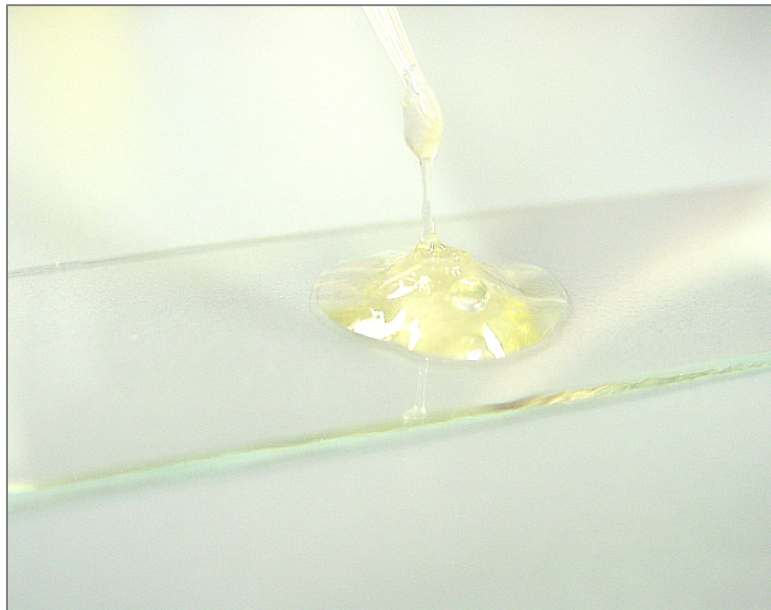


# Zytotoxizität bioresorbierbarer Hartgewebekleber *in vitro*



vorgelegt von

Inga Katharina Tittel

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Direktor: Prof. Dr. med. W. Mutschler

---

# **Zytotoxizität bioresorbierbarer Hartgewebekleber *in vitro***

**Dissertation**

**Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Inga Katharina Tittel

aus St. Georgen im Schwarzwald

2006

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Mutschler
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. J. Manhart Prof. Dr. med. W. Plitz
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. Schieker Dr. rer. nat. H. Bülle
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung	30. November 2006

---

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Stand der Forschung	9
1.1.1 Übersicht über verschiedene Gewebekleber	10
1.1.2 Synthetische Klebstoffe	11
1.1.3 Biologische Klebstoffe	14
1.1.4 Muscheladhäsive	17
1.2 Aufgabenstellung	20
1.2.1 Anforderungen an medizinische Klebstoffe	20
1.2.2 Entwicklung eines bioresorbierbaren Klebstoffes	21
1.2.3 Biomechanische Untersuchungen	23
1.2.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen <i>in vitro</i>	23
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1 Zellkultur	24
2.1.1 Zellen und Medien	24
2.1.2 Auftauen der Zellen	24
2.1.3 Kultivierung der Zellen	24
2.1.4 Kryokonservierung der Zellen	25
2.2 Kleberkomponenten	25
2.3 Versuchsansatz	26
2.3.1 Aufbringen der Kleber	26
2.3.2 Versuchsaufbau A und B	27
2.3.3 Aussaat der Zellen	28
2.4 Auswertemethoden	29
2.4.1 Zellaktivität - WST-I Assay	29
2.4.2 Zellmembranintegrität - TOX-7 Assay	30
2.4.3 Zellproliferation - BrdU Assay	33
2.4.4 Zellzahlbestimmung	35
2.5 Versuchsaufbau C	36
2.5.1 Versuchsaufbau	36
2.5.2 Zellvitalität - Fluoreszeindiacetat und Propidiumjodid	36
2.6 Material und Geräte	38

---

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Kleberproben	40
3.1.1	Eigenschaften der Einzelkomponenten	40
3.1.2	Eigenschaften der Zweikomponentenkleber	42
3.2	Zytotoxizität	44
3.2.1	Vorversuche	44
3.2.2	Versuchsaufbau A	46
3.2.3	Versuchsaufbau B	50
3.2.4	Einzelkomponenten	55
3.2.5	Versuchsaufbau C	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Versuchsansatz	59
4.1.1	Kleberkomponenten	59
4.1.2	Versuchsaufbau	60
4.2	Auswertemethoden und Ergebnisse	62
4.2.1	Vorversuche	62
4.2.2	Versuchsaufbau A	64
4.2.3	Versuchsaufbau B	68
4.2.4	Versuchsaufbau C	71
4.2.5	Einzelkomponenten	72
4.3	Klebeverhalten (Durchführung durch Kooperationspartner)	73
4.3.1	Screeningversuche Klebekraft	73
4.3.2	Biomechanische Untersuchung der Klebekraft	75
4.4	Ausblick	76
4.4.1	Kleberwahl für weitere Tests	76
4.4.2	Versuchsaufbau	77
4.4.3	Degradierbarkeit	77
4.4.4	Tiermodell	77
4.4.5	Biomechanik	78
4.4.6	Porenbildner	78
4.4.7	Applikationsformen	78
4.4.8	Sterilisation	79
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Adhäsion und Kohäsion .....	10
Abbildung 2 - Mytilus edulis.....	18
Abbildung 3 - Muschel Byssus, Waiter et al. (1999).....	18
Abbildung 4 - Reaktionen von DOPA und DOPA o-Quinon, Waiter et al. (1999) .....	19
Abbildung 5 - Schiff'sche Base .....	26
Abbildung 6 - Klebprinzip .....	26
Abbildung 7 - Kupferplättchen .....	27
Abbildung 8 - Versuchsaufbau A und B.....	28
Abbildung 9 - WST-I Assay .....	29
Abbildung 10 - Molekulare Struktur von WST-I und Formazan .....	30
Abbildung 11 - Defekte Zellmembran .....	31
Abbildung 12 - Arbeitsschritte TOX-7 Assay .....	32
Abbildung 13 - DNA Synthese und Zellverdopplung .....	33
Abbildung 14 - Arbeitsschritte BrdU Assay.....	34
Abbildung 15 - Neubauer Zählkammer.....	35
Abbildung 16 - TrypanBlau Färbung.....	35
Abbildung 17 - Defekte Zellmembran .....	37
Abbildung 18 - Chitosan 24 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata.....	40
Abbildung 19 - Dextran 1 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata.....	41
Abbildung 20 - Stärke 1,5 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata.....	41
Abbildung 21 - Stärke 72 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata.....	42
Abbildung 22 - Kleber a: Chitosan 24 h und Dextran 1 h .....	42
Abbildung 23 - Kleber b: Chitosan 24 h und Stärke 1,5 h.....	43
Abbildung 24 - Kleber c: Chitosan 24 h und Stärke 72 h.....	43
Abbildung 25 - Zellvitalität (WST-I) Vorversuch.....	44
Abbildung 26 - Zellproliferation (BrdU) Vorversuch .....	45
Abbildung 27 - Farbreaktion bei BrdU .....	45
Abbildung 28 - Zellvitalität Versuchsaufbau A .....	46
Abbildung 29 - Zellmembranpermeabilität Versuchsaufbau A.....	47
Abbildung 30 - Zellzahlen Versuchsaufbau A.....	48
Abbildung 31 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau A nach 48 h.....	49
Abbildung 32 - Zellvitalität Versuchsaufbau B .....	50

---

Abbildung 33 - Zellmembranpermeabilität Versuchsaufbau B.....	51
Abbildung 34 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau B am Tag 2 .....	52
Abbildung 35 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau B am Tag 7 .....	53
Abbildung 36 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau B am Tag 14.....	54
Abbildung 37 - Zellvitalität Einzelkomponenten .....	55
Abbildung 38 - Zellmembranpermeabilität Einzelkomponenten.....	56
Abbildung 39 - Zelladhärenz.....	57
Abbildung 40 - Versuchsansatz.....	57
Abbildung 41 a)-f) - Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau C .....	58
Abbildung 42 - BrdU Formel .....	63
Abbildung 43 - Nachweisreaktion LDH.....	67
Abbildung 44 - Aufbau Klebeschnelltest.....	73
Abbildung 45 - Kortikale Knochenquader .....	75
Abbildung 46 - Zugfestigkeitsprüfung .....	75

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 - Übersicht verwendete Materialien und Geräte .....	39
Tabelle 2 - Ergebnisse Klebescreeningtest .....	74
Tabelle 3 - Biomechanische Untersuchung zur Klebestärke .....	76

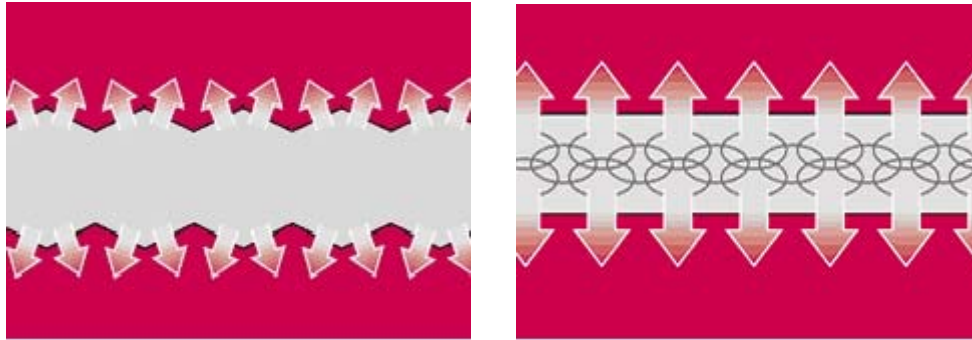


# 1 Einleitung

## 1.1 Stand der Forschung

Die Wiederherstellung der uneingeschränkten Funktionsfähigkeit und der vollen mechanischen Belastbarkeit der Knochen und Gelenke steht nach einer Fraktur im Vordergrund. So kann konsequente und schmerzfreie, frühfunktionelle Übungsbehandlung das Entstehen von Immobilisationsschäden und Thrombembolien vermindern. Deshalb werden die frakturierten Knochen nach anatomischer Reposition mit verschiedenen zur Verfügung stehenden Osteosynthesematerialien fixiert. In erster Linie kommen hier Schrauben- und Plattenosteosynthesen, Verriegelungsmarknagel und Fixateur externe zum Einsatz. Diese Materialien sorgen für eine primäre Stabilisierung des Bruches, haben jedoch auch Nachteile. Einerseits bieten die meisten Verfahren nur eine punktuelle und keine gleichmäßige und flächenhafte Kraftverteilung, was mitunter eine Lockerung des Materials zur Folge haben kann. Andererseits kann die durch den Einsatz von Osteosynthesematerialien entstehende Traumatisierung zu Infektion oder Durchblutungsstörungen bis hin zur Nekrose des behandelten Knochens führen. Vor allem aber in der Therapie kleinerer, unbelasteter Bruchfragmente und auch bei gelenknahen Trümmerfrakturen besteht seit langem der Wunsch nach einem bioresorbierbaren Klebstoff (Bloch 1958; Rietz 1964; Beck 1966; Giebel und Rimpler 1981; Donkerwolcke et al. 1998).

Wenn zwei adhäsive Substanzen miteinander reagieren, bestimmen ihre Eigenschaften das mechanische Verhalten der Verbindung. Während Kitt oder Zement der Spaltfüllung dient und vor allem durch mechanische Verzahnung wirkt (Weber und Chapman 1984; Okada et al. 1999), unterscheiden sich Klebstoffe dagegen hauptsächlich in der Ausbildung molekularer Anziehung mit der geklebten Oberfläche (Smith 1973). Neben der Adhäsion der Klebesubstanzen zur Oberfläche spielt auch das physikalische Gesetz der Kohäsion, der intermolekularen Vernetzung der Kleberkomponenten miteinander, eine große Rolle für die Klebewirkung. Adhäsion und Kohäsion eines Klebers müssen in Summe mindestens der internen Kohäsionskraft der verbundenen Objekte entsprechen (Donkerwolcke et al. 1998).



**Abbildung 1 - Adhäsion und Kohäsion**

Ein Klebstoff ließe Knochenfragmente schnell und flächenhaft miteinander verbinden und würde die Gewebeerletzung, die durch Einbringen von Platten und Schrauben und deren spätere Entfernung entsteht, überflüssig machen (Meyer et al. 1979). Die Klebung von Frakturen könnte eine gleichmäßige Kraftverteilung und Druckübertragung ermöglichen und daneben Unebenheiten der Oberflächen ausgleichen (Heiss und Schnettler 2003). So könnten die gängigen Methoden der Osteosynthese ersetzt, beziehungsweise entscheidend ergänzt werden (Müller 1962; Meyer et al. 1979; Weber und Chapman 1984).

Ein innovatives Adhäsiv, das sich für ein solch vielfältiges Einsatzspektrum eignet, muss spezifische Anforderungen erfüllen (Giebel und Rimpler 1981; Weber und Chapman 1984; Donkerwolcke et al. 1998). Die bisher entwickelten Knochenklebstoffsysteme wurden diesen Eigenschaften nicht gerecht und scheiterten an mangelnder Biokompatibilität (Donkerwolcke et al. 1998; Otani et al. 1998a; Sung et al. 1999; Grossterlinden et al. 2006), unzureichender Degradierbarkeit (Tseng et al. 1990), potentieller Infektiosität (Otani et al. 1998a; Ono et al. 2000), schlechter Handhabbarkeit (Otani et al. 1999; Sung et al. 1999) oder geringer Klebestärke (Silver et al. 1995; Jurgensen et al. 1997).

### 1.1.1 Übersicht über verschiedene Gewebekleber

Die Entwicklung von Adhäsiven zur Behandlung von Gewebeerletzungen und zur Fixierung von Implantaten hat eine lange Geschichte. Das Kleben ist allgemein eines der ältesten Fügeverfahren der Welt, denn bereits vor 8000 Jahren verwendeten Menschen der jüngeren Steinzeit eine Mischung aus Birkenharz und Bienenwachs um Pfeil- und Speerspitzen zu befestigen (Pantel 2001). Die Ägypter kochten um

1500 v. Chr. Klebstoffe aus Haut und Knochen von Tieren, die sie für Furnierarbeiten gebrauchten. Die Römer erhielten einen Leim aus dem Saft der Mistel oder gekochten Fischresten und nannten ihn Glutinum (Brockmann 2000). Später wurden Bitumen, Bienenwachs und Pech zum Versiegeln von Gefäßen benutzt (Donkerwolcke et al. 1998). Mitte des 18. Jahrhundert entdeckte man die klebende Eigenschaft des Kautschuks (Pantel 2001) und Gluck beschrieb 1891 die Verwendung eines Knochenklebers, der Kolophonium, Bimsstein und Gips enthielt (Gluck 1891). In den Dreißigern des 20. Jahrhunderts gewann Hedri (1931) Kollagen und Proteine aus fibrösem Bindegewebe und stellte sein Gemisch Ossocol<sup>®</sup> als neues Prinzip der Osteosynthese vor. Er konnte mit seinem Knochenklebstoff eine gute Bindungsstärke und rasche Wundheilung erzielen. Heftige allergische Reaktionen aufgrund antigen wirkender xenogener Proteine verhinderten jedoch die weitere Anwendung (Hedri 1931; Giebel und Rimpler 1981).

Bereits seit mehreren Jahrzehnten werden mögliche Klebstoffe untersucht, ohne dass bisher ein einsatzfähiger, bioresorbierbarer Knochenkleber für den klinischen Alltag gefunden wurde. Die unterschiedlichen Kleberarten können in zwei Klassen unterteilt werden. Zum einen gibt es synthetische, aus körperfremden Material hergestellte Adhäsive, zum anderen die biologischen Klebstoffe aus biologischen oder körpereigenen Substanzen. Im Folgenden werden die wichtigsten der in den letzten Jahrzehnten entwickelten Knochenklebstoffe vorgestellt.

## 1.1.2 Synthetische Klebstoffe

### 1.1.2.1 Epoxidharze

Epoxidharze entstehen durch Reaktion von Epichlorhydrin mit aromatischen Dihydroxyverbindungen und werden industriell als Klebstoffe, Gießharze und Lacke verwendet (Giebel und Rimpler 1981). Der Australier Bloch beschrieb 1958 erstmals einen Versuch mit Araldit<sup>®</sup> an Schafen, wobei die Frakturbehandlung der Vorderläufe zu 40% misslang (Bloch 1958). Später mischte Golovin Fibrin und Knochenmehl dazu und erhielt mit Osteoplast<sup>®</sup> gute Ergebnisse an über 30 Patienten mit frischen und pathologischen Frakturen (Giebel und Rimpler 1981). Epoxidharze weisen eine starke Haftfestigkeit in trockenem und feuchtem Milieu auf (Giebel et al. 1981). Mitte der 60er Jahre entdeckte Rietz (1964) einige Schwächen des zuerst so positiv

bewerteten Klebers: Neben bindegewebiger Kapselbildung, verzögerter Kallusbildung und Nekrosen aufgrund hoher Polymerisationstemperatur, führte vor allem auch die mangelnde Klebestärke an feuchten oder fettigen Haftflächen zu Dislokationen.

### 1.1.2.2 Polyurethane

1959 wurde unter dem Namen Ostamer<sup>®</sup> ein Polyurethan-Hartschaum als Knochenkleber entwickelt. Zwei Komponenten reagieren unter Freisetzung von Kohlendioxid zu einer schwammähnlichen Verbindung, die nach 20 Minuten erstarrt (Giebel und Rimpler 1981). Ostamer<sup>®</sup> wurde z.B. zur Fixierung von in die Markhöhle eingebrachten Metallstiften benutzt. Initial wurde eine gute Bindung zur Oberfläche, Biokompatibilität und eine genügend große Porengröße für einwachsende Zellen beschrieben (Mandarino und Salvatore 1959; Mandarino und Salvatore 1960). Weitere Untersuchungen ergaben allerdings eine hohe Polymerisationstemperatur von über 70°C (Rietz 1964), wachstumshemmende bis ausgeprägt zelltoxische Wirkung (Leemann et al. 1961; Hulliger 1962), mangelnde Klebestärke in feuchtem Milieu (Giebel et al. 1981), unzureichende Abbaubarkeit (Leemann et al. 1961; Ehalt 1961), verzögerte Knochenheilung und Wundheilungsstörungen, Infektionen, Nekrosen, fibrotische Kapselbildung und Fistelbildung (Drompp 1960; Leemann et al. 1961; Buchner und Feischl 1962; Rietz 1964; Meyer et al. 1979).

### 1.1.2.3 Cyanoacrylate

Die in allen Bereichen der Chirurgie verwandten Wund- und Gewebekleber Cyanoacrylate (Matsumoto 1968; Schmeissner 1970; Weber und Chapman 1984) wurden Ende der 50er Jahre zufällig als Klebstoffe entdeckt. Sie wurden als erste künstliche Klebstoffe von der Firma Eastman Kodak vermarktet und sind den handelsüblich erhältlichen Sekundenklebern vergleichbar (Coover et al. 1959). Cyanoacrylate sind monomere Flüssigkeiten, die beim Kontakt mit Wassermolekülen innerhalb von 10 Sekunden polymerisieren und dabei eine starke Haftfestigkeit aufweisen (Brug et al. 1976; Giebel und Rimpler 1981). Da sie die Gerinnungszeit erheblich verkürzen, wurden sie auch zur Verwendung als Hämostatika überprüft (Schmeissner 1970; Montanaro et al. 2001). Über ihre Klebeeigenschaften in feuchter Umgebung gibt es unterschiedliche Erkenntnisse (Schmeissner 1970;

Giebel et al. 1981). Cyanoacrylate binden sehr gut auf gründlich von Blut und Fett gereinigten kortikalen Oberflächen, jedoch nur schlecht auf Spongiosa (Weber und Chapman 1984). Neben ihren Eigenschaften als Adhäsive sind Cyanoacrylate preiswert (Gonzalez et al. 2000) und unkompliziert applizierbar (Schmeissner 1970). 1968 brachte die Firma B. Braun das Butyl-Cyanoacrylat Histoacryl® zum nahtlosen Wundverschluß auf den Markt, das seither weltweit mit guter Wundheilung (Simhon et al. 2004) und Klebekraft (Brosh et al. 2004) angewandt wird. Allerdings werden Cyanoacrylate von den Zellen resorbiert (Kort 1971) und wirken dabei zellgiftig und wachstumshemmend (Tseng et al. 1990; Montanaro et al. 2001). Sie lassen sich nur unzureichend biodegradieren (Smith 1973; Bruns et al. 1993) und setzen beim Abbau die toxischen Substanzen Cyanessigsäure und Formaldehyd frei, weshalb die Cyanoacrylate auch im indirekten Kontakt zellunverträglich sind (Meyer et al. 1979; Tseng et al. 1990). Karzinogenität wurde bisher nur in einer unpublizierten Studie von Larson nachgewiesen (Weber und Chapman 1984), was für die Butyl-Cyanoacrylate nicht bestätigt werden konnte. Histologisch konnte eine gestörte Knochenheilung durch Barrierefunktion der Cyanoacrylate für proliferierende Zellen nachgewiesen werden (Edlich et al. 1971; Bruns et al. 1993). Darüber hinaus wurde von unterschiedlichen Komplikationen wie z.B. hoher Infektionsrate, Dislokationen und lokale Gewebs- und Fremdkörperreaktion berichtet (Koehnlein und Lemperle 1969; Edlich et al. 1971; Meyer et al. 1979; Giebel und Rimpler 1981). Diese Ergebnisse veranlassten die amerikanische Gesundheitsbehörde (FDA - Food and Drug Administration) zu einem generellen Einsatzverbot der Methyl-Cyanoacrylate am Menschen (Weber und Chapman 1984). Derzeit ist der klinische Einsatz der Butyl-Cyanoacrylate auf die Verlegung pathologisch veränderter Gefäße (Duncan et al. 2004; Yu et al. 2004) und die äußerliche chirurgische Naht beschränkt (Jallali et al. 2004). Die Verwendung als Knochenkleber wird immer noch diskutiert und überprüft (Maurer et al. 2004).

#### **1.1.2.4 Polymethylmethacrylate**

Der Zement Polymethylmethacrylat (PMMA) wird in der Zahnheilkunde und der Orthopädie zur Fixierung von Prothesen schon seit den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts verwendet. 1958 implantierte Charnley erstmals eine Hüftendoprothese mit PMMA (Charnley 1960). Nachdem Hulliger 1962 experimentell die Gewebeverträglichkeit untersuchte und zeigen konnte, dass zumindest

ausgehärtetes Methacrylat nicht zelltoxisch war, konnte das unter dem Namen Palacos<sup>®</sup> erhältliche PMMA systematisch angewandt werden. Hulliger beschrieb das Präparat als gewebefreundlich und bestätigte damit auch frühere Tests (Hoppe 1956; Hulliger 1962). PMMA wurde tierexperimentell auf unterschiedliche Weise untersucht, wobei meist von einer guten Stabilität und angemessenen Frakturheilung berichtet wurde (Charnley 1966; Weber und Chapman 1984). Zu den Nachteilen der Polymethylmethacrylate zählen die geringe Degradierung, Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes (Albrektsson und Linder 1981; Zysk et al. 2004), hohe Polymerisationstemperaturen von bis zu 96°C (Charnley 1960; Müller 1962) und fibröse Kapselbildung, die möglicherweise die Lockerung der mit PMMA fixierten Prothesen ohne Zeichen von Infektion verursacht (Okada et al. 1999; Fujita et al. 2000).

#### **1.1.2.5 Alkylen-bis(oligolactoyl)-methacrylate**

Alkylen-bis(oligolactoyl)-methacrylate bestehen aus der synthetischen Methacrylsäure und der natürlichen Milchsäure. Die Bausteine können zu stark verzweigten, hydrolysierbaren Netzwerken polymerisieren (Wenz 1998). Bisherige Ergebnisse liessen von einer hohen Klebefestigkeit, einer guten Bioverträglichkeit und Degradation ausgehen (Wenz 1998). Auch die Frakturheilung und Migration der Zellen über den Kleber hinweg, schienen nicht vermindert zu sein (Heiss und Schnettler 2003). Eine neue Studie im Tiermodell zeigte nach 6 Wochen eine massive Fremdkörperreaktion mit aseptischer Inflammation und Gewebedestruktion (Grossterlinden et al. 2006).

### **1.1.3 Biologische Klebstoffe**

#### **1.1.3.1 Fibrinklebstoffe**

1909 wurde erstmals das Blutgerinnungsprotein Fibrin erwähnt. Es wurde aus dem Serum von Pferden und Rindern gewonnen und zur Hämostase und Wundheilung eingesetzt (Bergel 1909). Erst die Entdeckung des Gerinnungsfaktors VIII (Fibrin stabilisierender Faktor) 1972 führte zur klinischen Anwendung von Fibrin (Matras et al. 1972). Fibrin ist heute der wohl bekannteste biologische Klebstoff und wird aus thrombozytenreichem Spenderplasma gewonnen (Silver et al. 1995), dadurch ergibt sich eine potentielle Infektiosität mit Hepatitis oder HIV (Otani et al. 1996a; Iwata et

al. 1998). Das Klebprinzip beruht auf der Ausbildung kovalenter Bindungen zwischen Fibrin und Kollagen, die auch in feuchter Umgebung bestehen bleiben. Fibrinkleber sollte auf natürliche Weise Osteosynthesematerial wie Nägel, Schrauben und Nähte ersetzen (Passl et al. 1976; Bösch et al. 1977). Später gelang es hochkonzentrierte und klebestarke Fibrinogenlösungen herzustellen (Bösch 1981). Weitere Studien berichteten von gesteigerter Revaskularisierung (Bösch et al. 1977; Arbes et al. 1981) und beschleunigter Knochenheilung (Bösch et al. 1977; Weber und Chapman 1984). Die aktive Kleberkomponente Thrombin scheint die Migration und Proliferation von Knorpelzellen zu fördern (Kirilak et al. 2006). Eine starke Hitzeentwicklung wie bei den künstlichen Klebern war nicht zu beobachten. Auch wurden weder gewebetoxische Effekte noch allergische Reaktionen festgestellt. Der Zweikomponentenkleber wird innerhalb weniger Tage durch Phagozytose vom Organismus ohne Rückstände abgebaut (Giebel und Rimpler 1981; Bruns et al. 1993). Aufgrund unzureichender Klebestärke und früher Lockerung durch Abbau eignen sich Fibrinklebstoffe jedoch nicht zur Anwendung am lasttragenden Knochen (Arbes et al. 1981; Claes et al. 1981; Weber und Chapman 1984; Silver et al. 1995; Donkerwolcke et al. 1998; Nomori et al. 1999; Bolliger-Stucki et al. 2000)

### **1.1.3.2 Gelatine-Resorcin-Aldehyd-Klebstoffe**

Gelatine ist ein tierisches Protein, dient als Füllsubstanz und wird mit Resorcinol, das mit Aldehyden netzartige Polymere ausbildet, kombiniert (Koehnlein und Lemperle 1969). Diese 1966 in den USA entwickelte Verbindung sorgt auch bei Nässe für eine gute Adhäsion (Giebel et al. 1981) und wurde vor allem zur Klebung parenchymatöser Organe, Gefäße und Haut eingesetzt (Sung et al. 1999). Koehnlein berichtete von einer leichten Applikation auch bei blutenden Wunden, geringer Hitzeentwicklung bei der Polymerisation, anhaltender Elastizität, schneller Phagozytose des Klebers ohne Entzündungsreaktion und adäquater Wundheilung (Koehnlein und Lemperle 1969). In weiteren Untersuchungen an Patienten wurde Fieber ohne begleitende Entzündung beschrieben. Eine Fremdkörperreaktion gegen xenogene Proteine der Gelatine könnte ursächlich sein (Nomori et al. 1999). Histologisch konnten nekrotische und entzündliche Gewebsschäden, die später von Granulationsgewebe ummantelt wurden in direkter Umgebung zum Adhäsiv nachgewiesen werden (Nomori et al. 2000). Gelatine-Resorcin-Formaldehyd-Kleber finden zwar vereinzelt Anwendung im Verschluss von Leckagen im Bereich der

Lunge, bergen aber ebenfalls das Risiko der Freisetzung von Formaldehyd. Es wurden Versuche unternommen, Formaldehyd durch Glutaraldehyd (Giebel et al. 1981) und andere weniger toxische Dialdehyde zu substituieren. Die Adhäsive wirkten dennoch stark toxisch oder büßten an Haftstärke erheblich ein (Sung et al. 1999). Gelatine-Resorcin-Aldehyd-Klebstoffe finden nicht zuletzt wegen zu geringer Degradierbarkeit und unzureichender Klebestärke keine Anwendung in der Frakturbehandlung (Nomori et al. 1999; Nomori et al. 2000).

### **1.1.3.3 Protein-Aldehyd-Systeme**

Auch die Protein-Aldehyd-Klebesysteme bedienen sich der Inhaltsstoffe Gelatine und Aldehyd. Allerdings reagieren hier die Aminogruppen der tierischen Gelatine direkt mit den zur Verfügung stehenden Aldehydgruppen unter Ausbildung von Schiff'schen Basen. Das seit 1998 unter dem Namen BioGlue<sup>®</sup> zur Unterstützung der chirurgischen Naht und zur Therapie der Aortendissektion von der FDA zugelassene Adhäsiv, wurde für die Osteosynthese bisher nicht getestet (Chao und Torchiana 2003).

### **1.1.3.4 Gelatine-Polycarboxysäuren**

Wasserlösliches Carbodiimid (WSC - water-soluble carbodiimide) verbindet Polyglutaminsäure (PLGA - Poly L-glutamic acid) mit Gelatine innerhalb weniger Sekunden unter Bildung von Amidbindungen zu einem adhäsiven Hydrogel. Dessen Viskosität sichert eine bessere Applikation als Fibrinkleber (Otani et al. 1996a; Otani et al. 1996b; Otani et al. 1999). Außerdem zeigt dieser Weichgewebeklebstoff eine deutlich stärkere Klebeeigenschaft als ein Fibrinklebstoff (Otani et al. 1996a; Otani et al. 1996b; Iwata et al. 1998; Otani et al. 1998a). PLGA zeigt hämostatische Eigenschaften (Otani et al. 1998b). Im Tierexperiment war nur eine schwache Gewebereaktion durch noch vorhandenes WSC nachweisbar (Otani et al. 1996a). Zudem war eine kontinuierliche und vollständige Degradation innerhalb von drei Monaten zu vermerken (Otani et al. 1998a).

### **1.1.3.5 Klebstoffe auf Peptidbasis**

Aminosäuren dienen diesen in den letzten Jahren entwickelten Klebstoffen als Bausteine. Dabei werden Aminosäuren zu polymerisierbaren Acrylatpeptiden, den



sogenannten Peptoplasten, modifiziert (Berndt und Rimpler 1991a). Die Peptoplaste polymersieren im Zwei-Komponenten-Verfahren mit einem Initiator (Berndt und Rimpler 1991b). In verschiedenen Versuchen zeigten sich eine gute Adhäsionskraft und ausreichende Biokompatibilität, allerdings nur unvollständige Abbaubarkeit (Berndt und Rimpler 1991c).

#### **1.1.3.6 Klebstoffe auf Oligo- und Polylactonbasis**

Synthetisch hergestellte resorbierbare Polylactone bilden die Basis dieser Kleber. Eine freie Hydroxylgruppe am Polylacton ermöglicht eine Funktionalisierung durch vernetzungsfähige Gruppen (Schnabelrauch und Vogt 1999). Die Aushärtung zu einem Hydrogel wird photochemisch durch UV-Strahlung vorgenommen. Vor allem bei Leckagen der Lungen findet ein solcher Kleber Anwendung (Heiss und Schnettler 2003).

#### **1.1.3.7 Weitere Klebstoffe**

In den letzten Jahrzehnten ist eine Vielzahl weiterer Klebstoffe für den medizinischen Gebrauch entwickelt worden. Zu nennen sind z.B. Polyaminosäuren (Hwang und Stupp 2000), isocyanathaltige Vinylpolymere (Brauer und Lee 1989a; Brauer und Lee 1989b), Gewebe-Transglutaminasen (Jurgensen et al. 1997) oder photovernetzbares Chitosan (Ono et al. 2000), die jedoch bisher keine klinische Anwendung finden.

#### **1.1.4 Muscheladhesive**

Viele Meeresmuscheln, Seepocken und -würmer benutzen eine Kombination aus Polysacchariden und Proteinen, um sich unter Wasser fest an verschiedenste oftmals unebene Oberflächen wie Pflanzen oder Steine zu heften. Sie brauchen nur sehr wenig ihres äußerst effizienten Klebers, um sich auch bei großen Temperaturunterschieden im Salzwasser gegen mechanische Beanspruchung (z.B. Wellengang, Gezeitenströmung) und den Angriff von Mikroorganismen zu behaupten (Ebert 1993; Deming 1999). Dabei erreichen die Meerestiere mit ihren Adhäsiven eine Zugfestigkeit von 0,1 - 10 MPa abhängig von der Oberflächenbeschaffenheit des Substrats (Waiter 1999). Dieses Beispiel für erfolgreiche Adhäsion in feuchter Umgebung hat die Forschung auf der Suche nach einem bioresorbierbaren Kleber,

der auch in Gegenwart von Wasser schnell und effektiv haftet, in den letzten Jahren inspiriert (Burzio et al. 1997; Frank und Belfort 2002).



Abbildung 2 - *Mytilus edulis*

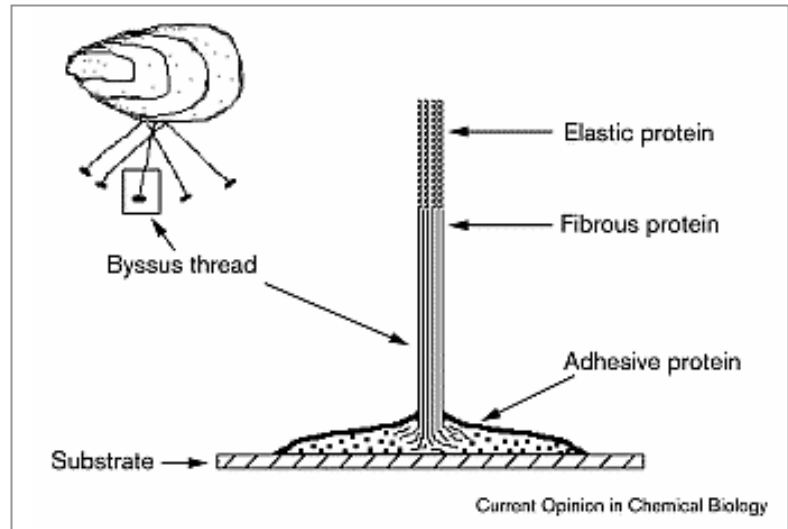


Abbildung 3 - Muschel Byssus, Waite et al. (1999)

Mit Hilfe des Byssus, ein aus mehreren Haftfäden bestehender Komplex, kleben sich die Muscheln an ihre Zieloberfläche (Waite et al. 1998). Holokrine Drüsen dieses Muschelfußes sezernieren adhäsive Proteine. Bereits 1969 konnte Cook im adhäsiven Gemisch 16 Aminosäuren, darunter Tyrosin, Phenylalanin und auch Polysaccharide identifizieren (Cook 1969). Nach vergeblichen Versuchen gelang Waite erst 1985 die komplizierte Isolierung und Charakterisierung des für die Klebewirkung hauptsächlich verantwortlichen Miesmuschelproteins Mefp-1 (*Mytilus edulis* Fussprotein 1) (Waite et al. 1985). Das basische und hydrophile Mefp-1 besteht zu 14 % aus der Aminosäure 3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), das durch posttranslationale Hydroxylierung aus Tyrosinabkömmlingen entsteht (Frank und Belfort 2002). 2006 konnte das Fussprotein der *Mytilus californianus* Mcfp-3 isoliert werden, das sich aus verschiedenen Aminosäuren und bis zu 28 % aus L-DOPA zusammensetzt (Zhao et al. 2006). L-DOPA besitzt zwei interessante Eigenschaften: einerseits zeigt es eine außergewöhnlich starke Bindung zu feuchten Oberflächen, andererseits vernetzt es andere Substanzen miteinander zu dreidimensionalen Strukturen (Burzio et al. 1997; Deacon et al. 1998; Pawlicki et al. 2004).

Die systematische Isolierung der adhäsiven Proteine für den klinischen Gebrauch ist ökonomisch kaum sinnvoll, da bereits etwa 150 Seepocken (*Balanus crenatus*) für die Gewinnung von nur 1 mg Klebprotein benötigt werden. In den letzten Jahren wurden viele Proteine identifiziert, die für die Adhäsion verschiedener Wassertiere verantwortlich sind (Burzio et al. 1997; Yu und Deming 1998). Die Gemeinsamkeit aller adhäsiven Proteine ist die relativ große Menge an Hydroxyprolin, Lysin und L-DOPA (Yu und Deming 1998; Yu et al. 1999; Zhao et al. 2006). Salerno versuchte 1993 mit rekombinanter cDNA das Protein Mefp-1 in *Escherichia coli* zu exprimieren. Die Substanz konnte daraufhin *in vitro* mit Hilfe einer Tyrosinase zu DOPA oxidiert werden (Kitamura et al. 1999). Der Versuch, DOPA direkt und in Abwesenheit von oxidierenden Enzymen ins Protein zu integrieren, misslang (Salerno und Goldberg 1993). In den letzten Jahren wurden erste Versuche unternommen, nur die bereits bekannten adhäsiven Elemente der Muschelproteine in synthetische Polymere zu integrieren (Yu und Deming 1998; Deming 1999).

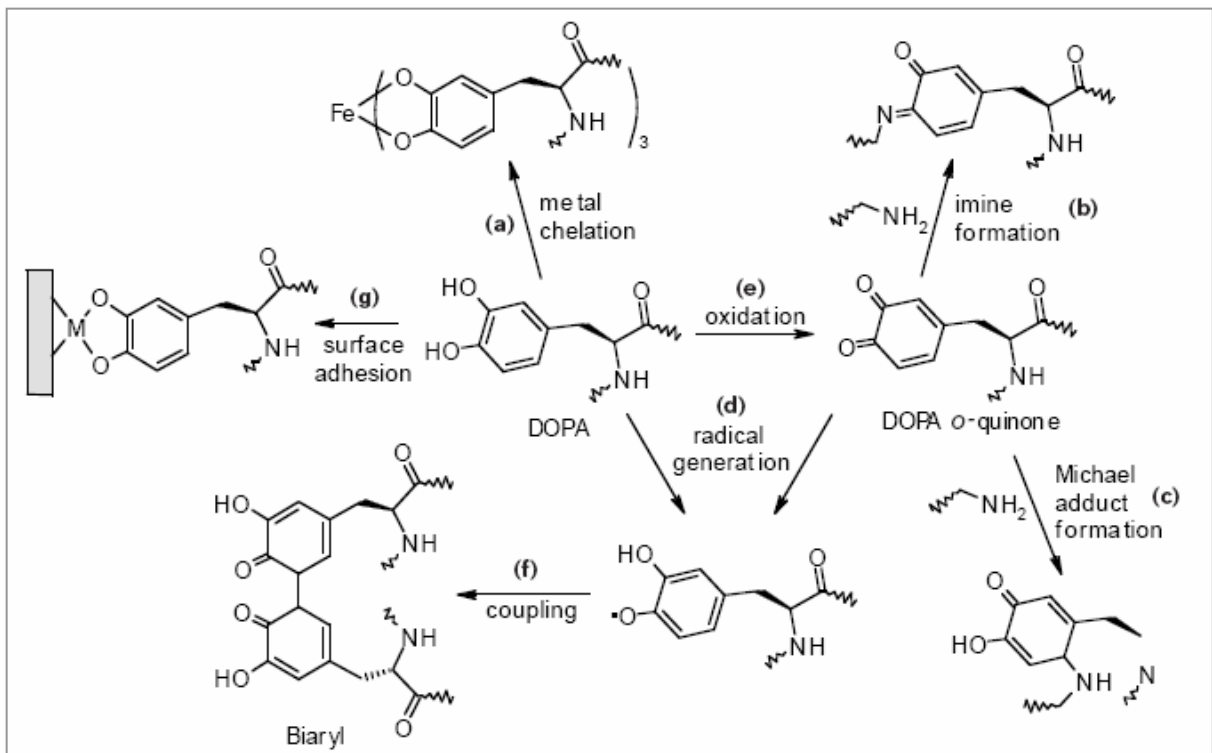


Abbildung 4 - Reaktionen von DOPA und DOPA o-Quinon, Waite et al. (1999)

Zwar wurde die adhäsive Eigenschaft des L-DOPA und die vernetzende Funktion der oxidierten Form Dopaquinon vielfach bestätigt, der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht annähernd geklärt (Yu et al. 1999; Waite 1999). Waite et al. gehen von

fünf verschiedenen möglichen Reaktionen aus, die für die klebende Wirkung des DOPA und seiner Abkömmlinge verantwortlich sein könnten. Die Reaktion mit einer Aminogruppe zu einem Imin mit Ausbildung einer Schiff'schen Basenbindung ist dargestellt unter b) in der Abbildung 4. Die Klebewirkung der hier entwickelten Kleber wurde dem der Muscheladhäsive nachempfunden und dabei auf diesen Reaktionsmechanismus reduziert.

## 1.2 Aufgabenstellung

### 1.2.1 Anforderungen an medizinische Klebstoffe

Ein idealer Gewebekleber zeigt auch in feuchter Umgebung eine starke Kohäsion und eine gute chemische Bindung zum Gewebe (Beck 1966; Brauer und Lee 1989b; Hwang und Stupp 2000; Montanaro et al. 2001). Die Bindung darf das Gewebe nicht schädigen und seine biologische Funktion nicht beeinträchtigen (Rietz 1964; Weber und Chapman 1984; Donkerwolcke et al. 1998). Der Kleber muss sterilisierbar und intraoperativ einfach zu verwenden sein (Beck 1966; Smith 1973; Meyer et al. 1979; Weber und Chapman 1984; Otani et al. 1996b; Otani et al. 1999). Zudem sollte die Festigkeit des Klebers und damit die Stabilität des Bruches binnen weniger Minuten auch bei Körpertemperatur (Smith 1973) erreicht werden, um die Operationszeiten nicht zu verlängern (Meyer et al. 1979). Darüber hinaus muss das Material biodegradierbar sein (Otani et al. 1996b; Heiss und Schnettler 2003) und die Abbauprodukte dürfen nicht toxisch, nicht teratogen, nicht kanzerogen und nicht mutagen sein (Rietz 1964; Meyer et al. 1979; Giebel und Rimpler 1981; Donkerwolcke et al. 1998). Der Gebrauch des Adhäsivs, geeignet für den klinischen Alltag, muss auch ökonomisch realisierbar sein (Meyer et al. 1979; Heiss und Schnettler 2003). Der Kleber und seine Abbauprodukte sollten durch natürliche Vorgänge vom Applikationsort entfernt und aus dem Körper ausgeschieden werden (Rietz 1964; Beck 1966). Vor allem bei der Fixierung von knöchernen Fragmenten soll die Klebewirkung für die Dauer der Heilung und Regeneration des geschädigten Gewebes erhalten bleiben bzw. nur in dem Maße abnehmen, wie sie vom regenerierenden Gewebe wieder übernommen wird (Beck 1966; Donkerwolcke et al. 1998; Hwang und Stupp 2000; Heiss und Schnettler 2003). Bei der Heilung von Frakturen werden ausreichende Festigkeiten für die physiologischen

Beanspruchungen meist nach etwa 6-12 Wochen erreicht. Durch den Einsatz eines Klebers sollte vor allem die schnelle Belastbarkeit und damit die Möglichkeit zur frühfunktionellen Therapie verbessert werden. Obwohl die Klebefestigungen am Knochen bisher nur wenig untersucht wurden und die Beanspruchungen unter physiologischen Bedingungen für die verschiedenen Indikationsbereiche erheblich variieren, lassen sich folgende mechanische Anforderungen definieren:

Die Zugfestigkeit für kortikalen Knochen beträgt ca. 100 MPa abhängig von der Dichte (McCalden et al. 1993). Für spongiösen Knochen liegt sie bei ca. 5 MPa (Carter et al. 1980; Weber und Chapman 1984). Eine solche Klebestärke wird bisher von keinem verfügbaren Kleber erzielt. Neben der Zugfestigkeit bestehen aber auch weitere Beanspruchungen an kortikale oder krafttragende Fragmente wie z.B. Biege- und Torsionskräfte. Für diese Indikationen werden auch weiterhin zusätzliche osteosynthetische Verfahren, wenn auch vielleicht in geringerem Umfang, unerlässlich sein. Durch die Anwendung eines Klebers sollen v.a. kleinere Fragmente im Gelenkbereich sicher fixiert werden. Hierbei scheinen Zugfestigkeiten von 1-3 MPa ausreichend. Andere Klebeverfahren erreichen bei der Klebung mit Fibrinkleber von kortikalem Knochen Zugfestigkeiten von 0,42 MPa (Giebel et al. 1981) und von spongiösem Knochen 0,02 MPa (Weber und Chapman 1984). Bei der Verwendung von Zementen (Calciumphosphatzement, PMMA) werden Festigkeiten von 2 - 7 MPa erreicht (Smith 1973). Die Klebestärke der Cyanoacrylate liegt bei 6,5 MPa (Brauer et al. 1979), Weber et al. messen beim Kleben von kortikalen Stücken nur 0,3 - 2,9 MPa, bei Spongiosa 0,003 - 0,5 MPa (Weber und Chapman 1984).

### 1.2.2 Entwicklung eines bioresorbierbaren Klebstoffes

Als Basismaterialien für die Klebersynthese wurden für diese Arbeit Polysaccharide (Chitosan, Stärke u. a.) ausgewählt. Die chemische Struktur der Polysaccharide lässt Biokompatibilität und Resorbierbarkeit erwarten. Eine Infektiosität der Polysaccharide ist aufgrund ihres Ursprungs in Pflanzen eher unwahrscheinlich. Außerdem bieten sie verschiedene reaktive funktionelle Gruppen zur chemischen Modifizierung. Der Klebeeffekt der entwickelten Kleber beruht auf der Vernetzung der Polysaccharidketten untereinander sowie mit dem zu verklebenden Gewebe. Dazu müssen auf den Polysacchariden funktionelle Gruppen vorhanden sein, die unter

schonenden Bedingungen bei Körpertemperatur in feuchtem Milieu miteinander Reaktionen eingehen können. Als funktionelle Gruppen zur Vernetzung werden Amino- und Aldehydgruppen benötigt. Diese Gruppen wurden entweder bei Cellulose und Stärke eingeführt oder sind bei Chitosan, einem Mucopolysaccharid, bereits vorhanden.

Polysaccharide sind Makromoleküle, deren Ketten aus monomeren Zuckereinheiten aufgebaut sind. Jede Monomereinheit besitzt bis zu drei Hydroxylgruppen. Durch polymeranaloge Reaktionen, also Reaktionen an der Kette unter weitgehendem Erhalt des Polymerisationsgrades, können diese Gruppen funktionalisiert oder substituiert werden. So können Eigenschaften der Kleber wie Löslichkeit, Reaktivität mit anderen Komponenten, Vernetzungsgrad, Adhäsion zum Gewebe und enzymatische Abbaubarkeit durch polymeranaloge Reaktionen an den funktionellen Gruppen der Polymerketten gesteuert werden (Onishi und Machida 1999; Zhang und Neau 2001). Ein Beispiel für eine pharmakologische Wirkung eines polymeranalog modifizierten Polysaccharidderivates ist die anti-HIV-1 Wirkung von regioselektiv modifizierten Chitinderivaten (Nishimura et al. 1998). Reaktive funktionelle Gruppen wie Aldehyde oder Carboxylgruppen lassen sich durch selektive Oxidationen in Polysaccharide einführen (Fransson et al. 1980; de Nooy et al. 1995), aber auch durch reduktive N-Carboxymethylierung von Chitosan (Muzzarelli et al. 1984). Bei der Funktionalisierung wurden insbesondere solche Gruppen zur kovalenten Vernetzung der Klebermoleküle mit dem Gewebe eingeführt, die auch in den Proteinen des Knochengewebes vorhanden sind, um so eine gleichmäßige Verbindung zu erreichen.

Das *Friedrich-Baur-Institut (FBI)* übernahm im Projekt, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand, die materialwissenschaftliche und chemische Entwicklung des Klebers. Dies beinhaltete die Auswahl der Grundmaterialien, die chemische Synthese verschiedener Kleberkomponenten, sowie deren chemische und physikalische Charakterisierung. Klebeversuche mit den entwickelten Materialien an Modelloberflächen dienten als Screening-Versuche und ermöglichten die Auswahl geeigneter Systeme für weiterführende Funktionalitätsprüfungen.

### 1.2.3 Biomechanische Untersuchungen

Neben der chemischen Entwicklung geeigneter Klebersysteme unter der Untersuchung auf Zelltoxizität, ist insbesondere die Prüfung der mechanischen und biomechanischen Funktionalität von entscheidender Bedeutung. Dazu war es notwendig, einen einfachen und schnellen Screeningtest für die Überprüfung des Klebeverhaltens der neu-synthetisierten potentiellen Klebermaterialien auf Modelloberflächen zu entwickeln. Glasplatten wurden mit Amino- und Carboxysilanen funktionalisiert, so dass sie die gleichen funktionellen Gruppen enthalten wie die Proteine des zu verklebenden Gewebes. Dadurch sind sie in der Lage mit den modifizierten Polysaccharidmolekülen der Kleberkomponenten kovalente Bindungen einzugehen.

Erfolgversprechende Systeme wurden durch das *Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik (UFB)* in Ulm mittels standardisierter Knochenstücke Zugfestigkeitsuntersuchungen unterzogen.

### 1.2.4 Zytotoxizitätsuntersuchungen *in vitro*

Es ist notwendig, die toxikologische Unbedenklichkeit der eingesetzten Materialien anhand von Parametern wie Zellproliferation, Zellvitalität und Morphologie in Anlehnung an ISO 10993-5 zu untersuchen. Dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Zellkulturmodell entwickelt und etabliert, das es erlaubt, die Kleber in physiologischen Systemen *in vitro* zu untersuchen. Nach Inkubation der Kulturwells mit den Klebern wurden Zellen in unterschiedlichen Zellzahlen für verschiedene Zeitintervalle kultiviert und beobachtet. Die Viabilität der Zellen wurde mit Assays zur Zellaktivität, Zellproliferation und zur Zellmembranintegrität bewertet. Außerdem wurden die Zellen bezüglich ihrer Morphologie beurteilt. Darüber hinaus wurden Wachstumstests im indirekten Kontakt mit den Klebern durchgeführt, die mit einem Zellviabilitätsassay mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden konnten. Die in dieser Arbeit etablierten Methoden und gesammelten Ergebnisse sollen als Screening-Methode zur gezielten Auswahl der entwickelten Materialien für die *in vivo*-Testung dienen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zellen und Medien

Mesenchymale Mauszellen (MC3T3-E1) wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben. Die ursprünglich aus Japan stammende Zelllinie (RIKEN Cell Bank (RCB1126), Tsubuka Science City, Ibaraki, Japan) wurde aus dem knöchernen Schädeldach von Embryos bzw. Föten der C57BL/6 Maus gewonnen und mittels verschiedener maustypischer Oberflächenantigene spezifiziert. Die osteoblastenähnlichen Zellen wachsen adhärent als Monolayer und verdoppeln ihre Zellzahl innerhalb von 2-3 Tagen. Zudem gehören die Differenzierung zu osteoblastären Zellen und Kollagensynthese zu den beschriebenen Eigenschaften dieser Zellen (Sudo et al. 1983).

#### 2.1.2 Auftauen der Zellen

Nach Auftauen des Röhrchens unter vorsichtigem Schwenken im 37°C warmen Wasserbad, wurde dessen Inhalt in 5 ml Nährmedium aufgenommen. Die Suspension wurde anschließend bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Sediment in 8 ml Medium resuspendiert und auf vier T 75 Kultivierungsflaschen (75 cm<sup>2</sup> Bodenfläche) verteilt. Jede T 75 wurde mit zusätzlich 8 ml Nährmedium befüllt und zur Kultivierung bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in den Brutschrank gestellt.

#### 2.1.3 Kultivierung der Zellen

MC3T3-E1-Zellen wurden entsprechend der Herstellerangaben als Monolayer bei 37°C, 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und ca. 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Kultivierung wurden die Zellen in einer Konzentration von 0,2 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>2</sup> großen Kulturflaschen angesetzt. Das Kulturmedium  $\alpha$ -MEM mit Glutamax I (Zusätze: Ribonukleotide, Desoxyribonukleotide) wurde gemäß Herstellerangaben



mit 10 % FBS (fetal bovine serum), sowie 40 IU/ml Penicillin/Streptomycin versetzt. Der Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle drei bzw. vier Tage.

Bei Erreichen der Zellkonfluenz erfolgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 3 ml PBS (phosphat buffered saline) gespült, um Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml 0,5 %igem Trypsin in 5,3 mM Na-EDTA für die Dauer von 6 Minuten inkubiert, bis sie sich vom Flaschenboden lösten. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen, mikroskopisch mittels Neubauer Zählkammer ausgezählt und nach Bedarf weiterkultiviert oder für Experimente ausgesät. Bis auf PBS, das Raumtemperatur hatte, wurden alle Lösungen und Medien zuvor auf 37°C im Wasserbad erwärmt. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die die 17. Passage nicht überschritten hatten.

#### 2.1.4 Kryokonservierung der Zellen

Kryomedium, bestehend aus 70 %  $\alpha$ -MEM mit Glutamax I, 20 % (v/v) FBS und 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde angesetzt und sterilfiltriert.  $1 \times 10^6 - 2 \times 10^6$  Zellen wurden in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden für 2 Stunden bei -20°C gelagert, bevor sie im Anschluß über Nacht auf -80°C herunter gekühlt wurden. Am folgenden Tag wurden sie zur Kryokonservierung in flüssigen Stickstoff gegeben.

## 2.2 Kleberkomponenten

Der Hartgewebekleber besteht aus zwei verschiedenen Substanzen: Eine Komponente mit Aldehydgruppen R-CH=O (Dextran oder Stärke) und eine mit Aminogruppen NH<sub>2</sub> (Chitosan). Bei Kontakt binden beide Komponenten unter Ausbildung von Schiff'schen Basen innerhalb weniger Sekunden kovalent.

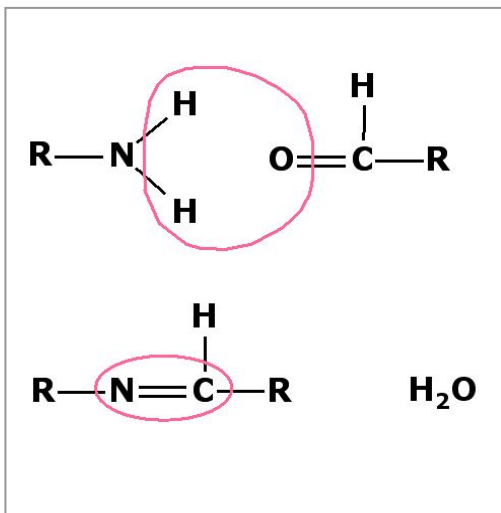


Abbildung 5 - Schiff'sche Base

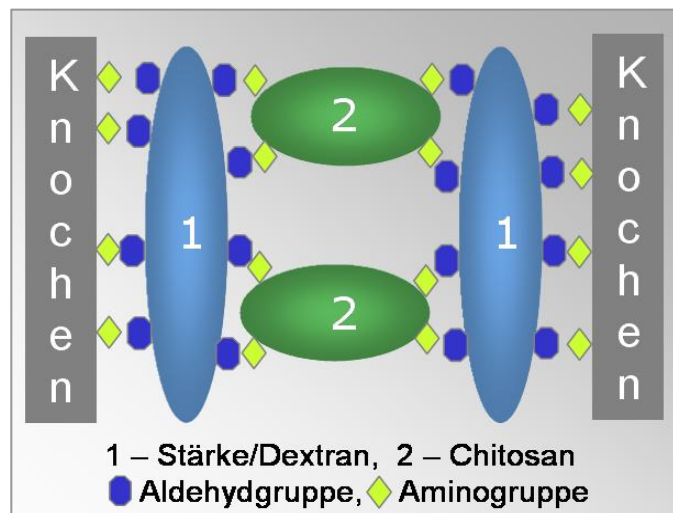


Abbildung 6 - Klebprinzip

Zur Auswahl standen mehrere Polysaccharidkomponenten, die sich durch die Funktionalisierung unterscheiden. Zur Testung der Zytotoxizität wurden die folgenden Kombinationen gewählt, wobei die Stundenzahl der Deacetylierungszeit (Chitosan) bzw. Oxidationszeit (Dextran oder Stärke) der Komponenten entspricht:

**Kleber a:** Chitosan 24 h und Dextran 1 h

**Kleber b:** Chitosan 24 h und Stärke 1,5 h

**Kleber c:** Chitosan 24 h und Stärke 72 h

Die einzelnen Komponenten wurden in Pulverform, trocken und bei Raumtemperatur gelagert. Für die Experimente wurde jede Kleberkomponente getrennt abgewogen und in den Konzentrationen 0,07 g/ml (Chitosan) und 0,2 g/ml (Dextran bzw. Stärke) separat in einem kleinen Rollrandglas in Aqua bidestillata gelöst. Bei schlechtem Löseverhalten wurde die magnetische Rühr- und Wärmeplatte kurz auf maximal 40°C erhitzt.

## 2.3 Versuchsansatz

### 2.3.1 Aufbringen der Kleber

Für jeden vorgesehenen Testtag wurde eine Kollagen-I beschichtete 24-Well Kultivierungsplatte angesetzt. Je 100 µl der beiden gelösten Komponenten (siehe

2.2) wurden nacheinander gleichmäßig in die Wells gegeben und durch rasches resuspendieren miteinander vermischt. Nach etwa 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde jedes Well je dreimal mit 1 ml PBS gründlich gespült, um Kleberreste zu entfernen. Anschließend wurde jedes Well mit 1 ml FBS benetzt und für mindestens 12 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. So sollten eventuell noch vorhandene reaktive Gruppen der Kleberkomponenten geblockt werden.

### 2.3.2 Versuchsaufbau A und B

Gemäß ISO 10993-5 wurden drei verschiedene Versuchsansätze zur Untersuchung der zelltoxischen Effekte der Kleber gewählt.

#### **Versuchsaufbau A**

Um eine Vorstellung von den Effekten der Kleber auf eine große Zellzahl zu bekommen wurden folgende Bedingungen gewählt: Drei der mit Kleber versehenen Wells wurden mit je  $5 \times 10^4$  MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> beimpft, für 2 Tage kultiviert und anschließend getestet.

#### **Versuchsaufbau B**

$0,5 \times 10^4$  MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> wurden in die zuvor mit Kleber behandelten Wells ausgesät und für die Dauer von 14 Tagen kultiviert. Zur Testung wurden die Zeitfenster Tag 2, Tag 7 und Tag 14 bestimmt. So konnte die längerfristige Entwicklung der Zellen im Kontakt mit den Kleberproben beobachtet werden.

Alle beschriebenen Versuche wurden in Triplets durchgeführt. Bei beiden Versuchs-



Abbildung 7 - Kupferplättchen

aufbauten wurden zudem für jeden Testzeitpunkt eine Negativkontrolle (Polyesterol, Kollagen-I beschichtet) und eine Positivkontrolle (Kupferplättchen, Stärke 0,3 mm) mitgeführt. Die der Wellgröße exakt angepassten Plättchen bedeckten den Boden vollständig. Für jedes zu testende Well wurde der entsprechende Leerwert ermittelt, der später vom Ergebnis abgezogen wurde.

Für jede Probe wurde eine Doppelwertbestimmung durchgeführt.

### 2.3.3 Aussaat der Zellen

MC3T3-E1 Zellen wurden trypsiniert und in Medium auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5/\text{ml}$  für Versuchsansatz A beziehungsweise  $0,2 \times 10^5/\text{ml}$  für Versuchsansatz B verdünnt. Nach Abnehmen des FBS wurden je  $500 \mu\text{l}$  der entsprechenden Zellsuspensionen in die Wells gegeben. Für den Positivkontrollwert wurden die zuvor mit 70 %igem Ethanol desinfizierten Kupferplättchen mit Werkzeug fest in die Vertiefungen gedrückt und ebenfalls mit der entsprechenden Zelllösung versehen. Kultivierung und Medienwechsel erfolgten wie oben beschrieben.

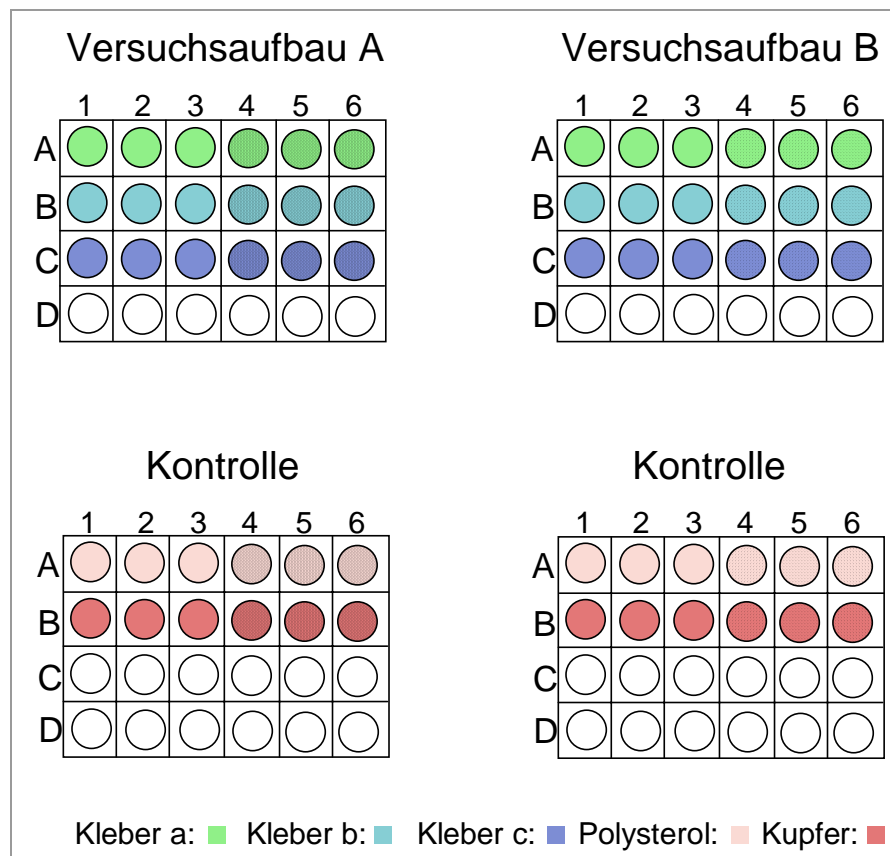


Abbildung 8 - Versuchsaufbau A und B

## 2.4 Auswertemethoden

### 2.4.1 Zellaktivität - WST-I Assay

Eine gesunde Zelle ist in der Lage benötigte Energie in den zelleigenen „Kraftwerken“, den Mitochondrien, zu generieren. Eine Vielzahl unterschiedlicher Enzyme ist an diesem komplexen Prozess beteiligt. Eine vitale, sich in der Zellteilung befindende Zelle mit einem hohen energetischen Umsatz muss demnach eine ausgeprägte mitochondriale Aktivität zeigen. Eine geschwächte Zelle, die nicht unter idealen Bedingungen kultiviert wird (wie z.B. nicht ausreichend Nährstoffe im Medium), weist dagegen eine verringerte Zellaktivität auf.

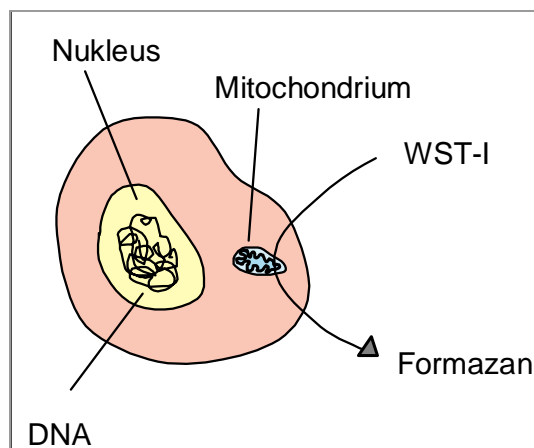


Abbildung 9 - WST-I Assay

Der WST-I Assay (Roche) ermöglicht die Messung der metabolischen Aktivität der Zelle. Das hellrote Substrat WST-I wird dabei von mitochondrialen Enzymen (vor allem Succinat-Dehydrogenase) der Zelle zu intensivrotem Formazan reduziert. Die Extinktion dieses wasserlöslichen Salzes lässt sich mit dem ELISA plate reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmen. Das Ergebnis korreliert direkt mit der Aktivität der mitochondrialen Enzyme der Zellen.

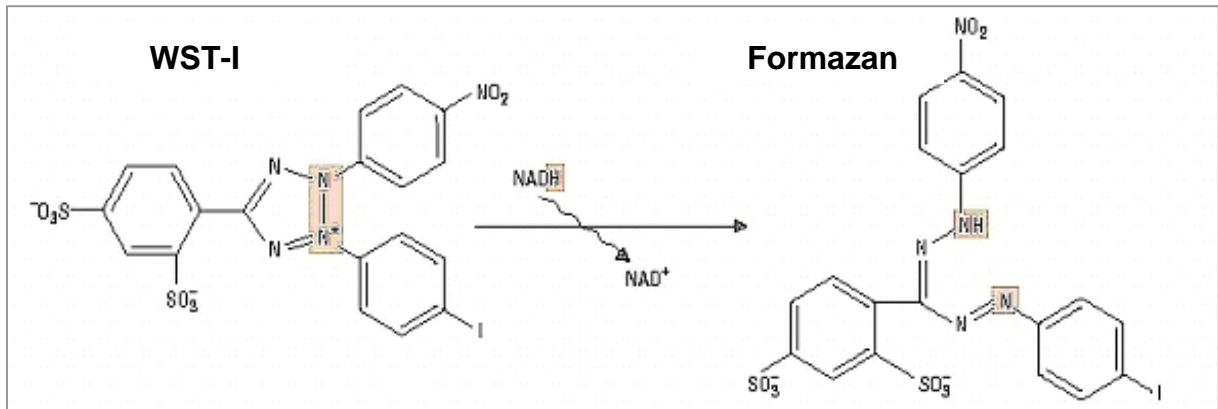


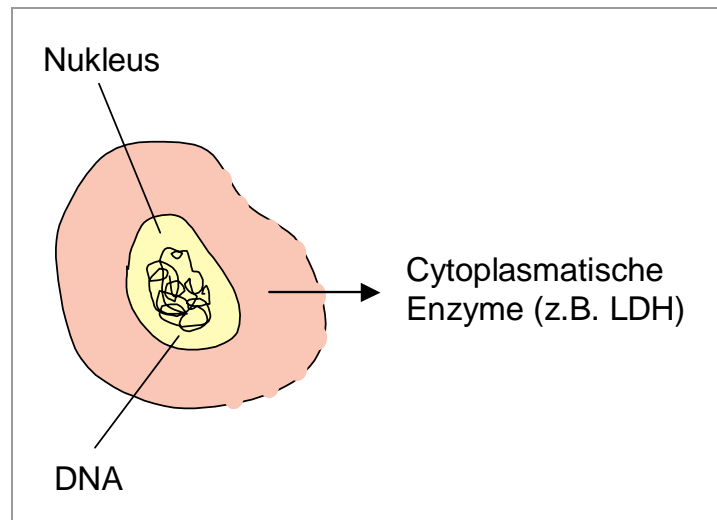
Abbildung 10 - Molekulare Struktur von WST-I und Formazan

Die Durchführung erfolgte entsprechend der Anleitung: Das WST-I Reagenz wurde kurz vor Versuchsbeginn auf 37°C angewärmt und in der Konzentration 1:10 in Medium verdünnt. Von dieser Lösung wurden 500 µl in jedes Kulturwell gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden zur Doppelbestimmung 2 x 100 µl aus jedem Well in eine 96-Well Platte überführt und die Extinktionen bei 450 nm mit Hilfe des ELISA plate reader gemessen.

#### 2.4.2 Zellmembranintegrität - TOX-7 Assay

Die Membran einer Zelle ist ihre Abgrenzung nach außen. Die Zelle ist in der Lage die Membrandurchlässigkeit für verschiedene Stoffe zu bestimmen und regelt damit den Stoffaustausch mit ihrer Umgebung. Die Funktion der Membran gewährleistet zum einen das empfindliche Gleichgewicht der Stoffe (z.B. Elektrolyte) zwischen Intra- und Extrazellulärraum. Zum anderen bietet sie den Schutz vor Verlust wichtiger zelleigener Moleküle.

Die Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, das vor allem im Glucose-Stoffwechsel eine Rolle spielt. Im Falle eines beginnenden Membrandefekts diffundiert LDH in den Extrazellulärraum.



**Abbildung 11 - Defekte Zellmembran**

LDH oxidiert Lactat unter Freiwerden von NADH zu Pyruvat (Yu et al. 2001). Die katalysierende Funktion dieses freigewordenen NADH macht sich der TOX-7 Assay zu Nutze um die extrazellulär vorhandene Menge an LDH quantitativ bestimmen zu können: Hinzugefügtes Tetrazolium wird mit Hilfe des freien NADH zu Formazan umgewandelt, dessen Extinktion im ELISA plate reader bei 490 nm bestimmt wird. Die daraus gewonnenen Ergebnisse stehen in direktem Zusammenhang mit der Membranintegrität der Zellen und lassen damit eine Aussage über ihre Vitalität zu.

An den Auswertetagen wurden aus jedem Well 500 µl des Überstands abgenommen und in einzelne Eppendorf Reaktionsgefäße gegeben. Die Überstände wurden 4 Minuten bei 200 g in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

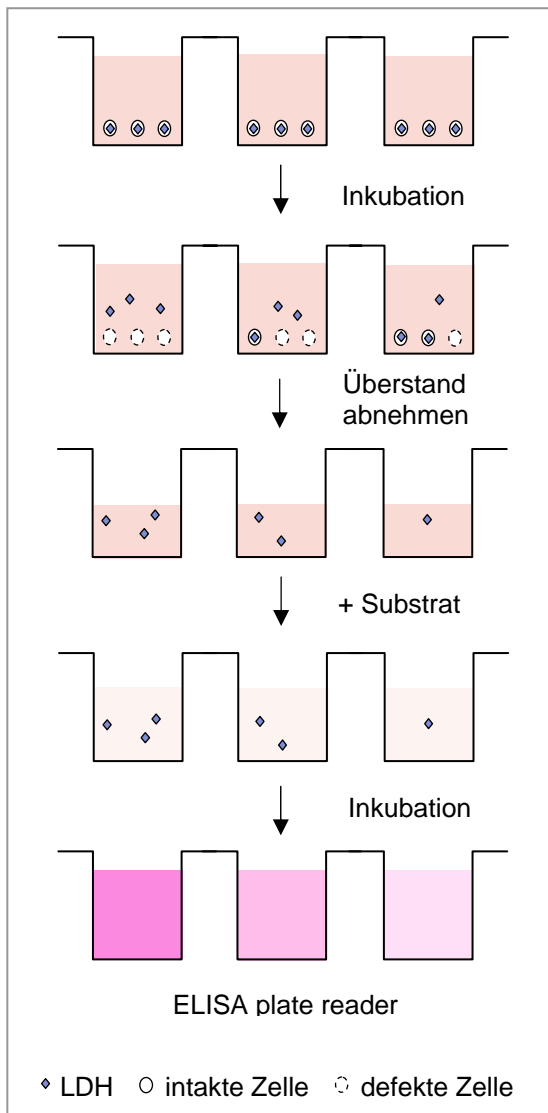


Abbildung 12 - Arbeitsschritte TOX-7 Assay

Anschließend wurden je 200  $\mu\text{l}$  Überstand aus jedem zentrifugierten Reaktionsgefäß in ein neues gegeben. Die Arbeitsschritte erfolgten gemäß der Anleitung im Kit: Die TOX-7 Arbeitslösung wurde im Verhältnis 1:2 (100  $\mu\text{l}$  TOX-7 Solution auf 200  $\mu\text{l}$  Überstand) in die Eppendorf Reaktionsgefäße pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluß inkubiert. Die TOX-7 Arbeitslösung, bestehend aus je gleichen Teilen Substrat-, Enzyme- und Dye-Solution, muss sofort nach dem Mischen verwendet werden. Nach beendeter Inkubationszeit wurden aus jedem Reaktionsgefäß 2 x 100  $\mu\text{l}$  zur Doppelwertbestimmung in eine 96-Well-Platte überführt und deren Extinktionen im ELISA plate reader bei 490 nm bestimmt.



### 2.4.3 Zellproliferation - BrdU Assay

Bevor sich eine Zelle in zwei Tochterzellen teilen kann, muss sie ihr Erbmateriale verdoppeln. Der direkte Zusammenhang zwischen DNA Synthese und Zellverdopplung lässt die Messung von neusynthetisierter DNA als Parameter für die Zellproliferation zu.

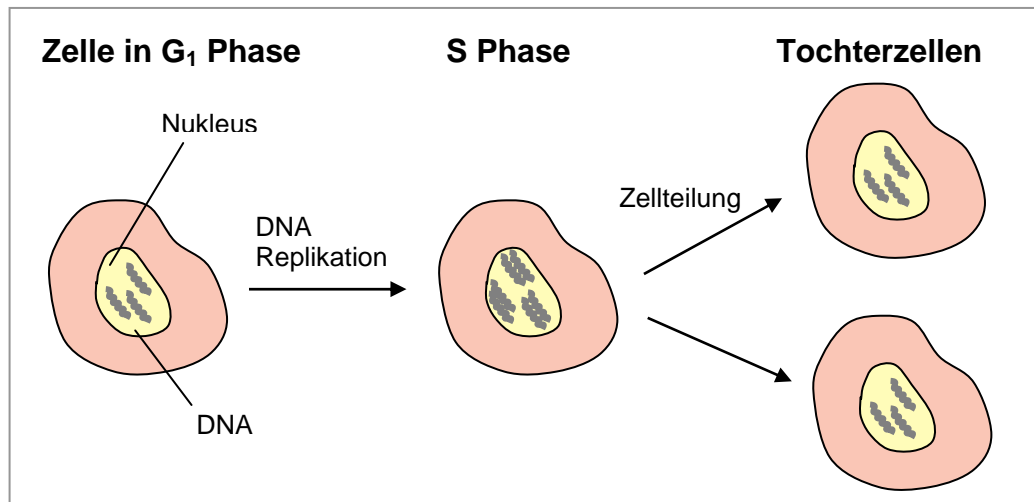
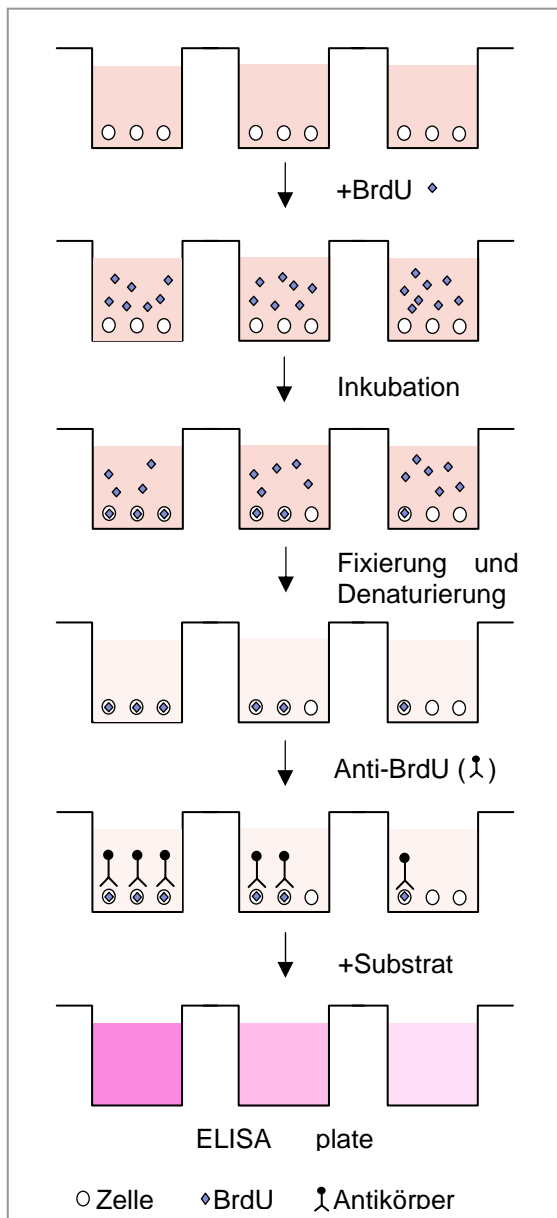


Abbildung 13 - DNA Synthese und Zellverdopplung

Zur Synthese der neuen, komplementären DNA benötigt die Zelle verschiedene Einzelbausteine wie z.B. Nucleotide. Thymidin, ein Nucleotid, wird mit Brom markiert und dem Medium zugegeben. Die proliferierende Zelle baut nun das baugleiche Nucleotid 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) an Stelle des Thymidin in die synthetisierte DNA ein. Das eingebaute BrdU wird nach Fixieren der Zelle und Denaturieren der DNA von spezifischen monoklonalen Antikörpern erkannt. An diese Antikörper wurde zuvor eine Peroxidase (POD) gekoppelt. Diese ermöglicht die quantitative Messung des eingebauten BrdU, weil sie ein dazugegebenes Substrat (TMB) umsetzt. Die Extinktion des entstandenen Produktes kann im ELISA plate reader bei 450 nm photometrisch bestimmt werden.



**Abbildung 14 - Arbeitsschritte BrdU Assay**

Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der Vorgaben im Kit: An den Testzeitpunkten wurde BrdU labeling solution (BrdU-Kit) mit Medium auf 1:1000 verdünnt in jedes Well gegeben. Nach zweistündiger Inkubation der Kulturplatten im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen durch Zugabe von 1000 µl FixDenat Lösung (BrdU-Kit) für 30 min bei Raumtemperatur fixiert und deaktiviert. Je 500 µl in Antibody-solution (BrdU-Kit) verdünnten Antikörper wurde dazugegeben und für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer x 1 (BrdU-Kit) für je 3 min wurden 500 µl Substrat (BrdU-Kit) zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in jedes Well beendet. Zur Doppelbestimmung wurden 2 x je 100 µl aus jedem Well entnommen, in eine 96-Well Platte überführt und die Extinktionen bei 450 nm im ELISA plate Reader bestimmt.

### 2.4.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe eines Hämocytometers. Dafür wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Medium resuspendiert. 10 µl dieser Zellsuspension wurden in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Um tote Zellen von der Messung auszuschließen und nur lebende Zellen zu zählen, wird die Zellsuspensionsprobe mit 5 µl TrypanBlau Stain 0,4 % (Gibco), versetzt. Der blaue Farbstoff dringt nur durch defekte Zellmembranen in die Zellen ein und lässt so die Unterscheidung von gesunden und lebenden Zellen zu. Etwa 7 µl der gefärbten Zellsuspension werden zwischen Glaskammer und Deckblatt aufgetragen. Die mikroskopische Ausgezählung der Zellen erfolgt auf einer Fläche von 4 x 1 mm<sup>2</sup> der flachen Glaskammer (Abbildung 15, Abschnitte 1-4).

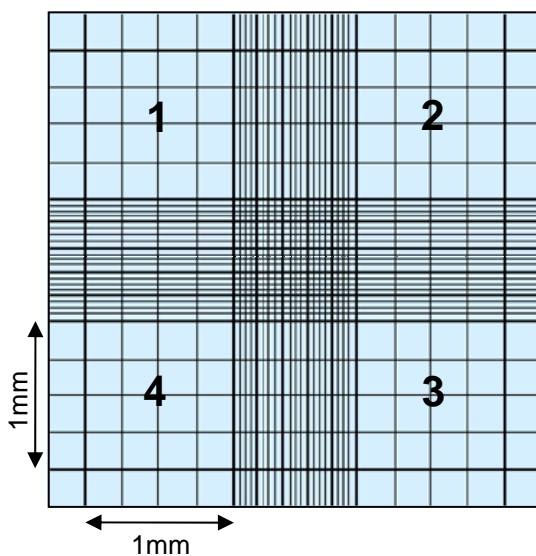


Abbildung 15 - Neubauer Zählkammer

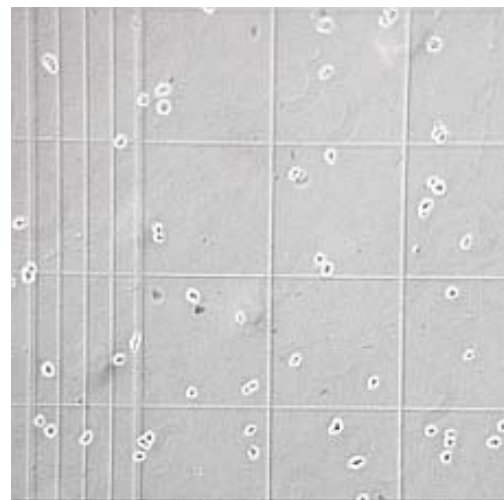


Abbildung 16 - TrypanBlau Färbung

Die Gesamtzahl aller gezählten lebenden Zellen wird durch vier geteilt und mit dem Verdünnungsfaktors der Färbung 1,5 multipliziert. Um die Zellzahl pro ml zu erhalten, wird mit 10.000 multipliziert.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Gezählte Zellzahl}}{4} \times 1,5 \times 10^4$$

## 2.5 Versuchsaufbau C

### 2.5.1 Versuchsaufbau

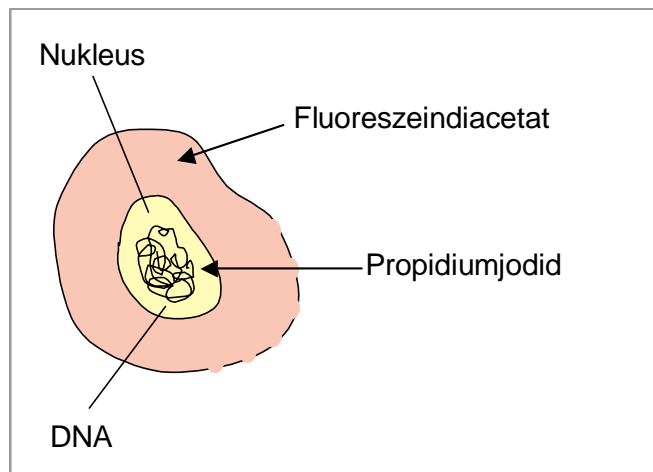
Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen nicht in direkten Kontakt mit dem Kleber gebracht, sondern nur mit seinem Eluat. Dafür wurde Kleber a (wie unter 2.2 beschrieben) in Aqua bidestillata gelöst und in die Wells zweier Kollagen-I beschichteter 6-Well Kultivierungsplatten gegeben. Nach Spülen mit PBS und Blocken eventuell noch vorhandener reaktiver Gruppen mit FBS wurden in jedes Well ca. 2,5 ml MC3T3-E1 Kulturmedium pipettiert und für die Dauer von 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und gesammelt.

### 2.5.2 Zellvitalität - Fluoreszeindiacetat und Propidiumjodid

Für die Färbung mit Fluoreszeindiacetat und Propidiumjodid wurden die Zellen auf sterilen, Kollagen-I beschichteten Objektträgern in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro Objektträger (ca. 600 Zellen/cm<sup>2</sup>) in 2,5 ml Medium angesetzt. Die Objektträger inkubierten für 2 Stunden im Brutschrank bis die Zellen am Boden adhärten. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zelladhärenz wurde das Medium abgenommen. Drei der Objektträger wurden mit 2,5 ml des zuvor mit Kleber a inkubierten Mediums versetzt, drei weitere Objektträger wurden mit der gleichen Menge des normalen MC3T3-E1 Mediums versehen und unter gewohnten Zellkulturbedingungen für 24 Stunden kultiviert. Im Stadium der Subkonfluenz wurden die unterschiedlichen Medien abgenommen und die Objektträger mit PBS gespült.

Zur Herstellung einer Arbeitslösung der fluoreszierenden Substanzen, wurde Fluoreszeindiacetat im Verhältnis 1:500 und Propidiumjodid im Verhältnis 1:1 in PBS verdünnt. Die Objektträger wurden anschließend mit einer Lösung aus den verdünnten Substanzen Fluoreszeindiacetat und Propidiumjodid (im Verhältnis 2:1) unter Lichtausschluß für 30 Sekunden bedeckt. Nach Spülen mit dem Puffer wurden die fluoreszierenden Farbstoffe mit einem Dreifachfilter der Firma Zeiss (Fluoreszeindiacetat: Ex 450 nm, Em 515 nm, Propidiumjodid: Ex 488 nm, Em 615 nm) im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen und digital festgehalten.

Die unpolare, hydrophobe und nicht fluoreszierende Esterbindung Fluoresceindiacetat diffundiert passiv durch die Zellmembranen in die Zellen, und wird dort durch unspezifische Esterasen zu einem polaren, fluoreszierenden Farbstoff hydrolysiert. Dieser Farbstoff wird in vitalen Zellen zurückgehalten, so dass diese unter dem Fluoreszenzmikroskop leuchtend grün fluoreszieren. Avitale Zellen verfügen über keine Esteraseaktivität und zeigen daher keine Fluoreszenz. Propidiumjodid kann nur in avitale Zellen durch nicht intakte Zellmembranen eindringen. Der Farbstoff lagert sich im Zellkern in die helikale Struktur der DNA ein und wird im Fluoreszenzmikroskop rot fluoreszierend sichtbar gemacht.



**Abbildung 17 - Defekte Zellmembran**

## 2.6 Material und Geräte

Material	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Typ 770	Kern, D
Aqua ad injectabilia	-	B. Braun, D
Aqua bidestillata	-	Noll, D
Autoklav	Varioklav 300	H+P Labortechnik, D
BrdU-Kit	Cellproliferation ELISA, colorimetric	Roche Diagnostics, D
Brutschrank	IG 150	Jouan, F
Digitalkamera	3CCD Color Video Camera	Sony, J
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma-Aldrich, D
Einmal-Pipetten	2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, D
Einmal-Spritzen	2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml	Becton Dickinson, USA
ELISA plate reader	Microplatereader	Dynex Technologies, UK
Eppendorf Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf, D
Ethanol	70 % in Aqua dest	Staub, D
Fetal Bovine Serum	FBS	Sigma-Aldrich, D
Fluoreszeindiacetat	-	Fluka, D
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Zeiss, D
Flüssigkeitsabsaugssystem	-	Roth, D
Kühl-Gefrierkombination	Premium	Liebherr, D
Kulturflaschen	Nunclone surface, T25, T75	Nunc, DK
Kulturmedium MC3T3-E1	Alpha MEM Glutamax I	GibcoBRL, D
Kulturmedium POB	Dulbeccos Modified Eagle Medium	GibcoBRL, D
Kulturplatte	96-Well	Nunc, DK
Kulturplatte, Kollagen-I beschichtet	24-Well	Greiner bio-one, D
Kupferplättchen und Werkzeug	0,3 mm x 16 mm	Werkstatt im Hause, D
LDH Assay-KIT	TOX-7	Sigma-Aldrich, D

Material	Bezeichnung	Hersteller
Magnetische Rühr- und Wärmeplatte	heating magnetic stirrer	ARE, USA
MC3T3-E1	MC3T3-E1	DSMZ, D
Mikroskop	Axiovert S100	Zeiss, D
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved	Brand, D
Objektträger Kollagen-I beschichtet	Biocoat, 1 Well CultureSlide	Becton Dickinson Labware, USA
Pasteur-Pipetten	230 mm	Schott, D
Penicillin/Streptomycin	-	Gibco, USA
Phosphate Buffered Saline	PBS	Gibco, USA
Pipetten	Pipetman	Gilson, USA
Pipettenspitzen	10, 20, 100, 200,1000 µl	Biozym, D
Pipettierhilfe	Pipettus akku	Hirschmann, D
Propidiumjodid	-	Sigma, D
Rollrandglas	mit Kunststoffdeckel	Roth, D
Schwefelsäure	0,5 molar	Roth, D
Sterilbank	Antares 72	Biohit, D
Tischzentrifuge	Centrifuge 54115D	Eppendorf, D
TrypanBlau Stain 0,4%	-	Gibco BRL life technologies, USA
Trypsin/EDTA	-	Gibco BRL life technologies, USA
Universalindikator	pH 0-14	Merck, D
Vortex-Schüttler	Vortex genie 2	Scientific industries, USA
Wasserbad	-	GFL, D
WST-I Reagent	-	Roche, D
Zellschaber	Cell Scraper	Sarstedt, USA
Zentrifuge	CT 422	Jouan, F
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml	Sarstedt, D

Tabelle 1 - Übersicht verwendeter Materialien und Geräte

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kleberproben

#### 3.1.1 Eigenschaften der Einzelkomponenten

Die verschiedenen Komponenten, in Pulverform, trocken und bei Raumtemperatur gelagert, wurden für die Experimente in den Konzentrationen 0,07 g/ml (Chitosan) und 0,2 g/ml (Dextran bzw. Stärke) separat im kleinen Rollrandglas in Aqua bidestillata gelöst. Alle vier Komponenten sind in trockenem Zustand und auch gelöst geruchlos.

Chitosan 24 h ist ein weisses bis bräunliches, flockiges Pulver und wird in gelöster Form hellbraun und leicht viskös.



**Abbildung 18 - Chitosan 24 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata**

Das hellweisse, in trockenem Zustand voluminöse Dextran 1 h wird vollständig gelöst in Aqua bidestillata und nach etwa einer Stunde Rühren klar und flüssig bis viskös.





**Abbildung 19 - Dextran 1 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata**

Stärke 1,5 h, zuerst ebenfalls weiss und flockig, wird bei Lösen in bidestilliertem Wasser milchig weiß, geleeartig, und löst sich auch nach mehrstündiger Rührzeit schwer.



**Abbildung 20 - Stärke 1,5 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata**

Stärke 72 h ist in trockenem Zustand weiss und wird bei Zugabe von Aqua bidestillata rasch klar und flüssig.



Abbildung 21 - Stärke 72 h trocken und gelöst in Aqua bidestillata

### 3.1.2 Eigenschaften der Zweikomponentenkleber

**Kleber a:** Chitosan 24 h und Dextran 1 h werden zusammen gegeben und durch rasches Resuspendieren möglichst homogen miteinander vermischt. Bereits nach wenigen Sekunden wird die Masse geleeartig und bleibt am Objektträger haften.

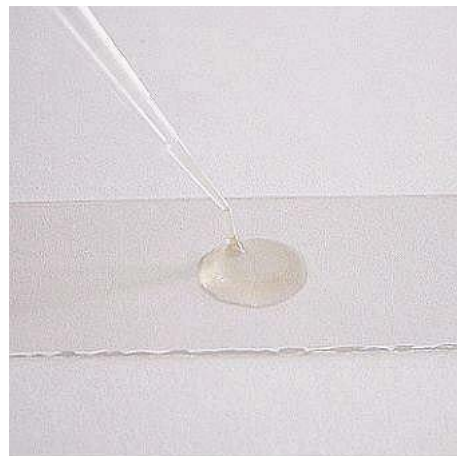
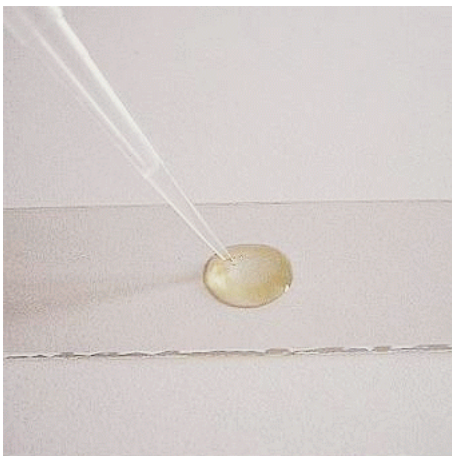


Abbildung 22 - Kleber a: Chitosan 24 h und Dextran 1 h

**Kleber b:** Chitosan 24 h und Stärke 1,5 h werden wie oben beschrieben zusammengegeben und flocken im gleichen Moment aus. Der Kleber wird feucht-klumpig und bleibt nur teilweise am Boden haften.

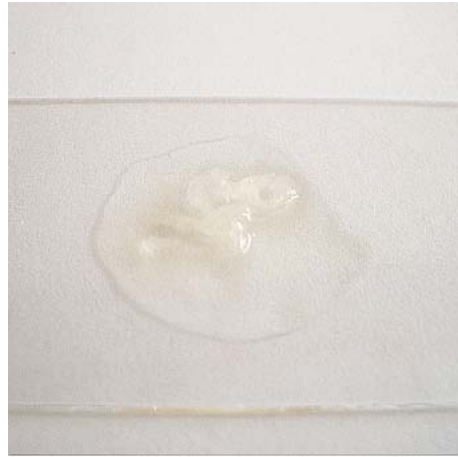


Abbildung 23 - Kleber b: Chitosan 24 h und Stärke 1,5 h

**Kleber c:** Die Komponenten Chitosan 24 h und Stärke 72 h ergeben in Kombination sehr schnell eine gelatineartige Masse, die feine Fäden zieht. Der Kleber bedeckt den Wellboden komplett.



Abbildung 24 - Kleber c: Chitosan 24 h und Stärke 72 h

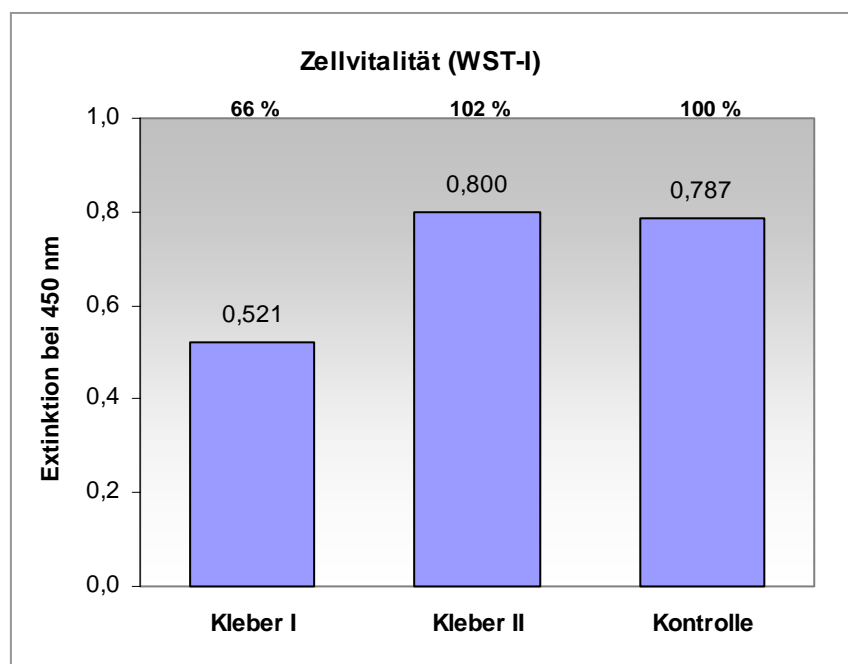
## 3.2 Zytotoxizität

### 3.2.1 Vorversuche

#### 3.2.1.1 Zellaktivität - WST-I

In einem Vorversuch wurden zwei früh entwickelte Kleber getestet. Kleber I enthielt 50 mg/ml Chitosan und 100 mg/ml Stärke gelöst in Wasser. Kleber II bestand ebenfalls aus 50 mg/ml Chitosan und 100 mg/ml einer kombinierten Stärke/L-Dopa Komponente. Auf den gespülten und geblockten Kleber wurden  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und für 48 h kultiviert. Anschließend wurden ein Zellvitalitätsassay (WST-I) und ein Proliferationsassay (BrdU) durchgeführt.

Die gemessenen Extinktionen der Proben mit direktem Kontakt zu Kleber II im WST-I Assay zeigen eine Extinktion, die sich kaum vom Ergebnis der Negativkontrolle unterscheidet. Die Extinktion des Versuchs mit Kleber I liegt mit 66 % Aktivität verglichen mit der Kontrolle deutlich darunter.

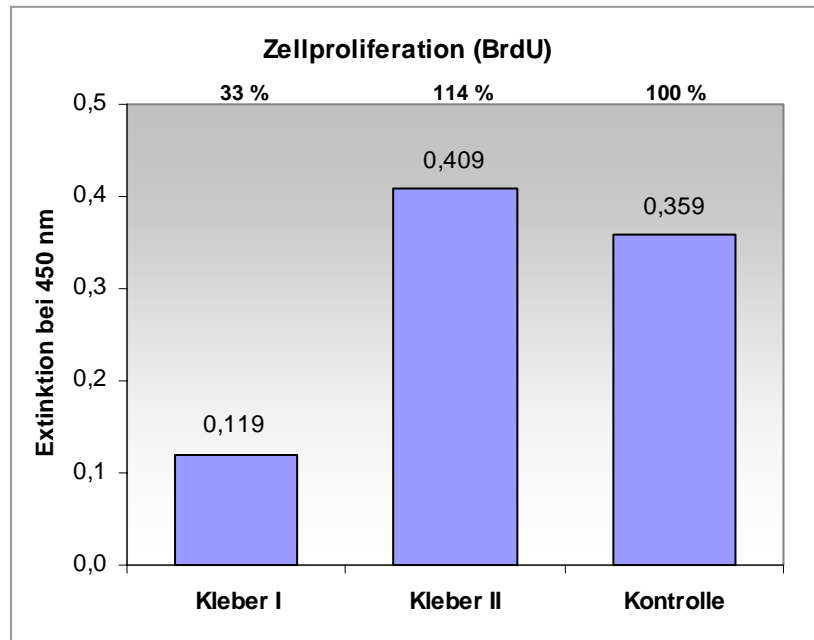


**Abbildung 25 - Zellvitalität (WST-I) Vorversuch**

Ergebnisse des WST-I Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 450 nm nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Klebern I und II, sowie auf der Plastikkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 Proben nach Abzug des Nullwertes.

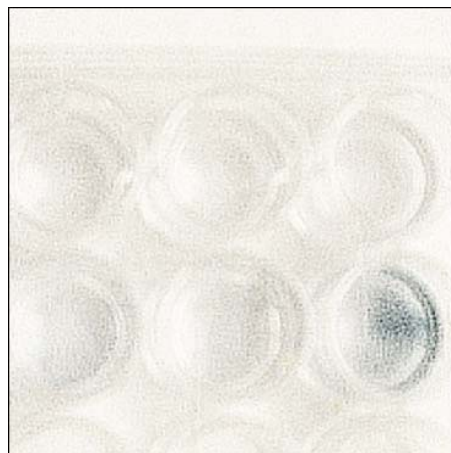
### 3.2.1.2 Zellproliferation - BrdU

Die Ergebnisse des BrdU Assays zeigten hohe Extinktionen für die Überstände der Negativkontrolle und der mit Kleber II kultivierten Zellen. Bei der Probe mit Kleber I war weniger Extinktion messbar, was nur wenig neusynthetisierter DNA entspricht.



**Abbildung 26 - Zellproliferation (BrdU) Vorversuch**

Ergebnisse des BrdU Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 450 nm nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Klebern I und II, sowie auf der Plastikkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte von je 3 Proben nach Abzug des Nullwertes.



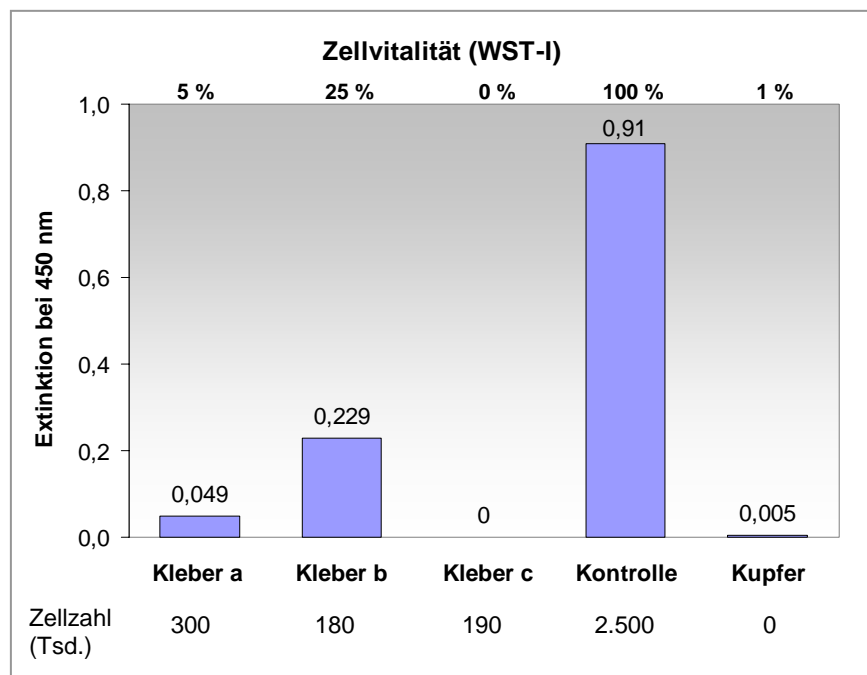
**Abbildung 27 - Farbreaktion bei BrdU**

Nach Zugabe des Substrates fiel eine deutliche, blaue Farbreaktion in direkter Nähe zu den Kleberresten auf. Abbildung 27 zeigt in den oberen drei Wells die Kontrolle und unten die mit Kleber beimpften Wells nach Zugabe von BrdU-Substrat.

### 3.2.2 Versuchsaufbau A

#### 3.2.2.1 Zellaktivität - WST-I

Die Ergebnisse des WST-I Assays im Versuchsansatz A mit  $5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  und einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden sind in der Abbildung 28 dargestellt. Bei den Klebern a und b zeigt sich im WST-I Assay nur eine geringe Extinktion. In den mit Kleber c inkubierten Wells war keine Enzymaktivität messbar. Die Negativkontrolle auf Kollagen-I - beschichtetem Polyesterol zeigte eine Extinktion von 0,91. Das Ergebnis der Positivkontrolle auf Kupfer lag bei 0.

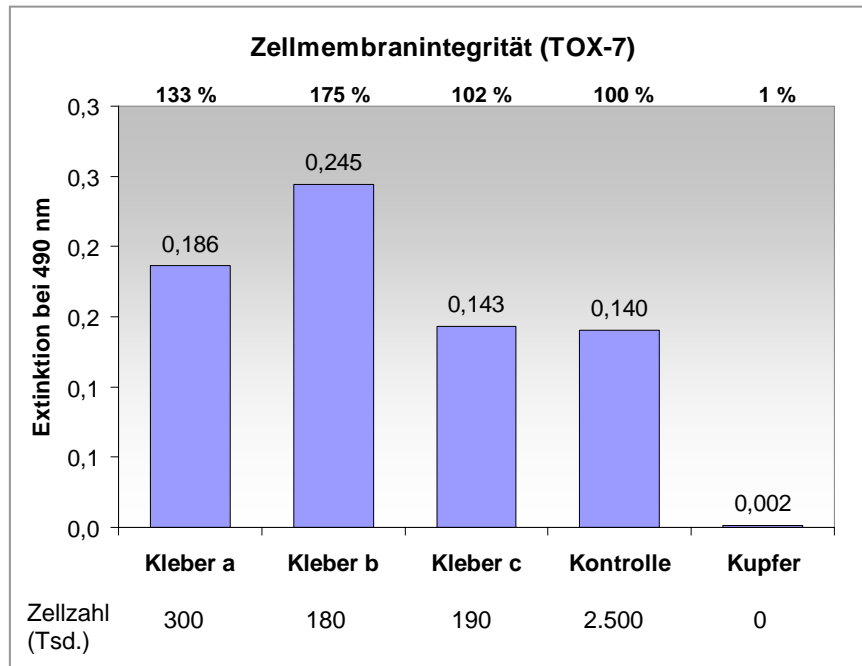


**Abbildung 28 - Zellvitalität Versuchsaufbau A**

Ergebnisse des WST-I Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 450 nm nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  auf den Klebern a, b, c, auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.

### 3.2.2.2 Zellmembranintegrität - TOX-7

Im Versuchsansatz A konnte in den mit den Klebern a, b und c behandelten Wells, sowie in der Negativkontrolle eine mittlere Extinktion im TOX-7 Assay bestimmt werden. Im Überstand der Positivkontrolle mit Kupferplättchen war kaum Extinktion messbar.

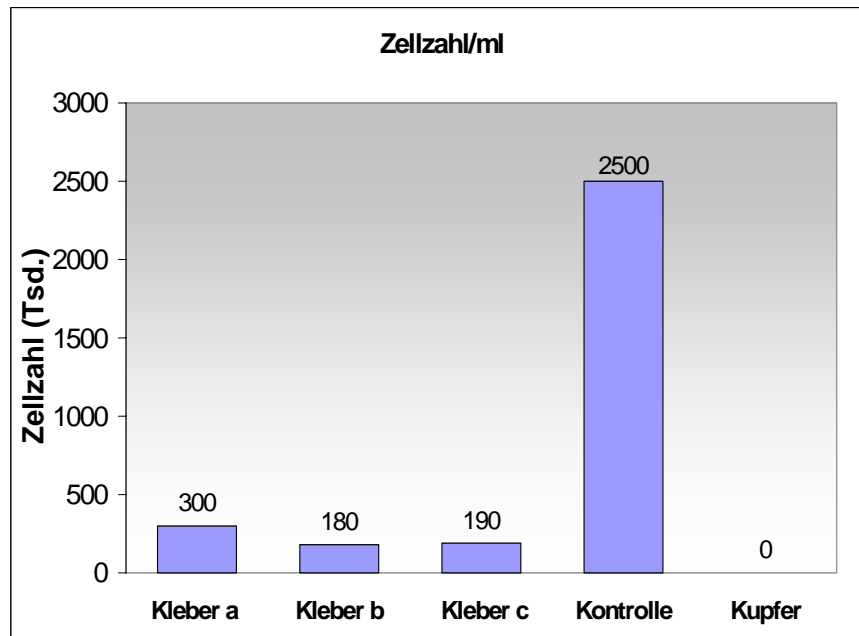


**Abbildung 29 - Zellmembranpermeabilität Versuchsaufbau A**

Ergebnisse des TOX-7 Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 490 nm nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Klebern a, b, c, auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.

### 3.2.2.3 Zellzahlbestimmung

Im Anschluss an die Auswertung der Zellvitalität und Zellmembranpermeabilität, wurde in jedem Well die Zellzahl/ml mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.



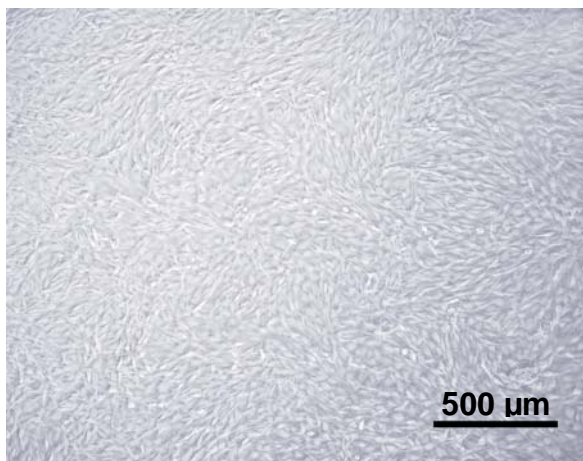
**Abbildung 30 - Zellzahlen Versuchsaufbau A**

Ergebnisse der Zellzählung. Dargestellt sind die Zahlen der gelösten Zellen pro ml nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Klebern a, b, c, auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.



### 3.2.2.4 Zellmorphologie

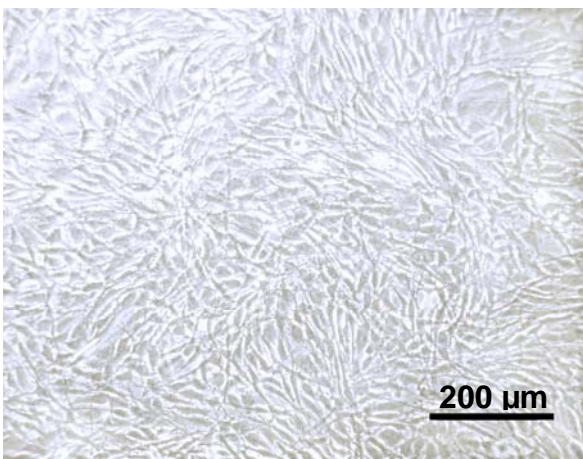
Am Auswertetag wurden von jedem Well mikroskopische Aufnahmen gemacht. Die Abbildung 31 a und b zeigt Mausfibroblasten im Kontrollwell. Die Abbildung 31 c) und d) wurden über Kleber b aufgenommen und können hier exemplarisch für die drei getesteten Kleberproben gesehen werden. Die Kontrollaufnahmen zeigen einen gleichmäßig konfluent besiedelten Wellboden. Die Zellen sind spindelförmig, liegen dicht beieinander und sind adhärent. In den mit Kleber b beimpften Wells sind insgesamt weniger Mausfibroblasten zu erkennen. Viele der Zellkörper erscheinen abgerundet und bilden kaum Zellausläufer und Zellkontakte zu anderen Zellen aus. Es sind braune, flockige Kleberreste zu sehen (siehe Pfeil).



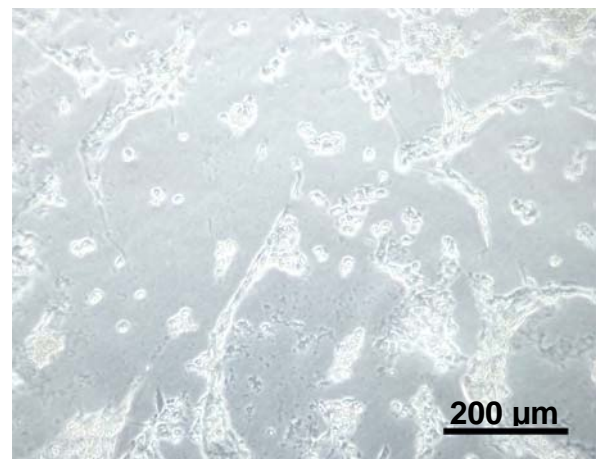
a)



c)



b)



d)

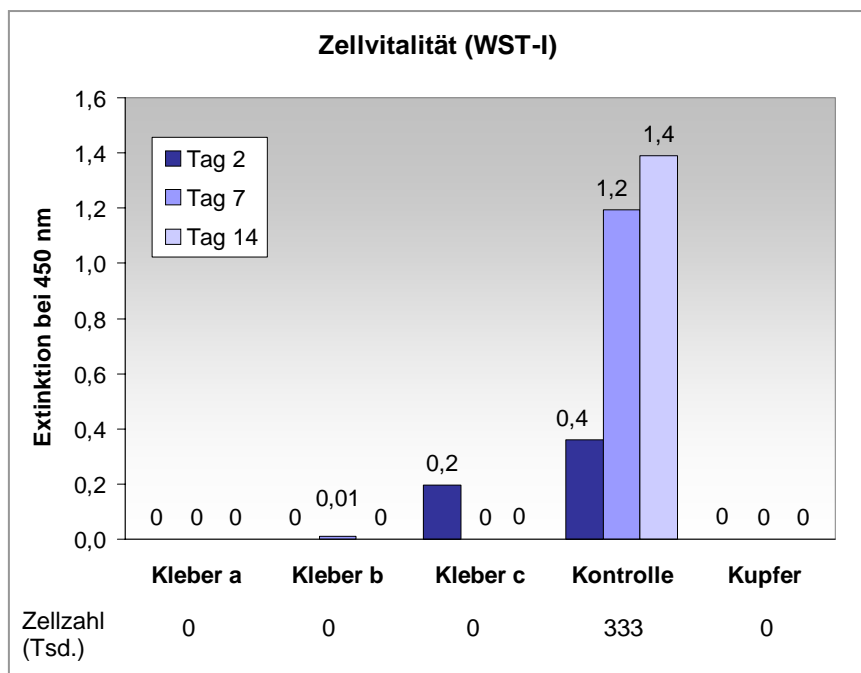
**Abbildung 31 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau A nach 48 h**

$5 \times 10^4$  MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> wurden ausgesät. Abbildung a) und b) zeigen die Negativkontrolle, die Abbildungen c) und d) wurden über Kleber b aufgenommen.

### 3.2.3 Versuchsaufbau B

#### 3.2.3.1 Zellaktivität - WST-I und Zellzahlbestimmung

Die Ergebnisse des WST-I Assays zur Messung der Zellvitalität im Versuchsbau B mit  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen sind in der Abbildung 32 zusammengefasst. Im WST-I Assay nimmt die Extinktion der Kontrolle bei 450 nm mit zunehmender Kultivierungsdauer zu. Dabei ist ein großer Anstieg von Tag 2 auf Tag 7 zu bemerken, während sich die gemessene Extinktion zu Tag 14 nur unwesentlich erhöht. Kleber c zeigt noch zu Beginn der Testreihe wenig Aktivität, die im weiteren Verlauf nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Kleber a und b zeigen keine messbare enzymatische Aktivität zu allen drei Messzeitpunkten.

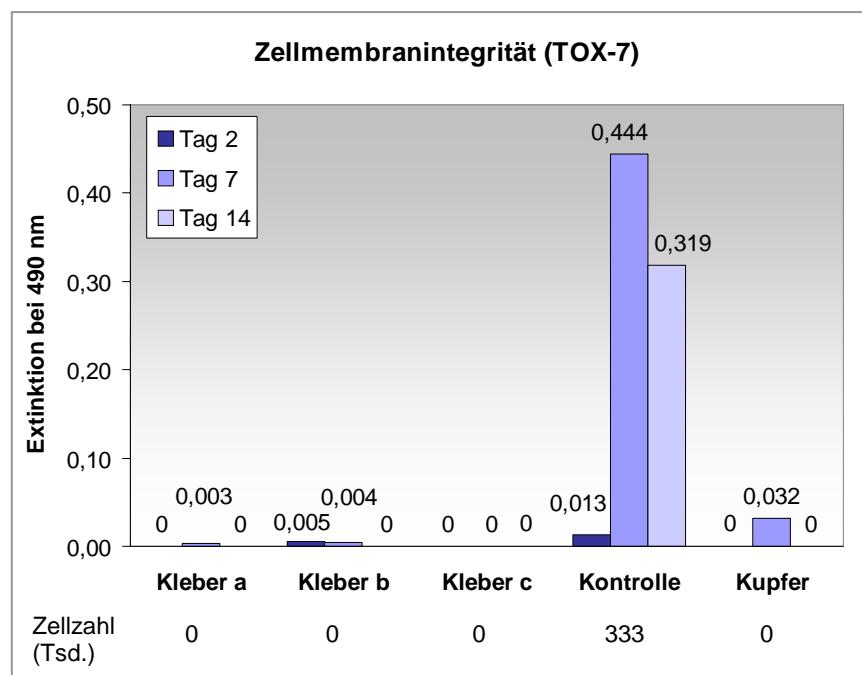


**Abbildung 32 - Zellvitalität Versuchsaufbau B**

Ergebnisse des WST-I Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 450 nm nach 2, 7 und 14 Tagen Kultivierung von  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Klebern a, b, c, auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.

### 3.2.3.2 Zellmembranintegrität - TOX-7 und Zellzahlbestimmung

Bei den Kleberproben ließ sich, ähnlich wie bei den über Kupfer kultivierten Zellen zu keinem Testzeitpunkt eine erhöhte Menge an extrazellulär vorhandenem LDH mit dem TOX-7 Assay messen. Die Kontrolle zeigte am 7. Tag des Versuchs einen großen Anstieg des LDHs, das am 14. Tag wieder etwas zurückging. Diese im Verhältnis zu den Kleberproben hohen Werte an Tag 7 und 14 sprechen am ehesten für den Nachweis physiologisch sezernierten LDHs der proliferierenden Zellen ins Medium.

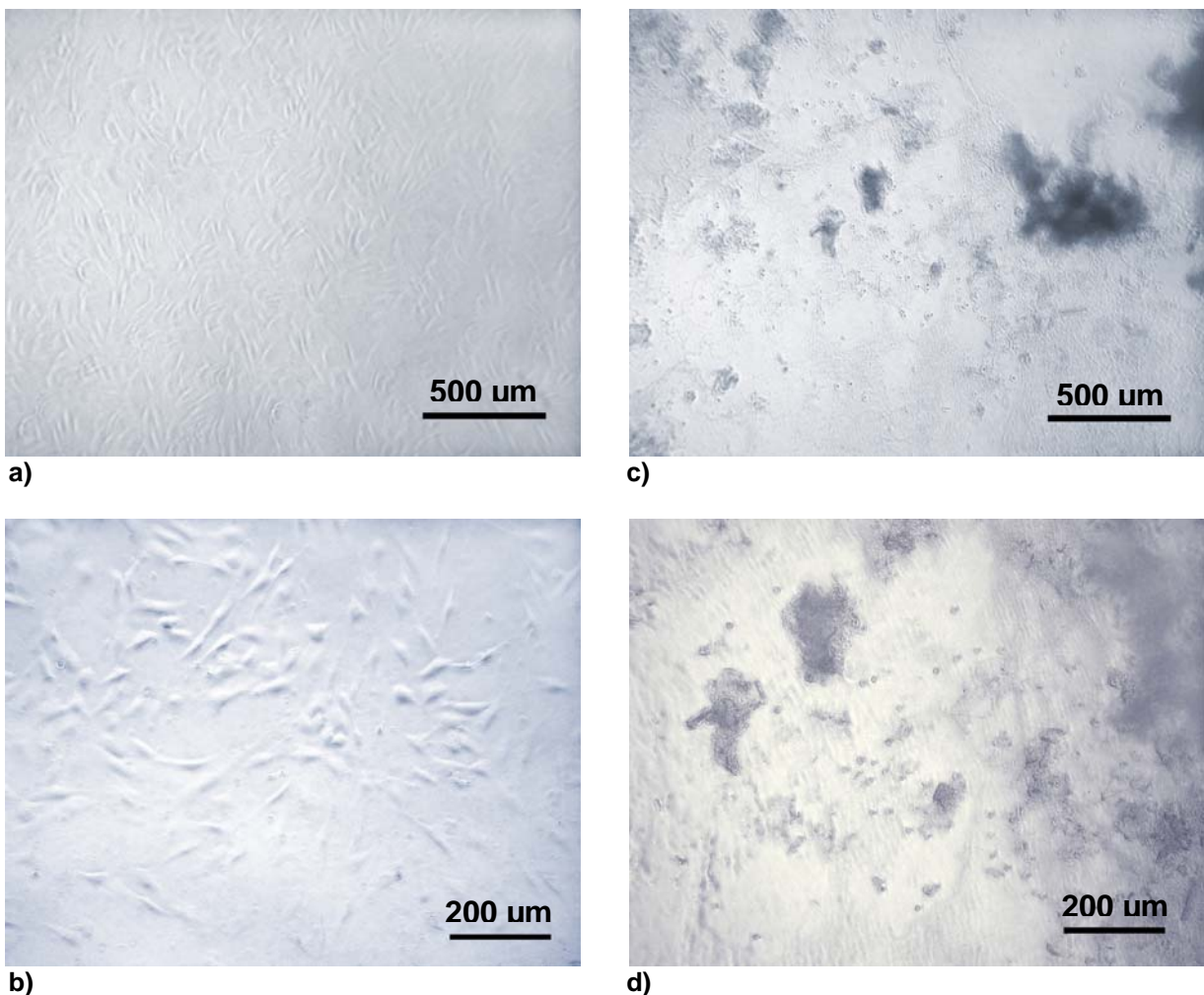


**Abbildung 33 - Zellmembranpermeabilität Versuchsaufbau B**

Ergebnisse des TOX-7 Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 490 nm nach 2, 7 und 14 Tagen Kultivierung von  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Klebern a, b, c auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Die Experimente wurden in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.

### 3.2.3.3 Zellmorphologie

Aus jedem Well wurden zum Testzeitpunkt (Tag 2) mikroskopische Aufnahmen gemacht. Abbildung 34 zeigt auf der linken Seite (a und b) die Positivkontrolle und auf der rechten (c und d) exemplarisch für alle getesteten Kleberproben Kleber b. Im Kontrollwell ist eine gleichmäßige und subkonfluente Besiedelung des Wellbodens zu sehen. Die Zellkörper sind spindelförmig und bilden Zellausläufer und Zellkontakte aus. In den mit Kleber b inkubierten Wells sind insgesamt nur wenige Zellen zu sehen. Sie sind zumeist abgerundet und nicht vom Wellboden abgelöst und scheinen im Kleber fixiert zu sein. In den Wells sind zum Teil größere, hier graufarbige Kleberflocken zu sehen.



**Abbildung 34 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau B am Tag 2**

$0,5 \times 10^4$  MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> wurden ausgesät. Abbildung a) und b) zeigen die Negativkontrolle, die Abbildungen c) und d) wurden über Kleber b aufgenommen.



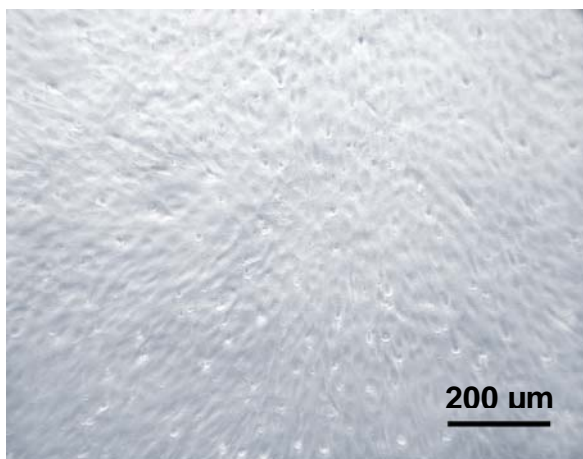
Der Wellboden der Kontrollwells, die in den Abbildung 35 a) und b) aufgenommen wurden, ist am Tag 7 des Versuchs konfluent von Mausfibroblasten bewachsen. Die Zellkörper sind jetzt von pflastersteinartiger Form. Vereinzelt lösen sich Zellen vom dicht besiedelten Boden und schwimmen im Medium. Die Abbildung 35 c) und d) zeigen Fibroblasten, die über Kleber b kultiviert wurden exemplarisch für alle Kleberproben. Die Zellzahl scheint im gesamten Well nicht angestiegen zu sein. Die wenigen sichtbaren Zellen sind rundlich und ohne Zellausläufer und scheinen an der Unterfläche auf dem Kleber zu haften, es schwimmen kaum Zellen im Medium. Am Rand der Aufnahmen sind schleierartig gelöste Kleberreste, die den Wellboden bedecken, zu erkennen.



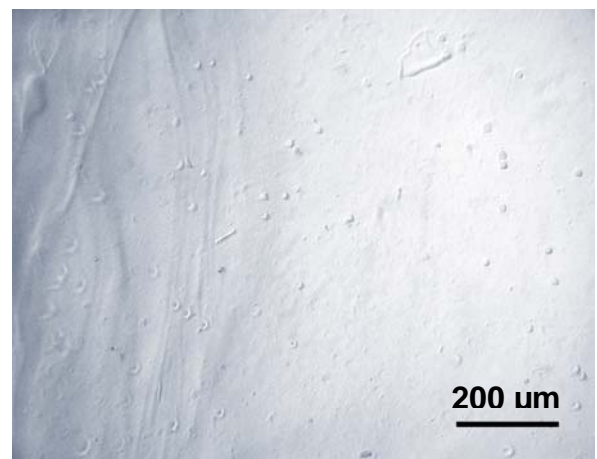
a)



c)



b)

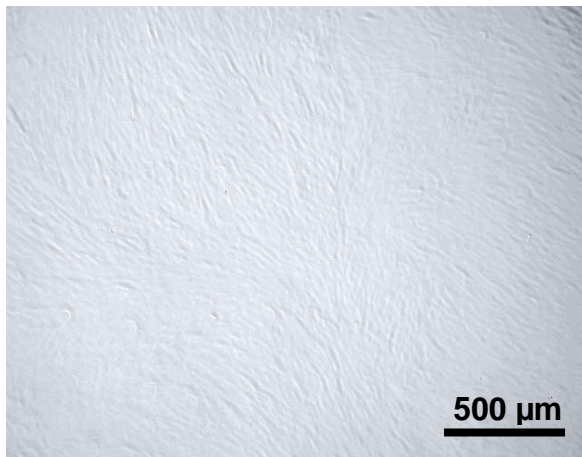


d)

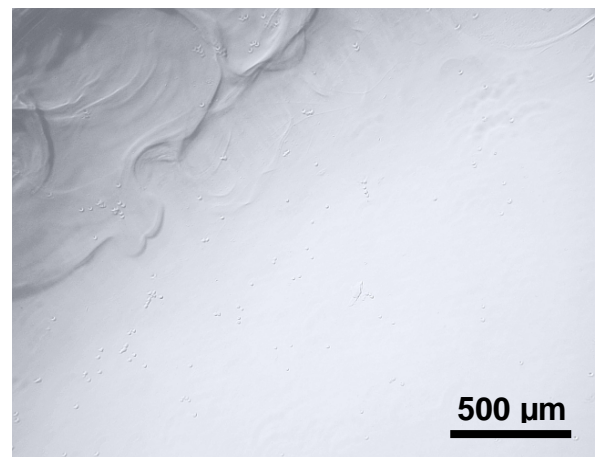
**Abbildung 35 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau B am Tag 7**

$0,5 \times 10^4$  MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> wurden ausgesät. Abbildung a) und b) zeigen die Negativkontrolle, die Abbildungen c) und d) wurden über Kleber b aufgenommen.

Am Testtag 14 wurden ebenfalls Aufnahmen aller Testwells gemacht (siehe Abbildung 36). Diese unterscheiden sich nicht wesentlich von denen des Tag 7. Der Boden des Kontrollwells ist dicht von MC3T3-E1 bewachsen. Die Abbildungen b) und d) wurden über Kleber b aufgenommen und zeigen vereinzelt abgerundete, am Boden fixierte Zellen.



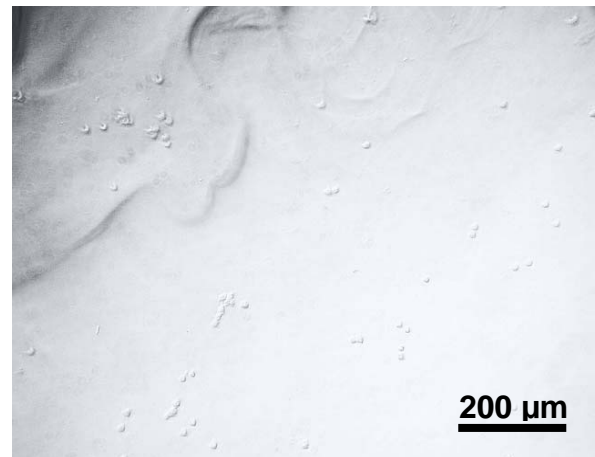
a)



b)



c)



d)

**Abbildung 36 a)-d) - Mikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau B am Tag 14**

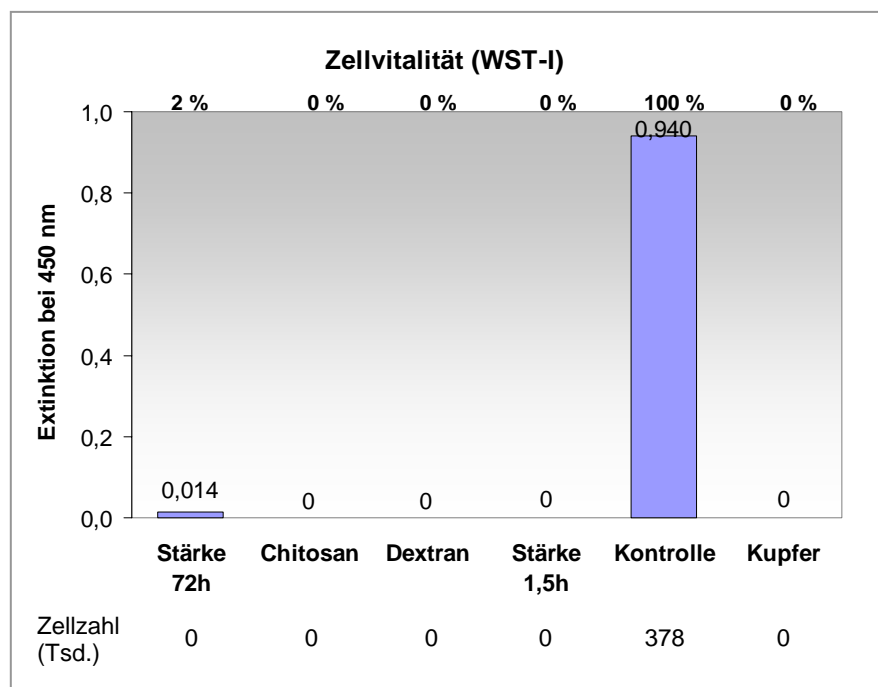
$0,5 \times 10^4$  MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> wurden ausgesät. Abbildung a) und b) zeigen die Negativkontrolle, die Abbildungen c) und d) wurden über Kleber b aufgenommen.

### 3.2.4 Einzelkomponenten

#### 3.2.4.1 Zellaktivität – WST-I

Die Einzelkomponenten der Kleber wurden gemäß des Versuchsaufbau A mit  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden auf zelltoxische Effekte mit Hilfe des Zellvitalitätsassays WST-I und dem Assay zur Zellmembranintegrität TOX-7 geprüft.

Die Negativkontrolle auf Kollagen-I beschichtetem Kunststoff zeigt im WST-I Assay eine Extinktion von annähernd 1,0. Bei der Negativkontrolle, wie auch bei den Komponenten Stärke 72 h, Chitosan 24 h, Dextran 1 h, Stärke 1,5 h war keine Extinktion messbar.

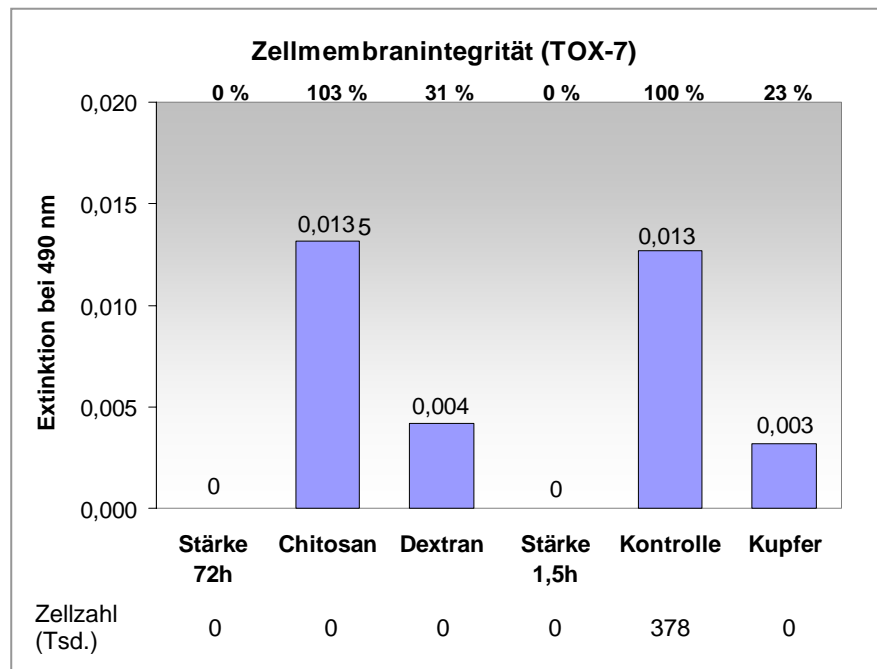


**Abbildung 37 - Zellvitalität Einzelkomponenten**

Ergebnisse des WST-I Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 450 nm nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Komponenten Chitosan 24 h, Dextran 1 r, Stärke 1,5 h, Stärke 72 h, auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.

### 3.2.4.2 Zellmembranintegrität

Im TOX-7 Assay zur Testung der Zellmembranpermeabilität wurde die Extinktion im gleichen Zeitintervall bei 490 nm bestimmt. Auf den Komponenten Stärke 72 h und Stärke 1,5 h ist keine Extinktion in diesem Wellenlängenbereich zu messen. Chitosan, Dextran und auch die Kontrollen zeigen kaum Extinktion und damit wenig extrazellulär vorhandenes LDH.



**Abbildung 38 - Zellmembranpermeabilität Einzelkomponenten**

Ergebnisse des TOX-7 Assays. Dargestellt sind die gemessenen Extinktionen bei 490 nm nach 48 Stunden Kultivierung von  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf den Komponenten Chitosan, Dextran, Stärke 1,5 h, Stärke 72 h, auf der Plastikkontrolle sowie auf Kupfer. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes. Die Zellzahlen wurden im Anschluß mittels Zählkammer bestimmt.

## 3.2.5 Versuchsaufbau C

### 3.2.5.1 Versuchsaufbau

Mauszellen wurden auf Kollagen-I beschichteten Objektträgern ausgesät. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zelladhärenz (siehe Abbildung 39) wurden drei der Objektträger mit Medium, das zuvor mit Kleber a inkubiert wurde, befüllt. Drei weitere Objektträger wurden mit der gleichen Menge des normalen MC3T3-E1 Mediums versehen und unter gewohnten Zellkulturbedingungen für 24 Stunden kultiviert. Das Eluat des Klebers a zeigt im Vergleich zum Kulturmedium eine gelbe Farbe (siehe



Abbildung 40). Der mit einem Universalindikator gemessene pH-Wert ist 7, entsprechend dem pH-Wert des Vergleichsmediums.

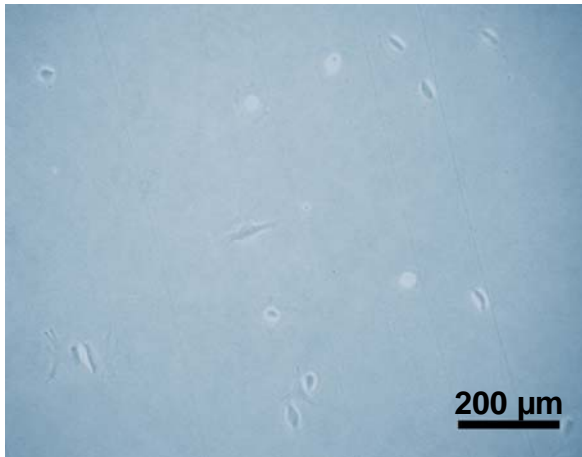


Abbildung 39 - Zelladhärenz

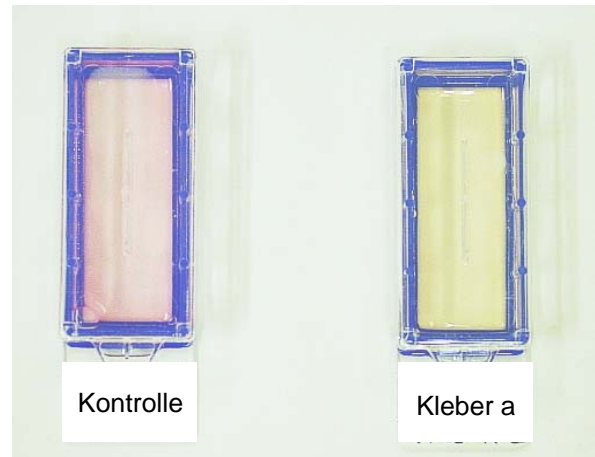
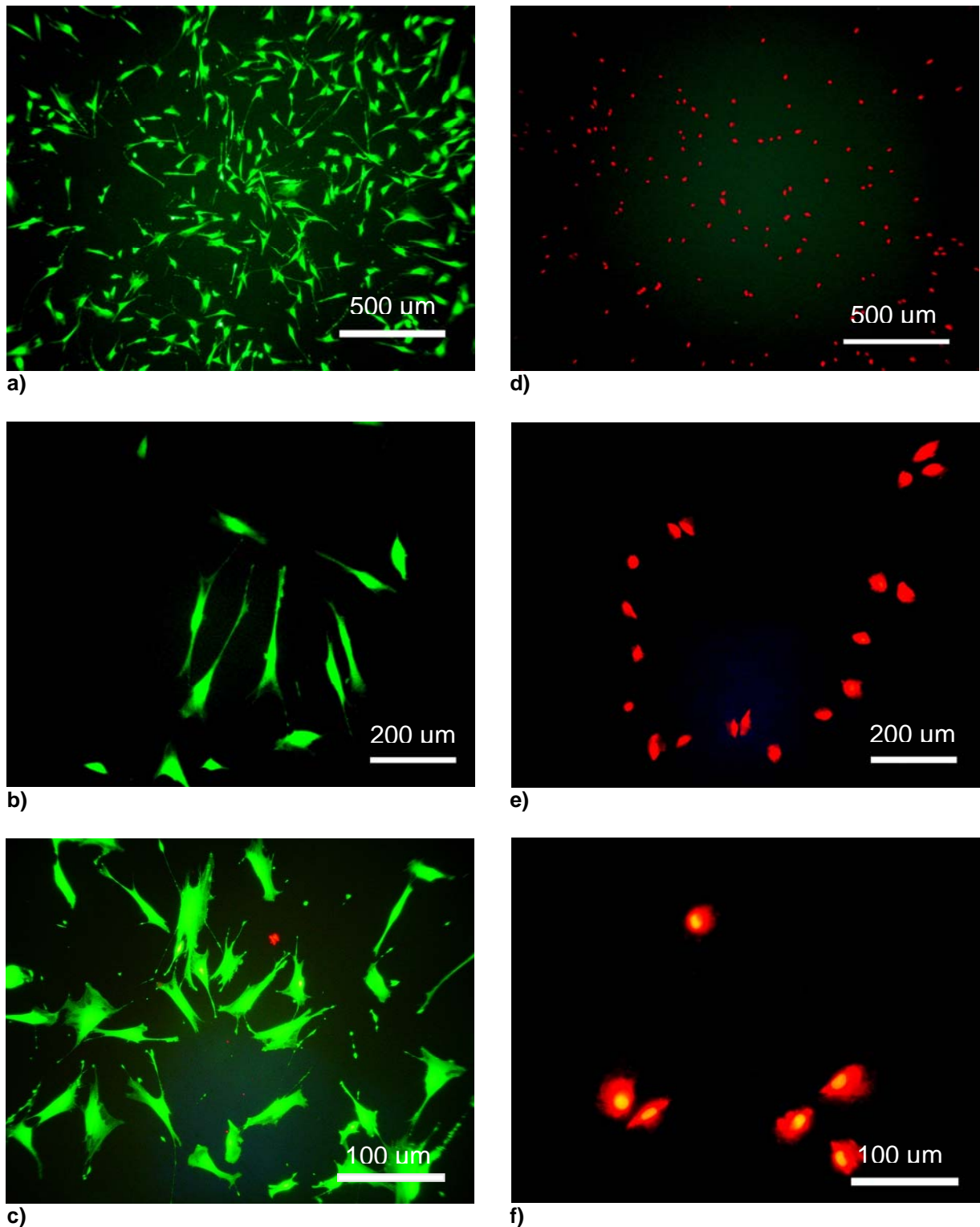


Abbildung 40 - Versuchsansatz

### 3.2.5.2 Zellvitalität - Fluoreszeindiacetat und Propidiumjodid

Im Stadium der Subkonfluenz wurden die Objektträger mit einer Lösung aus Propidiumjodid und Fluoreszeindiacetat inkubiert und im Anschluß unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Vitale Zellen fluoreszieren durch Fluoreszeindiacetat grün und avitale Zellen erscheinen durch Propidiumjodid rot.

Die Objektträger, die mit normalem Nährmedium kultiviert wurden zeigen grün - fluoreszierende Zellen. Die Zellzahl hat sich seit dem Stadium der Zelladhärenz (siehe Abbildung 39) vermehrt. Die Zellform ist spindelförmig, es sind viele Zellausläufer erkennbar. Die Mausfibroblasten, die mit Eluat kultiviert wurden, erscheinen in der Fluoreszenzmikroskopie rot, wobei der Zellkern stärker fluoresziert. Die Zellkörper sind im Vergleich zur Kontrolle kleiner und rundlicher. Es sind nur sehr wenige Zellausläufer zu erkennen.



**Abbildung 41 a)-f) - Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Versuchsaufbau C**

600 MC3T3-E1/cm<sup>2</sup> wurden ausgesät. Die Abbildungen a), b) und c) zeigen die Negativkontrolle, die Abbildungen d), e) und f) wurden von Zellen, die mit Eluat a kultiviert wurden, aufgenommen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Versuchsansatz

#### 4.1.1 Kleberkomponenten

Stärke ist biokompatibel und wird vom Organismus unproblematisch enzymatisch abgebaut und ausgeschieden. Es dient als Grundsubstanz für verschiedene Biomaterialien (Salgado et al. 2004). Chitosan, ein deacetyliertes Chitin, findet in der Lebensmittelchemie, der Textilindustrie und auch in der pharmazeutischen Industrie aufgrund besonderer chemischer und biokompatibler Eigenschaften vielfältige Anwendung. Chitosan ist nicht toxisch (Rao und Sharma 1997) und beschleunigt die Wundheilung durch Steigerung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation. Seine effektive hämostatische Wirkung ist unabhängig von der Gerinnungskaskade und begründet sich vor allem auf einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Chou et al. 2003b). Chitosan scheint eine entzündungshemmende und antimikrobielle Wirkung zu haben und inhibiert die Induktion von COX-2 (Cyclooxygenase-2). Außerdem vermindert es die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) und Interleukin-1 $\beta$ . Darüber hinaus fördert Chitosan die Bildung des anti-inflammatorisch wirkenden Interleukin-10 (Chou et al. 2003a). Chitosan scheint sich positiv auf die Fibroblastenproliferation durch eine Komplexbildung mit Heparin auszuwirken. Es unterstützt die Zellteilung von Fibroblasten und hat zudem über Interleukin-8 gefäßproliferative Eigenschaften (Mori et al. 1997; Kiyozumi et al. 2006). Allerdings scheint Chitosan in hohen Dosen die Migration von Fibroblasten zu hemmen. Möglicherweise veranlasst es die Zellen zur Bildung motilitätshemmender Substanzen oder es absorbiert migrationsfördernde Stoffe aus dem Kulturmedium (Okamoto et al. 2002). Sehr hohe Konzentrationen von Chitosan im Medium vermindern die Zellproliferation. Dieser Effekt zeigt sich nur, wenn dem Kulturmedium FBS hinzugefügt wird, was auf eine indirekte wachstumshemmende Wirkung des Chitosans deutet. Es ist ein polyanionisches Polysaccharid und dadurch in der Lage, Proteine zu binden. Möglicherweise werden Wachstumsfaktoren im Medium gebunden und inaktiviert (Mori et al. 1997). Regelmäßige, hochdosierte Gabe von Chitosan über einen Zeitraum von 14 Wochen führte zu Appetitlosigkeit bei BALB/c Mäusen mit folgender Gewichtsverringerung

und Inaktivität. Im Bereich der subkutanen Injektionsstelle waren Fremdkörperriesenzellen und fettgefüllte Makrophagen, bedingt durch Entzündung oder Nekrose, zu sehen. Es ist beschrieben, dass Chitosan in den Lysosomen der Zellen enzymatisch abgebaut wird. Möglicherweise verhindert seine große Molekülgröße die rasche Degradation *in vivo* (Tanaka et al. 1997).

#### 4.1.2 Versuchsaufbau

Die schnelle und nahezu unbegrenzte Verfügbarkeit und die unkomplizierte und kostengünstige Gewinnung sprechen für die Verwendung von isolierten und kultivierten humanen Knochenzellen. Zur Testung der Biokompatibilität von Hartgewebeklebern eignen sich vor allem ossäre Zellen, da sie am späteren Einsatzort in erster Linie zu finden sind. Primäre Zellen haben allerdings den Nachteil, dass sie vor dem Einsatz in einem Zelltoxizitätstest exakt charakterisiert und bezüglich Keimfreiheit, Differenzierungstendenz und Wachstumskinetik beurteilt werden müssen. Nur die sichere Kenntnis des konstanten Verhaltens einer Zelllinie, lässt einen späteren Vergleich verschiedener auf die Zellen einwirkende Substanzen zu und garantiert Reproduzierbarkeit der Versuche (International Organization of Standardization 1999).

MC3T3-E1 Zellen haben viele Vorteile gegenüber primären Zellen. Zum einen ist die Zelllinie seit über 20 Jahren bekannt und detailliert charakterisiert worden (Sudo et al. 1983). Zum anderen werden Eigenschaften wie Morphologie, Differenzierung, Verdoppelungszeit und auch Keimfreiheit durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) garantiert. Der Zelltyp MC3T3-E1 ist für die Zellkultur etabliert und wird häufig zur Testung von Zytotoxizität (Tokura und Tamura 2001; Ren et al. 2002; Chou et al. 2005), Adhäsionsverhalten (El Ghannam et al. 2004) oder Induktion von Differenzierung (Tachibana et al. 2005) vor allem in Zusammenhang mit Biomaterialien verwendet.

In Hinblick auf den angestrebten klinischen Einsatz der Hartgewebekleber und der damit verbundenen strengen Auflagen für Biomaterialien, wurde den Versuchen die internationale Norm ISO 10993-5 „Tests for *in vitro* toxicity“ zu Grunde gelegt. Dieses Kapitel fordert beispielsweise zum Vergleich das Vorhandensein einer zelltoxischen

Positivkontrolle und einer unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Kontakt zur Testsubstanz kultivierten Negativkontrolle. Außerdem sollte die Testausführung in Triplets durchgeführt werden und eine Zeitspanne von mindestens 24 h beinhalten (International Organization of Standardization 1999). Damit zeichnet die ISO Norm aber lediglich einen allgemeinen Rahmen für Versuchsbedingungen und schreibt nicht etwa einen speziellen Versuchsaufbau oder eine besondere Testmethode vor. Auch Expositionsart und -dauer mit dem zu testenden Material werden in drei verschiedenen Varianten zugelassen: im direkten Kontakt, im Kontakt mit dem Extrakt und im indirekten Kontakt der Zellen mit der Testsubstanz. Zur Testung der entwickelten Hartgewebekleber wurden die Zellen in den Versuchsaufbauten A und B den Klebern im direkten Kontakt ausgesetzt. Im Versuchsansatz C wurden sie nach Kultivierung im indirekten Kontakt mit den Klebern auf zelltoxische Effekte untersucht. Versuchsansatz A der vorliegenden Untersuchungen entspricht mit 48 Stunden direkter Expositionszeit der kurzfristigen Einwirkung der Substanzen auf die Zellen. Versuchsansatz B, mit einer Versuchszeit von 14 Tagen, sollte ergänzende Beurteilung über die Entwicklung der Zellen im Kontakt mit den Klebern liefern. Die hier gewählte längerfristige Untersuchung erscheint wiederum sinnvoll in Anbetracht des möglichen Einsatzes im menschlichen Körper, in der das Material bis zum vollständigen enzymatischen Abbau verbleibt. Das kostengünstige Prooxidanz Kupfer eignet sich wegen seiner stark zelltoxischen Eigenschaften (Jing und Kitts 2004; Rau et al. 2004) zur Verwendung als Positivkontrolle. Für die Negativkontrolle wurden Zellen unter exakt gleichen Versuchsbedingungen, jedoch ohne Kleberkontakt kultiviert.

Es war von nicht-toxischen Komponenten, die vom Körper unproblematisch über die Niere ausgeschieden werden (Onishi und Machida 1999; Tanabe et al. 2002; Fakhry et al. 2004) ausgegangen worden. Deshalb wurde mit 200 µl Kleber auf  $0,5 - 5 \times 10^4$  eine relativ hohe aber durchaus gebräuchliche Konzentration der Kleber in Bezug auf die Zellzahl gewählt (Sung et al. 1999). Die Kleberkomponenten lösten sich zum Teil nur schwer, oder erst nach mehrstündigem Rühren. Insgesamt war das Löseverhalten auch innerhalb einer Charge so unterschiedlich, dass auch die Reaktion zweier Komponenten miteinander stark beeinflusst wurde. Die Kleber reagierten beispielsweise gelatineartig oder aber sie flockten aus. Die teilweise inhomogene Viskosität der Proben erschwerte auch die exakte Dosierung der

einzelnen Komponenten. Dadurch konnte ihr Verhältnis zueinander nur ungefähr eingehalten werden.

Im vorliegenden Modell bot der Kollagen-I beschichtete Wellboden Aminogruppen und damit Reaktionspartner für die Aldehydgruppen der Einzelkomponenten. Die Klebereaktion besteht aus der Bildung von Schiff'schen Basen bei Reaktion von einer Aminogruppe mit einer Aldehydgruppe (siehe Abbildung 5). Das Chitosan stellt weitere Aminogruppen um die Zuckerketten untereinander zu vernetzen, den Kleber zu stabilisieren und um dadurch das Überbrücken von Knochenspalten zu ermöglichen. Durch die rasche Reaktion beider Komponenten miteinander und das bereits erwähnte variable Lösungsverhalten der Komponenten, ist eine homogene Mischung allerdings nur annähernd zu erreichen. Weil davon ausgegangen werden musste, dass nicht alle Kleberpartikel reagiert haben, wurde anschließend mehrmals mit PBS gewaschen, um überschüssige Kleberreste zu entfernen. Um eine Vernetzung der Zelloberflächen zu verhindern mussten eventuell noch vorhandene freie reaktive Aldehydgruppen mit weiteren Aminogruppen abgesättigt werden. Dazu bietet sich hitzeinaktiviertes 100 %iges fetales Rinderserum an, da es eine Vielzahl verschiedener Aminosäuren und Proteine enthält, die in ihrer Zusammenstellung das Zellwachstum selbst bei Rückständen nicht beeinflussen würden.

## **4.2 Auswertemethoden und Ergebnisse**

### **4.2.1 Vorversuche**

#### **4.2.1.1 Zellaktivität**

Im WST-I Assay zeigte sich eine verminderte Zellaktivität der Zellen, die auf Kleber I kultiviert wurden gegenüber der Negativkontrolle. MC3T3-E1 die auf Kleber II, der zusätzlich L-DOPA enthielt kultiviert wurden, waren ebenso aktiv wie die Kontrolle. Der Zusatz von L-DOPA zum Klebergemisch scheint sich positiv auf die Vitalität der Zellen auszuwirken.

### 4.2.1.2 Zellproliferation

Der BrdU Assay lässt über mehrere Zwischenschritte eine exakte Quantifizierung der neu synthetisierten Zellen zu. Diese Arbeitsschritte machen den BrdU Assay zu einem zeitintensiven Assay, der im Gegensatz zu anderen Proliferationsassays dennoch ein vielverwandter Test in der Biokompatibilitätsforschung ist (Guggi et al. 2004; Tamaoki et al. 2004; Sundstol et al. 2004). Nach Etablierung des BrdU Assays für die Versuchsaufbauten, wurde er erstmals für die Vorversuche mit den Kleberproben I und II eingesetzt (siehe Seite 44). Im Testwell des Kleber II konnte die gleiche Menge neusynthetisierter DNA nachgewiesen werden wie bei der Negativkontrolle. Die Zellen, die auf Kleber I kultiviert wurden, proliferierten weniger stark. Die Ergebnisse korrelieren damit direkt mit denen des WST-I. Allerdings konnte eine unregelmäßige blaue Verfärbung nach Zugabe des Substrates in direkter Nähe zu den Kleberresten beobachtet werden (Abbildung 27). Eine Interaktion der Kleberkomponenten mit den Kitkomponenten und damit eine Verfälschung der Ergebnisse des BrdU Proliferationsassays konnte deshalb nicht ausgeschlossen werden.

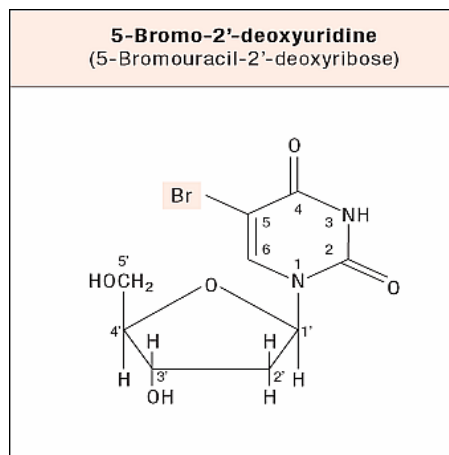


Abbildung 42 - BrdU Formel

Die chemische Formel des BrdU (siehe Abbildung 42) lässt mehrere reaktive Gruppen erkennen, die in Interaktion mit den Klebern stehen könnten. Eine Reaktion mit den ungesättigten reaktiven Gruppen könnte den Assay stören. Damit wäre die Aussagekraft der Ergebnisse fraglich, weshalb für die weiteren Versuche auf den Einsatz des BrdU Assays verzichtet wurde. Die Zellzahl wurde im Folgenden mittels Hämocytometer bestimmt.

## 4.2.2 Versuchsaufbau A

### 4.2.2.1 Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die MC3T3-E1 mit Trypsin/EDTA vom Wellboden gelöst und mit Medium aufgenommen. Die Suspension konnte nach Färbung mit TrypanBlau Stain 0,4 % unter dem Mikroskop ausgezählt werden (siehe Seite 35). Die Zellen, die auf den Kleberproben a, b oder c kultiviert wurden, hafteten oftmals besonders fest am Boden, so dass sie auch nach zehnmütiger Inkubationszeit mit Trypsin/EDTA nicht von der Wellfläche zu lösen waren. Die Zellen schienen regelrecht in die Klebermasse eingesunken und dort fixiert zu sein. Ein Überschreiten der Einwirkzeit mit Trypsin/EDTA von 10 Minuten brachte wenig Erfolg, ließ aber die toxische und membranschädigende Wirkung des Trypsins in den Vordergrund treten. So wurden zwar mehr Zellen gelöst, aber die Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen durch die Färbung mit TrypanBlau Stain 0,4 % war durch die starke Schädigung der Membran nicht mehr möglich. Zudem lösten sich bei verlängerter Inkubation mit Trypsin/EDTA auch vermehrt Kleberreste, so dass die Differenzierung von einzelnen Zellkörpern von Zelldetritus und Kleberpartikeln unter dem Mikroskop kaum mehr möglich war. Deshalb können die Ergebnisse der Zellzählung mit dem Hämocytometer ausschließlich eine Tendenz bedeuten und keine definitive quantitative Beurteilung der Zellen zu den Testzeitpunkten.

### 4.2.2.2 Zellaktivität

Die metabolische Aktivität einer Zelle, als Parameter für ihre Vitalität, lässt sich über verschiedene biochemische Mechanismen messen. Hierbei spielen vor allem Substrate, die von zelleigenen Enzymen umgesetzt werden, eine große Rolle. Der häufig verwendete WST-I Assay von Roche (Boland et al. 2004; Wen et al. 2004; Toimela und Tahti 2004) bedient sich der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen, die das Substrat des WST-I Assays, ein Tetrazoliumsalz, zu Formazan umwandeln. Es gibt neben dem WST-I Assay eine Vielzahl an Vitalitätsassays wie z.B. den MTT oder XTT Assay von Roche, die auf dem gleichen Mechanismus wie der des WST-I beruhen, sich jedoch durch die Substrate unterscheiden (Roche Molecular Biochemicals 2006). Der WST-I Assay ist jedoch nicht toxisch und ist am schnellsten und einfachsten durchführbar.



Die Ergebnisse im Versuch A mit  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden wurden bereits in Abbildung 28 dargestellt. Die Negativkontrolle zeigte im WST-I Assay eine Extinktion von 0,91. Dieses Ergebnis und auch die später bestimmten Zellzahlen sprechen für dicht gesiedelte aktive Mauszellen auf Kollagen-I - beschichtetem Kunststoff. Im Vergleich dazu war bei der Positivkontrolle nach 48 Stunden keine Enzymaktivität messbar. Auf den Kupferplättchen muss von mitochondrial inaktiven und nicht adhärennten Zellen ausgegangen werden. Beide Kontrollergebnisse stimmen mit den zu erwartenden Werten überein. Bei den auf Kleber a und c kultivierten Zellen war keine mitochondriale Aktivität nachweisbar. Die auf Kleber b kultivierten Zellen waren aktiver. Diese Ergebnisse sprechen entweder für wenige aber stoffwechselaktive Zellen, oder sind Ausdruck verminderter Aktivität der Zellen auf Kleber b. Sieht man jedoch die tendenziell bestimmten Zellzahlen in Zusammenhang, kann man von wenigen aber aktiven Zellen auf Kleber b ausgehen. Die Kleber a, b und c jedoch scheinen die mitochondriale Dehydrogenasenaktivität zu mindern und damit auch Vitalität und Proliferation der Mauszellen negativ zu beeinflussen.

#### **4.2.2.3 Zellmembranintegrität**

Ein weiterer, häufig verwendeter Parameter zur Beurteilung der Vitalität einer Zelle ist die Unversehrtheit ihrer Zellmembran (Davis et al. 2002). So deutet eine beschädigte Zellmembran auf eine defekte Zelle hin. Zelluläre Enzyme, die durch eine nicht mehr intakte Membran in den Extrazellulärraum entweichen, können dort detektiert werden (Murray et al. 1998; Mott et al. 1998; Radad et al. 2004; Chou et al. 2005). Der hier verwendete TOX-7 Assay von Sigma misst die Abgabe von zytoplasmatischer Laktatdehydrogenase ins Medium (siehe auch Seite 30). Da die Zelle aber auch unter physiologischen Bedingungen geringere Mengen an LDH in den Extrazellulärraum entlässt, ist eine Beurteilung der mit dem TOX-7 gemessenen Werte nur in Relation zur gleichzeitig bestimmten Zellzahl möglich. Durch die Menge des extrazellulär vorhandenen LDHs ließe sich auch indirekt die Proliferation gesunder Zellen bestimmen, weshalb dieser Test auch oft als Proliferationsassay herangezogen wird.

Die Ergebnisse des TOX-7 Assays im Versuchsansatz A mit  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden wurden zusammengefasst in Abbildung 29.

Für die Negativkontrolle wie auch für die mit Kleber behandelten Wells konnte eine LDH Aktivität im Medium detektiert werden. Bezieht man die Größenordnung der Zellzahlen mit ein, kann man in den Kontrollwells mit Kollagen-I beschichtetem Polyesterol bei relativ geringer extrazellulär vorhandener LDH Menge von der bereits beschriebenen physiologischen Sekretion ausgehen. Werden die Extinktionen, die in den Wells der Kleber a, b und c gemessen wurden, dividiert durch die Zellzahl, spricht das für eine deutlich erhöhte LDH Konzentration im extrazellulären Raum. Dieses Ergebnis lässt auf eine verminderte Membranintegrität und eine daraus resultierende vermehrte und unphysiologische Abgabe des LDHs nach außen schließen. Der Überstand aus den Wells mit Kupferplättchen zeigte kaum Extinktion bei 490 nm. Doch obwohl damit keine beschädigte Membran nachzuweisen war, muss davon ausgegangen werden, dass die über Kupfer kultivierten Zellen bei einer ermittelten Zellzahl von 0 und keiner messbaren Aktivität im WST-I Assay weder adhärent noch vital gewesen sein können. Der Grund für die fehlende LDH Erhöhung im Medium könnte in der Art der Toxizität des Kupfers liegen: Kupfer ermöglicht die vermehrte Bildung von Hydroxylradikalen, die z.B. die für den Zellstoffwechsel essentielle Enzyme wie Pyruvatdehydrogenase, alpha-Ketoglutardehydrogenase (Sheline und Choi 2004) und Histonacetyltransferase (Kang et al. 2004) hemmen, lässt aber die Zellmembran an sich weitestgehend unversehrt (Seth et al. 2004). Das heisst, die Zellen wären trotz intakter Membran nicht in der Lage zu überleben. Allerdings wurden im Überstand zum Testzeitpunkt nur noch etwa ein Viertel der ausgesäten Zellen gefunden. Die Mehrzahl der Zellen muss im Versuchsverlauf zerstört worden sein. Möglicherweise stört Kupfer den Nachweis von LDH des TOX-7 Assays. LDH wird über zwei enzymatische Reaktionen detektiert (siehe Abbildung 43). 1. LDH setzt Laktat zu Pyruvat unter freierwerden von NADH um. 2. Das NADH wird von Dehydrogenasen zu NAD<sup>+</sup> oxidiert, wobei aus einem Tetrazoliumsalz das photometrisch bestimmbare Formazan entsteht. Da diese Reaktionen allerdings enzymatisch erfolgen, ist eine Beeinträchtigung durch Kupferionen im Medium nicht auszuschließen. Das würde bedeuten, dass beim Zelluntergang freigewordenes LDH nicht mit dem TOX-7 Assay messbar ist.

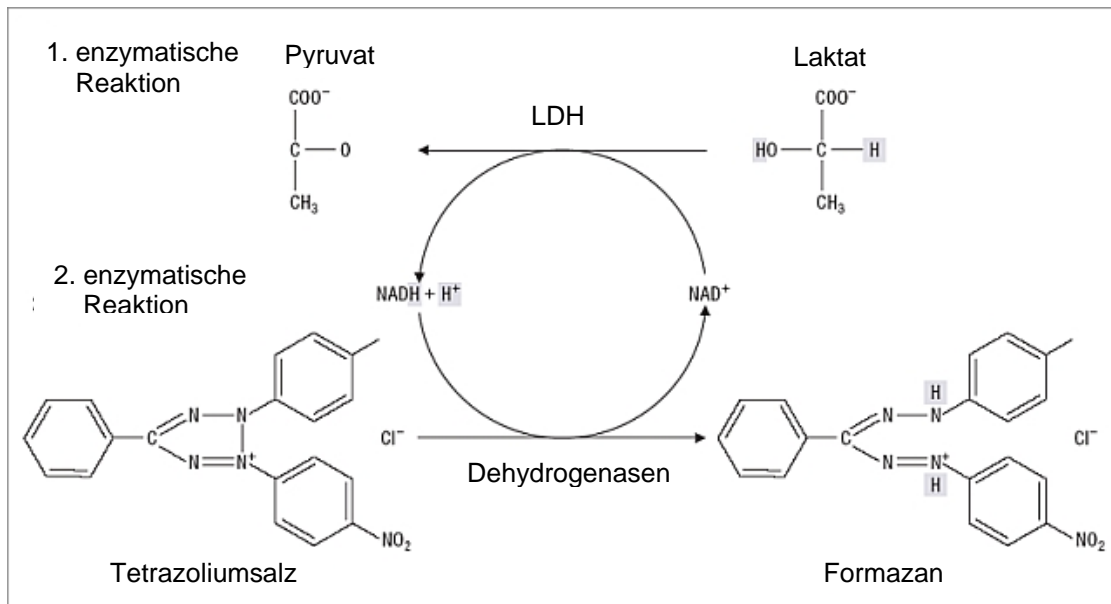


Abbildung 43 - Nachweisreaktion LDH

Für weitere Versuche sollte deshalb nach einer geeigneteren toxischen Substanz, mit zellmembranschädigender Wirkung gesucht werden.

#### 4.2.2.4 Morphologie

Zeitgleich mit der Durchführung der oben beschriebenen Assays zur Zellvitalität und -proliferation wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der einzelnen Wells gemacht. Diese dienen der optischen Validierung der mit der Neubauer Zählkammer ermittelten Zellzahl, vor allem aber sollten sie Aufschluss geben über die Morphologie der kultivierten Zellen.

Die Abbildung 31a bis d zeigt die Testwells mit Kleber b in Relation zur Kontrolle. Auf der Kontrollaufnahme ist der Wellboden komplett mit regelmäßig und mosaikförmig wachsenden Zellen bedeckt. Die Vergrößerung lässt die spindelförmigen Zellkörper mit ihren Ausläufern deutlich erkennen. Die Morphologie der kultivierten MC3T3-E1 bestätigt damit die Ergebnisse des WST-I Assays, des TOX-7 Assays und auch der Zellzählung entsprechend aktiver, proliferierender und deshalb vitaler Zellen. Die Testwells des Kleber b lassen nur wenige Zellen erkennen. Es kann nur eine geringfügige Proliferation der Mauszellen stattgefunden haben. Die wenigen sichtbaren Zellen sind zumeist klein und abgerundet, nur selten lassen sich in der Vergrößerung spindelförmig aussehende Zellen ausmachen. Diese Zellen scheinen

allerdings auf kleberfreien Flächen, die durch unregelmäßiges Bedecken des Wellbodens mit den Klebern entstanden ist, in Kontakt mit anderen Zellen zu wachsen. Diese wenigen spindelförmigen Zellen könnten für die gemessene Aktivität im WST-I Assay verantwortlich sein. Die runden Zellen schwimmen nicht im Medium, wie es bei abgestorbenen Zellen beobachtet wird, vielmehr scheinen sie am Wellboden fixiert zu sein, denn sie lassen sich auch mit Trypsin/EDTA kaum lösen. Die Kleberproben scheinen die Zellen in ihrer Motilität und Proliferation entweder direkt zu hindern oder die für die Vitalität der Zellen nötigen Substanzen im Medium zu verringern.

### 4.2.3 Versuchsaufbau B

#### 4.2.3.1 Zellaktivität

Im Test mit  $0,5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> und einer Versuchsdauer von 14 Tagen (Abbildung 32) zeigte die Negativkontrolle auf Kollagen-I beschichtetem Kunststoff den einer Wachstumskurve gleichenden Verlauf. Die Zellen, die in den Kontrollwells ausgesiedelt wurden, verdoppelten ihre Zahl schon innerhalb der ersten 2-3 Tage. Sie proliferierten stark, bis sie am Messtag 7 konfluent und dicht gewachsen den Wellboden komplett bedeckten. Zwischen Tag 7 und Tag 14 wuchsen die Zellen bereits im Multilayer. Dadurch waren die Bedingungen in Bezug auf Nährstoff- und Platzangebot nicht mehr optimal. Die Zellen reagieren in Abhängigkeit zur Zelldichte mit einer Minderung ihrer Aktivität. Die Positivkontrolle auf Kupfer zeigt auch in diesem Versuchsansatz keinerlei Aktivität der ausgesäten Zellen. Bei den Kleberproben a, b und c konnte zu keinem Zeitpunkt mitochondriale Dehydrogenasenaktivität der kultivierten Mauszellen nachgewiesen werden. Kleber c lässt zu Beginn einige aktive Zellen vermuten, dieses Ergebnis konnte aber im wiederholten Versuch nicht bestätigt werden. Die gemessenen Extinktionen der Kleberwells in diesem Versuchsansatz über 14 Tage sprechen für eine starke, die Vitalität der Zellen beeinflussende Wirkung der Kleber. Nicht aktive Zellen können weder proliferieren noch überleben, das deutet auf eine stark toxische Wirkung der Kleber. Da die Nachweisgrenze der Zellaktivität mit dem WST-I Assays bei etwa 5000 Zellen liegt, müssen zumindest über die Hälfte der ausgesäten Zellen avital sein. Mit Sicherheit sind die Ergebnisse dieses Versuchsansatzes auch mitverursacht worden

durch die sehr gering gewählte Zellzahl in Bezug zu Klebermenge und -konzentration.

#### **4.2.3.2 Zellmembranintegrität**

Die Membranpermeabilität der ausgesäten Zellen wurde ebenfalls an den Testtagen 2, 7 und 14 ermittelt (siehe auch Abbildung 33). Bei den Positivkontrollen ließ sich zu keinem Zeitpunkt extrazellulär eine erhöhte LDH Konzentration bestimmen. Aber auch die mit Kleber inkubierten Testwells zeigten keine messbare Erhöhung der LDH Spiegel im Medium. Werden die Ergebnisse aus Zellzählung und Aktivitätsbestimmung mit einbezogen, kann in den Kleberwells trotz fehlendem LDH Nachweis im Überstand nicht von vitalen Zellen mit intakter Membran ausgegangen werden. Nach Rücksprache mit dem Technical Service von Sigma Aldrich (USA) könnte die Ursache für die mit dem TOX-7 in diesem Fall nicht detektierbare Zellmembranschädigung in der sehr geringen Zellzahl liegen. Der TOX-7 Assay misst nur zwischen  $1 \times 10^4$  und  $30 \times 10^4$  Zelldichte verlässlich genau. Nachdem aber die Ergebnisse aus WST-I Assay und Zellzählung auf einen Untergang der meisten Zellen deuten, lag die Menge des ausgeschiedenen LDHs möglicherweise unter der Nachweisgrenze. Durch Subtrahieren des zu jedem Testzeitpunkt ermittelten Leerwertes sollten Störfaktoren wie Extinktionen des Kulturmediums, des Klebers oder der Testsubstrate eliminiert werden. Eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse durch das dem Nährmedium zugefügte, LDH enthaltende, fetale Rinderserum kann jedoch ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Die Kontrolle auf Kollagen-I beschichtetem Polyesterol zeigte am 7. Tag des Versuchs einen großen Anstieg des extrazellulär nachweisbaren LDHs, das am 14. Tag wieder etwas zurückging. Die Diskrepanz zwischen den gemessenen Zellzahlen der Negativkontrolle und der Kleberwells sprechen am ehesten für den Nachweis physiologisch sezernierten LDHs der großen Zahl proliferierender Zellen der Kontrolle ins Medium.

#### **4.2.3.3 Morphologie**

**Tag 2** - Die mikroskopischen Aufnahmen wurden in Abbildung 34 gezeigt. In e, sind einige spindelförmige Zellen zu erkennen. Im Vergleich zu den Übersichtsaufnahmen im Versuchsansatz A, in dem 10 mal mehr Zellen ausgesät worden waren, sind auf

den Bildern der Negativkontrolle weniger Zellen zu sehen. Sie haben mehr Platz zur Verfügung, ihre Zellausläufer auszubilden. Übersichtsaufnahme und auch Vergrößerung stützen die Ergebnisse aus Zellzählung, WST-I und TOX-7 im Sinne vitaler und proliferierender Mauszellen in der Negativkontrolle. Die getesteten Kleberproben zeigen im Gegensatz dazu nur wenige und ausschließlich kugelförmige Zellen, umgeben von großen Kleberflocken. Die abgerundeten Zellen zeigen weder Zellausläufer noch bilden sie Zellkontakte aus, sie scheinen vielmehr immobil am Wellboden im Kleber fixiert zu sein. Diese Beobachtungen unterstützen die in den Vitalitätsassays gemessenen Daten in bezug auf fehlende Aktivität und Proliferation.

**Tag 7** - Bis zum Testtag 7 bewachsen die ausgesäten Zellen im Kontrollwell bereits dicht und konfluent den Wellboden. Im Medium finden sich wenige frei schwimmende Zellen, die sich z.B. wegen Mangel an Platz oder Nährstoffen vom Boden lösten. Die Nahaufnahme bestätigt die Übersicht mit den eng aneinander liegenden Zellkörpern der Mausfibroblasten. Die morphologischen Beobachtungen der Zellen passen eindeutig zu den erhobenen Daten aus den anderen Untersuchungen. Obwohl die Aufnahmen bei einem exakt gleich durchgeführten Versuch mit den gleichen Proben und Konzentrationen des Klebers b entstanden, wird hier offensichtlich, wie groß die Variabilität des Reaktionsverhaltens der Kleber sein kann. Die Zellzahl hat sich innerhalb der letzten 7 Tage kaum oder gar nicht verändert, denn es sind nur wenige Zellen in der Übersicht zu sehen. Die Zellen haften abgerundet und unbeweglich auf oder in den Proben. Fehlende Zellvermehrung kann nicht verwundern, da sich die Zellen bereits am ersten Testtag der Versuche avital und immobil zeigten.

**Tag 14** - Die Aufnahmen über dem Kontrollwell dichten Zellrasen. Die Zellen wachsen in Verbänden in wellenförmiger Ausrichtung. Die teilweise übereinander wachsenden spindelförmigen Zellkörper lassen sich selbst in der Nahaufnahme nur schwer voneinander abgrenzen. Ein limitierendes Platz- und Nahrungsangebot bestätigt sich im WST-I und TOX-7 Assay. Über Kleber b zeigt sich keine Veränderung verglichen mit Tag 7. Noch immer finden sich vereinzelt rundliche, am Wellboden fixierte Zellen. Zellausläufer sind nicht auszumachen.

#### 4.2.4 Versuchsaufbau C

Nach Vorlage der ersten Ergebnisse aus den Tests zu Vitalität und Morphologie in direktem Kontakt musste von toxischen Effekten der Kleber auf die Zellen ausgegangen werden. Deshalb wurden die Zellen in einem weiteren Versuch um den in der Mitte eines Objektträgers aufgetragenen Klebertropfen herum angesiedelt, um mögliche toxische Wirkungen in indirektem Kontakt zu beobachten. Nach 24 Stunden konnte mikroskopisch keine lebenden Zellen mehr ausgemacht werden. Weitere Untersuchungen wurden nicht erhoben. Dieses Ergebnis bestätigte den Verdacht, die Kleberproben, bzw. Bestandteile des Klebers könnten die Zellen indirekt schädigen. Möglicherweise beeinträchtigt die Abgabe toxischer Substanzen ins Medium die Zellvitalität. Oder aber reaktive Gruppen der Kleber binden für die Zelle essentielle Nährstoffe. Gemäß ISO Norm sollte ein Versuch ohne direkten Kontakt zwischen Kleberprobe und Zellen, weiteren Aufschluß geben.

Auf Kleber inkubiertes Kulturmedium wurde adhären Zellen als Nährmedium hinzugegeben, um die Zellvitalität in indirektem Kontakt zu untersuchen (genauer Versuchsaufbau siehe Seite 36). Die Auswertung zeigte ausschließlich avitale Zellen (siehe Abbildung 41). Das vorinkubierte Medium war zuvor wegen einer deutliche Farbänderung aufgefallen (Abbildung 40). Das benutzte Kulturmedium alpha MEM mit Glutamax I der Firma Gibco enthält mit Phenolrot einen farblichen pH-Wert Indikator, der in saurem Milieu seine rote Farbe zu orange bis gelb ändert und auf basischen pH-Wert mit einer intensivroten bis pinken Färbung reagiert. Die Annahme, das Medium könnte nun einen vom Neutralbereich abweichenden pH-Wert zeigen, der ein Überleben der Zellen unmöglich machen würde, ließ sich mit Hilfe eines pH-Universalindikators der Firma Merck nicht bestätigen. Die Strukturformel von Phenolrot zeigt reaktive Gruppen, die mit den Kleberkomponenten interagieren und die Farbreaktion ohne Änderung des pH-Wertes erklären könnten. Als weitere mögliche Ursache für das Absterben der Zellen, käme eine Vernetzung oder ein Fixieren der Zellen durch noch nicht umgesetzte Aldehydgruppen in Betracht. Die so fixierten Zellen wären immobil, was zu Wachstumsstillstand und Zelltod führen könnte. Um nicht umgesetzte Aldehydgruppen biochemisch nachzuweisen, wurde das mit Kleber inkubierte Medium den Kooperationspartnern im Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth zur Analyse zugesandt.

Das Nährmedium wurde mit einem Farbnachweis und IR-spektrometrisch auf reduzierende Gruppen untersucht. Ein Vergleich mit normalem Kulturmedium wurde nicht durchgeführt. Es gab jedoch keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Aldehydgruppen, so dass ein Überschuss an Aldehydgruppen als Ursache der Toxizität in diesem Versuch ausgeschlossen werden konnte.

Die Abwesenheit von reaktiven Gruppen lässt vermuten, dass alle Aldehydgruppen bereits von Stoffen im Medium oder durch Oberflächenmoleküle abgesättigt wurden. Möglicherweise ist das initiale Blocken mit FBS nicht ausreichend und Nährstoffe im Kulturmedium, wie z.B. Aminosäuren, Nukleinsäuren und Proteine werden durch ständiges Umsetzen der Klebergruppen abgebunden und verbraucht. Damit wären für die Zellen nicht mehr genügend essentielle Stoffe vorhanden, was zu Inaktivität und letztendlich zum Absterben der kultivierten Zellen führen würde. Für diese These sprächen auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 41d-f). Die eindeutig avitalen Zellen zeigen wenig Zytoplasma und keine Zellausläufer. Bezüglich der Morphologie scheinen sich die Zellen nur geringfügig vom Ausgangsbild der gerade adhären Zellen (Abbildung 39) zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu zeigt die Kontrolle proliferierende Zellen, die sich in ihrem morphologischen Erscheinungsbild von den Ausgangsaufnahmen eindeutig differenzieren lassen.

#### 4.2.5 Einzelkomponenten

##### 4.2.5.1 Zellaktivität

Die Durchführung eines Versuchs, ähnlich dem Versuchsaufbau A mit  $5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> zur Testung der Einzelkomponenten konnte in Bezug auf die Zellaktivität wenig Aufschluss geben über die für die toxische Wirkung der Kleber verantwortliche Komponente. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 zusammengefasst. Womöglich war auch hier das Verhältnis zwischen Komponentenmenge und Zellzahl ungünstig gewählt worden. Zudem wurden die Komponenten im Gegensatz zu den gemischten Klebern nicht fest und bildeten somit auch keine Grundlage für die darauf gesiedelten Zellen. Vielmehr versanken die Mausfibroblasten in den teils viskösen Flüssigkeiten, weshalb im Anschluss auch auf eine Zellzählung in den Kleberwells verzichtet werden musste.



#### 4.2.5.2 Zellmembranintegrität

Im Test der Einzelkomponenten wurde für keine der Komponenten eine wertbare Extinktion ermittelt (siehe Abbildung 38). Keine gezählten Zellen in allen Komponentenwells und auf Kupfer lassen im Vergleich zu etwa 380.000 Zellen in den Kontrollwells eine deutlichere Unterscheidung zu. Auch hier entspricht die extrazellulär gemessene LDH Konzentration in den Kontrollwells wahrscheinlich einer physiologischen Sekretion. Da bei diesem Versuchsansatz die einzelnen Komponenten während der Dauer des Tests flüssig blieben, war keine feste Oberfläche für die Zellen zum Adhären geben. Die Ergebnisse des TOX-7 sind vereinbar mit der Auswertung des WST-I und sprechen für eine toxische Wirkung der Komponenten auf die ausgesiedelten Zellen.

### 4.3 Klebeverhalten (Durchführung durch Kooperationspartner)

#### 4.3.1 Screeningversuche Klebekraft

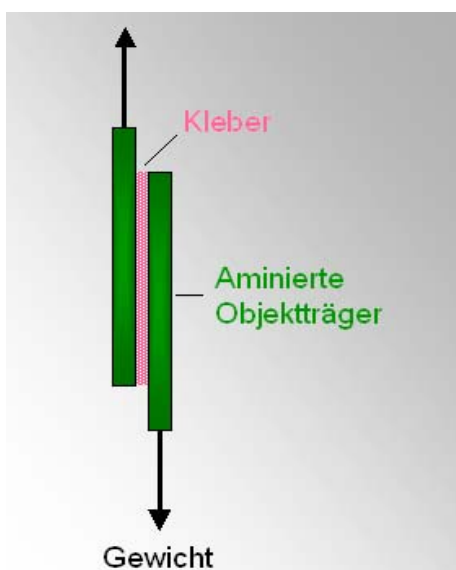


Abbildung 44 - Aufbau Klebeschnelltest

Die verschiedenen synthetisierten Kleberproben wurden von den Kooperationspartnern des FBI in Bayreuth in einem Laborvorversuch (Abbildung 44) auf deren Klebewirkung getestet. Dazu wurden die Oberflächen von Objektträgern mit Aminogruppen funktionalisiert, um dem Kleber ähnlich dem Kollagen des Knochens Aminogruppen bereitzustellen. Die Proben wurden zwischen den Objektträger auf einer Klebefläche von  $15,6 \text{ cm}^2$  dünn aufgetragen und für

45 Minuten mit einem 400 g schweren Gewicht aufeinander gepresst. Die Objektträger wurden für den Zugversuch mit bis zu maximal 2 kg belastet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über eine Auswahl verschiedener Systeme wieder.

Verbindung	Gewicht
Pritt-Stift	107 g
Sekundenkleber	2000 g
Oxidierter Stärke	2000 g
Chitosan	200 g
Chitosan/oxidierter Stärke	2000 g

**Tabelle 2 - Ergebnisse Klebescreeningtest**

Während Chitosan keine Möglichkeit hat, kovalent an die mit Aminogruppen beschichteten Glasplättchen anzuknüpfen und dementsprechend schon bei 200 g reisst, halten oxidierte Stärke bzw. oxidierte Stärke kombiniert mit Chitosan ein Gewicht von mehr als 2 kg. Die Aldehydgruppen ermöglichen eine kovalente Bindung an die Oberfläche des Objektträgers. In Anbetracht der gleich starken Zugfestigkeit für Stärke und Stärke/Chitosan, wäre der Zusatz von Chitosan überflüssig. Die Anwendung am Knochen allerdings, macht die Kombination mit Chitosan notwendig, um den breiteren Bruchspalt stabil überbrücken zu können. Der Screeningversuch ließ keine weitere Optimierung zu, nachdem die maximal mögliche Belastung von 2 kg in vielen Fällen bereits überschritten werden konnte.

Die Oberfläche eines aminierten Objektträgers entspricht nur modellhaft der Beschaffenheit des Knochens. Neben Belegung mit Proteinen und Fetten aus Blut und Knochenmark unterscheidet sich vor allem die Topographie. Um den eigentlichen Bedingungen näher zu kommen, wurden erste Klebeversuche auch an zersägten oder zerbrochenen Rinderknochen unternommen. Vorherige Reinigung der Oberfläche von Fetten und Proteinen, beispielsweise mit Tensiden, führte zu einer besseren Klebewirkung.

Erste Klebeversuche wurden auch an humanen Knochenstücken durchgeführt. Dafür wurde ein Hüftkopf in kleine Stücke zersägt. Die Oberfläche der Stücke wurde mit PBS gereinigt und trocken getupft. Chitosan 0,75 %ig, und eine Stärke/L-Dopa Komponente 2 %ig wurden auf die Oberfläche pipettiert. Daraufhin wurden die Stücke für einige Minuten zusammengedrückt. Jedoch lösten sich alle Proben allein

durch Schwerkraft. Dies lag augenscheinlich an der zu flüssigen Konsistenz der Proben, die nach Pipettieren sofort in der spongiösen Struktur des Knochens versickerten. Daraufhin wurden die Proben viskös bis streichfest auf Chitosan 5 %ig und Stärke/L-Dopa 13 %ig konzentriert. Die Klebermasse ließ sich so mit einem Spatel auf die Oberfläche streichen und floß nicht in die Spongiosa. Nach mehrminütigen Andrücken hafteten beide Knochenstücke aneinander und hielten der Erdanziehungskraft stand. Bei leichtem Zug lösten sich die Stücke voneinander.

#### 4.3.2 Biomechanische Untersuchung der Klebekraft

Zur standardisierten Bestimmung der Klebekraft verschiedener Kleberkombinationen wurde vom Kooperationspartner (Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm) eine Vorrichtung zum Kleben von quaderförmigen Knochenproben entwickelt und gebaut. Diese Vorrichtung erlaubt es, kortikale Knochenproben mit einer standardisierten Federkraft von 8 N gegeneinander zu pressen. Die gesamte Vorrichtung konnte während des Aushärtvorgangs des Klebers auch in einem temperierten Wasserbad platziert werden. Es wurde eine Vorrichtung konstruiert und gebaut, mit der vorgefertigte kortikale Knochenproben in der Materialprüfmaschine auf ihre Klebefestigkeit untersucht werden können. Die Prüfung fanden in isotonischer Kochsalzlösung statt, um realitätsnahe Bedingungen zu simulieren.

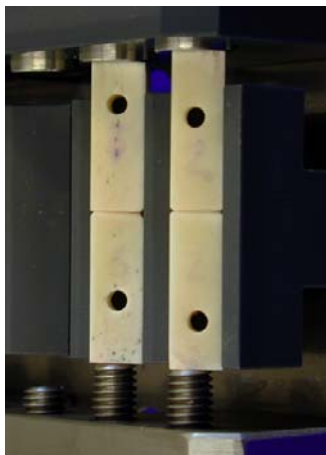


Abbildung 45 - Kortikale Knochenquader



Abbildung 46 - Zugfestigkeitsprüfung

Aus den Diaphysen von Rinderfemora und Rindertibien wurden quaderförmige Kortikalisproben mit Abmessungen von 40 mm x 8 mm x 8 mm hergestellt. Die Proben wurden verklebt und in nassem Milieu bis zum mechanischen Test belassen. In der folgenden Tabelle sind einige Ergebnisse der mechanischen Tests dargestellt.

Komponente 1 (7 %)	Komponente 2 (20 %)	Haftfestigkeit N/mm <sup>2</sup> (MPa)
Chitosan 24h	Ox. Stärke 24h	0,16
	Ox. Dextran 24h	0,81
	Ox. Dextran + L-Dopa 24h	0,91
	Ox. Stärke + L-Dopa 24h	0,28
	Alginsäure + L-Dopa 1,5h	0,61

**Tabelle 3 - Biomechanische Untersuchung zur Klebestärke**

Neben der insgesamt recht geringen Haftfestigkeit der Klebermischungen selbst unter idealen Umgebungsbedingungen (trockene, glatte Knochenoberfläche) war vor allem die Variabilität der Haftfestigkeiten ein Problem. Bei gleicher Konzentration der Komponenten hatte die Mischung eine sehr variable Viskosität. Zum Teil flockten die Komponenten aus. Dadurch war ein gleichmäßiges Auftragen fast unmöglich, was in diesen Fällen meist zu ungenügender Klebewirkung führte. Bei der Aushärtung im nassen Milieu kam es teilweise zu komplettem Versagen der Klebeeigenschaften. Dies könnte mit dem Eindringen von Wasser in den Klebeverbund zu tun haben.

## 4.4 Ausblick

### 4.4.1 Kleberwahl für weitere Tests

Aufgrund der Ergebnisse der biomechanischen Testung durch die Projektpartner in Ulm konnte eine gezielte Auswahl der am besten klebenden Proben getroffen werden. Diese werden in über diese Arbeit hinausgehenden weiteren Untersuchungen mit Hilfe der hier etablierten Versuchsaufbauten auf Biokompatibilität untersucht.

#### 4.4.2 Versuchsaufbau

Die vorliegenden Erkenntnisse über die zelltoxische Wirkung der Adhäsive, lässt zum einen die Suche nach geeigneten Substanzen zur Absättigung möglicher reaktiver Gruppen in den Vordergrund rücken. Zum anderen wird auch die Wahl der geringsten noch klebenden Konzentrationen der Proben zukünftig eine größere Rolle spielen müssen. Es sollten unterschiedliche zu testende Klebermengen in Verhältnis zur ausgesäten Zellzahl gewählt werden. Im indirekten Test sollte eine Positivkontrolle mit isotoner Kochsalzlösung mitgeführt werden. Auch hier sollten aber zumindest verschiedene Verdünnungen des Mediumüberstandes untersucht werden.

#### 4.4.3 Degradierbarkeit

Nachdem durch Untersuchungen der Biomechanik und der Biokompatibilität *in vitro* die möglichen Kleberkombinationen enger eingegrenzt werden können, muss in einem weiteren Schritt auch die Biodegradierbarkeit der Klebesysteme experimentell bestätigt werden. Dazu gehören einerseits die *in vitro* Testung der Klebestärke in physiologischen Salzlösungen alleine und in Kombination mit Serum. Dafür muss ein System entwickelt werden, das die Untersuchung der Degradierbarkeit beispielsweise unter Zugbelastung ermöglicht. Ein weiteres *in vitro* Testmodell sieht die dreidimensionale Kultivierung primärer Knochenzellen auf spongiösen Leitschienen in der Durchflußkammer vor. Diese Leitschienen werden nach mehrwöchiger Kultivierung durchtrennt und unter Verwendung der Kleberproben wieder miteinander verklebt und weiter kultiviert. Eine histologische Auswertung der Schnittflächen könnte auch Aufschluß über Wachstum der Zellen in den Kleber oder durch ihn hindurch geben.

#### 4.4.4 Tiermodell

Um das Verhalten des gesamten Organismus auf die entwickelten Klebesysteme beurteilen zu können, wird eine *in vivo* Untersuchung im Tiermodell erfolgen müssen. Davon werden weiterführende Ergebnisse zu Klebestärke, lokaler Gewebereaktion, Knochenformation und -resorption im Bereich des Bruches, und möglicher systemischer Reaktionen auf die Kleberproben erwartet. Vor allem aber die

Biodegradierbarkeit der Adhäsive könnte detailliert untersucht werden und Abbauprodukte und deren Elimination durch den Organismus beurteilt werden.

#### 4.4.5 Biomechanik

Die biomechanische Untersuchung der Kleber zur Zugfestigkeit könnte mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergänzt werden. Dadurch könnten die Bruchflächen genauer analysiert werden. Informationen darüber, an welchen Stellen die Proben auseinander reißen, würde die gezielte chemische Weiterentwicklung der Adhäsive ermöglichen. Dabei wäre vor allem von Bedeutung, ob die Kleber in Bezug auf Kohäsion oder Adhäsion Schwächen zeigen (Sung et al. 1999).

#### 4.4.6 Porenbildner

Um ein schnelles Einsprossen von Knochenzellen in den Kleber zu erreichen, ist es möglicherweise notwendig, den Kleber mit schnell bioresorbierbaren Substanzen zu versehen, die als Porenbildner fungieren. Es ist zu überprüfen, in wie weit die anorganischen bzw. organischen Füllstoffe die mechanischen Eigenschaften (Abbaurrate, Haftfestigkeit) beeinflussen und somit deren Verwendung ermöglichen. Sowohl Porenbildner als auch Matrix sind bestimmend für die makroskopischen Eigenschaften und haben dadurch auch großen Einfluss auf die Applikationsformen des Klebers.

#### 4.4.7 Applikationsformen

Die Applikation sollte möglichst praktisch gestaltet werden, um eine einfache Handhabung auch unter den Bedingungen einer Operation zu ermöglichen. Eine kurze Abbindezeit mit Erreichen der maximalen Klebeleistung binnen weniger Minuten ist anzustreben. Denkbare Applikationen, abhängig von den Eigenschaften des entwickelten Klebers sind Pinsel oder Tube. Die einzelnen Komponenten müssen eine ausreichende Lagerstabilität besitzen. Die Viskosität des einsatzfertigen Klebers sollte so eingestellt werden, dass einerseits eine vollständige Benetzung der Klebestücke gewährleistet ist, andererseits aber eine unbeabsichtigte Kontamination von nicht zu verklebendem Gewebe, hervorgerufen durch zu geringe Viskosität, unterbleibt. Die Einstellung der Viskosität könnte durch Variation der Konzentration

der Komponenten im wässrigen Lösungsmittelsystem geschehen. Darüber hinaus könnte die Verwendung eines füllstoffhaltigen Klebersystems zum gleichzeitigen Auffüllen kleinerer Defektstellen am Applikationsort von großem Nutzen sein.

#### 4.4.8 Sterilisation

Die Sterilisierbarkeit der Kleber insbesondere durch Gammastrahlung sollte zum Ende der Entwicklung und Untersuchung der Klebersysteme an ausgewählten Adhäsiven getestet werden. Dazu sollten die Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Klebers und die Toxikologie etwaiger Abbauprodukte nach Bestrahlung bestimmt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Wiederherstellung der uneingeschränkten Funktionsfähigkeit und der vollen mechanischen Belastbarkeit der Knochen und Gelenke steht nach einer Fraktur im Vordergrund. Ausgehend von den Bedürfnissen der Chirurgie nach einem bioresorbierbaren Klebstoff zur Therapie kleinerer, unbelasteter Bruchfragmente und gelenknaher Trümmerfrakturen wurde ein Zweikomponenten-Kleber auf Polysaccharidbasis (Chitosan und ox. Stärke bzw. ox. Dextran) entwickelt. Der Kleber kopiert die Klebewirkung von Muscheladhäsiven und reduziert sich dabei auf den Reaktionsmechanismus der Schiff'schen Basenbindung.

Es ist gelungen, ein geeignetes *in vitro* Testsystem zu etablieren, mit dem Biokompatibilitätsstudien von Hartgewebeklebern rasch und in hohem Durchsatz durchgeführt werden können. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Klebervarianten und deren Einzelkomponenten in verschiedenen Versuchsansätzen gemäß ISO Norm 10993-5 im direkten bzw. indirekten Kontakt mit Zellen auf ihre Biokompatibilität getestet. Die Auswertung erfolgte mit geeigneten Assays, die neben der Zellzahl, die Zellaktivität (WST-I/Roche) und die Zellmembranpermeabilität (TOX-7/Sigma) bestimmten. Versuchsansatz C mit indirektem Kleberkontakt wurde fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Unter den etablierten Versuchsbedingungen zeigte sich ein proliferationshemmender bzw. letaler Einfluss der Kleber auf die Zellen.

Durch Modifikation der Versuchsbedingungen können nun weitere, neu entwickelte Kleberproben zunächst *in vitro* auf ihre biomechanische Klebewirkung und auf ihre Biokompatibilität gescreent werden, um geeignete Kombinationen für *in vivo* Untersuchungen auswählen zu können.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Albrektsson T, Linder L (1981) A method for short- and long-term in vivo study of the bone-implant interface. *Clin Orthop* 159:269-273
2. Arbes H, Bösch P, Lintner F, Salzer M (1981) First clinical experience with heterologous cancellous bone grafting combined with the fibrin adhesive system (F.A.S.). *Arch Orthop Trauma Surg* 98(3):183-188
3. Beck H (1966) Kunststoffklebung mit Cyanoacrylaten an Sehnen- und Knochengeweben. *Langenbecks Arch Chir* 316:563-568
4. Bergel S (1909) Über Wirkungen des Fibrins. *Dtsche med Wschr* 35(15):663-665
5. Berndt H, Rimpler M (1991a) Klebstoffe in der Humanmedizin Teil 1: Peptoplaste, Synthese eines neuen resorbierbaren Klebstoffsystems. *Adhäsion* 35:23-27
6. Berndt H, Rimpler M (1991b) Klebstoffe für die Humanmedizin Teil 2: Untersuchung von Peptidklebern auf ihre Verwendbarkeit in biologischen Systemen. *Adhäsion* 35:34-37
7. Berndt H, Rimpler M (1991c) Klebstoffe in der Humanmedizin Teil 3: Restmonomerbestimmung bei Peptidklebern nach erfolgter Polymerisation. *Adhäsion* 35:16-18
8. Bloch B (1958) Bonding of fractures by plastic adhesives; preliminary report. *J Bone Joint Surg Br* 40-B(4):804-812
9. Boland ED, Telemeco TA, Simpson DG, Wnek GE, Bowlin GL (2004) Utilizing acid pretreatment and electrospinning to improve biocompatibility of poly(glycolic acid) for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 71B(1):144-152
10. Bolliger-Stucki B, Baillod P, Mader W, Furlan M (2000) Biochemical properties of the fibrinogen component of a fibrin glue before and after severe dry heat treatment. *J Biomed Mater Res* 53(5):577-583
11. Bösch P (1981) Die Fibrinpongiosaplastik. Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrung. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 124:1-26
12. Bösch P, Braun F, Eschberger J, Kovac W, Spangler HP (1977) Die Beeinflussung der Knochenheilung durch hochkonzentriertes Fibrin, Experimentelle Untersuchung am Kaninchen. *Arch Orthop Unfallchir* 89(3):259-273

13. Brauer GM, Kumpula JW, Termini DJ, Davidson KM (1979) Durability of the bond between bone and various 2-cyanoacrylates in an aqueous environment. *J Biomed Mater Res* 13(4):593-606
14. Brauer GM, Lee CH (1989a) Oligomers with pendant isocyanate groups as tissue adhesives. I. Synthesis and characterization. *J Biomed Mater Res* 23(3):295-309
15. Brauer GM, Lee CH (1989b) Oligomers with pendant isocyanate groups as tissue adhesives: II. Adhesion to bone and other tissues. *J Biomed Mater Res* 23(7):753-763
16. Brockmann W (2000) Die Bedeutung der Verbindungstechnik in Vergangenheit und Zukunft. In: Schindel-Bidinelli E: Kleben 1-11
17. Brosh T, Simhon D, Halpern M, Ravid A, Vasilyev T, Kariv N, Nevo Z, Katzir A (2004) Closure of skin incisions in rabbits by laser soldering II: Tensile strength. *Lasers Surg Med* 35(1):12-17
18. Brug E, Braunsteiner E, von Gemmern C (1976) Die Ultraschallverschweißung von Knochen. Vorläufige Ergebnisse. *Chirurg* 47(10):555-558
19. Bruns J, Klima H, Rosenbach B, Lussenhop S (1993) Langzeitergebnisse nach Klebung von osteochondralen Fragmenten bei Osteochondrosis dissecans. *Langenbecks Arch Chir* 378(3):160-166
20. Buchner H, Feischl P (1962) Spätergebnisse bei der Behandlung von Knochenbrüchen mit Polyurethanschaum. *Arch Orthop Unfallchir* 54:48-57
21. Burzio LO, Burzio VA, Silva T, Burzio LA, Pardo J (1997) Environmental bioadhesion: themes and applications. *Curr Opin Biotechnol* 8(3):309-312
22. Carter DR, Schwab GH, Spengler DM (1980) Tensile fracture of cancellous bone. *Acta Orthop Scand* 51(5):733-741
23. Chao HH, Torchiana DF (2003) BioGlue: albumin/glutaraldehyde sealant in cardiac surgery. *J Card Surg* 18(6):500-503
24. Charnley J (1960) Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Joint Surg Br* 42-B(1):28-30
25. Charnley J (1966) The healing of human fractures in contact with self-curing acrylic cement. *Clin Orthop* 47:157-163
26. Chou TC, Fu E, Shen EC (2003a) Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 308(2):403-407
27. Chou TC, Fu E, Wu CJ, Yeh JH (2003b) Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 302(3):480-483

28. Chou YF, Huang W, Dunn JC, Miller TA, Wu BM (2005) The effect of biomimetic apatite structure on osteoblast viability, proliferation, and gene expression. *Biomaterials* 26(3):285-295
29. Claes LE, Burri C, Helbing G, Lehner E (1981) Biomechanische Untersuchung zur Festigkeit verschiedener Knorpelklebungen. *Helv chir Acta* 48:11-13
30. Cook M (1969) Crustacean bioadhesive secretions. *J Dent Res Suppl* 48:1124
31. Coover HW, Joyner FB, Shearer NH, Wicker TH (1959) Chemistry and Performance of Cyanoacrylate Adhesives. *SPE Journal* 15:413-417
32. Davis BB, Thompson DA, Howard LL, Morisseau C, Hammock BD, Weiss RH (2002) Inhibitors of soluble epoxide hydrolase attenuate vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(4):2222-2227
33. de Nooy AEJ, Besemer AC, van Bekkum H (1995) Highly selective nitroxyl radical-mediated oxidation of primary alcohol groups in water-soluble glucans. *Carbohydr Res* 269:89-98
34. Deacon MP, Davis SS, Waite JH, Harding SE (1998) Structure and mucoadhesion of mussel glue protein in dilute solution. *Biochemistry* 37(40):14108-14112
35. Deming TJ (1999) Mussel byssus and biomolecular materials. *Curr Opin Chem Biol* 3(1):100-105
36. Donkerwolcke M, Burny F, Muster D (1998) Tissues and bone adhesives--historical aspects. *Biomaterials* 19(16):1461-1466
37. Drompp BW (1960) Chemical osteosynthesis of fractures and nonunions of the shafts of long bones of the lower extremity. *Am J Surg* 99:733-744
38. Duncan IC, Gebka M, Hellig F, Cilliers A, Klug E, Harrisberg JR, Govendrageloo K, Middlemost SJ (2004) Percutaneous endovascular occlusion of symptomatic coronary arteriovenous fistulas with cyanoacrylate. *J Invasive Cardiol* 16(9):469-474
39. Ebert G (1993) Biopolymere. In: Teubner BG: *Biopolymere*, Stuttgart 231-233
40. Edlich RF, Prusak M, Panek P, Madden J, Wangensteen OH, Thul J (1971) Studies in the management of the contaminated wound. 8. Assessment of tissue adhesives for repair of contaminated tissue. *Am J Surg* 122(3):394-397
41. Ehalt W (1961) Erfahrungen mit Ostamer. *Langenbecks Archiv für klinische Chirurgie* 298:257-260

42. El Ghannam AR, Ducheyne P, Risbud M, Adams CS, Shapiro IM, Castner D, Golledge S, Composto RJ (2004) Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity. *J Biomed Mater Res* 68A(4):615-627
43. Fakhry A, Schneider GB, Zaharias R, Senel S (2004) Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. *Biomaterials* 25(11):2075-2079
44. Frank BP, Belfort G (2002) Adhesion of *Mytilus edulis* foot protein 1 on silica: ionic effects on biofouling. *Biotechnol Prog* 18(3):580-586
45. Fransson LA, Malmström A, Sjöberg I (1980) Periodate oxidation and alkaline degradation of Heparin-related glycans. *Carbohydr Res* 80:131-145
46. Fujita H, Ido K, Matsuda Y, Iida H, Oka M, Kitamura Y, Nakamura T (2000) Evaluation of bioactive bone cement in canine total hip arthroplasty. *J Biomed Mater Res* 49(2):273-288
47. Giebel G, Rimpler M (1981) Klebungen am Skelettsystem: Klebstoffe, 50 Jahre Hilfsstoffe für den Chirurgen (Teil 1). *Biomed Tech (Berl)* 26(3):35-40
48. Giebel G, Rimpler M, Borchers L (1981) Klebungen am Skelettsystem: Untersuchung der Klebfestigkeit von 22 Klebstoffen am Knochen (Teil 2). *Biomed Tech (Berl)* 26(7-8):170-174
49. Gluck T (1891) Referat über die durch das moderne chirurgische Experiment gewonnenen positiven Resultate, betreffend die Naht und den Ersatz von Defecten höherer Gewebe, sowie über die Verwerthung resorbierbarer und lebendiger Tampons in der Chirurgie. *Arch f Klin Chir* 41(Band a):187-239
50. Gonzalez E, Orta J, Quero C, Niemshik L, Galera R, Onay D, Rojas O (2000) Ethyl-2-cyanoacrylate fixation of the cranial bone flap after craniotomy. *Surg Neurol* 53(3):288-289
51. Grossterlinden L, Janssen A, Schmitz N, Priemel M, Pogoda P, Amling M, Rueger JM, Linhart W (2006) Deleterious tissue reaction to an alkylene bis(dilactoyl)-methacrylate bone adhesive in long-term follow up after screw augmentation in an ovine model. *Biomaterials* 27(18):3379-3386
52. Guggi D, Langoth N, Hoffer MH, Wirth M, Bernkop-Schnurch A (2004) Comparative evaluation of cytotoxicity of a glucosamine-TBA conjugate and a chitosan-TBA conjugate. *Int J Pharm* 278(2):353-360
53. Hedri A (1931) Ein neues Prinzip der Osteosynthese. *Arch f Klin Chir* 167:145-146
54. Heiss C, Schnettler R (2003) Bioresorbierbare Klebstoffe in der operativen Traumatologie und Orthopädie. *Biomaterialien* 4:298-304

55. Hoppe W (1956) Tierexperimentelle Untersuchungen über Gewebsreaktionen auf Injektionen von autopolymerisierendem Kunststoff. Dtsch Zahnärztl Z 11(15):837-847
56. Hulliger H (1962) Untersuchungen über die Wirkung von Kunstharzen (Palacos und Ostamer) in Gewebekulturen. Arch orthop Unfallchir 54:581-588
57. Hwang JJ, Stupp SI (2000) Poly(amino acid) bioadhesives for tissue repair. J Biomater Sci Polym Ed 11(10):1023-1038
58. International Organization of Standardization (1999) ISO 10993-5. EN ISO 10993
59. Iwata H, Matsuda S, Mitsuhashi K, Itoh E, Ikada Y (1998) A novel surgical glue composed of gelatin and N-hydroxysuccinimide activated poly(L-glutamic acid): Part 1. Synthesis of activated poly(L-glutamic acid) and its gelation with gelatin. Biomaterials 19(20):1869-1876
60. Jallali N, Haji A, Watson CJ (2004) A prospective randomized trial comparing 2-octyl cyanoacrylate to conventional suturing in closure of laparoscopic cholecystectomy incisions. J Laparoendosc Adv Surg Tech A 14(4):209-211
61. Jing H, Kitts DD (2004) Antioxidant activity of sugar-lysine Maillard reaction products in cell free and cell culture systems. Arch Biochem Biophys 429(2):154-163
62. Jurgensen K, Aeschlimann D, Cavin V, Genge M, Hunziker EB (1997) A new biological glue for cartilage-cartilage interfaces: tissue transglutaminase. J Bone Joint Surg Am 79(2):185-193
63. Kang J, Lin C, Chen J, Liu Q (2004) Copper induces histone hypoacetylation through directly inhibiting histone acetyltransferase activity. Chem Biol Interact 148(3):115-123
64. Kirilak Y, Pavlos NJ, Willers CR, Han R, Feng H, Xu J, Asokanathan N, Stewart GA, Henry P, Wood D, Zheng MH (2006) Fibrin sealant promotes migration and proliferation of human articular chondrocytes: possible involvement of thrombin and protease-activated receptors. Int J Mol Med 17(4):551-558
65. Kitamura M, Kawakami K, Nakamura N, Tsumoto K, Uchiyama H, Ueda Y, Kumagai I, Nakaya T (1999) Expression of a model peptide of a marine mussel adhesive protein in Escherichia coli and characterization of its structural and functional properties. J Polym Sci A: Polym Chem 37:729-736
66. Kiyozumi T, Kanatani Y, Ishihara M, Saitoh D, Shimizu J, Yura H, Suzuki S, Okada Y, Kikuchi M (2006) Medium (DMEM/F12)-containing chitosan

- hydrogel as adhesive and dressing in autologous skin grafts and accelerator in the healing process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*
67. Koehnlein HE, Lemperle G (1969) Experimental studies with a new gelatin-resorcin-formaldehyde glue. *Surgery* 66(2):377-382
  68. Kort J (1971) *Klebstoff in der Chirurgie*. Schattauer Verlag, Stuttgart
  69. Leemann RA, Hedinger C, Jenny M (1961) Tierexperimentelle und histologische Ergebnisse bei der Frakturleimung mit dem Polyurethanpolymer "Ostamer". *Schweiz med Wschr* 91(31):908-914
  70. Mandarino MP, Salvatore JE (1959) Polyurethane polymer; its use in fractured and diseased bones. *Am J Surg* 97(4):442-446
  71. Mandarino MP, Salvatore JE, TJ (1960) Chemical Osteosynthesis - A new method of treatment of fractures and diseased bone with a Polyurethane Polymer. *J Bone Joint Surg Am* 42 A(5):901
  72. Matras H, Dinges P, Lassmann H., Mamoli B (1972) Zur nahtlosen interfazikulären Nerventransplantation im Tierexperiment. *Wien med Wschr* 37:517-523
  73. Matsumoto T (1968) Vienna International Symposium--tissue adhesives in surgery. *Arch Surg* 96(2):226-230
  74. Maurer P, Bekes K, Gernhardt CR, Schaller HG, Schubert J (2004) Tensile bond strength of different adhesive systems between bone and composite compared: an in vitro study. *J Craniomaxillofac Surg* 32(2):85-89
  75. McCalden RW, McGeough JA, Barker MB, Court-Brown CM (1993) Age-related changes in the tensile properties of cortical bone. The relative importance of changes in porosity, mineralization, and microstructure. *J Bone Joint Surg Am* 75(8):1193-1205
  76. Meyer G, Muster D, Schmitt D, Jung P, Jaeger JH (1979) Bone bonding through bioadhesives: present status. *Biomater Med Devices Artif Organs* 7(1):55-71
  77. Montanaro L, Arciola CR, Cenni E, Ciapetti G, Savioli F, Filippini F, Barsanti LA (2001) Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use. *Biomaterials* 22(1):59-66
  78. Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, Minami S, Fujinaga T (1997) Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials* 18(13):947-951
  79. Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, Dingledine R (1998) Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* 1(8):659-667

80. Müller ME (1962) Die Verwendung von Kunstharzen in der Knochenchirurgie. *Arch orthop Unfallchir* 54:513-522
81. Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG, Furshpan EJ (1998) Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(20):11975-11980
82. Muzzarelli RA, Tanfani F, Emanuelli M, Pace DP, Chiurazzi E, Piani M (1984) Sulfated N-(carboxymethyl)chitosans: novel blood anticoagulants. *Carbohydr Res* 126(2):225-231
83. Nishimura SI, Kai H, Shinada K, Yoshida T, Tokura S, Kurita K, Nakashima H, Yamamoto N, Uryu T (1998) Regioselective syntheses of sulfated polysaccharides: specific anti-HIV-1 activity of novel chitin sulfates. *Carbohydr Res* 306(3):427-433
84. Nomori H, Horio H, Morinaga S, Suemasu K (1999) Gelatin-resorcinol-formaldehyde-glutaraldehyde glue for sealing pulmonary air leaks during thoracoscopic operation. *Ann Thorac Surg* 67(1):212-216
85. Nomori H, Horio H, Suemasu K (2000) The efficacy and side effects of gelatin-resorcinol formaldehyde-glutaraldehyde (GRFG) glue for preventing and sealing pulmonary air leakage. *Surg Today* 30(3):244-248
86. Okada Y, Kawanabe K, Fujita H, Nishio K, Nakamura T (1999) Repair of segmental bone defects using bioactive bone cement: comparison with PMMA bone cement. *J Biomed Mater Res* 47(3):353-359
87. Okamoto Y, Watanabe M, Miyatake K, Morimoto M, Shigemasa Y, Minami S (2002) Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium. *Biomaterials* 23(9):1975-1979
88. Onishi H, Machida Y (1999) Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 20(2):175-182
89. Ono K, Saito Y, Yura H, Ishikawa K, Kurita A, Akaike T, Ishihara M (2000) Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *J Biomed Mater Res* 49(2):289-295
90. Otani Y, Tabata Y, Ikada Y (1996a) A new biological glue from gelatin and poly(L-glutamic acid). *J Biomed Mater Res* 31(2):158-166
91. Otani Y, Tabata Y, Ikada Y (1996b) Rapidly curable biological glue composed of gelatin and poly(L-glutamic acid). *Biomaterials* 17(14):1387-1391
92. Otani Y, Tabata Y, Ikada Y (1998a) Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly(L-glutamic acid) mixture. *Biomaterials* 19(23):2167-2173

93. Otani Y, Tabata Y, Ikada Y (1998b) Hemostatic capability of rapidly curable glues from gelatin, poly(L-glutamic acid), and carbodiimide. *Biomaterials* 19(22):2091-2098
94. Otani Y, Tabata Y, Ikada Y (1999) Sealing effect of rapidly curable gelatin-poly (L-glutamic acid) hydrogel glue on lung air leak. *Ann Thorac Surg* 67(4):922-926
95. Pantel B (2001) Klebstoffe im Bogenbau. In: Alrune F: *Das Bogenbauer-Buch* 178-195
96. Passl R, Plenk H, Sauer G, Spängler HP, Radaszkiewicz T, Holle J (1976) Die homologe reine Gelenkknorpeltransplantation im Tierexperiment. *Arch orthop Unfallchir* 86:243-256
97. Pawlicki JM, Pease LB, Pierce CM, Startz TP, Zhang Y, Smith AM (2004) The effect of molluscan glue proteins on gel mechanics. *J Exp Biol* 207(Pt 7):1127-1135
98. Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H, Rausch WD (2004) Ginsenosides Rb(1) and Rg(1) effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Res* 1021(1):41-53
99. Rao SB, Sharma CP (1997) Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* 34(1):21-28
100. Rau MA, Whitaker J, Freedman JH, Di Giulio RT (2004) Differential susceptibility of fish and rat liver cells to oxidative stress and cytotoxicity upon exposure to prooxidants. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 137(4):335-342
101. Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A (2002) Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering. *Biomaterials* 23(24):4765-4773
102. Rietz KA (1964) Polymer osteosynthesis. Experimental studies with an epoxy resin (Araldite AW 120). *Acta Chir Scand* 128:387-401
103. Roche Molecular Biochemicals (2006) Apoptosis, Cell Death and Cell Proliferation. *Roche Applied Science* 3:58-70
104. Salerno AJ, Goldberg I (1993) Cloning, expression, and characterization of a synthetic analog to the bioadhesive precursor protein of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 39(2):221-226
105. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004) Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture, and protein expression. *Tissue Eng* 10(3-4):465-474
106. Schmeissner H (1970) Chemische und physikalische Eigenschaften der Cyanoacrylate. *Dtsch zahnärztl Z* 25(9):907-913



107. Schnabelrauch M, Vogt S (1999) Funktionalisierte Oligoester als Bausteine für biologisch abbaubare Polymermaterialien in der Medizin. In: Planck, H: Werkstoffe für Medizintechnik Werkstoffwoche 98:161-166
108. Seth R, Yang S, Choi S, Sabeen M, Roberts EA (2004) In vitro assessment of copper-induced toxicity in the human hepatoma line, Hep G2. *Toxicol In Vitro* 18(4):501-509
109. Sheline CT, Choi DW (2004) Cu<sup>2+</sup> toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 55(5):645-653
110. Silver FH, Wang MC, Pins GD (1995) Preparation and use of fibrin glue in surgery. *Biomaterials* 16(12):891-903
111. Simhon D, Brosh T, Halpern M, Ravid A, Vasilyev T, Kariv N, Katzir A, Nevo Z (2004) Closure of skin incisions in rabbits by laser soldering: I: Wound healing pattern. *Lasers Surg Med* 35(1):1-11
112. Smith DC (1973) Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry. *Biomed Eng* 8(3):108-115
113. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983) In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96(1):191-198
114. Sundstol EG, Pettersson H, Lundh T (2004) Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites. *Food Chem Toxicol* 42(4):619-624
115. Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, Hsu JC (1999) Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study. *J Biomed Mater Res* 46(4):520-530
116. Tachibana A, Kaneko S, Tanabe T, Yamauchi K (2005) Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation. *Biomaterials* 26(3):297-302
117. Tamaoki J, Tagaya E, Kawatani K, Nakata J, Endo Y, Nagai A (2004) Airway mucosal thickening and bronchial hyperresponsiveness induced by inhaled beta 2-agonist in mice. *Chest* 126(1):205-212
118. Tanabe T, Okitsu N, Tachibana A, Yamauchi K (2002) Preparation and characterization of keratin-chitosan composite film. *Biomaterials* 23(3):817-825
119. Tanaka Y, Tanioka S, Tanaka M, Tanigawa T, Kitamura Y, Minami S, Okamoto Y, Miyashita M, Nanno M (1997) Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials* 18(8):591-595

120. Toimela T, Tahti H (2004) Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Arch Toxicol* 78(10):565-574
121. Tokura S, Tamura H (2001) O-carboxymethyl-chitin concentration in granulocytes during bone repair. *Biomacromolecules* 2(2):417-421
122. Tseng YC, Tabata Y, Hyon SH, Ikada Y (1990) In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method. *J Biomed Mater Res* 24(10):1355-1367
123. Waite JH, Housley TJ, Tanzer ML (1985) Peptide repeats in a mussel glue protein: theme and variations. *Biochemistry* 24(19):5010-5014
124. Waite JH, Qin XX, Coyne KJ (1998) The peculiar collagens of mussel byssus. *Matrix Biol* 17(2):93-106
125. Waite JH (1999) Reverse engineering of bioadhesion in marine mussels. *Ann N Y Acad Sci* 875:301-309
126. Weber SC, Chapman MW (1984) Adhesives in orthopaedic surgery. A review of the literature and in vitro bonding strengths of bone-bonding agents. *Clin Orthop Rel Res* 191:249-261
127. Wen J, Mao HQ, Li W, Lin KY, Leong KW (2004) Biodegradable polyphosphoester micelles for gene delivery. *J Pharm Sci* 93(8):2142-2157
128. Wenz R (1998) First results with a new bioresorbable bone glue. In: Walenkamp, GHIM: *Biomaterials in surgery*. Thieme. 132-135
129. Yu M, Deming TJ (1998) Synthetic Polypeptide Mimics of Marine Adhesives. *Macromolecules* 31(15):4739-4745
130. Yu M, Hwang J, Deming TJ (1999) Role of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in mussel adhesive proteins. *J Am Chem Soc* 121(24):5825-5826
131. Yu SC, Chan MS, Lam JM, Tam PH, Poon WS (2004) Complete obliteration of intracranial arteriovenous malformation with endovascular cyanoacrylate embolization: initial success and rate of permanent cure. *Am J Neuroradiol* 25(7):1139-1143
132. Yu Y, Deck JA, Hunsaker LA, Deck LM, Royer RE, Goldberg E, Vander Jagt DL (2001) Selective active site inhibitors of human lactate dehydrogenases A4, B4, and C4. *Biochem Pharmacol* 62(1):81-89
133. Zhang H, Neau SH (2001) In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 22(12):1653-1658

- 
134. Zhao H, Robertson NB, Jewhurst SA, Waite JH (2006) Probing the adhesive footprints of *mytilus Californianus* byssus. *J Biol Chem* 281(16):11090-11096
  135. Zysk SP, Gebhard H, Plitz W, Buchhorn GH, Sprecher CM, Jansson V, Messmer K, Veihelmann A (2004) Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint. *J Biomed Mater Res* 71B(1):108-115

## Danksagung

Ermöglicht durch die finanzielle Unterstützung der Synos Stiftung, entstand diese Arbeit an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München. Herrn Prof. W. Mutschler und Dr. M. Schieker bin ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen sehr zu Dank verpflichtet.

Vielen Dank den Mitarbeitern des Friedrich-Baur-Instituts in Bayreuth und des Instituts für unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm für die freundliche Überlassung der erhobenen Daten. Dr. Bettina Hoffmann, Dr. Andreas Kokott und Dr. Rainer Detsch haben durch ihr Fachwissen und ihre ständige Bereitschaft zu konstruktiven und immer humorvollen Diskussionen einen wesentlichen Beitrag am Gelingen dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Hülya Bülle für ihre außerordentlich intensive und freundschaftliche Unterstützung. Ohne ihre fachliche Kompetenz, ihre kritischen Anmerkungen und ihren liebevollen kulinarischen Support wäre es mir unmöglich gewesen, die Dissertation in dieser Form durchzuführen.

Für die angenehme Atmosphäre, viele anregende Diskussionen und Soforthilfe bei Problemen aller Art bedanke ich mich bei meinen Kollegen und Freunden Brigitte Hackl, Gabor Horvath, Florian Haasters, Christoph Pautke, Nicole Sedlmayr, Michael Stengele, Juliane Winkelmann, Dorothea Holzwarth, Verena Peus und Carolin Busch.

Herzlichst danke ich an dieser offiziellen Stelle meinen Eltern, die meine Füße immer auf weiten Raum stellten und mich von jeher in jeder erdenklichen Hinsicht unterstützten. Ich danke Peter Körte, meinem besten Freund und Mann, der sich mit mir gemeinsam in biochemische und andere Sachverhalte hineindachte und mir auch in kritischen Situationen immer ein bemerkenswert guter Ratgeber war.

Schließlich möchte ich meine Arbeit der Frau widmen, die mir diesen Weg vor einem dreiviertel Jahrhundert vorangegangen ist; meiner Großmutter Dr. Berta Burgdörfer. Ihrem akademischen Erfolg und dem ihrer Kolleginnen ist zu verdanken, dass mir eine Universitätsausbildung in der Medizin heute so selbstverständlich erscheinen kann.

# CURRICULUM VITAE

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name	Inga Katharina Tittel
Geburtstag	23.07.1979
Geburtsort	St. Georgen im Schwarzwald
Nationalität	Deutsch

## AUSBILDUNG

---

09/1990 - 06/1999	<b>Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium</b> , St. Georgen
10/1999 - 09/2001	<b>Albert-Ludwigs-Universität</b> , Freiburg Studium der Humanmedizin, Vorklinischer Studienabschnitt
10/2001 - 06/2006	<b>Ludwig-Maximilians-Universität</b> , München Studium der Humanmedizin, Klinischer Studienabschnitt <b>Harvard Medical School</b> , Boston, USA Tertial Innere Medizin <b>Dr. von Haunersches Kinderspital, Kinderchirurgie</b> , München Tertial Chirurgie <b>Universitäts-Kinderspital Beider Basel</b> , Basel, Schweiz Tertial Pädiatrie
12/2002 - 11/2006	<b>Chirurgische Klinik Innenstadt</b> , Experimentelle Chirurgie, München Dissertation, Arbeitsgruppe Tissue Engineering Knochen „Zytotoxizität bioresorbierbarer Hartgewebekleber <i>in vitro</i> “

## ABSTRACTS UND VORTRÄGE

---

**Titel I**, Gülkan H, Hoffmann B, Kokott A, Detsch R, Ziegler G, Mutschler W, Schieker M  
*Cytotoxic effects of hard tissue adhesives in vitro*  
Cytotherapy, 2004, Vol 6(3): 285, P-17  
Strategies in Tissue Engineering, Würzburg, June 17-19, 2004

**Titel I**, Gülkan H, Hoffmann B, Kokott A, Detsch R, Ziegler G, Sedlmayr N, Mutschler W, Schieker M  
*Cytotoxic effects of hard tissue adhesives in vitro*  
Joint Meeting of Tissue Engineering Society International (TESI) and European Tissue Engineering Society (ETES), Lausanne, Switzerland, October 10-13, 2004

**Titel I**, Sedlmayr N, Gülkan H, Hoffmann B, Kokott A, Detsch R, Ziegler G, , Mutschler W, Schieker M  
*Cytotoxicity of hard tissue adhesives in vitro*  
Langenbecks Arch Surg 2004, Vol 389(5): 461 [125]  
8. Chirurgische Forschungstage, Mannheim, October 28-30, 2004