

# **Bericht zum Beratungsvertrag**

von

**INNOVENT e.V. Technologieentwicklung**

für

**Moje Keramik-Implantate GmbH**

zur Thematik

**Bioverträglichkeit von Keramik-Implantaten durch  
Zellkulturuntersuchungen**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Spezifische Erwartungen und Erfordernisse der Moje Keramik-Implantate GmbH .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Grundsätzliche Möglichkeiten und Limitierungen der Aussagen aus Zellkulturuntersuchungen .....</b>	<b>3</b>
2.1	Beratung zur Eignung von Zellkulturuntersuchungen für spezifische Fragen der Implantatproblematik .....	3
2.2	Zellkulturen, Zelltypen und Zelllinien.....	4
2.3	Spezifische Tests .....	5
2.3.1	Cytotoxizitätstests .....	5
2.3.2	Sonstige Zellkulturtests .....	6
<b>3</b>	<b>Beratung: Cytotoxizitätsuntersuchungen nach Kultur permanenter Zelllinien auf ausgewählten Materialien .....</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>Beratung: Kultur von Osteoblasten auf ausgewählten Materialien und Nachweis Alkalischer Phosphataseaktivität als Differenzierungsmarker.....</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>Beratung: Zell-Adhäsionstests auf ausgewählten Materialien.....</b>	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>Perspektive und Möglichkeiten weiterführender Zellkulturuntersuchungen.....</b>	<b>24</b>

## **1 Spezifische Erwartungen und Erfordernisse der Moje Keramik-Implantate GmbH**

Im Rahmen der Beratung werden Aussagen erwartet, welche Möglichkeiten bestehen, durch Zellkulturversuche die besondere Qualität und Eignung der Produkte der Moje Keramik-Implantate GmbH zu belegen und darzustellen. Von besonderem Interesse sind Ergebnisse, die geeignet sind, insbesondere Ärzte, die potentielle Anwender sind (Orthopäden, Unfallchirurgen) davon zu überzeugen, dass die Produkte aussagekräftigen Untersuchungen und Tests unterworfen wurden, die dem internationalen Stand der Wissenschaft entsprechen. Positiven Ergebnisse könnten a) bereits in die Bewerbung der Produkte einbezogen werden oder b) als Basis weiterführender, u. U. zertifizierter Untersuchungen dienen, um z. B. die Zulassung auf neuen Märkten beantragen zu können. Besonderes Interesse besteht 1) an Cytotoxizitätsuntersuchungen, 2) an Experimenten, die geeignet sind, spezifische Zelldifferenzierungen darzustellen und 3) Untersuchungen zur Adhäsion von Zellen auf der Materialoberfläche.

Daneben sind Experimente und Versuchsergebnisse von Interesse, die geeignet sind, Parameter zur Verbesserung der Produkte zu liefern oder Mängel aufzudecken.

Nicht zuletzt soll die Beratung dazu dienen, Sachverhalte der gegenwärtigen Biomaterialforschung, in die vielfältige biowissenschaftliche Gesichtspunkte einfließen (neben rein medizinischen Aspekten z. B. Erkenntnisse der Zell- und Entwicklungsbiologie bis hin zu Möglichkeiten der Bioanalytik), für den Nutzer Moje Keramik-Implantate GmbH anwendungsbezogen darzustellen.

## **2 Grundsätzliche Möglichkeiten und Limitierungen der Aussagen aus Zellkulturuntersuchungen**

### **2.1 Beratung zur Eignung von Zellkulturuntersuchungen für spezifische Fragen der Implantatproblematik**

Bisher wurden aussagekräftige Daten zur Eignung der Materialien vorrangig aus Ergebnissen von Tierversuchen und den Ergebnissen aus der medizinischen Praxis erhalten.

Zellkulturuntersuchungen können diese Ergebnisse ergänzen und vertiefen, da die Techniken inzwischen etabliert und ihre Aussagen anerkannt sind. Zellkulturuntersuchungen haben zudem insbesondere folgende Vorteile:

- sie sind meist besser standardisierbar als Tierexperimente oder Ergebnisse der medizinischen Praxis
- ihre Durchführung ist mit weniger bürokratischen Hindernissen (Antragstellungen, Genehmigungsverfahren) verbunden; insbesondere deshalb werden die Ergebnisse relativ schnell verfügbar
- sie sind vergleichsweise kostengünstig
- Versuche können relativ einfach wiederholt oder erweitert werden
- es existiert eine breite Palette von Methoden zur Bearbeitung spezifischer Fragen (s. u.).

Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass Zellkulturuntersuchungen beim gegenwärtigen Entwicklungsstand nicht die Komplexität intakter Gewebe oder Organismen widerspiegeln können. Die Wahl eines bestimmten Systems, insbesondere Zelltyps, ist auch immer mit Einschränkungen der erzielbaren Aussagen verbunden.

## **2.2 Zellkulturen, Zelltypen und Zelllinien**

Im Rahmen dieses Berichts kann nicht auf alle mit der Nutzung von Zellkulturen verbundenen Fragen eingegangen werden. Für die Interpretation der Ergebnisse sollten jedoch einige grundsätzliche Sachverhalte berücksichtigt werden:

Die im Rahmen dieser Beratung bei INNOVENT e.V. durchgeführten Untersuchungen wurden an Hand etablierter Zelllinien (3T3-, CHO-9-, MC3T3-E1-Zellen) durchgeführt. Diese tierischen Zelllinien sind kommerziell verfügbar (Zellkultursammlungen) und als Untersuchungsgegenstand für viele Untersuchungen anerkannt. Doch ist diesen Zellen gemeinsam, dass sie gegenüber frisch präparierten Zellen, wie sie unmittelbar aus Geweben gewonnen werden können (sogenannte Primärkulturen), verändert sind, da sie nahezu unbegrenzt teilungsfähig sind. Solche Zellen werden als „transformiert“ angesehen, d. h. sie befinden sich auf einer bestimmten Stufe der Entwicklung hin zu entarteten Krebszellen. Wesentliches Merkmal dafür ist ihre unbegrenzte Teilungsfähigkeit. Doch sind sie nicht mit malignen Tumorzellen gleichzusetzen, die in der Lage sind, in geeigneten Tiermodellen Tumore zu erzeugen oder sogar zu metastasieren. Die für ihre Eignung in Zellkulturuntersuchungen wichtigste Einschränkung ist die, dass in diesen Zelllinien in unterschiedlichem Maße spezifische Zelldifferenzierungsmerkmale bereits verloren gegangen sind. Im Hintergrund vollziehen sich aber auch gravierende Veränderungen beispielsweise in

Chromosomensatz und –struktur solcher über lange Zeiträume *in vitro* kultivierten Zellen. Es ist grundsätzlich vorteilhaft, wenn bestimmte Zelldifferenzierungsmerkmale noch ausgeprägt werden, doch lässt sich ein einigermaßen zuverlässiges Gesamtbild über den Differenzierungsstatus einer Zellpopulation nur an Hand mehrerer Zelldifferenzierungsmarker einschließlich histologisch-morphologischer Kriterien geben.

In diesem Kontext kann man beispielsweise zu den drei oben genannten Zelllinien folgende Aussagen treffen:

- alle drei Zelllinien sind adhärente Zelllinien mit fibroblasten-ähnlichem Zelltyp (obwohl CHO-Zellen primär epitheloid eingeordnet wurden [1])
- mit allen drei oben genannten Zelllinien lassen sich in sinnvoller Weise Cytotoxizitätsuntersuchungen durchführen
- 3T3-Zellen sind offenbar weniger transformiert als CHO-9-Zellen – dies zeigt sich hinsichtlich ihrer Adhärenz und der Kontakthemmung bei Erreichen einer geschlossenen Zelldichte
- MC3T3-E1-Zellen sind klonal zu einer osteogenen Differenzierung in der Lage, d. h. es entwickeln sich in der Kultur vereinzelt bis verstärkt, je nach Bedingungen, Alkalische Phosphatase (AP) produzierende Zellen. Im Zusammenhang mit der primären Isolation von MC3T3-E1-Zellen aus dem Schädelknochen der Maus werden solche Zellen als osteoblastenähnlich betrachtet (s. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH zu MC3T3-E1).

## **2.3 Spezifische Tests**

### **2.3.1 Cytotoxizitätstests**

Cytotoxizitätstests sind geeignet, zu untersuchen, ob eine allgemein toxische Wirkung von einem Material auf Zellen ausgeht. Die Zellen können in unmittelbarem Kontakt mit dem Material gebracht werden, in dem man sie darauf aussät wie auf einem normalen Zellkulturträger oder sie werden in Nachbarschaft zum Material kultiviert, um den Einfluss von Substanzen zu testen, die evtl. aus dem Material in Lösung gehen. Dieses Vorgehen kann auch angezeigt sein, wenn adhärente Zellen zur Testung eingesetzt werden, das Testmaterial aber keine Adhärenz zulässt, da manche Zellen bereits auf ausbleibende Adhärenz mit Einleitung eines programmierten Zelltodes reagieren (Anoikis als spezielle Form der Apoptose, vgl. [2]). Da in Vorversuchen zu sehen war, dass verschiedene tierische Zellen auf den interessierenden Trägermaterialien adhärent anwachsen, konnte für die Testuntersuchungen der direkte Material-Zell-Kontakt einbezogen werden.

Zur Erfassung der allgemein zelltoxischen Wirkung existieren unterschiedlichste Methoden, für die von mehreren Firmen standardisierte Kits bzw. Protokolle angeboten werden, die jedoch immer in Details zu konkretisieren sind. Selbst DIN-Vorschriften beinhalten keine zwingenden Vorschriften bezüglich anzuwendender Zellen, Zelldichten, Medien, Messzeitpunkte etc. (vgl. DIN EN ISO 10993-5, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten, Teil 5: Prüfungen auf *in vitro*-Zytotoxizität), da dies auch immer ein einengendes Korsett schaffen würde, das in verschiedenen Fällen auch anfechtbar wäre. Entscheidend ist vielmehr, dass die allgemeinen Prinzipien guter Laborpraxis und insbesondere die Anwendung anerkannter Zellkulturmethoden an den Untersuchungsgegenstand anzupassen sind.

Zur Messung gelangen bei Cytotoxizitätstests unterschiedliche Parameter, die mit der Zellvitalität korrelieren. Eine erste Klasse von Tests beruht auf der Anfärbarkeit durch membranpermeable oder –impermeable Farbstoffe sein, wenn die Membrangängigkeit von der Zellvitalität abhängt. Ein „klassischer“ Cytotoxizitätstests ist beispielsweise der Trypanblau-Test, der auf der Anfärbarkeit toter und/oder geschädigter Zellen durch Trypanblau beruht. Eine zweite Klasse von Tests verfolgt die Freisetzung von Zellinhaltsstoffen (beispielsweise von Enzymen wie der Laktatdehydrogenase, die sich relativ einfach photometrisch bestimmen lässt), die schädigungsbedingt erfolgt. Eine dritte Klasse von Tests erfasst Stoffwechsellleistungen der Zelle, beispielsweise der MTT-Test, usw. Eine gute Übersicht über eine Reihe derartiger Tests findet sich bei [3]. Daneben gibt es immer wieder Neuentwicklungen wie beispielsweise den Oxygen Biosensor Assay der Frima BD-Biosciences, bei dem der Sauerstoffverbrauch einer Zellkultur über ein Fluoreszenzsignal verfolgt werden kann. Der Stellenwert neuer Tests muss sich jedoch erst erweisen.

### 2.3.2 Sonstige Zellkulturtests

Es soll in diesem Zusammenhang erwähnt werden, dass neben einer unspezifischen Cytotoxizität Zellkulturtests existieren, die eine Reihe von Beeinflussungen spezifischerer Zellprozesse erfassen. Hervorzuheben wären Tests zur Messung der Apoptose. Die Apoptose ist eine „programmierte“ Form des Absterbens von Zellen, der durch die Zelle selbst, wenn auch auf auslösende Signale oder Einflüsse hin, eingeleitet und zunächst relativ koordiniert vollzogen wird. Sie wird daher von der Zellnekrose abgegrenzt, die den unregelmäßigen und unkontrollierten Zusammenbruch der Zellfunktionen und –strukturen umfasst, wobei auch zwischen Apoptose und Nekrose Übergänge existieren. Sollte bei einem Biomaterial eine erhöhte Absterberate von Zellen gefunden werden, könnte es sinnvoll sein, zu prüfen, ob es

sich um apoptotisch fundierte Prozesse handelt. Apoptose ist für umgebende noch intakte Zellen weniger belastend und lässt sich u. U. eher günstig beeinflussen, da oft nur Störungen spezifischer Mechanismen und Gleichgewichte bereits zur Apoptose führen.

Daneben wären Zellkulturuntersuchungen zu unterscheiden, die zu spezifischen Schädigungen von Zellen über Angriffe an der DNA oder Chromosomenstrukturen etc. führen. Hierfür existieren cytogenetische Untersuchungsmethoden sowie Mutagenesetests. Sie spielen jedoch auf Grund der chemischen Natur der für Moje-Keramimplantate relevanten Materialien keine Rolle.

### **3 Beratung: Cytotoxizitätsuntersuchungen nach Kultur permanenter Zelllinien auf ausgewählten Materialien**

Problem: Es existieren bisher nur begrenzte Daten zur Cytotoxizität von Bioverit *in vitro*.

Zielstellung: Das Ziel bestand darin, zu untersuchen, inwieweit sich Bioverit und Zirkonoxid in In-vitro-Cytotoxizitätstests als nicht cytotoxische Materialien bestätigen, bzw. zu untersuchen, ob sich in diesen Tests ein besseres Abschneiden insbesondere von Bioverit gegenüber anderen Materialien zeigen lässt.

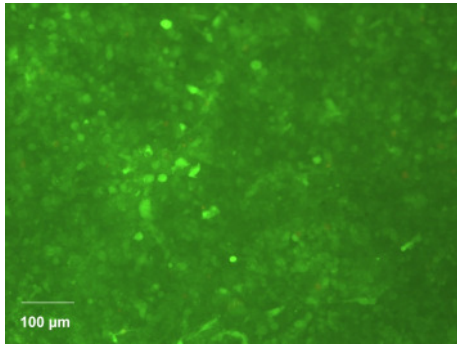
Methode: Zur Testung der Cytotoxizität von Biomaterialien wurde bei INNOVENT e.V. eine auf der Anfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid basierende Methode etabliert. Sie hat den großen Vorteil, auf verschiedenen Materialoberflächen gut detektierbar zu sein. Probleme mit Oberflächen wie Titandioxid, auf denen ein extrem schnelles Fading (Ausbleichen) der Fluoreszenz zu beobachten war, waren durch Kombination mit einem Antifading-Reagenz zu beherrschen. Auch komplettieren sich beide Färbungen gegenseitig, obwohl theoretisch die Färbung beispielsweise nur mit dem Lebendfarbstoff bereits eine Abschätzung des Anteils toter Zellen ermöglichen sollte. Der Farbstoff FDA kombiniert zwei selektive Prinzipien: einerseits wird FDA nur durch lebende Zellen aufgenommen, darüberhinaus erfolgt die Freisetzung des fluoreszierenden Fluoresceins aus FDA erst intrazellulär durch die Deacetylierung durch Esterasen (Lipasen).

Zur Testung wurden Zellen der Linien CHO-9, 3T3 und MC3T3-E1 eingesetzt. Die Kultur der Zellen erfolgte in DMEM/F12 mit Antibiotikazusatz und Zusatz von 5% (CHO-9-Zellen) bzw. 10% FCS (3T3-Zellen) bzw. in Alpha-Medium mit Nucleosiden unter Zusatz von 2 mM Acetyl-Alanyl-Glutamin (Biochrom) sowie Antibiotikazusatz und 10% FCS (MC3T3-E1) bei 37 °C unter 5% CO<sub>2</sub>. Zur Erfassung cytotoxischer Wirkungen wurden sterile Probekörper

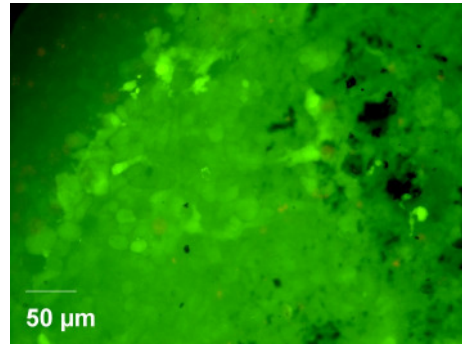
(von ca. 13 mm Durchmesser und ca. 4 mm Höhe im Fall von Bioverit und Zirkonoxid; bei einer Reihe von Vergleichsmaterialien wurden rechteckige Flächen von 10 x 10 mm und ca. 1 mm Stärke eingesetzt) in Vertiefungen einer 24-Well-Zellkulturplatte gegeben und mit 1 ml einer Zellsuspension beimpft (Standarddichte  $5 \times 10^4$  Zellen/ml). Es erfolgte täglicher Mediumswechsel. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Live/Dead-System aus Fluoresceindiacetat (FDA) und Ethidiumbromid in PBS angefärbt. Im Ergebnis fluoreszieren lebende Zellen grün und die Kerne toter Zellen orange. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellzahl dient als Maß für die Cytotoxizität. Er wurde durch Schätzung bzw. Zählung am mikroskopischen Bild unter Nutzung der Zählfunktion der Image Pro Express Software ermittelt.

Ergebnisse: Abbildung 1 zeigt die Ergebnisse von FDA/Ethidiumbromidfärbungen von 3T3-Zellen die 4 bzw. 8 Tage auf verschiedenen Materialoberflächen kultiviert wurden.

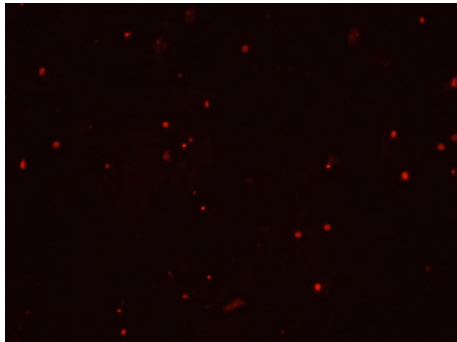




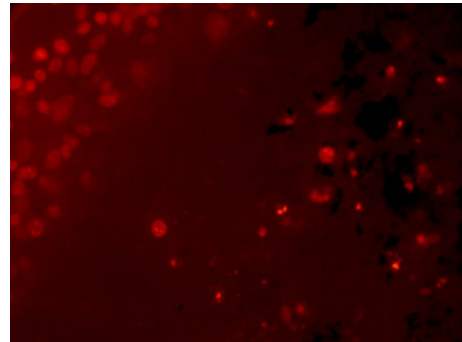
**A** Bioverit



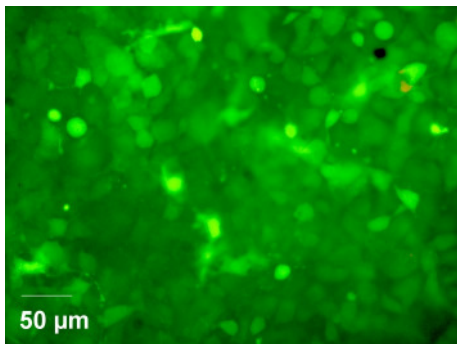
**B** Aluminiumoxid



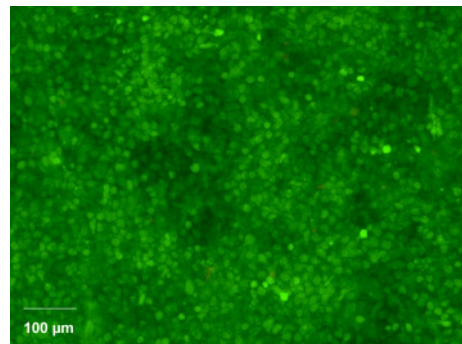
**C** Bioverit (Rotfluoreszenz)



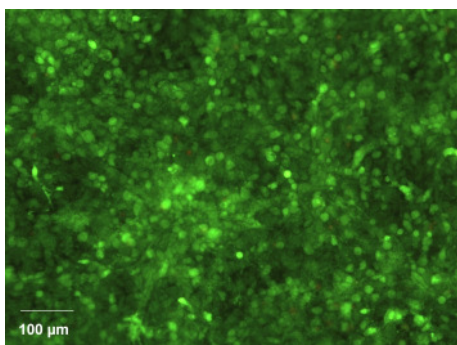
**D** Aluminiumoxid (Rotfluoreszenz.)



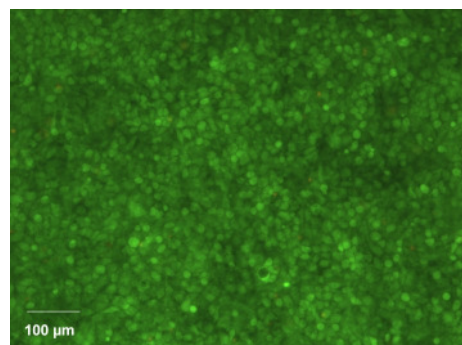
**E** Zirkonoxid



**F** Ca.-phosphatbeschicht. Titan



**G** Chrom-Cobalt-Molybdän-Stahl



**H** Titan

**Abbildung 1** Ergebnisse der FDA/Ethidiumbromidfärbung von 3T3-Zellen nach 4 d (E) und 8 d Kultur auf verschiedenen Implantamaterialoberflächen. Fluoreszenzmikroskopische Bilder, Zeiss-Filtersatz 09 bzw. 14 (C, D). Außer auf Aluminiumoxid betrug der Prozentsatz toter Zellen unter 5%.

Sowohl auf Bioverit wie auf Zirkonoxid lag der Anteil toter Zellen auch nach 8 d Kultur unter 5%, was einer Standardkultur unter optimalen Bedingungen entspricht. Die Zellen bilden einen dichten Zellrasen und zeigen zu einem großen Prozentsatz die Morphologie adhärenter Fibroblasten (vgl. Abbildung 1 E). Es lässt sich somit keine unspezifisch cytotoxische Wirkung dieser Materialien detektieren. Dieses Ergebnis lässt sich auch mit CHO-9- und MC3T3-E1-Zellen bestätigen. Auch andere Materialien schneiden jedoch vergleichbar positiv ab (vgl. Abbildung 1 F - H). Nur auf der in den Test einbezogenen Aluminiumoxid-Keramik war insbesondere nach 8 d ein erhöhter Anteil toter Zellen nachweisbar (Abbildung 1 D).

Diskussion: Erfahrungsgemäß sind tierische Zellen in der Lage, auf einer Reihe von festen Materialoberflächen anzuwachsen, wenn diese keine hydrophobe Oberfläche besitzen und sich ausreichend inert verhalten, d. h. nur geringe Mengen an Ionen oder anderen löslichen Produkten abgeben. Dennoch gestatten nur Zellkulturtests zuverlässige Aussagen. Für Bioverit und Zirkonoxid bestätigt sich die aus der Praxis zu erwartende gute Zellverträglichkeit. Der angewandte Test ist auch sensitiv genug, um beispielsweise Unterschiede zu dem Ergebnis auf Aluminiumoxid-Keramik zu erfassen.

#### **4 Beratung: Kultur von Osteoblasten auf ausgewählten Materialien und Nachweis Alkalischer Phosphataseaktivität als Differenzierungsmarker**

Problem: Neben Aussagen zur unspezifischen Cytotoxizität ist für die Eignung von Implantatmaterialien, die in Knochen implantiert werden, der Nachweis von besonderer Bedeutung, dass insbesondere Knochenzellen nicht in ihren grundsätzlichen Differenzierungsmerkmalen negativ beeinflusst werden. Ein Schwerpunkt liegt dabei auf der Charakterisierung von Osteoblasten als den noch teilungsfähigen Knochenzellen, die zu den in der Knochenmatrix eingebauten Osteozyten ausdifferenzieren. Im Rahmen dieser Ausdifferenzierung werden verschiedene osteoblasten- bzw. osteozytenspezifische Gene eingeschaltet, die zur Synthese entsprechender spezifischer Proteine führen (Genexpression), wie Osteopontin, Osteonectin, Osteocalcin u. a. In den Binde- und Stützgeweben sind Marker oft Bestandteile der extrazellulären Matrix, der hier eine besondere Rolle zukommt. Können diese Komponenten in der die Zellen umgebenden extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (bzw. im Zellinneren) spricht das für eine normale Differenzierung der Zellen. Hierfür sind immunhistologische Methoden zu favorisieren, bei denen die Spezifität des Nachweises auf der Spezifität des verwendeten Antikörpers beruht. Komplettiert werden diese

spezifischen Marker durch weniger spezifische wie Kollagen Typ I oder das Enzym AP. Sie kommen nicht nur im Knochen vor, spielen dort aber eine wichtige Rolle.

Nach wie vor ist die AP neben spezifischen Matrixkomponenten ein anerkannter Marker für Knochenzellen. Das beruht nicht zuletzt auf ihrer relativ einfachen Messbarkeit, doch hat sich auch immer wieder bestätigt, dass Prozesse der Knochenbildung und Mineralisation mit einer Zunahme der AP-Aktivität einhergehen [4-6]. Trotzdem ist die Funktion der AP im Knochen nicht restlos aufgeklärt. (AP ist eigentlich eine Zusammenfassung einer Gruppe von 4 Glykoprotein-Enzymen, die optimal im alkalischen Milieu Orthophosphorsäureester spalten. Im Knochen wird das als „gewebeunspezifisch“ bezeichnete Isoenzym synthetisiert, das auch in Leber und Niere vorkommt.) Relativ unstrittig ist, dass sie eine Rolle bei der Mineralisation der Knochenmatrix (d. h. insbesondere Bildung und Einlagerung von Calciumphosphatkristallen, wie Hydroxylapatit) spielt [7]. Dabei werden Funktionen in der Pyrophosphat-Spaltung sowie dem Phosphat- und Calcium-Transport gesehen. Die Vielfalt der möglichen Substrate spricht für eine komplexe biologische Funktion: neben phosphorylierten Proteinen sind Pyrophosphat, Beta-Glycerophosphat, Phosphoethanolamin und Pyridoxal-5'-phosphat natürliche Substrate (vgl. [8]).

Zielstellung: Es sollte daher geprüft werden, inwieweit Veränderungen der AP-Aktivität bei Wachstum geeigneter Zelltypen auf Bioverit oder Zirkonoxid im Vergleich zu anderen Materialien nachweisbar und messbar werden und eine bevorzugt osteogene Differenzierung auf diesen beiden Materialien anzeigen; übliche Methoden der AP-Bestimmung waren auf ihre Eignung zu prüfen.

Methode: Primärkulturen aus Knochengewebe wären für verschiedene Versuchsreihen neu zu präparieren und stellen für diese Studie, die mehr Aussagen zur grundsätzlichen Machbarkeit erbringen soll, einen verhältnismäßig hohen Aufwand dar. Als Alternative wurden daher MC3T3-E1-Zellen der Maus ausgewählt, die auch in der Zellkultur klonal zu AP-positiven Zellen differenzieren. AP-positive Zellen sind grundsätzlich mittels entsprechender Substrate anfärbbar. Dabei wird ein lösliches Substrat angeboten, dessen Phosphatrest durch AP abgespalten werden kann, und dessen dephosphoryliertes Produkt als unlöslicher Farbstoff am Ort der Aktivität auskristallisiert. Ein hoch empfindliches Substratsystem besteht beispielsweise aus Bromchlorindolylphosphat (BCIP) und Nitroblautetrazoliumsalz (NBT), wobei die primäre Reaktion die Phosphatabspaltung am BCIP ist. Das reagiert in einer Redoxreaktion mit NBT unter Dimerisierung zu einem Indigofarbstoff weiter, NBT wird

dabei zu einem Formazan reduziert [9]. Beide Produkte bilden einen auch mikroskopisch gut sichtbaren violetten Farbkomplex. Mit dieser Methode lassen sich beispielsweise in einem Zellrasen die AP-positiven Zellen darstellen, da die AP in Knochenzellen vorrangig an der Zelloberfläche lokalisiert ist. Grundsätzlich wäre in ähnlicher Weise auch ein Substrat geeignet, das nach Phosphatabspaltung ein fluoreszierendes unlösliches und damit auskristallisierendes Produkt bildet, wie beispielsweise das als ELF 97-Phosphat bezeichnete Substrat von Molecular Probes (s. Ergebnisse) [9].

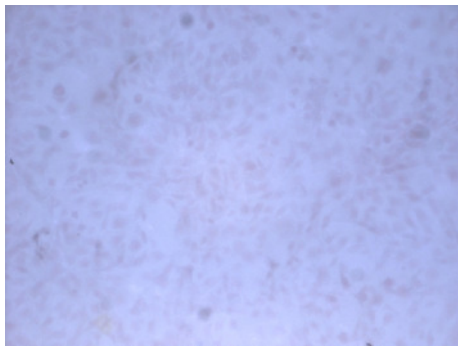
Um eine Zu- oder Abnahme der AP-Aktivität in einer Zellpopulation zu quantifizieren, kann man entweder versuchen, die mikroskopischen Bilder bezüglich des Anteils AP-positiver Zellen auszuwerten, was entweder über eine Zählung den Anteil AP-positiver an der Gesamtzellzahl ausweist, oder man versucht, über eine Bildauswertungsfunktion die Farbintensität des Bildes zu bewerten. Eine prinzipielle Alternative ist die Messung der AP-Aktivität durch das Verfolgen der Enzymreaktion mittels eines Substrats, das ein lösliches Produkt liefert, das spektrophotometrisch oder anderweitig gut messbar ist. Das ermöglicht eine Aktivitätsbestimmung, indem die Produktbildung als Funktion der Zeit unter standardisierten Bedingungen (Puffer, Temperatur, Substrat) gemessen wird. Ein Standardsubstrat für die absorptionsphotometrische Messung ist p-Nitrophenylphosphat, ein Standardsubstrat für Fluoreszenzintensitätsmessungen ist 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP). Die Zunahme der Absorption bzw. Fluoreszenzintensität pro Zeiteinheit als Maß für die Enzymaktivität wurde in Form der mittleren Steigung mittels Software Magellan (Tecan) ermittelt. (Bei hohen Aktivitäten, bei denen schnell Substratlimitierung eintritt, Ermittlung der maximalen Steigung aus dem initialen Kurvenverlauf.)

### Ergebnisse:

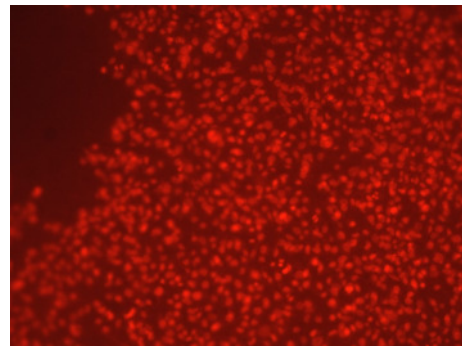
#### 1) Qualitativer Nachweis AP-positiver MC3T3-E1-Zellen mittels BCIP/NBT-Färbung

Die Anfärbung AP-positiver Zellen gelingt zwar prinzipiell mittels BCIP/NBT-Färbung recht gut sowohl an unfixierten wie an mit 70% Ethanol fixierten Zellen, auf den Oberflächen der hier interessierenden Materialien gestaltet sich die anschließende mikroskopische Begutachtung jedoch relativ schwierig, da lichtundurchlässige Materialien im Auflicht mikroskopiert werden müssen. Die dunkle Färbung ist dann beispielsweise auf Titanoberflächen schlecht sichtbar (vgl. Abbildung 2 E), auf hellen Keramikoberflächen (Bioverit, Zirkonoxid, Aluminiumoxid-Keramik) wird sie überstrahlt und gelingt nur mit reduzierter Beleuchtung bei hoher Restlichtverstärkung (vgl. Abbildung 2 A, C).

### 3T3 auf Zirkonoxid

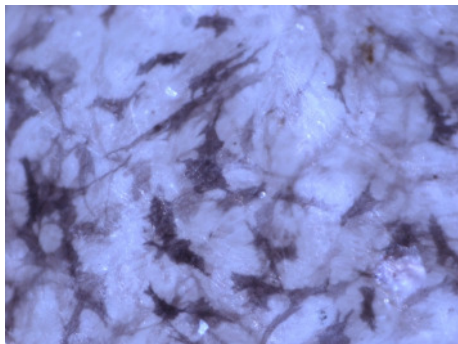


**A**

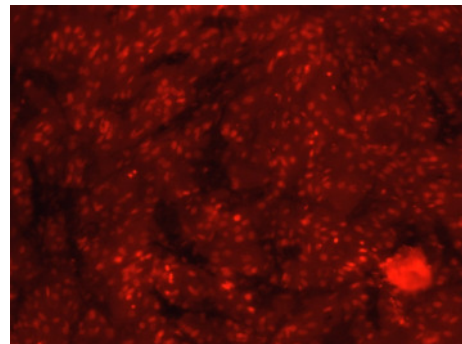


**B**

### MC3T3-E1 auf Zirkonoxid

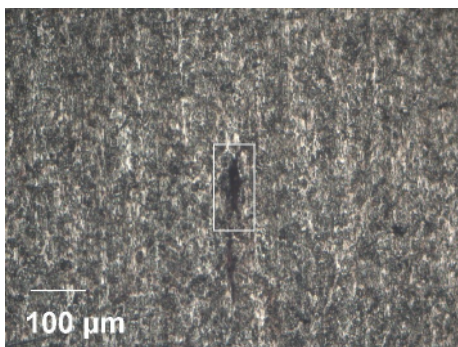


**C**

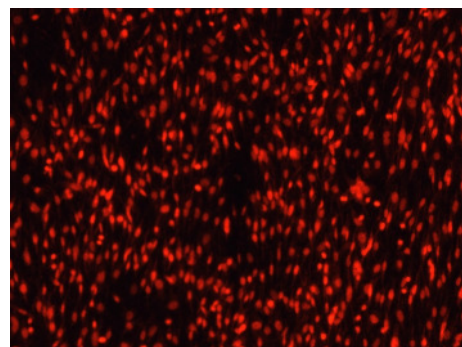


**D**

### MC3T3-E1 auf Titan



**E**



**F**

**Abbildung 2** AP-Färbung mittels BCIP/NBT (linke Spalte, Hellfeld Auflicht) und Ethidiumbromidfärbung (rechte Spaltung, Fluoreszenzmikroskopie, Zeiss-Filtersatz 14) von 3T3-Zellen (A, B) und MC3T3-E1-Zellen (C bis F) auf Zirkonoxid bzw. Titan.

In Abbildung 2 offenbart die Ethidiumbromidfärbung, die zur Anfärbung der DNA-haltigen Zellkerne führt, dass auf allen Proben eine relativ dichte Zellbesiedlung vorlag (Abbildung 2 B, D, F). 3T3-Zellen (Abbildung 2 A) zeigten im Vergleich zu MC3T3-E1-Zellen (Abbildung

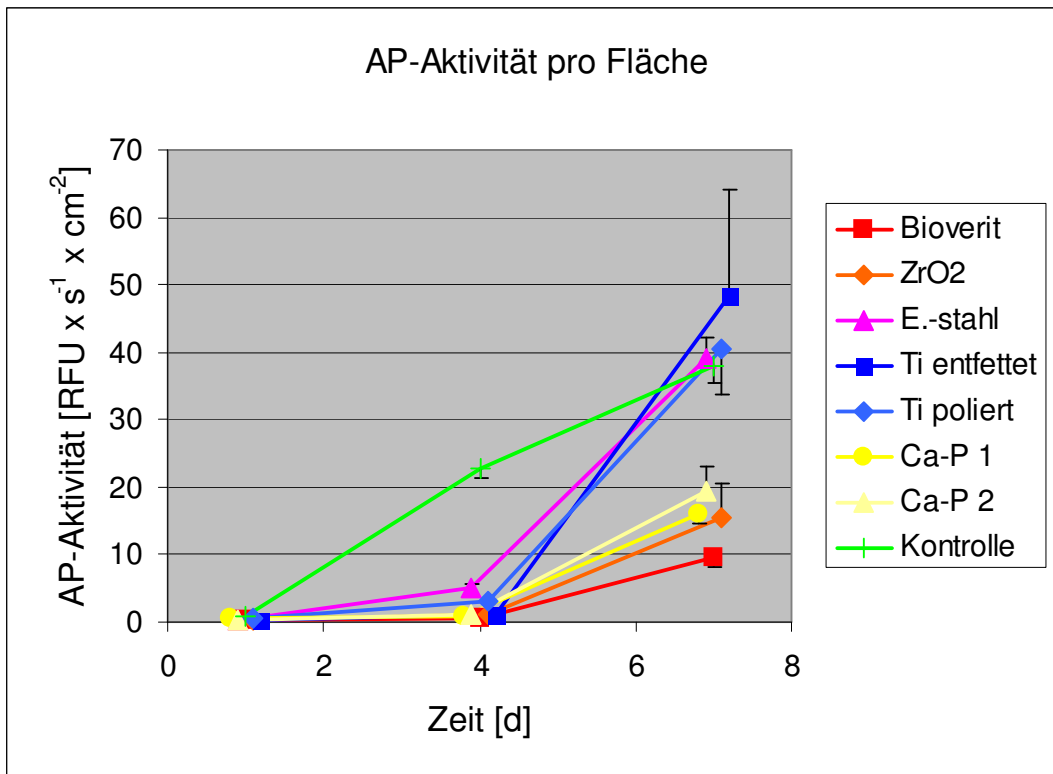
2 C) kaum AP-Aktivität. Die AP-positiven Zellen, die auf Zirkonoxid noch gut darstellbar waren (auf Bioverit deutlich schlechter), waren auf Titan kaum zu identifizieren (Abbildung 2 E, Rahmen).

Da ein objektiver Vergleich zwischen verschiedenen Materialien dadurch sehr schwierig wird, wurde auch die Möglichkeit einer Anfärbung durch das Substrat ELF 97-Phosphat versucht. Es versagte jedoch insbesondere auf Titanoberflächen völlig (was mit dem katalytischen Reduktionsvermögen von Titandioxid zusammenhängen kann) und erwies sich auch zum Nachweis der endogenen AP in der reinen Zellkultur als ungeeignet. Deshalb wurde für weitere Untersuchungen quantitativen Messungen mittels Multiplattenphotometer der Vorzug gegeben.

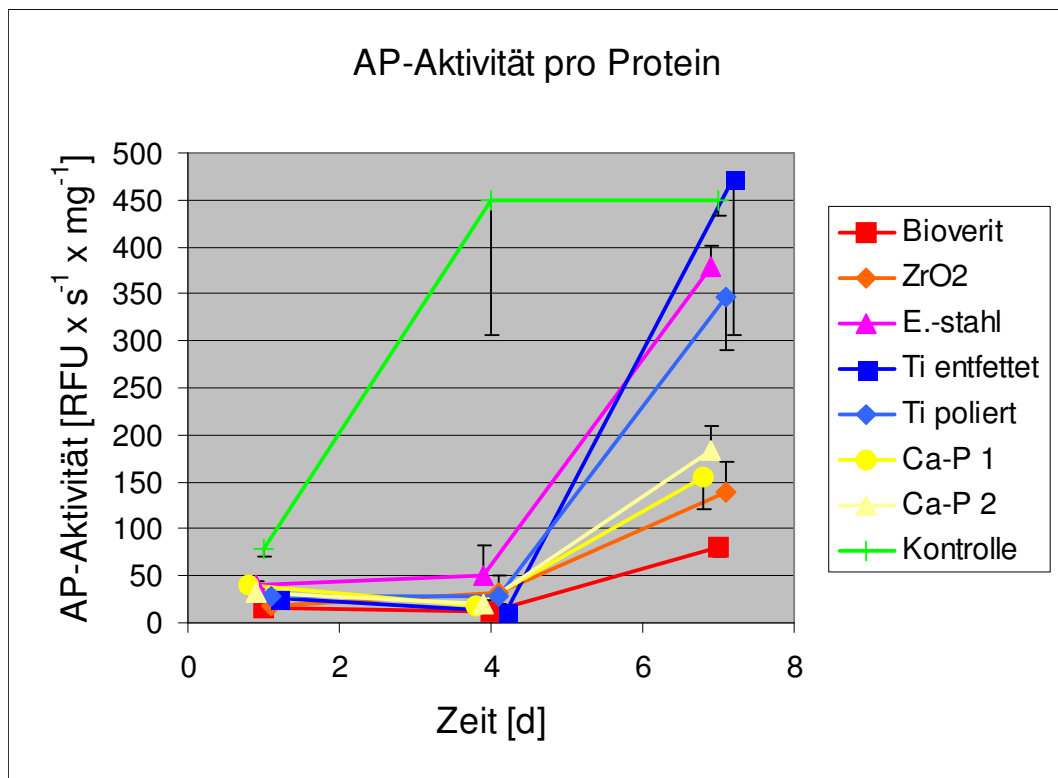
## 2) Quantifizierung der AP-Aktivität im MUP-Test

Um quantitative Aussagen zur Entwicklung der AP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen auf Bioverit und Zirkonoxid im Vergleich zu anderen Materialien zu erhalten, wurden Probekörper dieser Materialien mit MC3T3-E1-Zellen besiedelt und nach 1, 4 und 7 Tagen mit einem alkalischen Lysepuffer (pH 9,5) resuspendiert und aufgelöst (auf Eis, um die AP-Aktivität möglichst zu erhalten). Dem Lysat wurde als Reaktionsstart MUP zugesetzt und die Hydrolyse als Kinetik der Fluoreszenzintensität bei 25 °C gemessen (Messgerät Genios Pro, Tecan; Anregungswellenlänge: 360 nm, Emissionswellenlänge: 465 nm, konstante Verstärkung). Von einem aliquoten Teil des Lysats wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (Coomassie-Test). Vor Versuchsbeginn wurden die Flächen der Probekörper bestimmt, bei den eingesetzten Blechen (Rechtecke von ca. 10 x 10 mm) durch Auswägen und Bezug auf eine Standardfläche; die Bioverit- und Zirkonoxid-Probekörper hatten einen Durchmesser von 12,5 mm.

Die Ergebnisse vergleichender Aktivitätsbestimmungen auf verschiedenen Implantatoberflächen sind in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 3** Zunahme der auf die Fläche bezogenen relativen AP-Aktivitäten ( $\pm$  Standardabweichung, SD) von MC3T3-E1-Zellen nach 1, 4 und 7 Tagen Kultur auf Bioverit, Zirkonoxid, Edelstahl, entfettetem bzw. poliertem Titan, zwei Varianten von calciumphosphatbeschichtetem Titan (INNOVENT). Kontrolle: Gewebekultur-Polystyrol (Greiner).



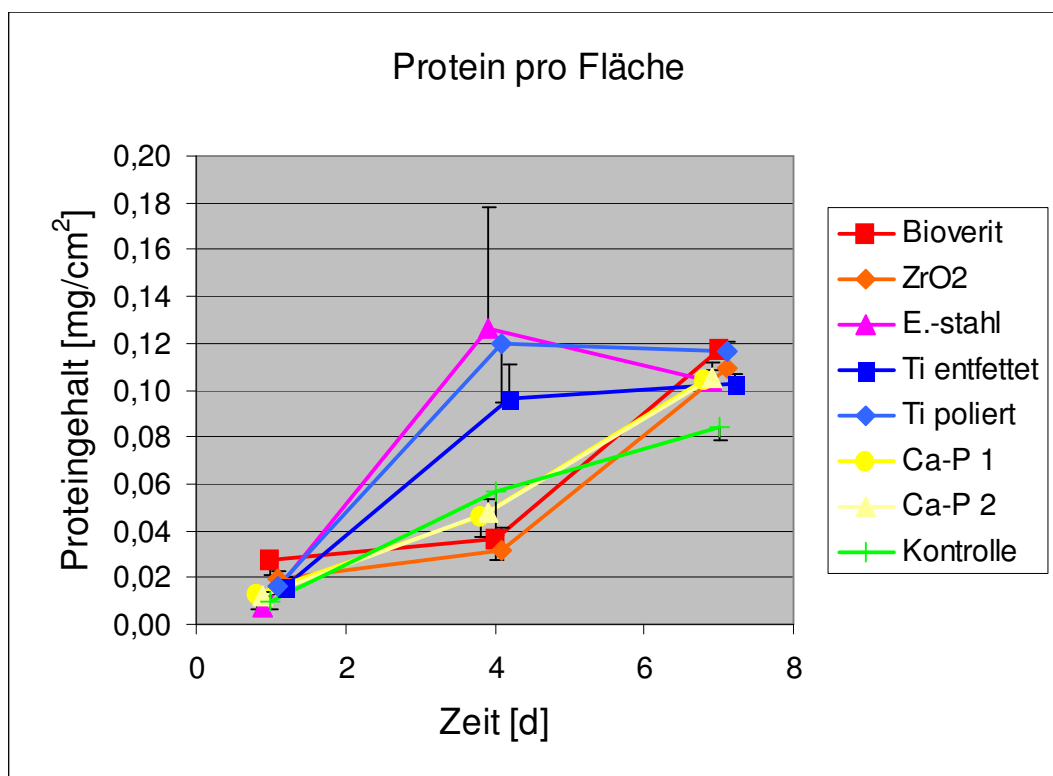
**Abbildung 4** Zunahme der auf die Proteinkonzentration des Zell-Lysates bezogenen relativen AP-Aktivitäten ( $\pm$  SD) von MC3T3-E1-Zellen 1, 4 und 7 Tage nach Kulturbeginn. Kontrolle: Gewebekultur-Polystyrol (Greiner).

Die Ergebnisse zeigen, dass auf Bioverit und Zirkonoxid im Untersuchungszeitraum deutlich niedrigere AP-Aktivitäten gemessen wurden, als in der Kontrolle. Doch während dieser Unterschied nach 4 Tagen, wo die Aktivität nur 2% bzw. 5% der Kontrolle betrug, besonders auffallend war, stieg die Gesamtaktivität nach 7 Tagen auf 25% bzw. 41% der Kontrolle an. Der Verlauf der auf den Proteingehalt bezogenen Aktivität (spezifische Aktivität) lässt vermuten, dass auch hier eine allmähliche Annäherung der auf Bioverit und Zirkonoxid erhaltenen Werte an die Kontrolle eintreten kann, da sich die spezifische Aktivität bei der Kontrolle bereits im Zeitraum zwischen 4 und 7 Tagen an einen konstanten Wert anzunähern scheint. Es ist bemerkenswert, dass nach 7 Tagen auf den einbezogenen metallischen Oberflächen etwa die Werte der Kontrolle erreicht wurden, während die langsamere Zunahme der AP-Aktivität von Bioverit und Zirkonoxid eher mit der auf Calciumphosphat-beschichteten Titanoberflächen zu vergleichen ist.

Neben der Betrachtung der Gesamtaktivität auf der Fläche ist die Betrachtung der spezifischen Aktivität sinnvoll, um auszuschließen, dass unterschiedliche AP-Werte lediglich



ein Resultat verschiedener Zellzahlen sind. Insbesondere nach 7 Tagen könnten Änderungen in der Zellteilungsrate, mit denen auf unterschiedlichen Materialien zu rechnen ist, zu abweichenden Zelldichten führen. Oder Zellen können sich in unterschiedlichem Umfang vom Material wieder abgelöst haben. Die Proteinbestimmung kann zwar nur grob als Maß für die Zellzahl dienen, da der Proteingehalt der Zellen erheblich mit Zellzyklusstadien, Differenzierungszustand usw. schwankt, doch liefert sie einen durchaus geeigneten Bezugswert. Sie muss natürlich auf die Fläche bezogen werden. Den zugehörige Verlauf der Zunahme an Protein zu den in Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellten Ergebnissen zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 5** Zunahme der auf die Fläche bezogenen Proteinmenge ( $\pm$  SD) aus Konzentrationsbestimmungen des Zell-Lysates von MC3T3-E1-Zellen 1, 4 und 7 Tage nach Kulturbeginn. Kontrolle: Gewebekultur-Polystyrol (Greiner).

Wichtigstes Ergebnis der Proteinbestimmung ist, dass auf Bioverit und Zirkonoxid eine zwar gegenüber anderen Materialien etwas verzögerte, dann aber durchaus adäquate Proteinbildung stattfindet, die im wesentlichen die Zellvermehrung reflektiert. Nach 7 Tagen wurden relativ unabhängig vom Implantatmaterial einheitliche Proteinmengen detektiert, die sogar über der Kontrolle lagen.

Diskussion: Wie die Ergebnisse der AP-Färbung von MC3T3-E1-Zellen zeigten, tragen in der quantitativen AP-Bestimmung nur die AP-positiven Zellen zur Gesamtaktivität bei. Da im Ergebnis der Proteinbestimmung die Implantatmaterialien relativ gleichmäßig mit Zellen bewachsen wurden, resultieren die Unterschiede in der AP-Aktivität wahrscheinlich vorrangig aus einem unterschiedlichen Anteil AP-positiver Zellklone in der Gesamtzellpopulation. Dies ist zunächst kein Ergebnis, dass zu einer positiven Bewertung der Materialien Bioverit und Zirkonoxid führt, obwohl eigentlich unklar ist, welche Relevanz eine Verzögerung im Ausdifferenzieren AP-positiver Zellklone hat. Das wichtigere Ergebnis dürfte sein, dass auch auf Bioverit und Zirkonoxid eine normale Zellproliferation und eine – wenn auch verzögerte - Bildung AP-positiver Zellen zu erwarten sind. Es wäre durchaus möglich, dass sich die Unterschiede in Langzeitversuchen relativieren. Auch ist offen, welche Ergebnisse erhalten werden, wenn der Versuch in einem die Osteogenese stimulierenden Medium durchgeführt wird, oder wenn ein MC3T3-E1-Klon eingesetzt würde, der aus überwiegend AP-positiven Zellen besteht (erhältlich von der American Type Culture Collection). Diese Fragen bleiben weiterführenden Untersuchungen vorbehalten.

## **5 Beratung: Zell-Adhäsionstests auf ausgewählten Materialien**

Problem: Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Beurteilung der Eignung von Implantatmaterialien ist die Festigkeit der Verbindung zwischen Implantatmaterial und angrenzendem Gewebe. Bei Oberflächen, die keine makroporöse Struktur aufweisen, ist das vorrangig eine Frage der Adhäsion und der Ausbildung von Bindungen zwischen den Zellen des Gewebes und der Materialoberfläche. Zwischen beiden kann die extrazelluläre Matrix liegen und als zusätzliche „Klebstoffkomponente“ wirken, ihre Ausbildung könnte aber auch das Bindungsverhalten der Zellen negativ beeinflussen. Für das Einwachsen eines Implantates ist wahrscheinlich die initiale Phase von besonderer Bedeutung, um Fehlentwicklungen durch das Anlagern bzw. Einwachsen unerwünschter Zellen zu vermeiden.

Zielstellung: Es sollte daher untersucht werden, ob ein Zellkulturtest geeignet wäre, um Aussagen zur Stärke Adhäsion von Zellen auf Bioverit und Zirkonoxid im Vergleich zu anderen Materialien zu liefern.

Methode: Es gibt eine Reihe von Adhäsionstests, um zu bestimmen, wieviele Zellen prozentual unter bestimmten Bedingungen auf einer bestimmten Oberfläche angewachsen (adhäriert) sind. Dabei werden nicht angewachsene Zellen meist durch Spülvorgänge entfernt

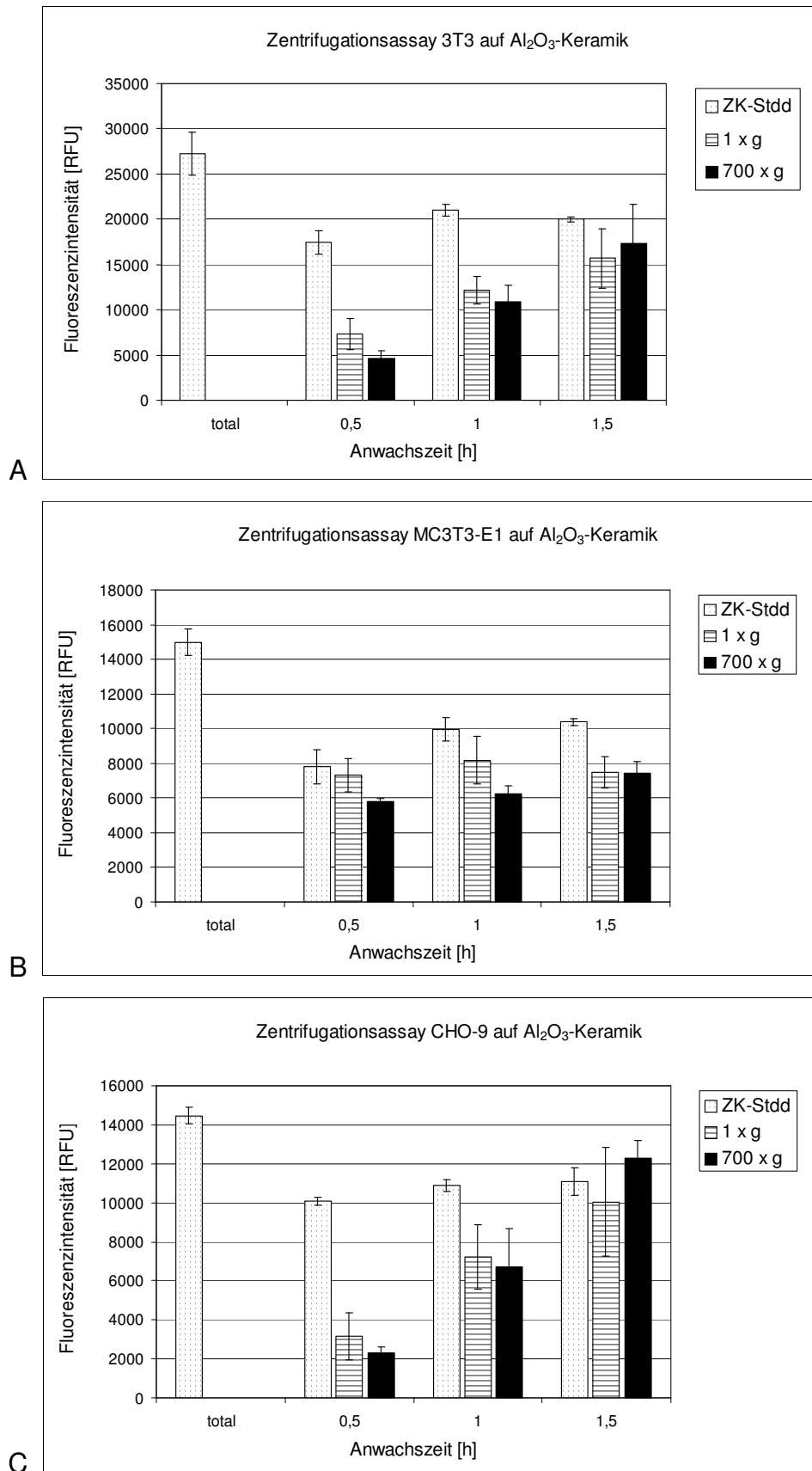
(s. beispielsweise Vybrant Cell Adhesion Assay Kit von Molecular Probes). Erweiterte Möglichkeiten sollten Zentrifugationsassays bieten, bei denen die Ablösung von der Materialoberfläche durch Einwirken definierter Zentrifugalkräfte bewerkstelligt wird (vgl. Cell Adhesion Studies with Microplate Fluorometry; CAFCA – a novel centrifugal assay for fluorescence-based cell adhesion, Tecan Application Notes). Die in einer Zentrifuge erzeugbaren relativen Zentrifugalbeschleunigungen (RZB) werden allein von Radius und Drehzahl bestimmt, wobei sich der RZB-Wert proportional zu Radius und zum Quadrat der Drehzahl verhält. Für die auf eine Zelle einwirkende Kraft ist außerdem der Dichteunterschied zwischen Zelle und umgebendem Medium ausschlaggebend. Wie bei anderen Adhäsionstests können die Zellen vor dem Abzentrifugieren von der Materialoberfläche mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, was eine Quantifizierung des Effekts durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten vor und nach Zentrifugation ermöglicht (vgl. [10]). Bei INNOVENT wurde dieser für die Untersuchung oberflächenmodifizierter Zellkulturplatten beschriebene Test wie folgt für die Untersuchung fester Probekörper abgewandelt:

Zellen einer Vorkultur (größtenteils CHO-9-Zellen, s. Ergebnisse) wurden mit 5  $\mu\text{M}$  Carboxyfluoresceindiacetat-Succinimidylester (CFSE) in phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) 20 min bei 37 °C markiert. Sterile Probekörper wurden mit oberflächlich mit 70% Ethanol desinfizierten Lochverstärkern beklebt, so dass im Zentrum ein rundes Areal von ca. 20 mm<sup>2</sup> frei blieb. Die CFSE-markierten Zellen wurden durch trypsinieren abgelöst, als Zellsuspension in Standardnährmedium aufgenommen und in einer Zellkultur-Multiwellplatte über den Probekörpern mit einer Animpfdichte von ca. 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Nach 0,5, 1 bzw. 1,5 h wurden die Probekörper entnommen und in einer Multiwellplatte in serumfreiem Nährmedium mit der zellbesiedelten Oberfläche nach unten auf O-Ringe aus Silikon gelegt (4 Parallelen je Zeitpunkt), so dass die zellbesiedelten Kreisflächen im Inneren des O-Ringes zu liegen kamen und damit frei abzentrifugiert werden konnten. Zentrifugiert wurde in einem Rotor für Mikrotiterplatten 10 min bei 2000 rpm (700 x g). Als Kontrolle wurden identisch zellbesiedelte und gewendete Probekörper unzentrifugiert liegen gelassen, d. h. hier erfolgt die Ablösung lediglich durch die Schwerkraft (1 x g). Für eine Reihe von Versuchen wurde ein aliquoter Teil der Zellsuspension (160  $\mu\text{l}$ ; berechnet aus dem über der Kreisfläche vorhandenen Volumen an Zellsuspension) durch Zentrifugation gesammelt bzw. direkt in 96-well-Gewebekulturplatten ausgesät, um für Vergleichszwecke einen Maximalwert bzw. Basiswerte zu erhalten, die einer sehr guten Adhäsion auf Zellkultur-Polystyrol entsprechen. Anschließend wurden die Zellen auf den Probekörpern mit 0,5 ml Lysepuffer (0,1% Triton x-100 in PBS) aufgelöst und von jeweils 200  $\mu\text{l}$  des Lysats (2 Parallelen) die Intensität des

Fluoreszenzsignals gemessen (Messgerät Genios Pro, Tecan; Anregungswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm, konstante Verstärkung)

### Ergebnisse:

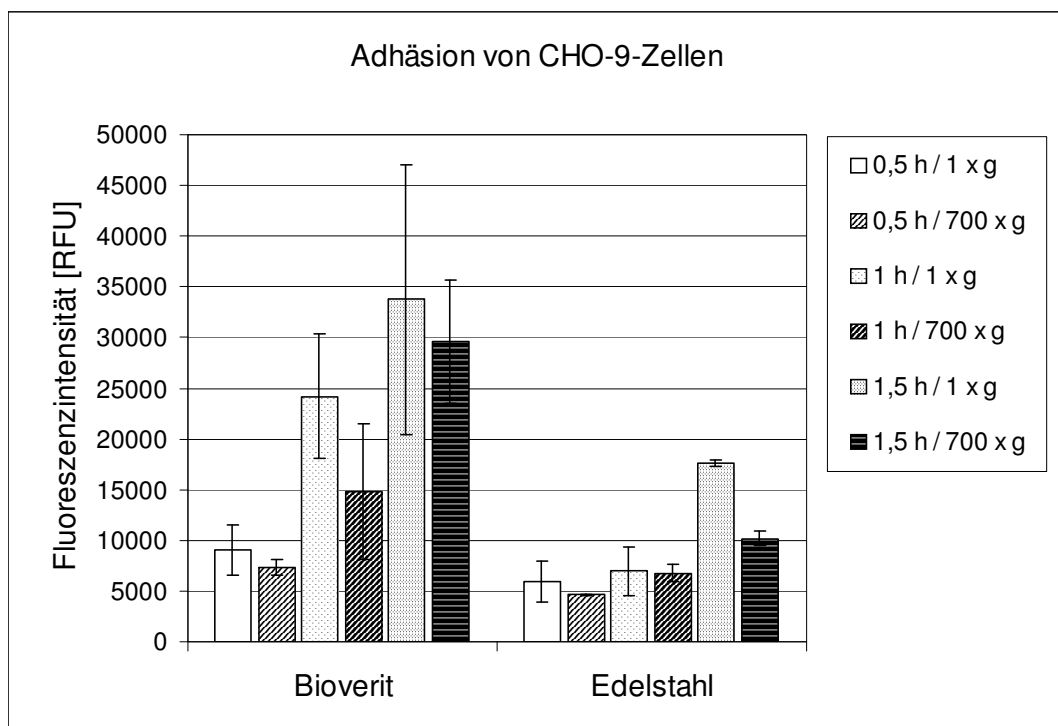
- 1) Die Fluoreszenzintensität nach CFSE-Markierung liefert ein sehr gut linear mit der Zellzahl korrelierendes Signal ( $R = 0,9995$ ), wie die Messung identisch lysierter Zellsedimente ergab, die über eine Verdünnungsreihe erzeugt wurden.
- 2) Es hat sich gezeigt, dass im Bereich der mit dem Mikrotiterplatten-Rotor realisierbaren relativen Zentrifugalbeschleunigungen (RZB) keineswegs immer eine differenzierte Ablösung erreicht werden kann. Rotordrehzahlen von 500, 1000 bzw. 2000 rpm (die RZB-Werten von 45 x, 175 x bzw. 700 x g entsprechen) führten oft zu ähnlichen Ergebnissen. Das bedeutet beispielsweise, dass in Abhängigkeit vom Material Zellen, die bereits so fest adhärirt sind, dass sie sich bei 175 x g nicht ablösen, zum überwiegenden Teil auch 700 x g widerstehen. Generell gilt, dass nach 2 h kaum noch eine differenzierte Bewertung von Adhäsionsunterschieden möglich ist, weil alle zur Adhäsion fähigen Zellen bereits zu fest angewachsen sind.
- 3) An Hand der Versuchsergebnisse auf Aluminiumoxid-Keramik wurde geprüft, ob eine der verwendeten Zelllinien CHO-9, 3T3 oder MC3T3-E1 sich in besonderer Weise für die Durchführung des beschriebenen Adhäsionsassays eignet. Aluminiumoxid-Keramik wurde ausgewählt, da sie nach Ergebnissen aus Tierversuchen als Material mit relativ schlechten Gewebe- bzw. Zelladhäsionseigenschaften vorbewertet wurde (Mitteilung Moje Keramikimplantate). Die Ergebnisse der unterschiedlichen Zelllinien auf Aluminiumoxid-Keramik sind in Abbildung 6 dargestellt.



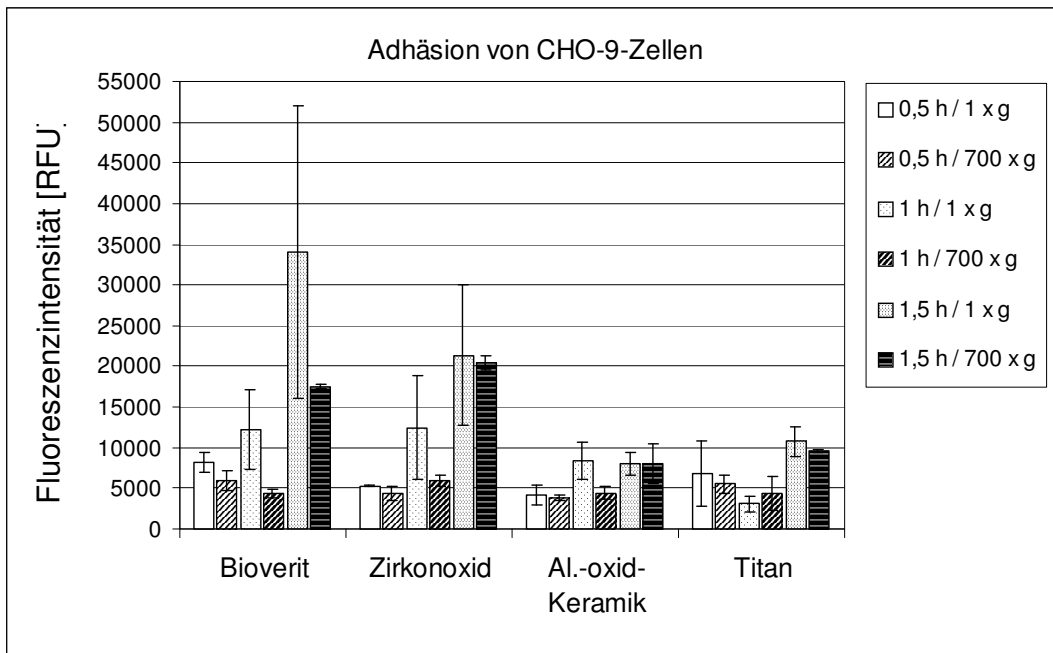
**Abbildung 6** Ergebnisse von Adhäsionstests mit unterschiedlichen Zelllinien auf Aluminiumoxidkeramik. ZK-Std entspricht der Adhärenz auf Zellkultur-Polystyrol (Greiner). Total entspricht dem theoretischen Maximalwert.

In Abbildung 6 ebenfalls enthalten sind die Vergleichswerte, die erzielt werden, wenn die entsprechenden Zellen statt auf Aluminiumoxid in einer Zellkulturplatte anwachsen und hier lose Zellen lediglich abgespült werden. Der theoretische Maximalwert (total) wurde aus dem Volumen Zellsuspension gemessen, aus dem sich die Zellen auf der Fläche absetzen können. Alle drei Zelllinien zeigen eine Zeitabhängigkeit der Adhärenz auf der Unterlage, die bei CHO-Zellen besonders deutlich wurde (Abbildung 6 C), während MC3T3-E1-Zellen bereits nach 0,5 h grundsätzlich über 75% des 1,5 h-Wertes erzielten und auch früh mit der Adhärenz auf Gewebekultur-Polystyrol vergleichbare Werte erreichten. Daher wurden für weitere Untersuchungen vorrangig CHO-9-Zellen eingesetzt.

4) Die Ergebnisse von Adhäsionstests zum Vergleich der Materialien Bioverit, Zirkonoxid, Aluminiumoxid-Keramik, Edelstahl und Titan sind in Abbildung 7 und Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 7** Auf Bioverit bleibt zu jedem Zeitpunkt nach Einwirkung niedriger und hoher RZB mehr fluoreszenzmarkiertes Material (Zellen) zurück als auf Edelstahl (das 1,5 bis 3,5fache).



**Abbildung 8** Auf Bioverit und Zirkonoxid bleibt 1 und 1,5 h nach Aussaat der Zellen nach Einwirkung niedriger und hoher RZB mehr fluoreszenzmarkiertes Material (Zellen) zurück als auf Aluminiumoxid-Keramik und Titan.

Diskussion: Der auf Zentrifugation beruhende Adhäsionstest ist durchaus geeignet, die Adhäsion auf festen und ausreichend stabilen Materialoberflächen zu bewerten. Er erfasst allerdings lediglich die initiale Phase vom Kontakt bis zum Ausbilden relativ fester Bindungen. Um differenzierende Aussagen über die Festigkeit angewachsener Zellen zu treffen, müssten höhere RZB-Werte realisiert werden, was in erster Linie praktische Probleme aufwirft, aber möglich ist. Die zeitabhängige Zunahme der Signale unzentrifugierter Proben zeigt, dass die Adhäsion aus der Zellsuspension ein Prozess ist, der sich etwa über 2 h erstreckt (durch weitere Daten belegt). Dass jedoch zum Teil bereits nach 0,5 h mit 700 g zentrifugierte Proben nahezu gleiche Signalintensitäten aufwiesen wie unzentrifugierte, zeigt, dass Zellen, sobald sie erste Bindungen ausgebildet haben, sehr schnell weitere Bindungen ausbilden und fest adhären.

In der hier durchgeführten Form zeigt der Test noch eine relativ hohe Streuung. Die Hauptursache liegt in Streuunterschieden beim Anwachsen der Zellen aus der Suspension, die mit dem Erfassen größerer Flächen verringert werden könnten. Dazu wären veränderte Auflagevarianten für die Probekörper zu nutzen. Die erhaltenen Ergebnisse lassen die Erwartung zu, dass insbesondere bei einer Erhöhung der Stichprobenumfänge für die einzelnen Messwerte die gefundenen Unterschiede mit statistischer Signifikanz abgesichert werden können. Bioverit, aber auch Zirkonoxid, erwiesen sich bei den

Adhäsionsuntersuchungen als Materialien mit positiven Eigenschaften, die Vergleichsmaterialien überlegen waren.

## **6 Perspektive und Möglichkeiten weiterführender Zellkulturuntersuchungen**

Das Ziel der vereinbarten Beratung bestand darin, der Moje-Keramikimplantate GmbH eine experimentell abgesicherte Entscheidungsgrundlage zu geben, in welcher Richtung Zellkulturuntersuchungen sinnvollerweise eingesetzt werden können, um die Eignung von Bioverit und Zirkonoxid-Keramik zu untermauern. Das wird von INNOVENT als erreicht eingeschätzt werden. Für bestimmte Untersuchungen (Cytotoxizitätstests, AP-Messungen, Adhäsionstests) konnte gezeigt werden, mit welchen Ergebnissen grundsätzlich zu rechnen ist und die insgesamt positiven Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchungen vorteilhaft publiziert werden könnten. Im Rahmen des vereinbarten Leistungsumfanges war es nicht sinnvoll, detailliertere und umfangreichere Versuchsreihen durchzuführen. (Insbesondere für die Ergebnisse der Adhäsionstests wäre das zur statistischen Absicherung angezeigt, da hier oft eine relativ hohe Streuung zu verzeichnen war.) Dafür bietet sich INNOVENT als Forschungs- und Kooperationspartner an und gibt mit den vorgelegten Studien nicht zuletzt einen Einblick in die vorhandenen labortechnischen Möglichkeiten und Kompetenzen. Davor sollten jedoch die vorliegenden Ergebnisse durch die Moje-Keramikimplantate GmbH ausgewertet werden. INNOVENT ist an einer Weiterführung und Vertiefung der Kooperation mit Moje-Keramikimplantate sehr interessiert, da die hier anstehenden Sachfragen Bestandteil von Grundproblemen sind, die am Bereich Biomaterialien bearbeitet werden.

Jena, 07. 04. 2004

Dr. Jürgen Weisser  
(Fachl. Bearbeiter)

Dr. Matthias Schnabelrauch  
(Bereichsleiter Biomaterialien)



## Literaturverzeichnis

1. Halle, W., *Zell- und Gewebezüchtung bei Tieren*. Bausteine der modernen Physiologie. 1976: Gustav Fischer Verlag Jena.
2. Grossmann, J., *Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis"*. Apoptosis, 2002. **7**(3): p. 247-60.
3. Eisel, D., et al., eds. *Apoptosis and cell proliferation*. 2 ed. 2000, Roche Molecular Biochemicals.
4. Gerstenfeld, L.C. and F.D. Shapiro, *Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development*. J Cell Biochem, 1996. **62**(1): p. 1-9.
5. Aubin, J.E., et al., *Osteoblast and chondroblast differentiation*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 77S-83S.
6. Cormier, C., *Markers of bone metabolism*. Curr Opin Rheumatol, 1995. **7**(3): p. 243-8.
7. Anderson, H.C., *Molecular biology of matrix vesicles*. Clin Orthop, 1995(314): p. 266-80.
8. Whyte, M.P., et al., *Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy*. J Clin Invest, 1995. **95**(4): p. 1440-5.
9. Haugland, R.P., *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 9 ed, ed. J. Gregory. 2002: Molecular Probes, Inc.
10. Reyes, C.D. and A.J. Garcia, *A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces*. J Biomed Mater Res, 2003. **67A**(1): p. 328-33.

Siehe auch TAKAKURA / JAPAN Erfahrung : Laut Prof. Karl Tillmann / Bad Bramstedt