

Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universität Rostock

(Direktor: Prof. Dr. med. Wolfram Mittelmeier)

**Etablierung und Evaluation eines In-vitro-Systems zur  
biophysikalischen Stimulation humaner Osteoblasten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

der Universitätsmedizin Rostock



vorgelegt von

Martin Stephan

geb. am 25.10.1993 in Demmin

Rostock, Dezember 2022



**Dekan:**

Prof. Dr. med. univ. Emil C. Reisinger, MBA

**Gutachter:**

Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader, Universität Rostock, Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie

Prof. Dr. rer. nat. Andrea Hoffmann, Medizinische Hochschule Hannover, Labor für Biomechanik und Biomaterialien

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. et med. habil. Kirsten Peters, Universität Rostock, Arbeitsbereich Zellbiologie

**Jahr der Einreichung:** 2022

**Jahr der Verteidigung:** 2022



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Grundlagen der Knochen-Morphologie.....	3
2.2	Marker des Knochenstoffwechsels .....	5
2.2.1	Osteogenese.....	5
2.2.2	Bone Remodeling.....	6
2.3	Osseointegration und Implantatversagen .....	7
2.4	Biophysikalische Stimulation von Knochen.....	10
2.4.1	Einfluss von Elektrostimulation auf Osteoblasten und Knochengewebe .....	13
2.4.2	Einfluss von Mikrobewegungen auf Osteoblasten und Knochengewebe .....	15
<b>3</b>	<b>Zielstellung</b> .....	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>19</b>
4.1	Versuchsaufbau .....	19
4.1.1	Die Kollagen-Scaffolds .....	19
4.1.2	Das Elektrostimulationssystem.....	20
4.1.3	Das Mikrobewegungssystem.....	22
4.1.4	Rauheitsmessung der Ti6Al4V-Zylinder .....	25
4.1.5	Numerische Simulation der elektrischen Feldverteilung .....	25
4.1.6	Validierung der Mikrobewegungen .....	27
4.2	Zellkulturarbeiten.....	28
4.2.1	Isolierung und Kryokonservierung primärer humaner Osteoblasten .....	28
4.2.2	Auftauen und Aussaat der humanen Osteoblasten .....	30
4.3	Hauptversuch: Etablierung eines In-vitro-Systems zur biophysikalischen Stimulation humaner Osteoblasten .....	31
4.3.1	Allgemeiner Versuchsablauf.....	31
4.3.2	Versuchsdurchführung der biophysikalischen Stimulation .....	34
4.4	Zellbiologische Untersuchungen .....	35
4.4.1	Viabilitätsbestimmung .....	36
4.4.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	36
4.4.2.1	RNA-Isolierung .....	37
4.4.2.2	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	37
4.4.2.3	Quantitative-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR).....	37
4.4.3	Analyse der Synthese und Aktivität osteogener Marker.....	38
4.4.3.1	Quantifizierung der Prokollagen-Typ-I-Synthese .....	38
4.4.3.2	Gesamtproteinbestimmung.....	39
4.4.3.3	Quantifizierung der ALP-Aktivität.....	39
4.5	Statistische und graphische Auswertung.....	40
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
5.1	Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen nach Applikation der Elektrostimulation.....	42
5.2	Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen nach Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern und Applikation der Elektrostimulation .....	45
5.3	Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen nach Applikation von Mikrobewegungen und Elektrostimulation .....	49
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
6.1	Versuchsaufbau .....	56
6.2	Einfluss der Elektrostimulation auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau .....	57

6.3	Einfluss der Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern und der Elektrostimulation auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau.....	61
6.4	Einfluss von Mikrobewegungen und Elektrostimulation auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau .....	63
6.5	Limitationen und Aussichten.....	67
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>89</b>
10.1	Verbrauchsgegenstände .....	89
10.2	Geräte .....	91
10.3	Reagenzien und Lösungen .....	92
10.4	Kits und Assays.....	93
10.5	Primer .....	94
10.6	Medien und Zusätze.....	94
10.7	Software.....	95
10.8	Reinigungsprotokolle.....	95
	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>97</b>
	<b>Promotionserklärung .....</b>	<b>99</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>101</b>
	<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>103</b>
	<b>Thesen der Dissertation.....</b>	<b>105</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
<i>ALP</i>	Alkalische-Phosphatase-Gen
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
Col1	Prokollagen Typ I
<i>COL1A1</i>	Prokollagen-Typ-I-Gen
CT	<i>threshold cycle</i>
CICP	Typ I C-terminale Kollagenpropeptid ( <i>Type I C-terminal collagen propeptide</i> )
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate ( <i>deoxyribose nucleoside triphosphate</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ES	Elektrostimulation
FKS	fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FORBIOMIT	Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
LVDT	<i>Linear Variable Differential Transformer</i>
MM	Mikrobewegungen ( <i>micromotion</i> )
MMP1	Matrix-Metalloproteinase-1
<i>MMP1</i>	Matrix-Metalloproteinase-1-Gen
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NO	Stickstoffmonoxid ( <i>nitric oxide</i> )
OC	Osteocalcin
<i>OC</i>	Osteocalcin-Gen
OPG	Osteoprotegerin
<i>OPG</i>	Osteoprotegerin-Gen
<i>OSX</i>	Osterix-Gen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pNpp	p-Nitrophenylphosphat

qRT-PCR	Quantitative-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion ( <i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i> )
RANK	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand</i>
<i>RANKL</i>	<i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B Ligand-Gen</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SaOS-2	<i>Sarcoma osteogenic</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIMP1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1</i>
<i>TIMP1</i>	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1-Gen</i>
<i>TIMPs</i>	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
WST-1	<i>water-soluble-tetrazolium Assay</i>

## 1 Einleitung

In der 26. Ausgabe der *World Population Prospects* [1] veröffentlichten die Vereinten Nationen die Bevölkerungsschätzungen von 1950 bis 2100 für 235 Länder oder Gebiete. Untermauert durch die Analyse historischer und demografischer Trends der letzten Jahre wird angenommen, dass sich die Anzahl der Menschen mit einem Lebensalter von über 65 Jahren zwischen 2019 und 2050 weltweit voraussichtlich verdoppeln wird, sodass bis 2050 jede vierte Person in Europa und Nordamerika 65 Jahre oder älter sein könnte. Zudem wird geschätzt, dass sich bis 2050 die Anzahl der Menschen über 80 Jahren global verdreifachen und auf ca. 426 Millionen ansteigen wird. Im Jahr 2100 wird sogar von mehr als 881 Millionen Menschen mit einer Lebenserwartung von über 80 Jahren ausgegangen. Mit dieser deutlichen Zunahme der älteren Bevölkerung steigt auch die Nachfrage nach regenerativen Therapien im Gesundheitswesen. Dies gilt insbesondere für medizinische Implantate, die für eine Vielzahl von Indikationen wie Hüpf- und Knieendoprothesen sowie als Zahnersatz genutzt werden. Im Jahr 2018 antizipierten Pilz *et al.* [2] in ihrer Studie, dass die Anzahl an Implantationen primärer Hüftendoprothesen in Deutschland zwischen 2010 und 2040 um 27 % steigen wird, wobei die Projektionszahlen bei Patienten im Alter von 60 bis 70 Jahren am höchsten waren. Zudem hat sich die Prävalenz von Zahnimplantaten in den USA von 0,7 % in den Jahren 1999 bis 2000 auf 5,7 % in den Jahren 2015 bis 2016 erhöht und wird im Jahr 2026 voraussichtlich auf 17 % steigen, sollte sich der Trend fortsetzen [3].

Entscheidend für eine schnelle Funktionalität, zuverlässige Langzeitstabilität sowie lange Überlebensdauer der Implantate ist dabei ein Prozess, der als Osseointegration bezeichnet wird [4]. Im Wesentlichen beschreibt dieser die Entwicklung einer direkten strukturellen und funktionellen Verbindung zwischen geordnetem, lebendem Knochen und der Oberfläche des Implantats, ohne erkennbare Intervention von Weichgewebe zwischen dem Knochengewebe und der Implantatoberfläche [5, 6]. Ausschlaggebend für diesen knöchernen Einheilungsprozess sind vor allem die Anzahl und Aktivität der ortsständigen osteogenen Zellen, die Beschaffenheit des Wirtsknochens und sein intrinsisches Heilungspotential sowie das Ausmaß der Vaskularisation des periimplantären Gewebes [4, 7]. Die Erhöhung der Lebenserwartung führt dazu, dass eine zunehmende Anzahl von Patienten, die orthopädische Implantate benötigen, von altersbedingtem, systemischem oder medikamentösem Knochenschwund sowie multiplen Komorbiditäten und verminderter Gewebsvaskularisierung betroffen sind [8, 9]. Dies wiederum führt zu einem erhöhten Risiko für aseptische Lockerung und Implantatversagen in der Endoprothetik und folglich einer Zunahme an Revisionsoperationen [7]. Während Faktoren wie optimales Implantatdesign [10], eine adäquate mechanische Belastung und der adjuvante Einsatz biophysikalischer Stimulationen einen positiven Einfluss auf die Osseointegration haben können, können erhöhte

Implantatmobilität und übermäßige Mikro- beziehungsweise Relativbewegungen diese hemmen [4, 11315].

Im Rahmen des DFG-Sonderforschungsbereiches 1270 *Elektrisch aktive Implantate (ELAINE)* wird untersucht, wie Implantatdesign sowie elektrische beziehungsweise mechanische Stimulation die Regeneration von Knochen und Knorpel fördern und das Risiko eines Implantatversagens verringern können. Der Einsatz neuartiger, elektrisch aktiver Implantate könnte somit die Anzahl an Revisionsoperationen minimieren [10]. Während der Einfluss von Implantatoberfläche und -material bereits in einer Vielzahl von Studien [16320] analysiert worden ist, gibt es bisher kaum Arbeiten, die sich mit dem Einfluss der biophysikalischen Stimulation auf die Osseointegration von Implantaten auseinandergesetzt haben. Mit einem besseren Verständnis der ablaufenden Prozesse an der Knochen-Implantat-Grenze und einer optimierten Applikation zusätzlicher Stimulationsverfahren könnten neue Systeme entwickelt werden, die helfen die Osseointegration beziehungsweise Standzeit von orthopädischen Implantaten und damit auch Lebensqualität von Patienten zu verbessern.

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Grundlagen der Knochen-Morphologie

Der Knochen bildet zusammen mit dem Knorpel die beiden Gewebekomponenten des Skeletts. Dabei stellt Ersterer ein äußerst dynamisches Gewebe dar, das sich durch eine hohe Druck- und Biegebelastbarkeit sowie charakteristische Härte auszeichnet [21]. Auf makroskopischer Ebene wird zwischen Spongiosa und Kompakta unterschieden. Die Spongiosa bildet ein Gitterwerk aus dünnen Platten und Bälkchen im Inneren des Knochens. Hingegen stellt die Kompakta die homogen erscheinende Rinde eines Knochens dar, die auch als Kortikalis bezeichnet wird [22].

Das Knochengewebe besteht, bezogen auf das Gewicht, zu ca. 60 % aus anorganischen Mineralien, zu ca. 10 % aus Wasser und zu ca. 30 % aus organischen Bestandteilen [23]. Das anorganische Knochenmaterial setzt sich dabei hauptsächlich aus Hydroxylapatit-Kristallen zusammen, die vorwiegend aus Calcium-, Phosphat- und Hydroxid-Ionen bestehen [22]. Aber auch Magnesium, Natrium, Kalium, Chlor, Fluor und weitere Spurenelemente werden im Knochen gespeichert [24]. Die Hauptkomponenten der organischen Substanz hingegen stellen Fibrillen der Kollagene Typ I, III, V und XI dar, die das Knochenmaterial organisieren und dem Knochen eine elastische Festigkeit verleihen [21]. Die Verbindung von zugfesten Kollagenfibrillen mit druckfesten Hydroxylapatit-Kristallen sowie kleineren Mengen von Proteoglykanen, verschiedenen Glykoproteinen und weiteren anorganischen Ionen bildet schließlich die mineralisierte Knochenmatrix, die dem Knochen seine charakteristische Biegefestigkeit verleiht [22].

Auf mikroskopischer Ebene hingegen kann zwischen Geflecht- und Lamellenknochen unterschieden werden. Im unreifen Knochengewebe, das sich zum Beispiel anfänglich nach einer Fraktur bildet, werden die kollagenen Fasern in scheinbar zufälliger Anordnung eingebaut. Durch die anschließende Mineralisation entsteht daraufhin ein Maschenwerk von Knochenbälkchen, das als Geflechtknochen bezeichnet wird [22, 24]. Der Lamellenknochen hingegen entspricht dem reifen Knochengewebe, in dem die mineralisierte Knochenmatrix in histologisch erkennbaren Schichten den sogenannten Lamellen angeordnet ist. Dabei werden sowohl Spongiosa als auch Kompakta aus Lamellenknochen gebildet [22].

Wenngleich Knochenzellen nur etwa 2 % zur Knochenmasse beisteuern, sind sie dennoch die Hauptakteure für den gesamten Knochenaufbau und -umbau [24]. Die Knochenbildung, die auch als Osteogenese bezeichnet wird, geht dabei von Osteoblasten aus. Diese spezielle Form von Fibroblasten, die sich über Osteoprogenitor-Zellen aus mesenchymalen Stammzellen entwickeln, bildet die organische Knochenmatrix und veranlasst deren

Mineralisation [21, 22]. Hierzu reihen sich die Zellen perlschnurartig an den Knochenoberflächen auf und bilden dort die nichtmineralisierte Interzellulärsubstanz, das Osteoid, die anschließend durch die schrittweise Einlagerung von Hydroxylapatit-Kristallen und weiteren anorganischen Substanzen mineralisiert wird [24]. Neben den Osteoblasten als sogenannte ‚Knochenbildner‘ wird das Knochengewebe von Osteoklasten und Osteozyten unterhalten. Erstere sind mehrkernige Riesenzellen, die durch die Fusion einkerniger Vorläuferzellen der Makrophagenreihe entstehen. Die Differenzierung der Osteoklasten wird hierbei vor allem durch Interaktionen zwischen Osteoklasten-Vorläuferzellen und Osteoblasten reguliert [22]. Osteoklasten liegen der mineralisierten Knochenmatrix direkt an und sind für deren Abbau verantwortlich. Osteozyten hingegen entstehen aus Osteoblasten, die von nachfolgenden Osteoblastengenerationen in kleine Höhlen, den sogenannten Lakunen, inmitten der mineralisierten Knochenmatrix eingemauert werden [24]. Sie sind durch zahlreiche Fortsätze mit anderen Osteozyten und Osteoblasten verbunden [25]. Diese Zellfortsätze liegen in einem komplexen Netzwerk zahlreicher Knochenkanälchen, den Kanalikuli, das die gesamte mineralisierte Knochenmatrix durchzieht und als lakuno-kanalikuläres System bezeichnet wird [26]. Die Lakunen und Kanalikuli werden dabei jedoch nicht vollständig von den Zellen ausgefüllt. Stattdessen verbleibt um jede Zelle und jeden Fortsatz eine schmale Zone, die interstitielle Flüssigkeit sowie geringe Mengen organischer nichtmineralisierter Matrix enthält und als perilakunäre beziehungsweise perikanalikuläre Matrix bezeichnet wird (siehe Abb. 2-1) [22, 26].

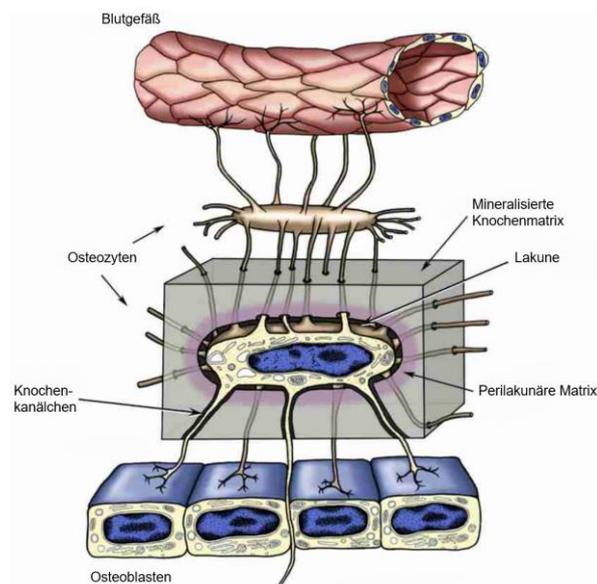


Abb. 2-1: Schematische Darstellung eines eingebetteten Osteozyten im lakuno-kanalikulären System. Die dendritischen Fortsätze des Osteozyten sind mit anderen Osteozyten und Osteoblasten verbunden. Zudem besteht Kontakt zu den Blutgefäßen. Die Zusammensetzung der unmittelbar an die Osteozyten angrenzenden perilakunären Matrix (lila Schattierung) unterscheidet sich von jener der übrigen Knochenmatrix (graue Schattierung), was bei mechanischer Beanspruchung des Knochens das Ausmaß der von den Osteozyten wahrgenommenen mechanischen Signale beeinflussen kann. Modifiziert von Dallas *et al.* [26] unter Einholung der Genehmigung.

Die Aufgaben der Osteozyten sind neben der interzellulären Kommunikation auch die Aufrechterhaltung der Mineralstoff-Homöostase und die Mechanotransduktion, das heißt die Umwandlung mechanischer Beanspruchung des Knochens in biochemische Vorgänge [24, 27]. Aber auch Osteoblasten sind zur Mechanotransduktion fähig [28, 29].

## 2.2 Marker des Knochenstoffwechsels

### 2.2.1 Osteogenese

Der Prozess der Osteogenese beruht auf der Bereitstellung von Vorläuferzellen, die zu reifen Osteoblasten differenzieren [24]. Dabei durchlaufen die Zellen drei Reifungsstadien der Differenzierung, die als Proliferation, Matrixentwicklung und -reifung sowie Mineralisation bezeichnet werden [30]. Nach der Zellproliferation lagern die Osteoblasten das Osteoid als organische Interzellulärsubstanz ab, die im Rahmen der sogenannten Mineralisation beziehungsweise Kalzifizierung mineralisiert wird [24, 31]. Das Osteoid besteht dabei zu 90 bis 95 % aus Kollagen Typ I [24]. Während der Biosynthese des Kollagens im rauen endoplasmatischen Retikulum wird zunächst das Prokollagen gebildet. Die Prokollagen-Tripelhelix des Kollagens Typ I wird dabei aus zwei Pro- $\alpha$ 1- sowie einer Pro- $\alpha$ 2-Kette gebildet und besitzt sowohl am N-Terminus als auch C-Terminus ein Registerpeptid, das Propeptid [21]. Die Propeptide dienen der Zusammenlagerung der  $\alpha$ -Ketten zu Tripelhelices und werden nach Sekretion in den extrazellulären Raum durch Peptidasen abgespalten [32]. Sie werden daher während der Knochenformation in äquimolaren Mengen gebildet und lassen gute Rückschlüsse auf osteoanabole Vorgänge der Kollagenmatrix und einen erhöhten Knochenstoffwechsel zu [33]. Die Expression von Kollagen Typ I, alpha 1 mRNA (*COL1A1*), das für die Pro- $\alpha$ 1-Kette des Prokollagens codiert, ist dabei bereits in jungen Osteoblasten nachweisbar und steigt mit zunehmender Differenzierung der Zellen [34].

Während der anschließenden Mineralisation kommt es zur Einlagerung kristallinen Hydroxylapatits in die organische Knochenmatrix [24]. Einen entscheidenden Marker für diesen Vorgang stellt dabei die alkalische Phosphatase (ALP) dar. Das Enzym ist durch einen Lipidanker an der Außenseite der Plasmamembran der Osteoblasten befestigt und wird in den frühen Phasen der Kalzifizierung exprimiert und synthetisiert [35]. Es wird davon ausgegangen, dass ALP die Mineralisation durch die Bereitstellung hoher lokaler Konzentrationen anorganischen Phosphats fördert, indem es organische Phosphate spaltet [36]. Zudem wird durch ALP Pyrophosphat gespalten, das die Mineralisation des Knochens ansonsten hemmen würde [37].

Einen weiteren bedeutsamen Marker der Knochenbildung stellt das Osteocalcin (OC) dar. Dieses Protein wird ebenfalls von Osteoblasten gebildet und größtenteils in die extrazelluläre

Knochenmatrix eingebaut, wo es Calcium-Ionen bindet [24, 38]. Dabei scheint die Genexpression von Osteocalcin während der Differenzierung von Osteoblasten streng reguliert zu sein [38]. So wird OC-mRNA in den frühen Stadien der osteogenen Differenzierung kaum exprimiert, ist jedoch ein zuverlässiger Marker für reife Osteoblasten [39341]. Dabei steigt die Transkription von OC-mRNA mit vorschreitender Mineralisation der extrazellulären Knochenmatrix deutlich an und kennzeichnet damit die späten Phasen der Knochenbildung [38, 42].

### 2.2.2 Bone Remodeling

Zu Lebzeiten unterliegt der Knochen einem kontinuierlichen Ab- und Aufbau [43]. Hierbei 'fressen' Osteoklasten Gruben, sogenannte Howship-Lakunen, in den Knochen, die anschließend in monatelanger Arbeit von den Osteoblasten wieder aufgefüllt werden [22]. Dabei werden jährlich ungefähr 25 % der Spongiosa und 2,5 % der Kompakta umgebaut [44]. Auch wird während dieses Vorgangs der unreife Geflechtknochen in biomechanisch hochwertigeren Lamellenknochen umgewandelt. Der ständige Umbau dient der Vorbeugung von Materialermüdung, Reparatur von Mikroschäden sowie Anpassung der Knochenmenge bei Veränderung der mechanischen Beanspruchung [22, 24, 44]. Osteoklasten und Osteoblasten sind dabei als eine Art 'Bautrupp' organisiert, der den Ab- und Aufbau zeitlich und räumlich koordiniert [22]. Dieses sogenannte *Bone Remodeling* unterliegt einer strengen Kontrolle sowohl durch hormonal systemische als auch lokale Signal- und Botenstoffe [24]. Ein unerlässliches System bildet hierbei der RANK/RANKL/OPG-Signalweg. Osteoblasten stimulieren die Osteoklastenbildung über das in ihrer Plasmamembran verankerte Protein *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand* (RANKL). Dieses bindet an den *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B* (RANK), der auf Vorläuferzellen der Osteoklasten präsentiert wird [21]. Die Aktivierung von RANK durch RANKL führt daraufhin zur Fusion der monozytären Vorläuferzellen zu mehrkernigen Riesenzellen und zur terminalen Differenzierung zu aktiven Osteoklasten [22, 27]. Ein natürlicher Antagonist von RANKL ist das Osteoprotegerin (OPG), das ebenfalls von Osteoblasten gebildet werden kann [43]. Dieses frei lösliche Protein konkurriert mit dem RANK um die Bindung von RANKL, vermag aber keine Signaltransduktion auszulösen [21]. Somit schützt OPG den Knochen vor einem erhöhten Knochenabbau durch Osteoklasten [22]. Die relative Konzentration von RANKL und OPG stellt daher einen guten Indikator für die allgemeine Knochenmasse und -stärke dar [27]. Bei einer Hochregulation von *RANKL*-mRNA ist die Genexpression von *OPG* in der Regel deutlich herunterreguliert und andersherum [45]. So wird bei einem erhöhten *RANKL/OPG*-Quotienten die Knochenresorption durch eine Steigerung der Anzahl und Aktivität funktionsfähiger Osteoklasten gefördert, während sie bei einem negativen Quotienten gehemmt wird [27, 43].

Des Weiteren wird der Knochenumbau von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) und ihren Inhibitoren, den *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMPs), beeinflusst. Matrix-Metalloproteinasen bilden eine Familie von  $Zn^{2+}$ -abhängigen Endopeptidasen, die Komponenten der extrazellulären Matrix verdauen [46]. So werden beispielsweise verschiedene Kollagenasen zur Familie der MMPs gezählt [21]. Während die Kollagenasen in vielen Geweben mesenchymalen Ursprungs gefunden werden, wird die Kollagenase-1 primär im sich entwickelnden Knochengewebe exprimiert und synthetisiert [47]. Sie wird dabei durch das Gen *MMP1* codiert und initiiert unter anderem die Spaltung der interstitiellen Kollagene Typ I, II und III [46, 47]. Da eine unkontrollierte Reaktion dieser Enzyme jedoch leicht zu einer Gewebeerstörung führen würde, wird die Aktivität der MMPs durch verschiedene Proteine reguliert [21]. Dabei gibt es vier als TIMP1 bis 4 bezeichnete Inhibitoren der MMPs, die die MMP-Aktivität hemmen, indem sie an ihre aktiven Formen binden [46, 48]. TIMP1 bindet und inaktiviert hierbei die meisten MMPs [46]. Normalerweise herrscht im Knochen ein fein reguliertes Gleichgewicht zwischen den MMPs und TIMPs. Ist dieses jedoch gestört, resultiert daraus ein erhöhter beziehungsweise erniedrigter Abbau der extrazellulären Knochenmatrix [21]. So wird angenommen, dass eine Überexpression von MMPs mit einem pathologischen Knochenverlust verbunden ist, während transgene Mäuse, die *TIMP1*-mRNA in Osteoblasten überexprimieren, eine verringerte Knochenresorption und erhöhte Knochendichte aufweisen [46, 49]. *MMP1* und *TIMP1* können daher als Markergene für pathologische Veränderungen, vor allem der Knochenhomöostase, dienen [47].

### 2.3 Osseointegration und Implantatversagen

Durch biomedizinische Fortschritte werden bei orthopädischen, dentalen und traumatologischen Operationen immer häufiger Fremdmaterialien (Implantate) verwendet. Während temporäre Implantate vor allem der vorübergehenden Stabilisierung von Knochenfragmenten oder Skelettabschnitten in der Traumatologie dienen, sollen Langzeitimplantate destruierte Gelenke oder Knochenabschnitte dauerhaft ersetzen, weshalb diese erheblichen Anforderungen an die mechanische Festigkeit und Biokompatibilität standhalten müssen [50]. Der Indikationsbereich von Langzeitimplantaten ist dabei vielseitig und reicht von künstlichem Gelenkersatz bei arthrotisch oder traumatisch zerstörten Gelenken bis zum Zahnersatz durch dentale Implantate. So führt die Implantation künstlicher Hüftgelenke, beispielsweise bei Patienten mit Koxarthrose, durch eine Schmerzreduktion und eine Verbesserung der Mobilität sowie Funktionalität im Hüftgelenk zu einer höheren gesundheitsbezogenen Lebensqualität [51, 52]. Der Einsatz dentaler Implantate geht nicht nur mit einer kaufunktionellen Rehabilitation nach Zahnverlust einher, sondern auch mit einer erheblichen ästhetischen Verbesserung [53]. Durch eine Erhöhung der Lebenserwartung und

den steigenden medizinischen Fortschritt erhöht sich der Bedarf an Implantaten, die einen Funktionserhalt des Bewegungsapparates bis ins hohe Lebensalter gewährleisten sollen.

Entscheidend für die Einheilung der Implantate in den Knochen ist dabei der Prozess der Osseointegration, der erstmals von Brånemark [5] beschrieben wurde. Dieser beschrieb die Osseointegration als „eine direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen geordnetem, lebendem Knochen und der Oberfläche eines tragenden Implantats“ [5]. Im Wesentlichen spiegelt die Osseointegration einen Verankerungsmechanismus wider, durch den nicht lebende Komponenten zuverlässig in lebende Knochen eingebaut werden können [4]. Hierbei kommt es zu einem histologisch sichtbaren Zusammenwachsen mit Letzterem, sodass beide Komponenten nur schwer wieder voneinander getrennt werden können.

Die periimplantäre Knocheneinheilung beinhaltet dabei eine Kaskade zellulärer und extrazellulärer Ereignisse, die an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat stattfinden [8]. Diese wird durch Wachstums- und Differenzierungsfaktoren reguliert, die von aktivierten Blutzellen an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat freigesetzt werden [54]. Das erste Gewebe, das unmittelbar nach der Implantation mit der enossalen Implantatoberfläche in Kontakt kommt, ist Blut [4, 7, 55]. Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten wandern an die Implantatgrenzfläche. Dort werden sie aktiviert und setzen Zytokine sowie andere lösliche Wachstums- und Differenzierungsfaktoren frei [4, 54, 56]. Erste Wechselwirkungen der Blutzellen mit dem Implantat führen zu einer Gerinnelbildung im Sinne der Hämostase. Die gebildete Fibrinmatrix fungiert als Gerüst für die Migration von Osteoprogenitorzellen und mesenchymalen Stammzellen, die im Anschluss zu Osteoblasten differenzieren [4]. Die osteogenen Zellen scheinen dabei bereits am ersten Tag nach der Implantation an die Implantatoberfläche zu wandern und sich dort anzuhafte, woraufhin knochenspezifische Proteine abgelagert werden und auf der Implantatoberfläche eine kollagene Matrixschicht entsteht, die die Zelladhäsion und Bindung von Mineralien reguliert [7, 55, 57]. Hierbei kann zwischen Distanz- und Kontaktosteogenese unterschieden werden. Erstere beschreibt die Bildung neuer Knochentrabekel, die sich von der Wirtsknochenhöhle zur Implantatoberfläche entwickeln. Die Kontaktosteogenese hingegen bezieht sich auf den neu gebildeten periimplantären Knochen, der sich vom Implantat zum heilenden Knochen entwickelt [4]. Das so gebildete Geflecht aus Knochentrabekeln sorgt für eine biologische Fixierung des Implantats und umgibt Markräume mit einer Vielzahl mesenchymaler Zellen und breiter Blutgefäße [7, 54, 58]. Diese sogenannte biologische Sekundärstabilisierung beginnt ca. 10 bis 14 Tage nach der Implantation [55, 59, 60]. Sie ist von der Primärstabilisierung zu unterscheiden, die die initiale mechanische Fixierung des Implantats im Knochen direkt nach der Implantation beschreibt [61]. Im weiteren Verlauf wird der entstandene Geflechtknochen schrittweise umgestaltet und durch Lamellenknochen ersetzt. Ungefähr drei Monate nach der Implantation ist histologisch eine gemischte Knochentextur aus Geflecht- und

Lamellenknochen um das Implantat sichtbar. Nach sechs Monaten findet sich periimplantär fast ausschließlich Lamellenknochen, womit die Osseointegration als abgeschlossen betrachtet wird [62].

Dieser knöchernen Einheilungsprozess kann dabei durch verschiedenste exogene und endogene Faktoren beeinflusst werden. Zu den Letzteren zählen vor allem Anzahl und Aktivität ortsständiger Zellen, das intrinsische Heilungspotential sowie die Beschaffenheit des Wirtsknochens und das Ausmaß der periimplantären Vaskularisation [7].

So kann eine verminderte Anzahl und Aktivität von Osteoblasten 3 oder eine Kombination aus beiden 3 beziehungsweise eine erhöhte osteoklastische Aktivität ein Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen lokalen Faktoren der Knochenbildung sowie des Umbaus und eine verminderte Durchblutung des periimplantären Knochengewebes eine erfolgreiche Implantation verhindern [4, 7, 8]. Auf der anderen Seite können exogene, implantatbezogene Faktoren wie Implantatdesign und chemische Zusammensetzung, Topographie und Beschichtung der Implantatoberfläche sowie die Implantatbelastung und nicht implantatbezogene Faktoren wie der Einsatz adjuvanter Therapien einen wesentlichen Einfluss auf die Osseointegration haben [7]. Zu letztgenannten Therapien zählen dabei vor allem Knochentransplantationen, medikamentöse Behandlungen mit beispielsweise Simvastatin oder Bisphosphonaten sowie biophysikalische Stimulationen [4, 63]. Vor allem bei einem zunehmend älter werdenden Patientenkollektiv finden sich vermehrt ungünstige endogene Voraussetzungen für eine erfolgreiche Osseointegration. So konnten Moy *et al.* [64] zeigen, dass ein erhöhtes Alter eng mit der Rate nichteinheilender dentaler Implantate verknüpft ist. Altern verändert außerdem die Zellproliferations- und Zellsyntheseaktivität sowie Reaktivität der Zellen gegenüber lokalen Faktoren [8]. Auch werden die Angiogenese des Gewebes [9] und die Osteoporoseprävalenz [65] durch das Alter beeinflusst. So findet sich vor allem bei älteren Menschen mit Osteoporose und einer verminderten periimplantären Vaskularisation ein erhöhtes Risiko für aseptische Lockerung und Implantatversagen [8].

Auf der anderen Seite verbessert sich mit fortschreitender Technologie und einem besseren Verständnis der zellulären und molekularen Vorgänge an der Knochen-Implantat-Grenze die Möglichkeit, exogene Einflussfaktoren zu optimieren. So wurden bereits verschiedene Materialien, Formen, Längen, Durchmesser, Oberflächenbehandlungen und Beschichtungen vorgeschlagen, um die Standzeit von Implantaten zu verbessern [4, 66]. Die Biokompatibilität des Materials ist dabei von großer Bedeutung und ein Prädiktor für die Osseointegration [67, 69]. Titan oder Titanlegierungen werden häufig als orthopädisches Implantatmaterial verwendet [68, 70]. Zu ihren Vorteilen zählen eine hohe Biokompatibilität [69], eine erhöhte Korrosionsbeständigkeit [70] und eine fehlende Zytotoxizität für Osteo- und Fibroblasten [71]. Zudem begünstigen raue Oberflächen die Osseointegration durch vermehrte Blutplättchen- und Monozytenadhäsion, eine Verbesserung der direkten Osteoblastenanhaftung und

anschließenden Proliferation und Differenzierung sowie die Vergrößerung der Implantatoberfläche in Kontakt mit dem Wirtsknochen, was die Primärstabilität begünstigt [4]. So konnten Franchi *et. al* [55] in ihrer Arbeit zeigen, dass bei glatten Implantatoberflächen eher die Distanzosteogenese von Bedeutung ist, während bei rauen sowohl Distanz- als auch Kontaktosteogenese eine Osseointegration fördern. Aber auch eine suffiziente Primärstabilität des Implantats, vor allem in den frühen Phasen der Gewebeheilung, ist eng mit einer erfolgreichen Implantatintegration und einem nachhaltigen klinischen Ergebnis verbunden [72]. Diese wird vor allem von Knochenqualität und -quantität, Implantatgeometrie und angewandter Operationstechnik beeinflusst [61]. So ermöglicht beispielsweise Kortikalis eine höhere mechanische Verankerung des Implantats als Spongiosa [73]. Eine unzureichende Implantatstabilität hingegen führt zu ausgeprägten Mikrobewegungen, die die Bildung einer Bindegewebsmembran um das Implantat fördern und eine Verschiebung der Grenzflächen zwischen Knochen und Implantat verursachen, wodurch die Osseointegration gehemmt und das Implantat aseptisch gelockert wird [4, 7]. Das Ausmaß der Mikrobewegungen scheint dabei einen großen Einfluss auf die Implantateinheilung und Bildung einer erfolgreichen Sekundärstabilität zu haben [12, 15, 74, 75].

## 2.4 Biophysikalische Stimulation von Knochen

Im Jahr 1892 veröffentlichte Julius Wolff in seiner Arbeit *Das Gesetz der Transformation der Knochen* [76] einen Grundsatz, der sich mit der Anpassung von Knochengewebe auf mechanische Belastung auseinandersetzt. Es wird postuliert, dass sich Knochengewebe unter Belastung aufbaut und an Festigkeit gewinnt, wohingegen es sich bei wenig oder keiner Beanspruchung abbaut. Diese Gesetzmäßigkeit wurde mittlerweile in einer Vielzahl von weiteren Arbeiten bestätigt. So konnte in mehreren In-vivo- und In-vitro-Studien nachgewiesen werden, dass mechanische Belastung den Knochenabbau hemmt und einen stimulierenden Einfluss auf den Knochenaufbau hat [74, 77, 383]. Klinisch zeigt sich dieser Grundsatz beispielsweise in verstärkten Unterarmknochen bei Tennisspielern [84]. Auf der anderen Seite findet bei hospitalisierten Patienten mit langen Liegezeiten [85] sowie während eines Aufenthalts in Schwerelosigkeit [86] ein sukzessiver Knochenabbau aufgrund der fehlenden Belastung des Gewebes statt. Wolff konnte in seiner Arbeit an menschlichen Femurköpfen nachweisen, dass sich Knochengewebe in seiner Form und Festigkeit an die Funktion anpasst und bei dauerhafter Entlastung degeneriert [76].

Eine wesentliche Rolle bei diesem Anpassungsprozess spielt dabei die zelluläre Mechanotransduktion. Sie beschreibt die Umwandlung von physikalischen Signalen in zelluläre und molekulare Prozesse [87]. Entsprechend Duncan *et. al.* [77] kann der Prozess der Mechanotransduktion im Knochen in vier verschiedene Schritte unterteilt werden:

(1) mechanische Einkopplung, (2) biochemische Einkopplung, (3) Signalübertragung und (4) Reaktion der Effektorzellen. Während der mechanischen Einkopplung verursachen mechanische Belastungen Deformationen im Knochen, die osteogene Zellen in der Knochenmatrix dehnen sowie verformen und Flüssigkeitsströme beziehungsweise Scherkräfte in Flüssigkeiten des lakuno-kanalikulären Systems des Knochens verursachen [77]. Bei der biochemischen Einkopplung erfolgt die Umwandlung solcher mechanischen Signale auf Zellebene in intrazelluläre biochemische Reaktionen. Dabei werden verschiedene Mechanismen zur Kopplung eines externen mechanischen Signals in ein intrazelluläres biochemisches Signal beschrieben. Hierzu gehören unter anderem die Kraftübertragung von der mineralisierten Knochenmatrix zum Zytoskelett und zur Kernmatrix durch Integrine, die Aktivierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle innerhalb der Zellmembran [88], G-Protein-abhängige Wege in der Zellmembran und die Verknüpfung zwischen dem Zytoskelett und der Phospholipase C beziehungsweise Phospholipase A [87]. Bei der Signalübertragung leiten Osteoblasten und Osteozyten als Sensoren für mechanische Signale diese an die Effektorzellen (Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten) weiter. Die Übertragung erfolgt hierbei am wahrscheinlichsten über Gap junctions und parakrine Signalmoleküle, die zudem Osteoprogenitorzellen mobilisieren und zur Differenzierung anregen [77]. Am Ende steht die Reaktion der Effektorzellen, die den erforderlichen Umbau herbeiführen. Der Umfang des Letzteren hängt dabei vom Ausmaß der mechanischen Belastung und somit der Größe, Dauer und Geschwindigkeit des Stimulus ab [24]. Hierbei hat sich gezeigt, dass eine statische Verformung des Knochengewebes keine erhöhte Osteogenese verursacht, während zyklische Belastungen zu einer signifikanten Zunahme der Knochenbildung führen können [24, 77, 88, 89]. Daher ist die dynamische Belastung, die mit extrazellulären Flüssigkeitsströmen und der Erzeugung von Strömungspotentialen im Knochen verbunden ist, wahrscheinlich am effektivsten, um eine Knochenneubildung zu stimulieren [77]. Dabei wurde eine Latenz von bis zu fünf Tagen zwischen der mechanischen Belastung in vivo und dem sichtbaren Beginn des Knochenaufbaus verzeichnet. Diese ist durch die Verzögerung zwischen dem anfänglichen Aufbau neuen Knochens und der Bildung vollständig mineralisierter Knochen trabekeln gerechtfertigt [88]. Auch spiegelt sie vermutlich die Zeit wider, die für die Übermittlung des mechanischen Signals an Osteoprogenitorzellen im Knochenmark oder Periost und die Proliferation beziehungsweise Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in aktive Osteoblasten erforderlich ist [77].

Abgesehen von mechanischen Reizen können auch weitere physikalische Signale den Knochenmetabolismus beeinflussen. So konnte bereits in mehreren Versuchen ein positiver Einfluss elektrischer und elektromagnetischer Felder auf den Knochenstoffwechsel gezeigt werden [90393]. Mitte des 20. Jahrhunderts entdeckten Forscher, dass mechanische Belastungen elektrische Potentialunterschiede entlang der Seiten- und Längsachse von

Knochen erzeugen [88]. Dabei wurden vor allem zwei Mechanismen für die Erklärung belastungsabhängiger bioelektrischer Potentiale im Knochen herangezogen: Strömungspotentiale und piezoelektrische Effekte. Mechanische Belastungen des Knochens erzeugen innerhalb des lakuno-kanalikulären Systems einen Druckgradienten, der interstitielle Flüssigkeit durch das Kanalsystem strömen lässt [94]. Die Oberfläche des Knochens ist negativ geladen, sodass Kationen in der interstitiellen Flüssigkeit, die durch die Kanäle gedrückt werden, von ihr angezogen werden [77]. Dadurch wird ein Ionenungleichgewicht mit einem Überschuss an Anionen in der Flüssigkeit erzeugt, was wiederum eine elektrische Spannung hervorruft [77, 95], die in der Größenordnung von einigen 100  $\mu\text{V}$  liegt [94]. Es wird angenommen, dass durch diese Strömungspotentiale biochemische Reaktionen in den osteogenen Zellen ausgelöst werden können, einschließlich der Aktivierung spannungsaktiver Ionenkanäle in der Zellmembran, und diese daher mitverantwortlich für die Mechanotransduktion im Knochen sind [88].

Als zweiter Mechanismus werden piezoelektrische Effekte diskutiert. Diese beschreiben das Auftreten einer elektrischen Spannung in bestimmten Feststoffen bei Verformung. Im Jahr 1880 entdeckten Paul-Jacques und Pierre Curie [96], dass bei gewissen Kristallen durch Druck oder Dehnung in bestimmte Richtungen positive und negative elektrische Ladungen auftreten. Ihre Versuche zeigen zudem, dass sich bei der Vertauschung von Kompression und Dilatation das Vorzeichen der Ladungen ändert [97]. Inzwischen konnte dieser direkte piezoelektrische Effekt in einer Vielzahl von Materialien nachgewiesen werden. In einem piezoelektrischen Material verändern mechanische Belastungen den Abstand zwischen dem Zentrum positiver und jene negativen Ladungen, wodurch elektrische Dipolmomente erzeugt oder vorhandene Dipolmomente geändert werden. In beiden Fällen werden Polarisationsladungen auf der Oberfläche des Materials induziert [98]. Umgekehrt können elektrische Felder beziehungsweise Ladungen piezoelektrische Materialien verformen, was als inverser piezoelektrischer Effekt bezeichnet wird [97]. In den 1950er-Jahren wurden piezoelektrische Effekte von Fukada und Yasuda [99] erstmals in Knochengewebe beschrieben. In einer weiteren Arbeit von Marino *et al.* [100] wurde der Effekt an menschlichen Knochen gemessen und jene Messungen an entkalktem Knochen und einer anorganischen Knochenmatrix wiederholt. Die Resultate wiesen darauf hin, dass vermutlich der gesamte, im intakten Knochen gefundene piezoelektrische Effekt oder zumindest ein Teil davon durch die organische Komponente hervorgerufen wird. Mittlerweile konnte jener Effekt von Knochengewebe und vor allem Kollagen Typ I in mehreren Studien bestätigt werden [1013 106].

Mit zunehmenden Erkenntnissen über die Einflüsse physikalischer Reize auf zelluläre Mechanismen steigt das Interesse, diese therapeutisch zu nutzen. Verfahren zur Applikation elektrischer, mechanischer oder magnetischer Reize an einem biologischen System werden

als biophysikalische Stimulationen bezeichnet. Biophysikalische Stimulationstechniken können dabei in der klinischen Medizin entweder allein eingesetzt werden, um die Reparatur und anabole Aktivität im Gewebe zu erhöhen und zu fördern, oder in Verbindung mit operativen und medikamentösen Behandlungen, um deren Wirksamkeit zu verbessern und Nebenwirkungen zu verringern. Zudem hat die biophysikalische Stimulation den Vorteil, dass sie lokal und nebenwirkungsarm verabreicht werden kann [90]. Innerhalb der letzten Jahre haben sich dabei mehrere Systeme etabliert, die unterschiedliche biophysikalische Reize für die Stimulation von Knochengeweben nutzen. Zu den bekanntesten gehören dabei Stimulationssysteme, die mechanische Energie applizieren, sowie Elektrostimulationssysteme, die die Zellen mittels elektrischer und elektromagnetischer Felder beeinflussen.

#### **2.4.1 Einfluss von Elektrostimulation auf Osteoblasten und Knochengewebe**

Basierend auf der Entdeckung von belastungsinduzierten bioelektrischen Potentialen im Knochen wurde angenommen, dass die Aktivität der Osteoblasten durch elektrische Felder beeinflusst werden kann [88, 1073109]. Zudem konnten in weiteren Studien belastungsunabhängige bioelektrische Potentiale, vor allem während des Knochenumbaus [110, 111] und der Frakturheilung [112, 113], beobachtet werden. Dies weckte erneut das Interesse an der Elektrostimulation als regenerationsunterstützendes Verfahren [42, 114]. Seither wurden zahlreiche Applikationssysteme zur elektrischen und elektromagnetischen Stimulation von Knochenzellen etabliert, die versuchen, die intrinsischen bioelektrischen Potentiale nachzuahmen, zu modifizieren und therapeutisch zu nutzen [115].

Zu den geläufigsten Systemen gehören dabei die Stimulation mittels direkt eingekoppelter elektrischer Spannung mit Gleich- oder Wechselstrom (direkte Elektrostimulation), die Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern (kapazitive Elektrostimulation) und die Stimulation mit induktiv eingekoppelten elektro-magnetischen Feldern (induktive Elektrostimulation) [91, 108, 115]. Eine schematische Darstellung der genannten Applikationsformen ist in Abb. 2-2 veranschaulicht.

Bei der direkten Elektrostimulation werden zwei oder mehr Elektroden direkt in den Knochen beziehungsweise das umliegende Weichgewebe implantiert und über eine subkutane oder extrakorporale Spannungsquelle versorgt. Dies ermöglicht eine gezielte Applikation elektrischer Spannungen in nahezu jeder Größe und zudem eine Therapie, die von der Compliance des Patienten nahezu unabhängig ist. Nachteilig sind hingegen die Invasivität der Elektrodenplatzierung sowie ein erhöhtes Risiko für Weichteilreaktionen und Infektionen [91]. In vitro wird die direkte Einkopplung durch Elektroden im Medium erreicht, das als Leiter dient. Dies birgt allerdings den Nachteil einer Wechselwirkung des Elektrodenmaterials mit der

Zellkulturumgebung. Die möglichen resultierenden elektrochemischen Reaktionen wie pH-Änderungen und die Bildung von Wasserstoffperoxid oder reaktiven Sauerstoffspezies können dabei einen schädigenden Einfluss auf die Zellen haben [116, 117].

Die kapazitive Einkopplung elektrischer Wechselfelder funktioniert über die Anlage zweier Elektroden auf gegenüberliegenden Hautarealen. Durch die Anlage einer Spannungsquelle baut sich ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden auf [91]. In vitro erfolgt die Stimulation über gegenüberliegende Elektroden außerhalb der Zellkultur. Dies verhindert Probleme der Materialkompatibilität und die Entstehung elektrochemischer Reaktionen durch die Elektroden. Nachteilig sind jedoch starke Spannungsabfälle des elektrischen Feldes durch isolierende Dielektrika wie verschiedene Gewebe bei In-vivo-Versuchen oder die Polystyrol-Wand des Wells bei In-vitro-Experimenten, was die Effektivität und Steuerbarkeit der Stimulation beeinträchtigen kann.

Bei der induktiven Elektrostimulation wird eine elektromagnetische stromführende Induktionsspule über dem zu stimulierenden Bereich extern platziert. Durch die Anlage von Wechselstrom entsteht ein magnetisches Feld, das im Gewebe beziehungsweise Zellkulturmedium ein elektrisches Feld induziert. Auch hier variiert das Feld stark in Abhängigkeit vom umliegenden Gewebe beziehungsweise den Bestandteilen der Zellkultur [91].

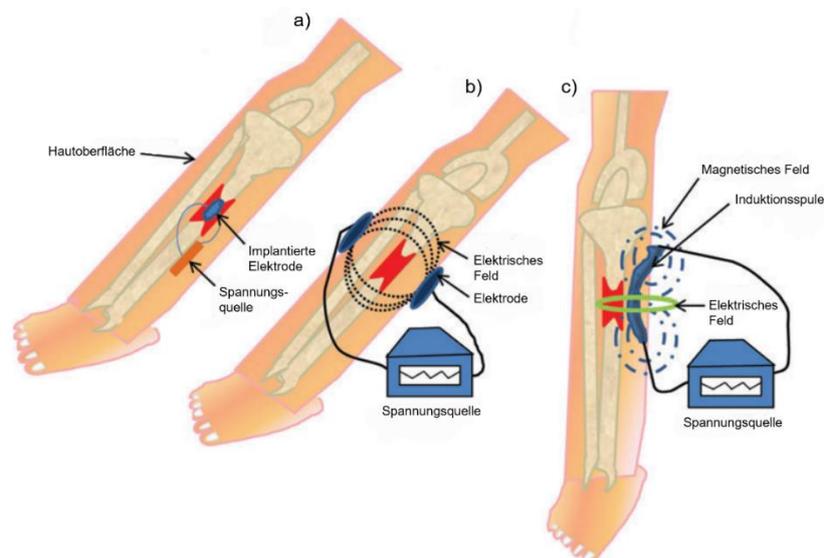


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Applikationssysteme zur elektrischen und elektromagnetischen Stimulation von Knochenzellen: **a) Direkte Elektrostimulation:** Implantierte Elektroden werden direkt in den Knochen beziehungsweise das umliegende Weichgewebe implantiert und entweder an eine subkutane oder an eine externe Spannungsquelle angeschlossen, um im Defektbereich ein elektrisches Feld zu erzeugen. **b) Kapazitive Elektrostimulation:** Zwei kapazitiv gekoppelte Elektroden befinden sich auf beiden Seiten des zu stimulierenden Bereiches auf der Haut. An den Elektroden wird eine externe Spannungsquelle angebracht, die im Defektbereich ein elektrisches Feld aufbaut. **c) Induktive Elektrostimulation:** Eine elektromagnetische stromführende Induktionsspule, die an eine externe Stromquelle angeschlossen ist, wird auf der Haut über dem zu stimulierenden Bereich platziert. Die Spule erzeugt ein Magnetfeld, das im Defektbereich ein elektrisches Feld induziert. Modifiziert von Griffin *et al.* [91] unter Einholung der Genehmigung.

Als Mechanismus, mit dem die Elektrostimulation in den Knochenstoffwechsel eingreift, wird postuliert, dass durch membrangebundene Ionenkanäle und Rezeptoren sowie intrazelluläre Signalkaskaden die Produktion von Wachstumsfaktoren und die Genexpression der Knochenzellen modelliert wird [114]. Dies wiederum beeinflusst die Differenzierung und Proliferation der osteogenen Zellen. So wurde gezeigt, dass die direkte Elektrostimulation vorrangig durch elektrochemische Reaktionen an der Kathode wirkt, während kapazitive und induktive Elektrostimulation primär durch eine Veränderung von Wachstumsfaktoren und Genexpression auf die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten eingreifen [91].

#### **2.4.2 Einfluss von Mikrobewegungen auf Osteoblasten und Knochengewebe**

Wie in Kapitel 2.3 beschrieben, treten in Abhängigkeit von der Primärstabilität des Implantates Mikrobewegungen an der Knochen-Implantat-Grenze auf. Diese scheinen einen wesentlichen Einfluss auf die Osseointegration von Implantaten zu haben. Je nach verwendetem Implantat und Beschaffenheit des Wirtsknochen ist dabei ein unterschiedliches Ausmaß an Mikrobewegungen möglich. Amirouche *et al.* [118] berechneten in einem 3D-Model den Einfluss des femoralen Offsets auf jene Bewegungen, die an der Knochen-Implantat-Grenze während eines normalen Gangzyklus entstehen. Dabei zeigten sich bei allen fünf ermittelten femoralen Offsets die größten durchschnittlichen Mikrobewegungen entlang der lateralen Seitenfläche des Verankerungsschaftes in einem Bereich von 58,8 bis 68,7  $\mu\text{m}$ . Ähnliche Ergebnisse fanden sich in Ex-vivo-Studien, welche dreidimensionale Messsysteme verwendeten, um die Mikrobewegungen an der Knochen-Implantat-Grenze von unzementierten Hüftendoprothesen in Spender-Oberschenkelknochen zu untersuchen. So zeigten sich in einer Studie von Bühler *et al.* [119] bei Belastung der getesteten Endoprothesen mit dem dreifachen Körpergewicht durchschnittliche Mikrobewegungen von weniger als 100  $\mu\text{m}$ . Østbyhaug *et al.* [120] hingegen untersuchten die Mikrobewegungen von zwei unzementierten Ti6Al4V-Hüftendoprothesen unterschiedlicher Längen an drei definierten Messpunkten. Dabei zeigten sich Werte zwischen 12 und 152  $\mu\text{m}$  beim simulierten Ein-Bein-Stand sowie zwischen 14 und 182  $\mu\text{m}$  bei der Simulation von Treppensteigen in Abhängigkeit vom jeweiligen Messpunkt und der Prothesenlänge. Je distaler der Messpunkt und je länger die Prothese war, desto größer waren die Mikrobewegungen. Karl *et al.* [121] ermittelten die Mikrobewegungen von Zahnimplantaten in Knochenersatzmaterialien unterschiedlicher Dichte mittels Resonanzfrequenzanalyse. Dabei zeigte sich eine maximale Implantatverschiebung von 7,34 bis 71,88  $\mu\text{m}$  in Abhängigkeit von der jeweiligen Dichte der Knochenersatzmaterialien. So scheint die maximale Implantatbeweglichkeit wesentlich von der Knochendichte abhängig zu sein und bei steigender Dichte abzunehmen.

Zudem zeigte sich in mehreren In-vivo-Studien [10, 12315, 122], dass Grenzflächenmikrobewegungen unter 30  $\mu\text{m}$  mit einer stabilen Einheilung des Implantates vereinbar sind, während Mikrobewegungen von über 100  $\mu\text{m}$  zur vermehrten Bildung einer fibrösen Membran um das Implantat führen können, was mit einer aseptischen Lockerung und Implantatversagen assoziiert wird. So implantierten Bragdon *et al.* [15] porös beschichtete Implantate in den distalen Femurschaft von ausgewachsenen Hunde, die für jeweils 8 h pro Tag Mikrobewegungen von 20, 40 und 150  $\mu\text{m}$  ausgesetzt waren. Nach sechs Wochen erfolgte die Tötung der Tiere und die histologische Untersuchung des periimplantären Gewebes. Hier zeigte sich ein suffizientes Einwachsen von Knochengewebe in der 20- $\mu\text{m}$ -Gruppe, während in der 40- $\mu\text{m}$ - und 150- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungsgruppe eine Mischung aus fibrösem Binde- und Knochengewebe gefunden wurde. Des Weiteren untersuchten sie die Torsionssteifigkeit der verschiedenen Versuchsgruppen. Hier zeigte sich nach sechs Wochen eine Zunahme der Steifigkeit in der 20- $\mu\text{m}$ -Gruppe, während diese in der 40- $\mu\text{m}$ - und 150- $\mu\text{m}$ -Stimulationsgruppe deutlich abnahm. Übereinstimmende Ergebnisse fanden sich in einer Studie von Jasty *et al.* [14], in der porös-beschichtete Implantate in die distale femorale Metaphyse von Hunden implantiert wurden. Die Stimulation erfolgte mit Mikrobewegungen von 20, 40, 60 und 150  $\mu\text{m}$  für ebenfalls 8 h pro Tag in einen Zeitraum von sechs Wochen. Zudem wurde eine Kontrollgruppe ohne Mikrobewegungen mitgeführt und untersucht. In der anschließenden histologischen Untersuchung zeigte sich eine kontinuierliche Verbindung zwischen Knochen und Implantat in den Versuchsgruppen, die keiner oder einer Stimulation mit 20- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen ausgesetzt waren. Währenddessen fand sich in den Gruppen, die mit Mikrobewegungen von 40  $\mu\text{m}$  oder mehr stimuliert wurden, eine Zunahme von unmineralisiertem fibrösem Gewebe. Søballe *et al.* [12] untersuchten den Einfluss von 500- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen auf die Osseointegration von Titan-Implantaten sowie von Hydroxylapatit-beschichteten Implantaten in ausgewachsenen Labradoren. Nach vier Wochen fand sich auch hier eine fibröse Membran um das Implantat, wohingegen Implantate in der Kontrollgruppe ohne Mikrobewegungen eine stabile Einheilung zeigten.

Während der Einfluss von Mikrobewegungen bereits in einer Vielzahl von In-vivo-Studien [123 15, 78, 122, 123] untersucht worden ist, gibt es bisher nur wenige In-vitro-Studien, die sich mit den Auswirkungen von Mikrobewegungen auf zellulärer und molekularer Ebene auseinandersetzen. So untersuchten Pioletti *et al.* [124] den Einfluss von sinusförmigen Mikrobewegungen auf osteoblastenähnliche MG-63 Zellen, die mit Mikrobewegungen von 10  $\mu\text{m}$  stimuliert wurden. Dabei zeigte die Stimulation keinen Einfluss auf die Zellviabilität, während die Genexpression von *COL1A1* und *Osteonectin* signifikant erniedrigt war. Ziebart *et al.* [74] untersuchten den Einfluss von Mikrobewegungen im Bereich von 25 bis 100  $\mu\text{m}$  auf die Aktivität humaner Osteoblasten. Dabei konnten sie einen signifikanten Anstieg der metabolischen Aktivität sowie der Expression von *OC* nach einer Stimulation mit 25- $\mu\text{m}$ -

Mikrobewegungen nachweisen, während die Stimulation mit Mikrobewegungen von 100  $\mu\text{m}$  keinen signifikanten Unterschied zur beladenen Kontrolle zeigte. Bezüglich der Steuerung des Umbaus von Knochengewebe durch mechanische Belastungen konnte durch verschiedene Studien ein zunehmendes Verständnis für den Einfluss von Mikrobewegungen und anderen mechanischen Stimulationsverfahren auf Knochengewebe gewonnen werden. Dennoch gibt es bisher wenige Erkenntnisse darüber, welchen Einfluss die Mikrobewegungen in Grenzflächen auf die Knochenzellen und somit die zellulären und molekularen Prozesse der Osseointegration von Implantaten haben.

### 3 Zielstellung

Ein zunehmend älter werdendes Patientenkontingent und eine vermehrte Nachfrage an osseösen Implantaten stellen die behandelnden Ärzte und Zahnärzte vor immer größeren Herausforderungen. Das Alter stellt dabei einen Hauptrisikofaktor für aseptische Lockerung und Implantatversagen dar. Auf der anderen Seite bietet der adjuvante Einsatz elektrischer und mechanischer Stimulationsverfahren die Möglichkeit, das intrinsische Heilungspotential des Knochens und somit die Funktionalität, Langzeitstabilität und Überlebensdauer von Implantaten zu verbessern. Dennoch sind die genauen zellulären und molekularen Mechanismen, mit denen biophysikalische Stimulationen auf den Knochenstoffwechsel eingreifen, bisher weitgehend ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, ein In-vitro-System zu etablieren, das es ermöglicht, elektrische und mechanische Stimulationsverfahren sowohl separat als auch kombiniert zu applizieren. Zudem sollte das System die komplexen zellulären und physikalischen Abläufe an der Knochen-Implantat-Grenze eines beladenen Implantates nachstellen und den Nutzen einer zusätzlichen Elektrostimulation mittels kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder evaluieren. Es sollte somit nicht nur nahegelegt werden, wie die einzelnen Stimuli auf den Knochenstoffwechsel eingreifen, sondern auch, wie sie miteinander interagieren. Folglich wurde eine Stimulationskammer entwickelt, die die zeitgleiche Applikation von kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern und harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen erlaubt. Zudem wurde die Kammer durch numerische Simulation und Validierungsmessungen evaluiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der jeweiligen Stimulationsverfahren in Zellversuchen. Hierzu wurden primäre humane Osteoblasten auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und mit kapazitiv eingekoppelten Wechselfeldern und harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen unterschiedlicher Parameterkonfigurationen 3 beziehungsweise einer Kombination aus beiden 3 stimuliert. Der Einfluss der jeweiligen Stimuli auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie auf den Knochenumbau wurde anschließend mittels zellbiologischer Untersuchungen analysiert. Das System soll helfen die komplexen biophysikalischen Mechanismen, mit denen Mikrobewegungen und Elektrostimulation auf den Knochenstoffwechsel eingreifen, weiter zu entschlüsseln. Mit einem besseren Verständnis der verschiedenen Stimulationsvorgänge auf zellulärer und molekularer Ebene soll eine Optimierung der Knochenregeneration und Implantat-Osseointegration erzielt werden. Das langfristige Ziel ist die Entwicklung einer biophysikalisch gesteuerten Strategie für den Entwurf osseöser Implantate, die eine kontrollierte und schnelle periimplantäre Knochenheilung ermöglichen.

## 4 Materialien und Methoden

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind in Anhang 10 aufgelistet. Sämtliche Arbeitsabläufe der Zellkulturarbeit wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Inkubation, Kultivierung und Stimulation der Zellkulturen erfolgten in einem Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO<sub>2</sub>-Begasung von 5 %.

### 4.1 Versuchsaufbau

Zur Applikation kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder und harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen auf primäre humane Osteoblasten, sowohl einzeln als auch in Kombination, musste ein entsprechendes Stimulationssystem entwickelt werden. Hierfür wurde das von Ziebart *et al.* [74] beschriebene Mikrobewegungssystem um ein kapazitives Elektrostimulationssystem erweitert. Zudem wurden angeraute statt glattflächige Titankörper für die Stimulation mit dem Mikrobewegungssystem verwenden. Die Kultivierung der Osteoblasten erfolgte in dreidimensionalen Kollagen-Scaffolds.

#### 4.1.1 Die Kollagen-Scaffolds

Zur Herstellung der Kollagen-Scaffolds wurde die Biomatrix MatriDerm<sup>®</sup>, Fa. MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Billerbeck, Deutschland, verwendet. Diese offenporige Kollagen-Elastin-Matrix wird vor allem in der Plastischen Chirurgie als azellulärer Dermisersatz eingesetzt und besteht aus natürlichem Rinderkollagen der Typen I, II und V als Faservorlage, das mit  $\alpha$ -Elastin-Hydrolysat ummantelt ist [125]. Jene Ummantelung fördert dabei sowohl die Migration als auch Proliferation von Zellen und stellt damit ein geeignetes Gerüst zur Kultivierung von Osteoblasten dar [126, 127]. Die Herstellung der Kollagen-Scaffolds erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank. Zunächst wurde das 1 mm hohe MatriDerm<sup>®</sup>-Kollagenvlies mit einer sterilen Schere in bearbeitungsfähige Quadrate zerschnitten. Diese wurden in eine sterile Glaspetrischale gelegt und mittels einer Stanze mit 16 mm Durchmesser bearbeitet, die zuvor für 20 min in Ethanol eingelegt worden war. Die so entstandenen 16 mm Durchmesser und 1 mm hohen MatriDerm<sup>®</sup>-Kollagen-Scaffolds wurden anschließend mithilfe einer sterilen Pinzette und biokompatiblen Silikonpaste, Fa. Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, Deutschland, auf dem Boden einer Petrischale aus Polystyrol mit 35 mm Durchmesser, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, befestigt. Durch die Silikonpaste sollte ein Anhaften der Scaffolds an den angerauten Titankörpern des

Mikrobewegungssystems verhindert werden. Es wurden jeweils zwei Scaffolds nebeneinander in einer Petrischale fixiert (siehe Abb. 4-1).

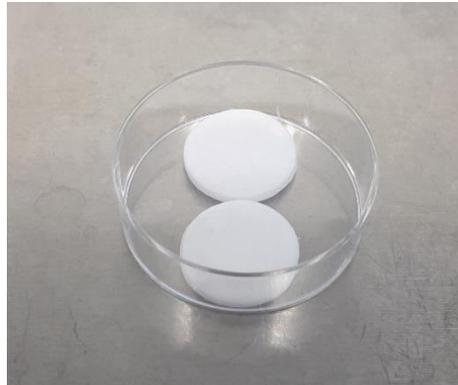


Abb. 4-1: Zwei MatriDerm®-Kollagen-Scaffolds mit 16 mm Durchmesser in einer sterilen Petrischale aus Polystyrol

#### 4.1.2 Das Elektrostimulationssystem

Beim Aufbau des Elektrostimulationssystems wurde an ein von Grunert [128] beschriebenes System angeknüpft. Statt einer direkten Applikation über Elektroden im Medium wurde das System so modifiziert, dass die Zellen mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern versorgt werden konnten. Dazu wurden zwei Elektroden in eine 6-Well-Zellkulturplatte aus Polystyrol, Fa. Falcon, Corning, New York City, New York, USA, eingearbeitet. Hierfür wurde die 6-Well-Platte zunächst mittels Fräse und Pfeilen bearbeitet, um Platz für die Elektroden zu schaffen. Das Material Letzterer bestand aus einer Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung (Ti6Al4V), die sich durch hohe mechanische Belastbarkeit und Korrosionsbeständigkeit auszeichnet [70, 129, 130]. Zur Herstellung der Elektroden wurde eine 0,5 mm dicke, plane Ti6Al4V-Platte per Laserschnittverfahren zugeschnitten und anschließend nach dem Verfahren DOTIZE®, Fa. DOT GmbH, Rostock, Deutschland, anodisiert. Die 27 mm breiten und 15 mm hohen Elektroden wurden an die Form der Wells der Zellkulturplatte angepasst. Jeweils drei davon waren über eine kleine Brücke mit einem Elektrodenstreifen verbunden. Durch die Positionierung von zwei Elektroden an der Außenseite des bearbeiteten Wells (siehe Abb. 4-2) könnte sich ein elektrisches Feld zwischen den Elektroden bilden, ohne dass ein direkter Kontakt zwischen der Titan-Legierung und dem Medium besteht. Somit konnte das von Grunert [128] beschriebene Problem der Materialkompatibilität der Elektroden umgangen und das Eintreten ungewünschter elektrochemischer Reaktionen zwischen den Elektroden und dem Medium verhindert werden. Zudem ermöglichte der Aufbau eine Kopplung mit dem in 4.1.3 beschriebenem Mikrobewegungssystem.



Abb. 4-2: 3D-Darstellung der 6-Well-Zellkulturplatte aus Polystyrol mit eingearbeiteten Ti6Al4V-Elektroden. Im vorderen rechten Well ist zusätzlich eine mit zwei Kollagen-Scaffolds beladene Petrischale dargestellt.

Aufgrund des geringen Abstands zwischen den Wells innerhalb einer Zellkulturplatte war mit diesem Versuchsaufbau nur eine Stimulierung von drei der sechs Wells realisierbar. Um die Kollagen-Scaffolds auf mittlerer Höhe zwischen den Elektroden zu positionieren und ein optimales sterileres Arbeiten zu ermöglichen, wurde eine mit den Scaffolds beladene sterile Petrischale in die Versenkung der Wells eingesetzt (siehe Abb. 4-3).

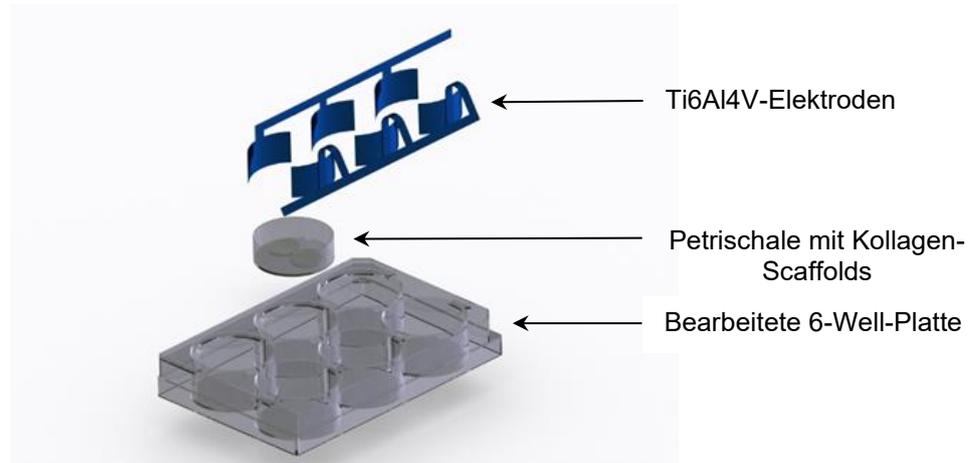


Abb. 4-3: 3D-Darstellung der einzelnen Bestandteile des Elektrostimulationssystems

Über den Funktionsgenerator GX305, Fa. Metrix, Kehl am Rhein, Deutschland, wurde ein sinusförmiger Wechselstrom angelegt. Frequenz und Spannung wurden mittels des Spannungsmessgerätes Digital Multimeter VC-960, Fa. Voltcraft, Wollerau, Deutschland, direkt an den Elektroden gemessen. Beide wurden am Funktionsgenerator so variiert, dass die gewünschte Frequenz und Spannung am Spannungsmessgerät angezeigt wurden. Durch diesen Aufbau konnte sichergestellt werden, dass alle drei Wells gleichzeitig mit den gleichen

Parametern versorgt werden. Eine vereinfachte Darstellung des Schaltkreises ist in Abb. 4-4 visualisiert.

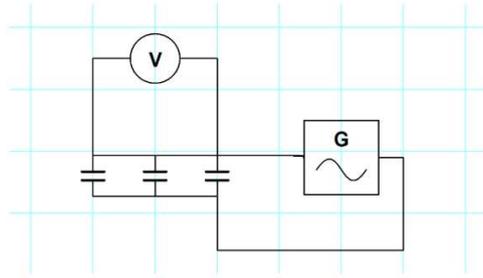


Abb. 4-4: Darstellung des Schaltkreises des Elektrostimulationssystems

Dielektrika zwischen den beiden Elektroden waren bei diesem Versuchsaufbau eine 4 mm dicke Schicht aus Polystyrol und Zellkulturmedium. Abb. 4-5 veranschaulicht den Verlauf des elektrischen Feldes durch eine mit Zellkulturmedium und Kollagen-Scaffolds beladene Petrischale. Zwischen jeder Versuchsreihe wurden die Elektroden und die bearbeitete 6-Well-Zellkulturplatte mit 70-prozentigem Ethanol gereinigt.

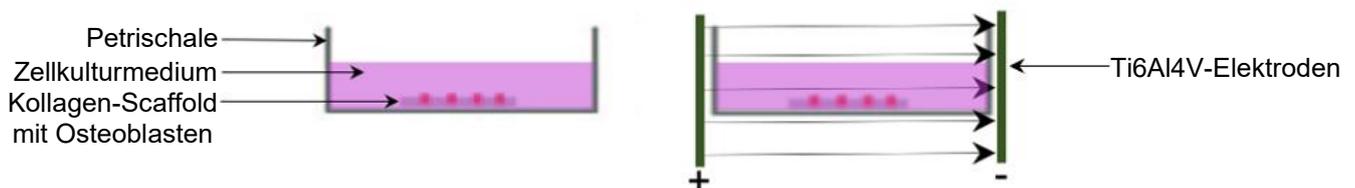


Abb. 4-5: Darstellung der Feldlinien des kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldes durch eine mit Medium und Kollagen-Scaffold beladene Petrischale (Die Darstellung der 6-Well-Platte wurde zur Vereinfachung weggelassen.)

### 4.1.3 Das Mikrobewegungssystem

Zur Umsetzung der Mikrobewegungen wurde ein zweiteiliges Kammersystem aus Grundplatte und Deckel verwendet. Der Boden der Kammer bestand aus einer Metallplatte, an die ein lineares Piezo-Positioniersystem, Fa. Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, mit einem Gestell zur Befestigung einer 6-Well-Zellkulturplatte angebracht wurde. Das Gestell verfügte über drei Stellschrauben zur Fixierung der 6-Well-Platte und wurde so ausgerichtet, dass sich die fixierte Zellkulturplatte genau mittig über der Metallplatte positionierte. An der rechten und linken Seite der Grundplatte befand sich jeweils ein Metallstab, der als Führung für den Deckel fungierte. Diese wurden mit Abstandhaltern aus Polystyrol versehen, um einen Kontakt zwischen den Elektroden des Elektrostimulationssystems und der Metallplatte des Deckels zu vermeiden. Zusätzlich wurden

zwei Halterungen für Messsonden an der linken Seite der Grundplatte befestigt. Diese ermöglichte eine externe Validierung der Genauigkeit des Mikrobewegungssystems (siehe 4.1.6). Der Aufbau der Grundplatte ist in Abb. 4-6 visualisiert.



Abb. 4-6: Grundplatte der Mikrobewegungskammer mit einem Gestell zum Einspannen von 6-Well-Zellkulturplatten, das an einem Piezo-Positioniersystem (unten dargestellt) festgeschraubt wurde

Der Deckel der Kammer bestand aus einer Metallplatte als Dach und durchsichtigen Außenwänden aus Kunststoff, die einen Blick in das Innere der Kammer ermöglichten. In das Dach wurden sechs Löcher gebohrt, durch die über ein Kunststoffgleitlager ein Metallstift in das Innere der Kammer ragte. Die Stifte waren am Ende mit einem Gewinde versehen, an das ein Metallzylinder geschraubt werden konnte. Wie auch die Elektroden wurden die Zylinder aus einer Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung (Ti6Al4V) hergestellt, die vorrangig für die Anfertigung von dentalen und orthopädischen Implantaten genutzt wird [70]. Die Zylinder maßen 30 mm im Durchmesser, 8 mm in der Höhe und besaßen mittig eine 5 mm große Bohrung für das Gewinde. Zudem wurde die Unterseite der Zylinder von Fa. DOT GmbH, Rostock, Deutschland, mithilfe von Korundstrahlen auf einen Mittenrauwert von ca. 3  $\mu\text{m}$  angeraut (Rauheitsmessung siehe Abschnitt 4.1.4). Wird der Deckel auf die Grundplatte der Kammer gesetzt, ruhen die Ti6Al4V-Zylinder mit ihrer angerauten Fläche auf den mit Osteoblasten versehenen Kollagen-Scaffolds. Mithilfe der Führungsstäbe und Stellschrauben der Grundplatte wurde sichergestellt, dass die Titankörper zentral im jeweiligen Well positioniert wurden.

Nach Einschalten des Piezopositioniersystems bewegte sich die daran fixierte 6-Well-Platte mit den mit Osteoblasten versehenen Kollagen-Scaffolds gegen die angeraute Fläche der Ti6Al4V-Zylinder. Der gesamte Kammeraufbau sowie die Bewegung der Petrischale in Korrelation zum Titankörper sind in Abb. 4-7 veranschaulicht.

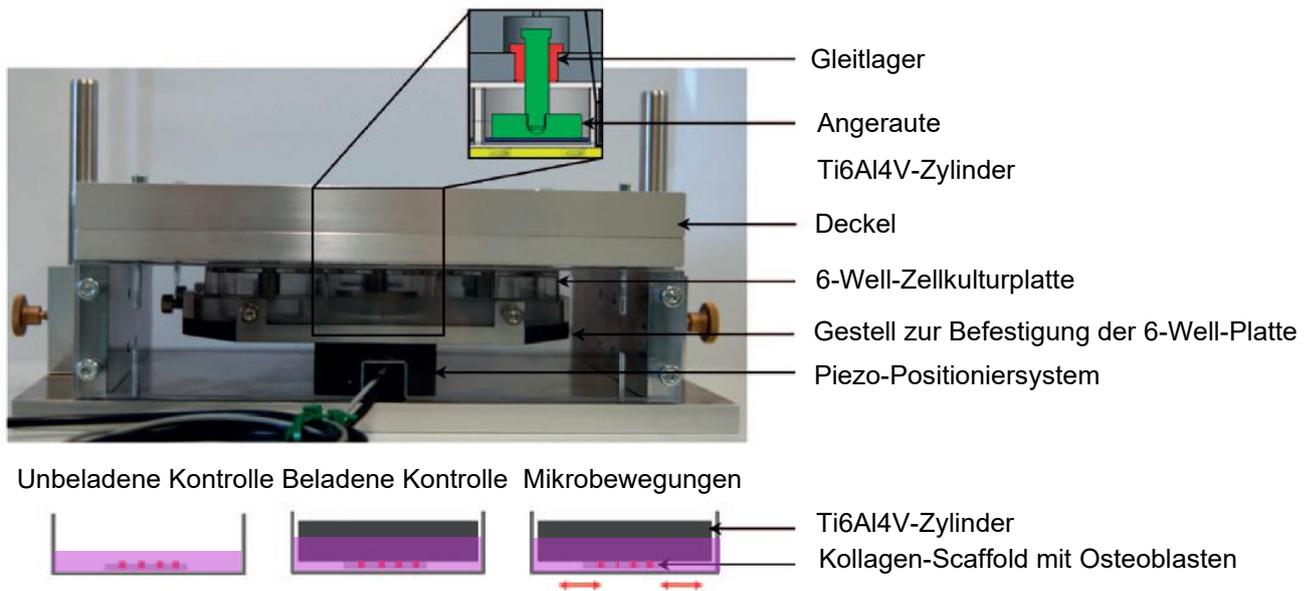


Abb. 4-7: Veranschaulichung der geschlossenen Kammer ohne Elektrostimulationssystem (oben), sowie Beziehung von Petrischale, Ti6Al4V-Zylinder und Kollagen-Scaffold mit Osteoblasten (unten). Die roten Pfeile verdeutlichen die Bewegung der Petrischale in Korrelation zum Titankörper. Modifiziert von Ziebart *et al.* [58] unter Einholung der Genehmigung.

Durch den Einbau des Elektrostimulationssystems in die Mikrobewegungskammer konnte in drei der sechs Wells eine simultane Stimulation aus kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern und harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen realisiert werden. In den anderen Wells erfolgte eine alleinige Stimulation durch harmonisch oszillierende Mikrobewegungen. Der kombinierte Versuchsaufbau aus Elektrostimulations- und Mikrobewegungssystem ist in Abb. 4-8 veranschaulicht.

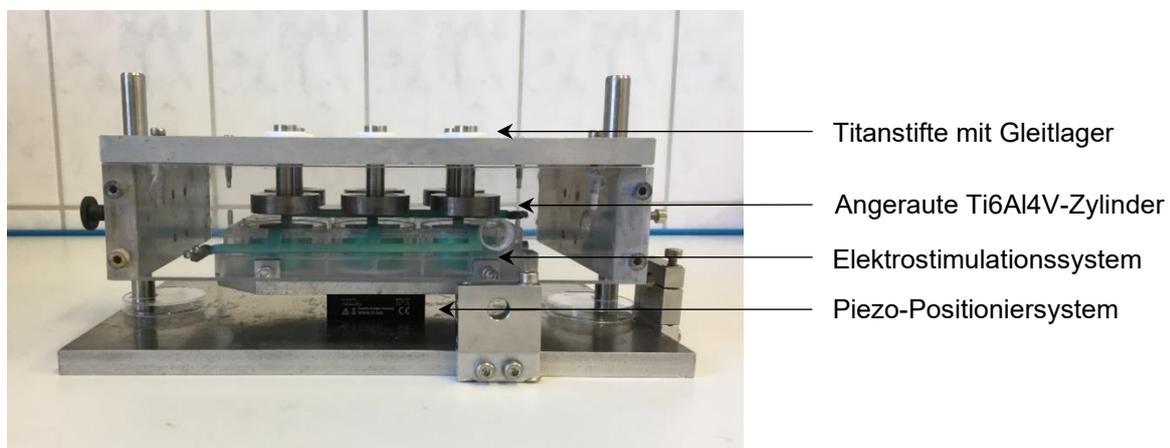


Abb. 4-8: Darstellung des Systems zur kombinierten biophysikalischen Stimulation humaner Osteoblasten. Das Elektrostimulationssystem wurde in die Mikrobewegungskammer eingebaut, um eine simultane Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern und harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen zu ermöglichen.

#### 4.1.4 Rauheitsmessung der Ti6Al4V-Zylinder

Die Rauheitsmessung der Titankörper wurde mithilfe des 3D-Laserscanning-Mikroskops VK-X1000, Fa. KEYENCE, Neu-Isenburg, Deutschland, durchgeführt. Hierbei wurde das Gesamtprofil der Rauheit von einer horizontalen und zwei diagonalen Linien ermittelt. Dabei zeigten die Titankörper einen Mittenrauwert von  $3,06 \mu\text{m}$  (Standardabweichung:  $0,21 \mu\text{m}$ ) sowie eine gemittelte Rautiefe von  $20,93 \mu\text{m}$  (Standardabweichung:  $1,98 \mu\text{m}$ ). Abb. 4-9 zeigt exemplarisch die Darstellung der Messlinien sowie die Messergebnisse der horizontalen Linie eines Ti6Al4V-Zylinders.

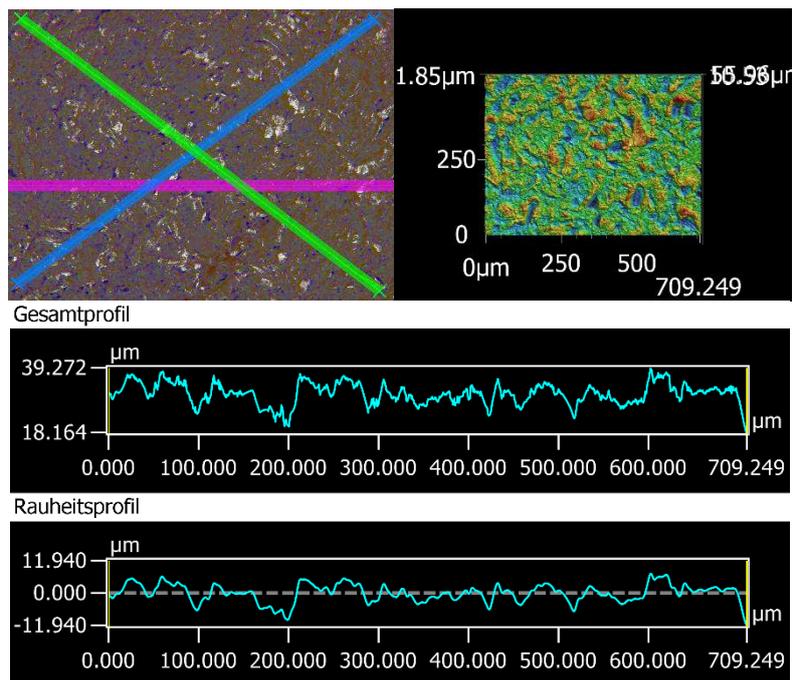


Abb. 4-9: Darstellung des Linienvverlaufs der Messung sowie 3D-Darstellung der Titankörper-Unterseite (oben). Gesamt- und Rauheitsprofil der horizontalen Linie (unten).

#### 4.1.5 Numerische Simulation der elektrischen Feldverteilung

Um die effektive elektrische Feldstärke in einem einzelnen Well abzuschätzen zu können, wurde ein 3D-Modell in COMSOL Multiphysics® (COMSOL AB, Stockholm, Schweden) erstellt. Dieses wurde aus zwei Elektroden, Zellkulturplatte, Petrischale, Zellkulturmedium und Ti6Al4V-Zylinder des Mikrobewegungssystems erstellt. Für die Berechnungen wurde angenommen, dass die Scaffolds die gleichen dielektrischen Eigenschaften wie das Zellkulturmedium haben, weshalb diese im Modell nicht explizit modelliert wurden. Das elektrische Feld wurde unter Verwendung der Schnittstelle 'elektrische Ströme' berechnet. Hierzu wurde die quasistatische Näherung der Maxwell-Gleichungen bei einer festen Frequenz von 60 kHz verwendet. Das elektrische Potential an einer Elektrode wurde auf 0 V eingestellt, während das Potential an der anderen auf 0,141 V beziehungsweise 1,41 V

eingestellt wurde. Dies entspricht einer angelegten Spannung von  $100 \text{ mV}_{\text{eff}}$  beziehungsweise  $1 \text{ V}_{\text{eff}}$ . Das elektrische Feld wurde in 1 mm Höhe über dem Boden der Schale ausgewertet, was in etwa mit dem Ort der Zellstimulierung übereinstimmt.

Die Ergebnisse der Numerischen Simulation sind in Abb. 4-10 veranschaulicht. Bei einer gewählten Eingangsspannung von  $1 \text{ V}_{\text{eff}}$  lag die elektrische Feldstärke zwischen 2,5 und  $3,5 \text{ mV/m}$  (j  $0,03 \text{ mV/cm}$ ) in der Simulation ohne Titankörper. Mit Ti6Al4V-Zylinder hingegen fanden sich nur im Bereich der Elektroden an den Rändern des Zylinders Feldstärken von 1 bis  $3,5 \text{ mV/m}$ . Unterhalb des Ti6Al4V-Zylinders betrug die Feldstärke in der Simulation  $< 0,5 \text{ mV/m}$  (entsprechend  $< 0,005 \text{ mV/cm}$ ). Wurde eine Spannung von  $100 \text{ mV}_{\text{eff}}$  an den Elektroden angelegt, so verkleinerte sich die elektrische Feldstärke um den Faktor 10. Hiermit erreichte das elektrische Feld in der Simulation ohne Ti6Al4V-Zylinder im Durchschnitt  $0,3 \text{ mV/m}$  (j  $0,003 \text{ mV/cm}$ ) mit einem Maximum von  $0,35 \text{ mV/cm}$  im Bereich der Elektroden. Analog zur Eingangsspannung mit  $1 \text{ V}_{\text{eff}}$  konnte dieser Maximalwert in den beladenen Proben nur an den Rändern des Titankörpers erreicht werden. Unterhalb des Zylinders hingegen zeigte sich in der Simulation kein nennenswertes elektrisches Feld.

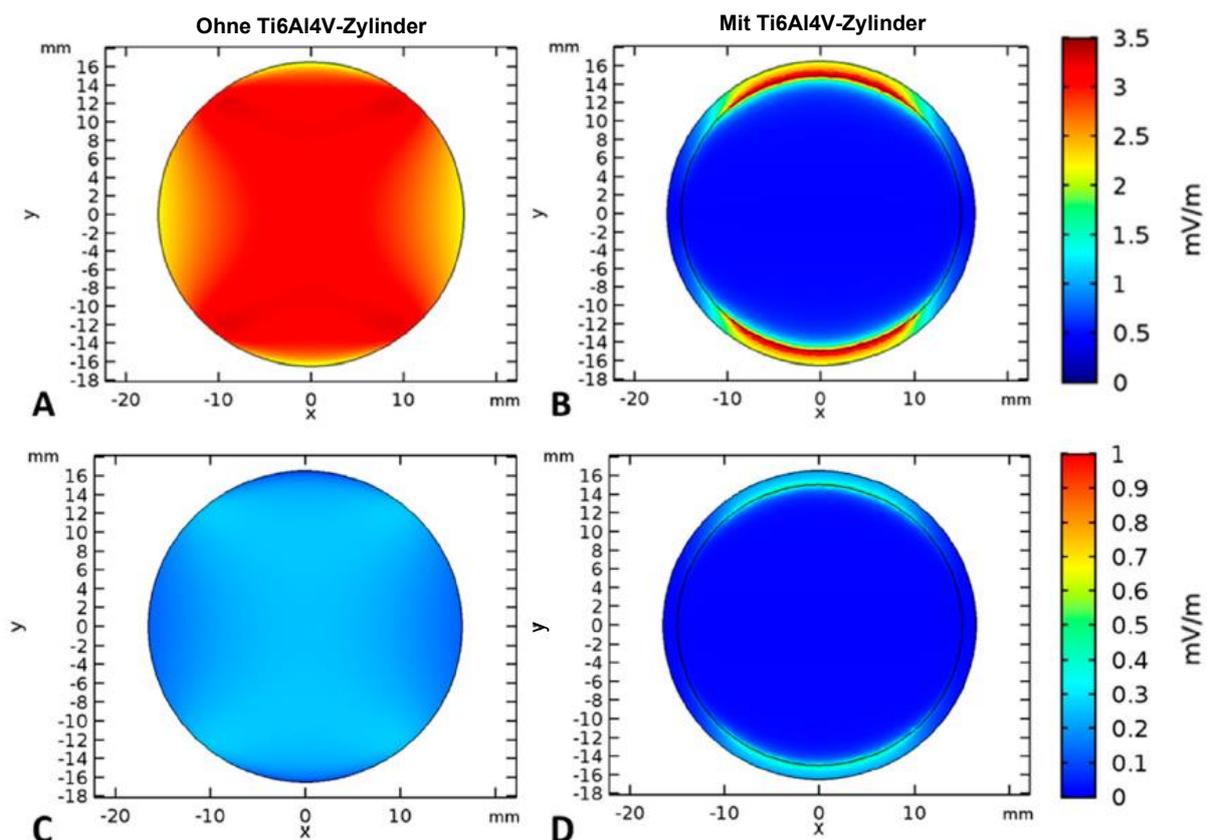


Abb. 4-10: Verteilung des elektrischen Feldes 1 mm über dem Boden der Kammer. Die Abbildungen A und B veranschaulichen die Simulation der elektrischen Feldstärke bei einer Eingangsspannung von  $1 \text{ V}_{\text{eff}}$ , die Abbildungen C und D bei einer Eingangsspannung von  $100 \text{ mV}_{\text{eff}}$ . Während die Abbildungen A und C die Simulation ohne Ti6Al4V-Zylinder zeigen, wurde in den Abbildungen B und D ein Ti6Al4V-Zylinder in die Simulation eingefügt.

#### 4.1.6 Validierung der Mikrobewegungen

Mittels LVDT (Linear Variable Differential Transformer)-Messsonden, Fa. Solartron Metrology, West Sussex, UK, die in die Halterungen der Mikrobewegungskammer eingespannt wurden, erfolgte die externe Validierung des Piezo-Positioniersystems. Der Aufbau der Validierungsmessung ist in Abb. 4-11 veranschaulicht.

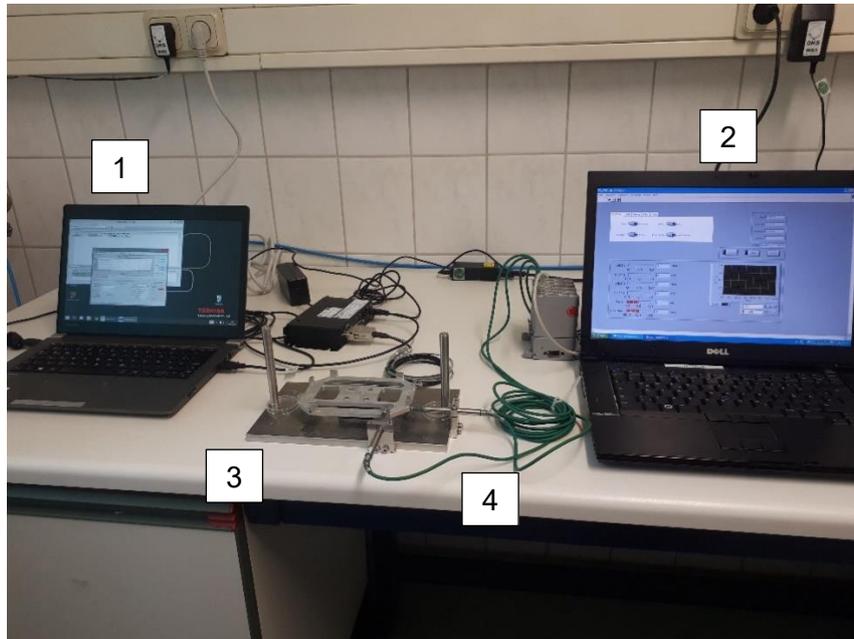


Abb. 4-11: Aufbau der Validierungsmessung: (1) Laptop zur Steuerung des Piezo-Positioniersystems mittels PIMikroMove (2) Laptop zur Positionsmessung mittels LVDT-Sonden (3) Grundplatte des Mikrobewegungssystems (4) Eingespannte LVDT-Messsonden

Die Frequenz der harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen betrug bei allen Versuchsreihen 1 Hz. Die Validierung erfolgte bei eingestellten Spitze-Tal-Werten von 25, 50 und 100  $\mu\text{m}$ . Es wurden sowohl die Abweichungen des Mikrobewegungssystems ohne Medium und Deckplatte als auch des gesamten Systems mit 1,7 ml Medium, Scaffolds und Deckplatte mit Titankörpern ermittelt. Die absoluten und prozentualen Abweichungen der Mikrobewegungsplatte sind in Tab. 4-1 veranschaulicht. Sie beruhen vor allem auf der Trägheit des Systems, die sich durch das zusätzliche Gewicht von Medium und Deckplatte erhöht.

Tab. 4-1: Absolute und prozentuale Abweichungen der Mikrobewegungsplatte

Eingestellter Spitze-Tal-Wert der Mikrobewegungen	25 $\mu\text{m}$		50 $\mu\text{m}$		100 $\mu\text{m}$	
	Absolut	Prozentual	Absolut	Prozentual	Absolut	Prozentual
System ohne Medium und Deckplatte	0,59 $\mu\text{m}$	2,34 %	0,86 $\mu\text{m}$	1,73 %	1,42 $\mu\text{m}$	1,42 %
System mit 1,7 ml Medium und Deckplatte	1,50 $\mu\text{m}$	6,00 %	1,78 $\mu\text{m}$	3,56 %	3,25 $\mu\text{m}$	3,25 %

Hieraus ergaben sich für das System mit Deckplatte und Medium die in Tab. 4-2 dargestellten Werte für die maximale Geschwindigkeit und Beschleunigung der Titankörper.

Tab. 4-2: Maximale Geschwindigkeit und Beschleunigung der Titankörper im System mit 1,7 ml Medium, Scaffolds und Deckplatte in Abhängigkeit vom Spitze-Tal-Wert

Eingestellter Spitze-Tal-Wert der Mikrobewegungen	25 $\mu\text{m}$	50 $\mu\text{m}$	100 $\mu\text{m}$
Maximale Geschwindigkeit	73,8 $\mu\text{m/s}$	151,5 $\mu\text{m/s}$	303,9 $\mu\text{m/s}$
Maximale Beschleunigung	463,9 $\mu\text{m/s}^2$	951,8 $\mu\text{m/s}^2$	1909,8 $\mu\text{m/s}^2$

## 4.2 Zellkulturarbeiten

Für alle Versuche wurden humane Osteoblasten verwendet. Die Isolierung der Zellen erfolgte aus der Spongiosa des Caput femoris, die von Patienten und Patientinnen mit primärem Hüftgelenkersatz an der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock gespendet wurden. Jeder Patient wurde vor der Operation über die Möglichkeit einer Spende aufgeklärt. Die Isolierung und Kultivierung der Osteoblasten wurde nur vollzogen, wenn der Patient seine Einverständniserklärung abgab. Dabei wurde das vom Ethikkomitee der Universität Rostock anerkannte Verfahren (Registriernummer: A2010-10) angewandt. Jedes Hüftkopfpräparat wurde unmittelbar nach der Operation an das Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie (FORBIOMIT) der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Rostock übergeben und dort weiterverarbeitet. Die Spenderzellen entstammten sieben männlichen und acht weiblichen Spendern. Erstere waren im Durchschnitt 59,4 Jahre (Standardabweichung: 14,9 Jahre) alt, während das durchschnittliche Alter der weiblichen Spender mit 72,8 Jahren (Standardabweichung: 10,9 Jahre) darüber lag. Die Auswahl der Spender erfolgte zufällig, das heißt unabhängig von Alter und Geschlecht.

### 4.2.1 Isolierung und Kryokonservierung primärer humaner Osteoblasten

Zur Isolierung der Osteoblasten aus den Präparaten wurde zuerst die Spongiosa mithilfe eines Meißels aus den Femurköpfen gelöst und in eine sterile, mit Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) gefüllte Petrischale überführt. Die Spongiosa wurde so lange mit PBS gereinigt, bis Blut und Fett größtenteils entfernt waren. Anschließend wurde sie mit einer Schere zerkleinert und vollständig vom PBS befreit. Die abgewogene Spongiosa wurde daraufhin in 50-ml-Polypropylen-Röhrchen, Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland, überführt und mit Kollagenase A, Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) und Dispase II im Verhältnis 1:1:2 überschichtet. Der 3-stündige Verdau der Spongiosa erfolgte auf dem Inkubationsschüttler KS 4000 i control, Fa. IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen,

Deutschland, bei 37 °C und 120 Umdrehungen pro Minute (rpm). Nach einem Filtrationsvorgang der verdauten Spongiosa erfolgte eine Zentrifugation bei 900 rpm für 8 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellsediment in 2 ml serumfreiem DMEM resuspendiert, um jeweils 1 ml Zellsuspension in eine 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche zu aliquotieren. Um die Ernährung der Zellen sicherzustellen und einer Kontamination durch Bakterien oder Pilzen entgegenzuwirken, erfolgte die Zugabe von 7 ml DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Amphotericin B und 1 % N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES)-Puffer. Der Zusatz von 50 µg/ml L-Ascorbinsäure, 10 mmol β-Glycerophosphat und 100 nmol Dexamethason erfolgte zur Unterstützung der Proliferation und osteogenen Differenzierung [131]. Die Proliferation der Zellen erfolgte im Brutschrank. Um eine Zellkontakthemmung und die damit einhergehende Verlangsamung der Zellteilungsrate zu vermeiden, wurden die Zellen ab einer 80-prozentigen Konfluenz (siehe Abb. 4-12) in einem Verhältnis von 1:6 in eine 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, überführt [132]. Hierzu wurde zunächst das Zellkulturmedium aus den 25-cm<sup>2</sup>-Flaschen entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gereinigt und mit 1 % Trypsin/EDTA überschichtet. Nach einer 3-minütigen Inkubation im Brutschrank wurde das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden durch leichtes Klopfen an der Seite der Kulturflasche induziert und unter dem Lichtmikroskop Primovert, Fa. Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland, kontrolliert. Bei erfolgreicher Ablösung wurde das Trypsin durch Zugabe von serumhaltigem DMEM neutralisiert. Der Inhalt der Flasche wurde in ein 50-ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und 8 min bei 120 × g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in DMEM-Knochenmedium mit den oben genannten Zusätzen resuspendiert und in die neue Zellkulturflasche überführt.

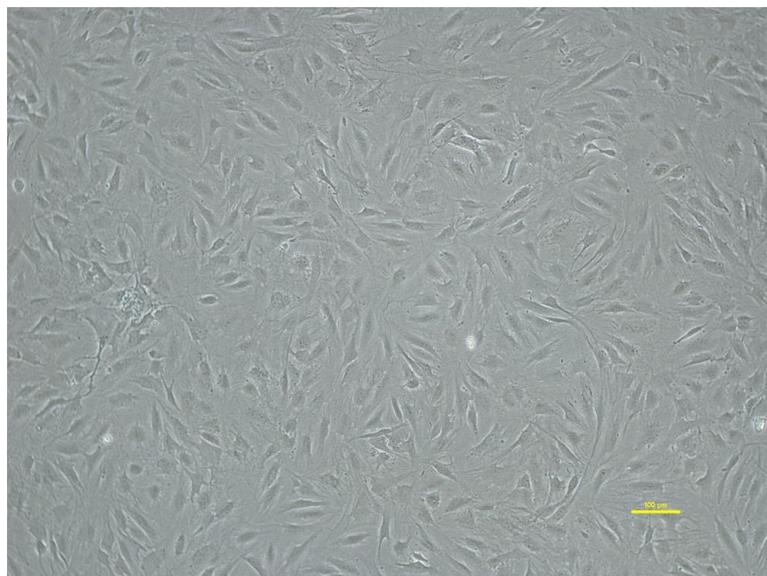


Abb. 4-12: Osteoblasten in Zellkulturflasche bei ca. 80%iger Konfluenz

Nach der ersten Passage erfolgte die Kryokonservierung der Zellen. Hierzu wurden diese wie beim oben beschriebenen Wechsel der Zellkulturflaschen vom Flaschenboden gelöst und bei  $120 \times g$  für 8 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen der Überstände wurde das Zellsediment in 1 ml Einfriermedium (FKS und Dimethylsulfoxid (DMSO) im Mischverhältnis 9:1) resuspendiert und in ein 1,8-ml-Kryoröhrchen, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, überführt. Die befüllten Kryoröhrchen wurden daraufhin in einem CoolCell Cryopreservation System, Fa. Brooks Life Sciences, Berlin, Deutschland, mit einer Abkühlungsrate von  $3 \text{ } ^\circ\text{C} / \text{min}$  auf ca.  $3 \text{ } 70 \text{ } ^\circ\text{C}$  abgekühlt und dort für 24 h gelagert. Anschließend wurden die Zellen in einen Stickstofftank für die weitere Lagerung bei  $3 \text{ } 196 \text{ } ^\circ\text{C}$  überführt.

#### 4.2.2 Auftauen und Aussaat der humanen Osteoblasten

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ . Das Gemisch aus Zellen und Konservierungsmedium wurde in DMEM-Kulturmedium aufgenommen und für 8 min bei  $120 \times g$  zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Mediums abgesaugt und das Zellpellet in DMEM-Kulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in  $75\text{-cm}^2$ -Zellkulturflaschen überführt und mit den in 10.6 genannten Zusätzen versehen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank, wobei das Zellkulturmedium alle zwei Tage gewechselt wurde.

Die Aussaat der Zellen in die Kollagen-Scaffolds erfolgte ab einer 90-prozentigen Konfluenz, die zwischen sieben bis zehn Tagen erreicht war und jeweils mit der dritten Zellpassage erfolgte. Nach dem Absaugen des Zellkulturmediums wurden die Zellen zunächst mit PBS gereinigt und mit 1 % Trypsin/EDTA überschichtet. Das Ablösen der Zellen vom Boden der  $75\text{-cm}^2$ -Zellkulturflasche wurde nach einer 3-minütigen Inkubation im Brutschrank unter dem Lichtmikroskop geprüft. Bei erfolgreicher Ablösung wurde die Reaktion mit DMEM abgestoppt und die Zellsuspension in ein 50-ml-Polypropylen-Röhrchen überführt. Es folgte eine 8-minütige Zentrifugation bei  $120 \times g$ . Der Überstand wurde abgesaugt und das zurückbleibende Zellsediment in 2 ml DMEM resuspendiert.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte manuell mittels einer Thoma-Zählkammer. Hierfür wurden  $10 \text{ } \mu\text{l}$  der resuspendierten Zelllösung in eine mit Deckglas vorbereitete Thoma-Zählkammer gegeben. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop, wobei zwei Gruppenquadrate je Probe ausgezählt wurden. Aus dem Mittelwert der Zellzählungen wurde anschließend die Zellzahl pro Milliliter errechnet. Die Zelllösung wurde so verdünnt, dass sich ca.  $5 \times 10^5$  Osteoblasten in 1 ml Suspension befanden. Nach der Verdünnung wurden ca.  $1 \times 10^5$  Zellen als 200- $\mu\text{l}$ -Tropfen mittig auf die vorbereiteten Kollagen-Scaffolds (entsprechend 4.1.1) aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Inkubation zur Adhäsion der Zellen an die Kollagen-Elastin-Matrix der Scaffolds erfolgte die Zugabe von 3 ml DMEM-

Kulturmedium, das zuvor durch 50 µg/ml L-Ascorbinsäure, 10 mM β-Glycerophosphat und 10 nM Dexamethason ergänzt wurde. Anschließend wurden die ausgesäten Osteoblasten für weitere 24 h im Brutschrank kultiviert.

### 4.3 Hauptversuch: Etablierung eines In-vitro-Systems zur biophysikalischen Stimulation humaner Osteoblasten

#### 4.3.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Jede Versuchsreihe erfolgte mit primären humanen Osteoblasten von mindestens fünf verschiedenen Spendern, die sieben bis zehn Tage vor Versuchsbeginn aufgetaut und in einer 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen bis zu 90-prozentiger Konfluenz kultiviert wurden. Die Versuchsreihen wurden nach dem in Tab. 4-3 dargestellten Schema durchgeführt.

Tab. 4-3: Schema der Versuchsreihen

Tag 1	Tage 2 bis 4	Tag 5
Aussaat der Zellen auf die vorbereiteten Kollagen-Scaffolds	Stimulation der Osteoblasten	Zellbiologische Untersuchungen

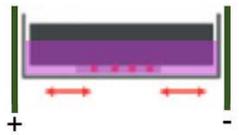
Insgesamt wurden fünf Versuchsgruppen untersucht:

1. Kultur im Elektrostimulationssystem ohne Titankörper (Reine Stimulation durch kapazitiv eingekoppelte elektrische Wechselfelder [ES])
2. Kultur in einer 6-Well-Platte mit Titankörper (Versuchsgruppe mit statischer Druckbelastung durch einen Ti6Al4V-Zylinder [load])
3. Kultur im Elektrostimulationssystem mit Titankörper (Stimulation durch kapazitiv eingekoppelte elektrische Wechselfelder und statische Druckbelastung durch einen Ti6Al4V-Zylinder [ES + load])
4. Kultur in der Mikrobewegungskammer ohne zusätzliche Elektrostimulation (Reine Stimulation durch harmonisch oszillierende Mikrobewegungen [MM])
5. Kultur in der Mikrobewegungskammer mit zusätzlicher Elektrostimulation (Simultane Stimulation durch harmonisch oszillierende Mikrobewegungen und kapazitiv eingekoppelte elektrische Wechselfelder [MM + ES])

Für die Versuchsgruppen 1 und 2 wurde jeweils eine unbehandelte Kultur als Kontrollgruppe herangezogen [untreated control]. Bei den Versuchsgruppen 4 und 5 wurde eine mit Titankörper beladene Kultur (entsprechend Versuchsgruppe 2 [load]) als Referenz gewählt. Für Versuchsgruppe 3 wurde je nach Vergleichsgruppe eine unbehandelte beziehungsweise beladene Kontrolle als Referenz herangezogen.

Die jeweiligen Versuchsgruppen inklusive unbehandelter Kontrollgruppe werden in Tab. 4-4 veranschaulicht.

Tab. 4-4: Kultur, Abkürzung und Veranschaulichung der Versuchsgruppen (Die Wände der 6-Well-Platte wurden in den Abbildungen zugunsten der Übersichtlichkeit weggelassen.)

Kultur	Abkürzung	Veranschaulichung
Kultur im Elektrostimulationssystem ohne Titankörper	ES	
Kultur in einer 6-Well-Platte mit Titankörper	load	
Kultur im Elektrostimulationssystem mit Titankörper	ES + load	
Kultur in der Mikrobewegungskammer ohne zusätzliche Elektrostimulation	MM	
Kultur in der Mikrobewegungskammer mit zusätzlicher Elektrostimulation	MM + ES	
Kultur in einer 6-Well-Platte ohne Behandlung	untreated control	

Mithilfe dieser Versuchsgruppen war es nicht nur möglich, die Einflüsse von Elektrostimulation, Titankörper und Mikrobewegungen auf die Osteoblasten jeweils einzeln zu untersuchen, sondern auch die simultanen Effekte von Mikrobewegungen und Elektrostimulation sowie Elektrostimulation und Titankörper zu validieren. Die Stimulation durch kapazitiv eingekoppelte elektrische Wechselfelder und harmonisch oszillierende Mikrobewegungen erfolgte an drei

aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils sechs Stunden. Alle Stimulationsvorgänge verliefen zeitgleich.

Zunächst erfolgte die Untersuchung der Elektrostimulation auf die Osteoblasten. Hierzu wurden die Zellen mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern bei einer Spannung von entweder 0,1 oder 1  $V_{\text{eff}}$  behandelt, wobei die Frequenz jeweils 60 kHz betrug. Anschließend wurde der allgemeine Einfluss der Titankörper auf die Osteoblasten ermittelt. Hierzu wurden Letztere für drei aufeinanderfolgende Tage mit einem Ti6Al4V-Zylinder beladen und anschließend mit unbehandelten Zellen der entsprechenden Spender verglichen. Die Titanzylinder übten dabei einen statischen Anpressdruck von 429,4 Pascal (Pa), unter Berücksichtigung der Auftriebskraft des Zellkulturmediums, auf die Kollagen-Scaffolds aus. Zudem wurden mehrere der beladenen Proben zusätzlich mit einer Elektrostimulation von 1  $V_{\text{eff}}$  behandelt. Hierdurch sollte festgestellt werden, welche Konsequenz die Beladung des Ti6Al4V-Zylinders auf die kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfelder und damit auf die Stimulation der Zellen hat. Der Vergleich erfolgte ebenfalls mit unbehandelten Zellen derselben Spender.

Für die Untersuchung des Einflusses mechanischer Beanspruchung auf die Viabilität und Differenzierung humaner Osteoblasten wurden die Zellen mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen bei einer Frequenz von 1 Hz behandelt. Die erste Versuchsgruppe wurde mit Spitze-Tal-Werten von 25  $\mu\text{m}$  stimuliert, während die zweite Mikrobewegungen mit einem Spitze-Tal-Wert von 100  $\mu\text{m}$  ausgesetzt war. Als Bezugsgruppe dienten die beladenen Zellen (mit Titankörper ohne Mikrobewegungen) des jeweiligen Spenders.

Für die kombinierte Stimulation wurden die Versuchsreihen mit 25- $\mu\text{m}$ - und 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen sowie zusätzlich mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern von 1  $V_{\text{eff}}$  behandelt. Auch hier wurde eine beladene Kontrolle als Referenz herangezogen. Zusätzlich zu den genannten Parametern wurden zunächst Versuchsreihen mit Titankörper und einer Elektrostimulation von 100  $\text{mV}_{\text{eff}}$  sowie kombinierte Stimulationen mit Mikrobewegungen und 100- $\text{mV}_{\text{eff}}$ -Elektrostimulation durchgeführt. Hierbei zeigten sich in den zellbiologischen Untersuchungen jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur beladenen Kontrolle beziehungsweise zu den Mikrobewegungen ohne Elektrostimulation. Da sich auch in der Simulation bei einer Eingangsspannung von 100  $\text{mV}_{\text{eff}}$  kein signifikantes elektrisches Feld unterhalb des Ti6Al4V-Zylinders zeigte, wurden diese Versuchsreihen jedoch nicht weiter fortgeführt. Für die kombinierte Stimulation und Elektrostimulation mit Titankörper wurde daher ausschließlich eine Eingangsspannung von 1  $V_{\text{eff}}$  verwendet.

### 4.3.2 Versuchsdurchführung der biophysikalischen Stimulation

Der Aufbau der Stimulationssysteme erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank. Hierbei wurden 24 h nach der Zellaussaat 1,3 ml des Zellkulturmediums aus allen vorbereiteten Petrischalen entnommen und verworfen. So konnte ein Überlaufen des Mediums durch das Volumen der Titankörper verhindert werden. Für die Elektrostimulation wurden die präparierten Petrischalen in die mit dem Elektrostimulationssystem versehenen 6-Well-Platte eingesetzt. Erfolgte zusätzlich eine Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern, so wurden die sterilisierten Titankörper mit einer sterilen Pinzette auf die Kollagen-Scaffolds gelegt (siehe Abb. 4-13).

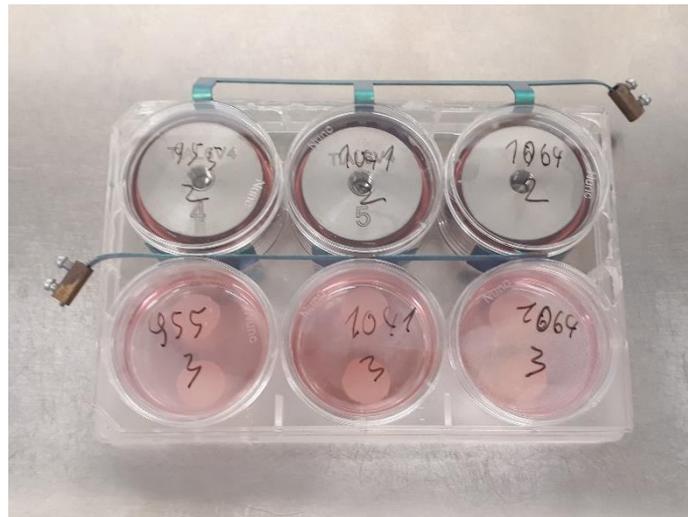


Abb. 4-13: Aufbau der 6-Well-Platte für die Applikation kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder. Mit einem Ti6Al4V-Zylinder beladene Proben im Elektrostimulationssystem (oben); unbeladene, auf Kollagen-Scaffolds ausgesäte Osteoblasten als unbehandelte Kontrolle (unten).

Auch für den Aufbau des Mikrobewegungssystems wurden zunächst die präparierten Petrischalen in eine mit dem Elektrostimulationssystem versehene 6-Well-Platte eingesetzt. Anschließend erfolgte die Verschraubung der Elektroden mit dem Kabel des Funktionsgenerators und die Befestigung der verkabelten 6-Well-Zellkulturplatte an das Gestell des Piezomotors (siehe Abb. 4-14)

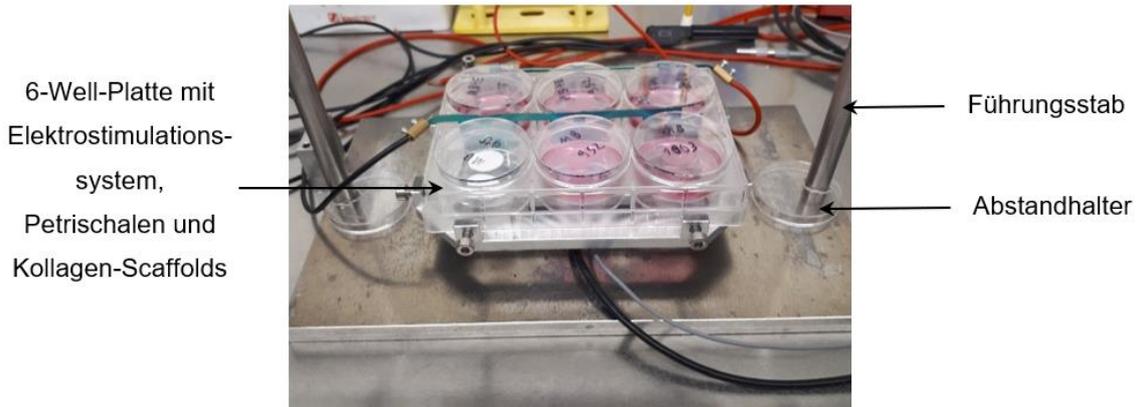


Abb. 4-14: Grundplatte der Mikrobewegungskammer mit eingespannter 6-Well-Zellkulturplatte und Elektrostimulationssystem sowie den Petrischalen mit jeweils zwei Kollagen-Scaffolds (im linken, unteren Well zu erkennen)

Die autoklavierten Titankörper wurden mit sterilen Handschuhen an den Deckel der Kammer angeschraubt, der daraufhin vorsichtig auf die Kammer gesetzt und festgeschraubt wurde. Für die beladenen Kontrollen wurden die sterilisierten Titankörper mithilfe einer sterilen Pinzette auf die Scaffolds gelegt. Bei den unbehandelten Kontrollen erfolgt nur die Entfernung von 1,3 ml des Zellkulturmediums. Nach erfolgreichem Aufbau der Stimulationssysteme wurden diese sowie die Kontrollen im Brutschrank positioniert. Das Elektrostimulationssystem wurde mit dem Funktionsgenerator verbunden. Die Ansteuerung des Piezo-Positioniersystems erfolgte mithilfe des Programms PIMicroMove (Physik Instrumente [PI] GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Die Spannung und Frequenz an den Elektroden wurde vor jeder Versuchsreihe mittels eines Spannungsmessgeräts überprüft. Die korrekte Ausführung des Piezo-Positionssystems konnte mittels PIMicroMove nachvollzogen werden. Die zellbiologischen Untersuchungen folgten 24 h nach dem letzten Stimulationsintervall. Vor jeder neuen Versuchsreihe wurden sowohl die 6-Well-Platten als auch Elektroden mit Ethanol gereinigt. Die Aufarbeitung von Titankörpern und dem Deckel der Mikrobewegungskammer erfolgte gemäß dem unter Kapitel 10.8 gelisteten Reinigungsprotokoll.

#### 4.4 Zellbiologische Untersuchungen

Für jede der fünf Versuchsgruppen (ES, load, load + ES, MM, MM+ ES) wurde zunächst kolorimetrisch die metabolische Aktivität mithilfe des Stoffwechselaktivitätstests WST-1 bestimmt. Die relative Genexpression von Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (*ALP*) und Osteocalcin (*OC*) wurden bestimmt, um die Effekte der einzelnen Versuchsgruppen auf die mRNA-Transkription dieser osteogenen Marker zu analysieren. Zudem erfolgte die Bestimmung der Prokollagen-Typ-I-Proteinbiosynthese mittels ELISA aus

dem Zellkulturüberstand und der ALP-Aktivität über die Hydrolysierung von p-Nitrophenylphosphat, wobei die Ergebnisse der Prokollagen-Typ-I-Biosynthese auf die Gesamtproteinmenge normiert wurden. Die Transkription von *Matrix Metalloproteinase-1 (MMP1)*-, *Osteoprotegerin (OPG)*-, *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)*- und *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP1)*-mRNA wurde bestimmt, um den Einfluss der jeweiligen Versuchsgruppen auf den Knochenumbau zu untersuchen.

#### 4.4.1 Viabilitätsbestimmung

Die Zellviabilität wurde 24 h nach Beginn des letzten Stimulationsintervalls mittels des Stoffwechselaktivitätstests WST-1, Fa. Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland, bestimmt. Dabei wird das stabile Tetrazoliumsals 4-[3-(4-Iodphenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzoldisulfonat (WST-1) durch mitochondriale Dehydrogenasen zum löslichen Formazan reduziert. Die Menge des durch die Aktivität der Dehydrogenase erzeugten Farbstoffs ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Für die Durchführung des Tests wurden zuerst die Ti6Al4V-Zylinder aus der entsprechenden 6-Well-Zellkulturplatte entfernt und anschließend wurde jeweils ein Scaffold vorsichtig mittels einer sterilen Pinzette in eine 12-Well-Platte überführt. Jeder Scaffold wurde mit einem Reagenz aus WST-1 und DMEM-Zellkulturmedium im Verhältnis 1:10 überschichtet und anschließend im Brutschrank inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 h wurden jeweils 100  $\mu$ l der farblich sichtbar veränderten Lösung (Farbumschlag von rotorange nach gelb) als Triplikate in eine 96-Well-Platte überführt. Die Quantifizierung des gebildeten Formazan-Farbstoffes erfolgte mittels des spektralphotometrischen Plattenreaders Tecan-Reader Infinite® 200 Pro, Fa. Tecan Trading AG, Männedorf, Deutschland, bei einer Wellenlänge von 450 nm und einem Referenzfilter von 630 nm. Die dabei gemessene Extinktion korreliert direkt mit der Anzahl der lebensfähigen Osteoblasten [133]. Bei jeder Versuchsreihe wurde ein Leerwert mitgeführt. Die Viabilitätsbestimmung wurde unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

#### 4.4.2 Molekularbiologische Arbeiten

Für die Analyse der Genexpression wurden die Osteoblasten aus den Kollagen-Scaffolds isoliert. Hierzu erfolgte ein Verdau der Scaffolds mit Kollagenase A. Die für den WST-1-Assay genutzten Kollagen-Scaffolds wurden mit PBS gereinigt und in sterile, mit Kollagenase A gefüllte Reaktionsgefäße, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland, überführt. Der anschließende Verdau erfolgte für 45 min bei 37 °C und 300 rpm auf einem Inkubationsschüttler. Die isolierten Osteoblasten wurden für 8 min bei 120  $\times$  g zentrifugiert und das Zellsediment für nachfolgende Arbeiten verwendet.

#### 4.4.2.1 RNA-Isolierung

Im Anschluss an den Kollagenase-A-Verdau erfolgte die RNA-Isolierung. Diese wurde mithilfe des peqGOLD Total RNA Kit, Fa. VWR International, Darmstadt, Deutschland, durchgeführt. Nach der Zugabe von 300 µl RNA-Lysepuffer zum Zellsediment wurde das Zelllysat auf eine DNA-Removing-Säule gegeben und für 1 min bei 12 000 × g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde mit 70-prozentigem Ethanol versetzt, gemischt und auf eine PerfectBind-RNA-Column geladen, in der die RNA-Moleküle an eine Silikamembran binden können. Zellulärer Debris und andere Kontaminationen wurden, entsprechend der Gebrauchsanweisung, mit speziellen Puffern in mehreren Reinigungsschritten entfernt. Die gesäuberte RNA wurde in 30 µl sterilem Ribonuklease-freiem Wasser eluiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der RNA-Konzentration mithilfe des Plattenreaders Tecan-Reader Infinite® 200 Pro. Als Blindprobe wurde Ribonuklease-freies Wasser verwendet.

#### 4.4.2.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR diente zur Herstellung von cDNA und wurde nach der Anleitung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, durchgeführt. Chemikalien und Proben wurden während der gesamten Bearbeitung auf Eis gelagert. Die isolierte RNA wurde zunächst mit Diethylidcarbonat (DEPC) behandeltem Wasser auf 10 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und daraufhin mit einem Mastermix aus dNTPs, Random Primers und Reverser Transkriptase im Verhältnis 1:1 gemischt. Anschließend erfolgte die RT-PCR im Thermocycler Biometra, Fa. Analytik Jena AG, Jena, Deutschland, nach dem folgenden Schema in Tab. 4-5:

Tab. 4-5: Ablauf der RT-PCR

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
37 °C	120 min
85 °C	15 sec

Nach Ablauf der RT-PCR wurden alle Proben mit 20 µl DEPC behandeltem Wasser verdünnt und bei 3 20 °C weggefroren oder weiterbehandelt.

#### 4.4.2.3 Quantitative-Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die Quantitative-Echtzeit-PCR zur Messung der Genexpression wurde mithilfe des innuMIX qPCR MasterMix SyGreen Kits, Fa. Analytik Jena AG, Jena, Deutschland, durchgeführt. Analysiert wurden die am Knochenaufbau beteiligten Gene für Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (*ALP*) und Osteocalcin (*OC*) sowie die Gene der am Knochenumbau beteiligten Mediatoren *Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP1)*, Osteoprotegerin

(*OPG*), *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)* und *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP1)*. Zur quantitativen Messung dieser Gene wurde ein Mix aus Wasser, Forward und Reverse Primern (siehe 10.5 Primer) sowie dem im Kit enthaltenen innuMix MasterMix im Mischungsverhältnis 6:1:1:10 hergestellt. Von jeder Probe wurde im Anschluss 1  $\mu$ l cDNA pro Gen als Duplikat auf den Boden einer 96-Well-Multiply-PCR-Platte pipettiert. Letztere wurde durch einen speziell angepassten Eisblock gekühlt. Als Negativkontrolle diente 1  $\mu$ l Ribonuklease-freies Wasser. Die Proben und Negativkontrollen wurden mit dem Mastermix auf ein Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l aufgefüllt. Die Multiply-PCR-Platte wurden anschließend mit einer transparenten Klebefolie zugeklebt und anzentrifugiert, damit sich alle Flüssigkeitsanteile auf dem Boden der Wells sammeln konnten. Die Expressionsanalyse der jeweiligen Ziel-Gene erfolgte durch Bestimmung der CT-Werte (threshold cycle) mithilfe des Real-Time Thermocycler qTower 2.0, Fa. Analytik Jena AG, Jena, Deutschland. Der Ablauf der qRT-PCR erfolgte nach dem in Tab. 4-6 dargestellten Schema.

Tab. 4-6: Ablauf der qRT-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl an Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	5 sec	40
60-65 °C	25 sec	

#### 4.4.3 Analyse der Synthese und Aktivität osteogener Marker

Um den Einfluss der verschiedenen Stimulationsarten auf die Osteoblasten genauer zu quantifizieren, wurde zudem die Synthese der osteogenen Marker Prokollagen Typ I und alkalische Phosphatase analysiert.

##### 4.4.3.1 Quantifizierung der Prokollagen-Typ-I-Synthese

Die Quantifizierung der Prokollagen-Typ-I-Synthese erfolgte aus den Überständen der Proben mithilfe des MicroVue C1CP ELISA, Fa. Quidel Metra, San Diego, USA. Dieser misst das C-terminale Kollagenpropeptid (C1CP) des Typ I. Letzteres kann als biochemischer Indikator für die Produktion und das Wachstum von Kollagen nützlich sein [33]. Vor dem Test wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt und jede Probe im Verhältnis 1:12 mit einer Testpufferlösung verdünnt. Die verdünnten Proben wurden jeweils in die Wells der im Kit enthaltenen Teststreifen pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Teststreifen entleert, mithilfe eines mit vollentsalztem Wasser verdünnten Waschpuffers (Verhältnis 1:10) dreimal gewaschen und getrocknet. Es folgten die in Tab. 4-7 aufgeführten Schritte.

Tab. 4-7: Schritte und Inkubationszeiten des CICIP-Immunassays

Schritt	Inkubationszeit bei Raumtemperatur
1. Zugabe von 100 µl Anti-CICIP	45 min
2. Zugabe von 100 µl Enzymkonjugat	45 min
3. Zugabe von 100 µl Substratlösung	30 min

Zwischen jedem der in Tab. 4-7 aufgeführten Schritte wurden die Teststreifen erneut entleert, dreimalig gewaschen und getrocknet. Nach der Zugabe von 100 µl Substratlösung pro Well und der 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet. Die Quantifizierung des CICIP erfolgte am Plattenreader bei einer Wellenlänge von 405 nm. Eine Standardkurve wurde mitgeführt, um die Peptidkonzentrationen innerhalb der Proben zu bestimmen.

#### 4.4.3.2 Gesamtproteinbestimmung

Die Gesamtproteinbestimmung erfolgte mithilfe des Qubit Protein Assay Kit, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA. Dabei binden die Qubit-Testfarbstoffe selektiv an die Proteine der Probenlösungen. Erstere werden sodann durch die Absorption von UV- und sichtbarem Licht elektronisch angeregt und relaxieren unter Aussendung von Licht höherer Wellenlänge. Intensität und Wellenlänge des emittierten Lichts werden gemessen und zur Proteinbestimmung genutzt [134]. Drei Standards wurden im Verhältnis 1:20 mit der Qubit-Arbeitslösung (Qubit protein Reagent: Qubit protein Buffer im Verhältnis 1:200) gemischt und zur Kalibrierung des Qubit-Fluorometers genutzt. Das Mischverhältnis von Probe und Arbeitslösung betrug 1:200. Nach einer Inkubationszeit von 15 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur erfolgte zunächst die Kalibrierung des Invitrogen™-Qubit™-3-Fluorometers, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, mit den Standards. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der Proben.

#### 4.4.3.3 Quantifizierung der ALP-Aktivität

Zur Quantifizierung der Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde p-Nitrophenylphosphat verwendet, das durch ALP zu einem gelb gefärbten Produkt hydrolysiert wird. Letzteres kann im Plattenreader bei einer Absorption von 405 nm quantifiziert und als indirektes Maß für die ALP-Aktivität der jeweiligen Versuchsprobe genutzt werden.

Unter einer Sterilbank wurde hierzu das zweite Kollagen-Scaffold vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entnommen und in eine 12-Well-Platte überführt. In dieser erfolgte ein zweimaliger Waschvorgang mit 50 mM TRIS-Puffer, der nach jedem Waschschrift wieder entfernt wurde. Die Lyse der Zellen erfolgte in einer 1:100-Verdünnung von Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat und destilliertem Wasser, die am Tag der Quantifizierung durch eine 100-mM-Stocklösung aus Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Isopropanol ergänzt wurde. Das

Mischverhältnis betrug hierbei ebenfalls 1:100. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde den lysierten Zellen eine 10-mM-Stocklösung aus p-Nitrophenylphosphat (pNpp) hinzugefügt. Zur Herstellung jener Lösung wurde pNpp in einer Mischung aus 1 M 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol, 5 mM Magnesiumchlorid und destilliertem Wasser im Verhältnis 1:1:10 gelöst und anschließend auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 h im Brutschrank wurde die Reaktion durch eine 2-M-Natriumhydroxidlösung gestoppt. Jeweils  $6 \times 100 \mu\text{l}$  der nun gelblich gefärbten Lösung wurden daraufhin in eine 96-Well-Platte übertragen und anschließend am Plattenreader bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert. Bei jeder Versuchsreihe wurde ein Leerwert mitgeführt.

#### 4.5 Statistische und graphische Auswertung

Sowohl die Ausführung der statistischen Tests als auch die graphische Darstellung wurde mithilfe von GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) umgesetzt. Die Sammlung der Daten erfolgte mithilfe von Excel 2019. Alle Zellversuche wurden mit mindestens fünf Spendern durchgeführt. Pro Spender wurden abhängig vom vorhandenen Spendermaterial ein bis fünf technische Replikate angefertigt.

Zur Auswertung der Zellviabilität und der ALP-Aktivität wurde zunächst der Mittelwert der jeweilig gemessenen Extinktionen jeder Probe gebildet und anschließend jener der Leerwerte abgezogen. Die auf diese Weise ermittelten Werte der behandelten Proben wurden auf jene der unbehandelten beziehungsweise beladenen Proben des jeweiligen Spenders der gleichen Versuchsreihe bezogen. Die im ELISA gemessenen Werte der Prokollagen-Typ-I-Synthese wurden zunächst auf die Gesamtproteinkonzentration der jeweiligen Probe genormt und anschließend auf die unbehandelte beziehungsweise beladene Probe des Spenders bezogen. Die Auswertung der Genexpressionsanalyse erfolgte mithilfe des Delta-delta-CT ( $\Delta\Delta\text{CT}$ )-Berechnungsmodells. Hierzu wurden zunächst die CT-Werte der Ziel-Gene auf ein Housekeeper-Gen gemäß der Gleichung  $\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{Ziel-Gen}} - \text{CT}_{\text{Housekeeper-Gen}}$  bezogen. Als Housekeeper-Gen wurde die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet. Anschließend wurde der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert durch die Subtraktion der  $\Delta\text{CT}$ -Werte der Kontrollgruppe von den  $\Delta\text{CT}$ -Werten der behandelten Gruppe bestimmt ( $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT}_{\text{Behandlung}} - \Delta\text{CT}_{\text{Kontrolle}}$ ). Dabei lagen die CT-Werte von *RANKL*- und *MMP1*-mRNA in den behandelten und unbehandelten Proben häufig unterhalb der Nachweisgrenze oder die gemessenen Werte lagen über dem Schwellenwert von 35 Zyklen. Daher wurden beide Marker für die Untersuchung ausgeschlossen. Die graphische Darstellung der Genexpressionsanalyse erfolgte durch die Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ -Werte. Zur statistischen Auswertung wurden die  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte genutzt.

Alle berechneten Werte wurden für die graphische Auswertung als Prozentsatz zur jeweiligen unbehandelten beziehungsweise beladenen Kontrolle dargestellt. Die Veranschaulichung der Ergebnisse erfolgte als Boxplot. Hierbei bilden das erste (25 %) und dritte (75 %) Quartil jeweils den Kasten des Boxplots. Die Linie innerhalb der Box stellt den Median der Datensätze dar und die Whisker veranschaulichen Minimum sowie Maximum der Wertegruppen. Verschiedene Versuchsgruppen wurden durch eine gestrichelte Linie voneinander getrennt. Statistische Signifikanzen zur jeweiligen Kontrollgruppe wurden mithilfe des Wilcoxon-Signed-Rank-Tests ermittelt. Hierzu wurden die Rohdaten der jeweiligen Versuchsreihen verwendet. Der Vergleich zweier Versuchsgruppen erfolgte mithilfe des Mann-Whitney-U-Test. Das Signifikanzniveau betrug jeweils  $p < 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen nach Applikation der Elektrostimulation

Um die Auswirkungen der Elektrostimulation auf die metabolische Aktivität von humanen Osteoblasten zu untersuchen, wurden mehrere Zellreihen mit einer Frequenz von 60 kHz und einer angelegten Spannung von entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub> stimuliert. Die in den zellbiologischen Untersuchungen erhobenen Ergebnisse wurde im Anschluss auf die Ergebnisse der jeweiligen unbehandelten Kontrolle desselben Spenders bezogen.

Wie in Abb. 5-1 veranschaulicht, war die metabolische Aktivität der mit 100 mV<sub>eff</sub> stimulierten Osteoblasten, mit einem Median von 125,5 %, signifikant höher als die der unbehandelten Zellen ( $p = 0,002$ ). Dabei zeigte sich auch im direkten Vergleich der beiden Spannungen eine signifikant höhere Zellviabilität nach einer Stimulation mit 100 mV<sub>eff</sub> gegenüber der Stimulation mit 1 V<sub>eff</sub> ( $p = 0,017$ ), während der Zellstoffwechsel durch die Stimulation mit 1 V<sub>eff</sub> nicht signifikant beeinflusst wurde ( $p = 0,569$ ).

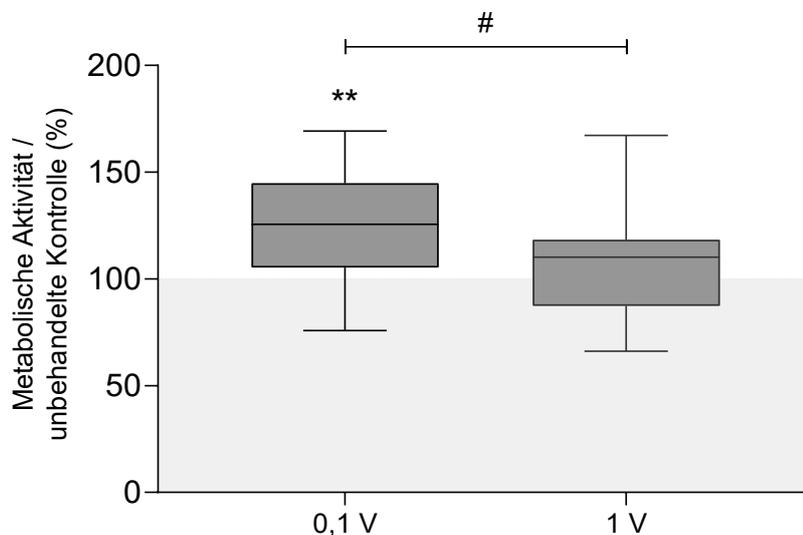


Abb. 5-1: Metabolische Aktivität humaner Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch über die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 24$ ). \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Spannungen (Mann-Whitney-U-Test).

Bei der Analyse der relativen Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus hingegen fand sich weder beim Vergleich der stimulierten mit den unbehandelten

Osteoblasten noch beim direkten Vergleich beider Spannungen ein signifikanter Unterschied in der Transkription von *COL1A1*-, *ALP*- und *OC*-mRNA (siehe Abb. 5-2).

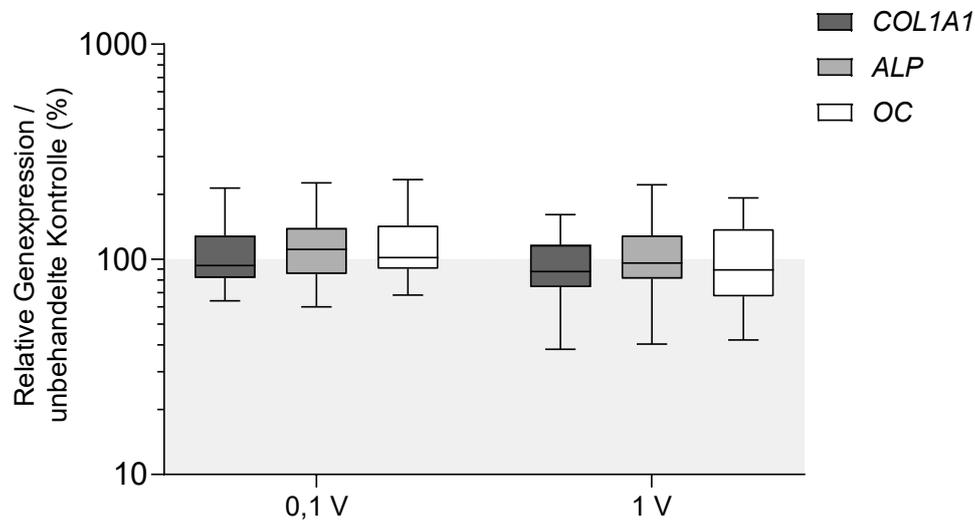


Abb. 5-2: Relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus: Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (*ALP*) und Osteocalcin (*OC*) in humanen Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *COL1A1*, *ALP* und *OC* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 24$ ).

Bei Betrachtung der in Abb. 5-3 dargestellten Synthese der osteogenen Marker Prokollagen Typ I und ALP zeigte sich die Synthese von Prokollagen Typ I mit einem Median von 93,9 % signifikant ( $p = 0,048$ ) unterhalb der unbehandelten Kontrolle, während die Stimulation mit 1 V<sub>eff</sub> einen positiven Einfluss auf die ALP-Synthese hatte. Diese befand sich mit einem Median von 102,3 % allerdings nur gering oberhalb der unbehandelten Kontrolle ( $p = 0,036$ ). In einem direkten Vergleich der beiden Spannungen in Bezug auf die Synthese osteogener Markerproteine konnte kein eindeutiger Vorteil einer Spannung festgestellt werden.

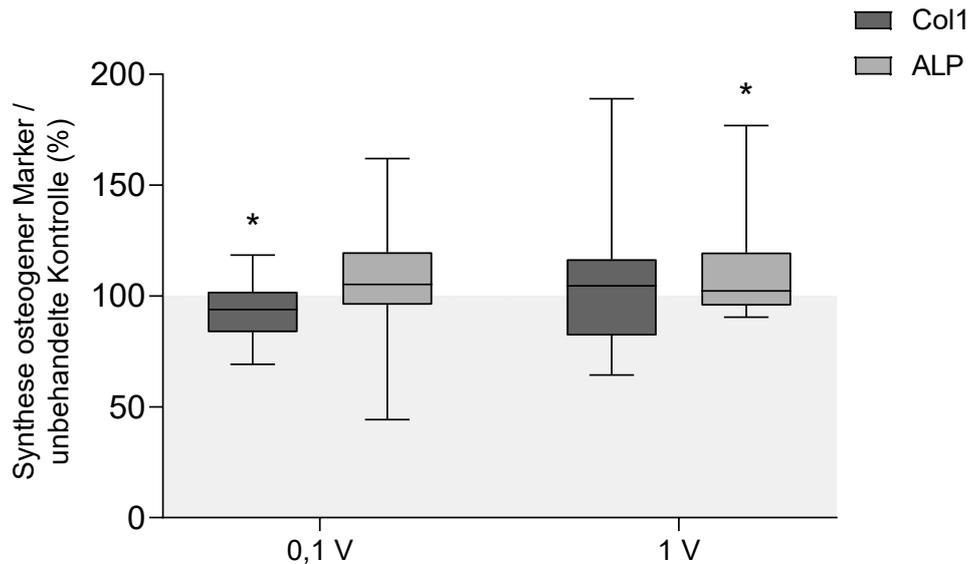


Abb. 5-3: Synthese osteogener Marker: Prokollagen Typ I (Col1) und Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Freisetzung von Prokollagen Typ I im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die ALP-Aktivität wurde kolorimetrisch über die Hydrolysierung von p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 15$ ). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test).

In der in Abb. 5-4 dargestellten relativen Genexpression der Mediatoren des Knochenumbaus fand sich erneut ein Vorteil einer Stimulation mit der niedrigeren Spannung von 100 mV<sub>eff</sub>. So zeigte sich, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, sowohl die Transkription von *TIMP1*-mRNA als auch *OPG*-mRNA im Median um mehr als 25 % erhöht (*TIMP1*: 125,1 %,  $p = 0,017$ ; *OPG*: 130,8 %,  $p = 0,005$ ). Die Expression von *OPG* war zudem im Vergleich zur Stimulation mit 1 V<sub>eff</sub> signifikant erhöht ( $p = 0,043$ ).

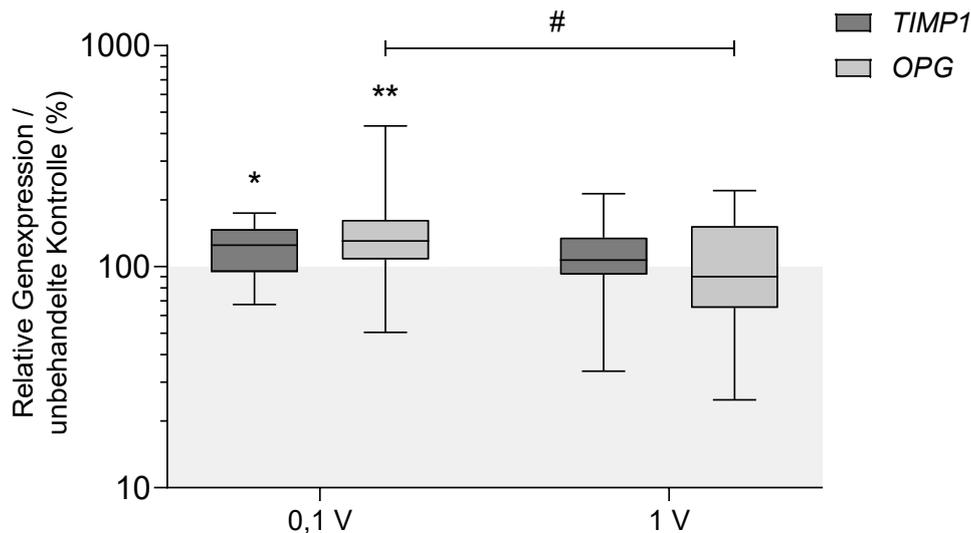


Abb. 5-4: Relative Genexpression von Mediatoren des Knochenbaus: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* (*TIMP1*) und Osteoprotegerin (*OPG*) in humanen Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *TIMP1* und *OPG* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 24$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Spannungen (Mann-Whitney-U-Test).

Insgesamt hatte somit die Stimulation mit einer angelegten Spannung von 100 mV<sub>eff</sub> einen positiven Einfluss auf die metabolische Aktivität und Expression der am Knochenumbau beteiligten Gene *TIMP1* und *OPG*, wohingegen sich die Synthese von Prokollagen Typ I durch die Stimulation verringerte. Die Applikation mit einer höheren Spannung von 1 V<sub>eff</sub> zeigte keinen oder allenfalls einen geringen positiven Einfluss auf die metabolische Aktivität der Osteoblasten, wohingegen die ALP-Aktivität durch die Stimulation signifikant erhöht werden konnte.

## 5.2 Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen nach Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern und Applikation der Elektrostimulation

Hierfür wurden in Kollagen-Scaffolds ausgesäte Osteoblasten zunächst mit einem sterilen Ti6Al4V-Zylinder beladen. Während eine Gruppe der beladenen Zellen zusätzlich mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern mit einer Frequenz von 60 kHz und einer angelegten Spannung von 1 V<sub>eff</sub> behandelt wurden, erfolgte bei der anderen keine zusätzliche elektrische Stimulation. Im Anschluss wurden die Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen beider Versuchsreihen mit den unbehandelten Kontrollen des jeweiligen Spenders in Relation gesetzt.

Wie in Abb. 5-5 veranschaulicht, fand sich kein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität zwischen den beladenen und unbelasteten Proben ( $p = 0,965$ ). Bei zusätzlicher Elektrostimulation hingegen lag der Median mit 113,4 % signifikant ( $p = 0,026$ ) über dem der unbelasteten Kontrolle. Im direkten Vergleich fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen ( $p = 0,182$ ).

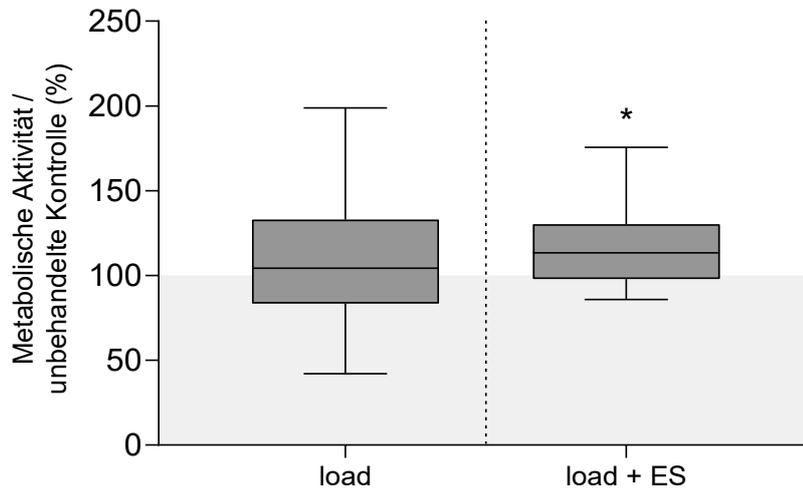


Abb. 5-5: Metabolische Aktivität humaner Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbelastete Zellen. Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch über die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur unbelasteten Kontrolle ( $n \geq 21$ ). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den unbelasteten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test).

Auf Genexpressionsebene hingegen (siehe Abb. 5-6) zeigte sich, bezogen auf die unbelastete Kontrolle, in beiden Versuchsgruppen eine signifikante Abnahme der *COL1A1*- (load: 62,2 %;  $p < 0,001$ ; load + ES: 30,4 %;  $p < 0,001$ ) und *ALP*-Expression (load: 74,0 %;  $p = 0,003$ ; load + ES: 65,3 %;  $p < 0,001$ ). Auch die Transkription von *OC*-mRNA stellte sich in beiden Versuchsgruppen erniedrigt dar (load: 80,1 %;  $p = 0,315$ ; load + ES: 62,2 %;  $p = 0,084$ ). Im direkten Vergleich der beiden Versuchsgruppen zeigte sich zudem eine signifikant herunterregulierte Transkription von *COL1A1*-mRNA in den beladenen Proben, die zusätzlich mit einer elektrischen Stimulation behandelt wurden ( $p = 0,005$ ).

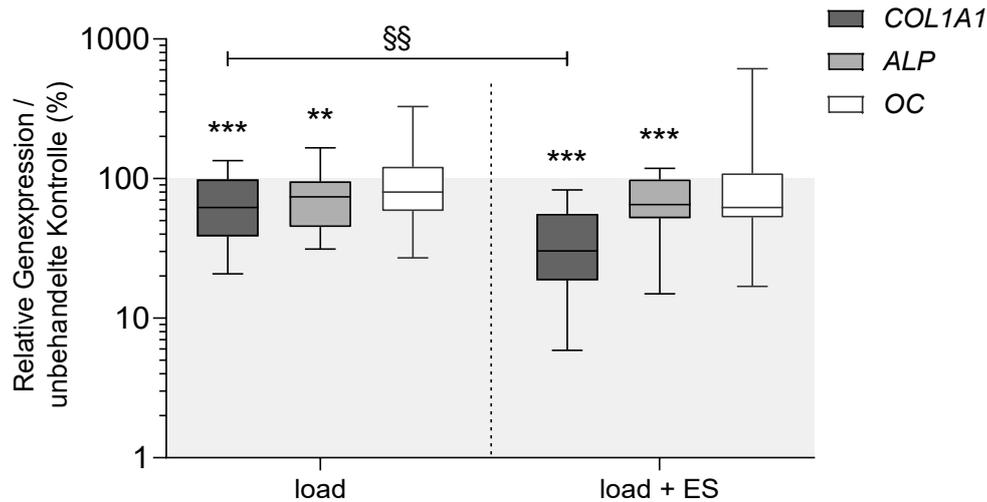


Abb. 5-6: Relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus: Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (OC) in humanen Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1  $V_{eff}$ . Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *COL1A1*, ALP und OC mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 21$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); §§  $p < 0,01$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test).

In Einklang mit den Ergebnissen der relativen Genexpression zeigte sich auf Proteinlevel und im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowohl die Synthese von Prokollagen Typ I (load: 81,2 %;  $p < 0,001$ ; load + ES: 68,4 %;  $p < 0,001$ ) als auch die ALP-Aktivität (load: 70,1 %;  $p < 0,001$ ; load + ES: 73,5 %;  $p < 0,001$ ) in den beladenen Versuchsgruppen signifikant herunterreguliert (siehe Abb. 5-7). Analog zur erniedrigten Transkription von *COL1A1*-mRNA auf Genexpressionsebene fand sich zudem im direkten Vergleich der beiden Versuchsgruppen eine signifikant niedrigere Prokollagen-Typ-I-Syntheserate ( $p = 0,047$ ) bei zusätzlicher Elektrostimulation.

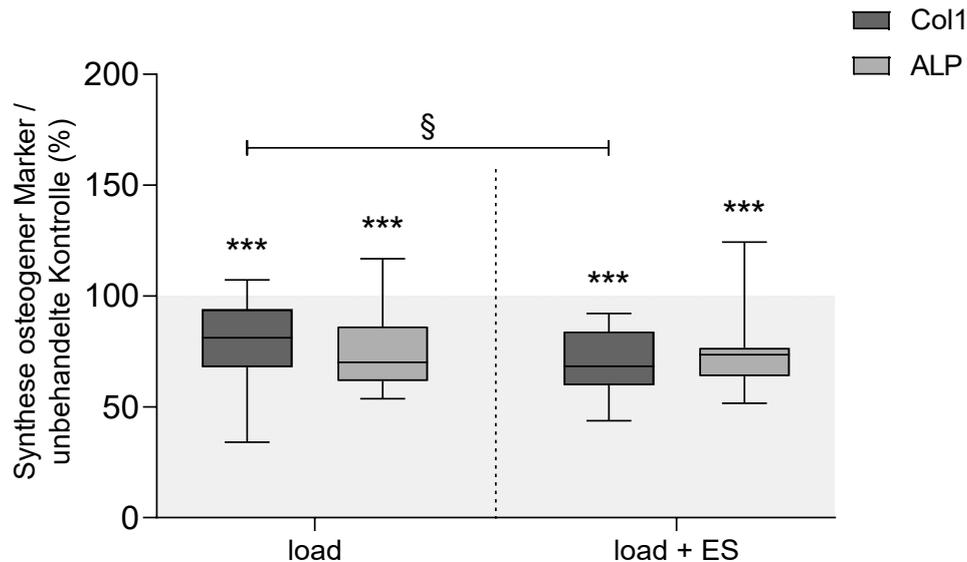


Abb. 5-7: Synthese osteogener Marker: Prokollagen Typ I (Col1) und Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen. Die Freisetzung von Prokollagen Typ I im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die ALP-Aktivität wurde kolorimetrisch über die Hydrolysierung von p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 18$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test).

Die Ergebnisse der relativen Genexpression von *TIMP1* und *OPG* sind in Abb. 5-8 veranschaulicht. Hier führte die Beladung der Zellen mit Ti6Al4V-Zylindern, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, zu einer signifikanten Hochregulation der *TIMP1*-Expression (187,3 %;  $p < 0,001$ ), während die Transkription der *OPG*-mRNA durch die Beladung nicht signifikant beeinflusst wurde (86,5 %;  $p = 0,235$ ). Auch bei zusätzlicher Elektrostimulation der beladenen Proben mit einer Spannung von 1 V<sub>eff</sub> zeigte sich eine signifikant erhöhte *TIMP1*-Expression (150,5 %;  $p < 0,001$ ) ohne eine deutliche Beeinflussung der *OPG*-Expression (108,7 %;  $p = 0,5$ ). Beim Vergleich der beladenen Zellen mit und ohne elektrische Stimulation zeigte sich weder bei der Transkription von *TIMP1*-mRNA ( $p = 0,995$ ) noch bei der von Transkription von *OPG*-mRNA ( $p = 0,209$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

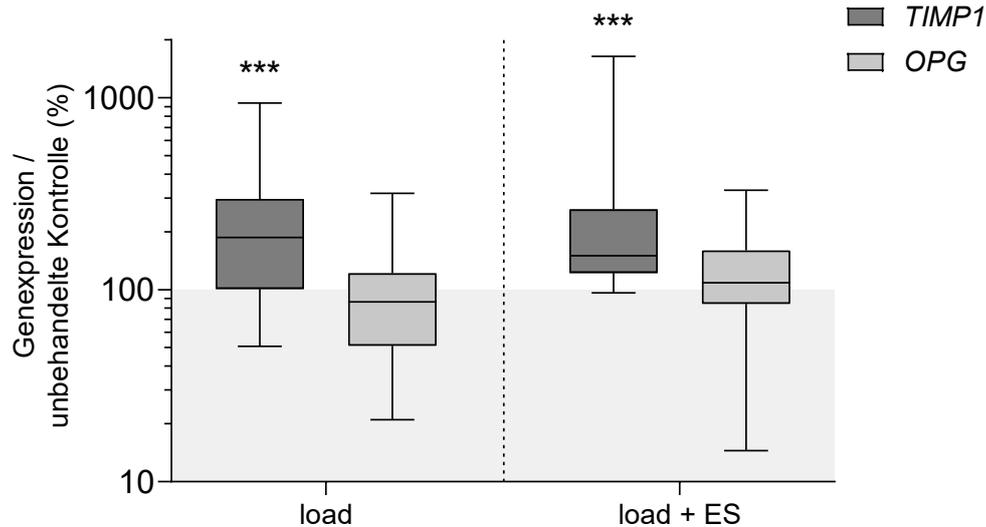


Abb. 5-8: Relative Genexpression von Mediatoren des Knochenbaus: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP1)* und Osteoprotegerin (*OPG*) in humanen Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *TIMP1* und *OPG* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 21$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test).

Zusammenfassend ergab sich durch die Beladung der Osteoblasten mit Ti6Al4V-Zylindern eine signifikante Reduktion der osteogenen Marker Prokollagen Typ I und ALP sowohl auf Proteinlevel als auch auf Genexpressionsebene. Dieser Effekt konnte bei Prokollagen Typ I durch zusätzliche Elektrostimulation verstärkt werden. Hingegen fand sich eine deutliche Hochregulation der *TIMP1*-Expression sowohl bei den beladenen als auch beladenen Proben, die zusätzlich mit einer elektrischen Stimulation behandelt wurden. Auch konnte die Zellviabilität der Osteoblasten durch eine Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern und simultaner Elektrostimulation signifikant erhöht werden.

### 5.3 Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen nach Applikation von Mikrobewegungen und Elektrostimulation

Im folgenden Abschnitt wurden die verschiedenen Versuchsgruppen von Mikrobewegungen, Mikrobewegungen und Elektrostimulation sowie Elektrostimulation und Beladung mit Titankörpern verglichen. Als Bezugsgruppe dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten des jeweiligen Spenders. Für die Untersuchung des Einflusses mechanischer Beanspruchung auf die Viabilität und Differenzierung humaner Osteoblasten sowie den Knochenbau wurden die Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 6 h mit harmonisch

oszillierenden Mikrobewegungen behandelt. Dabei wurde eine Versuchsreihe mit Spitze-Tal-Werten von 25  $\mu\text{m}$  stimuliert, während die andere Reihe Mikrobewegungen mit einem Spitze-Tal-Wert von 100  $\mu\text{m}$  ausgesetzt war. In der kombinierten Versuchsgruppe erhielten die Osteoblasten zusätzlich zu den Mikrobewegungen eine elektrische Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern bei einer angelegten Spannung von 1  $V_{\text{eff}}$  und einer Frequenz von 60 kHz. Die dritte Gruppe wurde mit Ti6Al4V-Zylindern beladen und zudem mit einer Elektrostimulation von 1  $V_{\text{eff}}$  und 60 kHz behandelt. Wie auch in den ersten beiden Versuchsgruppen erfolgte hier die Stimulation an drei aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 6 h. Auf einen Vergleich der Einzelstimulationen (Mikrobewegungen versus Elektrostimulation) in beladenen Proben wurde aufgrund der eingeschränkten Vergleichbarkeit verzichtet.

Abb. 5-9 veranschaulicht den Vergleich der drei Versuchsgruppen in Bezug auf die Zellviabilität. Hierbei zeigte sich bei keiner der Stimulationen ein signifikanter Unterschied zur beladenen Kontrolle. Auch beim Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied der einzelnen Gruppen festgestellt werden.

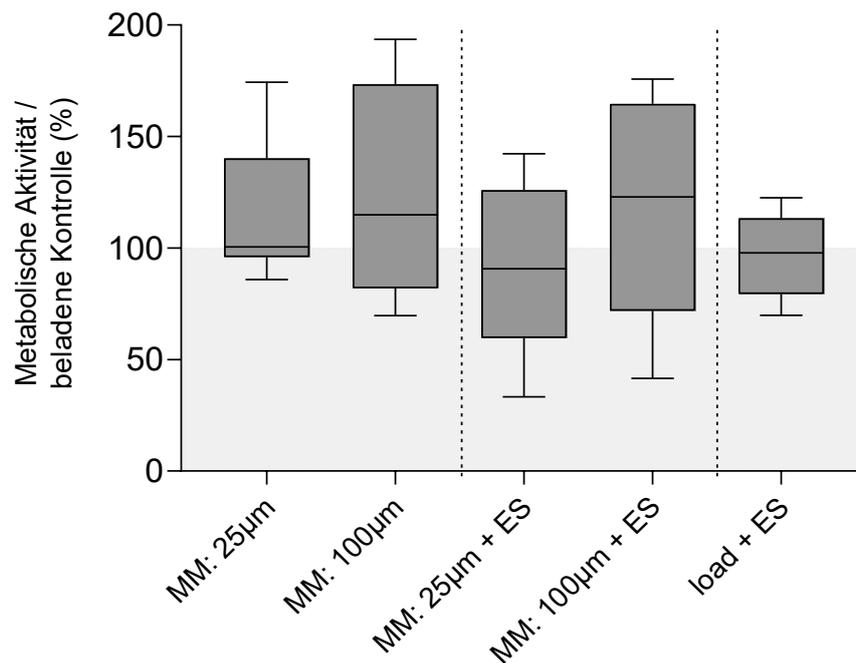


Abb. 5-9: Metabolische Aktivität humaner Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch über die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ).

In Abb. 5-10 ist die relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus der einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich zur beladenen Kontrolle veranschaulicht. Obwohl die Transkription von *COL1A1*- und *ALP*-mRNA durch keine der Versuchsgruppen signifikant beeinflusst werden konnte, fand sich nach der Behandlung mit 25  $\mu\text{m}$  harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen eine erhöhte Genexpressionsrate der beiden Marker (*COL1A1*: 120,4 %,  $p = 0,234$ ; *ALP*: 141,9 %,  $p = 0,195$ ). Verglichen mit der beladenen Kontrolle zeigte sich die Expression von *OC* nach einer Stimulation mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen im Median mehr als verdreifacht (322,9 %,  $p = 0,016$ ), während sie sich nach der kombinierten Stimulation mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen und 1- $V_{\text{eff}}$ -Elektrostimulation fast verdoppelte (171,5 %,  $p = 0,008$ ). Ferner fand sich innerhalb der beiden Versuchsgruppen sowohl bei der einzelnen ( $p = 0,02$ ) als auch kombinierten Stimulation ( $p = 0,008$ ) mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen ein signifikanter Unterschied der *OC*-Expression im Vergleich zur Behandlung mit 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen. Des Weiteren führte die alleinige Stimulation mit Mikrobewegungen von 100- $\mu\text{m}$ -Spitze-Tal-Werten zu einer Hochregulation der *OC*-Expression (133,2 %,  $p = 0,063$ ), jedoch ohne statistische Signifikanz, während die kombinierte Stimulation mit 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen und 1  $V_{\text{eff}}$  elektrischer Stimulation sowie die alleinige Elektrostimulation in den beladenen Proben keinen wesentlichen Einfluss auf die Transkription von *OC*-mRNA hatte.

Bei der vergleichenden Analyse der Versuchsgruppen zeigte sich nach der alleinigen Behandlung mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen eine signifikant höhere *OC*-Expression als bei der kombinierten Stimulation mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen und 1  $V_{\text{eff}}$  elektrischer Stimulation ( $p = 0,027$ ). Die kombinierte Stimulation hingegen führte zu einer signifikant hochregulierten Transkription von *OC*-mRNA verglichen mit der elektrischen Stimulation in beladenen Proben ( $p = 0,039$ ).

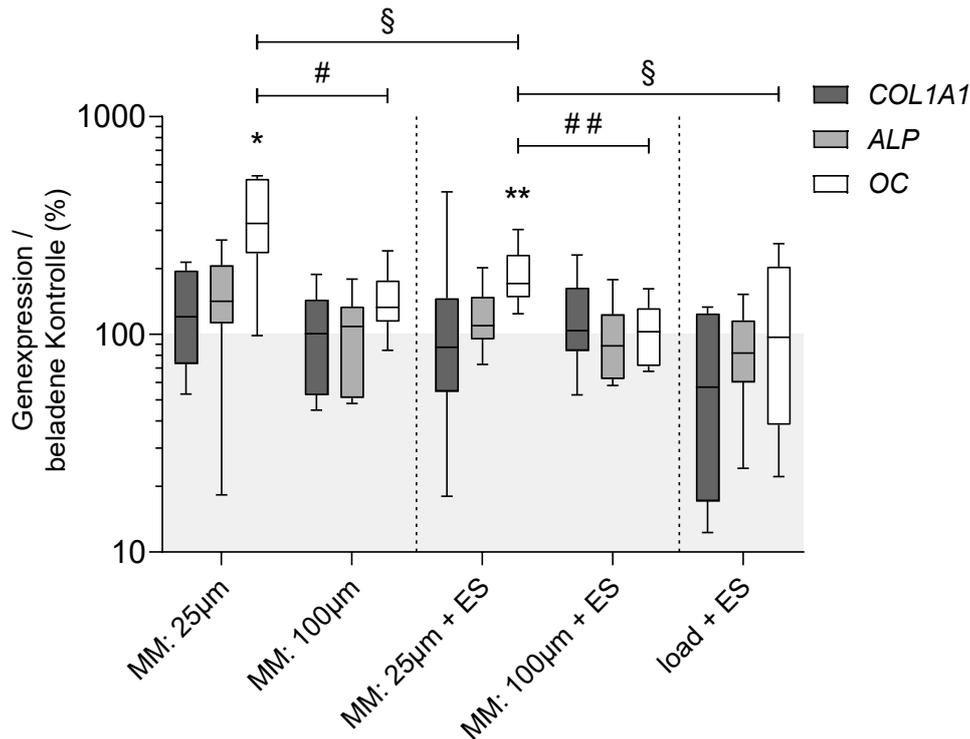


Abb. 5-10: Relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus: Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (OC) in humanen Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *COL1A1*, ALP und OC mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den beladenen Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  Vergleich zwischen verschiedenen Parametern (Mann-Whitney-U-Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der relativen Genexpression wurde, verglichen mit der beladenen Kontrolle, nach der Behandlung mit 25-µm-Mikrobewegungen eine leichte, aber nicht signifikante Hochregulation der Proteinfreisetzung von Prokollagen Typ I (110 %,  $p = 0,078$ ) und der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (114,4 %,  $p = 0,148$ ) beobachtet (siehe Abb. 5-11). Dagegen führte die Stimulation mit 100-µm-Mikrobewegungen zu einer geringen Abnahme beider Markerproteine (Prokollagen Typ I: 97,5 %,  $p = 0,4375$ ; ALP: 84,3 %,  $p = 0,1563$ ). Auch in der kombinierten Versuchsgruppe (MM + ES) zeigte sich kein signifikanter Unterschied der stimulierten Zellen verglichen zur beladenen Kontrolle. Während die Prokollagen-Typ-I-Proteinbiosynthese nach der Applikation von 1- $V_{\text{eff}}$ -Elektrostimulation in beladenen Proben signifikant abnahm (84,2 %,  $p = 0,02$ ), war die ALP-Aktivität im Vergleich zur beladenen Kontrolle signifikant erhöht (110,0 %,  $p = 0,025$ ). Nach der Behandlung mit 25-

$\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen waren sowohl die Proteinlevel von Prokollagen Typ I als auch Aktivitätslevel von ALP im Vergleich zur Applikation von 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen signifikant erhöht ( $p = 0,02$  für beide Marker).

Beim Vergleich der Versuchsgruppen war die Prokollagen-Typ-I-Synthese nach der kombinierten Stimulation mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen und 1  $V_{\text{eff}}$  elektrischer Simulation im Vergleich zur Elektrostimulation in beladenen Proben signifikant hochreguliert ( $p = 0,021$ ). Die ALP-Aktivität hingegen nahm nach der kombinierten Stimulation mit 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen und 1  $V_{\text{eff}}$  elektrischer Stimulation im Vergleich zu beladenen Proben, die ausschließlich mit Elektrostimulation behandelt wurden, signifikant ab ( $p = 0,014$ ).

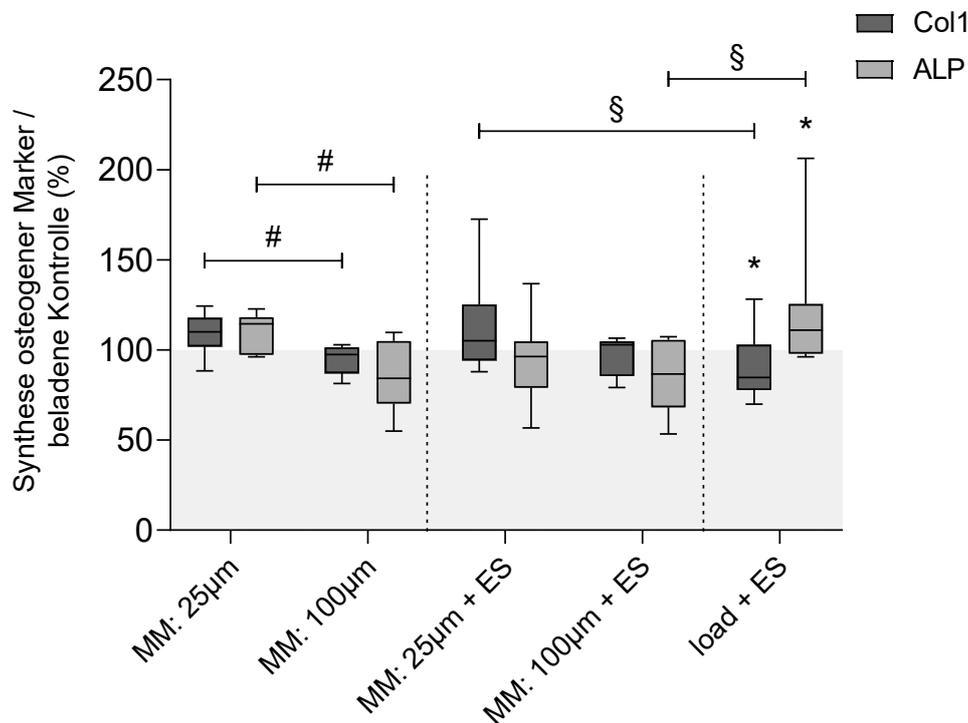


Abb. 5-11: Synthese osteogener Marker: Prokollagen Typ I (Col1) und Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Die Freisetzung von Prokollagen Typ I im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die ALP-Aktivität wurde kolorimetrisch über die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den beladenen Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Parametern (Mann-Whitney-U-Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test).

Nicht nur bei der Expression der am Knochenaufbau beteiligten Gene, sondern auch bei der in Abb. 5-12 dargestellten Expression von Genen des Knochenumbaus konnten Veränderungen durch die verschiedenen biophysikalischen Stimulationen festgestellt werden. So zeigte sich die Transkription von *TIMP1*-mRNA, im Vergleich zu den beladenen Kontrollen, in allen Versuchsgruppen hochreguliert und erreichte eine Signifikanz, wenn sie mit 25- $\mu$ m-Mikrobewegungen (159,6 %;  $p = 0,008$ ) oder Elektrostimulation in beladenen Proben behandelt wurde (146,6 %;  $p = 0,045$ ). Zusätzlich war, verglichen mit den beladenen Kontrollen, eine erhöhte Transkription der *OPG*-mRNA nach Behandlung mit 25 und 100  $\mu$ m sowohl bei der Einzel- (MM: 25  $\mu$ m: 147,1 %;  $p = 0,0547$ ; MM: 100  $\mu$ m: 152 %;  $p = 0,094$ ) als auch bei der kombinierten Stimulation (MM: 25  $\mu$ m + ES: 127,3 %;  $p = 0,25$ ; MM: 100  $\mu$ m + ES: 136,6 %;  $p = 0,063$ ) nachweisbar. Eine statistische Signifikanz wurde hierbei jedoch nicht erreicht.

Beim Vergleich der Versuchsgruppen zeigte sich die *OPG*-Expression nach der kombinierten Stimulation mit 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen und 1  $V_{\text{eff}}$  elektrischer Stimulation im Vergleich zur Elektrostimulation von beladenen Proben signifikant höher ( $p = 0,042$ ).

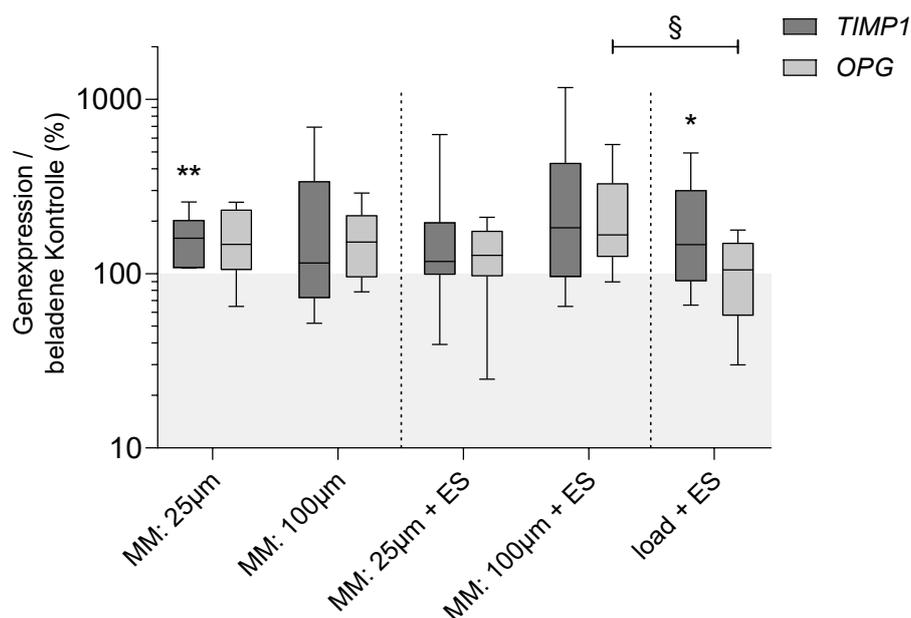


Abb. 5-12: Relative Genexpression von Mediatoren des Knochenumbaus: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1* (*TIMP1*) und Osteoprotegerin (*OPG*) in humanen Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *TIMP1* und *OPG* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den beladenen Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test).

Zusammenfassend hatte eine Stimulation mit 25- $\mu$ m-Mikrobewegungen einen signifikanten Anstieg der Transkription von *OC*- und *TIMP1*-mRNA zur Folge, während bei einer Stimulation mit Spitze-Tal-Werten von 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen keine signifikante Veränderung des Knochenstoffwechsels nachweisbar war. Im direkten Vergleich beider Mikrobewegungen zeigte sich zudem bei den osteogenen Markern Prokollagen Typ I und ALP sowie der Genexpression von *OC* ein signifikanter Vorteil der Stimulation mit 25  $\mu$ m gegenüber einer Behandlung mit 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen.

Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der kombinierten Stimulation. Auch hier zeigte sich bei der Stimulation mit 25- $\mu$ m-Mikrobewegungen ein signifikanter Anstieg der Transkription von *OC*-mRNA, sowohl im Vergleich zur beladenen Kontrolle als auch zur kombinierten Stimulation mit 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen. Die zusätzliche Elektrostimulation von beladenen Proben führte zu einem signifikanten Anstieg der ALP-Aktivität und der Transkription von *TIMP1*-mRNA, während die Syntheserate von Prokollagen Typ I, verglichen mit den beladenen Proben ohne Elektrostimulation, signifikant abnahm.

Der Vergleich der Versuchsgruppen zeigte bezogen auf die *OC*-Expression einen Vorteil der alleinigen Stimulation mit 25  $\mu$ m gegenüber der kombinierten Stimulation mit 25- $\mu$ m-Mikrobewegungen und Elektrostimulation. Letztere wiederum führte zu einer signifikant höheren Transkription von *OC*-mRNA sowie einer signifikant höheren Prokollagen-Typ-I-Synthese verglichen mit der alleinigen Elektrostimulation in beladenen Proben. Zudem zeigte die kombinierte Stimulation mit 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen und Elektrostimulation eine signifikant höhere *OPG*-Expression verglichen mit der Elektrosimulation in beladenen Proben, während die Prokollagen-Typ-I-Synthese im Vergleich signifikant abnahm.

## 6 Diskussion

Während bereits mehrere Studien den Einfluss mechanischer oder elektrischer Stimulationsverfahren auf die Osteogenese untersucht haben, gibt es bislang kaum Arbeiten, die den Effekt einer kombinierten Stimulation auf Osteoblasten beziehungsweise Knochengewebe aufgezeigt haben. Dabei bildet die Untersuchung dieser kombinierten biophysikalischen Stimulation eine annähernd physiologische Abbildung der im lebenden Knochen ablaufenden Prozesse, in denen mechanische und elektrische Stimuli simultan auf den belasteten Knochen einwirken [135]. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein In-vitro-System etabliert, das sowohl eine mechanische Belastung mittels harmonisch oszillierenden Grenzflächenmikrobewegungen als auch eine elektrische Stimulation mittels kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder auf mit humanen Osteoblasten besiedelte Kollagen-Scaffolds ausüben kann.

### 6.1 Versuchsaufbau

Die verwendeten Stimulationsparameter für die Elektrostimulation (Spannungen) und die Grenzflächenmikrobewegungen (Spitze-Tal-Werte, Frequenz, Wellenform und Stimulationszeit) wurden auf Grundlage früherer beziehungsweise parallel ablaufender Studien unserer Arbeitsgruppe ausgewählt. Entsprechend zeigten Krueger *et al.* [116] unter Verwendung des in 4.1.2 beschriebenen Elektrostimulationssystems erhöhte Syntheseraten von Kollagen Typ I und II sowie Glykosaminoglykanen in humanen Chondrozyten nach einer Stimulation mit  $100 \text{ mV}_{\text{eff}}$  bei einer Frequenz von 1 kHz. Zur Adaption des Elektrostimulationssystems an Osteoblasten erfolgte eine Anpassung der Parameterkonfigurationen anhand von Referenzstudien. So fanden Brighton *et al.* [93] einen signifikanten Anstieg der Proliferationsrate von Ratten-Knochenzellen nach dem Anlegen von sinusförmigen kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern mit einer Frequenz von 60 kHz, wenn die Stimulation kontinuierlich für 6 h erfolgte. Ferner zeigten Brighton *et al.* [136] radiologisch, mechanisch und histologisch anhand von Fibula-Knochen von Kaninchen, dass Frequenzen von 60 kHz gegenüber 10 beziehungsweise 250 kHz am besten zur Stimulation von Frakturen geeignet sind. Seither wurde diese Frequenz in einer Vielzahl weiterer Studien für die Stimulation von Knochengewebe eingesetzt [137, 141].

Das für die vorliegende Arbeit eingesetzte Mikrobewegungssystem wurde erstmals von Ziebart *et al.* [74] beschrieben. Sie untersuchten den Einfluss von Grenzflächenmikrobewegungen zwischen 25 und 100  $\mu\text{m}$ , die bei einer Frequenz von 1 Hz mittels planer Ti6Al4V-Zylinder auf in Kollagen-Scaffold ausgesäte humane Osteoblasten appliziert wurden. Unter Verwendung eines analogen Versuchsaufbaus wurden in dieser Arbeit jedoch angeraute Ti6Al4V-

Zylinderoberflächen für die mechanische Stimulation der Osteoblasten verwendet. Hierdurch sollte eine bessere Darstellung der In-vivo-Verhältnisse an der Grenzfläche zwischen Knochen und zementfreiem Implantat nach initialer Fixierung erreicht werden. Daher wurden die Unterseiten der Ti6Al4V-Zylinder durch Korundstrahlen auf einen Mittenrauwert von  $3,06 \mu\text{m}$  (Standardabweichung:  $0,21 \mu\text{m}$ ) angeraut. Somit lag der Mittenrauwert der Titankörper im Bereich von 3 bis  $5 \mu\text{m}$  für mit Sandstrahlen bearbeitete, kommerziell erhältliche Implantate [1423144]. Mehrere In-vitro-Studien konnten einen positiven Einfluss von moderat angerauten Oberflächen auf die Zelladhäsion [145], Zellaktivität und Kollagensynthese [146, 147] von Osteoblasten nachweisen. Entsprechend bilden angeraute Titanoberflächen eine vorteilhafte Struktur für die Osseointegration von Implantaten [146, 148].

Während frühere In-vitro-Studien vor allem Osteosarkom-Zelllinien wie MG-63 und SaOS-2 oder Primärzellen anderer Säugetier-Spezies nutzten, wurden in dieser Arbeit ausschließlich primäre humane Osteoblasten für die Experimente genutzt. Der Hauptvorteil primärer Zellen ist dabei ihre Aussagekraft, da osteoblastische Zelllinien beziehungsweise Osteoblasten anderer Spezies das Verhalten der Knochenzellen im Patienten nicht vollständig widerspiegeln [115, 131]. So konnten beispielsweise Saldaña *et al.* [149] nachweisen, dass osteoblastische Zelllinien nach der Kultivierung auf Ti6Al4V-Oberflächen beziehungsweise nach Behandlung mit Titanpartikeln andere Reaktionen in Bezug auf die metabolische Aktivität und Proteinbiosynthese aufweisen als humane Osteoblasten.

Auch wurden im Vergleich zu früheren Studien, die sich mit dem Einfluss von Mikrobewegungen und Elektrostimulation auseinandersetzten, 3D-Zellkulturen anstelle von Monolayer-Kulturen verwendet. Dabei verbessern dreidimensionale Kollagengerüste durch ihre biomimetische Natur die Zelladhäsion sowie die osteogene Differenzierung und bewirken eine genauere Nachahmung der natürlichen Zellumgebung [150].

## **6.2 Einfluss der Elektrostimulation auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau**

Kapazitiv eingekoppelte elektrische Wechselfelder wurden bereits in mehreren tierexperimentellen Studien erfolgreich zur Behandlung von Frakturen [136, 151] und Förderung der Osseointegration [1523154] eingesetzt. Des Weiteren konnten in klinischen Studien Erfolge am Menschen bei der Unterstützung der Behandlung von Pseudarthrosen [155, 156], Stressfrakturen [157] und Spondylodesen [158] erzielt werden. Dennoch sind die genauen Mechanismen, mit denen das elektrische Feld auf den Knochenstoffwechsel eingreift, nicht vollständig geklärt. Zudem wurden in In-vitro-Studien unterschiedliche Stimulationsparameter, wie Feldstärke, Stimulationsintervall und -dauer sowie Frequenz, eingesetzt. Das primäre Ziel dieser In-vitro-Arbeit war zu evaluieren, ob kapazitiv

eingekoppelte elektrische Wechselfelder die periimplantäre Knochenheilung begünstigen, um als unterstützende Therapie zur Förderung der Osseointegration von Implantaten einen Beitrag leisten zu können. Die Bestimmung der optimalen Parameterkonfigurationen soll in nachfolgenden Studien erfolgen.

Als sekundäres Ziel der Arbeit sollte untersucht werden, ob das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Stimulationssystem zur Stimulation von 3D-Kulturen humaner Osteoblasten geeignet ist, um in weiteren Studien die genauen Mechanismen der Elektrostimulation auf den Knochenstoffwechsel entschlüsseln zu können.

In den durchgeführten Versuchen wurde für die Elektrostimulation ein signifikanter Einfluss auf den Zellstoffwechsel der Osteoblasten beobachtet. Brighton *et al.* [93] untersuchten anhand von Schädelknochenzellen von Ratten die Wirksamkeit elektrischer Feldstärken im Bereich von 0,01 bis 20 mV/cm bei einer Sinusfrequenz von 60 kHz für verschiedene Stimulationsintervalle. Basierend auf den Versuchsergebnissen und im Vergleich zu einer Stimulation mit 0,0001 mV/cm bei einer Frequenz von 10 Hz schlussfolgerten Brighton *et al.* [93], dass die optimale Feldstärke zur Stimulation von Knochenzellen zwischen 0,1 und 20 mV/cm liegt. In diesem Bereich zeigte sich eine signifikante Zunahme des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus in die DNA, was auf eine erhöhte Zellproliferation hinweist [159]. In der vorliegenden Arbeit war die als Proliferationsmarker dienende metabolische Aktivität, nach der Elektrostimulation mit 100 mV<sub>eff</sub>, die gemäß der durchgeführten Numerischen Simulation zu einer elektrischen Feldstärke von ca. 0,003 mV/cm führte, signifikant erhöht. Die Zellviabilität war dabei nicht nur im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, sondern auch zu jenen Proben, die mit einer 10-mal höheren Spannung von 1 V<sub>eff</sub> behandelt wurden, signifikant hochreguliert. Somit hatte in der vorliegenden Arbeit die niedrigere elektrische Feldstärke von 0,003 mV/cm einen günstigeren Einfluss auf den Zellmetabolismus als die höhere von 0,03 mV/cm. In einer anderen Studie untersuchten Fitzsimmons *et al.* [160] Monolayer-Kulturen von Hühner-Schädelknochenzellen, die für 30 min mit einem kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeld von 0,0001 mV/cm bei einer deutlich niedrigeren Frequenz von 10 Hz stimuliert wurden. Entgegen den Ergebnissen von Brighton *et al.* [93] zeigte sich hier ein signifikanter Anstieg des <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbaus sowie der DNA-Syntheserate als Hinweis auf eine erhöhte Zellproliferation. Bisceglia *et al.* [137] untersuchten den Einfluss einer einstündigen Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern bei einer Feldstärke von 0,3 mV/cm bei ebenfalls 60 kHz auf osteoblastenähnliche SaOS-2-Zellen. Die Zellviabilität wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Während die Viabilität durch die Stimulation nicht wesentlich beeinflusst wurde, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität 4 h nach der Behandlung der Zellen, wobei diese 24 h nach der Stimulation wieder in den Bereich der unbehandelten Kontrolle abfiel. Ähnlich den Ergebnissen von Bisceglia *et al.* [137] wurde in der vorliegenden Arbeit, unter Verwendung einer zehnmal niedrigeren Feldstärke von

0,03 mV/cm, kein signifikanter Anstieg der Zellviabilität durch die Elektrostimulation mit 1 V<sub>eff</sub> beobachtet, während die ALP-Aktivität nach der Applikation signifikant erhöht war. Auch Brighton *et al.* [93] konnten zeigen, dass elektrische Stimulationen mit 0,01 und 0,1 mV/cm bei 60 kHz die ALP-Aktivität der Knochenzellen signifikant erhöhen. Griffin *et al.* [42] hingegen nutzten ein höheres elektrisches Feld von 1 mV/cm bei einer niedrigen Frequenz von 16 Hz, um SaOS-2-Monolayer-Kulturen zu stimulieren. Als Stimulationsintervall wurde eine zweimalige Behandlung für jeweils 4 h mit einer 20-stündigen Stimulationspause gewählt. Hierunter zeigte sich eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität der Zellen unter Verwendung des Stoffwechselaktivitätstests WST-1. Zudem konnte nach dem zweiten Stimulationsintervall ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität nachgewiesen werden. Griffin *et al.* [42] fanden in ihrer Arbeit einen signifikanten Anstieg der Genexpression von *COL1A1*, *ALP* und *OC*. Hingegen wurde in der vorliegenden Studie die Transkription von *COL1A1*-, *ALP*- und *OC*-mRNA durch die elektrische Stimulation nicht beeinflusst, während sich die relative Genexpression von *TIMP1* und *OPG* nach der Behandlung mit einer Feldstärke von 0,003 mV/cm signifikant erhöhte. Diese Ergebnisse weisen auf eine spannungsabhängige Veränderung des Knochenbaus hin, eine Hypothese, die von Rubin *et al.* [161] verfolgt wurde. Rubin *et al.* [161] fanden unter Verwendung eines In-vivo-Osteopeniemodells, dass die Knochenresorption durch das Anlegen elektrischer Felder unter 0,01 mV/cm verhindert werden kann, sofern das Knochengewebe bei Frequenzen zwischen 50 und 150 Hz für 1 h pro Tag stimuliert wird.

Andere In-vitro-Studien hingegen nutzen wesentlich höhere elektrische Feldstärken zur Stimulation der Zellen. So fanden Clark *et al.* [138] eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression mehrerer Gene der *Transforming Growth Factor* (TGF)- $\beta$ -Familie (*Bone Morphogenetic Proteins* (BMP)-2 und -4, TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3) sowie vom *Fibroblast Growth Factor* (FGF)-2, *OC* und *ALP* nach der Stimulation von humanen Osteoblasten des Schädelknochens mit einem kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeld von 20 mV/cm. Die Zellen wurden dabei in einem 1-minütigen An-/Aus-Zyklus für jeweils 2 h stimuliert. Als Frequenz verwendeten Clark *et al.* [138] ebenfalls 60 kHz. Hronik-Tupaj *et al.* [162] zeigten bei der Untersuchung elektrischer Stimulation auf mesenchymale Stammzellen unter Verwendung der gleichen Stimulationsparameter von 20 mV/cm bei 60 kHz einen signifikanten Anstieg der Expression von *COL1A1*- und *ALP*-mRNA nach einer 20-tägigen Stimulation mit einem Behandlungsintervall von 40 min pro Tag. Des Weiteren verwendeten Hartig *et al.* [108] eine Sägezahnspannung von 100 V bei einer Frequenz von 16 Hz, mit der sie ein berechnetes elektrisches Feld von 60 000 mV/cm für die Stimulation nutzten. Dabei zeigte sich nach einer siebentägigen kontinuierlichen Elektrostimulation von bovinen Osteoblasten ein signifikanter Anstieg von sowohl der Zellzahl als auch ALP-Aktivität. Zudem

fanden Hartig *et al.* [108] immunhistochemisch einen signifikanten Anstieg der Proteine Kollagen Typ I und Osteocalcin.

Ein direkter Vergleich der genannten Studien ist nicht nur hinsichtlich der stark variierenden elektrischen Feldstärken eine Herausforderung, sondern aufgrund teilweise unterschiedlicher verwendeter Proliferations- und Aktivitätsmarker, Versuchsaufbauten sowie Stimulationszeiten. Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass mit Ausnahme von Clark *et al.* [138] in allen genannten Studien entweder Zelllinien-Osteoblasten oder Knochenzellen anderer Spezies für die Versuche verwendet wurden. Spezies-abhängige, genomische und phänotypische Unterschiede müssen daher beim Vergleich der elektrischen Stimulation der Zellen berücksichtigt werden. Zudem wurden in früheren In-vitro-Studien ausschließlich Monolayer-Kulturen genutzt. Diese sind jedoch nur bedingt geeignet, um das In-vivo-Milieu sowie die Knochengewebsmineralisation nachzuahmen [131]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Numerische Simulation angewendet, um die applizierte elektrische Feldstärke zu ermitteln. Diese spiegelt die tatsächlich wirkende Feldstärke nur mit einer entsprechenden Unsicherheit wider. In nachfolgenden Studien sollte mittels entsprechender komplexer Messsysteme die exakt vorherrschende elektrische Feldstärke präzise experimentell ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellproliferation bei reduzierter Proteinbiosynthese von Prokollagen Typ 1, was auf einen wachstumsstimulierenden Reiz der niedrigeren elektrischen Stimulation mit 0,003 mV/cm hindeuten könnte. Zudem scheint die Behandlung mit 100 mV<sub>eff</sub> einen Einfluss auf Knochenumbauprozesse zu haben. So fand sich nach der Stimulation ein signifikanter Anstieg der Transkription von *TIMP1*- und *OPG*-mRNA. Demgegenüber zeigte die Applikation der Elektrostimulation keinen signifikanten Einfluss auf die relative Genexpression der Marker des Knochenaufbaus, während die Stimulation mit 1 V<sub>eff</sub> zu einem signifikanten Anstieg der ALP-Aktivität führte.

Entsprechend Stein *et al.* [30] muss die Proliferation herunterreguliert werden, damit Osteoblasten ihre Reifungsstadien der Differenzierung durchlaufen können. Von den drei Hauptperioden der Osteoblastenreifung Proliferation, Matrixentwicklung und -reifung sowie Mineralisation umfassen die beiden letztgenannten Stadien die Differenzierung. Eine höhere Expression differenzierungsbezogener Gene wie *COL1A1* und *ALP* sowie ein Anstieg der entsprechenden Proteinbiosynthese impliziert dabei den Übergang zu späteren Stadien [30, 42]. Eine signifikante Abnahme der Zellproliferation im Vergleich zur Stimulation mit 100 mV<sub>eff</sub> sowie ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität in der Elektrostimulation mit 1 V<sub>eff</sub> könnten somit auf eine beginnende Entwicklung der Osteoblasten zu den Reifestadien hindeuten [42]. So konnten Griffin *et al.* [42] zeigen, dass verschiedene Formen der Elektrostimulation den mehrstufigen Prozess der Osteoblastenreifung einleiten können, wobei bereits eine

geringfügige Veränderung des äußeren elektrischen Feldes einen signifikanten Einfluss auf die elektrophoretische Bewegung und Umverteilung von Proteinen innerhalb der Zellplasmamembran hat [163]. Um diese Hypothese zu verifizieren, sind allerdings weitere Versuche mit höheren Feldstärken nötig. Zudem sollte in weiteren Untersuchungen evaluiert werden, wie unterschiedliche elektrische Feldstärken genutzt werden können, um den Knochenumbau zu fördern und eine übermäßige Knochenresorption zu verhindern [161].

### **6.3 Einfluss der Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern und der Elektrostimulation auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau**

Während die Biokompatibilität von Titanlegierungen wie Ti6Al4V bereits in mehreren Studien [70, 164] nachgewiesen wurde und sich diese Legierung für Implantate durchsetzen konnte [71], sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welchen Einfluss die statische Beladung mit angerauten Ti6Al4V-Zylindern auf das Verhalten humaner Osteoblasten hat. Hierbei übten die Zylinder einen statischen Druck von ca. 429 Pa auf die im Zellkulturmedium befindlichen zellbesiedelten Kollagen-Scaffolds aus.

In vorliegenden Versuchen zeigte sich, dass sowohl die metabolische Aktivität als auch relative Genexpression von *OC* durch die Beladung mit Ti6Al4V-Zylindern nicht signifikant beeinflusst wurde, wobei die Transkription von *OC*-mRNA leicht herunterreguliert war. Dagegen zeigten sich *Col1A1*- und *ALP*-mRNA-Transkripte sowie deren Protein- und Aktivitätsniveaus in den beladenen Proben signifikant reduziert.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Pioletti *et al.* [124] nach Anwendung einer vergleichbaren Druckbelastung von 500 Pa auf osteoblastenähnliche MG-63-Zellen beschrieben. Sie stellten fest, dass die Zellviabilität durch die statische Druckbelastung nicht beeinträchtigt wird, während die Beladung die getesteten Gene (*COL1A1*, *COL1A2*, *OC* und *Osteonectin*) stärker herunterregulierte als eine kombinierte Behandlung aus Beladung und 10- $\mu$ m-Mikrobewegungen. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Pioletti *et al.* [124] Monolayer-Kulturen und Edelstahl in ihren Versuchen verwendeten. Hu *et al.* [165] untersuchten den Einfluss verschiedener Kompressionsdrucke auf fetale humane Osteoblasten. Hierbei zeigte sich, dass Drucke unter 100 kPa keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum haben und statische Drucke von 20 kPa im Vergleich zu Zellen ohne Behandlung mit statischer Druckbelastung sogar zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl führen können. Währenddessen führten Drucke über 100 kPa zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl. Kompressionsdrucke von 250 beziehungsweise 500 kPa reduzierten zudem signifikant die ALP-Aktivität und die Transkription von *COL1A1*- und *OC*-mRNA. Da diese Drucke jedoch um ein Vielfaches höher sind als der im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzeugte Kompressionsdruck von 429 Pa, ist es eher unwahrscheinlich, dass die Ti6Al4V-Zylinder

aufgrund der statischen Druckbelastung einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung ausgeübt haben.

Markhoff *et al.* [164] kultivierten MG-63-Zellen sowie humane Osteoblasten, Fibroblasten und Makrophagen für 96 h auf verschiedenen Titanlegierungen und untersuchten zudem den Einfluss vorinkubierten Kulturmediums, das für 72 h den jeweiligen Legierungen ausgesetzt war. Hierzu verwendeten sie unter anderem Ti6Al4V-Titankörper mit einem Mittelrauwert von 2,38 µm. In ihrer Studie zeigte sich in Bezug auf die metabolische Aktivität kein signifikanter Unterschied zwischen dem vorinkubierten Kulturmedium, das den Ti6Al4V-Titankörpern ausgesetzt war, und der unbehandelten Kontrolle. Hingegen offenbarte sich nach Kultivierung humaner Osteoblasten auf Ti6Al4V-Titankörpern eine signifikante Abnahme der Zellviabilität verglichen mit Zellen, die auf Polystyrol kultiviert wurden. Des Weiteren fand sich in der Arbeit von Markhoff *et al.* [164], wie in der vorliegenden Arbeit, eine signifikante Abnahme der Transkription von *COL1A1*-mRNA. Die Synthese von Prokollagen Typ I wurde dagegen verglichen mit der Kontrolle nicht signifikant beeinflusst, während die Transkription von *MMP1*-mRNA sowie die *MMP1*-Proteinbiosynthese im Vergleich zur Kontrolle leicht, aber nicht signifikant, anstiegen. Demgegenüber waren in der vorliegenden Arbeit die *TIMP1*-mRNA-Transkripte in beladenen Proben im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant erhöht, während die Genexpression von *MMP1* weitestgehend unterhalb der Nachweisgrenze lag, was auf einen Schutz der mineralisierten Knochenmatrix vor Degeneration hindeuten könnte [46, 48]. Beim Vergleich sollte berücksichtigt werden, dass in den Versuchen von Markhoff *et al.* [164] die Osteoblasten als Monolayer-Kulturen direkt auf die Ti6Al4V-Oberflächen gesät wurden, während die Zellen für die vorliegende Arbeit in Kollagen-Scaffolds kultiviert wurden und somit nur einen indirekten Kontakt zur Ti6Al4V-Oberfläche hatten. Auch wurden in den vorliegenden Versuchen die Zellen für 120 h ohne einen Mediumwechsel mit den Titankörpern kultiviert, anstatt für 96 h mit zweitägigem Wechsel des Zellkulturmediums. Es ist davon auszugehen, dass die Wechselwirkungen zwischen den Osteoblasten und dem Ti6Al4V-Zylinder einen Einfluss auf das Zellverhalten haben.

Nach Evaluierung des Einflusses der Ti6Al4V-Zylinder auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau sollte untersucht werden, inwiefern sich dieser durch eine zusätzliche Elektrostimulation beeinflussen lässt. Dadurch sollten Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder zur biophysikalischen Stimulation der Osseointegration von Implantaten gezogen werden. So konnten In-vivo-Studien [1523154] bereits einen positiven Einfluss kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder auf die Osseointegration nachweisen. Ochi *et al.* [153] stimulierten dentale Ti6Al4V-Implantate im distalen Femur von Kaninchen für 14 Tage mit einer angelegten Spannung von 10 V bei einer Frequenz von 60 kHz. Die Applikation der elektrischen Wechselfelder erfolgte für 4 beziehungsweise 8 h pro Tag. Hier zeigte sich in der

histologischen Untersuchung der Stimulationsgruppen eine deutliche Zunahme der Menge des neugebildeten Knochens und der Knochen-Implantat-Kontaktfläche, wobei die Zunahme in der 8-h-Stimulationsgruppe größer war. Zudem fand sich eine signifikante Zunahme der Verankerungsstabilität der eingesetzten Implantate im Knochenlage in den 4-h- und 8-h-Stimulationsgruppen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit führte die elektrische Stimulation der beladenen Proben mit einer Spannung von  $1 V_{\text{eff}}$  zu einem signifikanten Anstieg der Zellviabilität sowohl im Vergleich zur unbehandelten als auch beladenen Kontrolle. In der Numerischen Simulation zeigten sich im Bereich der Elektroden an den Rändern des Zylinders elektrische Feldstärken von 0,01 bis 0,035 mV/cm. Unterhalb des Ti6Al4V-Zylinders hingegen betrug die Feldstärke in der Simulation unter 0,005 mV/cm. Des Weiteren zeigte sich bei der Analyse der Marker des Knochenaufbaus eine signifikante Abnahme der Transkription der *COL1A1*- und *ALP*-mRNA sowie deren Synthese- und Aktivitätslevel im Vergleich zur unbeladenen Kontrolle, entsprechend den Ergebnissen der beladenen Proben ohne Elektrostimulation. Verglichen mit Letzterer zeigten sich die *COL1A1*-Expression und die Prokollagen-Typ-1-Proteinbiosynthese signifikant herunterreguliert. Bezogen auf die Marker des Knochenumbaus zeigte die Elektrostimulationsgruppe keinen signifikanten Unterschied zu den beladenen Proben ohne zusätzliche Stimulation. Es fand sich jedoch eine signifikante Zunahme der Transkription von *TIMP1*-mRNA im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Trotz deutlicher Abschwächung der elektrischen Feldstärke durch die Ti6Al4V-Zylinder, fand sich ein signifikanter Einfluss der Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern auf das Zellverhalten der Osteoblasten. Zudem führte die zusätzliche Stimulation mit einer angelegten Spannung von  $1 V_{\text{eff}}$  zu einem signifikanten Anstieg der Zellviabilität und zu einer Abnahme der Expression und Synthese von Kollagen Typ 1, ähnlich den Ergebnissen der  $100 mV_{\text{eff}}$  Elektrostimulation ohne Titankörper.

#### **6.4 Einfluss von Mikrobewegungen und Elektrostimulation auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau**

Während sich bereits mehrere In-vivo-Studien mit dem Einfluss von Grenzflächenbewegungen auf die Osseointegration auseinandergesetzt haben, gibt es bisher nur wenige In-vitro-Studien, die die zellulären und molekularen Mechanismen von Mikrobewegungen an der Knochen-Implantat-Grenze untersuchen. In mehreren In-vitro-Arbeiten [80383] konnte ein positiver Einfluss der mechanischen Belastung auf die Viabilität und Differenzierung von osteogenen Zellen nachgewiesen werden. So stellten beispielsweise Nishioka *et al.* [82] einen signifikanten Anstieg der DNA-Synthese, kollagenen Proteinbiosynthese und ALP-Aktivität nach Anwendung zyklischer mechanischer Dehnung auf murine Osteosarkoma-Zellen fest. In der

vorliegenden Arbeit sollte ein besonderes Augenmerk auf den Einfluss von Grenzflächenmikrobewegungen gelegt werden. Ziebart *et al.* [74] fanden hierbei unter Verwendung planer Ti6Al4V-Zylinder eine signifikante Zunahme der metabolischen Aktivität von humanen Osteoblasten nach Stimulation mit sinusförmigen 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen sowohl im Vergleich zur beladenen als auch unbehandelten Kontrolle. Des Weiteren zeigte sich die Proteinbiosynthese von Prokollagen Typ I nach der Behandlung mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen signifikant verringert. Analog induzierte die Stimulation eine Abnahme der Transkription von *COL1A1*-mRNA, während die *ALP*-Expression sowie das Aktivitätsniveau nicht signifikant beeinflusst wurden. In der vorliegenden Arbeit fand sich jedoch eine andere Reaktion der Osteoblasten auf die mechanische Stimulation. Während die Zellviabilität durch die Mikrobewegungen nicht signifikant beeinflusst wurde, waren die Synthese von Prokollagen Typ I und die *ALP*-Aktivität nach einer Stimulation mit 25- $\mu\text{m}$ -Spitze-Tal-Werten im Vergleich zur Stimulation mit 100  $\mu\text{m}$  signifikant erhöht. Zudem waren die *COL1A1*- und *ALP*-Genexpressionsraten erhöht. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass Ziebart *et al.* [74] die Prokollagen-Typ-I-Konzentrationen nicht auf den Gesamtproteingehalt normierten, sodass die Ergebnisse abweichen können. Übereinstimmend mit der Arbeit von Ziebart *et al.* [74] zeigte sich die *OC*-Expression nach der Applikation von 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen im Vergleich zur beladenen Kontrolle signifikant erhöht. Darüber hinaus war in der vorliegenden Arbeit die Transkription von *OC*-mRNA im Vergleich zur Stimulation mit 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen sowohl bei der Einzel- als auch bei der kombinierten Stimulation signifikant hochreguliert, was auf eine fortgeschrittene osteogene Differenzierung hindeutet [30].

Dennoch weisen die unterschiedlichen Resultate dieser Arbeit und der Ergebnisse von Ziebart *et al.* [74] darauf hin, dass die Zellproliferation und -differenzierung durch die Oberflächenbeschaffenheit der Titankörper beeinflusst werden, die die Mikrobewegungen auf die Osteoblasten ausüben. Dies lässt sich auf die unterschiedlichen Ausmaße an Scherbeanspruchung und Zelladhäsion zurückführen, die durch eine erhöhte Oberflächenrauheit entstehen [5,49].

Es fällt auf, dass bei den Versuchen nicht nur die Knochenbildung, sondern auch der Knochenumbau durch die Simulation mit Mikrobewegungen beeinflusst wurde. So kam es nach der Behandlung mit 25- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen zu einem signifikanten Anstieg der *TIMP1*-mRNA, was einen Einfluss der mechanischen Stimulation auf Knochenumbauprozesse belegt [49]. Währenddessen lag die relative Genexpression von *MMP1*-mRNA wiederholt unterhalb der Nachweisgrenze. So könnte eine Induktion der *TIMP1*-Expression bei verminderter Transkription von *MMP1*-mRNA auf eine verringerte Knochenresorption und eine Erhöhung der Knochendichte hindeuten [46]. Auch in der Studie von Ziebart *et al.* [74] zeigte sich die relative Genexpression von *TIMP1* um den Faktor  $10^3$  beziehungsweise  $10^4$  höher als die

*MMP1*-Expression. Jedoch fand sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

Ebenfalls zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nach der Applikation von Mikrobewegungen die Transkription von *OPG*-mRNA erhöht, was auf einen verminderten Knochenabbau hindeuten könnte [27]. Bei einem Anstieg unterhalb der Signifikanzniveaus und einem fehlenden quantitativen Nachweis von *RANKL*-mRNA als Gegenspieler kann allerdings keine zuverlässige Aussage über den Einfluss der Mikrobewegungen auf das *RANKL/OPG*-Zytokinsystem getroffen werden. In weiteren Studien müssen neben der relativen Genexpression zudem quantitative Messungen der *RANKL*- und *OPG*-Proteinlevel aus dem Zellkulturüberstand erfolgen, um den Einfluss der Mikrobewegungen auf den *RANKL/OPG*-Signalweg genauer zu evaluieren.

Auch Stadelmann *et al.* [75] untersuchten den Einfluss von 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen auf Knochenumbauprozesse, die unter einer Druckbelastung von 500 kPa in einem Ex-vivo-Versuch auf menschliche Femurköpfe appliziert wurden. Dabei zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Transkription von *RANKL*-mRNA, während die *OPG*-Expression signifikant verringert wurde.

Anhand der Ergebnisse von Stadelmann *et al.* [75] und in Anbetracht der in 2.4.2 genannten In-vivo-Studien, in denen sich eine insuffiziente Osseointegration in Anwesenheit von Mikrobewegungen größer als 40  $\mu$ m zeigte [4, 12315], wäre eine Abnahme der Zellproliferation und sowie eine Zunahme des *RANKL/OPG*- beziehungsweise *MMP1/TIMP1*-Quotienten nach der Stimulation mit 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen zu erwarten. Jedoch hatte in der vorliegenden Arbeit die Stimulation mit 100- $\mu$ m-Mikrobewegungen keinen signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität beziehungsweise die Marker des Knochenaufbaus beziehungsweise -umbaus. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass Stadelmann *et al.* [75] einen um den Faktor  $10^3$  höheren Kompressionsdruck in ihren Versuchen verwendeten. Somit ist von einer deutlich höheren mechanischen Beanspruchung der Zellen als in der vorliegenden Arbeit auszugehen. Ferner wurde in Letzterer nicht das komplette zelluläre und molekulare Spektrum des Knochengewebes abgebildet. Folgestudien unter der Anwendung periimplantärer Mikrobewegungen bei verschiedenen Druckbelastungen sollten weitere Erkenntnisse über den zellbiologischen Einfluss von Mikrobewegungen an der Knochen-Implantat-Grenze liefern.

Bei der kombinierten Behandlung mit elektrischen und mechanischen Stimuli wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst davon ausgegangen, dass die Kombination verschiedener biophysikalischer Reize die osteogene Proliferation und Differenzierung weiter verbessern könnte. So fanden Kang *et al.* [166] im Vergleich zu den Einzelstimulationen einen signifikanten Anstieg der Expression der osteoblastischen Differenzierungsmarker *ALP* und *OSX* (Osterix) durch die kombinierte biophysikalische Stimulation mit zyklischen

mechanischen Dehnungen, elektromagnetischen Feldern und Ultraschallwellen. Hierzu stimulierten sie humane Fettgewebstammzellen für 7 Tage jeweils mit Einzelstimulation und verschiedenen Kombinationen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch, dass eine Kombination harmonisch oszillierender Mikrobewegungen und Elektrostimulation unter Verwendung kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder der alleinigen Stimulation durch Mikrobewegung nicht überlegen ist und sogar zu einer signifikant geringeren Expression von *OC*-mRNA führen kann.

Dies ist vorrangig auf zwei Ursachen zurückzuführen: Erstens wird das elektrische Feld durch die Ti6Al4V-Zylinder stark verringert, wie in der Numerischen Simulation gezeigt. Nur im Bereich der Elektroden an den Rändern der Titankörper zeigen sich annähernd die gleichen Feldstärken wie in der elektrischen Stimulation ohne Titankörper. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nur eine begrenzte Anzahl von Osteoblasten einer suffizienten elektrischen Feldstärke ausgesetzt war und die kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfelder überwiegend durch die leitende Oberfläche der Ti6Al4V-Zylinder abgeschirmt wurden. Dennoch zeigten die vorliegenden Daten, dass die elektrische Stimulation beladener Proben mit  $1 V_{\text{eff}}$  verglichen mit den beladenen Kontrollen zu einer signifikant höheren ALP-Aktivität und verringerten Prokollagen-Typ-1-Synthese führten. Auch zeigte sich die die ALP-Aktivität im Vergleich zur kombinierten Stimulation mit 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen signifikant erhöht. Zudem war die relative Genexpression von *TIMP1* nach der Behandlung mit Ti6Al4V-Zylindern und Elektrostimulation im Vergleich zu den beladenen Kontrollen signifikant erhöht. Eine zweite Erklärung könnte der piezoelektrische Effekt liefern. Bei der Stimulation mit Mikrobewegungen wird aufgrund dieses physikalischen Prinzips in der Kollagenmatrix der Scaffolds eine Spannung erzeugt [104], die mit dem elektrischen Feld der Elektrostimulation interagieren könnte. Inwieweit diese induzierten Spannungen die elektrische Stimulation beeinflussen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Eine weitere Erklärung könnte auf eine Überstimulation der Osteoblasten zurückzuführen sein. Angesichts der niedrigen elektrischen Feldstärke im Vergleich zu anderen Studien mit induktiver [91, 115] oder kapazitiver Elektrostimulation [93, 107, 108, 138, 140] und der Reduzierung des elektrischen Feldes durch die Ti6Al4V-Zylinder erscheint diese Theorie jedoch eher unwahrscheinlich. Zudem ist zu erwähnen, dass die kombinierte Stimulation aus 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen und  $1\text{-}V_{\text{eff}}$ -Elektrostimulation im Vergleich zu den elektrisch stimulierten beladenen Proben zu einem signifikanten Anstieg der Transkription von *OPG*-mRNA führte. Dies könnte darauf hinweisen, dass die zusätzliche Stimulation mit 100- $\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen mit einer verringerten Aktivierung von Osteoklasten einhergehen könnte [27], verglichen mit den beladenen Proben, die zusätzlich eine Elektrostimulation erhalten haben.

## 6.5 Limitationen und Aussichten

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen und möglichen Wechselwirkungen zwischen der Anwendung mechanischer Beanspruchung und elektrischer Felder zu analysieren. Daher wurden für jeden biophysikalischen Stimulus zwei verschiedene Parameterkonfigurationen ausgewählt, wobei der Schwerpunkt auf der Stimulationsart lag und nicht darauf, eine optimale Einstellung der Stimulationsparameter für die jeweiligen Stimuli zu finden. Aufgrund der durch die Ti6Al4V-Zylinder verursachten Abschirmung des elektrischen Feldes wurde nur die Anwendung von  $1-V_{\text{eff}}$ -Elektrostimulation auf die kombinierte Stimulation und elektrische Stimulation in beladenen Proben weiter untersucht. In zukünftigen Experimenten können mithilfe des kapazitiv eingekoppelten Stimulationssystems weitere Parameterkonfigurationen untersucht werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass hierfür verglichen mit der direkten Elektrostimulation deutlich höhere Eingangsspannungen benötigt werden, um vergleichbare elektrische Felder zu erzeugen [115, 116]. Dies stellt eine klare Einschränkung der durchgeführten Untersuchungen dar. Dennoch kann aus den Ergebnissen der Arbeit postuliert werden, dass der Einsatz kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder in Kombination mit einem leitfähigen Metallimplantat die Osseointegration im klinischen Umfeld nicht wesentlich beeinflusst, da die Implantatoberfläche die elektrischen Felder für Zellen an der Implantatperipherie abschirmen würde. Daher sollte für weitere Experimente ein anderer Versuchsaufbau realisiert werden. So könnte das Implantat selbst die elektrostimulierende Einheit bilden beziehungsweise in diese einbezogen werden.

Eine Limitation dieser Studie ist auf die Verwendung isolierter humaner Osteoblasten zurückzuführen. So ist die Verfügbarkeit menschlicher Zellen, insbesondere desselben Spenders, häufig begrenzt. Dies ist beispielsweise auf eine variable Anzahl an Osteoblasten-Chargen pro entnommenem Femurkopf zurückzuführen. Entsprechend wurden in dieser Arbeit aufeinanderfolgende Versuchsreihen, teilweise unter Verwendung von Osteoblasten verschiedener Spenderchargen, durchgeführt, um die gewünschte Grundgesamtheit an Datensätzen für jede Versuchsgruppe zu erreichen. Darüber hinaus waren sowohl die Applikation von Mikrobewegungen als auch die kombinierte Stimulation auf drei Spender je Versuchsreihe mit denselben Parameterkonfigurationen beschränkt. Demzufolge war es nicht möglich, alle Versuchsgruppen einschließlich der Kontrolle mit unterschiedlichen Parameterkonfigurationen in einer Versuchsreihe zu untersuchen. Eine Standardisierung der Versuchsreihen erfolgte, indem die Rohdaten der Versuchsgruppen auf die jeweiligen Kontrollen desselben Versuchs und der gleichen Spendercharge bezogen wurden.

Des Weiteren stellen isolierte humane Osteoblasten, verglichen mit Zelllinien-Osteoblasten oder Primärzellen anderer Spezies, per se eine heterogene Zellpopulation dar, die abhängig vom Spenderalter und der Isolierungsmethode eine beträchtliche Anzahl phänotypischer Unterschiede aufweist [131]. Da das Proliferationspotential der Zellen sowie das Ausmaß ihrer

Genexpression und Proteinsynthese vor allem vom Osteoblasten-Phänotyp abhängen, zieht eine breite Variabilität des Phänotyps im Vergleich zu anderen Zellkulturen auch größere Standardabweichungen mit sich [115], was beim Vergleich der Ergebnisse mit Referenzstudien berücksichtigt werden sollte. Auf der anderen Seite spiegeln diese phänotypischen Unterschiede am ehesten die klinischen Gegebenheiten wider und liefern somit relevantere Ergebnisse, weshalb isolierte humane Osteoblasten bevorzugt wurden. Auch wenn es nicht möglich ist, die Spenderauswahl der Osteoblasten vollständig zu standardisieren, sollte in Folgestudien eine Berücksichtigung von Faktoren wie beispielsweise Patientenalter und Begleiterkrankungen erfolgen, da diese den Phänotyp der isolierten Zellen beeinflussen können [131].

Zudem ist zu berücksichtigen, dass der Phänotyp der Osteoblasten von der Entnahmestelle der Zellen abhängig ist. So zeigten Martinez *et al.* [167] bei der Untersuchung gleichaltriger Spender, dass dem Femurkopf entstammende Osteoblasten verglichen mit Zellen der oberen Tibia eine niedrigere Proliferationsrate und Synthese von Prokollagen Typ I sowie erhöhte ALP-Aktivität aufwiesen. Damit übereinstimmend fanden Kasperk *et al.* [168] durch die Untersuchung von spendergleichen Zellen heraus, dass Osteoblasten aus dem Unterkiefer eine höhere Proliferationsrate und verringerte ALP-Aktivität aufweisen als Zellen, die aus dem Beckenkamm der Spender isoliert wurden. Folglich könnten die biophysikalischen Stimuli abhängig von stimuliertem Knochen eine abweichende Effektivität zeigen. Dies sollte für den klinischen Translationsprozess und Folgearbeiten berücksichtigt werden.

Da bisher nur eine dreitägige Stimulation erfolgte, konzentrierte sich die Bestimmung der osteogenen Mineralisation primär auf die Induktion von Osteocalcin auf mRNA-Ebene. Da die Expression von OC durch die Mikrobewegungen signifikant induziert wurde, sollte die Proteinproduktion dieses Biomarkers im Zellkulturüberstand in nachfolgenden Studien mit längeren Stimulationsperioden untersucht werden. Hierbei gilt es zu evaluieren, welchen Einfluss längere Stimulationsperioden auf die Zellproliferation sowie Expression und Synthese weiterer osteogener Biomarker haben.

Zudem konnten in der vorliegenden Studie *MMP1*- und *RANKL*-mRNA-Transkripte wiederholt nicht in ausreichend hohen Konzentrationen nachgewiesen werden, um eine hinreichend hohe Grundgesamtheit für die statistische Auswertung zu erhalten. Dies muss bei der Interpretation der Knochenumbau-Marker *TIMP1* und *OPG* berücksichtigt werden, da Knochenbildung und -resorption maßgeblich durch ein Gleichgewicht zwischen aktiven TIMPs und MMPs [21, 48] sowie *OPG* und *RANKL* [27] reguliert werden.

Darüber hinaus sind *in vivo* neben Osteoblasten weitere Zelltypen an den Prozessen des Knochenaufbaus und -umbaus beteiligt, was die Ergebnisse dieser Studie einschränkt. Daher ist der Einfluss der biophysikalischen Stimulation auf osteoklastische Zellen sowie auf Co-Kulturen mit Osteoblasten und Osteoklasten Gegenstand künftiger Studien.

Während sich bereits eine Vielzahl von In-vivo- und In-vitro-Studien mit dem Einfluss der Oberflächenrauheit von Implantaten auf die Osseointegration auseinandergesetzt hat [72, 1423147, 169, 170], ist die Wirkung unterschiedlicher Implantatoberflächen auf Osteoblasten unter Stimulation mit Mikrobewegungen wenig erforscht. In zukünftigen Arbeiten kann das Mikrobewegungssystem zur Untersuchung unterschiedlicher Implantatoberflächen auf den Zellstoffwechsel genutzt werden und somit zur Entwicklung eines optimalen Implantatdesigns beitragen. Auch können mithilfe des Mikrobewegungssystems unterschiedliche Knochen-Scaffolds unter mechanischer Beanspruchung untersucht werden.

## 7 Zusammenfassung

Bei einem zunehmend älter werdenden Patientenkontinuum in der Orthopädischen Chirurgie steigt die Nachfrage nach Implantaten, die eine schnelle und sichere Osseointegration gewährleisten. Einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Implantat-Einheilung stellt dabei der Einsatz biophysikalischer Stimulationen dar. Bislang sind die genauen zellulären und molekularen Mechanismen, mit denen die verschiedenen biophysikalischen Stimuli in den Knochenstoffwechsel eingreifen, weitgehend ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit gelang es, ein neuartiges In-vitro-System zu etablieren, das es ermöglicht, eine elektrische und mechanische Stimulation sowohl separat als auch kombiniert zu applizieren. Hierzu wurde ein Elektrostimulationssystem entwickelt, mit dem zellbesiedelte Kollagen-Scaffolds mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt werden können. Damit konnte nicht nur den Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Osteoblasten, sondern auch die Wechselwirkungen zwischen Elektrostimulation und Titankörpern untersucht werden. Des Weiteren konnte mithilfe eines Mikrobewegungssystems analysiert werden, welchen Einfluss angeraute Titankörper auf das Zellverhalten von Osteoblasten unter mechanischer Belastung haben. Durch die Kombination der beiden Stimulationssysteme gelang es, den Einfluss einer simultanen Applikation von harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen und kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern auf die Zellviabilität sowie die osteogene Differenzierung und den Knochenumbau zu evaluieren. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Stoffwechselaktivität, Proteinbiosynthese und Genexpression durch das Anlegen kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder signifikant beeinflusst werden. So konnte nach elektrischer Stimulation mit einer angelegten Spannung von  $100 \text{ mV}_{\text{eff}}$  ein signifikanter Anstieg der Stoffwechselaktivität und der Expression von Markern des Knochenumbaus sowie eine reduzierte Synthese von Prokollagen Typ I nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich, dass die Elektrostimulation mit einer Spannung von  $1 \text{ V}_{\text{eff}}$  in beladenen Proben zu einem signifikanten Anstieg der Zellviabilität sowie einer signifikanten Abnahme der Expression und Proteinbiosynthese von Kollagen Typ I führt. Mithilfe des Mikrobewegungssystems konnte nachgewiesen werden, dass die mechanische Belastung  $25\text{-}\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen zu einer signifikant höheren Transkription von *OC*- und *TIMP1*-mRNA führt, während die Prokollagen-Typ-I-Proteinbiosynthese und ALP-Aktivität im Vergleich zur Stimulation mit  $100\text{-}\mu\text{m}$ -Mikrobewegungen ebenfalls signifikant erhöht wurden. Der zusätzliche Einsatz der elektrischen Stimulation führte dabei jedoch weder in der  $25\text{-}\mu\text{m}$ - als auch in der  $100\text{-}\mu\text{m}$ -Mikrobewegungsgruppe zu einer zusätzlichen Steigerung der osteogenen Differenzierung und ging mit einem Abfall der Transkription von *OC*-mRNA im Vergleich zur alleinigen Mikrobewegungstimulation einher. Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit mithilfe verschiedener biophysikalischer Reize bestimmte zelluläre

Verhaltensweisen ausgelöst und somit der Einfluss der verschiedenen Stimuli auf den Zellstoffwechsel weiter entschlüsselt werden. In zukünftigen Studien sollte das Implantat selbst in das Stimulationssystem einbezogen werden. Zudem sind weitere Untersuchungen mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern unterschiedlicher Stärke vonnöten und auch der Einfluss abweichender Kompressionsdrucke und Oberflächenbeschaffenheiten im Rahmen der mechanischen Stimulation der Knochen-Implantat-Grenzfläche sollte untersucht werden.

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 *Department of Economic and Social Affairs, Population Division.* World population prospects. New York: United Nations; 2019: 16-18
- 2 *Pilz V, Hanstein T, Skripitz R.* Projections of primary hip arthroplasty in Germany until 2040. *Acta Orthopaedica* 2018; 89: 3083313
- 3 *Elani HW, Starr JR, Da Silva JD et al.* Trends in Dental Implant Use in the U.S., 1999-2016, and Projections to 2026. *Journal of Dental Research* 2018; 97: 142431430
- 4 *Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J et al.* Biology of implant osseointegration. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 2009; 9: 61371
- 5 *Branemark P-I.* Osseointegration and its experimental background. *The Journal of Prosthetic Dentistry* 1983; 50: 3993410
- 6 *Branemark P-I.* Vital microscopy of bone marrow in rabbit. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1959; 11 Supp 38: 1382
- 7 *Marco F, Milena F, Gianluca G et al.* Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron* 2005; 36: 6303644
- 8 *Fini M, Giavaresi G, Torricelli P et al.* Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2004; 58: 4873493
- 9 *Lähteenvuo J, Rosenzweig A.* Effects of aging on angiogenesis. *Circulation Research* 2012; 110: 125231264
- 10 *Apostu D, Lucaciu O, Berce C et al.* Current methods of preventing aseptic loosening and improving osseointegration of titanium implants in cementless total hip arthroplasty: a review. *The Journal of International Medical Research* 2018; 46: 210432119
- 11 *Cameron HU, Pilliar RM, MacNab I.* The effect of movement on the bonding of porous metal to bone. *Journal of Biomedical Materials Research* 1973; 7: 3013311
- 12 *Søballe K, Hansen ES, B-Rasmussen H et al.* Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *Journal of Orthopaedic Research* 1992; 10: 2853299
- 13 *Kawahara H, Kawahara D, Hayakawa M et al.* Osseointegration under immediate loading: biomechanical stress-strain and bone formation-resorption. *Implant Dentistry* 2003; 12: 61368
- 14 *Jasty M, Bragdon C, Burke D et al.* In vivo skeletal responses to porous-surfaced implants subjected to small induced motions. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* 1997; 79: 7073714
- 15 *Bragdon CR, Burke D, Lowenstein JD et al.* Differences in stiffness of the interface between a cementless porous implant and cancellous bone in vivo in dogs due to varying amounts of implant motion. *The Journal of Arthroplasty* 1996; 11: 9453951

- 16 *Jonitz-Heincke A, Sellin M-L, Seyfarth A et al.* Analysis of Cellular Activity Short-Term Exposure to Cobalt and Chromium Ions in Mature Human Osteoblasts. *Materials (Basel, Switzerland)* 2019; 12: 1-17
- 17 *Markhoff J, Krogull M, Schulze C et al.* Biocompatibility and Inflammatory Potential of Titanium Alloys Cultivated with Human Osteoblasts, Fibroblasts and Macrophages. *Materials (Basel, Switzerland)* 2017; 10: 1-17
- 18 *Jonitz-Heincke A, Tillmann J, Klinder A et al.* The Impact of Metal Ion Exposure on the Cellular Behavior of Human Osteoblasts and PBMCs: In Vitro Analyses of Osteolytic Processes. *Materials (Basel, Switzerland)* 2017; 10: 1-15
- 19 *Markhoff J, Wieding J, Weissmann V et al.* Influence of Different Three-Dimensional Open Porous Titanium Scaffold Designs on Human Osteoblasts Behavior in Static and Dynamic Cell Investigations. *Materials (Basel, Switzerland)* 2015; 8: 549035507
- 20 *Feller L, Jadwat Y, Khammissa RAG et al.* Cellular responses evoked by different surface characteristics of intraosseous titanium implants. *BioMed Research International* 2015; 2015: 1-8
- 21 *Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G.* Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. Berlin: Springer; 2014: 952-960
- 22 *Lüllmann-Rauch R, Paulsen F.* Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012: 150-173
- 23 *Feng X.* Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Current Chemical Biology* 2009; 3: 1893196
- 24 *Jerosch J, Bader A, Uhr G.* Knochen. Curasan Taschenatlas spezial. Stuttgart: Thieme; 2002: 18-57
- 25 *Aumüller G, Aust G, Engele J.* Anatomie. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014: 75-81
- 26 *Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF.* The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocrine Reviews* 2013; 34: 6583690
- 27 *Boyce BF, Xing L.* Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 473: 1393146
- 28 *Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA et al.* Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends in Molecular Medicine* 2009; 15: 2083216
- 29 *Jones DB, Nolte H, Scholübbbers J-G et al.* Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials* 1991; 12: 1013110
- 30 *Stein GS, Lian JB, Owen TA.* Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB Journal* 1990; 4: 311133123
- 31 *Morello R.* Osteogenesis imperfecta and therapeutics. *Matrix biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 2018; 71-72: 2943312
- 32 *Rassow J.* Biochemie. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012: 386-391

- 33 *Obermayer-Pietsch B, Schwetz V.* Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung. *Z Rheumatol* 2016; 75: 4513458
- 34 *Bellows CG, Reimers SM, Heersche JN.* Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell and Tissue Research* 1999; 297: 2493259
- 35 *Golub EE, Boesze-Battaglia K.* The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics* 2007; 18: 4443448
- 36 *Chang WH-S, Chen L-T, Sun J-S et al.* Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 2004; 25: 4573465
- 37 *Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG.* Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Current Opinion in Pharmacology* 2016; 28: 57368
- 38 *Li J, Zhang H, Yang C et al.* An overview of osteocalcin progress. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2016; 34: 3673379
- 39 *Bellows CG, Reimers SM, Heersche JN.* Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell and Tissue Research* 1999; 297: 2493259
- 40 *Nakamura A, Dohi Y, Akahane M et al.* Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part C, Methods* 2009; 15: 1693180
- 41 *Lian JB, Stein GS, Stewart C et al.* Osteocalcin: characterization and regulated expression of the rat gene. *Connective Tissue Research* 1989; 21: 61-69
- 42 *Griffin M, Sebastian A, Colthurst J et al.* Enhancement of differentiation and mineralisation of osteoblast-like cells by degenerate electrical waveform in an in vitro electrical stimulation model compared to capacitive coupling. *PLOS one* 2013; 8: 1-9
- 43 *Peters KM, König DP, Hrsg.* Fortbildung Osteologie. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2010: 118-119
- 44 *Bartl R, Bartl C.* Das Osteoporose Manual. Biologie, Diagnostik, Prävention und Therapie. 1. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2021: 42-44
- 45 *Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ.* Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews* 2008; 29: 1553192
- 46 *Varghese S.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in bone: an overview of regulation and functions. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 2006; 11: 294932966

- 47 Gack S. Klonierung von Matrixmetalloproteinasen und deren Expressionsmuster in der Maus: AP-1 (Fos/Jun)-abhängige Expression von Kollagenase I im Knochen: Karlsruhe; 1994: 5-6, 84-87
- 48 Syggelos SA, Aletras AJ, Smirlaki I et al. Extracellular matrix degradation and tissue remodeling in periprosthetic loosening and osteolysis: focus on matrix metalloproteinases, their endogenous tissue inhibitors, and the proteasome. *BioMed Research International* 2013; 2013: 1-18
- 49 Bord S, Horner A, Beeton C et al. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone. *Bone* 1999; 24: 2293235
- 50 Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. Orthopädie und Unfallchirurgie. 7. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2014: 83-87
- 51 Sinici E, Tunay S, Tunay V et al. Primer kalça protezi uygulanan hastalarda yaşam kalitesinin değerlendirilmesi. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 2008; 42: 223 25
- 52 Mariconda M, Galasso O, Costa GG et al. Quality of life and functionality after total hip arthroplasty: a long-term follow-up study. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2011; 12: 222
- 53 Benic GI, Wolleb K, Sancho-Puchades M et al. Systematic review of parameters and methods for the professional assessment of aesthetics in dental implant research. *Journal of Clinical Periodontology* 2012; 39 Suppl 12: 1603192
- 54 Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *The International Journal of Prosthodontics* 1998; 11: 3913401
- 55 Franchi M, Fini M, Martini D et al. Biological fixation of endosseous implants. *Micron* 2005; 36: 6653671
- 56 Barnes GL, Kostenuik PJ, Gerstenfeld LC et al. Growth factor regulation of fracture repair. *Journal of Bone and Mineral Research* 1999; 14: 180531815
- 57 Meyer U, Joos U, Mythili J et al. Ultrastructural characterization of the implant/bone interface of immediately loaded dental implants. *Biomaterials* 2004; 25: 195931967
- 58 Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology* 1994; 6: 7173725
- 59 Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research* 2003; 14: 2513262
- 60 Franchi M, Bacchelli B, Martini D et al. Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials* 2004; 25: 223932246
- 61 Javed F, Ahmed HB, Crespi R et al. Role of primary stability for successful osseointegration of dental implants: Factors of influence and evaluation. *Interventional Medicine & Applied Science* 2013; 5: 1623167

- 62 *Chappard D, Aguado E, Huré G et al.* The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3- and 6-month study in sheep. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1999; 14: 1893196
- 63 *Fillingham Y, Jacobs J.* Bone grafts and their substitutes. *The Bone & Joint Journal* 2016; 98-B: 639
- 64 *Moy PK, Medina D, Shetty V et al.* Dental implant failure rates and associated risk factors. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2005; 20: 5693577
- 65 *Herold G, Hrsg.* *Innere Medizin* 2018. Köln: Gerd Herold; 2018: 776-779
- 66 *LeGeros RZ, Craig RG.* Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. *Journal of Bone and Mineral Research* 1993; 8 Suppl 2: 583-96
- 67 *Anselme K.* Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21: 6673681
- 68 *Plecko M, Sievert C, Andermatt D et al.* Osseointegration and biocompatibility of different metal implants--a comparative experimental investigation in sheep. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2012; 13: 32
- 69 *Guglielmotti MB, Olmedo DG, Cabrini RL.* Research on implants and osseointegration. *Periodontology* 2000 2019; 79: 1783189
- 70 *Shah FA, Trobos M, Thomsen P et al.* Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants - Is one truly better than the other? *Materials science & engineering. C, Materials for Biological Applications* 2016; 62: 9603 966
- 71 *Bordji K, Jouzeau JY, Mainard D et al.* Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5Fe alloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials* 1996; 17: 9293940
- 72 *Giebaly DE, Twaij H, Ibrahim M et al.* Cementless hip implants: an expanding choice. *Hip International* 2016; 26: 4133423
- 73 *Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE.* A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1992; 7: 62371
- 74 *Ziebart J, Fan S, Schulze C et al.* Effects of interfacial micromotions on vitality and differentiation of human osteoblasts. *Bone & Joint Research* 2018; 7: 1873195
- 75 *Stadelmann VA, Terrier A, Pioletti DP.* Microstimulation at the bone-implant interface upregulates osteoclast activation pathways. *Bone* 2008; 42: 3583364
- 76 *Wolff J.* *Das Gesetz der Transformation der Knochen.* 1. Aufl. Berlin: Pro Business; 2010
- 77 *Duncan RL, Turner CH.* Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcified Tissue International* 1995; 57: 3443358

- 78 *Duyck J, Vandamme K, Geris L et al.* The influence of micro-motion on the tissue differentiation around immediately loaded cylindrical turned titanium implants. *Archives of Oral Biology* 2006; 51: 139
- 79 *Leucht P, Kim J-B, Wazen R et al.* Effect of mechanical stimuli on skeletal regeneration around implants. *Bone* 2007; 40: 9193930
- 80 *Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C et al.* Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and CICP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *Journal of Biomechanics* 2000; 33: 45351
- 81 *Harter LV, Hruska KA, Duncan RL.* Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology* 1995; 136: 5283535
- 82 *Nishioka S, Fukuda K, Tanaka S.* Cyclic stretch increases alkaline phosphatase activity of osteoblast-like cells: a role for prostaglandin E2. *Bone and Mineral* 1993; 21: 1413150
- 83 *Neidlinger-Wilke C, Stalla I, Claes L et al.* Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF $\beta$ -release in response to cyclic strain. *Journal of Biomechanics* 1995; 28: 141131418
- 84 *Ireland A, Maden-Wilkinson T, Ganse B et al.* Effects of age and starting age upon side asymmetry in the arms of veteran tennis players: a cross-sectional study. *Osteoporosis International* 2014; 25: 138931400
- 85 *Zerwekh JE, Ruml LA, Gottschalk F et al.* The effects of twelve weeks of bed rest on bone histology, biochemical markers of bone turnover, and calcium homeostasis in eleven normal subjects. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998; 13: 159431601
- 86 *Morey ER, Baylink DJ.* Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 1978; 201: 113831141
- 87 *Tietze S, Hofmann A, Wolk S et al.* Grundlagen der zellulären Mechanotransduktion. *Gefässchirurgie* 2020; 25: 2443248
- 88 *Rosa N, Simoes R, Magalhães FD et al.* From mechanical stimulus to bone formation: A review. *Medical Engineering & Physics* 2015; 37: 7193728
- 89 *Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG.* Mechanobiology of bone tissue. *Pathologie-Biologie* 2005; 53: 5763580
- 90 *Massari L, Benazzo F, Falez F et al.* Biophysical stimulation of bone and cartilage: state of the art and future perspectives. *International Orthopaedics* 2019; 43: 5393551
- 91 *Griffin M, Bayat A.* Electrical Stimulation in Bone Healing: Critical Analysis by Evaluating Levels of Evidence. *Eplasty* 2011; 11
- 92 *Hiemer B, Ziebart J, Jonitz-Heincke A et al.* Magnetically induced electrostimulation of human osteoblasts results in enhanced cell viability and osteogenic differentiation. *International Journal of Molecular Medicine* 2016; 38: 57364

- 
- 93 *Brighton CT, Okereke E, Pollack SR et al.* In vitro bone-cell response to a capacitively coupled electrical field. The role of field strength, pulse pattern, and duty cycle. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1992; 255:3262
- 94 *Habel B.* Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen: 10-11
- 95 *Chakkalakal DA.* Mechanoelectric transduction in bone. *Journal of Material Research* 1989; 4: 103431046
- 96 *Curie J, Curie P.* Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées. *Bulmi* 1880; 3: 90393
- 97 *Bergmann L, Schaefer C.* Elektrizitätslehre. 5. Aufl. Berlin: De Gruyter; 2012:71-73
- 98 *Jenkins K, Nguyen V, Zhu R et al.* Piezotronic Effect: An Emerging Mechanism for Sensing Applications. *Sensors (Basel, Switzerland)* 2015; 15: 22914322940
- 99 *Fukada E, Yasuda I.* On the Piezoelectric Effect of Bone. *J. Phys. Soc. Jpn.* 1957; 12: 115831162
- 100 *Marino AA, Becker RO, Soderholm SC.* Origin of the piezoelectric effect in bone. *Calcified Tissue Research* 1971; 8: 1773180
- 101 *Bassett CA, Becker RO.* Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science (New York, N.Y.)* 1962; 137: 106331064
- 102 *Brighton CT, Wang W, Seldes R et al.* Signal transduction in electrically stimulated bone cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2001; 83: 151431523
- 103 *Fukada E, Yasuda I.* Piezoelectric Effects in Collagen. *Jpn. J. Appl. Phys.* 1964; 3: 502B
- 104 *Jacob J, More N, Kalia K et al.* Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering. *Inflammation and Regeneration* 2018; 38: 2
- 105 *Marino A, Becker RO.* Piezoelectric effect and growth control in bone. *Nature* 1970; 228: 4733474
- 106 *Minary-Jolandan M, Yu M-F.* Nanoscale characterization of isolated individual type I collagen fibrils: polarization and piezoelectricity. *Nanotechnology* 2009; 20: 85706
- 107 *Wiesmann HP, Joos U, Meyer U.* Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2004; 33: 5233530
- 108 *Hartig M, Joos U, Wiesmann H-P.* Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. *European Biophysics Journal* 2000; 29: 4993506
- 109 *Bassett CA, Pawluk RJ, Becker RO.* Effects of electric currents on bone in vivo. *Nature* 1964; 204: 6523654
- 110 *Rubinacci A, Tessari L.* A correlation analysis between bone formation rate and bioelectric potentials in rabbit tibia. *Calcified Tissue International* 1983; 35: 7283731

- 111 *Friedenberg ZB, Dyer RH, Brighton CT*. Electro-osteograms of long bones of immature rabbits. *Journal of Dental Research* 1971; 50: 6353639
- 112 *López-Duran Stern L, Yageya J*. Bioelectric potentials after fracture of the tibia in rats. *Acta Orthopaedica* 1980; 51: 6013608
- 113 *Friedenberg ZB, Smith HG*. Electrical potentials in intact and fractured tibia. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1969; 63: 2223225
- 114 *Brighton CT, Wang W, Seldes R et al*. Signal Transduction in Electrically Stimulated Bone Cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2001; 83: 151431523
- 115 *Grunert PC, Jonitz-Heincke A, Su Y et al*. Establishment of a novel in vitro test setup for electric and magnetic stimulation of human osteoblasts. *Cell Biochemistry and Biophysics* 2014; 70: 8053817
- 116 *Krueger S, Achilles S, Zimmermann J et al*. Re-Differentiation Capacity of Human Chondrocytes in Vitro Following Electrical Stimulation with Capacitively Coupled Fields. *Journal of Clinical Medicine* 2019; 8
- 117 *Brummer SB, Robblee LS, Hambrecht FT*. Criteria for selecting electrodes for electrical stimulation: theoretical and practical considerations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1983; 405: 1593171
- 118 *Amirouche F, Solitro G, Walia A*. No effect of femoral offset on bone implant micromotion in an experimental model. *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research* 2016; 102: 3793385
- 119 *Bühler DW, Berlemann U, Lippuner K et al*. Three-dimensional primary stability of cementless femoral stems. *Clinical Biomechanics* 1997; 12: 75386
- 120 *Østbyhaug PO, Klaksvik J, Romundstad P et al*. Primary stability of custom and anatomical uncemented femoral stems: a method for three-dimensional in vitro measurement of implant stability. *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)* 2010; 25: 3183324
- 121 *Friedrich Graef MK*. Determination of Micromotion at the Implant Bone Interface - An In-Vitro Methodologic Study. *Dentistry* 2015; 5
- 122 *Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C*. Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1986: 1083113
- 123 *Vandamme K, Naert I, Geris L et al*. The effect of micro-motion on the tissue response around immediately loaded roughened titanium implants in the rabbit. *European Journal of Oral Sciences* 2007; 115: 21329
- 124 *Pioletti DP, Müller J, Rakotomanana LR et al*. Effect of micromechanical stimulations on osteoblasts: development of a device simulating the mechanical situation at the bone3 implant interface. *Journal of Biomechanics* 2003; 36: 1313135

- 125 *Bloemen MCT, van Leeuwen MCE, van Vucht NE et al.* Dermal substitution in acute burns and reconstructive surgery: a 12-year follow-up. *Plastic and Reconstructive Surgery* 2010; 125: 145031459
- 126 *Amruthwar SS, Janorkar AV.* In vitro evaluation of elastin-like polypeptide-collagen composite scaffold for bone tissue engineering. *Dental Materials* 2013; 29: 2113220
- 127 *Daamen WF, Nillesen STM, Wismans RG et al.* A biomaterial composed of collagen and solubilized elastin enhances angiogenesis and elastic fiber formation without calcification. *Tissue Engineering. Part A* 2008; 14: 3493360
- 128 *Grunert PC.* Etablierung eines in vitro Testsystems zur Untersuchung des Einflusses von elektromagnetischen Feldern auf humane Osteoblasten in Knochenersatzmaterialien; 2014: 36-38
- 129 *Chaturvedi TP.* An overview of the corrosion aspect of dental implants (titanium and its alloys). *Indian Journal of Dental Research* 2009; 20: 91398
- 130 *Wang W, Ouyang Y, Poh CK.* Orthopaedic implant technology: biomaterials from past to future. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* 2011; 40: 2373244
- 131 *Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG et al.* In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *European Cells & Materials* 2012; 24: 1317
- 132 *Ribatti D.* A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Experimental Cell Research* 2017; 359: 17319
- 133 *Berridge MV, Herst PM, Tan AS.* Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely MR, Hrsg. *Biotechnology Annual Review*. vol. 11. Amsterdam, New York: Elsevier; 2005: 1273152
- 134 *Jansohn M, Rothhämel S.* *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2012: 1-4
- 135 *Li P, Xu J, Liu L et al.* Promoting Proliferation and Differentiation of Pre-Osteoblasts MC3T3-E1 Cells Under Combined Mechanical and Electrical Stimulation. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2019; 15: 9213929
- 136 *Brighton CT, Hozack WJ, Brager MD et al.* Fracture healing in the rabbit fibula when subjected to various capacitively coupled electrical fields. *Journal of Orthopaedic Research* 1985; 3: 3313340
- 137 *Bisceglia B, Zirpoli H, Caputo M et al.* Induction of alkaline phosphatase activity by exposure of human cell lines to a low-frequency electric field from apparatuses used in clinical therapies. *Bioelectromagnetics* 2011; 32: 1133119
- 138 *Clark CC, Wang W, Brighton CT.* Up-regulation of expression of selected genes in human bone cells with specific capacitively coupled electric fields. *Journal of Orthopaedic Research* 2014; 32: 8943903

- 139 Wang Z, Clark CC, Brighton CT. Up-regulation of bone morphogenetic proteins in cultured murine bone cells with use of specific electric fields. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2006; 88: 105331065
- 140 Zhuang H, Wang W, Seldes RM et al. Electrical stimulation induces the level of TGF-beta1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997; 237: 2253229
- 141 John R. Pepper, Morley A. Herbert, J. R. Anderson, and Walter P. Bobechko. Effect of capacitive coupled electrical stimulation on regenerate bone. *Journal of Orthopaedic Research* 1996; 14: 296-302
- 142 Delaunay C, Bonnomet F, North J et al. Grit-blasted titanium femoral stem in cementless primary total hip arthroplasty: a 5- to 10-year multicenter study. *The Journal of Arthroplasty* 2001; 16: 47354
- 143 Hacking SA, Bobyn JD, Tanzer M et al. The osseous response to corundum blasted implant surfaces in a canine hip model. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1999: 2403253
- 144 Khanuja HS, Vakil JJ, Goddard MS et al. Cementless femoral fixation in total hip arthroplasty. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume* 2011; 93: 5003509
- 145 Bowers KT, Keller JC, Randolph BA et al. Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 1992; 7: 3023310
- 146 Rønold HJ, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. Analysing the optimal value for titanium implant roughness in bone attachment using a tensile test. *Biomaterials* 2003; 24: 455934564
- 147 Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW et al. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63). *Journal of Biomedical Materials Research* 1995; 29: 3893401
- 148 Goldberg VM, Stevenson S, Feighan J et al. Biology of grit-blasted titanium alloy implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995: 1223129
- 149 Saldaña L, Bensiamar F, Boré A et al. In search of representative models of human bone-forming cells for cytocompatibility studies. *Acta Biomaterialia* 2011; 7: 421034221
- 150 Holzwarth JM, Ma PX. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2011; 32: 962239629
- 151 Chang WH, Hwang IM, Liu HC. Enhancement of fracture healing by specific pulsed capacitively-coupled electric field stimulation. *Frontiers of Medical and Biological Engineering* 1991; 3: 57364
- 152 Shigino T, Ochi M, Hirose Y et al. Enhancing osseointegration by capacitively coupled electric field: a pilot study on early occlusal loading in the dog mandible. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* 2001; 16: 8413850

- 153 *Ochi M, Wang P-L, Ohura K et al.* Solcoseryl, a tissue respiration stimulating agent, significantly enhances the effect of capacitively coupled electric field on the promotion of bone formation around dental implants. *Clinical Oral Implants Research* 2003; 14: 2943-302
- 154 *Shigino T, Ochi M, Kagami H et al.* Application of capacitively coupled electric field enhances periimplant osteogenesis in the dog mandible. *The International Journal of Prosthodontics* 2000; 13: 365-372
- 155 *Scott G, King JB.* A prospective, double-blind trial of electrical capacitive coupling in the treatment of non-union of long bones. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1994; 76: 820-826
- 156 *Brighton CT, Pollack SR.* Treatment of recalcitrant non-union with a capacitively coupled electrical field. A preliminary report. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1985; 67: 577-585
- 157 *Benazzo F, Mosconi M, Beccarisi G et al.* Use of capacitive coupled electric fields in stress fractures in athletes. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1995: 145-149
- 158 *Goodwin CB, Brighton CT, Guyer RD et al.* A double-blind study of capacitively coupled electrical stimulation as an adjunct to lumbar spinal fusions. *Spine* 1999; 24: 1349-56; discussion 1357
- 159 *Rajewsky MF.* Zellproliferation in normalen und malignen Geweben: 3H-Thymidin-Einbau in vitro unter Standardbedingungen. *Biophysik* 1966; 3: 65-93
- 160 *Fitzsimmons RJ, Farley J, Adey W et al.* Embryonic bone matrix formation is increased after exposure to a low-amplitude capacitively coupled electric field, in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1986; 882: 51-56
- 161 *Rubin CT, Donahue HJ, Rubin JE et al.* Optimization of electric field parameters for the control of bone remodeling: exploitation of an indigenous mechanism for the prevention of osteopenia. *Journal of Bone and Mineral Research* 1993; 8 Suppl 2: S573-81
- 162 *Hronik-Tupaj M, Rice WL, Cronin-Golomb M et al.* Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields. *Biomedical Engineering Online* 2011; 10: 9
- 163 *Jaffe LF.* Electrophoresis along cell membranes. *Nature* 1977; 265: 600-602
- 164 *Markhoff J, Krogull M, Schulze C et al.* Biocompatibility and Inflammatory Potential of Titanium Alloys Cultivated with Human Osteoblasts, Fibroblasts and Macrophages. *Materials (Basel, Switzerland)* 2017; 10
- 165 *Hu K, Wang C, Zhang X.* High pressure may inhibit periprosthetic osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* 2010; 28: 289-298
- 166 *Kang KS, Hong JM, Jeong YH et al.* Combined effect of three types of biophysical stimuli for bone regeneration. *Tissue Engineering. Part A* 2014; 20: 1767-1777

- 167 *Martínez ME, del Campo MT, Medina S et al.* Influence of skeletal site of origin and donor age on osteoblastic cell growth and differentiation. *Calcified Tissue International* 1999; 64: 2803286
- 168 *Kasperk C, Wergedal J, Strong D et al.* Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995; 80: 251132517
- 169 *Hayashi K, Inadome T, Tsumura H et al.* Effect of surface roughness of hydroxyapatite4 coated titanium on the bone-implant interface shear strength. *Biomaterials* 1994; 15: 118731191
- 170 *Reigstad O, Siewers P, Røkkum M et al.* Excellent long-term survival of an uncemented press-fit stem and screw cup in young patients: follow-up of 75 hips for 15-18 years. *Acta Orthopaedica* 2008; 79: 1943202

## 9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

- Abb. 2-1: Schematische Darstellung eines eingebetteten Osteozyten im lakuno-kanalikulären System. Die dendritischen Fortsätze des Osteozyten sind mit anderen Osteozyten und Osteoblasten verbunden. Zudem besteht Kontakt zu den Blutgefäßen. Die Zusammensetzung der unmittelbar an die Osteozyten angrenzenden perilakunären Matrix (lila Schattierung) unterscheidet sich von jener der übrigen Knochenmatrix (graue Schattierung), was bei mechanischer Beanspruchung des Knochens das Ausmaß der von den Osteozyten wahrgenommenen mechanischen Signale beeinflussen kann. Modifiziert von Dallas *et al.* [26] unter Einholung der Genehmigung. .... 4
- Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Applikationssysteme zur elektrischen und elektromagnetischen Stimulation von Knochenzellen: **a) Direkte Elektrostimulation:** Implantierte Elektroden werden direkt in den Knochen beziehungsweise das umliegende Weichgewebe implantiert und entweder an eine subkutane oder an eine externe Spannungsquelle angeschlossen, um im Defektbereich ein elektrisches Feld zu erzeugen. **b) Kapazitive Elektrostimulation:** Zwei kapazitiv gekoppelte Elektroden befinden sich auf beiden Seiten des zu stimulierenden Bereiches auf der Haut. An den Elektroden wird eine externe Spannungsquelle angebracht, die im Defektbereich ein elektrisches Feld aufbaut. **c) Induktive Elektrostimulation:** Eine elektromagnetische stromführende Induktionsspule, die an eine externe Stromquelle angeschlossen ist, wird auf der Haut über dem zu stimulierenden Bereich platziert. Die Spule erzeugt ein Magnetfeld, das im Defektbereich ein elektrisches Feld induziert. Modifiziert von Griffin *et al.* [91] unter Einholung der Genehmigung. .... 14
- Abb. 4-1: Zwei MatriDerm®-Kollagen-Scaffolds mit 16 mm Durchmesser in einer sterilen Petrischale aus Polystyrol ..... 20
- Abb. 4-2: 3D-Darstellung der 6-Well-Zellkulturplatte aus Polystyrol mit eingearbeiteten Ti6Al4V-Elektroden. Im vorderen rechten Well ist zusätzlich eine mit zwei Kollagen-Scaffolds beladene Petrischale dargestellt. .... 21
- Abb. 4-3: 3D-Darstellung der einzelnen Bestandteile des Elektrostimulationssystems ..... 21
- Abb. 4-4: Darstellung des Schaltkreises des Elektrostimulationssystems ..... 22
- Abb. 4-5: Darstellung der Feldlinien des kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldes durch eine mit Medium und Kollagen-Scaffold beladene Petrischale (Die Darstellung der 6-Well-Platte wurde zur Vereinfachung weggelassen.) ..... 22
- Abb. 4-6: Grundplatte der Mikrobewegungskammer mit einem Gestell zum Einspannen von 6-Well-Zellkulturplatten, das an einem Piezo-Positioniersystem (unten dargestellt) festgeschraubt wurde ..... 23
- Abb. 4-7: Veranschaulichung der geschlossenen Kammer ohne Elektrostimulationssystem (oben), sowie Beziehung von Petrischale, Ti6Al4V-Zylinder und Kollagen-Scaffold mit Osteoblasten (unten). Die roten Pfeile verdeutlichen die Bewegung der Petrischale in Korrelation zum Titankörper. Modifiziert von Ziebart *et al.* [58] unter Einholung der Genehmigung. .... 24
- Abb. 4-8: Darstellung des Systems zur kombinierten biophysikalischen Stimulation humaner Osteoblasten. Das Elektrostimulationssystem wurde in die Mikrobewegungskammer eingebaut,

- um eine simultane Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern und harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen zu ermöglichen. .... 24
- Abb. 4-9: Darstellung des Linienverlaufs der Messung sowie 3D-Darstellung der Titankörper-Unterseite (oben). Gesamt- und Rauheitsprofil der horizontalen Linie (unten)..... 25
- Abb. 4-10: Verteilung des elektrischen Feldes 1 mm über dem Boden der Kammer. Die Abbildungen A und B veranschaulichen die Simulation der elektrischen Feldstärke bei einer Eingangsspannung von 1 V<sub>eff</sub>, die Abbildungen C und D bei einer Eingangsspannung von 100 mV<sub>eff</sub>. Während die Abbildungen A und C die Stimulation ohne Ti6Al4V-Zylinder zeigen, wurde in den Abbildungen B und D ein Ti6Al4V-Zylinder in die Simulation eingefügt. .... 26
- Abb. 4-11: Aufbau der Validierungsmessung: (1) Laptop zur Steuerung des Piezo-Positioniersystems mittels PIMikroMove (2) Laptop zur Positionsmessung mittels LVDT-Sonden (3) Grundplatte des Mikrobewegungssystems (4) Eingespannte LVDT-Messsonden..... 27
- Abb. 4-12: Osteoblasten in Zellkulturflasche bei ca. 80%iger Konfluenz..... 29
- Abb. 4-13: Aufbau der 6-Well-Platte für die Applikation kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder. Mit einem Ti6Al4V-Zylinder beladene Proben im Elektrostimulationssystem (oben); unbeladene, auf Kollagen-Scaffolds ausgesäte Osteoblasten als unbehandelte Kontrolle (unten). .... 34
- Abb. 4-14: Grundplatte der Mikrobewegungskammer mit eingespannter 6-Well-Zellkulturplatte und Elektrostimulationssystem sowie den Petrischalen mit jeweils zwei Kollagen-Scaffolds (im linken, unteren Well zu erkennen) ..... 35
- Abb. 5-1: Metabolische Aktivität humaner Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch über die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 24$ ). \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Spannungen (Mann-Whitney-U-Test). .... 42
- Abb. 5-2: Relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus: Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (*ALP*) und Osteocalcin (*OC*) in humanen Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *COL1A1*, *ALP* und *OC* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 24$ ). .... 43
- Abb. 5-3: Synthese osteogener Marker: Prokollagen Typ I (Col1) und Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Freisetzung von Prokollagen Typ I im Zellkulturüberstand

- wurde mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die ALP-Aktivität wurde kolorimetrisch über die Hydrolysierung von p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 15$ ).
- \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test)..... 44
- Abb. 5-4: Relative Genexpression von Mediatoren des Knochenbaus: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP1)* und Osteoprotegerin (*OPG*) in humanen Osteoblasten nach Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und entweder 100 mV<sub>eff</sub> oder 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und über 3 Tage für jeweils 6 h mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *TIMP1* und *OPG* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 24$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Spannungen (Mann-Whitney-U-Test)..... 45
- Abb. 5-5: Metabolische Aktivität humaner Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch über die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 21$ ).
- \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test)..... 46
- Abb. 5-6: Relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus: Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (*OC*) in humanen Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *COL1A1*, ALP und *OC* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 21$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); §§  $p < 0,01$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test) ..... 47
- Abb. 5-7: Synthese osteogener Marker: Prokollagen Typ I (Col1) und Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Freisetzung von Prokollagen Typ I im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die ALP-Aktivität wurde kolorimetrisch über die Hydrolysierung von p-

- Nitrophenylphosphat bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 18$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test). ..... 48
- Abb. 5-8: Relative Genexpression von Mediatoren des Knochenumbaus: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP1)* und Osteoprotegerin (*OPG*) in humanen Osteoblasten nach Beladung mit Titankörpern (load) und Elektrostimulation (ES) mit 60 kHz und 1 V<sub>eff</sub>. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage mit einem zylindrischen Titankörper beladen. Ein Teil der Zellen wurde zudem für 6 h pro Tag mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *TIMP1* und *OPG* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse sind dargestellt als Boxplot in Relation zur unbehandelten Kontrolle ( $n \geq 21$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test). ..... 49
- Abb. 5-9: Metabolische Aktivität humaner Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Die metabolische Aktivität wurde kolorimetrisch über die Umsetzung von Tetrazoliumsalz zu Formazan bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). ..... 50
- Abb. 5-10: Relative Genexpression osteogener Marker des Knochenaufbaus: Kollagen Typ I, alpha 1 (*COL1A1*), Alkalische Phosphatase (ALP) und Osteocalcin (*OC*) in humanen Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *COL1A1*, ALP und *OC* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den beladenen Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$  Vergleich zwischen verschiedenen Parametern (Mann-Whitney-U- Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test). ..... 52

Abb. 5-11: Synthese osteogener Marker: Prokollagen Typ I (Col1) und Alkalische Phosphatase (ALP) in humanen Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Die Freisetzung von Prokollagen Typ I im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Die ALP-Aktivität wurde kolorimetrisch über die Hydrolysierung von p-Nitrophenylphosphat bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu den beladenen Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); #  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Parametern (Mann-Whitney-U- Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test). ..... 53

Abb. 5-12: Relative Genexpression von Mediatoren des Knochenumbaus: *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP1)* und Osteoprotegerin (*OPG*) in humanen Osteoblasten nach Behandlung mit Mikrobewegungen (MM) und Elektrostimulation (ES) im Vergleich zu Osteoblasten, die ausschließlich mit Mikrobewegungen behandelt wurden und Osteoblasten, die mit Titankörpern (load) beladen und Elektrostimulation behandelt wurden. Humane Osteoblasten wurden auf Kollagen-Scaffolds ausgesät und anschließend über 3 Tage für jeweils 6 h behandelt. Während ein Teil der Zellen ausschließlich über zylindrische Titankörper mit harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen behandelt wurden, erfolgte bei einem anderen Teil die alleinige beziehungsweise zusätzliche Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern. Als Kontrolle dienten mit Titankörpern beladene Osteoblasten (beladene Kontrolle). Nach 3 Tagen wurde die RNA isoliert und die Genexpression von *TIMP1* und *OPG* mittels semi-quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR) bestimmt. Ergebnisse sind dargestellt als Boxplots in Relation zur beladenen Kontrolle ( $n \geq 6$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  im Vergleich zu den beladenen Kontrollen (Wilcoxon-Signed-Rank-Test); §  $p < 0,05$  Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen (Mann-Whitney-U-Test). ..... 54

**Tabellen**

Tab. 4-1: Absolute und prozentuale Abweichungen der Mikrobewegungsplatte ..... 27

Tab. 4-2: Maximale Geschwindigkeit und Beschleunigung der Titankörper im System mit 1,7 ml Medium, Scaffolds und Deckplatte in Abhängigkeit vom Spitze-Tal-Wert ..... 28

Tab. 4-3: Schema der Versuchsreihen ..... 31

Tab. 4-4: Kultur, Abkürzung und Veranschaulichung der Versuchsgruppen ..... 32

Tab. 4-5: Ablauf der RT-PCR ..... 37

Tab. 4-6: Ablauf der qRT-PCR ..... 38

Tab. 4-7: Schritte und Inkubationszeiten des C1CP-Immunassays ..... 39

## 10 Anhang

### 10.1 Verbrauchsgegenstände

Material	Referenznummer	Firma
12-Well Zellkulturplatte Nunclon™ Delta Surface	150628	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
6-Well-Zellkulturplatte	353046	Falcon by Corning Incorporated, Corning, New York, USA
96-Well-Mikrotiterplatten	M33089	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
96-Well-Zellkulturplatte Nunclon™ Delta Surface	168055	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
AMPLIseal™, Klebefolie, transparent	676040	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Stericlin® Klarsichtbeutel mit Seitenfalte	230110	Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen, Deutschland
Cellstar® Polypropylen- Röhrchen		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
15 ml	188271	
50 ml	227261	
Einmal-Schutzhandschuhe aus Nitril	349422031	Paul Hartman AG, Heidenheim, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen LoRetention Dualfilter		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
0.1-10 µl	022493000	
2-100 µl	022493006	
20-300 µl	022493004	
50-1000 µl	022493008	
Kosmetiktücher tapira® Plus	07730010	GVS-Großverbrauchspezialisten eG, Friedewald, Deutschland
Kryoröhrchen Thermo Scientific™ Nunc™ 1,8 ml	10577391	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Latex OP-Handschuhe mit Biogel®	82270-01	Mölnlycke Health Care AB, Gothenburg, Schweden
MatriDerm® Kollagen- Elastin-Matrix 210×297×1 mm	83500-200	MedSkin Solutions Dr. Suwelack AG, Billerbeck, Deutschland
Mikroskopische Objektträger	8037/1	Thermo Fisher Scientific, Waltham Massachusetts, USA

Menzel-Gläser (geschnitten,  
Mattrand, 76×26 mm)

PCR Reaktionsgefäße		Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
0.2 ml	96.09852.901	
Pipettenspitzen epT.I.P.S		Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Standard/Bulk		
0.1-10 µL	022492012	
2-100 µL	022492039	
50-1000 µL	022492055	
Plastik Petrischale		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Nunclon™ Delta Surface 35	10738581	
mm Ø		
Qubit™ Assay Tubes	Q32856	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Reagiergefäß		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
1.5 ml	72.690.001	
Safe-Lock 2,0 ml	0030 123.344	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße		
Serologische Pipetten		Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
5 ml	86.1253.001	
10 ml	86.1254.001	
25 ml	86.1685.001	
Spezial-Vernichtungsbeutel	09.302.0020	Nerbe plus. GmbH, Winsen, Deutschland
White Multiply® PCR Platten	140111	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen		Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
25 ml	136196	
75 ml	178905	

## 10.2 Geräte

Gerät	Firma
3D-Laserscanning-Mikroskop VK-X1000	KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Analysewaage ABT220-4M	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Austauschbarer Hohlstempel	Hoffmann Group, München, Deutschland
BRAND® Petrischale, Glass	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
CertoClav EL Aluminium Autoklav	Certoclav Sterilizer GmbH, Traun, Österreich
CoolCell Cryopreservation System	Brooks Life Sciences, Berlin, Deutschland
Durchlauf-Schweißmaschine POLYSTAR® 620 DSM	Rische + Herfurth GmbH, Hamburg, Deutschland
Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop Merlin VP compact	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Funktionsgenerator GX305	Metrix, Kehl am Rhein, Deutschland
Inkubationsschüttler KS 4000 i control	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Inkubator	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Lineares Piezopositioniersystem	Physik Instrumente (PI) GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LVDT-Elektroden Solatron	Solartron Metrology, West Sussex, UK
Magnetrührer	MR Hei-Tec, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Mikroskop Primovert	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
NanoQuant Plate™	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
pH-Messgerät FiveGo	Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz
Pipetboy	Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Plattenreader Tecan-Reader Infinite® 200 Pro	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Real-Time Thermocycler qTower 2.0	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Spannungsmessgerät Digital Multimeter VC-960	Voltcraft, Wollerau, Schweiz
Sterile Werkbank Herasafe™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Thermocycler Biometra	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Thermomixer comfort 1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Thoma Zählkammer 0.0025 mm <sup>2</sup>	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Ultraschallbad SONOREX SUPER	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Vakuumpumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland

Vortex Mixer, lab dancer S40	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad Aqualine AL5	LAUDA Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda- Königshofen, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Perfect Spin 24R refrigerated microcentrifuge	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

### 10.3 Reagenzien und Lösungen

Material	Referenznummer	Firma
10 x HBSS Puffer	14 060-040	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Amphotericin B	A2612	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Ascorbinsäure (1g per 100 ml)	A4034	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
Kollagenase A	10 103 586 001	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
Dispase II	4942078001	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
Dexamethason	D-2915	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	P04-01501	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	16743.1000	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
Ethanol (70 %)	1703-026	Walter 3 CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland
Ethanol absolut	021216/503/022	Walter 3 CMP GmbH & Co. KG, Kiel, Deutschland
Extran® MA 01 alkalisches Reinigungskonzentrat	1.07555.2500	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
FKS (Fetales Kälberserum)	P303306	PAN™-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
HCL 37 %	1.00317.1000	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
HEPES Puffer	1.5630-056	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Korasilon-Paste, medium-viscous	AA-S 250	Kurt Obermeier GmbH & Co KG, Bad Berleburg, Deutschland
PBS 10x	L1835	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	15140-122	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Sterile H <sub>2</sub> O/Spüllösung	7151-5	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Trypsin/EDTA 10x	15400-054	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Wasser (Nuklease-frei)	496252354	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
WST-1 Reagenz	MK400	TaKaRa Clontach Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
β-Glycerophosphat	G9422	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland

#### 10.4 Kits und Assays

Kit	Referenznummer	Firma
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	4368814	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
innuMIX qPCR MasterMix SyGreen	845-AS-1300200	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
MicroVue™ C1CP ELISA	8003	Quidel Metra, San Diego, Kalifornien, USA
peqGOLD Total RNA Kit	12-6834-01	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Qubit™ Protein Assay Kit	1845066	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
WST-1 Assay	Cellproliferation reagent WST-1	Roche Applied Science, Penzberg, Deutschland

## 10.5 Primer

Gen	Sequenz	Firma
<i>ALP</i> Alkalische Phosphatase	For: 5'-CATTGTGACCACCACGAGAG-3' Rev: 5'-CCATGATCACGTCAATGTCC-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>COL1A1</i> Kollagen Typ I, alpha 1	For: 5'-ACGAAGACATCCCACCAATC-3' Rev: 5'-AGATCACGTCATCGCACAAC-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>HPRT</i> Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl- Transferase	For: 5'-CCCTGGCGTCGTGATTAGTG-3' Rev: 5'-TCGAGCAAGACGTTCAAGTCC-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>MMP1</i> <i>Matrix-</i> <i>Metalloproteinase-1</i>	For: 5'-AGAGCAGATGTGGACCATGC-3' Rev: 5'-TCCCGATGATCTCCCCTGAC-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>OC</i> Osteocalcin	For: 5'-TCAGCCAACTCGTCACAGTC-3' Rev: 5'-GGTGCAGCCTTTGTGTCC-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>OPG</i> Osteoprotegerin	For: 5'-AGGCGATACTTCTGTTGCC-3' Rev: 5'-GATGTCCAGAAACACGAGCG-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>RANKL</i> <i>Receptor Activator of</i> <i>NF-κB Ligand</i>	For: 5'-TCTTCTATTTTCAGAGCGCAGATGG-3' Rev: 5'-CTGATGTGCTGTGATCCAACG-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland
<i>TIMP1</i> <i>Tissue Inhibitor of</i> <i>Metalloproteinase-1</i>	For: 5'-ATTGCTGGAAAACGAGGATG-3' Rev: 5'-GTCCACAAGCAATGAGTGCC-3'	Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland

## 10.6 Medien und Zusätze

DMEM-Kulturmedium	Grundmedium	87 % DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
		1 % HEPES buffer
		1 % Amphotericin
		1 % Penicillin/Streptomycin
		10 % FCS
	Frisch hinzugefügt	50 µg/ml Ascorbinsäure
		100 nmol Dexamethason
		10 mmol β-Glycerophosphat

## 10.7 Software

Software name	Firma
COMSOL Multiphysics®, Version 5.3a	COMSOL AB, Stockholm, Schweden
GraphPad Prism 9	GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA
i-control	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
LVDT-Messung	National Instruments, Austin, Texas, USA
Magellan	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
Microsoft Excel 2019	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Microsoft Word 2019	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
PIMikroMove	Physik Instrument (PI) GmbH & Co. KG, Kahlsruhe, Deutschland
qPCRsoft	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Revelation QuickLink	Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA

## 10.8 Reinigungsprotokolle

Die Reinigung der Ti6Al4V-Zylinder und des Kammerdeckels erfolgte nach jeder Versuchsreihe. Hierzu wurden die Titankörper zunächst in einem Gemisch aus Extran® MA 01, Fa. Sigma-Aldrich (Merck), Darmstadt, Deutschland, einem alkalischen Reinigungskonzentrat, und destilliertem Wasser für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Im Anschluss erfolgten zwei weitere Reinigungsprozesse im Ultraschallbad mit reinem destilliertem Wasser für je 15 min. Zwischen jedem Reinigungsschritt wurden die Titankörper mit Leitungswasser abgespült. Der Kammerdeckel wurde mit in 70-prozentigem Ethanol getränkten Papiertüchern abgewischt. Anschließend wurden Titankörper und der Kammerdeckel in Stericlin® Autoklavierfolie, Fa. Vereinigte Papierwarenfabriken GmbH, Feuchtwangen, Deutschland, eingeschweißt und für 20 min bei 120 °C autoklaviert.



## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Jena, Dezember 2022

Martin Stephan



## **Promotionserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen oder um eine Zulassung zu solchem beworben habe. Die eingereichte Schrift wurde an keiner anderen Hochschule vorgelegt.

Jena, Dezember 2022

Martin Stephan



## **Danksagung**

Das Gelingen der Arbeit wäre ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen nicht möglich gewesen. Dabei möchte ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Dipl.-Ing. Rainer Bader und PD Dr. rer. hum. Dipl.-Biol. Anika Jonitz-Heincke für die Bereitstellung des Themas und die stetige Betreuung sowie Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Außerdem danke ich Simone Krüger und Dr. rer. nat. Annett Klinder für die Unterstützung sowie ihre Zeit für die vielen Besprechungen und Tipps.

Besonders danke ich auch Doris Hansmann, die mich während meiner ersten Schritte im Labor und auch darüber hinaus geduldig beraten und unterstützt hat. Ebenso möchte ich mich bei Mario Jackszis und Christian Schulze dafür bedanken, dass sie mir bei allen technischen und handwerklichen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für die nette Zusammenarbeit und Unterstützung im Labor möchte ich mich zudem bei Franziska Sahm, Sophie Achilles, Martin Sass und Bianca Souffrant bedanken.

Ein großes Dankeschön geht zudem an Julius Zimmermann für die Erstellung der Numerischen Simulation und an Vincent Schlüter für das Design der Abbildungen Abb. 4-2 und Abb. 4-3.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie, meinen Eltern Reik und Susanne Stephan und meinem Bruder Mark Stephan, die mich die Zeit über in allen Bereichen unterstützt hat, sowie meiner Freundin Elisabeth Fischer, die mich während meiner Arbeit auf den ein oder anderen Rechtschreibfehler aufmerksam gemacht hat und auch in schwierigen Phasen immer für mich da war.

Zu guter Letzt danke ich der gesamten Arbeitsgruppe des Forschungslabors für Biomechanik und Implantattechnologie der Universitätsmedizin Rostock für die herzliche Aufnahme und das gemeinsame Arbeiten. Die Zeit im Labor hat mir viel Freude bereitet und ich bin sehr froh über die Erfahrung, mit solch großartigen Menschen zusammengearbeitet zu haben. Vielen Dank!



## **Eigene Publikationen**

### **Originalarbeiten veröffentlicht:**

*Stephan M, Zimmermann J, Klinder A, Sahm F, van Rienen U, Kämmerer P, Bader R, Jonitz-Heincke A.* Establishment and Evaluation of an In Vitro System for Biophysical Stimulation of Human Osteoblasts. *Cells* 2020; 9

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung, Schreiben des Originalentwurfs, Erstellung von Grafiken

Jena, Dezember 2022

Martin Stephan



## **Thesen der Dissertation**

### **„Etablierung und Evaluation eines In-vitro-Systems zur biophysikalischen Stimulation humaner Osteoblasten“**

1. Basierend auf den bisher publizierten Daten wird angenommen, dass durch die Applikation kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder die Zellaktivität humaner Osteoblasten stimuliert werden kann.
2. Die Beladung zellbesiedelter Kollagen-Scaffolds mit Ti6Al4V-Zylindern führt zu einer Veränderung der osteogenen Viabilität und Differenzierung sowie des Knochenumbaus.
3. Durch kapazitiv eingekoppelte elektrische Wechselfelder wird der Zellstoffwechsel periimplantärer Osteoblasten beeinflusst.
4. Es wird vermutet, dass die Oberflächenbeschaffenheit von Titankörpern, die harmonisch oszillierende Mikrobewegungen auf zellbesiedelte Kollagen-Scaffolds ausüben, einen wesentlichen Einfluss auf die osteogene Viabilität und Differenzierung sowie den Knochenumbau hat.
5. Eine weitere Annahme ist, dass Mikrobewegungen mit Spitze-Tal-Werten von 25  $\mu\text{m}$  die osteogene Differenzierung fördern, während solche mit Spitze-Tal-Werten von 100  $\mu\text{m}$  diese hemmen.
6. Es wird weiterhin die Hypothese aufgestellt, dass eine kombinierte Stimulation aus mechanischen Belastungen mittels harmonisch oszillierender Mikrobewegungen und elektrischer Energie mittels kapazitiv eingekoppelter elektrischer Wechselfelder einer alleinigen Stimulation mit Mikrobewegungen überlegen ist.
7. Zusätzlich wird die Vermutung aufgestellt, dass eine kombinierte Stimulation aus harmonisch oszillierenden Mikrobewegungen und kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern einer Elektrostimulation in beladenen Proben überlegen ist.
8. Nach Abschluss der Experimente wird die Hypothese aufgestellt, dass die Stimulation mit kapazitiv eingekoppelten elektrischen Wechselfeldern, in Abhängigkeit von der Feldstärke, den Zellstoffwechsel von Osteoblasten wesentlich beeinflussen kann, während für die periimplantäre Stimulation von Zellen andere Stimulationssysteme genutzt werden sollten.
9. Der Einsatz biophysikalischer Stimulationen führt zu einer deutlichen Verbesserung der Osseointegration von Implantaten im klinischen Umfeld.