

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
Direktor: Prof. Dr.-Ing. R. Thull

Analyse des Zellverhaltens auf metallischen Proben in Abhängigkeit von der Oberflächenpolarisation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tobias Tauböck
aus
Würzburg

Würzburg, Juli 2008

Referent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull

Koreferent: Prof. Dr. med. dent. W. Wiedemann

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. September 2008

Der Promovend ist Zahnarzt

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
1.1	Geschichte der Implantate	1
1.2	Stahl und Titan als Implantatmaterialien	2
1.3	Biokompatibilität	4
1.4	Einheilen von Implantaten	6
1.5	Wirkung von elektrischen Feldern auf Zellen	7
1.6	Zielsetzung der Studie	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Puffer, Medien und Lösungen	10
2.1.2	Antikörper	12
2.1.2.1	Primärantikörper	12
2.1.2.2	Sekundärantikörper	13
2.1.3	Osteosarkomzelllinie MG-63	13
2.1.4	Prüfkörper	13
2.1.5	Elektrokammern	14
2.1.6	Geräte	15
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.8	Computerprogramme	17
2.2	Methoden	18
2.2.1	Reinigung der Prüfkörper und Elektrokammern	18
2.2.2	Schaltkreis der Versuchsanordnung	19
2.2.3	Zellkultivierung	19
2.2.4	Proteinanlagerung und Zellaussaat	20
2.2.5	Zellzahlbestimmung	21
2.2.5.1	Messprinzip	21
2.2.5.2	Durchführung	22

2.2.6	WST-1 Zellvitalitätstest	22
2.2.6.1	Messprinzip	22
2.2.6.2	Durchführung	22
2.2.7	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	23
2.2.7.1	Prinzip	23
2.2.7.2	Durchführung	23
2.2.8	Versuchsalgorithmus und Plattenbelegung	25
2.2.9	Statistische Auswertung	26
3	Ergebnisse	28
3.1	Bestimmung der Zellzahl und Zellaktivität	28
3.1.1	Untersuchungen zur Proteinadsorption	28
3.1.1.1	Auswertung der Stahloberflächen	28
3.1.1.2	Auswertung der Titanoberflächen	30
3.1.2	Untersuchungen zur Zelladsorption	32
3.1.2.1	Auswertung der Stahloberflächen	33
3.1.2.2	Auswertung der Titanoberflächen	34
3.1.3	Untersuchungen zur Protein- und Zelladsorption	36
3.1.3.1	Auswertung der Stahloberflächen	37
3.1.3.2	Auswertung der Titanoberflächen	38
3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zellzahl und Zellaktivität	41
3.2	Analyse der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie	41
3.2.1	Untersuchungen zur Proteinadsorption	41
3.2.1.1	Auswertung der Stahloberflächen	42
3.2.1.2	Auswertung der Titanoberflächen	44
3.2.2	Untersuchungen zur Zelladsorption	46
3.2.2.1	Auswertung der Stahloberflächen	46
3.2.2.2	Auswertung der Titanoberflächen	48
3.2.3	Untersuchungen zur Protein- und Zelladsorption	50
3.2.3.1	Auswertung der Stahloberflächen	50
3.2.3.2	Auswertung der Titanoberflächen	52

4	Diskussion	54
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung und Problemstellung

1.1 Geschichte der Implantate

Der Wunsch, verloren gegangene Zähne und andere Körperteile durch Implantate zu ersetzen und damit eine Wiederherstellung der Funktion zu gewährleisten, regte schon immer die Fantasie des Menschen an.

Ein bei Ausgrabungen in Honduras entdecktes Unterkieferfragment aus der Mayazeit wies im Bereich der Schneidezähne drei aus Muscheln gefertigte Implantate auf. Dieses Fragment datiert ca. aus dem Jahr 600 n. Chr. und ist der älteste Beleg für eine Implantation anorganischen Materials in das Knochengewebe eines lebenden Menschen (Ring, 1997).

Die Anwendung erster metallischer Implantate geht bis in das 18. Jahrhundert zurück. Aufgrund ihrer Korrosionsbeständigkeit bevorzugte man zunächst Edelmetalle wie Gold, Silber und Platin. Ihre mechanischen Eigenschaften erwiesen sich für die klinische Anwendung jedoch als unzureichend. Während Messing, Kupfer und Eisen zwar über die erforderliche mechanische Stabilität verfügten, waren sie wegen ihrer geringen Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität für den klinischen Einsatz nicht geeignet (Hench & Ethridge, 1982; Ha & Wintermantel, 2002). Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit dem V2A-Stahl von Krupp erstmals eine rostfreie Chrom-Nickel-Legierung entwickelt (Strübig, 1989), die zum Durchbruch der Osteosynthesetechnik beitrug (Rüedi, 1975). In den 30er Jahren dieses Jahrhunderts wurde die Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung Vitallium[®] in die Zahnheilkunde eingeführt und aufgrund ihrer ausgezeichneten mechanischen Eigenschaften und guten Korrosionsbeständigkeit auch als Osteosynthesen- und Hüftendoprothesenmaterial eingesetzt (Judet & Judet, 1949; Combe, 1984; Watzek & Blahout, 1993).

Bereits in den 40er und 50er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde über die Körperverträglichkeit sowie die hervorragende Eignung von Titan als Implantatwerkstoff berichtet (Bothe et al., 1940; Leventhal, 1951). Aufgrund der Kombination ausgezeichneter biologischer und mechanischer Eigenschaften nehmen Titan und seine Legierungen inzwischen eine klar bevorzugte Rolle als Funktions- und Strukturwerkstoffe in der klinischen

Medizin und Zahnheilkunde ein (Wagner & Tatsch, 1984; Breme et al., 2000; Rauwolf et al., 2003; Wagner & Al-Nawas, 2004).

1.2 Stahl und Titan als Implantatmaterialien

Aus der klinischen Erfahrung werden von Implantatwerkstoffen mechanische Festigkeit, Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität erwartet. Aufgrund dieser Anforderungen finden in der Implantologie korrosionsbeständige austenitische Stähle sowie Titanwerkstoffe in Form von Titan technischer Reinheit oder in Form von Titanlegierungen als metallische Biomaterialien Anwendung (Breme et al., 2000; Ha & Wintermantel, 2002).

Implantate aus rostfreien Stählen werden vorwiegend als kurzzeitiges und kostengünstiges Osteosynthesematerial, bevorzugt bei Platten-Schrauben-Systemen, verwendet (Fink, 2001; Kramer, 2001). Dazu wird meist hochlegierter Stahl mit 17 – 20 % Chrom, 12 – 14 % Nickel und 2 – 4 % Molybdän (AISI-Bezeichnung: 316L) eingesetzt. Durch den niedrigen Kohlenstoffgehalt von max. 0,03 % wird die Ausscheidung von Chromkarbid an den Korngrenzen verhindert und somit die Beständigkeit gegen interkristalline Spannungsrisskorrosion erhöht. Im geschmiedeten Zustand besitzt die Legierung eine rein austenitische Kristallstruktur (Semlitsch & Willert, 1981; Ha & Wintermantel, 2002). Der Molybdänanteil erhöht die Beständigkeit gegen Spaltkorrosion, die im Wesentlichen auf der Bildung eines dünnen Passivfilms (1 – 5 nm) beruht. Wird diese Passivschicht durch mechanische Oberflächenzerstörungen, Heterogenitäten, Verunreinigungen oder örtlich unterschiedliche Elektrolytzusammensetzungen durchbrochen, kann eine spontane Repassivierung an schwer zugänglichen Stellen wie Löchern und Spalten durch den Mangel an Sauerstoff und eine stark erhöhte Passivierungsstromstärke ausbleiben (Gellings, 1981; Macionczyk et al., 2001).

Rostfreie Stähle weisen eine niedrige Dehngrenze bei gleichzeitig hoher Bruchdehnung auf. Deshalb können Chrom-Nickel-Stähle warm- oder kaltverformt werden, wobei bei der Kaltverformung eine Verfestigung erfolgt. Der im Vergleich zur Knochenkortikalis hohe Elastizitätsmodul von Stahl führt infolge der Lastübernahme durch das Implantat zu einer als stress-shielding bezeichneten Knochenresorption (Niethard & Pfeil, 1997; Ha & Wintermantel, 2002).

Titan technischer Reinheit (commercially pure (cp) titanium) und die Legierungen Ti-6Al-4V und Ti-6Al-7Nb haben sich als Endoprothesen- und Osteosynthesenmaterial sowie in der Kiefer- und Zahnimplantologie bewährt (Kramer, 2001). Bei cp Titan handelt es sich um unlegiertes Titan (α -Titan mit hexagonal dicht gepackter Kristallstruktur) mit geringer Konzentration an Verunreinigungselementen wie Kohlenstoff, Eisen oder Sauerstoff. Da Titan im geschmolzenen Zustand zusätzliche Verunreinigungen aufnimmt, erfolgt der Schmelzvorgang im Vakuumofen. Reines Titan weist im Vergleich zu seinen Legierungen eine geringere Festigkeit, jedoch eine höhere Bruchdehnung auf. Durch Zulegieren von Aluminium als α -Phase-stabilisierendes Element und Vanadium als β -Phase (kubisch-raumzentrierte Struktur)-stabilisierendes Element resultiert eine Zweiphasenlegierung ($\alpha + \beta$) mit erhöhter Härte, Dehngrenze und Zugfestigkeit sowie verbesserten Ermüdungseigenschaften (Bardos, 1990; Päßler, 1997; Lenz, 1998; Peters et al., 2002). Da das in dieser Legierung enthaltene zytotoxische Vanadium in Hinsicht auf eventuelle Unverträglichkeitsreaktionen kritisch betrachtet wird, wurde die vanadiumfreie Titanlegierung Ti-6Al-7Nb entwickelt, die vergleichbare mechanische Eigenschaften, Biokompatibilität und Korrosionsbeständigkeit aufweist (Geis-Gerstorfer, 2003).

Titan und die Titanbasislegierungen gehören aufgrund der elektronischen Struktur des Titans zu den so genannten Übergangsmetallen, deren Oberfläche sich nach Kontakt mit Körperflüssigkeiten passiviert. Im Gegensatz zu den ebenfalls passivierenden Eisenbasislegierungen, die metallisch leitende Oxide bilden, sind die Oxidschichten auf Titan oder den Titanbasislegierungen elektrisch nicht- oder halbleitend und bilden die notwendige Grundlage für die beobachtete Körperverschbarkeit. Hierzu trägt noch die Eigenschaft bei, dass Titan selbst nach chemischer Lösung des Oxids oder bei temporärer Korrosion nach mechanischer Zerstörung der Passivschicht als Folge von Relativbewegungen zum Gewebe keine Ionen, sondern mehr oder weniger aufoxidierte Moleküle an das Gewebe abgibt (Thull, 1992; Thull et al., 1992; Thull et al., 1995). Üblicherweise weist das Oxid eine Schichtdicke von etwa 10 nm auf und besteht aus TiO_2 in der Anatasmodifikation (Tümmler, 1986).

Der Elastizitätsmodul von Titan ist um den Faktor 2 niedriger als der von austenitischem Stahl und kommt von allen metallischen Biomaterialien dem des Knochens am nächsten. Die daraus resultierende vergleichsweise geringe Steifigkeit minimiert bei gleicher Implantatgeometrie das stress-shielding für den Knochen (Ferracane, 1995;

Head et al., 1995; Breme et al., 2000; Macionczyk & Thull, 2001; Breme et al., 2002). Das geringe spezifische Gewicht von $4,5 \text{ g/cm}^3$ bringt für den Patienten einen angenehmen Tragekomfort mit sich (Päßler, 1997; Geis-Gerstorfer, 2003).

Nachteile von Titan sind die vergleichsweise geringe Verschleißfestigkeit des Werkstoffs und die Anfälligkeit für Reibkorrosion durch mechanischen Abtrag der schützenden Passivschicht. Einen Beweis für Relativbewegungen zwischen Implantat und Gewebe stellt der häufig bei Explantation gefundene schwarze Niederschlag aus Titanpartikeln dar, der durch Makrophagen auch in die Lunge, Leber, Milz und Niere abtransportiert und dort nachgewiesen werden kann (Agins et al., 1988; Lombardi et al., 1989; Thull et al., 1995; Craig et al., 2006).

1.3 Biokompatibilität

Ein erfolgreiches Implantateinheilen setzt eine hohe Biokompatibilität der Implantatoberfläche voraus (Klein et al., 2006). Ratner definiert Biokompatibilität als die Fähigkeit eines Werkstoffes durch aktive Wechselwirkung mit körpereigenen Proteinen und Zellen ein bestimmtes (erwünschtes) Funktionsergebnis in einem Empfängerorganismus zu erzielen (Ratner, 1993).

Um dieses Funktionsergebnis vorhersehbar beeinflussen zu können, ist die Herstellung eines kausalen Zusammenhangs zwischen den Eigenschaften des Werkstoffes und den Reaktionen des Biosystems notwendig. Diese Zielsetzung erfordert insbesondere die Charakterisierung der Werkstoffoberfläche und die genaue Kenntnis der für Art und Ausmaß der biologischen Wirkungen verantwortlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der Grenzfläche (Ratner et al., 1987; Thull, 2000). Im optimalen Fall sollen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Implantatwerkstoffe mit denjenigen des zu ersetzenden Gewebes weitgehend übereinstimmen (Wintermantel et al., 2002).

Die biologische Akzeptanz und langfristige Stabilität der Integration von Implantaten wird entscheidend durch die sich zwischen der Implantatoberfläche und dem Umgebungsgewebe ausbildenden Wechselwirkungen bestimmt. Obwohl über das Biosystem selbst und seine von zahlreichen inneren und äußeren Faktoren beeinflussten Reaktionen – in diesem Zusammenhang sind neben den Interaktionen verschiedener

Reaktionskaskaden (Koagulation, Komplementsystem, zelluläres Immunsystem etc.) auch der Gesundheitszustand des Patienten, der Einfluss von Pharmaka, die Kontamination der Biomaterialien mit Endotoxinen oder Oberflächenartefakte zu nennen – umfangreiche Kenntnisse vorliegen, sind die Wechselwirkungsprozesse zwischen Implantat und Biosystem sowie deren Auswirkungen auf das Umgebungsgewebe (immunologische Auswirkungen, Differenzierung und Proliferationsverhalten der Zellen) derzeit noch nicht ausreichend verstanden (Garvey & Bizios, 1995; Höcker, 1997; Rößler et al., 1997). Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass unmittelbar nach Kontakt mit einer biologischen Flüssigkeit die Implantatoberfläche mit in Wasser gelösten Ionen bedeckt wird und es zur Adsorption körpereigener Proteine der extrazellulären Matrix kommt. Die Zusammensetzung der adsorbierten Proteinschicht sowie das Spektrum der Konformationszustände der einzelnen Proteine werden durch die physikochemischen Eigenschaften der Implantatoberfläche beeinflusst und steuern ihrerseits maßgeblich die zelluläre Reaktion des Kontaktgewebes (Albrektsson et al., 1983; Williams & Williams, 1989; Williams, 1990; Thull, 1993; Kasemo & Lausmaa, 1994; Sinha et al., 1994; Martin et al., 1995; Boyan et al., 1996; Horbett, 1996; Jones, 1998; Thull, 1998; Grill et al., 2000; Kasemo, 2002; Meadows & Walker, 2005; Lee et al., 2006; Scharnweber, 2007).

Der Informationsaustausch zwischen Biomaterial und biologischem Umfeld, das Zellen und die extrazelluläre Matrix einschließt, erfolgt durch Degradations-, Korrosions- und Auslaugprodukte des Werkstoffs. Bei abrieb- oder korrosionsfesten Materialien bestimmt die Oberflächenladung die Kommunikation, bei elektrisch leitenden Materialien ein Ladungsträgerdurchtritt durch die Phasengrenze mit Oxidation oder Reduktion von Makromolekülen sowie Konformationsänderungen (Thull, 1994a; Thull, 1994b; Thull, 2000). Während die Antigenbildung durch Bindung von Elementen der oben genannten werkstoffspezifischen Destruktionsprodukte an Proteine und die Veränderung makromolekularer Bestandteile der interstitiellen Flüssigkeit nach Adsorption an die Oberfläche und Ladungstransfer gut untersucht sind, stellt die Wirkung von Proteinen aus der interstitiellen Flüssigkeit, die an die Oberfläche adsorbieren und im oberflächennahen elektrischen Feld oder aktiviert durch die Oberflächenenergie eine Veränderung der Molekülstruktur erfahren, einen noch weitgehend hypothetischen Ansatz zur Erklärung der Biokompatibilität dar. Durch eine solche Reaktion könnten körpereigene Proteine als Antigene wirken und zu einer Abwehrreaktion des Körpers durch Aktivierung des Immunsystems führen (Bauerschmidt et al., 1976; Thull et al., 1992; Thull, 1997; Thull,

2003). Eine gewebeverträgliche Oberfläche liegt dann vor, wenn der Werkstoff durch Adsorption individueller Makromoleküle gegenüber dem immunologischen System maskiert wird (Thull et al., 1992; Thull, 1994a).

Da, wie Thull postuliert, die Biokompatibilität von der Oberfläche ausgeht, erfordern moderne Funktions- und Strukturwerkstoffe eine funktionelle Trennung ihrer Eigenschaften in einen vorwiegend funktionsorientiert mechanisch definierten Volumenwerkstoff und einen an den Anforderungen des biologischen Umfelds und den angestrebten Reaktionen mit dessen Bestandteilen orientierten Oberflächenwerkstoff (Thull, 1994b; Thull, 1997; Thull, 2003).

Biokompatibilität stellt sich im submikrometerdicken Grenzbereich zwischen Werkstoff und biologischem Umfeld ein und ist damit keine spezifische Werkstoffeigenschaft, sondern hängt von der Implantatfunktion, dem Anwendungsort und der Anwendungsdauer ab (Williams, 1990; Thull, 2000).

1.4 Einheilen von Implantaten

Die Einheilung eines Implantats kann als Sonderfall der regulären Knochenfrakturheilung betrachtet werden (Knöfler & Graf, 1989). Post operationem entstehen, verursacht durch das Operationstrauma, um das Implantat nekrotisches Gewebe und ein Blutkoagulum, das durch Granulationsgewebe organisiert wird. Der Organismus reagiert mit einer Entzündungsreaktion, deren Ziel die Beseitigung der Schädigung und die Wundheilung ist. Diese Inflammationsphase beginnt mit Plasmaaustritt aus den Gefäßen, verbunden mit einer Emigration von polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen. Die bei den oben genannten Vorgängen freigesetzten Zytokine führen zur Chemoattraktion und zur Einwanderung von potenten osteoblastären Vorläuferzellen, die nach Adhäsion auf der Implantatoberfläche in reife Osteoblasten ausdifferenzieren. Der Bildung von Knochenmatrix folgt ein lebenslanges Knochenremodelling als Antwort auf die funktionelle Belastung des Implantats und den physiologischen Knochenumbau (Fallschüssel, 1986; Watzek & Mailath-Pokorny, 2000; Davies, 2003; Stanford & Schneider, 2004; Klein et al., 2006). Ausgehend von der Tatsache, dass beim natürlichen Knochen turnover ein zurückbleibendes Kollagengerüst als Leitstruktur für neuen Knochen dient, formuliert Davies die Hypothese, dass ein ähnlicher Effekt

durch das Fibringerüst im Blutgerinnsel am frisch eingebrachten Implantat stattfinden kann (Davies, 1998).

Eine erfolgreiche Osseointegration gilt als die stabilste Form der Langzeitfixation zwischen Implantat und Knochen (Brånemark, 1983). Die wissenschaftlichen Grundlagen der Osseointegration wurden von der Arbeitsgruppe um den Göteborger Orthopäden Brånemark beschrieben, der Osseointegration definierte als den direkten funktionellen und strukturellen Verbund zwischen dem organisierten, lebenden Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantats (Brånemark, 1985). Carlsson und Mitarbeiter erweiterten die Definition der Osseointegration um den Kontakt zwischen Implantat und Knochen ohne dazwischenliegende Bindegewebsschicht im optischen Auflösungsbe- reich der Lichtmikroskopie (Carlsson et al., 1986).

Neben den Materialeigenschaften und der Struktur der Implantatoberfläche ist vor allem die als Funktion aus mechanischer Knochenqualität, Implantatgeometrie und Eindrehmoment zu beschreibende Primärstabilität am Implantationsort mit Verhinderung von Relativbewegungen zwischen Knochen und Implantat für eine schnell eintretende und anhaltende Sekundärstabilität bzw. Osseointegration entscheidend (van Recum, 1990; Schmitz et al., 1996; Hoffmann et al., 1997; Östman et al., 2005; Ottoni et al., 2005). Während die meisten metallischen Implantatmaterialien (u. a. Stahl) hinsichtlich der vom Knochengewebe zu erwartenden Reaktionen als biotolerant gelten und dauerhaft von einer fibrösen Bindegewebsschicht umkapselt werden (Distanzosteogenese), rufen Titan und seine Legierungen als bioinerte Werkstoffe eine Kontaktosteogenese hervor, bei der keine Bindegewebsbildung erfolgt und das Knochengewebe auf der Implantatoberfläche abgelagert werden kann (Schroeder, 1994; Rößler et al., 1997; Wintermantel et al., 2002).

1.5 Wirkung von elektrischen Feldern auf Zellen

Körpereigene elektrische Felder treten während der Wundheilung, Embryogenese, Morphogenese und des Tumorwachstums auf und bewirken dabei eine gerichtete Migration von Zellen (Monsees & Funk, 2005). Gleichströme findet man im normalen Knochen. Diese steigen um eine Frakturzone deutlich an und kehren infolge des Heilungsprozesses wieder auf Normalwerte zurück (McGinnis, 1989).

In vitro wandern die meisten Zellen bei Feldstärken von 1 – 10 V/cm auf die Kathode zu, wobei Geschwindigkeit und Ausmaß der gerichteten Bewegung spannungsabhängig sind. Nur wenige Zelltypen, wie Zellen aus dem Linsenepithel des Rindes und einige transformierte humane Zelllinien bewegen sich in Richtung Anode (Stump & Robinson, 1983; Chao et al., 2000; Wang et al., 2000; Wang et al., 2003). Zellen richten sich im elektrischen Feld in der Regel senkrecht zu den elektrischen Feldlinien aus (Stump & Robinson, 1983; Soong et al., 1990; Chao et al., 2000; Curtze et al., 2004). Diese Ausrichtung findet in zwei Phasen statt. Zunächst ziehen die Zellen ihre in Richtung der elektrischen Feldlinien orientierten Zellausläufer zurück und elongieren in einer zweiten Phase senkrecht zu den elektrischen Feldlinien. Die für diesen Orientierungsprozess benötigte Zeit ist negativ zur elektrischen Feldstärke korreliert (Curtze et al., 2004). Membranruffles, Lamellipodien und Filipodien werden bei Elektrotaxis vorzugsweise in Bewegungsrichtung ausgebildet (Soong et al., 1990). Im Gegensatz zu der bei der Wundheilung beobachteten Umverteilung von Golgi-Apparat, Mikrotubulus-Organisations-Centrum (MTOC) sowie post translational detyrosinierten (GLU) Mikrotubuli in Bewegungsrichtung der Zelle (Kupfer et al., 1982; Gundersen & Bulinski, 1988), findet eine solche Orientierung während der allein durch ein externes elektrisches Feld vermittelten Zellmigration nicht statt (Finkenstein et al., 2004).

Beim Erkennen von elektrischen Feldgradienten durch Zellen könnte Elektrophorese eine entscheidende Rolle spielen (Jaffe, 1977). Das Anlegen eines elektrischen Feldes induziert eine Seitwärtsbewegung von geladenen Molekülen innerhalb der Zellmembran (Poo, 1981). Umverteilte Membranmoleküle könnten z. B. durch Komponenten des Zytoskeletts „erspürt“ und als Orientierungshilfe verwendet werden (Monsees & Funk, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli an der durch ein elektrisches Feld induzierten Migration von Fibroblasten beteiligt sind und von vielen Signalmolekülen als Transportsystem verwendet werden, um effektiv Signale zwischen dem führenden sowie nachfolgenden Ende der Zelle und dem Kern auszutauschen (Finkenstein et al., 2004).

In zahlreichen klinischen und Tierstudien wurde gezeigt, dass elektrische Felder Osteogenese *in vivo* induzieren und verstärken können (Richez et al., 1972; Hassler et al., 1977; Shandler et al., 1979; Ganne, 1988; Alexa, 1996; Yonemori et al., 1996; Huang, 1997). Die zugrunde liegenden Mechanismen auf zellulärer und molekularer Ebene sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden (Hartig et al., 2000; Chang et al., 2004).

Elektrische Felder beschleunigen die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten *in vitro* und steigern die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen sowie Wachstumsfaktoren (Hartig et al., 2000; Aaron et al., 2004). Wird ein ganzes Organ elektrisch stimuliert, ist es möglich, nur eine Zellpopulation der vielen verschiedenen Zelltypen innerhalb des Organs spezifisch zu beeinflussen, da gezeigt werden konnte, dass das Ansprechen auf unterschiedliche elektrische Feldstärken zellspezifisch ist (Binderman et al., 1985). In Zukunft könnten statische elektrische Felder klinisch eingesetzt werden, um die Wundheilung zu fördern, neues mesodermales Gewebe zu bilden und die überschießende Zellmigration bei Narbenbildung zu hemmen (Finkenstein et al., 2004).

1.6 Zielsetzung der Studie

Ziel der Studie war es, den Einfluss eines elektrischen Feldes auf das Proliferationsverhalten und die mitochondriale Zellaktivität sowie das Zytoskelett Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) in einem *in vitro*-Modell zu untersuchen. Es wurden eigens dafür konzipierte Elektrokammern hergestellt, in denen die als Testoberflächen verwendeten Stahl- und Titanplättchen polarisiert wurden. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus konnten elektrische Felder simuliert werden, wie sie an rauen Oberflächen auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Puffer, Medien und Lösungen

Es wurde Reinstwasser aus der laboreigenen Wasseraufbereitungsanlage Purelab Ultra (Fa. USF Deutschland, Ransbach-Baumbach) verwendet.

PBS-Puffer

8,0 g Natriumchlorid NaCl (Fa. Merck, Darmstadt)

0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (Fa. Merck, Darmstadt)

2,8 g Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ (Fa. Merck, Darmstadt)

0,2 g Kaliumchlorid KCl (Fa. Merck, Darmstadt)

ad 1000 ml Reinstwasser

20 min bei 121 °C autoklavieren

Isoton-Pufferlösung

(Fa. Beckman Coulter, Krefeld)

9,72 g/l Natriumsulfat, wasserfrei

4,00 g/l Natriumchlorid

1,00 g/l Dimethylolharnstoff

0,11 g/l Procainhydrochlorid

Die isotone, phosphatgepufferte Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert.

Foetal Bovine Serum (FCS)

(Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

EU approved origin (South America)

mycoplasma and virus screened, performance tested,

inaktiviert durch 30 min Inkubation bei 56 °C

DMEM-Kulturmedium für Osteosarkomzellen MG-63

60,0 ml Dulbecco's Mod Eagle Medium (500 ml)

mit 4,5 g/l Glukose, mit GlutaMAX™-I, mit Pyruvat
(Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

5,0 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 IU/l – 10.000 IU/ml

(Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

5,0 ml HEPES Buffer (Solution 1M)

(Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

50,0 ml Foetal Bovine Serum (FCS)

(Fa. Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe)

Accutase

(Fa. PAA Laboratories, Cölbe)

Proliferations-Reagent WST-1

(Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

Farbstoff WST-1 (4-3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium-1,3-Benzendi-
sulfonat)

bisBenzimide, Hoechst 33258 Trihydrochloride

(Fa. Sigma, Taufkirchen)

Stammlösung: 5,0 µg/ml Ethanol

Arbeitslösung: 20,0 µl/1000µl PBS (aus Stammlösung)

Mowiol

(Fa. Sigma, Taufkirchen)

PBS ohne KH₂PO₄ ansetzen und mit KH₂PO₄ pH 8,0 einstellen

3,0 g Mowiol in 40 ml PBS lösen, 16 h rühren

20,0 ml wasserfreies Glycerin (Fa. Merck, Darmstadt) dazugeben, 16 h rühren

15 min bei 12000 U/min zentrifugieren, aliquotieren, lagern bei –20 °C

Aceton

(Fa. Merck, Darmstadt)

in Glasschale gekühlt auf –20 °C

Methanol

(Fa. Merck, Darmstadt)

in Glasschale gekühlt auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

96 % Ethanol

(Fa. Brüggemann, Heilbronn)

2%ige SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)-Lösung

(Fa. Sigma, Taufkirchen)

5%ige Extranlösung, Extran MA 01 alkalisch

(Fa. Merck, Darmstadt)

Isopropanol

(Fa. Heding, Stuttgart)

2.1.2 Antikörper**2.1.2.1 Primärantikörper****anti- α -Actinin**

(Fa. Sigma, Taufkirchen)

monoklonaler Antikörper (IgG1), Spezies Maus, Klon BM-75.2

Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Verdünnung 1 : 200 in PBS + 0,1 % BSA (Fa. Sigma, Taufkirchen)

anti- β -Tubulin

(Fa. Sigma, Taufkirchen)

monoklonaler Antikörper (IgG1), Spezies Maus, Klon TUB 2.1

Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Verdünnung 1 : 200 in PBS + 0,1 % BSA

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Cy™2-konjugiertes Affinity Pure Ziege anti-Maus IgG + IgM (H+L)

(Fa. Dianova, Hamburg)

Lagerung bei -20 °C

Verdünnung 1 : 75 in PBS + 0,1 % BSA

2.1.3 Osteosarkomzelllinie MG-63

Die Osteosarkomzelllinie MG-63 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen. Erstmals beschrieben wurde sie 1977 (Billiau et al., 1977). Ursprung dieser stabilen, reproduzierbaren Zelllinie sind Zellen, die aus dem Osteosarkom eines 14-jährigen männlichen Kaukasiers isoliert wurden. In Kultur gebracht wachsen die Zellen adhärent und zeigen fibroblastische Morphologie. Sie exprimieren die Rezeptoren RI und RII für TGF- β . Genetisch liegt eine Abweichung vom normalen Chromosomensatz vor.

Die Zellkultivierung erfolgte bei 37 °C unter einer 5%igen CO_2 -Begasung. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Mod Eagle Medium verwendet.

2.1.4 Prüfkörper

Als Prüfkörper wurden Stahlplättchen (1.4441) aus medizinischem Edelstahl sowie Titanplättchen, bestehend aus Titan-Grade 2, verwendet. Die Prüfkörper wurden von der hauseigenen Werkstatt hergestellt und lagen als kreisrunde Scheiben mit einem Durchmesser von 15,50 mm (entsprechend dem Innendurchmesser einer handelsüblichen 24-Well-Zellkulturplatte) und einer Höhe von 1,20 mm (Stahlplättchen) bzw. 1,00 mm (Titanplättchen) vor. Zur besseren Handhabung wiesen die Plättchen eine randständige Bohrung (Durchmesser: 1,65 mm) auf.

2.1.5 Elektrokammern

Damit auf die Prüfkörper ein elektrisches Feld wirken konnte, wurden von der haus-eigenen Werkstatt speziell dafür konzipierte Elektrokammern hergestellt (Abbildung 2.1, 2.2). Die Kammern bestanden aus einem Kunststoffgehäuse und konnten mit einem Deckel und Boden mit 4 Schrauben dicht verschlossen werden. Das Gehäuse wies sechs Vertiefungen auf, in denen die Plättchen passgenau gelagert wurden und mit den Probenkontaktierungen verbunden werden konnten. Die Ringelektrode verlief am Innenrand des Kunststoffgehäuses. Probenkontaktierungen und Ringelektrode bestanden jeweils aus dem gleichen Material wie die verwendeten Prüfkörper (medizinischer Edelstahl bzw. Titan-Grade 2).

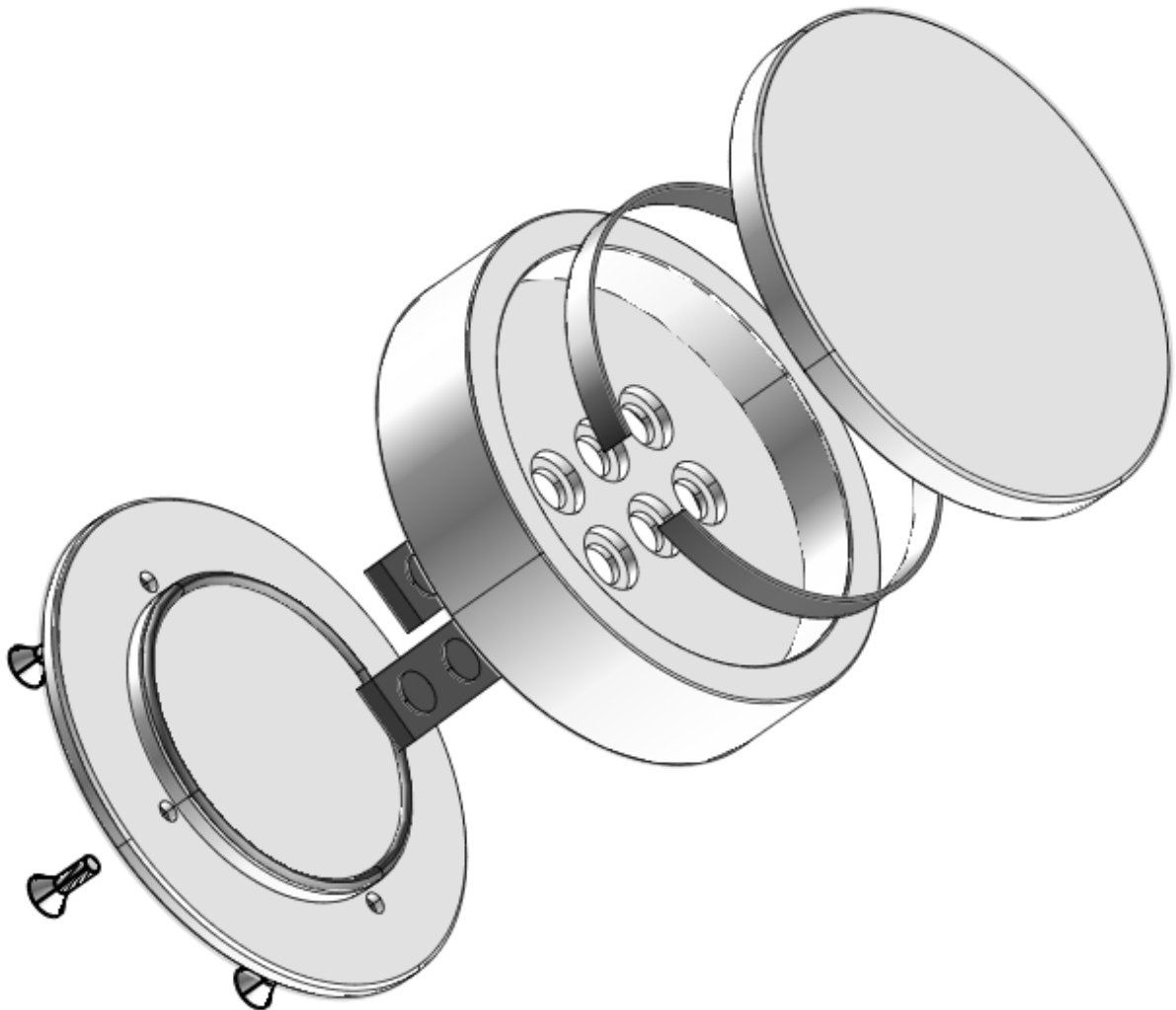


ABBILDUNG 2.1: Elektrokammeraufbau

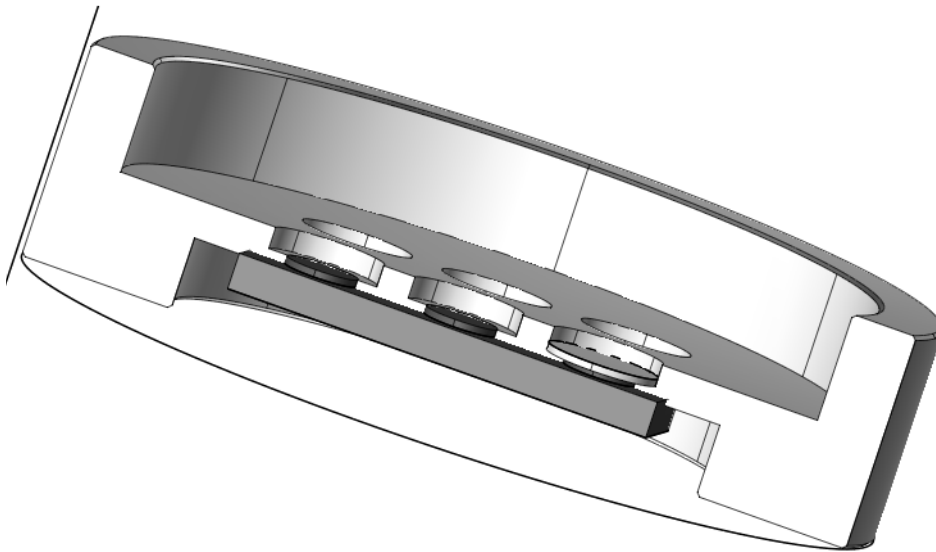


ABBILDUNG 2.2: Elektrokammerschnittbild

2.1.6 Geräte

Geräte	Herkunft
Analysenwaage	Fa. Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV	Fa. Systec, Wettenberg
Bechergläser	Fa. Schott, Mainz
Brutschrank	Fa. Jouan, Unterhaching
Digitalkamera AxioCam MRm	Fa. Carl Zeiss, Göttingen
Digitalmultimeter VC 840	Fa. Conrad Electronic, Hirschau
DMM Scanner	Fa. Keithley, München
Eisbad	Fa. Hartenstein, Würzburg
Eppendorfpipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axio HBO 100 Imager. M1	Fa. Carl Zeiss, Göttingen
Folienschweißgerät	Fa. Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen
Gefrierschrank	Fa. Linde, Wiesbaden
Gefriertruhe	Fa. Bader, Würzburg
Glasschalen (eckig, rund)	Fa. Hartenstein, Würzburg
Kühl-Gefrierkombination	Fa. Bosch, Stuttgart

Kühlschrank	Fa. Quelle, Fürth
Kunststoffbehälter	Fa. Hartenstein, Würzburg
Labormikroskop	Fa. Leitz, Wetzlar
Magnetrührer	Fa. IKA-Werke, Staufen
Magnetrührstäbchen	Fa. Hartenstein, Würzburg
Metallhaken am Gewindestab	hauseigene Werkstatt, Würzburg
Metallsonde	Fa. Hartenstein, Würzburg
Multipette	Fa. Eppendorf, Hamburg
Objektiv EC Plan-Neofluar 40x/0,75 Ph2	Fa. Carl Zeiss, Göttingen
Photometer Spectrafluor Plus	Fa. Tecan Deutschland, Crailsheim
Pinzetten	Fa. Hartenstein, Würzburg
Pipettierhilfe	Fa. Brand, Wertheim
Präparateständer	hauseigene Werkstatt, Würzburg
R-Dekade	Fa. EKF Elektronik, Hamm
Reinstwasseranlage Purelab Ultra	Fa. USF Deutschland, Ransbach-Baumbach
Scanning Potentiostat Model 326	Fa. EG&G, München
Sterilarbeitsbank LaminAir HB 2472	Fa. Heraeus, Hanau
Stickstoffbehälter	Fa. Air Liquide Kryotechnik, Düsseldorf
Ultraschallbad	Fa. Bandelin electronic, Berlin
Waage	Fa. Mettler-Waagen, Gießen
Wasserbad	Fa. Memmert, Schwabach
Zellzähler CASY 1 Modell TTC	Fa. Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge	Fa. Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge	Fa. Jouan, Unterhaching

TABELLE 2.1: Geräteliste

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Herkunft
24-Well-Zellkulturplatten	Fa. Nunc, Wiesbaden
96-Well-Zellkulturplatten	Fa. Nunc, Wiesbaden
Autoklaventüten	Fa. Wipak Medical, Walsrode
Combitips plus	Fa. Eppendorf, Hamburg

Deckgläschen für Mikroskopie (rund, Ø 15 mm)	Fa. Hartenstein, Würzburg
Einmalpipetten	Fa. Costar, Bodenheim
Einmalspitzen	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf Reaktionsgefäße	Fa. Greiner, Frickenhausen
Filterpapier	Fa. Schleicher & Schuell, Dassel
Kryoröhrchen	Fa. Nunc, Wiesbaden
Latexhandschuhe (puderfrei)	Zentrallager des Klinikums der Universität Würzburg
Objekträger mit Mattrand	Fa. Hartenstein, Würzburg
Objekträgeraufbewahrungsbox	Fa. Hartenstein, Würzburg
Parafilm	Fa. Hartenstein, Würzburg
Pasteurpipetten	Fa. Scherf, Meiningen
Zählgefäße	Fa. Hartenstein, Würzburg
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Fa. Falcon, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Fa. Greiner, Frickenhausen

TABELLE 2.2: Verbrauchsmaterialliste

2.1.8 Computerprogramme

Computerprogramme	Herkunft
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San Jose (USA)
AxioVision Rel. 4.5	Carl Zeiss, Göttingen
Harvard Graphics AP 3.0	Harvard Graphics, Amherst (USA)
Magellan 3	Tecan Deutschland, Crailsheim
Microsoft Office XP Professional	Microsoft Corporation, Redmond (USA)

TABELLE 2.3: Computerprogrammliste

2.2 Methoden

2.2.1 Reinigung der Prüfkörper und Elektrokammern

Je 10 Prüfkörper wurden mit einer Pinzette an einer in Eigenbau hergestellten Haltevorrichtung, die das jeweilige Plättchen über einen Metallhaken in der randständigen Bohrung fixierte, befestigt und berührungsfrei in ein 600 ml Becherglas gehängt.

Die in ihre Einzelkomponenten zerlegten Elektrokammern wurden in je einen 2 l fassenden Kunststoffbehälter überführt.

Zur Herstellung gleicher Ausgangsbedingungen wurden dann die Prüfkörper und Elektrokammern mit folgenden Medien der Reihe nach im Ultraschallbad bei 40 °C gereinigt:

Dauer	Reinigungsmedium
10 min	2%ige SDS-Lösung
10 min	Reinstwasser
10 min	5%ige Extranlösung
10 min	Reinstwasser
10 min	Reinstwasser
10 min	Isopropanol

Die Prüfkörper und wieder zusammengebauten Elektrokammern wurden anschließend 20 min bei 121 °C und 1,0 bar autoklaviert.

2.2.2 Schaltkreis der Versuchsanordnung

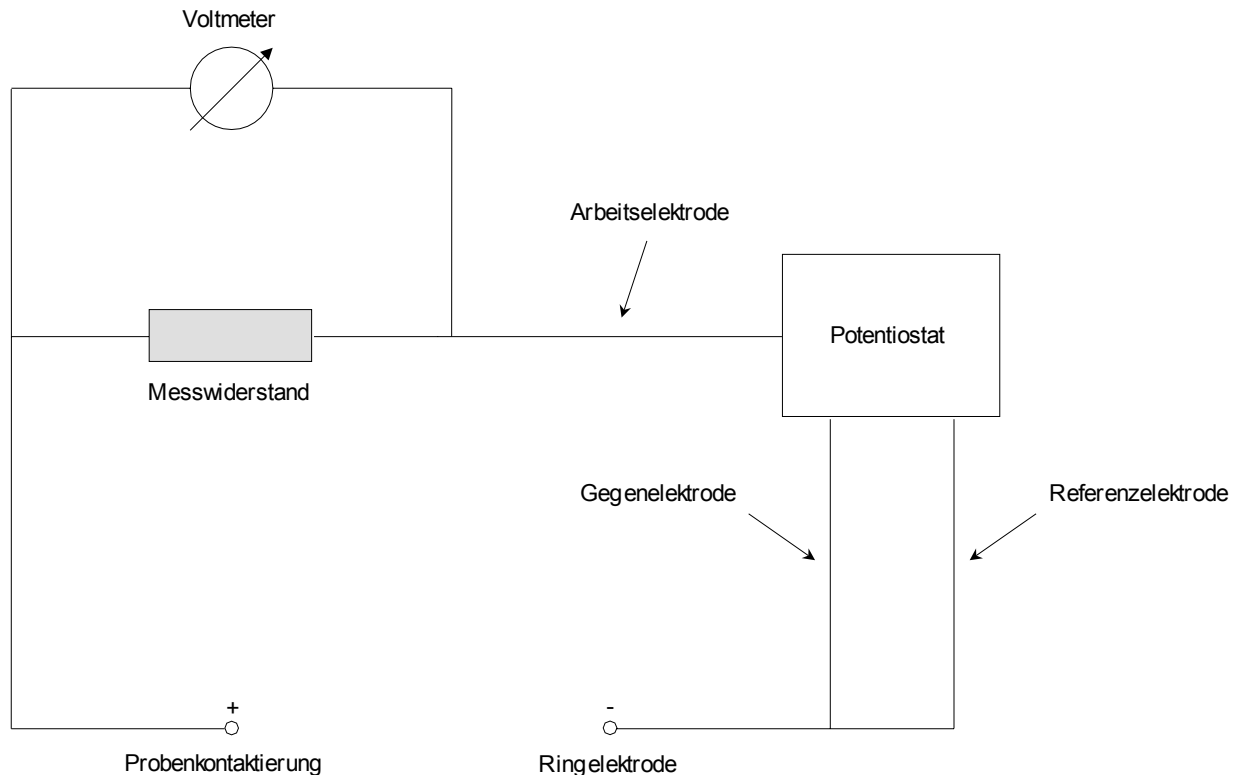


ABBILDUNG 2.3: Schaltkreisskizze

Abbildung 2.3 zeigt den Schaltkreis der Versuchsanordnung. Die Prüfkörper wurden über die Probenkontaktierungen mit dem Pluspol der Stromquelle verbunden, die Ringelektrode mit dem Minuspol. Über dem Messwiderstand (1000 Ω) konnte mit einem Voltmeter die am Potentiostat eingestellte Spannung von +600 mV kontrolliert werden.

2.2.3 Zellkultivierung

Ein Kryoröhrchen mit tiefgekühlten Zellen MG-63 wurde aus flüssigem Stickstoff entnommen und bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden unter der Sterilarbeitsbank mit 9,0 ml DMEM-Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wurde 5 min bei Raumtemperatur und 1000 U/min zentrifugiert und der Mediumüberstand abgesaugt. Dieser Schritt diente dazu, das beim Einfrieren der Zellen zugegebene Dimethylsulfoxid-FCS-Gemisch zu entfernen.

Das Zellpellet wurde mit 2,0 ml DMEM-Medium resuspendiert und die Suspension mit 5 ml DMEM-Medium in eine kleine Zellkulturflasche überführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Die Zellkultur wurde auf Mycoplasmenbefall untersucht, belastete Zellkulturen wurden verworfen. Nach ca. 6 h erfolgte der erste Mediumwechsel, weitere Mediumwechsel wurden im 2-tägigen Abstand durchgeführt. Sobald die Zellkulturflaschen gut bewachsen waren, wurden die Zellen gewaschen, abgelöst und in großen Zellkulturflaschen subkultiviert.

2.2.4 Proteinanlagerung und Zellaussaat

Je 6 Prüfkörper der Testoberfläche wurden unter der Sterilarbeitsbank in die beiden Elektrokammern gelegt und mit je 25 ml (Stahlkammern) bzw. 35 ml (Titankammern) fötalem Kälberserum (FCS) bedeckt. Die Kammern wurden 35 min bei 37 °C inkubiert. Dabei wurde eine Elektrokammer je nach geplantem Versuch entsprechend der Schaltkreisskizze (Abbildung 2.3) an den Stromkreis angeschlossen. Die am Potentiostat eingestellte Spannung von +600 mV wurde alle 10 min mit einem digitalen Spannungsmessgerät überprüft und protokolliert.

Für die nachfolgenden Versuchsansätze wurden Zellsuspensionen von 50 000 Zellen/ml (für die Zellzahlbestimmung und den WST-1 Zellvitalitätstest) bzw. 30 000 Zellen/ml (für die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie) benötigt. Hierzu wurde unter der Sterilarbeitsbank das DMEM-Medium in den Zellkulturflaschen mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgezogen und die adhärenen Zellen zweimal mit je 10 ml PBS-Puffer gespült. Anschließend wurden die Zellen durch eine 7-minütige Inkubation mit 1 ml Accutase bei 37 °C abgelöst. Zur Neutralisation und damit zum Abstoppen der Accutase-Wirkung wurden 5 ml DMEM-Medium hinzupipettiert. Nach Homogenisierung der gewonnenen Zellsuspension wurde eine Zellzählung durchgeführt.

Um die gewünschten 50 000 bzw. 30 000 Zellen/ml zu erhalten, wurde eine entsprechende Verdünnung mit dem DMEM-Medium hergestellt. Nach einer Kontrollzählung und gründlichem Absaugen des FCS aus den Elektrokammern wurden die Kammern und 24-Well-Kulturplatten mit der Zellsuspension beimpft. In den Stahlkammern wurden je 25 ml, in den Titankammern je 35 ml der Zellsuspension verteilt. In die 24-Well-Platten wurden pro Well jeweils 1 ml der Zellsuspension gegeben. Die Elektrokammern und 24-Well-Zellkulturplatten wurden anschließend für 48 h in den Brutschrank (37 °C) gestellt, wobei wiederum die eine Kammer optional an den

Stromkreis angeschlossen wurde. Die angelegte Spannung (+600 mV) wurde stichprobenweise kontrolliert und protokolliert.

2.2.5 Zellzahlbestimmung

2.2.5.1 Messprinzip

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde der Zellzähler CASY 1 Modell TTC (Fa. Schärfe System, Reutlingen) verwendet (Abbildung 2.4).

Das Messprinzip beruht auf einer Widerstandsmessung in Kombination mit einer Signalauswertung (Pulsflächenanalyse).

Die Zellsuspension wird mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine elektrolytgefüllte Kapillare definierter Geometrie gesaugt, an der während der Messung über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt wird. Beim Durchtritt durch die Messkapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolytlösung. Dies führt zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke, über die der Zellzähler das Volumen der Zellen und damit die Zellzahl ermittelt.

Die Zellen werden beim Durchgang durch die Messpore mit einer Frequenz von 1 MHz abgetastet. Aus den Einzelmessungen wird dann das Integral des Messsignals berechnet (Pulsflächenanalyse).

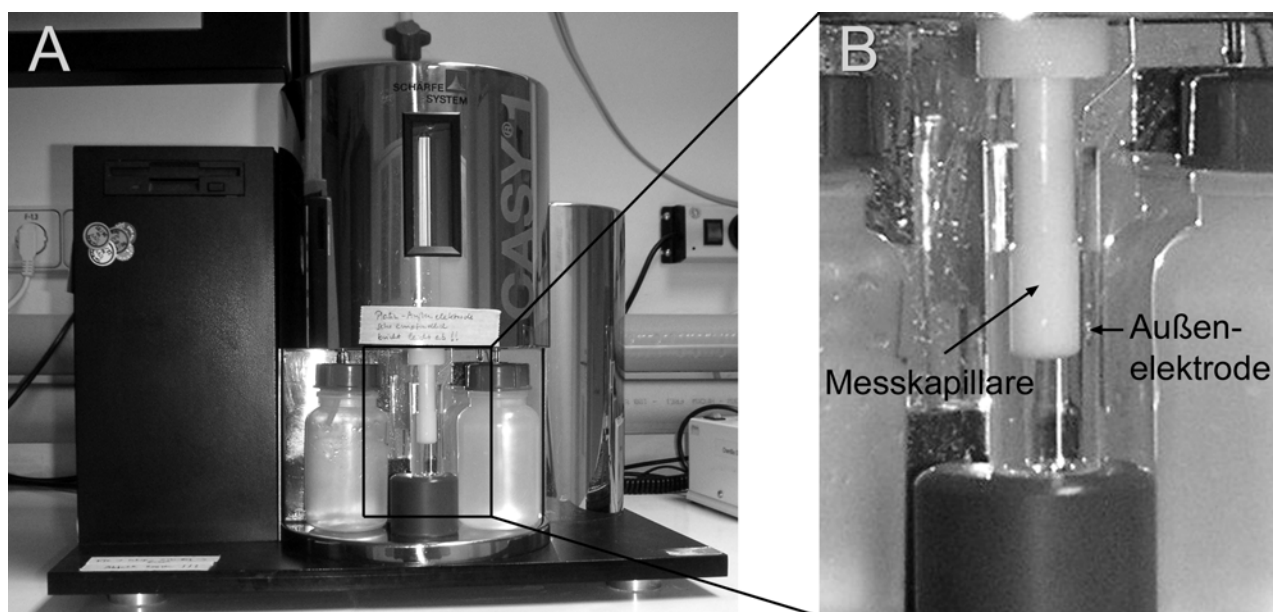


ABBILDUNG 2.4: Zellzähler CASY 1 Modell TTC
(A) Übersicht. (B) Markierter Ausschnitt aus (A).

2.2.5.2 Durchführung

Die Prüfkörper wurden unter der Sterilarbeitsbank aus den Elektrokammern in eine 24-Well-Zellkulturschale überführt. Das vorgelegte DMEM-Medium (1 ml/Well) wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellschicht zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden je 500 µl Accutase zupipettiert und die Kulturplatten 7 min bei 37 °C inkubiert. Nach vorsichtigem Anschlagen der 24-Well-Zellkulturplatten wurde unter dem Labormikroskop die vollständige Ablösung der Zellen kontrolliert. Durch Zugabe von 500 µl DMEM-Medium pro Well wurde die Accutase-Wirkung gestoppt. Nach 20-maligem Auf- und Abpipettieren mit der 1,0 ml Eppendorfpipette zum Vereinzeln der Zellen wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml vorgelegte Isoton-Pufferlösung gegeben und sofort im Zellzähler gemessen.

2.2.6 WST-1 Zellvitalitätstest

2.2.6.1 Messprinzip

Dieser Versuch beruht auf der Umsetzung des Farbstoffs WST-1 (4-3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium-1,3-Benzendisulfonat) durch die Succinatdehydrogenase in den Mitochondrien stoffwechselaktiver Zellen zum farbigen Formazan. Die Absorption wird im Photometer gemessen und ist direkt proportional zur Stoffwechselaktivität der Zellen.

2.2.6.2 Durchführung

In einem Reaktionsgefäß mit Deckel wurden unter der Sterilarbeitsbank Proliferations-Reagent WST-1 und DMEM-Kulturmedium im Verhältnis 1 : 10 gemischt. Nach Überführen der Prüfkörper in eine 24-Well-Kulturplatte und Absaugen des vorgelegten DMEM-Mediums (1 ml/Well) aus jeder Kavität wurden je 600 µl des hergestellten Gemisches zupipettiert. Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden zur Doppelbestimmung je 2 x 200 µl des Gemisches aus den Überständen der mit Zellen bewachsenen Prüfkörper in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Absorption im Photometer Spectrafluor Plus (Fa. Tecan Deutschland, Crailsheim) mit einem Messfilter von 450 nm und einem Referenzfilter von 690 nm ermittelt.

Als Leerwert für diese Messung diente das Gemisch aus Proliferations-Reagent WST-1 und DMEM-Kulturmedium (Verhältnis 1 : 10). Die Einstellungen am Photometer wurden mit der Bedienungssoftware Magellan 3 vorgenommen.

2.2.7 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

2.2.7.1 Prinzip

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie dient der Identifizierung und Lokalisierung von Proteinen in Zellen. Zunächst bindet ein unmarkierter, spezifischer Primärantikörper an antigene zelluläre Strukturen. Der gebundene Primärantikörper wird anschließend mittels eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers nachgewiesen, der gegen das Immunglobulin des Primärantikörpers gerichtet ist und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann.

2.2.7.2 Durchführung

Die Prüfkörper wurden mit Hilfe einer Pinzette in einen Präparateständer überführt und kurz in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Methanol/Aceton fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden die Präparate mit Präparateständer 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in eine mit Methanol gefüllte Glasschale und 4 min bei ebenfalls $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in eine mit Aceton gefüllte Glasschale gestellt. Die Präparate wurden mit der Zellseite nach oben auf ein Filterpapier gelegt und 30 min luftgetrocknet.

Zur Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Präparate mit den fixierten und permeabilisierten Zellen in eine feuchte Kammer (runde Glasschale, ausgelegt mit in Wasser getränktem Filterpapier, auf das ein entsprechend großes Stück Parafilm gelegt wurde) überführt und mit $75\text{ }\mu\text{l}$ des im Verhältnis 1 : 200 in PBS mit 0,1 % BSA verdünnten Primärantikörpers (anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin) überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur in der geschlossenen feuchten Kammer.

Die Präparate wurden in den Präparateständer, der sich in einer mit PBS gefüllten Glasschale befand, überführt und kurz gewaschen. Anschließend wurden die Präparate im Präparateständer für je 5 min in einer zweiten und dritten mit PBS gefüllten Glasschale gewaschen.

Der Fluorochrom-markierte Sekundärantikörper (Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege) wurde im Verhältnis 1 : 75 in PBS mit 0,1 % BSA verdünnt. Die Präparate wurden in die feuchte Kammer gelegt und mit 50 µl Sekundärantikörperlösung 15 min bei Raumtemperatur in der geschlossenen Feuchtkammer inkubiert.

Zur Anfärbung der chromosomalen DNA wurden pro Präparat 2 Tropfen des DNA-Farbstoffs Hoechst 33285 dazugegeben. Die Inkubation erfolgte für 7 min bei Raumtemperatur.

Die Präparate wurden in den Präparateständer zurücküberführt und dreimal in mit PBS gefüllten Glasschalen gewaschen (einmal kurz, zweimal für je 5 min).

Zum Entwässern wurde der Präparateständer mit den Präparaten für 1 min in eine mit 96 % Ethanol gefüllte Glasschale gestellt. Die Präparate wurden anschließend mit der Zellseite nach oben auf ein Filterpapier gelegt und mindestens 30 min luftgetrocknet.

Zur Einbettung wurde auf die Zellseite der Probenplättchen ein Tropfen Mowiol aufgebracht und ein frisches Deckglas darauf gelegt. Die Probenplättchen wurden nun mit einem weiteren Tropfen Mowiol auf dem Objektträger mit der Zellseite nach oben fixiert.

Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axio HBO 100 Imager. M1 (Fa. Carl Zeiss, Göttingen) mit Plan-Neofluar 40x Objektiv (Abbildung 2.5). Das Mikroskop war mit der Digitalkamera AxioCam MRm gekoppelt, die von der Bedienungssoftware AxioVision Rel. 4.5 unterstützt wurde. Die mit der Kamera aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden mit Adobe Photoshop 7.0 zusammengestellt.



ABBILDUNG 2.5: Fluoreszenzmikroskop Axio HBO 100 Imager. M1

2.2.8 Versuchsalgorithmus und Plattenbelegung

Für die Testoberflächen Stahl und Titan wurden jeweils drei Versuchsreihen durchgeführt, in denen eine der mit den jeweiligen Prüfkörpern beladenen Kammern nur nach FCS-Zugabe für 35 min (zur Untersuchung der „Proteinadsorption“) bzw. nur nach Zellaussaat für 48 h (zur Untersuchung der „Zelladsorption“) bzw. nach FCS-Zugabe für 35 min und nach Zellaussaat für 48 h (zur Untersuchung der „Protein- und Zelladsorption“) bei einer Spannung von +600 mV an den Stromkreis angeschlossen wurde. Die andere Kammer wurde bei keiner der Versuchsreihen an den Stromkreis angeschlossen und diente damit jeweils als Negativkontrolle.

48 h nach Beimpfung der Prüfkörper mit 50 000 Zellen/ml wurden zu jeder der Versuchsreihen die Bestimmung der Zellzahl und der WST-1 Zellvitalitätstest durchgeführt. Die jeweils 6 Prüfkörper in beiden Kammern wurden gleichmäßig auf zwei 24-Well-Zellkulturplatten verteilt, wobei auf der einen die Zellzahlbestimmung und auf der anderen der WST-1 Zellvitalitätstest erfolgte. Die ersten 3 Kavitäten einer Platte wurden mit den Prüfkörpern der entsprechend der durchgeführten Versuchsreihe am Stromkreis

angeschlossenen Kammer belegt, die folgenden 3 Kavitäten mit den Prüfkörpern der Referenzkammer.

Je 3 weitere Kavitäten waren mit Prüfkörpern belegt, die bereits vor Zellaussaat in die 24-Well-Schale gelegt wurden bzw. blieben als Polystyrolkontrolle ohne Belegung. Diese 6 Kavitäten wurden wie die Elektrokammern am Tag 0 mit 50 000 Zellen/ml beimpft und 48 h bei 37 °C inkubiert. Sie dienten als sog. Wachstumskontrolle labor-internen Untersuchungen und gingen nicht in die genauere Analyse der Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit ein.

Es wurden für die Zellzahlbestimmung bzw. den WST-1 Zellvitalitätstest pro Kavität Doppelwerte genommen. Die drei Versuchsreihen pro Testoberfläche wurden je zweimal durchlaufen.

Die indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie wurde ebenfalls zu jeder Versuchsreihe durchgeführt, jedoch zeitlich getrennt von der Zellzahlbestimmung bzw. dem WST-1 Zellvitalitätstest. Die beiden Elektrokammern enthielten jeweils 4 Prüfkörper der jeweiligen Testoberfläche und wurden mit einer Zellsuspension von 30 000 Zellen/ml befüllt. Nach Inkubation für 48 h im Brutschrank bei 37 °C wurden je 2 Prüfkörper aus den beiden Kammern mit dem Primärantikörper anti- α -Actinin und je 2 Prüfkörper mit dem Primärantikörper anti- β -Tubulin beimpft. Pro Prüfkörper wurden bis zu 6 immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Die Immunfluoreszenzfärbungen der zwei in einer 24-Well-Zellkulturschale mit der Zellsuspension beimpften Prüfkörper wurden für laborinterne Zwecke herangezogen und gingen nicht in den Ergebnisteil ein.

2.2.9 Statistische Auswertung

Für alle Messwerte der Zellzahlbestimmung und des WST-1 Zellvitalitätstests wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Als Referenzwert zur Ermittlung des relativen Zellwachstums bzw. der relativen Zellaktivität wurde jeweils der auf den Plättchen der nicht am Strom angeschlossenen Kammer berechnete Mittelwert auf 100 % festgelegt. Die Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken graphisch dargestellt. Für die statistischen Berechnungen wurde die Excel-Tabellenkalkulations-

software verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet. Die Diagramme wurden mit Harvard Graphics AP 3.0 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Zellzahl und Zellaktivität

3.1.1 Untersuchungen zur Proteinadsorption

Bei diesem Versuchsteil sollte die Auswirkung einer Spannung auf die Adsorption der Proteine bestimmt werden. Dazu wurden die Testoberflächen 35 min mit FCS bei einer Spannung von +600 mV inkubiert. Auf die präadsorbierten Proteine wurden die Zellen (MG-63) gegeben und nach Aussaat 48 h ohne Spannung inkubiert. Diese Vorgehensweise wird im Folgenden als „Proteinadsorption“ bezeichnet. Als Referenzwert wurde der auf den nicht polarisierten Oberflächen berechnete Mittelwert auf 100 % festgelegt.

3.1.1.1 Auswertung der Stahloberflächen

In beiden Versuchsdurchgängen konnten auf den polarisierten Stahloberflächen höhere Zellzahlen ermittelt werden als auf den nicht polarisierten (Kontrolle). Im 1. Durchgang betrug die Zellzahl 131,99 %, im 2. Durchgang 104,09 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Unterschied zu den nicht polarisierten Kontrolloberflächen war in beiden Versuchsdurchgängen jedoch nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.1).

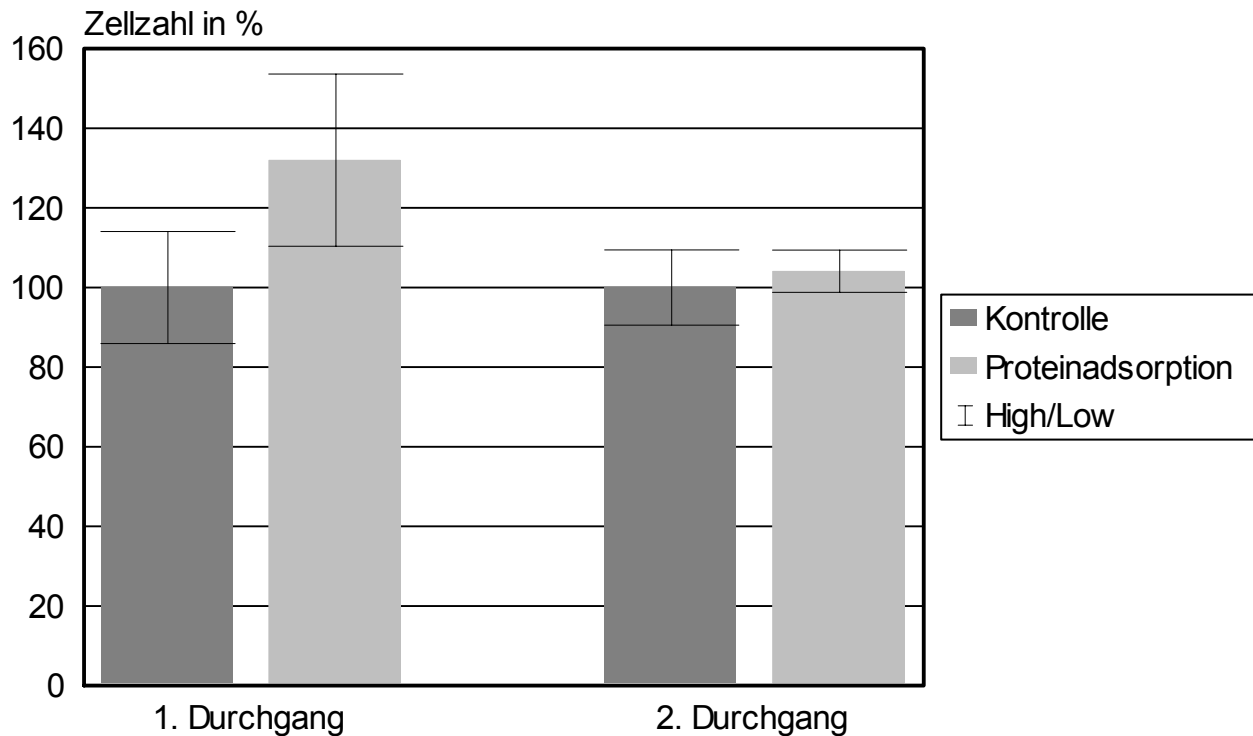


ABBILDUNG 3.1: Relative Zellzahl Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Proteinadsorption.

Auf der Ordinate ist die Zellzahl in % zu den nicht polarisierten Stahlplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurden auf den polarisierten Stahloberflächen höhere Zellzahlen ermittelt als auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war jeweils nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Mit dem WST-1 Test wurde auf den polarisierten Stahloberflächen im 1. Versuchsdurchgang eine tendenziell niedrigere (88,66 %), im 2. Versuchsdurchgang eine nahezu identische (97,34 %) mitochondriale Zellaktivität bestimmt wie auf den nicht polarisierten Stahloberflächen (Kontrolle). Der Unterschied zur Negativkontrolle war in beiden Versuchsdurchgängen nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.2).

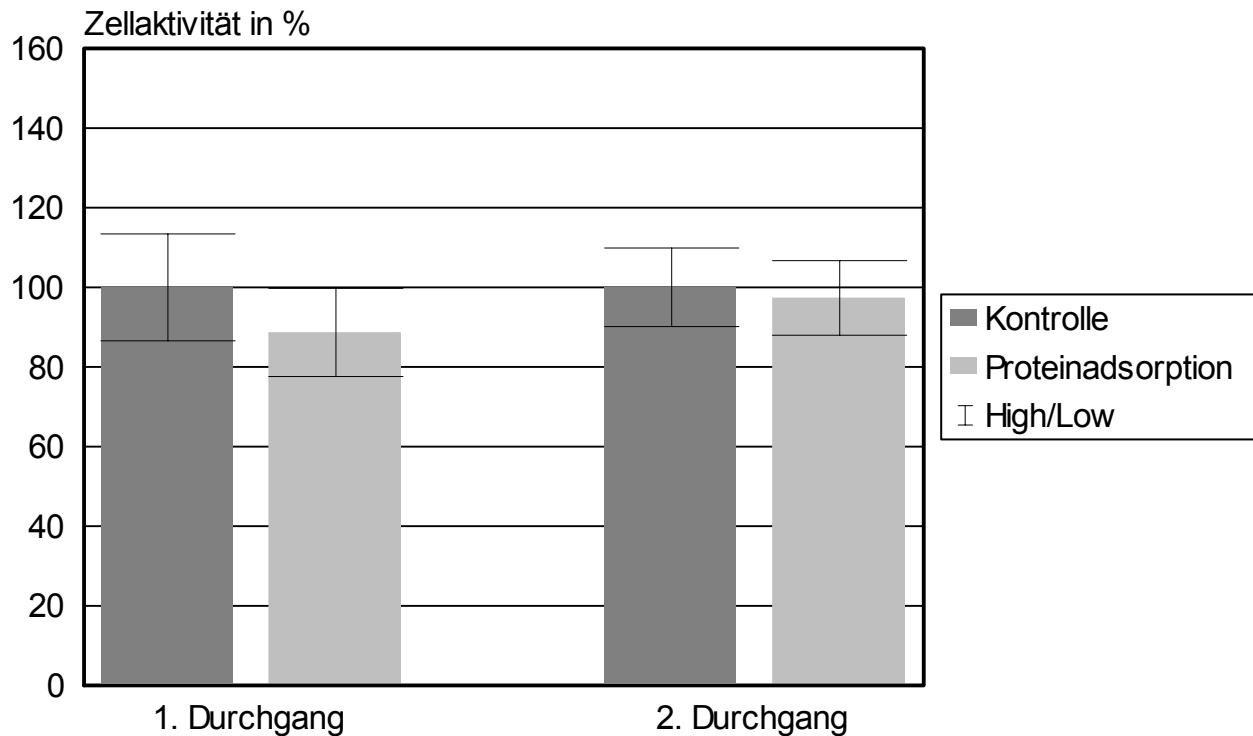


ABBILDUNG 3.2: Relative Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Proteinadsorption ermittelt durch WST-1 Test.

Auf der Ordinate ist die Zellaktivität in % zu den nicht polarisierten Stahlplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. Es wurde auf den polarisierten Stahloberflächen eine tendenziell niedrigere (1. Durchgang) bzw. nahezu identische (2. Durchgang) Zellaktivität ermittelt wie auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war jeweils nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.1.1.2 Auswertung der Titanoberflächen

In beiden Versuchsdurchgängen konnten auf den polarisierten Titanoberflächen niedrigere Zellzahlen ermittelt werden als auf den nicht polarisierten (Kontrolle). Im 1. Durchgang betrug die Zellzahl 94,04 %, im 2. Durchgang 87,55 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Während im 1. Versuchsdurchgang kein signifikanter Unterschied zu den nicht polarisierten Kontrolloberflächen festgestellt wurde ($p \geq 0,05$), war die Zellzahl im 2. Versuchsdurchgang auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant erniedrigt ($p < 0,05$) (Abbildung 3.3).

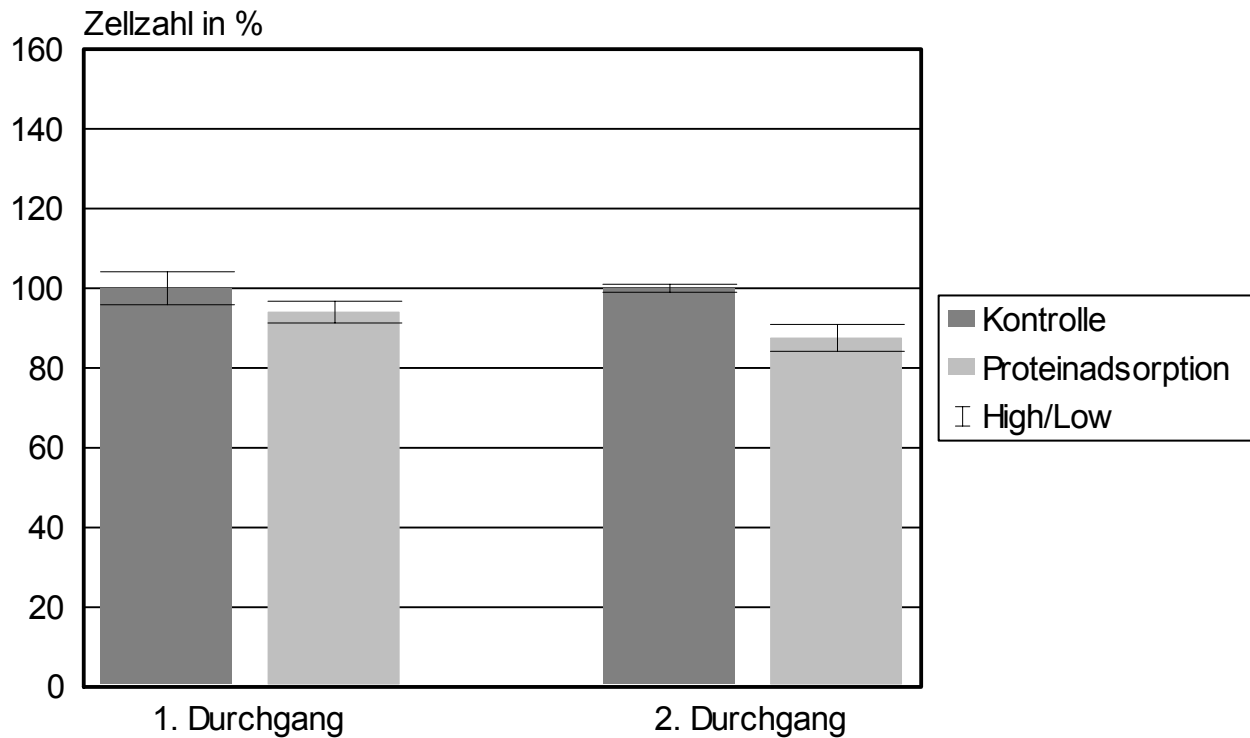


ABBILDUNG 3.3: Relative Zellzahl Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Proteinadsorption.

Auf der Ordinate ist die Zellzahl in % zu den nicht polarisierten Titanplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Versuchsdurchgängen wurden auf den polarisierten Titanoberflächen niedrigere Zellzahlen ermittelt als auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war im 1. Durchgang nicht signifikant ($p \geq 0,05$), im 2. Durchgang signifikant ($p < 0,05$).

Mit dem WST-1 Test wurde auf den polarisierten Titanoberflächen in beiden Versuchsdurchgängen eine tendenziell höhere mitochondriale Zellaktivität bestimmt als auf den nicht polarisierten (Kontrolle). Im 1. Durchgang betrug die Zellaktivität 104,47 %, im 2. Durchgang 106,65 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Unterschied zu den nicht polarisierten Kontrolloberflächen war in beiden Versuchsdurchgängen nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.4).

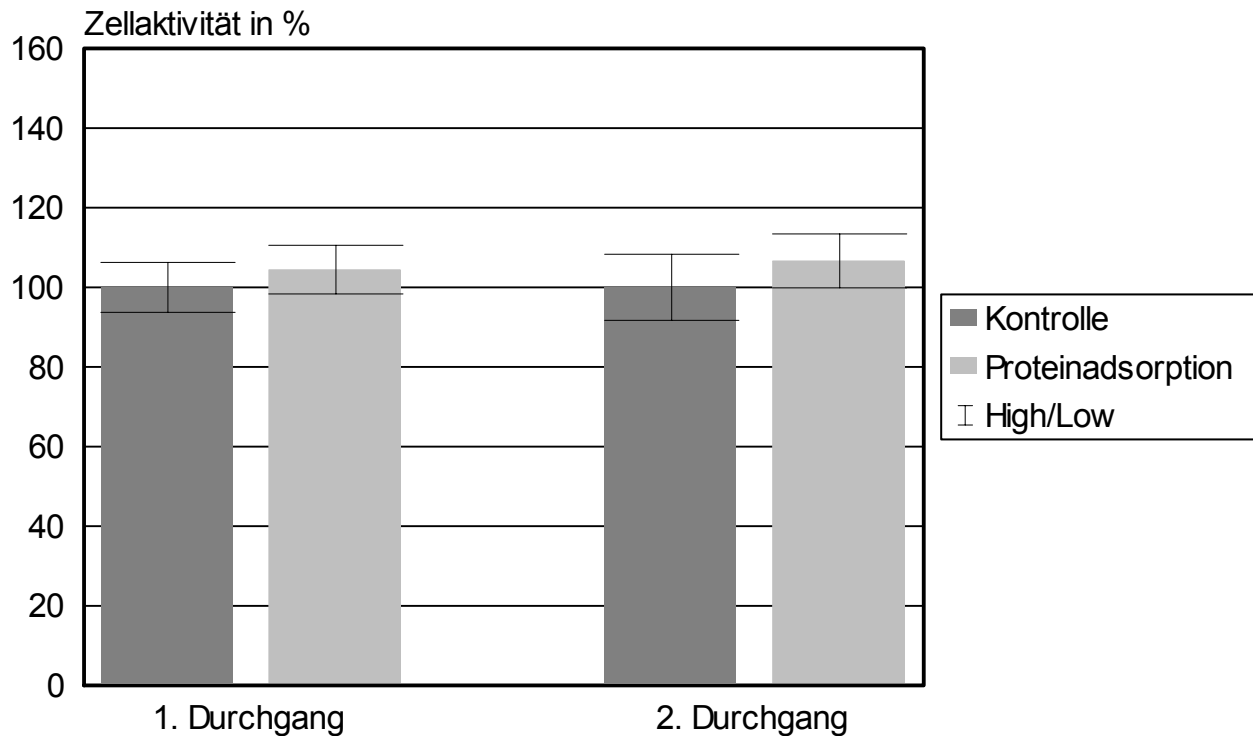


ABBILDUNG 3.4: Relative Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Proteinadsorption ermittelt durch WST-1 Test.

Auf der Ordinate ist die Zellaktivität in % zu den nicht polarisierten Titanplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurde auf den polarisierten Titanoberflächen eine tendenziell höhere Zellaktivität ermittelt als auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war jeweils nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.1.2 Untersuchungen zur Zelladsorption

Bei diesem Versuchsteil sollte die Auswirkung einer Spannung auf die Adsorption der Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Testoberflächen 35 min mit FCS ohne Spannung inkubiert. Auf die präadsorbierten Proteine wurden die Zellen (MG-63) gegeben und nach Aussaat 48 h bei einer Spannung von +600 mV inkubiert. Diese Vorgehensweise wird im Folgenden als „Zelladsorption“ bezeichnet. Als Referenzwert wurde der auf den nicht polarisierten Oberflächen berechnete Mittelwert auf 100 % festgelegt.

3.1.2.1 Auswertung der Stahloberflächen

Auf den polarisierten Stahloberflächen wurde im 1. Versuchsdurchgang eine tendenziell niedrigere (88,06 %), im 2. Versuchsdurchgang eine nahezu identische (99,01 %) Zellzahl ermittelt wie auf den nicht polarisierten Stahloberflächen (Kontrolle). Der Unterschied zur Negativkontrolle war in beiden Versuchsdurchgängen nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.5).

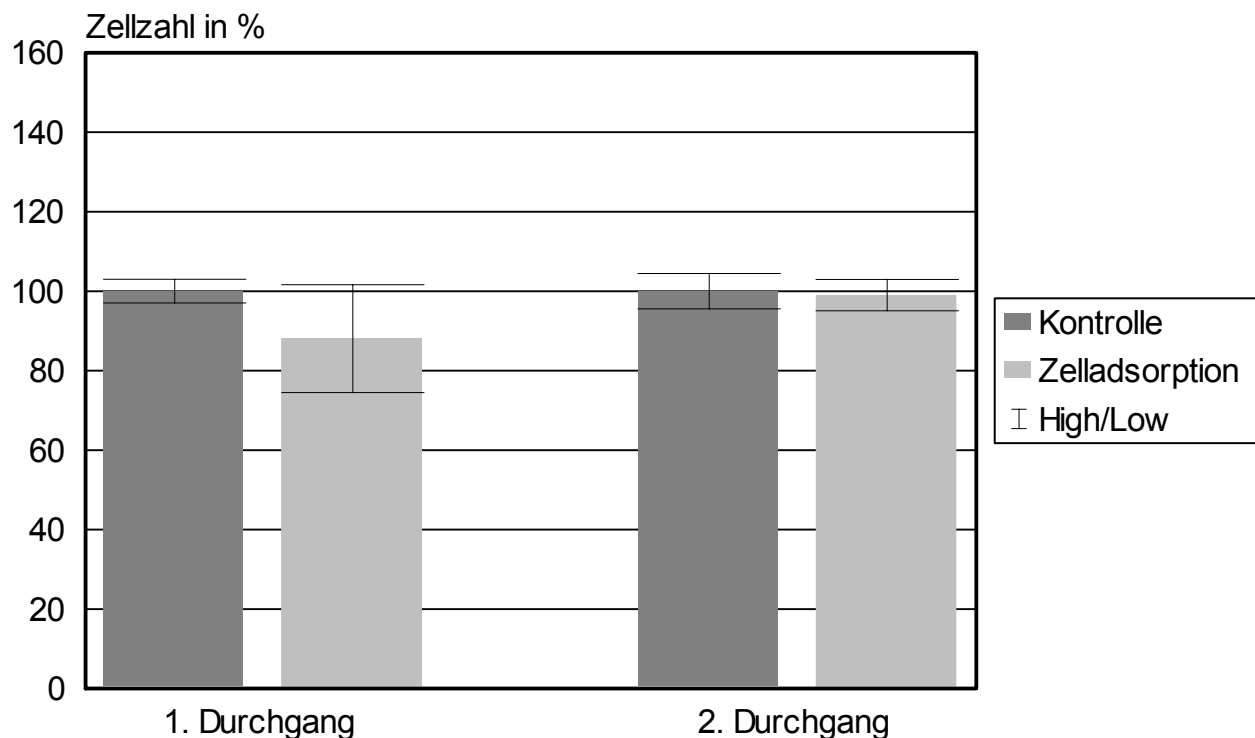


ABBILDUNG 3.5: Relative Zellzahl Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Zelladsorption.

Auf der Ordinate ist die Zellzahl in % zu den nicht polarisierten Stahlplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. Es wurde auf den polarisierten Stahloberflächen eine tendenziell niedrigere (1. Durchgang) bzw. nahezu identische (2. Durchgang) Zellzahl ermittelt wie auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war jeweils nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

Mit dem WST-1 Test wurde auf den polarisierten Stahloberflächen im 1. Versuchsdurchgang eine nahezu identische (99,15 %), im 2. Versuchsdurchgang eine tendenziell niedrigere mitochondriale Zellaktivität (90,02 %) bestimmt als auf den nicht polarisierten Stahloberflächen (Kontrolle). Der Unterschied zur Negativkontrolle war in beiden Versuchsdurchgängen nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.6).

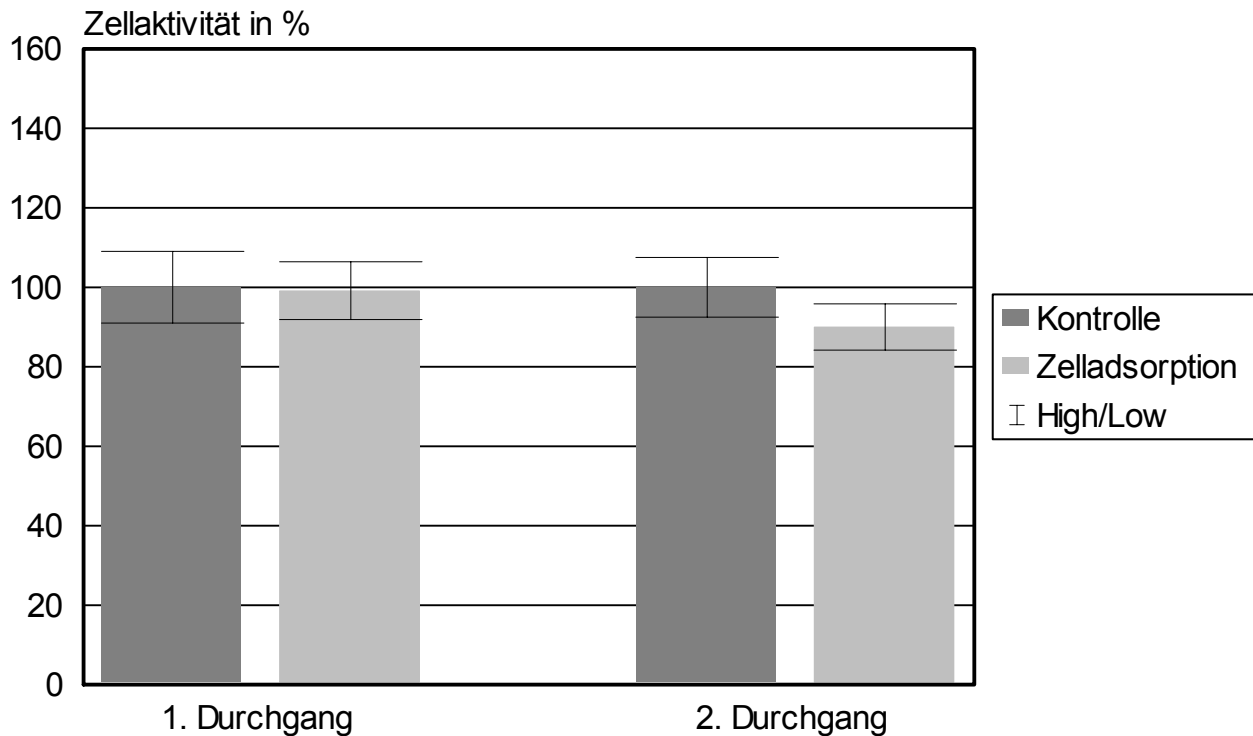


ABBILDUNG 3.6: Relative Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Zelladsorption ermittelt durch WST-1 Test.

Auf der Ordinate ist die Zellaktivität in % zu den nicht polarisierten Stahlplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. Es wurde auf den polarisierten Stahloberflächen eine nahezu identische (1. Durchgang) bzw. tendenziell niedrigere (2. Durchgang) Zellaktivität ermittelt als auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war jeweils nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.1.2.2 Auswertung der Titanoberflächen

In beiden Versuchsdurchgängen konnten auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant niedrigere Zellzahlen ermittelt werden als auf den nicht polarisierten Kontrolloberflächen ($p < 0,05$). Im 1. Durchgang betrug die Zellzahl 89,37 %, im 2. Durchgang 91,76 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3.7).

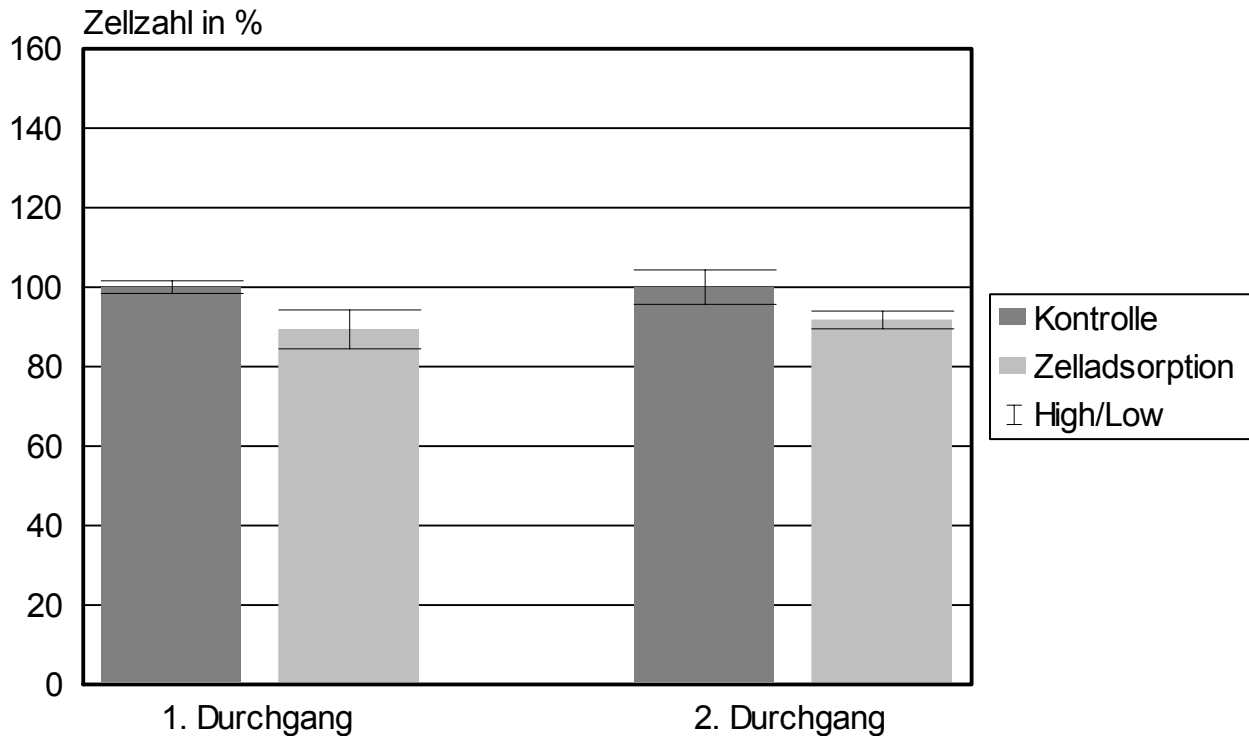


ABBILDUNG 3.7: Relative Zellzahl Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Zelladsorption.

Auf der Ordinate ist die Zellzahl in % zu den nicht polarisierten Titanplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurden auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant niedrigere Zellzahlen ermittelt als auf den nicht polarisierten ($p < 0,05$).

Mit dem WST-1 Test wurde auf den polarisierten Titanoberflächen in beiden Versuchsdurchgängen eine niedrigere mitochondriale Zellaktivität bestimmt als auf den nicht polarisierten (Kontrolle). Im 1. Durchgang betrug die Zellaktivität 76,49 %, im 2. Durchgang 91,67 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Während im 1. Versuchsdurchgang die Zellaktivität auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant erniedrigt war ($p < 0,05$), wurde im 2. Versuchsdurchgang kein signifikanter Unterschied zu den nicht polarisierten Kontrolloberflächen festgestellt ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.8).

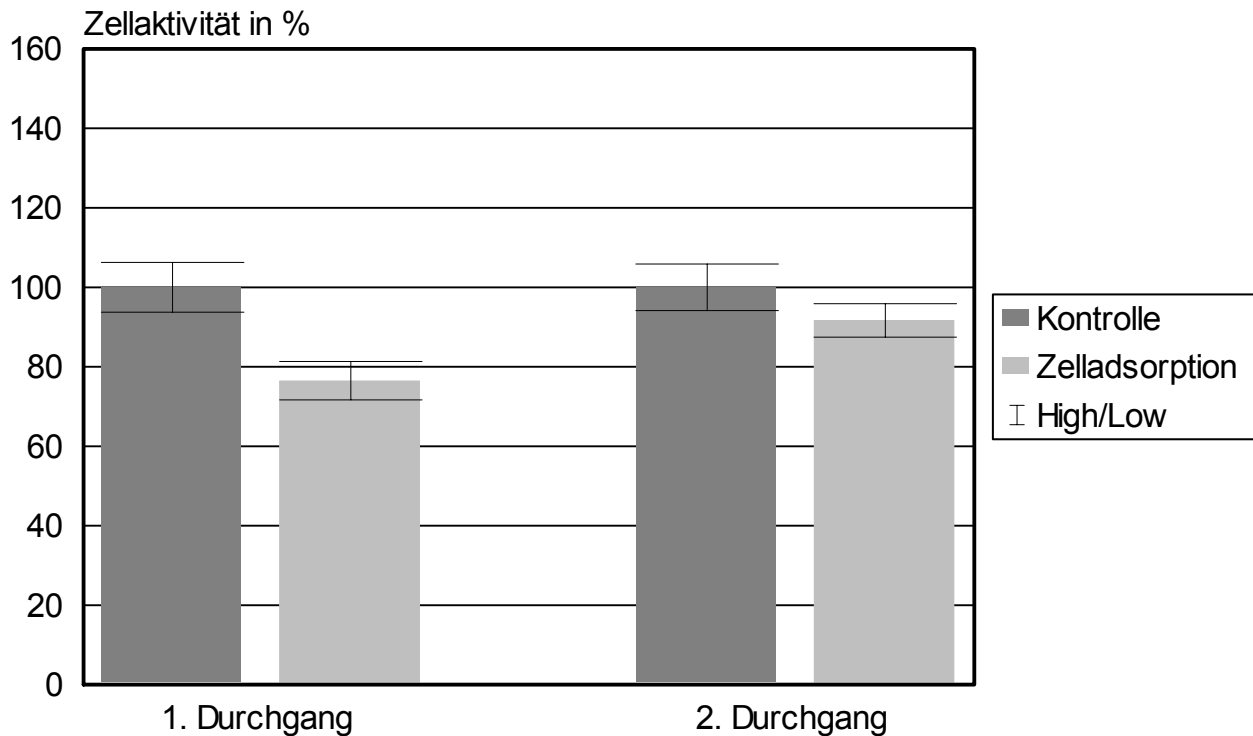


ABBILDUNG 3.8: Relative Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Zelladsorption ermittelt durch WST-1 Test.

Auf der Ordinate ist die Zellaktivität in % zu den nicht polarisierten Titanplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Versuchsdurchgängen wurde auf den polarisierten Titanoberflächen eine niedrigere Zellaktivität ermittelt als auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war im 1. Durchgang signifikant ($p < 0,05$), im 2. Durchgang nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.1.3 Untersuchungen zur Protein- und Zelladsorption

Bei diesem Versuchsteil sollte die Auswirkung einer Spannung auf die Adsorption der Proteine und Zellen bestimmt werden. Dazu wurden die Testoberflächen 35 min mit FCS bei einer Spannung von +600 mV inkubiert. Auf die präadsorbierten Proteine wurden die Zellen (MG-63) gegeben und nach Aussaat 48 h ebenfalls bei einer Spannung von +600 mV inkubiert. Diese Vorgehensweise wird im Folgenden als „Protein- und Zelladsorption“ bezeichnet. Als Referenzwert wurde der auf den nicht polarisierten Oberflächen berechnete Mittelwert auf 100 % festgelegt.

3.1.3.1 Auswertung der Stahloberflächen

In beiden Versuchsdurchgängen konnten auf den polarisierten Stahloberflächen signifikant niedrigere Zellzahlen ermittelt werden als auf den nicht polarisierten Kontrolloberflächen ($p < 0,05$). Im 1. Durchgang betrug die Zellzahl 75,28 %, im 2. Durchgang 75,10 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3.9).

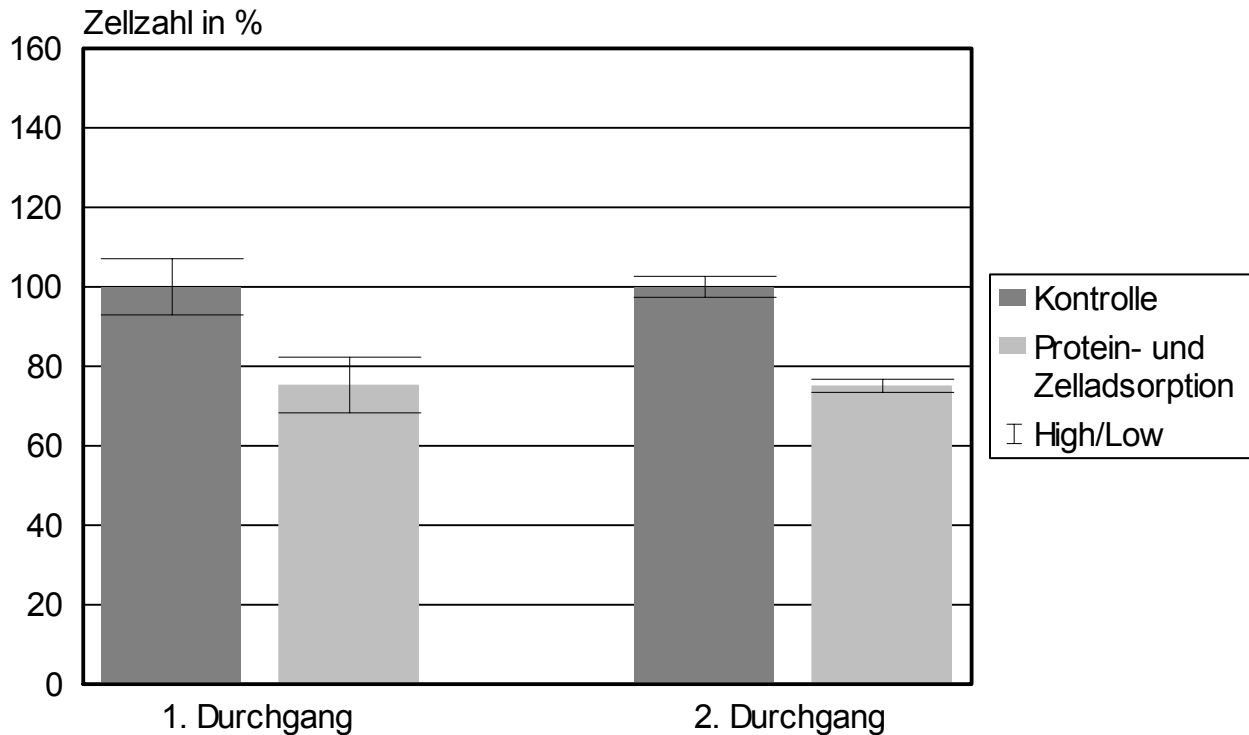


ABBILDUNG 3.9: Relative Zellzahl Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Protein- und Zelladsorption.

Auf der Ordinate ist die Zellzahl in % zu den nicht polarisierten Stahlplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurden auf den polarisierten Stahloberflächen signifikant niedrigere Zellzahlen ermittelt als auf den nicht polarisierten ($p < 0,05$).

Mit dem WST-1 Test wurde auf den polarisierten Stahloberflächen in beiden Versuchsdurchgängen eine signifikant niedrigere mitochondriale Zellaktivität bestimmt als auf den nicht polarisierten Kontrolloberflächen ($p < 0,05$). Im 1. Durchgang betrug die Zellaktivität 76,08 %, im 2. Durchgang 75,11 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3.10).

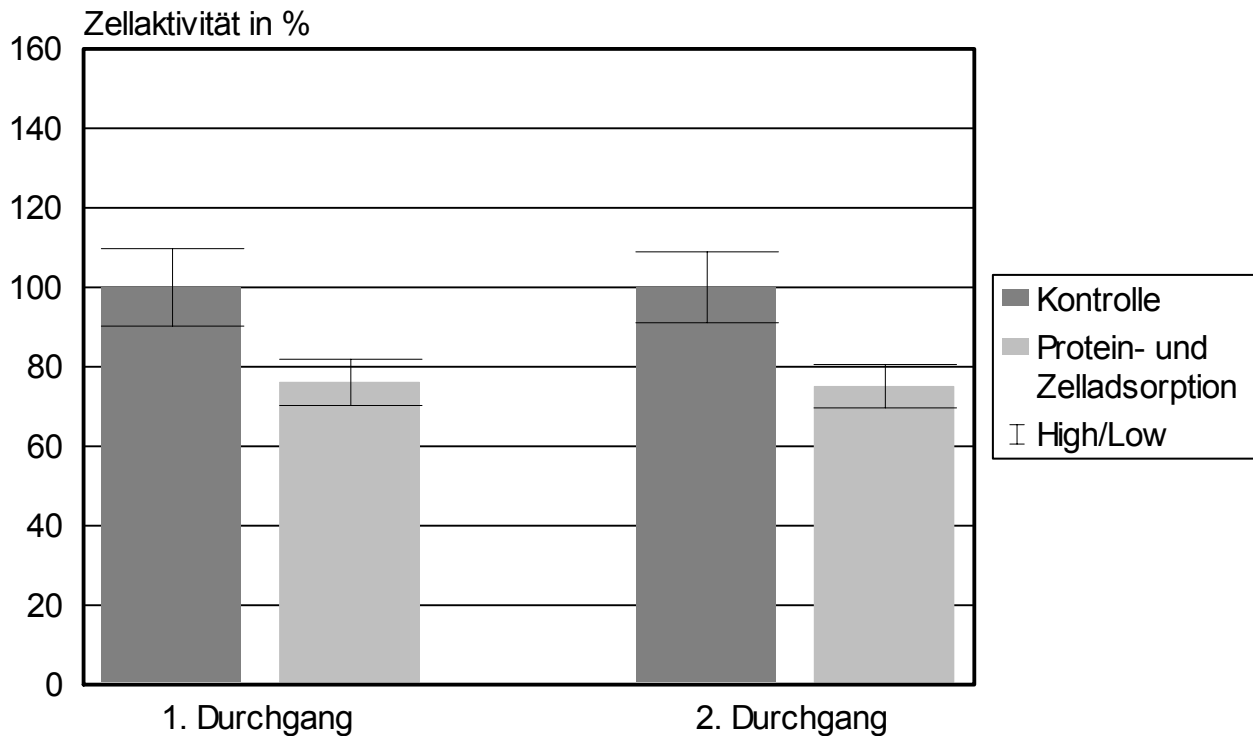


ABBILDUNG 3.10: Relative Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Protein- und Zelladsorption ermittelt durch WST-1 Test.

Auf der Ordinate ist die Zellaktivität in % zu den nicht polarisierten Stahlplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurde auf den polarisierten Stahloberflächen eine signifikant niedrigere Zellaktivität ermittelt als auf den nicht polarisierten ($p < 0,05$).

3.1.3.2 Auswertung der Titanoberflächen

In beiden Versuchsdurchgängen konnten auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant niedrigere Zellzahlen ermittelt werden als auf den nicht polarisierten Kontrolloberflächen ($p < 0,05$). Im 1. Durchgang betrug die Zellzahl 80,46 %, im 2. Durchgang 83,71 % im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 3.11).

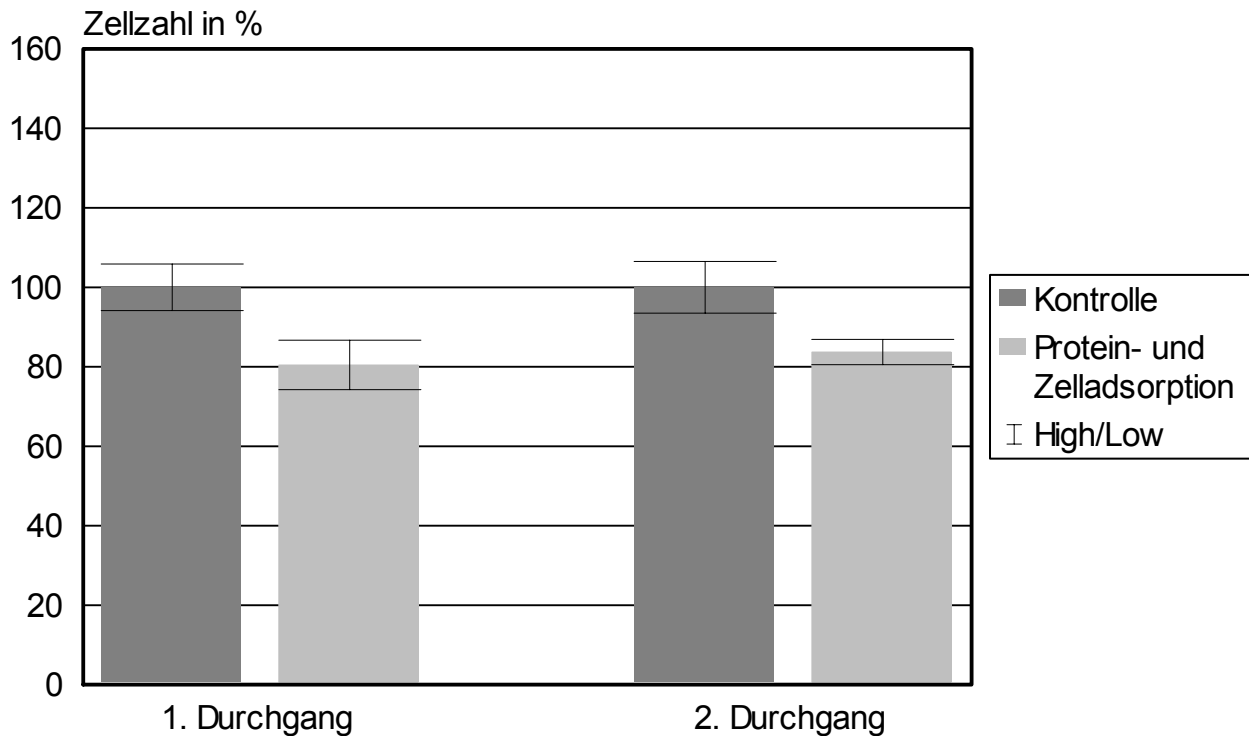


ABBILDUNG 3.11: Relative Zellzahl Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Protein- und Zelladsorption.

Auf der Ordinate ist die Zellzahl in % zu den nicht polarisierten Titanplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurden auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant niedrigere Zellzahlen ermittelt als auf den nicht polarisierten ($p < 0,05$).

Mit dem WST-1 Test wurde auf den polarisierten Titanoberflächen in beiden Versuchsdurchgängen eine tendenziell höhere mitochondriale Zellaktivität bestimmt als auf den nicht polarisierten (Kontrolle). Im 1. Durchgang betrug die Zellaktivität 109,62 %, im 2. Durchgang 103,97 % im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Unterschied zu den nicht polarisierten Kontrolloberflächen war in beiden Versuchsdurchgängen nicht signifikant ($p \geq 0,05$) (Abbildung 3.12).

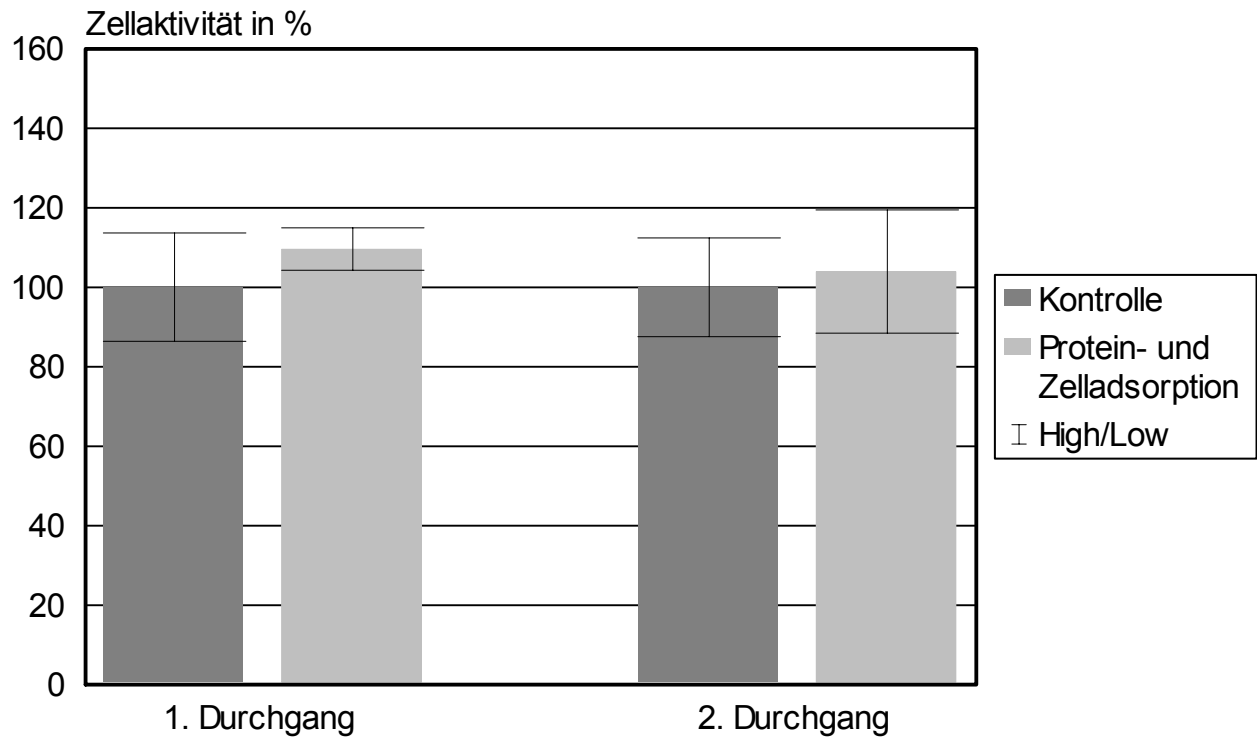


ABBILDUNG 3.12: Relative Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Protein- und Zelladsorption ermittelt durch WST-1 Test.

Auf der Ordinate ist die Zellaktivität in % zu den nicht polarisierten Titanplättchen (Kontrolle) dargestellt, auf der Abszisse ist der Versuchsdurchgang aufgetragen. In beiden Durchgängen wurde auf den polarisierten Titanoberflächen eine tendenziell höhere Zellaktivität ermittelt als auf den nicht polarisierten. Der Unterschied zur Negativkontrolle war jeweils nicht signifikant ($p \geq 0,05$).

3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Zellzahl und Zellaktivität

	Stahloberflächen		Titanoberflächen	
	Zellzahl	Zellaktivität	Zellzahl	Zellaktivität
Proteinadsorption	+/+	-/0	-/--	+/+
Zelladsorption	-/0	0/-	--/--	--/-
Protein- und Zelladsorption	--/--	--/--	--/--	+/+
	++	signifikant erhöht		
	+	tendenziell erhöht		
	0	gleich		
	-	tendenziell verringert		
	--	signifikant verringert		

TABELLE 3.1: Ergebniszusammenfassung zur Zellzahl und Zellaktivität auf polarisierten Stahl- und Titanoberflächen im Vergleich zu den nicht polarisierten Oberflächen.

Das Symbol vor dem Schrägstrich repräsentiert jeweils das Ergebnis des 1. Versuchsdurchgangs, das Symbol hinter dem Schrägstrich steht jeweils für das Ergebnis des 2. Versuchsdurchgangs.

3.2 Analyse der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie

3.2.1 Untersuchungen zur Proteinadsorption

Für die Versuchsreihe zur Proteinadsorption wurden die Testoberflächen 35 min mit FCS bei einer Spannung von +600 mV und nach Zellaussaat 48 h ohne Spannung inkubiert.

Zum Nachweis der intrazellulären Proteinverteilung wurden die in Methanol/Aceton fixierten und permeabilisierten Zellen mit den monoklonalen Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin und einem entsprechenden Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 markiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte bei 40facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.1.1 Auswertung der Stahloberflächen

Die immunhistochemische Färbung des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin zeigte auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen ein ähnliches zytoplasmatisches Verteilungsmuster mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität. Auf beiden Oberflächen konnten Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte, an denen α -Actinin als Adaptor zur Verankerung von kontraktile Aktinfilament-Bündeln an Transmembranproteine der Plasmamembran beteiligt ist, ähnlicher Form identifiziert werden (Abbildung 3.13 A, B). Sowohl auf den polarisierten als auch den nicht polarisierten Stahloberflächen wurde ein gut ausgebildetes, das gesamte Zytoplasma durchziehendes Mikrotubulusnetzwerk nachgewiesen (Abbildung 3.13 C, D). Alle untersuchten Stahloberflächen zeigten gut ausgebreitete polygonale Zellen, wobei auf den polarisierten Stahloberflächen wachsende Zellen sowie deren Zellkerne im Vergleich zu den auf den nicht polarisierten Oberflächen lokalisierten Zellen und Zellkernen etwas kleiner erschienen. Die Chromatinstruktur der Zellkerne war auf allen ausgewerteten Stahloberflächen nahezu identisch (Abbildung 3.13 A – D').

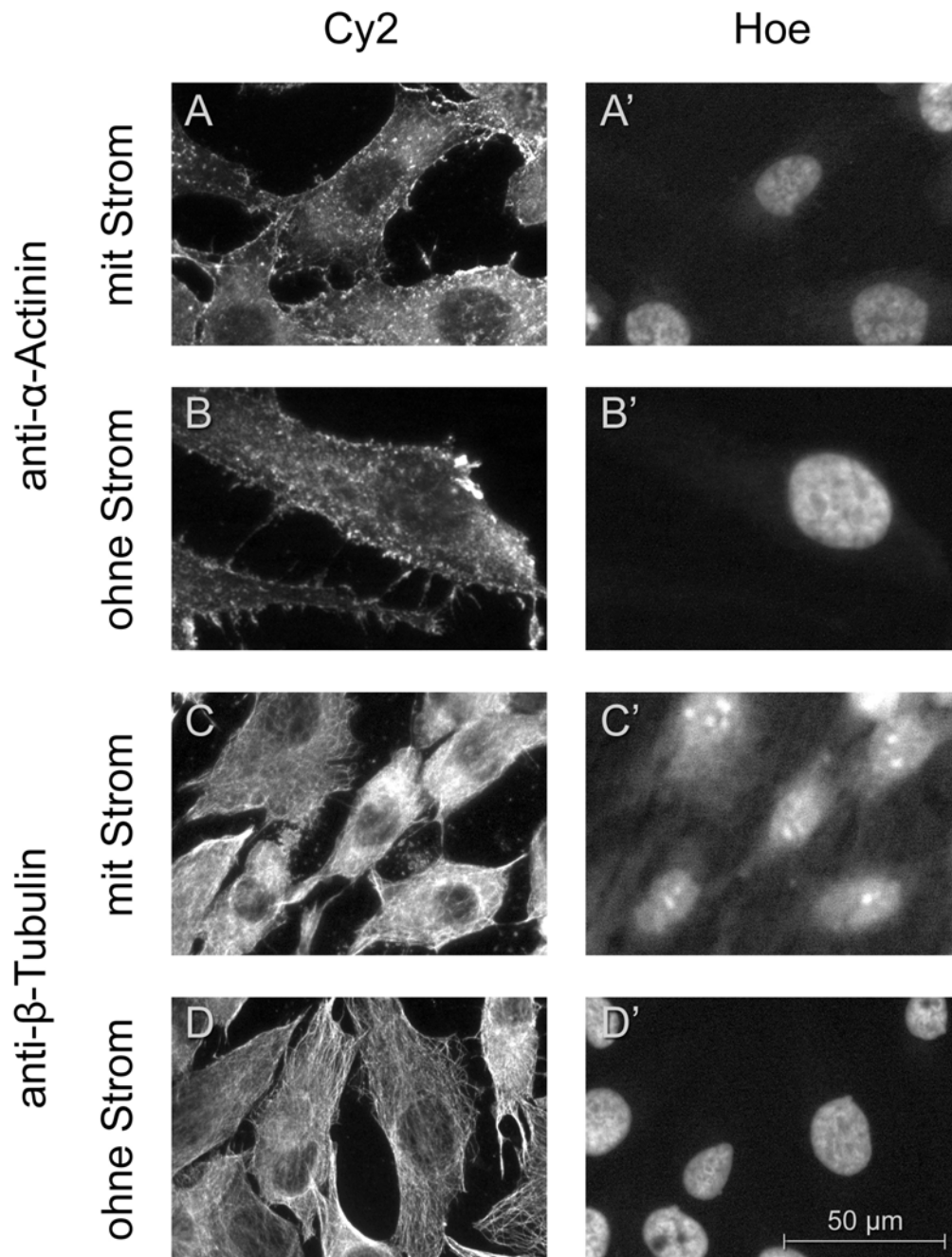


ABBILDUNG 3.13 A – D': Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Proteinadsorption.

In Methanol/Aceton fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin inkubiert (A – D). Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege als Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 (A' – D'). Auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen konnten ein ähnliches Verteilungsmuster des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin mit vergleichbarer Fluoreszenzintensität und ähnliche Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte nachgewiesen werden. Das gut ausgebildete Mikrotubulusnetzwerk zeigte zwischen beiden Stahloberflächen keine Unterschiede. Die auf den polarisierten Stahloberflächen lokalisierten Zellen erschienen wie die korrespondierenden Zellkerne im Vergleich zu den Kontrollen geringfügig kleiner. Die Chromatinstruktur der Zellkerne war auf allen ausgewerteten Stahloberflächen nahezu identisch. Vergrößerung 40 x.

3.2.1.2 Auswertung der Titanoberflächen

Das Aktin-vernetzende Protein α -Actinin lag auf den polarisierten Titanoberflächen insbesondere perinukleär in einer höheren Dichte vor als auf den nicht polarisierten. Auch die Fluoreszenzintensität des α -Actinin war auf den polarisierten Titanoberflächen etwas höher als auf den nicht polarisierten. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte konnten auf beiden Titanoberflächen identifiziert werden (Abbildung 3.14 A, B). Sowohl auf den polarisierten als auch den nicht polarisierten Titanoberflächen wurde ein gut ausgebildetes, das gesamte Zytoplasma durchziehendes Mikrotubulusnetzwerk nachgewiesen (Abbildung 3.14 C, D). Alle untersuchten Titanoberflächen zeigten gut ausgebreitete polygonale Zellen. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der Zellkerne zeigten zwischen den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen nahezu keine Unterschiede (Abbildung 3.14 A – D').

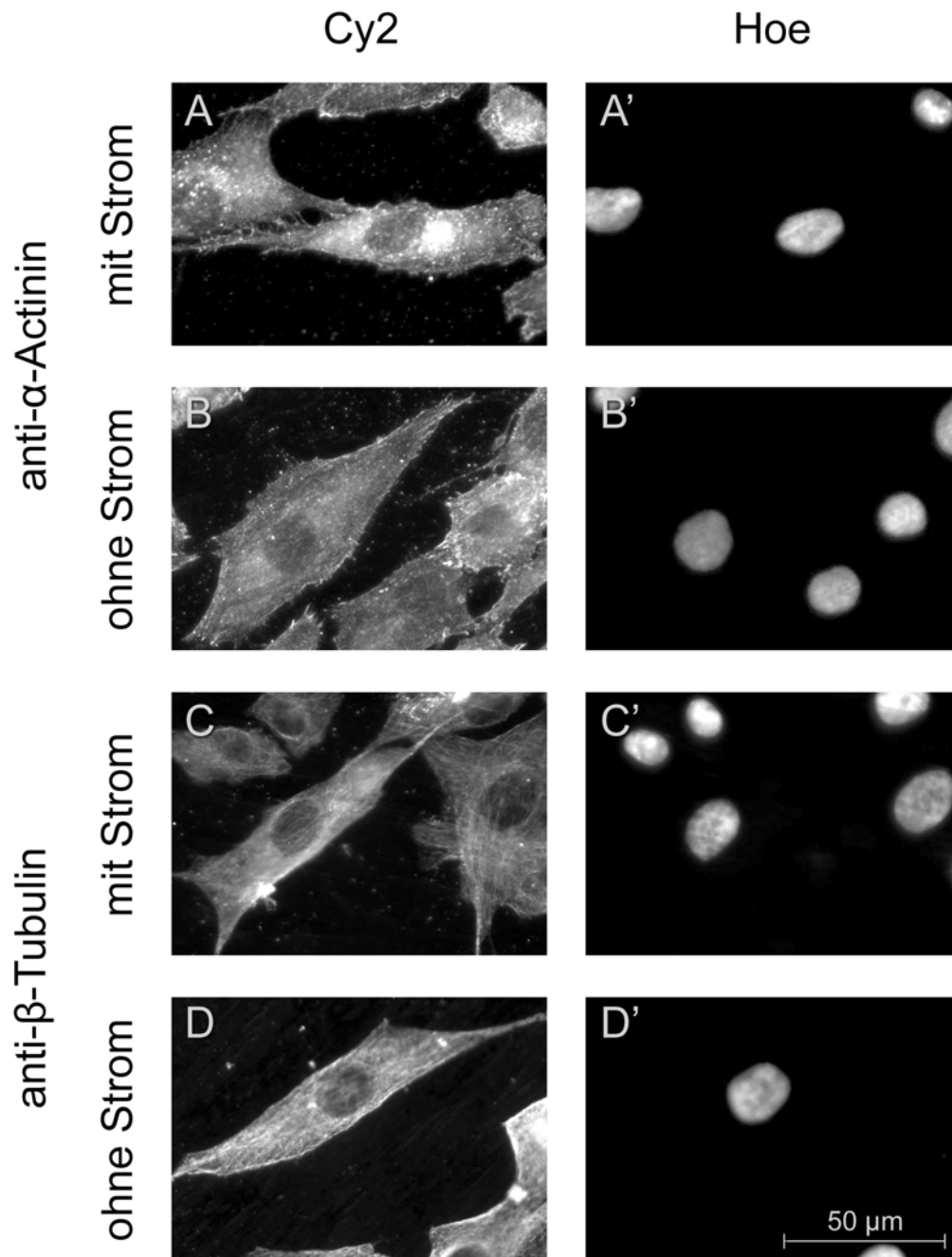


ABBILDUNG 3.14 A – D': Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Proteinadsorption.

In Methanol/Aceton fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin inkubiert (A – D). Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege als Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 (A' – D'). Auf den polarisierten Titanoberflächen konnten insbesondere perinukleär eine höhere Dichte und Fluoreszenzintensität des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin nachgewiesen werden als auf den nicht polarisierten Titanoberflächen. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte wurden auf beiden Titanoberflächen identifiziert. Das gut ausgebildete Mikrotubulusnetzwerk zeigte zwischen beiden Titanoberflächen keine Unterschiede. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der korrespondierenden Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen nahezu gleich. Vergrößerung 40 x.

3.2.2 Untersuchungen zur Zelladsorption

Für die Versuchsreihe zur Zelladsorption wurden die Testoberflächen 35 min mit FCS ohne Spannung und nach Zellaussaat 48 h bei einer Spannung von +600 mV inkubiert.

Zum Nachweis der intrazellulären Proteinverteilung wurden die in Methanol/Aceton fixierten und permeabilisierten Zellen mit den monoklonalen Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin und einem entsprechenden Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 markiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte bei 40facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.2.1 Auswertung der Stahloberflächen

Die immunhistochemische Färbung des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin zeigte auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen ein ähnliches zytoplasmatisches Verteilungsmuster mit bevorzugter perinukleärer Anordnung. Die Fluoreszenzintensität des α -Actinin erschien auf den polarisierten Stahloberflächen etwas höher als auf den nicht polarisierten. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte konnten auf beiden Stahloberflächen gleichermaßen identifiziert werden (Abbildung 3.15 A, B). Statt eines typischen Mikrotubulusnetzwerkes wurden sowohl auf den polarisierten als auch den nicht polarisierten Stahloberflächen lediglich kurze Tubulinfilamente nachgewiesen, die auf den polarisierten Oberflächen eine höhere Fluoreszenzintensität aufwiesen als auf den nicht polarisierten (Abbildung 3.15 C, D). Alle untersuchten Stahloberflächen zeigten gut ausgebreitete polygonale Zellen. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen nahezu gleich (Abbildung 3.15 A – D').

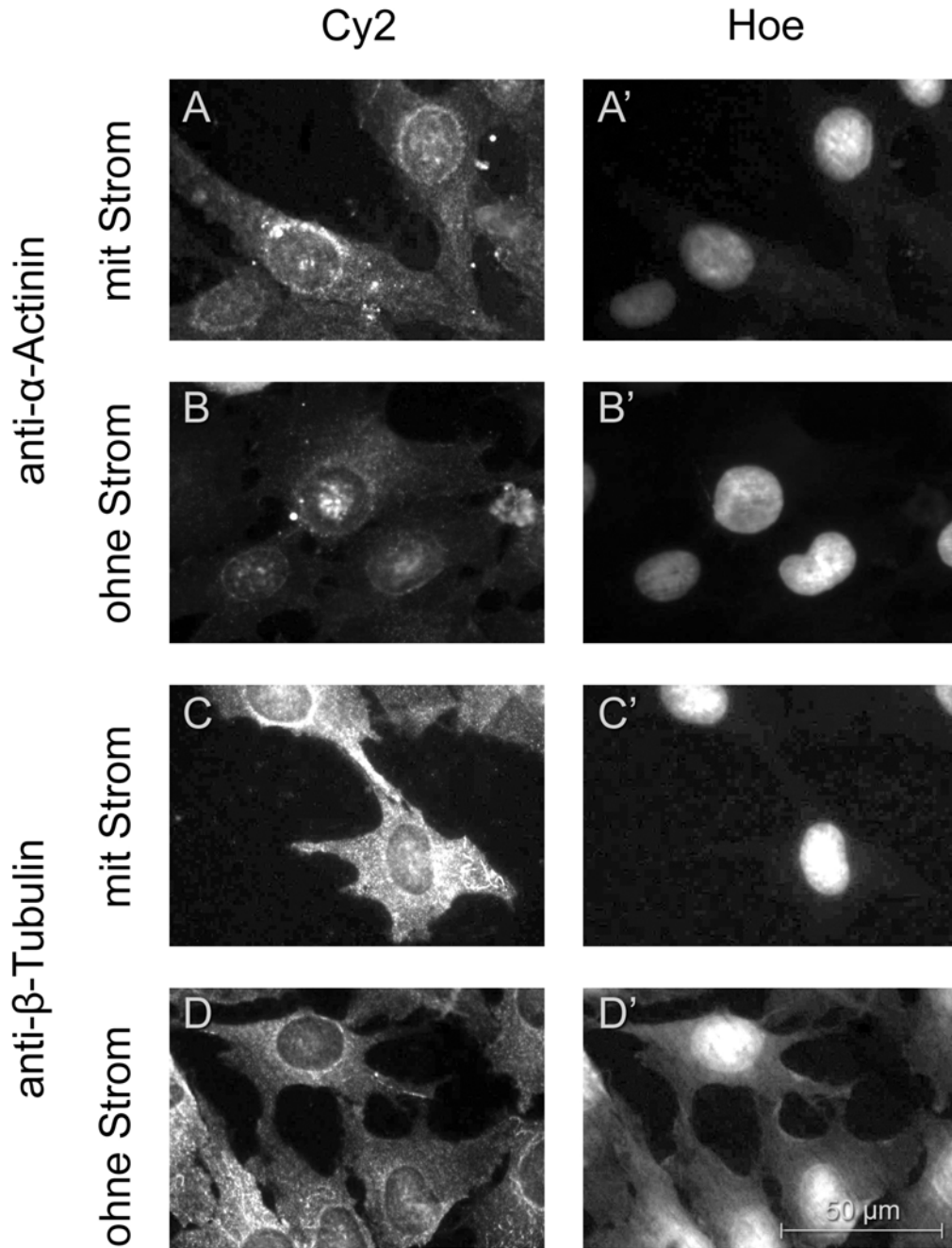


ABBILDUNG 3.15 A – D': Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Zelladsorption.

In Methanol/Aceton fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin inkubiert (A – D). Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege als Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 (A' – D'). Auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen wurden ein ähnliches Verteilungsmuster des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin mit bevorzugter perinukleärer Anordnung und ähnliche Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte nachgewiesen. Sowohl beim α -Actinin-Nachweis als auch bei der Anfärbung des Proteins β -Tubulin, das in Form kurzer Tubulinfilamente nachgewiesen wurde, war die Fluoreszenzintensität auf den polarisierten Stahloberflächen höher als auf den nicht polarisierten. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der korrespondierenden Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen nahezu gleich. Vergrößerung 40 x.

3.2.2.2 Auswertung der Titanoberflächen

Das Aktin-vernetzende Protein α -Actinin zeigte auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen ein ähnliches zytoplasmatisches Verteilungsmuster mit bevorzugter Aggregatbildung in Kernnähe und identischer Fluoreszenzintensität. Adhärenskontakte und Fokalkontakte konnten auf beiden Titanoberflächen gleichermaßen identifiziert werden (Abbildung 3.16 A, B). Sowohl auf den polarisierten als auch den nicht polarisierten Titanoberflächen wurde ein gut ausgebildetes, das gesamte Zytoplasma durchziehendes Mikrotubulusnetzwerk nachgewiesen (Abbildung 3.16 C, D). Alle untersuchten Titanoberflächen zeigten gut ausgebreitete polygonale Zellen. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen nahezu gleich (Abbildung 3.16 A – D').

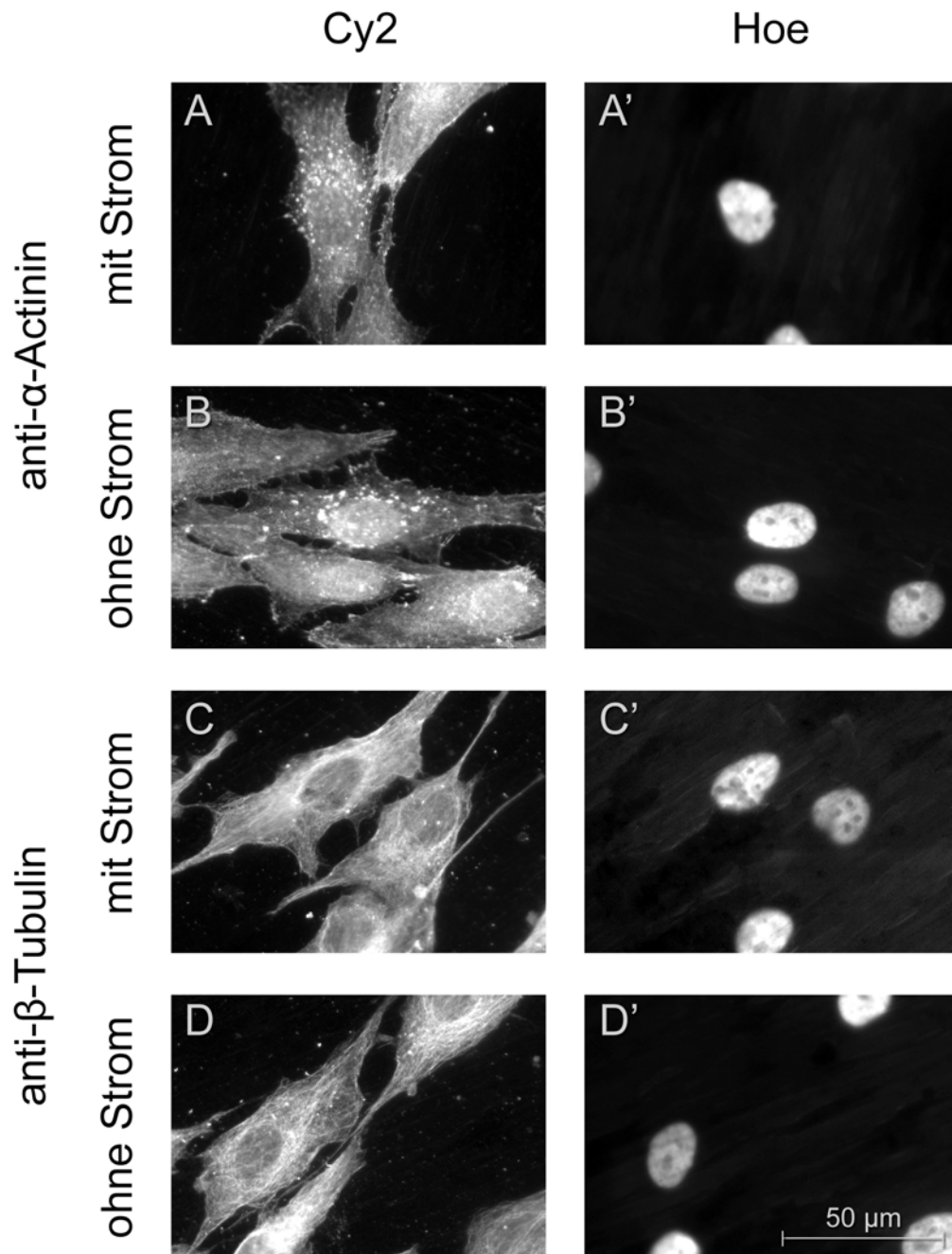


ABBILDUNG 3.16 A – D': Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Zelladsorption.

In Methanol/Aceton fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin inkubiert (A – D). Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege als Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 (A' – D'). Auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen wurde ein ähnliches Verteilungsmuster des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin mit bevorzugter Aggregatbildung in Kernnähe und identischer Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte wurden auf beiden Titanoberflächen gleichermaßen identifiziert. Das gut ausgebildete Mikrotubulusnetzwerk zeigte zwischen beiden Titanoberflächen keine Unterschiede. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der korrespondierenden Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen nahezu gleich. Vergrößerung 40 x.

3.2.3 Untersuchungen zur Protein- und Zelladsorption

Für die Versuchsreihe zur Protein- und Zelladsorption wurden die Testoberflächen 35 min mit FCS und nach Zellaussaat 48 h jeweils bei einer Spannung von +600 mV inkubiert.

Zum Nachweis der intrazellulären Proteinverteilung wurden die in Methanol/Aceton fixierten und permeabilisierten Zellen mit den monoklonalen Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin und einem entsprechenden Cy2-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Zellkerne wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 markiert. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte bei 40facher Vergrößerung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.3.1 Auswertung der Stahloberflächen

Die immunhistochemische Färbung des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin zeigte auf den polarisierten Stahloberflächen eine höhere Dichte und Fluoreszenzintensität als auf den nicht polarisierten Kontrollen. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte konnten auf beiden Stahloberflächen identifiziert werden (Abbildung 3.17 A, B). Sowohl auf den polarisierten als auch den nicht polarisierten Stahloberflächen wurde ein gut ausgebildetes, das gesamte Zytoplasma durchziehendes Mikrotubulusnetzwerk nachgewiesen, das an den Zellausläufern der auf den polarisierten Oberflächen lokalisierten Zellen weniger aufgelockert erschien als bei den nicht polarisierten Kontrollen (Abbildung 3.17 C, D). Alle untersuchten Stahloberflächen zeigten gut ausgebreitete polygonale Zellen. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen nahezu gleich (Abbildung 3.17 A – D').

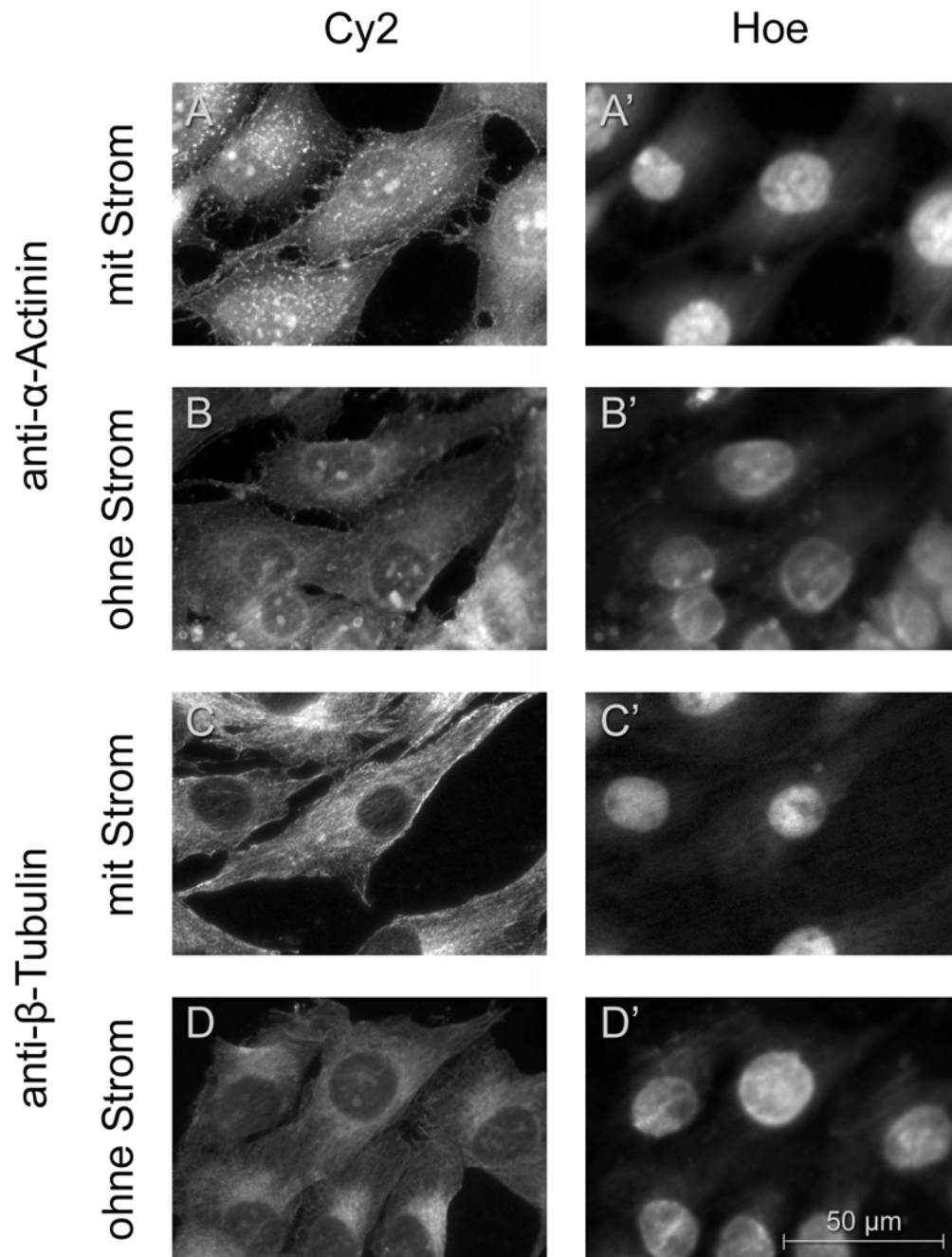


ABBILDUNG 3.17 A – D': Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Stahloberflächen bei Protein- und Zelladsorption.

In Methanol/Aceton fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin inkubiert (A – D). Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege als Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 (A' – D'). Auf den polarisierten Stahloberflächen konnten eine höhere Dichte und Fluoreszenzintensität des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin nachgewiesen werden als auf den nicht polarisierten Stahloberflächen. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte wurden auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen identifiziert. Das auf beiden Stahloberflächen gut ausgebildete Mikrotubulusnetzwerk erschien an den Zellausläufern der Zellen auf den polarisierten Oberflächen dichter als bei den nicht polarisierten Kontrollen. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der korrespondierenden Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Stahloberflächen nahezu gleich. Vergrößerung 40 x.

3.2.3.2 Auswertung der Titanoberflächen

Das Aktin-vernetzende Protein α -Actinin zeigte auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen ein ähnliches zytoplasmatisches Verteilungsmuster mit bevorzugter Aggregatbildung in Kernnähe und identischer Fluoreszenzintensität. Adhärenskontakte und Fokalkontakte konnten auf beiden Titanoberflächen gleichermaßen identifiziert werden (Abbildung 3.18 A, B). Sowohl auf den polarisierten als auch den nicht polarisierten Titanoberflächen wurde ein gut ausgebildetes, das gesamte Zytoplasma durchziehendes Mikrotubulusnetzwerk nachgewiesen (Abbildung 3.18 C, D). Alle untersuchten Titanoberflächen zeigten gut ausgebreitete polygonale Zellen. Morphologie der Zellen sowie Größe und Chromatinstruktur der Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen nahezu gleich (Abbildung 3.18 A – D').

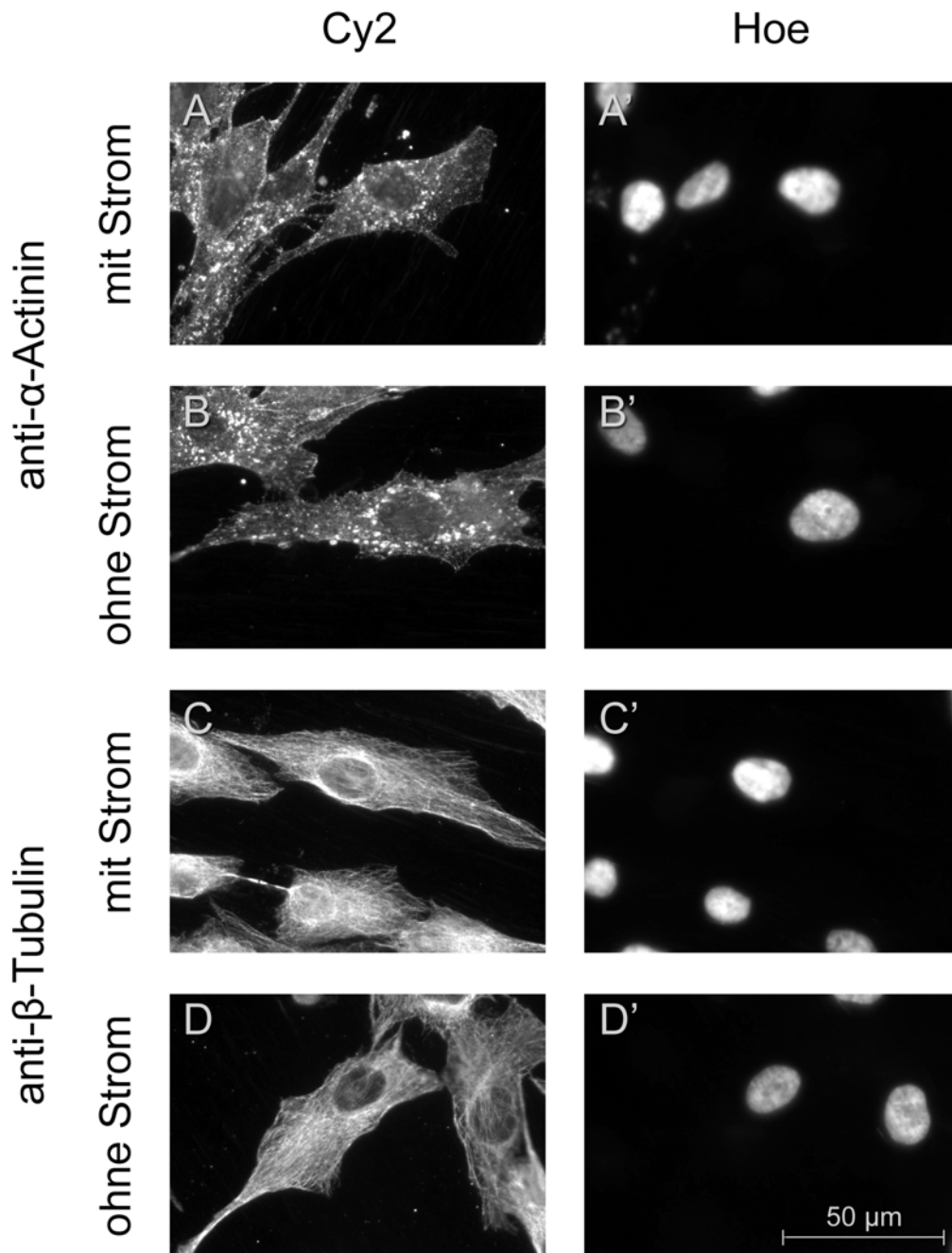


ABBILDUNG 3.18 A – D': Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) auf Titanoberflächen bei Protein- und Zelladsorption.

In Methanol/Aceton fixierte und permeabilisierte Zellen wurden mit den Primärantikörpern anti- α -Actinin bzw. anti- β -Tubulin inkubiert (A – D). Zur Detektion der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ein Cy2-konjugierter anti-Maus-Antikörper aus der Ziege als Sekundärantikörper verwendet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33285 (A' – D'). Auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen wurde ein ähnliches Verteilungsmuster des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin mit bevorzugter Aggregatbildung in Kernnähe und identischer Fluoreszenzintensität nachgewiesen. Adhärens-Kontakte und Fokalkontakte wurden auf beiden Titanoberflächen gleichermaßen identifiziert. Das gut ausgebildete Mikrotubulusnetzwerk zeigte zwischen beiden Titanoberflächen keine Unterschiede. Morphologie der Zellen sowie Größe und Farbmuster der korrespondierenden Zellkerne waren auf den polarisierten und nicht polarisierten Titanoberflächen nahezu gleich. Vergrößerung 40 x.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss eines elektrischen Feldes auf die Adsorption von Proteinen bzw. Zellen zu testen. Dazu wurden metallische Oberflächen in Elektroammern polarisiert und die Wirkung der angelegten Spannung (+600 mV) auf das Proliferationsverhalten, die mitochondriale Zellaktivität und die intrazelluläre Proteinverteilung Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) untersucht. Als Testoberflächen dienten die im klinischen Einsatz bewährten Implantatmaterialien Stahl und Titan. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus konnten elektrische Felder simuliert werden, wie sie an rauen, im Mikro- bis Nanometerbereich strukturierten Oberflächen auftreten.

In zahlreichen *in vivo*-Studien konnte eine bessere Knochenanlagerung auf rauen als auf glatten Implantatoberflächen beobachtet werden (Thomas & Cook, 1985; Buser et al., 1991; Wannerberg et al., 1997). *In vitro*-Untersuchungen zeigten bezüglich der durch Oberflächenrauigkeit hervorgerufenen Veränderung osteoblastärer Zelleigenschaften durchaus widersprüchliche Ergebnisse. So werden in der Literatur auf rauen Oberflächen sowohl höhere als auch niedrigere Proliferations- und Differenzierungsparameter beschrieben als auf glatten (Martin et al., 1995; Lincks et al., 1998; Nöth et al., 1999; Anselme et al., 2000a; Anselme et al., 2000b; Kunzler et al., 2007). Allerdings wurden die bisherigen Studien mit zum Teil unterschiedlichen Zellkultursystemen durchgeführt, so dass ein direkter Vergleich der Ergebnisse erschwert wird. Abgesehen davon können die Anwendung verschiedener Testmethoden, die Wahl unterschiedlicher Beobachtungszeitpunkte sowie die Verwendung von Zellen unterschiedlicher Herkunft, Entnahmestellen und Reifegrade eine Erklärung für diese Divergenzen bieten.

Neuere Untersuchungen belegen, dass sogar Nanostrukturen, sog. „Nanopits“ in der Lage sind, Zellmigration, -orientierung und -funktion zu beeinflussen (Curtis et al., 2004; Dalby et al., 2004; Martines et al., 2004). Monsees et al. konnten zeigen, dass Osteoblasten-ähnliche Zellen bereits auf 12 nm hohe Streifenmuster reagieren und dort fokale Kontakte bilden (Monsees et al., 2005). Auf Implantatoberflächen mit Mikrometer großen Rillenstrukturen richten sich Zellen häufig längs dieses Oberflächenmusters aus. Diese Erscheinung ist als Kontaktführung bekannt (Rovensky et al., 1971; Brunette, 1986a; Brunette, 1986b; Chehroudi et al., 1989; Chehroudi et al., 1990; Clark et al., 1990; Chesmel & Black, 1995; Chesmel et al., 1995). Während auf glatten Oberflächen

flache, gut ausgebreitete und eher unbewegliche Zellen nachweisbar sind, die vermehrt Aktin-Stressfasern ausbilden, nehmen Osteoblasten und Osteoblasten-ähnliche Zellen auf rauen Oberflächen eine eher kubische Form bei kleinerem Durchmesser an und sind weniger ausgebreitet. Strukturierte Oberflächen sind den inneren Oberflächen des Körpers ähnlicher und ermöglichen „natürlichere“ Zellreaktionen und Zellbeweglichkeit (Chesmel & Black, 1995; Chesmel et al., 1995; Lincks et al., 1998; Anselme et al., 2000a; Anselme et al., 2000b; Monsees & Funk, 2005; Kunzler et al., 2007).

Außer den topographisch-mechanischen Reizen treten auch andere Phänomene als kausale Faktoren für das beobachtete oberflächenabhängige Zellverhalten auf. In diesem Zusammenhang sind neben Chemotaxis (z. B. Konzentrationsgradienten von Wachstumshormonen oder Komponenten der extrazellulären Matrix) insbesondere elektrische Potentialgradienten zu nennen (Monsees & Funk, 2005; Funk & Monsees, 2006), deren Einfluss auf Proteine und Zellen bisher weitgehend unerforscht ist.

Elektrische Potentialgradienten an der Phasengrenze sind das Ergebnis von Raumladungen an der Werkstoffoberfläche und im oberflächennahen Elektrolytbereich. Oxide zeigen in wässriger Umgebung eine unterschiedliche Adsorption von Wasserstoffionen und Hydroxylgruppen an Lewis-Valenzen. Es resultiert eine hydratisierte Oberfläche, die jedoch abhängig davon, ob zum Abbinden der Lewis-Valenzen Wasserstoffionen oder Hydroxylgruppen benutzt werden, eine unterschiedliche effektive, elektrische Ladung trägt. Die Oberflächenladung wird nach Einstellung des Gleichgewichts in der extrazellulären Flüssigkeit durch eine gleich große Ladung in der oberflächennahen Elektrolytschicht mit umgekehrtem Vorzeichen zu einer elektrischen Doppelschicht vervollständigt. Das von den Eigenschaften der Bindungen in den Oberflächenoxiden und Mischoxiden sowie von den mechanischen und chemischen Präparationen der Oberfläche abhängige elektrische Feld im oberflächennahen Elektrolyten könnte die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen durch Lösen schwacher elektrostatischer oder Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen. Deformationen der sterischen Atomanordnung oder Konformationsänderungen von Proteinen könnten körpereigene Moleküle zu körperfremden umwandeln und durch eine Antigen-Antikörperreaktion zu einer Abwehrreaktion des Körpers führen (Thull et al., 1992; Thull, 1994a; Thull, 1994b; Thull, 1997; Thull, 1998; Thull, 2000; Thomas et al., 2001; Thull, 2002; Thull, 2003).

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass das Anlegen einer Spannung (+600 mV) während der Proteinadsorption das Proliferationsverhalten und die Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen in unterschiedlicher Weise beeinflusst. Während auf den polarisierten Stahloberflächen im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollplättchen tendenziell höhere Zellzahlen bei gleichzeitig tendenziell niedrigerer bzw. nahezu identischer Atmungsaktivität ermittelt werden konnten (Abbildung 3.1, 3.2), wurden auf den polarisierten Titanoberflächen tendenziell bzw. signifikant niedrigere Zellzahlen bei tendenziell höherer Atmungsaktivität gefunden als auf den unpolarisierten (Abbildung 3.3, 3.4). Die Struktur der auf der Implantatoberfläche adsorbierten Proteine beeinflusst maßgeblich die nachfolgende Zelladsorption (Albrektsson et al., 1983; Williams & Williams, 1989; Williams, 1990; Thull, 1993; Kasemo & Lausmaa, 1994; Martin et al., 1995; Boyan et al., 1996; Horbett, 1996; Jones, 1998; Thull, 1998; Grill et al., 2000; Kasemo, 2002; Meadows & Walker, 2005; Lee et al., 2006; Scharnweber, 2007). Demzufolge führt die durch das externe elektrische Feld hervorgerufene veränderte Ladungsverteilung auf den Testoberflächen indirekt über eine Veränderung der adsorbierten Proteinschicht, der u. a. Wachstumsfaktoren und Adhäsionsproteine angehören, zu dem oben beschriebenen Zellverhalten. Die Ergebnisse zur Zellzahl, die einen positiven Einfluss der auf den polarisierten Stahloberflächen adsorbierten Proteine und einen negativen Effekt der auf den polarisierten Titanoberflächen adsorbierten Proteinschicht zeigten, konnten mit dem WST-1 Test nicht bestätigt werden. Während die auf den polarisierten Stahloberflächen im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollen ermittelten geringeren WST-Werte auf eine niedrigere Mitochondrienanzahl der Zellen oder eine verringerte Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase schließen lassen, deuten die höheren WST-Werte auf den polarisierten Titanoberflächen auf eine Zunahme der Mitochondrienzahl oder eine Steigerung der mitochondrialen Stoffwechselaktivität hin. Zusammenfassend ist allerdings anzumerken, dass der Einfluss der angelegten Spannung auf die Proteinadsorption gering war, da lediglich einer der zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens bzw. der Zellaktivität durchgeführten Versuchsdurchgänge das statistische Signifikanzniveau erreichte.

Der Einfluss des während der Zelladsorption angelegten externen elektrischen Feldes auf das Proliferationsverhalten und die mitochondriale Zellaktivität der auf die Testoberflächen ausgesäten Osteoblasten-ähnlichen Zellen war auf den Titanplättchen deutlich stärker als auf den Stahlplättchen. Im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollen

wurden sowohl bei der Zellzahlbestimmung als auch bei der Untersuchung der Zellaktivität auf den polarisierten Stahloberflächen in je einem Versuchsdurchgang praktisch identische Messwerte, in einem weiteren Durchgang lediglich tendenziell verringerte Werte ermittelt (Abbildung 3.5, 3.6). Das Abweichen der Ergebnisse in den beiden Versuchsdurchgängen könnte daran liegen, dass sich die Zellen zum Messzeitpunkt in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus befanden. Der Effekt der elektrischen Stimulation auf das Zellverhalten hängt u. a. vom Reifegrad der Zellen ab (Diniz et al., 2002). Auf den polarisierten Titanoberflächen konnten signifikant niedrigere Zellzahlen bei signifikant bzw. tendenziell verringerter Atmungsaktivität gefunden werden als auf den unpolarisierten Kontrollplättchen (Abbildung 3.7, 3.8). Neben der aus der Versuchsreihe zur Proteinadsorption gefolgerten indirekten Beeinflussung des Zellverhaltens über eine Veränderung der adsorbierten Proteine durch das externe elektrische Feld, kann davon ausgegangen werden, dass eine angelegte Spannung insbesondere auf Titanoberflächen auch einen direkten Einfluss auf die adsorbierten Osteoblasten-ähnlichen Zellen hat.

Die während der Protein- und Zelladsorption angelegte Spannung beeinflusste die untersuchten Testparameter Zellzahl und mitochondriale Zellaktivität sowohl auf den Stahl- als auch den Titanoberflächen. Während auf den polarisierten Stahloberflächen in allen Versuchsdurchgängen signifikant niedrigere Zellzahlen und eine signifikant verringerte Zellaktivität im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollen gefunden wurden (Abbildung 3.9, 3.10), konnten auf den polarisierten Titanoberflächen signifikant geringere Zellzahlen bei gleichzeitig tendenziell erhöhter Atmungsaktivität ermittelt werden als auf den unpolarisierten Plättchen (Abbildung 3.11, 3.12). Der Effekt des bei Protein- und Zelladsorption angelegten elektrischen Feldes auf die untersuchten Testparameter auf den Stahloberflächen war deutlich stärker als die Wirkung einer ausschließlich bei Proteinadsorption bzw. Zelladsorption angelegten Spannung, die das Proliferationsverhalten und die Atmungsaktivität lediglich tendenziell bzw. nahezu gar nicht beeinflusste. Die auf den bei Protein- und Zelladsorption polarisierten Titanoberflächen im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollen erheblich geringeren Zellzahlen bestätigen die Ergebnisse der Versuchsreihen zur Proteinadsorption und Zelladsorption. Die gleichzeitig gemessene tendenzielle Zunahme der mitochondrialen Zellaktivität korreliert mit den Beobachtungen, die beim Anlegen einer Spannung bei Proteinadsorption auf den Titanoberflächen gemacht wurden und widerspricht den Resultaten der bei

Zelladsorption polarisierten Titanplättchen. Daraus kann gefolgert werden, dass die durch das externe elektrische Feld hervorgerufene Veränderung der adsorbierten Proteinschicht für die positive Beeinflussung der zellulären Atmungsaktivität verantwortlich ist. Die sowohl bei Osteoblasten (Nöth et al., 1999) als auch bei Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) (Martin et al., 1995; Lincks et al., 1998) beschriebene, auf glatten gegenüber rauen Oberflächen initial gesteigerte Proliferationsrate, kann einerseits mit der verfügbaren kleineren Kulturfläche erklärt werden, die infolge der höheren Zelldichte anfangs zu einem verstärkten Wachstum führt (Nöth et al., 1999), andererseits scheinen die an rauen Oberflächen auftretenden und in der vorliegenden Studie simulierten elektrischen Felder einen negativen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Zellen zu haben.

Der Einfluss eines externen elektrischen Feldes auf die intrazelluläre Proteinverteilung kann nach Analyse der Immunfluoreszenzen sowohl auf den Stahl- als auch den Titanoberflächen als äußerst gering betrachtet werden. Lediglich auf den während der Proteinadsorption polarisierten Titanplättchen sowie den während der Protein- und Zelladsorption polarisierten Stahlplättchen wurden verglichen mit den jeweils nicht polarisierten Kontrolloberflächen eine höhere Dichte des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin beobachtet (Abbildung 3.14 A, B; 3.17 A, B). Dies deutet auf eine Zunahme von kontraktilen Aktinfilament-Bündeln („Stressfasern“) in den Osteoblasten-ähnlichen Zellen hin, die u. a. in Fokalkontakte einstrahlen und damit auf eine verstärkte Anheftung an den polarisierten Oberflächen bzw. eine eingeschränkte Zellbeweglichkeit schließen lassen.

Mit Ausnahme der auf den Stahlplättchen durchgeführten Versuchsreihe zur Zelladsorption wurde auf allen ausgewerteten Testoberflächen, unabhängig von der Polarisation der Plättchen, ein gut ausgebildetes Mikrotubulusnetzwerk nachgewiesen (Abbildung 3.13 C, D; 3.14 C, D; 3.16 C, D; 3.17 C, D; 3.18 C, D). Sowohl auf den bei Zelladsorption polarisierten Stahloberflächen als auch den unpolarisierten Kontrollen wurden statt des typischen Mikrotubulusnetzwerkes lediglich kurze Tubulinfilamente identifiziert (Abbildung 3.15 C, D). Dies könnte auf eine fehlerhafte Fixierung bzw. ein Austrocknen der Zellen zurückzuführen sein. Das auf den bei Protein- und Zelladsorption polarisierten Stahlplättchen im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollen an den Zellausläufern beobachtete dichtere Mikrotubulusnetzwerk (Abbildung 3.17 C, D) lässt auf

eine durch das angelegte elektrische Feld hervorgerufene verstärkte mechanische Stabilisierung der Zellen schließen.

Eine Beeinflussung der Zellmorphologie durch die angelegte Spannung konnte in allen Versuchsreihen ausgeschlossen werden. Unabhängig von der Polarisierung der Oberfläche wurden ausschließlich gut ausgebreitete Zellen gefunden. Die auf rauen Oberflächen beschriebenen weniger ausgebreiteten Zellen lassen sich folglich mit dem Oberflächenrelief erklären, das den Zellen auch in dieser Form genügend Stabilität verleiht (Kunzler et al., 2007) und nicht mit den in der vorliegenden Studie simulierten und an rauen Oberflächen auftretenden elektrischen Feldern. Die im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollplättchen auf den während der Proteinadsorption polarisierten Stahloberflächen nachgewiesenen geringfügig kleineren Zellen und Zellkerne (Abbildung 3.13 A – D') könnten Folge einer unterschiedlichen Reifung der Osteoblasten-ähnlichen Zellen sein. So haben unreife Zellen größere Kerne als ausgereifte, deren Funktionsstoffwechsel nicht mehr im Dienst der Gewebeneubildung steht (Curran & Codling, 1972).

Mit dem vorgestellten *in vitro*-Modell konnte ein deutlich größerer Einfluss der angelegten Spannung (+600 mV) auf das Proliferationsverhalten und die mitochondriale Zellaktivität Osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63) als auf die intrazelluläre Proteinverteilung gezeigt werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Ergebnisse zur Zellzahl und Atmungsaktivität nur eingeschränkt aussagekräftig sind, da jeder Versuch lediglich einmal wiederholt wurde. Um verlässliche Aussagen treffen zu können, bedarf es weiterer *in vitro*-Untersuchungen. Ziele folgender Forschungsarbeiten könnten zusätzlich sein, den Einfluss eines externen elektrischen Feldes auf die Osteoblastendifferenzierung zu evaluieren bzw. die Testparameter Zellzahl und Stoffwechselaktivität über einen längeren Zeitraum zu dokumentieren.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde in einem *in vitro*-Modell der Einfluss eines elektrischen Feldes auf die Adsorption von Proteinen und Zellen getestet. Dazu wurden Elektrokammern hergestellt, in denen metallische Oberflächen während der Proteinadsorption, der Zelladsorption sowie der Protein- und Zelladsorption polarisiert wurden. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus konnten elektrische Felder simuliert werden, wie sie an rauen, im Mikro- bis Nanometerbereich strukturierten Oberflächen auftreten. Als Testoberflächen dienten die im klinischen Einsatz bewährten Implantatmaterialien Stahl und Titan. Die Wirkung der angelegten Spannung (+600 mV) auf die Testparameter Proliferationsverhalten, mitochondriale Zellaktivität und intrazelluläre Proteinverteilung wurde 48 h nach Aussaat der Osteoblasten-ähnlichen Zellen (MG-63) untersucht.

Mit Ausnahme der während der Proteinadsorption polarisierten Stahlplättchen konnten auf allen polarisierten Testoberflächen geringere Zellzahlen nachgewiesen werden als auf den unpolarisierten Kontrollen.

Die mitochondriale Zellaktivität war auf allen polarisierten Stahloberflächen im Vergleich zu den unpolarisierten Kontrollplättchen verringert, wobei lediglich in der Versuchsreihe zur Protein- und Zelladsorption eine statistisch signifikante Abnahme ermittelt werden konnte. Auf den während der Zelladsorption polarisierten Titanoberflächen wurde ebenfalls eine verglichen mit den unpolarisierten Kontrollen geringere Stoffwechselaktivität beobachtet, während dieser Testparameter durch die bei Proteinadsorption und Protein- und Zelladsorption angelegte Spannung auf den übrigen Titanplättchen positiv beeinflusst wurde.

Der Einfluss des externen elektrischen Feldes auf die intrazelluläre Proteinverteilung stellte sich nach Analyse der Immunfluoreszenzen als äußerst gering dar. Lediglich auf den während der Proteinadsorption polarisierten Titanplättchen sowie den bei Protein- und Zelladsorption polarisierten Stahlplättchen wurde eine verglichen mit den jeweils nicht polarisierten Kontrolloberflächen höhere Dichte des Aktin-vernetzenden Proteins α -Actinin gefunden. Ein an den Zellausläufern dichteres Mikrotubulusnetzwerk wurde ebenfalls auf den letztgenannten Stahloberflächen nachgewiesen. Auf den anderen Testoberflächen zeigte das jeweils gut ausgebildete Mikrotubulusnetzwerk keine polarisationsbedingten Abweichungen.

Die Morphologie der Osteoblasten-ähnlichen Zellen wurde in keinem der Versuchsdurchgänge durch die angelegte Spannung beeinflusst.

Mit dem beschriebenen *in vitro*-Modell konnte gezeigt werden, dass ein externes elektrisches Feld das Zellverhalten sowohl direkt als auch indirekt über eine Veränderung der adsorbierten Proteinschicht beeinflussen kann. Ziele folgender Forschungsarbeiten könnten das Verifizieren der ermittelten Ergebnisse sowie die Untersuchung des Einflusses der angelegten Spannung auf die Osteoblastendifferenzierung sein.

6 Literaturverzeichnis

Aaron RK, Boyan B, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004). Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields. *Clin Orthop* 419: 30 – 37.

Agins HJ, Alcock NW, Bansal M, Salvati EA, Wilson PD, Pellicci PM, Bullough PG (1988). Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis. *J Bone Joint Surg Am* 70: 347 – 356.

Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Kasemo B, Larsson K, Lundström I, McQueen DH, Skalak R (1983). The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implants in bone. *Ann Biomed Eng* 11: 1 – 27.

Alexa O (1996). Osteogeneza indusă electric – Nota II: Cercetări experimentale. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iași* 100: 62 – 65.

Anselme K, Bigerelle M, Noel B, Dufresne E, Judas D, Jost A, Hardouin P (2000a). Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughness. *J Biomed Mater Res* 49: 155 – 166.

Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le Maguer D, Le Maguer A, Hardouin P, Hildebrand HF, Jost A, Leroy JM (2000b). The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behavior. *Biomaterials* 21: 1567 – 1577.

Bardos DI (1990). Titanium and titanium alloys.

In: Concise encyclopedia of medical and dental materials.

Williams DF, Cahn RW, Bever MB (eds.). Pergamon Press, Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto; pp 360 – 365.

Bauerschmidt P, Thull R, Schaldach M (1976). Model of an antithrombogenic surface of a solid.

In: Blood vessels: Problems arising at the borders of natural and artificial blood vessels.

Effert S, Meyer-Erkelenz JD (eds.).

Springer, Berlin, Heidelberg, New York; pp 177 – 181.

Billiau A, Edy VG, Heremans H, Van Damme J, Desmyter J, Georgiades JA, De Somer P (1977). Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. *Antimicrob Agents Chemother* 12 (1): 11 – 15.

Binderman I, Somjen D, Shimshoni Z, Levy J, Fischler H, Korenstein R (1985). Stimulation of skeletal-derived cell cultures by different electric field intensities is cell-specific. *Biochim Biophys Acta* 844: 273 – 279.

Bothe RT, Beaton LE, Davenport HA (1940). Reaction of bone to multiple metallic implants. *Surg Gynec Obstet* 71: 598 – 602.

Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17 (2): 137 – 146.

Brånemark PI (1983). Osseointegration and its experimental background. *J Prosth Dent* 50 (3): 399 – 410.

Brånemark PI (1985). Einführung in die Osseointegration.

In: Gewebeintegrierter Zahnersatz: Osseointegration in klinischer Zahnheilkunde.

Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T (Hrsg.). Quintessenz, Berlin, Chicago, London, Rio de Janeiro, Tokio; pp 11 – 76.

Breme J, Eisenbarth E, Biehl V (2000). Metalle und mechanische Oberflächenmodifikationen. *Biomaterialien* 1 (1): 48 – 53.

Breme J, Eisenbarth E, Biehl V (2002). Titanlegierungen in der Medizintechnik.

In: Titan und Titanlegierungen. Peters M, Leyens C (Hrsg.).

Wiley-VCH, Weinheim; pp 431 – 462.

Brunette DM (1986a). Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions. *Exper Cell Res* 164: 11 – 26.

Brunette DM (1986b). Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exper Cell Res* 167: 203 – 217.

Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* 25: 889 – 902.

Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Brånemark PI (1986). Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthop Scand* 57: 285 – 289.

Chang WH, Chen LT, Sun JS, Lin FH (2004). Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 25: 457 – 465.

Chao PH, Roy R, Mauck RL, Liu W (2000). Chondrocyte translocation response to direct current electric fields. *J Biomech Eng* 122: 261 – 267.

Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM (1989). Effects of a grooved titanium-coated implant surface on epithelial cell behavior in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res* 23: 1067 – 1085.

Chehroudi B, Gould TR, Brunette DM (1990). Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently in vivo. *J Biomed Mater Res* 24: 1203 – 1219.

Chesmel KD, Black J (1995). Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. I. A novel in vitro model system. *J Biomed Mater Res* 29: 1089 – 1099.

Chesmel KD, Clark CC, Brighton CT, Black J (1995). Cellular responses to chemical and morphologic aspects of biomaterial surfaces. II. The biosynthetic and migratory response of bone cell populations. *J Biomed Mater Res* 29: 1101 – 1110.

Clark P, Connolly P, Curtis AS, Dow JA, Wilkinson CD (1990). Topographical control of cell behaviour: II. Multiple grooved substrata. *Development* 108: 635 – 644.

Combe EC (1984). *Zahnärztliche Werkstoffe: Zusammensetzung, Verarbeitung, Anwendung*. Dt. Ausgabe von Dermann K. Carl Hanser Verlag, München, Wien.

Craig RG, Powers JM, Wataha JC (2006). Zahnärztliche Werkstoffe: Eigenschaften und Verarbeitung. Elsevier, München.

Curran RC, Codling BW (1972). The cellular basis of pathology.
In: The pathological basis of medicine. Curran RC, Harnden DG (eds.).
Heinemann, London; pp 1 – 27.

Curtis AS, Gadegaard N, Dalby MJ, Riehle MO, Wilkinson CD, Aitchison G (2004). Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings.
IEEE Trans Nanobiosci 3: 61 – 65.

Curtze S, Dembo M, Miron M, Jones DB (2004). Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. J Cell Sci 117: 2721 – 2729.

Dalby MJ, Riehle MO, Johnstone H, Affrossman S, Curtis AS (2004). Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia.
Cell Biol International 28: 229 – 236.

Davies JE (1998). Mechanisms of endosseous integration.
Int J Prosthodont 11: 391 – 401.

Davies JE (2003). Understanding peri-implant endosseous healing.
J Dent Educ 67: 932 – 949.

Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G (2002). Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. Bioelectromagnetics 23: 398 – 405.

Fallschüssel GK (1986). Zahnärztliche Implantologie - Wissenschaft und Praxis.
Quintessenz, Berlin, Chicago, London, São Paulo, Tokio.

Ferracane JL (1995). Materials in dentistry: principles and applications.
Lippincott, Philadelphia.

Fink U (2001). Metallische Werkstoffe für orthopädische Implantate. *Biomaterialien* 2 (4): 170 – 174.

Finkenstein E, Chang W, Chao PH, Gruber D, Minden A, Hung CT, Bulinski JC (2004). Roles of microtubules, cell polarity and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 117: 1533 – 1545.

Funk RH, Monsees TK (2006). Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction – a review. *Cells Tissues Organs* 182: 59 – 78.

Ganne JM (1988). Stimulation of bone healing with interferential therapy. *Aust J Physiother* 34 (1): 9 – 20.

Garvey BT, Bizios R (1995). A transmission electron microscopy examination of the interface between osteoblasts and metal biomaterials. *J Biomed Mater Res* 29: 987 – 992.

Geis-Gerstorfer J (2003). Titan und Titan-Legierungen. *ZM* 93 (7): 828 – 832.

Gellings PJ (1981). *Korrosion und Korrosionsschutz von Metallen: eine Einführung*. Carl Hanser Verlag, München, Wien.

Grill V, Sandrucci MA, Di Lenarda R, Marisa B, Narducci P, Martelli AM, Bareggi R (2000). In vitro evaluation of the biocompatibility of dental alloys: fibronectin expression patterns and relationships to cellular proliferation rates. *Quintessence Int* 31: 741 – 747.

Gundersen GG, Bulinski JC (1988). Selective stabilization of microtubulus oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 5946 – 5950.

Ha SW, Wintermantel E (2002). *Metalle*.

In: *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*.

Wintermantel E, Ha SW (Hrsg.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio; pp 121 – 148.

Hartig M, Joos U, Wiesmann HP (2000). Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *Eur Biophys J* 29: 499 – 506.

Hassler CR, Rybicki EF, Diegle RB, Clark LC (1977). Studies of enhanced bone healing via electrical stimuli: Comparative effectiveness of various parameters. *Clin Orthop Relat Res* 124: 9 – 19.

Head WC, Bauk DJ, Emerson RH (1995). Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 311: 85 – 90.

Hench LL, Ethridge EC (1982). *Biomaterials: An interfacial approach*. Academic Press, New York, London, Paris, San Diego, San Francisco, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto.

Höcker H (1997). Implantatwerkstoffe – Versuche zur Erzielung von Biokompatibilität. In: *Nordrhein-Westfälische Akademie der Wissenschaften: Natur-, Ingenieur- und Wirtschaftswissenschaften N 430*. Nordrhein-Westfälische Akademie der Wissenschaften (Hrsg.). Westdeutscher Verlag, Opladen; pp 1 – 32.

Hoffman A, Zhou Y, Groh L, Breme J (1997). Optimierte Hydroxylapatitbeschichtungen auf Titanimplantaten. In: *Werkstoffwoche '96. Symposium 4: Werkstoffe für die Medizintechnik*. Breme J (Hrsg.). DGM Informationsgesellschaft, Frankfurt; pp 105 – 110.

Horbett TA (1996). Proteins: structure, properties, and adsorption to surfaces. In: *Biomaterials science: An introduction to materials in medicine*. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE (eds.). Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto; pp 133 – 141.

Huang SC (1997). Effect of electrical stimulation on callus maturation during callus distraction in rabbits. *J Formos Med Assoc* 96: 429 – 434.

Jaffe LF (1977). Electrophoresis along cell membranes. *Nature* 265: 600 – 602.

Jones DB (1998). Cells and metals.

In: *Metals as biomaterials*. Helsen JA, Breme HJ (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto; pp 317 – 336.

Judet R, Judet J (1949). Essais de reconstruction prothétique de la hanche après résection de la tête fémorale. *J Chir* 65: 17 – 24.

Kasemo B (2002). Biological surface science. *Surf Sci* 500: 656 – 677.

Kasemo B, Lausmaa J (1994). Material-tissue interfaces: the role of surface properties and processes. *Environ Health Perspect* 102 (5): 41 – 45.

Klein MO, Al-Nawas B, Bijelic A, Wörsdörfer N, Götz H, Sandhöfer F, Wagner W, Duschner H (2006). Implantateinheilung: Osteoblastenkulturen zur Charakterisierung der Biokompatibilität moderner Zahnimplantatoberflächen. *Biomaterialien* 7 (4): 291 – 297.

Knöfler W, Graf HL (1989). Zur Knochenregeneration auf Biomaterialien. Komplexes Versuchsmodell zur Beschreibung der Knochenumbauvorgänge und Interfacereaktion unter Biomaterialeinfluß. *Z Zahnärztl Implantol V*: 256 – 262.

Kramer KH (2001). Metallische Implantatwerkstoffe – ein Überblick. *Biomaterialien* 2 (4): 187 – 197.

Kunzler TP, Drobek T, Schuler M, Spencer ND (2007). Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 28: 2175 – 2182.

Kupfer A, Louvard D, Singer SJ (1982). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 2603 – 2607.

Lee MH, Ducheyne P, Lynch L, Boettiger D, Composto RJ (2006). Effect of biomaterial surface properties on fibronectin- $\alpha_5\beta_1$ integrin interaction and cellular attachment. *Biomaterials* 27: 1907 – 1916.

Lenz E (1998). Dentallegierungen.

In: *Klinische Materialkunde für Zahnärzte*. Meiners H, Lehmann KM (Hrsg.). Carl Hanser Verlag, München, Wien; pp 71 – 118.

Leventhal GS (1951). Titanium, a metal for surgery.

J Bone Joint Surg Am 33: 473 – 474.

Lincks J, Boyan BD, Blanchard CR, Lohmann CH, Lin Y, Cochran DL, Dean DD, Schwarz Z (1998). Response of MG63 osteoblast-like cells to titanium and titanium alloy is dependent on surface roughness and composition. *Biomaterials* 19: 2219 – 2232.

Lombardi AV, Mallory TH, Vaughn BK, Drouillard P (1989). Aseptic loosening in total hip arthroplasty secondary to osteolysis induced by wear debris from titanium-alloy modular femoral heads. *J Bone Joint Surg Am* 71: 1337 – 1342.

Macionczyk F, Gerold B, Thull R (2001). Repassivating tantalum/tantalum oxide surface modification on stainless steel implants.

Surface and Coatings Technology 142 – 144: 1084 – 1087.

Macionczyk F, Thull R (2001). Oberflächenmodifikation von Hüftendoprothesenschäften mit strukturierter (Ti, Nb)ON-Schicht. *Biomaterialien* 2 (1): 25 – 30.

Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD (1995). Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63).

J Biomed Mater Res 29: 389 – 401.

Martines E, McGhee K, Wilkinson C, Curtis A (2004). A parallel-plate flow chamber to study initial cell adhesion on a nanofeatured surface. *IEEE Trans Nanobiosci* 3: 90 – 95.

-
- McGinnis ME (1989). The nature and effects of electricity in bone.
In: Electric fields in vertebrate repair. Borgens RB, Robinson KR, Venable JW, McGinnis ME (eds.). Alan R. Liss, New York; pp 225 – 284.
- Meadows PY, Walker GC (2005). Force microscopy studies of fibronectin adsorption and subsequent cellular adhesion to substrates with well-defined surface chemistries. *Langmuir* 21: 4096 – 4107.
- Monsees TK, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk RH (2005). Effects of different titanium alloys and nanosize surface patterning on adhesion, differentiation, and orientation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs* 180: 81 – 95.
- Monsees TK, Funk RH (2005). Wirkung von Oberflächenladungen und elektromagnetischen Feldern auf Zellen. *Biomaterialien* 6 (2): 67 – 74.
- Niethard FU, Pfeil J (1997). Orthopädie. Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- Nöth U, Hendrich C, Merklein F, Altvater T, Rader CP, Schütze N, Eulert J, Thull R (1999). Standardisiertes Testen von Skelett-Implantatoberflächen mit einem Osteoblasten-Zellkultursystem. II. Titanoberflächen unterschiedlicher Rauigkeit. *Biomed Tech* 44: 6 – 11.
- Östman PO, Hellman M, Sennerby L (2005). Direct implant loading in the edentulous maxilla using a bone density-adapted surgical protocol and primary implant stability criteria for inclusion. *Clin Implant Dent Relat Res* 7 (Suppl 1): 60 – 69.
- Otoni JM, Oliveira ZF, Mansini R, Cabral AM (2005). Correlation between placement torque and survival of single-tooth implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20: 769 – 776.

Päßler K (1997). Titan in der Zahnmedizin.

In: Titan in der Zahnmedizin: Ein Basiswerk über den biologischen Werkstoff Titan, seine Verarbeitung und seinen klinischen Einsatz. Wirz J, Bischoff H (Hrsg.).

Quintessenz, Berlin, Chicago, London, Tokio, Paris, Barcelona, São Paulo, Moskau, Prag, Warschau; pp 41 – 62.

Peters M, Hemptenmacher J, Kumpfert J, Leyens C (2002). Titan und Titanlegierungen: Struktur, Gefüge, Eigenschaften.

In: Titan und Titanlegierungen. Peters M, Leyens C (Hrsg.).

Wiley-VCH, Weinheim; pp 1 – 38.

Poo MM (1981). In situ electrophoresis of membrane components.

Ann Rev Biophys Bioeng 10: 245 – 276.

Ratner BD (1993). New ideas in biomaterials science – a path to engineered biomaterials. J Biomed Mater Res 27: 837 – 850.

Ratner BD, Johnston AB, Lenk TJ (1987). Biomaterial surfaces.

J Biomed Mater Res Appl Biomat 21: 59 – 89.

Rauwolf C, Schneider K, Werner C (2003). Molecular Modeling der Grenzfläche amorphes TiO₂-Kollagen. Biomaterialien 4 (3): 178 – 183.

Richez J, Chamay A, Biéler L (1972). Bone changes due to pulses of direct electric microcurrent. Virchows Arch Abt A Path Anat 357: 11 – 18.

Ring ME (1997). Geschichte der Zahnmedizin. Könenmann, Köln.

Rößler S, Stölzel M, Scharnweber D, Worch H (1997). Biologisierung von Implantatoberflächen durch Immobilisierung von Biopolymeren.

In: Werkstoffwoche '96. Symposium 4: Werkstoffe für die Medizintechnik.

Breme J (Hrsg.). DGM Informationsgesellschaft, Frankfurt; pp 123 – 128.

Rovensky YA, Slavnaja IL, Vasiliev JM (1971). Behaviour of fibroblast-like cells on grooved surfaces. *Exper Cell Res* 65: 193 – 201.

Rüedi TP (1975). Titan und Stahl in der Knochenchirurgie.
In: Hefte zur Unfallheilkunde. Rehn J, Schweiberer L (Hrsg.).
Springer, Berlin, Heidelberg, New York; Heft 123: 1 – 66.

Scharnweber D (2007). Bio surface-engineering of titanium materials.
Biomaterialien 8 (1): 8 – 15.

Schmitz HJ, Kettner R, Eren S (1996). Implantatmaterialien.
In: Praxis der Zahnheilkunde Bd 13. Implantologie. Koeck B, Wagner W (Hrsg.).
Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore; pp 9 – 30.

Schroeder A (1994). Voraussetzungen für einen implantologischen Dauererfolg.
In: Orale Implantologie. Schroeder A, Sutter F, Buser D, Krekeler G (Hrsg.).
Thieme, Stuttgart, New York; pp 2 – 10.

Semlitsch M, Willert HG (1981). Korrosions- und Festigkeitseigenschaften metallischer ISO-5832 Implantatwerkstoffe auf Eisen-, Kobalt- und Titanbasis für künstliche Hüftgelenke.
In: Symposium über Biomaterialien. Rettig H, Weber U (Hrsg.).
Gentner Verlag, Stuttgart; pp 54 – 65.

Shandler MS, Weinstein S, Nathan LE (1979). Facilitated healing of osseous lesions in the canine mandible after electrical stimulation. *J Oral Surg* 37 (11): 787 – 792.

Sinha RK, Morris F, Shah SA, Tuan RS (1994). Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 305: 258 – 272.

Soong HK, Parkinson WC, Bafna S, Sulik GL, Huang SC (1990). Movements of cultured corneal epithelial cells and stromal fibroblasts in electric fields.
Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 2278 – 2282.

Stanford CM, Schneider GB (2004). Functional behaviour of bone around dental implants. *Gerodontology* 21: 71 – 77.

Strübig W (1989). *Geschichte der Zahnheilkunde: Eine Einführung für Studenten und Zahnärzte*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Stump RF, Robinson KR (1983). *Xenopus neural crest cell migration in an applied electrical field*. *J Cell Biol* 97: 1226 – 1233.

Thomas K, Cook S (1985). An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition. *J Biomed Mater Res* 19: 875 – 901.

Thomas P, Barnstorf S, Summer B (2001). Allergologische Aspekte der Bioverträglichkeit von Titanbasisimplantaten. *Biomaterialien* 2 (1): 35 – 44.

Thull R (1992). Titan in der Zahnheilkunde – Grundlagen. *ZM* 7: 40 – 45.

Thull R (1993). Hartstoffbeschichtungen für Zahnimplantate zur Verhinderung von Reibekorrosion bei Mikrobewegungen. *Z Zahnärztl Implantol* IX: 275 – 280.

Thull R (1994a). Werkstoffkundliche Oberflächeneigenschaften knochenimplantierbarer Biomaterialien.

In: *Jahrbuch für Orale Implantologie*. Gesellschaft für orale Implantologie (Hrsg.). Quintessenz, Berlin; pp 55 – 70.

Thull R (1994b). Naturwissenschaftliche Aspekte von Werkstoffen in der Medizin. *Naturwissenschaften* 81: 481 – 488.

Thull R (1997). Beschreibung biokompatibler Werkstoffe durch physikalisch-chemische Parameter zur funktionsgerechten Modifikation von Oberflächen.

In: *Werkstoffwoche '96. Symposium 4: Werkstoffe für die Medizintechnik*. Breme J (Hrsg.). DGM Informationsgesellschaft, Frankfurt; pp 3 – 14.

Thull R (1998). Tissue-implant interaction.

In: Metals as biomaterials. Helsen JA, Breme HJ (eds.). John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto; pp 291 – 316.

Thull R (2000). Biokompatibilitätsbestimmende Eigenschaften der Grenzfläche zwischen Werkstoff und Biosystem. Biomaterialien 1 (1): 6 – 11.

Thull R (2002). Physiochemical principles of tissue material interactions.

Biomol Eng 19: 43 – 50.

Thull R (2003). Oberflächenmodifikationen zur Verbesserung von Biokompatibilität und mechanischen Eigenschaften von orthopädischen Implantaten. Orthopäde 32: 51 – 59.

Thull R, Handke KD, Karle EJ (1995). Tierexperimentelle Prüfung von Titan mit Oberflächenbeschichtungen aus (Ti,Nb)ON und (Ti,Zr)O.

Biomed Tech 40 (10): 289 – 295.

Thull R, Trautner K, Karle EJ (1992). Modell zur immunologischen Prüfung von Biomaterialien. Biomed Tech 37: 162 – 169.

Tümmler HP (1986). Oberflächeneigenschaften von Titan und Tantal für Implantate. Dissertation FAU Erlangen-Nürnberg.

Van Recum AF (1990). New aspects of biocompatibility: motion at the interface.

In: Clinical implant materials. Heimke G, Soltész U, Lee AJ (eds.).

Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo; pp 297 – 302.

Wagner W, Al-Nawas B (2004). Implantatmaterialien und Konstruktionsprinzipien der Implantate aus chirurgischer Sicht.

In: Praxis der Zahnheilkunde Bd. 13. Implantologie. Koeck B, Wagner W (Hrsg.).

Urban & Fischer, München, Berlin; pp 61 – 98.

Wagner W, Tatsch P (1984). Materialentwicklung als Teilaspekt der Implantat-Prognose.

Fortschr Zahnärztl Implantol I: 13 – 24.

Wang E, Zhao M, Forrester JV, McCaig CD (2000). Re-orientation and faster, directed migration of lens epithel cells in a physiological electric field. *Exp Eye Res* 71: 91 – 98.

Wang E, Zhao M, Forrester JV, McCaig CD (2003). Bi-directional migration of lens epithelial cells in a physiological electrical field. *Exp Eye Res* 76: 29 – 37.

Wannerberg A, Ektessabi A, Albrektsson T, Johansson B, Anderson B (1997). A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone.

Int J Oral Maxillofac Implants 12: 486 – 494.

Watzek G, Blahout R (1993). Historischer Rückblick.

In: *Enossale Implantate in der oralen Chirurgie*. Watzek G (Hrsg.).

Quintessenz, Berlin, Chicago, London, Moskau, São Paulo, Tokio; pp 1 – 12.

Watzek G, Mailath-Pokorny G (2000). Zahnärztliche Implantate.

In: *Zahnärztliche Chirurgie*. Schwenzler N, Ehrenfeld M (Hrsg.).

Thieme, Stuttgart, New York; pp 127 – 168.

Williams DF (1990). Biocompatibility: An overview.

In: *Concise encyclopedia of medical and dental materials*.

Williams DF, Cahn RW, Bever MB (eds.). Pergamon Press, Oxford, New York, Beijing, Frankfurt, São Paulo, Sydney, Tokyo, Toronto; pp 51 – 59.

Williams RL, Williams DF (1989). The spatial resolution of protein adsorption on surfaces of heterogeneous metallic biomaterials. *J Biomed Mater Res* 23: 339 – 350.

Wintermantel E, Shah-Derler B, Bruinink A, Petitmermet M, Blum J, Ha SW (2002). Biokompatibilität.

In: *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*.

Wintermantel E, Ha SW (Hrsg.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio; pp 5 – 44.

Yonemori K, Matsunaga S, Ishidou Y, Maeda S, Yoshida H (1996). Early effects of electrical stimulation on osteogenesis. *Bone* 19: 173 – 180.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr.-Ing. Roger Thull für die freundliche Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Promotionsthemas sowie die Möglichkeit in einem etablierten Zelllabor promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. dent. Wolfgang Wiedemann danke ich vielmals für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. rer. nat. Andrea Ewald danke ich ganz herzlich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, ihre Unterstützung bei der Zusammenstellung des Bildmaterials und die konstruktiven Diskussionen und Anregungen, die maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Frau Ursula Rummel und Frau Rita Schmid für die engagierte und motivierende Hilfe bei der Durchführung der wissenschaftlichen Experimente und den Feinmechanikern Herrn Anton Hofmann und Herrn Harald Hümpfer für den Bau der Elektrokammern und ihr stets offenes Ohr bei technischen Problemen.

Mein allergrößter und herzlichster Dank gilt meinen Eltern Sigrid und Thomas Tauböck, die mir in allen erdenklichen Lebenslagen beiseite standen und mir unendlich viel Liebe, Rückhalt und Kraft gegeben haben. Ohne Eure mit Worten nicht zu beschreibende und ihresgleichen suchende, immer währende Unterstützung in schulischer, beruflicher und sportlicher Hinsicht sowie während des Studiums und nicht zuletzt der Promotionsarbeit wäre ich in meinem Leben nie so weit gekommen und stünde heute nicht dort, wo ich jetzt angelangt bin. Für all das, was ihr für mich getan und mir ermöglicht habt, danke ich Euch von ganzem Herzen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tobias Tauböck
geboren am 19. Februar 1982
in Würzburg
Familienstand: ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988 – 07/1992 Grundschule Würzburg Dürrbachgrund
09/1992 – 06/2001 Städt. Schönborn-Gymnasium Würzburg

Schulabschluss

06/2001 Allgemeine Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,0)

Bundeswehr

07/2001 – 03/2002 Grundwehrdienst in Kilsheim und Veitshöchheim

Studium

04/2002 – 07/2002 Studium der Nanostrukturtechnik
an der Universität Würzburg

10/2002 – 02/2007 Studium der Zahnmedizin
an der Universität Würzburg

04/2003 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
09/2004 Zahnärztliche Vorprüfung
02/2007 – 06/2007 Staatsexamensprüfungen

Studienabschluss

06/2007 Staatsexamen

Approbation als Zahnarzt

06/2007 Regierung von Unterfranken

Zahnärztliche Tätigkeit

seit 01/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für
Präventivzahnmedizin, Parodontologie und
Kariologie, Zentrum für Zahn-, Mund- und
Kieferheilkunde der Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. Thomas Attin

Stipendium

10/2001 - 09/2005

e-fellows.net Stipendium

Sonstige Interessen

Tennis

Mitglied im Tennisverein TC Weiß-Blau Würzburg
ehemaliger BTV-Jugendkader-Spieler
Fachübungsleiter (C-Trainer)
Bezirksoberschiedsrichter

Leichtathletik

Mitglied im Leichtathletikverein
LAZ Kreis Würzburg
u. a. Bayerischer Meister 2003

Würzburg, Juli 2008