zusatz therapeutisch aktiver Ionen in die Glaskomposition kann dieser Reiz moduliert werden. So können unter anderem die Osteogenese oder Angiogenese gefördert sowie entzündungshemmende oder antimikrobielle Eigenschaften erzielt werden. Aufgrund möglicher osteostimulativer Effekte stellt Mangan ein vielversprechendes Ion zur Supplementation in bioaktiven Gläsern dar. In diesem in vitro Projekt soll das therapeutische Potenzial von Mangan-supplementierten mesoporösen bioaktiven Glasnanopartikeln evaluiert werden.

Es wurden zunächst sechs häufig zur in vitro Evaluation neuer bioaktiver Glaskompositionen genutzte humane Zelltypen hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber dem etablierten und umfangreich untersuchten 45S5-bioaktivem Glas (BG) verglichen, um ein geeignetes Zellmodell zur Durchführung der weiteren Versuche zu bestimmen. Neben primären Osteoblasten und mesenchymalen Stromazellen waren dies die häufig als „Osteoblasten ähnliche“ bezeichneten und aus Tumorgewebe isolierten Zelllinien: MG-63, HOS, Saos-2 und U2OS. Nach Exposition mit 45S5-BG wurde neben der Zellvitalität die Aktivität der alkalischen Phosphatase, einem Marker der osteogenen Differenzierung, erhoben. Daraufhin wurde der Einfluss von Mangan-supplementierten mesoporösen Glasnanopartikeln (Mn-MBGNs) mit dem unsupplementierter Nanopartikel (MBGNs) in zwei verschiedenen Konzentrationen auf die Vitalität, Proliferation und Expression mehrerer osteogener Differenzierungsmarker der des zuvor als geeignet bestimmten Zelltyps verglichen. Die erhobenen Marker der osteogenen Differenzierung umfassten neben der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP-Aktivität) die Expression der Gene für Osteopontin, Osteocalcin und Alpha I Typ I Kollagen. Im letzten Schritt wurden zur weiteren Eingrenzung des therapeutischen Potenzials von Mn in MBGNs ein Vergleich von Mn-MBGNs mit Zink- (Zn-MBGNs) und Kupfer-supplementierten Nanopartikeln (Cu-MBGNs) durchgeführt. Erhoben wurde dazu neben der Zellvitalität in den

Versuchsansätzen die ALP-Aktivität sowie die Osteopontin- und Osteocalcin-Genexpression. Da die Supplementation mit Zink und Kupfer in BG bereits eingehend untersucht wurde, liefern die zu ihnen erhobenen Daten wertvolle Vergleichswerte, um das therapeutische Potenzial von Mn in MBGNs weiter einzugrenzen. Zudem erfolgte die Etablierung eines kombinierten fluoreszenzbasierten Assays zur Quantifizierung der Vitalität und ALP-Aktivität der exponierten Zellen. Dieses liefert im Vergleich zur getrennten konventionellen Bestimmung Ergebnisse mit hoher Korrelation und bietet bei Verringerung der Arbeitsschritte und -zeit Vorteile unter ökonomischen Gesichtspunkten.

Da mesenchymale Stromazellen im Gegensatz zu Saos-2, HOS oder U2OS ein ähnliches Verhalten in Kontakt zu 45S5-BG wie die zuvor als Standard gesetzten primären human Osteoblasten aufwiesen und neben einem physiologischen Geno- und Phänotyp eine hohe osteogene Differenzierungskapazität aufweisen, wurden diese im weiteren Verlauf als Zellmodell genutzt. Es wurden sowohl dosisabhängige zytotoxische als auch osteostimulative Eigenschaften von Mn-Supplementation in MBGNs beobachtet. Sowohl die Zellzahl als auch die fluorometrisch bestimmte Zellvitalität der exponierten mesenchymalen Stromazellen verringerte sich unter steigender eingesetzter Konzentration der BGs sowie verstärkt unter Mn-Supplementation. Andererseits zeigte sich vor allem unter Einsatz höherer Glaskonzentrationen eine stärkere Expression von Markern der osteogenen Differenzierung in Kontakt zu Mn. Neben einer Induktion ALP Aktivität wurde hier vor allem eine stark erhöhte Osteopontin Genexpression beobachtet.

Auch im direkten Vergleich zu Zn-MBGNs und Cu-MBGNs verdeutlicht sich das schmale therapeutische Fenster von Mn als Zusatz in MBGNs. So wurden sowohl die am stärksten ausgeprägten zytotoxischen als auch osteostimulativen Effekte unter Mn-Supplementation bei Einsatz erhöhter Glaskonzentrationen beobachtet, obwohl die Freisetzung des jeweiligen supplementierten Ions aus den zugehörigen MBGNs für Mn geringer war als für Zink und Kupfer. Allein unter Einsatz erhöhter Konzentrationen Mn-MBGNs wurde eine eingeschränkte Vitalität der exponierten mesenchymalen Stromazellen beobachtet. Andererseits zeigte sich unter Verwendung der gleichen Glaskonzentration eine Induktion der Osteopontin-Genexpression. Auch wenn gegen Ende des Beobachtungszeitraums Cu-MBGNs eine Steigerung der ALP-Aktivität der exponierten Zellen vermitteln konnten, konnten für keine der supplementierten Nanopartikel eindeutige osteostimulative Vorteile eines einzelnen Supplements festgestellt werden.

Trotz seines schmalen therapeutischen Fensters bleibt Mn ein attraktives ionisches Supplement in MBGNs. Vor allem unter erhöhten eingesetzten Glaskonzentrationen zeigten sich unter Mn-Supplementation vorteilhafte osteostimulative Effekte durch MBGNs. Weitere Studien unter Betrachtung weiterer Marker der osteogenen Differenzierung wie die Ablagerung

kalzifizierter Extrazellulärmatrix exponierter Zellen oder eine Evaluation im in vivo Modell könnten das therapeutische Potenzial von Mn-Supplementation in MBGNs weiter spezifizieren.