

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt,
Ludwig-Maximilians-Universität zu München,
Labor für experimentelle Chirurgie und regenerative Medizin (Experimed)
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler

**Experimentelle Untersuchung zur Zytotoxizität chitosanbasierter
Hartgewebekleber *in vitro***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

vorgelegt von

Nicole Sedlmayr
aus Itzehoe

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Hans Martin Schardey

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Elias Volkmer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	6
1.1. Anforderungen an medizinische Klebstoffe	6
1.2. Allgemeiner historischer Rückblick.....	9
1.3. Synthetische Klebstoffe.....	10
1.3.1. Epoxidharze	10
1.3.2. Polyurethane.....	10
1.3.3. Cyanoacrylate	11
1.3.4. Polymethylmethacrylate (PMMA).....	12
1.4. Biologische Klebstoffe	13
1.4.1. Gelatin-Resorcin-Aldehyde	14
1.4.2. Protein-Aldehyd-Systeme	14
1.4.3. Fibrine.....	15
1.5. Projektgliederung	16
1.5.1. Entwicklung eines bioresorbierbaren Klebstoffes.....	16
1.5.2. Biomechanische Untersuchungen	18
1.5.3. Ziel des Projekts	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Zellkultur.....	21
2.1.1. Zellen und Medien	21
2.1.1.1. Kultivieren der Zellen	24
2.1.1.2. Kryokonservieren der Zellen.....	25
2.1.1.3. Auftauen der Zellen	25
2.2. Kleberkomponenten	26
2.2.1. Herstellung des Klebers	27

2.2.2. Herstellung der Eluate	29
2.2.3. Herstellung der kleberbeschichteten Glasplättchen	29
2.3. Methoden der Auswertung	30
2.3.1. Zellzahlbestimmung	30
2.3.2. Metabolische Zellaktivität WST-I-Assay	32
2.3.3. Zellvitalität – „Live/Dead Assay“ mittels Flouresceindiacetat und Propidiumjodid	34
2.3.4. Statistische Auswertung	35
2.4. Versuchsaufbau	35
2.4.1. Versuchsprinzip A	35
2.4.2. Versuchsprinzip B, Vorversuche	37
2.4.3. Versuchsprinzip B, Hauptversuche	39
2.5. Geräte, Material und Reagenzien	42
3. Ergebnisse	45
3.1. Versuchsprinzip A	45
3.1.1. Eluat-Testung	45
3.1.2. Direkte Klebstoff-Testung	46
3.1.3. Testung der Einzelkomponenten	47
3.2. Versuchsprinzip B	48
3.2.1. Evaluation verschiedener Trocknungszeiten	48
3.2.2. Eluat-Testung	50
3.2.3. Direkte Klebstoff-Testung	51
3.2.4. Testung kleberbeschichteter Glasplättchen	55
4. Diskussion	60
4.1. Klebstoffproben	61

4.2. Versuchsaufbau	64
4.3. Ergebnisse	66
4.4. Ausblick.....	68
5. Zusammenfassung.....	71
5.1. Einleitung	71
5.2. Material und Methoden.....	71
5.3. Ergebnisse	72
5.4. Diskussion.....	73
6. Literaturverzeichnis	75
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	83
Danksagung	85
Lebenslauf.....	86
Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit	87

1. Einleitung

Die Behandlung von Knochenbrüchen mit Hilfe eines bioresorbierbaren Klebstoffes ist eine theoretisch sehr attraktive Methode. Ein Knochenklebstoff könnte Knochenfragmente schnell und flächig verbinden, so dass eine gleichmäßig belastete Kraftverteilung resultierte. Dies würde zum Einen aus biomechanischer Sicht die Frakturheilung begünstigen, da eine punktuelle Belastung der Frakturstelle verhindert würde. Zum Anderen könnten die üblichen Osteosyntheseverfahren umgangen werden, was wiederum eine wesentlich geringere zusätzliche Gewebetraumatisierung zur Folge hätte (Wenz 1998). Eine Klebung würde sich besonders für eine Behandlung von Mehrfragment- und Trümmerfrakturen eignen, da hier viele kleine Fragmente vorliegen, welche mit konventionellen Osteosynthesematerialien nicht gefasst werden können.

Seit langer Zeit wird versucht, verschiedene adhäsive Substanzen sowohl auf biologischer als auch auf synthetischer Basis herzustellen (Bloch 1958, Donkerwolcke et al. 1998). Jedoch ist es bisher nicht gelungen einen klinisch einsetzfähigen Knochenklebstoff zu entwickeln, der alle Anforderungen erfüllt, welche an einen Knochenklebstoff gestellt werden (Donkerwolcke et al. 1998, Otani et al. 1998a und 1999, Tseng et al. 1990).

1.1. Anforderungen an medizinische Klebstoffe

Laut der DIN Norm 16920 ist ein Klebstoff ein nichtmetallischer Werkstoff, der Körper durch Adhäsion und Kohäsion verbindet, ohne dass sich das Gefüge der Körper wesentlich ändert. Adhäsion beschreibt dabei die Verbindung zweier

unterschiedlicher oder gleicher Stoffe durch molekulare Anziehung, wie Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindungen. Kohäsion hingegen beschreibt die intramolekulare Vernetzung zwischen den Atomen oder Molekülen eines Stoffes, vergleichbar mit einem molekularen „Klettverschluss“ (Tipler 2004).

Ein Klebstoff, der im menschlichen Körper angewendet werden soll, muss gewisse Voraussetzungen erfüllen, um eine maximale Klebeleistung bei möglichst geringen Zellverlusten zu gewährleisten. Der wohl wichtigste Punkt ist, dass der Klebstoff weder lokal noch systemisch toxisch ist. Proliferation, Regeneration sowie das Remodeling der den Kleber umgebenden Zellen dürfen nicht beeinflusst werden (Rietz 1964, Donkerwolcke et al. 1998). Weiterhin soll der Kleber biodegradierbar und bioresorbierbar sein, um eine endogene Knochenheilung zu ermöglichen. Gleichzeitig muss ein Knochenkleber eine sofortige funktionelle Beanspruchbarkeit besitzen, um eine frühfunktionelle Beübung der Extremität durchführen zu können. Er muss so lange beständig bleiben, bis die Stabilität des Knochens und die Regeneration des geschädigten Gewebes wieder hergestellt ist (Beck 1966, Donkerwolcke et al. 1998; Hwang and Strupp 2000, Heiss and Schnettler 2003). Der Klebstoff darf keine hohen Temperaturen bei der Polymerisation entwickeln (Smith DC 1973), da es sonst zu Nekrosen im angrenzenden Gewebe kommen kann. Trotzdem muss er jedoch eine schnell erzielte, hohe Klebkraft *in vivo* gefordert werden, um Operationszeiten nicht unnötig zu verlängern und um eine suffiziente initiale Stabilität zu gewährleisten (Mayer et al. 1979). Diese wird durch eine hohe Kohäsionskraft und gute chemische Bindung zum Gewebe gegeben (Beck 1966, Brauer and Lee 1989b, Montanaro et al. 2000). Ein Einsatz *in vivo* setzt voraus, dass der Kleber in feuchtem Milieu, idealerweise auch Protein- oder Fettenthaltige Oberflächen zu verbinden vermag. Wichtig ist außerdem, dass der ausgehärtete

Klebstoff ein kleines Volumen und eine gewisse Elastizität (insbesondere Zug- und Scherelastizität) aufweist, damit er das umgebene Gewebe nicht einschränkt. Er sollte leicht herstellbar und applizierbar, sterilisierbar, lagerungsstabil und kostengünstig sein (Smith DC 1973, Weber and Chapman 1983, Otani et al. 1998 und 1999). Alles in allem sollte die ökonomische Komponente in der heutigen Zeit nicht vernachlässigt werden (Heiss and Schnettler 2003). Natürlich spielen auch weitere mechanische Anforderungen eine wichtige Rolle. Es gibt in der heutigen Zeit keinen Klebstoff, der eine annähernd gleiche Zugkraft wie Knochengewebe besitzt. Kortikale Knochen halten einen Zug von etwa 100 MPa, je nach Dichte, aus (McCalden et al. 1993). Für Spongiosa liegen diese Werte deutlich darunter bei etwa 5 MPa. Hier scheinen Zugfestigkeiten von 1-3 MPa auszureichen (Weber and Chapman 1983). Wenn der Klebstoff lediglich dazu dienen soll, kleinere Fragmente in Gelenken zu kleben, dann müssen die größeren jedoch auch weiterhin klassisch versorgt werden, um eine suffiziente Gesamtstabilisation zu gewährleisten. Die derzeit erhältlichen Klebstoffe liegen bei Zugfestigkeiten zwischen 0,42 MPa bei kortikalem Knochen und Fibrinkleber und bis 6,5 MPa bei Cyanoacrylaten (Giebel and Rimpler 1981, Brauer et al. 1979 und 1989b).

Die verschiedenen Versuche, Kleber für den Einsatz am Knochen zu entwickeln, scheiterten an den mannigfaltigen Anforderungen der operativen Orthopädie und Traumatologie. Insbesondere problematisch waren eine mangelnde Biokompatibilität, schlechte Handhabbarkeit oder zu geringe Klebstärke (Giebel and Rimpler 1981; Donkerwolcke et al. 1998; Otani et al. 1998a und 1999). Der folgende Abschnitt zeigt in Kürze einen allgemeinen historischen Rückblick über Klebesubstanzen und im Speziellen deren Entwicklung zum heutigen Stand der Gewebeklebstoffe.

1.2. Allgemeiner historischer Rückblick

Das Kleben bzw. Herstellen einer Klebung ist eine seit etwa 6000 Jahren verwendete Methode, um zwei Materialien miteinander zu verbinden (Pantel 2001). Aus Haut, Sehnen, Knorpel und Knochen von Tieren wurde schon 3000 v. Chr. ein Klebstoff auf Eiweißbasis hergestellt (Industrieverband Klebstoffe ev. 1998/2000). Um kleine Vögel zu fangen, verwendeten die Römer bis ins 19. Jahrhundert einen aus Mistelsaft gewonnenen Vogelleim. Des Weiteren wurden auch Klebstoffe zum Versiegeln von Gefäßen hergestellt. Auch hier bediente man sich in der Natur, in dem man Bitumen, Bienenwachs oder Pech benutzte (Donkerwolcke et al. 1998). 1791 wurde erstmals die adhäsive Kraft des Kautschuks (natürliches Gummi) entdeckt, jedoch wurde dadurch keine wesentliche Weiterentwicklung der auf natürlichen Rohstoffen basierenden Klebstoffe bis zum 20. Jahrhundert erreicht (Kort 1971, Smith DC 1973).

Der erste Knochenklebstoff wurde 1931 von Hedri beschrieben (Hedri 1931). Er mischte Kollagen mit Protein und nannte es Ossocol® (Giebel and Rimpler 1981). Hierbei wurde eine initiale Verbindungsstärke und eine knöcherne Heilung beschrieben, allerdings traten starke allergische Reaktionen auf, so dass der Klebstoff sehr schnell nicht mehr eingesetzt wurde (Hedri 1931). In der Folge fand das Thema Knochenklebstoffe erst etwa 30 Jahre später erneut Einzug in die Literatur. Die noch heute gültige Einteilung der Klebstoffe in synthetische und biologische Klebstoffe sei im Folgenden kurz erläutert.

1.3. Synthetische Klebstoffe

In diesem Kapitel werden exemplarisch die gängigsten synthetischen Klebstoffe vorgestellt und entwicklungsgeschichtlich abgehandelt.

1.3.1. Epoxidharze

Epoxidharze wurden erstmals 1958 von Bloch als Knochenklebstoff in Betracht gezogen (Bloch 1958). Die duroplastischen Kunstharze (Verbindung aus Epichlorhydrin und aromatischen Dihydroxyverbindungen) weckten das Interesse der Forscher, da sie bereits als Lacke, Gießharze und zum industriellen Kleben verwendet wurden. Die verschiedenen Experimente zeigten unter anderem, dass die Klebefestigkeit in trockenem Milieu bei 50% lag (was einer Frakturheilung von drei bis vier Wochen entspricht), jedoch in feuchtem Milieu auf etwa 14% sank (Giebel and Rimpler 1981). Die negativen Eigenschaften wie schlechte Haftung des Klebers am feuchten Knochen, die bindegewebige Umkapselung des Klebers, eine verzögerte Kallusbildung, Nekrosen durch die hohe Polymerisationshitze und Dislokation der geklebten Fragmente wurden 1964 von Rietz beschrieben (Rietz 1964). Aufgrund des Überwiegens an schlechten Eigenschaften finden Epoxidharze heutzutage kaum noch Verwendung in der Medizin.

1.3.2. Polyurethane

Auch die Polyurethane wurden in diesem Zeitraum entdeckt und entwickelt. Ostamer[®] beispielsweise ist ein schwammähnlicher Polyurethanhartschaum mit 7-10% Hohlraumbildung. Auch dieser synthetische Klebstoff hatte erhebliche Nachteile, wie etwa eine sehr hohe Polymerisationshitze (Rietz 1964; Hoyt 1969), sowie eine reduzierte Haftkraft in feuchtem Milieu (Giebel and Rimpler 1981). Ferner

traten Wundheilungsstörungen und Infektionen mit Dehiszenzen auf (Buchner et al. 1962; Heiss und Schnettler 2003). Ostamer[®] erwies sich insgesamt als wachstumshemmend, toxisch und nicht resorbierbar, weshalb die Entwicklung nach 1964 nicht weitergeführt wurde (Buchner 1961; Leemann et al. 1961).

Zusammenfassend lassen sich synthetische Klebstoffe als Klebstoffe mit hoher Festigkeit, einfacher Handhabbarkeit und kostengünstigerer Herstellung als biologische Klebstoffe beschreiben. Nachteile sind die fehlende Resorbierbarkeit und die fehlende Möglichkeit des Organismus ein Remodelling durchführen zu können.

1.3.3. Cyanoacrylate

Die Kunststoffindustrie stellte mit ihren Entwicklungen die Basis für klinisch einsetzbare Klebstoffe dar. Cyanoacrylat, der als Sekundenkleber in der Industrie im Einsatz ist, wurde auch zur schnellen und schmerzlosen Wund- und Gewebeversorgung eingesetzt (Matsumoto 1968; Schmeissner 1970; Weber and Chapman 1983). Die gute Klebkraft von Cyanoacrylaten wurde erstmals 1959 von Coover beschrieben (Coover et al. 1959). Die monomeren Flüssigkeiten reagieren bei Kontakt mit Wassermolekülen zu Polymeren und weisen eine ähnlich starke Haftkraft wie handelsübliche Sekundenkleber auf (Brug et al. 1976). Verschiedene Ester der Acrylsäure und kalthärtende Einzelkomponenten bilden die Grundlage dieser relativ toxischen Substanzen. Je höher die Zahl der C-Atome der Alkylreste ist, desto toxischer, aber auch elastischer wird der Klebstoff, weil die Klebfestigkeit abfällt und die Polymerisationszeit ansteigt (Giebel and Rimpler 1981). Cyanoacrylate wurden ebenfalls als Hämostatika diskutiert, da sie die Gerinnungszeit des Blutes (partielle Thromboplastinzeit PTT) verkürzen (Montanaro et al. 2000). Ein Problem stellten allerdings die hohen Infektionsraten, Dislokation der geklebten

Komponenten, Fremdkörper- und lokale Gewebereaktionen dar. Besonders nachteilig in diesem Zusammenhang ist die Gewebetoxizität (Koehnlein and Lemperle 1969; Giebel and Rimpler 1981; Weber and Chapman 1983) sowie die für den Kleber Biobond® gezeigte Kanzerogenität. Biobond® ist ein in Europa vermarkteter Ethylcyanoacrylatkleber, der mit Polyisocyanat und Nitritgummi gemischt wird. Die Ursache der pathologischen Reaktionen erklärte sich durch die toxischen Abbauprodukte (Zyanessigsäure und Formaldehyd) des Klebers, welche in direktem Kontakt zellunverträglich und wachstumshemmend wirken (Tseng et al. 1990; Montanaro et al. 2000).

In der Chirurgie konnten nur n-Butyl- und n-Octylester (Bucrylat) eingesetzt werden, da sie die geringste Toxizität aufwiesen. Jedoch führten die reichlichen negativen Reaktionen schließlich dazu, dass die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA (Food and Drug Administration) alle Cyanoacrylate zur inneren Anwendung am menschlichen Körper verbot. Cyanoacrylate werden jedoch auch zukünftig als äußerliche chirurgische Naht eingesetzt, (zB. Dermabond) (Jallali et al. 2004). Wenngleich der Einsatz als Knochenklebstoff immer wieder diskutiert wird, muss festgestellt werden, dass sich Cyanoacrylate aufgrund der fehlenden Biokompatibilität und Bioabbaubarkeit für das Kleben von Knochen nicht eignen, da die endogene Knochenheilung letztlich verhindert wird (Maurer et al. 2004).

1.3.4. Polymethylmethacrylate (PMMA)

Ein weiterer potenzieller synthetischer Klebstoff ist das Polymethylmethacrylat (PMMA). Bekannt geworden ist es 1901 durch die Dissertation von Otto Röhm. 1933 erschien es erstmals unter dem Namen Plexiglas (www.plexiglas.de). Die Polymerisation des monomeren Methacrylsäuremethylesters führt zu diesem säure-

und laugebeständigen, gut bearbeitbaren Produkt. Erstmals wurde es in der Zahnheilkunde für die Herstellung von Prothesen eingesetzt. In der Orthopädie benutzte Charnley 1965 PMMA erstmals zur Verankerung einer Hüftprothese (Charnley 1960). Die Verträglichkeit dieses Materials in Bezug auf reaktive Erscheinungen und Gewebefreundlichkeit wurden hinreichend erforscht (Hullinger 1962). Interessanterweise wurden trotz der hohen Polymerisationshitze (Charnley 1960), der Toxizität der Mono- und Polymere sowie der Entzündung des umliegenden Gewebes (Zysk et al. 2004) weitere Experimente am Tiermodell durchgeführt. PMMA härtet innerhalb von 12-15 min aus und erreicht binnen Kürze eine extreme Festigkeit. Mangels besserer Alternativen hat sich PMMA weltweit zur Verankerung von Prothesen durchgesetzt. Bei Klebungen an langen Röhrenknochen und der Wirbelsäule traten jedoch Dislokationen und Fremdkörperreaktionen auf, weshalb PMMA nur noch in Einzelfällen als Knochenkleber eingesetzt wird (Kühn 2001; Smith DC 1973).

1.4. Biologische Klebstoffe

Ein biologischer Klebstoff hat gegenüber einem Synthetischen den Vorteil, dass er körpereigen bzw. körperähnlich ist. Durch diese Eigenschaft sind diese Klebstoffe bioverträglich und bioresorbierbar. Im Bereich der biologischen Klebstoffe ist die Forschung nicht weniger aktiv. Es liegen mittlerweile eine Vielzahl von biologischen Klebstoffen vor. Allerdings hat sich bislang keine der Substanzen als Knochenklebstoff durchgesetzt. Die wichtigsten zur Zeit im Gebrauch befindlichen Klebstoffe sollen an dieser Stelle vorgestellt werden.

1.4.1. Gelatin-Resorcin-Aldehyde

Der in der konventionellen Technik in der Chirurgie (chirurgische Naht) verwendete Gelatin-Resorcin-Aldehyd-Klebstoff (GRF-Klebstoff) wurde 1966 in den USA entwickelt. Der Klebstoff entsteht durch Reaktion von Resorcin und Formaldehyd unter Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerkes. Die Gelatine als Protein dient dabei als Füllmaterial. Er wurde vor allem bei der Therapie parenchymer Organe, als Hautkleber und für die Klebung von Gefäßen eingesetzt (Sung et al. 1998). Aufgrund der aufwendigen Herstellung und der Toxizität konnte der potenzielle Knochenklebstoff keine Verwendung am Knochen finden (Giebel and Rimpler 1981). Allerdings wurde er durch Ersetzen des Formaldehyds mit mindertoxischem Dialdehyd (Glutaraldehyd, Glyoxal) besser verträglich und hat damit heutzutage in der Rekonstruktion von insuffizienten Aortenklappen und Behandlung von Aortendissektionen einen gewissen Stellenwert erlangt (Ennker 1994).

1.4.2. Protein-Aldehyd-Systeme

Protein-Aldehyd-Systeme nutzen die Proteine nicht, wie bei den GRF-Klebstoffen, als Füllmaterial, sondern direkt als reaktive, vernetzbare Komponenten (Schnabelrauch et al. 1999). Aldehydgruppen reagieren hierbei mit den Aminogruppen des Klebstoffes. Unter dem Namen BioGlue[®] wurde ein derartiger Klebstoff 1998 erstmals zur Unterstützung der chirurgischen Naht und auch bei der Behandlung von Aortendissektionen von der FDA zugelassen. Als Knochenklebstoff wurde es jedoch nicht erprobt.

1.4.3. Fibrine

Fibrinklebstoffe werden seit den 70er Jahren verwendet und stellen gegenwärtig den am weitesten verbreiteten medizinischen Klebstoff dar (Kort 1971; Smith DC 1973). Dank der darin verwendeten körpereigenen Substanzen ist dieser Klebstoff hervorragend verträglich. Allerdings birgt er das Risiko der Übertragung von Viruserkrankungen wie Hepatitis oder HIV. Der Klebstoff wird vom Körper in wenigen Tagen abgebaut, was gegen eine Anwendung im Knochenbereich spricht, da gebrochener Knochen mehrere Wochen heilen muss, um eine ausreichende Stabilität vorzuweisen. Daher wäre ein Klebstoff, welcher nach einigen Tagen abgebaut ist, nicht praktikabel (Giebel and Rimpler 1981). Für Haut oder parenchymatöse Organe ist diese Eigenschaft jedoch von Vorteil. Fibrinklebstoffe bergen den Vorzug, dass sie deutlich besser in feuchtem Milieu haften als alle oben vorgestellten biologischen Klebesysteme. Die geringe Polymerisationshitze und die günstige Abbindezeit im Vergleich zu Epoxidharzen und Cyanoacrylatklebern ist ebenfalls günstig. Heutzutage werden Fibrinklebstoffe ebenfalls zur Unterstützung der chirurgischen Naht oder auch als Primärnaht an wenig beanspruchten Flächen verwendet.

Da Knochenklebstoffe ein weites Indikationsspektrum besitzen, wird deren Erforschung und Entwicklung weiterhin einen wichtigen Bestandteil der experimentellen Forschung darstellen. In der Traumatologie und operativen Orthopädie fänden die Klebstoffe eine wichtige Aufgabe im Fixieren von kleinen Fragmenten bei Trümmerbrüchen oder in belastungsarmen Bereichen, wie die der oberen Extremität. Operationen, wie Entfernung der Osteosynthesematerialien würden entfallen und somit auch die Risiken des Zweiteingriffs. Die Aufenthaltsdauer des Patienten im Krankenhaus könnte eventuell verkürzt werden. Auch als

Medikamententräger, wie der schon heute verwendete antibiotikahaltige Knochenzement, könnte der Klebstoff verwendet werden, um bakterielle Infektionen zu verhindern oder zu behandeln. Ebenso könnte der Klebstoff in der Neurochirurgie (bei Trepanationsdefektverschluss oder Schädeldeckenplastik) oder auch der Dentalchirurgie (bei Zahnfrakturen oder Refixation von Zahnfragmenten) Anwendung finden.

1.5. Projektgliederung

Diese Arbeit ist im Rahmen einer Kooperation zwischen dem Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth (www.fbi-biomaterialien.de), dem Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm (www.biomechanics.de) und der Experimentellen Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt in München (www.experimed.de) entstanden.

1.5.1. Entwicklung eines bioresorbierbaren Klebstoffes

Die materialwissenschaftliche und chemische Entwicklung des Klebstoffes wurde vom Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth übernommen. Hier wurden die Grundmaterialien ausgewählt und hin zu anwendbaren Kleberkomponenten verändert. Außerdem wurden Screening-Versuche zur Haftkraft des Klebers an Modelloberflächen durchgeführt, um eine Auswahl geeigneter Klebstoffe für weiterführende Funktionalitätsprüfungen treffen zu können (Hoffmann et al. 2009).

Bei der Kleberentwicklung wurden Polysaccharide (Glykane) als Grundmaterialien eingesetzt, da sie eine Unterklasse der Kohlehydrate darstellen, welche wichtige Energieträger des menschlichen Körpers sind. Aufgrund der chemischen Struktur

kann man davon ausgehen, dass diese Materialien bioresorbierbar, nicht-toxisch und dank der pflanzlichen Herkunft nicht infektiös sind. Der Klebeeffekt beruht auf einer chemischen Reaktion, der sogenannten Imin-Bildung (auch als Schiff'sche Base bezeichnet). Hierbei reagieren Aldehydgruppen des Klebers mit Aminogruppen des (Knochen-) gewebes, bzw. mit Aminogruppen des Klebers selbst (vgl. Abb.1).

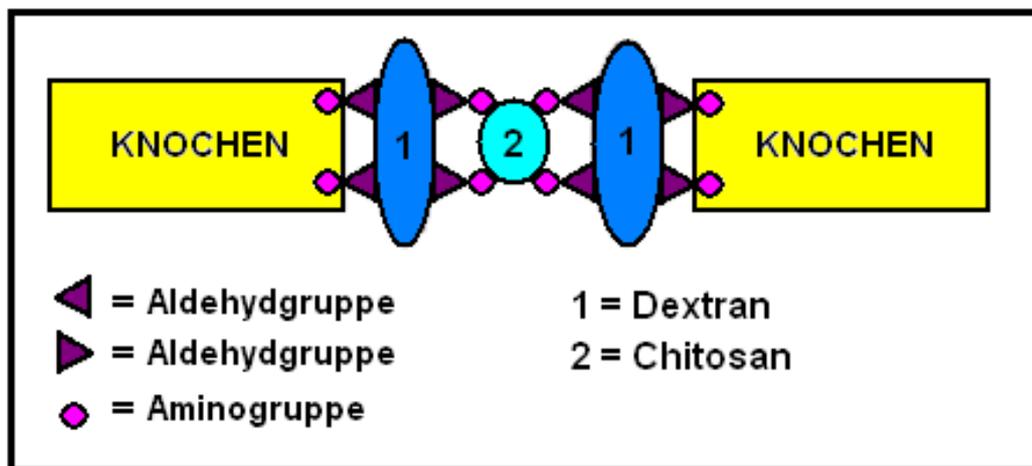


Abbildung 1: Prinzip des Klebevorganges

Als Träger der Aminogruppen wurde Chitosan ausgewählt, da es ein natürliches biodegradierbares Polymer ist, welches physiologischerweise bereits viele Aminogruppen trägt. Es entsteht durch Deacetylierung von Chitin. Entdeckt wurde das Biopolymer 1859 von Rouget, der es durch Kochen von Chitin mit Kalilauge herstellte. Es kommt in der Zellwand diverser Pilze, wie Zygomyceten, Austernpilzen und Champignons vor. Eine Toxizität ist nicht nachgewiesen und seine antibakteriellen und hämostatischen Eigenschaften (Fu et al. 2005, Liu et al. 2004) machen Chitosan zu einem guten Grundbaustoff in der Klebstoffentwicklung. Aber auch in anderen Bereichen ist Chitosan verwendbar. Heutzutage wird es als Filtermaterial in Wasseraufbereitungsanlagen oder als Ausgangsmaterial für Schaumstoffe und Folien verwendet.

Als Träger der Aldehydgruppen wurden Stärke, Dextran, Cellulose und Alginsäure eingesetzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nur Dextran verwendet, da es in den mechanischen Untersuchungen die stärkste Klebkraft zeigte (vgl. Tabelle 1). Dextran ist ein aus α -(1,6)-verknüpften Glucoseeinheiten bestehendes Biopolysaccharid. Bakterien (Milchsäurebakterien) produzieren es extrazellulär aus Saccharose (Taylor et al. 1984). Es enthält zwischen 50 und 97% α -(1,6)-Verknüpfungen. Da es durch Dextranase (α -1-Glycosidase) im menschlichen Organismus, besonders Niere, Leber und Milz, abgebaut wird ist es physiologisch unbedenklich und interessant für medizinische Zwecke. Außerhalb der Medizin wird es unter anderem verwendet bei Anstrichmitteln, Filmen und Kosmetika. Das hier eingesetzte Dextran wurde vor Versuchsbeginn derart modifiziert, dass es einerseits wasserlöslich ist und andererseits ausreichend viele reaktive Aldehydgruppen besitzt (Taylor et al. 1984).

1.5.2. Biomechanische Untersuchungen

Die biomechanischen Untersuchungen wurden vom Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm übernommen. Es wurden standardisierte Zugfestigkeitsuntersuchungen durchgeführt, mit denen die maximale Klebfestigkeit verschiedener Kleberkombinationen auf Knochenproben getestet werden konnte. Insgesamt wurden 120 Kortikalisproben hergestellt (40x8x8 mm) und entweder sequentiell mit je einer Kleberkomponente, oder mit vorgemischtem Kleber bestrichen. Anschließend wurden sie bis zur Testung entweder im trockenen oder feuchten Milieu belassen. Tabelle 1 zeigt exemplarisch einige Ergebnisse dieser mechanischen Tests (Tittel 2005). Die Haftfestigkeit von 1 N/mm² entspricht dabei 1.000.000 Pa.

Chitosan	Komponente 2	Auftragung	Milieu	N	N/mm²
24h, 7%	Ox. Stärke + L-Dopa 24h 20%	sequentiell	nass	1	0,02
24h, 7%	Ox. Dextran 24h+ L-Dopa1,5h 20%	sequentiell	nass	45	0,91
24h, 7%	Ox. Dextran 24h 20%	sequentiell	trocken	>50	>1,1
24h, 7%	Ox. Stärke + L-Dopa 24h 20%	sequentiell	trocken	0,8	0,02
24h, 7%	Ox. Dextran 20%	sequentiell	nass	32	0,66

Tabelle 1: Darstellung der auf Haftkraft (N) und Haftfestigkeit (N/mm²) getesteten Kleber Dargestellt ist ein Auszug einiger Kleberkomponenten in Ihrem Mischungsverhältnis, Ihre Auftragung, das umgebene Milieu, sowie Haftkraft und Haftfestigkeit bei Zug.

Der Ausschnitt der Tabelle zeigt, dass eine Verbindung des 7%igen Chitosans 24h mit 20%igem oxidiertem Dextran 24h die stärkste Haftkraft besitzt. Die Chitosan- und Dextranverbindungen wurden je aus der pulverisierten Komponente (Chitosan 24h, 20% oder oxidiertes Dextran 24h, 20%) mit Aqua bidestillata hergestellt, so dass eine gelartige Substanz entstand, welche für die Testzwecke pipettierbar war.

1.5.3. Ziel des Projekts

Das Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik hatte den folgenden Kleber als besonders haftstark identifiziert.

Kleber D: Chitosan 24h, 7% + ox. Dextran 24h, 20%

Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob der Klebstoff in die Vitalität und Kommunikation der Zellen eingreift. Hierzu wurden Prüfungsmethoden für Zellvitalität, Zellproliferation und Morphologie in Anlehnung an die ISO 10993-5 und ISO 10993-12 entwickelt und durchgeführt (ISO 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits vorliegende Ergebnisse interpretiert, Testverfahren verglichen, angepasst und erweitert. Die Zellen sollten unter möglichst physiologischen Bedingungen mit reellen Klebermengen inkubiert und die Vitalität, das Wachstum, die Morphologie und das Verhalten der Zellen untersucht werden. Die Versuche wurden im Labor für experimentelle Chirurgie und regenerative Forschung (Experimed) der chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt der LMU in München durchgeführt. Sie sollen als Screening-Versuche für die Testung eines geeigneten Klebers im Tiermodell dienen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zellen und Medien

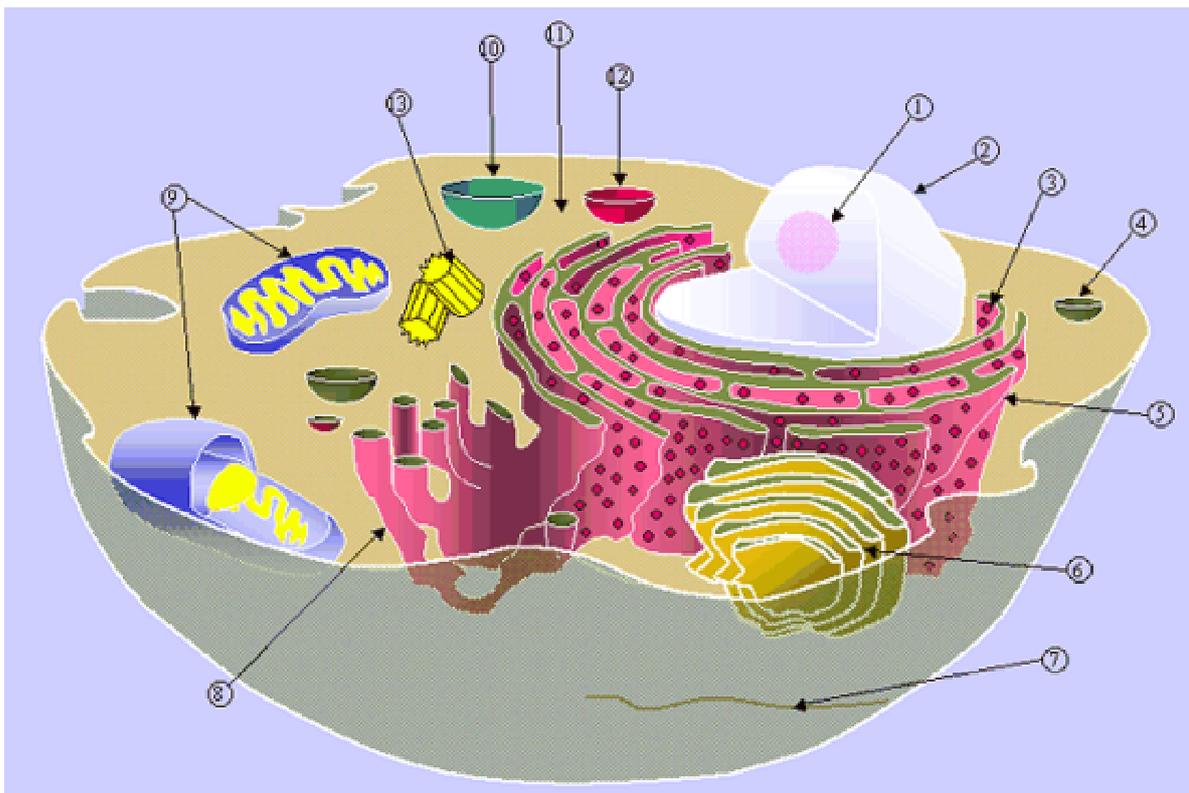


Abbildung 2: Aufbau einer eukaryoten Zelle

1. Nukleolus; 2. Zellkern (Nukleus); 3. Ribosomen; 4. Vesikel; 5. Raues Endoplasmatisches Reticulum (ER); 6. Golgi-Apparat; 7. Mikrotubuli; 8. Glattes ER; 9. Mitochondrien; 10. Lysosom; 11. Zytoplasma; 12. Mikrobodies; 13. Zentriolen (Quelle: www.wikipedia.de)

Jede Zelle stellt ein eigenständiges, selbsterhaltenes System dar, in dem sie in der Lage ist, aus aufgenommenen Nährstoffen die Energie bereitzustellen, die sie für ihre vielfältigen Funktionen braucht. Sie ist durch Ihre Organellen in der Lage, sich zu vermehren (Mitose und Meiose), auf Reize zu reagieren, sich zu bewegen und mit

anderen Zellen zu kommunizieren. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um etablierte mesenchymale Mausfibroblasten (MC3T3-E1), welche von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben wurden (Sudo et al. 1983). Die ursprünglich aus Japan stammende Zelllinie (RIKEN Cell Bank (RCB1126), Tsubuka Science City, Ibaraki, Japan) wird aus dem knöchernen Schädeldach der Föten der C57BL/6 Maus gewonnen und mittels verschiedener maustypischer Oberflächenantigene spezifiziert. Für *in vitro* Testungen von Knochenkleber sind MC3T3-E1 Zellen gut geeignet, da sie ihre Zellzahl innerhalb von 2-3 Tagen verdoppeln, osteoblastenähnlich sind und adhärent als Monolayer wachsen. Es werden weitere Eigenschaften wie Differenzierung zu osteoblastären Zellen und Kollagensynthese beschrieben (Sudo et al. 1996). Ausserdem sind sie kostengünstig und sehr robust. Untersucht wurden bei uns die Besiedlungsdichte und Morphologie der Zellen. Die Mikrofilamente, die an Zellteilung, Formänderungen, Bewegungen und Ausbildung von Haftpunkten der Zelle am Untergrund beteiligt sind (Rensing et al. 1998, Adler 1998), bestimmen den morphologischen Typus der Zellen. Die Anzahl und Länge der Zellausläufer lässt Rückschlüsse auf das Adhäsionsvermögen zum Substrat zu. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich viele Zell-Zell-Kontakte ausbilden, steigt mit Zunahme gerichteter Ausläufer. Bei einer gesunden Zelle ist die Strukturierung des Zytoplasmas gut zu erkennen, d.h. der innere, dünnflüssigere Bereich mit seinen Organellen (Endoplasma) lässt sich deutlich vom gelartigen Ektoplasma abgrenzen.

Am Beispiel der Tritonverdünnungsreihe (Kap. 2.4.2: Versuchsprinzip B, Vorversuche) sei die Morphologie der Zellen dargestellt. Hierzu wurden 50.000 Zellen in Kultivierungsplatten ausgesät und mit verschiedenen Verdünnungen von TritonX-100 beimpft. Nach 24-stündiger Inkubation wurden sie unter dem

Lichtmikroskop fotografiert. Abb. 3a zeigt die Zellen in ihrer natürlichen Form, eingebettet in Kulturmedium, welches alle wichtigen Nährstoffe enthält. Die Zellen zeigen viele Ausläufer, welche in die Richtung der anderen Zellen zeigen. Die Struktur der Zelle ist gut zu erkennen und die Zellen liegen adhärent dem Untergrund an. In Abbildung 3b bis d ist deutlich zu sehen, dass die Zahl der Zellausläufer mit steigender TritonX-100 Konzentration abnimmt und die Zellen eine nichtphysiologische Form mit abgerundetem und verdichtetem Zellkörper haben. Abbildung 3d zeigt zwar noch Zellausläufer, diese sind jedoch nicht in der Lage den Zellen Kommunikation zu ermöglichen, da sie nur noch Überreste der ehemals vitalen Zellen sind.

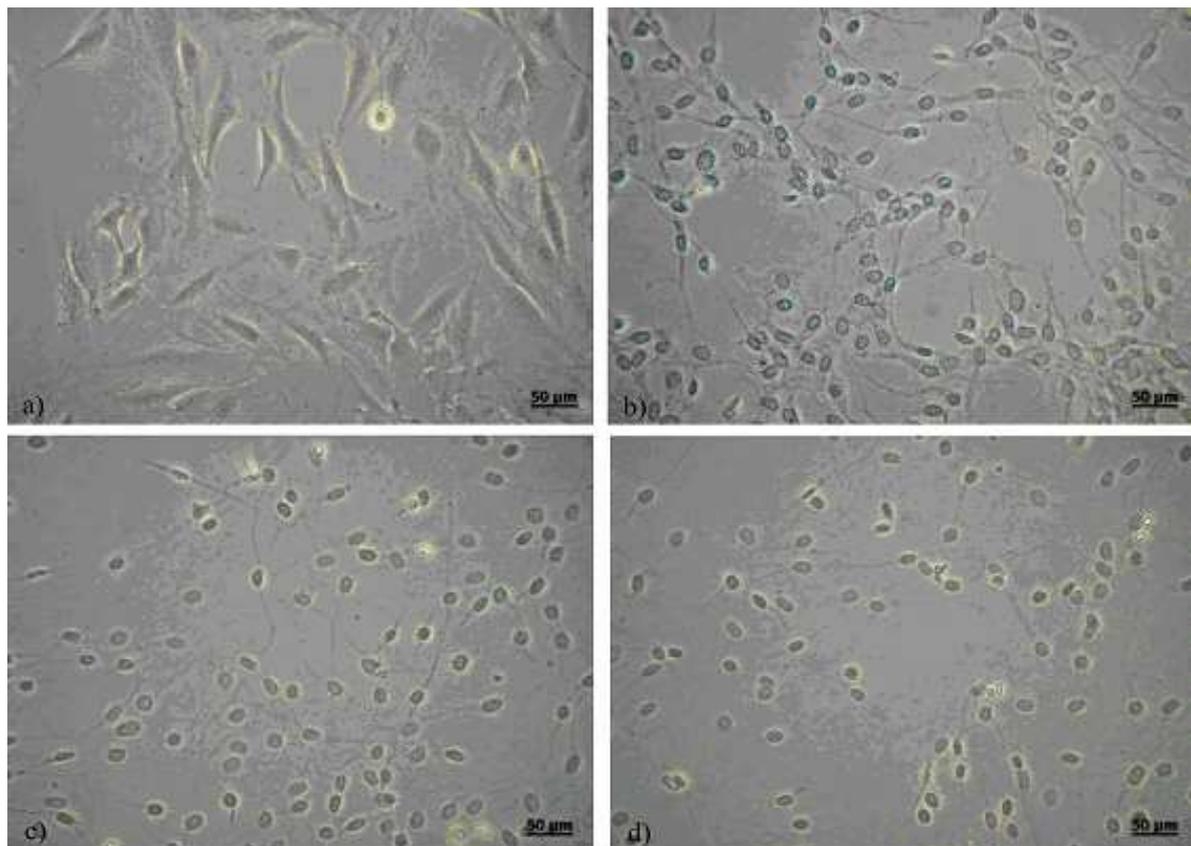


Abbildung 3: Zellmorphologie in mikroskopischen Bildern

MC3T3-E1 in a: Verbindung mit Kulturmedium b: TritonX-100 (0,1%) c: TritonX-100 (0,5%) d: TritonX-100 (1%). Ausgesät wurden 50.000 Zellen, Inkubationszeit keine, Vergrößerung 20-fach

2.1.1.1. Kultivieren der Zellen

Die Zellen werden in einem eigens angesetzten Medium kultiviert. Dieses enthält 89,6% alpha-MEM mit Glutamax I (Fa. Gibco, Karlsruhe, D), 10% FBS (fetal bovine serum; Fa. Sigma-Aldrich, München, D) und 0,4% Penicillin/Streptomycin (ca. 40 IU; Fa. Gibco, Carlsbad, USA), was den Richtlinien der Isonorm für Zellkultur entspricht (ISO 1998). Die Zellen werden bei 37°C, in 5%iger C O₂-Atmosphäre und bei ca. 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gehalten. Zum Kultivieren werden ca. 5×10^5 Zellen und ca. 10 ml Kulturmedium in je einer T75-Flasche (Fa. Nunc, Wiesbaden, D) angesetzt und regelmäßig alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. Ist eine 80-90%ige Konfluenz der Zellen erreicht erfolgt die Passagierung. Dazu wird das Medium mit einer Vakuumpumpe und Glas-Pasteur Pipetten abgesaugt und die Zellen durch mehrmaliges Spülen mit ca. 3ml PBS (phosphate buffered saline; Fa. IPAA Laboratories, Pasching, A) gereinigt. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe von 2ml 0,5%igem Trypsin (Fa. GibcoBRL life technologies, Carlsbad, USA) in 5,3 mM Na-EDTA vom Boden der T75-Flasche gelöst. Dies geschieht innerhalb von 5 Minuten und wird durch zwischenzeitige Lagerung im Brutschrank verbessert. Unter dem Lichtmikroskop wird der Erfolg der Ablösung beobachtet. Ist diese vollständig werden die Zellen sofort in Medium aufgenommen, mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und bei Bedarf weiterkultiviert oder für Experimente ausgesät. Alle Lösungen und Medien sind vor der Anwendung in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt worden (Ausnahme: PBS, welches bei Raumtemperatur gelagert wird). Alle Arbeitsschritte sind unter sterilen Bedingungen durchgeführt worden. Alle im Folgenden beschriebenen Experimente werden mit Zellen durchgeführt, welche die 18. Passage nicht überschritten haben.

2.1.1.2. Kryokonservieren der Zellen

Unter Kryokonservierung versteht man das Aufbewahren von lebenden Zellen durch Einfrieren. Das hierbei verwendete Medium wird Kryomedium genannt und besteht aus 70% alpha-MEM mit Glutamax I (Fa. Gibco, Karlsruhe, D), 20% FBS (fetal bovine serum; Fa. Sigma-Aldrich, München, D) und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid; Fa. Sigma-Aldrich, München, D). Zur Herstellung werden die verschiedenen Komponenten in einem Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg, D) gemischt und anschließend sterilfiltriert. 1×10^6 bis 2×10^6 Zellen werden in 2 ml Kryomedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Das Einfrierprocedere beginnt mit einer Lagerung der Kryoröhrchen für 2 Stunden bei -20°C , dann über Nacht bei -80°C . Am darauffolgenden Tag findet die Umlagerung in den flüssigen Stickstoff statt. Hier können die Zellen über Jahre gelagert werden ohne Schaden zu nehmen.

2.1.1.3. Auftauen der Zellen

Die Zellen werden in Kryomedium in flüssigem Stickstoff gelagert. Um sie aufzutauen wird das Kryoröhrchen vorsichtig dem Tank entnommen und in einem 37°C warmen Wasserbad so lange geschwenkt, bis die Zellen vollständig aufgetaut sind. Nach Aufnahme in 5 ml Medium werden sie bei 200G für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit Hilfe von Glas-Pasteur Pipetten und einer Vakuumpumpe abgesaugt und anschließend das Sediment in 8 ml Medium resuspendiert. Die Suspension wird gleichmäßig auf vier T75 ($=75 \text{ cm}^2$) Kultivierungsflaschen (Fa. Nunc, Wiesbaden, D) verteilt und es werden je 8 ml Medium hinzugegeben, bevor die Flaschen zur Kultivierung bei 37°C und 5% CO_2 in den Brutschrank gestellt werden.

2.2. Kleberkomponenten

Die Bereitstellung des Hartgewebeklebers erfolgte durch das Friedrich-Baur-Forschungsinstitut für Biomaterialien in Bayreuth. Es handelt sich um einen Zweikomponentenkleber, wobei die erste Komponente mit reichlich Aminosäureresten ($R-NH_2$) versehen ist, während die zweite vermehrt Aldehydgruppen ($R-CH=O$) enthält. Bei Kontakt der beiden Gruppen in wässriger Lösung bildet sich innerhalb weniger Sekunden eine kovalente Bindung aus, welche Schiff'sche Base oder Imin genannt wird. Die Reaktion wurde nach dem deutschen Chemiker Hugo Schiff benannt und beschreibt die Kondensationsreaktion von Aldehyden (oder Ketonen) mit Aminen.

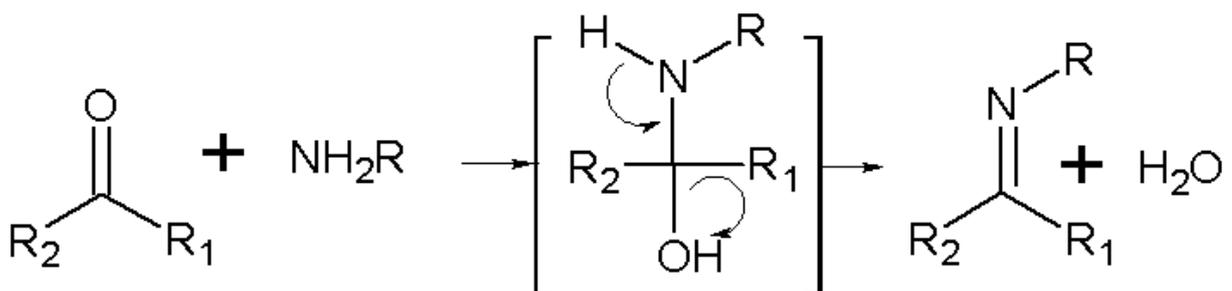


Abbildung 4: Ausbildung einer Schiff'schen Base

Es standen mehrere Polysaccharidkomponenten zur Verfügung, die sich durch ihre Strukturformel und somit auch in der Funktionalität unterschieden.

Die Wahl für Kleber D ergab sich aus den mechanischen Tests des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm unter der Leitung von Prof. Dr. L. Claes, in denen Kleber D die stärkste Klebkraft bewies ($>1,1 \text{ N/mm}^2$ in trockenem Milieu, vgl. Tabelle 1). Kleber D enthält eine Kombination aus Chitosan 24h, 7% mit oxidiertem Dextran 24h, 20%. Chitosan 24h, 7% entstand in vielen

Schritten durch Erhitzung in Argon Atmosphäre, Dialyse und Gefriertrocknung aus „Low Chitosan“ (Chitosan mit einem Molekulargewicht von 1,5g). Dextran 24h, 20% wurde durch Oxidation, Dialyse und ebenfalls Gefriertrocknung aus niedermolekularem Dextran hergestellt. Eine bessere Klebkraft in nassem Milieu erreichte zwar die Kombination aus Chitosan 24h – 7% und ox. Dextran+L-Dopa – 20%, jedoch kam es in Versuchen mit L-Dopa zu einem Ausflocken der Komponenten, wodurch ein gleichmäßiges Auftragen unmöglich gemacht wurde. Oftmals kam es sogar zu einem Versagen der Klebewirkung (Tittel 2005).

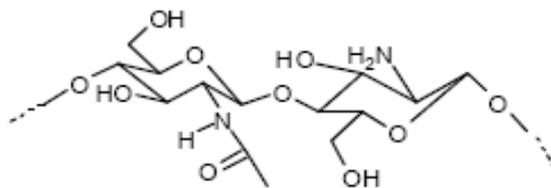


Abbildung 5: Chitosan (Rest-1,4-N-Acetylglucosamin/Glucosamin)

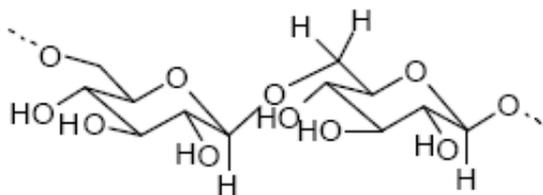


Abbildung 6: Dextran (Rest-1,6-Glycopyranose)

2.2.1. Herstellung des Klebers

Die trockenen Kleberkomponenten sind bei Raumtemperatur mittels Magnetrührer gelöst worden (0,07g Chitosan 24h und 0,2g oxidiertes Dextran 24h auf je 1ml Aqua bidestillata). Dabei entwickelten sie nach 3 Stunden eine transparente und visköse Form. Beide Komponenten sind sowohl trocken, als auch gelöst geruchlos, jedoch zeigt Chitosan eine bräunliche Einfärbung.

In trockener Form ist Chitosan gelblich, von flockiger Konsistenz und schnell lösbar (Abb. 6a). Dextran ist weiß, watteähnlich und erst nach etwa dreistündigem Rühren völlig gelöst (Abb. 7b).

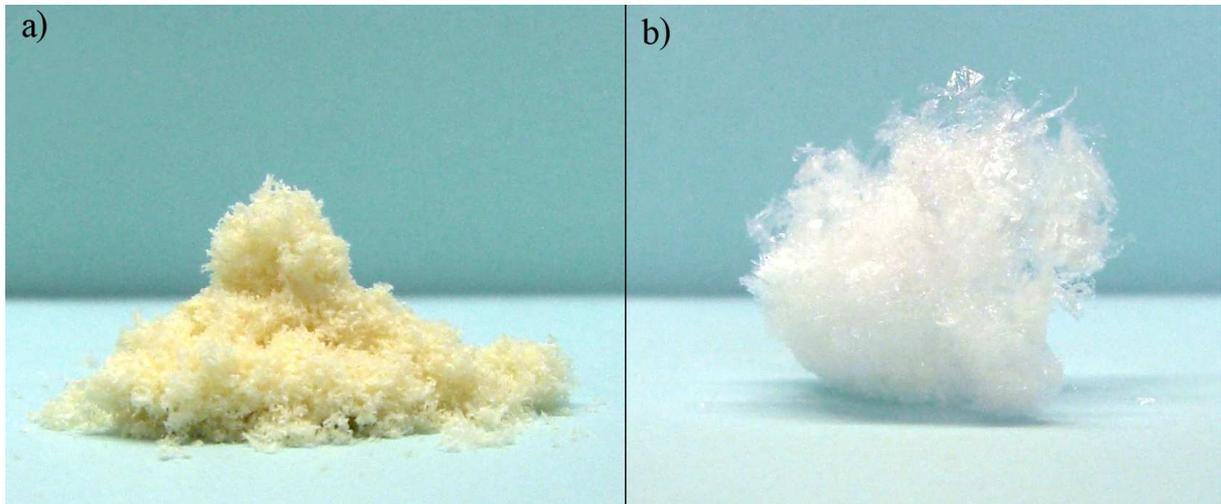


Abbildung 7: Chitosan (a) und Dextran (b), trocken

Das kleinste zu pipettierende Volumen beider Klebstoffe beträgt 25 μ l, da die viskose Form verhindert, dass kleinere Mengen in die Pipette eingesaugt werden können.



Abbildung 8: Chitosan und Dextran, gelöst

Dextran wurde mit einer Pipette auf den Objektträger gegeben und danach Chitosan in der gleichen Menge aufgezogen. Durch mehrmaliges rasches resuspendieren entstand eine gelartige Substanz, welche innerhalb weniger Sekunden am Untergrund haftete. Aus Chitosan wurde eine 7%ige und aus Dextran eine 20%ige Lösung hergestellt (0,07g Chitosan und 0,2g Dextran in je 1 ml Aqua bidest gelöst). Die Kleber sind für jeden Versuch neu angemischt worden.

2.2.2. Herstellung der Eluate

Für Versuchsansatz A (siehe Kap. 2.4.1) erfolgte die Herstellung der Eluate wie folgt. Der Kleber wurde auf eine 6 Well Platte aufgebracht, kurzzeitig unter der Sterilbank inkubiert, mit FBS gespült und danach mit Kulturmedium bedeckt. Für Versuchsansatz B (siehe Kap. 2.4.2) wurden die Kleberkomponenten nach ihrer Kombination für 72 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, dann gespült und mit Kulturmedium bedeckt. Nun wurde der Kleber in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C im Brutschrank gelagert. Alle Schritte wurden gemäß ISO 10993-5 durchgeführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und in Falconröhrchen zwischengelagert. Das 100%ige Eluat konnte durch Mischen mit frischem Kulturmedium in die gewünschten Verdünnungen überführt werden.

2.2.3. Herstellung der kleberbeschichteten Glasplättchen

Das Herstellen der kleberbeschichteten Glasplatten wurde vom Friedrich-Baur-Institut für Biomaterialien in Bayreuth übernommen. Hierzu wurden auf die runden Glasplättchen (Durchmesser: 16mm, Dicke 2mm) je 10 Schichten oxidiertes Dextran 24h, 20% und Chitosan 24h, 7% im Wechsel aufgetragen. Da die Schichten untereinander kovalente Bindungen eingehen, war die Beschichtung stabil und auf

allen Glasplättchen gleich (Abb. 9). Nach dem Trocknen der Plättchen wurden diese mittels Gassterilisation autoklaviert und im abgeschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur gelagert.



Abbildung 9: Glasplättchen mit Kleberbeschichtung

2.3. Methoden der Auswertung

2.3.1. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abb.10). Sie ist eine ca. 3x8x5 cm messende Glasplatte mit eingesetzten, quadratischen Feldern definierter Größe. Durch Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Zellen lässt sich die Zellzahl pro Volumeneinheit errechnen. Die Zählkammer hat eine definierte Höhe von 0,1 mm und wird durch ein plangeschliffenes, geeichtes Glasdeckgläschen abgedeckt. Zur Vorbereitung muss das Deckgläschen korrekt auf die Zählkammer aufgebracht werden, so dass Newton'sche Ringe (Interferenzfarben an dünnen Schichten) zu sehen sind.



Abbildung 10: Neubauer Zählkammer

Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturplatte abgelöst, in Medium resuspendiert und gezählt. Dazu wurden 10 μl der Zellsuspension mit 5 μl TrypanBlau Stain (Fa. Gibco, Carlsbad, USA) versetzt. Dies war nötig, damit nur die lebenden Zellen gezählt werden konnten. TrypanBlau Stain kann nur durch defekte Zellmembranen treten und macht somit eine Unterscheidung der lebenden von den toten Zellen möglich. Etwa 10 μl des Gemisches wurden vorsichtig an den Rand des Deckglases gegeben. Es diffundierte in den Zwischenraum bis die ganze Kammer gefüllt war. Unter dem Lichtmikroskop erfolgte die Auszählung der 4 Quadranten mit je 1 mm^2 (siehe unten).

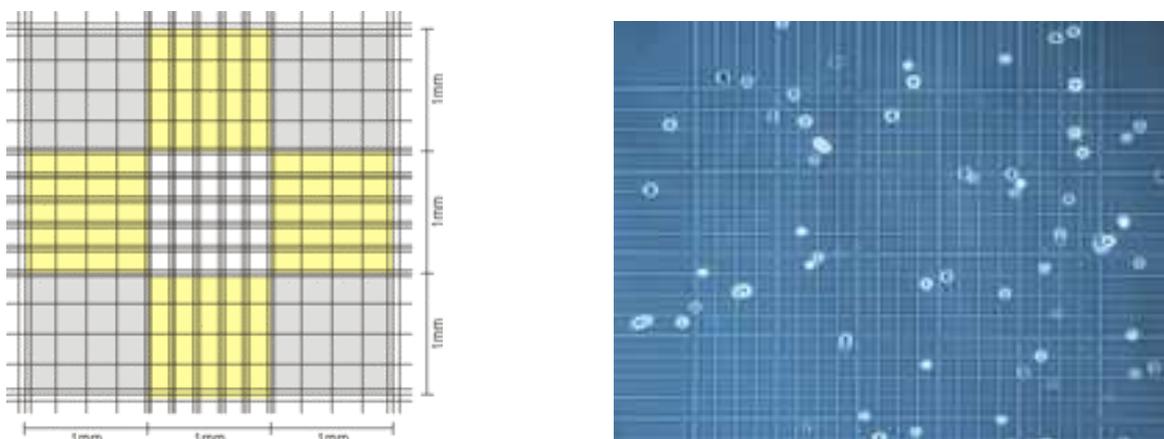


Abbildung 11: Neubauer-Quadranten und Trypan-Blau-Färbung

Um die Gesamtzahl aller gezählten, lebenden Zellen zu bestimmen wurde durch 4 geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor der Färbung 1,5 multipliziert. Die Zellzahl pro ml ergab sich durch weitere Multiplikation mit 10.000.

2.3.2. Metabolische Zellaktivität WST-I-Assay

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Vitalität einer Zelle zu bestimmen. Für unsere Zwecke war der WST-I-Assay besonders geeignet, da er nicht wie z.B. der H^3 -Thymidin-Verbindungs-Assay radioaktiv ist und simpel photometrisch bestimmt werden kann. Das Prinzip des Assays beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zelle. Eine gesunde Zelle ist durch Mitochondrien und viele zusätzlich beteiligte Enzyme in der Lage, benötigte Energie selber zu produzieren. Befindet sich eine vitale Zelle im Zustand der Zellteilung, also der Mitose, ist ein hoher energetischer Umsatz nötig und es sind auch eine Vielzahl der sich im inneren der Zelle befindlichen Mitochondrien aktiv. Eine geschwächte oder avitale Zelle zeigt einen geringeren bzw. keinen Umsatz.

Der WST-I-Assay (Fa. Roche, Mannheim, D) macht sich dieses Phänomen zu Nutze und ermöglicht die Messung der metabolischen Aktivität der Zelle. Das hellrote Substrat des WST-I-Assays basiert auf der Grundlage des farblosen Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC), welches zum Nachweis einer intakten Atmungskette in Zellen genutzt wird. TTC und WST-I werden in vitalen Zellen von mitochondrialen Enzymen (vor allem Succinat-Dehydrogenase) zu intensivrotem Formazan reduziert. Mit dem ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay) *plate reader* (Fa. Dynex Technologies, Worthing, UK) lässt sich eine Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmen. Die gesteigerte

Enzymaktivität korreliert mit der Bildung von Formazan und damit direkt mit der Menge des gebildeten Farbstoffes (Abb. 12).

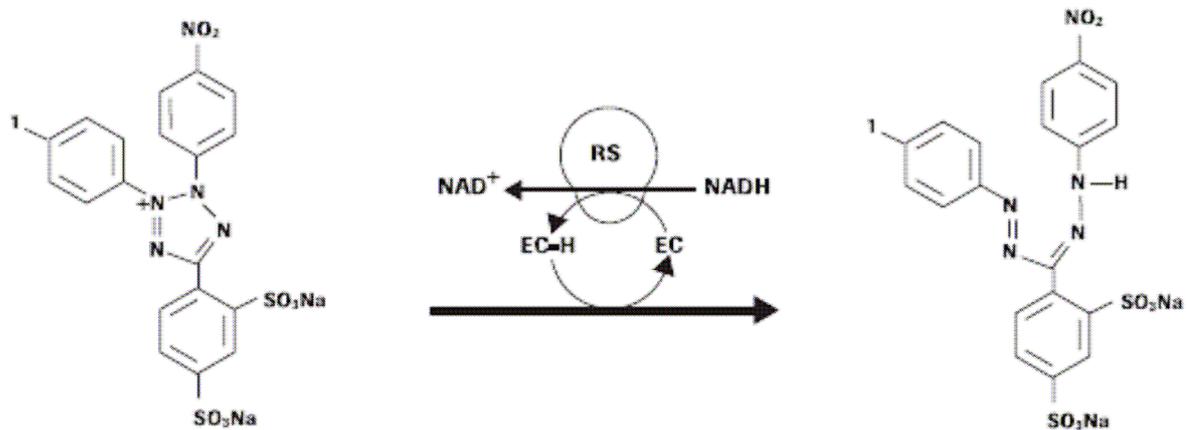


Abbildung 12: Reaktionsformel des WST-I-Assays

Die praktische Durchführung des WST-I-Assays verlief wie folgt:

Da das WST-I Reagenz zur längeren Haltbarkeit im Kühlschrank aufbewahrt wird, wurde es kurz vor Versuchsbeginn auf 37°C angewärmt und in einer Konzentration von 1:10 mit Medium verdünnt. Bei Versuchsplatten mit einem Bodendurchmesser von 9,6 cm² (6-Well Platte; Fa. Nunc, Wiesbaden, D) wurde zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt, dann mit PBS gespült und anschließend je Well 500 µl WST-I Reagenz dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre wurden zur Doppelbestimmung 2 x 100 µl aus jedem Well in eine 96-Well Platte überführt und die Extinktionen bei 450 nm Wellenlänge im ELISA *plate reader* gemessen.

2.3.3. Zellvitalität – „Live/Dead Assay“ mittels Fluoresceindiacetat und Propidiumjodid

Eine weitere Möglichkeit, die Vitalität der Zellen sichtbar zu machen ist der sog. „Live/Dead Assay“. Hierzu verwendet man zwei fluoreszierende Farbstoffe, wobei einer die vitalen und der andere die avitalen Zellen anfärbt. Fluoresceindiacetat (FDA; Fa. Fluka, München, D) ist ein fluorogenes Substrat, welches nur durch vitale Zellen zu dem Farbstoff Fluorescein umgesetzt werden kann. Dies geschieht mittels hydrolytischer Spaltung von Esterasen der vitalen Zellen. Wird Fluorescein mit Blaulicht (488nm) beleuchtet, emittiert es Grünlicht (520nm) und visualisiert somit die lebenden Zellen (Abb. 13). Avitale Zellen können nicht dargestellt werden. Propidiumjodid (PI; Fa. Sigma-Aldrich, München, D) übernimmt als DNS-Fluorochrom diese Aufgabe, indem es in Zellen mit geschädigter Zytoplasmamembran eindringt und mit den Nukleinsäuren reagiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop mit blauem Filter ruft es eine rote Fluoreszenz der eingefärbten, avitalen Zellen hervor (Abb. 13). Zellen mit intakter Zytoplasmamembran werden nicht dargestellt.

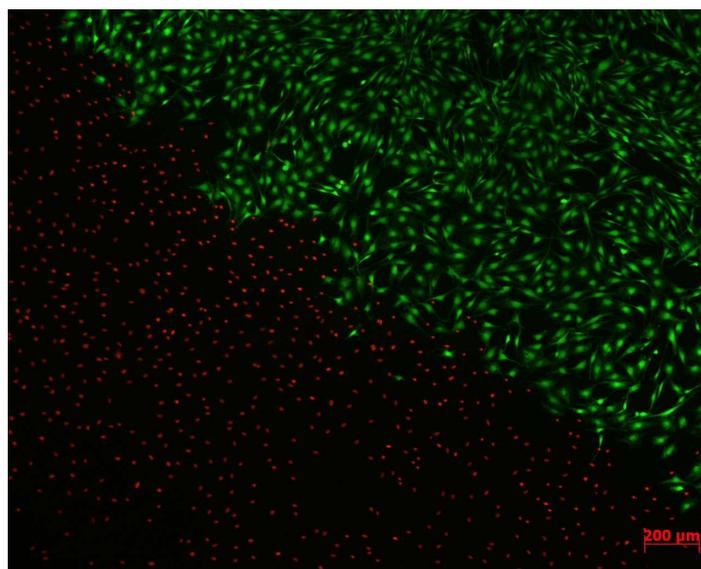


Abbildung 13: FDA/PI Färbung: „Live/Dead Assay“

Die avitalen Zellen sind in rot und die vitalen in grün dargestellt. 5-fach vergrößert.

2.3.4. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SigmaPlot und SigmaStat Software (Fa. Systat Software Inc., Chicago, USA) Es wurde der T-Test durchgeführt. Er erlaubt eine Aussage über die Konsistenz zweier Mittelwerte und liefert eine Entscheidungshilfe dafür, ob die Differenz zweier Mittelwerte völlig zufällig ist, oder ob dieser eine Bedeutung zugewiesen werden muss. Das Ergebnis des T-Tests wird im sogenannten p-Wert reflektiert. Ein p-Wert von $<0,005$ wurde in den vorliegenden Fällen als statistisch signifikant angesehen und in den dazugehörigen Graphen mit einem Stern markiert. Er besagt, dass sich die Zellzahl über einen bestimmten Zeitraum signifikant und nicht zufällig verändert hat.

2.4. Versuchsaufbau

2.4.1. Versuchsprinzip A

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Auswirkungen von Kleber-Eluat, dem angemischten Kleber und den Kleber-Einzelkomponenten auf die Zelltoxizität untersucht. Für die Eluatverdünnungen wurden mit einer Pipettenspitze von jeder Kleberkomponente $25\mu\text{l}$ auf einer 6-Well Kultivierungsplatte verstrichen, nach kurzem antrocknen mit FBS gespült, dann mit $1000\mu\text{l}$ Kulturmedium bedeckt und letztendlich bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das nun 100%ige Eluat aus dem Well in ein Falconröhrchen (Fa. Sarstedt, Hemer, D) überführt und durch Zugabe von Kulturmedium in die angegebenen Verdünnungen (10% und 1%) überführt. In einem 24-Well Kulturmedium (Fa. Nunc, Wiesbaden, D) wurden 50.000 MC3T3-E1 Zellen ausgesät und solange im Brutschrank inkubiert bis die Zellen am Boden haften blieben. Die Zellen wurden nun je dreifach mit den

verschiedenen Eluaten beimpft und wiederum für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Um die Reaktionen des angemischten Klebers zu testen wurden 50µl jeder Kleberkomponente in einer 24-Well Kultivierungsplatte durch rasches resuspendieren gemischt und mit der Pipettenspitze auf dem Boden der Platte verstrichen. Im Anschluss wurde mit FBS gespült, um eventuelle freie reaktive Gruppen des Klebstoffs zu blocken. Anschließend wurden je Well 100.000 MC3T3-E1 auf den Kleber gegeben. Die Anordnung wurde dann mit 500µl Kulturmedium für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

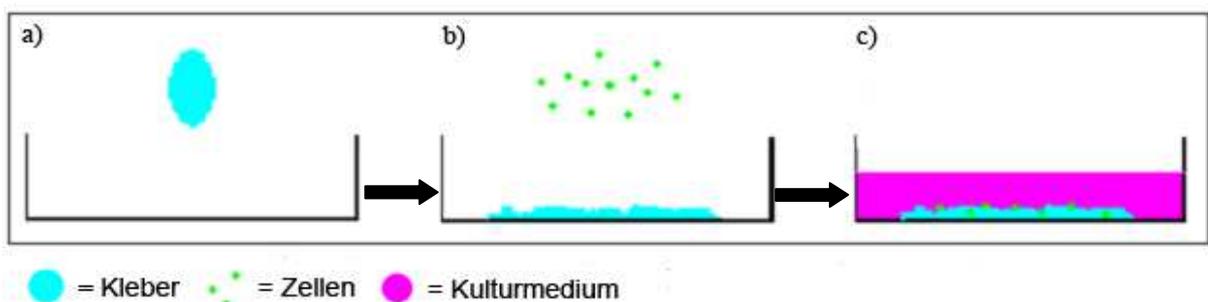


Abbildung 14: Versuchsprinzip A

a: Aufbringen des Klebstoffes auf die Well-Platte b: Beimpfen des Klebstoffes mit Zellen c: Bedecken mit Kulturmedium

Für das Testen der Einzelkomponenten wurde ähnlich verfahren. Es wurden 200µl jeder Einzelkomponente auf dem 24-Well Boden verstrichen. Da die Komponenten eine gelartige Konsistenz haben, musste auf das Spülen mit FBS verzichtet werden, da sonst die Komponenten herausgelöst worden wären. Somit wurden 100.000 MC3T3-E1 Zellen direkt auf die Einzelkomponenten aufgetragen und das ganze mit

500µl Kulturmedium beschickt. Die anschließende Inkubation im Brutschrank fand ebenfalls für 24 Stunden statt.

Als Kontrollen wurden Kulturmedium und Kupferplättchen (siehe Abb. 15) verwendet, welche zytotoxisch sind. Es wurden für die Negativkontrolle alle Versuche ebenso angesetzt wie im Aufbau zuvor beschrieben, nur dass die Klebstoffkomponenten weggelassen wurden. Als Positivkontrolle wurden eigens dafür hergestellte, runde Kupferplättchen mit dem gleichen Durchmesser wie die 24-Well Kultivierungsplatte verwendet und nach Desinfektion mit 70% Ethanol mittels Werkzeug in die Vertiefungen der Wellplatte geschlagen. Die Beimpfung mit Zellen und die anschließende Kultivierung erfolgten wie beschrieben.



Abbildung 15: Kupferplättchen

2.4.2. Versuchsprinzip B, Vorversuche

TritonX-100 ist ein nichtionisches Produkt, welches Proteine auflösen kann (Abb. 16).

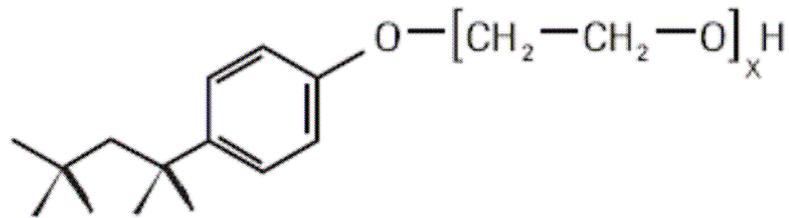


Abbildung 16: Strukturformel TritonX-100

Da TritonX-100 in der Literatur gern als Positivkontrolle verwendet wird, (Sawai et al. 2007, Strupp et al. 2000, Borner et al. 1994) wurde eine Testreihe mit verschiedenen Verdünnungen des Tritons durchgeführt, um zu überprüfen, bei welcher Konzentration alle Zellen untergehen. Hierzu wurde TritonX-100 mit PBS in die Verdünnungen 1%, 0,5% und 0,1% überführt und auf vitale, bereits adhärenente MC3T3-E1 Zellen gegeben. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wurde der WST-I-Assay durchgeführt, um die Vitalität der Zellen zu testen.

Um zu verhindern, dass Kleber durch das Spülen mit FBS aus dem Well gespült wird, wurden des weiteren Trocknungsversuche durchgeführt. Hierzu wurden die Komponenten des Klebers, wie in Versuchsprinzip A beschrieben, auf einer 24-Well Kultivierungsplatte ausgestrichen, nach verschiedenen langen Trocknungszeiten (0min, 10min, 30min, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden und 12 Stunden) mit FBS gespült und mit MC3T3-E1 für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Da die Kleberkomponenten in gelöster Form eine gelartige Konsistenz besitzen, beträgt die kleinste noch zu pipettierende Klebstoffmenge 25µl. Es wurde zunächst die Dextrankomponente tropfenförmig auf die Kulturplatte aufgetragen. Anschließend wurde die Chitosankomponente durch rasches resuspendieren mit dem Dextran vermischt.

Dieses musste innerhalb von etwa 3 Sekunden geschehen, da der Kleber sich sonst in der Pipettenspitze verfestigt hätte.

Für die Kontrollen wurde das gleiche Versuchsprinzip verwendet. Die Negativkontrolle wurde mit Kulturmedium ohne Klebstoff, ansonsten jedoch unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Für die Positivkontrolle wurde TritonX-100, in einer 1% Verdünnung mit PBS verwendet.

2.4.3. Versuchsprinzip B, Hauptversuche

In Versuchsprinzip B (Abb. 19) wurde der im folgenden beschriebene Versuch mit drei verschiedenen Grundmaterialien (welche Kleber D enthalten oder aus ihm bestehen) durchgeführt.

1. Zellen mit Kleber-Eluat von Kleber D bedeckt
2. Kleber D auf ein Well aufgetragen und mit Zellen beimpft
3. Zellen auf klebstoffbeschichteten Glasplättchen

Für den Eluatversuch wurden 25µl jeder Kleberkomponente in einer 6-Well Kultivierungsplatte ausgestrichen. Dextran wurde auf den Wellboden getropft und anschließend Chitosan mit der Pipette hinzugegeben. Innerhalb von 3 Sekunden wurden die Komponenten mittels Drigalsky-Spatel vermischt und auf dem Boden glatt ausgestrichen (siehe Abb. 8, 17 und 18).



Abbildung 17: Drigalski-Spatel



Abbildung 18: 6-Well mit ausgestrichenem Kleber

Zur besseren Darstellung des Klebers auf der Platte, wurde er mit Tinte vermischt, welche zum Ausflocken führte. In ursprünglicher Form ist der Kleber nahezu transparent und nicht ausgeflockt.

Im Unterschied zu Versuchsprinzip A wurde der Kleber nun für 72 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, um auszuschließen, dass flüssige Klebstoffreste die Zellen verkleben und somit in Ihrer Kommunikation und Mobilität stören. Nach dem Trocknen wurde der Klebstoff wieder mit FBS gespült und danach mit 100.000 Zellen/24-Well bedeckt. Nach der 24-stündigen Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C im Brutschrank wurde der WST-I-Assay durchgeführt. Dieser Test wurde an drei Testtagen wiederholt (Tag 1, Tag 3 und Tag 6).

Für den Versuch mit den Glasplättchen (steril) wurden diese zunächst in der 24-Well Kultivierungsplatte platziert, dann mit FBS gespült und mit 200.000 Zellen bedeckt. Nach 24 Stunden Inkubation unter den bekannten Bedingungen wurde ein Teil der Zellen mit dem WST-I-Assay untersucht und ein anderer mit FDA/PI gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden dann je Testtag fünf aussagekräftige „Regions of

Interest“ (ROI's) in 20-facher Vergrößerung fotografiert und beurteilt. Auch diese Tests wurden je an Tag 1, Tag 3 und Tag 6 nach Inkubation durchgeführt.

Der Versuch mit dem ausgestrichenen Klebstoff fand unter gleichen Bedingungen statt. Es wurden, wie bei dem Eluatversuch, von jeder Klebstoffkomponente 25µl in einem 24-Well platziert und mit dem Drigalski-Spatel glatt gestrichen. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 72 Stunden wurde mit FBS gespült. Nach bedecken mit 500.000 MC3T3-E1 je Well wurden die Zellen wieder für einen, drei und sechs Tage im Brutschrank inkubiert. Es wurden wieder mit einem Teil der Testreihe eine Fluoreszenzfärbung und mit dem anderen der WST-I Vitalitätsassay durchgeführt.

Die Kontrollmethoden aus Versuchsprinzip A wurden beibehalten. TritonX-100 wurde als Positivkontrolle benutzt. Die Negativkontrolle bestand aus reiner Inkubation mit Kulturmedium (bei Kleber- und Eluatversuch) und Inkubation mit nicht-beschichteten Glasplättchen beim Glasplättchenversuch.

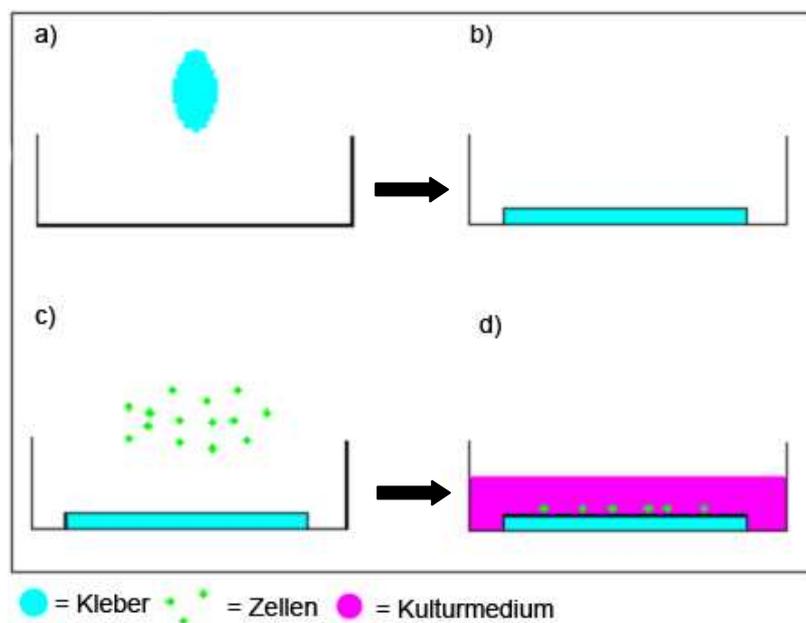


Abbildung 19: Versuchsprinzip B

a: Auftragen des Klebers, b: glattgestrichener Kleber im Wellboden, getrocknet, c: Auftragen der Zellen, d: Bedecken mit Medium

2.5. Geräte, Material und Reagenzien

Geräte/Material	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	Typ 770	Kern, D
Autoklav	Varioklav 300	H+P Labortechnik, D
Brutschrank	IG 150	Jouan, F
Digitalkamera	3CCD Color Video Camera	Sony, J
ELISA <i>plate reader</i>	Microplatereader	DynexTechnologies, Worthing, UK
Fluoreszenzmikroskop	Axioskop 2	Zeiss, D
Flüssigkeitsabsaugsystem		Roth, D
Kühl-Gefrierkombination	Premium	Liebherr, D
Lichtmikroskop	Axiovert S100	Zeiss, D
Magnetrührer	heating magnetic stirrer	ARE, USA
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved	Brand, D
pH-Meter		
Sterilbank	Antares 72	Biohit, D
Wasserbad		GFL, D
Zentrifuge	Zentrifuge 54115D (Tisch)	Eppendorf, D
	Zentrifuge: CT 422	Jouan, F

Material	Bezeichnung	Hersteller
Einmal Pipetten	2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Sarstedt, D
Einmal Spritzen	2ml, 5ml, 10ml, 20ml	Becton Dickinson, USA
Eppendorf Reaktionsgefäße	1,5ml	Eppendorf, HH, D
Glas-Pasteur Pipette	230nm	Schott, D
Kulturflaschen	T25, T75	Nunc, Wiesbaden, D
Kulturplatte	6well, 12well, 24well, 96well	Nunc, Wiesbaden, D
Kulturplatte, Kollagen I beschichtet	24well	Greiner bio-one, D
Kupferplättchen + Werkzeug	0,3mm x 16mm	Klinikums-Werkstatt, D
pH-Universalindikator	pH 0-14	Merck, D
Pipettenhalter	Pipetman	Gilson, USA
Pipettenspitzen	10, 20, 100, 200, 1000ul	Biozym, D
Rollrandgläser + Deckel		Roth, D
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml	Sarstedt, Hemer, D

Reagenz	Bezeichnung	Hersteller
Aqua ad injectabilia		Braun, D
Aqua bidestillata		Noll, D
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma-Aldrich, D
Ethanol 70% in Aqua destillata		Klinikapotheke, D
Fetal Bovine Serum	FBS	Sigma-Aldrich, München, D
Fluoreszeindiacetat	FDA	Fluka, München, D
Kulturmedium MC3T3-E1	Alpha MEM GlutaMAX I	GibcoBRL, Karlsruhe, D
MC3T3-E1		DSMZ, Braunschweig, D
Penicillin/Streptomycin		Gibco, Carlsbad, USA
Phosphate Buffered Salline	PBS	IPPA Laboratories, Pasching, A
Propidiumjodid	PI	Sigma, D
Trypan Blau Stain 0,4%		GibcoBRL life technologies, USA
Trypsin/EDTA		GibcoBRL life technologies, USA
WST-I Reagent		Roche, Mannheim, D

Tabelle 2: Geräte, Material und Reagenzien

3. Ergebnisse

3.1. Versuchsprinzip A

3.1.1. Eluat-Testung

Für die Eluat-Testung nach Versuchsprinzip A wurden aus Kleber D Eluate in verschiedenen Verdünnungen hergestellt. Die Eluate wurden auf bereits adhärente MC3T3 Zellen aufgetragen und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde ein WST-I-Assay durchgeführt.

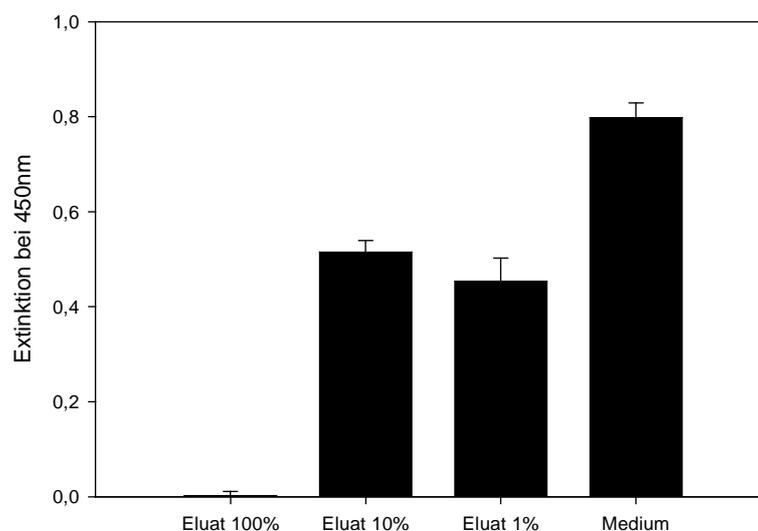


Abbildung 20: Zellvitalität nach Inkubation mit Eluat des Kleber D

Dargestellt sind die Extinktionswerte nach 24-stündiger Inkubation von 50.000 Zellen mit Eluat 100%, 10%, 1% sowie 0% entsprechend reinem Kulturmedium (Kontrolle). Die Extinktion wurde bei 450nm mit dem ELISA-plate-reader gemessen.

Wurden die Zellen mit 100%igem Eluat inkubiert, resultierten Extinktionen von nahe Null, was keiner messbaren Zellaktivität entspricht. Bezogen auf die Mediumkontrolle resultierte bei 1%igem Eluat eine Reduktion der Zellaktivität von ca. 50%. Bei

Inkubation mit 10%igem Eluat ergab sich eine Reduktion der Zellaktivität von 37,5%. Bei 10%igem und 1%igem Eluat nahm die Extinktion Werte zwischen 0,4 und 0,6 an. Das Ergebnis der Negativkontrolle, bei Zellen, die mit reinem Kulturmedium inkubiert wurden, lag mit gut 0,8% deutlich darüber (Abb. 20).

3.1.2. Direkte Klebstoff-Testung

Im folgenden Versuch wurden 50 μ l frisch angerührter Kleber direkt mit den Zellen in Kontakt gebracht. Nach 24-stündiger Inkubation wurde ein WST-I-Assay durchgeführt. Die Beimpfung der Zellen mit dem Kleber führte zu einem kompletten Abfall der Extinktion auf 0, während die Extinktion der Mediumkontrolle bei 1,1 lag. Es resultierte somit ein kompletter Verlust der Zellaktivität nach direktem Kontakt des Klebers mit den Zellen (Abb. 21).

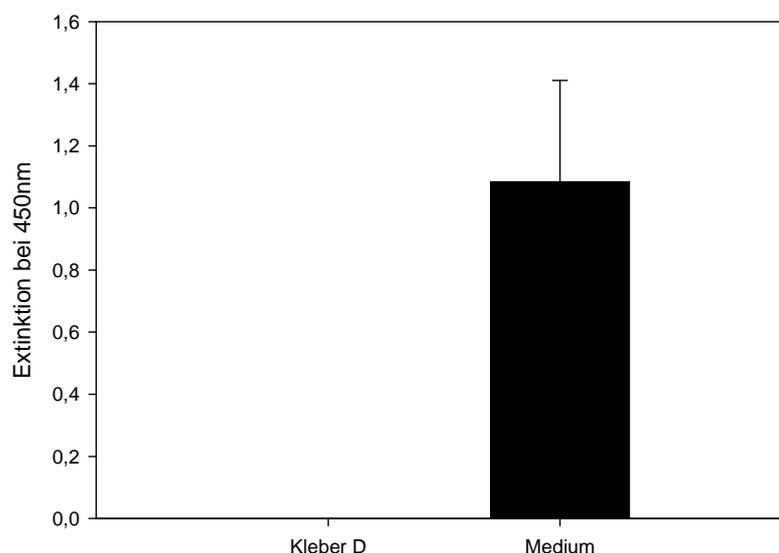


Abbildung 21: Zellvitalität nach Inkubation mit verschiedenen Kleberkombinationen

Dargestellt sind die Extinktionswerte nach 24-stündiger Inkubation von 100.000 Zellen mit Kleber D (je 50 μ l je Komponente). Die Kontrolle wurde mit Kulturmedium ohne Kleber durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 450nm mit dem ELISA-plate-reader gemessen.

3.1.3. Testung der Einzelkomponenten

Um nun herauszufinden, welche Komponente des Klebers für die toxische Wirkung verantwortlich war, wurde im Folgenden eine Testung der Einzelkomponenten des Klebers vollzogen. Anschließend wurde erneut ein WST-I-Assay durchgeführt. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit den Einzelkomponenten des Klebstoffs zeigte die Extinktion auch hier Werte nahe Null, wohingegen die Negativkontrolle mit reinem Kulturmedium bei gleichen Bedingungen wiederum Werte von etwa 1,1 ergab. Ähnlich der Ergebnisse mit reinem Kleber kam es nach Zugabe der Zellen zu den Einzelkomponenten zu einem kompletten Verlust der Zellaktivität (Abb. 22).

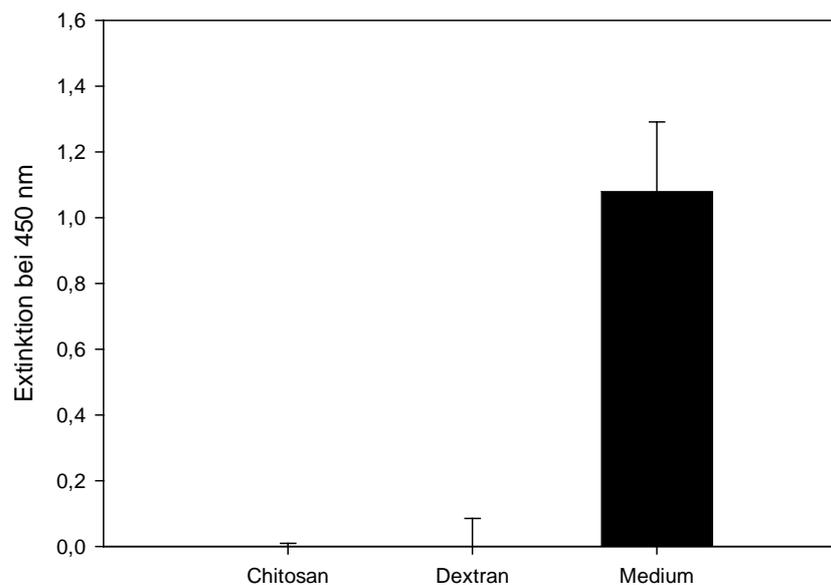


Abbildung 22: Zellvitalität nach Inkubation mit den Einzelkomponenten

Dargestellt sind Extinktionswerte nach 24-stündiger Inkubation von 100.000 Zellen mit den Einzelkomponenten Chitosan und Dextran (je 100µl je Komponente). Die Kontrolle wurde mit Kulturmedium ohne Kleberkomponente durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 450nm im ELISA-plate-reader gemessen.

Um potentielle Fehlerquellen zu analysieren, untersuchten wir den Versuchsablauf genauer. Schon bei der Vorbereitung der Well-Platten für den Zellvitalitätsversuch WST-I war ein deutlicher Farbunterschied zwischen den Einzelkomponenten und den Kontrollen sichtbar. Abbildung 23 zeigt den von den Zellen abpipettierten Überstand, nach Inkubation mit dem WST-I-Assay für 24 Stunden, kurz vor der Messung mit dem ELISA *plate reader*. Da der ELISA eine Farbänderung misst, mussten wir hier von einer Störung der Testergebnisse durch Farbartefakte ausgehen, weshalb das Test-Setting umgestellt wurde.



Abbildung 23: Farbdarstellung des WST-I-Assays nach Inkubation:

Das linke Bild zeigt die Einzelkomponenten: 1. Zeile = Chitosan, 2. Zeile = Dextran, 3. und 4. Zeile = Einzelkomponenten für andere Versuche; das rechte Bild zeigt die Kontrollen: 1. Zeile = reines Kulturmedium, 2. Zeile = Positivkontrolle mit Kupferplättchen, 3. und 4. Zeile = leer

3.2. Versuchsprinzip B

3.2.1. Evaluation verschiedener Trocknungszeiten

Das neue Test-Setting ist im Material und Methodenteil unter Versuchsprinzip B beschrieben. Entscheidend ist, dass hier zunächst der Kleber bzw. die

Kleberkomponenten in den Kulturschalen glatt ausgestrichen wurden und erst anschließend die Zellen aufgetragen wurden. Zwischen diesen Schritten wurde ein Trocknungsschritt eingeführt. Außerdem wurde der „Live/Dead Assay“ zur Testung der Zellvitalität eingesetzt, um Störungen durch Farbartefakte zu vermeiden. Um eine ideale Trocknungsdauer des Klebers zu ermitteln, wurden 25µl jeder Kleberkomponente gemischt und auf dem Wellboden ausgestrichen. Es wurden 50.000 Zellen für 0, 1, 3, 6 und 12 Stunden inkubiert und für 24h im Brutschrank bebrütet. Anschließend wurden Fluoreszenzaufnahmen angefertigt.

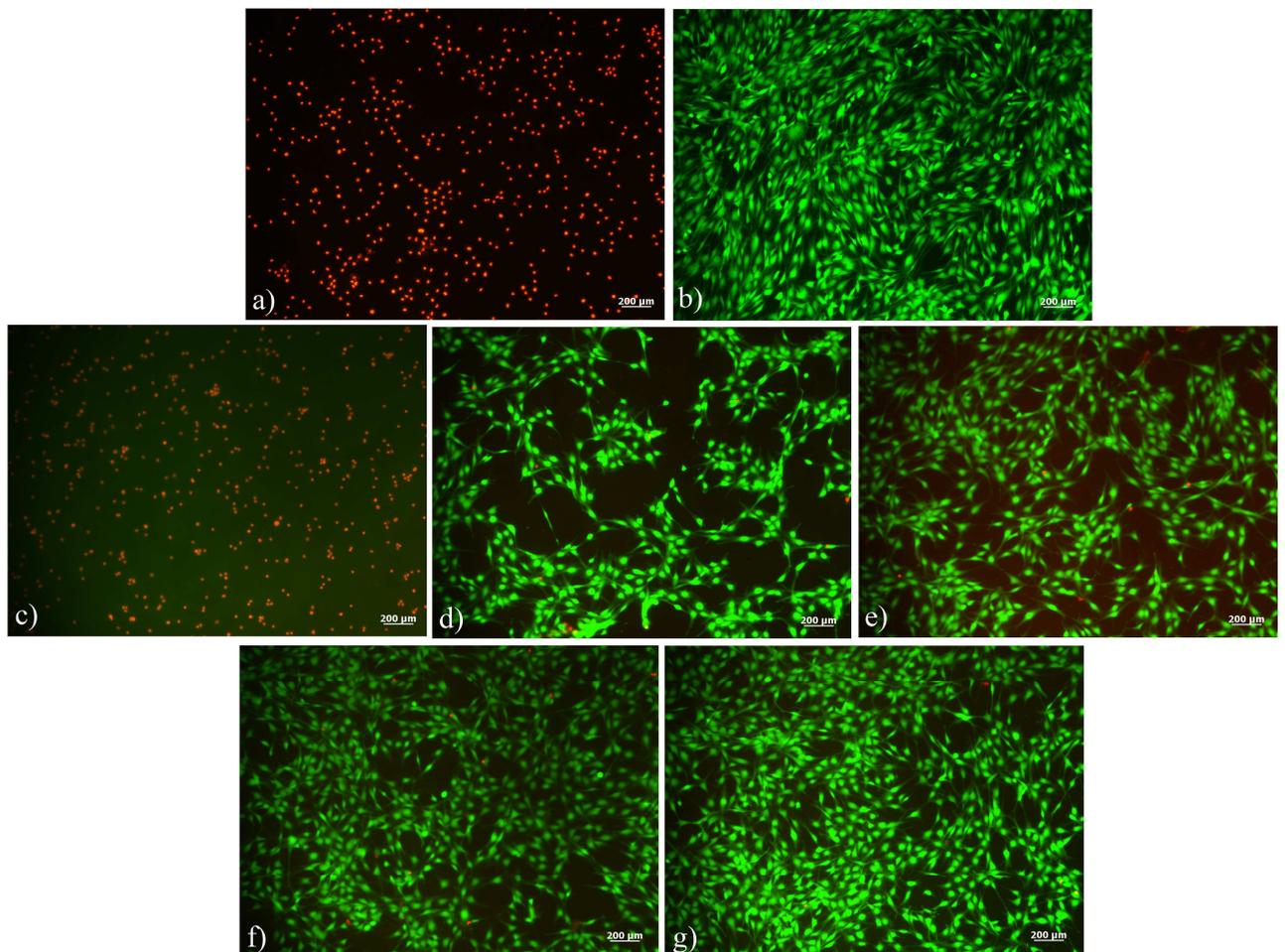


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Vorversuch Trocknungszeiten

Es wurde Kleber D auf 9,6 cm² (6-Well) aufgetragen, mit PBS gespült und getrocknet. a zeigt die Positivkontrolle nach Inkubation mit Kupferplättchen, b zeigt die Negativkontrolle nach Inkubation mit Kulturmedium. Trocknungszeiten: c: 0 Minuten, d: 1 Stunde, e: 3 Stunden, f: 6 Stunden, g: 12 Stunden. Dann wurden 50.000 MC3T3-E1 je Well ausgesät und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Es liegen Aufnahmen in 5-facher Vergrößerung vor.

Wurden die Zellen auf frisch aufgetragenen Kleber platziert, zeigten sie im „Live/Dead Assay“ eine rote Färbung und eine abgerundete Form ohne Zellausläufer (Abb. 24c). Mit zunehmender Verlängerung der Trocknungszeit (Abb. 24d-g) waren mehr vitale (grüne) Zellen und ein spindelförmiger Aufbau der Zellkörper zu erkennen. Die Positivkontrolle mit Kupfer (Abb. 24a) zeigt ausschließlich rote (tote), runde Zellen ohne Ausläufer. Im Gegensatz dazu zeigte sich deutlich die Spindelform und grüne Färbung der Zellen in der Negativkontrolle mit Kulturmedium (Abb. 24b).

3.2.2. Eluat-Testung

Mit Versuchsprinzip B wurden nun die alten Versuche wiederholt und erweitert. Die Zellen wurden mit 100%igem Kleber-Eluat beimpft, welches aus Kleber D gewonnen wurde, der mindestens 72 Stunden trocknete. Die Messung mittels WST-I-Assay wurde dann zu drei Zeitpunkten (1, 3 und 6 Tage nach Inkubation) durchgeführt. In Abbildung 25 sind die Extinktionen der Zellen mit Kleber-Eluat und mit Kulturmedium direkt nebeneinander aufgezeigt. Die Extinktionen der Zellen nach Eluatinkubation haben ihr Minimum (etwa 1,3) an Tag 1 und ihr Maximum (etwa 1,5) an Tag 3, Tag 6 liegt dazwischen. Ebenso verhalten sich die Werte der Positivkontrolle.

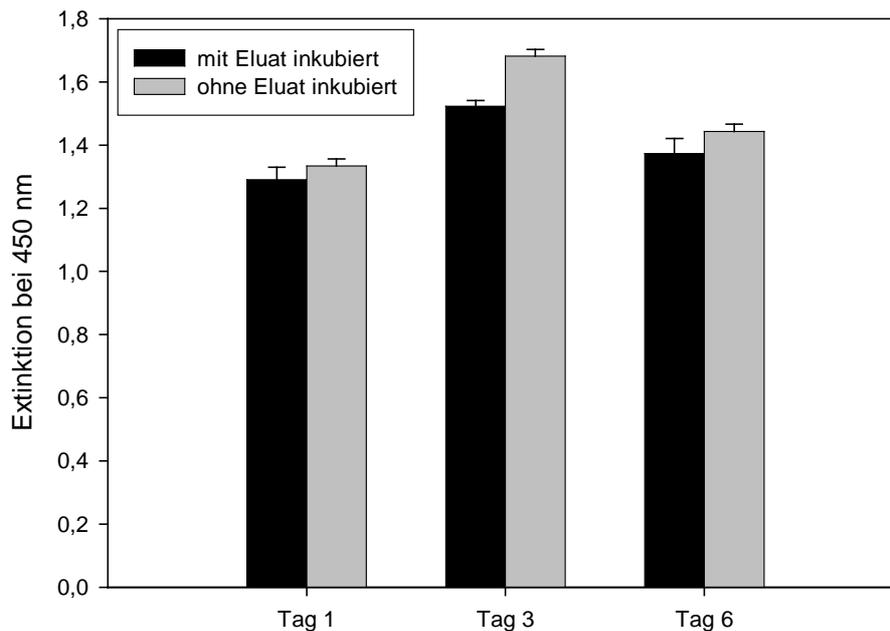


Abbildung 25: Zellvitalität nach Inkubation mit Eluat des Kleber D

Dargestellt sind Extinktionen bei 450 nm von 100.000 Zellen nach Inkubation mit Eluat 100% für 1, 3 und 6 Tage im Rahmen des Versuchsprinzips B. Verglichen werden die Werte nach Inkubation mit und ohne Eluat.

3.2.3. Direkte Klebstoff-Testung

Gemäß Versuchsprinzip B wurde Kleber D glatt auf dem 6-Well-Boden ausgestrichen, gespült, getrocknet und anschließend mit Zellen beimpft. An Tag 1, Tag 3 und Tag 6 nach Inkubation wurden die Zellen zum Einen PI/FDA gefärbt und fotografiert und zum Anderen wurde mittels WST-I-Assay die Vitalität bestimmt. Außerdem wurden die Zellen ausgezählt, um ein Wachstum der Population zu bestätigen.

In Abbildung 26 sind die Fluoreszenzaufnahmen nach der PI/FDA Färbung dargestellt, wobei rot die avitalen (durch PI) und grün die vitalen Zellen (durch FDA) zeigen. Es ist von Tag 1 bis Tag 6 (Abb. 26c-e) eine deutliche Vermehrung der vitalen Zellen und ein deutlicher Rückgang der avitalen Zellen zu erkennen. Die

Zellen haben im Gegensatz zu der Positivkontrolle mit TritonX-100 (Abb. 26b) ein eher spindelförmiges Aussehen und bilden untereinander Zellausläufer aus. Im Vergleich zu der Negativkontrolle von Tag 6 (Abb. 26a), welche ohne Kleber D (nur auf Kulturmedium) durchgeführt wurde, wirkt die Konfluenz dichter, jedoch sind die Zellen mit Kleberkontakt rundlicher und weniger untereinander vernetzt.

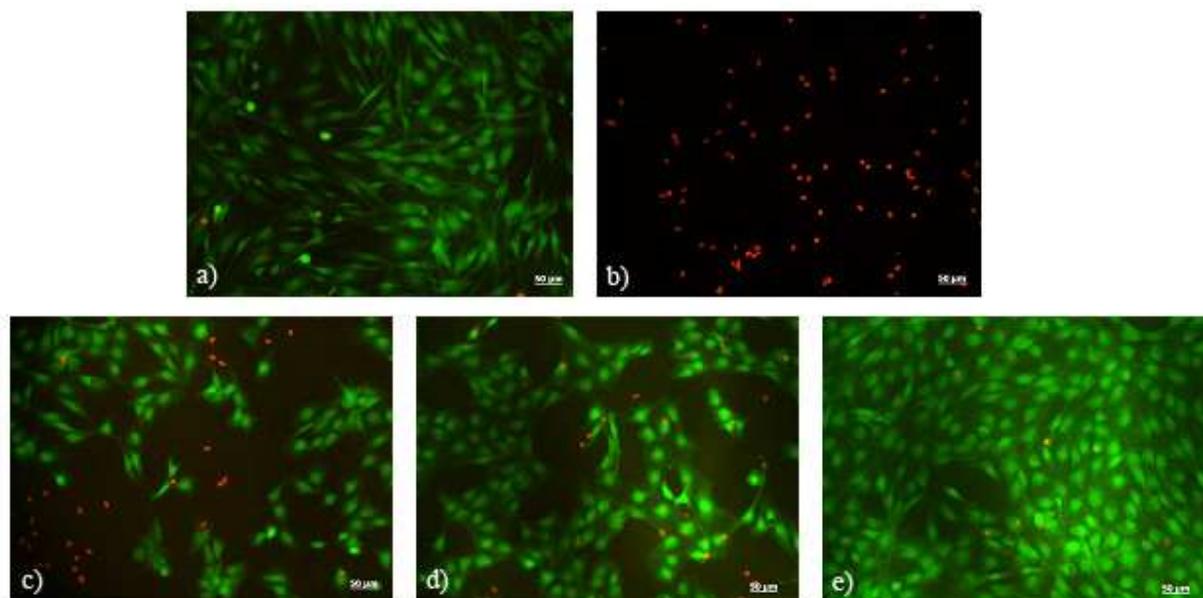


Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Versuchsprinzip B

Es wurden 500.000 Zellen auf mit Kleber beschichteten Wells ausgesät und nach Tag 1, 3 und 6 gefärbt und fotografiert. Je Well wurden 5 ROI's ausgewählt und in 20-facher Vergrößerung fotografiert. a zeigt die Negativkontrolle ohne Kleberkontakt, b zeigt die Positivkontrolle mit TritonX-100, c bis e zeigen die Zellen, welche für 1, 3 und 6 Tage auf kleberbeschichteten Wells gezüchtet wurden.

Für die Zählung der Zellen wurden aus jeder fotografierten Fluoreszenzaufnahme (je Tag wurden 3 Bilder erstellt) 5 aussagekräftige ROI's ausgewählt und die vitalen und avitalen Zellen gezählt. Abbildung 27a zeigt die absoluten Zahlen der vitalen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Hier ist bei beiden Kurven ein signifikantes Wachstum der Population zu sehen. Jedoch ist die Gesamtzellzahl bei den Zellen

ohne Kleberkontakt, trotz gleicher Zellzahl zu Beginn des Versuchs, deutlich höher. Abbildung 27b zeigt den Verlauf der avitalen Zellen über 6 Tage. Es zeigt sich, dass die Zahl der avitalen Zellen mit Kleberkontakt im Verlauf abnimmt.

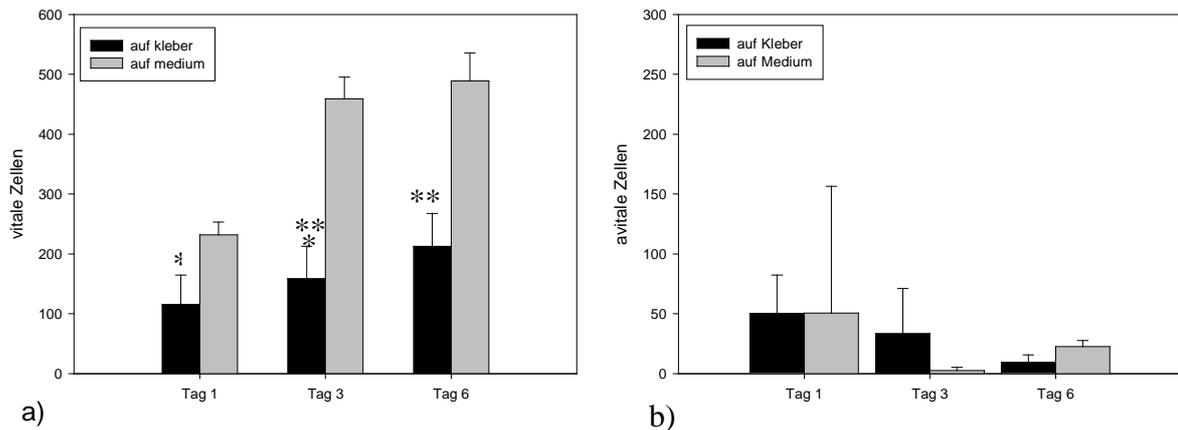


Abbildung 27: Zellvitalität, Versuchsprinzip B

Ergebnisse der Auszählung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der a: vitalen und b: avitalen Zellen (ausgesät 500.000 Zellen je 9,6cm²) nach Inkubation von 1,3 und 6 Tagen auf Kleber und Kulturmedium. Die Experimente wurden je 3-fach ausgeführt, 5 ROI's wurden fotografiert und die Zellen gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte. * = T-Test $p < 0,005$ in Bezug auf das Wachstum von Tag 1 auf Tag 3 und ** = T-Test: $p < 0,005$ in Bezug auf das Wachstum von Tag 3 auf Tag 6.

Abbildung 28 zeigt den prozentualen Anteil der vitalen Zellen auf Kleber im Vergleich zu der Kontrolle ohne Klebstoff. Die prozentuale Berechnung wurde aus den absoluten Zahlen aus Abb. 27 berechnet. Dargestellt sind die Wachstumskurven im Verlauf von Tag 1, 3 hin zu Tag 6. Zellen, die mit Klebstoff beimpft wurden vermehren sich kontinuierlich. Auch die Kontrollen zeigen ein Wachstum, welches allerdings ab dem dritten Tag wieder abnimmt.

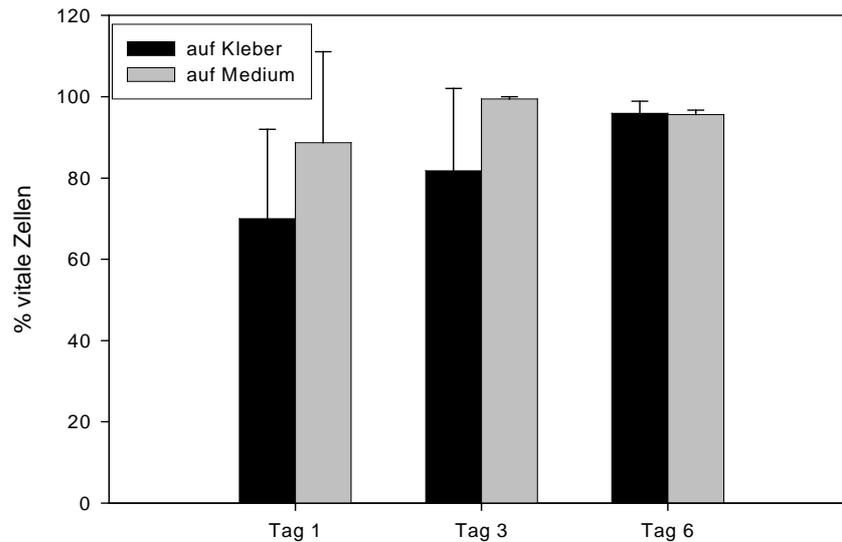


Abbildung 28: Zellvitalität in Prozent, Versuchsprinzip B

500.000 Zellen wurden gemäß Versuchsprinzip B auf mit Kleber beimpften Wells ausgesät. Als Kontrolle diente reines Kulturmedium. Dargestellt ist die prozentuale Auswertung der vitalen Zellen an Tag 1, 3 und 6

Um die Ergebnisse zu bestätigen wurde ein WST-I-Assay durchgeführt. Gemäß Versuchsprinzip B wurden Zellen auf getrocknetem Kleber ausgestrichen. Zusätzlich wurde eine Kontrolle mit Zellen durchgeführt, welche in reinem Kulturmedium inkubiert wurden. Die Extinktionswerte sind in Abbildung 29 dargestellt. Sie zeigt, dass die Aktivität der mit Klebstoff beimpften Zellen an allen Tagen annähernd gleich ist (etwa 1,7). Die Kontrollzellen ohne Klebstoff zeigen etwas höhere Werte (etwa 2,6).

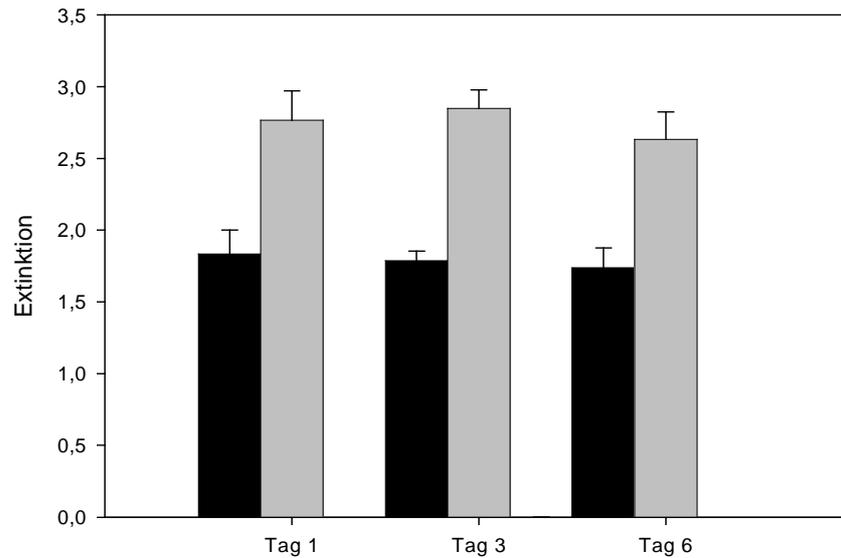


Abbildung 29: Zellvitalität WST-I, Versuchsprinzip B

Extinktionsergebnisse des WST-I-Assays, gemessen bei 450 nm nach Kultivierung der Zellen für 1, 3 und 6 Tage auf Kleber und Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes.

3.2.4. Testung kleberbeschichteter Glasplättchen

In Versuchsansatz B wurden die Zellen nicht nur auf getrocknetem ausgestrichenem Kleber gezüchtet, sondern auch auf vorbeschichteten Glasplättchen. Auf diese Plättchen wurden vom Team des Friedrich-Baur-Instituts in Bayreuth je 10 Schichten oxidiertes Dextran 24h und Chitosan 24h im Wechsel aufgetragen und getrocknet. Diese Plättchen (Abb. 9) wurden auf die Wellböden gelegt, im Anschluss mit FBS gespült und dann mit den Zellen beimpft. Nach Inkubation von 1, 3 und 6 Tagen wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht. Die Kontrollen wurden mit Glasplättchen ohne Kleberbeschichtung und TritonX-100 durchgeführt. Einige aussagekräftige Aufnahmen sind in Abbildung 30 dargestellt.

Abbildung 30a zeigt die Zellen an Tag 1 auf Glasplättchen ohne Kleberbeschichtung (= Negativkontrolle). Abbildung 30b zeigt die Zellen an Tag 1 mit TritonX-100 im

Kulturmedium (= Positivkontrolle). Avitale Zellen stellen sich rot dar, die vitalen Zellen sind grün. Auf Abbildung 30c bis e erkennt man deutlich eine Vermehrung der Zellen von Tag 1 bis Tag 6. Die Form der Zellen mit ihren Ausläufern und schlanken Körpern ähnelt sehr dem physiologischen Aussehen der MC3T3-E1 Zellen (Abb. 30a). An Tag 6 ist die maximale Konfluenz des Wellbodens erreicht und die ersten absterbenden Zellen sind zu sehen, da aufgrund von Platz und Nährstoffmangel keine adäquate Versorgung der gesamten Zellen möglich ist.

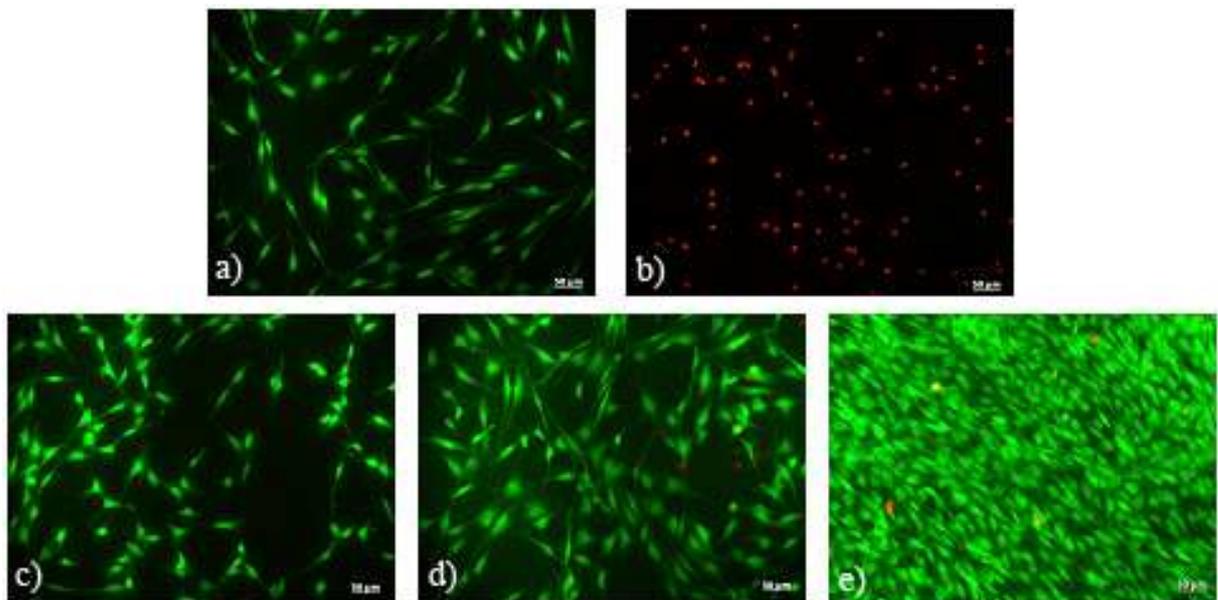


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Versuchsprinzip B

Es wurden 200.000 Zellen auf 9,6 cm² (6-Well) ausgesät und nach Tag 1, 3 und 6 gefärbt und fotografiert. Je Well wurden 5 ROI's ausgewählt und in 20-facher Vergrößerung fotografiert. a zeigt die Negativkontrolle ohne Kleberkontakt, b zeigt die Positivkontrolle mit TritonX-100, c bis e zeigen die Zellen, welche an Tag 1, 3 und 6 auf kleberbeschichteten Glasplatten ausgesät wurden.

Äquivalent zu dem Test im soeben beschriebenen Versuchsansatz (Kap. 3.2.3.) wurden je Tag 3 Bilder erstellt und je 5 ROI's ausgezählt. Abbildung 31a zeigt eine deutliche Vermehrung der Zellen im Well der Glasplättchen ohne Kleberbeschichtung. Die Zahl der Zellen auf den kleberbeschichteten Glasplättchen

liegt leicht unter den Werten der Kontrollen, steigt jedoch deutlich im Verlauf. An Tag 1 und Tag 3 liegt die Zahl der avitalen Zellen im entsprechenden Bereich wie die der Kontrollen.

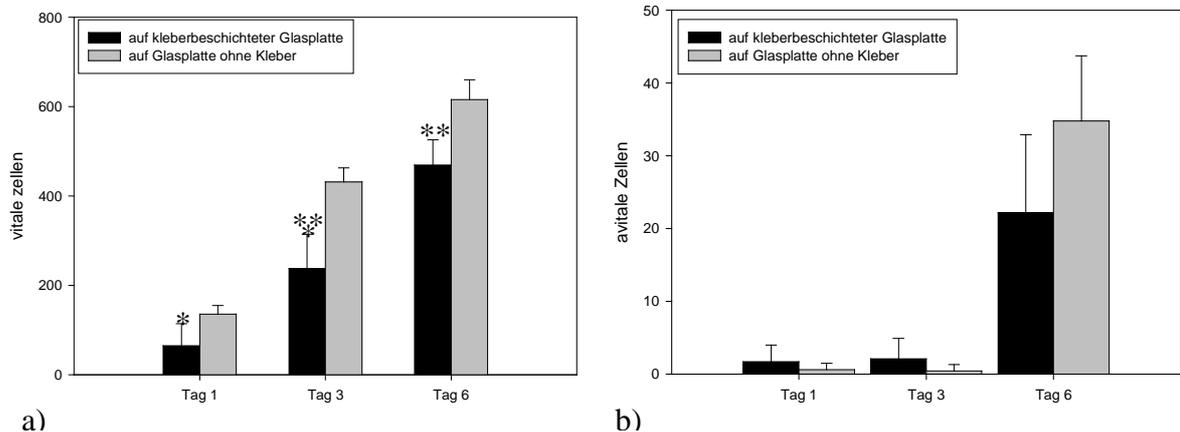


Abbildung 31: Zellvitalität, Versuchsprinzip B

Ergebnisse der Auszählung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder. Dargestellt sind die absoluten Zahlen der a) vitalen und b) avitalen Zellen (ausgesät 200.000 Zellen je 9,6cm²) nach Inkubation von 1,3 und 6 Tagen auf kleberbeschichteten Glasplatten und unbeschichteten Kontrollglasplatten. Die Experimente wurden je 3-fach ausgeführt, 5 ROI's wurden fotografiert und die Zellen gezählt. Dargestellt sind die Mittelwerte. * = T-Test $p < 0,001$ in Bezug auf das Wachstum von Tag 1 auf Tag 3 und ** = T-Test: $p < 0,001$ in Bezug auf das Wachstum von Tag 3 auf Tag 6.

Die prozentual erstellten Daten aus den absoluten Zahlen der Abb. 31 (Abb. 32) zeigen, dass die Werte für Zellen auf kleberbeschichteten Glasplättchen und Glasplättchen ohne Kleber kaum voneinander abweichen.

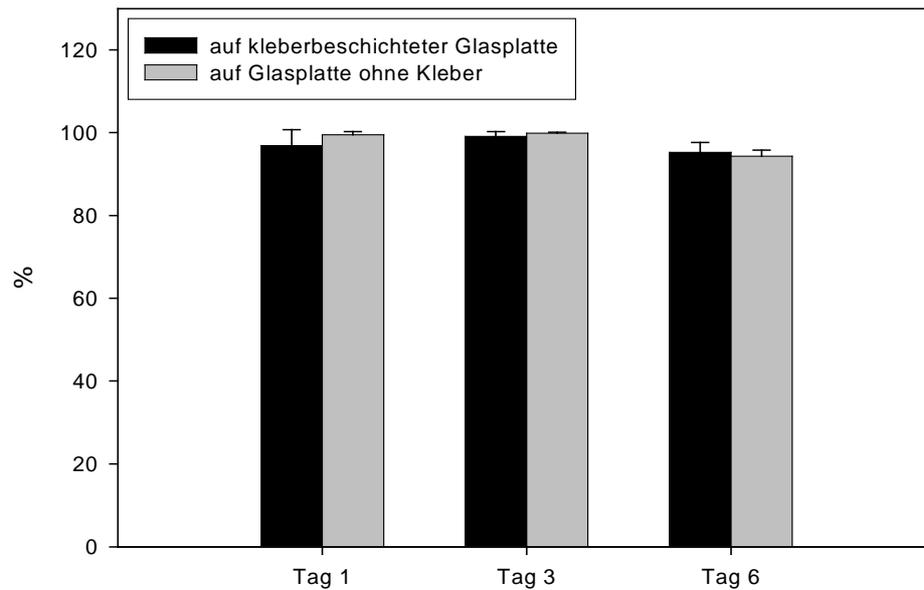


Abbildung 32: Zellvitalität in Prozent, Versuchsprinzip B

200.000 Zellen wurden gemäß Versuchsprinzip B auf mit Kleber beimpften Glasplättchen ausgesät. Als Kontrolle dienen Glasplättchen ohne Kleberbeschichtung. Dargestellt sind die vitalen Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle an Tag 1, Tag 3 und Tag 6.

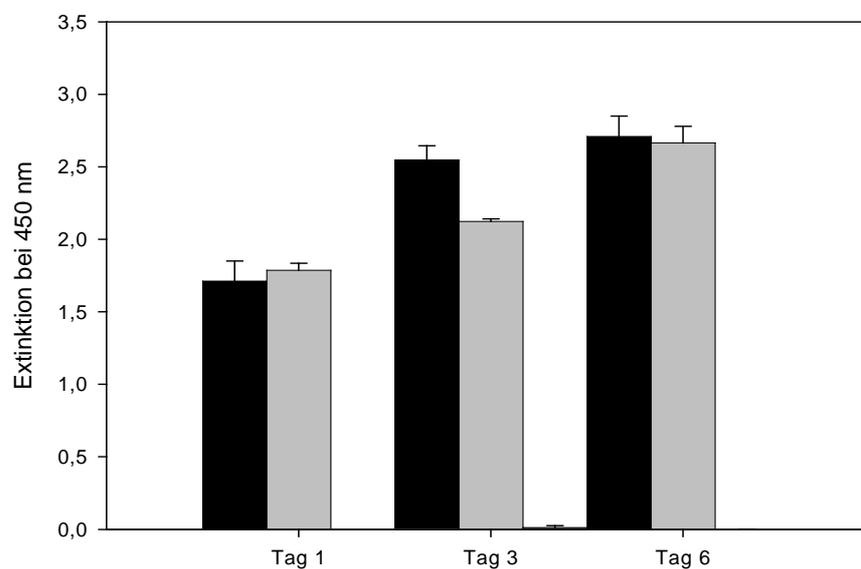


Abbildung 33: Zellvitalität WST-I, Versuchsprinzip B

Extinktionsergebnisse des WST-I-Assays, gemessen bei 450 nm nach Kultivierung der Zellen für 1, 3 und 6 Tage auf kleberbeschichteten Glasplatten und Kontrollen. Dargestellt sind die Mittelwerte nach Abzug des Nullwertes.

Zur Verifizierung der mittels „Live/Dead Assay“ gewonnenen Daten wurde auch hier ein WST-I-Assay durchgeführt. Die gemessenen Extinktionen bestätigen die Ergebnisse. Extinktionswerte für die Zellen der kleberbeschichteten Glasplättchen liegen zwischen 1,75 und 2,75. In diesem Bereich liegen auch die Werte der Zellen mit kleberlosen Glasplättchen (Abb. 33).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden experimentellen Untersuchung war es – unter den Voraussetzungen und Anforderungen die an einen Knochenklebstoff gestellt werden – einen neuartigen biologischen Knochenklebstoff bezüglich seiner Biokompatibilität kritisch zu prüfen. Dabei konnten Eigenschaften wie die Applikation, das Trocknungsverhalten und das Verhalten des Klebstoffes in Kulturmedium, sowie die Veränderungen der Zellen durch den Klebstoff dargestellt werden. Die oben genannten Aspekte wurden mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie, Zellzählung und Vitalitätsassay WST-I-Assay geprüft und statistisch ausgewertet.

Ein Material ist biokompatibel, wenn es eine angemessene Gewebsreaktion des Empfängers bei spezifischer Applikation erzeugt (Williams et al. 1987). Dieser Satz beinhaltet verschiedene Anforderungen an ein Material, welche von Kawahara folgendermaßen beschrieben werden: Es darf nicht toxisch oder kanzerogen, noch darf es mutagen für einen Organismus wirken. Bei Implantaten sollten diese zelladhäsiv sein und nicht zu einer Sensibilisierung des Gewebes führen (Kawahara 1985). In einer Zellkultur wird besonders Zellmigration, -adhärenz, -proliferation, -wachstum, -differenzierung, sowie metabolische Leistung gefordert (ISO Part 12 1998). Ein Material, welches im menschlichen Körper verwendet oder mit ihm in unmittelbarem Kontakt steht, muss diese Kriterien zwingend erfüllen. Da jedoch die Biokompatibilität von Materialien abhängig von vielen Eigenschaften ist (biologisches Verhalten, physio-chemische und mechanische Eigenschaften), müssen zusätzlich weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

Die biomechanischen Tests wurden von einem unserer Kooperationspartner, dem Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm, übernommen. Hierzu wurden Diaphysen von Rinderfemora und Rindertibiae in definierter Größe (40x8x8mm) mit verschiedenen Kombinationen der Kleberkomponenten verklebt und durch Zug auf ihre Haftkraft untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Variabilität der verschiedenen Klebergemische, da diese nach Lösung des Kleberpulvers unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Ein Auszug des Ergebnisse der Haftkraft ist in Tabelle 1 dargestellt. Für unsere Versuche wurde die haftstärkste Verbindung ausgewählt (Kleber D). Die Herstellung und Bereitstellung des biologischen Zweikomponentenklebstoffes erfolgte durch das Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth. Hier wurde das in Kapitel 1.5.1 beschriebene Klebprinzip auf biologisch abbaubare Substanzen (Chitosan, Dextran) übertragen. Die Aldehydgruppe des Dextrans verbindet sich unter Wasserabspaltung mit der Aminogruppe des Chitosans und bildet ein sogenanntes Imin (Schiff'sche Base) aus (siehe Abb. 4).

4.1. Klebstoffproben

Im vorliegenden Fall wurden als Kleberkomponenten Chitosan und Dextran verwendet. Diese beiden biologischen Materialien entsprechen grundsätzlich den Anforderungen an ein bioresorbierbares und -degradierbares Material. Es konnte mehrfach belegt werden, dass die Komponenten in ihrer Grundform nicht in den Organismus eingreifen und somit auch ein gutes Zellwachstum erfolgt (Rao et al. 2004, Chou et al. 2003a und 2003b, Fakhry et al. 2004).

Das polyanionische Polysaccharid Chitosan wird durch Deacetylierung aus Chitin gewonnen (Abb. 34). Es ergeben sich Moleküle die aus etwa 2000 Monomeren

bestehen, und somit eine beachtliche Größe erreichen können.

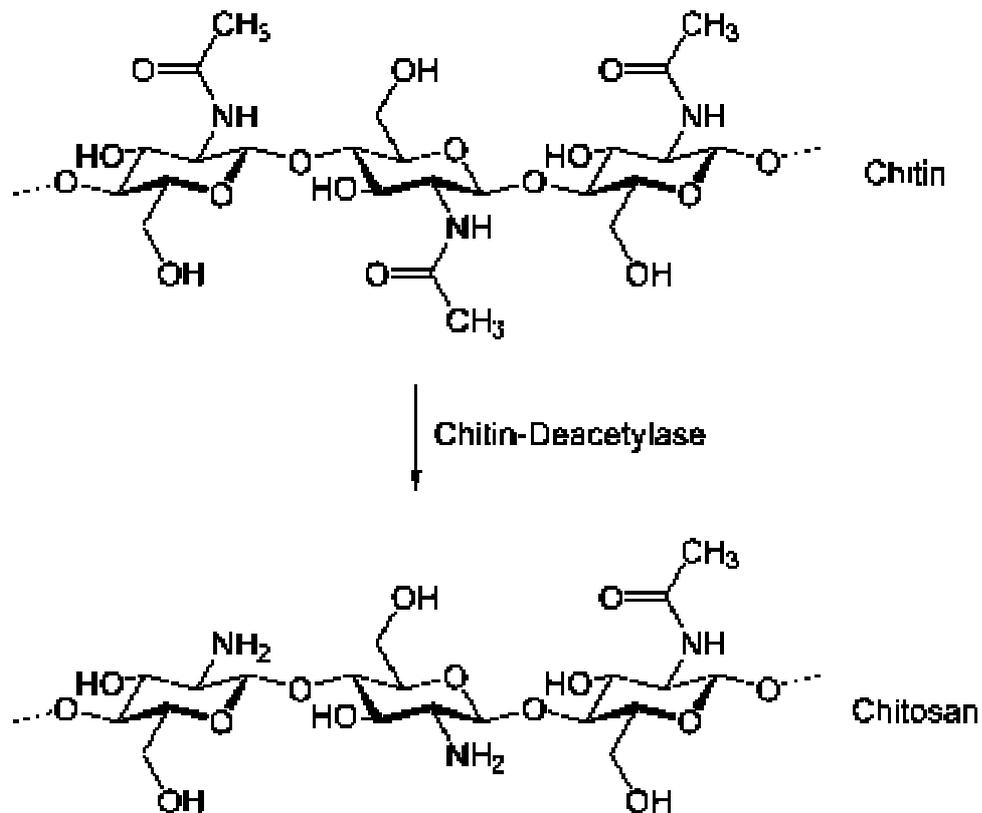


Abbildung 34: Entstehung von Chitosan aus Chitin

Dabei ist wichtig, in welcher Dosierung Chitosan verwendet wird. In hoher Dosierung hemmt es die Migration von Fibroblasten, was zu Kommunikationsstörungen zwischen den Zellen führen kann. Unter Umständen absorbiert es migrationsfördernde Stoffe aus dem Kulturmedium oder es veranlasst die Zellen zur Bildung motilitätshemmender Substanzen (Okamoto et al. 2002, Fakhry et al. 2004). Durch seine Fähigkeit, Proteine binden zu können, ist es in der Lage, auch Wachstumsfaktoren zu binden und damit zu inaktivieren (Mori et al. 1997). Dass es in sehr hohen Dosen die Zellproliferation vermindert, scheint eine der Auswirkungen zu sein. Es wurden viele Methoden, wie zum Beispiel mischen mit anderen Polymeren, zum Umgehen dieser Problematiken erforscht (Sarasam et al. 2005, Jiang et al. 2006). Jedoch wurde Chitosan in der Literatur bereits als Grundmaterial

für Leitschienen oder Kleber verwendet (Salgado et al. 2004, Subramanian et al. 2005), da es auch viele positive Eigenschaften besitzt. In angemessenen Dosen wirkt es sich positiv auf die Fibroblastenproliferation aus, da es einen Komplex mit Heparin bilden kann. Auch gefäßproliferative Eigenschaften über Interleukin-8 sind beschrieben worden (Mori et al. 1997). Es ist nicht toxisch (Rao and Sharma 1997) und hat hämostatische Funktionen, welche unabhängig von der Gerinnungskaskade sind, da sie auf eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels beruhen (Chou et al. 2003a und 2003b). Auch eine entzündungshemmende und antimikrobielle Wirkung sind in der Diskussion (Andres et al. 2007). Chitosan fördert die Bildung von Interleukin-10 (IL-10), welches ein wichtiger anti-inflammatorischer Wirkstoff ist. Außerdem hemmt es die Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2), was zu einer Reduktion der Überproduktion von Prostaglandin-E₂ (PGE₂) führt. Letztendlich vermindert es die Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) oder Interleukin 1 β (IL-1 β) (Chou et al. 2003a).

Das oxidierte Dextran ist ein verzweigtes Biopolysaccharid, welches aus Glukoseeinheiten besteht. Es ist wasserlöslich, wobei jedoch das Produkt eine schleimartige Konsistenz aufweist. Dextrane können in der Medizin als Blutplasmaersatzmittel eingesetzt werden (Wissenschaft-Online-Lexika), da ihre molekulare Masse (etwa 75000 Da) der des Blutes entspricht. Sie wirken dabei als Thrombozytenaggregationshemmer (Aloy 2007). Das in unseren Versuchen verwendete oxidierte Dextran wurde durch Oxidation, Dialyse und Gefriertrocknung gewonnen und so hergestellt, dass besonders viele reaktive Aldehydgruppen enthalten sind.

4.2. Versuchsaufbau

Für alle Versuche wurden MC3T3-E1 Zellen verwendet, da sie für die Anzahl und der Art der Versuche bestens geeignet und auch in verschiedenen Toxizitätstestungen verwendet wurden (Tokura et al. 2001, Ren et al. 2002). Auch das Adhäsionsverhalten und die Induktion der Differenzierung wurden hinreichend erforscht (El Ghannam et al. 2004, Tachibana et al. 2005). Die Zelllinie ist schon seit langem in der Forschung bekannt und ausreichend für die Zellkultur charakterisiert worden (Sudo et al. 1983). Die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) garantiert außerdem Keimfreiheit, Verdoppelungszeit, Morphologie und Differenzierung. Natürlich spielt auch die unkomplizierte und kostengünstige Beschaffung eine große Rolle.

All diese Voraussetzungen müssen an eine Zelllinie gestellt werden, da nur so ein Vergleich und eine Reproduzierbarkeit der Versuche erzielt werden kann. Die „International Organization of Standardization“ (ISO 1998) ist eine der größten Entwickler und Veröffentlichender von internationalen Standards. Für die durchgeführten Versuche sind die ISO 10993-5 und -12 „Tests for in vitro toxicity“ und „preparation of reference material“ die Grundlage, da strenge Auflagen für Biomaterialien auch im Hinblick auf die spätere klinische Verwendung, erfüllt werden müssen. Die ISO schreibt bestimmte Rahmenbedingungen vor, engt jedoch die Versuchsreihen nicht ein. Es ist freigestellt, über welchen Zeitraum getestet wird oder ob Material in direktem oder indirektem Kontakt zu den Zellen steht.

Unser Projektteil wurde in zwei Bereiche gegliedert: In **Versuchsansatz A** (A) wurde der Klebstoff in drei Varianten getestet. Im indirekten Versuch wurde der Kleber für 24 Stunden mit Kulturmedium beimpft und dieses Medium wurde anschließend auf die bereits adhärennten Zellen gegeben. Der direkte Versuch lief ebenfalls über 24 Stunden und testete die Zellen auf dem ausgestrichenen Kleber und auf seinen Einzelkomponenten. Als Kontrollen wurde hier das Kulturmedium ohne Kleberkontakt und das kostengünstige, aber dennoch zelltoxische Kupfer in Form von kleinen runden Plättchen verwendet (Rau et al. 2004).

Versuchsansatz B (B) wurde im Gegensatz zu A, der Kleber glatt auf dem Wellboden aufgestrichen und vor dem Auftragen der Zellen zunächst angetrocknet. Es wurde ein indirekter Test mit Eluat und zwei direkte Testverfahren mit dem glattgestrichenem Klebstoff und kleberbeschichteten Glasplättchen durchgeführt. Diese Versuche liefen über 6 Tage, da die längerfristigen Auswirkungen des Klebers getestet werden sollten. Hier wurde als Negativkontrolle ebenfalls das Kulturmedium ohne Kleberkontakt verwendet. Die Positivkontrolle wurde allerdings mit TritonX-100 durchgeführt, da eine Verfälschung des Vitalitätsassays durch die Kupferplättchen nicht auszuschließen war.

Der Unterschied der beiden Versuchsansätze bestand darin, dass bei A der Kleber nicht völlig glatt auf dem Wellboden verstrichen wurde und somit eine unebene und feuchte Oberfläche für die Zellen entstand. Der Kleber wurde mittels Pipettenspitze so gut wie möglich verteilt. Es entstanden dabei jedoch Bereiche, in denen die Kleberschicht dicker und andere Bereiche, in denen sie dünner aufgetragen war. In B wurde der Kleber mittels Drigalski-Spatel (Abb. 17) glatt auf dem Wellboden verteilt, so dass keine Unebenheiten entstanden. Ein weiterer Unterschied bestand darin,

dass der Kleber bei A nicht völlig getrocknet war, bevor er mit FBS gespült wurde. In B wurde der Kleber vor dem Spülen mindestens 72 Stunden getrocknet. Das Spülen mit FBS soll ein Abpuffern der freien reaktiven Gruppen bewirken, die zu Zellvitalitäts- und motilitätsstörungen führen könnten.

4.3. Ergebnisse

Aus der Literatur geht hervor, dass die Einzelkomponenten Chitosan und Dextran in angepassten Dosen den gestellten Anforderungen der Biokompatibilität entsprechen (Subramanian et al. 2005, Fakhry et al. 2004). Die Ergebnisse wurden unter anderem mittels des Vitalitätsassay WST-I erstellt, welcher in Kapitel 2.3.2 bereits ausführlich erläutert wurde. Er wird zur Bestimmung der Zellvitalität verwendet, da er leicht anwendbar, kostengünstig und im Gegensatz zu anderen Methoden (H^3 Thymidin Assay) nicht radioaktiv ist (Weir et al. 2006). Alternativ wurde noch der „Live/Dead Assay“ verwendet, der Aussagen über die Zellmorphologie und somit auch deren Aktivität macht.

In Versuchsaufbau A wurden Chitosan und Dextran als Einzelkomponenten auf Zytotoxizität getestet. Die Ergebnisse zeigten im WST-I-Assay keine mitochondriale Aktivität, was zeigt, dass das Wachstum der Zellen deutlich eingeschränkt sein muss. Die hohe Konzentration der Komponenten (200 μ l je Kleberkomponente je Well) und das Vorliegen freier radikaler Gruppen können diese Reaktion erklären. Auch die Extinktionswerte der mit Kleber in direktem Kontakt befindlichen Zellen zeigen eine geringe Aktivität. Da die Einzelkomponenten des Klebers eine gelartige Konsistenz besitzen und schlecht zu pipettieren waren, kann nicht von einem 1:1 Mischungsverhältnis ausgegangen werden. Dies führt zu einer Mehrheit von freien

reaktiven Gruppen, welche möglicherweise (wie bei den Einzelkomponenten) anti-proliferativ wirken. Die in Versuchsansatz A getesteten Zellen mit Eluatkontakt zeigen bei der Verdünnung von 10% eine deutlich bessere Aktivität, da hier das Zell-Eluat Verhältnis zu Gunsten der Zellen verschoben ist und die freien reaktiven Gruppen vermutlich mit dem Kulturmedium abgepuffert werden.

In Versuchsansatz B wurde die Menge des Klebers verringert (25µl je Kleberkomponente je Well), da diese den physiologischen Verhältnissen *in vivo* mehr entsprechen. In einem *in vivo* Modell wäre der Klebstoff nur auf der zu klebenden Fläche und die umgebenen Zellen wären in mehreren Lagen vorhanden. In unserem Modell sind die Zellen nur als Monolayer ausgelegt, von daher ist realistischerweise auch nur eine geringe Klebermenge anzusetzen. Die Ergebnisse im WST-I-Assay zeigen bei dem Eluat des Klebers D annähernde Ergebnisse wie bei den Negativkontrollen mit Kulturmedium ohne Kleberkontakt. Das Trocknen des Klebers und das anschließende Spülen mit FBS zum Abpuffern der freien reaktiven Gruppen kann ausschlaggebend für diese Veränderung im Vergleich zum Versuchsprinzip A sein.

Da das 1:1 Verhältnis der Kleberkomponenten aufgrund der Viskosität nicht gewährleistet werden konnte, wurde der aufgetragene Kleber bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend ebenfalls gespült. Die WST-I Ergebnisse zeigen eine deutliche Aktivität der Zellen, die über den Zeitraum von 6 Tagen gleichbleibend ist. Das bedeutet, dass die Zellzahl gleichbleibend ist und die Zellen ihre Aktivität beibehalten, oder aber dass die Zellzahl zu- und ihre Aktivität abnimmt. Um die Ursache zu erforschen, wurden die Zellen gefärbt und Fluoreszenzaufnahmen angefertigt. Aus diesen Bildern wurden aussagenkräftige ROI's erstellt und die Zellen

gezählt. An den Fotos und dazugehörigen Graphen in Kapitel 3.2.3. ist deutlich zu erkennen, dass die Zellzahl ansteigt. Dass die Aktivität gleichbleibend ist, erklären wir uns mit der Größe der Wellplatte. Die ausgesäte Zellzahl betrug 500.000 Zellen je 6 Well. Da MC3T3-E1 sich in etwa 3 Tagen verdoppeln, sind die Zellen konfluent, was zu einem Proliferationsstopp führt, was wiederum bedeutet, dass ihre Aktivität sinkt.

Im Glasplättchenexperiment wurde versucht, möglichst viele Störfaktoren auszuschließen. Es wurden je Well nur noch 200.000 Zellen ausgesät und die Glasplättchen wurden vor dem Experiment in exaktem 1:1 Mischungsverhältnis beschichtet (s. Kap. 2.2.3.). Die WST-I Ergebnisse zeigen eine steigende Aktivität über die 6 Tage und die Fluoreszenzaufnahmen bestätigen, dass die Zellzahl deutlich zunimmt. Die Ergebnisse sind mit der Negativkontrolle vergleichbar. Durch die exakte stöchiometrische Aufbringung des Klebers auf die Glasplatten scheinen die reaktiven Gruppen alle abgefangen zu sein. Dies bewirkte, dass die Zellen in ihrer Kommunikation und Proliferation nicht gehemmt wurden und es zu einem Wachstum kam.

4.4. Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass mit einem ausgeglichenen Komponentenverhältnis, einer möglichst geringen Klebermenge und einer ausreichend hohen Zahl von Zellen (wie es im menschlichen Körper physiologischerweise der Fall ist) die zelltoxische Wirkung des Klebers gering ist. Da durch die biomechanischen und zytotoxischen Untersuchungen die Kleberkombinationen nun enger eingegrenzt werden konnten, muss in einem

weiteren Schritt auch die Biodegradierbarkeit des Klebesystems experimentell bestätigt werden. Dazu wäre eine 3-D Testung für die Haftkraft in physiologischer Kochsalzlösung allein und auch in Kombination mit Serum anzustreben. Es ist allerdings ein System von Nöten, welches eine physiologische Situation darstellt (beispielsweise eine Apparatur, die Knochenstücke unter Zug hält, nachdem der Kleber aufgetragen wurde). Diese Untersuchungen sollten durch elektronenmikroskopische Aufnahmen ergänzt werden, um Bruchkanten genauer analysieren und gegebenenfalls den Kleber entsprechend verändern zu können. Man kann unter Umständen dadurch nachvollziehen, an welchen Stellen der Kleber versagt und ob Kohäsion oder Adhäsion verbessert werden müssen.

Ein weiteres *in vitro* Modell für das Testen der Zellvitalität und Morphologie ist nötig. Da bisher nur Zellen als Monolayer getestet wurden, ist nun ein Verfahren nötig, um die physiologischen Verhältnisse im Körper besser nachzuahmen. Hierzu müssten spongiöse Leitschienen (z.B. Tutobone®) mit Zellen beimpft und in einer Durchflussskammer inkubiert werden. Nach erfolgreichem Wachstum der Zellen müssten die Leitschienen nun durchtrennt und mittels Klebstoff wieder verbunden werden. Nach definierten Zeitpunkten wäre es nun möglich histologische Schnittbilder anzufertigen, welche dann Aufschluss über Wachstum, Vitalität und Veränderungen der Zellen geben. Auch der Abbau des Klebers oder seine Integration in den Zellverband ließen sich somit darstellen.

Eine *in vivo* Versuchsreihe im Tiermodell wäre der letzte Schritt, um das Verhalten des Klebers auf den gesamten Organismus beurteilen zu können. Die Klebstärke, lokale Gewebsreaktionen, Knochenveränderungen und –resorptionen im Bereich des Bruches, mögliche systemische Reaktionen auf den Kleber und natürlich der Verlauf

der Klebstoffeigenschaften könnten untersucht werden. Abbauprodukte und Elimination durch den Organismus interessieren dabei besonders.

In der in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsreihe wurden die einzelnen Kleberkomponenten zunächst vom festen in den flüssigen Zustand überführt, dann kombiniert und erst dann aufgetragen. Da die Applikation unter Operationsbedingungen jedoch möglichst schnell und einfach durchführbar sein sollte, besteht auch hier noch Forschungsbedarf. Eine sofortige Abbindzeit und maximale Haftkraft sollten binnen weniger Minuten erreicht sein. Der Kleber sollte steril und über einen längeren Zeitraum lagerfähig sein. Hierzu sind Tests am Klebstoff nach Sterilisierung (z.B. mit Gammastrahlen) nötig. Die Viskosität des Klebstoffes sollte individuell veränderbar sein. Es muss sichergestellt werden, dass alle zu verklebenden Materialien vollständig mit Klebstoff benetzt sind. Jedoch sollte die Umgebung möglichst wenig Kleberkontamination aufweisen. Die Einstellung der Viskosität kann durch verschiedene Konzentrationen der Kleberkomponenten in den vorgefertigten Applikationen erfolgen, so dass nur noch verschiedene Mengen an Lösungsmittel hinzugegeben werden müssen.

5. Zusammenfassung

5.1. Einleitung

Bioresorbierbare Knochenkleber sind theoretisch eine attraktive Methode, um Knochenbrüche ohne Implantation von metallischen Osteosynthesen zu behandeln. Bislang setzte sich jedoch kein Knochenkleber klinisch durch, da die hohen Anforderungen, wie z.B. geringe zytotoxische Wirkungen und hohe Haftkraft, nicht erfüllt wurden. In einer Forschungskooperation mit dem Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth und dem Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm entwickelten wir einen bioresorbierbaren Zweikomponentenknochenklebstoff auf der Basis von Aldehyd- und Aminogruppen. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, den biomechanisch stärksten Kleber auf seine Zytotoxizität *in vitro* zu testen.

5.2. Material und Methoden

Der in den biomechanischen Testungen beste Kleber (Kleber D) besteht aus den Einzelkomponenten Chitosan 24h in 7%iger Verdünnung und oxidiertem Dextran 24h in 20%iger Verdünnung. Bei der Mischung dieser Komponenten findet eine chemische Reaktion der Aldehyd- und Aminogruppen statt, welche einen Klebeeffekt durch Ausbildung einer Schiff'schen Base erzielt. Getestet wurden die Einzelkomponenten, Kombinationen dieser Komponenten und die Überstände (=Euate) des Klebers D. Die für die Biokompatibilitätstestungen verwendete Zelllinie ist MC3T3-E1, da sie aufgrund ihrer positiven Eigenschaften gut für *in vitro* Untersuchungen geeignet ist. Im Verlauf der Tests sind zwei Versuchsansätze entwickelt worden. Für Versuchsansatz A wurden die Zellen auf den frisch angemischten und uneben verteilten Klebstoff in Multiwellplatten gegeben, nachdem

dieser mit FBS gespült wurde. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank sind die Tests durchgeführt worden. Versuchsansatz B wurde in drei Teile gegliedert.

1. Es wurden die Eluate des getrockneten Kleber D auf die bereits adhärenen Zellen gegeben.
2. Es wurde der Kleber D glatt in den Multiwellplatten ausgestrichen, getrocknet und mit FBS gespült. Erst danach sind die Zellen aufgetragen worden.
3. Es wurden vorgefertigte kleberbeschichtete Glasplättchen zusammen mit den Zellen in die Multiwellplatten eingebracht.

An Tag 1, Tag 3 und Tag 6 wurden Vitalität und Morphologie untersucht.

Die Auswertung ist mittels Zellzahlbestimmung und WST-I-Assay für die Zellvitalität und mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen für die Morphologie und die Wachstumsbestimmung erfolgt.

5.3. Ergebnisse

In Versuchsansatz A zeigte sich sowohl bei den Einzelkomponenten als auch bei den Kleberkombinationen eine durchweg niedrige Zellvitalität und -aktivität. Bei den Eluat-Testungen zeigte sich eine direkte Korrelation von Wachstum und Verdünnung der Eluate. Versuchsansatz B zeigte im Vergleich zur Kontrolle bei dem 100%igem Eluat des Kleber D ein zufriedenstellendes Zellwachstum über den Zeitraum von 6 Tagen. Wurde der Kleber zuvor getrocknet, konnte ein besseres Wachstum der Zellen über 6 Tage (Kontrollzellen/Testzellen - Tag 1: 88,6%/69,9%, Tag 3: 99,4%/81,7%, Tag 6: 95,5%/95,8%) festgestellt werden. Die Morphologie der Zelle wich jedoch von den physiologischen Formen der Kontrollzellen ab. Wurden die Zellen auf beschichteten Glasplättchen gezüchtet, wiesen sie ein signifikant besseres Wachstum über 6 Tage auf Kontrollzellen/Testzellen - Tag 1: 99,5%/96,8%, Tag 3:

99,9%/99,1%, Tag 6: 94,3%/95,2%) . Auch morphologisch glichen sie hier den Kontrollgruppen.

5.4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ist ein biologisch abbaubarer Knochenkleber auf seine Zytotoxizität *in vitro* getestet worden. Das Aufbringen der Zellen auf einen kleberbeschichteten Untergrund führte zu einem raschen Zelltod, was eine schlechte Biokompatibilität bedeuten würde. Es wäre jedoch möglich, dass die zytotoxische Wirkung des Klebstoffes in Versuchsansatz A durch nicht abgesättigte freie reaktive Gruppen des Klebstoffes verursacht worden ist. Das kann zu einer Verklebung der Zellen untereinander geführt, oder auch die Nährstoffe aus dem Kulturmedium verbraucht haben, was zu mangelhafter Kommunikation, Unterversorgung und schließlich zum Zelltod geführt haben könnte. In Versuchsansatz B war der Kleber getrocknet, bevor er mit FBS gespült wurde. Dies hat möglicherweise die reaktiven Gruppen abgefangen und erklärt das bessere Überleben. Die Glasplättchen enthielten exakt die gleiche Menge jeder Kleberkomponente, im Gegensatz zu dem eigenhändig aufgetragenem Kleber D, weshalb sie bezüglich der Biokompatibilität am besten abschnitten.

Zusammenfassend zeigt die hier vorliegende Arbeit, dass der von uns entwickelte Klebstoff eine zufriedenstellende Biokompatibilität aufweist, vorausgesetzt, dass er in einem korrekten Verhältnis gemischt wird. Ferner hat unsere Arbeit gezeigt, dass es für bioresorbierbare Knochenklebstoffe noch Entwicklungsbedarf gibt. Es müssen noch weitere *in vitro* Versuche bezüglich des Klebstoffverhaltens der Dosierbarkeit und der Biomechanik unter physiologischen Bedingungen erfolgen. Ein Tiermodell

könnte Aufschluss über mögliche systemische Reaktionen geben.

6. Literaturverzeichnis

1. Adler CP (1998): Diagnostik makroskopischer, histologischer Knochenkrankheiten und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts; Springer 1998: 6-25
2. Aloy A (2007): Chirurgische Intensivmedizin: Kompendium für die Praxis. S. 295, Springer
3. Andres Y, Giraud L, Gerente C, Le Cloirec P (2007) : Antibacterial effects of chitosan powder: mechanisms of action; Environmental Technology 28(12): 1357-1363
4. Beck H (1966): Kunststoffklebung mit Cyanoacrylaten an Sehnen- und Knochengewebe; Langenbecks Arch Chir 316: 563-568
5. Bloch B (1958): Bonding of fractures by plastic adhesives; J Bone Joint Surg Br 40-B: 804-812
6. Borner M, Schneider E, Pirnia F (1994): The detergent Triton X-100 induces a death pattern in human carcinoma cell lines that resembles cytotoxic lymphocyte-induced apoptosis; FEBS Letters 353: 129-132
7. 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: 753-763
8. 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: 593-606

9. Brug E, Braunsteiner E, von Gemmern C (1976): Die Ultraschallverschweissung von Knochen, vorläufige Ergebnisse; Der Chirurg 47(10): 555-558
10. Buchner H, Feischl P (1962): Spätergebnisse bei der Behandlung von Knochenbrüchen mit Polyurethanschaum; Arch Orthop Unfallchir 54: 48-57
11. Buchner H (1961): Erfahrungen mit Polyurethanschaum (Ostamer) bei der Behandlung von Knochenbrüchen; Klein Med (Wien) 16: 264-288
12. 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
13. Chou TC, Fu E, Shen EC (2003a): Chitosan inhibits prostaglandin-E2 formation and Cyclooxygenase-2 Induktion in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages; Biochem Biophys Res Commun 308: 403-407
14. Chou TC, Fu E, Wu CJ, Yeh JH (2003b): Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation; Biochem Biophys Res Commun 302: 480-483
15. Coover HW, Joyner FB, Shearer NH (1959): Chemistry and Performance of cyanoacrylate Adhesives; SPE Journal 15: 413-417
16. Donkerwolcke M, Burny F, Muster D (1998): Tissues and bone adhesives - historical aspects; Biomaterials 19: 1461-1466
17. El Ghannam, Ducheyne P, Risbud M, Adams CS, Shapiro IM, Castner D (2004): Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast; J Biomed Mater Res 68A: 615-627
18. Ennker J (1994): Gewebestoffe in der Thorax- und Kardiovaskularchirurgie; Steinkopff Verlag, Darmstadt
19. Fa. Nunc: Wellgrößen

20. Fakhry A, Schneider GB, Zaharias R (2004): Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts; *Biomaterials* 25: 2075-2079
21. Fu J, Ji J, Yuan W (2005): Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan; *Biomaterials* 26: 6684-6692
22. Giebel G, Rimpler M (1981): Klebungen am Skelettsystem Teil 1; *Biomed Tech (Berl)* 1981 Mar; 26(3): 35-40
23. Giebel G, Rimpler M (1981): Klebungen am Skelettsystem Teil 2; *Biomed Tech (Berl)* 1981 Jul-Aug; 26(7-8): 170-174
24. Hedri A (1931): Ein neues Prinzip der Osteosynthese; *Arch f klin Chir* 167: 145-146
25. Heiss C, Schnettler R (2003): Bioresorbierbare Klebstoffe in der operativen Traumatologie und Orthopädie; *Biomaterialien* 4: 298-304
26. Hoffmann B., Volkmer E., Kokott A., Augat P., Ohnmacht M., Sedlmayr N., Schiker M., Claes L., Mutschler W., Ziegler G. (2009): Characterisation of a new bioadhesive system based on polysaccharides with the potential to be used as a bone glue; *J Mater Sci Vol 20*; 2001-2009
27. Hoyt W (1969): Diskussionsbeitrag; *J Bone Jt Surg* 1969; 42-A(5): 878
28. Hulliger H (1962): Untersuchungen über die Wirkung von Kunstharzen (Palacos und Ostamer); *Arch orthop Unfallchir* 54: 581-588
29. Hwang JJ, Strupp SI (2000): Poly(amino acid) bioadhesives for tissue repair; *J Biomater Sci Polym Ed* 11: 1023-1038
30. Industrieverband Klebstoffe ev. – Handbuch Klebstoffe 1998/2000
31. Isonorm 10993-12 (1998) - preparation of reference materials

32. Isonorm 10993-5 (1999) - biological evaluation of medical devices, in vitro tests
33. 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: 209-211
34. Jiang T, Abdel-Fattah W, Laurencin Ct (2006): In vitro evaluation of chitosan/poly(lactic acid-glycolic acid) sintered microsphere scaffolds for bone tissue engineering; *Biomaterials* 27: 4894-4903
35. Kawahara H (1985): Biological requirements for biomaterials; *Implantologist*: 3 (2):41-49
36. Koehnlein HE, Lemperle G (1969): Experimental studies with a new gelatinresorcin-formaldehyde glue; *Surgery* 66(2): 377-382
37. Kort J (1971): *Klebstoff in der Chirurgie*; Schattauer Stuttgart, New York
38. Kühn KD (2001): *Knochenzemente für die Endoprothetik*; Springer Berlin Heidelberg New York
39. Leemann RA, Hedinger C, Jenny M (1961): Tierexperimentelle und histologische Ergebnisse bei der Frakturleimung mit dem Polyurethanpolymer Ostamer; *Schweiz med Wschr* 91: 908-914
40. Liu H, Du Y, Wang X (2004) : Chitosan kills bacteria through cell membrane damage; *Int J Food Microbio* 95: 147-155
41. Matsumoto T (1968): Vienna international symposium - tissue adhesives in surgery; *Arch Surg* 96(2): 226-230
42. Maurer P, Bekes K, Gernhardt CR (2004): Tensile Bond strength of different adhesive systems between bone and composite compared; *J Craniomaxillofac Surg* 32(2): 85-89

43. Mayer G, Muster D, Schmitt D (1979): Bone bonding through bioadhesives: present status; *Biomater Med Devices Artif Organs*: 7(1): 55-71
44. 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: 1193-1205
45. Montanaro L, Arciola CR, Cenni E (2000): Cytotoxicity, blood compatibility and antimicrobial activity of two cyanoacrylate glues for surgical use; *Biomaterials* 22(1): 59-66
46. 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: 947-951
47. 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: 1975-1979
48. Otani Y, Tabata Y, Ikada Y (1998a): Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin-poly(L-glutamic acid) mixture; *Biomaterials* 19: 2167-2173
49. 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: 922-926
50. Pantel B (2001): *Das Bogenbauer Buch*
51. Rao SB, Sharma CP (1997): Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential; *J Biomed Mater Res* 34: 21-28
52. 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: 335-342
53. Ren L, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A (2002): Novel approach to fabricate porous gelatin-siloxane hybrids for bone tissue engineering; *Biomaterials* 23: 4765-4773
54. Rensing L, Cornelius (1998): *Grundlagen der Zellbiologie*; Verlag Eugen Ulmer Stuttgart
55. Rietz KA (1964): Polymer osteosynthesis. Experimental studies with an epoxy resin; *Acta Chir Scand* 128: 387-401
56. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL (2004): Novel starch-based scaffolds for bone tissue engineering: cytotoxicity, cell culture and protein expression; *Tissue Eng* 10: 465-474
57. Sarasam AR, Madhivaly S (2005): Characterization of chitosan-polycaprolactone blends for tissue engineering applications; *Biomaterials* 26: 5500-5508
58. Sawai H, Domae N (2007): Release of cytochrome c from mitochondria precedes Bax translocation/activation in Triton X-100-induced apoptosis; *Leuk Res Mar*;32(3):445-453
59. Schmeissner H (1970): Chemische und physikalische Eigenschaften der Zyanoacrylate; *Dtsch Zahnärztl Z* 25(9): 907-913
60. Schnabelrauch M, Vogt S (1999): Werkstoffe für die Medizintechnik; In: Planck H Stallforth H (Hrsg); *Werkstoffwoche 98, Symposium 4 WILEY-VCH, Weinheim* p: 161-166
61. Smith DC (1973): Lutes, glues, cements and adhesives in medicine and dentistry; *Biomed Eng*: 8(3): 108-115 passim

62. Strupp W, Weidinger G, Scheller C (2000): Treatment of Cells with Detergent Activates Caspases and Induces Apoptotic Cell Death; *J of Membrane Biol* 175: 181-189
63. Subramanian A, Lin HY (2005): Crosslinked Chitosan: Its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation; *Wiley Periodicals*: 742-753
64. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y (1983): In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria; *J of cell Biol Vol 96*: 191-198
65. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1996): In vitro differentiation in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria; *J. Cell. Biol.* 96, 191-198
66. Sung HW, Huang DM, Chang WH, Huang RN, Hsu JC (1998): Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: in vitro study; *J Biomed Mater Res* 46: 520-530
67. Tachibana A, Kaneko S, Tanabe T, Yamauchi K (2005): Rapid fabrication of keratin-hydroxyapatite hybrid sponges toward osteoblast cultivation and differentiation; *Biomaterials* 26: 297-302
68. Taylor C, Cheetham N.W.H., Walker G.J (1984): Application of High-Performance liquid Chromatography to a study of branching in Dextran, *Carbohydr. Res* : 137:1-12
69. Tipler PA (2004): Physik
70. Tittel I (2005): Zwischenbericht
71. Tokura S, Tamura H (2001): O-carboxymethyl-chitin concentration in granulocytes during bone repair; *Biomacromolecules* 2: 417-421

72. Tseng YC, Tabata Y, Hyon SH (1990): In vitro toxicity test of 2-cyanoacrylate polymers by cell culture method; J Biomed Mater Res 24(10): 1355-1367
73. Weber SC, Chapman MW (1983): Adhesives in orthopaedic surgery; Clin Orthop Rel Res: 249-261
74. Weir MD, Xu HH, Simon CG Jr (2006): Strong calcium phosphate cement-chitosan-mesh construct containing cell-encapsulating hydrogel beads for bone tissue engineering; J Biomed Mater Res A.: 77(3):487-96
75. Wenz R (1998): First results with a bioresorbable bone glue; Biomat in Surg GHIM Walenkamp Thieme Verlag
76. Williams DF, de Putter C, de Lange GL, de Groot K, Lee AJC (1987): Consensus and definitions in biomaterials Implant Materials in Biofunction; Journal of Polymer Science Part C: Polymer letters 26 (9): 414
77. Wissenschaft-Online-Lexika: Eintrag zu Dextrane im Lexikon der Chemie
78. Zysk SP, Gebhard H, Plitz W (2004): Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint; J Biomed Mater Res 71B(1): 108-115
79. www.iso.org
80. www.plexiglas.de
81. www.klebstoffe.com
82. www.fbi-biomaterialien.de
83. www.biomechanics.de
84. www.experimed.de

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip des Klebevorganges

Abbildung 2: Aufbau einer eukaryoten Zelle

Abbildung 3: Zellmorphologie in mikroskopischen Bildern

Abbildung 4: Ausbildung einer Schiff'schen Base

Abbildung 5: Strukturformel Chitosan

Abbildung 6: Strukturformel Dextran

Abbildung 7: Chitosan und Dextran, trocken

Abbildung 8: Chitosan und Dextran, gelöst

Abbildung 9: Glasplättchen mit Kleberbeschichtung

Abbildung 10: Neubauer Zählkammer

Abbildung 11: Neubauer Quadranten und Trypan-Blau-Färbung

Abbildung 12: Reaktionsformel des WST-I-Assays

Abbildung 13: FDA/PI Färbung: „Live/Dead Assay“

Abbildung 14: Versuchsprinzip A

Abbildung 15: Kupferplättchen

Abbildung 16: Strukturformel TritonX-100

Abbildung 17: Drigalski-Spatel

Abbildung 18: 6-Well mit ausgestrichenem Kleber

Abbildung 19: Versuchsprinzip B

Abbildung 20: Zellvitalität nach Inkubation mit Eluat des Kleber D

Abbildung 21: Zellvitalität nach Inkubation mit versch. Kleberkombinationen

Abbildung 22: Zellvitalität nach Inkubation mit den Einzelkomponenten

Abbildung 23: Farbdarstellung des WST-I-Assays nach Inkubation

Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Vorversuch Trocknungszeiten

Abbildung 25: Zellvitalität nach Inkubation mit Eluat des Kleber D

Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Versuchsprinzip B

Abbildung 27: Zellvitalität Versuchsprinzip B

Abbildung 28: Zellvitalität in Prozent, Versuchsprinzip B

Abbildung 29: Zellvitalität WST-I, Versuchsprinzip B

Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, Versuchsprinzip B

Abbildung 31: Zellvitalität Versuchsprinzip B

Abbildung 32: Zellvitalität in Prozent, Versuchsprinzip B

Abbildung 33: Zellvitalität WST-I, Versuchsprinzip B

Abbildung 34: Entstehung von Chitosan aus Chitin

Tabelle 1: Darstellung der Haftkraft und Haftfestigkeit der getesteten Kleber

Tabelle 2: Geräte, Material und Reagenzien

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Für die Bereitstellung der technischen und fachlichen Möglichkeiten danke ich meinem Doktorvater PD. Dr. med. Matthias Schieker. Besonderer Dank gilt meinen Betreuern seitens des chirurgischen Forschungslabors der LMU/Innenstadt Dr. med. Elias Volkmer und Dr. rer. nat. Hülya Gülkan, die mit ihrem Interesse und ihrer Unterstützung maßgeblich zur Realisierung dieses Projektes beigetragen haben. Auch den übrigen Mitarbeitern in diesem Labor sei an dieser Stelle gedankt.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Bettina Hoffmann und Dr. rer. nat. Andreas Kokott vom Friedrich-Baur-Institut in Bayreuth für die Bereitstellung der Kleberkomponenten und Glasplättchen bedanken. Für die Durchführung der mechanischen Versuche danke ich dem Team des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik in Ulm.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für Ihre vielfältige Unterstützung, insbesondere danke ich meinem Lebensgefährten Richard Wagensohner für seine stetige Ermunterung und Hilfe bei allen kleinen und größeren Problemen im Entstehungsprozess dieser Arbeit.

Lebenslauf

Zur Person

Name: Nicole Sedlmayr
Geburtstag und Ort: 18.02.1981 in Itzehoe

Schulbildung

1987 - 1990: Grundschule Itzehoe
1990 - 2000: Kaiser-Karl-Schule Itzehoe, Gymnasium
2000: Allgemeine Hochschulreife

Studium

2001 – 2008: Studium der Humanmedizin an der LMU München
Herbst 2008: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Weiterbildung

Jan 09-Apr 10: Assistenzärztin im Kreiskrankenhaus Erding
(Unfallchirurgie)
Seit Mai 2010: Assistenzärztin im Klinikum Landshut (Unfallchirurgie)

Hobbies: Sport, Bergsteigen, Klettern, Geocaching

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Tittel I, Sedlmayr N, Gülkan H, Hoffmann B, Kokott A, Detsch R, Ziegler G, ,
Mutschler W, Schieker M (2004): Cytotoxicity of hard tissue adhesives in vitro
Langenbecks Arch Surg Vol 389(5): 461 [12]

Hoffmann B, Volkmer B, Kokott A, Augat P, Ohnmacht M, Sedlmayr N, Schieker M,
Claes L, Mutschler W, Ziegler G (2009): Characterisation of a new bioadhesive
system based on polysaccharides with the potential to be used as bone glue
J Mater Sci Vol 20: 2001-2009

