

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. Dr. h. c. U. Joos-

**Vergleich des Einflusses von Kalziumcarbonat,
Putamen ovi und Estrogen auf Osteoblasten
in vitro**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Feldmann, Stefanie, geb. Wegener

aus

Arnsberg

2004

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Udo Stratmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Mund- und Kiefer-Gesichtschirurgie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. Dr. h. c. U. Joos –
Referent: Priv.-Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Udo Stratmann

Zusammenfassung

Vergleich des Einflusses von Kalziumcarbonat, Putamen ovi und Estrogen auf Osteoblasten in vitro

Feldmann, Stefanie

Estrogenmangel, ein veränderter Kalziummetabolismus und eine verringerte körperliche Betätigung stellen die Hauptursachen für die altersbedingte Osteoporose dar. Der fortlaufende Knochenverlust kann durch Kalzium- und Hormonsubstitution verlangsamt oder sogar verhindert werden. In dieser Studie wurde unter *in vitro* -Bedingungen der Einfluss von reinem Kalziumcarbonat, pulverisiertem Putamen ovi (Ei-Schale, *Gallus domesticus*) und Estradiolen auf die Entwicklung boviner Osteoblasten-ähnlicher Zellen untersucht.

Die Knochenzellen reagierten in allen Phasen ihrer Entwicklung auf die jeweilige Substitution: In der Proliferationsphase vermehrten und differenzierten sich die Osteoblasten in verstärktem Maße, wobei hier die Hormonersatztherapie den Kalziumpräparaten überlegen war. Während der nachfolgenden Phase der Matrixsynthese und Matrixreifung nahm die Produktion von Struktur- und Adhäsionsproteinen zu. Bei den Kalziumpräparaten konnte eine gesteigerte Syntheserate von Kollagen I, Fibronectin und Proteoglykan aufgezeigt werden, während die Estradiolkulturen erhöhte Expressionsprofile von Prokollagen I, Kollagen I, Fibronectin und Osteokalzin aufwiesen. In der Biomineralisationsphase führte sowohl die Estrogen- als auch die Kalziumsubstitution, insbesondere das Hühnereischalenpulver zu einer stark erhöhten Bildung von Biomineral.

Insgesamt bewirkte der Zusatz von reinem Kalziumcarbonat, Putamen ovi und Estradiol eine Stimulation der Osteoblasten-Entwicklung, eine Erhöhung der Matrixproteinsynthese und der Biomineralisation *in vitro*.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Stand der Forschung.....	1
1.1.1	Substitution mit Kalziumpräparaten.....	1
1.1.2	Substitution mit Hormonpräparaten.....	5
1.1.3	Elektrische und elektromagnetische Felder.....	8
1.2	Problemstellung.....	9
2	MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Die Zellkultur.....	10
2.1.2	Substanzen / Medikamente.....	11
2.1.3	Antikörper.....	11
2.1.4	Analysesysteme.....	12
2.1.5	Geräte.....	12
2.1.6	Computerprogramme.....	12
2.2	Methoden.....	13
2.2.1	Die Zellkultur.....	13
2.2.2	Die Zellproliferation.....	17
2.2.3	Die Syntheseleistung.....	20
2.3	Analysemethoden.....	22
2.3.1	Immunhistochemische Färbung.....	22
2.3.2	Kalziumbestimmung.....	23
2.3.3	Statistische Auswertung.....	23
3	ERGEBNISSE.....	25
3.1	Die Zellproliferation.....	25
3.1.1	Kontrolle der Kulturbedingungen und des Wachstums im in vitro System.....	25
3.1.2	Zellzahlanstieg pro Zeiteinheit.....	33

3.2 Die Syntheseleistung.....	35
3.2.1 Einfluss auf Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix im in vitro System.....	35
3.2.2 Einfluss auf die in vitro Mineralisation der extrazellulären Matrix.....	39
4 DISKUSSION.....	43
4.1 Die Zellproliferation.....	43
4.1.1 Das in vitro System.....	43
4.1.2 Zellzahlanstieg pro Zeiteinheit.....	44
4.2 Die Syntheseleistung.....	49
4.2.1 Einfluss auf Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix im in vitro System.....	49
4.2.2 Einfluss auf die in vitro Mineralisation der extrazellulären Matrix.....	53
5 AUSBLICK.....	56
6 ABKÜRZUNGEN.....	57
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	58
8 DANKSAGUNG.....	65
9 LEBENS LAUF.....	66

1 Einleitung

1.1 Stand der Forschung

Der Knochen erfüllt in unserem Organismus mehrere essentielle Funktionen. Zum einen ist er ein hochdifferenziertes Stützgewebe, das an den Bewegungen und am Schutz unseres Körpers beteiligt ist, zum anderen dient er als Hauptspeicher für Kalzium- und Phosphationen, der mit dem Extrazellulärraum im Gleichgewicht steht. Beim Erwachsenen erfolgt ein ständiger Knochenumbau. Diese dynamische und komplexe Knochenregeneration ist durch einen adaptiven Knochenan- und -Abbau gekennzeichnet, welcher zahlreichen hormonellen und nervalen Regulationsmechanismen unterworfen ist [52]. Ebenso wird mechanischen und elektrischen Reizen, sowie dem Kalzium- und Vitamin-D-Angebot im Körper eine entscheidende Bedeutung im Knochenstoffwechsel zugeschrieben. Mit zunehmenden Alter verschiebt sich das Umbaugleichgewicht und es findet ein vermehrter Knochenabbau statt. Vor allem bei Frauen kommt es als Begleiterscheinung der Menopause zu einer Steigerung des Knochenumbaus, insbesondere der Knochenresorption [52]. Dies kann einen stärkeren trabekulären und kortikalen Knochenverlust bewirken, so dass es zu einer verstärkten Frakturgefährdung mit dem klinischen Bild einer Osteoporose kommen kann.

In der gängigen Literatur sind zahlreiche Therapieansätze zu diesem Krankheitsbild beschrieben worden, die nachfolgend näher erläutert werden.

1.1.1 Substitution mit Kalziumpräparaten

Schon seit langem ist bekannt, dass Kalzium als essentielles Mineral für die Knochengesundheit und den Knochenmetabolismus eine Grundvoraussetzung ist [29; 39]. Kalzium-haltiges Apatit sorgt nicht nur für die mechanische Stabilität von Knochen und Zähnen, sondern dient im Skelett angereichert als Reserve bei Kalziummangel [39].

Es findet ein ständiger Kalziumverlust via Gastrointestinaltrakt, Niere und Haut statt [29; 39]. Um das Kalziumgleichgewicht im Körper aufrecht zu erhalten benötigt ein erwachsener Mensch durchschnittlich 800 – 1200 mg Kalzium pro Tag [39]. Während der Menopause ändert sich der Ca- Metabolismus mit sinkender Ca-Absorption [44] auf Grund der veränderten hormonellen Gegebenheiten. Es kommt zum postmenopausalen Knochenverlust mit dem klinischen Bild einer Osteoporose [29; 39]. Folglich steigt der tägliche Kalziumbedarf auf 1000- 1200 mg pro Tag [39]. Von der Mehrheit der Autoren wird sogar eine tägliche Ca-Zufuhr von 1500 mg [19; 25; 29; 55], teilweise auch 1600 mg [44] - 1700 mg [1] gefordert. Durch eine ausreichende tägliche Kalziumaufnahme kann der jährliche Knochenverlust während der Menopause signifikant verlangsamt werden [29; 39]. Die Ca-Gabe sollte in Form von Kalziumcarbonat (CaCO_3) erfolgen, da es den höchsten Prozentsatz an Kalzium enthält. Zudem wird es gut toleriert, ist kostengünstig und sicher [44; 55]. In einigen Studien wurden lediglich leichte gastrointestinale Beschwerden bei Kalziumsubstitution beobachtet [44].

Zahlreiche Untersuchungsreihen haben nachgewiesen, dass durch eine ausreichende tägliche Ca-Zufuhr Knochenverlust verringert oder sogar verhindert werden kann [5; 19; 29; 39; 44; 55]. Dies beruht auf der Tatsache, dass Kalzium den Knochenumbau verlangsamt [29], indem es zur Reduktion der Knochenumbaumarker und zur verminderten Knochenresorption beiträgt [19]. Fardellone et al. [19], ebenso wie Riggs et al. [44] konnten nach Kalziumcarbonatgabe auf zellulärer Ebene eine signifikante Reduktion der alkalischen Phosphatase sowie von Knochenresorptionsmarkern (Hydroxyproline [19], Pyridinoline [19; 44] und Deoxypyridinoline [19]) nachweisen. Ferner kam es zu einem signifikanten Anstieg des Kalziumspiegels sowohl im 24 Stunden Urin [19], als auch im Serum [1], und des Serum- Calcitonin-Spiegels [1]. Ebenso wird laut Riggs et al. [44] der altersbedingte PTH-Anstieg umgekehrt. Außerdem konnte er die Abnahme von Osteocalcin, einem wichtigen Marker der Knochenbildung im Serum nachweisen [44].

Viele klinische Studien der letzten Jahre haben teilweise widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Erfolges der Substitution mit Kalziumpräparaten zu Tage gebracht. Häufig konnte bei Frauen, deren Menopause erst ein paar (<5) Jahre her war, nur ein geringer oder gar kein Effekt durch die Ca-Gabe nachgewiesen werden [1; 5; 25; 29;

44]. Bei Frauen, die über 5 Jahre postmenopausal waren zeigten sich jedoch die protektiven Wirkungen der Kalziumgabe [5; 19; 29; 44]. Sowohl Riggs et al. [44], als auch Heaney et al. [29] sehen den Grund hierfür darin, dass die Abnahme der Knochendichte in den ersten Jahren nach der Menopause hauptsächlich durch den Estrogenmangel bedingt ist. Es kommt zu einem raschen Knochenverlust, wobei Kalzium in dieser Phase nur mäßigen Einfluss auf den Verlust von kortikalem Knochen im peripheren, nicht jedoch im zentralen Skelett hat. Der nachfolgende (ab dem ca. fünften Jahr postmenopausal) langsamere Knochenverlust ist auf die altersbedingte Umstellung der Ca-Homeostase zurückzuführen; dass heißt mangelnder Kalziumresorption, erhöhter renaler Verlust, der zu höheren Serum-PTH-Leveln und somit zu erhöhter Knochenresorption führt [19; 44]. In dieser Phase greift nun wiederum die Kalziumgabe [29; 44].

Durch die gleichzeitige Gabe von Estrogenpräparaten lässt sich die gastrointestinale Kalziumresorption wesentlich verbessern [39; 44]. Des weiteren kann auf diese Weise laut Riggs et al. [44] der oben genannte sekundäre Hyperparathyroidismus auf einen normalen PTH-Spiegel gesenkt werden.

Auch in der craniofacialen Chirurgie haben Kalziumpräparate gute Erfolge erzielt. Corrente et al. [9] füllten periimplantäre Defekte mit einem alloplastischen Knochenersatzmaterial aus Kalziumcarbonat auf. Mit dieser Defektfüllung erreichten sie ähnlich gute Resultate, wie bei Implantationen in adäquaten, nicht augmentierten Knochen.

Ebenfalls auf dem Gebiet der Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie haben Dupoirieux et al. [13; 14; 15; 16] auf der Suche nach geeigneten Knochenersatzmaterialien zahlreiche Versuche mit Vogeleischaalen durchgeführt. Laut Dupoirieux et al. [16] sollte eine neue Art der Defektfüllung geschaffen werden, die sowohl kostengünstig und quantitativ gut zu erlangen, als auch biokompatibel, stabil und im besten Falle zusätzlich osteoinduktiv ist [16]. Bis dato waren Vogeleischaalen noch nie als Knochenersatzmaterial eingesetzt worden [16], obwohl ihre chemische Zusammensetzung der Zusammensetzung von menschlichen und tierischen Knochen und Zähnen ähnelt. Die Schale besteht zu ca.

95,1% aus Mineral [16], wobei Kalzium als Hauptmineralkomponente etwa 37,3% ausmacht [16]. Es liegt zu 97,4 % in Form von Kalziumcarbonat vor [13], dem schon gute Biokompatibilität im Knochen nachgewiesen werden konnte [13]. Des weiteren finden sich neben Kalzium als Mineral 1,9% Magnesiumphosphat und 0,7% Trikalziumphosphat [13]. Die anderen chemischen Komponenten der Schale sind Wasser (1,6%) und Proteine (3,3%), die als Protein-Polysaccharidkomplex vorliegen (70% Proteine, 11% Polysaccharide) [16].

Dupoirieux et al. [13; 14; 15; 16] experimentierte mit den Vogeleischaalen sowohl in pulverisierter Form, als auch als vollständig erhaltenes und auf die jeweilige Defektform und –Größe zugeschnittenes Implantat und Onlay aus dem mechanisch sehr stabilen Straußenei (*Struthio camelus*) [13; 15]. Das Eischalenpulver (hier vom Huhn; *Gallus domesticus*) wurde zum einen in Oberschenkelmuskeltaschen von Ratten kultiviert, um eine osteoinduktive Wirkung der Substanz nachzuweisen [13; 15; 16]. Zum anderen wurden cranielle und mandibuläre ossäre Defekte verschiedener Größe [13; 15; 16] bei Ratten und Kaninchen mit dem neuen Knochenersatzmaterial aufgefüllt. Zusätzlich testeten Dupoirieux et al. die Tauglichkeit des Pulvers als Onlay [13; 16] und im Rahmen der Knochenaugmentation bei der Guided Bone Regeneration mit Membranen [14]. Die Auswertung erfolgte klinisch, röntgenologisch und histologisch.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei allen Versuchsreihen eine ausgezeichnete Biokompatibilität der Vogeleischaalen als Knochenersatzmaterial nachgewiesen werden konnte [13; 14; 15; 16]. Dies beruht sicherlich unter anderem darauf, dass Kalziumcarbonat die Hauptmineralkomponente der Schale bildet, dem auch schon gute Biokompatibilität im Knochen nachgewiesen werden konnte [13]. Durch die leichte Sterilisierbarkeit des Materials im Autoklaven besteht kein Risiko einer viralen Transmission [13; 16]. Die biologischen Fähigkeiten der Substanz bleiben beim Sterilisationsvorgang unbeeinflusst [13]. Eischalenpulver ist nicht toxisch [16], kostengünstig und quantitativ nicht limitiert [13; 16]. Vogeleischaalen lassen sich einfach und gut bearbeiten und somit in Form und Größe den Defekten gut anpassen [13]. Die Dicke und die Krümmung der Straußeneischaalen sind der menschlichen Orbita und dem Schädel sehr ähnlich [13]. Alle Implantate erwiesen sich als mechanisch äußerst stabil [13; 14; 16]. Jedoch ließ sich beim Eischalenpulver nicht die Stabilität von normalen

Knochen erreichen, so dass diese Art von Knochenersatzmaterial nur für kleinere Defekte in nicht tragenden Gebieten, wie zum Beispiel Extraktionswunden vorbehalten bleibt [13; 16]. Laut Dupoirieux et al. [13; 14; 16] fand keine Resorption statt. Leider konnte dem Material keine osteoinduktiven oder osteokonduktiven Fähigkeiten nachgewiesen werden [13; 14; 15; 16]. Bei einigen Versuchsreihen kam es zu einer minimalen Osteointegration/ partiellen Knochenregeneration vom Defektrand her, jedoch wurde eine vollständige knöcherne Regeneration nicht erreicht [13; 15; 16]. Meist wurde das Knochenersatzmaterial fibrös eingekapselt [13; 14; 15; 16].

1.1.2 Substitution mit Hormonpräparaten

In den letzten Jahren hat sich auf der Suche nach geeigneten Therapieformen bei postmenopausaler Osteoporose die Hormonersubstitutionstherapie (HST) mit Estrogenen als effektivste Behandlungsmaßnahme herausgestellt [39; 42]. Estrogene sind die wichtigsten Geschlechtshormone zur Aufrechterhaltung der skelettalen Homoestase, insbesondere Estradiol, als das wirksamste im menschlichen Organismus gebildete Estrogen [31]. Estrogenmangel führt nicht nur zu einem rapiden und fortwährenden Knochenverlust nach Menopause oder Entfernung der Eierstöcke [52], sondern trägt auch zum langsamen altersbedingten Knochenschwund bei Männern und Frauen bei [44; 49]. Während es im Alter zu einem rapiden Knochenverlust durch gesteigerten Umbau, v.a. Resorption bei Estrogenentzug kommt, führen steigende Serumestrogenspiegel in der Pubertät zu einem adaptiven Knochenanbau [7; 49; 52]. Schon geringe Estradiollevel in der frühen Phase der Pubertät stimulieren das Knochenwachstum [7; 49], wobei hohe Estradiolspiegel gegen Ende der Pubertät das Längenwachstum durch Inhibition des Knochenumbaus vermindern [7]. Ebenso berichten eine Mehrzahl der Autoren bei der postmenopausalen HST mit Estrogenen von einer Aufrechterhaltung der Knochendichte und teilweise sogar einen leichten Knochengewinn [11; 18; 39; 56].

Zahlreiche Untersuchungen sind auf zellulärer Ebene durchgeführt worden, um die Wirkung der Estrogene auf die Knochenzellen, insbesondere auf die Osteoblasten und Osteoklasten nachvollziehen zu können, um somit mögliche Therapieansätze zu optimieren. Gleichzeitig wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass der Wirkungsmechanismus der Estrogene noch nicht vollständig geklärt ist. Studien an Zellkulturen haben eine Vielzahl zum Teil widersprüchlicher Effekte auf zellulärer Ebene aufgezeigt.

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass die Knochenzellen "Ziele" der Sexualhormone, wie Estrogene darstellen, da Estrogenrezeptoren auf Osteoblasten und Osteoklasten nachgewiesen werden konnten [26; 52; 56]. Es wird vermutet, dass diese Rezeptoren nicht nur Mediatoren der direkten Wirkung von Estrogenen auf die Knochenzellen sind, sondern dass sie ebenso die mechanische Stimulation der Osteoblasten vermitteln [10]. Laut Damien et al. [10] führt der postmenopausale Estrogenmangel zu einer Verminderung der Rezeptorenzahl. Somit reduziert sich auch die mechanische Stimulation der Zellen im Alter. Ferner finden sich bei mutierten oder fehlenden Estrogenrezeptoren klinisch instabile und dünne Knochen [10]. Dagegen resultiert eine erhöhte mechanische Skelettbelastung in einer Knochenmassezunahme und einer Knochenumbauteigerung [4; 23; 37; 42; 57]. Eine Kombination aus erhöhter mechanischer Stimulation und einer Estrogensubstitution stellt sich hinsichtlich der Knochenmassezunahme als am effektivsten heraus [42; 57].

Während einige Autoren den Estrogenen eine inhibitorische Wirkung auf die Osteoblastenproliferation zuschreiben [34; 52], erwähnen andere eine Zunahme der Proliferationsrate der Osteoblasten nach Hormongabe [10; 17; 60]. Die proliferative Wirkung der Estrogene konnte durch Tamoxifen- einem "Antiöstrogen", bzw. Estrogenrezeptoragonist blockiert werden [10; 17]. Nach Gohel et al. [26] verhindern Estrogene ferner die Glukokortikoid-induzierte-DNA-Zerlegung, bzw. die durch Glukokortikoide verursachte Apoptose und den durch Lipopolysaccharide vermittelten Zelltod der Osteoblasten. Auf Ebene der Osteoblasten war nach Estrogen-Gabe ferner eine Steigerung des DNA-Gehaltes und der alkalischen Phosphatase-Aktivität zu verzeichnen. Estrogene stimulieren ebenfalls die Messenger-RNA-Spiegel der Osteoblasten für die Synthese von Prokollagen I und Kollagen I [26].

Der anti-resorptive Effekt der Estrogene, wie z.B. Estradiol wird zusätzlich über eine Hemmung der Osteoklastenfunktion vermittelt [31]. 17-beta-Estradiol aktiviert den apoptotischen Zelltod der Osteoklasten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* [20; 26; 52]. Ebenso wird laut Di Gregorio et al. [11] die Produktion der Osteoklasten bzw. ihrer Vorläuferzellen durch Hormonsubstitution unterdrückt. Des Weiteren beobachtete Spelsberg et al. [52] eine inhibitorische Wirkung der Estrogene auf die Genexpression resorbierender Enzyme.

Obwohl die Hormonsubstitution mit Estrogenen in angemessenen Dosen den postmenopausalen Knochenverlust verlangsamen oder sogar verhindern kann, erhalten nicht alle betroffenen Frauen eine derartige Therapie, da sie mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen einhergehen kann. Estrogene proliferieren das Endometrium und regen das Wachstum des Myometriums an, so dass es zu endometrischen Hyperplasien bis hin zum Krebs kommen kann [18; 31; 52]. Das Brustkrebsrisiko steigt bei Frauen mit HST [18; 31] auf Grund erhöhter Brustzellproliferation [52]. Es kann zu vaginalen Durchbruch- und Schmierblutungen kommen [18; 31]. Ebenso wurden das Auftreten venöser Thromboembolien, Flüssigkeitsretention, vasomotorischer Effekte, gutartiger, und noch seltener bösartiger Lebertumore nach Anwendung hormonaler Wirkstoffe wie z.B. Estradiol beobachtet [31]. Daher ist es von größtem Interesse die Estrogendosis möglichst gering zu halten, ohne seine positiven therapeutischen Wirkungen zu minimieren. Es wurden bereits gute klinische Ergebnisse mit niedrig dosierten Estrogenen in Kombination mit Kalziumpräparaten erzielt. Nach Ettinger [18] reichte eine Estrogendosis von 0,5mg in Verbindung mit 1500mg Kalzium pro Tag aus, um die Knochendichte aufrecht zu erhalten und dennoch die Nebenwirkungen wie Vaginalblutungen und Endometriumhyperplasie zu verringern. Ein weiterer positiver Effekt dieser Kombinationstherapie liegt in der Estrogen-bedingten erhöhten gastrointestinalen Absorption und renalen Reabsorption von Kalzium [31; 39; 44].

Veränderungen des Hormonhaushaltes stellen jedoch stets schwerwiegende Eingriffe in den menschlichen Organismus dar, die meist mit zahlreichen Nebenwirkungen behaftet sind. Daher sollte die Suche nach geeigneten Therapiealternativen zur Hormonsubstitution immer im Vordergrund stehen.

1.1.3 Elektrische und elektromagnetische Felder

Die Förderung der Knochenbildung durch exogene elektrische oder elektromagnetische Felder gibt einen weiteren Therapieansatz im Rahmen von Knochenerkrankungen wieder. Dieser beruht ebenfalls auf der Erfahrung, dass durch mechanische Belastung Umbauprozesse und eine verstärkte Osteogenese im Knochen hervorgerufen werden können. Hierbei wird die Vermutung zu Grunde gelegt, dass dies durch einen elektromechanischen Transduktionsmechanismus vermittelt wird [27].

1.2 Problemstellung

Trotz dieser zahlreichen Therapieansätze, die meist auf empirischen Erfahrungswerten beruhen und deren Therapie-Kombinationen bei der Behandlung der Osteoporose, sind die Wechselwirkungsvorgänge auf zellulärer Ebene größtenteils nur unzureichend bekannt. Inzwischen widmen sich viele Arbeitsgruppen zunehmend den Problemen der biologischen Grundlagenforschung mit dem Ziel, die Stimulationsmethoden auf eine fundiertere wissenschaftliche Grundlage zu stellen und somit optimierte Therapien zu entwickeln. Dabei sind eine Vielzahl zum Teil widersprüchlicher Effekte auf zellulärer Ebene nachgewiesen worden. Diese sind meist auf Unterschiede in der Kultur oder Versuchsdurchführung sowie auf die Komplexität des biologischen Systems zurückzuführen.

Einen möglichen Ansatz liefert die vorliegende Arbeit, in der die Reaktionen von Osteoblasten -ähnlichen Zellen auf verschiedene in der Mineral- und Hormonsubstitution bei Osteoporose angewandte Substanzen überprüft werden. Besonderes Augenmerk wird dabei zum einen auf die Gabe von Estradiol, dem wirksamsten im menschlichen Organismus gebildeten Estrogen gelenkt. Zum anderen werden zwei verschiedene Arten der Kalziumgabe getestet. Letztere erfolgt einerseits durch Zugabe von reinem Kalziumcarbonat (CaCO_3) als günstigste Kalziumquelle, da es den höchsten Kalzium-Prozentsatz aufweist. Andererseits wird die Kalziumsubstitution in Form von Hühnereischalenpulver untersucht. Auf Grund seiner natürlichen Zusammensetzung enthält Putamen ovi nicht nur Kalzium, sondern auch Mineralien und Spurenelemente, die sich positiv auf den Knochenmetabolismus auswirken können.

Hinsichtlich der Zellreaktion stellt sich die Frage, ob die zugegebenen Substanzen Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung der Osteoblasten nehmen, oder ob sie auf die gesamte Zellentwicklung einwirken. Es ist weiterhin von Interesse, wie sich die Syntheseleistung der Zellen bezüglich der Extrazellulärmatrix-relevanten Proteine und die Mineralisation bei Substitution verhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Die Zellkultur

- **Zellen:** primäre bovine Osteoblasten-ähnliche Zellen aus dem Periostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Rinder
- **Nährmedien:**
 - MM0: High Growth Enhancement Medium (High-GEM, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) + 10% fetales Kälberserum + 250 µg/ml Amphotericin + 10.000 IU/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin + 200mmol/l L-Glutamin
 - MM1: Mmo + 10 mmol/l β-Glycerophosphat + 25 µg/ml Ascorbinsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
- BSA (Bovine Serum Albumin) (International British Bio Cell)
- Collagenase (0,04%-tig) (Biochrom KG seromed®)
- Earl`s-Salzlösung
- Ham`s F10-Medium (Biochrom KG seromed®)
- HEPES-Puffer (Biochrom KG seromed®)
- Dibromol® Tinktur gefärbt (Trommsdorf GmbH & co.)
- Methanol
- PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline) / Sörenson-Puffer
- TBST (Tris Buffered Saline mit 0,1% Tween 20)
- Tyrode-Lösung (Kalzium- und Magnesium-frei)

2.1.2 Substanzen/ Medikamente

- Aar Os®/ Putamen ovi (aar pharma, Remscheid)
- Alendronat-Mononatrium / FORSAMAX® (MSD Sharp & Dohme GmbH)
- Calcitonin-ratiopharm® (ratiopharm GmbH, Ulm)
- Calciumcarbonat (Fresenius Medical Care GmbH, Bad Homburg)
- Estradiol (Jenapharm® GmbH, Jena)
- Monotridin® (Opfermann Arzneimittel GmbH)
- Os Pur® F25 (Henning Berlin GmbH & Co., Berlin)

2.1.3 Antikörper

- Anti-Bone Sialoprotein, polyclonal (ImmunDiagnostik GmbH, Bensheim; Art.-Nr. A222),
- Anti-Collagen Typ I, polyclonal (BioTrend Chemikalien GmbH, Köln; Art.-Nr. 2150-0510),
- Anti-Fibronectin, polyclonal (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA, USA; Art.-Nr.40094),
- Anti-Fibronectin-Rezeptor, monoclonal (TaKaRa Biomedical Europe S.A.,Gennevilliers, F; Art.-Nr. M022),
- Anti-Osteocalcin, monoclonal (TaKaRa; Art.-Nr. M041),
- Anti-Osteonectin, monoclonal (TaKaRa; Art.-Nr. M124),
- Anti-Osteopontin, polyclonal (R & D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt; Art.-Nr.AF808),
- Anti-Procollagen Typ I, monoclonal (TaKaRa; Art.-Nr. M011) und
- Anti-Proteoglycan, monoclonal (Chemicon Int. Inc. Temecula, CA, USA; Art.-Nr. MAB2005).

2.1.4 Analysesysteme

- Arsenazo III (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zur Kalziumbestimmung
- DAKO EnVision^{TM+}-Analysesystem (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg) für den Antigennachweis
- Kalzium/ Phosphor-Standardlösung (Kat.-Nr. 360-11, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) für die Kalziumbestimmung

2.1.5 Geräte

- Beckmann-Spektralphotometer ACTA V
- CO₂-Inkubator (Heraeus Instruments, Düsseldorf)
- Computer Counter-System CASY® I (Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen)
- Lichtmikroskop Diaphot-TMD (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Polystyrol-Kulturschalen (13,5 cm Durchmesser)
- Spiegelreflexkamera Nikon 801 (Nikon Kogaku K.K., Tokyo, Japan)
- Wachsstift PAP-Pen (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg)
- Zentrifuge Heraeus Labofuge 400R (Karl Willers Laborbedarf OHG, Münster)

2.1.6 Computerprogramme

- Bildverarbeitungsprogramm Easy Win 32 (Herolab, Wiesloch)
- Excel 2000
- SPSS 10.0 für Windows

2.2 Methoden

2.2.1 Die Zellkultur

Zur Zellgewinnung wurde in dieser Arbeit ein 1977 von Jones und Boyde [33] beschriebenes Verfahren benutzt, welches auf der Fähigkeit der Osteoblasten beruht, unter geeigneten Kulturbedingungen aus Gewebestücken auszuwachsen. Periostgewebe vom Metacarpus frisch geschlachteter Kälber diente als Ausgangsmaterial.

Die Kälberbeine wurden einmal pro Woche von einem Schlachthof aus der Umgebung bezogen und wenige Stunden nach Tötung des Tieres präpariert. Unter normalen Laborbedingungen erfolgte die Entfernung von Fell und Hufe (*Abbildung 1a*). Anschließend wurden die Beine gründlich mit Wasser abgespült und mit einer jodhaltigen Tinktur (Dibromol® Tinktur) desinfiziert (*Abbildung 1b*). Nach Entfernung des Weichgewebes unter sterilen Bedingungen mit Skalpell und Pinzette (*Abbildung 1c*) wurde das daraufhin freiliegende Periost im Bereich der Metaphyse in Streifen geschnitten und unter aseptischen Kautelen vom Knochen abgezogen (*Abbildung 1d*). Die Perioststreifen wurden mehrmals in 37°C warmer Earl's-Salzlösung sorgfältig gewaschen, danach in ca. 5 x 5 mm² große Stücke zerlegt (*Abbildung 1e*) und mit der osteogenetischen Seite nach unten in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 13,5 cm gelegt. Nach etwa 20 Minuten, die die Perioststücke zur Anheftung an den Polystyrolboden der Kulturschale benötigen, konnten sie mit 37°C warmen Nährmedium bedeckt werden, ohne dass sie sich vom Schalenboden lösten (*Abbildung 1f*).

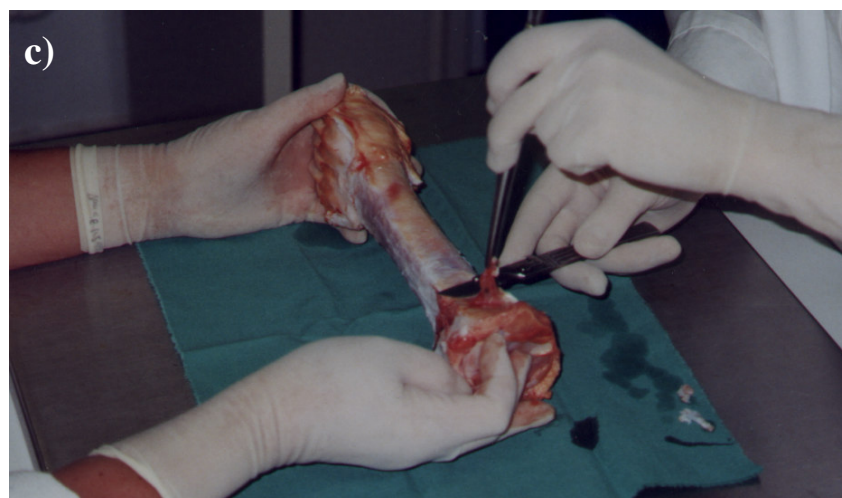


Abbildung 1a-c: Knochenzellgewinnung aus bovinem Periostgewebe: a) Kälberbeine bei der Entfernung von Hufe und Fell, b) Kälberbeine nach Desinfektion mit einer jodhaltigen Tinktur, c) Entfernung des Weichgewebes

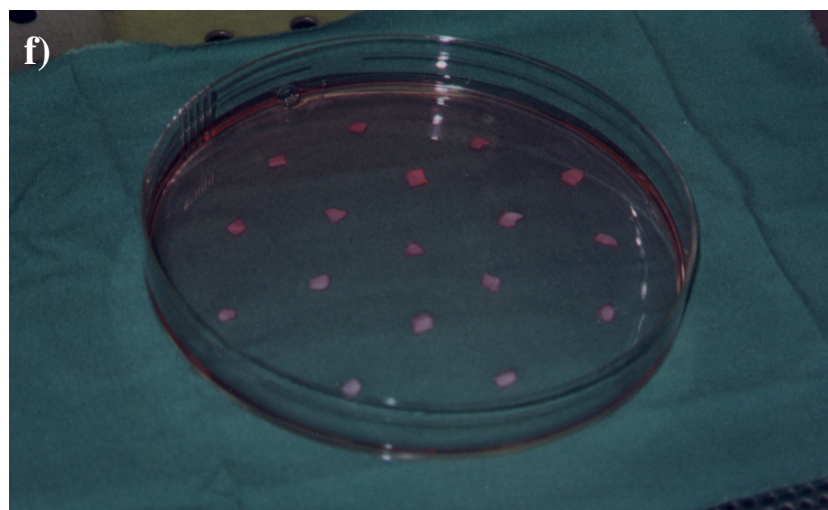
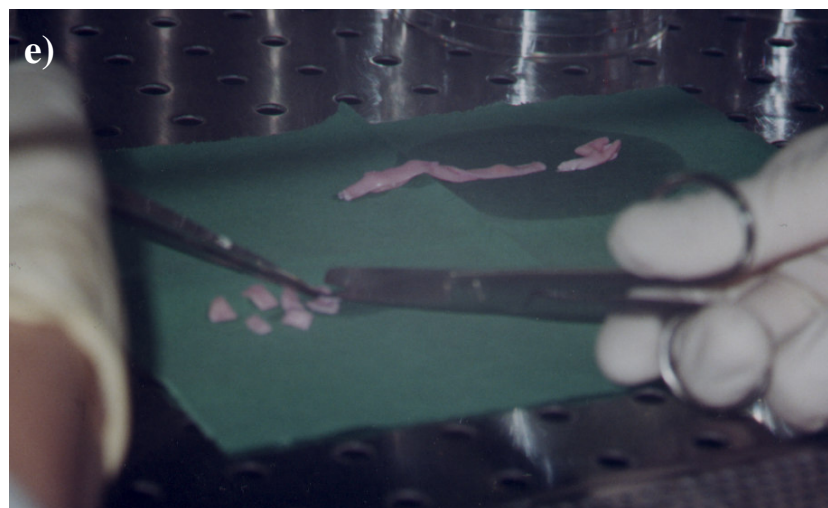


Abbildung 1d-f: d) Abziehen eines Perioststreifens von der Metaphyse, e) Zerlegen des Perioststreifens in $5 \times 5 \text{ mm}^2$ große Stücke, f) Ausgelegte Perioststücke in Kulturschale nach Bedecken mit dem Nährmedium

Als Nährmedium diente das im Folgenden als "MM0-Medium" bezeichnete Medium, welches sich aus kommerziell erhältlichem Standardmedium "High Growth Enhancement Medium" (High-GEM, ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) und jeweils frisch zugesetztem fetalen Kälberserum (10 %), Amphotericin B (250 µg/ml), Penicillin (10.000 IU/ml), Streptomycin (10.000 µg/ml) und L-Glutamin (200 mmol/l, Biochrom KG seromed[®], Berlin) zusammensetzt. Die Fütterung der Zellen fand einmal wöchentlich statt, indem das alte Medium vollständig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch neues MM0-Medium ersetzt wurde. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator bei 100% Luftfeuchtigkeit, einer Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5 % kultiviert.

Zu weiteren Versuchszwecken mussten die auf dem Polystyrolboden gewachsenen und darauf anhaftenden Zellen sorgsam abgelöst und in neue Kulturschalen ausgesiedelt werden. Hierzu wurde das Nährmedium vorsichtig abgesaugt, die Zellschicht bei 37°C für 20 Minuten mit 0,04 % Collagenase in 10 mM/l HEPES gepufferten Ham's F10-Medium (Biochrom KG seromed[®]) bedeckt und anschließend mehrmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde der Zellmonolayer 15 Minuten lang in Kalzium- und Magnesium -freier Tyrode-Lösung inkubiert. Nun konnten die Zellen mit einer Pipette vom Schalenboden abgespült und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen gegeben werden. Aus diesem wurde ein Aliquot der Zellsuspension entnommen und mit Hilfe eines Computer Counter - Systems (CASY[®]I Modell TT, Schärfe System GmbH, Reutlingen) die Zellzahl und die Zellgrößen-Verteilung bestimmt. Danach wurden die Zellen bei 500 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Tyrode-Überstandes wurde das Zellpellet mit neuem Medium versetzt. Jetzt konnten die Zellen in einer definierten Zellkonzentration in neue Kulturschalen ausgesiedelt werden. Es erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Kulturbedingungen und der Zellproliferation mit dem Lichtmikroskop (Diaphot-TMD, Nikon Kogaku K. K., Tokyo, Japan).

Für Mineralisations-Experimente wurde das MM0-Medium gegen ein im Folgenden als "MM1-Medium" bezeichnetes Nährmedium ausgetauscht, welches neben dem oben beschriebenen MM0-Medium zusätzlich frisch zugefügtes β-Glycerophosphat (10 mmol/l) und Ascorbinsäure (25 µg/ml Sigma-Aldrich, Deisenhofen) beinhaltet.

Tabelle 1: Verschiedene Nährmedien

Bezeichnung	Bestandteile	Anwendung
MM0	High-GEM + 10 % fetales Kälberserum + 250 µg/ml Amphotericin B + 10.000 IU/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin + 200 mmol/l L-Glutamin	Primärzellenanzucht
MM1	MM0 + 10mmol/l β-Glycerophosphat + 25 µg/ml Ascorbinsäure	Mineralisations- Experimente

2.2.2 Die Zellproliferation

Die aus dem Rindermetacarpusperiost ausgewachsenen Primärzellen wurden nach etwa 4 Wochen mit Collagenase vom Kulturschalenboden gelöst und in einer definierten Zelldichte zusammen mit dem Nährmedium MM0 in neue Kulturschalen ausgesiedelt. Als Aussaat-Konzentration wird die Konzentration der zugegebenen Zellsuspension [Zellen/ml] angegeben, da meist nicht alle Zellen nach der Aussiedelung an dem Polystyrolboden der Kulturschale anhaften. Die Aussaat erfolgte bei den Proliferationsexperimenten in geringeren Konzentrationen (< 100.000 Zellen/ml), was zu einer subkonfluenten Verteilung der Zellen führte (ca. 10.000 Zellen/cm²).

Die zu untersuchenden Substanzen (aar® os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat, Monotridin®, Alendronat, Os Pur®, Estradiol und Calcitonin) wurden in der Konzentration von jeweils 0,1mg Wirkstoff/ 1ml Flüssigkeit hinzugefügt. Da sich eine

Wirkkonzentration von 0,1mg /1ml bei Os Pur®, Monotridin® und Alendronat als zytotoxisch erwies (Abb. 2), wurden diese Substanzen in folgenden Konzentrationen zugegeben: Monotridin® und Os Pur® mit je 0,01mg Wirkstoff/1ml MM0 und Alendronat mit 0,001mg Wirkstoff/ 1ml MM0. Zusätzlich wurde eine Referenzkultur ohne Substanzzugabe angelegt. Die Kulturen wurden regelmäßig lichtmikroskopisch überwacht. Nach gut einwöchiger Applikation wurden die Zellen wie im Kapitel 2.2.1, S. 16 beschrieben geerntet, mit dem Zellcounter gezählt und Größenprofile erstellt.

Die Zellproliferation kann anhand der lichtmikroskopischen Beobachtung der Zellmorphologie, des Zellzahlanstieges und der Größenprofile der Zellpopulationen charakterisiert werden. Ferner erfolgte mit dem Mikroskop eine routinemäßige Kontrolle der Kulturbedingungen der bovinen Primärkultur.

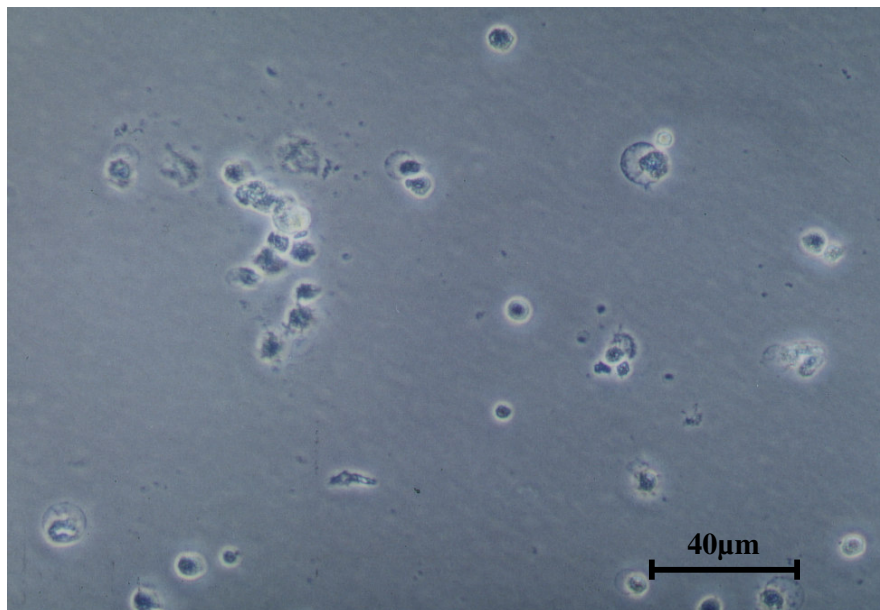


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme von Zellaggregaten abgestorbener Zellen bei zytotoxischen Wirkstoffkonzentrationen

Das nachfolgende Flussdiagramm (Abb. 3) gibt eine Übersicht über den Versuchsablauf an den ausgesiedelten Primärzellen.

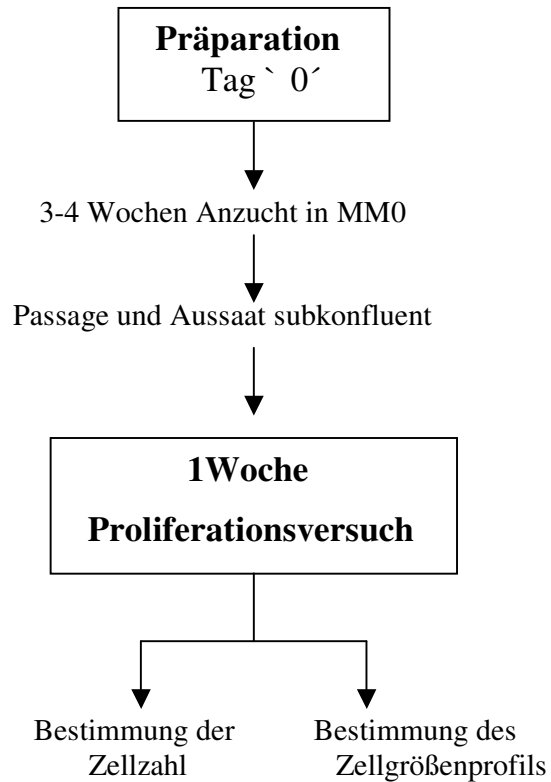


Abbildung 3: Versuchsablauf der Zellproliferations-Experimente an nach der Passage ausgesäten Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Die eine Woche lang kontinuierlich mit den jeweiligen Substanzen behandelten Kulturen sowie die unbehandelte Referenzkultur wurden hinsichtlich ihrer Zellzahl und ihres Zellgrößenprofils untersucht.

2.2.3 Die Syntheseleistung

Um die Auswirkung der Wirkstoffe auf die Zelldifferenzierung und Syntheseleistung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen zu überprüfen, wurden die ausgewachsenen bovinen Primärzellen im gewünschten Reifestadium von etwa 4 Wochen mit einer definierten Zelldichte zusammen mit dem Nährmedium MM0 in neue Kulturschalen ausgesiedelt. Die Aussaat erfolgte konfluent, was einer Zelldichte von 60.000 Zellen/cm² entspricht. Die Substanzzugabe wurde bereits im Kapitel 2.2.2, S. 17-19 beschrieben, jedoch beschränken sich die Syntheseleistungsversuche auf die Zugabe von aar® os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat (CaCO₃), Estradiol und Calcitonin. Demgegenüber stand die unbehandelte Kontrolle als Referenz. Ein Teil der Syntheseleistungsversuche lief eine Woche, der andere Teil wurde 2 Wochen lang durchgeführt.

Nach ein- /bzw. zweiwöchiger Wirkstoffapplikation wurden die Zellen geerntet, fixiert und gelabelt (Kapitel 2.3.1, S. 22-23). Anschließend erfolgte ein qualitativer und quantitativer immunhistologischer Nachweis (Kapitel 2.3.1, S. 22-23) der verschiedenen extrazellulären Matrixproteine der einzelnen Zellpopulationen für die jeweiligen Behandlungszeiträume.

Zum Nachweis der Biomineralbildung als wesentlichen Punkt der Syntheseleistung der Osteoblasten wurden weiteren Kulturen, welche ebenfalls mit einer konfluenten Zelldichte von 60.000 Zellen/cm² angesetzt wurden, 4 Wochen lang behandelt. Die Substanzen (aar® os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat, Monotridin®, Alendronat, Os Pur®, Estradiol und Calcitonin) wurden zusammen mit dem Nährmedium MM1 den Zellkulturen zugeführt. MM1 enthält neben dem bekannten MM0 als Zusatz β -Glycerophosphat als externen Phosphatlieferanten und Ascorbinsäure. Die unbehandelte Kontrolle diente wiederum als Referenz. Das Ausmaß der in den Zellpopulationen gebildeten Mineralphase wurde durch spektrometrische Bestimmung (Kapitel 2.3.2, S. 23) des gebundenen organischen und anorganischen Kalziums bestimmt.

Das nachfolgende Flussdiagramm (Abb. 4) gibt eine Übersicht über die einzelnen Versuchsabläufe an den ausgesiedelten Primärzellen.

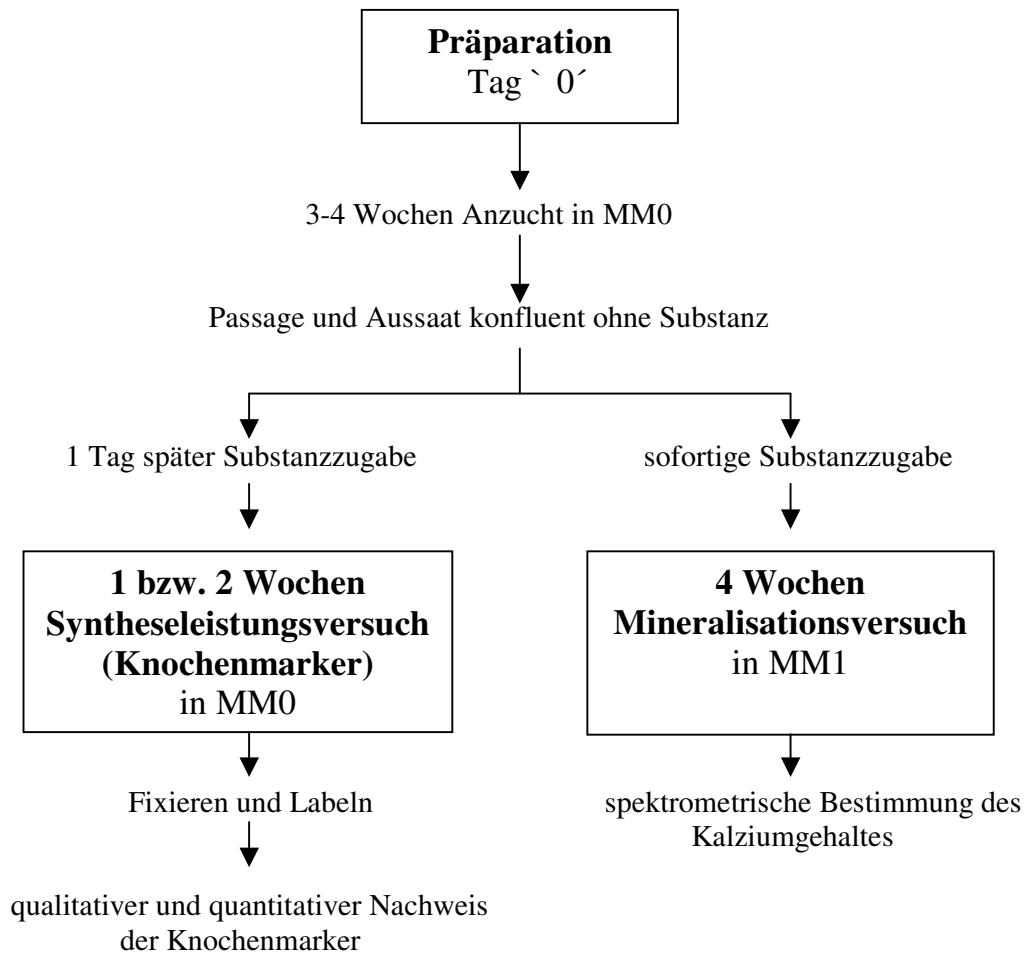


Abbildung 4: Versuchsablauf der Syntheseleistungs-Experimente an nach der Passage ausgesäten Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Der quantitative und qualitative Nachweis der produzierten Knochenmarker erfolgte an primären Rinderosteoblasten, welche eine bzw. zwei Wochen lang mit und bei der Referenzkultur ohne die jeweiligen Substanzen kultiviert wurden. Der Mineralisationsversuch zum Nachweis des Kalziumgehaltes lief dahingegen vier Wochen.

2.3 Analysemethoden

2.3.1 Immunhistochemische Färbung

Zur Beurteilung der Zelldifferation und Synthese der Extrazellulärmatrix diente der Nachweis Extrazellulärmatrix-relevanter Proteine in der jeweiligen Zellprobe. Zunächst wurde der am Polystyrolboden der Kulturschalen haftende Zellmonolayer fixiert, indem er sorgfältig mit kaltem PBS gewaschen und 10 Minuten lang, mit $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem reinen Methanol bedeckt, bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurde. Nach Abgießen des Methanols erfolgte eine Lufttrocknung der Proben, bis der noch verbliebene Alkohol vollständig verdunstet war. Um eine deutliche Abgrenzung der einzelnen Färbefelder zu gewährleisten, und um das Ineinanderlaufen nebeneinander aufgetragener Antikörperlösungen zu verhindern, wurde mit einem Wachsstift (PAP-Pen, DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg) ein Raster auf den nun fixierten Monolayer aufgemalt.

Nachdem der luftgetrocknete Zellmonolayer mit TBST (Tris Buffered Saline mit 0,1 % Tween 20) rehydratisiert worden war, wurden nach einem bestimmten Muster die jeweiligen verdünnten Primärantikörper (siehe Antikörperliste, Kapitel 2.1.3, S.11) in die Gitterfelder pipettiert und für eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit TBST, dem zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen jeweils frisch 1 % BSA (Bovine Serum Albumin) zugesetzt worden war. Im Anschluss wurde die Probe, nach Absaugen des Primärantikörpers, mehrmals mit TBST gewaschen. Die verschiedenen Antigene wurden mit dem DAKO EnVision^{TM+}-Analysesystem nachgewiesen. Im Folgenden wurde der zweite Antikörper, der je nach Herkunft des Primärantikörpers gegen Kaninchen- oder Maus-Antikörper gerichtet war, auf das jeweilige Gitterfeld pipettiert und 30 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers erfolgten weitere Waschvorgänge mit TBST, bevor das Substrat-Chromogen aufgetragen und die Kulturschalen zum Einwirken der Färbelösung 30 Minuten lang bei Raumtemperatur an einen lichtgeschützten Ort gestellt wurden. Als Chromogen diente in diesem Fall 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), welches ein unlösliches, rötlich-bräunliches Präzipitat an der Stelle des Antigens bildet.

Mit dem Lichtmikroskop erfolgte die Lokalisation der positiv gefärbten Zellen. Die quantitative Auswertung erfolgte am eingescannten und digitalisierten Bild. Mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogramms (Easy Win 32, Herolab, Wiesloch) wurde die Intensitätsverteilung der Färbung am Rechner statistisch ausgewertet und als Maß für die Antigenmenge in der Probe angesehen.

2.3.2 Kalziumbestimmung

Unter der zu prüfenden Voraussetzung, dass die Mineralbildung eine zellgesteuerte Mineralisation darstellt, wurde die chemische Kalzium-Quantifizierung im Sinne einer quantitativen "Endproduktkontrolle" als wesentliches Maß für die biologische Mineralisation der extrazellulären Matrix angesehen. Diese Methode basiert auf der Wechselwirkung des Kalzium-Kations mit dem Farbstoff Arsenazo III (Sigma-Aldrich). Unter sauren Bedingungen bildet dieses Chromogen mit Kalzium einen lila gefärbten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 600 nm, wobei die zur Kalziumkonzentration direkt proportionale Farbintensität spektrometrisch ausgelesen werden kann. Die Bestimmung des Kalziumgehaltes der Probe erfolgte anhand einer an Kalzium-Standard-Lösungen gewonnenen Eichkurve, welche aus Verdünnungen einer 10 mg/dl Kalzium/Phosphor-Standard-Lösung (Sigma-Aldrich, Kat.-Nr. 360-11) in entionisiertem Wasser hergestellt wurde. Laut Herstellerangaben zeigt der Farbstoff Arsenazo III bis zu einer Kalziumkonzentration von 18 mg/dl linear an.

2.3.3 Statistische Auswertung

Die in dieser Arbeit angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm der Standardabweichung des Mittelwertes. Zum Vergleich der Daten der verschiedenen Versuche untereinander wurde der *t*-Test für unabhängige Stichproben herangezogen. Hierbei kamen die Datenverarbeitungsprogramme "Excel 2000" und "SPSS 10.0 für Windows" zum Einsatz.

	aa r os	Alendronat	Calcitonin	CaCO3	Estradiol	Monotridin	Os Pur	Referenz
Zellproliferation								
a) Zellzahlanstieg								
b) Größenprofil								
Wirkstoffkonzentration [mg/ml Nährlg.]	0,1	0,001	0,1	0,1	0,1	0,01	0,01	x
Nährmedium	MMO	MMO	MMO	MMO	MMO	MMO	MMO	MMO
Zelldichte pro cm²	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000	10 000
Kulturfäche in cm²	143	143	143	143	143	143	143	143
Versuchsdauer in Wochen	1	1	1	1	1	1	1	1
Syntheseleistung								
a) Antikörpernachweis								
b) Mineralgehalt								
Wirkstoffkonzentration [mg/ml Nährlg.]	0,1	a) x b) 0,001	0,1	0,1	0,1	a) x b) 0,01	a) x b) 0,01	x
Nährmedium	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1	a) MMO b) MM1
Zelldichte pro cm²	60 000	60 000	60 000	60 000	60 000	60 000	60 000	60 000
Kulturfäche in cm²	64	64	64	64	64	64	64	64
Versuchsdauer in Wochen	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4	a) 1 bzw. 2 b) 4

Abbildung 5 : Überblick über die durchgeführten Versuche

3 Ergebnisse

3.1 Die Zellproliferation

3.1.1 Kontrolle der Kulturbedingungen und des Wachstums im in vitro System

Bei den durchgeführten Zellproliferationsexperimenten wurde überprüft, ob eine Hemmung oder Steigerung des Zellwachstums bei Osteoblasten-ähnlichen Primärzellen durch eine der zugegebene Substanzen hervorgerufen wird.

Nach vierwöchiger Aufzucht und anschließender Kultivierung im Nährmedium MM0 unter Zugabe der Substanzen aar® os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat, Monotridin®, Alendronat, Os Pur®, Estradiol und Calcitonin lassen alle angelegten Zellkulturen den gleichen morphologischen Ablauf erkennen.

Zunächst zeichnen sich die subkonfluent auf dem Kulturschalenboden ausgesiedelten Zellen nach einer Kulturdauer von fünf Tagen bei allen Zellkulturen durch ihre längliche, polygonale Form mit mehreren langen Zellausläufern aus (*Abb. 7a, 8a, 9a, S. 27-29*). Zwischen den benachbarten Zellen sind sowohl bei den Mineralstoffen Putamen ovi (*Abb. 7a*) und Kalziumcarbonat (*Abb. 8a*), als auch bei dem Hormon Estradiol (*Abb. 9a*) noch freie Bereiche zu erkennen. Bei den Hühnereischalenpulver- und Estradiol-Kulturen ist noch keine Orientierung der Zellen ersichtlich (*Abb. 7a und Abb. 9a*), während sich die Zellen der Kalziumcarbonat-Schalen schon annähernd parallel ausrichten (*Abb. 8a*).

Mit zunehmender Kulturdauer verdichtet sich der Zellrasen. Ab dem ca. sechsten Tag nach Versuchsbeginn nehmen die Osteoblasten-ähnlichen Zellen ein lang gestrecktes, spindelförmiges Aussehen an und orientieren sich parallel zueinander in Wirbeln und Windungen an (*Abb. 7b, 8b, 9b, S.27-29*). Bei allen Zellkulturen liegen die Zellen relativ dicht gepackt und lassen kaum noch freie Bereiche zwischen den Nachbarzellen

erkennen (*Abb. 7b, 8b, 9b*). Die ehemals langen Zellausläufer sind nur noch schwach zu sehen.

Mit steigender Zellzahl hebt sich die Orientierung allmählich auf, bis die Zellen mosaikartig dicht gepackt sind. Zwischen den einzelnen Zellen sind in diesem Kulturstadium der Eischalen-, Kalziumcarbonat- und Estradiolkulturen weder Freiräume, noch Zellausläufer erkennbar (*Abb. 7c, 8c, 9c, S. 27-29*). Etwa acht Tage nach Versuchsbeginn (ca. 5 Wochen nach Präparation) bedecken die Zellen den Kulturschalenboden als kompakten, konfluenten Zellmonolayer (*Abb. 7c, 8c, 9c*). Zwei oder mehr Zellrasen konnten nicht beobachtet werden.

Eine zytotoxische Anfangskonzentration der Wirkstoffe Os Pur®, Monotridin® und Alendronat führte in diesen Zellpopulationen anfangs zum Zelltod. Die Osteoblasten-ähnlichen Zellen bildeten keine Zellausläufer, sondern rundeten sich ab und lagen teilweise in Zellaggregaten von abgekugelten Zellen zusammen (*Abb. 6*).

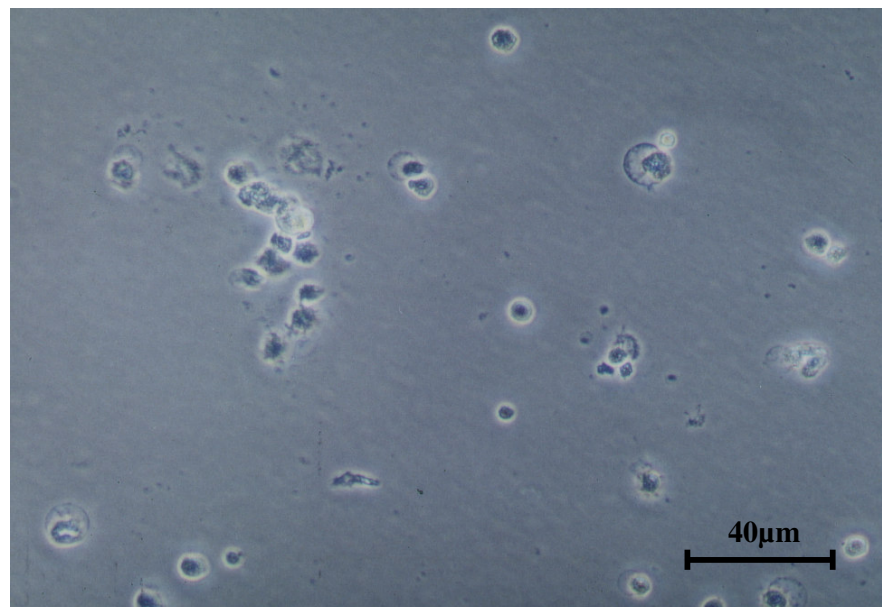


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme von Zellaggregaten abgestorbener Zellen bei zytotoxischen Wirkstoffkonzentrationen

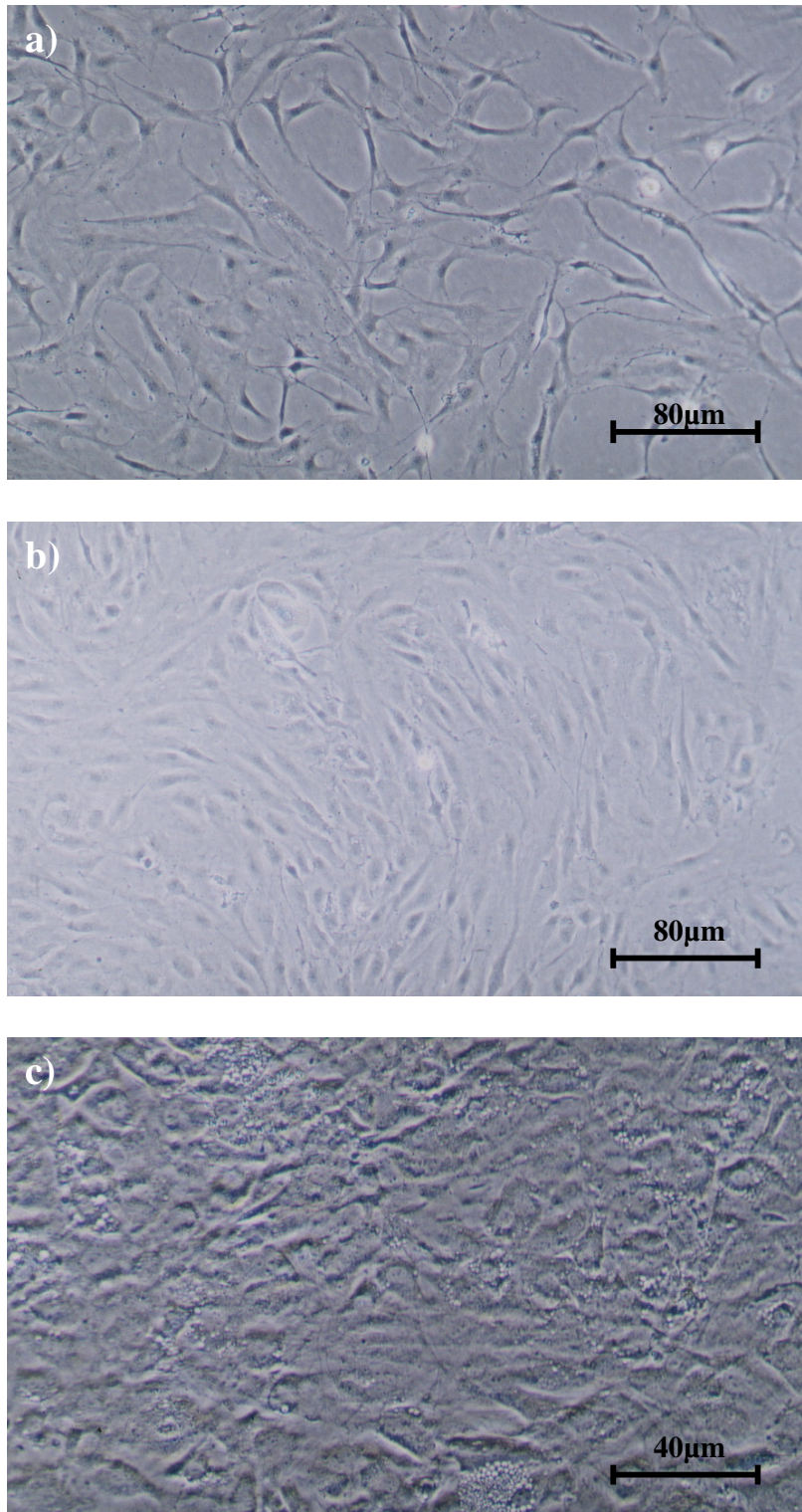


Abbildung 7a-c: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellpopulation bei Hühnereischalenpulverzugabe zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur: a) nach 5 Tagen, b) nach 6 Tagen, c) nach 8 Tagen

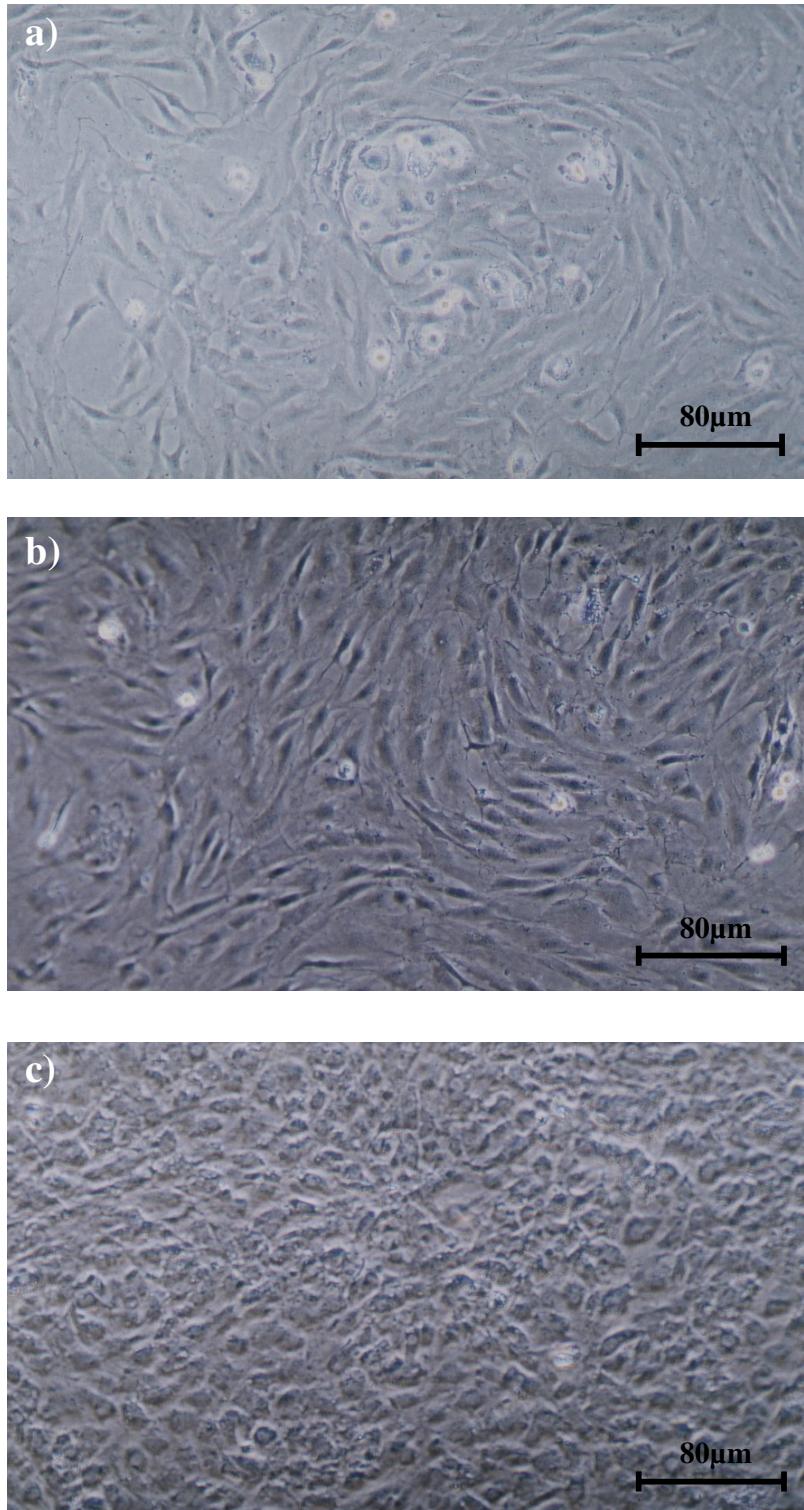


Abbildung 8a-c: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellpopulation bei Kalziumcarbonat-Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur: a) nach 5 Tagen, b) nach 6 Tagen, c) nach 8 Tagen

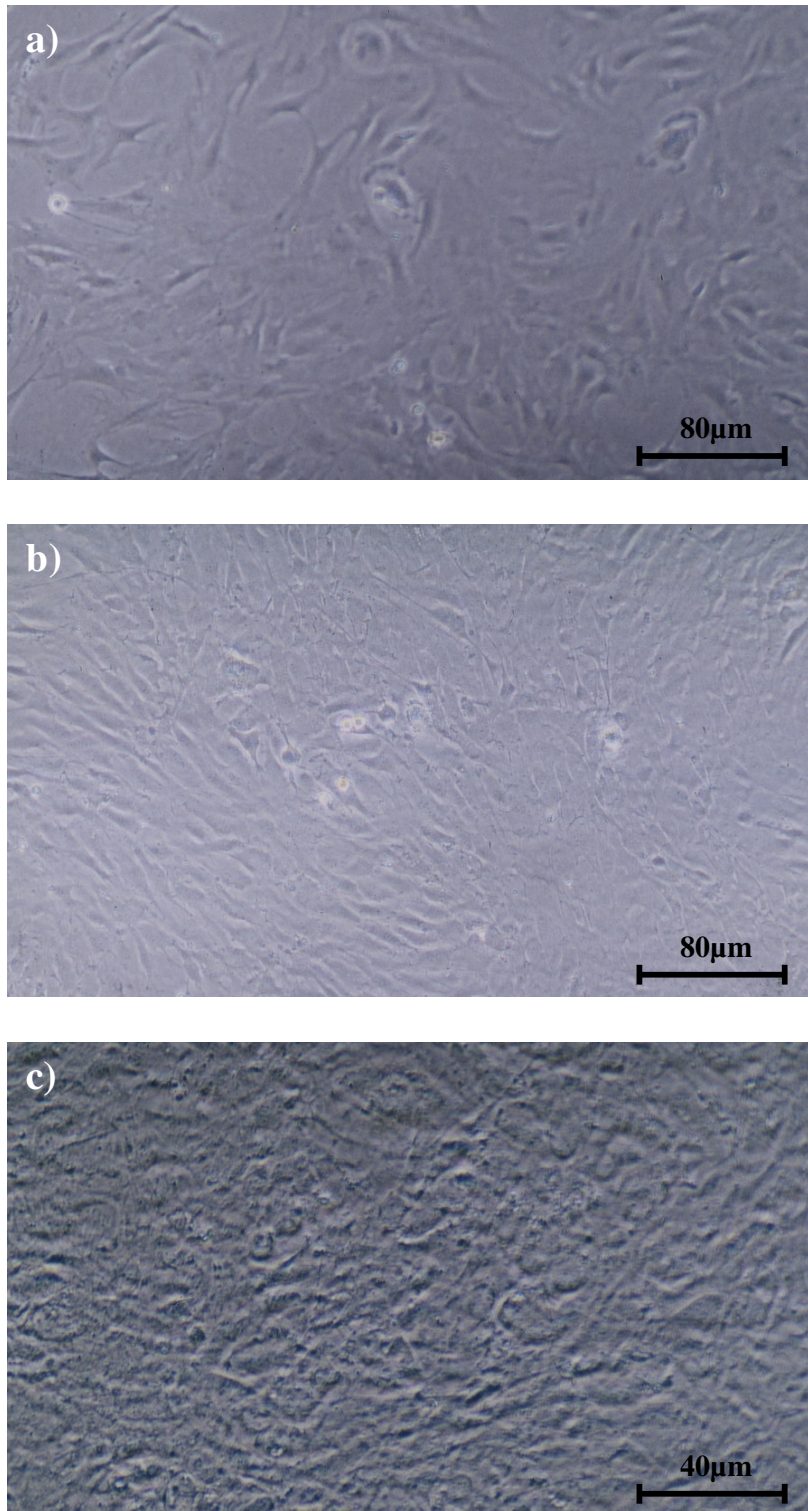


Abbildung 9a-c: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellpopulation bei Estradiol- Zugabe zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur: a) nach 5 Tagen, b) nach 6 Tagen, c) nach 8 Tagen

Neben der lichtmikroskopischen Beobachtung der Zellmorphologie wurden nach einer Woche die unterschiedlichen Zellkulturen mit dem Zellzähler hinsichtlich ihrer Zellgrößen-Verteilungen untersucht.

Abbildung 10 lässt erkennen, dass der mittlere Zellgrößendurchmesser bei allen Substanzen etwas über 17 μm (17,14 μm bei der Kontrolle bis 17,8 μm bei Os Pur®) liegt. Alle Zellpopulationen haben eine geringfügig größere mittlere Größe als die unbehandelte Kontrolle mit 17,14 μm .

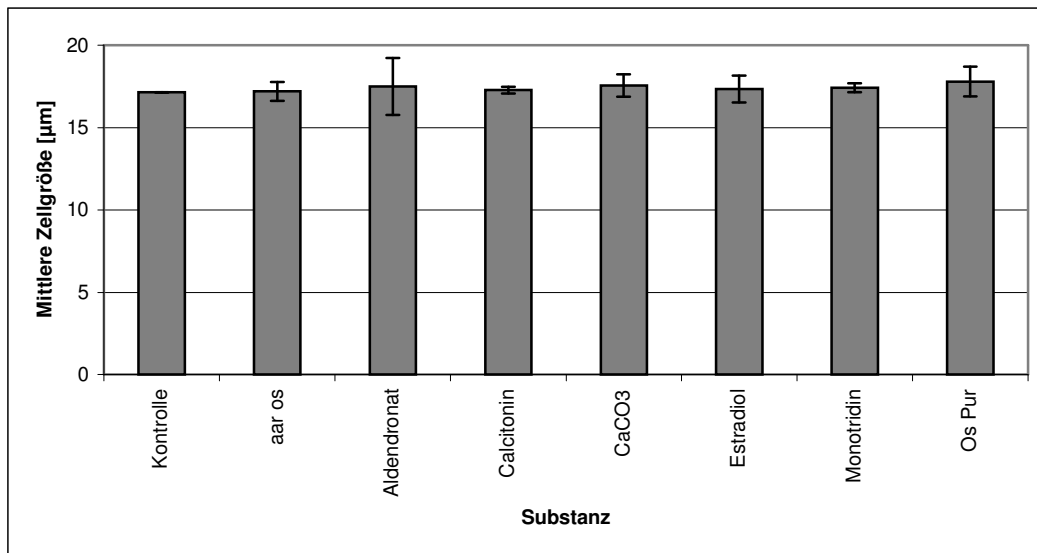


Abbildung 10: Maxima der Zellgrößenverteilung nach einer Woche Proliferationsversuch, gemessen mit dem Zellzähler ($n=6$). Die Verteilungsmaxima liegen im Durchschnitt bei etwa 17,4 μm . Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die Größenverteilungen der einzelnen Zellpopulationen bei der jeweiligen Substanzzugabe sind in *Abbildung 11a-h*, S.31-32 dargestellt. Die vitalen Osteoblasten-ähnlichen Zellen werden mit dem Zellgrößenbereich von 10 – 30 μm erfasst, wohingegen die Messsignale unterhalb von ca. 10 μm auf abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zurückzuführen sind.

Ähnlich wie bei den morphologischen Beobachtungen sind auch im Vergleich der acht Größenverteilungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Kulturen festzustellen.

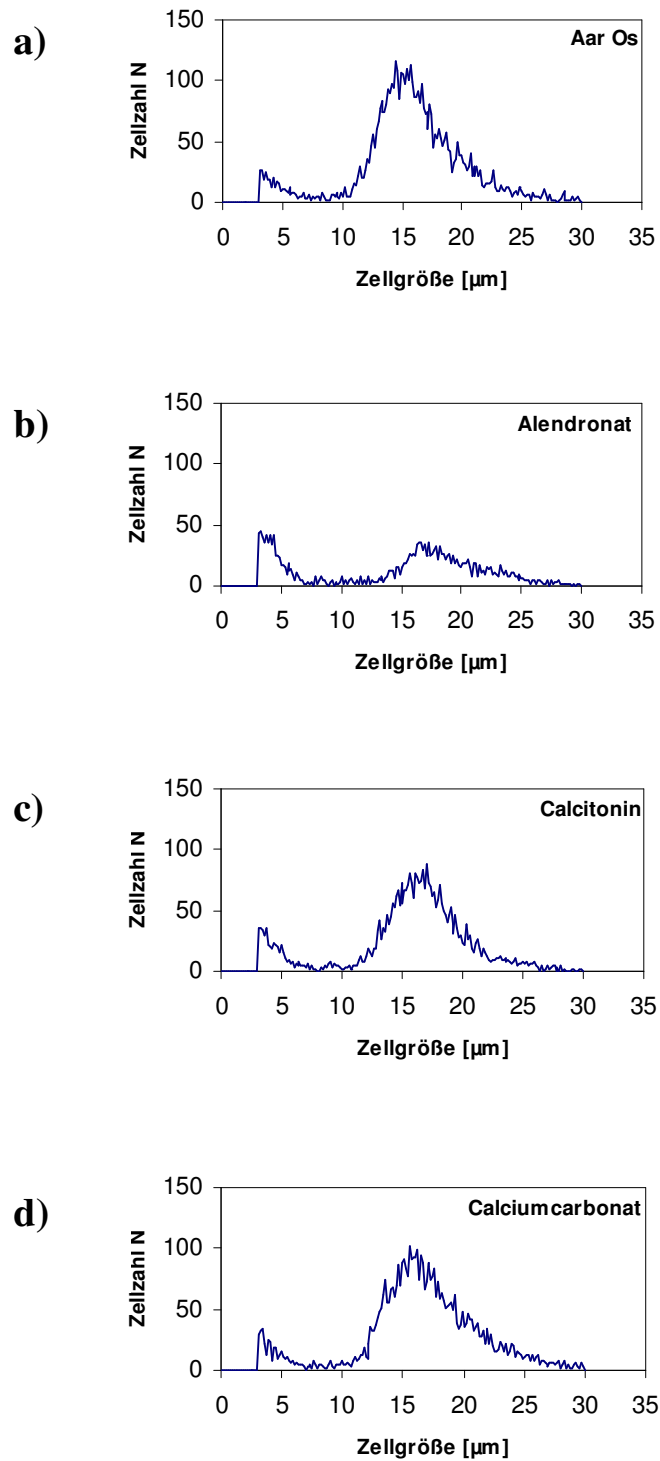


Abbildung 11a-d: Mit dem Zellcounter registrierte Zellgrößenprofile der behandelten Zellpopulationen nach einer Woche Proliferationsversuch in MMO

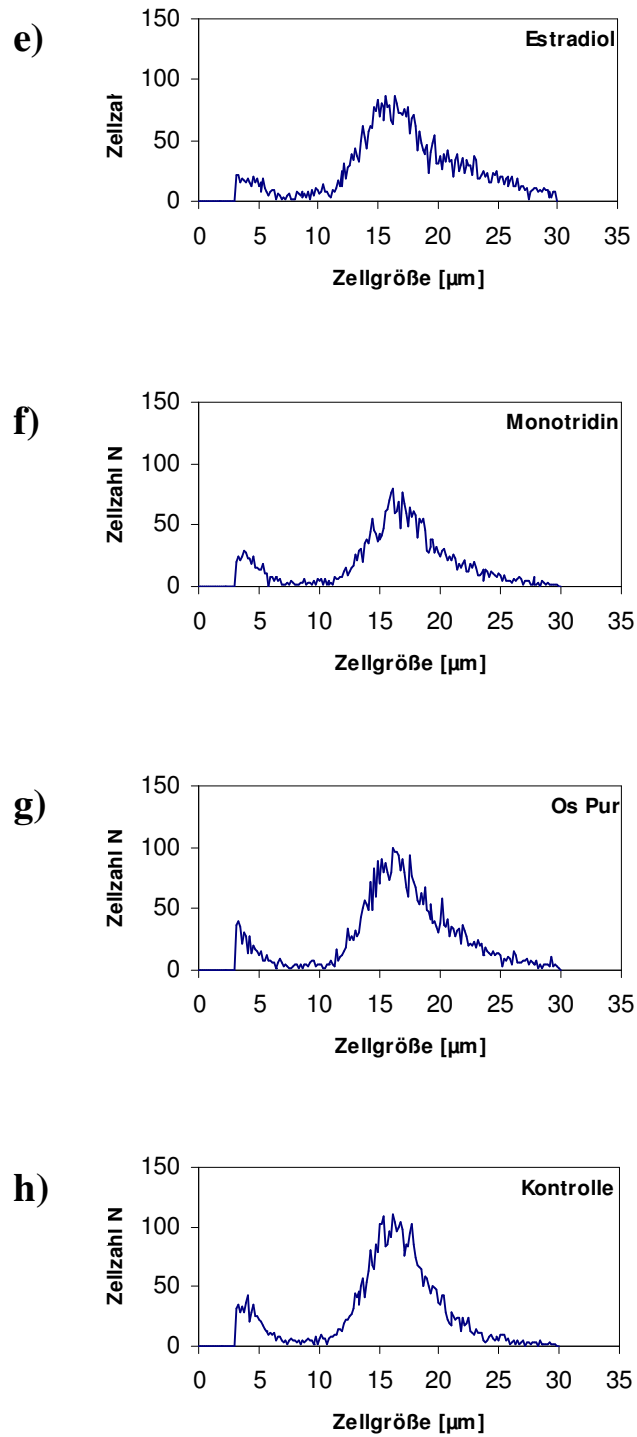


Abbildung 11e-h: Mit dem Zellcounter registrierte Zellgrößenprofile der behandelten Zellpopulationen nach einer Woche Proliferationsversuch in MM0

Die einzelnen Diagramme spiegeln im Wesentlichen die Ergebnisse des Zellzahlanstieges pro Zeiteinheit des folgenden Kapitels 3.1.2, S. 33 wieder.

Die Zellzahlen der Kulturschalen von aar® os (Abb. 11a), Kalziumcarbonat (Abb. 11d), Calcitonin (Abb. 11c), Estradiol (Abb. 11e) und Os Pur® (Abb. 11g) bewegen sich im Bereich der Werte der unbehandelten Kontrolle (Abb. 11 h) oder etwas über ihr. Im Gegensatz hierzu reichen die Zellzahlen der Monotridin®- (Abb. 11f) und Alendronatkulturen (Abb. 11b) nicht an die der Referenzkultur (Abb. 11h) heran. Dementsprechend weist die Zellkultur nach Alendronatzugabe erhöhte Zellzahlen im Messbereich unter 10 µm (Abb. 11b) auf, die auf abgestorbene Zellen und Zelltrümmer zurückzuführen sind. Dies entspricht der im Kapitel 2.2.2, S. 17 beschriebenen Problematik der vorliegenden Arbeit bezüglich der Zelltoxizität von Alendronat in den angewandten Wirkstoffkonzentrationen.

Das Größenverteilungsmaximum liegt jedoch bei allen Zellpopulationen bei Werten von etwas über 17 µm.

3.1.2 Zellzahlanstieg pro Zeiteinheit

Für die Untersuchung des Einflusses der angewandten Substanzen auf die Zellproliferation der ursprünglich subkonfluent ausgesäten Osteoblasten-ähnlichen Zellen wurden gleichzeitig mit den Zellgrößenprofilen die Zellzahlen der nun etwa fünf Wochen alten bovinen Kulturen im Zellzähler bestimmt.

Die Ergebnisse der eine Woche lang kontinuierlich behandelten Zellpopulationen sind in *Abbildung 12*, S. 34 dargestellt.

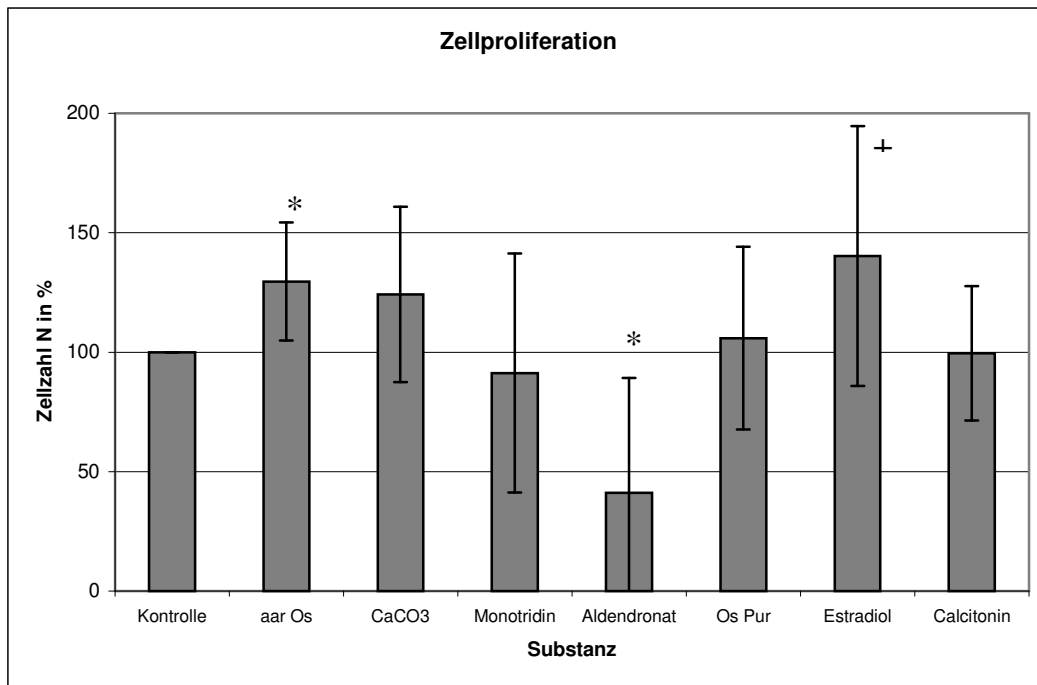


Abbildung 12: Anzahl der Zellen der eine Woche lang kontinuierlich mit aar[®] os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat, Monotridin[®], Alendronat, Os Pur[®] und Calcitonin behandelten Kulturen. Demgegenüber steht die unbehandelte Kontrolle. Die Zellzahl ist in Prozent zur angegebenen Kontrolle aufgetragen (n=14). Statistisch signifikante Differenzen zwischen der Zellzahl der behandelten Populationen und der Referenz sind durch Symbole gekennzeichnet (p<0,1 (+); p<0,05 (*)).

Abbildung 12 lässt größtenteils deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellpopulationen in Bezug auf die stimulierende Wirkung bzw. der Zu-/Abnahme der Zellzahl bei Zugabe der angegebenen Substanzen erkennen. Während nahezu keine Zu-/Abnahme des Zellwachstums bei Calcitonin (nur – 0,6%) festgestellt wurde, kam es bei Monotridin[®] zu einer Abnahme der Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle von etwa – 9%, und bei Alendronat sogar zu – 59% (p<0,05). Bei Os Pur[®] kam es zu einer Proliferationszunahme von ca. 6%. Wesentlich wird die Zellzahl der Referenz jedoch bei den mit Kalziumcarbonat (CaCO₃) stimulierten bovinen Zellkulturen mit Werten von etwa 24% überschritten. Bei Putamen ovi übersteigt die Zellzahl die entsprechende Kontrollkultur signifikant mit ca. 30% (p<0,05) und bei Estradiol sogar mit ungefähr 40% (p<0,1).

3.2 Die Syntheseleistung

3.2.1 Einfluss auf Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix im in vitro System

Um die Auswirkung der Wirkstoffe auf die Zelldifferenzierung und Syntheseleistung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen zu überprüfen, wurden die ausgewachsenen bovinen Primärzellen im gewünschten Reifestadium von etwa 4 Wochen konfluent (60 000 Zellen pro cm²) mit dem Nährmedium MM0 in neue Kulturschalen ausgesiedelt.

Nach ein- /bzw. zweiwöchiger Wirkstoffapplikation der Substanzen aar® os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat, Estradiol und Calcitonin wurden die Zellen geerntet, fixiert und gelabelt. Anschließend erfolgte ein qualitativer und quantitativer immunhistologischer Nachweis der verschiedenen extrazellulären Matrixproteine der einzelnen Zellpopulationen für die jeweiligen Behandlungszeiträume.

Der Differenzierungsgrad der Osteoblasten-ähnlichen Zellen wird durch das immunhistologische Expressionsmuster der verschiedenen Knochenmarker bzw. der Proteine als Bausteine der extrazellulären Matrix in *Abbildung 13a-d, Abb. 14a-e, S.36-37* deutlich.

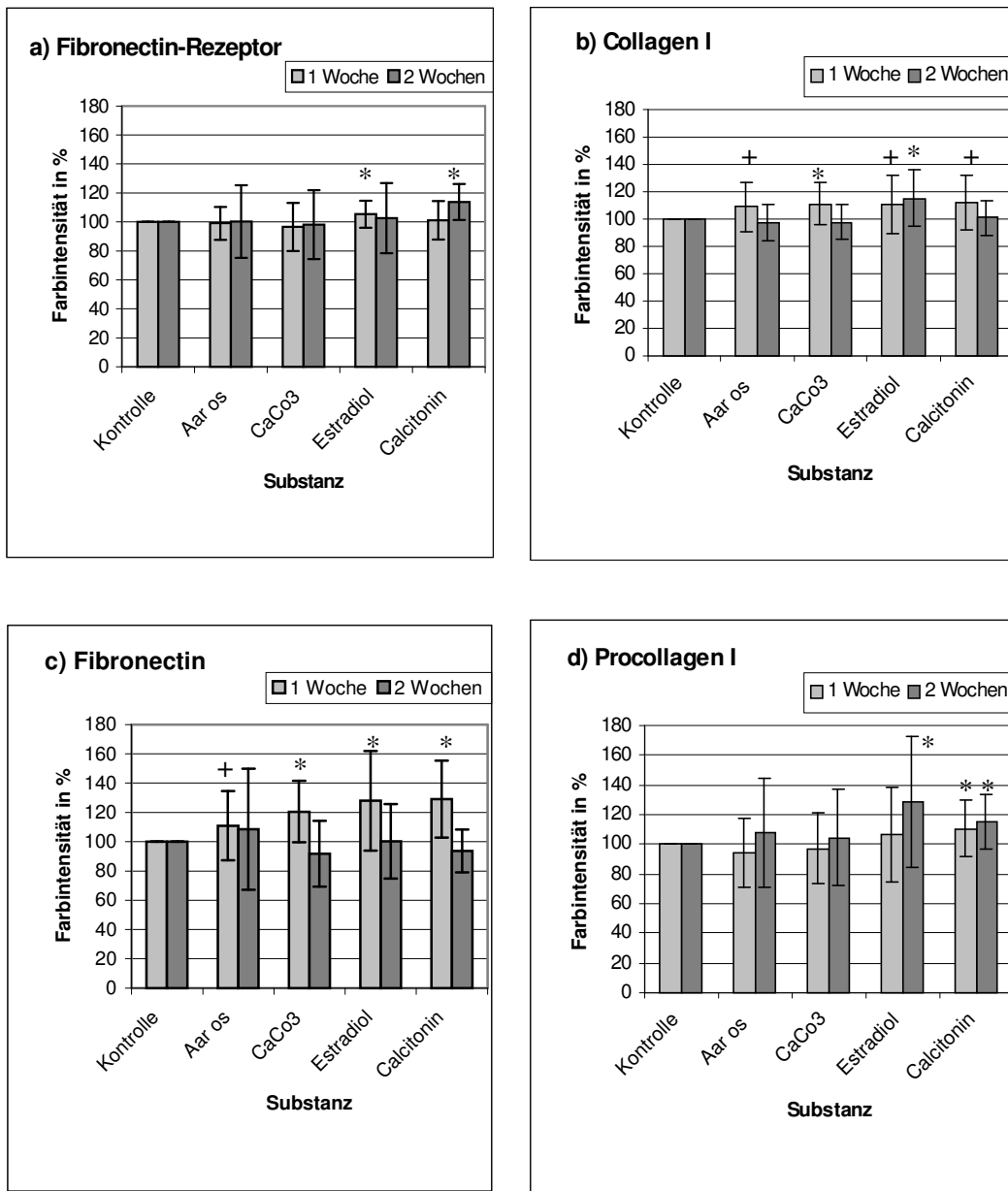


Abbildung 13a-d: Immunhistologischer Nachweis Extrazellulärmatrix-relevanter Proteine der Osteoblasten-ähnlichen Zellpopulationen für die unterschiedlich langen Behandlungs-zeiträume von einer Woche (n= 18) bzw. 2 Wochen (n=12). Statistisch signifikante Unterschiede der Syntheseleistung zwischen der unbehandelten Kontrolle und den stimulierten Zellkulturen sind mit einem Symbol gekennzeichnet (p<0,05 (*); p<0,1 (+)).

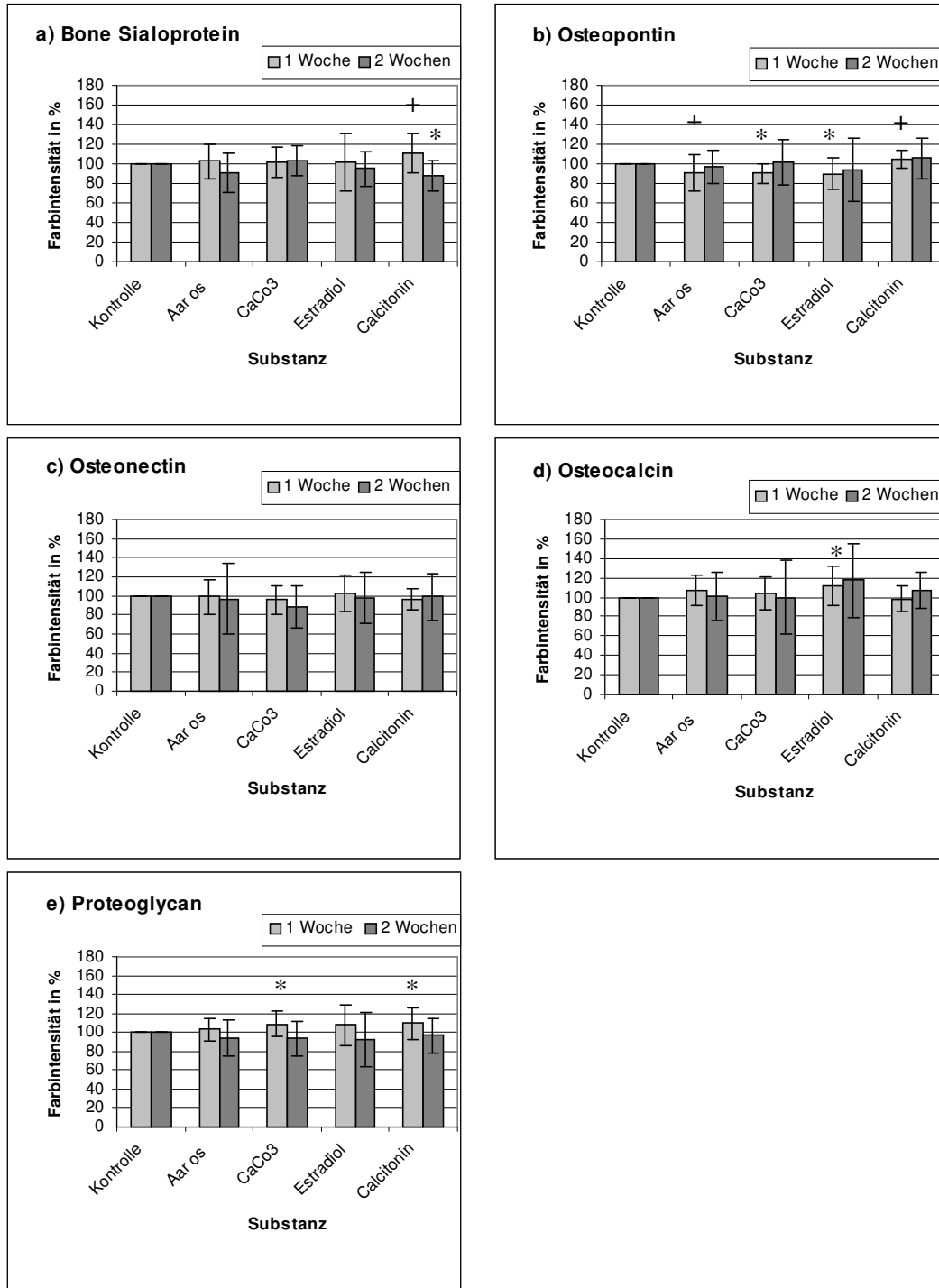


Abbildung 14a-e: Immunhistologischer Nachweis Extrazellulärmatrix-relevanter Proteine der Osteoblasten-ähnlichen Zellpopulationen für die unterschiedlich langen Behandlungszeiträume von einer Woche (n=18) und zwei Wochen (n=12). Statistisch signifikante Unterschiede der Syntheseleistung zwischen der unbehandelten Kontrolle und den stimulierten Zellkulturen sind mit einem Symbol gekennzeichnet (p<0,05 (*); p<0,1 (+)).

Der qualitative immunhistochemische Nachweis der verschiedenen Proteine der extrazellulären Matrix am fixierten Zellmonolayer fiel bei allen Zellkulturen positiv aus. An den 5 bzw. 6 Wochen alten bovinen Zellpopulationen traten deutliche Antikörper-Reaktionen von Anti-Fibronectin-Rezeptor, Anti-Fibronectin, Anti-Collagen I, Anti-Procollagen I, Anti-Bone Sialoprotein, Anti-Osteopontin, Anti-Osteonectin, Anti-Osteocalcin und Anti-Proteoglycan auf.

Ein Vergleich der Diagramme zeigt, dass die Synthese aller untersuchten Marker bei beiden Zeiträumen einem qualitativ und quantitativ relativ ähnlichen Verlauf folgt. Während Fibronectin-Rezeptor, Bone Sialoprotein, Osteonectin und Osteocalcin in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle nahezu konstant bleiben, liegen die Messwerte von Osteopontin sogar durchschnittlich leicht unterhalb der Kontrolle ($p < 0,05$; $p < 0,1$). Diese Substanzen scheinen keinen fördernden Einfluss auf die Syntheseleistung der EZM-Proteine zu haben. Bei Prokollagen I ist bei allen behandelten Zellpopulationen ein Anstieg über die Referenzwerte zur zweiten Behandlungswoche hin zu verzeichnen, wobei die gesamte Prokollagen I-Zunahme bei den Hormonen Estradiol und Calcitonin signifikant ($p < 0,05$) stärker als bei den Mineralstoffen Putamen ovi und Kalziumcarbonat ausgeprägt ist. Auffallende Unterschiede zur Kontrolle treten ebenfalls bei Kollagen I und Fibronectin auf. Hier liegen die Werten bei allen Substanzen nach der ersten Behandlungswoche signifikant über denen der Referenz ($p < 0,05$; $p < 0,1$), wobei die Hormone (Estradiol und Calcitonin) wiederum die größere Syntheseleistung zu verzeichnen haben. In der zweiten Behandlungswoche nehmen Kollagen I und Fibronectin jedoch größtenteils wieder auf das Niveau der Kontrolle ab. Dieser Trend zur Abnahme der Syntheseleistung der Proteine der extrazellulären Matrix lässt sich nahezu bei allen untersuchten Knochenmarkern und allen Zellpopulationen zur zweiten Untersuchungswoche hin erkennen.

3.2.2 Einfluss auf die *in vitro* Mineralisation der extrazellulären Matrix

Die Kultivierung der 3-4 Wochen alten bovinen Zellkultur für weitere 4 Wochen unter Zugabe der bereits erwähnten Substanzen (aar® os/ Putamen ovi, Kalziumcarbonat, Monotridin®, Alendronat, Os Pur®, Estradiol und Calcitonin) mit dem Nährmedium MM1 (MM0 plus Ascorbinsäure plus β -Glycerophosphat als externen Phosphatlieferanten) führte zur Biomineralisation der extrazellulären Matrix des Zellmonolayers. Einen Ausschnitt einer insgesamt 5 Wochen alten Zellkultur mit teilweise mineralisiertem Zellmonolayer liefert die lichtmikroskopische Aufnahme in *Abbildung 15*. Zwischen den mosaikartig dicht gepackten Zellen sind bereits mineralisierte Areale (siehe Pfeile) zu erkennen.

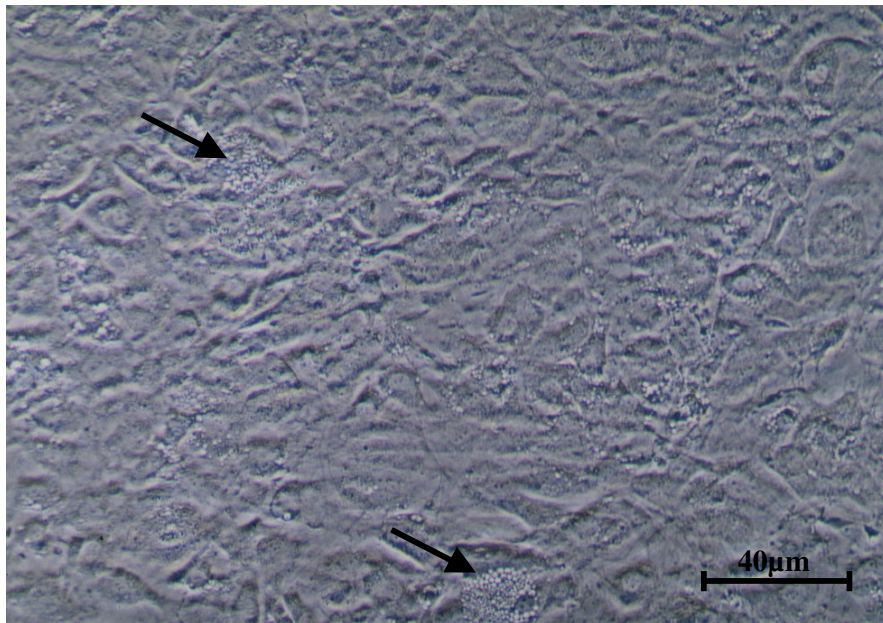


Abbildung 15: Lichtmikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme eines insgesamt 5 Wochen alten Zellmonolayers mit beginnender Mineralisierung der extrazellulären Matrix. Die Pfeile zeigen bereits mineralisierte Bereiche auf.

Des weiteren dienen die insgesamt 8 Wochen alten Zellpopulationen dem Nachweis der zellgesteuerten Mineralisation als wesentlichen Punkt der Syntheseleistung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Es wurde überprüft, ob durch die 4wöchige Behandlung mit den Substanzen eine Steigerung der Mineralbildung hervorgerufen werden kann. Der hierzu durchgeführte Kalziumnachweis ist ein wesentliches Maß für die Biomineralisation, quasi als quantitative Endproduktkontrolle der Syntheseleistung der Zellen.

Die Ergebnisse der spektrometrischen Kalziummessung zeigt die *Abbildung 16*, in der die Mittelwerte des in der Zellprobe gebundenen Kalziums gegen die verschiedenen Behandlungsarten aufgetragen sind. Demgegenüber steht die unbehandelte Kontrolle als Referenz.

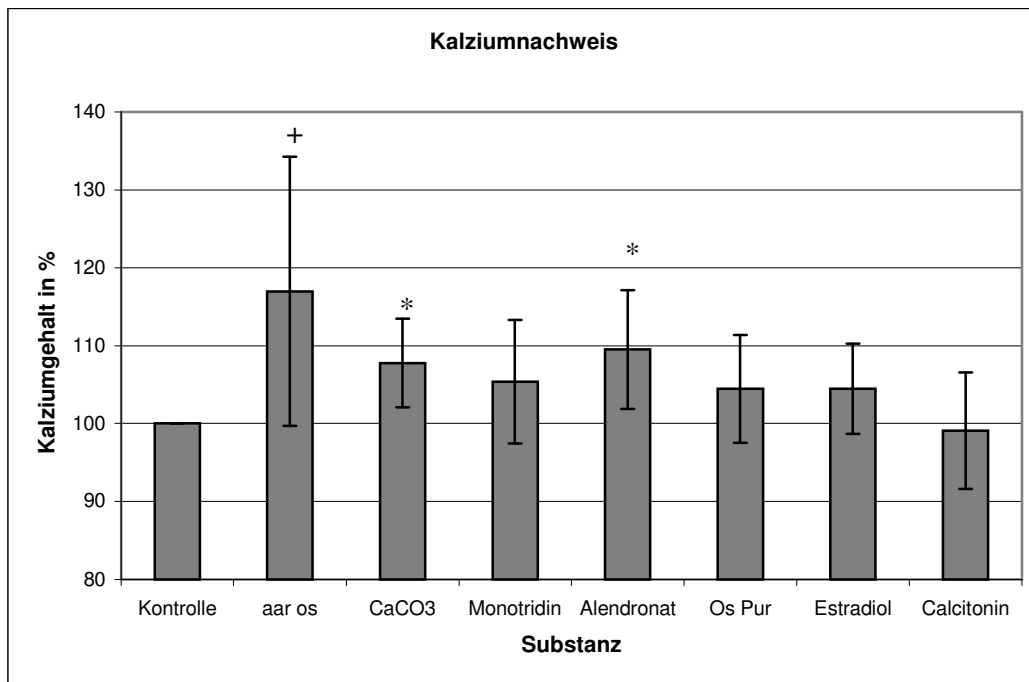


Abbildung 16: Mittelwerte des Gesamtgehalts an gebundenem organischem und anorganischem Kalzium in 8 Wochen alten Osteoblasten-ähnlichen Zellpopulationen als Funktion der Behandlungsart (n=4). Die Behandlungsdauer betrug 4 Wochen. Statistisch signifikante Unterschiede des Kalziumgehalts zwischen der unbehandelten Kontrolle und den stimulierten Zellkulturen sind mit einem Symbol gekennzeichnet ($p < 0,05$ (); $p < 0,1$ (+)).*

Die *Abbildung 16* lässt erkennen, dass bei nahezu allen behandelten Zellpopulationen mit Ausnahme von Calcitonin, der mittlere Gesamtgehalt an gebundenem Kalzium die Werte der unbehandelten Kontrolle übersteigt. Während die Kalziumkonzentration bei Calcitonin nur leicht (um $-0,1\%$) unter den Wert der Referenz sinkt, ist der mittlere Kalziumgehalt der anderen Proben bezogen auf die Kontrolle zum Teil signifikant erhöht. Somit werden mittlere Ca-Spiegel erreicht, die bei den jeweiligen Substanzen wie folgt liegen: Monotridin® 105 %, Os Pur® 104 %, Estradiol 104 %, Kalziumcarbonat 108 % ($p < 0,05$) und Alendronat 109 % ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle von 100%. Zu einem signifikant erhöhten Anstieg der Kalziumkonzentration führte die Applikation von Putamen ovi über 4 Wochen, bei der Werte von 117 % Gesamtkalzium in der Zellkultur erzielt wurden, also einen nahezu doppelt so hohen Mineralgewinn als bei allen anderen angewandten Substanzen.

	aar os	Alendronat	Calcitonin	CaCO3	Estradiol	Monotridin	Os Pur	Referenz
Zellproliferation								
a) Mittlere Zellgröße in μm	17,19	17,5	17,27	17,56	17,34	17,42	17,8	17,14
b) Zellzahlanstieg in %	129,75 (+29,57)	41 (-59)	99,42 (-0,6)	124,14 (+24,14)	140,29 (+40,29)	91,29 (-8,71)	105,86 (+5,86)	100
Syntheseleistung								
a) Zunahme der Synthese folgender Antikörper	Cl, Fn, PG	X	Fn-R, Cl, Fn, PCl, BSP, OP, PG	Cl, Fn, PG	Fn-R, Cl, Fn, PCl, OC, PG	X	X	X
b) Kalziumgehalt in %	117 (+17)	109 (+9)	99,9 (-0,1)	108 (+8)	104 (+4)	105 (+5)	104 (+4)	100

Abb. 17: Überblick über die Ergebnisse der durchgeführten Versuche

4 Diskussion

4.1 Die Zellproliferation

4.1.1 Das in vitro System

Während der Durchführung sämtlicher Substitutionsversuche wurden die bovinen Zellkulturen regelmäßig lichtmikroskopisch überwacht um die Eigenschaften und das Verhalten der Zellen zu determinieren. Die Untersuchungen zur Zellmorphologie und – Aktivität zu den verschiedenen Kulturzeitpunkten ergaben, dass die Zellen Osteoblasten-ähnlich sind.

Alle angelegten Zellkulturen lassen den gleichen morphologischen Ablauf erkennen (Kapitel 3.1.1, S. 25-26), wie er ähnlich auch in anderen Osteoblasten-Kultursystemen beobachtet wurde [3; 27]. Ein Indiz für die osteoblastische Herkunft der Zellen stellt ihre Fähigkeit dar, knochenspezifische Marker wie Osteocalcin, Bone Sialoprotein und Osteopontin zu synthetisieren [2; 8]. Alle Zellpopulationen dieser Arbeit bildeten charakteristische Proteine der extrazellulären Knochenmatrix wie Osteocalcin, Bone Sialoprotein und Osteopontin aus (Kapitel 3.2.1, S. 38). Dabei führte die jeweilige Substanzzugabe sogar zu einer verstärkten Syntheserate der angegebenen Knochenmarker.

Ebenso stellt die Fähigkeit zur Mineralisation ein charakteristisches, Osteoblastenspezifisches Merkmal dar (Kapitel 3.2.2, S. 39) [3; 8; 54]. Eine Voraussetzung für die Bildung von Hydroxylapatit-haltigem Mineral in der Zellkultur ist die Anwesenheit einer Phosphorquelle wie β -Glycerophosphat [6; 43]. Neben β -Glycerophosphat wurde dem Kulturmedium für die Mineralisationsexperimente Ascorbinsäure zugefügt um die Biomineralisation *in vitro* zu beschleunigen. Durch die Ascorbinsäure wird in Osteoblasten-Zellkulturen die Sekretion von Prokollagen I-Komponenten gesteigert. Außerdem wird die Weiterverarbeitung von Prokollagen I beschleunigt, so dass es zu

einer Stimulation der Kollagenproduktion und somit zu einer verstärkten extrazellulären Matrixbildung kommt [21; 22].

Ähnlich wie bei den morphologischen Beobachtungen sind auch beim Vergleich der Zellgrößenverteilungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Zellkulturen festzustellen (Kapitel 3.1.1, S. 30). Der mittlere Zellgrößendurchmesser liegt bei den etwa 4-5 Wochen alten Zellpopulationen bei etwas über 17 µm. Vergleichbare Ergebnisse wurden in anderen Osteoblasten-Kultursystemen beobachtet [27].

4.1.2 Zellzahlanstieg pro Zeiteinheit

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche an Osteoblasten-ähnlichen Primärzellen war von wesentlichem Interesse, ob eine Hemmung oder Steigerung des Zellwachstums durch eine der zugegebenen Substanzen hervorgerufen wird.

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass Mineralstoffe wie Kalzium, Phosphor und Magnesium unentbehrlich am Knochenstoffwechsel beteiligt sind [46]. Aber auch eine Reihe bestimmter Spurenelemente wie Mangan, Kupfer und Zink sind als Cofaktoren für die Kollagen- und Mukopolysaccharidsynthese für die Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichtes erforderlich [12; 40; 46; 53].

Die für den Knochenstoffwechsel essentiellen Mineralstoffe und Spurenelemente konnten auch in der Eischale von Hühnern nachgewiesen werden. Die Schale besteht zu ca. 95,1% aus Mineral [16], wobei Kalzium als Hauptmineralkomponente etwa 37,3% ausmacht [16]. Es liegt zu 97,4% in Form von Kalziumcarbonat vor [13], dem schon gute Biokompatibilität im Knochen nachgewiesen werden konnte [13]. Des weiteren finden sich neben Kalzium als Mineral 1,9% Magnesiumphosphat und 0,7% Trikalziumphosphat [13]. Ferner enthält Eischalenpulver relevante Mengen an Strontium und nur geringe Mengen an potentiell toxischem Aluminium, Blei, Kadmium und Quecksilber [47]. Ebenfalls gering waren die Spiegel von Vanadium, Bor, Eisen, Zink, Phosphor, Magnesium, Stickstoff, Selen, Kupfer und Chrom [47]. Je nach Fütterung und Haltung konnten große Unterschiede in den nachweisbaren Mengen von Eisen,

Selen, Kupfer, Chrom und Strontium aufgezeigt werden [47]. Die anderen chemischen Komponenten der Schale sind Wasser (1,6%) und Proteine (3,3%) [16].

Auch das in dieser Arbeit erprobte Eischalenpräparat enthält die für den Knochenstoffwechsel notwendigen biologisch wirksamen organischen und überwiegend komplex gebundenen anorganischen Bestandteile wie Kalzium, Eisen, Fluor, Kalium, Kieselsäure, Magnesium, Kupfer, Molybdän, Selen, Zink u.a. weitgehend bioverfügbar [46]. Es hat den Anschein, dass sich gerade diese Mineralstoffe und Spurenelemente im Gegensatz zu reinem Kalziumcarbonat günstig auf die Entwicklung der Knochenzellen auswirken.

Dawson-Hughes et al. [5] konnte in einer 2-Jahres-Studie an gesunden postmenopausalen Frauen nachweisen, dass die Behandlung mit reinem Kalziumcarbonat im Gegensatz zu organischen Kalziumverbindungen lediglich einen geringgradig ausgeprägten hemmenden Einfluss auf den Knochenmasseverlust hat. Übereinstimmend fanden Schaafsma et al. [48] im direkten Vergleich der postmenopausalen Supplementation mit Hühnereischalenpulver und reinem Kalziumcarbonat heraus, dass nach 12 Monaten nur die Gabe des Eischalenpulvers als zusätzliche Kalziumquelle zu einer signifikanten Zunahme der Knochendichte führte. Die Knochenmineraldichtezunahme korreliert hier mit dem nachgewiesenen Absinken der Knochenresorptions- und Knochenformationsmarker [48].

Die *in vitro* Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Kapitel 3.1.2, S. 33-34) unterstützen die *in vivo* Studie von Schaafsma et al. [48]. Nach einwöchiger Behandlung ist sowohl bei Kalziumcarbonat als auch bei Zugabe des Eischalenpulvers eine verstärkte Zellproliferation zu beobachten, wobei die Putamen ovi- Werte die Zellzahlen von reinem Kalziumcarbonat übersteigen und signifikant über denen der unbehandelten Referenz liegen. Andere Studien belegen ebenfalls die positive Wirkung von Eischalenpräparaten auf den Knochenmetabolismus. So dokumentieren Ruepp et al. [46] eine durchschnittliche Knochenmineraldichtezunahme um +9,4% nach einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von 304 Tagen mit aar® os.

Zahlreiche Untersuchungsreihen sind bezüglich der Wirkung von Estrogenen auf zellulärer Ebene durchgeführt worden. Diese Studien an Zellkulturen haben eine Vielzahl zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse hinsichtlich Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen ergaben eine signifikante Stimulation der Proliferation der Osteoblasten-ähnlichen Zellen nach Estradiolgabe um +40% gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Kapitel 3.1.2, S. 33-34). Zusätzlich erweist sich das Hormon Estradiol tendenziell stärker proliferativ als die erprobten Mineralstoffe Kalziumcarbonat (+24%) und das Eischalenpräparat (+30%).

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis bestätigen viele Autoren den signifikanten Proliferationsanstieg von Osteoblasten-ähnlichen Zellen von Ratten [10; 17] und fetalen menschlichen Osteoblasten [60] nach Gabe von 17β -Estradiol. Nach Ernst et al. [17] kam es nach 21tägiger Behandlung mit $0,1\text{nmol}$ 17β -Estradiol zu einem Zellzahlanstieg von ebenfalls +41% und bei 1nmol Estradiol sogar von +68%. Sowohl Ernst et al. [17] als auch Damien et al. [10] belegten, dass die über den Estrogenrezeptor vermittelte Stimulation der Zellproliferation durch den Estrogenrezeptormodulator ICI 182,780 reduziert [10], und durch den Estrogenrezeptoragonist Tamoxifen blockiert werden kann [10; 17].

Neben der verstärkten Zellproliferation verhindert 17β -Estradiol ferner die Glucokortikoid-induzierte-DNA-Zerlegung, als auch die durch Lipopolysaccharide vermittelte Apoptose der Osteoblasten *in vitro* und *in vivo* [26]. Dies führt nach Gohel et al. [26] zu einer verlängerten Lebensdauer der Osteoblasten. Dieser Effekt erwies sich nach 72stündiger Behandlung am stärksten bei einer 17β -Estradiolkonzentration von $0,01\text{nmol}$ [e12].

Andere Analysereihen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Zum Beispiel dokumentierten sowohl Yücel et al. [57] als auch Spelsberg et al. [52] und Keeting et al. [34] eine inhibitorische Wirkung von Estradiol auf die Proliferation von Osteoblasten-ähnlichen Zellen boviner [57] und menschlicher [52] Herkunft. Laut Yücel et al. [57] wird die Inhibition der Zellproliferation mit steigender Estradiolkonzentration (100pmol – $10\text{ }\mu\text{mol}$ Estradiol) sogar noch verstärkt. Jedoch wurde im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche das Zellkulturnährmedium alle

2 Tage ausgetauscht, um durchgehend hohe Estradiollevel zu gewährleisten [57]. Die stets hohen Estrogenspiegel könnten einen negativen Einfluss auf die Proliferation genommen haben. Dementsprechend ergab eine Studie von Di Gregorio et al. [11], dass 17 β -Estradiol *in vitro* und *in vivo* die Produktion von Osteoblasten und Osteoklasten unterdrückt. Dabei verhindert 17 β -Estradiol die "Selbsterneuerung" von frühen Osteoblastenvorläuferzellen (CFU-Osteoblasten) um fast 50% [11]. Dagegen führt Estradiolmangel zu einer gesteigerten Osteoblastengnese und Osteoklastengnese und somit wiederum zu einer Steigerung des Knochenumbaus [11; 52].

Bei den Zellproliferationsexperimenten dieser Arbeit wird das Nährmedium nur einmal direkt zu Versuchsbeginn zugegeben (siehe *Abb. 18*, S. 48), so dass anfänglich eine Stimulation des Zellwachstums über die Estrogenrezeptoren erreicht wird. Ferner wird die Glucokortikoid-induzierte-DNA-Zerlegung und die durch Lipopolysaccharide vermittelte Apoptose der Osteoblasten verhindert, wodurch die Lebensdauer der Osteoblasten verlängert wird [26]. Die bereits beschriebenen negativen Wirkungen des Estradiols, wie Verminderung der "Selbsterneuerung" der Osteoblastenvorläuferzellen [11] und die Unterdrückung der Produktion von Osteoblasten und Osteoklasten [11] kommen in diesen Versuchsreihen nicht zu tragen. Da das Estradiol in einer Art "Schubsystem" zugegeben wird (siehe *Abb. 18*), nimmt der anfängliche Estradiolspiegel stetig ab, so dass wahrscheinlich schon nach 48 Stunden kein Estradiol mehr im Medium verfügbar ist. Denn aus der Literatur ist bekannt, dass Estradiol *in vivo* eine Halbwertszeit von 50 Minuten besitzt [31]. Bereits 45 Minuten nach i.v.-Gabe findet eine Bindung am Zellkern statt und innerhalb von 48 Stunden werden das Estradiol und seine Metaboliten im Harn ausgeschieden [31].

Somit unterscheiden sich die Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit von anderen Systemen, da nicht fortwährend hohe Substanzlevel auf die Zellen einwirken, sondern immer nur ein kurzer Stimulus mit anschließender "Ruhephase" gesetzt wird. Nach der Substanzzugabe werden die Mineralien des reinen Kalziumcarbonats und des Eischalenpulvers mit in die extrazelluläre Knochenmatrix eingebaut, während das Estrogen mit der Zeit "zerfällt".

Gerade letzteres lässt die Estrogendosierung am Patienten mit täglicher Substanzaufnahme unsinnig erscheinen. Es bleibt vielmehr zu diskutieren, ob eine Dosierung in größeren zeitlichen Intervallen auch in Hinblick auf die möglichen Nebenwirkungen der Hormonersatztherapie nicht als sinnvoller anzusehen ist.

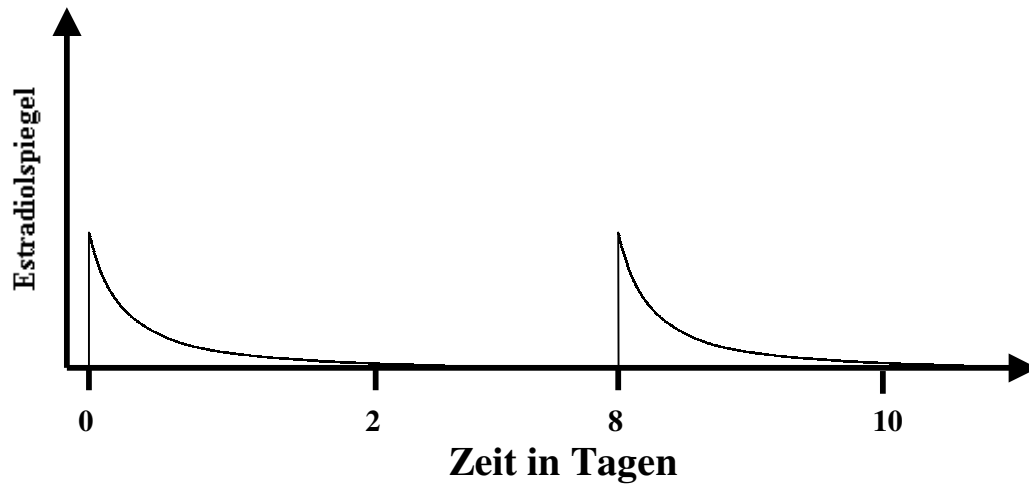


Abb. 18: Darstellung der "schubartigen" Zugabe von Estradiol zum Zellkultursystem und seines "Zerfalls" innerhalb von 48 Stunden nach Substanzzugabe

4.2 Die Syntheseleistung

4.2.1 Einfluss auf Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix im *in vitro* System

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Matrixproteinsynthese an den fünf bzw. sechs Wochen alten Osteoblasten fiel bei allen Zellkulturen positiv aus (Kapitel 3.2.1, S. 38). Substanzspezifisch konnte jedoch die Osteoblastendifferenzierung bezüglich einiger Matrixproteine stimuliert werden.

Die mit reinem Kalziumcarbonat behandelten Kulturen weisen signifikant gesteigerte Syntheseraten von Kollagen I, Fibronectin und Proteoglykan auf (Kapitel 3.2.1, S. 35-38). Kollagen I sowie Fibronectin sind Grundbausteine der extrazellulären Matrix [27; 51; 58], die bereits während der Proliferationsphase der Zellen verstärkt produziert werden und den intensiven Aufbau der organischen Matrix anzeigen. Fibronectin ist ferner beteiligt an der Anhaftung und Adhäsion der Zellen [27; 35; 59]. Dagegen wird Proteoglykan erst nach der Proliferation aktiv synthetisiert [27; 45] und weist auf die Reifung der zuvor gebildeten, kollagenen Matrix hin [27; 41]. Die organische Matrix wird hierdurch modifiziert und für die Einlagerung von Mineral vorbereitet [27; 41].

Dagegen konnte Schaafsma et al. [48] keine Stimulation der Expression von Kollagen I nachweisen. In Übereinstimmung mit den *in vivo* Ergebnissen von Schaafsma et al. [48], Fardellone et al. [19], Aloia et al. [1] und Gambacciani et al. [25] konnten keine weiteren signifikanten Veränderungen bzw. Stimulation der Expression der biochemischen Knochenmarker bei Kalziumsubstitution nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.1, S. 35-38).

Sowohl Riggs et al. [44], als auch Fardellone et al. [19] beschreiben dagegen sogar eine signifikante Reduktion aller Marker des Knochenbaus (Osteocalcin [nur 44], PTH, knochenspezifischer alkalischer Phosphatase) und der Knochenresorption (Hydroxyproline, Pyridinoline, Deoxypyridinoline) bei der Behandlung mit Kalziumpräparaten.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten Expressionsraten von Kollagen I, Fibronectin und Proteoglycan in der vorliegenden Arbeit ist die schubartige Substanzzugabe. Reines Kalziumcarbonat wird nur einmal pro Woche zusammen mit dem neuen Nährmedium zugegeben, so dass es einen Stimulus für die Synthese der genannten extrazellulären Matrixproteine in der frühen Osteoblastendifferenzierung setzt. Jedoch müssten noch weitere Langzeitstudien folgen, um die Wirkung von Kalziumcarbonat auf die Osteoblastendifferenzierung *in vitro* und *in vivo* aufzuzeigen.

Obwohl der Effekt der Kalziumersatztherapie auf die Syntheseleistung der Osteoblasten schwächer ist als die Auswirkungen der Substitution mit Estrogen (Kapitel 3.2.1, S.38), gilt die Kalziumsubstitution trotzdem als sichere, gut tolerierte und kostengünstige präventive Maßnahme zur Vorbeugung der altersbedingten Osteoporose [44].

Ähnlich der mit Kalziumcarbonat behandelten Kulturen, konnten auch bei den mit dem Eischalenpräparat substituierten Zellkulturen signifikant erhöhte Expressionsmuster der extrazellulären Matrixproteine Kollagen I und Fibronectin nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.1, S. 35-38). Sie deuten auch hier als Strukturproteine der EZM [27; 41] auf einen intensiven Aufbau der organischen Matrix hin [27; 51; 58] und spielen daher sowohl in der Zellkultur als auch *in vivo* eine essentielle Rolle in der Knochenbildung. Hinsichtlich der anderen untersuchten biochemischen Knochenmarker, wie Fibronectin-Rezeptor, Prokollagen I, Bone Sialoprotein, Osteonektin, Osteokalzin, und Proteoglycan konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Referenz aufgezeigt werden (Kapitel 3.2.1, S. 35-38). Lediglich bei Osteopontin lagen die Werte signifikant unterhalb der Kontrolle (Kapitel 3.2.1, S.38).

Einen weiteren Vergleich der Auswirkung der Substitution mit reinem Kalziumcarbonat und Hühnereischalenpulver auf die Osteoblastendifferenzierung liefert die Publikation von Schaafsma et al. [48]. Schaafsma analysierte in einer 1-Jahres-Studie mit 85 gesunden Frauen in der Postmenopause (mindestens 5 Jahre postmenopausal) die Wirkung von reinem Kalziumcarbonat und Hühnereischalenpulver auf die Knochenmineraldichte, die biochemischen Knochenmarker, wie Kollagen I und die Marker des Kalziummetabolismus (knochenspezifische alkalische Phosphatase, Deoxypyridinoline, Calcitonin, PTH, Calcidiol, Kalziumkonzentration im Urin). Nach 12monatiger Behandlung konnte nur bei der Substitution mit dem Eischalenpräparat ein

signifikanter Anstieg der Knochenmineraldichte nachgewiesen werden. Diese Steigerung korreliert mit einer signifikanten Abnahme der Marker der Knochenresorption und Knochenformation [48].

Die oben genannten Ergebnisse bestätigen, dass Vogeleischaalenpräparate durchaus als adäquate Kalziumquellen zur Prävention der Osteoporose und zur Unterstützung der Hormonersatztherapie anzusehen sind.

Die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen nach der Behandlung mit Estradiol ergab signifikant erhöhte Expressionsprofile von Prokollagen I, Kollagen I, Fibronectin, Fibronectin-Rezeptor und Osteokalzin (Kapitel 3.2.1, S. 35-38). Während die Werte für Osteopontin wieder leicht unterhalb der Referenz lagen, zeigten die übrigen Expressionsmuster der Matrixproteine keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (Kapitel 3.2.1, S.35-38).

Prokollagen I als Vorläufer von Kollagen I, gehört wie Kollagen I und Fibronectin zu den Grundbausteinen der EZM, die bereits während der Proliferationsphase der Osteoblasten gebildet werden [27; 51; 58]. Die gesteigerten Syntheseraten von Prokollagen I und Kollagen I in der vorliegenden Arbeit unterstützten weitere *in vitro* und *in vivo* Studien anderer Autoren. So berichten sowohl Gohel et al. [26] als auch Ernst et al. [17] von erhöhten messenger-RNA-Spiegeln für Prokollagen I [26] und Kollagen I [17; 26] nach Estrogenbehandlung an Rattenosteoblasten. Dabei fand eine maximale Stimulation der Kollagen I-Synthese bei einer 17β -Estradiolkonzentration von 1nM und 10nM statt [17]. Schlegel et al. [50] führte eine *in vivo*-Studie an postmenopausalen Frauen durch, die Estrogendosen von 0,3mg/Tag (Gruppe 1), 0,6mg/Tag (Gruppe 2) und 1,25mg/Tag (Gruppe 3) über 6 Monate erhielten. Im Unterschied zu den oben genannten Ergebnissen diagnostizierte Schlegel keine signifikanten Veränderungen der biochemischen Knochenmarker wie Prokollagen I und Kollagen I *in vivo* [50]. Dies korreliert mit der *in vitro*-Analyse von Yücel et al. [57], die ebenfalls keine Stimulation der Kollagen I-Synthese nach Estradiolgabe nachweisen konnte.

Osteokalzin gilt als Marker der späten Osteoblasten-Differenzierung [2; 27; 30], der in direktem Zusammenhang mit der Biomineralbildung steht [3; 27; 28] und das Einsetzen und Fortschreiten der Mineralisation in der Kultur fördert [27; 41]. Auf Grund seiner

hohen Affinität zu Kalzium und Hydroxylapatit spielt es eine essentielle Rolle bei der Kontrolle der Initiation, des Wachstums sowie der Größe von Hydroxylapatitkristallen im Laufe der Knochenbildung [30; 37]. Im Gegensatz zu der signifikant erhöhten Expressionsrate von Osteokalzin in der vorliegenden Arbeit, ergaben die Untersuchungen anderer Autoren keine statistisch signifikante Zunahme der Osteokalzinspiegel nach 17β -Estradiolgabe *in vitro* [34; 57] und *in vivo* [1]. In der *in vivo*- Studie von Aloia et al. [1] an 71 Frauen in der Postmenopause wird nach Hormongabe sogar eine Verminderung des Serumosteokalzinlevels beobachtet [1]. Dagegen konnten die Zellkulturstudien an menschlichen [34] und tierischen [57] Osteoblasten trotz Gabe von 17β - Estradiolkonzentrationen von 1pmol bis 1nmol [34] und 100pmol bis 10 μ mol [57] keine signifikante Stimulation der Expressionsprofile von Osteokalzin bestätigen [34; 57]. Im Zusammenhang mit der mechanischen Stimulation der Osteoblastenkultursysteme durch eine uniaxiale Dehnung konnte Yücel et al. [57] jedoch eine vermehrte Produktion der extrazellulären Proteine Osteokalzin und Osteonektin nach Zusatz von hohen Estradiolspiegeln (10nmol und 10 μ mol) aufzeigen. Dies bestätigt die Ergebnisse verschiedener Autoren, die demonstrieren konnten, dass uniaxiale Dehnung einen bedeutsamen Einfluss auf das Proliferations- und Differenzierungsverhalten osteoblastärer Zellen hat [23; 32; 36; 37; 38]. Letzteres verdeutlicht die enorme Wichtigkeit des Zusammenspiels vieler Komponenten wie Kalzium- und Hormonersatztherapie, aber auch die physiologische Belastung des Bewegungsapparates in Hinsicht auf eine Aufrechterhaltung des Knochenmetabolismus im Alter.

4.2.2 Einfluss auf die *in vitro* Mineralisation der extrazellulären Matrix

Die im Kapitel 3.2.2, S. 39-41 vorgestellten Untersuchungen dienten dem Nachweis der zellgesteuerten Mineralisation als wesentliches Merkmal der Syntheseleistung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen. Der hierzu durchgeführte spektrometrische Kalziumnachweis ist ein wesentliches Maß für die Biomineralisation, quasi als quantitative Endproduktkontrolle der Syntheseleistung der Zellkulturen. Wie bereits im Kapitel 4.1.1, S. 43 beschrieben, ist die Anwesenheit einer Phosphorquelle eine Grundvoraussetzung für die Bildung von Hydroxylapatit-haltigem Mineral in der Kultur [6; 43]. Daher wurde dem Nährmedium für die Mineralisationsexperimente β -Glycerophosphat als Phosphatlieferant zugeführt. Neben β -Glycerophosphat wurde dem Kulturmedium noch Ascorbinsäure zugefügt um die Biomineralisation *in vitro* zu beschleunigen [21; 22] (Kapitel 4.1.1, S.43).

Nach 4wöchiger Behandlungsdauer mit den jeweiligen Substanzen konnte bei allen Zellkulturen eine Steigerung der Mineralbildung gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden (*Abb. 16*, S.40). Dabei konnte die Biomineralbildung bei reinem Kalziumcarbonat um 8% auf 108% ($p < 0,05$) und bei Estradiol um 4% auf 104% gegenüber der unbehandelten Kontrolle von 100% erhöht werden (Kapitel 3.2.2, S. 40-41). Zu einem signifikant erhöhten Anstieg der Kalziumkonzentration führte die Applikation des Hühnereischalenpräparates, bei der Werte von 117% Gesamtkalzium in der Zellkultur erzielt wurden, also einen nahezu doppelt so hohen Mineralgewinn als bei allen anderen angewandten Substanzen (Kapitel 3.2.2, S.40-41).

Leider mangelt es noch an Zellkulturstudien um die oben genannten Ergebnisse zu vergleichen. Jedoch sind zahlreiche *in vivo*- Studien mit Frauen in der Postmenopause durchgeführt worden, welche die positiven Auswirkungen der Kalzium- und Hormonsubstitution auf die Knochenmineraldichte unterstreichen. Eine Analyse von 20 Kalziumuntersuchungen der letzten 20 Jahre zeigte, dass bei Kalziumsubstitution ein geringerer jährlicher Knochenverlust (-0,014%) als bei den unbehandelten Kontrollen (-1%) auftritt [39]. Studien, in denen Kalzium- und Estrogensubstitution direkt miteinander verglichen wurden, belegten, dass Estrogene effektiver [39; 44] sind und teilweise sogar einen kleinen aber oft signifikanten Knochengewinn produzieren [39].

Bezüglich der Kalziumsubstitution muss jedoch differenziert werden, ob sich die behandelten Frauen mehr als 5 Jahre in der Postmenopause befinden. Während der ersten 5 Jahre nach der Menopause konnten zahlreiche Autoren trotz Kalziumgabe einen raschen Knochenverlust mit signifikanter Reduktion der absoluten Knochenmineraldichte demonstrieren [5; 25; 44]. Bei Frauen, die über 5 Jahre postmenopausal waren, führte die Kalziumsubstitution nicht nur zu einem signifikanten Anstieg der Kalziumspiegel im 24-Stunden-Urin und Serum, sondern auch zu einer erhöhten Knochenmineraldichte gegenüber der Referenz [5; 44]. Dies wird durch die *in vitro* Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt, da auch auf zellulärer Ebene ein signifikanter Mineralgewinn durch die Osteoblastenbehandlung mit Kalziumcarbonat nachgewiesen werden konnte (Kapitel 3.2.2, S. 39-41).

Die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführten Zellkulturanalysen bestätigen die Ergebnisse anderer *in vivo*- Untersuchungen an postmenopausalen Frauen hinsichtlich des Mineralgewinns durch die Applikation von Hühnereischalenpulver [48]. Schaafsma et al. [48] verglich in einer 1Jahres-Studie an Frauen, deren Menopause mehr als 5 Jahre zurück lag die tägliche Substitution mit Kalziumcarbonat und Hühnereischalenpulver als Nahrungsergänzung. Dabei führte nur die Gabe des Eischalenpulvers zu einer Erhöhung der Knochenmineraldichte an der Lendenwirbelsäule [48]. Die positive Wirkung des Eischalenpulvers wird durch die Arbeit von Ruepp et al. [46] untermauert. Er fand eine durchschnittliche Zunahme der Knochenmineraldichte um +9,4% an den Lendenwirbeln postmenopausaler Frauen nach durchschnittlich 304 Behandlungstagen mit dem Hühnereischalenpräparat aar® os [46]. Die in den oben genannten Studien und in der vorliegenden Arbeit beschriebene Überlegenheit der Präparate aus Vogeleischaalen gegenüber reinem Kalziumcarbonat wird durch die Experimente von Dawson-Hughes et al. [5] bekräftigt. Laut Dawson-Hughes zeigt die Behandlung mit reinem Kalziumcarbonat im Gegensatz zu organischen Kalziumverbindungen lediglich einen geringgradig ausgeprägten hemmenden Einfluss auf den Knochenmasseverlust [5].

Im Gegensatz zu den *in vitro* Resultaten der vorliegenden Arbeit, bei denen das Hormon Estradiol den Kalziumpräparaten bezüglich des Mineralgewinns leicht unterlegen war (Kapitel 3.2.2, S. 39-41), gilt Estrogen weiterhin jedoch als ‘Hauptthormon‘ für die

Aufrechterhaltung der Knochenmasse erwachsener Frauen [52]. Estrogenmangel, bedingt durch die Menopause oder die Entfernung der Eierstöcke führt zu einem gesteigerten Knochenumbau, v.a. Resorption, so dass es zu einem raschen Knochenmasseverlust kommt [26; 52]. Ebenso wurden niedrige Estrogenspiegel mit menstruellen Dysfunktionen heranwachsender und junger erwachsener Frauen in Zusammenhang gebracht, die in einer verminderten Knochendichte resultieren [7]. Laut Cadogan et al. [7] ist Estradiol die wichtigste Determinante des Knochenmineralgewinns bei Mädchen in der Pubertät, und wird dementsprechend signifikant positiv assoziiert mit einem Anstieg der absoluten Knochenmineraldichte des Körpers.

Letzteres wird durch zahlreiche Studien wie z.B. die von Prince et al. [42] unterstrichen, in der 120 postmenopausale Frauen mit geringer Knochendichte am Vorderarm in einer 2Jahres-Studie bezüglich ihrer Knochendichte untersucht wurden. Die Frauen wurden in drei Gruppen unterteilt: 1. erhöhte körperliche Belastung/ "Turngruppe"; 2. körperliche Belastung plus Kalziumsubstitution; 3. körperliche Belastung plus Estrogen- und Progesteronsubstitution. Nur in der Gruppe mit erhöhter körperlicher Belastung und Hormonsubstitution war nach 2 Jahren ein Knochendichteanstieg von +2,7% zu verzeichnen. In der Turngruppe dagegen sank die Knochendichte um -2,7%, während der Knochendichteverlust in der "Kalziumgruppe" nur bei -0,5% lag [42]. Die *in vivo*-Studien bestätigen die größere Effizienz der Estrogene über den Kalziumpräparaten, jedoch wird stets auf die zahlreichen Nebenwirkungen der Hormonersatztherapie verwiesen [42]. Umso interessanter erscheinen Experimente mit niedrig dosierten Estrogenen oder Kombinationen aus mehreren Wirkstoffen. Nach Ettinger et al. [18] reichte bereits eine Estrogendosis von 0,5mg in Verbindung mit 1500mg Kalzium pro Tag aus, um die Knochendichte aufrecht zu erhalten und dennoch die Nebenwirkungen wie Vaginalblutungen und Endometriumhyperplasie möglichst gering zu halten. Gerade die Kombinationstherapien mit Kalziumpräparaten bedürfen weiterer Analysen auf zellulärer Ebene, da sich letztere als sichere, gut tolerierte und kostengünstige Mittel zur Prävention und unterstützenden Osteoporosetherapie bewährt haben [44]. Dabei sollten sich *in vitro* Untersuchungen anschließen, die eine Kombination aus Estrogenen und Eischalenpräparaten testen, um die positiven Eigenschaften dieser "neuartigen" Kalziumquelle auszunutzen.

5 Ausblick

Bei der Anwendung von Substitutionstherapien ist die Kenntnis der lokalen Wirkung der Substanzen auf den Knochenmetabolismus und die Zielorgane, hier die Osteoblasten Voraussetzung für die Interpretation der Versuchsergebnisse. Bisherige Publikationen beruhen jedoch meist auf klinischen Erfahrungswerten bei der Osteoporosebehandlung. Die Wechselwirkungsvorgänge auf zellulärer Ebene sind größtenteils nur unzureichend bekannt. Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Versuchsanordnung lassen sich die Reaktionen von Osteoblasten-ähnlichen Zellen auf die verschiedenen in der Mineral- und Hormonsubstitution bei Osteoporose angewandten Substanzen überprüfen. Es konnte bestätigt werden, dass sowohl die Gabe von Kalziumpräparaten wie reinem Kalziumcarbonat und Hühnereischalenpulver, als auch die Gabe von Hormonpräparaten wie Estradiol zu einer Stimulation der gesamten Osteoblastenentwicklung führt. Diese reicht von einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung bis hin zu einer erhöhten Synthese bestimmter Extrazellulärmatrix-relevanter Proteine und geförderter Mineralisation *in vitro*. Dieses Ergebnis liefert die Grundlage für weiterführende Studien, die die Aufklärung der zellulären Wechselwirkungen von Kombinationstherapien von Estrogenen und Eischalenpräparaten *in vitro* und *in vivo* verfolgen. Ein Ziel dieser Untersuchungen muss die Reduktion der Hormondosis und ihre schubartige Verabreichung am Patienten sein, um den zahlreichen Nebenwirkungen der Hormonersatztherapie entgegenzuwirken [18; 31; 52] und auch ihrer stimulativen, pharmakokinetischen Wirkung gerecht zu werden. Andererseits bietet das Studium an Eischalenpräparaten viele neue Aspekte bezüglich der Kalziumsubstitution, da sie als organische Kalziumquelle reinem Kalziumcarbonat überlegen sind [5; 48] und auch als Knochenersatzmaterial in der craniofacialen Chirurgie bereits gute Erfolge erzielt haben [13; 14; 15; 16]. Bei den nachfolgenden Analysen sollten auch die positiven Auswirkungen uniaxialer Dehnung, bzw. die physiologische Belastung des Bewegungsapparates berücksichtigt werden [23; 32; 36; 37; 38; 57]. Denn nur die Kenntnisse und Kombination sämtlicher auf die Zellentwicklung stimulativ wirkenden Therapieansätze bieten eine gesicherte Grundlage für die Anwendung der Stimulations-Techniken am Patienten und können zu schnellen Therapieerfolgen führen.

6 Abkürzungen

AEC:	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BSA:	Bovine Serum Albumin
BSP:	Bone Sialoprotein
Ca	Kalzium
CaCO₃:	Kalziumcarbonat
C I:	Kollagen I
EZM:	Extrazelluläre Matrix
Fn:	Fibronectin
Fn-R:	Fibronectin-Rezeptor
HST:	Hormonsubstitutionstherapie
n:	Stichprobenumfang/Anzahl der Messungen
N:	Zellzahl
OC:	Osteokalcin
ON:	Osteonectin
OP:	Osteopontin
PBS:	Phosphat Buffered Saline
PC I:	Prokollagen I
PG:	Proteoglycan
TBS:	Tris Buffered Saline
TBST:	Tris Buffered Saline mit Tween 20
U/min:	Umdrehungen pro Minute

7 Literaturverzeichnis

1. Aloia J.F., Vaswani A., Yeh J.K., McGowan D.M., Ross P. (1991)
Biochemical short-term changes produced by hormonal replacement therapy.
J. Endocrinol. Invest. **14**, 927-934
2. Aronow M.A., Gerstenfeld L., Owen T.A., Tassinari M.S., Stein G.S., Lian J.B. (1990)
Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells.
J. Cell. Physiol. **143**, 213-221
3. Auf'mkolk B., Hauschka P.V., Schwartz E.R. (1985)
Characterization of human bone cells in culture.
Calcif. Tiss. Int. **37**, 228-235
4. Basse E.J., Ramsdale S.J. (1994)
Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise.
Osteoporos. Int. **4**, 72-75
5. Bess Dawson-Hughes M.D. et al. (1990)
A controlled trial of the effect of calcium supplementation on bone density in postmenopausal women.
The New Engl. J. of Med. **323**, 878
6. Binderman I., Greene R.M., Pennypacker J.P. (1979)
Calcification of differentiating skeletal mesenchyme in vitro.
Science **206**, 222-225
7. Cadogan J., Blumsohn A., Barker M.E., Eastell R. (1998)
A longitudinal study of bone gain in pubertal girls: anthropometric and biochemical correlates.
J. Bone Miner. Res. **13**, 1602-1612
8. Casser-Bette M., Murray A.B., Closs E.I., Schmidt J. (1990)
Bone formation of osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture.
Calcif. Tiss. Int. **46**, 46-56
9. Corrente G., Abundo R., Cardaropoli G., Martuscelli G. (2000)
Long-term evaluation of osseointegrated implants in regenerated and nonregenerated bone.
Int. J. Periodontics Restorative Dent **20**, 390-397

10. Damien E. Price J.S., Lanyon L.E. (2000)
Mechanical strain stimulates osteoblast proliferation through the estrogen receptor in males as well as females.
J. Bone Miner. Res. **15**, 2169-2177
11. Di Gregorio G.B., Yamamoto M., Ali A.A., Abe E., Roberson P., Manolagas S.C., Jilka R.L. (2001)
Attenuation of the self-renewal of transit-amplifying osteoblast progenitors in the murine bone marrow by 17 beta-estradiol.
J. Clin. Invest. **107**, 803-812
12. Dowd P.S., Kelleher J., Walker B.E., Guillou P.J. (1986)
Nutrition and cellular immunity in hospital patients.
Br. J. Nutr. **55**, 515-527
13. Dupoirieux L. (1999)
Ostrich eggshell as a bone substitute: a preliminary report of its biological behavior in animals – a possibility in facial reconstructive surgery.
Br. J. Oral Maxillofac. Surg. **37**, 467-471
14. Dupoirieux L., Neves M., Pourquier D. (2000)
Comparison of pericranium and eggshell as space fillers used in combination with guided bone regeneration : an experimental study.
J. Oral Maxillofac. Surg. **58**, 47-48
15. Dupoirieux L., Pourquier D., Neves M., Teot L. (2001)
Resorption kinetics of eggshell: an in vivo study.
J. Craniofac. Surg. **12**, 53-58
16. Dupoirieux L., Pourquier D., Souyris F. (1995)
Powdered eggshell: a pilot study on a new bone substitute for use in maxillofacial surgery.
J. Craniomaxillofac. Surg. **23**, 187-194
17. Ernst M., Schmid C., Froesch E.R. (1988)
Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 2307-2310
18. Ettinger B. (1993)
Use of low-dosage 17 beta-estradiol for the prevention of osteoporosis.
Clin. Ther. **15**, 950-962
19. Fardellone P., Brazier M., Kamel S., Gueris J., Graulet A.M., Lienard J., Sebert J.L. (1998)
Biochemical effects of calcium supplementation in postmenopausal women: influence of dietary calcium intake.
Am. J. Clin. Nutr. **67**, 1273- 1278

20. Fiorelli G., Gori F., Frediani U., Morelli A.M., Falchetti A., Benvenuti S., Masi L., Brandi M.L. (1995)
Evidence for bioeffects of LY 139478 on the human pre-osteoblastic cell line FLG 29.1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **211**, 857-863
21. Franceschi R.T., Iyer B.S. (1992)
Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells.
J. Bone Miner. Res. **7**, 235-246
22. Franceschi R.T., Iyer B.S., Cui Y. (1994)
Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells.
J. Bone Min. Res. **9**, 843-854
23. Frost H.M. (1987)
Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal.
Anat. Rec. **219**, 1-9
24. Frost H.M (1988).
Vital biomechanics: proposed concepts for skeletal adaptations to mechanical usage.
Calcif. Tissue Int. **42**, 145-156
25. Gambacciani M., Spinetti A., Taponeco F., Piaggese L., Cappagli B., Ciaponi M., Rovati L.C., Genazzani A.R. (1995)
Treatment of postmenopausal vertebral osteopenia with monofluorophosphate: a long-term calcium-controlled study.
Osteoporos. Int. **5**, 467-471
26. Gohel A., Mc Carthy M.B., Gronowicz G. (1999)
Estrogen prevents glucocorticoid-induced apoptosis in osteoblasts in vivo and in vitro.
Endocrinology **140**, 5339-5347
27. Hartig M.(2000)
Untersuchung des Einflusses kapazitiv eingekoppelter elektrischer Felder auf Knochenzellen in vitro.
Medizinische Dissertation, Universität Münster; (2000)
28. Hauschka P., Lian J., Cole D., Gundberg C. (1989)
Osteocalcin and matrix Gla Protein: Vitamin K-dependent proteins in bone.
Physiol. Rev. **69**, 990-1047
29. Heaney R.P. (1991)
Effect of calcium on skeletal development, bone loss, and risk of fractures.
Am. J. Med. **91**, 23S-28S

30. Ingram R.T., Park Y.K., Clarke B.L., Fitzpatrick L.A. (1994)
Age- and gender-related changes in the distribution of osteocalcin in the extracellular matrix of normal male and female bone.
J. Clin. Invest **93**, 989-997
31. Jenapharm (2001)
Herstellereinfachinformation zum Präparat: Estradiol 2mg JENAPHARM®
32. Jones D.B., Nolte H., Scholübbbers J.G., Turner E., Veltel D. (1991)
Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells.
Biomaterials **12**, 101-110
33. Jones S. J., Boyde A. (1977)
The migration of osteoblasts.
Cell Tiss. Res. **184**, 179 – 193.
34. Keeting P.E., Scott R.E., Colvard D.S., Han I.K., Spelsberg T.C., Riggs B.L. (1991)
Lack of a direct effect of estrogen on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells.
J. Bone. Miner. Res. **6**, 297-304
35. Lane T.F., Sage E.H. (1994)
The biology of SPARC, a protein that modulated cell-matrix interactions.
FASEB J. **8**, 163-173
36. Meyer U., Meyer T., Vosshans J., Joos U. (1999)
Decreased expression of osteocalcin and osteonektin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis.
J. Craniomaxillofac. Surg. **27**, 222-227
37. Meyer U., Terodde M., Joos U., Wiesmann H.P. (2001)
Mechanische Stimulation von Osteoblasten in der Zellkultur.
Mund Kiefer Gesichts Chir. **5**, 166-172
38. Meyer U., Wiesmann H.P., Kruse-Lösler B., Handschel J., Stratmann U., Joos U. (1999)
Strain related bone remodelling in distraction osteogenesis of the mandible.
Plast. Reconstr. Surg. **103**, 800-807
39. Nordin B.E. (1997)
Calcium and osteoporosis.
Nutrition **13**, 664-686
40. Opsahl W., Zeronian H., Ellison M., Lewis D., Rucker R.B., Riggins R.S. (1982)
Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon.
J. Nutr. **112**, 708-716

41. Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Kennedy M.B., Pockwinse S., Lian J.B., Stein G.S. (1990)
Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix.
J. Cell. Physiol. **143**, 420-430
42. Prince R.L., Smith M., Dick I.M., Price R.I., Webb P.G., Henderson N.K., Harris M.M. (1991)
Prevention of postmenopausal osteoporosis. A comparative study of exercise, calcium supplementation, and hormone-replacement therapy.
N. Engl. J. Med. **325**, 1189-1195
43. Raisz L.G., Dietrich J.W., Canalis E.M. (1976)
Factors influencing bone formation in organ culture.
Isr. J. Med.Sci. **12**, 108-114
44. Riggs B.L., O` Fallon W.M., Muhs J., O` Connor M.K., Kumar R., Melton L. (1998)
Longterm effects of calcium supplementation on serum parathyroid hormone level, bone turnover, and bone loss in elderly women.
J. Bone Miner. Res. **13**, 168-174
45. Robey P.G., Termine J.D. (1985)
Human bone cells in vitro.
Calcif. Tiss. Int. **37**, 453-460
46. Ruepp M.O., Borchert U. (1995)
Wirkung von aar® os auf die verminderte Knochendichte in der Postmenopause.
Erfahrungsheilkunde Band 44-Heft 2/1995, 96-100
47. Schaafsma A., Pakan I., Hofstede G.J., Muskiet F.A., Van Der Veer E., De Vries P.J. (2000)
Mineral, amino acid, and hormonal composition of chicken eggshell powder and the evaluation of its use in human nutrition.
Poult Sci. **79**, 1833-1838
48. Schaafsma A., van Doormaal J.J., Muskiet F.A., Hofstede G.J., Pakan I., van der Veer E. (2002)
Positive effects of a chicken eggshell powder-enriched vitamin-mineral supplement on femoral neck bone mineral density in healthy late postmenopausal Dutch women.
Br. J. Nutr. **87**, 267-275
49. Schiessl H., Frost H.M., Jee W.S. (1998)
Estrogen and bone-muscle strength and mass relationship.
Bone **22**, 1-6

50. Schlegel W., Petersdorf L.I., Junker R., Schulte H., Ebert C., Von Eckardstein A. (1999)
The effects of six months of treatment with a low-dose of conjugated oestrogens in menopausal women.
Clin. Endocrinol. (Oxf.) **51**, 643-651
51. Scott D.M., Kent G.N. Cohn D.V. (1980)
Collagen synthesis in cultured osteoblast-like cells.
Arch. Biochem. Biophys. **201**, 384-391
52. Spelsberg T.C., Subramaniam M., Riggs B.L., Khosla S. (1999)
The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton.
Mol. Endocrinol. **13**, 819-828
53. Tapazoglou E., Prasad A.S., Hill G., Brewer G.J., Kaplan J. (1985)
Decreased natural killer cell activity in patients with zinc deficiency with sickle cell disease.
J. Lab. Clin. Med. **105**, 19-22
54. Tenenbaum H.C., Heersche J.N.M. (1982)
Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro.
Calcif. Tiss. Int. **34**, 76-79
55. Trachtenbarg D.E. (1990)
Treatment of osteoporosis. What is the role of Calcium?
Postgrad. Med. **87**, 263-266, 269-270
56. Tremollieres F., Pouilles J.M., Ribot C. (1992)
Postmenopausal bone loss. Role of estrogens.
Presse Med. **21**, 903-906
57. Wiesmann H.P., Yücel H., Joos U., Schlegel W., Meyer U. (2003)
Influence of estrogens on mechanically stimulated osteoblasts in vitro.
Publikation im Druck
58. Wiestner M., Fischer S., Dessau W., Müller P.K. (1981)
Collagen types synthesized by isolated calvarium cells.
Exp. Cell. Res. **133**, 115-125
59. Winnard R.G., Gerstenfeld L.C., Toma C.D., Franceschi R.T. (1995)
Fibronectin gene expression, synthesis and accumulation during in vitro differentiation of chicken osteoblasts.
J. Bone Miner. Res. **10**, 1969-1977

60. Zang X.Y., Tan Y.B., Pang Z.L., Zhang W.Z., Zhao J. (1994)
Effects of parathyroid hormone and estradiol on proliferation and function of
human osteoblasts from fetal long bone. An in vitro study.
Chin. Med. J. (Engl.) **107**, 600-603

8 Danksagung

Allen, die mich bei der Erstellung dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen. Ganz besonders danke ich:

Herrn Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. Ulrich Joos für die Möglichkeit in seinem Institut an dieser Arbeit forschen zu dürfen,

Herrn Priv. Doz. Dr. Hans-Peter Wiesmann für die Vermittlung dieser Arbeit und die Anregung zu diesem Thema, sowie für die fachliche Unterstützung,

Frau Irene Grabiniok für die ausgezeichnete technische Assistenz, insbesondere in der Zellkultur,

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, ganz besonders Frau Dr. Mareke Hartig und Frau Elke Stoffels für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima,

und insbesondere meiner Familie, die mich während der ganzen Zeit nach Kräften unterstützt und motiviert hat.

9 Lebenslauf

Name: Feldmann, geb. Wegener
Vorname: Stefanie
Geburtsdatum: 29. 04. 1976
Geburtsort: Arnsberg 1
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1982 - 1986 Grundschole in Ense-Höingen
1986 - 1995 Ursulinengymnasium in Werl
Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

WS 95/96 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
09/1996 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
04/1998 Zahnärztliche Vorprüfung
07/2000 Abschluss des Studiums der Zahnmedizin
Abschluss: Staatsexamen vom 17. 07. – 11.12. 2000
12/2000 Erlangung der Approbation als Zahnärztin

Berufsweg

04/2001 – 03/2002 Vorbereitungsassistentin bei Dr. A. Schulz, Werl
04/2002 – 01/2003 Assistenzärztin bei Dr. S. Kawalec, Arnsberg
02/2003 – 09/2004 Vorbereitungsassistentin bei Dr. A. Schulz, Werl
Seit 10/2004 Niedergelassen in Gemeinschaftspraxis mit Dr. A. Schulz,
Werl

Ense, den 23.11.2004