

**Zytomorphometrische und fluoreszenzmikroskopische
Untersuchungen humaner männlicher Osteoblasten
auf Implantatoberflächen in vitro
unter Stimulation mit gepulsten elektrischen Feldern**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.

an der medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:
Victoria Lang
geboren am 12.06.1989 in Forst / Lausitz

angefertigt am:
Friedrich-Louis-Hesse-Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
und Orale Medizin
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Leipzig AÖR

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. H.-L. Graf

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.02.2016

Bibliografische Beschreibung

Lang, Victoria

Zytomorphometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen humaner männlicher Osteoblasten auf Implantatoberflächen in vitro unter Stimulation mit gepulsten elektrischen Feldern

Universität Leipzig, Dissertation

81 Seiten, 57 Abbildungen, 12 Tabellen, 159 Literaturzitate

Referat

Ließe sich das Wachstum des Knochengewebes in der Umgebung dentaler Implantate durch Einwirkung externer elektrischer Stimuli beschleunigen, könnte dadurch die Einheilzeit nach der Implantation entscheidend verkürzt und folglich der darauf verankerte Zahnersatz zeitiger eingegliedert werden.

Ziel dieser experimentellen Studie ist es, den Einfluss elektrischer Stimulation auf humane Knochenzellen zu untersuchen, die zuvor im Bereich der Unterkiefermolaren von Probanden entnommen und auf den zu vergleichenden, klinisch verwendeten Implantatoberflächen Titan, Ticer® und TiWhite® kultiviert worden sind.

Dazu wurde in Zusammenarbeit mit der Hochschule Mittweida eine Apparatur konzipiert, mit deren Hilfe die Probekörper unter standardisierten Bedingungen jeweils mit einer Frequenz von 3,8 Hz, einer Amplitude von 3 V sowie einem Tastverhältnis von 50 % befeldet wurden.

Nach einer Gesamtversuchsdauer von 120 h erfolgte die fluoreszenzoptische Auswertung anhand der Zellzählung sowie der Bestimmung der mit Antikörpern gefärbten Zellkerne und Bone Sialoprotein-Moleküle, wobei letztere besonders in Phasen der Knochenneubildung vermehrt nachweisbar sind und folglich als Marker des Knochenstoffwechsels gelten.

Die auf Titan erhobenen Daten können aufgrund der drastisch erhöhten Anzahl von Zellen und der hoch-signifikant gesteigerten Proteinanheftung eine positive Wirkung der Elektrostimulation nachweisen.

Gegenteiliges ist auf der Ticer®-Oberfläche feststellbar; hier sind sowohl die gezählten Zellen als auch die relativen Grauwerte der Zellkern- und Proteinanfärbung bei den befeldeten verglichen mit den unbefeldeten Zellen deutlich erniedrigt.

Weniger eindeutig sind die Ergebnisse auf der TiWhite®-Oberfläche. Während in der befeldeten Kultur mehr Zellen gezählt wurden als in der unbefeldeten, differiert der Betrag der Proteinbestimmung zu unterschiedlichen Zeitpunkten und lässt folglich keine präzise Aussage hinsichtlich der durch die Elektrostimulation verursachten Effekte zu.

Inhaltsverzeichnis

Bibliografische Beschreibung	II
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung und Zielstellung	1
2. Literatur	5
2.1 Knochenarchitektur	5
2.2 Knochenwundheilung	7
2.3 Bone Sialoprotein als Knochenmarker	9
2.4 Implantatoberflächen	11
2.4.1 Titan	12
2.4.2 Ticer [®]	13
2.4.3 TiWhite [®] (Duraplast [®] 2.2)	15
2.5 Elektrostimulation in-vitro und in-vivo	17
2.5.1 Anwendung von Gleichstrom	18
2.5.2 Anwendung von kapazitiv gekoppelten elektrischen Feldern	21
2.5.3 Anwendung von induktiv gekoppelten elektromagnetischen Feldern	23
2.6 Regulierende Mechanismen	27
3. Material und Methoden	31
3.1 Material	31
3.1.1 Chemikalien	31
3.1.2 Puffer	31
3.1.3 Nährmedien	32
3.1.4 Primärantikörper	32
3.1.5 Sekundärantikörper	32
3.1.6 Labortechnisches Zubehör	32
3.1.7 Geräte zur Auswertung	33
3.1.8 Verwendete Probekörper	33
3.1.9 Stimulationsgerät und Chamber Slides	39
3.2 Methoden	40
3.2.1. Materialgewinnung	40
3.2.2 Anzucht der Knochenzellen	40
3.2.3 Erste Subkultur	41
3.2.4 Zweite Subkultur	42
3.2.5 Versuchsvorbereitung	42

3.2.6 Versuchsaufbau	43
3.2.7 Versuchsbeginn	44
3.2.8 Versuchsdurchführung	44
3.2.9 Histochemische Untersuchung des Bone Sialoprotein (BSP)	45
3.2.10 Zellzählung.....	46
3.2.11 Grauwertanalyse	46
3.2.12 Statistische Auswertung	48
4. Ergebnisse.....	49
4.1 Direkter Vergleich Verum-Placebo-Befeldung	49
4.1.1 Titan.....	50
4.1.2 Ticer®	53
4.1.3 TiWhite® (Duraplant® 2.2).....	56
4.2 Vergleich mit der Normalkultur	59
4.2.1 Titan.....	59
4.2.2 Ticer®	62
4.2.3 TiWhite® (Duraplant2.2®).....	64
5. Interpretation und Diskussion.....	66
5.1 Direkter Vergleich Verum- und Placebo-Befeldung	66
5.1.1 Titan.....	66
5.1.2 Ticer®	67
5.1.3 TiWhite® (Duraplant 2.2®).....	68
5.2 Vergleich mit der Normalkultur	69
5.3 Potenzielle Fehlerquellen	70
5.4 Vergleich mit der Literatur	76
5.5 Ausblick.....	79
6. Zusammenfassung.....	80
Abbildungsverzeichnis.....	i
Tabellenverzeichnis	iv
Literaturverzeichnis.....	v
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	xix
Lebenslauf	xx
Danksagung	xxi

Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOF	Anodische Oxidation unter Funkenentladung
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
BZ	Belichtungszeit
Cy3	Sekundärantikörper zur Anfärbung von BSP
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
etc.	et cetera
GW	Grauwert
h	Stunde
HS	Hochschule
Hz/kHz	Hertz/Kilohertz
IL	Interleukin
LIPUS	Low-Intensity Pulsed Ultrasonic
m/cm/mm	Meter/Zentimeter/Millimeter
MKG	Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
MTA	Medizinisch Technische Assistentin
MW	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
p.a.	pro analysi (Reinheitsbezeichnung)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Pufferlösung)
PEMF	Pulsed Electromagnetic Field
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin-Lösung
PGE	Prostaglandin E
Pk	Probekörper
rel.	relativ
REM	Rasterelektronenmikroskop
resp.	respektive (beziehungsweise)
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Ti	Titan
Tic	Ticer [®]
TiW	TiWhite [®]
TRITC	Tetramethylrhodamine Isothiocyanate
V/mV	Volt/Millivolt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vergr.	Vergrößerung

1. Einleitung und Zielstellung

Im Zuge der rasanten Weiterentwicklung der Zahnärztlichen Implantologie im Hinblick auf Werkstoffeigenschaften und Biophysik steigen die Ansprüche der Behandler und in erster Linie der Patienten an eine zügige Rehabilitation nach eingetretenem Zahnverlust.

Darüber hinaus sind analog der demografischen Entwicklung und dem damit verbundenen zukünftig steigenden Behandlungsbedarf erwachsener und alternder Menschen Funktionszeiten wünschenswert, die über die bisher wissenschaftlich belegte Liegezeit von mindestens 15 Jahren hinausreichen (Böttcher 2012).

Das primäre Ziel ist dabei der als Erfolgsmerkmal dentaler Implantationen geltende Begriff der „Osseointegration“. Dieser wurde in den 1950er Jahren erstmals von dem orthopädischen Chirurgen Per-Ingvar Brånemark als direkter, histologisch darstellbarer Knochen-Implantat-Kontakt unter Last definiert, wobei der Erfolg der Implantation vom strukturellen und funktionellen Kontakt zwischen dem lebendem Knochen und der lasttragenden Implantatoberfläche abhängt (Brånemark et al. 1977).

Zu dieser grundlegenden und die Zahnmedizin revolutionierenden Erkenntnis gelangte er durch Einbringung von Titan-Implantaten, die mit einem zentralen Kanal und einer transversalen Öffnung für das Einwachsen von Knochen und Gefäßen versehen waren. Das vitale Knochengewebe und die Titanoxidschicht waren so fest miteinander verwachsen, dass sie nicht ohne Fraktur voneinander getrennt werden konnten. So beobachtete er eine vollständige, permanente Inkorporation der Titanschrauben mit dem daraus resultierenden Potenzial, langfristig die Verankerung von Zahnprothesen zu verbessern. In der Folge gewann dieses Phänomen stetig an Relevanz für die rekonstruktive Chirurgie und wurde mithilfe zahlreicher Forschungsarbeiten innerhalb eines breiten Spektrums klinischer Anwendungsmöglichkeiten thematisiert.

Darüber hinaus wird ein Implantat als osseointegriert bezeichnet, wenn keine fortschreitende Relativbewegung zwischen dem Implantat und dem umgebenden Knochen feststellbar ist. Histologisch ist hierbei kein lichtmikroskopischer Nachweis einer bindegewebigen Einscheidung möglich, die klinisch das Risiko von durch Bakterien aus der Mundhöhle und ihren Stoffwechselprodukten verursachten, entzündlichen Reaktionen erhöht (Brånemark 1983).

Albrektsson und Jacobsson charakterisierten 1987 durch 100.000-fache elektronenmikroskopische Vergrößerung die Knochen-Implantat-Kontaktzone und definierten sie wie folgt: dem Titan lagert unmittelbar eine amorphe, teils mineralisierte Grundsubstanz an, die von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen durchsetzt ist. Bis zu einem Abstand von 0,5 μm um das Titan finden sich Kollagenfaserbündel und weitere willkürlich angeordnete Fasern. Daran schließen sich Knochenzellen an, deren Fortsätze etwa 200 – 300 Ångström überbrücken und an die Titanoberfläche heranreichen (Albrektsson und Jacobsson 1987).

Anhand der Beobachtung, dass implantatprothetische Restaurationen stabil funktionieren, obwohl in den seltensten Fällen genauso viel oder mehr Implantatoberfläche zur Verfügung steht als Desmodont verloren gegangen ist, scheint das voll ausgebildete Implantat-Knochen-Interface erheblich lastresistenter zu sein als das natürliche Desmodont (Graf 1997).

Abbildung 1 vergegenwärtigt den Unterschied zwischen der Aufhängung des natürlichen Zahnes im Knochen durch einen komplexen Faserapparat, welcher der Kompensation einwirkender Druckkräfte dient und der funktionellen Ankylose des Implantates, also der direkten Anlagerung des Knochens an die Implantatoberfläche bei fehlender Faserverankerung. Eine wesentliche Verschlechterung der Prognose würde stattdessen die Ausbildung eines wenig differenzierten und unmineralisierten Narbengewebes mit unvorhersehbaren Folgeschäden nach sich ziehen.

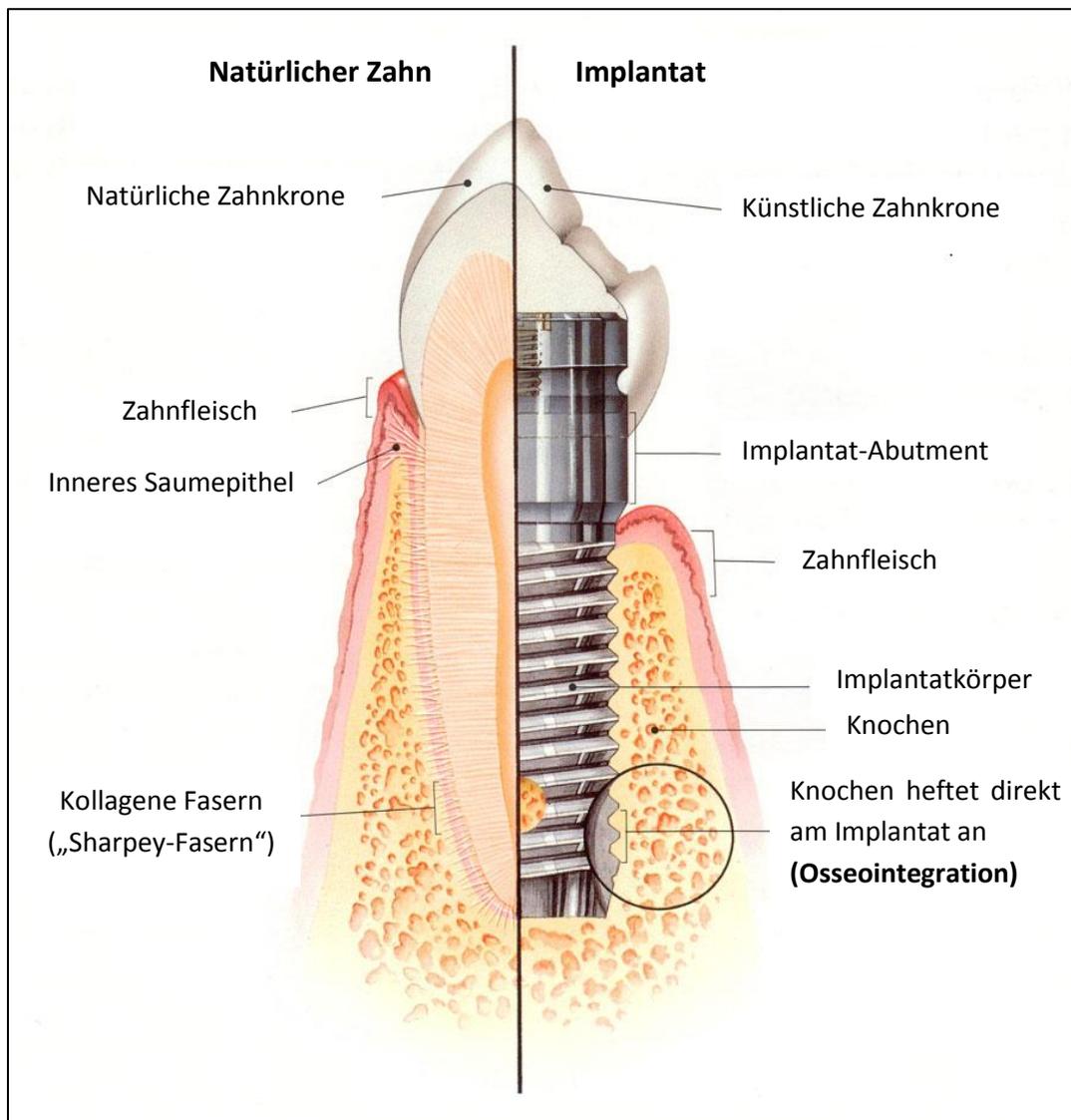


Abbildung 1: Schematische Darstellung der desmodontalen Integration eines Zahnes verglichen mit der knöchernen eines Implantates (Abbildung modifiziert; Homepage: dentalimplants.uhc.edu)

Prinzipiell ist zwischen Primär- und Sekundärstabilität zu unterscheiden. Erstere bezeichnet die initiale mechanische Stabilität direkt nach der Insertion des Implantates in den Knochen und ist sowohl vom makroskopischen Implantatdesign als auch vom kortikalen Angebot abhängig. Realisiert werden kann dies durch Klemmpassung in ein formkongruentes, jedoch diskret unterdimensioniert präpariertes Lager sowie unterschiedlich konstituierte vorgeschchnittene oder selbstschneidende Gewinde (DaSilva 2012).

Die Intention ist die Vermeidung schädlicher Mikrobewegungen mit daraus resultierender Ausbildung eines wenig differenzierten Narbengewebes, da die bindegewebige Einheilung an einem Implantatmisserfolg maßgeblich beteiligt sein kann.

Die Formation neuen Knochens durch Osteoblasten während der Einheilphase und die dadurch entstehende Koexistenz mechanischer und physikochemischer Verzahnung zwischen der Implantatoberfläche und dem Knochen kennzeichnen die Sekundärstabilität. Sie stellt jedoch keine statische Größe dar, sondern unterliegt permanent adaptiven Prozessen und ist insbesondere bei rotationssymmetrischen Implantatformen zur Vermeidung einer Lösung des Implantates durch Rotations- und Abzugskräfte erforderlich. Nur wenn eine gute Sekundärstabilität erreicht ist, kann das Implantat okklusal-funktionell belastet werden (Okko 2013).

Bislang ist für den Patienten je nach Implantatposition eine Einheilzeit von drei bis sechs Monaten unerlässlich, während der die jeweilige Lückensituation lediglich mithilfe suboptimaler Provisorien versorgt werden kann und keinerlei Belastung tragen darf.

Eine besondere Indikationsgruppe bilden zudem Patienten mit kompromittiertem Knochen. In diesem Fall können unterschiedliche Umstände zugrunde liegen, wobei eine Langzeittherapie mit immunsupprimierenden Medikamenten, zum Beispiel bei Vorliegen einer Autoimmunerkrankung oder nach Organtransplantation, eine vorangegangene Bestrahlung im Mund-, Kiefer-, Gesichtsbereich oder eine antineoplastische Chemotherapie bzw. Tumormimmuntherapie zu den häufigsten zählen. Die Folge ist bei allen Methoden eine gravierende Beeinträchtigung des Knochenstoffwechsels sowie eine Senkung der körpereigenen Abwehrleistung, die eine erhöhte Anfälligkeit gegen pathogene Bakterien und Viren bedingt (Al-Nawas und Grötz 2011). Postoperative Periimplantitiden bis hin zu Osteomyelitiden stellen eine gefürchtete Gefahr besonders in vorgeschädigtem Knochen dar, weil sich ihre Therapie entsprechend schwierig gestaltet (Al-Nawas 2013).

Zahlreiche Forschungsprojekte experimentierten in den letzten Jahrzehnten zum einen mit verschiedensten Konfigurationen des Implantatkörpers selbst, zum anderen rückten die vielfältigen Möglichkeiten der Oberflächenmodifikationen in den Vordergrund.

So wurde unter anderem versucht, durch Veränderung der Topografie, Ladung und chemischen Zusammensetzung positiven Einfluss auf die knöcherne Einheilung zu nehmen oder auch durch gezielte Beschichtung der Oberfläche mit Matrixproteinen, Wachstumsfaktoren oder Medikamenten die Bedingungen des Implantatlagers zu optimieren.

Ein relativ neuer Ansatz ist die elektrische Stimulation des implantatumgebenden Gewebes zum Zweck der Anregung der umgebenden Knochenzellen mit dem Ziel der beschleunigten Knochenheilung und früherer Belastbarkeit; eine Methode, die in der orthopädischen

Chirurgie bereits seit einigen Jahrzehnten erfolgreich zur Behandlung von Frakturen sowie schlecht heilender Wunden und im Rahmen der Nachsorge nach erfolgtem Gelenkersatz angewendet wird.

Unter Zusammenwirkung der Hochschule Mittweida, der Technischen Universität Chemnitz, der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig sowie der Firma ZL-Microdent wurde im vergangenen Jahr das Projekt „Elektrostimulations-Mikroabutment“ initiiert, um diese Möglichkeit zunächst *in vitro* im Rahmen der dieser Arbeit zugrundeliegenden Zellkulturversuche und anschließend *in vivo* tierexperimentell und später an ersten Probanden zu untersuchen. Langfristig soll so ein Aufbau entwickelt und klinisch etabliert werden, der direkt nach der Insertion des Implantates anstelle der bislang aufgeschraubten Einheilkappe verankert wird und im Innern Raum für den Stromgenerator bietet. Voraussetzung ist eine entsprechend mikrodimensionierte Apparatur, die innerhalb des Abutments verbaut werden kann und dennoch genügend Leistung liefern muss, um eine konstante Stimulationszeit von mindestens drei Wochen gewährleisten zu können. Abbildung 2 illustriert eine mögliche Umsetzung der Konstruktion unter Einbeziehung der wichtigsten Komponenten.

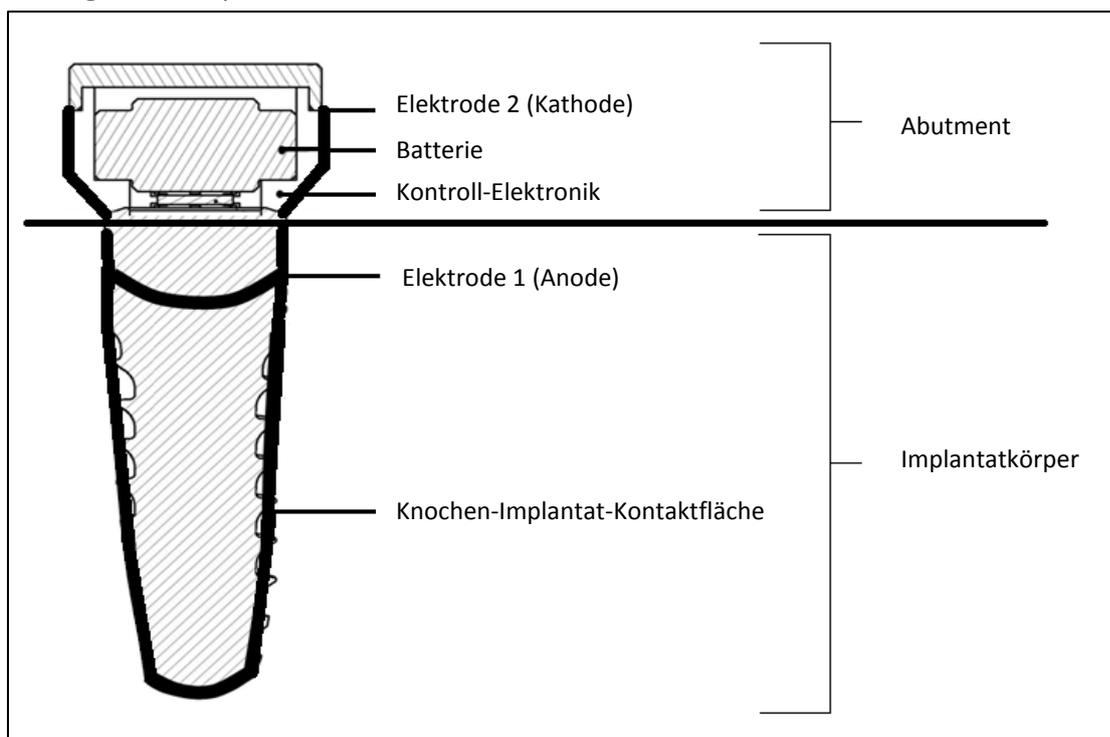


Abbildung 2: Schematischer Querschnitt eines Implantates mit Elektrostimulation-Mikroabutment (modifiziert nach Dipl.-Ing. (FH) H. Polster; Hochschule Mittweida)

Die vorliegende Arbeit untersucht zu diesem Zweck den Einfluss gepulster elektrischer Felder auf das Wachstum humaner Osteoblasten und die Anlagerung des Knochenmarkers Bone Sialoprotein (BSP) auf den Implantatoberflächen Titan, Ticer® und TiWhite®.

Hierbei wurden während einer Gesamtstimulationsdauer von 24 Stunden Impulsphasen mit einer Frequenz von 3,8 Hz, einer Amplitude von 3 V sowie einem Tastverhältnis von 50% generiert und anschließend nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen rasterelektronenmikroskopisch die Zellzahl, die Zellgröße und die Bone Sialoprotein-Expression analysiert.

2. Literatur

2.1 Knochenarchitektur

Knochengewebe ist mesenchymalen Ursprungs und entsteht individuell im Rahmen der Osteogenese, die über zwei Wege erfolgen kann (Groos 2007):

1. Durch desmale Ossifikation werden die Knochen des Schädeldaches, des Gesichtsschädels sowie des Schlüsselbeines gebildet. Dazu verdichten sich Mesenchymzellen inselförmig um ein Kapillarnetz, differenzieren direkt zu Osteoblasten und beginnen Osteoid abzulagern. Nach der sich anschließenden Mineralisation werden sie zu eingemauerten Osteozyten. Durch Anlagerung von weiterem Knochengewebe an der Peripherie wächst das Knochenteilchen weiter (appositionelles Wachstum). Bereits während der Knochenentwicklung erfolgt zur Anpassung an das fortschreitende Schädelwachstum ein Umbau durch Osteoklasten.
2. Die meisten Knochen entstehen durch chondrale Ossifikation, das bedeutet auf Grundlage eines Knorpelgerüsts. Hierbei differenzieren Mesenchymzellen zunächst zu Chondroblasten und formen ein Modell aus hyalinem Knorpel. Nach der Weiterdifferenzierung zu Osteoblasten erfolgt die Mineralisation je nach Lokalisation an der Außengrenze (perichondrale Ossifikation) oder im Innern (enchondrale Ossifikation).

Obleich physikalisch fest, ist Knochen ein vitales Gewebe und besteht zu unter 1 % aus Zellen, knapp 30 % organischer Matrix und 70 % Mineralien (Habel 2004).

Die als „Bone Remodeling“ bezeichneten permanenten Umbauprozesse sorgen für Plastizität und ermöglichen so eine Adaptation der inneren Architektur und äußeren Form an mechanische Belastungen. Dies dient der Optimierung der Knochenstruktur in Bezug auf Masse und Stabilität (Frost 1990).

Osteoblasten sind spezialisierte Zellen des embryonalen Mesenchyms und realisieren die Synthese des organischen Anteils des Osteoids. Dies bezeichnet ein kollagenes Stützgewebe, welches Glykosaminoglykane und kalziumbindende Glykoproteine enthält. Über Zell-Zell-Verbindungen, die sich innerhalb enger Kanälchen befinden, sind die Zellen chemisch und elektrisch gekoppelt, so dass Sensitivität und Selektivität in Relation zu isolierten Zellen erhöht sind (Zhang et al. 1997).

Osteoklasten hingegen sind mehrkernige Riesenzellen, die aus der Fusion von mononukleären Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems entstehen. Sie befinden sich an der Knochenoberfläche in Resorptionslakunen („Howship-Lakunen“) und sind in der Lage, sich amöboid fortzubewegen.

Wie Abbildung 3 schematisch verdeutlicht, ist histologisch die außen gelegene Kortikalis, die aus einer kompakten Schicht aus Lamellen besteht, von der trabekulären Spongiosa im Inneren, die von schwammartig angeordneten Knochenbälkchen gebildet wird, abzugrenzen.

Die strukturelle Einheit des Knochens ist das zylindrische Osteon, das sich seinerseits aus einem Blut- und Nervengefäße enthaltenden Zentralkanal, dem sogenannten Havers'schen Kanal und ringsum konzentrisch angeordneten Lamellen zusammensetzt. Diese werden durch parallel angeordnete Kollagenfaserbündel mit Apatitkristallen gebildet und von innerhalb der Knochenmatrix liegenden Osteozyten umgeben. Die einzelnen Osteone stehen über als Volkmann-Kanäle bezeichnete, laterale Verzweigungen miteinander in Verbindung. Die Begrenzung bilden zum einen das Periost nach außen, welches Mesenchymzellen sowie Nerven und für die Ernährung des Knochens essenzielle Gefäße enthält und zum anderen das Endost, das der Kortikalis innen anliegt und sie vom Knochenmark abgrenzt.

Im Gegensatz dazu besteht die Spongiosa aus einem komplexen Netzwerk von Knochen-trabekeln, deren Ausrichtung der Lage der Druck- und Zugtrajektorien entspricht. Anstelle systematisch angeordneter Osteone finden sich konzentrische Osteozyten, die über kanalikuläre Fortsätze miteinander kommunizieren. Innerhalb der Trabekel befindet sich blutbildendes Knochenmark (Junqueira und Carneiro 1996).

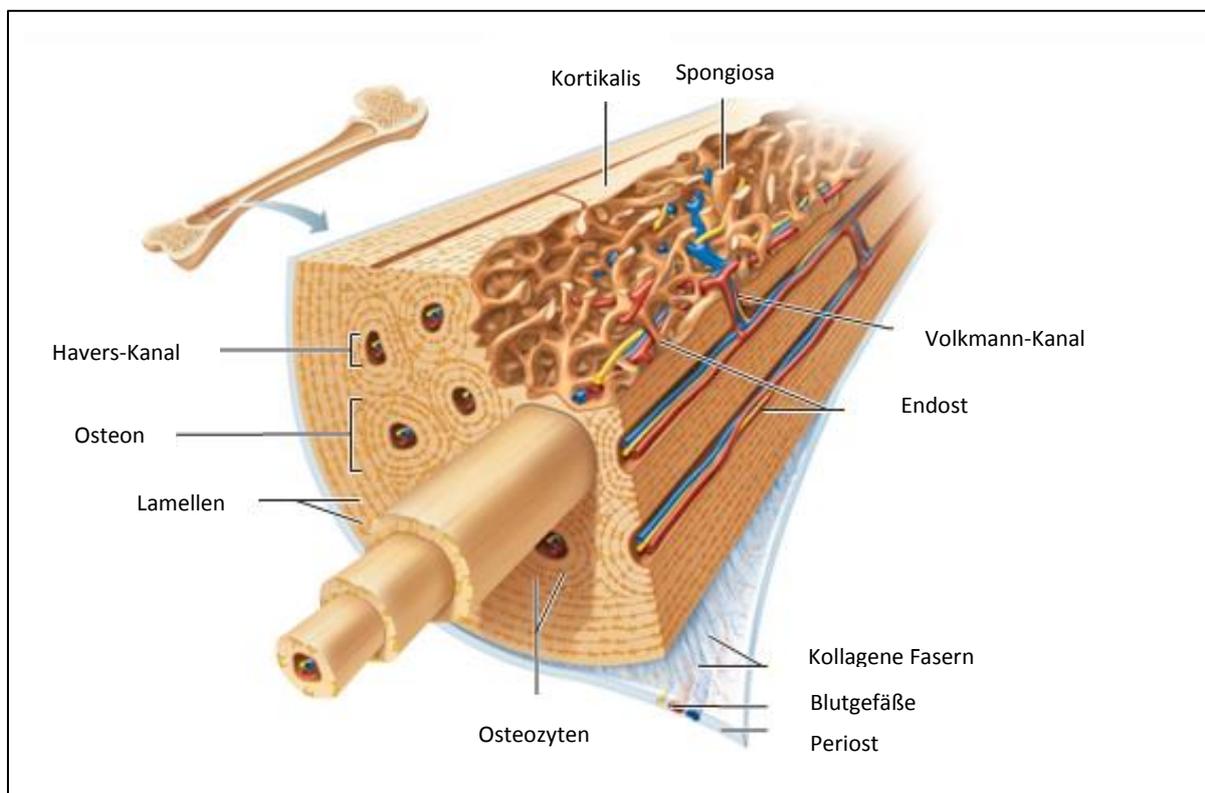


Abbildung 3: Mikroskopische Anatomie des Knochens

(Abbildung modifiziert nach Salt Lake Community College (Utah, USA); Homepage: www.studyblue.com)

Makroskopisch können Knochen in drei Formen unterteilt werden: lange Knochen (Röhrenknochen) bilden die Extremitäten und gliedern sich in Diaphyse, Epiphysen und Metaphyse. Kurze Knochen, z. B. Wirbelkörper, haben einen geringen Kortikalis- und einen hohen Spongiosaanteil und bei platten Knochen, z. B. Schulterblatt, sind beide Schichten nur flach ausgeprägt (Ulfig 2002).

2.2 Knochenwundheilung

Die Knochenheilung erfordert einerseits die Migration mesenchymaler Zellen in den Hohlraum und andererseits die Proliferation und Differenzierung knochenbildender Zellen.

Hierbei kommt eine Vielzahl von systemischen und lokalen Regulatorzytokinen wie Knochenmatrixproteine und Wachstumsfaktoren zum Einsatz. Sie lassen sich zudem unterteilen in Morphogene wie beispielsweise die Bone Morphogenetic Proteins, welche an der Differenzierung pluripotenter mesenchymaler Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen beteiligt sind sowie Mitogene (z. B. Platelet Derived Growth Factor, Insulin-like Growth Factor und Transforming Growth Factor- β), die die Reifung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten unterstützen (Neukam et al. 2007).

Abhängig von der Defektgröße lassen sich die folgenden beiden Vorgänge voneinander abgrenzen (Schwenzer und Ehrenfeld 2008):

1. Primäre Knochenheilung

Die Grundvoraussetzung hierfür ist ein nahezu lückenloser Kontakt der Knochenkanten, wobei man bei einer Größe des Frakturspalts von weniger als 10 μm von „Kontaktheilung“ spricht. Dabei überbrücken bereits vorhandene Osteone die Distanz zum anderen Fragment und ermöglichen den Abbau der Nekrosezone durch Osteoklasten und anschließend die Auskleidung des Resorptionskanals mit Osteoid durch Osteoblasten. Bei einer Größe des Frakturspalts von mehr als 10 μm kommt es zur „Spaltheilung“, wobei kapillarreiches Mesenchym in den Frakturspalt einwächst und parallel dazu lamelläres Knochengewebe gebildet wird, welches später durch senkrecht zum Frakturspalt verlaufende Osteone ersetzt wird (Gutwald et al. 2010). Bei der Therapie von Frakturen kann dies nur durch operative Darstellung und exakte Adaptation der Fragmentenden mit stabiler Fixierung (z.B. über Plattenosteosynthese) unter Aufrechterhaltung einer ausreichenden Blutversorgung erreicht werden. Durch unzureichende Immobilisation kann es im ungünstigsten Fall zum Ausbleiben der Mineralisation und infolgedessen trotz übermäßiger proliferativer Aktivität zur Ausbildung einer bindegewebigen Überbrückung des Defektes, einer sogenannten Pseudarthrose, kommen (Rost und Appell 2001).

2. Sekundäre Knochenheilung

Besteht keine präzise Adaptation oder Immobilisation der Knochenfragmente oder ist eine Auffüllung von Knochendefekten nötig, erfolgt die Bildung neuen Knochengewebes über den Umweg eines sogenannten Kallus, der durch bindegewebige Organisation des Frakturhämatoms entsteht und bei dem es sich um ein Konglomerat aus innerer und äußerer Knochenhaut, Havers-Kanälen und Knochenmark handelt. Zunächst bildet sich überschüssig die Fraktur ummantelndes Bindegewebe, welches erst in unverkalktes Osteoid und später unter funktioneller Belastung in mineralisiert, reifes Knochengewebe umgebaut wird. Folglich nimmt die Stabilität des Knochens zu und komplexe Remodelling-Vorgänge setzen zur Anpassung des neu gebildeten Knochens an Form und Funktion des ortständigen ein. Die Ausrichtung der Knochenbälkchen erfolgt hier entsprechend der trajektorialen Druck- und Zugsysteme der Spongiosa (Gutwald et al. 2010).

Prinzipiell ähneln die Mechanismen denen der Weichgewebsheilung: Zu Beginn kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms und einer entzündlichen Reaktion, in deren Verlauf das Komplementsystem aktiviert wird. Daraufhin werden erst nekrotische Gewebeanteile durch Osteoklasten und Makrophagen resorbiert und anschließend wird die Stimulation der Knorpel- und Knochenzellen sowie der Angiogenese durch die bone morphogenetic proteins (BMPs) initiiert. Es bildet sich ein Kallus, der zunächst aus Granulationsgewebe und nach Einsetzen der Kollagensynthese aus Bindegewebe besteht. Nachdem als Zwischenstufe von den Osteoblasten organisches Osteoid gebildet wird, beginnt etwa nach zehn Tagen die Mineralisation mit der Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen. Die letzte Phase ist das Einsetzen dynamischer Knochenumbauprozesse durch das komplexe Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten.

Die Einheilung dentaler Implantate ist als Sonderfall der primären Knochenheilung aufzufassen und kann nach Albrektsson und Johansson in die drei miteinander verbundenen Phasen der Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osseointegration unterteilt werden (Albrektsson und Johansson 2001). Zur Definition des Begriffs der Osseointegration wird auf Kapitel 1 verwiesen.

Der auch während der normalen Knochenheilung auftretende Vorgang der Osteoinduktion beginnt unmittelbar nach der Implantation und weist innerhalb der ersten Woche post implantationem die höchste Aktivität auf. Im Zuge dessen wird die Knochenneubildung induziert. Dies erfolgt durch die Entwicklung primitiver, undifferenzierter Zellen zu Präosteoblasten als Teil der knochenbildenden Zelllinie. Aber auch weniger differenzierte Zellen sind von Bedeutung für eine vollständige knöcherne Verankerung des Implantats, da sie zur Bildung von Osteoprogenitorzellen rekrutiert werden können (Urist und McLean 1952).

Eine Methode zur Testung der Osteoinduktivität ist die Einbringung in ein heterotopes Lager wie eine Muskellücke und anschließende Analyse potenzieller Knochenbildung.

Osteokonduktion vollzieht sich z. B. nach Insertion eines Implantates und bedeutet, dass Knochenwachstum auf einer artifiziellen Oberfläche stattfindet. Diese wird im Umkehrschluss als osteokonduktiv bezeichnet und ermöglicht das Einsprossen von Knochenzellen in ihre Poren und Kanälchen. Das transplantierte Material fungiert dabei als Leitschiene für den neu gebildeten Knochen. Das Ausmaß des Knochenwachstums hängt dabei von der Aktivität differenzierter Knochenzellen ab, die entweder durch das vorangegangene Trauma aus Präosteoblasten entwickelt oder im Rahmen der Osteoinduktion aus mesenchymalen Stammzellen rekrutiert wurden (Frost 1989). Unabdingbare Voraussetzung ist eine ausreichende Vaskularisation des Implantatlagers (Albrektsson 1980).

Auf bestimmten Materialien, so z. B. Kupfer und Silber, ist Osteokonduktion nicht möglich, während sie auf anderen Oberflächen mit geringer Biokompatibilität wie Edelstahl beobachtet werden kann (Di Silvio 2008).

2.3 Bone Sialoprotein als Knochenmarker

Nonkollagenen Matrixproteinen wird bei der Organisation der Kollagen-Matrix und der Bildung von Hydroxylapatitkristallen eine entscheidende Rolle zuteil.

Zu ihnen zählen unter anderen die Proteoglykane Decorin und Biglycan, die Sialoproteine Osteopontin und Bone Sialoprotein sowie Osteonektin (Young et al. 1992).

Exprimiert wird speziell das Bone Sialoprotein (BSP) von Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten sowie von Chondrozyten (Bianco et al. 1991), Ameloblasten (Chen et al. 1998) und Zementoblasten (Bosshardt et al. 1998).

Die Verteilung innerhalb der Matrix ist unregelmäßig: die höchsten Konzentrationen sind in Arealen der Neubildung und des Remodelings zu verzeichnen, dort wo von Osteoklasten alter Knochen resorbiert und von Osteoblasten neuer Knochen synthetisiert wird (Hultenby et al. 1994). In der Folge konnte auch quantitativ nachgewiesen werden, dass hohe BSP-Spiegel mit der de-novo-Formation von Knochen und Zement einhergehen (Chen et al. 1998).

Es eignet sich deshalb hervorragend als Zielmolekül für in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen der regulierenden Mechanismen während der Osteogenese (Ganss et al. 1999).

Die osteoinduktive Wirkung realisiert das Protein, indem es an Hydroxylapatit und Zellen bindet und dort als Adhäsionsmolekül dient, wodurch die Anheftung von Zellen an die extrazelluläre Matrix ermöglicht wird. Hierzu dienen Arg-Gly-Asp-Sequenzen als Zellkontakte und als Rezeptoren für integrale Zellproteine, während die Kalziumbindung durch Abschnitte mit hohem Glutaminsäureanteil realisiert wird (Fujisawa et al. 1997).

Bei Kindern und Jugendlichen sind die BSP-Werte mit Maxima während der frühen Kindheit und der Pubertät höher als bei Erwachsenen. Prinzipiell unterliegt die Konzentration dabei tageszeitlichen Schwankungen mit einem Peak zwischen 4.00 Uhr und 8.00 Uhr. Nach der Menopause konnten bei Frauen im Serum um 50 % erhöhte BSP-Werte gemessen werden, während bei Männern kein signifikanter Zusammenhang zwischen BSP und Alter, Körpergröße und -gewicht sowie Knochendichte und Serum-Kalziumkonzentration nachgewiesen werden konnte (Seibel et al. 1996).

In der Vergangenheit wurde vor allem der Einfluss von BSP auf den Knochenmetabolismus und bei Knochenerkrankungen untersucht. Deutlich erhöht sind die Werte demnach bei Stoffwechsel- und malignen Knochenerkrankungen wie Morbus Paget, Primärer und Sekundärer Hyperparathyreoidismus und darüber hinaus auch bei chronischen Nierenerkrankungen und verminderter Lungenfunktion. Chronische Lebererkrankungen verändern den BSP-Spiegel hingegen nicht (Ruf 1999).

Anhand der Analyse des BSP-Spiegels in der Kniegelenksflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte eine Korrelation des BSP mit dem Grad der funktionellen Gewebeerstörung nachgewiesen werden (Saxne et al. 1995).

Des Weiteren wurde durch Untersuchungen an Patientinnen mit Mamma-Karzinom eine signifikant hohe Korrelation zwischen dem Auftreten von Knochenmetastasen und dem Serum-BSP nachgewiesen. Die Expression bestimmter Knochenmatrixproteine, darunter BSP, Osteonektin und Osteopontin, wird folglich von malignen Tumorzellen gesteigert (Diel et al. 1999).

In einer anderen Studie wurde bei 62 Patienten mit neu diagnostiziertem Multiplem Myelom über vier Jahre regelmäßig das immunreaktive BSP bestimmt. Zum einen konnten die in Relation zu gesunden Vergleichsgruppen deutlich erhöhten Werte als Diagnoseparameter herangezogen werden, zum anderen eignen sie sich als Prognosefaktor ergänzend zum konventionellen Staging (Woitge et al. 2001).

Auch von mineralisierten Geweben ausgehende Sarkomzellen exprimieren BSP, so zum Beispiel Osteosarkome, Zementoblastome und Osteoklastome (Riesenzelltumoren) (Oldberg et al. 1988).

Nachdem sich bioaktive Proteine bereits experimentell erfolgreich als Beschichtungsmaterialien dentaler und orthopädischer Implantate erwiesen hatten, wurde im Rahmen einer in-vitro-Studie mit humanen Knochenzellen des Oberkiefers jeweils auf reinen Titan- und Ticer®-Probekörpern untersucht, ob die Anheftung und Differenzierung von Osteoblasten auf mit BSP beschichteten Oberflächen im Vergleich zu mit Hydroxylapatit oder Kollagen beschichteten Oberflächen beschleunigt werden kann. Dabei wiesen sowohl die glatten als auch die rauen BSP-beschichteten Titanoberflächen positive Effekte im Hinblick auf Zellverteilung, -adhäsion und -proliferation auf. Daraus kann geschlossen werden, dass die Beschichtung mit BSP durchaus dazu in der Lage ist, die Knochenneubildung an der Implantat-Knochen-Schnittstelle zu beschleunigen und so die Einheilzeit zu reduzieren (Graf et al. 2008).

2.4 Implantatoberflächen

Entscheidend für die Geschwindigkeit der Einheilung dentaler Implantate ist deren Oberflächenbeschaffenheit. Konkret beeinflussen Rauigkeit, Ladung, chemische Zusammensetzung, Benetzbarkeit sowie andere Faktoren zahlreiche biologische Reaktionen und entscheiden so über Abstoßung oder Integration (Gradinger und Gollwitzer 2006). Inzwischen steht eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Einflussnahme auf die komplexen Wechselwirkungen mit dem menschlichen Organismus zur Verfügung, die weiter in mechanische, chemische und biologische Modifikationen unterteilt werden können.

Die Oberflächenrauigkeit zählt zu den mechanischen Modifikationen und beeinflusst in erster Linie die Osteokonduktivität, also die postoperative Migration osteogener Stammzellen vom periimplantären Kieferknochen durch das Thrombozyten-Fibrinogen-Netzwerk zur Implantatoberfläche. Während glatte Oberflächen die Adhäsion humaner Fibroblasten begünstigen und somit einen Vorteil für das Weichgewebsmanagement im transgingivalen Bereich des Abutments bedeuten (Nothdurft et al. 2014), ist die Oberflächenrauigkeit besonders für die knöcherne Einheilung des enossalen Implantatkörpers von Bedeutung. Dabei weisen klassifiziert nach der Porentiefe glatte ($< 0,5 \mu\text{m}$) und geringfügig raue ($0,5 - 1\mu\text{m}$) Oberflächen eine weniger gute Osseointegration auf als raue ($> 2 \mu\text{m}$) Oberflächen (Wennerberg und Albrektsson 2009).

Histomorphometrische Untersuchungen konnten ebenfalls zum einen die Überlegenheit rauher Implantatoberflächen in Relation zu glatten und geringfügig rauhen und zum anderen den gegenüber der Makrostruktur wesentlich größeren Einfluss auf die Implantat-Knochen-Verbindung (bone implant contact) belegen (Al-Nawas et al. 2008).

Erzeugt wird die Rauigkeit zum Beispiel durch das Plasmasprayverfahren (TPS), durch Sandstrahlen mit Keramikpartikeln, durch Säureätzung oder durch anodische Oxidation. Letztere führt durch Schaffung einer schützenden Struktur-Oxidschicht ebenfalls zu einer bedeutsamen elektrochemischen Veränderung.

Weitere chemische Modifikationen sind die Beschichtungen mit biomimetischen, dies bedeutet biologische Prozesse und Strukturen nachahmenden Materialien wie Hydroxylapatit oder Kalziumphosphat. Durch deren chemische Bindungen soll eine starke Wechselwirkung zwischen der Implantatoberfläche und dem umgebenden Knochengewebe induziert werden (Junker et al. 2009).

Die dritte Gruppe der Oberflächenmodifikationen und Gegenstand zahlreicher aktueller Studien sind die Beschichtungen mit bioaktiven Substanzen, die ähnlich einer „Retard-Wirkung“ mit zeitlicher Verzögerung freigesetzt werden und den Heilungsprozess dadurch über einen langen Zeitraum hinweg fördern.

Hierzu zählen mit dem gemeinsamen Ziel der beschleunigten Osteoblasten-Differenzierung unter anderem die Einlagerung von Wachstumsfaktoren sowie die Beschichtung mit BMPs oder mit extrazellulären Matrixproteinen wie z. B. Typ-I-Kollagen.

Darüber hinaus stellen Titanoberflächen, die durch Peptide mit der Sequenz „Arginin-Glycin-Aspartat“ funktionalisiert wurden, eine Bindungsstelle für Integrine dar und begünstigen so die Adhäsion körpereigener Zellen untereinander und an Implantatoberflächen (Schliephake et al. 2005).

Im Folgenden werden die im Zuge der unten erläuterten Versuchsanordnung verwendeten Oberflächenkonfigurationen einzeln charakterisiert.

Prinzipiell bietet der Markt auch die Möglichkeit der Verwendung keramischer Implantate, da diese elfenbeinfarben sind und so der Zahnhartsubstanz ähneln. Ihre Röntgenopazität erlaubt zudem eine regelmäßige kontrollierende Bildgebung und die im Rahmen zahlreicher Studien gemessene Plaqueanlagerung war auf Zirkonoxid-Oberflächen in Relation zu Titan vergleichbar oder sogar geringer (Egawa et al. 2013; Nascimento et al. 2014). Problematisch sind hingegen die geringe Biegefestigkeit und in der Folge das Auftreten von Sprödbrüchen (Misch 2008). Der größte Nachteil ist allerdings eine nachweislich schlechtere Osseointegration von rein keramischen Implantaten, die sich in einer von Fasern anstatt von Knochenzellen dominierten Verankerung niederschlägt (Depprich et al. 2008). Infolgedessen ist der klinische Einsatz limitiert und rein keramische Oberflächen wurden in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

2.4.1 Titan

In den letzten Jahrzehnten haben sich Titan und seine Legierungen als Implantatwerkstoffe in der Medizin etabliert. Dies ist in erster Linie auf die guten physikalischen Eigenschaften wie Leichtigkeit aufgrund der geringen Dichte, relativ geringe Wärmeleitfähigkeit, hohe Festigkeit und hervorragende Biokompatibilität zurückzuführen. Nachteilig sind hingegen die Sprödigkeit und fehlende Elastizität des Materials (Wintermantel und Ha 2009).

Im Bereich der Implantologie wird es als commercially pure Titanium (cpT) Grade 1 bis 4, als Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung (TiAl_6V_4) oder als Titan-Aluminium-Nobium-Legierung (TiAl_6Nb_7) eingesetzt. Die Einteilung in die Grade 1 bis 4 klassifiziert dabei nach der Verunreinigung durch Kohlenstoff, Eisen oder Sauerstoff, wobei Grad 1 der geringsten Verunreinigung entspricht. Das Legieren mit Vanadium und Aluminium verhindert, dass sich die kubische Gitterstruktur beim Erkalten in eine hexagonale umwandelt und erhöht so das Elastizitätsmodul und die Festigkeit (Dinkelacker 2014).

Bisher gibt es in der wissenschaftlichen Literatur keinen Beleg für eine Titan-Allergie, die bei Patienten durch das Einsetzen von Titan-Implantaten ausgelöst wurde (Reichl et al. 2014).

Ogleich Titan von einigen Autoren als inert angesehen wird (Bücking 1995), oxidiert es leicht innerhalb von Millisekunden und bildet dabei eine sehr dünne, aber stabile Passivschicht aus, welche selbstlimitierend ist und die Metalloberfläche vor weiterer Oxidation schützt. Diese als Passivierung bezeichnete Eigenschaft begünstigt die hohe Korrosionsbeständigkeit des Titans und ermöglicht eine biochemische Verbindung zum neugebildeten Knochen (Sul et al. 2005).

Durch elektrochemische Untersuchungen konnte eine Dicke der Oxidschicht von etwa 20 nm und eine Rauigkeit von etwa 1 μm ermittelt werden (Sul et al. 2002).

Mit der Zeit können sich Ionen aus der Umgebung in die Oxidschicht einlagern und die Charakteristik der Oberfläche maßgeblich beeinflussen. Dieser Umstand wird zum Vorteil genutzt, um z. B. den Einbau gewünschter Elemente wie Kalzium und Phosphat zu steuern. So wird versucht, eine hydroxylapatitähnliche Zusammensetzung auf der Oberfläche zu erreichen, die dem Knochen eine Grundlage zum Anwachsen bereitstellt (Wen et al. 1998).

Unabhängig von der verbesserten mikromechanischen Fixation des Implantates durch Einwachsen des Knochens in Mikroporen wird die Bildung poröser Schichten auch zur Einbringung von Medikamenten wie Antibiotika verwendet, um potenziellen postoperativen Infektionen lokal vorzubeugen bzw. diese zu bekämpfen (Dunn et al. 1994).

Obwohl experimentell nach Insertion von Titan-Implantaten erhöhte Konzentrationen in Lunge, Nieren, Milz, Leber und regionären Lymphknoten festgestellt wurden, ist bisher keine pathogene Bedeutung dieser Ablagerungen erwiesen (Schliephake et al. 1991; Deppe et al. 2002).

Bei ungünstiger Weichgewebssituation, so vor allem bei Patienten mit dünnen periimplantären Mukosaverhältnissen, kann die dunkle Farbe des Titans besonders bei oberen Frontzähnen und Prämolaren ästhetisch problematisch sein. Aus diesem Grund wurde in den letzten Jahren vermehrt auf dem Gebiet der zahnfarbenen Implantatmaterialien geforscht (Gutwald 2010).

2.4.2 Ticer®

Seit 1992 befindet sich das ZL-Duraplant-Implantatsystem® auf dem Markt der dentalen Implantologie und wurde seitdem im Rahmen zahlreicher Studien in Zusammenarbeit der Universität Leipzig mit der Technischen Universität Chemnitz im Rahmen analytischer und klinischer Studien untersucht und weiterentwickelt. Das Kernmaterial ist hierbei ein unter dem Handelsnamen Timedur® erhältliches, kaltverfestigtes Reintitan (Grad 4), welches von der elektrochemisch konditionierten Ticer®-Oberfläche umgeben ist. Diese ist ein von „Titan-Ceramic“ gebildetes Akronym und entsteht durch das 1982 von Krysmann erstbeschriebene Verfahren der anodischen Oxidation unter Funkenentladung (ANOF), wobei die Implantatoberfläche durch den Funkenschlag aufgeschmolzen und oxidiert wird. In der Folge besteht die Schicht aus 60 % Titanoxid und 40 % Kalziumphosphatverbindungen (Graf 1998).

Das Ziel der Anodisation ist es, eine Oxidschicht auf ein metallenes Bauteil aufwachsen zu lassen und dadurch in erster Linie die Korrosionsbeständigkeit, aber auch andere Oberflächeneigenschaften wie das Abriebverhalten oder die Porosität zu verbessern.

Im Zuge der Korrosion kann das Vorhandensein von korrosiven Spezies wie Hydrogen-Ionen (H^+), Schwefel-Verbindungen (S^{2-}), gelöster Sauerstoff (O_2) und Chlorid-Ionen (Cl^-) zur Freisetzung von Ti^{4+} -Ionen führen und dadurch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase in

osteoblastischen Zellen reduzieren. Eine Studie untersuchte dazu mithilfe von Impedanz-Spektrometrie die zeitabhängige elektrochemische Korrosion von anodisch oxidiertem Titan in humanem Plasma und zeigte, dass diese stark von der Präsenz von Biomolekülen beeinflusst wird und die Widerstandsfähigkeit der Oxidschicht deutlich höher im Plasma als in wässriger Lösung war (Bozzini et al. 2008).

Abbildung 4 zeigt die Funktionsweise zur Erzeugung funktioneller Oberflächen, die nahezu beliebig an die gewünschten Anforderungen angepasst werden können.

Hierzu wird das zu anodisierende Bauteil mit einem elektrischen Kontakt versehen und in eine Elektrolyt-Lösung gegeben. Anschließend wird ein elektrisch leitfähiger, inerte Werkstoff ebenfalls in dem Elektrolyt platziert und zwischen beiden ein Stromfluss generiert, wobei das zu anodisierende Bauteil als Anode geschaltet ist. Folglich laufen auf dem Bauteil Oxidationsvorgänge ab, während derer die oxidierten Ionen sofort mit Sauerstoff aus der Lösung zu einem Oxid reagieren, welches auf der Oberfläche haften bleibt und dadurch zum Aufwachsen einer Oxidschicht führt (Müller 2002).

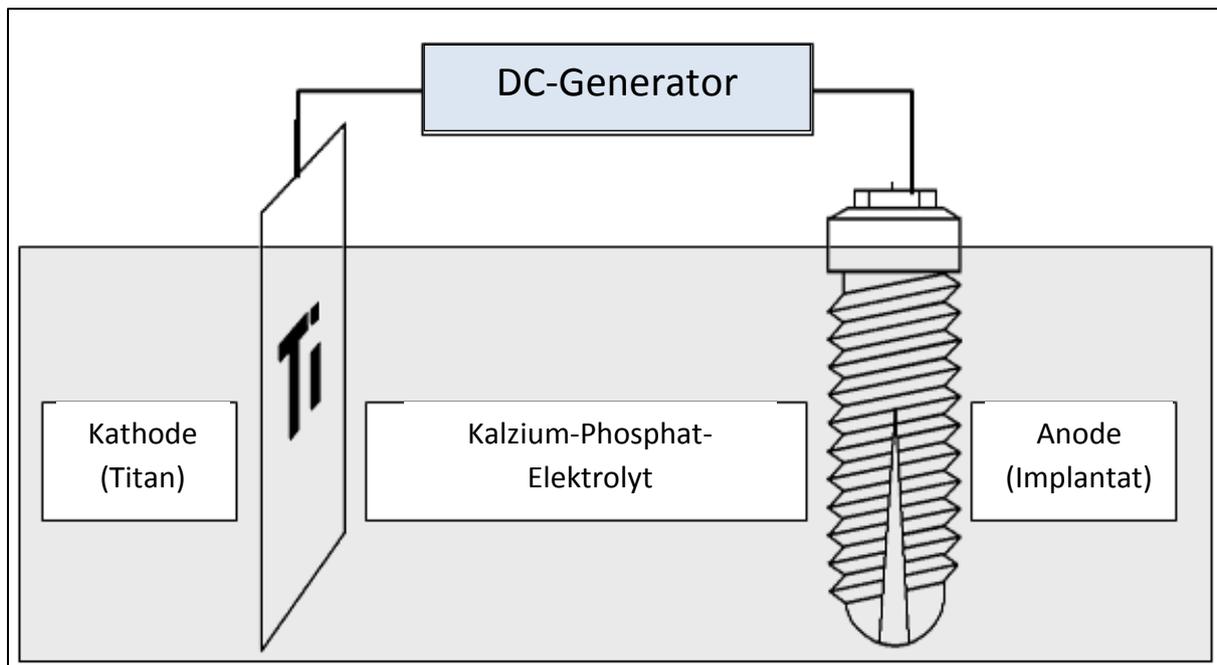


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Elektrolysezelle zur Ticer-Oberflächenkonditionierung (Graf 1997)

Die auf diese Weise mikrostrukturierte Titanoxid-Kalziumphosphat-Oberfläche weist eine Dicke von 20 – 30 μm auf (Graf et al. 2001).

Auf anodisierten Titanoberflächen kultivierte Osteoblasten zeigten eine deutlich verstärkte Adhäsion durch einen Anstieg der Vitronektin- und Fibronektin-Adsorption und sezernierten im Beobachtungszeitraum von 21 Tagen signifikant gesteigerte Kalziumablagerungen, was den Rückschluss auf eine potenziell beschleunigte Knochenmineralisation während der frühen Einheilphase zulässt (Yao et al. 2008).

Klinische Studien konnten nachweisen, dass die Ticer®-Oberfläche verglichen mit reinem Titan durch die begünstigte Kontaktnahme zwischen Implantat und Knochen ein signifikant

reduziertes Verlustrisiko in der Einheilphase bewirkt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die transgingival mit der Titanoxidschicht in Verbindung stehende Mukosa in den ersten Jahren der Funktionszeit weniger entzündliche Veränderungen aufweist (Graf et al. 2002).

Darüber hinaus konnte eine maximale Zellanheftung auf der Oberfläche verglichen mit anderen modifizierten Titanoberflächen (Hilbig et al. 2005) sowie eine höhere Expression von BSP (Kaluderović et al. 2014b), in einer weiteren Studie überdies von BSP, Osteonektin und TGF- β nachgewiesen werden (Kohlweyer 2012).

Al-Nawas et al. inserierten Beagle-Hunden je Kiefer drei anodisch oxidierte Implantate sowie ein glattes Kontrollimplantat (Brånemark; Nobel Biocare) und untersuchten nach zweimonatiger Einheilzeit und dreimonatiger physiologischer Kaubelastung anhand einer qualitativen Histomorphologie die jeweiligen Implantatlagerqualitäten. Dabei konnte im kristallinen Bereich der Implantat-Knochen-Übergangszone nur das anodisch oxidierte Implantat einen osteokonduktiven Anbau verzeichnen und sogar oberhalb der ersten Schraubenwindung wurde vertikaler Knochenzuwachs nachgewiesen. Diese Beobachtung ist von hoher Relevanz für den Erfolg der Implantation, da dieser Eigenschaft eine hohe Bedeutung für die Langzeitprognose zugeschrieben wird (Al-Nawas et al. 2006).

2.4.3 TiWhite® (Duraplant® 2.2)

Mit der Markteinführung des ZL-Duraplant®-2.2-Systems wurde im vergangenen Jahr infolge der Weiterentwicklung der Ticer®-Oberfläche erstmals eine zahnweiße Oberfläche auf reinem Titan vorgestellt und unmittelbar anhand wissenschaftlicher Publikationen belegt.

Dabei war das Ziel, von den hervorragenden und klinisch langzeiterprobten, mechanischen Eigenschaften des Titans zu profitieren und diese mit der vorteilhaften optischen Charakteristik der Zirkonoxid-Keramik zu kombinieren sowie einen entscheidenden Zugewinn an harmonischer Ästhetik durch die zahnfarbene Erscheinung zu erlangen. Darüber hinaus scheinen auch irrationale Beweggründe wie eine Metallphobie, Ökochondrie sowie eine soziokulturelle Assoziation zur Farbe Weiß von Bedeutung zu sein (Buttchereit 2013).

Der Herstellungsprozess basiert analog der Ticer®-Oberfläche auf einer anodischen, plasmaelektrochemischen Beschichtung. Zuvor werden die Titankörper für zehn Sekunden in einem Gemisch aus 85 %iger Phosphorsäure, 38 %iger Flusssäure und 53 %iger Salpetersäure im Verhältnis 49/24/27 chemisch poliert und mithilfe von Ultraschall gereinigt. Anschließend erfolgt die Beschichtung durch das oben beschriebene Verfahren der Anodischen Oxidation unter Funkenentladung (ANOF) in einer Elektrolysezelle, in der die Titankörper als Anode und ein Platindraht als Kathode geschaltet wurden.

Die Elektrolyselösung besteht hierbei aus einer wässrigen Lösung aus Natriumhydroxid (NaOH) und als Stromquelle fungiert ein elektrischer Pulsgenerator. Zunächst wird bei einer Stromdichte von 50 mA/cm^2 eine bereits vor dem Funkenschlag auftretende anodische Schicht gebildet, bevor bei $0,9 \text{ A/cm}^2$ der eigentliche Funkenschlag auftritt. Abschließend

wird das auf diese Weise modifizierte Material in destilliertem Wasser gespült und luftgetrocknet.

Anhand von Röntgen-Diffraktion gelang die Eruierung der Zusammensetzung von TiWhite® aus einer dominanten kristallinen Phase monoklinen Zirkoniums und der Titan-Modifikationen Rutil und Anatas. Dabei konnten exakte Anteile von 84 % Zirkonoxid und 16 % Titanoxid ermittelt werden.

Kaluđerović et al. untersuchten dazu 2014 in vitro die werkstofftechnischen Eigenschaften und deren biochemische Konsequenzen verglichen mit reinem Titan (cpT), Ticer® und einer subtraktiv bearbeiteten Titanoberfläche (SS). Zunächst erfolgte die indirekte Toxizitätstestung unter Verwendung von MTT (Microtetrazoline) und SRB (Sulforhodamine B), wobei MTT von metabolischen Bedingungen abhängt, SRB hingegen ist unabhängig und dadurch sensitiver (Banasiak et al. 1999). Die Resultate ähnelten denen der Referenzmaterialien und lieferten keinen Hinweis auf eine Beeinflussung der Zellfunktionsfähigkeit oder Beeinträchtigung des Zellwachstums, woraus keine toxischen Effekte resultieren. Zudem wurde ersichtlich, dass durch das neue Material weder die Mitochondrien-Viabilität noch die Protein-Produktion der Osteoblasten eingeschränkt wird. Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen konnten zeigen, dass die neue Oberfläche ähnlich der bisher klinisch bewährten die Expression von Osteocalcin und Bone Sialoprotein hochregulieren und so einen positiven Einfluss auf die Osteogenese ausüben.

Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Zellproliferation und -morphologie lieferte zum einen die Erkenntnis, dass auf reinem Titan eine höhere Anzahl von Zellen beobachtet wurde, während zum anderen ab dem fünften Tag auf Ticer®, SS und der zu testenden Oberfläche eine vermehrte Bildung von mindestens 30 % polygonal geformter Zellen nachvollziehbar war. Dabei weisen rund geformte Osteoblasten zwar eine geringere Proliferationsrate auf als flach konfigurierte, deuten aber auf eine erhöhte Syntheseaktivität der Zelle hin (Anselme 2000).

Resümierend kann TiWhite® neben dem bislang unerreichten Vorteil der weißen und somit ästhetisch ansprechenden Titanoberfläche ebenfalls ein begünstigender Effekt auf die Knochenbildungsrate und demnach auf die Osseointegration des Implantates zugeschrieben werden (Kaluđerović et al. 2014a).

2.5 Elektrostimulation in-vitro und in-vivo

Nachdem piezoelektrische Effekte zuvor nur in Mineralien und in der Folge an Holz, Wolle und Haar festgestellt werden konnten, gelang Fukada und Yasuda 1957 auch der Nachweis in getrocknetem Knochen. Dazu verwendeten sie Knochenpräparate aus menschlichen Femora, denen in einem mit Kalziumchlorid gefüllten Exsikkator die Feuchtigkeit entzogen wurde. Auf die Oberfläche wurde dünne Silberfolie mit alkoholischer Schellack-Lösung in der Funktion von Elektroden aufgebracht. So wurden bei Verbiegung des Knochens elektrische Potenziale gemessen, wobei der Umfang der Polarisierung mit der Richtung des einwirkenden Druckes variiert. Fundamental ist hier der kristalline Aufbau aus avitalem anorganischem Hydroxylapatit und organischen kollagenen Fasern, die elektrische Ladungsverschiebungen als Antwort auf die einwirkenden Scherkräfte generieren (Fukada und Yasuda 1957).

Bassett und Becker gelangten 1962 bei weiteren Untersuchungen an Katzentibiae zu der Erkenntnis, dass die Größe der Amplitude des gemessenen elektrischen Potentials proportional zu den einwirkenden Kräften ist. Areale der Kompression weisen dabei negative Potenziale, Areale der Dehnung positive Potenziale auf (Bassett und Becker 1962).

Zudem erkannte Bassett 1966 durch Untersuchungen an Hundefemora erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen elektrischer Negativität und Knochenneubildung.

In unmittelbarer Umgebung der implantierten Kathode wurde überwiegend Knochenapposition festgestellt, an der Anode nahezu keine Veränderung (Bassett 1966; Zengo 1976). Auf Grundlage der von Bassett verfassten Erkenntnis, dass im Falle langsam verformten Knochens keine messbare Spannung auftrat, aber bei in gleichem Ausmaß schnell verformtem Knochen Spannung gemessen werden konnte, folgerte Eriksson 1974, dass der Betrag des Strömungspotentials umso größer ist, je schneller die Flüssigkeit bewegt wird und dass dabei irrelevant ist, ob die Belastung zugeführt oder abgegeben wird (Eriksson 2006). Entgegen der Annahme, dass sich die Effekte der Piezoelektrizität und der Strömungspotenziale überlagern, konstatierten Gross und Williams 1982 nach Untersuchungen am physiologisch durchfeuchteten Knochen, dass in vivo die Strömungspotenziale der Piezoelektrizität überlegen sind, was vermutlich auf der viskoelastischen Relaxation des feuchten Gewebes basiert (Gross und Williams 1982).

Auch in einer Versuchsanordnung mit Osteoklasten und osteoblastenähnlichen Zellen der Ratte wurde bei konstanten elektrischen Feldstärken von 0,1 und 1 V/mm nachgewiesen, dass die Osteoklasten zügig in Richtung der positiven Elektrode wanderten, während die osteoblastenähnlichen Zellen in die entgegengesetzte Richtung zur negativen Elektrode migrierten (Ferrier et al. 1986).

In den folgenden 30 Jahren beschäftigten sich zahlreiche in-vitro- und in-vivo-Studien sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene mit den zugrundeliegenden Mechanismen und der sich daraus ergebenden Möglichkeit, den Prozess der Wachstumsorientierung von Knochenzellen elektrisch zu stimulieren, besonders wenn er pathologisch geschädigt ist.

Anhand der Methodik lassen sich drei Gruppen potenzieller Techniken zur beschleunigten Differenzierung und Proliferation osteogenetischer Zellen unterteilen:

1. Gleichstrom
2. Kapazitiv gekoppelte elektrische Felder
3. Induktiv gekoppelte elektromagnetische Felder

2.5.1 Anwendung von Gleichstrom

Diese Methode ist invasiv und setzt die Implantation einer oder mehrerer Kathoden (C) in den Knochen voraus, wie Abbildung 5 exemplarisch für einen Oberschenkelbruch zeigt.

Ein großer Nachteil ist folglich das Erfordernis eines zweiten chirurgischen Eingriffs am Ende des Behandlungszeitraumes zur Entfernung der Elektrode(n) am Ort der Knochenneubildung, nachdem die Knochenheilung erfolgreich stattgefunden hat.

Impliziertes Risiko ist dabei das Eintreten von Keimen in den frischen Operationsitus und schließlich das Auftreten einer postoperativen Wundinfektion mit Schädigung des neugebildeten Knochens (Basset et al. 1964). Im speziellen Fall dentaler Implantate entfällt diese Notwendigkeit, da die Implantatoberfläche selbst die Verbindung zwischen intraossären und extrakorporalen Arealen bildet und somit als Elektrode fungieren kann, was als einzigartig im menschlichen Körper angesehen werden kann (Song et al. 2009).

Die Anode (E) ist üblicherweise an der darüberliegenden Haut angebracht und es wird Strom mit einer Stärke von 5 bis 100 μA zugeführt (Pankaj und Narkhede 1998).

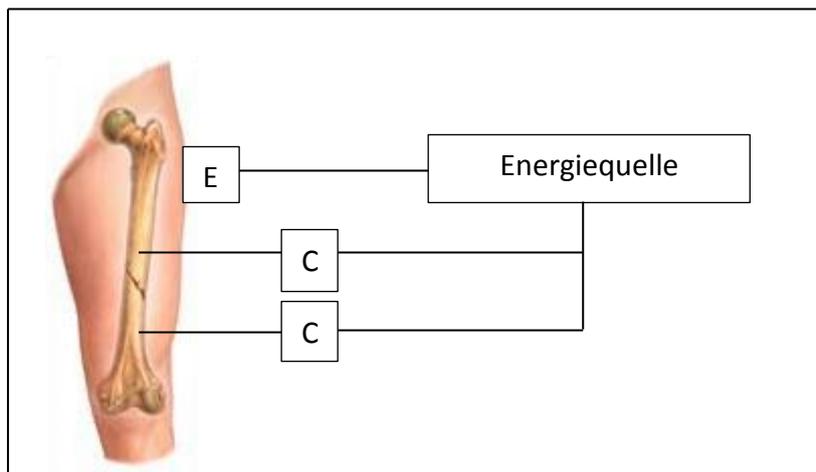


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Therapie mit Gleichstrom

Bei Verwendung von konstanten elektrischen Gleichströmen („Galvanischer Strom“) bleiben Intensität und Richtung gleichmäßig. Eine Anwendung ist nur großflächig, z. B. über Plattenelektroden möglich, birgt aber auch stets die Risiken von Verbrennungen und Verätzungen und ist deshalb bei Patienten mit Sensibilitätsausfällen, Hautdefekten, malignen Tumoren etc. kontraindiziert. Im Falle von Arthrosen sowie Entzündungen der Muskeln, Bänder, Sehnen und Nerven findet dieses Verfahren jedoch auch heute noch

regelmäßig Anwendung. Begünstigend ist hierbei eine über den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) vermittelte Steigerung der Angiogenese, die die Durchblutung des geschädigten Gewebes erhöht und dadurch die Heilung beschleunigt (Janigro 2008).

Einer Hypothese von Vodonik et al. zufolge ist die Behandlung mit elektrischem Strom nicht nur in der Lage, die Heilungsrate chronischer Wunden zu verbessern, sondern auch das Wachstum von Tumoren zu hemmen. Dazu wurden in einer Studie subkutane Fibrosarkome von Mäusen mit einer einstündigen One-Shot-Elektrotherapie befeldet und so die Zunahme des Tumolvolumens verlangsamt (Vodonik et al. 1992).

Als Elektrodenmaterial eignen sich der Literatur zufolge Platin, Titan und Edelstahl, wobei erwiesen ist, dass der Großteil der Elektrode inaktiv ist, aber eine kleinflächige aktive Region, vermutlich an der Schnittstelle zwischen Metall und Isolierung, existiert (Black et al. 1984). Diese führt auf elektrochemischer Grundlage zu einer an der Kathode stattfindenden Faraday-Reaktion, die eine abgesenkte Sauerstoffkonzentration und einen Anstieg des pH-Wertes nach sich zieht (Bodamyali et al. 1999). Solch ein Abfall der Sauerstoffkonzentration führt nachweislich zu einer gesteigerten Osteoblastenaktivität, während aufgrund der basischen Umgebung die Aktivität der Osteoblasten erhöht und die der Osteoklasten gesenkt wird (Bushinsky 1996).

Eine der ersten Studien zur Erforschung möglicher Einflussnahme auf die Einheilung von Implantaten durch elektrische Stimulation veröffentlichte Narkhede. Er versah Kaninchen nach erfolgter Extraktion mit jeweils einem Disk-Implantat und legte Spannungen von 20 bis 100 μA an. Da nach der Stimulation mit 20 μA kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe feststellbar war, schlussfolgerte er diesen Wert als unerschwinglich. Bei einer Spannung von 100 μA wurde hingegen eine Hemmung der Knochenbildung verzeichnet, während die besten Resultate bei den mit 40 μA stimulierten Tieren ermittelt wurden (Narkhede 1998).

Unmittelbar nach Sofortimplantation angelegte konstante elektrische Felder von 3 V konnten bei Hunden lokal eine gesteigerte Knochenkontaktrate sowie in der Folge eine reduzierte Zeitspanne der Osseointegration bewirken (Shayesteh et al. 2007).

Durch szintigrafische und histologische Untersuchungen an Kaninchen- (Klems et al. 1975) bzw. Rattentibiae (Giannunzio et al. 2008), die zuvor mit konstantem Gleichstrom unterschiedlicher Stromstärke stimuliert worden sind, wurde in allen Fällen ein in Relation zur unbehandelten Seite gesteigerter lokaler Osteozytenstoffwechsel sowie eine erhöhte Dichte des spongiösen Knochens nachgewiesen.

In einer anderen Versuchsanordnung, ebenfalls an Kaninchen, wurde Gleichstrom mit einer Stärke von 20 μA über jeweils eine Platinelektrode intramedullär und ringförmig den Femur umschließend über einen Zeitraum von sechs Wochen appliziert. Anhand der folgend durchgeführten Röntgendichtemessungen und Histomorphometrien konnte ein gesteigertes Knochenwachstum ausschließlich an der intramedullär angebrachten Kathode festgestellt werden (Lagey et al. 1986). Dies deckt sich mit den oben angeführten Beobachtungen von Bassett bei Versuchen an Hundefemora (Bassett 1966).

Bei dem Versuch, die Stimulationsparameter auf einen klinisch anwendbaren Rahmen einzugrenzen, gelangten Bodhak et al. durch Versuche an humanen Osteoblasten mit Titan-elektroden zu der Erkenntnis, dass bei einem Stromfluss von 25 μA der stärkste positive Effekt auf die Anheftung, Verteilung und Proliferation der Osteoblasten zu verzeichnen ist. Außerdem konnten bei diesem Wert die höchste Anzahl fokaler Adhäsionspunkte sowie die dichteste Osteoblastenverteilung festgestellt werden (Bodhak et al. 2012).

Eine andere Versuchsreihe hatte sich ebenfalls die Optimierung der Stimulationsparameter zur Verbesserung des Zellmetabolismus auf Biomaterialien zum Ziel gesetzt und dazu Fibroblasten mit variierenden Frequenzen von 1, 15, 25, 50 und 150 Hz sowie elektrische Ströme von 1 - 100 V beauftragt. Sie konnten dadurch einen Bereich optimaler Stimulation eingrenzen, der bei 50 bis 150 Hz und 2 bis 15 V liegt, wobei beide Größen indirekt proportional zueinander verändert werden sollten. So konnten die höchsten Werte für gesteigerte Zelldifferenzierung bei 50 Hz und 15 V, entsprechend einer Feldstärke von 5 V/cm, zum einen und 150 Hz und 2 V, entsprechend 666,7 mV/cm, zum anderen ermittelt werden. Da unabhängig davon bei einem externen Stimulus von 2 V die höchste Zelldichte gemessen wurde, ist dieser Wert als optimale Spannung für die Maximierung der Zellproliferation konstatiert worden (Dubey et al. 2011).

Nach Publikation zahlreicher Grundlagenstudien wurde 1974 erstmalig ein implantierbares Gleichstrom-Stimulations-System zur Behandlung nicht-heilender Frakturen der langen Röhrenknochen entwickelt und veröffentlicht (Dwyer und Wickham 1974).

Darauffolgend lässt sich in der Literatur ein breites Spektrum verschiedener klinischer Anwendungssysteme direkter elektrischer Stimulation zur Therapie nicht oder schlecht heilender Wunden und Knochenfrakturen nachvollziehen (Paterson et al. 1980; Gupta et al. 1990; Hughes und Anglen 2010).

Direkt relevant für die Konzeption unserer Versuchsanordnung ist eine Studie koreanischer Wissenschaftler aus dem Jahr 2009, die eine direkt auf dem Implantat verankerte Apparatur zur Stimulation des periimplantären Knochens mit biphasischem elektrischem Strom zum Zweck der beschleunigten Knochenbildung vorstellt. Bisher ist es mehrheitlich üblich, das Implantat in einem ersten chirurgischen Eingriff einzubringen, anschließend im Oberkiefer sechs bzw. im Unterkiefer drei Monate unbelastet einheilen zu lassen und anschließend in einem zweiten Eingriff freizulegen. Hier wurde jedoch direkt nach der Insertion des Implantates suprakrestal ein Abutment platziert, welches einen nanotechnologisch konstruierten, elektrischen Stimulator enthält. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde biphasischer elektrischer Strom mit einer Amplitude von 20 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ und einer Pulsrate von 100 Pulsen/s auf die umgebenden Gewebe gegeben. Nachfolgende histologische Untersuchungen ergaben einen 1,35-fach höheren Betrag der Knochenneubildung im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Resultierend ergibt sich langfristig die Möglichkeit, zum einen die Latenzzeit, während derer die Osseointegration voranschreitet, zu senken und zum anderen die Erfolgsrate in vorgeschädigtem Knochen zu erhöhen (Song et al. 2009).

Des Weiteren finden sich zahlreiche Parallelen zu unserem experimentellen Ansatz in der Veröffentlichung von Ercan und Webster. Sie untersuchten erstmalig in der wissenschaftlichen Literatur die biophysikalischen Auswirkungen einer Kombination aus einer anodierten, nanodimensionierten Titanoberfläche mit elektrischer Stimulation in Form von konstanten, bipolaren Pulsen mit einer Frequenz von 20 Hz und variierenden Spannungen von 1 V, 5 V, 10 V bzw. 15 V über einen Zeitraum von fünf Tagen. Im Vergleich zu unbefeldeten Titanoberflächen stellte sich heraus, dass eine beschleunigte Osteoblastenproliferation um bis zu 72 % bereits bei niedrigeren Spannungen erzielt werden konnte. Die Ursache hierfür sehen sie darin, dass auf anodisiertem Titan vermutlich initial mehr Zellen anhaften und dadurch mehr fokale Zell-Zell-Kontakte zustande kommen, die das Zellwachstum triggern (Ercan und Webster 2008). In einer darauf aufbauenden Studie gelang es ihnen, die hierfür zugrundeliegenden, biochemischen Signalwege zu entschlüsseln, die sie in einer gesteigerten Synthese von Kollagen Typ I, der Alkalischen Phosphatase sowie einer erhöhten Kalzium-Deposition sehen (Ercan und Webster 2010).

Ein vollkommen neuer, jedoch aufgrund des Tätigkeitsfeldes für unsere Forschungsgruppe überaus interessanter Indikationsbereich wurde 2011 erstmalig publiziert. Vorgestellt wurde eine non-invasive, antimikrobielle Strategie zur Therapie der Periimplantitis, einer von Mikroorganismen verursachten lokalen Entzündung in der direkten Umgebung dentaler Implantate mit daraus resultierendem Knochen- und schlimmstenfalls Implantatverlust. Dazu sollen Titan-Implantate als Elektroden genutzt werden können, um durch elektrolytische Prozesse die Anzahl adhärenter Bakterien zu reduzieren.

In einem Modellsystem, in dem handelsübliche dentale Implantate mit einem von *Escherichia coli* besiedelten Biofilm bedeckt und in Gelatine fixiert wurden, erfolgte eine Behandlung mit konstantem Strom von 0 - 10 mA über einen Zeitraum von 15 Minuten. Anschließend konnte an dem kathodischen Implantat eine Reduktion der Bakterienanzahl um zwei Größenordnungen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde an dem anodischen Implantat die Existenz aktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen. Hier genügte ein Stromfluss von lediglich 7,5 mA für die komplette Abtötung der Bakterien.

Resultierend erwies sich die Menge der Elektrolyse-Produkte als proportional zu dem Betrag der elektrischen Ladung, ergo führt eine erhöhte Stromzufuhr zu einer gesteigerten Effizienz bei der Bakterientötung, wie sowohl an der Kathode als auch an der Anode beobachtet werden konnte (Mohn et al. 2011).

2.5.2 Anwendung von kapazitiv gekoppelten elektrischen Feldern

Bei dieser non-invasiven Technik werden zwei gekoppelte Elektroden oberflächlich so an der Haut angebracht, dass der zu stimulierende Bereich dazwischen liegt, siehe Abbildung 6. Dann wird Spannung mit Potenzialen von 1 - 10 V und Frequenzen von 20 - 200 kHz angelegt und es entstehen elektrische Felder von 1 - 100 mV/cm (Aaron et al. 2004).

Die elektrische Feldstärke spielt eine entscheidende Rolle für das Ausmaß der Proliferation von Knochenzellen. Durch Versuche an Knochenzellen aus Rattencalvaria konnte ein Bereich von 0,1 - 10 mV/cm ermittelt werden, innerhalb dessen eine gesteigerte Zellproliferation zu verzeichnen ist (Brighton et al. 1992).

Hartig et al. weisen dabei erstmalig auf den Nachteil hin, dass bei Verwendung von Plattenkondensatoren ein vergleichsweise hoher Betrag an Spannung beim Durchtritt durch die isolierenden Schichten verloren geht und nur schwache elektrische Felder auf der Zellseite wirksam werden können (Hartig et al. 2000).

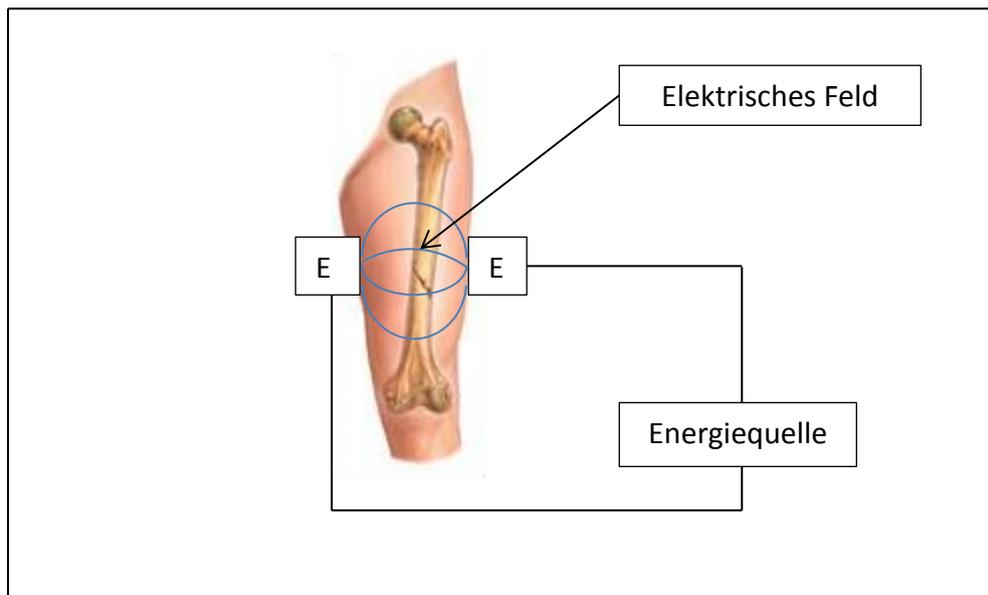


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Therapie mit kapazitiv gekoppelten elektrischen Feldern

Darüber hinaus sind die therapeutischen Ergebnisse von der Compliance des Patienten abhängig und mögliche Folgeschäden wegen der Komplexität der lokalen Stromdichtemessungen am behandelten Knochenareal schwer vorhersehbar (Gittens et al. 2011).

Die Therapie mit einem kapazitiv gekoppelten Feld erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration, sofern kein Kalziumkanalblocker oder Hemmer der Prostaglandinsynthese medikamentös verabreicht wurde. Vermittelt wird diese Antwort der Knochenzellen auf die Therapie durch den Kalziumeinstrom über membranständige, spannungsabhängige Kalziumkanäle (Lorich et al. 1998).

Den gleichen Mechanismus der Signaltransduktion beschrieben auch Brighton et al. nach DNA-Analysen von Knochenzellen, die mit unterschiedlichen Stromformen befeldet wurden. Im direkten Vergleich mit induktiv gekoppelten oder kombinierten elektromagnetischen Feldern erzielte einzig die Stimulation mit kapazitiv gekoppelten Feldern eine signifikante, ständig zunehmende DNA-Produktion (Brighton et al. 2001).

Ein alternativer Mechanismus die Osteogenese zu beeinflussen wird von Wang et al. beschrieben. Deren Untersuchungen ergaben, dass kapazitiv gekoppelte Felder die mRNA-Expression für die bone morphogenetic proteins (BMP) 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 sowie der Signalmoleküle Gremlin und Noggin hochregulieren (Wang et al. 2006).

Bei der Entwicklung leitfähiger Materialien wurden unter anderem neue Nanokomposite untersucht, die ein Gemisch aus Polymilchsäuren und Kohlenstoffnanoröhren enthalten. Im Rahmen erster Versuche wurden Osteoblasten auf dieser Oberfläche kultiviert und über sechs Stunden mit einem Stromfluss von 10 μA sowie einer Frequenz von 10 Hz stimuliert.

Anschließend wurde eine enorme Steigerung der Osteoblastenproliferation um 46 % sowie eine dreifach erhöhte Kalziumablagerung festgestellt. Zudem konnte erstmals der Beweis erbracht werden, dass die Stimulation von Knochen mit „alternating electric current“ die Transkription von Genen, die mit dem Aufbau von Knochenmatrix zusammenhängen und mit der Hämostase zusammenhängen, positiv beeinflusst. Insbesondere wurde die Hochregulation der Gene für Kollagen Typ I, Osteocalcin und Osteonectin nachgewiesen (Supronowicz et al. 2002).

Kontrovers sind hingegen die Ergebnisse einer Studie, die unter der Verwendung eines niederfrequenten elektrischen Feldes keinen Unterschied in der Zellproliferation humaner Knochenzellen nachweisen konnte (Caputo et al. 2013).

2.5.3 Anwendung von induktiv gekoppelten elektromagnetischen Feldern

Weil elektrische und magnetische Felder normalerweise nicht getrennt voneinander vorkommen, werden sie vereinfachend als elektromagnetische Felder bezeichnet. Das magnetische Feld durchdringt dabei anders als das elektrische alle Zellen des Organismus vollständig und nahezu verlustfrei, so dass nur vergleichsweise geringe Mengen an Energie übertragen werden. Es ergibt sich damit die Möglichkeit der nicht-invasiven und so für den Patienten angenehmen Therapiemöglichkeit, die bereits bei Energiedichten von geringem energetischem Niveau ihre Wirksamkeit erreicht (Ruoff 2008).

Abbildung 7 zeigt die Applikation eines gepulsten elektromagnetischen Feldes (PEMF) mittels einer Spule, durch die elektrischer Strom fließt, wodurch ein Magnetfeld generiert wird.

Dieses induziert wiederum ein elektrisches Feld innerhalb des stimulierten Areals. Die Dimension des elektrischen Feldes hängt von der Größe des Magnetfeldes und den physikalischen Eigenschaften der umgebenden Gewebe ab.

Magnetfelder in der Größenordnung von 0,1 - 20 G wurden experimentell verwendet, um im Knochen elektrische Felder von 1 - 100 mV/cm zu erzeugen (Aaron und Steinberg 1991).

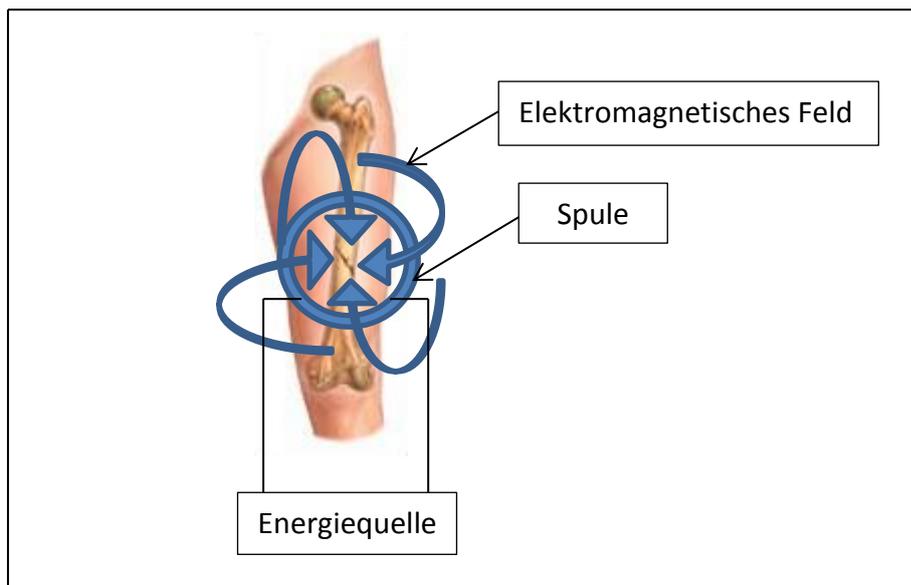


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Therapie mit elektromagnetischen Feldern

Folgen der Stimulation sind eine gesteigerte Synthese extrazellulärer Matrix, vor allem Proteoglykan und Kollagen, eine Beschleunigung sowohl der Kalzifizierung während der Maturation des Knochens als auch der Differenzierung pluripotenter Stammzellen in Osteoblasten (Aaron und Ciombor 1996; Lohmann et al. 2000) sowie gleichzeitig eine Verminderung des Abbaus extrazellulärer Matrixproteine (Sollazzo et al. 2010).

Einen alternativen Mechanismus beschreibt Greenough, indem er unter Verwendung von drei verschiedenen Wellenformen stets eine primäre Beeinflussung des Gefäßzuwachses beobachtete und daraus einen positiven Effekt auf die Gewebeheilung schlussfolgerte (Greenough 1992).

Nachweislich haben PEMFs einen signifikanten Einfluss auf die Bildung und Funktionalität des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors in menschlichen neutrophilen Granulozyten. Sie reduzieren dadurch die Produktion anionischer Hyperoxide und limitieren die Entzündungsantwort des Gewebes (Varani et al. 2002).

Zudem wurde analog zu der Methodik des kapazitiven Koppelns ein Anstieg der BMP-2- und BMP-4-mRNA-Expression (Nagai und Ota 1994) sowie der Transforming Growth Factor Beta(TGF- β)-Produktion nachgewiesen (Guerkov et al. 2001).

Bereits 1978 entwickelte Spiekermann ein Verfahren zur Untersuchung des Einflusses elektromagnetischer Behandlung auf das Einheilverhalten dentaler Implantate bei Beagle-Hunden. Dabei wurde auf induktivem Weg, also drahtlos mit Hilfe eines in einer Kieferspule entwickelten, pulsierenden Magnetfeldes zwischen zwei enossalen Blattimplantaten ein elektrisches Wechselfeld mit einer Feldstärke von 60 mV/cm erzeugt. Als Erfolgsparameter wurde die Bindegewebsbreite zwischen Implantat und Knochen histologisch quantifiziert, die bei den elektrostimulierten Implantaten weniger als die Hälfte verglichen mit den nicht-stimulierten Implantaten betrug. Korrelierend wiesen die stimulierten Implantate auch einen signifikant geringeren Lockerungsgrad auf, woraus eine „positive Beeinflussung der knöchernen Regeneration und (...) Einheilung enossaler Implantate“ geschlossen wurde (Spiekermann 1978).

Der in-vivo-Effekt elektromagnetischer Felder wurde von Mammi et al. an einer Gruppe von 40 Patienten untersucht, die sich aufgrund einer Knie-Arthrose jeweils einer stets von demselben Operateur durchgeführten Tibia-Osteotomie unterzogen. Nach dem chirurgischen Eingriff wurden sie randomisiert entweder an einen aktiven (3 mV elektrisches Feld; Frequenz 75 Hz; 8 h pro Tag) oder einen Dummy-Simulator angeschlossen. Durch vier orthopädische Chirurgen wurden die am 60. postoperativen Tag aufgenommenen Röntgenbilder analysiert und so ein dosisabhängiger positiver Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Osteogenese langer Röhrenknochen belegt (Mammi et al. 1993).

In einer Studie kanadischer Wissenschaftler aus dem Jahr 2008 wurde der Prototyp eines „non-invasiven intraoralen Knochenwachstums-Stimulators für dentale Titan-Implantate“ entwickelt. Die Apparatur generiert über einen Zeitraum von acht Wochen für jeweils zwei Stunden pro Tag gepulste elektromagnetische Felder im Bereich der Knochen-Implantat-Schnittstelle. Nach Proteinbestimmung der ALP-Aktivität und histologischer Untersuchung der Mineralisation, wurde eine beschleunigende Wirkung der PEMF auf die Progression der Knochenformation geschlussfolgert (Chan und Bergman 2008).

Im Rostocker Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologien wurden humane primäre Osteoblasten aus der Spongiosa des Femurkopfes isoliert und kultiviert.

Anschließend erfolgte die elektrische Stimulation mit einer Wechselspannung von 700 mV und 20 Hz. Nach drei Tagen Dauerbefeldung war die Stoffwechselaktivität der Zellen um ca. 40 %, bei Intervallbefeldung sogar um ca. 200 % erhöht. Zudem wurden eine vermehrte Ausbreitung der stimulierten Zellen sowie die Ausbildung zahlreicher Pseudopodien festgestellt. Im Gegensatz zu dieser positiv zu wertenden Beeinflussung der Zellvitalität zeigte sich aber auch eine verminderte Synthese der extrazellulären Matrix, die anhand einer Prokollagen-I-Proteinbestimmung quantifiziert wurde (Marrot et al. 2011).

Im Gegensatz zu zahlreichen Studien mit reiner Strombefeldung ergab eine Versuchsreihe von Jansen et al. bei der Behandlung mit PEMF weder eine signifikante Veränderung der Alkalische-Phosphatase-Aktivität noch einen zeitlichen Unterschied in der Matrix-Mineralisation. Allerdings wurden die osteogenetischen Markergene von Osteoprotegerin, Bone Sialoprotein und Osteocalcin nachweislich hochreguliert. Schließlich konnte erst nach einer Expositionsdauer von 14 Tagen eine im Vergleich zu den unstimulierten Zellen gesteigerte Mineralisation beobachtet werden (Jansen et al. 2010).

Ein direkter Vergleich von Gleichstrom und PEMF bei der Stimulation des Knochenmarks von Kaninchen zeigte, dass beide Methoden die Knochenformation zwar signifikant steigern konnten, quantitativ jedoch nach Bestimmung der Alkalische-Phosphatase-Aktivität und der Osteoblastenproliferation die Verwendung von Gleichstrom die eindeutig besseren Ergebnisse erzielte (Yonemori et al. 1996).

Ebenfalls kontrovers äußert sich die Studie von Buzza et al., in der kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Osseointegrationsprozesses zwischen den PEMF-befeldeten und den unbehandelten Tieren. Sie erklären dies zum einen mit der Verwendung glatter Titanoberflächen im Vergleich zu Studien, die auf rauen Oberflächen positive Einflüsse beobach-

teten, und zum anderen mit der Inhomogenität der Stimulationsparameter in der Literatur, die besonders in Hinblick auf die Intensität der elektromagnetischen Feldstärken und in der Dauer der Stimulation differieren (Buzza et al. 2003).

Auch Shafer et al. kamen nach Auswertung ihrer Studie an dentalen Titan-Implantaten zu dem Schluss, dass Elektrostimulation weder die Knochenheilung positiv beeinflusst noch das Knochenwachstum zu beschleunigen vermag (Shafer et al. 1995).

In-vivo konnten Hannemann und Kollegen bei der Behandlung frischer Scaphoid-Frakturen weder klinisch noch radiologisch einen Hinweis auf eine beschleunigte Knochenheilung der stimulierten im Vergleich zur doppelblind unstimulierten Kontrollgruppe finden (Hannemann et al. 2012).

Konkrete Schwellenwerte ermittelten d'Ambrosio et al. durch Zellkulturversuche, mithilfe derer sie zu der Erkenntnis gelangten, dass bei einer Feldstärke von 200 mV/m und einer Frequenz von 60 Hz kein Einfluss auf die Zellwachstumsrate nachgewiesen werden konnte und dass darüber hinaus bei Werten von 700 mV/m und 60 – 75 Hz die Mitoserate gesenkt war (d'Ambrosio et al. 1985).

Eine weitere Möglichkeit der Einwirkung mechanischer Energie auf lebende Gewebe ist die Anwendung von Ultraschall, in der Fachliteratur als „low intensity pulsed ultrasound“ (LIPUS) bezeichnet. Die dabei emittierten akustischen Druckwellen liegen oberhalb der menschlichen Hörschwelle und werden in einem Betrag proportional der Dichte des Gewebes, das sie durchdringen, absorbiert (Claes und Willie 2007).

Die vermutete Wirkhypothese ist dabei die Umwandlung mikromechanischer Spannungen in biochemische Prozesse, die wiederum die Proliferation und Differenzierung humaner Osteoblasten, Fibroblasten und Monozyten sowie die Produktion kollagener und non-kollagener Proteine induzieren. Zudem werden anabole und angiogenetische Faktoren wie TGF- β 1, IL-8 (Interleukin-8) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) freigesetzt (Kim et al. 2006), während die Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 (Interleukin-6) und TNF- α (Tumornekrose-faktor-alpha) gesenkt werden (Doan et al. 1999).

Bei Verwendung hoher Dosen wurden allerdings negative Effekte, im Einzelnen reduzierte Kallusbildung, verzögerte Knochenheilung, fibröse Gewebebildung bis hin zu Nekrosen beobachtet, woraus sich die Notwendigkeit weiterführender Forschung zur Evaluation geeigneter Parameter, vor allem zur Eingrenzung von Intensität, Frequenz und Einschaltdauer, ergibt (Padilla et al. 2014).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Anwendung sowohl von Ultraschall als auch von elektromagnetischen Feldern non-invasive, extern einwirkende und lokal applizierte Methoden darstellen, denen die meisten Studien begünstigende Einflüsse auf die Wundheilung zuschreiben. Systemische Auswirkungen wurden bislang nicht nachgewiesen (Dimitriou und Babis 2007).

2.6 Regulierende Mechanismen

Bereits 1638 findet der Zusammenhang zwischen mechanischen Reizen und Konfiguration des Knochens bei Galileo Erwähnung (Reprint Ascenzi 1993).

Die nachfolgend angeführte Abbildung 8 wurde erstmals im Jahre 1867 in einer Veröffentlichung des deutschen Anatomen Georg Hermann von Meyer dargestellt, um den Zusammenhang zwischen auf den Knochen einwirkenden Druck- und Zugkräften und der Form sowie Struktur von trabekulären Knochen abzubilden (Meyer 2011a).

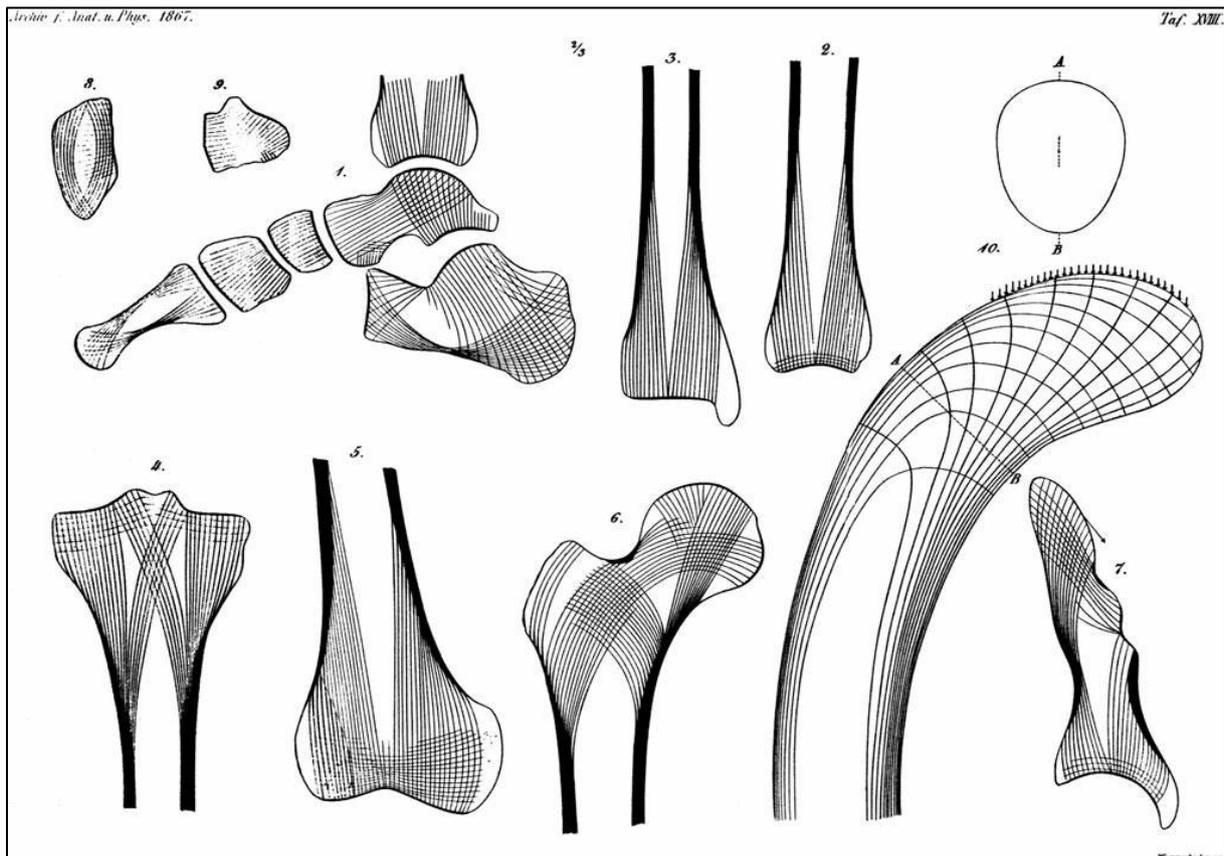


Abbildung 8: Die Architektur des trabekulären Knochens (Meyer 2011b)

Julius Wolff publizierte 1892 „Das Gesetz der Transformation der Knochen“, in dem er die trajektorielle Ausrichtung der Knochentrabekel beschreibt und die Erkenntnis formuliert, dass die Dichte und Festigkeit von Knochen mit steigender mechanischer Belastung zunimmt, während es bei abnehmender oder fehlender Belastung zu Resorptionserscheinungen kommt. Da die Veränderung eines Knochens mit den einwirkenden Kräften korreliert, muss die Transformation mathematischen Gesetzen folgen (Reprint Wolff 2010).

Als Erweiterung des Wolff'schen Gesetzes gilt das 1960 von Harold M. Frost verfasste „Mechanostat-Theorem“ der Knochenphysiologie, welches die Vorgänge des Bone Modeling und Remodeling als Adaptation der mechanischen Funktion und Festigkeit an die tägliche Beanspruchung beschreibt (Frost 1987).

Dabei definiert Frost vier Bereiche der elastischen Knochenverformung unter Verwendung der Einheit Strain (E), wobei 1000 μ Strain einer Längenänderung von 0,1 % entsprechen (Frost 2000):

1. Disuse: Bei einer Verformung von weniger als 800 μ Strain findet Remodeling statt und Knochenmasse wird abgebaut.
2. Adapted State: Bei einer Verformung von 800 bis 1500 μ Strain findet Remodeling statt und die Knochenmasse bleibt unverändert.
3. Overload: Bei einer Verformung von über 1500 μ Strain findet Modeling statt und die Knochenmasse nimmt zu.
4. Fracture: Bei mehr als 15000 μ Strain bricht der Knochen.

Mehrere Autoren konnten in der Folge in vivo nachweisen, dass statische Belastung die Differenzierung von Osteoblasten inhibiert, die RNA- und Proteinsynthese vermindert und die Bildung neuer Osteoklasten stimuliert, während periodische Belastung einen Anstieg der Knochenneubildung sowie eine Verringerung der Resorption bewirkt (Chamay und Tschantz 1972; Lanyon et al. 1982; Chen et al. 2010; Hassler et al. 1980; O'Connor et al. 1982).

Ursächlich dafür ist der durch zyklische Belastung induzierte Anstieg der Synthese von Kollagen, Vinculin, Calmodulin und Vimentin (Stoltz 2012).

Abbildung 9 zeigt schematisch die Schlüsselrolle der zwei Zelltypen, die nach Chen et al. entscheidend für die Vermittlung der mechanisch induzierten Anpassungsvorgänge in Knochengewebe sind.

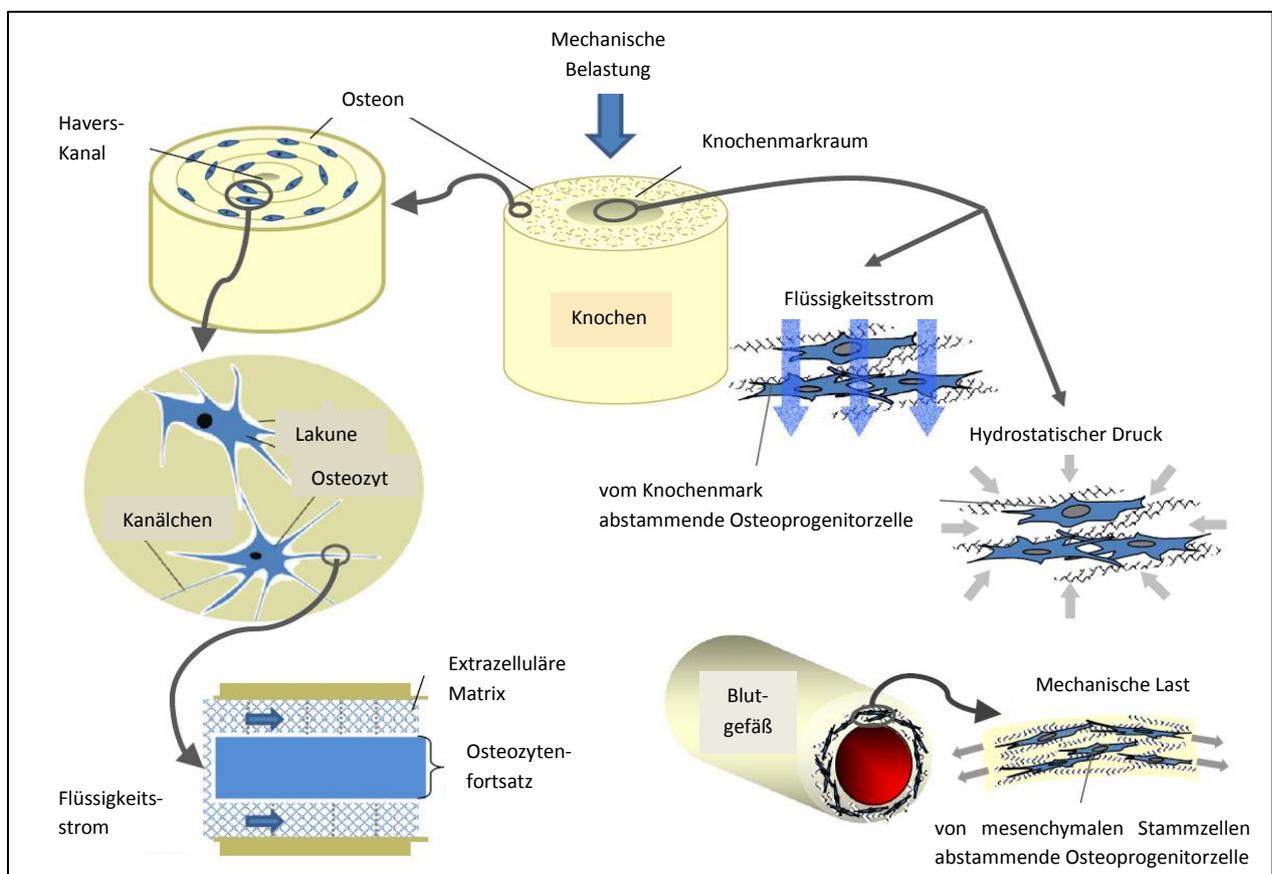


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweisen von Osteozyten (links) und Osteoprogenitorzellen (rechts) bei Lasteinwirkung (Chen et al. 2010)

Die in flüssigkeitsgefüllten Lakunen angesiedelten und über Zellfortsätze gut vernetzten Osteozyten sind dabei die primären Mechanosensoren. Wird der Knochen belastet, entsteht ein Druckgradient innerhalb der Knochenmatrix, der zu einer interstitiellen Flüssigkeitsströmung führt, die wiederum biochemische Prozesse in der extrazellulären Matrix auslöst.

Mechanische Überlastung kann im Gegensatz dazu in Osteozyten zu einer direkten Ausschüttung von Prostaglandin E₂ und folglich zu einer Herauslösung von Kalziumionen aus den internen Speichern im Sinne von Knochenresorption führen (Ajubi et al. 1999).

Dabei lässt sich ein synergistischer Effekt zwischen mechanischem Stress und dem Vorhandensein von Interleukin-1 β als Entzündungsmediator bei der vermehrten Prostaglandin-E₂-Ausschüttung nachweisen (Saito et al. 1991). Die parakrine Wirkung der Prostaglandine beruht auf der biphasischen und dosisabhängigen Stimulation der DNA- und Kollagensynthese, wobei niedrige Konzentration eher eine Hemmung, höhere Konzentrationen jedoch eine Steigerung der DNA-Synthese nach sich ziehen. Vermittelt wird dies vermutlich durch Inhibierung bzw. verstärkten Abbau von cAMP (Chyun und Raisz 1984).

Osteoprogenitorzellen hingegen befinden sich nicht nur im Knochenmark, sondern auch in verschiedenen kollagenen Weichgeweben, die sich bereits unter physiologischer Belastung verformen. Diese Matrixdeformation ist ein wichtiger Stimulus für die Osteoprogenitorzellen, in Bereiche noch unmineralisierter Gewebe, z.B. bei der Frakturheilung oder postoperativ an den Übergang von Implantat zu periimplantärem Knochen zu migrieren (Chen et al. 2010).

Eine Arbeit von Stoltz aus dem Jahr 2012 beschreibt ausführlich die Auswirkungen von mechanischer Belastung auf verschiedene Zellarten. Die Mechanotransduktion des Knochens lässt sich demzufolge in die folgenden vier Stadien unterteilen: Zunächst wird im Zuge der als „mechanocoupling“ bezeichneten Phase die angelegte Kraft in ein Signal umgewandelt, welches direkt auf die Zelle wirkt. Anschließend erfolgt die Konversion der verschiedenen Kräfte in eine elektrische, chemische oder biochemische Reaktion und weiter die intrazelluläre Transduktion in finale Signale. Letztlich folgt die zelluläre Antwort, die Zelldifferenzierung und –proliferation, Genregulation, Matrixsynthese sowie zahlreiche weitere Prozesse umfassen kann (Stoltz 2012).

Besondere Relevanz finden diese Erkenntnisse bei der Beeinflussung des Unterkieferwachstums durch (funktions-)kieferorthopädische Apparaturen. Zur Untersuchung von Rückkopplungsmechanismen des kondylären Knorpelwachstums versah Dannhauer juvenile Hauschweine einseitig mit einem okklusionsstörenden Element. In der Folge der daraus resultierenden funktionellen Minderbelastung konnten eine Erhöhung der extrazellulären Leitfähigkeit sowie eine Verringerung des Belastungspotenzials nachgewiesen werden. In der Annahme, dass dies letztlich zu einem Anstieg der Zellteilungsaktivität im kondylären Knorpel führt, kann eine vermittelnde Funktion zwischen dem biomechanischen Reiz und der Wachstumsantwort im Kondylenknorpel geschlussfolgert werden (Dannhauer 1992).

Um die Erkenntnis der Existenz von belastungsabhängigen elektrischen Potenzialen im Knochen als Grundlage für den therapeutischen Einsatz elektrischer Felder bei der Behandlung von Knochendefekten langfristig etablieren zu können, untersuchte Beate Habel die zellulären Wirkungsmechanismen an humanen Osteosarcomazellen und an aus Minischweinen isolierten primären Osteoblasten, die mit elektrischen Feldern von 0,1 Hz bis 100 kHz befeldet wurden. Sie konnte so nachweisen, dass elektrische Felder das Signalsystem und den Knochenzellstoffwechsel im gesamten untersuchten Frequenzbereich beeinflussen, wobei bei über 1 kHz eine Erhöhung des Wachstums und ein verzögerter Anstieg der Alkalische-Phosphatase(ALP)-Aktivität sowie ein Absinken der Nitrit- und H_2O_2 -Konzentration zu verzeichnen war, wohingegen bei Frequenzen unter 1 kHz eine Hemmung des Wachstums, verbunden mit einer gleichzeitigen Erhöhung der ALP-Aktivität und des oxidativen Stress festgestellt wurden.

Allerdings waren signifikante Auswirkungen erst bei Feldstärken von mehr als 100 V/m feststellbar. Induktive und kapazitive Feldapplikationen können diesen Wert nicht erreichen; dies gelingt nur durch direkte Befeldung mit Hilfe von Elektroden.

Des Weiteren formuliert sie analog einiger zuvor zitierter Autoren den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration als einen generellen Mechanismus der Feldwirkung. Verantwortlich dafür sind sowohl der Influx als auch die Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Bei elektrischer Stimulation dreidimensionaler Zellverbände wurden im Vergleich zur Monolayerkultur die Proliferation weniger und die Differenzierung mehr beeinflusst, woraus geschlossen werden kann, dass durch die Befeldung undifferenzierte Zellen vermehrt zur Teilung angeregt werden, während bei differenzierten Zellen die Matrixbildung stimuliert wird.

Da die erfassten Effekte in Relation zu bereits publizierten klinischen Erfolgen vergleichsweise schwach sind, bleibt die Existenz von in-vivo-Verstärkungsmechanismen zu vermuten, die im Rahmen der Zellkulturen nicht untersucht werden können (Habel 2004).

Nach dem Versuch, das Spektrum der bisherigen wissenschaftlichen Untersuchungen zu den verschiedenen experimentellen Ansätzen, Stromformen und Stimulationsparametern zu vergegenwärtigen, folgt im nächsten Abschnitt die Beschreibung der verwendeten Arbeitsmittel und Vorgehensweise bei der Durchführung der Versuche.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Anschließend findet sich eine Auflistung aller für den Versuchsansatz notwendigen Chemikalien unter Angabe des jeweiligen Herstellers:

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Paraformaldehyd	Merck
Rinderserumalbumin (Fraktion 5)	SIGMA
Ethanol (absolut)	J.T. Baker
Trypsin 0,5 % in PBS (mit EDTA)	PromoCell bioscience alive
Aqua dest.	Apotheke Universitätsklinikum Leipzig
Ziegen-Normalserum	DAKO CORPORATION
Pen/Strep (10.000 IU/ml each)	PromoCell bioscience alic
4,6-Diamidino-2-phenylindol. 2HCL p.a. (DAPI)	SERVA Feinbiochemica GmbH & Co. KG
Fluoreszent Mounting Medium	DAKO CORPORATION

3.1.2 Puffer

Die Phosphatpufferlösung wird im Folgenden mit „PBS“ abgekürzt und hat einen pH-Wert von 7,4.

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Dulbeccos Phosphatpuffer	Biowest

3.1.3 Nährmedien

Zur Kultivierung der Osteoblasten auf der jeweiligen Probeoberfläche kam ein Gemisch aus einem speziell für das Osteoblastenwachstum geeigneten Medium und fetalem Kälberserum zur Anwendung.

Chemikalien

Hersteller

Osteoblast Growth Medium

PromoCell bioscience alive

Supplement Mix/ Osteoblast Growth Medium

Fetal Calf Serum

3.1.4 Primärantikörper

Für die immunhistochemische Erhebung der BSP-Expression wurde monoklonaler Anti-human-BSP-Antikörper verwendet.

Chemikalien

Hersteller

Anti-human-BSP-Antikörper

Immundiagnostik AG

3.1.5 Sekundärantikörper

Die folgenden Präparate wurden als Sekundärantikörper für die immunhistochemische Analyse benötigt:

Chemikalien

Hersteller

CyTM3-konjugiertes Ziegen-Anti-Maus

ImmunoResearch

IgG (H+L)

Laboratories, INC.

3.1.6 Labortechnisches Zubehör

Die unten angeführten Materialien waren zur Durchführung der Zellkulturversuche erforderlich:

Gerät

Hersteller

Sicherheitswerkbank Herasafe

Kendro Laboratory Products

Brutschrank Thermo Forma

Thermo Electron Corporation

Zentrifuge Eppendorf 5702	Eppendorf-Netheler-Hinz
Analysenwaage Kern 410	Kern
Neubauer Zählkammer	Feinoptik Bad Blankenburg
Schüttler VIPRAMAX 100	Heidolph
Vortex-Mixer	Stuart
Kühlschrank	Liebherr
Tiefkühlschrank	Liebherr
Wasserbad	GFL
Zellkulturflaschen mit Filter Top (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner bio one
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brandt
Serologische Einmalpipetten	Sarstedt
Eppendorf Reaktionsgefäße 2,0 ml	Eppendorf AG Hamburg
Deckgläschen	Menzel Gläser
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner bio one
Skalpell	Aesculap

3.1.7 Geräte zur Auswertung

Es folgen alle zur Datenerhebung und -auswertung notwendigen Utensilien:

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss Jena
Mikroskop Axiovert	Carl Zeiss Jena
Mikroskop Laboval	Carl Zeiss Jena
Axio Cam MRc5	Carl Zeiss Jena
Software Axio Vision	Carl Zeiss Jena
Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2010	Microsoft

3.1.8 Verwendete Probekörper

Es wurden für die Studie insgesamt 105 Prüfkörper, jeweils mit einem Durchmesser von 6 mm sowie einer Dicke von 0,5 mm verwendet.

1. Probeoberfläche: Titan – maschinert

Die Oberfläche aus kommerziell reinem Titan (cpT) wurde von ZL-Microdent zur Verfügung gestellt und liegt aufgrund der Spontanoxidation als Titanoxidoberfläche vor.

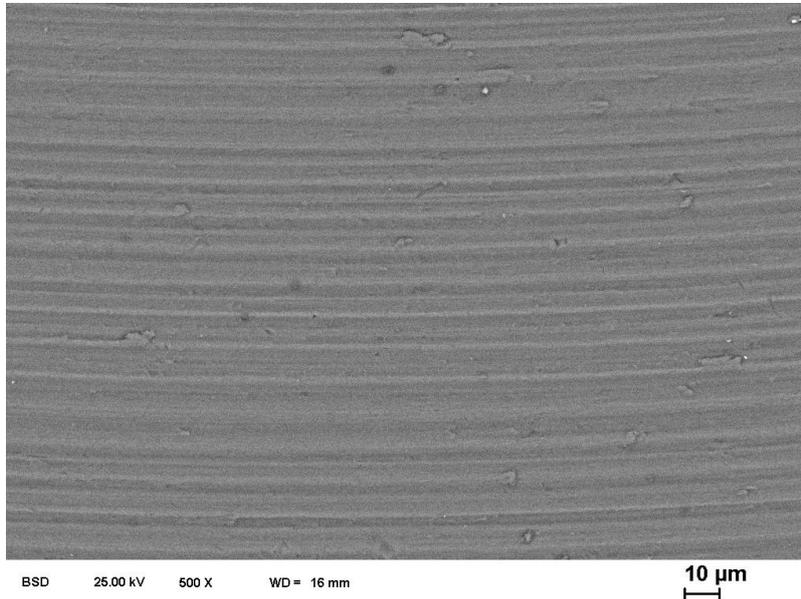


Abbildung 10: REM-Aufnahme Titan - maschinert; Maßstab 10 µm

Das charakteristische Rillenmuster entsteht hierbei in Form von Werkzeugspuren durch „Abstechen“ von einem größeren Titankörper im Rahmen der Maschinenbearbeitung sowie durch die Säureätzung während der Vorbehandlung.

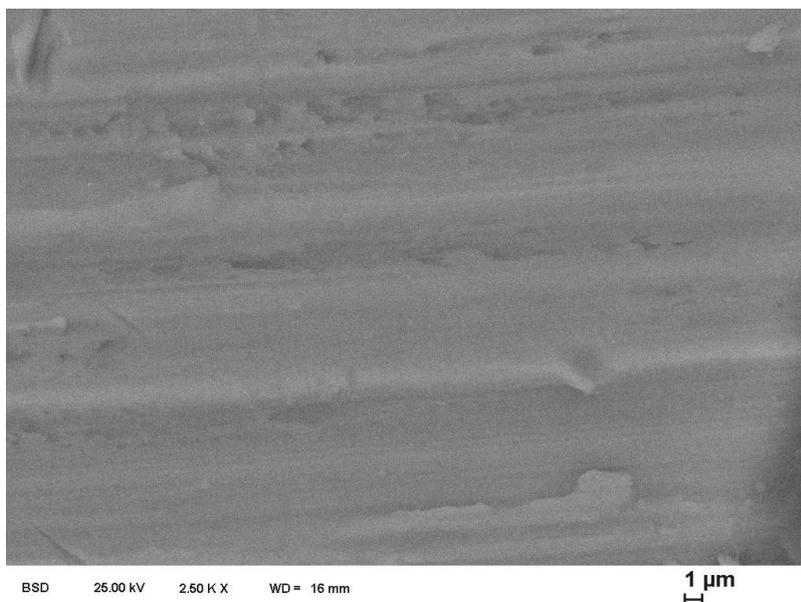
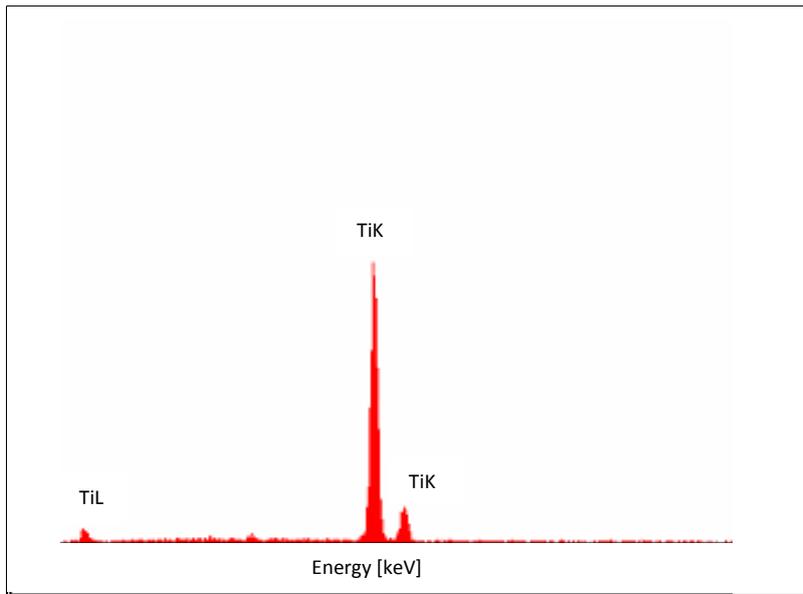


Abbildung 11: REM-Aufnahme Titan - maschinert; Maßstab 1 µm

Abbildung 12 zeigt entsprechend der Verwendung reinen Titans das Elementprofil des maschinenbearbeiteten Titans mit einem stark ausgeprägten Titan-Peak und nahezu ohne Vorkommen von Kohlenstoff, Eisen oder Sauerstoff.



Element	Wt %	At %
TiK	100,00	100,00

Abbildung 12: Elementprofil Titan – maschinert

2. Probeoberfläche: Titan – Ticer-Beschichtung

Abbildung 13 und Abbildung 14 verdeutlichen die Oberflächenbeschaffenheit der Ticer®-Oberfläche. Typisch ist vor allem das poröse Netzwerk mit irregulär verteilten und teilweise vergrößerten Poren.

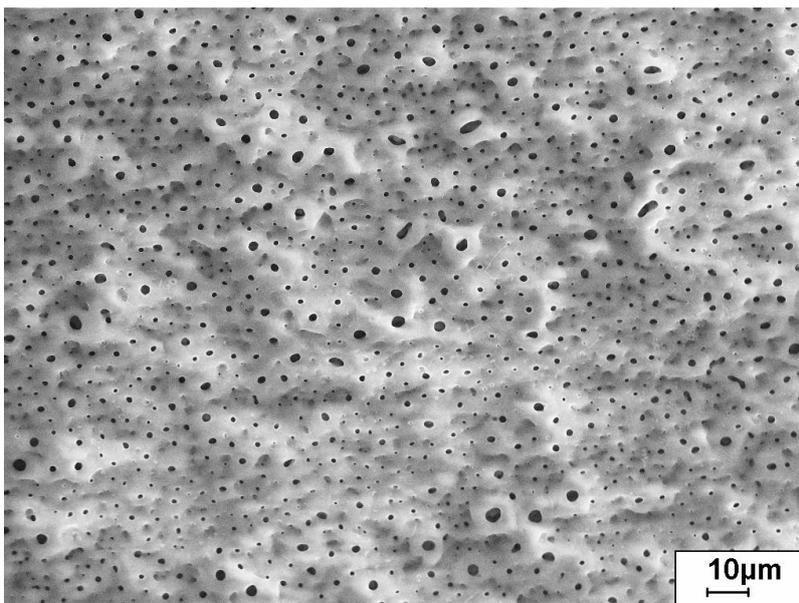


Abbildung 13: REM-Aufnahme Ticer; Maßstab 10 µm

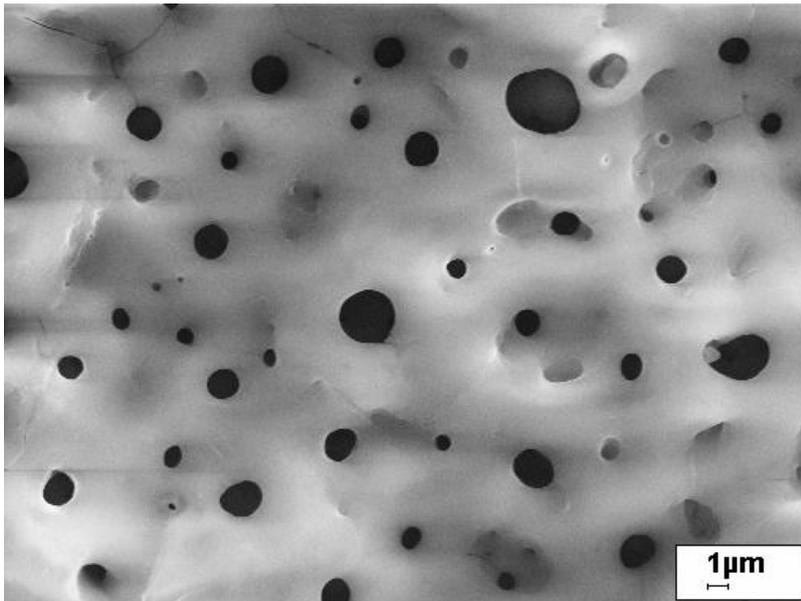
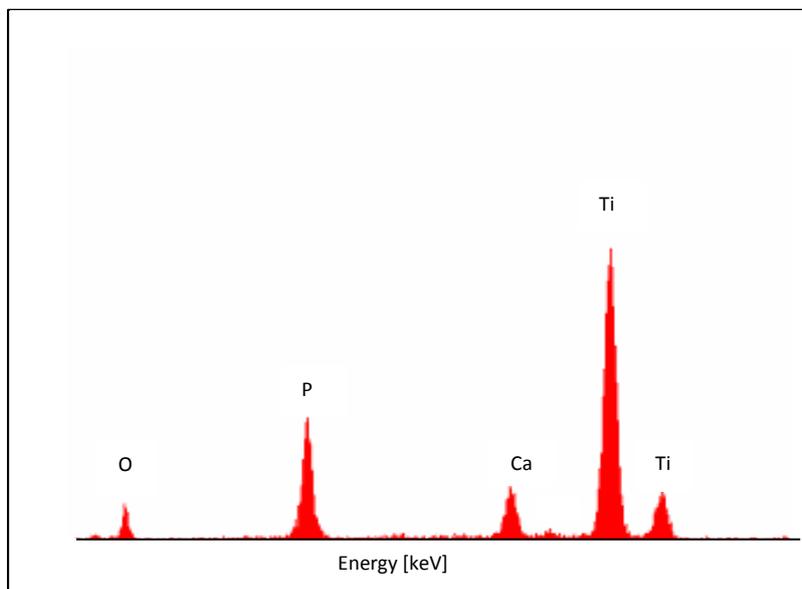


Abbildung 14: REM-Aufnahme Ticer; Maßstab 1 µm

Wie Abbildung 15 erkennen lässt, setzt sich die Ticer®-Oberfläche aus einem großen Anteil Titan sowie Beimischungen von Sauerstoff, Kalzium und Phosphor zusammen, die unter anderem die Ursache für die vergleichsweise hohe Affinität von Knochen zu der modifizierten Oberfläche sind.



Element	Wt %	At %
OK	53,89	74,66
PK	14,27	10,21
CaK	4,28	2,37
TiK	27,57	12,76

Abbildung 15: Elementprofil Ticer

3. Probeoberfläche: Titan – TiWhite®-Oberfläche (Duraplant 2.2)

Die Abbildung 16: REM-Aufnahme TiWhite®; Maßstab 10 µm und 17 stellen die rasterelektronischen Visualisierungen der TiWhite®-Oberfläche dar. Charakteristisch ist hierbei die heterogen poröse Struktur mit knopfförmig aufgeworfenen Anteilen und Poren in der Größenordnung von etwa 1 µm.

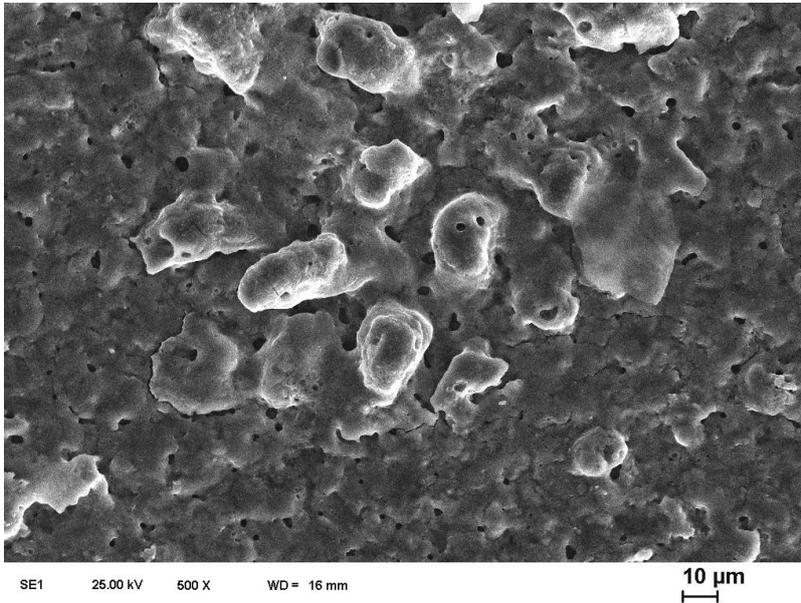


Abbildung 16: REM-Aufnahme TiWhite®; Maßstab 10 µm

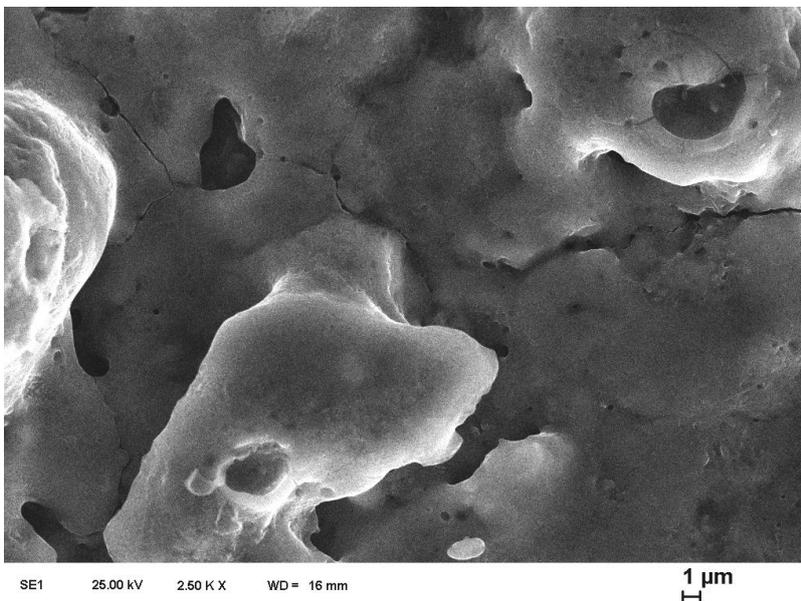
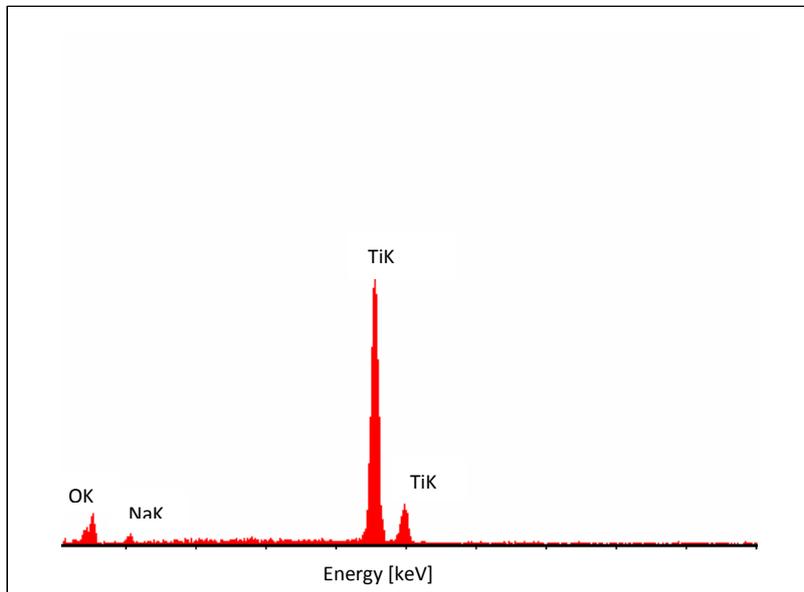


Abbildung 17: REM Aufnahme TiWhite®; Maßstab 1 µm

Abbildung 18 zeigt die Zusammensetzung der TiWhite®-Oberfläche, die hauptsächlich aus Titan und einem geringen Anteil Sauerstoff und Natrium besteht.



Element	Wt %	At %
OK	41,70	66,77
NaK	3,54	3,94
TiK	54,76	29,29

Abbildung 18: Elementprofil TiWhite®

3.1.9 Stimulationsgerät und Chamber Slides

Die zur Durchführung des Versuches notwendigen, elektrotechnischen Bauteile wurden vom Application Center Microcontroller der Hochschule Mittweida zur Verfügung gestellt und gemäß den unter Punkt 3.2.5 Versuchsvorbereitung festgelegten Parametern programmiert.

Abbildung 19 zeigt die in der Mitte befindlichen und als Chamber Slides bezeichneten Kammerobjektträger, die über Adapter mit dem am rechten Bildrand abgebildeten Stimulationsgerät verbunden sind.

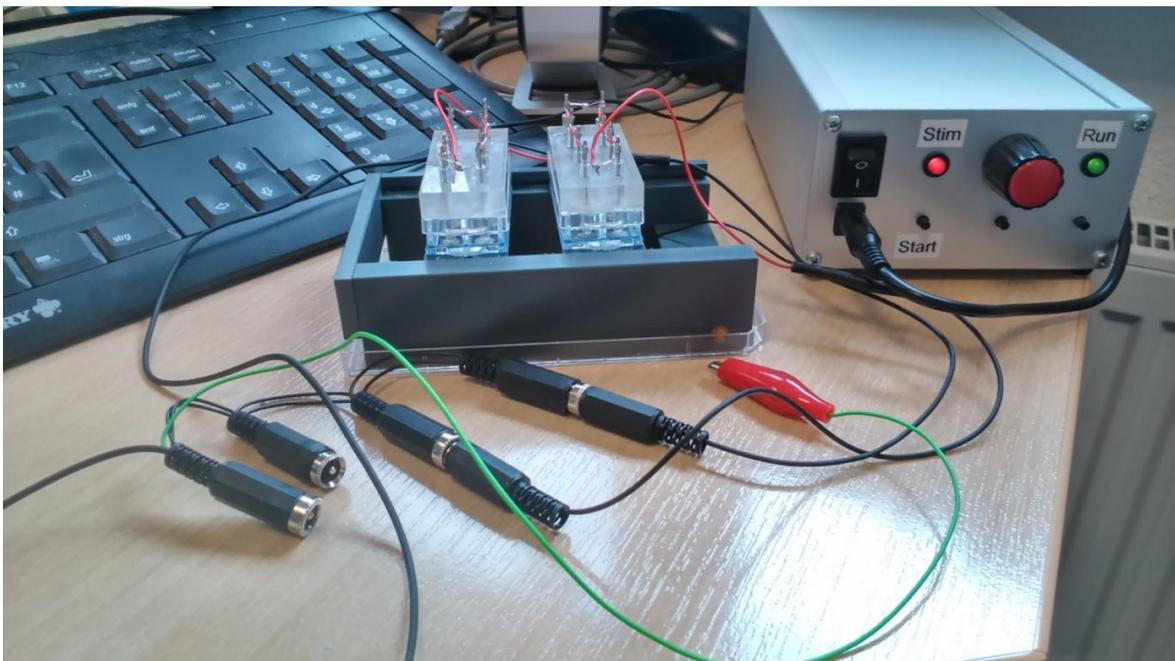


Abbildung 19: Probeaufbau des Stationären Stimulators mit angeschlossenen Chamber Slides im Labor
(Quelle: Dipl.-Ing. H. Polster; HS Mittweida)

An dieser Stelle darf ich Herrn Dipl.-Ing. Heiko Polster für die Entwicklung, Installation und Bereitstellung der Stimulationsapparatur danken.

3.2 Methoden

3.2.1. Materialgewinnung

Nach Genehmigung der Ethik-Kommission der Universität Leipzig und präoperativer Aufklärung des Spenders wurde im Rahmen eines elektiven, oralchirurgischen Eingriffes im Bereich des klinisch und röntgenologisch unauffälligen Zahnes 48 im ambulanten OP der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig Knochengewebe entnommen und unverzüglich in sterile Pufferlösung (PBS) mit einer Antibiotikamischung aus Penicillin, Streptomycin und stabilisierendem Natriumchlorid (Pen/Strep) eingelegt.



Abbildung 20: Knochenpräparat in PBS und Pen/Strep

3.2.2 Anzucht der Knochenzellen

Zunächst wurde das gewonnene Material in einer sterilen Werkbank mechanisch von Blut gereinigt und mit frischer PBS-Lösung gespült. Im Anschluss wurde das Gewebe über einen Zeitraum von 30 Minuten mit 0,25 %iger Kollagenase-Lösung im Brutschrank zur enzymatischen Reaktion gebracht, wobei als Rahmenbedingungen eine Temperatur von 37 °C, eine Luftfeuchtigkeit von 95 % und ein CO₂-Gehalt von 5 % definiert waren. Danach wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Nachdem dem Präparat ein weiteres Mal Kollagenase zugesetzt worden war, wurde das Gemisch für drei Stunden unter den oben angeführten Bedingungen erneut zur Reaktion gebracht.

Abschließend wurde die Kollagenase-Lösung bei 150 G für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und der Rückstand mit 2 ml Nährmedium resuspendiert.

Mittels Pipette erfolgte daraufhin die Überführung in eine Zellkulturflasche mit einer Grundfläche von 25 cm², in die zusätzlich 3 ml frisches Nährmedium hinzu gegeben wurden.

Die folgenden sieben Tage wurde die Kulturflasche bei konstanten Bedingungen (37 °C; 95 % Luftfeuchte; 5 % CO₂) in einem Brutschrank aufbewahrt, wobei jegliche Berührungen der Flasche zu vermeiden waren, um die Anheftung der Zellen am Boden nicht zu stören. Unter regelmäßiger mikroskopischer Überwachung wurde nach dem 7. Tag an jedem 3. Tag das Nährmedium gewechselt.

Nachdem ein subkonfluentes Wachstum der primären Knochenzellen beobachtet werden konnte, wurde die erste Subkultur der Zellen angelegt.

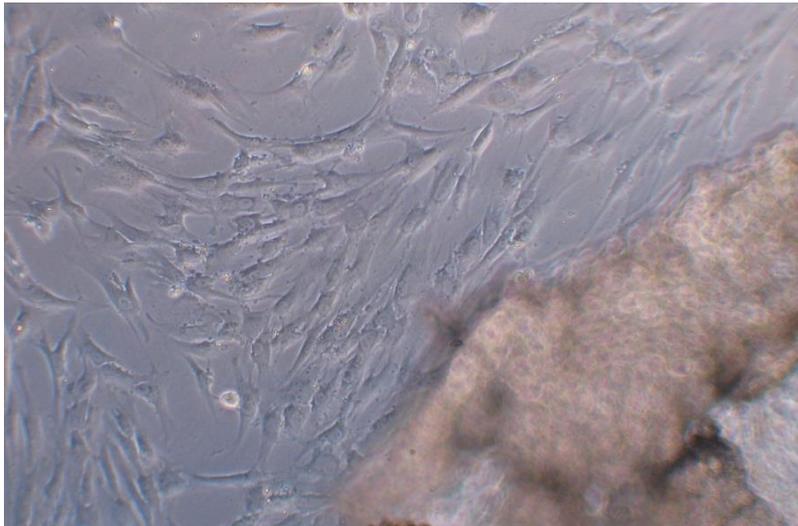


Abbildung 21: Wachstum der Knochenzellen; 20-fache Vergrößerung; inverses Mikroskop

3.2.3 Erste Subkultur

Als das Nährmedium abgesaugt war und die Knochenzellen mehrfach mit PBS gespült worden waren, konnten sie vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst werden.

Um eine möglichst schonende Ablösung der Zellen zu erreichen, erfolgte die Trypsinierung unter den oben angeführten Bedingungen, indem 1 ml Trypsin-Lösung in die Kulturflasche gegeben und nach Ablauf einer Minute abgesaugt und das Ablösen der Zellen mikroskopisch gesichert wurde. Nachdem die Knochenzellen durch Klopfen an die Unterseite der Flasche vollständig abgelöst worden waren, wurde der enzymatische Vorgang durch die Zugabe von 4 ml Nährmedium gestoppt.

Im nächsten Schritt wurde das Medium mit den Zellen abpipettiert, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und über einen Zeitraum von 10 Minuten bei 150 G zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspension des Gewebes mit 2 ml frischem Medium, wobei jeweils 1 ml der Zelllösung in eine 75 cm² große Zellkulturflasche überführt, mit 15 ml Nährmedium aufgefüllt und in einem Inkubator mit dem Ziel des weiteren Zellwachstums aufbewahrt wurde. In der Folge wurde aller drei Tage das Medium gewechselt und mit der Herstellung der zweiten Subkultur begonnen, sobald die Zellen subkonfluent gewachsen waren.

3.2.4 Zweite Subkultur

Analog der ersten Subkultur begann die Gewinnung der zweiten; mit dem Unterschied, dass das Zellpellet nach der Zentrifugation mit 3 ml Nährmedium resuspendiert und je 1 ml aus dem Zentrifugenröhrchen in eine von drei 75 cm² großen Zellkulturflaschen gegeben wurde. Es folgte das Auffüllen der drei Flaschen mit jeweils 15 ml Nährmedium und die Aufbewahrung im Brutschrank, wo aller drei Tage ein Wechsel des Mediums verbunden mit einer mikroskopischen Kontrolle des Zellwachstums erfolgte.

Mit Beobachtung eines subkonfluenten Wachstums konnte die Durchführung des Versuchsaufbaus beginnen.

3.2.5 Versuchsvorbereitung

Die Probekörper wurden gammasterilisiert und einzeln in je einer Kammer der Chamber Slide entsprechend des in Abbildung 23 dargestellten Versuchsschemas platziert.

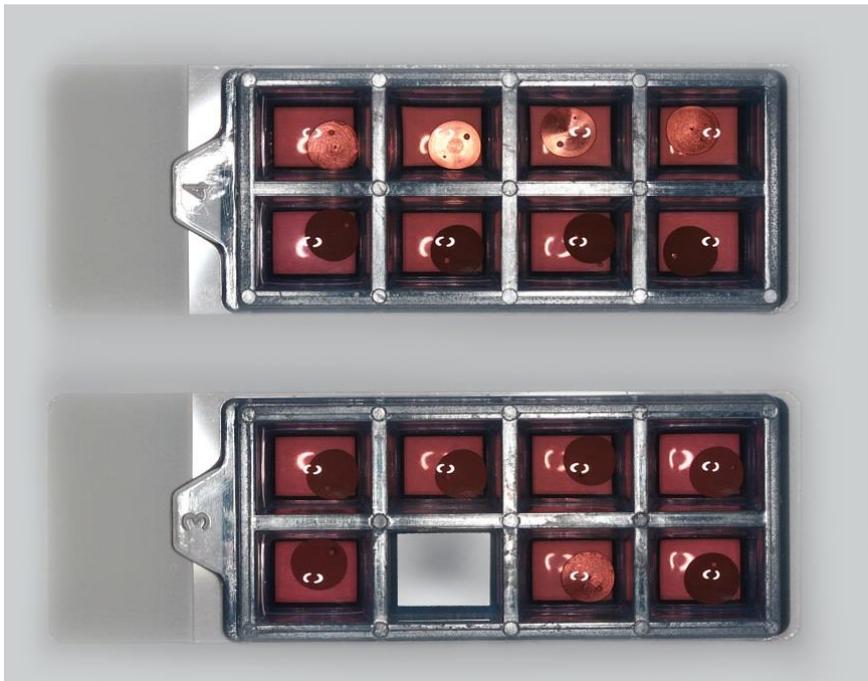


Abbildung 22: Probekörper in Chamber Slides

Auf Grundlage der zuvor im Rahmen der Literaturrecherche zusammengetragenen Werte vergleichbarer Versuchsanordnungen wurden gemeinsam mit dem Application Center Microcontroller der Hochschule Mittweida die folgenden Parameter festgelegt und im Stimulationsgerät programmiert:

1. Vorreaktion: 72 Stunden
2. Gesamtstimulationsdauer: 24 Stunden; gegliedert in:
 - Impulszeit: 7,5 Minuten
 - Impulszeitpause: 7,5 Minuten
 - Impulszeit: 7,5 Minuten
 - Behandlungspause: 45 Minuten
3. Nachreaktion: 24 Stunden

Die Phase der Impulszeit wird mit einer **Frequenz von 3,8 Hz** gepulst und besitzt eine **Amplitude von 3 V**, wobei das **Tastverhältnis auf 50 %** festgelegt wurde.

3.2.6 Versuchsaufbau

Zur Erläuterung des Versuchsschemas sei auf Punkt 3.2.8 Versuchsdurchführung verwiesen.

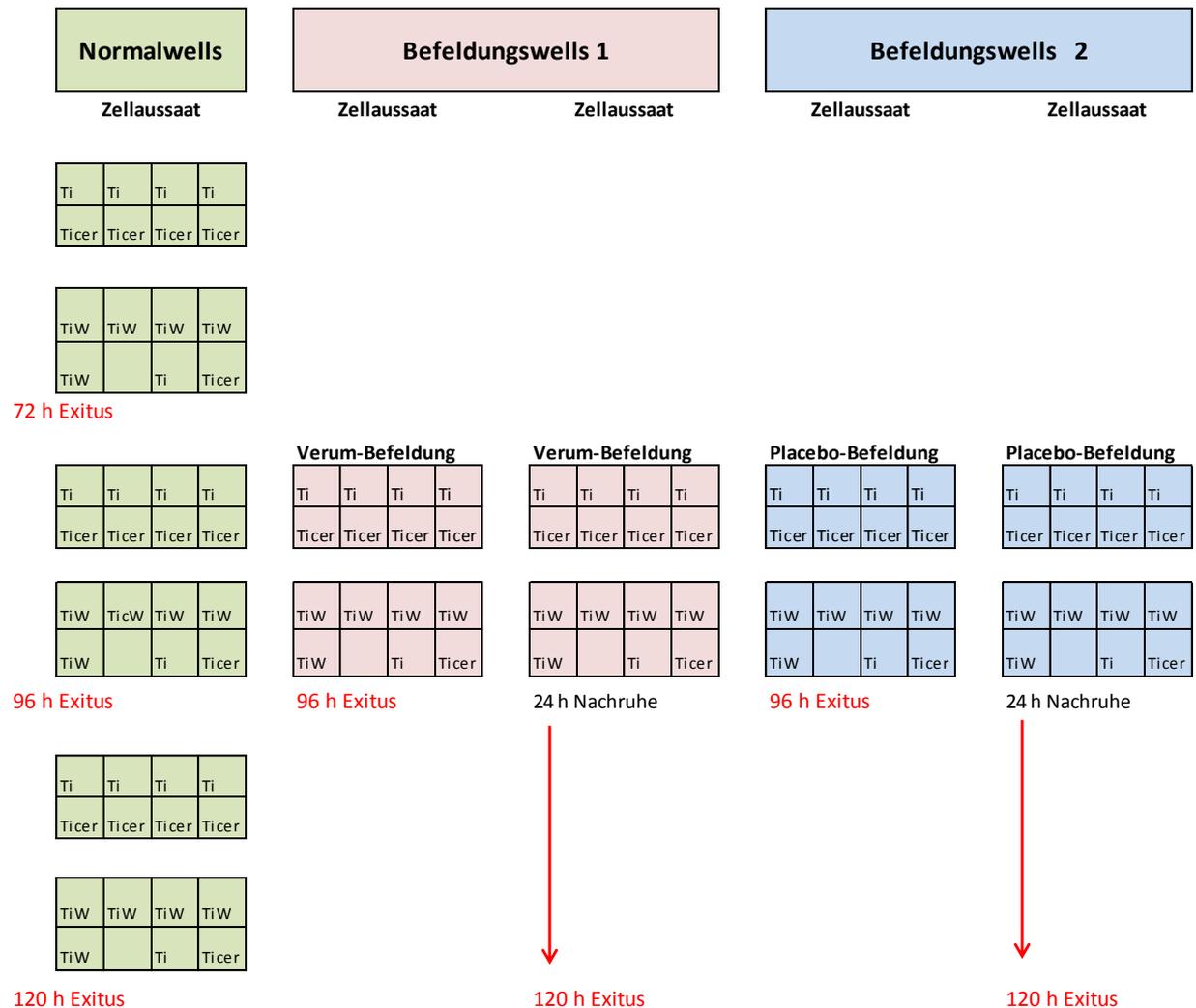


Abbildung 23: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

3.2.7 Versuchsbeginn

Zunächst erfolgte die Trypsinierung der zweiten Subkultur analog den Erläuterungen unter Punkt 3.2.3 Erste Subkultur sowie die Resuspension der Proben mit 5 ml Nährmedium nach dem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes.

Der Versuch erforderte eine Verdünnung der Zellsuspension mit Medium bis zu einem Wert von 1000 Zellen auf 500 μ l. Anschließend wurden je 500 μ l der Verdünnungsreihe in jede der acht Kammern der Chamber Slides hinzugegeben und die Slides schließlich im Brutschrank deponiert.

3.2.8 Versuchsdurchführung

Sobald die Chamber Slides mit den Probekörpern versehen und im Brutschrank platziert worden waren, wurden sie anschließend mit dem Adapterkabel verbunden. Dieses wurde daraufhin ebenso wie das Steckernetzteil an das Stimulationsgerät angeschlossen und die Stromzufuhr gewährleistet. Abbildung 24 zeigt schematisch die Platzierung der Probekörper in den Chamber Slides.

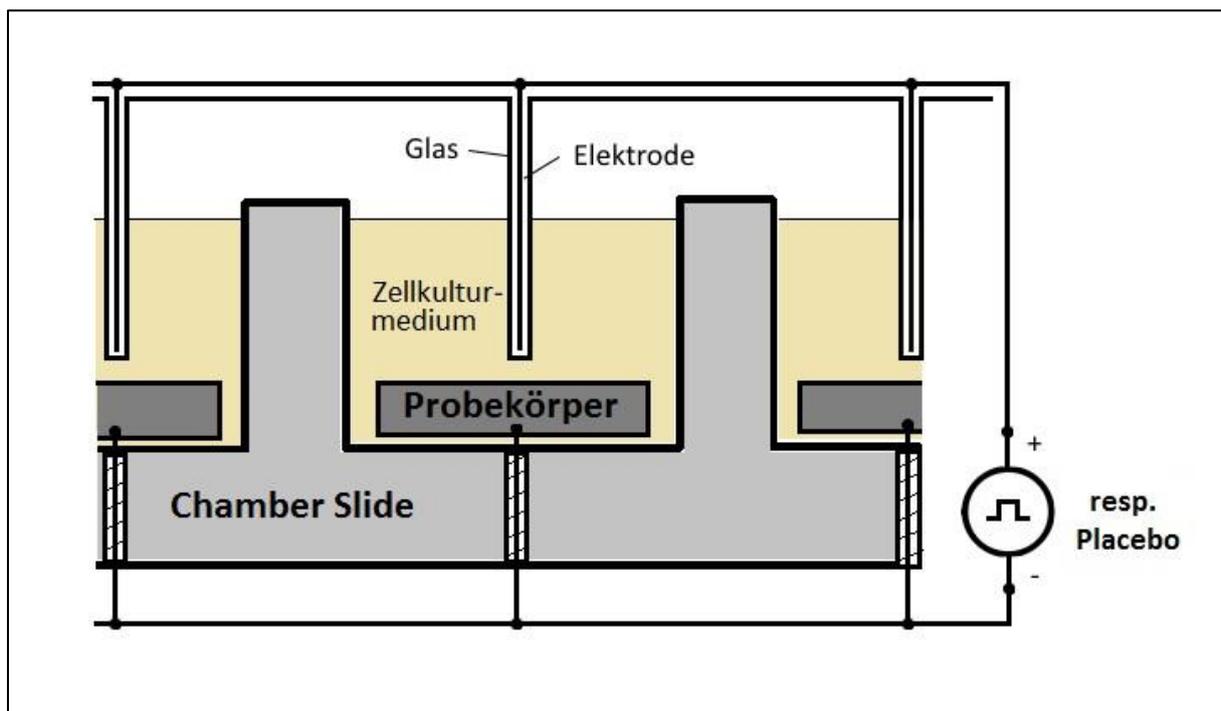


Abbildung 24: Schematische Darstellung der Probekörper in den Chamber Slides

Die im Versuchsschema als „Normalwells“ bezeichneten Probekörper wiesen keinen Kontakt zum Befeldungsapparat auf und dienen der Veranschaulichung des unbeeinflussten Knochenzellwachstums auf der jeweiligen Oberfläche und können folglich als Kontrollgruppe betrachtet werden. Des Weiteren ergänzen sie den Vergleich zwischen unbefeldeten und

befeldeten Zellen, indem sie eine Unterscheidung erlauben, ob bereits das Anbringen der Befeldungsapparatur Einfluss auf die Messwerte nimmt.

Der Schwerpunkt des Experimentes liegt jedoch auf der Analyse der Wirkung von gepulsten elektrischen Feldern zum einen auf die Zellproliferation und –differenzierung und zum anderen auf die BSP-Expression. Dazu wurden jeweils fünf Probekörper gleicher Oberfläche aus den unter Punkt 2.4 charakterisierten drei Materialien Titan, Ticer® und TiWhite® mit dem Befeldungsequipment versehen, wobei in der nachfolgenden Ergebnisdarstellung die Termini „Verum“ für tatsächlich befeldete Zellen sowie „Placebo“ für an den Apparat angeschlossene, jedoch unbefeldete Zellen verwendet werden. Eine weitere Untergliederung in zwei Versuchsgruppen ist erforderlich, wobei im Rahmen der ersten die Zellen nach 96 h Befeldung direkt dem Exitus zugeführt worden, während die der zweiten Gruppe erst nach weiteren 24 h Nachruhe ausgewertet wurden.

Alle Probekörper wurden mittels der anschließend aufgeführten Methoden hinsichtlich der folgenden Parameter untersucht:

- 1. Zellzahl**
- 2. Relativer Grauwert DAPI**
- 3. Relativer Grauwert Cy3**

3.2.9 Histochemische Untersuchung des Bone Sialoprotein (BSP)

Am Versuchstag wurden die Chamber Slides mit den Prüfkörpern dem Brutschrank entnommen und wie folgt weiterbehandelt: zunächst wurde eine Fixation mit 4 %igem Paraformaldehyd auf dem Schüttler durchgeführt. Daraufhin wurde das Paraformaldehyd abgesaugt und die Probekörper jeweils viermal über einen Zeitraum von fünf Minuten mit frischem PBS gespült.

Die weiteren Arbeitsschritte wurden unter Lichtausschluss vorgenommen. Zur Blockung unspezifischer Reaktionen wurden die Probekörper für 60 Minuten mit 10 %igem Ziegennormalserum auf dem Schüttler inkubiert und anschließend das Serum wieder abpipettiert. Zu allen Probekörpern des jeweiligen Chamber Slides wurden nun die mit PBS auf 1:100 verdünnten monoklonalen Primärantikörper anti-human-BSP-Antikörper gegeben und letztendlich in den Kühlschrank überführt.

Nach einer Zeitspanne von 16 Stunden wurden die Kammern aus dem Kühlschrank genommen und die Antikörper abpipettiert. Es folgten drei Spülvorgänge à fünf Minuten mit PBS und daraufhin die Markierung mit dem Sekundärantikörper CyTM 3-konjugiertes Ziegen-Anti-Maus-IgG (H+L), der zuvor auf 1:200 verdünnt worden war.

Auf dem Rüttler erfolgte eine 30-minütige Inkubation, bevor die Probekörper dreimal für 5 Minuten mit PBS gespült und die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt wurden. Zu diesem Zweck wurde 1 mg DAPI in 1 ml absolutem, unvergälltem Alkohol gelöst, um eine Stammlösung zu

gewinnen. Diese wurde mit PBS auf 1:1000 verdünnt und abschließend eine Minute auf den Probekörpern mit den entsprechenden Markern lichtgeschützt inkubiert.

Des Weiteren wurden die Probekörper zweimal für jeweils fünf Minuten mit PBS und erneut zweimal für jeweils fünf Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Nachdem alle Probekörper mit Fluoreszenzmedium eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen worden waren, wurden sie bis zur Auswertung bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Mithilfe eines TRITC-Filters konnte fluoreszenzoptisch die Expression von BSP dargestellt werden. Dabei wurde die Messung mit 200-facher Vergrößerung an je zehn Messpunkten pro Probekörper durchgeführt.

3.2.10 Zellzählung

Es standen 14 präparierte Objektträger zur Verfügung, wobei insgesamt 105 Probekörper der verschiedenen Probeoberflächen ausgewertet wurden.

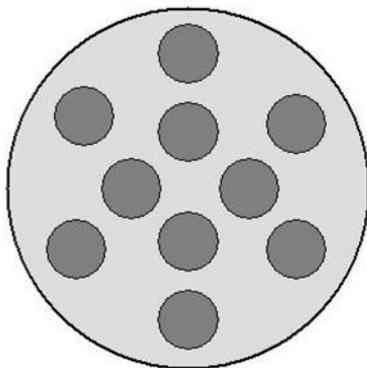


Abbildung 25: Zählschema

Wie Abbildung 25 verdeutlicht, befinden sich vier der Messfelder im zentralen und sechs im randnahen Bereich des Probekörpers. Mit der digitalen Kamera Axio Cam wurden die für die Auswertung benötigten Bilder über eine Mehrkanalaufnahme aufgezeichnet, damit unter Zuhilfenahme der Software AxioVision für jedes Messfeld die Belichtungszeit (rot) und der Grauwert zur Untersuchung der Osteogenese bestimmt.

3.2.11 Grauwertanalyse

Um den Grauwert jedes aufgenommenen Bildes bestimmen zu können, wurde ein Referenzrahmen genutzt, der jedem Bild eingefügt wurde. Das Programm AxioVision errechnete für diese Fläche von 440 x 330 µm den von der Belichtungszeit abhängenden Grauwert. Die Software arbeitet mit einer automatischen Belichtungszeit, welche dokumentiert wird.

Die Fluorochrome fluoreszieren umso länger, je länger sie vom Licht angeregt werden, ergo ist der Grauwert kleiner bei kurzer Belichtungszeit und vergrößert sich entsprechend bei langer Belichtungszeit.

Folglich lässt sich der relative Grauwert aus dem Quotienten aus absolutem Grauwert und Belichtungszeit errechnen.

Abbildung 26 bis Abbildung 28 zeigen am Beispiel einer einzelnen Aufnahme einer im vorliegenden Versuch verwendeten Titanoberfläche die separate Darstellbarkeit der Zellkerne und BSP-Moleküle, die zur exakten Zellzählung und Proteinbestimmung unabdingbar ist sowie deren überlagerte Darstellung.

Die Zusammenstellung und grafische Darstellung aller erhobenen Daten erfolgte mittels des Programmes Microsoft® Excel 2010.

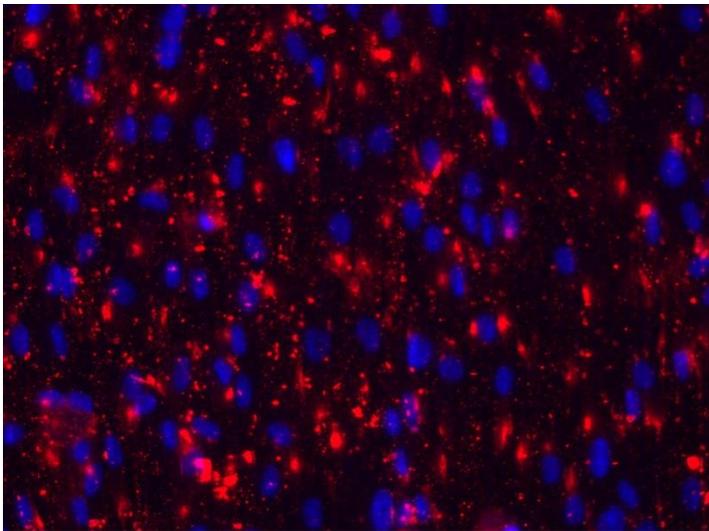


Abbildung 26: Rechnergestütztes Summationsbild von Zellkernen (blau/DAPI) und BSP-Molekülen (rot/TRITC); 200-fache Vergrößerung; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

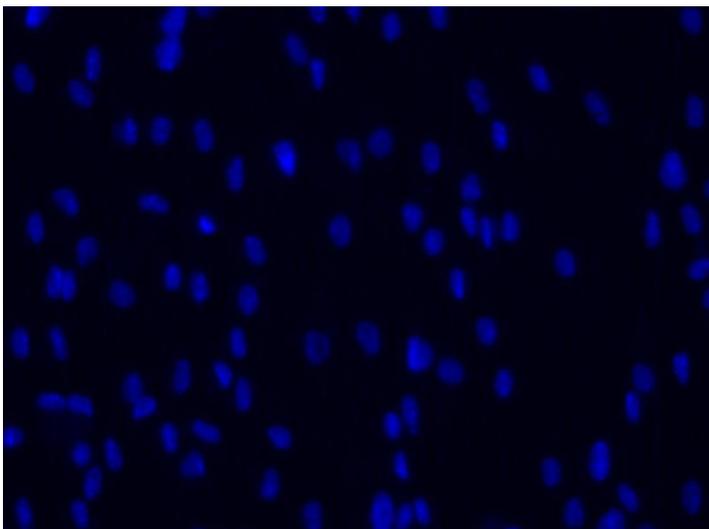


Abbildung 27: Mikroskopische Darstellung der Zellkerne (DAPI); 200-fache Vergrößerung; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

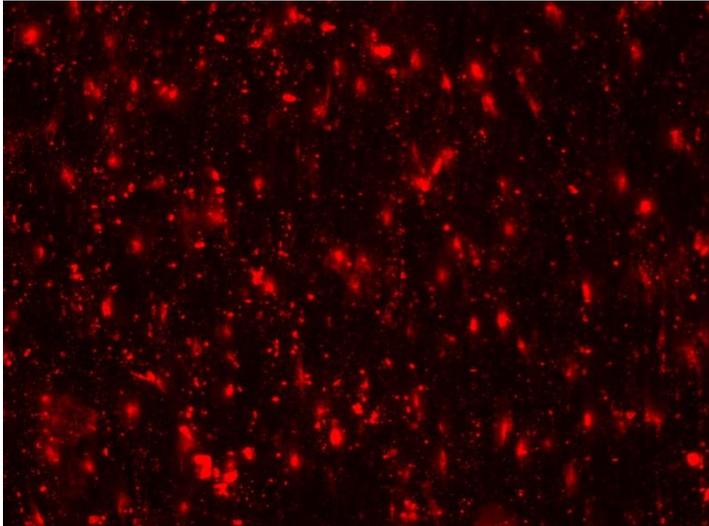


Abbildung 28: Mikroskopische Darstellung der BSP-Moleküle (TRITC); 200-fache Vergrößerung; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

3.2.12 Statistische Auswertung

Mittels deskriptiver Statistik wurden für die jeweiligen Parameter Mittelwert und Standardabweichung ermittelt und die errechneten Werte mithilfe von Säulendiagrammen visualisiert.

Auf Basis der relativen Grauwerte wurde zunächst die Markerexpression quantifiziert und anschließend eine Signifikanztestung wie folgt durchgeführt:

1. Fragestellung: Unterscheiden sich die Kennwerte (Markerexpression) zwischen Verum- und Placebo-befeldeten Probekörpern zu einem bestimmten Zeitpunkt?
2. Testmethode: Angewandt wurde der U-Test nach Mann & Whitney; ein Rangsummentest, bei dem die Kalkulation der Teststatistik auf dem Vergleich von zwei Rangreihen basiert. Eine Normalverteilung wird hierbei nicht vorausgesetzt. Alle Werte aus den zu vergleichenden Datenreihen werden in aufsteigender Reihenfolge sortiert und mit Rangnummern versehen. Mithilfe einer komplexen Folge von Formeln, die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung als Kalkulation im Software-Programm Microsoft® Excel 2010 erstellt worden ist, wurde für jede Gegenüberstellung von Messparametern ein p-Wert errechnet, also die Wahrscheinlichkeit, mit der die Differenz des jeweiligen Ergebnisses rein zufällig zustande gekommen ist. Je näher dieser Wert bei 0 liegt, umso eher wird die Alternativhypothese angenommen und somit die zuvor formulierte Forschungsfrage bestätigt (Weiß und Bucsky 2013).
3. Signifikanztest: Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ (resp. $\leq 5\%$) auf überzufälligen Zusammenhang (Signifikanz) getestet worden. Die Nullhypothese entspricht hierbei dem Fall, dass es keinen Unterschied bei der BSP-Expression zwischen befeldeten und unbefeldeten Knochenzellen gibt, während die Alternativhypothese im Umkehrschluss annimmt, dass durch die Befeldung von Knochenzellen eine Stimulation der BSP-Expression erzielt wird.

4. Ergebnisse

Eine Zusammenstellung aller erhobenen Messwerte findet sich in Form je einer Tabelle pro verwendeter Oberfläche und weiter untergliedert in die Gruppen „Verum“, „Placebo“ und „Normalkultur“ sowie die Zeitpunkte 72 h, 96 h und 120 h.

Die Ergebnisdarstellung erfolgt zur besseren Nachvollziehbarkeit anhand grafischer Aufarbeitungen der Daten.

4.1 Direkter Vergleich Verum-Placebo-Befeldung

Die nachfolgend abgebildeten Säulendiagramme wurden für jedes der drei Oberflächenmaterialien auf Grundlage der Durchschnittswerte aller fünf Probekörper (Pk) zu jeweils zwei definierten Zeitpunkten (96 h und 120 h) erstellt.

Um Verfälschungen der Mittelwerte durch methodisch nicht erklärbare Maximalwerte zu vermeiden, wurde das bei biologischen Versuchen übliche Verfahren der Extremwertstreichung angewandt.

Folgende Werte wurden aus den grafischen Berechnungen ausgeschlossen:

1. Ticer® 96h Verum Probekörper 5 (rel. Grauwert DAPI und Cy3)
2. Ticer® 120h Verum Probekörper 1 (rel. Grauwert DAPI)
3. TiWhite® 96h Verum Probekörper 5 (Zellzahl)
4. TiWhite® 120h Verum Probekörper 2 (Zellzahl und rel. Grauwert Cy3)

Die Standardabweichungen wurden als vertikale Fehlerindikatoren in die jeweilige Säule integriert.

Darüber hinaus ist über jedem Säulenpaar die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben.

Nach Maßgabe des zuvor festgelegten Signifikanzniveaus von $\alpha = 0,05$ sind Unterschiede mit kleinerem p-Wert als statistisch „signifikant“ zu betrachten.

Bei Werten von $p \leq 0,01$ ist die Differenz „sehr signifikant“, bei $p \leq 0,001$ definitionsgemäß „hoch-signifikant“.

In der Folge kann die Nullhypothese verworfen werden und die Alternativhypothese gilt als zutreffend.

4.1.1 Titan

Tabelle 1: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	114,9	2,85	1,79
Pk 2	81,8	2,83	2,71
Pk 3	110,5	2,65	3,1
Pk 4	118,9	3,41	2,82
Pk 5	97,2	2,62	2,17
Durchschnitt	104,66	2,87	2,52
Standardabw.	15,17	0,32	0,53
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	82,1	2,33	2,53
Pk 2	85,7	2,32	1,8
Pk 3	123,5	3,32	1,99
Pk 4	102,4	3,18	1,89
Pk 5	98,1	2,44	2,02
Durchschnitt	98,36	2,72	2,05
Standardabw.	16,38	0,49	0,28

Tabelle 2: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	100,5	1,92	1,74
Pk 2	106,2	2,2	2,88
Pk 3	167,1	3,7	2,29
Pk 4	144,7	3,07	3,36
Pk 5	139,4	2,3	2,79
Durchschnitt	131,58	2,64	2,61
Standardabw.	27,86	0,73	0,62
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	107,2	1,98	2,06
Pk 2	116,6	1,77	2,25
Pk 3	150,5	2,34	2,51
Pk 4	89,5	1,96	2
Pk 5	146,6	2,03	2,67
Durchschnitt	122,08	2,02	2,30
Standardabw.	26,09	0,21	0,29

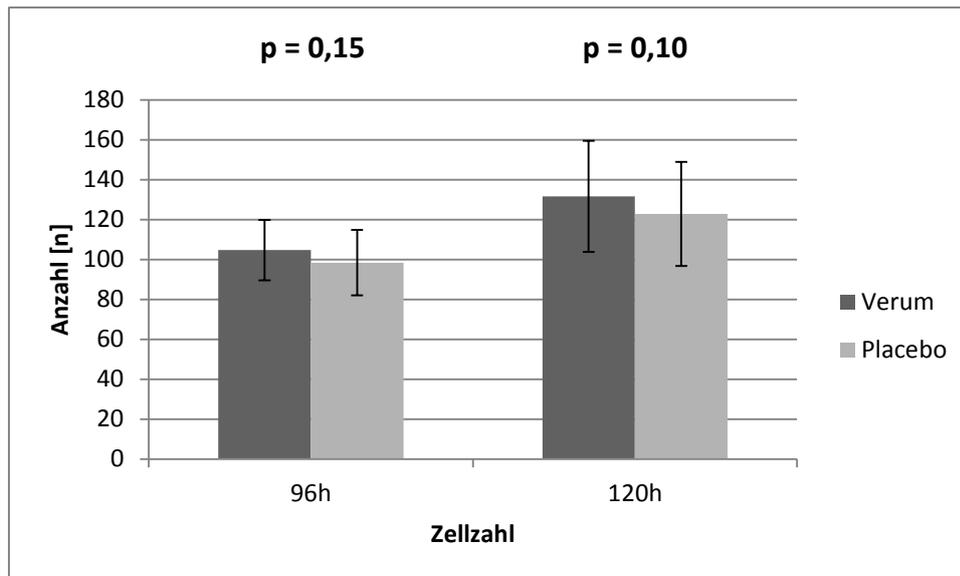


Abbildung 29: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Zellzahl (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h

Zunächst ist ersichtlich, dass die 24-stündige Nachruhezeit einen positiven Effekt auf die Zellproliferation ausübt. Beide Versuchsgruppen weisen nach 120 h eine um ca. 25 erhöhte Anzahl von Knochenzellen auf.

Des Weiteren ist bei den tatsächlich befeldeten Zellen verglichen mit der Placebo-Gruppe eine leichte Tendenz zu höheren Zellzahlen feststellbar, wobei die Unterschiede nicht signifikant sind. Nach 96 h wurden durchschnittlich sechs, nach 120 h neun Zellen mehr gezählt.

Die Standardabweichung ist mit rund 16 bei 96 h und rund 27 bei 120 h relativ hoch, was auf einen großen Streubereich der Ergebnisse schließen lässt. Diese Tatsache ist bei biologischen Experimenten allerdings durchaus nicht ungewöhnlich und liegt in der individuellen Reaktion der Zellen auf kleinste Veränderung der Umgebungsbedingungen begründet.

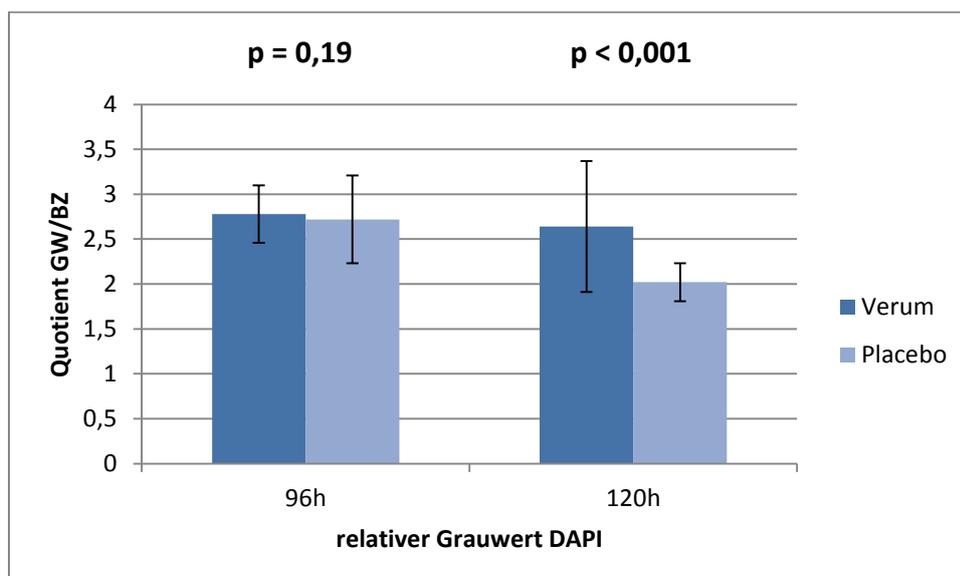


Abbildung 30: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h

Während die Differenz zwischen den angefärbten Flächen der Zellkerne von Verum- und Placebo-befeldeten Knochenzellen nach 96 h nur minimal und nicht signifikant ist, wurde nach 120 h ein deutlicher und zudem hoch-signifikanter Unterschied festgestellt. Dabei betrug der relative Grauwert in der Placebo-Gruppe im Durchschnitt etwa 0,6 respektive 23 % weniger als in der Vergleichsgruppe. Die geringe Streubreite dieser Datenreihe lässt hierbei auf eine relativ hohe Konstanz der Messwerte schließen.

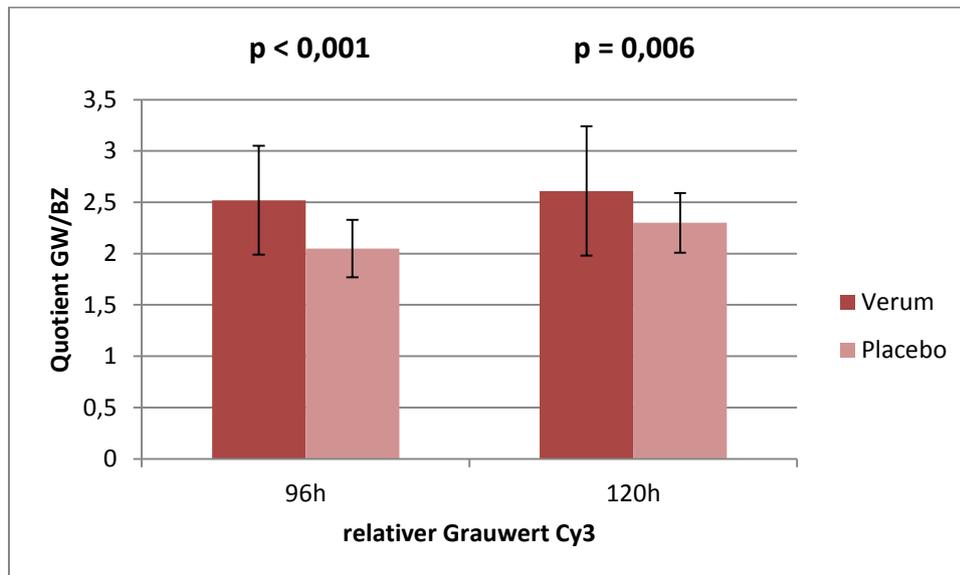


Abbildung 31: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Titan nach 96h bzw. 120h

In der zeitlichen Gegenüberstellung zwischen den nach 96 h und nach 120 h erhobenen Messwerten lässt sich ein nur geringfügiger Unterschied feststellen, der in einer um 0,1 bei den Verum-befeldeten und um 0,3 erhöhten Cytochrom-Fläche bei den Placebo-befeldeten Zellen besteht.

Darüber hinaus fällt unabhängig von der zeitlichen Komponente ein deutliches Defizit der Placebo- verglichen mit der Verum-Gruppe auf, das in beiden Fällen als statistisch hoch-signifikant einzuordnen ist. So beträgt die Differenz der relativen Grauwerte nach 96 h knapp 0,5 entsprechend einer um 19 % gesteigerten BSP-Anheftung und nach 120 h rund 0,3 entsprechend einer Steigerung um 12 %, wobei der Streubereich der Verum- jeweils größer ist als der der Placebo-Gruppe. Letztere weist demnach ein vergleichsweise höheres Gleichmaß der Daten in diesem Punkt auf.

4.1.2 Ticer®

Tabelle 3: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	84,6	1,48	3,73
Pk 2	52,1	1,46	3,14
Pk 3	54,4	1,17	2,42
Pk 4	69,3	1,44	2,43
Pk 5	49	0,92	0,87
Durchschnitt	61,88	1,29	2,52
Standardabw.	14,91	0,24	1,07
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	61,3	1,48	4,08
Pk 2	51	1,24	4,32
Pk 3	84,2	1,54	3,55
Pk 4	82,3	1,95	5,65
Pk 5	75,3	1,8	4,28
Durchschnitt	70,82	1,60	4,38
Standardabw.	14,27	0,28	0,78

Tabelle 4: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	48	0,89	2,26
Pk 2	61,9	1,5	3,26
Pk 3	72,4	1,46	3,13
Pk 4	48,8	1,34	2,79
Pk 5	52,4	1,36	2,82
Durchschnitt	56,70	1,31	2,85
Standardabw.	10,37	0,24	0,39
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	50,3	1,13	4,22
Pk 2	99,9	1,15	3,38
Pk 3	120,8	1,57	4,6
Pk 4	117,5	1,45	3,91
Pk 5	75,1	1,14	3,25
Durchschnitt	92,72	1,29	3,87
Standardabw.	29,85	0,21	0,57

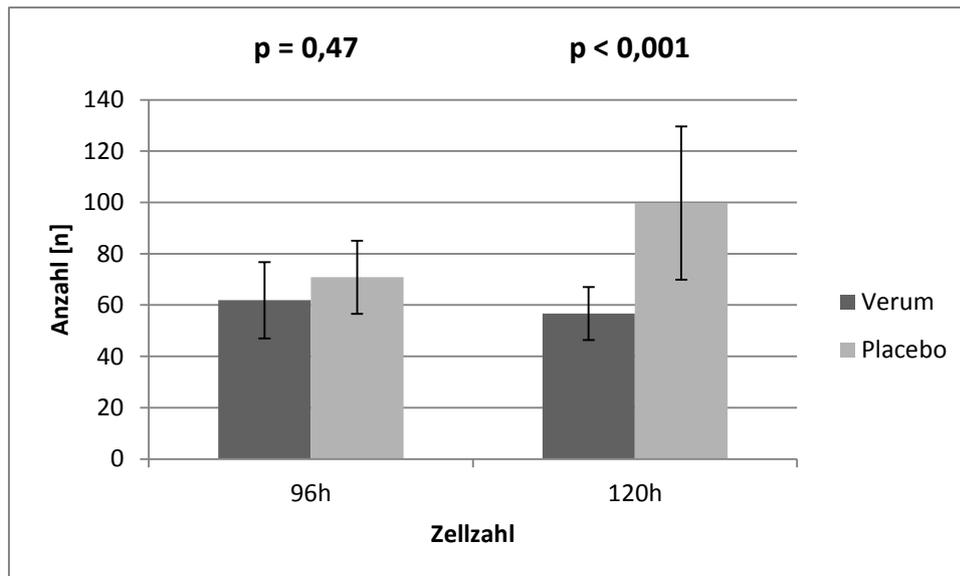


Abbildung 32: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Zellzahl (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h

Nach 96-stündiger Befeldung differieren die Zellzahlen im Durchschnitt statistisch nicht signifikant um lediglich etwa neun Zellen, während nach zusätzlicher Nachruhezeit der Unterschied 43 Zellen beträgt und statistisch hoch-signifikant ist. Die absolute Zellzahl ist folglich nach 120 h in der Placebo- fast doppelt so hoch wie in der Verum-Gruppe. Allerdings ist hier auch die Standardabweichung vergleichsweise hoch und deutet auf ein hohes Maß an Unbeständigkeit hin.

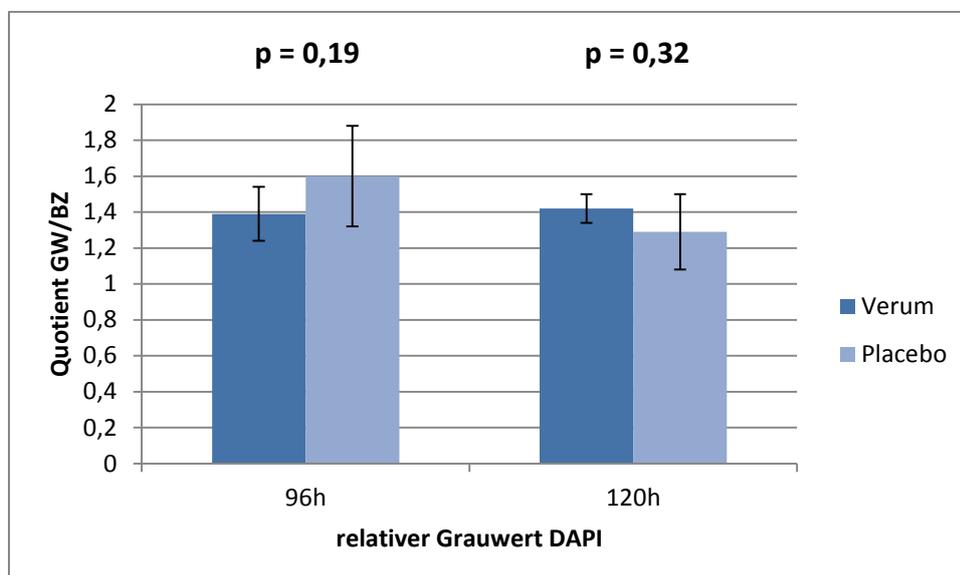


Abbildung 33: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h

Bei der Messung der relativen Grauwerte der Zellkerne auf Ticer®-Probekörpern fiel zu verschiedenen Zeitpunkten erstmals eine Diversität der Ergebnisse zwischen der Verum- und der Placebo-Gruppe auf. So waren die Werte nach 96 h bei den tatsächlich befeldeten Zellen in Relation zur Vergleichsgruppe um durchschnittlich 0,21 resp. 13 % erniedrigt sowie nach 120 h um 0,13 resp. 9 % erhöht. Beide Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

Betrachtet man die Ergebnisse im zeitlichen Verlauf, sind die Werte der Verum-Gruppe nach der Nachruhezeit leicht gestiegen, wohingegen die der Placebo-Gruppe etwas deutlicher abgesunken sind.

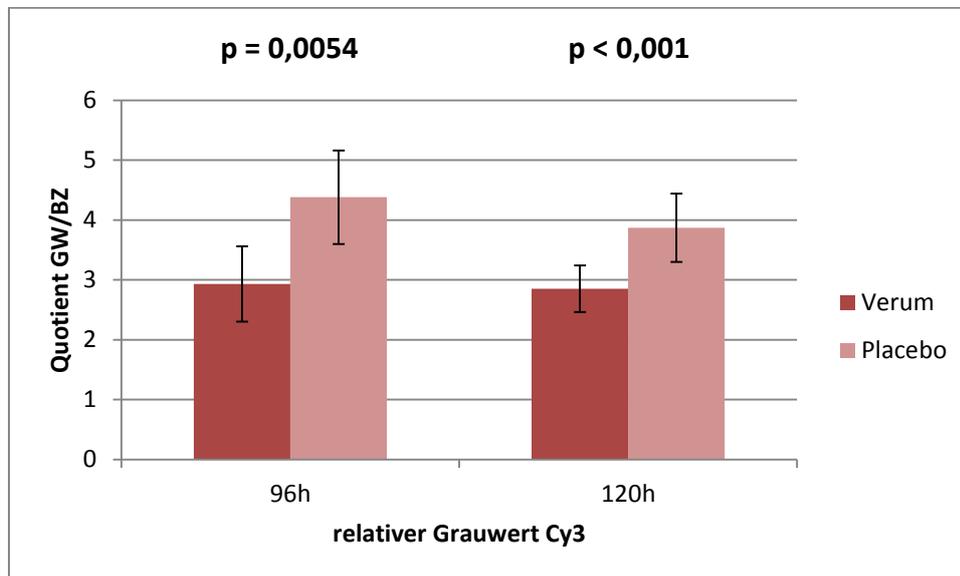


Abbildung 34: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h

Im Gegensatz zu den Ergebnissen auf Titan-Probekörpern lässt sich auf der Ticer®-Oberfläche eine Tendenz zu deutlich geringeren BSP-Anlagerungen bei den Verumbefeldeten Knochenzellen feststellen. Konkret ist nach 96 h eine Steigerung in der Placebo-Gruppe um 1,45 resp. 33 % sowie nach 120 h um 1,0 resp. 26 % nachzuvollziehen und statistisch hoch-signifikant gesichert.

4.1.3 TiWhite® (Duraplant® 2.2)

Tabelle 5: Durchschnittswerte der auf TiWhite® erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	50,5	2,08	6,46
Pk 2	57,2	3,07	5,15
Pk 3	55,5	2,94	6,38
Pk 4	42,8	1,94	7,33
Pk 5	75	2,65	2,42
Durchschnitt	56,20	2,54	5,55
Standardabw.	11,91	0,51	1,91
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	51,9	2,28	7,55
Pk 2	34,6	1,92	8,41
Pk 3	31,7	1,77	5,78
Pk 4	43,1	2,56	2,62
Pk 5	32,6	1,87	5,91
Durchschnitt	38,78	2,08	6,05
Standardabw.	8,61	0,33	2,22

Tabelle 6: Durchschnittswerte der auf TiWhite erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	33,3	1,67	3,99
Pk 2	11	1,5	2,12
Pk 3	67,7	2,14	6,95
Pk 4	51	2,13	4,61
Pk 5	50,2	1,56	5,78
Durchschnitt	42,64	1,80	4,69
Standardabw.	21,47	0,31	1,83
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Pk 1	44,6	2,15	4,78
Pk 2	44,1	1,71	4,18
Pk 3	40,4	1,6	5,24
Pk 4	38,3	1,6	4,84
Pk 5	40,3	1,75	5,04
Durchschnitt	41,54	1,76	4,82
Standardabw.	2,70	0,23	0,40

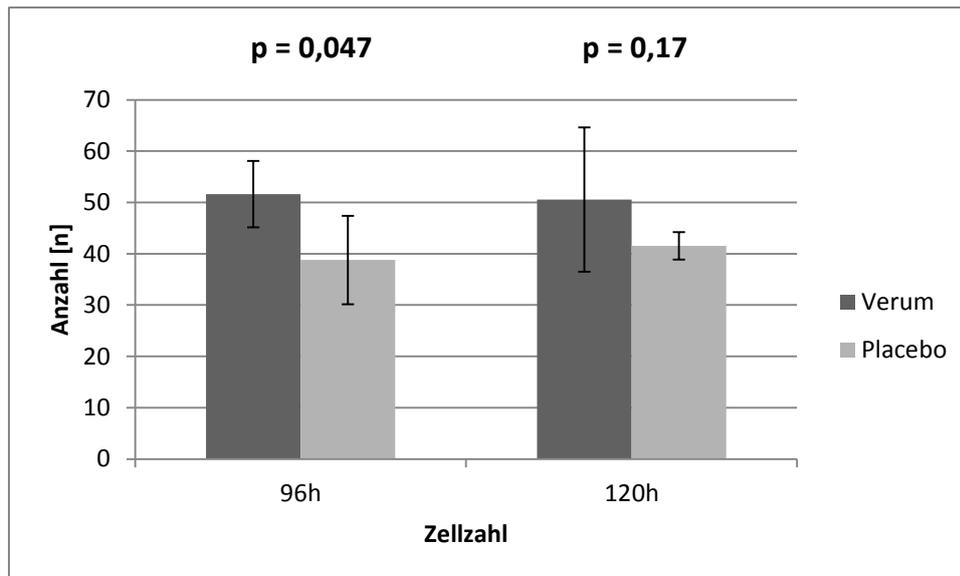


Abbildung 35: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Zellzahl (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h

Konträr zu den Beobachtungen auf der Ticer®-Oberfläche, aber analog zu Titan, wenn auch hier stärker ausgeprägt, ist eine erhöhte Zellzahl der Verum- verglichen mit den Placebo-befeldeten Knochenzellen festzustellen. So ist nach 96 h die Anzahl bei den tatsächlich befeldeten Zellen um durchschnittlich 13 resp. 25 % und nach 120 h um 9 resp. 18 % erhöht, wobei die erste Differenz statistisch signifikant, die zweite hingegen nicht signifikant zu werten ist.

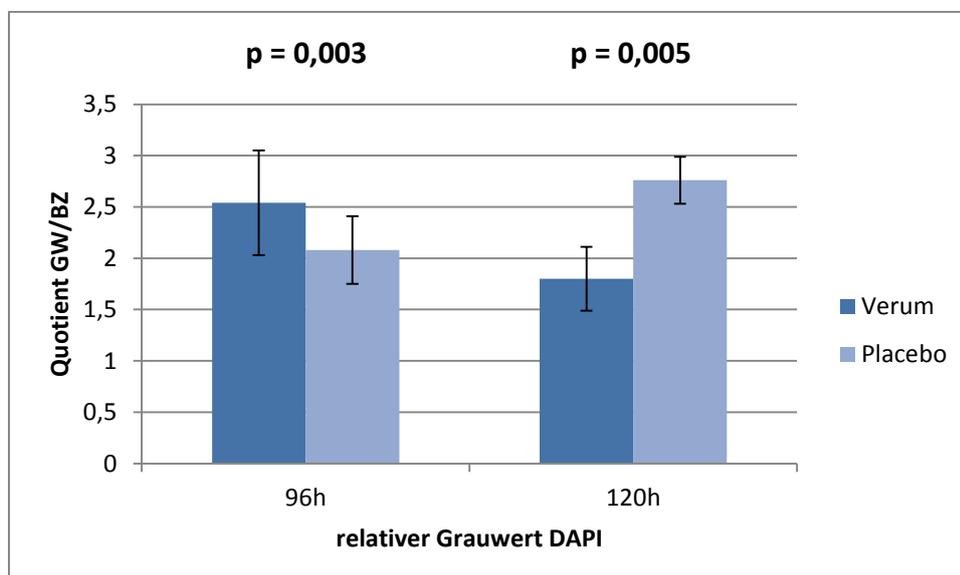


Abbildung 36: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h

Die bei der Anfärbung der Zellkerne auf TiWhite® erhobenen Daten sind ähnlich denen auf Ticer® erneut widersprüchlich. So ist nach 96 h bei den Verum-befeldeten Zellen ein erhöhter relativer Grauwert um 0,5 resp. 18 %, der zudem signifikant gesichert ist. Allerdings sind nach 24-stündiger Nachruhezeit die Werte der Placebo-Gruppe um 1,0 resp. 34 % erhöht. Dieser Unterschied ist eindeutig als signifikant zu betrachten.

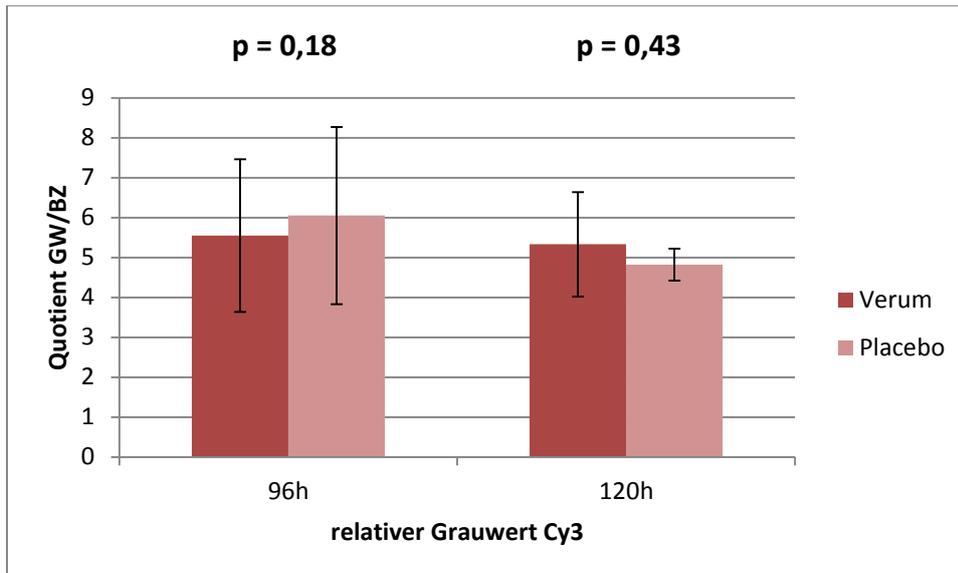


Abbildung 37: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung BSP-Expression (TRITC) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h

Eine gegenläufige, geringer differierende Relation zu den gefärbten Zellkernen zeigen die Werte der BSP-Expression. Hier ist nach 96 h bei den Placebo-befeldeten Zellen eine um 0,5 resp. 8 % gesteigerte BSP-Anlagerung nachvollziehbar, während nach 120 h die tatsächlich befeldeten Zellen eine um 0,5 resp. 10 % erhöhte Expression aufweisen. Beide Unterschiede sind dabei statistisch nicht signifikant.

4.2 Vergleich mit der Normalkultur

Um zu untersuchen, ob das Anbringen der Befeldungsapparatur Einfluss auf das Zellwachstum und die BSP-Expression nimmt, stellen die folgenden Säulendiagramme sowohl die Daten der tatsächlich befeldeten (Verum) und angeschlossenen, aber unbefeldeten (Placebo) als auch die nicht mit Befeldungsequipment versehenen (normal) Knochenzellen jeweils zu den Zeitpunkten 96 h und 120 h gegenüber.

4.2.1 Titan

Tabelle 7: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung verglichen mit der Normalkultur

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	104,66	2,87	2,52
Standardabw.	15,17	0,32	0,53
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	98,36	2,72	2,05
Standardabw.	16,38	0,49	0,28
normal	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	136,65	3,13	2,62
Standardabw.	12,04	0,54	0,43

Tabelle 8: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung verglichen mit der Normalkultur

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	131,58	2,64	2,61
Standardabw.	27,86	0,73	0,62
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	122,08	2,02	2,30
Standardabw.	26,09	0,21	0,29
normal	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	161,52	3,76	2,52
Standardabw.	30,95	0,83	0,42

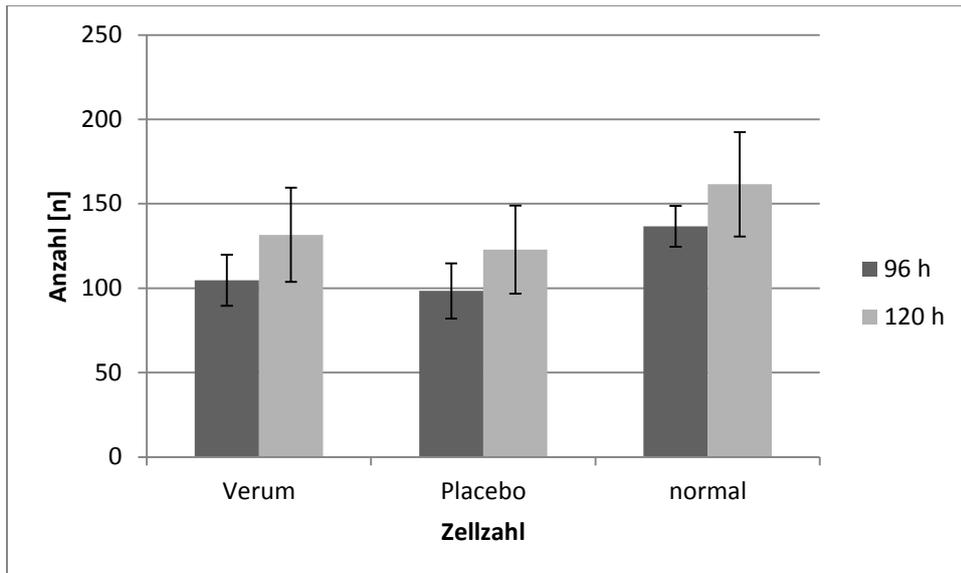


Abbildung 38: Vergleich Verum-Placebo-normal: Zellzahl (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h

Relativ zu den mit Befeldungsapparat versehenen Knochenzellen war die Zellzahl bei den unberührt wachsenden Knochenzellen durchschnittlich um 36 resp. 27 % nach 96 h und um 35 resp. 22 % nach 120 h erhöht.

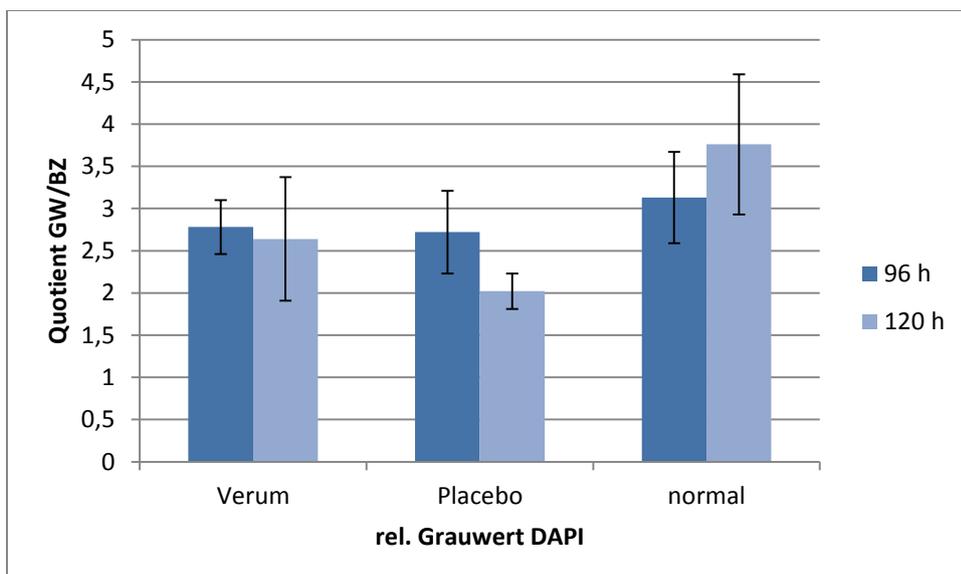


Abbildung 39: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h

Auch der Betrag der angefärbten Zellkerne war bei der Normalkultur im Durchschnitt um 0,3 resp. 11 % nach 96 h und um 1,4 resp. 38 % nach 120 h im Vergleich zu den Verum- und Placebo-befeldeten Zellen gesteigert.

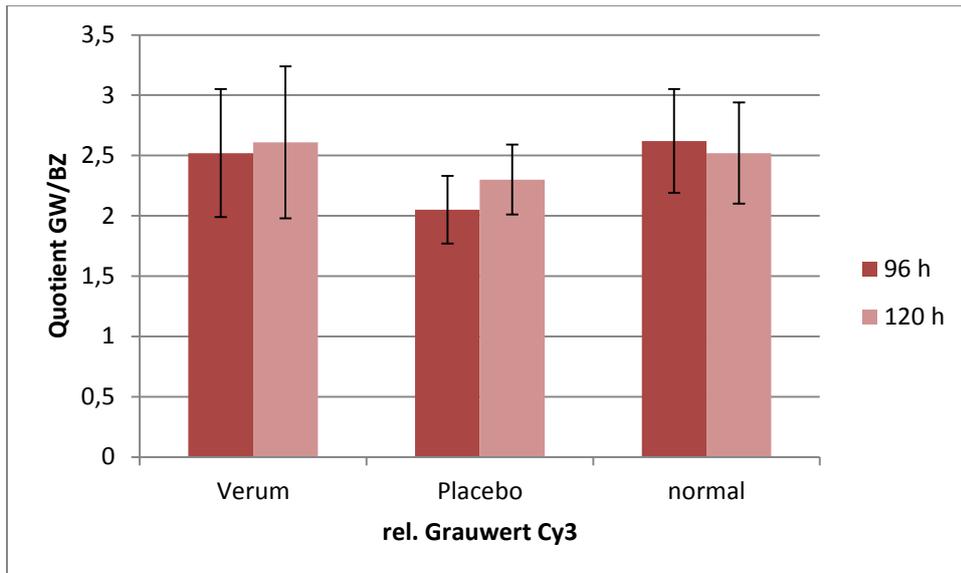


Abbildung 40: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Titan nach 96h bzw. 120h

Die Werte der quantitativen BSP-Bestimmung unterscheiden sich bei der Normalkultur nur minimal von denen der Verum-Gruppe. So sind sie nach 96 h um 0,1 resp. 4 % erhöht, nach 120 h hingegen um 0,2 resp. 3 % erniedrigt.

Verglichen mit den Daten der Placebo-Gruppe ist eine Steigerung nach 96 h um 0,6 resp. 22 % und nach 120 h um 0,2 resp. 9 % feststellbar.

4.2.2 Ticer®

Tabelle 9: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung verglichen mit der Normalkultur

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	65,01	1,39	2,93
Standardabw.	15,07	0,15	0,63
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	70,82	1,60	4,38
Standardabw.	14,27	0,28	0,78
normal	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	76,46	2,02	4,47
Standardabw.	27,43	0,42	0,87

Tabelle 10: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung verglichen mit der Normalkultur

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	56,70	1,42	2,85
Standardabw.	10,37	0,08	0,39
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	92,72	1,29	3,87
Standardabw.	29,85	0,21	0,57
normal	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	68,06	2,02	5,37
Standardabw.	23,05	0,48	1,57

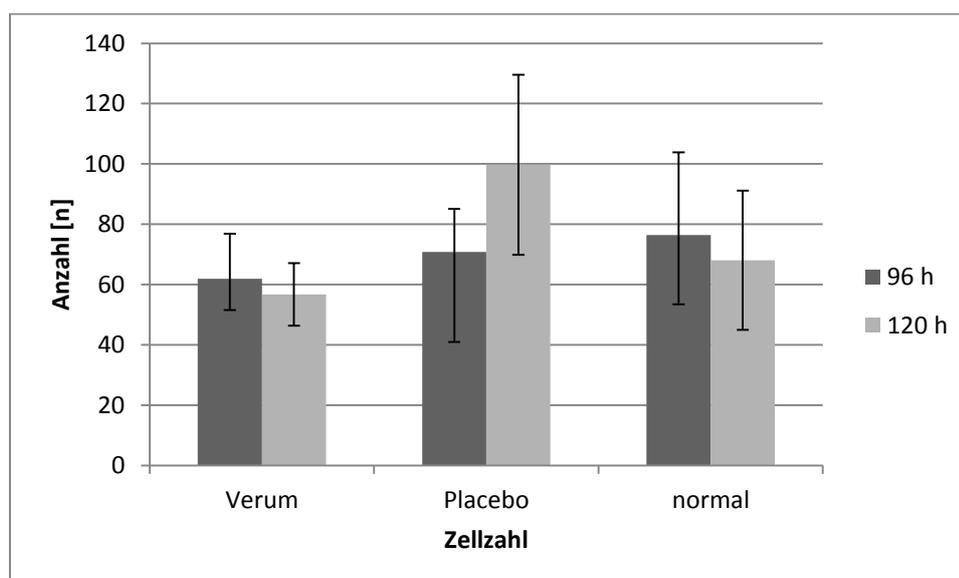


Abbildung 41: Vergleich Verum-Placebo-normal: Zellzahl (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h

Der Vergleich der Zellzahlen zwischen Verum-, Placebo- und Normalkultur-Gruppe ist konträr. Während die ohne Befeldungsequipment untersuchten Zellen verglichen mit den tatsächlich befeldeten Zellen durchschnittlich eine Steigerung nach 96 h um 11 resp. 14 % und nach 120 h um 11 resp. 16 % aufweisen, sind die Werte relativ zur Placebo-Gruppe nach 96 h um 5 resp. 7 % erhöht, nach 120 h hingegen um 25 resp. 27 % erniedrigt.

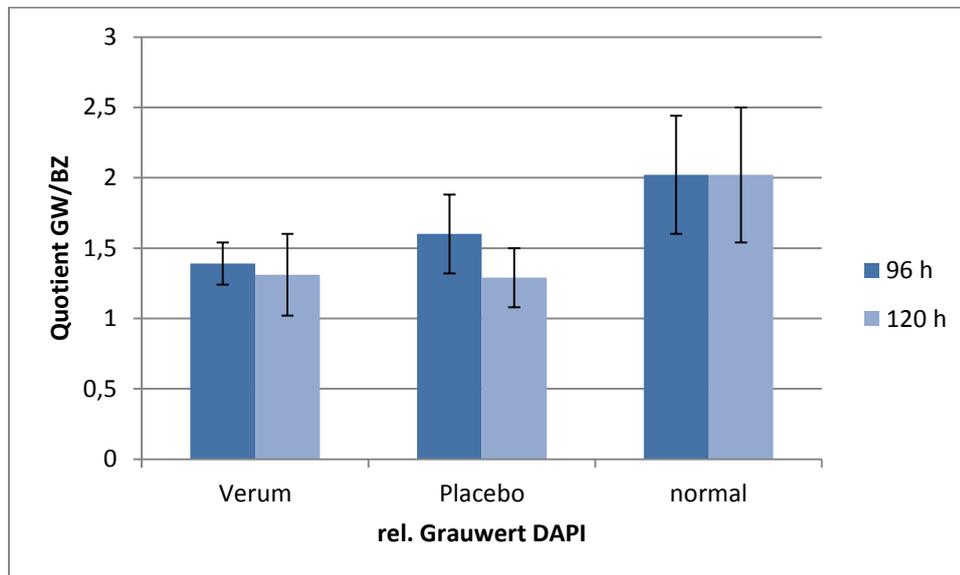


Abbildung 42: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h

Die Werte der quantitativen Zellkern-Anfärbung sind bei der Normalkultur-Gruppe verglichen mit denen der Verum- und Placebo-Befeldung im Durchschnitt nach 96 h um 0,5 resp. 25 % sowie nach 120 h um 0,7 resp. 33 % erhöht.

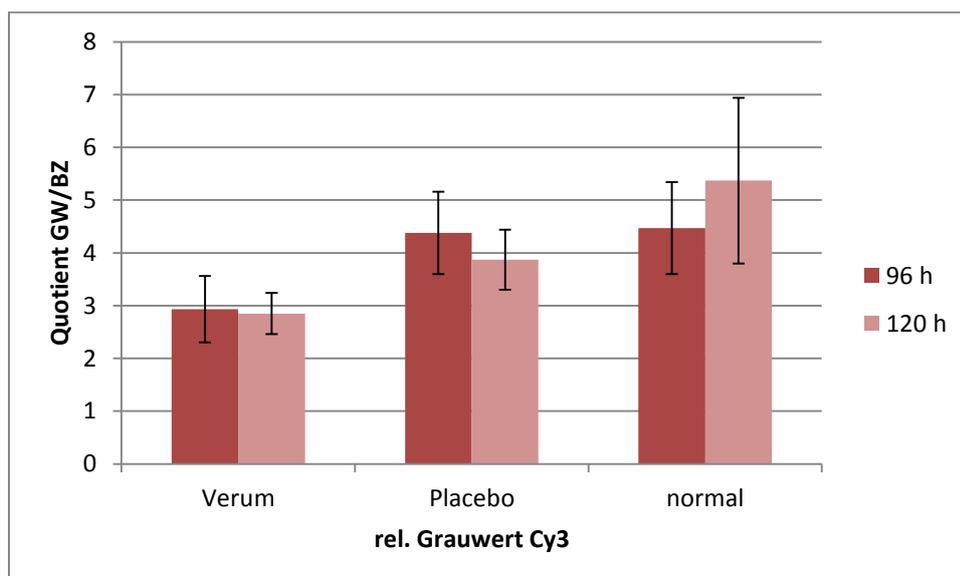


Abbildung 43: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h

Relativ zu den bei den Verum- und Placebo-befeldeten Zellen erhobenen Werten ist die BSP-Anheftung bei der Normalkultur durchschnittlich um 0,8 resp. 18 % nach 96 h und um 2,0 resp. 37 % erhöht.

4.2.3 TiWhite® (Duraplast2.2®)

Tabelle 11: Durchschnittswerte der auf TiWhite erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung verglichen mit der Normalkultur

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	51,50	2,54	5,55
Standardabw.	6,46	0,51	1,91
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	38,78	2,08	6,05
Standardabw.	8,61	0,33	2,22
normal	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	40,90	1,58	7,61
Standardabw.	10,88	0,33	1,50

Tabelle 12: Durchschnittswerte der auf TiWhite® erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung verglichen mit der Normalkultur

Verum	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	50,55	1,80	5,33
Standardabw.	14,05	0,31	1,31
Placebo	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	41,54	1,76	4,82
Standardabw.	2,70	0,23	0,40
normal	Zellanzahl	rel. GW DAPI	rel. GW Cy3
Durchschnitt	43,04	1,67	8,36
Standardabw.	15,86	0,40	1,57

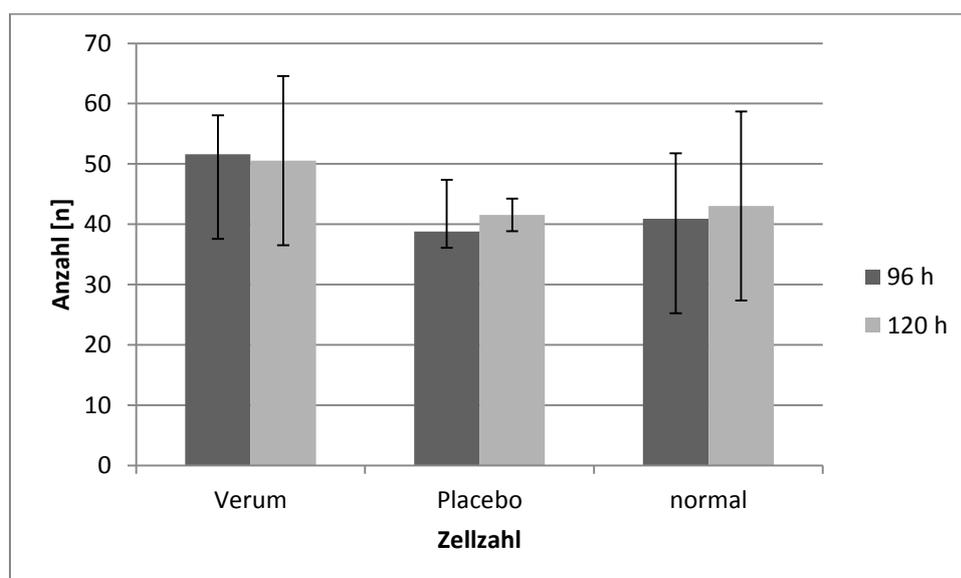


Abbildung 44: Vergleich Verum-Placebo-normal: Zellzahl (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h

Zum einen ist die Zellzahl der Normalkultur gegenüber den tatsächlich befeldeten Zellen nach 96 h um 11 resp. 21 % und nach 120 h um 8 resp. 16 % erniedrigt, zum anderen gegenüber den Placebo-befeldeten Zellen nach 96 h um 2 resp. 5 % und nach 120 h um 1 resp. 2 % minimal erhöht.

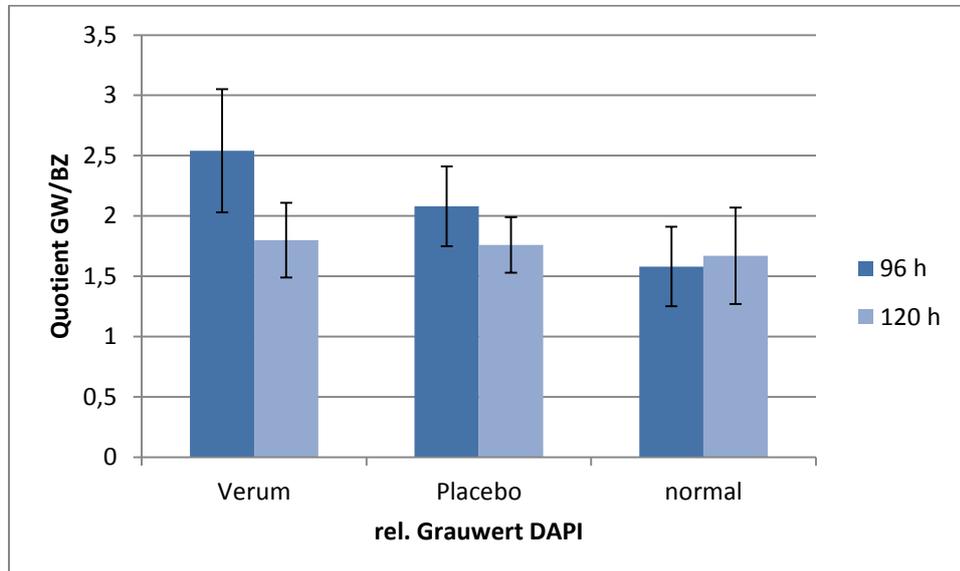


Abbildung 45: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h

Die Daten der fluoreszenzmarkierten Zellkerne sind bei der Normalkultur relativ zu den Verum- und Placebo-befeldeten Zellen durchschnittlich um 0,8 resp. 33 % nach 96 h sowie um 0,1 resp. 6 % nach 120 h erniedrigt.

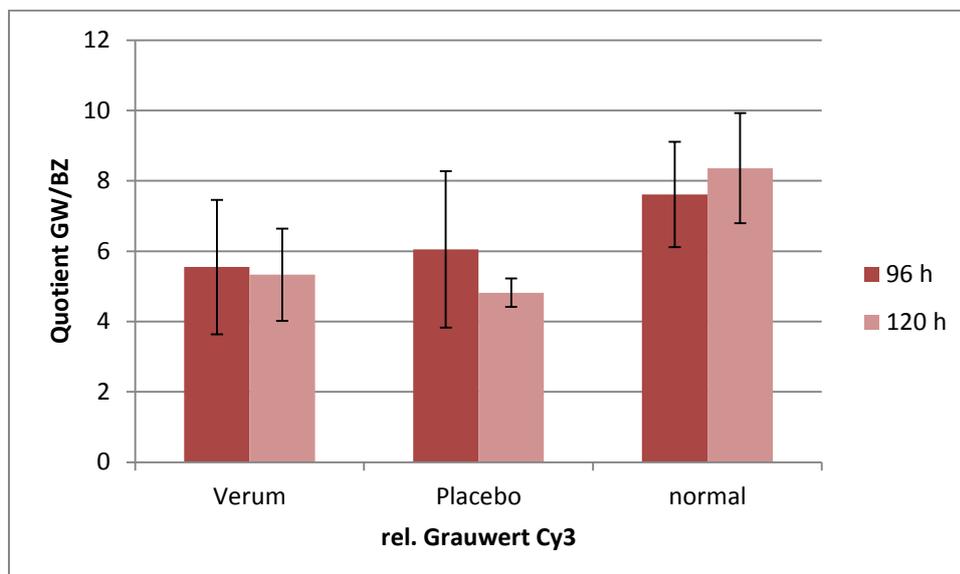


Abbildung 46: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h

Die Werte der quantitativen BSP-Messung liegen bei der Normalkultur-Gruppe im Durchschnitt nach 96 h um 1,8 resp. 24 % und nach 120 h um 3,2 resp. 38 % höher als bei der Verum- bzw. Placebo-Gruppe.

5. Interpretation und Diskussion

5.1 Direkter Vergleich Verum- und Placebo-Befeldung

5.1.1 Titan

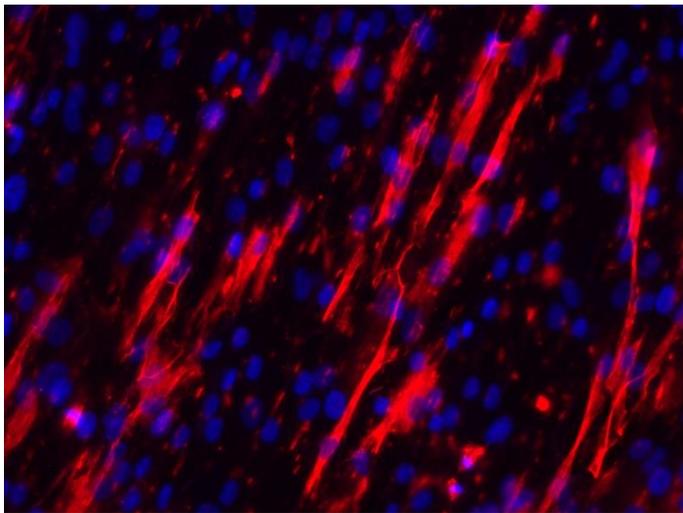


Abbildung 47: Summationsbild der Zellkerne (blau/DAPI) und BSP-Expression (rot/TRITC) auf Titan; 200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Die Untersuchungen der Feldwirkung auf die auf Titan kultivierten Knochenzellen lassen eindeutig darauf schließen, dass die Stimulation mit gepulsten elektrischen Feldern positiven Einfluss auf den Knochenstoffwechsel nimmt.

So ist zum einen die Anzahl gezählter Zellen verglichen mit der unstimulierten Kultur nach 96-stündiger Befeldung bereits leicht und nach weiteren 24 h Nachruhezeit merklich erhöht. Es kann demnach begründet vermutet werden, dass nach einer längeren Stimulationsdauer, wie sie in der praktischen Anwendung vorgesehen ist, eine deutlich gesteigerte Zellzahl auf befeldeten Titanoberflächen zu verzeichnen sein wird.

Analog zeigt die fluoreszenzoptische Flächenbestimmung der Zellkerne ohne Nachruhe einen dezenten Vorteil der befeldeten gegenüber den unbefeldeten Zellen, der nach weiteren 24 h noch stärker ausgeprägt und zudem hoch-signifikant ist.

Darüber hinaus kommt auch die quantitative Analyse des Bone Sialoproteins zu dem hoch-signifikanten Ergebnis, dass die stimulierten Knochenzellen wesentlich mehr dieses Knochenstoffwechselfparameters exprimieren als die unstimulierten. In vivo ist folglich mit einer erhöhten Knochenneubildungsrate und beschleunigten Mineralisation des de novo formatierten Gewebes zu rechnen.

Resultierend konnte im Rahmen der vorliegenden Versuchsreihe der Nachweis für eine gesteigerte Zellproliferation und BSP-Expression erbracht werden, sodass der Stimulation von humanen Knochenzellen auf Titanoberflächen mit gepulsten elektrischen Feldern ein begünstigender Effekt auf die Osteogenese zugeschrieben wird.

5.1.2 Ticer®

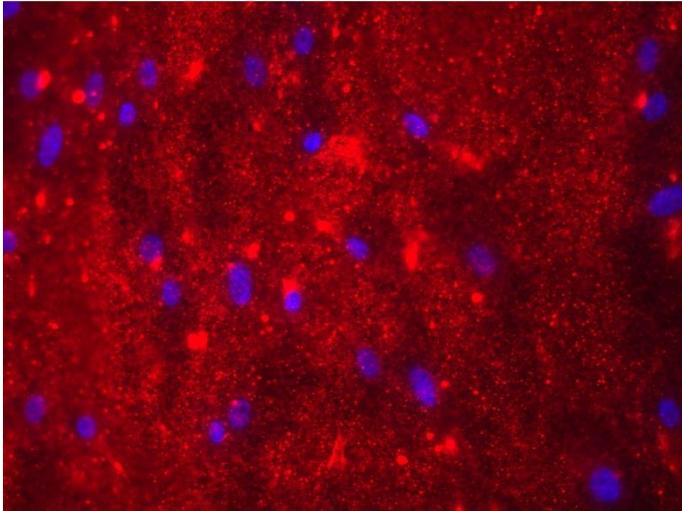


Abbildung 48: Summationsbild der Zellkerne (blau/DAPI) und BSP-Expression (rot/TRITC) auf Ticer®; 200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Die Zellzählung ergab bei Untersuchung der Ticer®-Oberfläche eine nach 96 h deutliche, nach 120 h signifikante Erhöhung der Placebo- in Relation zur Verum-Gruppe. Im Umkehrschluss liegt die Vermutung nahe, dass durch die Feldwirkung entweder direkt die Zellteilung beeinträchtigt wurde oder dass z.B. durch Veränderung der elektrochemischen Oberflächeneigenschaften die Anheftung der Knochenzellen auf der Ticer®-Oberfläche gestört war.

Betrachtet man hingegen die farbstoffquantifizierte Fläche der Zellkerne, differieren die Ergebnisse zu den definierten Zeitpunkten. So sind die relativen Grauwerte nach 96 h bei den befeldeten Zellen verglichen mit den unbefeldeten zunächst erniedrigt, während sie nach 120 h erhöht sind, wobei beide Unterschiede nicht signifikant sind.

Auffällig ist, dass nach 120 h die absolute Zellzahl bei den unbefeldeten Zellen höher ist als bei den befeldeten, wohingegen der relative Grauwert niedriger ist. Eine mögliche Erklärung für die Diversität dieser Daten könnte in der Zytomorphologie begründet liegen. Einerseits kann die Zellgröße geringer sein, was sich in einem kleineren Zellkerndurchmesser widerspiegelt, andererseits kann die Zelle ähnlich groß, aber das Zytoplasma weniger dicht sein, wobei auch eine Kombination beider Varianten denkbar ist. Eine Überprüfung dieses Erklärungsansatzes war anhand der zur Verfügung stehenden Arbeitsmaterialien und -methoden nicht möglich.

Die Ergebnisse der BSP-Bestimmung ähneln auf der Ticer®-Oberfläche denen der Zellzahl und sind sowohl nach 96 h als auch nach 120 h bei den unstimulierten Zellen deutlich und hoch-signifikant gegenüber den stimulierten Zellen gesteigert. Sicher ist, dass auf den befeldeten Probekörpern weniger Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen werden konnte, wobei nicht differenziert werden kann, ob von den Knochenzellen weniger Protein sezerniert wurde oder ob die Anheftung auf der Oberfläche gestört war.

Es bleibt festzuhalten, dass die Elektrostimulation von Knochenzellen auf Ticer® einen negativen Einfluss sowohl auf das Zellwachstum als auch auf den Knochenmetabolismus ausübt.

5.1.3 TiWhite® (Duraplant 2.2®)

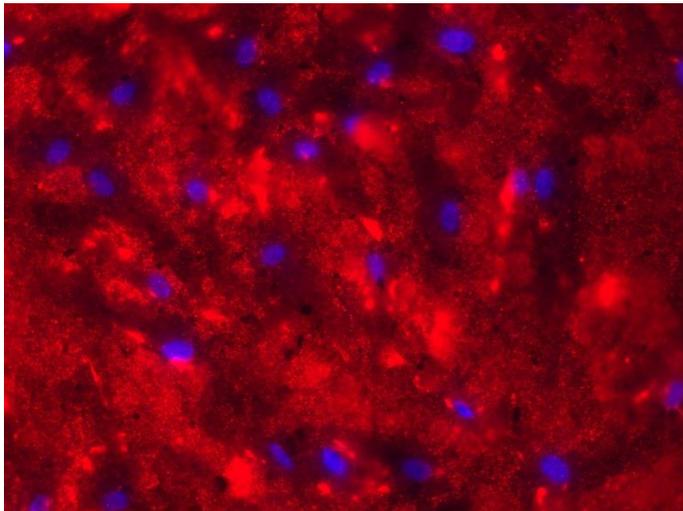


Abbildung 49: Summationsbild der Zellkerne (blau/DAPI) und BSP-Expression (rot/TRITC) auf TiWhite®; 200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Die auf der TiWhite®-Oberfläche bestimmten Zellzahlen waren bei der stimulierten Zellkultur relativ zur unstimulierten drastisch erhöht, wobei der Unterschied zum einen nach 96 h größer ist als nach 120 h und zum anderen statistisch hoch-signifikant gesichert ist.

Generell ist in Gegenüberstellung mit den auf Titan und Ticer® ermittelten Parametern erstmals ein leichtes Absinken der Zellzahl nach 120 h feststellbar, das allerdings einzig bei der Verum-Kultur auftritt und somit als Resultat der Elektrostimulation, nicht des Oberflächenmaterials zu betrachten ist.

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Zellkerne ist der relative Grauwert analog den Zellzahlen nach 96 h bei den unbefeldeten Zellen in Bezug auf die befeldeten erhöht. Gegensätzliche Ergebnisse finden sich nach 120 h; hier ist die Zellzahl in der Placebo-Gruppe erhöht, der relative Grauwert hingegen erniedrigt. Scheinbar sind die Knochenzellen nach Stimulation zwar quantitativ mehr, aber morphologisch kleiner oder von weniger dichtem Zytoplasma durchsetzt.

Durch Anfärbung der BSP-Expression zeigt sich, dass die unbefeldeten Knochenzellen verglichen mit den tatsächlich befeldeten Zellen nach 96 h geringfügig mehr Protein aufweisen. Dieser Unterschied ist nach 120 h nahezu nivelliert und darüber hinaus in beiden Fällen nicht signifikant. Ob sich die Effekte aufheben oder nach längerer Versuchsdauer sogar zugunsten der stimulierten Kultur weiterentwickeln würden, ist von hypothetischer Natur.

Entgegen der recht eindeutigen, wenngleich konträren Aussagen der auf Titan und Ticer® erhobenen Daten suggerieren die absoluten Zellzahlen auf TiWhite® eine Überlegenheit der stimulierten Zellen, während die Bestimmung der relativen Grauwerte sowohl die Zellkerne als auch BSP betreffend inhomogene Ergebnisse lieferte.

Um eine konkrete Überlegenheit einer Gruppe gegenüber der jeweils anderen konstatieren zu können, sind offenbar weitere Untersuchungen über einen längeren Versuchszeitraum unabdingbar.

5.2 Vergleich mit der Normalkultur

1. Titan

Die Untersuchungen auf Titan ergaben im Vergleich der Verum- und Placebo-Kulturen mit der völlig unberührt wachsenden Normalkultur einen um etwa ein Drittel höheren Betrag sowohl an absolut gezählten Zellen als auch an relativen Grauwerten der Zellkernfärbung. Dies lässt den Rückschluss auf einen schädigenden Einfluss der Befeldungsapparatur zu, wobei dieser zum einen während der Applikation des Equipments mit anschließender Inbetriebnahme und zum anderen nach Versuchsdurchführung bei der Demontierung auftreten kann. Auch eine Überlagerung beider Effekte ist denkbar.

Bei der Bestimmung der relativen Grauwerte der BSP-Expression ähneln die Werte der Normalkultur sehr denen der Verum-Gruppe; eine Beeinträchtigung der Proteinsynthese oder -anheftung durch die Befeldungsmimik ist somit nahezu ausgeschlossen.

2. Ticer®

Auf der Ticer®-Oberfläche wurden bei der Normalkultur durchschnittlich etwas mehr Zellen als bei der Verum-Gruppe und etwas weniger Zellen als in der Placebo-Gruppe gezählt. Eine Störung der Zellproliferation durch Anbringen der Befeldungsapparatur ist somit unwahrscheinlich.

Bei der Betrachtung der nach Zellkernfärbung ermittelten relativen Grauwerte fällt allerdings auf, dass die Werte der ohne verglichen mit den mit Befeldungsapparatur kultivierten Zellen um mehr als ein Viertel gesteigert ist. Es ist demnach denkbar, dass durch die Installation des Equipments die Zellzahl unbeeinflusst, die Morphologie jedoch im Sinne kleinerer oder weniger Zytoplasma enthaltender Zellen gestört ist.

Die relativen Grauwerte der BSP-Bestimmung sind in der Normalkultur generell höher als in der Verum-Gruppe, während sie verglichen mit der Placebo-Kultur nach 96 h nahezu identisch und nach 120 h deutlich erhöht sind. Die Frage, ob die BSP-Sezernierung durch Montage des Befeldungsapparates negativ beeinflusst wird, kann folglich nur nach Analyse einer zeitlich extendierten Versuchsdauer eindeutig beantwortet werden.

3. TiWhite®

Betrachtet man die Ergebnisse auf der TiWhite®-Oberfläche, so liegen bei der Normalkultur sowohl die Zellzahlen als auch die relativen Grauwerte deutlich unter denen der Verum-Gruppe und leicht unter denen der Placebo-Gruppe, wodurch eine Beeinträchtigung des Zellwachstums durch das Stimulationsgerät ausgeschlossen werden kann.

Gegensätzliches ist bei den relativen Grauwerten der BSP-Färbung festzustellen; hier sind die Werte der Normalkultur relativ zur Verum- und Placebo-Gruppe zu beiden Zeitpunkten deutlich erhöht, was als störender Einfluss des Befeldungsequipments auf die Proteinbildung und -absonderung interpretiert werden kann.

5.3 Potenzielle Fehlerquellen

Beeinträchtigung der Zell- und BSP-Anheftung durch die Befeldungsapparatur

Sowohl der Vergleich der Verum- und Placebo-Daten mit denen der Normalkultur als auch die während der Versuchszeit erworbenen Eindrücke lassen vermuten, dass das Anbringen und vor allem das Entfernen der elektrotechnischen Materialien die Versuchsergebnisse beeinflussen. Während der Versuchszeit mussten die Probekörper mehrmals umgesetzt werden und es ist trotz größter Vorsicht nicht auszuschließen, dass dadurch Zellen und BSP-Partikel beschädigt oder von der Oberfläche gelöst wurden.

Um diese Problematik zukünftig umgehen zu können, ist die Verwendung spezieller Chamber Slides ratsam, die gleichzeitig als Objektträger fungieren und so unnötige Manipulationen am Probenmaterial vermeiden.

Abbildung 50 zeigt am Beispiel eines befeldeten Ticer[®]-Probekörpers eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung, die lediglich im Zentrum ausreichend scharf ist, während die Konturen im Randbereich deutlich weniger scharf sind. Verursacht wurde dies durch einen unter dem Probekörper befindlichen Drahtrest, welcher in Folge des Abtrennens der Kabel mit Hilfe eines Seitenschneiders zum Versuchsende verblieben ist. Dieses Drahtende hätte nicht weiter gekürzt werden können ohne eine Schädigung der Zellen zu riskieren und wurde folglich toleriert, erschwerte aber eine plane Auflage des Probekörpers auf dem Objektträger und schließlich auch eine präzise fluoreszenzoptische Erhebung der Grauwerte von Zellen und BSP-Molekülen.

Zur Optimierung des Versuchsansatzes hinsichtlich künftiger Studien werden weitere Modifikationen der Befeldungsapparatur notwendig sein, die in Zusammenarbeit mit dem Application Center Microcontroller der Hochschule Mittweida konzipiert und umgesetzt werden können.

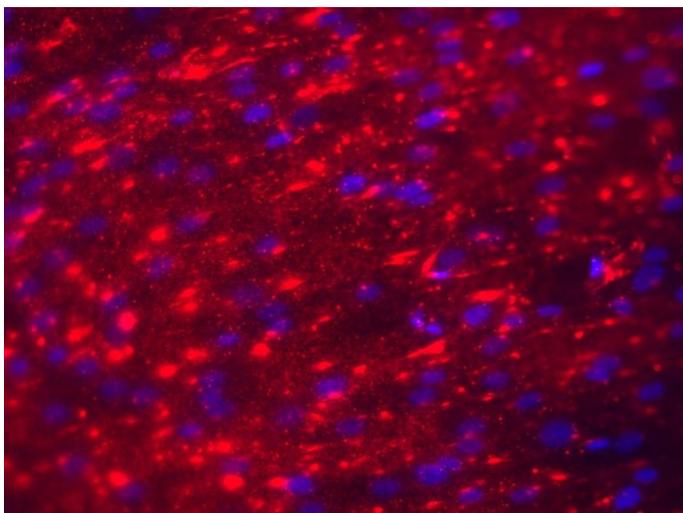


Abbildung 50: Unscharfes Messfeld aufgrund von Oberflächenunebenheiten (Bsp. Ticer[®]-Probekörper); 200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Einfluss der Oberflächentopografie auf das Zellwachstum und die BSP-Expression

Bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung der untersuchten Materialien lassen sich wesentliche Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit feststellen, wobei stark zu vermuten ist, dass diese gravierenden Einfluss auf die Zellansiedlung zum einen und die BSP-Expression zum anderen nehmen.

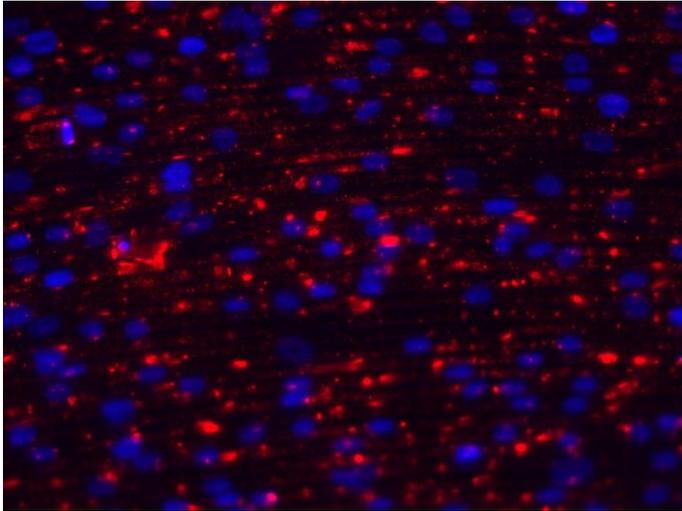


Abbildung 51: Summationsbild der charakteristischen Rillenstruktur von Titan;
200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Kommerziell reines Titan (cpT) kann anhand der durch Werkzeugspuren während der Maschinenbearbeitung entstandenen Rillen topografisch leicht von Ticer[®] und TiWhite[®] unterschieden werden. Da im vorliegenden Versuch kreisrunde Prüfkörper verwendet wurden, ähnelt die mikroskopische Struktur der einer Schallplatte und zeigt eine konzentrische Anordnung von Erhebungen und Vertiefungen, wobei der Eindruck entsteht, sowohl die blau angefärbten Knochenzellen als auch die rot angefärbten Moleküle des Bone Sialoprotein konzentrierten sich hauptsächlich in den Tiefen des Reliefs.

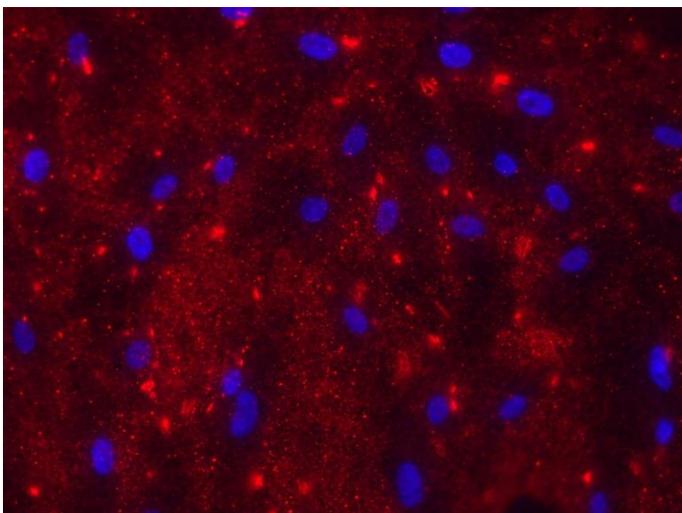


Abbildung 52: Summationsbild der feinporigen Struktur von Ticer[®];
200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Typisch für die Ticer®-Oberfläche sind die unregelmäßig verteilten und in ihrer Größe variierenden Poren, die in der Folge der elektrochemischen Oberflächenmodifikation zustande gekommen sind. Der Schwerkraft folgend lagert sich Bone Sialoprotein offensichtlich vermehrt in den Tiefen der Poren ab, wobei der Betrag kumulierter BSP-Moleküle scheinbar direkt proportional zur jeweiligen Porengröße ist.

Ein Zusammenhang zwischen Oberflächenbeschaffenheit und Zellwachstum konnte auf Ticer® hingegen nicht festgestellt werden.

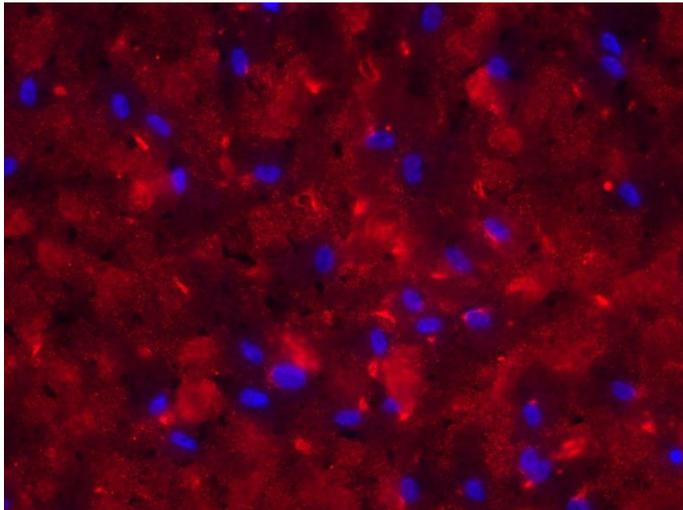


Abbildung 53: Summationsbild der knopfartigen Schollenstruktur von TiWhite®; 200-fache Vergr.; Axiophot (Carl Zeiss Jena)

Analog zu dem sich ähnelnden Herstellungsprozess ist die TiWhite®-Oberfläche topografisch vergleichbar mit der Ticer®-Oberfläche. Auch hier lagert sich in den Poren deutlich mehr BSP ab als auf den knopfartig aufgeworfenen Erhebungen und die Zellbesiedelung scheint von der Materialstruktur unbeeinflusst zu sein.

Wollte man Zellwachstum und BSP-Anlagerung isoliert ohne den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit analysieren, ist es denkbar, vor den fluoreszenzmikroskopischen Messungen eine Leerwertaufnahme der jeweiligen Oberfläche zu erstellen und die so ermittelten Grauwerte von den anschließend erhobenen Daten zu subtrahieren.

Diese Vorgehensweise ist allerdings mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln derzeit nicht realisierbar.

Einfluss elektrochemischer Oberflächencharakteristika auf die Feldausprägung

Zur Untersuchung, welcher Betrag des innerhalb des Mikrostimulationsabutments generierten, gepulsten elektrischen Feldes tatsächlich den umgebenden Alveolarknochen erreicht und dort wirksam werden kann, wurden vom Application Center Microcontroller der Hochschule Mittweida sowohl Simulationen als auch reale Messungen des Feldstärkeverlaufes in einer potentialresistenten Messkammer mit Implantaten aus Titan, Ticer® und TiWhite® durchgeführt.

Die nachfolgenden Abbildungen illustrieren den unterschiedlichen Feldstärkeverlauf der drei untersuchten Oberflächen, wobei auffällt, dass die Ergebnisse der Messungen an Ticer® und TiWhite® nahezu identisch sind, während sich beide drastisch von dem auf Titan gemessenen Resultat unterscheiden. So liegen einerseits die Spitzenwerte der Feldstärke E mit ca. 300 V/m deutlich über denen der Vergleichsmaterialien; zum anderen ist die Reichweite der Feldwirkung an der Implantat-Abutment-Schnittstelle in vertikaler und horizontaler Dimension größer.

Diese Unterschiede resultieren aus der Tatsache, dass die im Zuge der Anodischen Oxidation unter Funkenentladung erzeugte Beschichtung auf Ticer® und TiWhite® ein zusätzliches Dielektrikum im System darstellt und daraus folgend die Ausprägung des elektrostatischen Feldes durch die Beschichtung stärker blockiert wird als dies bei Titan der Fall ist.

In der Konsequenz liegt der Verdacht nahe, dass auch bei der hier vorliegenden Versuchsanordnung die elektrochemisch modifizierten Oberflächen Ticer® und TiWhite® verglichen mit Titan einen minder ausgeprägten Feldstärkeverlauf auf den jeweiligen Probekörpern aufweisen, wodurch die wesentlich besseren Ergebnisse der auf Titan erhobenen Messungen erklärt werden können.

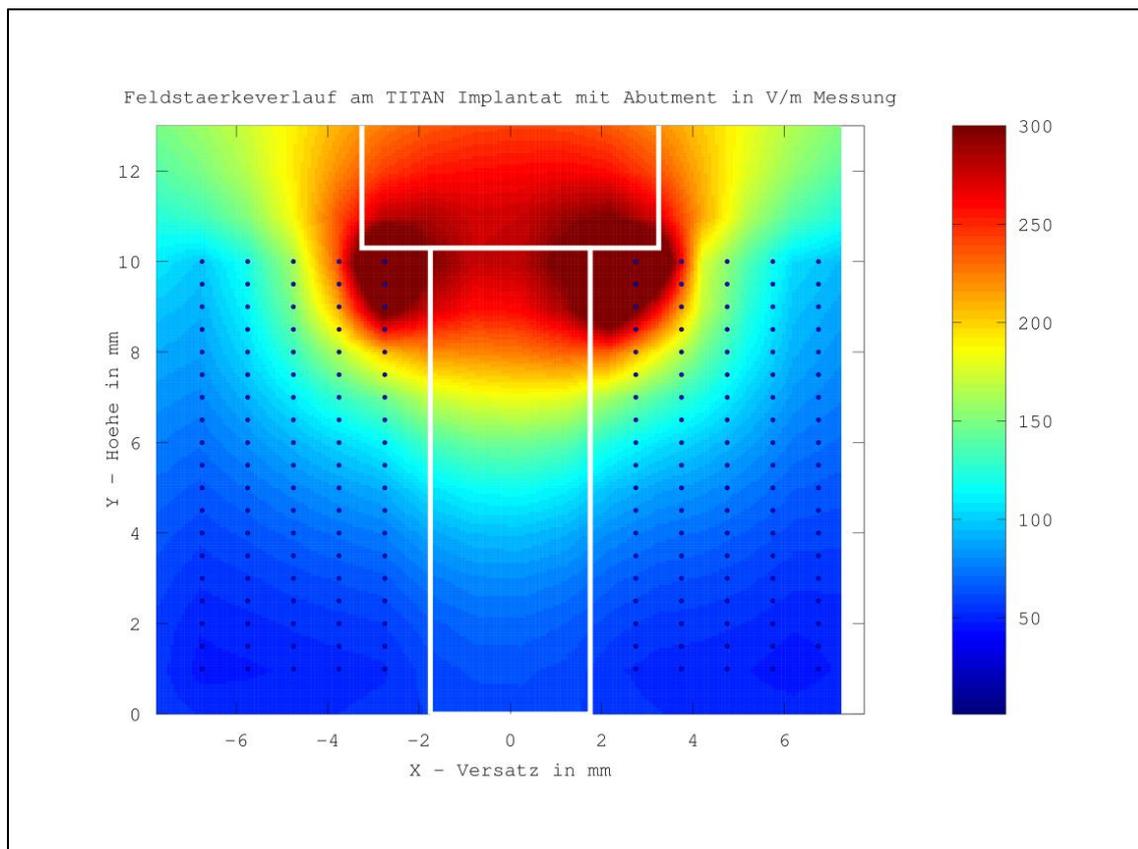


Abbildung 54: Feldstärkeverlauf am Titan-Implantat mit Abutment

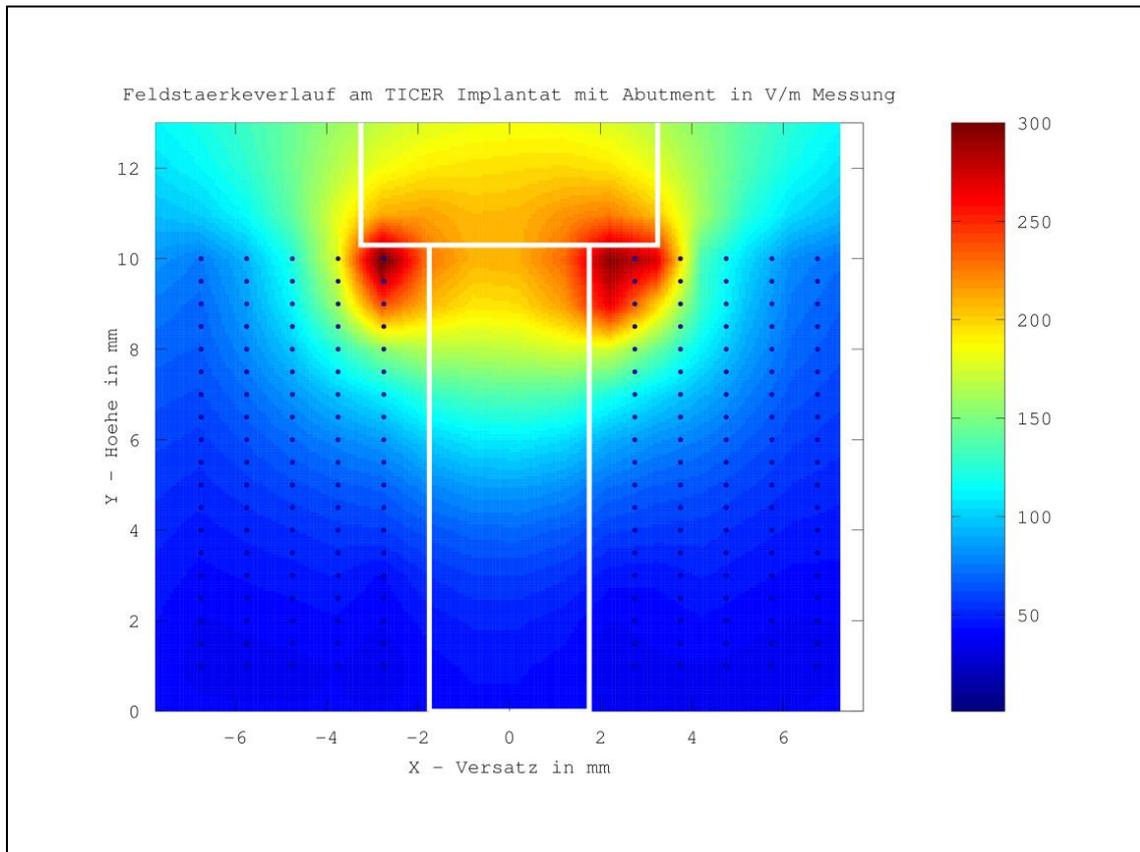


Abbildung 55: Feldstärkeverlauf am Ticer®-Implantat mit Abutment

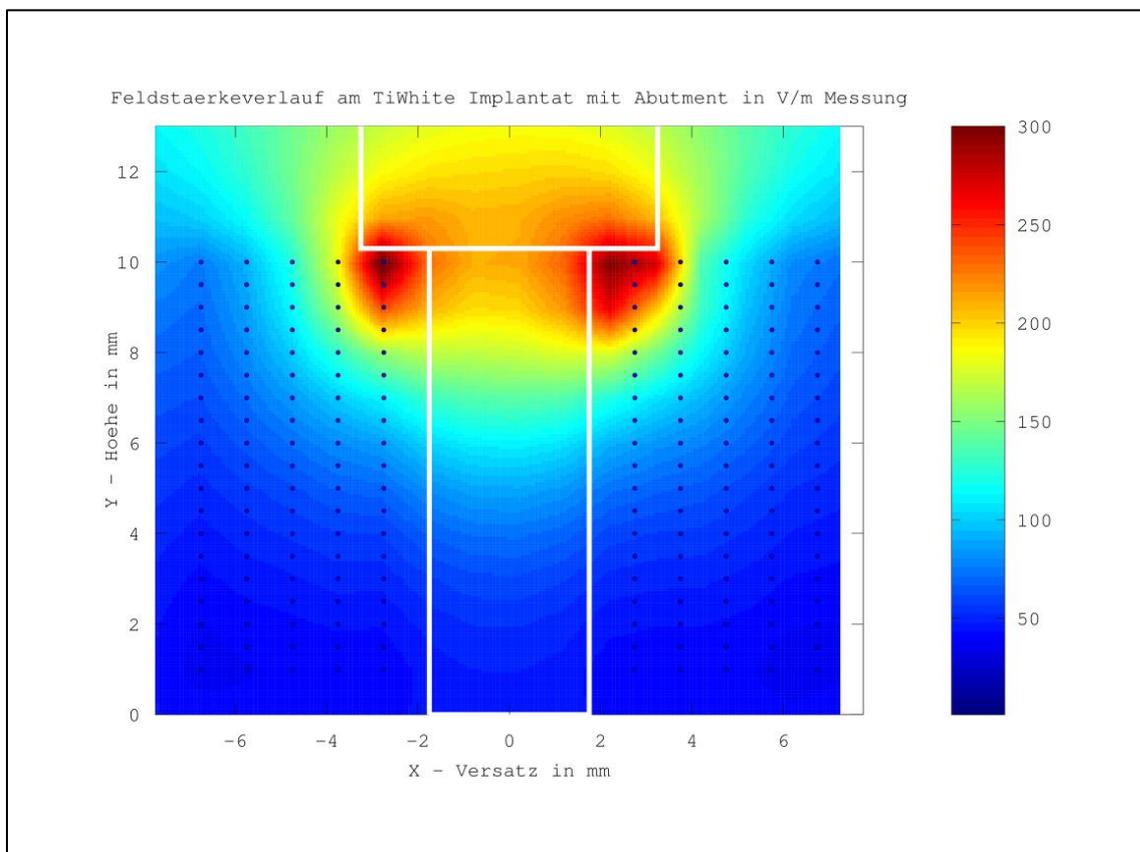


Abbildung 56: Feldstärkeverlauf am TiWhite®-Implantat mit Abutment

Auswahl der Stimulationsparameter und Versuchsdauer

Gleich zu Beginn der Forschungsarbeit erwies sich die Orientierung der festzulegenden Parameter an den bisher veröffentlichten Studien als komplex, da durch die umfangreiche Literaturanalyse ein außerordentlich breites Spektrum an Werten zur Verfügung stand, die zum Teil erheblich differieren. Aus diesem Grund wurden durch Tierversuche und an Knochen chondraler Ossifikation (Oberschenkel, Knie etc.) erhobene Daten ausgeschlossen und ausschließlich die vereinzelt publizierten Publikationen in die Auswahl einbezogen, die die spezielle Situation von Kieferknochenzellen untersuchen.

Da es sich bei dem durchgeführten Versuch um eine Grundlagenstudie handelt, ist der Beobachtungszeitraum mit 120 h vergleichsweise klein gewählt worden. Zudem kann trotz intensiver Literaturrecherche nicht eindeutig konstatiert werden, welche Phase des Zellzyklus durch die Elektrostimulation beeinflusst wird.

Anhand zytometrischer Analysen konnten Rosenberg et al. 2012 nachweisen, dass die Stimulation osteoblastenähnlicher Zellen mit elektromagnetischen Feldern die Zellproportionen in der G1-Phase, ergo dem Zeitraum zwischen Kernteilung und DNA-Synthese, signifikant steigern konnten. Darüber hinaus war der Anteil nekrotischer und apoptotischer Zellen deutlich geringer als in der Vergleichskultur. Die Autoren schließen daraus die Hypothese, der Zellzyklus der Osteoblasten werde durch das Anlegen elektromagnetischer Felder beeinflusst (Rosenberg et al. 2012, Nahum et al. 2012).

Auch variierten die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte teilweise nach 96- bzw. 120-stündiger Beobachtung, so zum Beispiel bei der Zellkernanfärbung auf Ticer®.

Um die Fragestellung der Feldwirkung auf Knochenzellen des Unterkiefers präzise auswerten zu können, bedarf es weiterführender Untersuchungen, im Rahmen derer über einen Zeitraum von mindestens mehreren Tagen bis Wochen bestenfalls verschiedene Werte der jeweiligen Parameter bestimmt werden und so ein optimaler Bereich der Befeldung definiert werden kann.

5.4 Vergleich mit der Literatur

Der Anteil von Publikationen über elektrostimulative Verfahren in der Zahnärztlichen Implantologie am gesamten das Thema „Elektrostimulation“ betreffenden Literaturvolumen ist zugunsten von Hüft- und Kniegelenk-Ersatz vergleichsweise gering. Dies korreliert jedoch nicht mit der statistischen Verteilung der jeweiligen Eingriffe. Während das Deutsche Ärzteblatt im Jahr 2009 rund 210.000 Hüftgelenk- und 175.000 Kniegelenk-Totalendoprothesen verzeichnete (Schnabel und Borelli 2011), schätzt die Deutsche Gesellschaft für Implantologie (DGI) etwa 1.000.000 jährlich in Deutschland inserierte dentale Implantate.

Es ist demnach durchaus ein attraktives Forschungsgebiet, die bisher größtenteils in der Orthopädischen Chirurgie etablierten Methoden und Geräte auf deren Anwendbarkeit am Kieferknochen zu untersuchen.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Literaturrecherche umfasst einige konzeptionelle Studien, deren Grundgedanken stets die Beschleunigung der Osseointegration und daraus folgend eine zeitlich verkürzte Knochenwundheilung sind, die aber in der Umsetzung sowie der technischen Parametrierung teilweise erheblich differieren.

So wurde beispielsweise anhand eines in-vitro-Modells der Einfluss elektrischer Felder auf die Protein- und Zelladsorption auf osteoblastenähnliche Zellen untersucht. Dazu wurde an die zu testenden Stahl- und Titan-Implantatoberflächen eine Spannung von 600 mV angelegt und nach 48 h der Einfluss auf das Proliferationsverhalten, die mitochondriale Zellaktivität und die intrazelluläre Proteinverteilung analysiert. Dabei konnte eine positive Beeinflussung der auf den Titanplättchen gemessenen Stoffwechselaktivität durch Einwirkung des externen elektrischen Feldes nachgewiesen werden, während eine Einflussnahme auf die Zellmorphologie in allen Versuchsreihen ausgeschlossen wurde (Tauboeck 2008). Auch dieser Versuchsaufbau weist mit 48 h einen recht kleinen Beobachtungszeitraum auf, der allerdings ausreicht um analog der vorliegenden Analyse auf Titanoberflächen eine Begünstigung des Zellmetabolismus durch die Stimulation mit elektrischen Feldern nachzuweisen.

Des Weiteren wurde 2005 ein Zahnimplantat mit zwischen Abutment und enossalem Implantatkörper in Längsrichtung befindlichem Piezoelement aus Quarz oder Keramik vorgestellt, dessen Elektroden an der Außenfläche angeordnet sind, so dass die während der Kaubewegung entstehenden und sich ständig ändernden Spannungen als wirksame Potenziale an den umgebenden Knochen weitergegeben werden (Behr 2005).

Entscheidender Unterschied zu unserem Leitgedanken ist hierbei, dass kein zusätzlicher Strom angelegt wird, sondern die ohnehin einwirkende Kraft in elektrische Potenziale umgewandelt und an das Knochengewebe weitergegeben wird.

Ogleich der technische Aufwand wesentlich kleiner ist als bei unserem Ansatz, da keine Energiequelle mikroelektronisch verbaut werden muss, sind die zu erwartenden Effekte gleichermaßen deutlich geringer, wobei ein direkter Vergleich aufgrund der fehlenden experimentellen Daten derzeit nicht möglich ist.

Auch Ingenieure der Gesellschaft für Elektro-Osteo-Therapie (GEOT) in München ließen im Jahr 2004 eine „Knochenschraube mit Vorrichtung zur Elektrostimulation“ patentieren, die wie in Abbildung 57 dargestellt im Inneren einen hohlzylinderförmigen Titanschaft sowie ein selbstschneidendes Außengewinde aufweist. Innerhalb des Hohlraumes befindet sich eine Aufnehmerspule, in der durch einen externen Schwingungsgenerator eine niederfrequente elektrische Spannung induziert wird und die mit Schaft und Endstück elektrisch gekoppelt ist, wodurch diese als Gewebeelektroden fungieren und im periimplantären Gewebe Wachstum anregen können.

In der Patentschrift wird neben den klassischen Indikationen wie Osteosynthesen und Wirbelversteifungen ausdrücklich auf die Anwendungsmöglichkeit der Prothesenverankerung hingewiesen (Liebrecht et al. 2004), wobei die unten angeführte Abbildung eher als Osteosyntheschraube Verwendung finden wird, da die Dimensionierung im Kieferknochen den Knochenverhältnissen entsprechend kürzer und dicker sein muss.

Denkbar ist der Einsatz als Fixationselement für Zahnersatz besonders bei stark kompromittiertem Knochen auch für das von unserer Forschungsgruppe konzipierte Mikrostimulationsabutment, sofern zukünftige Tier- und klinische Versuche die im Rahmen der Zellexperimente erlangten, vielversprechenden Ergebnisse bestätigen werden.

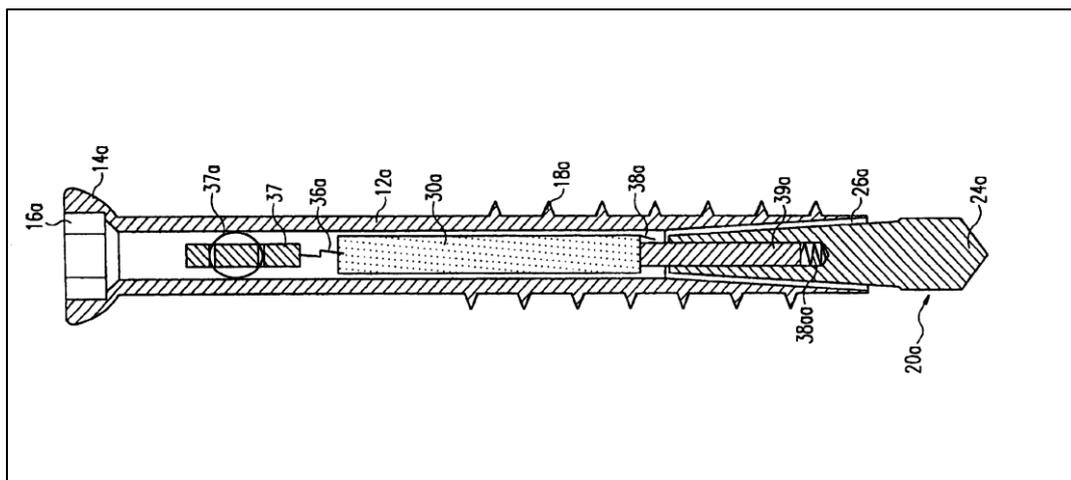


Abbildung 57: Knochenschraube zur Elektrostimulation von Knochen (Quelle: Patentschrift US 6778861 B1)

Darüber hinaus wurden unter Punkt 2.5.1 bereits drei Publikationen thematisiert, die in ihrem Versuchsansatz dem unseren insofern sehr ähneln, als dass sie dentale Implantate verwenden und folglich konkret die Wirkung des applizierten Gleichstroms auf den Kieferknochen untersuchen

Zunächst ist die Innovation einer Schweizer Forschungsgruppe betrachtet worden, die darin bestand, Titan-Implantate durch Verwendung ihrer Oberfläche als Elektroden in der Periimplantitis-Therapie einzusetzen.

Durch eine 15-minütige Behandlung mit 10 mA konstantem Strom konnten sie eine Reduktion der Bakterienzahl um zwei Potenzen sowie die Existenz aktiver Sauerstoffspezies nachweisen, wobei die Menge der Elektrolyse-Produkte proportional zum Betrag der angelegten Ladung war, woraus geschlossen werden kann, dass die Effizienz der Bakterienabtötung durch eine Steigerung der Stromzufuhr erhöht wird (Mohn et al. 2011).

Auch dieser Indikationsbereich ließe sich mit unserem noch in der Entwicklung befindlichen Mikrostimulationsabutment realisieren und sollte weiterführende Forschung erfahren, da mit jährlich wachsenden Implantationsraten zum einen und steigender Inzidenz immunkompromittierender Volkskrankheiten wie z.B. Diabetes zum anderen der Behandlungsbedarf periimplantärer Infektionen in den kommenden Jahren deutlich zunehmen wird und diese non-invasive Methode eine vergleichsweise kostengünstige sowie risikoarme Alternative zu dem bisher bewährten chirurgischen Verfahren der Implantoplastik darstellt.

Zahlreiche Parallelen weist auch eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2009 auf, in der eine Suprakonstruktion vorgestellt wird, die unmittelbar nach der Insertion auf dem Implantat verankert wird und mithilfe eines mikroelektrischen Stimulators biphasischen elektrischen Strom an das krestale Knochengewebe abgibt. Die Gesamtversuchsdauer war mit sieben Tagen Beobachtung etwas länger als in der vorliegenden Untersuchung und die Pulsrate war mit 100 Hz gegenüber den hier verwendeten 3,8 Hz wesentlich höher. Ungeachtet dessen konnte histologisch ein um 1,35 erhöhter Betrag der Knochenneubildung verglichen mit den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden (Song et al. 2009).

Diese durchaus beachtliche Steigerung bestätigt wiederum die Lukrativität weiterführender Studien zur Verwendung gepulster Gleichstromformen in elektrostimulativer Anwendung an dentalen Implantaten.

Zwei Arbeiten von Ercan und Webster aus den Jahren 2008 und 2010 dienten zur Orientierung bei der Auswahl der zu programmierenden Stimulationsparameter und bieten folglich eine sehr gute Vergleichbarkeit mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten.

Zum einen ist die verwendete Stromform sehr ähnlich; konkret wurden über einen Zeitraum von fünf Tagen konstante, bipolare Pulse mit einer Frequenz von 20 Hz und variierende Spannungen von 1 V, 5 V, 10 V bzw. 15 V angelegt. Zum Vergleich: Im Rahmen dieser Studie wurden über einen Gesamtzeitraum von fünf Tagen konstante, gepulste elektrische Felder mit einer Frequenz von 3,8 Hz und einer Spannung von 3 V generiert.

Zum anderen wird analog unserer Versuchsanordnung der Vergleich zwischen anodisierten, nanodimensionierten Titanoberflächen und kommerziell reinem Titan als Standardoberfläche angestellt.

Resümierend wird auf den anodisierten Oberflächen eine gegenüber konventionellem Titan um bis zu 72 % beschleunigte Osteoblastenproliferation bestimmt (Ercan und Webster 2008), wobei als Ursachen eine initial gesteigerte Zellanheftung, eine erhöhte Kollagensynthese sowie eine vermehrte Kalziumablagerung konstatiert werden (Ercan und Webster 2010).

Im Gegensatz zu dieser Erkenntnis legt der für diese Arbeit zugrundeliegende Datensatz die Vermutung nahe, dass einzig die Titan-Probekörper nach erfolgter Elektrostimulation gesteigerte Zellraten und BSP-Anheftungen aufweisen, während die anodisierten Oberflächen Ticer® und TiWhite® nahezu unbeeinflusst oder sogar beeinträchtigt zu sein scheinen.

5.5 Ausblick

Die temporäre Befeldung des Kieferknochens sowohl in prophylaktischer Anwendung während der Einheilphase dentaler Implantate als auch visionär therapeutisch zur Behandlung periimplantärer Infektionen stellt eine vielversprechende Methodik zur Ergänzung bewährter klinischer Verfahren dar.

Da der Großteil der bisherigen klinischen Anwendung elektrostimulierender Apparate auf die Fachgebiete der Unfallchirurgie und der Rehabilitationsmedizin beschränkt ist, sind umfangreiche Untersuchungen speziell für den Einsatz am Kieferknochen vonnöten, die in der Lage sind, die vom übrigen Skelett differierende Knochenstruktur und Belastungsanforderung zu berücksichtigen.

Die Schwerpunkte weiterführender in-vitro- bis hin zu in-vivo-Studien sollten zum einen die präzise Charakterisierung der durch Elektrostimulation erwirkten Effekte und zum anderen die Feinabstimmung hinsichtlich der festzulegenden Parameter, in erster Linie Spannung, Frequenz, Stromdichte, Pulsform und -dauer sowie die Gesamtbefeldungsdauer, umfassen.

Bislang finden sich in der Literatur nur wenige Publikationen, die zusätzlich zu den experimentell erhobenen Daten anhand von Modellen und Simulationen theoretisch kalkulieren, welcher Betrag der Feldstärke letztlich die Zelle erreicht und dort wirksam werden kann. Folglich können verschiedene Studiendesigns und -ergebnisse nur schwer miteinander verglichen werden und bieten kaum Anhaltspunkt für die konkrete Festlegung der zu programmierenden Parameter.

Simulations-Software, die in der Lage ist die effektive Feldwirkung lokal zu detektieren, kann hierbei mit relativ geringem Kostenaufwand hilfreich sein, ein in dem jeweiligen Gewebe anwendbares „therapeutisches Fenster“ festzulegen und auch die Elektrode(n) optimal zu platzieren (Hronik-Tupaj und Kaplan 2012).

Im Hinblick auf den potenziell erheblichen Nutzen, den der Patient durch eine verkürzte oder gemilderte Leidenszeit und schlussendlich auch durch eine Reduzierung der privat zu tragenden Kosten erhoffen kann, ist die Weiterführung experimenteller Versuche mit anschließender Initiierung klinischer Beobachtungen ein lohnender Ansatz, die Zahnärztliche Implantologie langfristig um eine alternative therapeutische Anwendung zu erweitern.

6. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med. dent.

Zytomorphometrische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen humaner männlicher Osteoblasten auf Implantatoberflächen in vitro unter Stimulation mit gepulsten elektrischen Feldern

eingereicht von:
Victoria Lang

angefertigt am:
Friedrich-Louis-Hesse-Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
und Orale Medizin

Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Leipzig AöR

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. H.-L. Graf

September 2015

Grundlage der vorliegenden Arbeit sind die im Versuchslabor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig durchgeführten Zellkulturtests, im Rahmen derer der Einfluss gepulster elektrischer Gleichstromfelder auf das Zellwachstum und den Stoffwechsel humaner männlicher Osteoblasten beobachtet wurde.

Die erhobenen Daten sollen entscheiden helfen, die Arbeitshypothese wissenschaftlich fundiert und experimentell belegt bestätigen oder widerlegen zu können. Diese besteht in der Annahme, das dentale Implantate umgebende Knochengewebe ließe sich durch Einwirkung externer elektrischer Felder positiv beeinflussen und in der Konsequenz könne die Einheilzeit verkürzt werden und die prothetische Versorgung zeitiger erfolgen.

Übergeordnet ist hierbei ein gemeinsames Forschungsprojekt des Application Center Microcontroller der Hochschule Mittweida, der Technischen Universität Chemnitz, der Firma ZL-Microdent sowie der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Leipzig, dessen Schwerpunkt die Entwicklung eines Mikrostimulations-Abutments ist, das unmittelbar nach der operativen Implantation auf dem Implantatkörper befestigt wird.

Chronologisch sind die Zellversuche vor den anschließend durchzuführenden Tierexperimenten am Minischwein sowie den klinischen Studien an ausgewählten Implantat-Patienten einzuordnen; sie bilden folglich die Basis für weiterführende Untersuchungen des mehrjährig angelegten Projektes.

Zunächst wurden im Zuge eines elektiven oralchirurgischen Eingriffes Knochenzellen gewonnen und auf den drei zu vergleichenden Oberflächen Titan, Ticer® und TiWhite® kultiviert. Anschließend wurden die Probekörper auf Objektträgern platziert und an die Befeldungsapparatur angeschlossen. Die Gesamtversuchsdauer von 120 h setzt sich hierbei aus einer 24-stündigen Vorreaktion, der 72-stündigen Stimulationszeit sowie einer 24-stündigen Nachreaktion zusammen. Zuvor sind die zu programmierenden Parameter auf eine Frequenz von 3,8 Hz, eine Amplitude von 3 V und ein Tastverhältnis von 50 % festgelegt worden.

Der Vergleich erfolgte zum einen zwischen den befeldeten und unbefeldeten Zellkulturen und zum anderen zwischen diesen beiden und einer dritten Kultur, die nicht an das Stimulationsgerät angeschlossen war und so die Erhebung von Daten völlig unbeeinflusst wachsender Zellen erlaubt.

Zur Versuchsauswertung wurden schließlich für je fünf unter den gleichen Bedingungen auf der gleichen Oberfläche kultivierte Probekörper eine Zellzählung sowie eine Bestimmung der relativen Grauwerte der mit DAPI gefärbten Zellkerne und des mit Cytochrom 3 gefärbten Knochenstoffwechsel-Markers Bone Sialoprotein durchgeführt.

Zusammenfassend betrachtet kann der Stimulation auf Titan wachsender Knochenzellen mit gepulsten elektrischen Feldern eindeutig eine begünstigende Wirkung auf die Knochenmineralisation zugeschrieben werden, da nicht allein die absoluten Zellzahlen deutlich über denen der unstimulierten Zellkultur lagen, sondern auch die relativen Grauwerte der Zellkerne und der BSP-Moleküle hoch-signifikant gesteigert waren.

Die auf der Ticer®-Oberfläche erhobenen Werte suggerieren hingegen eine negative Beeinflussung sowohl des Zellwachstums als auch der Knochenneubildung.

Diese Erkenntnis lässt sich aus den drastisch geringeren Zellzahlen sowie dem hochsignifikant kleineren Betrag an gemessenem BSP in der Verum- verglichen mit der Placebo-Kultur folgern.

Kontrovers sind die Daten der TiWhite®-Oberfläche zu werten. Hier ist die Anzahl gezählter Zellen bei den befeldeten Zellen deutlich größer als bei den unbefeldeten, während die relativen Grauwerte jeweils nach 96 h bzw. nach 120 h völlig gegensätzliche Tendenzen erkennen lassen, weshalb eine korrekte Interpretation erst nach einem längeren Beobachtungszeitraum erfolgen kann.

Im Hinblick auf weiterführende Studien scheint es generell ratsam, zur Analyse der durch elektrische Stimulation im periimplantären Knochen bewirkten, biochemischen Effekte eine Zeitdauer von mindestens mehreren Wochen zu wählen, da so einerseits verlässliche Aussagen über die jeweils bestimmten Parameter getroffen werden können und dies andererseits der im Konzept des Mikrostimulations-Abutments vorgesehene Zeitrahmen ist, im Laufe dessen das Bauteil im Mund des Patienten verankert sein soll.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der desmodontalen Integration eines Zahnes verglichen mit der knöchernen eines Implantates	2
Abbildung 2: Schematischer Querschnitt eines Implantates mit Elektrostimulation-Mikroabutment	4
Abbildung 3: Mikroskopische Anatomie des Knochens	6
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Elektrolysezelle zur Ticer-Oberflächenkonditionierung (Graf 1997).....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Therapie mit Gleichstrom	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Therapie mit kapazitiv gekoppelten elektrischen Feldern.....	22
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Therapie mit elektromagnetischen Feldern	24
Abbildung 8: Die Architektur des trabekulären Knochens (Meyer 2011b).....	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Funktionsweisen von Osteozyten (links) und Osteoprogenitorzellen (rechts) bei Lasteinwirkung (Chen et al. 2010)	28
Abbildung 10: REM-Aufnahme Titan - maschinert; Maßstab 10 µm	34
Abbildung 11: REM-Aufnahme Titan - maschinert; Maßstab 1 µm	34
Abbildung 12: Elementprofil Titan – maschinert	35
Abbildung 13: REM-Aufnahme Ticer; Maßstab 10 µm	35
Abbildung 14: REM-Aufnahme Ticer; Maßstab 1 µm	36
Abbildung 15: Elementprofil Ticer	36
Abbildung 16: REM-Aufnahme TiWhite®; Maßstab 10 µm	37
Abbildung 17: REM Aufnahme TiWhite®; Maßstab 1 µm.....	37
Abbildung 18: Elementprofil TiWhite®	38
Abbildung 19: Probeaufbau des Stationären Stimulators mit angeschlossenen Chamber Slides im Labor	39
Abbildung 20: Knochenpräparat in PBS und Pen/Strep.....	40
Abbildung 21: Wachstum der Knochenzellen; 20-fache Vergrößerung; inverses Mikroskop. 41	
Abbildung 22: Probekörper in Chamber Slides	42
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	43
Abbildung 24: Schematische Darstellung der Probekörper in den Chamber Slides.....	44

Abbildung 25: Zählschema	46
Abbildung 26: Rechnergestütztes Summationsbild von Zellkernen (blau/DAPI) und BSP-Molekülen (rot/TRITC);.....	47
Abbildung 27: Mikroskopische Darstellung der Zellkerne (DAPI); 200-fache Vergrößerung; Axiophot (Carl Zeiss Jena).....	47
Abbildung 28: Mikroskopische Darstellung der BSP-Moleküle (TRITC); 200-fache Vergrößerung; Axiophot (Carl Zeiss Jena)	48
Abbildung 29: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Zellzahl (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h.....	51
Abbildung 30: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h.....	51
Abbildung 31: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Titan nach 96h bzw. 120h	52
Abbildung 32: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Zellzahl (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h.....	54
Abbildung 33: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h.....	54
Abbildung 34: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h	55
Abbildung 35: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Zellzahl (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h	57
Abbildung 36: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h.....	57
Abbildung 37: Vergleich Verum-Placebo-Befeldung: Anfärbung BSP-Expression (TRITC) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h.....	58
Abbildung 38: Vergleich Verum-Placebo-normal: Zellzahl (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h.....	60
Abbildung 39: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Titan nach 96h bzw. 120h.....	60
Abbildung 40: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Titan nach 96h bzw. 120h	61
Abbildung 41: Vergleich Verum-Placebo-normal: Zellzahl (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h.....	62
Abbildung 42: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h.....	63

Abbildung 43: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf Ticer® nach 96h bzw. 120h.....	63
Abbildung 44: Vergleich Verum-Placebo-normal: Zellzahl (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h.....	64
Abbildung 45: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der Zellkerne (DAPI) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h.....	65
Abbildung 46: Vergleich Verum-Placebo-normal: Anfärbung der BSP-Expression (TRITC) auf TiWhite® nach 96h bzw. 120h.....	65
Abbildung 47: Summationsbild der Zellkerne (blau/DAPI) und BSP-Expression (rot/TRITC) auf Titan;.....	66
Abbildung 48: Summationsbild der Zellkerne (blau/DAPI) und BSP-Expression (rot/TRITC) auf Ticer®;.....	67
Abbildung 49: Summationsbild der Zellkerne (blau/DAPI) und BSP-Expression (rot/TRITC) auf TiWhite®;.....	68
Abbildung 50: Unscharfes Messfeld aufgrund von Oberflächenunebenheiten (Bsp. Ticer®-Probekörper);.....	70
Abbildung 51: Summationsbild der charakteristischen Rillenstruktur von Titan;.....	71
Abbildung 52: Summationsbild der feinporigen Struktur von Ticer®;.....	71
Abbildung 53: Summationsbild der knopfartigen Schollenstruktur von TiWhite®;.....	72
Abbildung 54: Feldstärkeverlauf am Titan-Implantat mit Abutment	73
Abbildung 55: Feldstärkeverlauf am Ticer®-Implantat mit Abutment	74
Abbildung 56: Feldstärkeverlauf am TiWhite®-Implantat mit Abutment.....	74
Abbildung 57: Knochen-Schraube zur Elektrostimulation von Knochen (Quelle: Patentschrift US 6778861 B1)	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	50
Tabelle 2: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	50
Tabelle 3: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	53
Tabelle 4: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	53
Tabelle 5: Durchschnittswerte der auf TiWhite® erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	56
Tabelle 6: Durchschnittswerte der auf TiWhite erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	56
Tabelle 7: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	59
Tabelle 8: Durchschnittswerte der auf Titan erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	59
Tabelle 9: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	62
Tabelle 10: Durchschnittswerte der auf Ticer® erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	62
Tabelle 11: Durchschnittswerte der auf TiWhite erhobenen Parameter nach 96-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	64
Tabelle 12: Durchschnittswerte der auf TiWhite® erhobenen Parameter nach 120-stündiger Verum- bzw. Placebo-Befeldung.....	64

Literaturverzeichnis

1. Aaron, R. K.; Steinberg, M. E. (1991): Electrical stimulation of osteonecrosis of the femoral head. In: *Semin Arthroplasty* 3 (2), S. 214–221, zuletzt geprüft am 31.10.2014.
2. Aaron, Roy K.; Ciombor, Deborah McK (1996): Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery* (14), S. 582–589, zuletzt geprüft am 02.11.2014.
3. Aaron, Roy K.; Ciombor, Deborah McK; Simon, Bruce J. (2004): Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields. In: *Clin Orthop Relat Res* (419), S. 21–29, zuletzt geprüft am 30.10.2014.
4. Ajubi, N. E.; Klein-Nulend, J.; Alblas, M. J.; Burger, E. H.; Nijweide, P. J. (1999): Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. In: *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 276 (1), S. E171, zuletzt geprüft am 29.10.2014.
5. Albrektsson, T. (1980): The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. In: *J Bone Joint Surg Br* 62 (3), S. 403–410.
6. Albrektsson, T.; Jacobsson, M. (1987): Bone-metal interface in osseointegration. In: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 57 (5), S. 597–607. DOI: 10.1016/0022-3913(87)90344-1.
7. Albrektsson, T.; Johansson, C. (2001): Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. In: *Eur Spine J* 10 Suppl 2, S. S96-101. DOI: 10.1007/s005860100282.
8. Al-Nawas, B. (2013): Antiinfektive Therapie der Osteomyelitis. In: *MKG-Chirurg* 6 (2), S. 88–91. DOI: 10.1007/s12285-012-0323-x.
9. Al-Nawas, B.; Groetz, K. A.; Goetz, H.; Duschner, H.; Wagner, W. (2008): Comparative histomorphometry and resonance frequency analysis of implants with moderately rough surfaces in a loaded animal model. In: *Clinical oral implants research* 19 (1), S. 1–8. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2007.01396.x.
10. Al-Nawas, B.; Groetz, K. A.; Goetz, H.; Feil, M.; Duschner, H.; Wagner, W. (2006): Systematische qualitative Histologie von enossalen Implantaten mit anodisch oxidierten Oberflächen. In: *Mund Kiefer GesichtsChir* 10 (4), S. 229-237. DOI: 10.1007/s10006-006-0002-z.
11. Al-Nawas, B.; Grötz, K. A. (2011): Implantatgetragene Rehabilitation im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Strahlentherapie. In: *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 66 (11), S. 818–826, zuletzt geprüft am 23.05.2015.
12. Anselme, K. (2000): Osteoblast adhesion on biomaterials. In: *Biomaterials* 21 (7), S. 667–681. DOI: 10.1016/S0142-9612(99)00242-2.

13. Ascenzi, A. (1993): Biomechanics and Galileo Galilei. In: *J Biomech* 26 (2), S. 95–100, zuletzt geprüft am 29.10.2014.
14. Banasiak, D.; Barnetson, A. R.; Odell, R. A.; Mameghan, H.; Russell, P. J. (1999): Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. In: *Radiat Oncol Investig* 7 (2), S. 77–85. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6823(1999)7:2<77::AID-ROI3>3.0.CO;2-M.
15. Basset, C. A.; Becker, R. O. (1962): Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. In: *Science* 3535 (137), S. 1063–1064.
16. Basset, C. A.; Pawluk, R. J.; Becker, R. O. (1964): Effects Of Electric Currents On Bone In Vivo. In: *Nature* 204, S. 652–654.
17. Bassett, C. A. (1966): Electro-mechanical Factors Regulating Bone Architecture. In: H. Fleisch, H.J.J Blackwood und M. Owen (Hg.): *Calcified Tissues 1965*: Springer Berlin Heidelberg, S. 78-89. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-49802-2_16.
18. Behr, Karl (2005): Implant for a tooth which provides accelerated bone formation and having a piezoelectric element am 31.05.2005. Anmeldenr: DE200510024894. Veröffentlichungsnr: DE102005024894 A1.
19. Bianco, P.; Fisher, L. W.; Young, M. F.; Termine, J. D.; Robey, P. G. (1991): Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. In: *Calcif Tissue Int* 49 (6), S. 421–426, zuletzt geprüft am 07.11.2014.
20. Black, J.; Baranowski, T. J.; Brighton, C. T. (1984): Electrochemical aspects of d.c. stimulation of osteogenesis. In: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 12 (3-4), S. 323–327. DOI: 10.1016/0302-4598(84)87012-9.
21. Bodamyali, T.; Kanczler, J. M.; Simon, B.; Blake, D. R.; Stevens, C. R. (1999): Effect of faradic products on direct current-stimulated calvarial organ culture calcium levels. In: *Biochem Biophys Res Commun* 264 (3), S. 657–661. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1355.
22. Bodhak, Subhadip; Bose, Susmita; Kinsel, William C.; Bandyopadhyay, Amit (2012): Investigation of In Vitro Bone Cell Adhesion and Proliferation on Ti Using Direct Current Stimulation. In: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 32 (8), S. 2163–2168. DOI: 10.1016/j.msec.2012.05.032.
23. Bosshardt, D. D.; Zalzal, S.; McKee, M. D.; Nanci, A. (1998): Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. In: *Anat Rec* 250 (1), S. 13–33, zuletzt geprüft am 07.11.2014.
24. Böttcher, Christine (2012): Untersuchungen zur Überlebensrate von Implantaten in einer zahnärztlichen Praxis und zur Häufigkeit von Komplikationen in Korrelation zu Koronarer Herzerkrankung und Stoffwechselerkrankungen. Dissertation. Universität Würzburg. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie.

- Online verfügbar unter <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/docId/10043>, zuletzt geprüft am 23.05.2015.
25. Bozzini, B.; Carlino, P.; D'Urzo, L.; Pepe, V.; Mele, C.; Venturo, F. (2008): An electrochemical impedance investigation of the behaviour of anodically oxidised titanium in human plasma and cognate fluids, relevant to dental applications. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 19 (11), S. 3443–3453. DOI: 10.1007/s10856-008-3487-1.
 26. Brånemark, P. I. (1983): Osseointegration and its experimental background. In: *The Journal of Prosthetic Dentistry* 50 (3), S. 399–410, zuletzt geprüft am 10.11.2014.
 27. Brånemark, P. I.; Hansson, B. O.; Adell, R.; Breine, U.; Lindstrom, J.; Hallen, O.; Ohman, A. (1977): Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. In: *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 16, S. 1–132.
 28. Brighton, C. T.; Okereke, E.; Pollack, S. R.; Clark, C. C. (1992): In vitro bone-cell response to a capacitively coupled electrical field. The role of field strength, pulse pattern, and duty cycle. In: *Clin Orthop Relat Res* (285), S. 255–262.
 29. Brighton, C. T.; Wang, W.; Seldes, R.; Zhang, G.; Pollack, S. R. (2001): Signal transduction in electrically stimulated bone cells. In: *J Bone Joint Surg Am* 83-A (10), S. 1514–1523.
 30. Bücking, Wolfram (1995): *Implantat-Prothetik*. 1. Aufl. München: Verlag Neuer Merkur.
 31. Bushinsky, D. A. (1996): Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. In: *Am J Physiol* 271 (1 Pt 2), S. F216-22, zuletzt geprüft am 31.10.2014.
 32. Buttchereit, Ingo (2013): In vitro Osteokompatibilitätstestung strukturierter „Zirkoniummischoxidschichten“ in der humanen enoralen Knochenzellstruktur. Universität Leipzig, Leipzig. Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, zuletzt geprüft am 25.10.2014.
 33. Buzza, Edmur Pereira; Shibli, Jamil Awad; Barbeiro, Roberto Henrique; Barbosa, Jose Ricardo de Albergaria (2003): Effects of electromagnetic field on bone healing around commercially pure titanium surface: histologic and mechanical study in rabbits. In: *Implant Dent* 12 (2), S. 182–187.
 34. Caputo, M.; Zirpoli H; De Rosa MC; Rescigno T; Chiadini F; Scaglione A et al. (2013): Effect of low frequency (LF) electric fields on gene expression of a bone human cell line. In: *Electromagn Biol Med* 2013 (doi:10.3109/15368378.2013.822387). Online verfügbar unter <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/15368378.2013.822387>.
 35. Chamay, A.; Tschantz, P. (1972): Mechanical influences in bone remodeling. Experimental research on Wolff's law. In: *Journal of Biomechanics* 5 (2), S. 173–180. DOI: 10.1016/0021-9290(72)90053-X.

36. Chan, Anthony; Bergman, Harold (2008): Performance verification of a prototype non-invasive intra-oral bone growth stimulator for titanium dental implants. In: *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 24 (20), S. 5624–5627. DOI: 10.1109/IEMBS.2008.4650489.
37. Chen, J.; Sasaguri, K.; Sodek, J.; Aufdemorte, T. B.; Jiang, H.; Thomas, H. F. (1998): Enamel epithelium expresses bone sialoprotein (BSP). In: *Eur J Oral Sci* 106 (1), S. 331–336, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
38. Chen, Jan-Hung; Liu, Chao; You, Lidan; Simmons, Craig A. (2010): Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. In: *J Biomech* 43 (1), S. 108–118. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.016.
39. Chyun, Y. S.; Raisz, L. G. (1984): Stimulation of bone formation by prostaglandin E2. In: *Prostaglandins* 27 (1), S. 97–103.
40. Claes, Lutz; Willie, Bettina (2007): The enhancement of bone regeneration by ultrasound. In: *Prog Biophys Mol Biol* 93 (1-3), S. 384–398. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2006.07.021.
41. d'Ambrosio, G.; Mostacciolo, E.; Scaglione, A.; Scarfi, M. R. (1985): Continuous exposure of cell cultures to weak E.L.F. electric fields. In: *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 14 (1-3), S. 99–104. DOI: 10.1016/0302-4598(85)85012-1.
42. Dannhauer, K.-H. (1992): Die Wachstumsreaktion des mandibulären Gelenkknorpels auf biomechanische Reize und ihre Bedeutung für die Funktionskieferorthopädie — Ergebnisse tierexperimenteller und biophysikalischer Untersuchungen. In: *Fortschritte der Kieferorthopädie* 53 (1), S. 53–60. DOI: 10.1007/BF02165146.
43. DaSilva, M. A. B. (2012): Osseointegration bei dentalen Implantaten - eine Literaturübersicht und -auswertung. Dissertation. Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main. Fachbereich Humanmedizin, zuletzt geprüft am 10.11.2014.
44. Deppe, Herbert; Greim, Helmut; Brill, Thomas; Wagenpfeil, Stefan (2002): Titanium deposition after peri-implant care with the carbon dioxide laser. In: *Int J Oral Maxillofac Implants* 17 (5), S. 707–714.
45. Depprich, Rita; Zipprich, Holger; Ommerborn, Michelle; Naujoks, Christian; Wiesmann, Hans-Peter; Kiattavorncharoen, Sirichai et al. (2008): Osseointegration of zirconia implants compared with titanium: an in vivo study. In: *Head Face Med* 4, S. 30. DOI: 10.1186/1746-160X-4-30.
46. Di Silvio, L. (2008): Cellular Response to Biomaterials: Elsevier Science (Woodhead Publishing Series in Biomaterials). Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=WKejAgAAQBAJ>.
47. Diel, I. J.; Solomayer, E. F.; Seibel, M. J.; Pfeilschifter, J.; Maisenbacher, H.; Gollan, C. et al. (1999): Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a

- prognostic marker for subsequent bone metastasis. In: *Clin Cancer Res* 12 (5), S. 3914–3919, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
48. Dimitriou, R.; Babis, G. C. (2007): Biomaterial osseointegration enhancement with biophysical stimulation. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 7 (3), S. 253–265.
49. Dinkelacker, Wolfgang (2014): Implantatprothetik. Biomechanische und prothetische Konzepte in der Implantologie. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
50. Doan, N.; Reher, P.; Meghji, S.; Harris, M. (1999): In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. In: *J Oral Maxillofac Surg* 57 (4), S. 409-19; discussion 420.
51. Dubey, Ashutosh Kumar; Gupta, Shourya Dutta; Basu, Bikramjit (2011): Optimization of electrical stimulation parameters for enhanced cell proliferation on biomaterial surfaces. In: *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98 (1), S. 18–29. DOI: 10.1002/jbm.b.31827.
52. Dunn, D. S.; Raghavan, S.; Volz, R. G. (1994): Ciprofloxacin attachment to porous-coated titanium surfaces. In: *J Appl Biomater* 5 (4), S. 325–331. DOI: 10.1002/jab.770050407.
53. Dwyer, A. F.; Wickham, G. G. (1974): Direct current stimulation in spinal fusion. In: *Med J Aust* 1 (3), S. 73–75.
54. Egawa, Masahiro; Miura, Tadashi; Kato, Tetsuo; Saito, Atsushi; Yoshinari, Masao (2013): In vitro adherence of periodontopathic bacteria to zirconia and titanium surfaces. In: *Dent Mater J* 32 (1), S. 101–106.
55. Ercan, Batur; Webster, Thomas J. (2008): Greater osteoblast proliferation on anodized nanotubular titanium upon electrical stimulation. In: *Int J Nanomedicine* 3 (4), S. 477–485.
56. Ercan, Batur; Webster, Thomas J. (2010): The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces. In: *Biomaterials* 31 (13), S. 3684–3693. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.078.
57. Eriksson, C. (2006): Streaming Potentials and other water-dependent Effects in Mineralized Tissues. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* (238), S. 321–338, zuletzt geprüft am 29.10.2014.
58. Ferrier, J.; Ross, S. M.; Kanehisa, J.; Aubin, J. E. (1986): Osteoclasts and osteoblasts migrate in opposite directions in response to a constant electrical field. In: *J Cell Physiol* 129 (3), S. 283–288. DOI: 10.1002/jcp.1041290303.
59. Frost, H. M. (1987): The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. In: *Bone Miner* 2 (2), S. 73–85.

60. Frost, H. M. (1989): The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. In: *Clin Orthop Relat Res* (248), S. 283–293.
61. Frost, H. M. (1990): Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 1. Redefining Wolff's Law: The bone modeling problem. In: *The Anatomical Record* (226), S. 403–413, zuletzt geprüft am 07.11.2014.
62. Frost, H. M. (2000): The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. In: *J Bone Miner Metab* 18 (6), S. 305–316, zuletzt geprüft am 27.10.2014.
63. Fujisawa, R.; Mizuno, M.; Nodasaka, Y.; Kuboki, Y. (1997): Attachment of osteoblastic cells to hydroxyapatite crystals by a synthetic peptide (Glu7-Pro-Arg-Gly-Asp-Thr) containing two functional sequences of bone sialoprotein. In: *Matrix Biol* 16 (1), S. 21–28, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
64. Fukada, E.; Yasuda, I. (1957): On the Piezoelectric Effect of Bone. In: *J Phys Soc Jap* 12, S. 1158–1162, zuletzt geprüft am 29.10.2014.
65. Ganss, B.; Kim, R. H.; Sodek, J. (1999): Bone sialoprotein. In: *Crit Rev Oral Biol Med* 10 (1), S. 79–98, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
66. Giannunzio, Graciela Ana; Speerli, Rodolfo Carlos; Guglielmotti, Maria Beatriz (2008): Electrical field effect on peri-implant osteogenesis: a histologic and histomorphometric study. In: *Implant Dent* 17 (1), S. 118–126. DOI: 10.1097/ID.0b013e318166d800.
67. Gittens, R. A.; Olivares-Navarrete, R.; Tannenbaum, R.; Boyan, B. D.; Schwartz, Z. (2011): Electrical implications of corrosion for osseointegration of titanium implants. In: *Journal of Dental Research* 90 (12), S. 1389–1397. DOI: 10.1177/0022034511408428.
68. Gradinger, R.; Gollwitzer, H. (2006): *Ossäre Integration*. Heidelberg: Springer.
69. Graf, H-L (1997): Zur Entwicklung und Charakterisierung eines neuen Implantatsystems. Habilitationsschrift. Universität Leipzig, Leipzig. Medizinische Fakultät.
70. Graf, H-L (1998): Zur biologischen Verträglichkeit von Titanoberflächen (CPT) und ihren Abkömmlingen unter besonderer Berücksichtigung der TICER-Oberfläche. Zusammenstellung der Literaturerkenntnisse. Universität Leipzig - Medizinische Fakultät, Leipzig. Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, zuletzt geprüft am 25.11.2014.
71. Graf, H-L; Geu, B.; Knöfler, W.; Hemprich, A. (2001): Klinisches Verhalten des ZLDura-plant- Implantatsystems mit Ticer- Oberfläche. Prospektive Studie Mitteilung I: Überlebensraten. In: *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 17, S. 124–131.
72. Graf, H-L; Geu, B.; Knöfler, W.; Hemprich, A. (2002): Klinisches Verhalten des ZL-Dura-plant-Implantatsystems mit Ticer- Oberfläche. Mitteilung II: Zustandsbeschreibende Parameter. In: *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* 3, S. 169–176, zuletzt geprüft am 24.11.2014.

73. Graf, H-L; Stoeva, S.; Armbruster, F. P.; Neuhaus, J.; Hilbig, H. (2008): Effect of bone sialoprotein and collagen coating on cell attachment to TICER and pure titanium implant surfaces. In: *International journal of oral and maxillofacial surgery* 37 (7), S. 634–640. DOI: 10.1016/j.ijom.2008.01.021.
74. Greenough, C. G. (1992): The effects of pulsed electromagnetic fields on blood vessel growth in the rabbit ear chamber. In: *J Orthop Res* 10 (2), S. 256–262. DOI: 10.1002/jor.1100100213.
75. Groos, Stephanie (2007): Zellbiologische Grundlagen der Medizin. Medizinische Hochschule Hannover. Hannover. Online verfügbar unter https://www.mh-hanno-ver.de/fileadmin/institute/zellbiologie/downloads/alt_MSE_P_103/Groos060207.pdf, zuletzt geprüft am 07.11.2014.
76. Gross, David; Williams, Wendell S. (1982): Streaming potential and the electromechanical response of physiologically-moist bone. In: *Journal of Biomechanics* 15 (4), S. 277–295. DOI: 10.1016/0021-9290(82)90174-9.
77. Guerkov, H. H.; Lohmann, C. H.; Liu, Y.; Dean, D. D.; Simon, B. J.; Heckman, J. D. et al. (2001): Pulsed electromagnetic fields increase growth factor release by nonunion cells. In: *Clin Orthop Relat Res* (384), S. 265–279, zuletzt geprüft am 03.11.2014.
78. Gupta, T. D.; Jain, V. K.; Tandon, P. N. (1990): Electric fields in direct current stimulation system for bone healing. In: *Med Biol Eng Comput* 28 (3), S. 260–263.
79. Gutwald, R.; Gellrich, N. C.; Schmelzeisen, R. (2010): Einführung in die zahnärztliche Chirurgie und Implantologie: für Studium und Beruf ; mit 71 Tabellen: Dt. Ärzte-Verlag. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=er3MZL4qwi4C>.
80. Gutwald, Ralf (2010): Einführung in die zahnärztliche Chirurgie. Für Studium und Beruf. 2. Aufl. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
81. Habel, Beate (2004): Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I, zuletzt geprüft am 03.11.2014.
82. Hannemann, P. F.; Göttgens, K. W.; van Wely, B. J.; Kolkman, K. A.; Werre, A. J.; Poeze, M.; Brink, P. R. (2012): The clinical and radiological outcome of pulsed electromagnetic field treatment for acute scaphoid fractures: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre trial. In: *J Bone Joint Surg Br.* 94 (10) (1403-8). Online verfügbar unter <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/94-B/10/1403.abstract>.
83. Hartig, Mareke; Joos, Ulrich; Wiesmann, Hans-Peter (2000): Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation in vitro. In: *Eur Biophys J* 29 (7), S. 499–506. DOI: 10.1007/s002490000100.

84. Hassler, Craig R.; Rybicki, Edmund F.; Cummings, Kevin D.; Clark, Lynn C. (1980): Quantification of bone stresses during remodeling. In: *Journal of Biomechanics* 13 (2), S. 185–190. DOI: 10.1016/0021-9290(80)90192-X.
85. Hilbig, H.; Wiener, T.; Armbruster, F. P.; Bekele, A.; Kirsten, M.; Graf, H-L (2005): Effects of dental implant surfaces on the expression of bone sialoprotein in cells derived from human mandibular bone. In: *Med Sci Monit* 11 (4), S. 111–115, zuletzt geprüft am 25.11.2014.
86. Hronik-Tupaj, Marie; Kaplan, David L. (2012): A review of the responses of two- and three-dimensional engineered tissues to electric fields. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 18 (3), S. 167–180. DOI: 10.1089/ten.teb.2011.0244.
87. Hughes, Michael S.; Anglen, Jeffrey O. (2010): The use of implantable bone stimulators in nonunion treatment. In: *Orthopedics* 33 (3). DOI: 10.3928/01477447-20100129-15.
88. Hultenby, K.; Reinholt, F. P.; Norgard, M.; Oldberg, A.; Wendel, M.; Heinegard, D. (1994): Distribution and synthesis of bone sialoprotein in metaphyseal bone of young rats show a distinctly different pattern from that of osteopontin. In: *Eur J Cell Biol* 63 (2), S. 230–239, zuletzt geprüft am 07.11.2014.
89. Janigro, D. (2008): *The Cell Cycle in the Central Nervous System*: Humana Press (Contemporary Neuroscience). Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=mRvKsVZyPpkC>.
90. Jansen, J.H.W.; van der Jagt, Olav P; Punt, Bas J.; Verhaar, Jan A N; van Leeuwen, Johannes P T M; Weinans, Harrie; Jahr, Holger (2010): Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. In: *BMC musculoskeletal disorders* 11, S. 188. DOI: 10.1186/1471-2474-11-188.
91. Junker, Rudiger; Dimakis, Athanasios; Thoneick, Maurice; Jansen, John A. (2009): Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. In: *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4, S. 185–206. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2009.01777.x.
92. Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (1996): Knochen und Knochenverbindungen. In: L. C. Junqueira und J. Carneiro (Hg.): *Histologie*: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 190-217. Online verfügbar unter http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-07780-1_11.
93. Kaluđerović, Milena R.; Schreckenbach, Joachim P.; Graf, Hans-Ludwig (2014a): First titanium dental implants with white surfaces: preparation and in vitro tests. In: *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* 30 (7), S. 759–768. DOI: 10.1016/j.dental.2014.04.005.
94. Kaluđerović, Milena R.; Schreckenbach, Joachim P.; Graf, Hans-Ludwig (2014b): Zirconia coated titanium for implants and their interactions with osteoblast cells. In:

- Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 44, S. 254–261. DOI: 10.1016/j.msec.2014.08.032.
95. Kim, In Sook; Song, Jong Keun; Zhang, Yu Lian; Lee, Tae Hyung; Cho, Tae Hyung; Song, Yun Mi et al. (2006): Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. In: *Biochimica et biophysica acta* 1763 (9), S. 907–916. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2006.06.007.
 96. Klems, H.; Venohr, H.; Weigert, M. (1975): Stimulierung des Längenwachstums von Röhrenknochen durch elektrischen Gleichstrom. Szintigraphische Untersuchungen an der Kaninchentibia. In: *Arch. orthop. Unfall-Chir.* (81), S. 285–289, zuletzt geprüft am 30.10.2014.
 97. Kohlweyer, Hannes (2012): Vergleichende Untersuchungen zur Zellproliferation, Apoptose und Expression nonkollagener Knochenproteine auf Zirkonoxidoberflächen unterschiedlicher physikalischer Genese. Universität Leipzig, Leipzig. Poliklinik für Mund, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, zuletzt geprüft am 25.10.2014.
 98. Lagey, C. L.; Roelofs, J. M.; Janssen, L. W.; Breedijk, M.; Lentferink, R. H.; Visser, W. J. et al. (1986): Electrical stimulation of bone growth with direct current. In: *Clin Orthop Relat Res* (204), S. 303–312.
 99. Lanyon, L. E.; Goodship, A. E.; Pye, C. J.; MacFie, J. H. (1982): Mechanically adaptive bone remodelling. In: *Journal of Biomechanics* 15 (3), S. 141–154. DOI: 10.1016/0021-9290(82)90246-9.
 100. Liebrecht, F.; Kraus, W.; Stephan, H. (2004): Bone screw comprising a device for electrostimulation am 21.06.2004. Anmeldenr: US 10/018,937. Veröffentlichungsnr: US6778861 B1.
 101. Lohmann, C. H.; Schwartz, Z.; Liu, Y.; Guerkov, H.; Dean, D. D.; Simon, B.; Boyan, B. D. (2000): Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production. In: *J Orthop Res* 18 (4), S. 637–646. DOI: 10.1002/jor.1100180417.
 102. Lorch, D. G.; Brighton, C. T.; Gupta, R.; Corsetti, J. R.; Levine, S. E.; Gelb, I. D. et al. (1998): Biochemical pathway mediating the response of bone cells to capacitive coupling. In: *Clin Orthop Relat Res* (350), S. 246–256, zuletzt geprüft am 30.10.2014.
 103. Mammi, G. I.; Rocchi, R.; Cadossi, R.; Massari, L.; Traina, G. C. (1993): The electrical stimulation of tibial osteotomies. Double-blind study. In: *Clin Orthop Relat Res* (288), S. 246–253, zuletzt geprüft am 03.11.2014.
 104. Marrot, A.; Jonitz, A.; Grunert, P.; Haba, Y.; Hansmann, D.; Bader, R. (2011): Vitalität und Kollagensynthese humaner, primärer Osteoblasten unter dem Einfluss der elektrischen Stimulation in vitro. In: *Interdisciplinary Journal of Bone and Joint Diseases* 20 (1), S. 62–63, zuletzt geprüft am 03.11.2014.

105. Meyer, G. H. von (2011a): The architecture of the trabecular bone (tenth contribution on the mechanics of the human skeletal framework). In: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469 (11), S. 3079–3084. DOI: 10.1007/s11999-011-2042-4.
106. Meyer, G. H. von (2011b): The architecture of the trabecular bone (tenth contribution on the mechanics of the human skeletal framework). In: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469 (11), S. 3079–3084. DOI: 10.1007/s11999-011-2042-4.
107. Misch, Carl E. (2008): Contemporary implant dentistry. S. 615. 3rd ed. St. Louis: Mosby Elsevier.
108. Mohn, D.; Zehnder M.; Stark, W. J.; Imfeld T (2011): Electrochemical Disinfection of Dental Implants - a Proof of Concept. In: *PLoS One* 6 (1), zuletzt geprüft am 08.11.2014.
109. Müller, Y. (2002): Untersuchung Anodischer Oxidschichten auf Titan. Einfluss und Wirkung der Anodisation. Dissertation. Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich. Werkstoffingenieurwesen, zuletzt geprüft am 18.11.2014.
110. Nagai, M.; Ota, M. (1994): Pulsating electromagnetic field stimulates mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 and -4. In: *J Dent Res* 73 (10), S. 1601–1605, zuletzt geprüft am 03.11.2014.
111. Nahum et al. (2012): Pulsed Low Intensity Electromagnetic Field Alters Cell Cycle of Human Osteoblast in vitro. Poster No. 871. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. Israel Institute of Technology. Haifa, Israel, 2012, zuletzt geprüft am 06.04.2015.
112. Narkhede, P. R. (1998): A histologic evaluation of the effect of electrical stimulation on osteogenic changes following placement of blade-vent implants in the mandible of rabbits. In: *J Oral Implantol* 24 (4), S. 185–195. DOI: 10.1563/1548-1336(1998)024<0185:AHEOTE>2.3.CO;2.
113. Nascimento, Cassio do; Pita, Murillo Sucena; Fernandes, Flavio Henrique Nogueira Carrico; Pedrazzi, Vinicius; de Albuquerque Junior, Rubens Ferreira; Ribeiro, Ricardo Faria (2014): Bacterial adhesion on the titanium and zirconia abutment surfaces. In: *Clin Oral Implants Res* 25 (3), S. 337–343. DOI: 10.1111/clr.12093.
114. Neukam, F. W.; Wichmann, M.; Wiltfang, J. (2007): Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen: Thieme (ZMK Praxis). Online verfügbar unter http://books.google.de/books?id=uBQ_PDHhdGkC.
115. Nothdurft, Frank P.; Fontana, Dorothee; Ruppenthal, Sandra; May, Alexander; Aktas, Cenk; Mehraein, Yasmin et al. (2014): Differential Behavior of Fibroblasts and Epithelial Cells on Structured Implant Abutment Materials: A Comparison of Materials and Surface Topographies. In: *Clin Implant Dent Relat Res*. DOI: 10.1111/cid.12253.

116. O'Connor, J. A.; Lanyon, L. E.; MacFie, H. (1982): The influence of strain rate on adaptive bone remodelling. In: *Journal of Biomechanics* 15 (10), S. 767–781. DOI: 10.1016/0021-9290(82)90092-6.
117. Okko, Salma (2013): Prospektive Studie zur Primär- und Sekundärstabilität enossaler Implantate, ermittelt mit der Drehmomentmessung und der Resonanzfrequenzanalyse. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn. Hohe Medizinische Fakultät, zuletzt geprüft am 10.11.2014.
118. Oldberg, A.; Franzen, A.; Heinegard, D.; Pierschbacher, M.; Ruoslahti, E. (1988): Identification of a bone sialoprotein receptor in osteosarcoma cells. In: *J Biol Chem* 263 (36), S. 19433–19436, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
119. Padilla, Frederic; Puts, Regina; Vico, Laurence; Raum, Kay (2014): Stimulation of bone repair with ultrasound: a review of the possible mechanic effects. In: *Ultrasonics* 54 (5), S. 1125–1145. DOI: 10.1016/j.ultras.2014.01.004.
120. Pankaj, R.; Narkhede, B.D.S. (1998): A Histologic Evaluation Of The Effect Of Electrical Stimulation On Osteogenic Changes Following Placement Of Blade-Vent Implants In The Mandible Of Rabbits. In: *Journal of Oral Implantology* 24, S. 185–195, zuletzt geprüft am 17.11.2014.
121. Paterson, D. C.; Lewis, G. N.; Cass, C. A. (1980): Treatment of delayed union and non-union with an implanted direct current stimulator. In: *Clin Orthop Relat Res* (148), S. 117–128.
122. Reichl, F.-X.; Mohr, K.; Hein, L.; Hickel, R. (2014): Atlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner. 2., aktualisierte und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.
123. Rosenberg, Nahum; Rosenberg, Orit; Soudry, Michael (2012): Pulsed Low Intensity Electromagnetic Field (PEMF) Affects Cell Cycle of Human Osteoblast-like Cells *in Vitro*. In: *AJBE* 2 (4), S. 181–184. DOI: 10.5923/j.ajbe.20120204.05.
124. Rost, R.; Appell, H. J. (2001): Lehrbuch der Sportmedizin. S. 163: Dt. Ärzte-Verlag. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=ZN1orNfXiHUC>.
125. Ruf, T. (1999): Bone Sialoprotein (BSP) ein neuer Knochenstoffwechselfaktor : Wertigkeit unter Berücksichtigung der etablierten Knochenumsatzparameter. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Haushalts- und Ernährungswissenschaften, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
126. Ruoff, G. W. (2008): Effekte elektromagnetischer Felder auf biologische Systeme und Expressionsmuster von Wachstumsfaktoren. Ein Review. In: *Schweiz. Zschr. GanzheitsMedizin* 20 (6), S. 347–353, zuletzt geprüft am 08.11.2014.
127. Saito, S.; Ngan, P.; Rosol, T.; Saito, M.; Shimizu, H.; Shinjo, N. et al. (1991): Involvement of PGE Synthesis in the Effect of Intermittent Pressure and Interleukin-1 on Bone Resorption. In: *Journal of Dental Research* 70 (1), S. 27–33. DOI: 10.1177/00220345910700010401.

128. Saxne, T.; Zunino, L.; Heinegard, D. (1995): Increased release of bone sialoprotein into synovial fluid reflects tissue destruction in rheumatoid arthritis. In: *Arthritis Rheum* 38 (1), S. 82–90, zuletzt geprüft am 04.12.2014.
129. Schliephake, H.; Reiss, J.; Urban, R.; Neukam, F. W.; Günay, H. (1991): Freisetzung von Titan aus Schraubenimplantaten. In: *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie* VII, S. 6–10.
130. Schliephake, H.; Scharnweber, D.; Dard, M.; Sewing, A.; Aref, A.; Roessler, S. (2005): Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 73 (1), S. 88–96. DOI: 10.1002/jbm.b.30183.
131. Schnabel, Peter; Borelli, Siegfried (2011): Hüftgelenkendoprothesen. Zur Notwendigkeit von Endoprothesenregistern. In: *Dtsch Arztebl* 2011 108 (48), S. A 2598–602. Online verfügbar unter <http://www.aerzteblatt.de/archiv/115583/Endoprothesenregister-Hoehsten-Anforderungen-genuegen>, zuletzt geprüft am 19.04.2015.
132. Schwenzer, N.; Ehrenfeld, M. (2008): Chirurgische Grundlagen: Thieme (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde). Online verfügbar unter http://books.google.de/books?id=gkD3XIDNI_wC.
133. Seibel, M. J.; Woitge, H. W.; Pecherstorfer, M.; Karmatschek, M.; Horn, E.; Ludwig, H. et al. (1996): Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (9), S. 3289–3294, zuletzt geprüft am 04.11.2014.
134. Shafer, David M.; Rogerson, Keith; Norton, Louis; Bennett, Jeffrey (1995): The effect of electrical perturbation on osseointegration of titanium dental implants. In: *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 53 (9), S. 1063–1068. DOI: 10.1016/0278-2391(95)90125-6.
135. Shayesteh, Yadollah Soleymani; Eslami, Behnam; Dehghan, Mohammad Mehdi; Vaziri, Hamed; Alikhassi, Marzyeh; Mangoli, Amir; Khojasteh, Arash (2007): The effect of a constant electrical field on osseointegration after immediate implantation in dog mandibles: a preliminary study. In: *Journal of prosthodontics : official journal of the American College of Prosthodontists* 16 (5), S. 337–342. DOI: 10.1111/j.1532-849X.2007.00208.x.
136. Sollazzo, Vincenzo; Palmieri, Annalisa; Pezzetti, Furio; Massari, Leo; Carinci, Francesco (2010): Effects of pulsed electromagnetic fields on human osteoblastlike cells (MG-63): a pilot study. In: *Clin Orthop Relat Res* 468 (8), S. 2260–2277. DOI: 10.1007/s11999-010-1341-5.
137. Song, Jong K.; Cho, Tae H.; Pan, Hui; Song, Yoon M.; Kim, In S.; Lee, Tae H. et al. (2009): An electronic device for accelerating bone formation in tissues surrounding a dental implant. In: *Bioelectromagnetics* 30 (5), S. 374–384. DOI: 10.1002/bem.20482.

138. Spiekermann, H. (1978): Enossale Implantate in der prothetischen Zahnheilkunde - Klinische Erfahrungen und Tierexperimentelle Untersuchungen. Habilitationsschrift. Universität Düsseldorf, Düsseldorf. Hohe Medizinische Fakultät.
139. Stoltz, J. F. (2012): Response of cells and tissues to mechanical stimulation. In: *Series on Biomechanics* (27), S. 17–32. Online verfügbar unter http://www.imbm.bas.bg/biomechanics/uploads/Archive2012-1-2/17-32_Stoltz.pdf, zuletzt geprüft am 27.10.2014.
140. Sul, Young-Taeg; Johansson, Carina; Byon, Eungsun; Albrektsson, Tomas (2005): The bone response of oxidized bioactive and non-bioactive titanium implants. In: *Biomaterials* 26 (33), S. 6720–6730. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.058.
141. Sul, Young-Taeg; Johansson, Carina B.; Petronis, Sarunas; Krozer, Anatol; Jeong, Yong-soo; Wennerberg, Ann; Albrektsson, Tomas (2002): Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown. In: *Biomaterials* 23 (2), S. 491–501. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00131-4.
142. Supronowicz, P. R.; Ajayan, P. M.; Ullmann, K. R.; Arulanandam, B. P.; Metzger, D. W.; Bizios, R. (2002): Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation. In: *Journal of biomedical materials research* 59 (3), S. 499–506. DOI: 10.1002/jbm.10015.
143. Tauboeck, Tobias (2008): Analyse des Zellverhaltens auf metallischen Proben in Abhängigkeit von der Oberflächenpolarisation. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg. Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde, zuletzt geprüft am 06.04.2015.
144. Ulfing, Norbert (2002): Bewegungsapparat. Lehrbuch der allgemeinen und speziellen Anatomie des Bewegungsapparates und Systematik der Leitungsbahnen. Basel: Karger.
145. Urist, M. R.; McLean, F. C. (1952): Osteogenetic potency and new-bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. In: *J Bone Joint Surg Am* 34-A (2), S. 443–476.
146. Varani, Katia; Gessi, Stefania; Merighi, Stefania; Iannotta, Valeria; Cattabriga, Elena; Spisani, Susanna et al. (2002): Effect of low frequency electromagnetic fields on A2A adenosine receptors in human neutrophils. In: *Br J Pharmacol* 136 (1), S. 57–66. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704695.
147. Vodonik, L.; Miklavcic, D.; Sersa, G. (1992): Modified cell proliferation due to electrical currents. In: *Med. & Biol. Eng. & Comp.* (30), S. 21–28, zuletzt geprüft am 08.11.2014.

148. Wang, Zhenyu; Clark, Charles C.; Brighton, Carl T. (2006): Up-regulation of bone morphogenetic proteins in cultured murine bone cells with use of specific electric fields. In: *J Bone Joint Surg Am* 88 (5), S. 1053–1065. DOI: 10.2106/JBJS.E.00443.
149. Weiß, C.; Bucsky, P. (2013): Basiswissen Medizinische Statistik: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=qgmzBgAAQBAJ>.
150. Wen, H. B.; Liu, Q.; De Wijn, J R; Groot, K. de; Cui, F. Z. (1998): Preparation of bioactive microporous titanium surface by a new two-step chemical treatment. In: *J Mater Sci Mater Med* 9 (3), S. 121–128.
151. Wennerberg, Ann; Albrektsson, Tomas (2009): Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. In: *Clin Oral Implants Res* 20 Suppl 4, S. 172–184. DOI: 10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x.
152. Wintermantel, Erich; Ha, Suk-Woo (2009): Medizintechnik - Life Science Engineering. Titanisierung von Implantatoberflächen. 5. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (39).
153. Woitge, H. W.; Pecherstorfer, M.; Horn, E.; Keck, A. V.; Diel, I. J.; Bayer, P. et al. (2001): Serum bone sialoprotein as a marker of tumour burden and neoplastic bone involvement and as a prognostic factor in multiple myeloma. In: *Br J Cancer* 84 (3), S. 344–351. DOI: 10.1054/bjoc.2000.1614.
154. Wolff, Julius (2010): On the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870. In: *Clin. Orthop. Relat. Res.* 468 (4), S. 1056–1065. DOI: 10.1007/s11999-010-1239-2.
155. Yao, Chang; Slamovich, Elliott B.; Webster, Thomas J. (2008): Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. In: *Journal of biomedical materials research. Part A* 85 (1), S. 157–166. DOI: 10.1002/jbm.a.31551.
156. Yonemori, K.; Matsunaga, S.; Ishidou, Y.; Maeda, S.; Yoshida, H. (1996): Early effects of electrical stimulation on osteogenesis. In: *Bone* 19 (2), S. 173–180. DOI: 10.1016/8756-3282(96)00169-X.
157. Young, M. F.; Kerr, J. M.; Ibaraki, K.; Heegaard, A. M.; Robey, P. G. (1992): Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. In: *Clin Orthop Relat Res* (281), S. 275–294, zuletzt geprüft am 05.11.2014.
158. Zengo, A. N.; Bassett, C. A.; Proutzos, G.; Pawluk, R. J.; Pilla, A. (1976): In vivo effects of direct current in the mandible. In: *J Dent Res* 55 (3), S. 383–390.
159. Zhang, D.; Cowin, S. C.; Weinbaum, S. (1997): Electrical signal transmission and gap junction regulation in a bone cell network: a cable model for an osteon. In: *Ann Biomed Eng* 25 (2), S. 357–374.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift

Lebenslauf

Victoria Magdalena Lang
Karl-Liebknecht-Str. 7
04107 Leipzig

geboren am 12.06.1989 in Forst/Lausitz,
Familienstand: ledig, keine Kinder

Eltern: Dipl.-Ing. Kathrin Lang, geb. Woye, Architektin
Christian Immanuel Lang, Opernsänger

Geschwister: Dipl.-Ing. Valentin Lang, Wissenschaftlicher Mitarbeiter TU Dresden
Olivia Lang, Schülerin
Evelyn Lang, Schülerin

Schulbildung: 1995 – 1999 Grundschule Markkleeberg-West
1999 – 2007 Rudolf-Hildebrand-Schule Markkleeberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 2007 – 2012 Studium der Zahnmedizin an der Universität Leipzig
Sept. 2008 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
März 2010 Zahnärztliche Vorprüfung
Okt. 2012 Staatsexamen
30.10.2012 Erteilung der Approbation

Beruf: 2013 – 2014
Wissenschaftliche Mitarbeiterin
Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
Universitätsklinikum Leipzig

seit 2015
Weiterbildungsassistentin für Oralchirurgie
Kieferchirurgische Gemeinschaftspraxis
Dres. Neubauer, Schreder, Heinrich

Leipzig, den 02.09.2015

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. med. dent. Alexander Hemprich für die Möglichkeit sowohl wissenschaftlich als auch klinisch arbeiten zu können und die während dieser spannenden Zeit gewonnenen, kostbaren Erkenntnisse.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. habil. Hans-Ludwig Graf für die langjährige Betreuung als Studentin, Assistentin und Promovendin, die von konstruktivem Gedankenaustausch und stetiger Unterstützung geprägt war.

Eine große Hilfe im Labor war zur jeder Zeit Frau Ursula Tröger. Ihr danke ich herzlich für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien, die Begleitung der Zellversuche sowie die Mitwirkung bei der Auswertung der Daten.

Darüber hinaus danke ich Herrn Dipl.-Ing. Heiko Polster für die Konzeption der Befeldungsapparatur, die Überlassung der grafischen Darstellung der Feldwirkung und die während zahlreicher gemeinsamer Besprechungen aufgebrachte Geduld physikalische Zusammenhänge betreffend.

Herrn Dr. Joachim Schreckenbach danke ich für seinen Rat hinsichtlich elektrochemischer Feinheiten und patentrechtlicher Fragestellungen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank Sebastian und David für ihre Hilfe bei der grafischen Umsetzung und statistischen Analyse der Daten sowie Franziska und Tobias für ihr gewissenhaftes Korrekturlesen.

Schlussendlich danke ich von Herzen meinen Großeltern, deren bedingungsloser Rückhalt weit über den Zeitraum der Promotion hinausreicht.