

Bettina Bundschuh

Dr. med.

## **Wirkung mechanischer Belastung auf den menschlichen Knochenzellstoffwechsel in vitro**

Geboren am 27.07.1970 in Frankfurt am Main

Reifeprüfung am 13.06.1990 in Usingen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990/91 bis WS 1996/97

Physikum am 16.09.1992 an der Universität Gießen

Klinisches Studium in Gießen und Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg, Schwetzingen und Columbia, MO (USA)

Staatsexamen am 15.04.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Herr Priv.- Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Ch. Kasperk

Mechanische Belastung ist eine wichtige Einflußgröße für den Erhalt der Knochenmasse und der Knochenarchitektur und wird durch nicht vollständig verstandene Mechanismen vom Knochengewebe registriert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von mechanischer Belastung auf primäre menschliche osteoblastäre Knochenzellkulturen untersucht, die auf einem Plattformschüttler einer Rotationsbewegung der Kulturschale ausgesetzt wurden. Durch die Bewegung des Kulturmediums werden Scherkräfte auf die Zellmembranen ausgeübt, die in etwa  $2,3 \cdot 10^{-6} \text{N/m}^2$  betragen.

Dabei zeigte sich in Abhängigkeit von der Zelldichte und von der Einwirkungszeit der Belastung (Dauer und Frequenz) eine unterschiedlich starke Stimulation der Knochenzellproliferation. Intermittierendes Schütteln über 24 Stunden bei einer Frequenz von 75 Rotationsbewegungen pro Minute erzielte eine signifikante Proliferationsstimulation von maximal 38% gegenüber einer Kontrollgruppe in Ruhe. Die Messung der Aktivität der alkalischen Phosphatase ergab einen signifikanten Unterschied von 20,8% zwischen den belasteten Zellen und der Kontrollgruppe. Demnach eignen sich sowohl die Messung der Knochenzellproliferation als auch die

Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase zur Beurteilung der hier untersuchten Effekte einer mechanischen Belastung auf humane Knochenzellkulturen. Indometacin wurde zur Hemmung der Prostaglandinbiosynthese zugegeben, da in der Literatur Hinweise darauf bestehen, daß Prostaglandine an der Vermittlung der Wirkungen einer mechanischen Stimulation auf das Knochengewebe beteiligt sind. In Übereinstimmung damit zeigte sich eine Abnahme der belastungsinduzierten Proliferationsstimulation bei Hemmung der Prostaglandinbiosynthese durch Indometacin.

Die Wirkung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$ , eines wichtigen Regulators des menschlichen Knochenzellstoffwechsels, wurde in den Experimenten durch blockierende TGF- $\beta$ -Antikörper gehemmt, wodurch eine verminderte Proliferationsstimulation durch die mechanische Belastung beobachtet wurde. Die auf die Knochenzellkulturen einwirkende mechanische Scherkraft zeigte bei Hemmung der Wirkung des Wachstumsfaktors TGF- $\beta$  keine signifikante mitogene Wirkung mehr. Diese Beobachtung spricht dafür, daß auch TGF- $\beta$  in den humanen Knochenzellkulturen an der Vermittlung der positiven Wirkungen von mechanischem Streß auf den Knochenzellstoffwechsel mitwirkt.

Die Effekte von 17 $\beta$ -Östradiol und Dihydrotestosteron im Zusammenhang mit mechanischer Belastung wurden in einem menschlichen Knochenzellmodell untersucht, da die Inaktivitätsosteoporose und die durch Sexualhormonmangel induzierte Osteoporose die gleichen histopathologischen Charakteristika zeigen. Dabei zeigte sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen hinsichtlich der Zellproliferation kein signifikanter zusätzlicher stimulierender Effekt der Hormone auf die Zellproliferation unter Belastung. Die Knochenzeldifferenzierung hingegen, gemessen anhand der AP-Aktivität der Zellen, wurde durch DHT unter Belastung stimuliert.

Durch Zugabe von mit Fibronectin beschichteten Latexperlen als zusätzlichem Belastungsreiz gelang es, den beobachteten Effekt einer mechanischen Belastung durch die Bewegung des Kulturmediums über den Zellen auf maximal 58% zu erhöhen. Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung sowohl in Bezug auf die Größe als auch auf die Anzahl der Perlen.

Durch Vorbehandlung der Zellen mit 17 $\beta$ -Östradiol oder Dihydrotestosteron konnte die Zahl der an den osteoblastären Zelloberflächen gebundenen, mit Fibronectin beschichteten Latexperlen erhöht werden, was eine Induktion der Fibronectinrezeptorgenexpression durch Östradiol und DHT vermuten läßt. Der

daraufhin in Anwesenheit der mit Fibronectin beschichteten Latexperlen beobachtete Effekt der mechanischen Belastung durch Schütteln auf die Zellproliferation war größer als der Effekt ohne eine Vorbehandlung mit Östradiol und DHT.

In der vorliegenden Arbeit wurde somit ein Modell entworfen, mit dem in erster Näherung die Wirkung mechanischer Belastung auf humane osteoblastäre Knochenzellkulturen untersucht werden konnte. Damit können die Mechanismen untersucht werden, die an den unter mechanischer Belastung in den Knochenzellen ablaufenden Prozessen beteiligt sind. Außerdem läßt sich anhand der Versuchsanordnung untersuchen, wie mechanische Belastung durch Knochenzellen perzipiert werden könnte und welche möglichen Botenstoffe an dieser Signalübertragung beteiligt sein könnten.

Aus den hier gemachten experimentellen Beobachtungen läßt sich schließen, daß bei der Vermittlung des Effektes mechanischer Belastung auf primäre menschliche Knochenzellkulturen TGF- $\beta$  und Prostaglandine beteiligt sind und daß der trophische Einfluß mechanischer Belastung auf den Knochenstoffwechsel durch Östradiol und DHT modifiziert werden kann.