

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Physiologie

*In vitro*- Untersuchungen zur Biokompatibilität  
des neuen, austenitischen nickelfreien Stahls P2000  
an Osteoblasten-ähnlichen Zellen

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von:

Martina Monika Mölders  
aus Mülheim an der Ruhr  
2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Jöckel

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wiemann

2. Gutachter: Prof. Dr. St. Ruchholtz

3. Gutachter: Prof. Dr. N. Binding, Münster

Tag der mündlichen Prüfung: 3. April 2006

### Im Rahmen dieser Dissertation

- *sind folgende Publikationen erschienen:*

Mölders M., Fischer A., Wiemann M. (2002):  
Biocompatibility of a nickel-free austenitic steel assayed by osteoblastic MC3T3-E1.  
Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 33, 775-778.

Tikhovski I., Brauer H., Mölders M., Wiemann M., Bingmann D., Fischer, A. (2003):  
Fatigue behaviour and in-vitro biocompatibility of the Ni-free austenitic high-nitrogen  
steel X13CrMnMoN18-4-3.  
Stainless Steels for Medical and Surgical Applications, ASTM STP 1438, G. L.  
Winters and M. J. Nutt, Eds., ASTM International, West Conshohocken PA,

- *ist folgender Abstract erschienen:*

Mölders M., Wiemann M. (2003):  
Metal and metal ions interfere with BMP-2 induced expression of alkaline  
phosphatase  
Pflügers Arch., Eur. J. Physiol. 445, S108.

- *sind folgende Ergebnisse als Vortrag vorgestellt worden:*

Mölders M., Wiemann M. (2001):  
Growth of MC3T3-E1 cells on nickel-free steel.  
4th International Essen Symposium on Biomaterials: Fundamentals and Clinical  
Applications, Essen 3.-5. Oktober 2001.

- *sind folgende Poster auf Kongressen ausgestellt worden:*

Mölders M. (2002):  
Biocompatibility of a nickel-free steel (P2000) assayed with direct metal contact of  
osteoblast-like cells.  
5th International Essen Symposium on Biomaterials: Fundamentals and Clinical  
Applications, Essen 9.-11. Oktober 2002.

Mölders M., Wiemann M. (2003):  
Metal ions influence BMP-2 stimulated expression of alkaline phosphatase of  
MC3T3-E1 cells.  
Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft  
in Bochum 2.-5. März 2003.

Wiemann M., Mölders M. (2002):  
Interference of metal and metal ions with BMP-2 signaling of osteoblast-like cells.  
4<sup>th</sup> international conference on bone morphogenetic Protein  
17.-21. Oktober 2002 Sacramento.

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1 Eigenschaften von 316L-Stahl</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Zytotoxische Reaktionen auf Stahl und Metalle</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Nickelfreie Stähle</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Eigenschaften von P2000</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Untersuchungssysteme</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Fragestellungen</b>	<b>10</b>
<b><u>2. Material und Methoden</u></b>	<b>11</b>
<b>2.1 Probenkörper</b>	<b>11</b>
2.1.1 P2000	11
2.1.2 316L-Stahl	11
2.1.3 Behandlung der Probenkörper	12
2.1.4 Polystyrol	13
<b>2.2 Zellkultur</b>	<b>13</b>
2.2.1 MC3T3-E1- Zellen	13
2.2.2 Nickeladaptierte MC3T3-E1-Zellen	13
2.2.3 Knochenmark-Stromazellen (hBMSC)	14
<b>2.3 Verwendete Substanzen und Lösungen</b>	<b>15</b>
2.3.1 Substanzen	15
2.3.2 Lösungen	16
<b>2.4 Versuchsdurchführung</b>	<b>16</b>
2.4.1 Zellmorphologie und Wachstumskurve	16
2.4.2 BMP-2 Induktion der alkalischen Phosphatase	18
2.4.2.1 <i>Photometrische ALP-Bestimmung</i>	19
2.4.3 CRAC (Calcium Release Activated Current)	20
2.4.4 pH-Messungen	21
2.4.5 Versuche mit Metall-Ionen und Chelatoren	22
2.4.6 Quantifizierung des intrazellulären Nickelgehaltes	23
2.4.7 Statistik	23

## Inhaltsverzeichnis

<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	<b>24</b>
<b>3.1 Biokompatibilität von P2000</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Langzeittest</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Nickelgehalt von MC3T3-E1-Zellen</b>	<b>28</b>
<b>3.4 BMP-2 Stimulation</b>	<b>29</b>
3.4.1 ALP-Expression bei direktem Materialkontakt	29
3.4.2 Beeinflussung der ALP-Aktivität durch Metall-Ionen	31
<b>3.5 pH-Messungen</b>	<b>40</b>
<b>3.6 CRAC (Calcium Release Activated Current)</b>	<b>43</b>
<b><u>4. Diskussion</u></b>	<b>45</b>
<b>4.1 Biokompatibilität</b>	<b>45</b>
<b>4.2 Langzeittest</b>	<b>47</b>
<b>4.3 BMP-2 Stimulation</b>	<b>47</b>
<b>4.4 pH-Messungen</b>	<b>52</b>
<b>4.5 CRAC (Calcium Release Activated Current)</b>	<b>53</b>
<b>4.6 Bewertung von P2000</b>	<b>54</b>
<b><u>5. Ausführliche Zusammenfassung</u></b>	<b>55</b>
<b><u>6. Zusammenfassung</u></b>	<b>58</b>
<b><u>7. Literaturverzeichnis</u></b>	<b>59</b>
<b><u>8. Danksagung</u></b>	<b>66</b>
<b><u>9. Lebenslauf</u></b>	<b>67</b>

## **1. Einleitung**

Metallische Implantate spielen in der heutigen Medizin eine wichtige Rolle. Sei es, dass auf Grund von Unfällen Knochen mit Hilfe von Implantaten reponiert und fixiert werden oder, dass ganze Gelenke, z. B. bedingt durch Verschleiß oder irreparable Fraktur, ausgetauscht werden müssen. Hierbei sind insbesondere Knie- und Hüftgelenke zu erwähnen. Um durch solche Transplantate eine Knochenstabilität und/oder Gelenkfähigkeit zu erreichen, müssen Implantatmaterialien gewisse Forderungen erfüllen, die als Normen für Implantate nach DIN ISO definiert sind. Dazu gehören Stabilität, mechanische Belastbarkeit und Korrosionsbeständigkeit ebenso wie Biokompatibilität, die unter anderem in der DIN ISO Norm 10993-5 [Normenausschuss, siehe Lit. 51] definiert ist. Diese Norm umfasst allgemeine Richtlinien zur in vitro-Zytotoxizitätsprüfung von Implantatmaterialien und schlägt unter anderem den direkten Materialkontakt der Testzellen, die Verwendung von etablierten Zelllinien, die Art der Sterilisierung der Probenkörper sowie die Verwendung frischen Mediums vor. Ferner werden Vorschläge zur Wahl von Materialien zur Positiv- und Negativkontrolle unterbreitet. Die Zytotoxizitätsbestimmung soll sowohl qualitativ, durch Bewertung der Zellen im mikroskopischen Vergleich, als auch quantitativ erfolgen, indem eine Wachstumskurve erstellt wird. Wenn gleich die Vorschriften zur Dauer solcher Tests und zu einzelnen Verfahren vergleichsweise weit gefasst sind, wird hervorgehoben, dass die Wahl der Testzellen stets im Hinblick auf den angestrebten Einsatz des Materials zu begründen ist. Demgemäß wurden in dieser Arbeit, die sich mit den Eigenschaften eines neuen nickelfreien Stahls (P2000) beschäftigt, der für den Einsatz in Hartgewebe besonders geeignet erscheint, Versuche mit Knochenzelllinien unternommen.

## 1.1 Eigenschaften von 316L-Stahl

Derzeit werden für Implantate, die besonders hohen mechanischen Belastungen ausgesetzt sind (künstliche Hüften, Schulter- und Kniegelenke), nickelhaltige Stähle eingesetzt. Das als AISI 316L-Stahl (Nummer: 1.4441) bezeichnete Material gilt als biokompatibel, das heißt, es beeinträchtigt nicht das Überleben und die Funktion direkt angrenzender Zellen (siehe 1.5 zur Definition der Biokompatibilität). Er besteht vor allem aus Eisen mit festgelegten Anteilen von Chrom, Nickel und Molybdän (X2CrNiMo 18-15-3) und zeichnet sich durch hohe Stabilität, Korrosionsbeständigkeit und Belastbarkeit aus.

Implantate, bestehend aus 316L-Stahl, werden seit langem erfolgreich in der Chirurgie und der Orthopädie eingesetzt, obwohl nickelhaltige Implantationsmaterialien, wie 316L-Stahl, in der Diskussion stehen, allergische und toxische Reaktionen auszulösen [Hildebrand et al. 1989, Lewis and Sunderman 1996, Mc Kay et al. 1996, Köster et al. 2000, Hillen et al. 2002, Gawkrödger 2003]. Eine Freisetzung von zytotoxischem Nickel aus solchen Implantaten könnte besonders durch Partikel erfolgen, die zum Beispiel durch Abrieb artikulierender Flächen entstehen. Metallische Abriebpartikel, die in der Nähe des Implantationsortes von Makrophagen phagozytiert und verschleppt werden, sind daher in jüngster Zeit ins Zentrum vieler Untersuchungen gerückt [Garrigues et al. 2005]. Aber auch freigesetzte Metalle könnten möglicherweise zur Entstehung lokaler Entzündungsreaktionen oder allergischer Reaktionen beitragen, die im Zusammenhang mit nickelhaltigen Implantaten beobachtet wurden [Rosenberg et al. 1993; Gawkrödger 2003].

Im Weiteren wird 316L-Stahl ebenfalls in der Körperschmuckindustrie eingesetzt und zwar im Rahmen von Piercings. Laut Gesetzlage (LMBG 7. Verordnung) darf er jedoch nicht als „Ersteinsatz“, also in noch offene Piercingkanäle, sondern nur nach erfolgtem Abheilungsprozeß (Epithelisierung des Kanals) eingesetzt werden [Referenz 31]. Im Gegensatz hierzu darf 316L-Stahl jedoch im direkten Knochenkontakt implantiert werden.

## 1.2 Zytotoxische Reaktionen auf Stahl und Metalle

Lokale und systemische Korrosionsprodukte sowie eine damit verbundene Freisetzung von Metall-Ionen aus Implantaten [Michel et al. 1991, Lugowski et al. 1991, Pierini et al. 1999, Brayda et al. 2001] können zu allergischen Reaktionen führen [Hillen et al. 2002]. Im schlimmsten Fall kommt es durch Gewebeveränderungen zum Versagen des Implantats [Bischoff et al. 1994].

Für einen Teil der in Implantaten enthaltenen Metalle bzw. Metall-Ionen wurden bisher klare, konzentrationsabhängige toxische Effekte beschrieben, die in vivo zum Beispiel zu Nekrosen und Neoplasien führen können [Doran et al. 1998, Morais et al. 1998a, Morais et al. 1998b, Morais et al. 1999]. Dementsprechend wurde in etablierten Zellkulturmodellen, z.B. unter Verwendung modifizierter Osteoblasten, die ähnlich empfindlich auf Metalle und Metall-Ionen reagieren wie humane Osteoblasten, demonstriert [Macnair et al. 1997], dass zum Beispiel Chrom VI und Nickel, aber auch Vanadium, bereits ab Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  innerhalb weniger Tage zytotoxische Wirkungen entfalten. Diese Effekte zeigten sich zum Beispiel durch eine Verminderung des Zellwachstums und eine herabgesetzte Expression spezifischer Enzyme [McKay et al. 1996]. Es ist jedoch hervorzuheben, dass diese Versuche mit Lösungen von Metall-Ionen durchgeführt wurden, die entweder als Chloride vorlagen [McKay et al. 1996], oder durch anodische Oxidation gewonnen wurden [Morais et al. 1999]. Dabei geht man bei letzterem Verfahren vereinfachend davon aus, dass die erzwungene Korrosion der Stähle zu einem Gemisch von Metall-Ionen führt, wie es auch in vivo freigesetzt werden könnte. Solche Versuche können jedoch keineswegs ausschließen, dass auch geringere Konzentrationen von Metallen und Metall-Ionen wesentliche physiologische Parameter der Zellen verändern können, wenn sie über längere Zeit einwirken [Bingmann et al. 1990].

Für Knochenzellen werden daher seit neuerem auch spezifische Enzymaktivitäten getestet, die zum Beispiel an der Ossifikation beteiligt sind. Diesen Überlegungen liegen Beobachtungen zugrunde, die zeigen, dass implantierte Stähle bisweilen keinen direkten Knochenkontakt haben, sondern nach längerer Zeit von einer bindegewebigen Einscheidung umgeben sind [Fini et al. 2003], die auf eine Störung der lokalen Ossifikation deuten könnte. Vor diesem Hintergrund wurde besonders über die Messung von Alkalischer Knochenphosphatase berichtet

[McKay et al. 1996]. Alkalische Phosphatase (ALP) wird während der Differenzierung von Osteoblasten in hohem Maße gebildet und ausgeschüttet. Sie trägt in noch unbekannter Weise zur Knochenbildung bei. Obwohl ALP auch von vielen anderen Zellen exprimiert wird, ist dieses leicht nachweisbare Protein neben Osteocalcin, Osteopontin und Kollagen Typ I ein für Knochenzellen charakteristisches Exoenzym. Einflüsse von Metall-Ionen auf die ALP-Aktivität wurden von McKay et al. [1996] beschrieben und ermöglichen das Auffinden geringer Metall-Ionen-Mengen. Aufbauend auf diesen Untersuchungen, wurde in dieser Arbeit ein Verfahren zur Detektion von Metall-Ionen etabliert, bei dem durch Stimulation einer Knochenzelllinie (MC3T3-E1-Zellen) mit Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) die Expression von ALP bedeutend verstärkt wird [Takuwa et al. 1991], mit dem Ziel, die Nachweisgrenze für Metall-Ionen-Effekte zu verbessern.

### **1.3 Nickelfreie Stähle**

Eine Alternative zu 316L-Stählen könnte – insbesondere vor dem Hintergrund der viel diskutierten Nickel-Toxizität - in nickelfreien Stählen bestehen. Bei gleicher Festigkeit ist zu erwarten, dass nickelfreie oder nickelreduzierte Stähle weniger toxisch sind und keine allergischen Reaktionen hervorrufen, was die Zahl von Implantatwechsell, besonders im Bereich des künstlichen Gelenkersatzes, vielleicht reduzieren könnte. Zu den derzeit verwendeten Alternativen zählen einerseits Stähle, die durch Aufbringen von passiven  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  Schichten maskiert werden [Thomann and Uggowitz 2000], sowie Titan, dessen Biokompatibilität vor allem auf seiner passivierenden  $\text{TiO}_2$ -Schicht beruht [Oshida and Myazaki 1991; Breme et al. 1998].

Nachteil dünner Metalloxid-Schichten ist, dass sie einer mechanischen Beanspruchung möglicherweise nicht standhalten, so dass eine Freisetzung der im Material enthaltenen Ionen ebenfalls nicht dauerhaft verhindert werden kann.

Diese Schwierigkeiten (sowie die Kostenfrage) bedingen, dass derzeit auf Grund guter mechanischer Voraussetzungen, akzeptabler Biokompatibilität und dokumentierten Standzeiten von im Durchschnitt 12-15 Jahren (persönliche Mitteilungen verschiedener Unfallchirurgen und Orthopäden), weiterhin häufig nickelhaltiger Stahl verwendet wird [Disegi and Eschbach 2000; Schmidt et al.

2001]. Eine aus materialkundlicher Sicht vielversprechende Alternative stellt jedoch der nickelfreie Stahl P2000 dar.

### **1.4 Eigenschaften von P2000**

P2000 (Nummer: 1.4452) besteht aus Chrom, Mangan, Molybdän und Stickstoff in folgender Zusammensetzung: X13CrMnMoN 18-14-3. Er ist damit nominell nickelfrei und zeichnet sich durch eine hohe Stabilität sowie eine niedrige Ermüdungsrate aus [Suresh 1992, Tikhovski et al. 2003]. Der Stahl besitzt im Vergleich zu 316L-Stahl und Kobalt-Chrom-Mangan ein überlegenes Korrosionsverhalten [Koch et al. 2002], das durch einen hohen Stickstoffanteil von etwa 1% erreicht wird. Auf Grund der Zusammensetzung des Materials lässt sich vorhersagen, dass der Stahl bei Kontakt mit Wasser Ammonium ( $\text{NH}_3$ ) abgibt (Prof. Fischer, persönliche Mitteilung). Da Ammonium außerordentlich zytotoxisch ist, die Menge des pro Zeiteinheit abgegebenen  $\text{NH}_3$  aber unbekannt ist, könnte dieser Umstand der Biokompatibilität von P2000 widersprechen.

## 1.5 Untersuchungssysteme

Ausgangspunkt dieser Doktorarbeit war zunächst die Untersuchung zellulärer Reaktionen auf P2000 im Vergleich zu nickelhaltigem 316L-Stahl und Polystyrol (negativ Kontrolle, definiert nach DIN ISO Norm 10993-5). Da P2000 als Implantatmaterial in Hartgewebe vorgesehen ist, wurden die Versuche vor allem mit der etablierten [Sudo et al. 1986] Osteoblasten-artigen Zelllinie aus der Maus (MC3T3-E1-Zellen), in Anlehnung an die DIN ISO Norm 10993-5, in vitro durchgeführt.

Die Quantifizierung des Wachstums erfolgte im direkten Materialkontakt, um mögliche Schädigungen z. B. durch freigesetzte Metallspezies<sup>1</sup> erfassen zu können. Durch diese Versuche sollte zunächst festgestellt werden, ob es sich bei P2000 um ein biokompatibles Material handelt. Biokompatibilität ist hierbei nach Wintermantel definiert als „die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System“ [Wintermantel und Ha 1998].

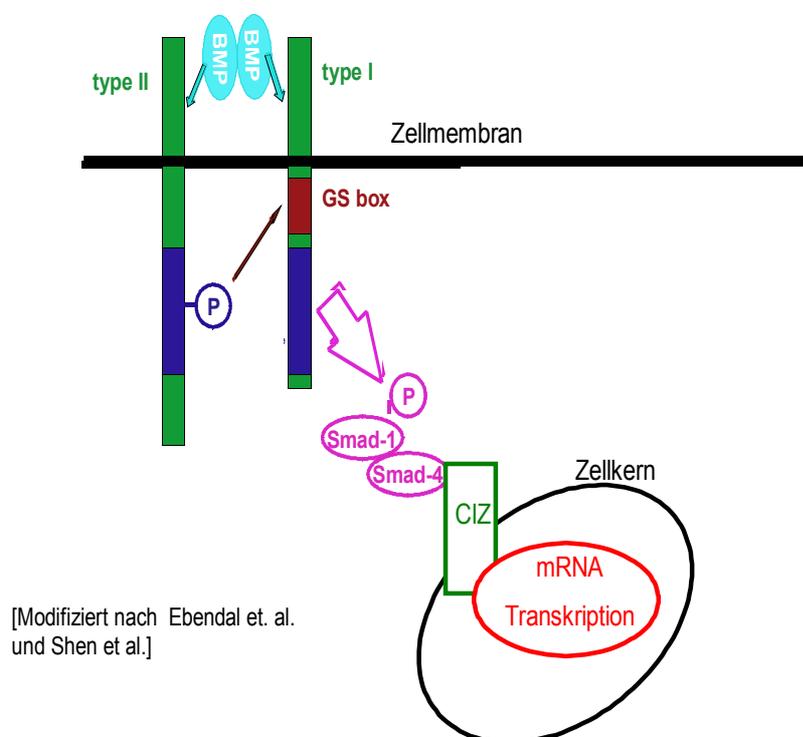
Ausgehend von der Vorstellung, dass Nickel, wenn auch nur in begrenztem Umfang, aus Implantat-Stählen freigesetzt wird, wurden weitere zellphysiologische Prozesse untersucht, auf die Nickel und andere Schwermetall-Ionen nachweislich Einfluss haben. Dazu gehört die oben genannte Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP), deren Aktivität durch Metall-Ionen reduziert werden kann [McKay et al. 1996]. In dieser Arbeit werden Metall-Effekte auf ALP erstmals nach BMP-2 Stimulation untersucht. BMP-2 ist ein Protein aus der TGF- $\beta$ -Familie, das die Expression der ALP und anderer knochenspezifischer Proteine (Osteocalcin, Osteopontin, Kollagen Typ I) bei MC3T3-E1-Zellen und zahlreichen anderen Knochenzelllinien heraufsetzt [Hazama et al. 1995; Hoffmann and Gross 2001].

---

<sup>1</sup> Bei der Bezeichnung Metallspezies wird von der Annahme ausgegangen, dass bei Kontakt mit Wasser verschiedene Arten von Metallverbindungen wie Hydroxide oder Ionen entstehen können, die jedoch nicht ausdrücklich genannt werden.

Die BMP-2-Stimulation (Abb. 1) beruht auf einer Rezeptor-Bindung mit nachfolgender Signalkaskade, die verschiedene Rezeptortypen, Phosphorylierungsschritte sowie die Beteiligung von Smad-Proteinen einschließt.

Eine Beeinflussung durch Metallspezies erschien daher auf mehreren Ebenen möglich und wurde für Zinkfingerproteine, die unter dem Einfluss von BMP-2 in dieser Kaskade als Transkriptionsfaktoren auftreten (CIZ), bereits gezeigt. [Sarkar 1995; Conte et al. 1996]. Daher bot die BMP-2 Stimulation der ALP zahlreiche mögliche Angriffspunkte für Schwermetall-Ionen und erschien für eine Beurteilung der Biokompatibilität besonders geeignet.



**Abbildung 1: BMP-2 Signalweg**

BMP-2 bindet an membranständige Rezeptoren (Typ I und II). Durch Dimerisierung des Rezeptors [Nohe et al. 2002], Phosphorylierung von Rezeptor-Proteinen und Interaktion mit Zelltyp-spezifischen Smad Proteinen wird das Signal schließlich mittels eines nucleo-cytoplasmatischen Shuttle-Proteins (CIZ: cas-interaction zinc-finger protein, [Shen et al. 2002]) in den Zellkern weitergeleitet, wo eine spezifische mRNA-Transkription eingeleitet wird [Hoffmann and Gross 2001]. Im Verlauf von Tagen kommt es so zur gesteigerten Expression von knochentypischen Proteinen. Andere Autoren berichten zusätzlich von einer Beteiligung des p38 MAPK-Wegs [Nohe et al. 2002]

Ein weiteres System, auf das Nickel-Ionen Einfluss nehmen, sind Calciumkanäle der Zellmembran (Abb. 2), die bei einer Leerung intrazellulärer Calciumspeicher (ICS) geöffnet werden und einen sogenannten Calcium Release Activated Calcium Current (CRAC) ermöglichen [Hoth und Penner 1993]. Die Durchlässigkeit solcher CRAC-Kanäle kann indirekt durch Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration ermittelt werden. Dazu nutzt man künstlich herbeigeführte transmembranöse Calciumgradienten nach Öffnung von CRAC-Kanälen durch Thapsigargin<sup>2</sup>, das zur irreversiblen Leerung der ICS führt (Abb. 2, 2.4.3).

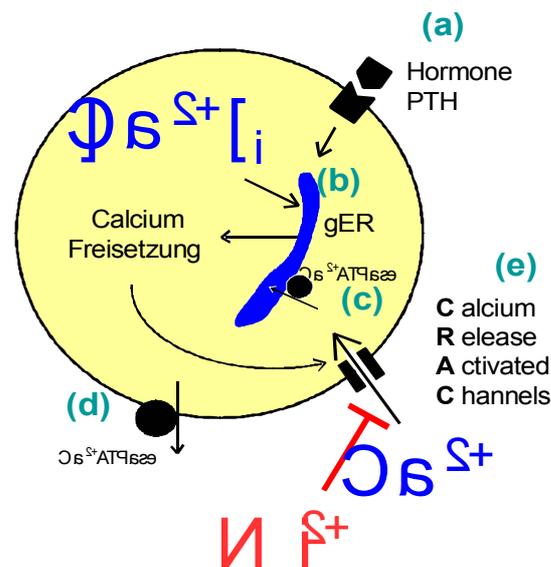


Abbildung 2:

Mechanismus der Calcium Release Activated Current Channels-Öffnung:

Extrazelluläre Botenstoffe, zum Beispiel Parathormon (PTH), binden an spezifische Rezeptoren (a), was zur Leerung der Calciumspeicher des glatten endoplasmatischen Retikulums (gER, (b) und zum Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration ( $Ca^{2+}_i$ ) führt. Das gER besitzt in seiner Membran Thapsigargin sensitive  $Ca^{2+}$ -ATPasen (SERCA-ATPasen /smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase, (c)), die die Speicher wieder auffüllen. Die in der äußeren Zellmembran befindlichen  $Ca^{2+}$ -ATPasen (d) pumpen bei erhöhter intrazellulärer Calciumkonzentration Calcium unter ATP-Verbrauch aus der Zelle. Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird daher vor allem von der Affinität der  $Ca^{2+}$ -ATPase zum Calcium bestimmt. Durch die Entleerung des Calciumspeichers werden auf noch unbekanntem Wege Kanäle in der äußeren Membran geöffnet, die diesem Vorgang entsprechend (e) als "Calcium Release Activated Current" (CRAC) -Kanäle bezeichnet werden. Ihre Aufgabe scheint darin zu bestehen, die intrazelluläre Calciumkonzentration vorübergehend zu erhöhen, so dass die SERCA-ATPasen (c) die Calciumspeicher wieder auffüllen können.

<sup>2</sup> Thapsigargin ist eine Substanz, die in der Lage ist, ATPasen vom SERCA-Typ zu blockieren.

Der Vergleich von CRACs bei Zellen auf nickelhaltigem 316L-Stahl und nickelfreiem P2000 war in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung, da bekannt ist, dass der Calciuminflux durch CRAC-Kanäle an Osteoblasten-ähnlichen Zellen durch Nickel gehemmt wird [Wiemann et al. 1998].

Da der intrazelluläre pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ) eine wichtige Basisgröße im Stoffwechselgeschehen von Zellen ist und P2000 an seiner Oberfläche  $\text{NH}_3$  freisetzt, wurde der "steady state"  $\text{pH}_i$  und die  $\text{pH}_i$ -Regulation geprüft. Für diese Untersuchungen wurde die sog. Ammonium Präpuls-Methode [Roos and Boron 1981] erstmals auf Zellen in direktem Materialkontakt angewandt. Dabei wird durch eine kurze Applikation von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  zunächst der  $\text{pH}_i$  in alkalische Richtung (Einwärtsdiffusion von  $\text{NH}_3$ ), dann in saure Richtung (Auswärtsdiffusion von  $\text{NH}_3$ ) verschoben (siehe Abb. 3). Da an der  $\text{pH}_i$ -Regulation von Knochenzellen Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) sowie  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher (NCBE) beteiligt sind, wurden Versuche sowohl in bicarbonatfreier, als auch in bicarbonathaltiger Lösung durchgeführt, um mögliche Metall-Effekte auf beide Systeme getrennt bewerten zu können. Darüber hinaus gibt die  $\text{pH}_i$ -Verschiebung beim Einwaschen von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  Auskunft über die intrazelluläre Pufferkapazität der Zellen.

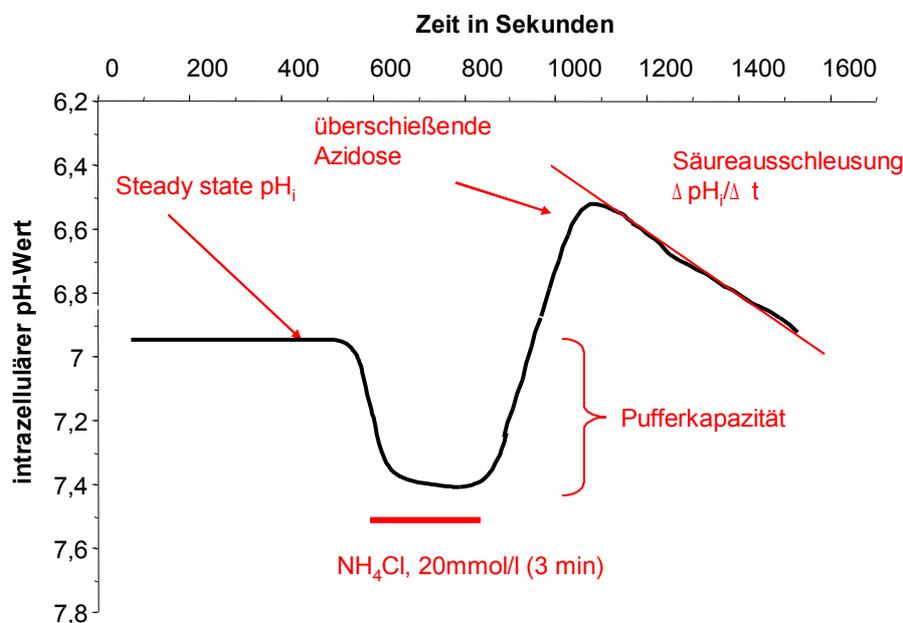


Abbildung 3: Idealisierter Verlauf einer  $\text{pH}_i$ -Messung mit der Ammonium-Präpuls-Methode

## 1.6 Fragestellungen

Aufbauend auf die eben genannten Überlegungen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- 1) Ist P2000-Stahl ein biokompatibles Material?
- 2) Welche Effekte von Schwermetall-Ionen auf BMP-2 induzierte ALP-Aktivität treten auf?  
Sind ähnliche Effekte auf nickelfreiem bzw. nickelhaltigem Stahl zu beobachten?
- 3) Ist die Funktion von CRAC-Kanälen bei Zellen auf 316L- bzw. P2000-Stahl beeinträchtigt?
- 4) Ergeben sich Änderungen der  $pH_i$ -Regulation durch den Kontakt mit nickelfreiem bzw. nickelhaltigem Stahl?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probenkörper

#### 2.1.1 P2000

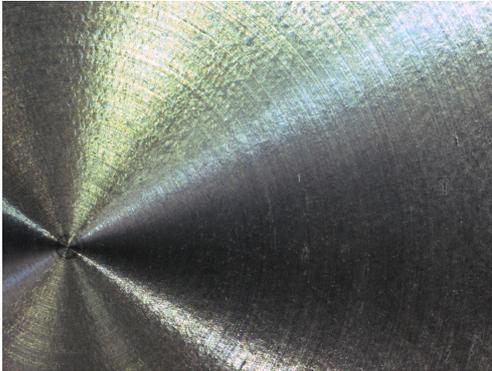


Abbildung 4: Probenkörper aus P2000 (35 mm Ø)

P2000  
(Nummer:  
1.4452),  
bestehend  
aus  
Chrom,  
Mangan,

Molybdän und Stickstoff (X13CrMnMoN 18-14-3) wurde als kalt-verfestigtes und lösungsgeglühtes Material in Form von Rundstäben (35 mmØ), von der Werkstofftechnik der Universität Duisburg-Essen (Prof. Fischer) zur Verfügung gestellt, die auch die Rauigkeit bestimmte. Je

niedriger der  $R_a$ -Wert, umso niedriger ist die Rauigkeit. Für kaltverfestigten, electropolierten P2000-Stahl lag der  $R_a$ -Wert nach Bearbeitung der Probenkörper bei 1,54, für kaltverfestigten bei 3,24 und für lösungsgeglühten bei 0,59. Für Zellkulturtests in 96-well Platten stand nur lösungsgeglühtes Stangenmaterial (5 mmØ) zur Verfügung. Von allen Rundstäben wurden dünne Scheiben, mit einer Dicke von 1,5 - 2 mm, in der Werkstatt des Universitäts-Klinikums Essen abgestochen. Jeweils die Hälfte der so gewonnenen Probenkörper wurde electropoliert (siehe 2.1.3,  $R_a$ -Wert: siehe oben).

#### 2.1.2 316 L-Stahl

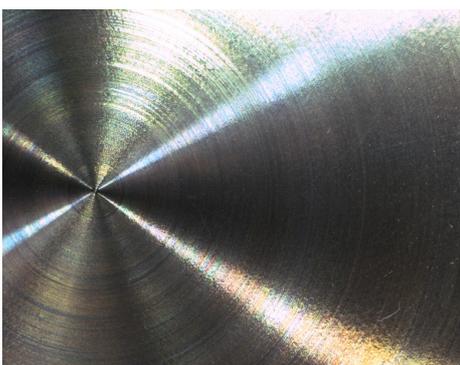


Abbildung 5: Probenkörper aus P2000 (35 mm Ø)

Als weiteres Testmaterial wurde 316 L-Stahl, bestehend

aus Chrom, Nickel, Molybdän und Eisen (X2CrNiMo 18-15-3, AISI 316L, No. 1.4441, Sandvik AG Luzern, Schweiz) verwendet. Der  $R_a$  Wert für kaltverfestigten, electropolierten 316L-Stahl lag bei 1,86, für kaltverfestigten bei 3,45 und für lösungs-  
geglühten bei 3,33.

Dieser Stahl wurde ausgewählt, da es sich hierbei um einen häufig genutzten Implantatstahl handelt, der im Gegensatz zu P2000 nickelhaltig ist. Dieser Stahl wurde ebenfalls von der Werkstofftechnik der Universität Essen (Prof. Fischer) in Rundstäben, mit dem gleichen Durchmesser wie P2000 (35 mm), in beiden Qualitäten (lösungsgeglüht und kaltverfestigt) geliefert. Diese wurden, ebenso wie P2000, in dünne Scheiben, mit einer durchschnittlichen Dicke von 1,5-2 mm, in der Werkstatt des Klinikums abgestochen. Jeweils eine Hälfte der Probenkörper wurde electropoliert (siehe 2.1.3). Für Untersuchungen zu intrazellulären  $H^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen wurden rechteckige Probenkörper (15 mm X 10 mm, Dicke 1,5-2 mm) verwendet, die aus 316L-Flachmetall (BalTec AG Pfäffikon) ausgestanzt worden waren und von Prof. Jennissen (Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung gestellt wurden.

### **2.1.3 Behandlung der Probenkörper**

Um oberflächliche Verunreinigungen zu entfernen, wurde ein Teil der Probenkörper zunächst mit einer speziellen Lösung (Polier- und Entgratungselektrolyt für rostfreien Stahl, Firma Graul, 75417 Mühlacker), bei ca. 70°C, für 15 Sekunden electropoliert und anschließend mit Aqua bidest überspült. Danach erfolgte eine Reinigung mit Ethanol und Acetat. Aus den oben beschriebenen Materialien entstanden insgesamt die in Tabelle 1 aufgeführten Probenkörper:

	P2000				316L			
	lösungsgeglüht		kaltverfestigt		lösungsgeglüht		kaltverfestigt	
	e.p.		e.p.		e.p.		e.p.	
Ø 5mm	9	14	/	/	/	/	/	/
Ø 35mm	3	4	4	5	5	5	5	5
10 mm x 15 mm	/	/	/	/	9	/	/	/

*Tabelle 1: Probenkörper (e.p.: elektroliert)*

Alle Probenkörper wurden vor Gebrauch in 5%iger Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>) im Wasserbad bei 82°C, 1 Stunde gekocht (Siedepunkt HNO<sub>3</sub> bei 80°C), gründlich mit Aqua bidest (mindestens. 3 x 10 min.) gespült, mit Aceton und Ethanol (3 x 10min) entfettet, getrocknet und anschließend 3 Stunden bei 180 - 210°C sterilisiert.

#### 2.1.4 Polystyrol

MC3T3-E1-Zellen wurden in Kulturflaschen aus Polystyrol (cellstar<sup>®</sup>, tissue culture flasks, DNase and RNase free) kultiviert. Polystyrol der gleichen Qualität diente als Negativ-Kontrollmaterial (ohne zytotoxische Reaktion), allerdings wurden in den Versuchen 6-wells (Katalognummer: 657 160, greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) und Petrischalen mit Ø 35 mm von cellstar<sup>®</sup> (Katalognummer: 627 160 greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) sowie 96-wells von falcon<sup>®</sup> (Katalognummer: 35-3072, Becton Dickinson Labware Europe, Franklin Lakes, NJ, USA) benutzt.

## 2.2 Zellkultur

#### 2.2.1 MC3T3-E1- Zellen

Bei der etablierte Zelllinie MC3T3-E1 [Sudo et al. 1986] handelt es sich um Osteoblasten-artige Zellen aus der Maus. MC3T3-E1-Zellen wurden unter Zellkulturbedingungen (35°C, 5% CO<sub>2</sub>) in α-MEM (alpha Modification of Minimum Essential Medium Eagle) gehalten. Dem Medium waren 2 mmol/l Glutamin, 50 I.U./ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, sowie 20% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Die Zellen wurden 1-mal wöchentlich trypsiniert. Dazu wurden sie zweimal kurz mit je 3 ml Mosconapuffer gewaschen, anschließend mit 1,5 ml

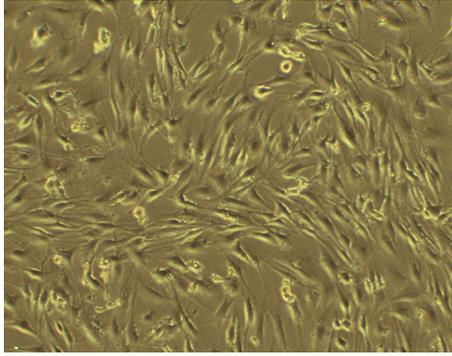
Trypsin-EDTA für 30 Sekunden überschichtet und nach Absaugen der Trypsin-Lösung für 2,5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Medium suspendiert, auf drei 50 ml Flaschen verteilt und erneut ausgesät (Erhaltungskulturen). Das Medium wurde 3-mal wöchentlich erneuert. Für die Versuche wurden Zellen der Passage 9-20 eingesetzt [Chung et al. 1999]. (Abbildung 6)

### **2.2.2 Nickeladaptierte MC3T3-E1-Zellen**

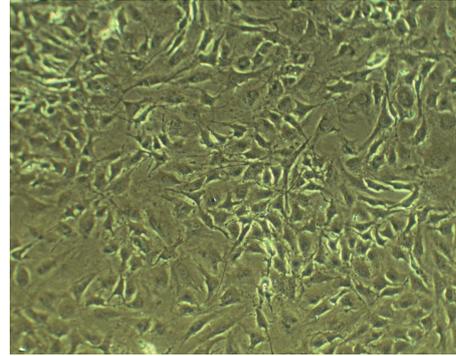
Bei Langzeittestungen (siehe 3.2) stellte sich heraus, dass MC3T3-E1-Zellen trotz Zusatz vergleichsweise hoher Nickel-Chlorid-Konzentrationen zum Medium überleben. Diese Zellen wurden in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Nickel-Chlorid (bei dieser Konzentration war in vorausgegangenen Studien die Zellzahl halbiert worden [Vorpahl et al. 2001]) wie normale MC3T3E1-E1-Zellen weiter kultiviert, auf Grund ihres verzögerten Wachstums jedoch nur etwa einmal wöchentlich passagiert. Diese als "nickeladaptiert" bezeichneten MC3T3-E1-Zellen wiesen u.a. feine fädige Ausläufer auf (Abbildung 7) und wurden für Versuche zur Toxizität von Nickel und Zink eingesetzt.

### **2.2.3 Knochenmark-Stromazellen (hBMSC)**

Für einige Untersuchungen wurden uns von der Abteilung für Hämatologie (Prof Dührsen) der Universität Duisburg-Essen menschliche Knochenmark-Stromazellen (hBMSC) zur Verfügung gestellt, die aus heparinisiertem Knochenmark eines "Non-Hodgkin Lymphoma" Patienten nach einem Standardverfahren gewonnen wurden [Studený et al. 2002]. Die Zellen wurden in einem Ficoll-Gradienten separiert und in IMDM (Iscove's modified Dulbeccos medium, Gibco), in Anwesenheit von 15% FCS, wieder aufgenommen. 10 ml (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen) dieser Zellsuspension wurden in eine 25 ml Kulturflasche überführt und für drei Tage inkubiert. Durch kurzes Waschen mit PBS wurden nicht-adhärenente Zellen anschließend entfernt. Nach weiteren sieben Tagen in IMDM erfolgte die Bildung von Zellkolonien. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsinierung (s.o.) nur noch einmal passagiert und anschließend für Untersuchungen zur Wirkung von BMP-2 eingesetzt.



*Abbildung 6:  
MC3T3-E1 Zellen auf Polystyrol*



*Abbildung 7 :  
Nickeladaptierte MC3T3-E1  
Zellen auf Polystyrol*

## 2.3 Verwendete Substanzen und Lösungen

### 2.3.1 Substanzen

BCECF-AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6-)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester	Molecular Probes, B-1170, Leiden, NL
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein-2, Stammlösung: 0,1mg/ml	Prof. W. Sebold, Würzburg
Calcein AM	Calcein-AM	Molecular Probes, Leiden, NL
Chrom (III)-Chlorid	CrCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, MW: 266,45; min. 95%	Merck, Art. Nr. 2487, Darmstadt
Dipyridol	2,2 Dipyridol, MW: 156,5	Sigma, D-7505, Taufkirchen
DMSO	Dimethyl Sulfoxide, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS, MW: 78,13	Sigma, D-8779, Taufkirchen
DTPA	N,N-bis 2(bis[carboxymethyl]amino)ethyl]glycerine Pentetic acid, MW: 393,3	Sigma, D-6518, Taufkirchen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma, Taufkirchen
Eisen (III)-Chlorid	FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, MW: 270,30; min. 99%	Merck, Nr. 3943, Darmstadt
FCS	Fetale Kälberserum	ICN, Meckenheim
Fura	Fura-2 AM, 4 mM Fura-2 in DMSO	Molecular Probes F-1201, Leiden, NL
Mangan-Chlorid	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, MW:197,9; min. 99%	Sigma, M-3634, Taufkirchen
Molybdän-Chlorid	MoCl <sub>5</sub> , MW: 273,21	Aldrich Chem. Co, Art. Nr.: 24,193-8, Milwaukee, USA
MTT	Thiazolyl Blue, MTT	Sigma, Taufkirchen
Nickel-Chlorid	NiCl <sub>2</sub> , MW: 237,71; min. 98%	Merck, Art. Nr.: 6717, Darmstadt
Phenantrolin	1,10-Phenantrolin, MW: 180,21 (Schmelzpunkt: 114-117°C)	Aldrich Cat. No: 13,137-7, Milwaukee, USA
p-Nitrophenyl phosphat	p-Nitrophenyl phosphat	Sigma, 104S, Taufkirchen
SDS	Natriumdodecylsulfat	Sigma, Taufkirchen
Thapsigargin	5 mM in DMSO.	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	Trypsin	Sigma, Taufkirchen
Zink-Chlorid	ZnCl <sub>2</sub> , MW: 136,28; min. 98%	Merck, Art. Nr. 8816, Darmstadt

*Tabelle 2: Substanzen*

## 2.3.2 Lösungen

α-MEM	Alpha Modification of Minimum Essential Medium mit Natriumbicarbonat und Earles Salzen (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH, USA)
ACSF	40,0314 g NaCl, 1,120 g KCl, 1,602 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 0,850 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5,4605 g NaHCO <sub>3</sub> , 9,908 g Glucose, 8,75 ml 1M CaCl <sub>2</sub> -Lsg. auf 5000 ml aqua bidest
ALP-Substratlösung	40 mg p-Nitrophenylphosphat in 10 ml Aqua bidest lösen, 1:1 mit Trispuffer 100mM, pH 10,3 mischen
Fixierlösung	2ml 10%iges Paraformaldehyd-Lösung, 5 ml Phosphatpuffer 0,2 M, 3 ml Aqua bidest
HBS	4,09 g NaCl, 0,112 g KCl, 0,16 g MgSO <sub>4</sub> , 0,085g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,99 g Glucose, 1,19 g HEPES, 0,133CaCl <sub>2</sub> in 500 ml Aqua bidest, pH 7,4
IMDM	Iscove`s modified Dulbeccos medium
Lysispuffer	Stammlösung: 100ml Dimethylformamid (DMF), 100ml Aqua bidest, 40 g Natriumdodecylsulfat (SDS), 2,5ml 80%ige Essigsäure, 2,5 ml 1N HCl
Moscona Puffer	4,0 g NaCl, 1,0 g Glucose, 0,5 g NaHCO <sub>3</sub> , 0,15 g KCl, 0,025 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,0125 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 500 ml Aqua bidest
MTT-Stammlösung	0,5 mg Thiazolyl Blue (MTT) pro ml HBS
PBS	8,67 g NaCl, 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 0,2 g KCl, 0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 1000 ml Aqua bidest
Phosphatpuffer	4 Teile Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> zu 1 Teil NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
Tris-puffer	100 mM Tris/HCl, pH 10,3
Trypsin-EDTA	0,25 g Trypsin, 0,1 g EDTA in 500ml PBS

Tabelle 3: Lösungen

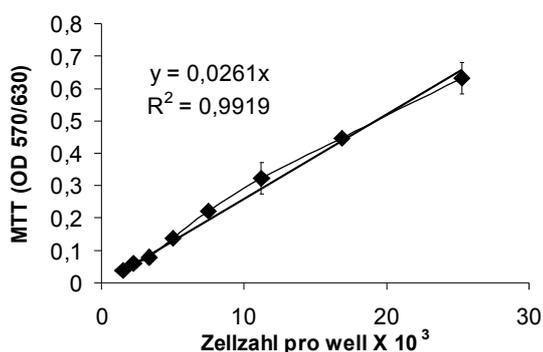
## 2.4 Versuchsdurchführung

### 2.4.1 Zellmorphologie und Wachstumskurve

Zur Bestimmung der Zell-Proliferation und Analyse der Morphologie wurden MC3T3-E1-Zellen auf P2000-Probenkörpern (Ø 35mm) in Petrischalen ausgesät. Die Probenkörper bedeckten dabei ca. 99% des Petrischalenbodens. Nach dreitägigem Wachstum in direktem Materialkontakt (Polystyrol und P2000) erfolgte die Färbung der Zellen mit Calcein AM (1 µg/ml Medium), einem Zellfarbstoff zur Fluoreszenzmikroskopie, mit einer Beladungszeit von 30 min. Anschließend wurden die Zellen in HBS überführt und mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Olympus Bx50Wi) betrachtet, das mit einem Filtersatz für Fluorescein-Fluoreszenz und einem Wasserimmersionsobjektiv (20-fach) ausgestattet war. Fotografien entstanden mit einer digitalen Kamera, die Teil eines Nikon-Bildanalyse-Systems war (Nikon Lucia).

Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde ein standardisierter MTT-Test in 96-well-Platten durchgeführt [Lindl 2000]. Dazu wurden 20 µl MTT-Stammlösung (0,5 mg MTT pro ml HBS) zu 100 µl Medium jeder zellhaltigen Vertiefung pipettiert. MTT wird durch den oxidativen Stoffwechsel in Mitochondrien zum roten, unlöslichen Formazan reduziert. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit HBS gewaschen, anschließend trocken gesaugt und über Nacht mit 100 µl Lysispuffer inkubiert. Die Konzentrationsbestimmung des so gelösten Formazans erfolgte bei einer Wellenlänge von 570nm/630nm. Die Umrechnung der Messwerte in Zellzahlen wurde anhand einer zuvor erstellten Eichkurve vorgenommen (Abbildung 8), für die eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt wurde.

Zur Bestimmung des Zellwachstums auf P2000 (direkter Materialkontakt) wurden P2000-Plättchen (5 mm Ø) in die Vertiefungen einer 96-well Platte eingelegt, die den gesamten Boden bedeckten (Abbildung 9).



Als Positiv-Kontrolle (mit zytotoxischer Reaktion) diente zum einen ein Zusatz von 0,05% (w/v)



NaN<sub>3</sub> zum Zellkulturmedium, zum anderen wurden Plättchen aus Kupfer eingebracht (5 mm Ø), die ein Absterben der Zellen innerhalb weniger Stunden induzierten. Allerdings interferierte Kupfer mit der anschließenden Formazan-Bildung, so dass der NaN<sub>3</sub>-Kontrolle der Vorzug gegeben wurde. Als Negativ-Kontrolle diente das Polystyrol-Material der 96-well Platte. Zu Beginn des 3-tägigen Tests wurden die MC3T3-E1-Zellen in einer Dichte von ca. 1000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Das MTT-Signal wurde nach 20, 44,5, 69 und 92 Stunden bestimmt.

Abbildung 8: Eichkurve zur Bestimmung der Zellzahl mittels MTT-Test

Abbildung 9:

Für eine Langzeitüberprüfung des Zellwachstums in direktem Metallkontakt wurden größere Petrischalen aus Polystyrol gegeben, so dass die Schale bedeckt war. Von jeder Stahlqualität (3 Scheiben, rechts unpolierte P2000- Scheiben). jeweils vier Probenkörper parallel getestet. Als Negativkontrolle wurden die Polystyrol-Petrischalen. Um den Einfluss von Nickel unter diesen Bedingungen richtungweisend zu prüfen, wurde dem Medium in einem weiteren Ansatz 50 µM Nickel-Chlorid zugesetzt. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 4 ml α-MEM, die Zellzahl betrug dabei 380.000 Zellen pro Ansatz (etwa 50% konfluent). Bei diesem Test erfolgte die Bestimmung der über sechs Wochen anwachsenden Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer. Ziel war, die Zellen im Materialkontakt möglichst lange unter Wachstumsbedingungen zu halten (log-Phase). Daher wurde jede Probe in Abständen von sieben Tagen vollständig trypsiniert; ein Viertel der Zellsuspension wurde auf das jeweilige Probenmaterial zurück pipettiert, auf ein Gesamtvolumen von 4 ml mit Medium (αMEM, 20% FCS) aufgefüllt und weiter kultiviert.

#### 2.4.2 BMP-2 Induktion der alkalischen Phosphatase

Zur Stimulation der ALP wurde dem Medium eine Konzentration von 0,5 µg BMP-2 pro ml zugesetzt, welche sich in Vorversuchen (Abbildung 10)

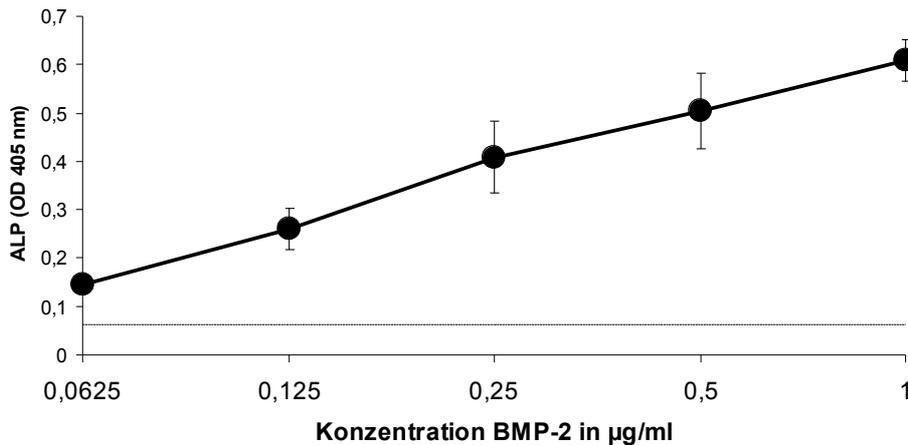


Abbildung 10: ALP-Aktivität von MC3T3-E1 Zellen in Abhängigkeit von der BMP-2 Stimulation (gestrichelt: unstimulierte ALP-Aktivität = Basisaktivität).

als

ausreichend (3- bis 10-fach über der Basisaktivität) erwiesen hatte. Dabei wurde die Konzentration des FCS auf 1% gesenkt [Hazama et al. 1995].

Unter diesen Bedingungen ist Zellwachstum, gemessen am zellulären Proteinstieg, nicht mehr messbar [Wiemann et al 2002]. Die Stimulation erfolgte für 72 h. Metalle oder Metall-Ionen, deren Einfluss auf die BMP-2 stimulierte ALP getestet werden sollte, waren während der gesamten Stimulationsdauer anwesend. Im Allgemeinen wurden MC3T3-E1-Zellen zunächst konfluent in  $\alpha$ -MEM (20% FCS) auf dem jeweiligen Testmaterial oder in den Testgefäßen ausgesät und für 24 h auf dem Material belassen. Erst dann wurde das Medium gewechselt,  $\alpha$ -MEM (1% FCS) und BMP-2 zugesetzt.

#### 2.4.2.1 Photometrische ALP-Bestimmung

Der Nachweis zellgebundener alkalischer Phosphatase (ALP) erfolgte mit Hilfe eines Standardtests, bei dem *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat eingesetzt wurde [Hazama et al. 1995]. Am Ende einer BMP-2-Stimulation wurde zweimal mit HBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl ALP-Substratlösung bei pH 10,3 inkubiert. Die Zunahme des dephosphorylierten *p*-Nitrophenyls (Gelbfärbung) wurde nach 20 min mit 100 µl 0,2 M NaOH abgestoppt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgt bei 405 nm

photometrisch in einem Dynatec MRX Plate Reader (Dynatec GmbH, Denkendorf, Deutschland) gegen einen Leerwert, bestehend aus 100 µl ALP-Substratlösung plus 100 µl 0,2 M NaOH. Sofern die Zellzahl bei diesen Tests unverändert blieb (Prüfung z.B. parallel durch Auflichtfluoreszenz), wurden die so ermittelten OD<sub>405nm</sub>-Werte als Maß für die absolute Aktivität der ALP-Aktivität pro Ansatz verwendet.

### 2.4.3 CRAC (Calcium Release Activated Current)

Zur Darstellung von Calcium-Strömen durch "calcium release activated current" (CRAC)-Kanäle wurde ein „calcium withdrawal - calcium readdition protocol“ eingesetzt [Wiemann et al 1998]. MC3T3-E1-Zellen wurden zunächst so auf die verschiedenen Materialien (P2000, Glas, 316L) ausgesät, dass sie nach drei Tagen im direkten Materialkontakt unter Zellkulturbedingungen (35°C, 5% CO<sub>2</sub>) Konfluenz erreichten. Nach Beladen der Zellen mit Fura-2 AM (Stammlsg.: 1 µg/µl DMSO, Endkonz.: 4 µM Fura-2 AM, Färbung für 20 min im Zellkulturmedium), einem Calcium-sensitivem Zellfarbstoff, wurde das Medium durch eine HBS-Lösung ersetzt. Durch selektives Blockieren der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des endoplasmatischen Retikulums (Abb.2) mit Thapsigargin (TG, 5 µl Stammlsg./ml Medium; Endkonz.: 5-10 µM) wird Ca<sup>2+</sup> aus den intrazellulären Calciumspeichern entlassen und von den Ca<sup>2+</sup>-ATPasen der äußeren Zellmembran aus der Zelle gepumpt (erkennbar als transienter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>) nach TG-Gabe). Die Leerung der Ca<sup>2+</sup>-Speicher öffnet nun die vorhandenen CRAC-Kanäle. Bei Osteoblasten bleiben die Kanäle für Stunden geöffnet, da die TG-Wirkung praktisch irreversibel ist [Wiemann et al. 1998]. Der Calcium-Einstrom durch geöffnete CRAC-Kanäle nach Zugabe extrazellulären Calciums führt dann zu einem deutlichen Anstieg der Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>. Änderungen der Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> wurden mit Hilfe des Ratio-Imaging-Verfahrens ermittelt: Paare von Fluoreszenzbildern (Emission > 520nm) Fura-2 beladener Zellen wurden direkt nacheinander mit Licht der Wellenlänge 340 nm und 380 nm aufgenommen. Nach Abzug des Hintergrund-Fluoreszenzsignals wurden die Bilder Pixel für Pixel dividiert. Das entstandene "Ratio-Bild (R-Wert, "Ratio 349/380") zeigt die Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub>-Verteilung (Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> wächst mit dem R-Wert). Da dem korrekten Hintergrundabzug bei Messungen auf Metalloberflächen eine besondere Bedeutung zukommt, wurden für die Messungen Stellen ausgewählt, wo kleine Bereiche der Oberfläche (ca. 5% der Bildfläche) nicht vom Zellrasen bedeckt waren. Die Fluoreszenzintensität an diesen Stellen wurde für die online-Hintergrundkorrektur genutzt. Die Aufnahme und Verrechnung der Bilder erfolgte mit einer PTI 200 Kamera (PTI Surbiton, Surrey, England) und einem CARAT-System (O. Ahrens, Bargteheide), das an ein Olympus Bx50Wi Mikroskop angeschlossen war. Alle Messungen wurde mit einem 20-fachen Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, N.A.) durchgeführt.

#### 2.4.4 pH-Messungen

Um den intrazellulären pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ) von Zellen zu bestimmen, wurden diese mit dem membranpermeablen BCECF-AM beladen. Nach Abspalten des AM-Komplexes, durch intrazelluläre Esterasen, fluoresziert BCECF in den Zellen grün, wenn es mit blauem Fluoreszenzlicht angeregt wird. BCECF ist ein pH-sensitiver Farbstoff. Die Fluoreszenzemission ( $> 520 \text{ nm}$ ) nimmt bei Anregung mit Licht der Wellenlänge  $490 \text{ nm}$  zu, wenn der pH-Wert steigt. Bei Anregung mit  $440 \text{ nm}$  tritt der Effekt nicht auf (isobestische Wellenlänge). Analog zur  $\text{Ca}^{2+}_i$ -Messung mit Fura-2 kann mit Hilfe des Ratios  $440/490$  eine Aussage zur  $\text{H}^+$ -Konzentration gemacht werden: In diesem Fall zeigt das steigende Ratio  $440/490$  einen fallenden pH-Wert an. Das Ratio  $440/490$  wurde mittels in vitro-Kalibrierung geeicht [Bonnet et al. 2000] und in intrazelluläre pH-Werte umgerechnet. Die apparative Ausstattung entsprach der der  $\text{Ca}^{2+}_i$ -Messung (siehe 2.4.3).

MC3T3-E1-Zellen wurden auf verschiedenen Probenkörpern (P2000, 316L-Stahl und Glas) ausgesät und für drei Tage inkubiert ( $35^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{ CO}_2$ ). Nach einer Beladungszeit von  $30 \text{ min}$  mit  $10 \mu\text{l}$  BCECF-AM Stammlösung (Endkonz.:  $5 - 10 \mu\text{M}$ ) wurden die Zellen entweder mit ACSF ( $5\% \text{ CO}_2$ ,  $\text{pH} \sim 7,4$ ; Flussrate:  $2 \text{ ml/min}$ ) oder mit HBS-Lösung ( $\text{pH} \sim 7,4$ ; Perfusor-getriebener Fluss mit  $1 \text{ ml/min}$ . oder  $6 \text{ ml/min}$ .) superfundiert. Die Verwendung  $\text{CO}_2$ -begaster, bicarbonathaltiger ACSF ermöglicht den Zellen, sowohl NHE, als auch NCBE für die Säureextrusion zu nutzen, wohingegen die HBS-Lösung die Nutzung der NHE zulässt.

Die Fähigkeit von Zellen Protonen zu exportieren und somit den intrazellulären pH-Wert zu regulieren, kann mittels der Ammonium-Präpuls-Methode sichtbar gemacht werden [Roos and Boron 1981]. Im Experiment werden die Zellen zuerst auf dem Testmaterial mit ACSF oder HBS überspült, bis sich der  $\text{pH}_i$  im "steady-state" stabilisiert hat. Durch Applikation von Ammonium-Chlorid ( $20 \text{ mM}$ ) wird der  $\text{pH}_i$ -Wert zunächst in alkalische Richtung (Eindringen von  $\text{NH}_3$ ), dann in saure Richtung verschoben (Zurückbleiben von  $\text{NH}_4^+$  in der Zelle). Die Regulation des so in saure Richtung verschobenen  $\text{pH}_i$  kann durch die Analyse von  $\Delta \text{pH}_i/\text{Zeit}$  (Steilheit des  $\text{pH}_i$ -Verlaufs) bestimmt werden. Um  $\text{CO}_2$ -Verluste zu vermeiden, wurde die auf  $31^\circ\text{C}$  erwärmte ACSF kontinuierlich appliziert (Badfluss  $2 \text{ ml/min}$ ). Bei Versuchen mit HBS (Badfluss  $1 \text{ ml/min}$ ) erfolgte der Lösungswechsel mittels Perfusor. Dabei wurde die Strömungsgeschwindigkeit auf  $6 \text{ ml/min}$  heraufgesetzt.

### 2.4.5 Versuche mit Metall-Ionen und Chelatoren

Metall-Ionen (Chrom, Eisen, Mangan, Molybdän, Nickel, Zink) wurden als Chloride (5 mM Stammlösung) dem Medium in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Freie Metall-Ionen können durch Zugabe von Chelatoren aus Flüssigkeiten entfernt werden. Mit dem Ziel die durch Metall-Ionen hervorgerufenen Effekte auf Zellfunktionen durch chelatoren zu antagonisieren, wurden zunächst die Metall-Ionen-Chelatoren 2,2 Dipyridol (Dipyridol), 1,10 Phenantrolin (Phenantrolin), und Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in Konzentrationen von 0,0002 - 0,2 mmol/l getestet.

Es erfolgte eine Bestimmung der oberen Konzentration, die im dreitägigen MTT-Test (siehe Abbildung 11) keine zytotoxischen Effekte mehr hervorbrachte. Diese Versuche führten zur Verwendung von DTPA, das sich für MC3T3-E1-Zellen als am wenigsten schädigend herausstellte

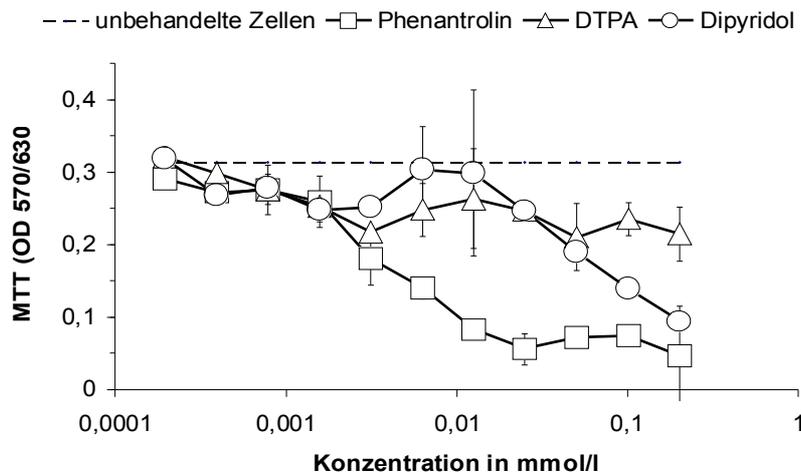


Abbildung 11: MTT-Signal von MC3T3-E1-Zellen unter Zugabe verschiedener Konzentrationen folgender Chelatoren: Phenantrolin, Dipyridol, DTPA

### 2.3.1 2.4.6 Quantifizierung des intrazellulären Nickelgehaltes

MC3T3-E1-Zellen wurden nach viertägigem direktem Materialkontakt (P2000, 316L) 5 mal mit Calcium-freier HBS unter Zusatz von 2mM EDTA (zur vollständigen Entfernung extrazellulärer Ni-Ionen) gewaschen und anschließend trypsiniert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden für 10 min bei 13.000xg sedimentiert und bei -20°C gefroren. Aufgetaute Zellpellets (mit bekannter Zellzahl) wurden durch Ultraschall (5 min) aufgeschlossen, vollständig auf PVDF-Membranen überführt und dort luftgetrocknet. Die zellulären Bestandteile wurden mittels LA-ICP-MS (Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) vollständig abliert und analysiert. Zur Ablation wurde ein NEW WAVE Up213 Laser eingesetzt (Scan Geschwindigkeit: 100µm/s, Laser-Leistung: 40%, Wiederholungsrate: 10Hz, Argon-Flussgeschwindigkeit: 1,4l/min). Der Durchmesser der ablierten Region (spot size) betrug 100 µm. Für die ICP-MS wurde ein Agilent 7500 cs eingesetzt (RF power: 1300W, RF matching 1,6 V, Plasma Gas 1,1 l/min). Die Prüfung auf vollständige Ablation der Proben erfolgte durch eine zweite Ablierung und anschließende Signal-überprüfung. Zur Kalibrierung des erhaltenen Nickel-Signals wurden PVDF-Membranen mit definierten Mengen (20 pg - 200 ng) eines Nickel-Oxid-Standards beladen (NiO, gelöst in Salpetersäure, Konzentration: 1 g Ni/l) und in gleicher Weise analysiert. Die so erhaltenen Eichwerte korrelierten linear mit der aufgetragenen Ni-Menge. Der Ni-Gehalt der Laser-ablierten Zellen wurden auf der Basis einer Eichgeraden bestimmt.

### 2.4.7 Statistik

Alle Berechnungen und die Erstellung aller Grafiken wurden mit Microsoft Office Excel 2003 ® mit einer Windows XP ® Version durchgeführt. Die Testung der Signifikanz erfolgte durch den t-Test, der stets zweiseitig durchgeführt wurde. Signifikanz wurde angenommen, wenn  $p \leq 0,05$  war.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Biokompatibilität von P2000

Zur Überprüfung der Biokompatibilität von P2000 wurde (nach DIN ISO Norm 10993-5) zunächst eine morphologische Analyse sowie eine Wachstumskurve erstellt.

Der mikroskopisch-optische Vergleich nutzte Calcein-gefärbte Zellen als Negativ-Kontrolle (keine Zytotoxizität) auf Polystyrol (Petrischalen, 35 mm Ø) im Vergleich zu P2000-Plättchen (35 mm Ø). Nach dreitägigem Wachstum auf dem Testmaterial (Abbildung 12), waren beide Materialoberflächen gleichermaßen dicht bewachsen und zeigten keine abgelösten oder absterbenden Zellen. Auf beiden Oberflächen traten sowohl spindelförmige Zellen mit feinen Ausläufern, als auch abgerundete Zellen auf.

Kontrolle auf Polystyrol

P2000

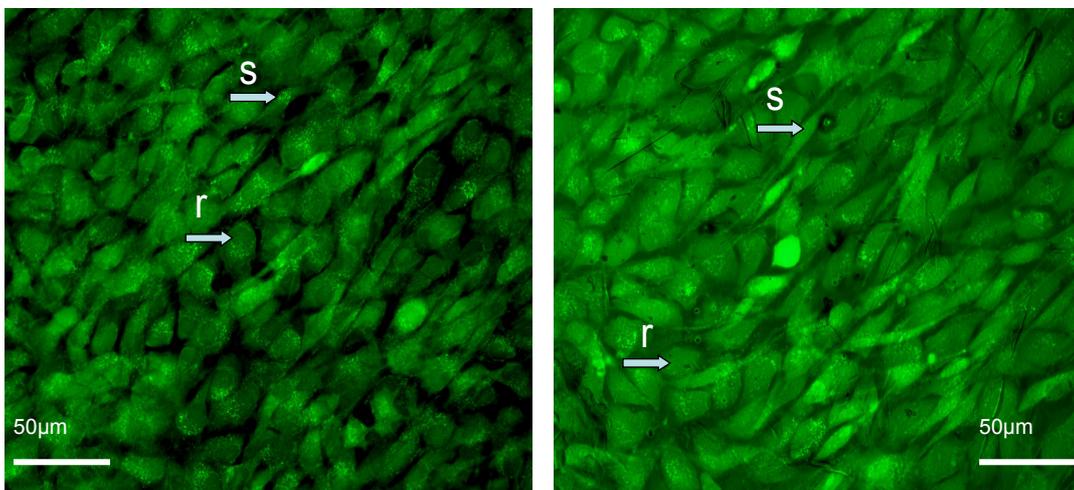


Abbildung 12: Mikroskopisches Auflicht-Fluoreszenzbild von Calcein-gefärbten MC3T3-E1-Zellen nach dreitägigem Wachstum in direktem Materialkontakt. Auf P2000 (rechtes Bild) ist ein grüner Hintergrundschimmer erkennbar, der auf vom Material reflektiertes Fluoreszenzlicht zurückzuführen ist. Es sind sowohl spindelförmige Zellen (s) als auch abgerundete Zellen (r) zu sehen.

Abbildung 13 zeigt die Wachstumskurve von MC3T3-E1-Zellen in direktem Materialkontakt zu P2000 (5 mm Ø) und Polystyrol (MTT-Test).  $\text{NaN}_3$ -Zusatz diente als Positivkontrolle, um zu zeigen, dass nach Absterben der Zellen das MTT-Signal ausfällt. Das MTT-Signal der Zellen auf P2000 und auf Polystyrol war über den gesamten Zeitraum annähernd identisch ( $p$  bei allen Wertepaaren  $> 0,2$ ). Zusatz von  $\text{NaN}_3$  verminderte schon nach wenigen Stunden das MTT-Signal (24 Stunden,  $p < 0,001$ ).

Als weitere Positivkontrolle wurden Zellen auf Kupferplättchen ausgesät. Kupfer führte schon nach wenigen Stunden zum Untergang benachbarter Zellen (nicht gezeigt). Als toxische Positivkontrolle wurde Kupfer jedoch nicht eingesetzt, da es im MTT-Test zur Reduktion des Formazans (Meßgröße) führte.

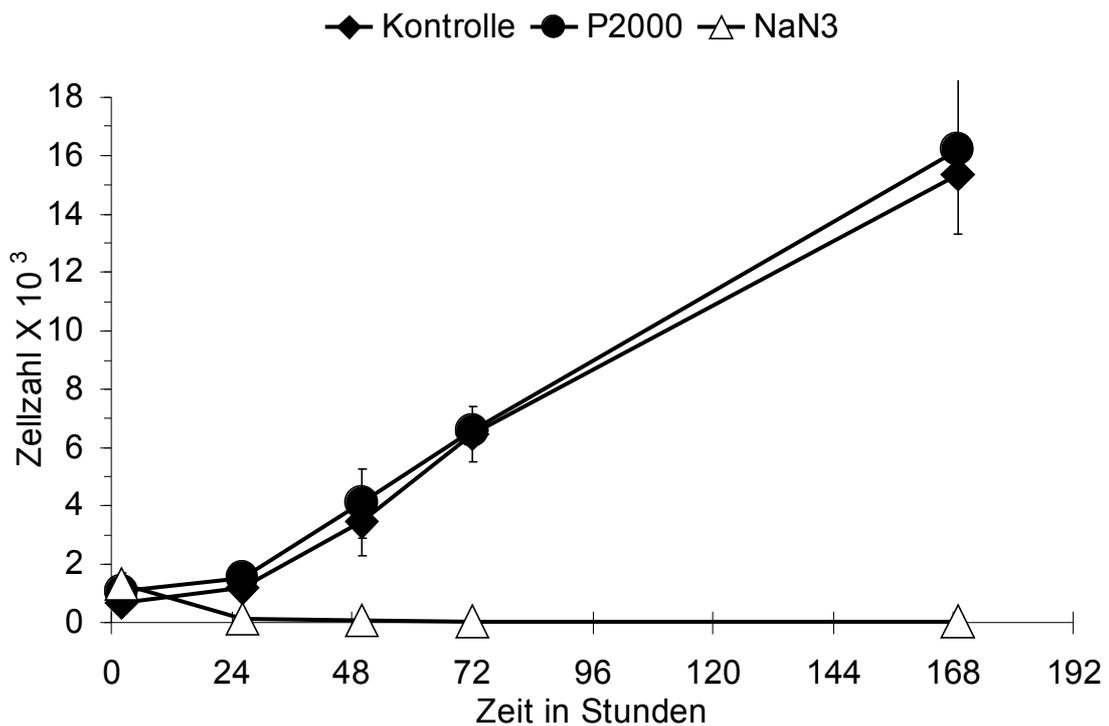


Abbildung 13: Wachstumskurve von MC3T3-E1-Zellen in direktem Materialkontakt 2, 26, 50, 72 und 169 Stunden nach Aussaat. MTT-Test nach Umrechnung der Zellzahl (vergleiche Abbildung 8).

### 3.2 Langzeittest

Ein angeschlossener Langzeittest sollte zeigen, ob möglicherweise durch eine Akkumulation von aus den Metallproben abgegebenen Substanzen eine Beeinträchtigung des Zellwachstums erfolgt. MC3T3-E1-Zellen wurden wiederum in direktem Materialkontakt auf Plättchen aus 316L (kaltverfestigt und lösungsgeglüht, 35 mm Ø), P2000 (kaltverfestigt und lösungsgeglüht, 35 mm Ø) sowie in Polystyrolschälchen ausgesät (Negativkontrolle, keine Zytotoxizität). Als Positivkontrolle (Zytotoxizität wird erwartet) wurde ein Ansatz zusätzlich mit 50 µM Nickel-Chlorid versetzt.

Es zeigte sich (Abbildung 14), dass die Zellzahl auf allen Probenkörpern sowie in den Schalen ohne Probenkörper nach 21 Tagen annähernd gleich war. Allerdings ergaben sich Unterschiede nach einer Woche, wobei die Zellzahlen auf den metallischen Probenkörpern erhöht waren. Die Zellzahl wurde alle sieben Tage durch Trypsinieren um 75% reduziert, die Zellen aber auf dem jeweiligen Material weiter kultiviert.

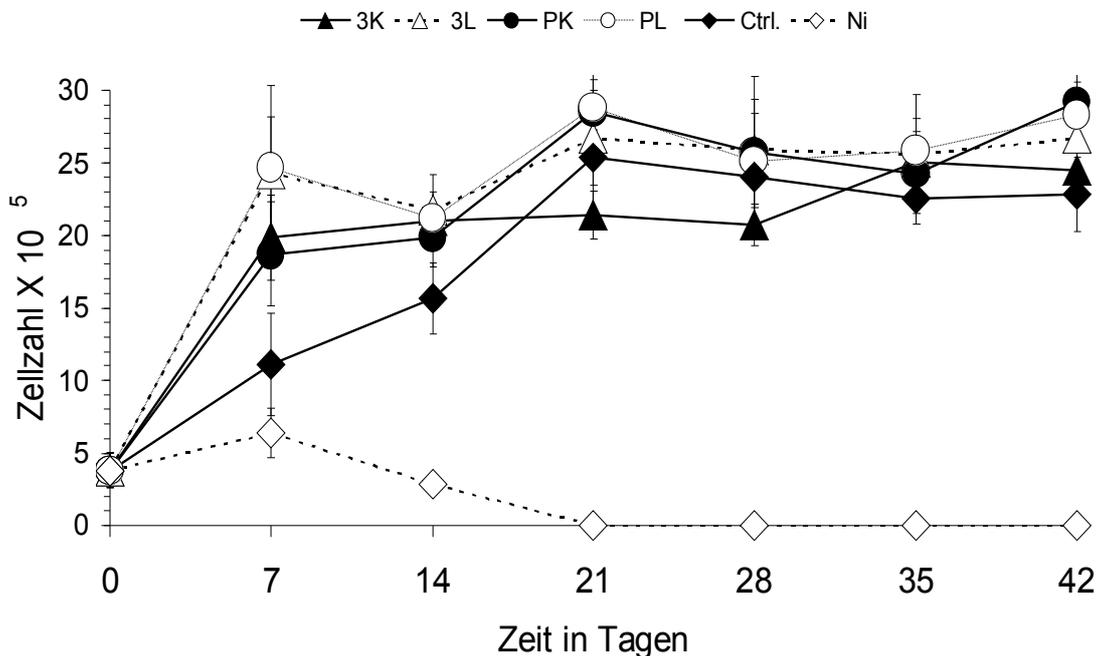
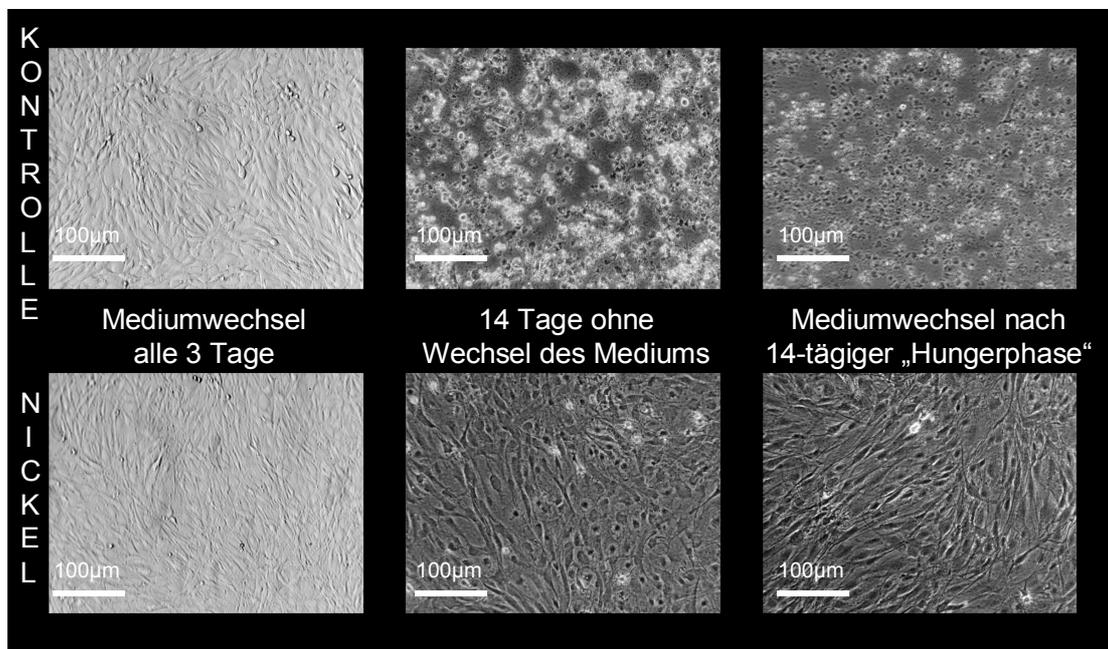


Abbildung 14: Langzeitwachstumskurve von MC3T3-E1-Zellen in direktem Materialkontakt mit 316L kaltverfestigt (3K), 316L lösungsgeglüht (3L), P2000 kaltverfestigt (PK), P2000 lösungsgeglüht (PL), 50 µM Nickel-Chlorid (Ni) und der Positivkontrolle (Ctrl) auf Polystyrol.

Ab der dritten Woche waren alle metallischen Probenkörper, sowie die Petrischalen aus Polystyrol, vor jeder Aufteilung und Zählung vollständig mit Zellen bewachsen. Zellen auf P2000 (kaltverfestigt und lösungsgeglüht) erreichten nach ca. 2 - 3 Wochen die gleiche Zellzahl ( $p > 0,05$ ), die nach der 6. Woche leicht ( $p < 0,05$ ) über der von Polystyrol lag (P2000 kaltverfestigt:  $29,25 \times 10^5$  Zellen; P2000 lösungsgeglüht:  $28,25 \times 10^5$  Zellen; Kontrolle:  $22,82 \times 10^5$  Zellen).

Die Proben, denen  $50 \mu\text{M}$  Nickel-Chlorid zugefügt worden war, zeigten eine klar verminderte Wachstumsgeschwindigkeit, so dass hier die Zellzahl durch die alle sieben Tage stattfindende Reduktion abnahm. Nach 21 Tagen waren keine Zellen mehr nachweisbar. Dennoch konnten diese Zellen zunächst ohne Trypsinierung weiter inkubiert werden. Ein Absterben der Zellen erfolgte nicht. Stattdessen setzte ein langsames Wachstum ein, das als Adaptation an den  $\text{NiCl}_2$ -Gehalt gedeutet wurde. Nach der Adaptationsphase war eine einmal wöchentliche Passagierung möglich. Interessanterweise unterschieden sich nickeladaptierte MC3T3-E1-Zellen von parentalen MC3T3-E1-Zellen durch die Morphologie (Abbildung 7).



*Abbildung 15: Vergleich von MC3T3-E1 Zellen mit nickeladaptierten MC3T3-E1-Zellen nach einer 14-tägigen Phase ohne Mediumwechsel. Während nickeladaptierte Zellen (untere Reihe) diesen Versuch gut überstehen, kugeln sich die nicht nickeladaptierten Zellen (obere Reihe) ab und gehen zu Grunde.*

Bei regulärem Mediumwechsel (2 - 3 x wöchentlich) erreichten parentale und nickeladaptierte Zellen einen konfluenten Zustand. Nickeladaptierte MC3T3-E1-Zellen erschienen auch unter diesen Bedingungen langezogen und spindelförmig.

Ein weiteres Charakteristikum der nickeladaptierten Zellen bestand in ihrer Fähigkeit, auch längere Phasen, bis zu 20 Tage, ohne Wechsel des Mediums zu überleben. Abbildung 15 zeigt einen typischen Versuch. Nach einer „Hungerphase“ von 14 Tagen wurde das Medium erneuert, um eine Regeneration zu ermöglichen. Man erkennt, dass nickeladaptierte MC3T3-E1-Zellen schnell und fast vollständig regenerieren, während sich die parentalen MC3T3-E1-Zellen, die bereits während des Versuchs abgelöst waren, nicht mehr erholten. Nach der Zugabe von Medium zeigte sich ein stellenweise fischzugartiges Wachstum der nickeladaptierten MC3T3-E1-Zellen.

### 3.3 Nickelgehalt von MC3T3-E1-Zellen

Für die folgenden Versuche war es wichtig zu wissen, ob MC3T3-E1-Zellen, die in direktem Materialkontakt zu nickelhaltigem 316L-Stahl gewachsen waren, mehr Nickel enthalten, als Zellen auf Polystyrol (Negativkontrolle) oder auf P2000.

Aus diesem Grund fand eine quantitative Analyse des Nickelgehaltes von MC3T3-E1-Zellen statt, die auf 316L-Stahl, P2000 oder Kontrollmaterial (Polystyrol) gewachsen waren (in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen, Prof. Hirner). Die Messungen wurden jeweils an zwei Proben durchgeführt. Bei jeder Probe wurde die Gesamtheit der aufgewachsenen Zellen Laser-abliert (2.4.6). Es zeigte sich (Tabelle 4), dass trotz der nominellen Nickelfreiheit von P2000, MC3T3-E1-Zellen einen um 76% höheren Nickelgehalt

	Probe 1	Probe 2	Durchschnitt	%
Polystyrol	24,7 pg	22,8 pg	23,75 pg	100%
P2000-Stahl	47,1 pg	36,5 pg	41,8 pg	176%
316L-Stahl	237,9 pg	241 pg	239,45 pg	1008%

*Tabelle 4: Nickelgehalt von MC3T3-E1 Zellen im direkten Materialkontakt mit Polystyrol (Kontrolle), P2000 und 316L in pg. Die Werte sind normiert auf  $10^5$  Zellen.* als die

Kontrollzellen aufwiesen. Bei MC3T3-E1-Zellen auf 316L-Stahl war der Nickelgehalt um 908% erhöht. Dies zeigt, dass MC3T3-E1-Zellen, die im direkten

Materialkontakt zu 316L-Stahl, aber auch zu P2000 wachsen, erhöhte zelluläre Nickelgehalte aufweisen.

### 3.4 BMP-2 Stimulation

#### 3.4.1 ALP-Expression bei direktem Materialkontakt

Durch Stimulation mit BMP-2 wird die Expression verschiedener knochenspezifischer Proteine angeregt, wie zum Beispiel Osteocalcin und alkalische Phosphatase, die besonders leicht nachgewiesen und quantifiziert werden kann. (siehe Material und Methoden 2.4.2). Zellen, die in direktem Materialkontakt gewachsen waren, sollten Auskunft darüber geben, ob der Kontakt mit dem Metall die Expression BMP-2-induzierter Proteine beeinflusst. Vereinfachend wurde hierzu ALP gemessen. Durch optische Kontrolle der konfluent ausgesäten Zellen konnte sichergestellt werden, dass jeweils gleiche Zellzahlen miteinander verglichen wurden. Die Bestimmung der ALP-Aktivität nach BMP-2-Stimulation wurde zunächst mit Zellen auf 316L-Stahl durchgeführt.

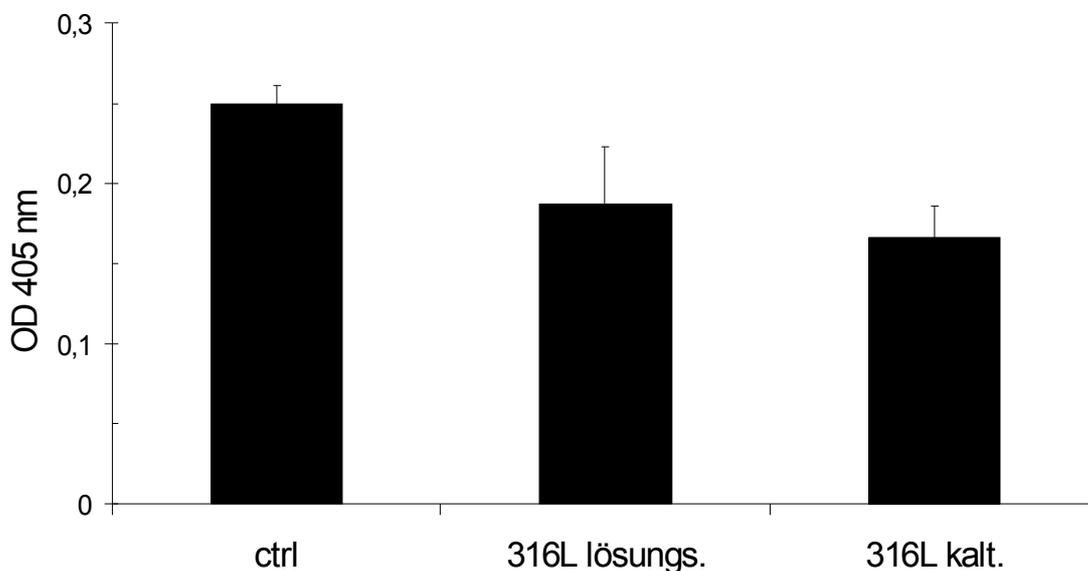
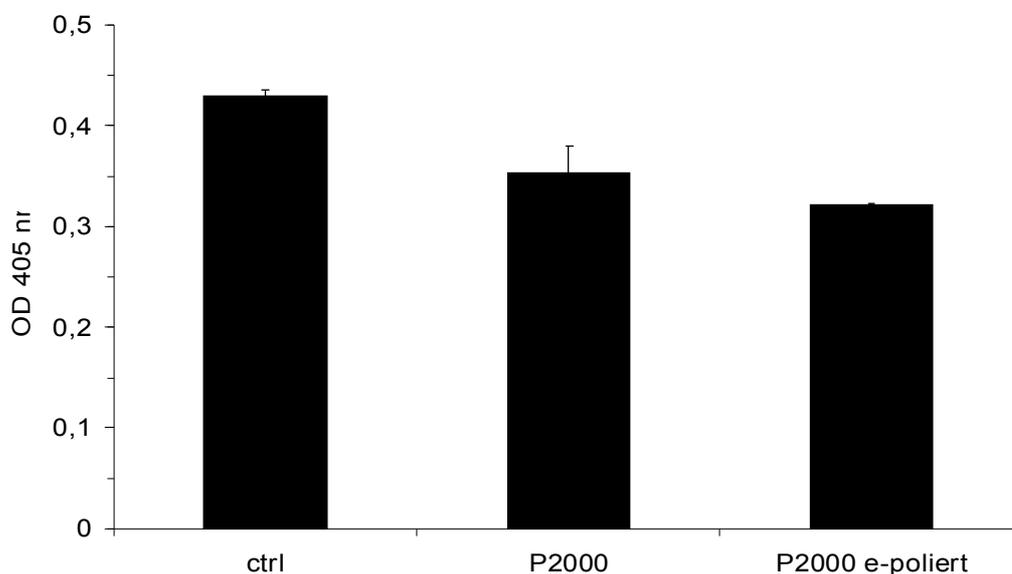


Abbildung 16: ALP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen unter BMP-2 Stimulation auf Polystyrol (ctrl.) und 316L lösungsgeglüht (lösungs.) sowie kaltverfestigtem (kalt.) 316L-Stahl.

Hierzu wurden lösungsgeglühte und kaltverfestigte, nicht elektropolierte Probenkörper mit einem Durchmesser von 35 mm in Polystyrolpetrischalen

(Positivkontrolle ohne Probeneinlage) mit MC3T3-E1-Zellen bedeckt und drei Tage mit 500 ng/ml BMP-2 (siehe Vorversuch Abb. 10) inkubiert. Die zellgebundene ALP-Aktivität wurde photometrisch bestimmt. Es zeigte sich (Abb.16), dass MC3T3-E1-Zellen, die in direktem Materialkontakt mit 316L-Stahl gewachsen waren, unter BMP-2 Stimulation signifikant weniger ALP aufwiesen als Zellen auf Polystyrol. Auf lösungsgeglühtem 316L- Stahl sank die ALP-Aktivität auf 75% ab ( $p < 0,01$ ). Die ALP-Aktivität von Zellen auf kaltverfestigtem 316L-Stahl beträgt nur 67% der Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Der Unterschied der ALP-Aktivität zwischen Zellen auf kaltverfestigtem und lösungs-geglühtem 316L-Stahl war nicht signifikant ( $p > 0,1$ ).

Hiernach waren MC3T3-E1-Zellen auf Polystyrol und kaltverfestigtem P2000 in ausgesät worden. Nach drei Tagen Stimulationszeit zeigten Zellen auf P2000 (Abb. 17) ebenfalls eine leicht verminderte ALP-Aktivität. Im Vergleich zur Kontrolle (Polystyrol) war die ALP-Aktivität von Zellen auf kaltverfestigtem, elektropoliertem P2000 um ca. 22 % reduziert ( $p < 0,002$ ). Bei kaltverfestigtem, nicht-elektropoliertem P2000 war die ALP-Aktivität auf ca. 91 % der Kontrolle herabgesetzt ( $p \sim 0,057$ ). Der Unterschied zwischen elektropoliertem und nicht



*Abbildung 17: ALP-Aktivität von MC3T3-E- Zellen unter BMP-2 Stimulation auf Polystyrol (ctrl) und P2000 sowie elektropoliertem P2000 beides kaltverfestigt.*

elektropoliertem kaltverfestigtem P2000 war nicht signifikant ( $p > 0,2$ ). Durch das Elektropolieren wird die oberste Schicht des Metalls abgetragen, wodurch Werk-

zeugspuren und Verunreinigungen des Materials entfernt werden. Der Rauheitswert für elektropolierten Stahl liegt daher deutlich niedriger (1,54 zu 3,24)

### 3.4.2 Beeinflussung der ALP-Aktivität durch Metall-Ionen

P2000- und 316L-Stahl bestehen aus verschiedenen Metall-Komponenten. Beide beinhalten Eisen, Chrom und Molybdän. Bei 316L-Stahl kommt noch Nickel, bei P2000 Mangan und Stickstoff hinzu. Alle diese Komponenten kommen theoretisch in Frage, um den zuvor gezeigten Metall-Effekt auf die ALP-Aktivität auszulösen.

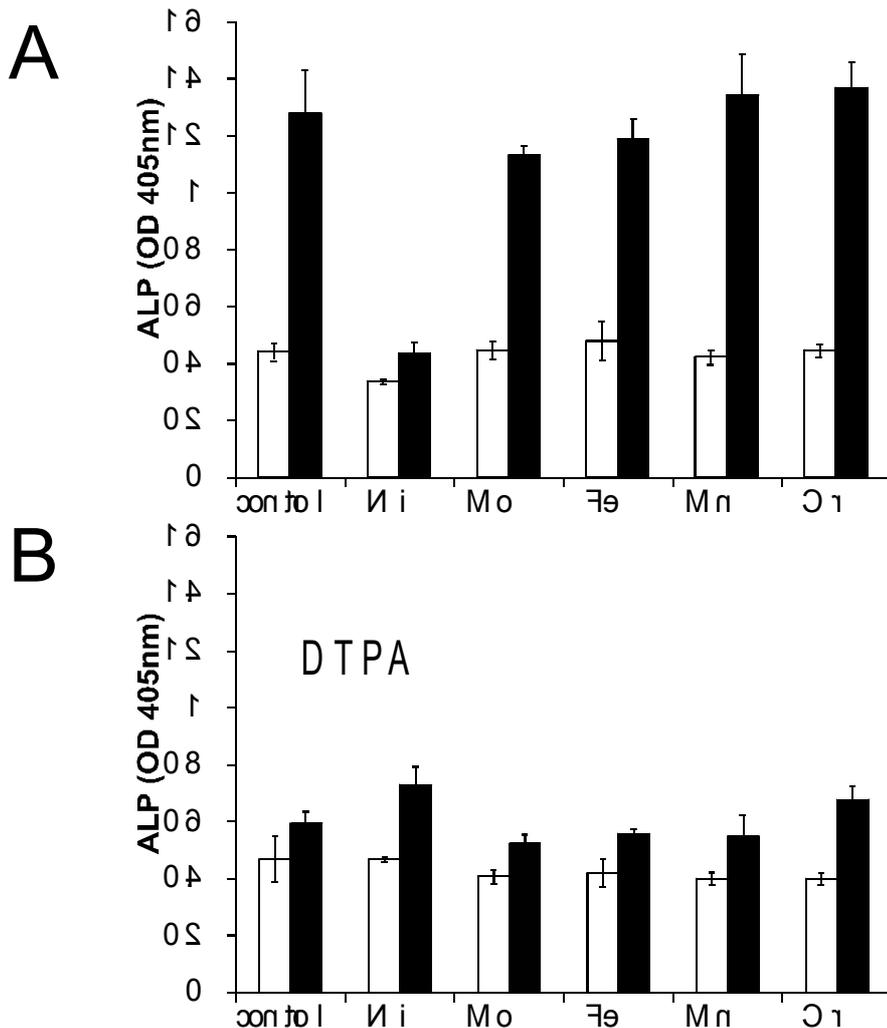


Abbildung 18: Einfluss von Metall-Ionen ( $50 \mu\text{M}$ ) auf die basale (weiße Säulen) und BMP-2 stimulierte (3d, schwarze Säulen) Aktivität von ALP. Kontrolle (control) (A) Molybdän (Mo), Eisen (Fe), Mangan (Mn) und Chrom (Cr) stören die ALP-Aktivität nicht. Nickel (Ni) hemmt die ALP nach BMP-2 Stimulation. (B) Chelatierung von Metall-Ionen mit DTPA hemmt den BMP-2 stimulierten Effekt; der hemmende Effekt von Nickel ist unter DTPA nicht erkennbar.

Durch Zugabe von Nickel-Chlorid, Molybdän-Chlorid, Eisen-Chlorid, Mangan-Chlorid, Chrom-Chlorid (jeweils  $50 \mu\text{M}$ ) zum Medium sollte herausgefunden

werden, welche Metallspezies, die in P2000 bzw. 316L enthalten sind, einen Effekt auf BMP-2 induzierte ALP ausüben können. MC3T3-E1-Zellen wurden dazu in Anwesenheit von Metall-Ionen-haltigem Medium drei Tage mit und ohne BMP-2-Stimulation inkubiert. Es zeigte sich, dass die Aktivität der ALP von Zellen, denen Molybdän-Chlorid, Eisen-Chlorid, Mangan-Chlorid oder Chrom-Chlorid zugegeben worden war, weder ohne noch mit BMP-2 Stimulation signifikant von denen der Kontrollzellen abwichen ( $p$  jeweils  $> 0,17$ ). Hingegen verminderte Nickel-Chlorid in Abwesenheit von BMP-2, insbesondere aber auch in Anwesenheit von BMP-2, die ALP-Aktivität auf 76,5% bzw. 34% der Kontrolle (Abbildung 18 A).

Um herauszufinden, ob die hemmenden Effekte von Metall-Ionen auf die ALP-Aktivität durch deren Chelatierung verhindert werden können, wurde das Experiment in Anwesenheit des Metall-Ionen-Chelators DTPA (siehe Vorversuche Abbildung 11) wiederholt. Es zeigte sich (Abbildung 18 B), dass 50  $\mu\text{M}$  Molybdän-Chlorid, Eisen-Chlorid, Mangan-Chlorid oder Chrom-Chlorid die ALP-Aktivität *ohne* Zusatz von BMP-2 nicht veränderten. Bei der Stimulation *mit* BMP-2 ergaben sich jedoch in Anwesenheit von DTPA ALP-Aktivitäten, die im Vergleich zum Versuch in Abbildung 18 A) vermindert waren. Lediglich Zellen, die Nickel-Chlorid und DTPA (je 50  $\mu\text{M}$ ) ausgesetzt waren, wiesen eine *höhere* ALP-Aktivität auf als ohne DTPA (+ 37% unstimuliert und + 66% BMP-2 stimuliert). Im Vergleich zur Kontrolle mit DTPA unter BMP-2 Stimulation bedeutet dies einen Zuwachs von 23%.

Eine herabgesetzte ALP-Aktivität war besonders bei nickeladaptierten (50  $\mu\text{M}$ ) Zellen im Vergleich zu parental MC3T3-E1-Zellen zu beobachten (Abb. 19) Ohne BMP-2 Stimulation erreichten nickeladaptierte und parentale Zellen, bei optisch kontrollierter gleicher Zellzahl, ähnliche ALP-Ausgangswerte ( $p > 0,05$ ).

Nach dreitägiger Stimulation mit BMP-2 war bei nickeladaptierten MC3T3-E1-Zellen, im Gegensatz zu parental Zellen, keine ALP-Aktivität mehr induzierbar. Diese Versuche zeigten, dass bei nickeladaptierten Zellen die BMP-2 stimulierbare ALP-Aktivität nachhaltig gestört ist.

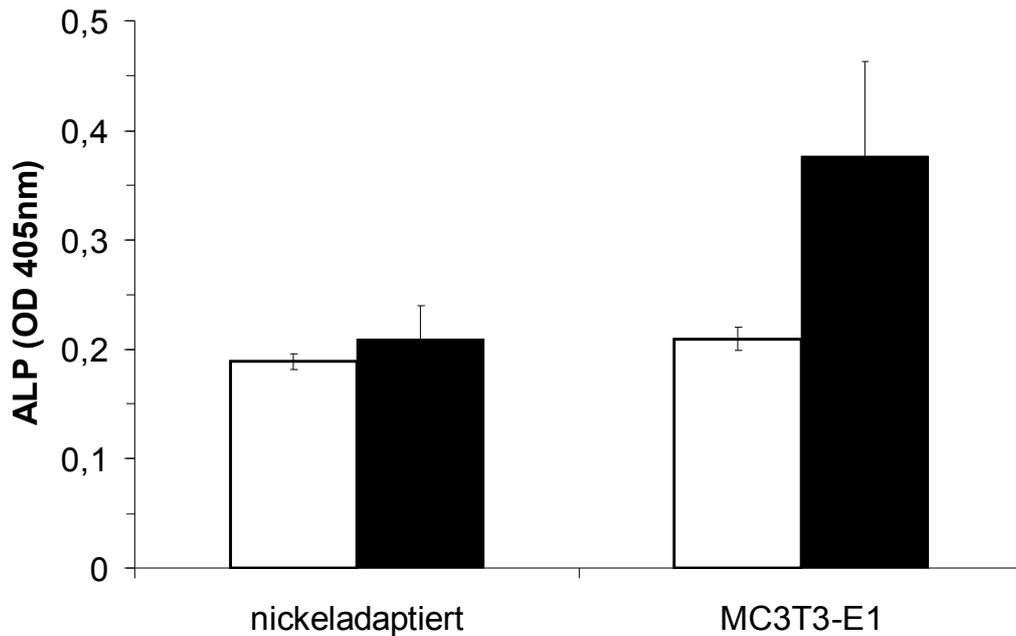


Abbildung 19: ALP-Aktivität mit (schwarze Säulen) und ohne (weiße Säule) BMP-2 Stimulation von nickeladaptierten Zellen im Vergleich zu parentalen MC3T3-E1-Zellen.

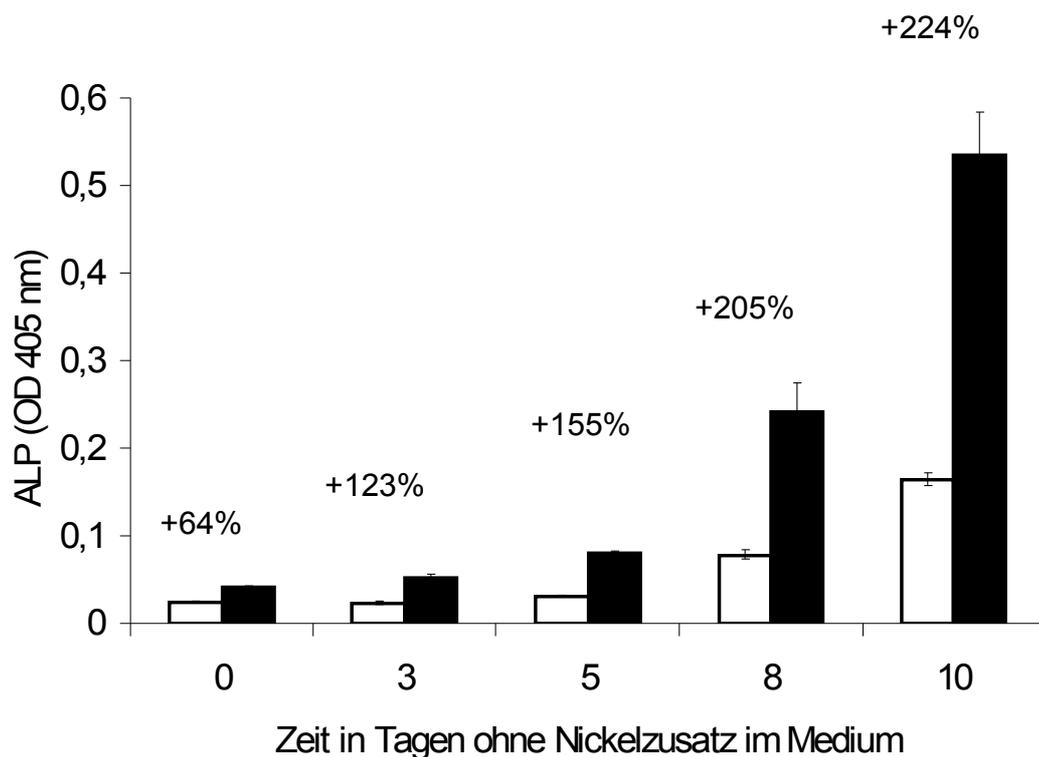
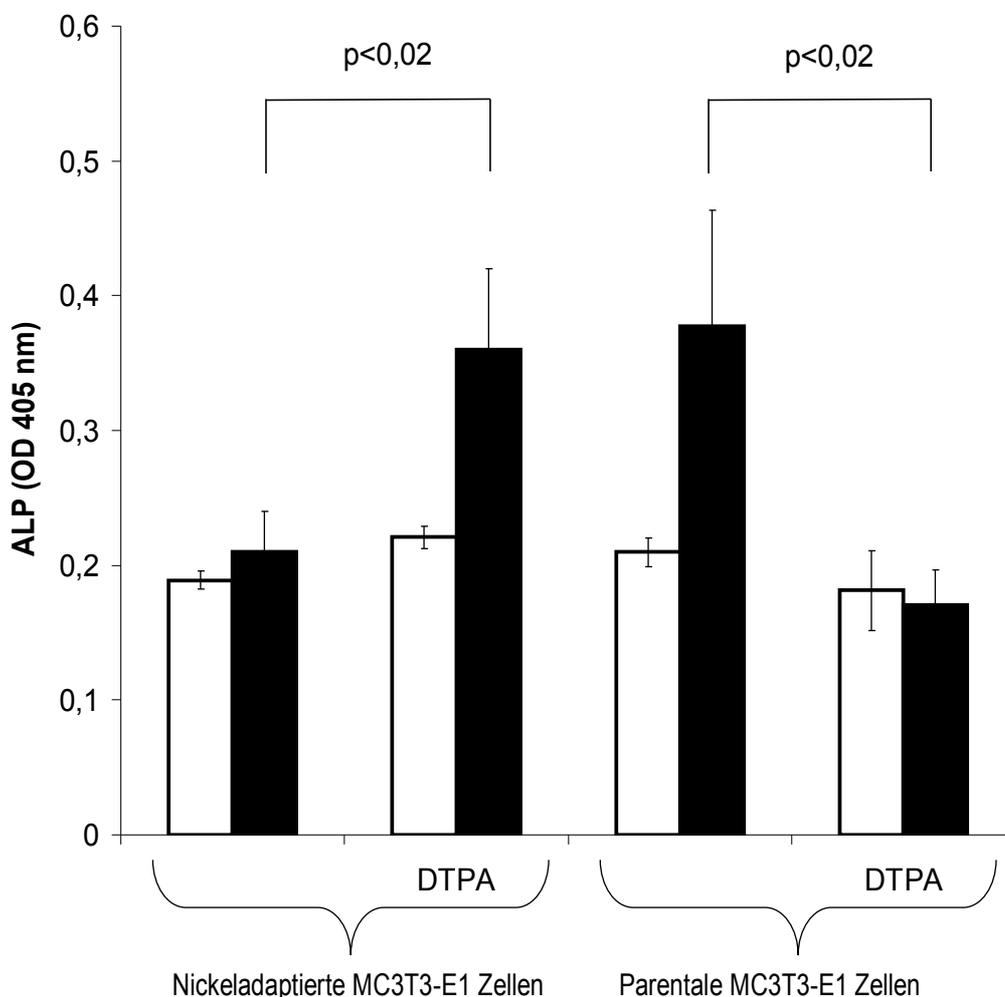


Abbildung 20: ALP-Aktivität nickeladaptierter MC3T3-E1-Zellen nach Übergang in nickelfreies Medium. BMP-2 Stimulationszeit: 3 Tage. Die Prozentzahlen zeigen die Zunahme im Vergleich zur nicht BMP-2 stimulierten Kontrolle, deren Zuwachs auf eine Steigerung der Zellzahl beruht. (Schwarze Säulen: BMP-2 stimuliert, weiße Säulen: nicht stimuliert)

Um zu testen, ob die inhibitorische Wirkung des Nickels reversibel war, wurden nickeladaptierte Zellen 0 - 8 Tage nach Absetzen des Nickelzusatzes mit BMP-2 stimuliert, so dass die Zellen am Ende dieses Versuchs zehn Tage Wachstum incl. drei Tage BMP-2-Stimulation zur Verfügung hatten. Es zeigte sich (Abbildung 20), dass die Induzierbarkeit der ALP durch BMP-2 progressiv zurückkehrte, je länger die MC3T3-E1-Zellen nickelfrei inkubiert wurden.

Wie bereits in Abbildung 18 B gezeigt, wird die BMP-2 stimulierbare ALP sowohl durch DTPA als auch durch Nickel-Ionen gehemmt, bei gleichzeitiger Applikation erfolgte jedoch eine Aktivierung. Dieser Effekt war auch an nickeladaptierten Zellen zu beobachten.



Nickeladaptierte Zellen in nickelhaltigem Medium und parentale MC3T3-E1-Zellen  
 Abbildung 21: ALP-Aktivität mit (schwarze Säule) und ohne (weiße Säule)  
 BMP-2 Stimulation nickeladaptierter (mit 50  $\mu$ M Nickel, links) und parentaler  
 MC3T3-E1-Zellen (rechts) unter Zugabe von DTPA (50  $\mu$ m)

wurden mit DTPA versetzt und über drei Tage mit BMP-2 stimuliert. Wie Abbildung

21 zeigt, sind nickeladaptierten Zellen, die keine BMP-2 induzierbare ALP-Aktivität mehr zeigten, unter dem Einfluss von DTPA (äquimolar zu Ni) wieder in der Lage, ihre ALP-Produktion um 72% ( $p < 0,02$ ) zu steigern. Dieser Zuwachs entsprach dem der ALP-Aktivität nicht nickel-behandelter MC3T3-E1-Zellen, der unter Zugabe von DTPA aus blieb (Abbildung 21). Die Versuche an parentalen und nickeladaptierten Zellen zeigten insgesamt, dass Nickel die BMP-2 induzierbare ALP reversibel hemmt und lassen vermuten, dass weitere DTPA chelatierbare Ionen für die Induktion der ALP durch BMP-2 notwendig sind.

Da DTPA die BMP-2 stimulierte ALP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen unterdrückt, jedoch bei nickeladaptierten Zellen zu einer Erhöhung der ALP-Aktivität führt, wurde vermutet, dass DTPA intrazelluläre Ionen chelatiert, die in der BMP-2 Signalkette von Bedeutung sind. Wie bereits beschrieben, spielen Zink-Finger Proteine eine Rolle unter anderem im Signalweg der BMP-2 Stimulation. Daher wurde die Rolle des Zink für die ALP-Induktion durch BMP-2 untersucht. Es zeigte sich (Abbildung 22), dass Zink bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  eine hohe ALP-Antwort der MC3T3-E1-Zellen auf BMP-2 Stimulation zulässt, bei höheren Konzentrationen jedoch eine Unterdrückung herbeiführt.

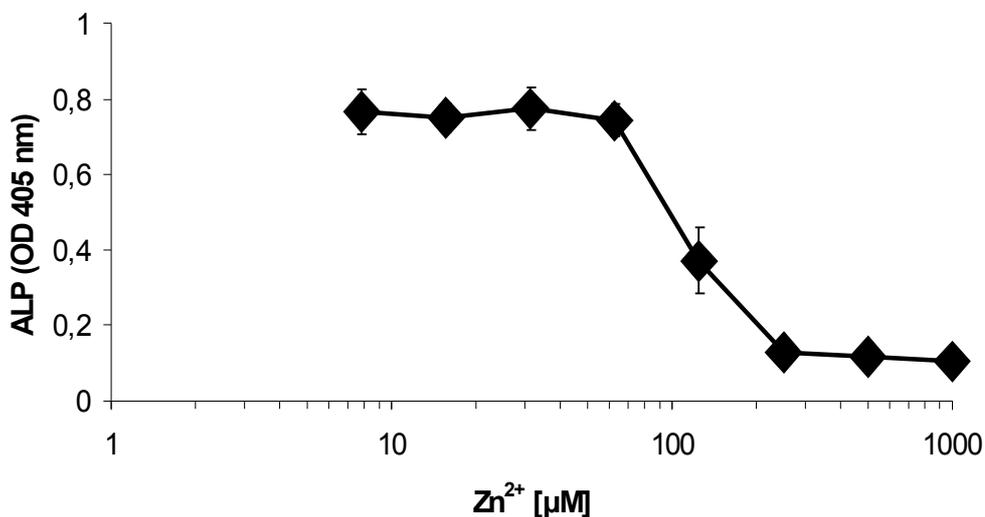


Abbildung 22: Effekt von Zink auf die ALP-Antwort von MC3T3-E1-Zellen nach BMP-2 Stimulation

In  
einem

nächsten Schritt erfolgte die BMP-2 Stimulation von MC3T3-E1-Zellen sowohl

unter Zusatz von DTPA als auch von Zink-Chlorid (50  $\mu\text{M}$ ) sowie einer Kombination von beidem.

Während BMP-2 bei Zellen ohne DTPA einen signifikanten ( $p < 0,01$ ) Anstieg der ALP-Aktivität herbeiführte (+269%, Abbildung 23) stieg die BMP-2 stimulierte ALP-Aktivität unter Zusatz von DTPA nur um 117% an. Zink-Chlorid (50  $\mu\text{M}$ ) allein bewirkte bei DTPA-behandelten Zellen ein Ansteigen der ALP-Aktivität auf Werte, die ähnlich der unstimulierten Positivkontrolle (ohne DTPA Zusatz) waren. Applikation von BMP-2 führte jedoch dann zu uneingeschränkter Steigerung der ALP unter DTPA, wenn Zink anwesend war (+ 306%,  $p < 0,01$ ). Diese Versuche zeigen, dass Zink ( $\leq 50 \mu\text{M}$ ) die ALP nur unwesentlich beeinflusst, aber dass es die DTPA-vermittelte Inhibition der BMP-2 stimulierten ALP aufheben kann.

Dieser eindrucksvolle Effekt des Zink auf BMP-2 stimulierte ALP wurde auch bei nickeladaptierten Zellen gefunden. Abbildung 24 zeigt einen Versuch, bei dem nickeladaptierte MC3T3-E1-Zellen über drei Tage mit BMP-2 stimuliert wurden, ohne dass es zu einer Zunahme von ALP kam (vergleiche Abbildung 19 und Abbildung 21).

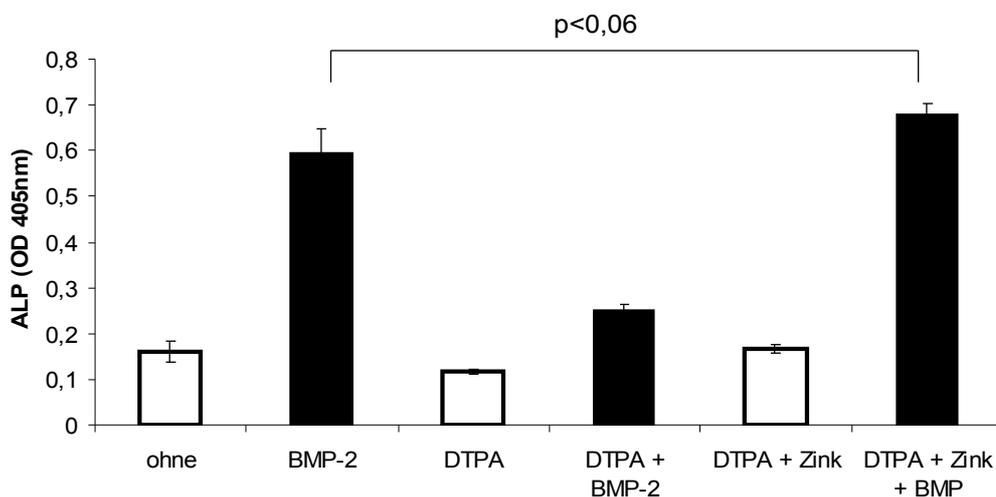


Abbildung 23: ALP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen mit (schwarze Säulen) und ohne (weiße Säulen) BMP-2-Stimulation unter Zusatz von DTPA und Zink.

Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Zink-Chlorid zu nickeladaptierten MC3T3-E1-Zellen bewirkte (Abbildung 24), dass nach Stimulation mit BMP-2 die ALP-Aktivität signifikant ( $p < 0,01$ ) zunahm (+ 100%).

Die basale ALP-Aktivität war bei nickeladaptierten Zellen (mit und ohne BMP-2 Stimulation) sowie bei den mit Zink versetzten, nicht-BMP-2-stimulierten Zellen annähernd gleich ( $p \sim 0,23$ ).

Die Ergebnisse legen das Vorhandensein eines kompetitiven Effektes nahe, bei dem Zink als positiver, Nickel als negativer Effektor der BMP-2 Wirkung auf die ALP fungiert. Um zu prüfen, ob ein solcher „Zink-Nickel-Schalter“ auch bei menschlichen Zellen am BMP-2-Signaling beteiligt ist, fanden entsprechende Versuche mit menschlichen Knochenmark-Stromazellen (hBMSC) statt. Diese wurden ebenfalls für drei Tage mit BMP-2 stimuliert.

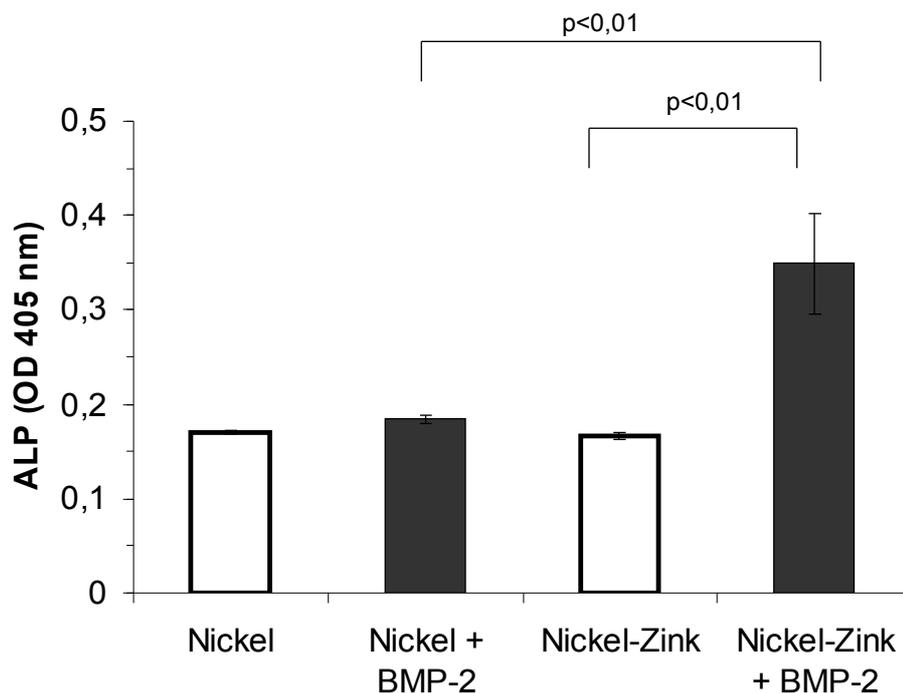


Abbildung 24: ALP-Aktivität von nickeladaptierten MC3T3-E1-Zellen mit (schwarze Säulen) und ohne (weiße Säulen) BMP-2 Stimulation unter Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Zink-Chlorid

hBMSC zeigten (Abbildung 25) nach BMP-2 Stimulation eine vergleichsweise geringe, dennoch signifikant ( $p \sim 0,01$ , + 40%) gesteigerte ALP-Aktivität. Zusatz von DTPA (50  $\mu\text{M}$ ) senkte die ALP-Aktivität nach BMP-2 Stimulation unter den Kontrollwert nicht-stimulierter Zellen (- 52,7 %,  $p < 0,01$ ).

Auch der Zusatz von 50  $\mu\text{M}$  Nickel-Chlorid senkte die BMP-2 stimulierte ALP-Aktivität um 33% ( $p < 0,03$ ), bezogen auf die BMP-2 stimulierten Zellen. Wiederum steigerte der gleichzeitige Zusatz von DTPA und Nickel die ALP der BMP-2 stimulierten Zellen (+ 50%). Schließlich konnte auch der Zinkzusatz eine Steigerung um 22% erwirken.

Zink ist demnach auch bei menschlichen Zellen in der Lage die Inhibition der BMP-2 stimulierten ALP durch Nickel zu antagonisieren.

Die Effekte von DTPA und Zink wurden ebenfalls bei BMP-2 stimulierten MC3T3-E1-Zellen geprüft, die auf nickelhaltigem nicht-elektropliertem 316L-Stahl gewachsen waren.

Wie Abbildung 26 A zeigt, wird die BMP-2 stimulierte ALP auf 316L-Stahl im Vergleich zur Kontrolle (MC3T3-E1-Zellen auf Polystyrol) um 20 - 30% vermindert.

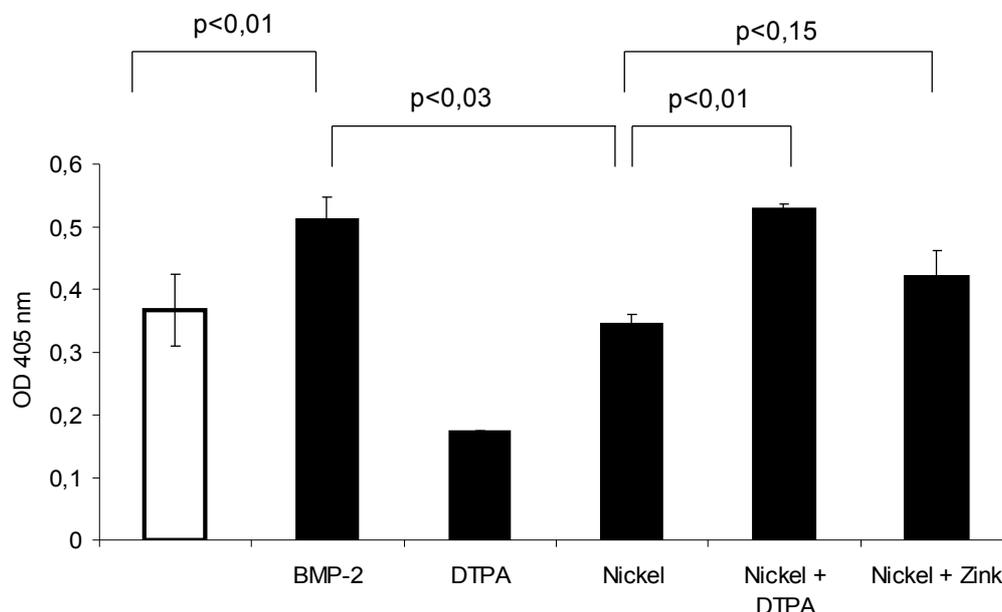


Abbildung 25: ALP-Aktivität humaner Zellen (hBMSC) mit (schwarze Säule) und ohne (weiße Säule) BMP-2 Stimulation unter Zusatz von Nickel, DTPA und Zink

DTPA reduzierte die ALP nach BMP-2 Stimulation auf ein bei allen Ansätzen gleiches Maß (Abbildung 26 B), was für eine Beeinträchtigung des BMP-2-Signals spricht und zudem die Gleichheit der Zellzahl auf allen Materialien unterstreicht. Schließlich wirkte Zink ( $Zn^{2+}$ ) auf die BMP-2 induzierte ALP leicht erhöhend. Dieser Effekt war etwas stärker ausgebildet, wenn MC3T3-E1-Zellen auf lösungsgeglühtem oder kaltverfestigtem 316L-Stahl gewachsen waren (Abbildung 26 C).

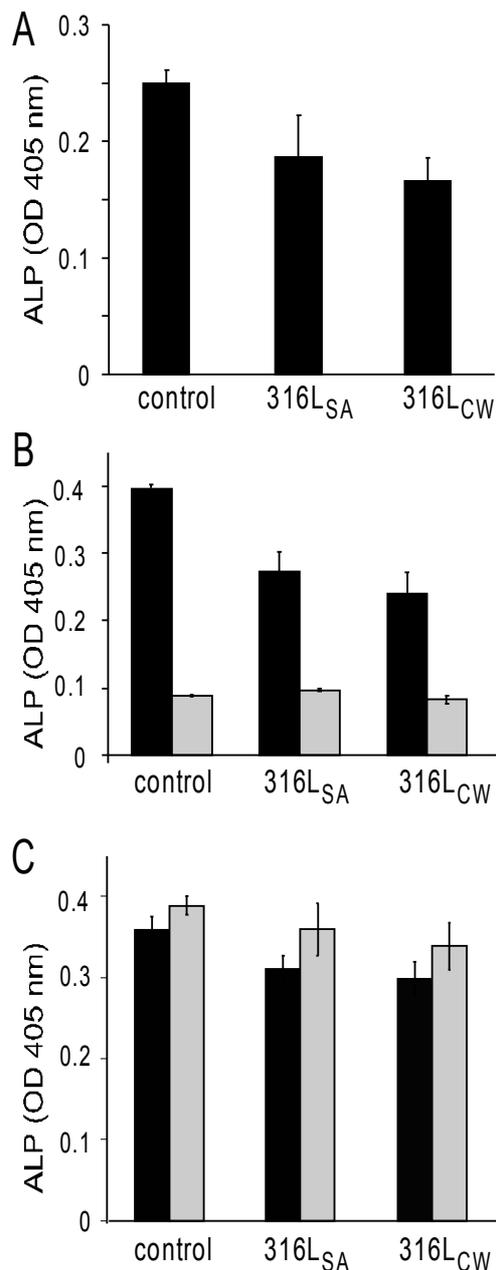


Abbildung 26: ALP-Aktivität von MC3T3-E1-Zellen auf nickelhaltigem 316L-Stahl unter Zusatz von BMP-2 (A-C, schwarze Säulen), BMP-2 und 50  $\mu$ M DTPA (Abbildung 26 B, graue Säulen) sowie BMP-2 und 50  $\mu$ M Zink (Abbildung 26 C, graue Säulen)

### 3.5 intrazelluläre pH-Messungen

Mögliche Änderungen des intrazellulären pH-Wertes ( $pH_i$ ), die durch den direkten Kontakt der Zellen mit P2000 oder 316L entstanden sein könnten, wurden mittels Ratio Imaging an BCECF-beladenen Zellen überprüft.

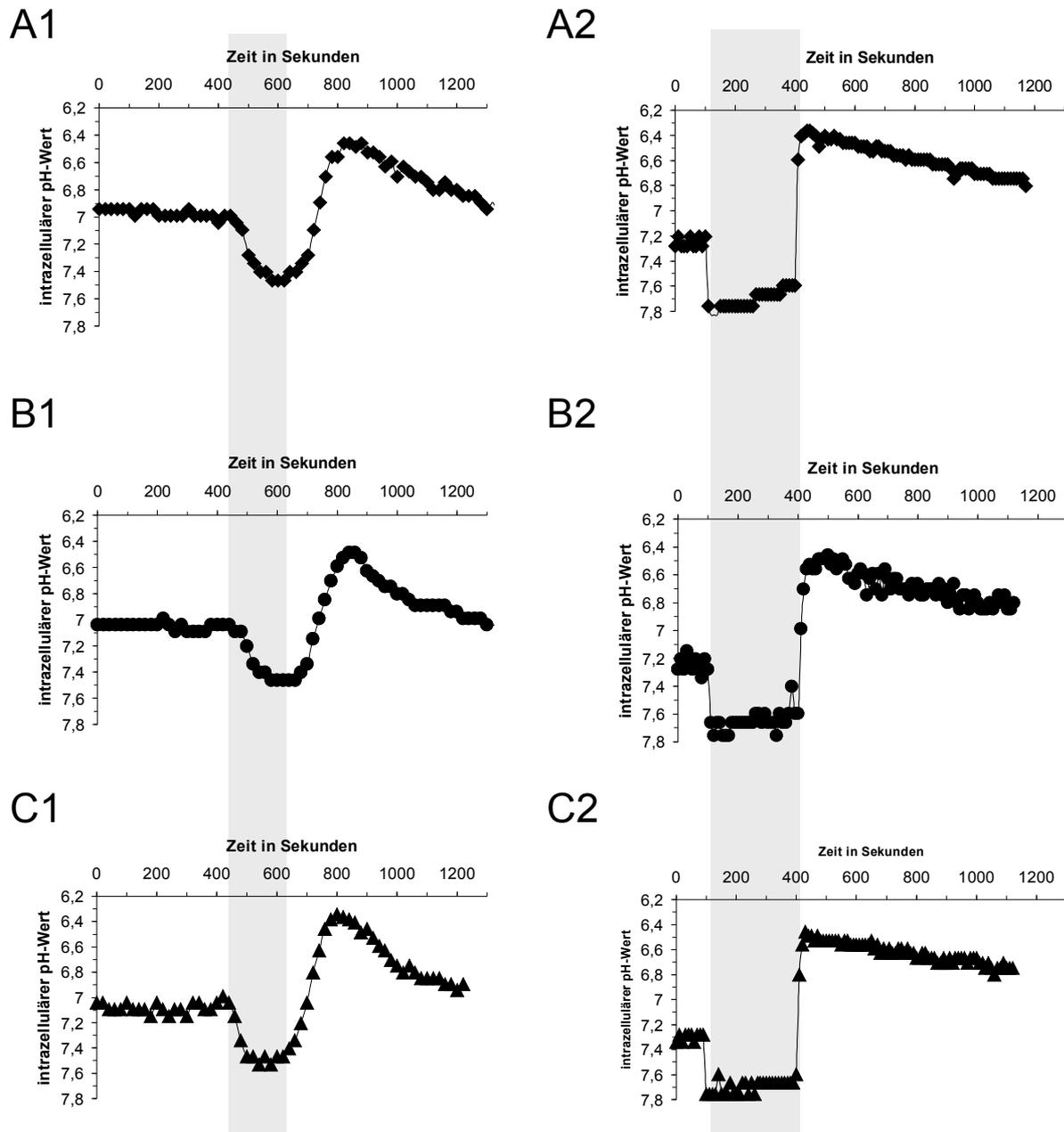


Abbildung 27 : Messung des steady state  $pH_i$  und der  $pH_i$ -Regulation mit der Ammonium-Präpuls-Methode. Gegenüberstellung der  $pH_i$ -Kurven, aufgenommen in ACSF (bicarbonatgepuffert, A1 - C1) und in HBS (Hepes-gepuffert, A2 - C2). Die graue Fläche zeigt die Dauer der Ammonium-Chlorid-Applikation (20 mM, 180 sec (A1-C1) bzw. 300 sec (A2-C2)). Jede Messung ist ein Mittelwert von 50-100 konfluent gewachsenen Zellen auf Glas (A), P2000 (B), und 316L (C).

Zudem wurde die Fähigkeit der Zellen zur  $\text{pH}_i$ -Regulation unter bicarbonat-gepufferten und bicarbonatfreien Bedingungen getestet. Dazu wurde die Ammonium-Präpuls-Methode (2.4.4) eingesetzt.

Abbildung 27 zeigt ein typisches Ergebnis. Zu erkennen ist, dass der  $\text{pH}_i$  bei Einwaschen der Ammonium-Chlorid-haltigen Lösung ansteigt, beim Auswaschen abfällt und schließlich - bedingt durch die Säureextrusion der Zellen - wieder ansteigt.

In der rechten Darstellung (Abb. 27, A2 bis C2) wird deutlich, dass MC3T3-E1-Zellen auf Glas, 316L und P2000 unter bicarbonatfreien Bedingungen einen ähnlichen steady state  $\text{pH}_i$ -Wert von 7,25 - 7,3 aufweisen. Der Anstieg des  $\text{pH}_i$  in den alkalischen Bereich, um 0,5 pH-Einheiten, erfolgte während des Ammonium-Pulses auf allen Materialien innerhalb von 20 Sekunden, da die ammoniumhaltige Lösung, bedingt durch ein schnelles Superfusionsystem, innerhalb von 20 Sekunden vollständig eingewaschen wurde. Bei anhaltender Ammonium-Chlorid-Exposition fiel der  $\text{pH}_i$  jedoch innerhalb von 5 min wieder leicht ab. Diese  $\text{pH}_i$ -Veränderungen waren vom Material unabhängig (siehe Tab.5). Damit ist gezeigt, dass sich die intrinsische Pufferkapazität der Zellen auf P2000 und 316L-Stahl nicht verändert. Die an die überschießende Azidose anschließende Regulation des  $\text{pH}_i$  erfolgte unter HEPES-gepufferten Bedingungen linear (Abbildung 27, A2-C2) und war auf 316L verzögert, nicht jedoch auf P2000, wie aus den in Tab. 5 aufgelisteten Steigungen der Geradengleichungen und  $\Delta \text{pH}_i/\text{min}$  ersichtlich ist. Diese Ergebnisse sprechen für eine Verminderung der Aktivität des Natrium-Protonen-Austauschs in MC3T3-E1-Zellen auf 316L, nicht aber auf P2000.

Unter bicarbonatgepufferten Bedingungen (Abb. 27 A1-C1) waren materialbedingte Veränderungen der  $\text{pH}_i$ -Regulation ebenfalls zu erkennen. Hervorzuheben ist, dass der steady state  $\text{pH}_i$  bei allen Zellen um etwa 0,22 - 0,3 pH Einheiten geringer war, was auf den Beitrag von Bicarbonat-Ionen bei der Regulation des steady state  $\text{pH}_i$  zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu HEPES-gepufferten Bedingungen erscheinen die Ammonium-bedingten  $\text{pH}_i$ -Verschiebungen "verschliffen" (Abbildung 27, A1-C1). Diese Unterschiede sind zum Teil versuchsbedingt und beruhen darauf, dass in bicarbonatgepuffelter Lösung eine konstante Superfusion mit  $\text{CO}_2$ -begaster Lösung gewählt wurde, was die Zeiten für einen vollständigen Lösungswechsel auf ca. eine Minute verlängerte. Zudem kam es während der Applikation von Ammonium-Chlorid

bereits zu einem deutlichen Abfall des  $pH_i$  (Wiederanstieg der Kurve), der darauf hindeutet, dass die Zellen in bicarbonathaltiger Lösung Verschiebungen des  $pH_i$  in alkalische Richtung effizient regulieren können. Die Regulation der nach Auswaschen des  $NH_4Cl$  einsetzenden Azidose war insgesamt schneller als in Hebes-gepufferter Lösung. Der Verlauf des  $pH_i$  war nur zu Beginn der  $pH_i$ -Regulation annähernd linear und wurde daher nur in einem Zeitintervall von der 440ten bis 740ten Sekunde nach Ende der Ammonium-Applikation gemessen (Steigungen der Ausgleichsgeraden, siehe Tabelle 5). So gab es im Vergleich zu Glas als Trägermaterial keine Zunahme der Säureextrusion bei Zellen auf P2000, jedoch auf 316L (von 0,068 (Glas) auf 0,1  $\Delta pH_i/min$ ). Diese Zunahme zeigt, dass die bicarbonatabhängige Säureextrusion der Zellen auf 316L im Vergleich zur Kontrolle beschleunigt verläuft.

Material	Lösung	steady state	Alkalose	Azidose	Säureextrusion	$\Delta pH_i/min$
Glas	ACSF	6,95	7,45	6,45	$y=0,001x+5,5041$	0,068
P2000	ACSF	7,05	7,45	6,52	$y=0,0011x+5,6929$	0,066
316L	ACSF	7,08	7,5	6,35	$y=0,0016x+4,8811$	0,1
Glas	HBS	7,25	7,75	6,36	$y=0,0006x+6,1784$	0,036
P2000	HBS	7,25	7,65	6,52	$y=0,0005x+6,2993$	0,032
316L	HBS	7,3	7,7	6,45	$y=0,0004x+6,3443$	0,014

*Tabelle 5:  $pH_i$ -Werte des Ammonium-Präpuls-Versuchs aus Abbildung 27 (S.40) in bicarbonat- (ACSF) und Hebes-gepufferter Lösung (HBS). Die Säureextrusion entspricht der Steigung der (gezeigten)berechneten Ausgleichgeraden.*

### 3.6 CRAC (Calcium Release Activated Current)

Die Auswirkungen von P2000 und 316L auf Calciumströme durch CRAC-Kanäle wurden getestet, indem MC3T3-E1-Zellen zunächst für drei Tage auf den entsprechenden Materialien bis zur Konfluenz kultiviert wurden. Anschließend wurden sie mit dem Calciumfarbstoff Fura-2 beladen und einem „Calcium withdrawal - calcium readdition“ - Protokoll unterzogen. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur in HBS durchgeführt.

Wie erwartet [vgl. Wiemann et al. 1998], zeigten die zuvor in Calcium-freier Lösung mit Thapsigargin behandelten Zellen nach Zugabe von Calcium zur extrazellulären Flüssigkeit ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Zunahme des Ratios 340/380 von 0,75 auf 0,98). Mit Entzug des extrazellulären Calciums kehrte dieser Wert innerhalb von 2 - 10 min auf den Ausgangswert zurück (68 Zellen in drei Versuchen). MC3T3-E1-Zellen, die in direktem Materialkontakt mit P2000 standen, zeigten unter diesen Bedingungen einen intrazellulären Calciumanstieg, der von Kontrollzellen auf Polystyrol nicht unterscheidbar war (57 Zellen in drei Versuchen). In Abbildung 28 sind typische Calcium-Transienten zweier repräsentativer Zellen überlagert.

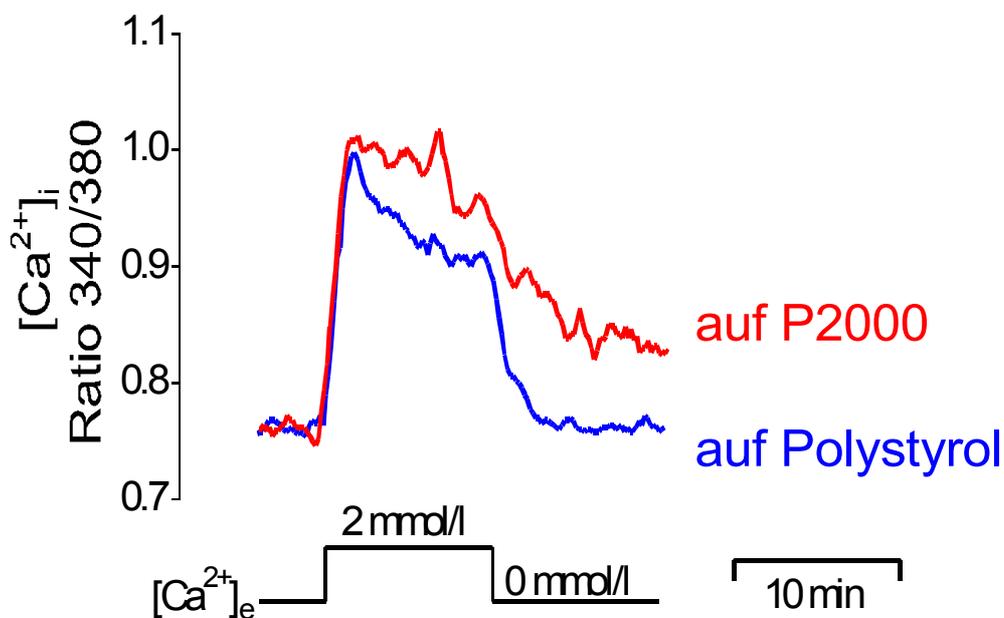


Abbildung 28: Calciumeinstroms durch CRAC-Kanäle von Zellen auf Polystyrol und P2000. CRAC-Kanäle wurden durch Thapsigargin-Behandlung geöffnet

Anders waren die Verhältnisse bei Zellen, die auf 316L-Stahl gewachsen waren (Plättchen 1x1,5 cm). Abbildung 29 (oben) zeigt ein typisches Experiment. Man erkennt zunächst den transienten Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von Thapsigargin. Erhöhung der *extrazellulären* Calciumkonzentration führte auch hier zum Anstieg der *intrazellulären* Calciumkonzentration, der jedoch nur bei zwei von insgesamt 57 Zellen gefunden wurde (Abb. 29 oben). Bei der Mehrheit der Zellen (55 von 57, Abb. 29 unten) wurde nach Zugabe des extrazellulären Calciums (2 mmol/l) *keine* Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration gefunden. Dieses Experiment zeigt, dass CRAC-Kanäle oder deren Öffnung bei Zellen auf nickelhaltigem 316L-Stahl (aber nicht auf P2000) beeinträchtigt sind.

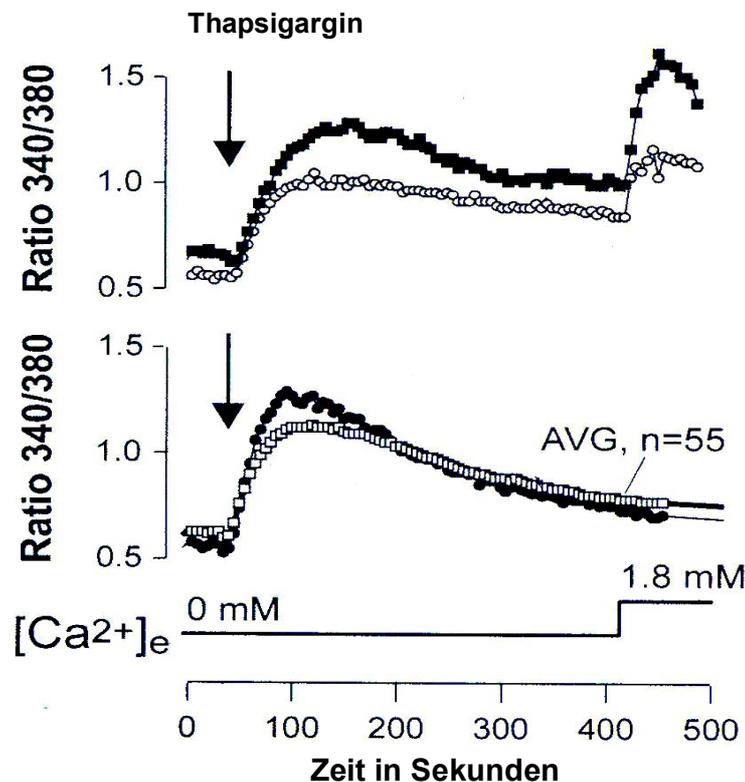


Abbildung 29: Messung intrazellulärer Calciumveränderungen durch Calcium Release Activated Current-Kanäle mittels Calcium-withdrawal-readdition-Protokoll. Der Calciumeinstrom durch CRAC-Kanäle ist bei Zellen auf 316L-Stahl vermindert. Dargestellt ist das Ratio 340/380 Fura-2 beladener MC3T3-E1-Zellen (3 Tagen auf 316L-Stahl). Die Entladung intrazellulärer Calciumspeicher erfolgte durch Thapsigargin unter extrazellulär Calcium-freien Bedingungen ( $[\text{Ca}^{2+}]_e = 0 \text{ mM}$ ). Oben: nur 2 der 57 Zellen zeigen einen CRAC-bedingten Calciumanstieg bei Zugabe von Calcium. Unten: bei 55 der 57 Zellen (AVG = Mittelwert der nicht reagierenden Zellen, schwarze Kurve) fehlt der Calciumanstieg. Die schwarze untere Kurve repräsentiert eine typische Zelle. Alle Kurven stammen aus dem gleichen Experiment.

## **4. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der nickelfreie Stahl P2000 auf seine Biokompatibilität in vitro, nach DIN ISO Norm 10993-5, getestet. Da dieser Stahl für Knochenimplantate besonders geeignet erscheint, wurden in vitro-Experimente mit MC3T3-E1-Zellen im direkten Materialkontakt durchgeführt. Darüber hinaus wurden Versuche zum Langzeitwachstum, zur BMP-2-Stimulierbarkeit, zum Verhalten des transmembranösen Calciumeinstroms sowie zur intrazellulären pH-Regulation der Zellen angestellt und der Vergleich zu nickelhaltigem 316L-Stahl gezogen. In parallelen Experimenten wurde der Einfluss von Metall-Ionen auf die BMP-2 stimulierte ALP-Expression untersucht. Die wichtigsten Befunde waren, dass Zellen auf P2000-Stahl wachsen und mit BMP-2 stimulierbar sind. Sie nehmen auf diesem Stahl deutlich weniger Nickel auf, als auf 316L-Stahl (Messung mit LA-ICP-MS). Nickel-Ionen selbst hemmen von allen in 316L-Stahl enthaltenen Metallen die BMP-2 stimulierte ALP besonders effektiv, wobei diese Hemmung durch Zink antagonisiert werden kann. Dieser Antagonismus wurde auch bei humanen Stromazellen nach BMP-2-Stimulation gefunden.

### **4.1 Biokompatibilität**

Die Europäische Norm zur Biologischen Beurteilung von Medizinprodukten (DIN ISO 10993-1 bis 12, vom 21. November 1997) regelt im Abschnitt fünf die Prüfung von Implantatmaterialien auf in vitro-Zytotoxizität. Dabei soll eine Inkubation von Kulturzellen mit dem Testmaterial direkt oder indirekt (Diffusion von Substanzen aus dem Produkt) stattfinden. In dieser Untersuchung wurde der direkte Zellkontakt mit P2000 gewählt, damit keine Schicht zwischen Zellen und Material die eventuell aus dem Metall diffundierenden Stoffe behindern konnte. Der direkte Materialkontakt der Zellen stellte jedoch spezifische Anforderungen an die Form der Probenkörper. Diese wurden speziell gefertigt, um den Boden der Gefäße komplett zu bedecken, so dass möglichst alle Zellen in der Kultur mit dem Metall in Kontakt kamen.

Bei der Herstellung der Metallplättchen entstanden Prüfkörper mit einer Rauigkeit, die Material-bedingt leicht unterschiedlich und von der der Negativkontrolle (Polystyrol) verschieden war. Das Abtragen der obersten Schicht

durch Elektropolieren verringerte diese Rauigkeit und entfernte zudem mögliche Verunreinigungen durch andere Stähle, die zur Bearbeitung der Proben eingesetzt worden waren. Für alle Untersuchungen an Zellen ist die Rauigkeit des Trägermaterials bedeutsam, da sie Adhäsion und Differenzierung der Zellen beeinflussen kann [Linez-Bataillon et al. 2002, Keller et al. 2003]. Dies gilt auch für die Bildung der ALP-Aktivität, die als empfindlicher Indikator gilt [Citeau et al. 2005]. Da der Vergleich der ALP-Aktivität gleicher Zellzahlen auf elektroliertem (Ra:1,54) und nicht-elektroliertem P2000 (Ra: 3,24) keine signifikante Änderung herbeiführte, scheint der Aspekt der Rauigkeit für die hier verwendeten Probenkörper jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein. Auch bei mikroskopischer Kontrolle waren Zellen auf P2000-Prüfkörpern keineswegs in Tal-Strukturen eingebettet, sondern lagen flach ausgebreitet auf der Oberfläche. Die Adhäsion der Zellen, abgeschätzt nach der Zellform und der Anzahl der Anhaftungspunkte, erschien ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

Laut der o.g. Norm wird ein Material zur Negativkontrolle benötigt, dass *keine* zytotoxische Zellreaktion hervorruft, wie zum Beispiel das hier verwendete, Zellkultur-getestete Polystyrol. Demgegenüber ruft eine Positivkontrolle eine reproduzierbare zytotoxische Reaktion hervor und zeigt dadurch die korrekte Funktion des Prüfsystems an. Bei metallischen Probenkörpern ist die Auswahl solcher Materialien eingeschränkt. Metallisches Kupfer wirkte zwar stark zytotoxisch, interferierte jedoch mit dem MTT-Test. Um dennoch die Kriterien der DIN Norm erfüllen zu können, wurde Natriumazid eingesetzt, das Zellen auf allen Metallen absterben ließ, den MTT-Test jedoch nicht beeinflusste. Die Zellen wurden wie gefordert in der Phase des logarithmischen Wachstums eingesetzt, waren frei von Mycoplasmen, und vertrugen den Zusatz von Antibiotika zum Kulturmedium. Da unter diesen methodischen Rahmenbedingungen weder qualitative noch quantitative Veränderungen der Morphologie oder des Wachstums (über 3 Tage) bei Zellen auf P2000 feststellbar waren, muss der Stahl daher sowohl in kaltverfestigter als auch in lösungsgeglühter Form als biokompatibles Material eingestuft werden. Dennoch ergaben sich in den übrigen Untersuchungen durchaus Unterschiede zwischen Zellen auf Polystyrol, P2000 und 316L.

## 4.2 Langzeittest

Obwohl ein Langzeittest nicht von der DIN ISO Norm für in vitro-Tests vorgesehen ist, erschien eine 6-wöchige Kultivierung der Zellen unter Wachstumsbedingungen zunächst geeignet, um möglicherweise langsam einsetzende Schädigungen erkennen zu können, die z.B. durch eine Akkumulation von Schadstoffen zustande kommen könnten. Auch unter diesen Bedingungen fanden sich nach 6 Wochen keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl. Dennoch schienen Zellen auf P2000 insbesondere zu Beginn schneller zu wachsen als auf Polystyrol und auch in der 3.-6. Woche lagen die Werte teilweise über denen der Kontrollen. Da zur Ermittlung der Zellzahl jedoch abgelöste Zellen nach Trypsinierung verwendet wurden, könnten eine geringere Zellzahl im Überstand auch auf eine festere, d.h. Trypsin-beständigere Adhäsion der Zellen auf Polystyrol hindeuten. Da Zellen an extrazellulären Proteinen anheften, die sie selbst sezernieren (z.B. Fibronectin [Horton 1995, Liu et al. 1997]), könnten Unterschiede zwischen den Oberflächen im Verlauf des Experiments durch progressive Bindung von Adhäsionsfaktoren verringert worden sein. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten Untersuchungen zur Qualität der von den Zellen sezernierten Oberflächenproteine erfolgen. Festzuhalten bleibt dennoch, dass MC3T3-E1 Zellen auf P2000 und 316L normal adhärten und normale Zellformen ausbildeten. Der Langzeittest stützt daher die Befunde der vorangegangenen Biokompatibilitätstestung.

## 4.3 BMP-2 Stimulation

In dieser Arbeit bestätigte sich, dass lösliches BMP-2 die ALP-Aktivität von MC3T3-E1 Zellen auf Metallen steigert. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für andere Knochenzellen auf diversen Oberflächen [Kim et al. 1997] gemacht. Die Steigerung der ALP-Aktivität durch BMP-2 sowohl auf 316L als auch auf P2000 und die Unterschiede zum Kontrollmaterial wurden jedoch erstmals im Rahmen dieser Untersuchungen gezeigt. Dabei war insgesamt eine Verminderung der BMP-2 stimulierten ALP-Aktivität zu erkennen, die jedoch auf 316L-Stahl deutlicher ausgeprägt war.

Die Hemmung der ALP-Aktivität auf kaltverfestigtem P2000 betrug 9 % (Abb.17) und war damit nicht signifikant. Auch die verschiedenen Rauigkeiten hatten, wie schon unter 4.1 für das Wachstum der Zellen festgestellt, im Bereich von  $R_a$ : 1,54-

3,24 keinen erkennbaren Einfluss. Man kann daher schlussfolgern, dass weder das P2000 Material selbst noch die Rauigkeit seiner Oberfläche (in den Grenzen  $R_a$ : 1,54-3,24) die Aktivität der BMP-2 induzierten ALP beeinflussen. Dennoch wurde bei elektropoliertem P2000 eine signifikant verminderte ALP-Aktivität beobachtet (-22%), deren mögliche Ursachen im Folgenden diskutiert werden.

Im Vergleich der Materialien zeigten Zellen auf 316L-Stahl eine deutlich geringere ALP-Aktivität als Zellen auf Polystyrol (Abb.16). Schließt man auch in diesem Fall Unterschiede der Rauigkeit als Ursache aus, muss es andere Faktoren geben, die in die BMP-2-stimulierte ALP-Synthese eingreifen. Der Befund entspricht anderen Untersuchungen [Wiemann et al. 2002] die zeigen, dass nicht-kovalent immobilisiertes BMP-2 auf 316L-Oberflächen zu einer niedrigeren ALP-Aktivität als auf Glas oder Titan führt. Die genannte Untersuchung ließ jedoch offen, ob diese Unterschiede auf der Menge und/oder Qualität des immobilisierten BMP-2 beruhen, oder mit störenden Metall-Ionen-Einflüssen einher gehen. Vor diesem Hintergrund ist die hier durchgeführte LA-ICP-MS-Untersuchung wichtig, da sie klar zeigt, dass Zellen in direktem Kontakt zu 316L-Stahl oder P2000 innerhalb von 4 Tagen messbare Mengen von Nickel aufnehmen. Dieser Befund ist im Hinblick auf die hohe Korrosionsbeständigkeit der Stähle und das Vorhandensein passivierender Oxidschichten überraschend. Zwar finden sich auch in Patienten mit nickelhaltigen Groß-Implantaten (z.B. Hüftgelenke) erhöhte Konzentrationen des Metalls besonders im umgebenden Gewebe [Sundermann et al. 1989], doch werden hier vor allem von Makrophagen verschleppte Abriebpartikel, die an den Gelenkflächen entstehen, als Ursache genannt [Garrigues et al. 2005]. Eine langsame Freisetzung von Metall-Ionen bekommt vor diesem Hintergrund auch eine Bedeutung für die Frage, inwiefern Zellen z.B. im Interphase eines Implantates Schwermetall-Ionen aufnehmen und welche ihrer Funktionen dadurch gestört sein können.

Der direkte Nachweis einer Metall-Ionen-Aufnahme durch Zellen auf P2000 bzw. 316L-Stahl erfolgte massenspektrometrisch nach Laser-Ablation abgelöster Zellen (LA-ICP-MS). Mit dieser Methode können z.B. Schwermetalle in Metalloproteasen auf Western Blots bestimmt werden [Wind et al. 2003]. Da der Ionisierungsgrad der Atome dabei nicht ermittelt wird, ist nicht klar, in welcher Form Nickel aus der Metalloberfläche austritt und wie es von den Zellen aufgenommen wird. Durch die

Behandlung der vom Material abgelösten Zellen mit EDTA ist jedoch gesichert, dass zumindest extrazelluläre Nickel-Ionen nicht mit erfasst wurden. Demnach könnte der etwa 10fach erhöhte Nickel-Gehalt der auf 316L-Stahl kultivierten Zellen auf anhaftendem und intrazellulärem Nickel beruhen. Genauere Aussagen verlangen eine Fraktionierung der Zellen in cytoplasmatische und Membranbestandteile. Geht man davon aus, dass Nickel von den Zellen aufgenommen wurde, so ist eine Ionisierung vor allem in den sauren lysosomalen Kompartimenten wahrscheinlich. Die Aufnahme von Schwermetall-Ionen durch die Membran könnte durch spezielle Transportproteine wie z.B.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher [Egger et al. 1999] oder durch wenig selektive Kationenkanäle erfolgen [Wiemann et al. 1999].

Der Nachweis, dass Nickel aus Metalloberflächen austritt, könnte bedeuten, dass auch andere Metalle bzw. deren Ionen in die Zellen gelangen, die in dieser Untersuchung zunächst ausgeklammert wurden. Es ist bekannt, dass zumindest Fe, V und Mo in Konzentrationen von 50 – 100  $\mu\text{mol/l}$  (Fe), 8 – 16  $\mu\text{mol/l}$  (V) und 125 – 250  $\mu\text{mol/l}$  (Mo) das Wachstum von Zellen unterbinden [Vorpahl et al. 2001]. 316L-Stahl besteht überwiegend aus Eisen (Fe 64%), Chrom (Cr 18%), Nickel (Ni 15%) und Molybdän (Mo 3%), die allesamt hemmend auf die ALP wirken könnten [Morais et al. 1999]. Versuche zur Toxizität einzelner Bestandteile wurden auf eine Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  beschränkt, die sicherlich über der Metall-Ionen-Konzentration im Umfeld der Implantatstähle lag. Diese Annahme basiert vor allem auf der starken Hemmung der BMP-2-induzierten ALP durch 50  $\mu\text{M}$  Nickel im Vergleich zum eher schwach hemmenden Effekt, der vom 316L-Stahl auszugehen scheint. Die Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  wurde auch im Hinblick auf den hemmenden Effekt von Nickel auf das Zellwachstum von C2C12 – und MC3T3-E1-Zellen gewählt, das dabei etwa um die Hälfte reduziert war [Vorpahl et al. 2001]. Unter den gewählten Bedingungen konnte nur Nickel die BMP-2 induzierte ALP hemmen, während Eisen und Molybdän geringe Verminderungen (<10%) herbeiführten, die nicht signifikant waren. Diese geringen Effekte könnten sich jedoch auch überlagert und zur reduzierten ALP-Aktivität von Zellen auf elektropoliertem P2000 beigetragen haben.

Ähnliche Ergebnisse fand man bei Untersuchungen von Metall-Ionen-Gemischen, hergestellt aus 316L-Stahl [Morais et al. 1999]. Auch hier zeigte sich, dass Nickel-

Ionen den größten Einfluss auf die ALP-Aktivität hatten. Da Nickel aus 316L und auch aus P2000 von MC3T3-E1-Zellen aufgenommen wird (siehe Tabelle 4), könnte es an verschiedenen Stellen in die Transkription, Translation oder posttranslationale Modifikation der ALP eingreifen.

Über den genauen Schädigungsmechanismus des Nickels bei der Induktion der ALP können derzeit nur Vermutungen angestellt werden. Zunächst sollte erwähnt werden, dass Nickel auch andere Enzyme inhibiert, wie z.B. die Katalase [Rodriguez et al 1990], die Glutathion Reduktase und die Glutathion Peroxidase [Cartana and Romeu 1989, Misra et al. 1990], was den Schutz der Zellen vor freien Radikalen vermindert [McKay et al. 1996] und so die Zytotoxizität des Nickels zumindest teilweise erklären könnte. Da es sich bei der ALP des Knochens um ein Exoenzym handelt [Torii et al. 1996], könnte die Beeinflussung der Aktivität vor allem extrazellulär erfolgen. So bestünde z.B. die Möglichkeit, dass Nickel das Zink aus dem aktiven Zentrum der ALP kompetitiv verdrängt. Dies würde insbesondere den hier beschriebenen „Zink-Nickel-Schalter“ der BMP-2 induzierten ALP erklären. Zink, das als wichtiges Element auch an anderen aktiven Zentren von Proteinen bindet [Applebury et al. 1970], kann auch durch EDTA-Behandlung aus Proteinen entfernt und z.B. durch  $\text{Co}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  ersetzt werden [Ojha and Mahmood 1992]. Dazu passt der Befund dieser Arbeit, dass auch der Metall-Ionen-Chelator DTPA die BMP-2 induzierte ALP-Aktivität hemmte, und dass diese Hemmung durch Zugabe von Zink wieder aufgehoben werden konnte. Auf Grund dieser Beobachtungen könnte es sein, dass Zink und Nickel um das aktive Zentrum der ALP konkurrieren. Ein ähnliches Gegenspiel zwischen Nickel und Zink wurde auch für andere Phosphatasen wie Calcineurin [Takahashi et al. 2003] und die im Gehirn exprimierte alkalische Phosphatase gefunden [Brunel and Cathala 1973], wobei hier jedoch Zink das inhibierende und Nickel das aktivierende Ion war. Interessanterweise hat Zink einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung [Halsted and Smith 1970, Dimai et al. 1998, Yu et al. 2002], was auf der Bedeutung von Zink für die ALP-Aktivität des Knochens in vivo beruhen könnte [Hall et al. 1999, Peretz et al. 2001].

Metall-Ionen können aber auch über verschiedene Transportsysteme wie zum Beispiel  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscher [Egger et al. 1999] oder über nicht selektive

Kationen-Kanäle [Wiemann et al.1998] in die Zelle gelangen. Somit wäre es auch möglich, dass sich die beschriebenen Effekten aus *intrazellulären* Störungen ergeben. Unterstrichen wird diese Überlegung durch Studien, die gezeigt haben, dass die  $Zn^{2+}$ -beeinflusste ALP-Aktivitätssteigerung durch Hemmung der Proteinbiosynthese mit Cycloheximid oder Actinomycin D aufgehoben werden kann [Yamagushi and Yamagushi 1986]. Ferner wurde gezeigt, dass die Unterdrückung von im Knochen befindlicher ALP durch  $Cd^{2+}$  mit der intrazellulären  $Zn^{2+}$  Konzentration zusammenhängt [Suzuki et al. 1989]. Ein möglicher intrazellulärer Angriffsort könnte im BMP-2-abhängigen Signalweg zur Bildung der ALP bestehen. Diese Überlegung fußt vor allem auf der Beobachtung, dass ohne BMP-2 Induktion die Aktivität der ALP durch Nickel nur geringfügig vermindert ist (Abb.18A). Mögliche intrazelluläre Störungsstellen im Verlauf der Signaltransduktion wären vor allem die in der Signalkaskade von BMP-2 vorkommenden Zink-Finger Proteine, die die informationstragenden smad-Proteine im Zellkern binden [Hata et al. 2000, Shen et al. 2002]. Ein eher allgemein schädigender Mechanismus könnte z.B. im Ersatz von komplexem Zink durch Nickel in DNA-bindenden Proteinen bestehen, welcher zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen und einer DNA-Schädigung führen kann [Conte et al. 1996].

Intra- und extrazelluläre Wirkorte können auf Grund der vorliegenden Versuchsergebnisse nicht voneinander getrennt werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die BMP-2 induzierte ALP von MC3T3-E1 Zellen empfindlicher auf Nickel bzw. auf die Anwesenheit von nickelhaltigem Stahl reagiert als die basale ALP-Expression, was insgesamt eher für einen intrazellulären Prozess spricht.

Interessant ist ferner, dass es möglich ist, Zellen an hohe Nickelkonzentration zu gewöhnen, was in dieser Arbeit durch die Kultivierung von „nickeladaptierten Zellen“ gelungen ist. Diese Adaptation könnte z.B. auf einer Induktion schützender Metallothionine beruhen [Murata et al. 1999]. Dass es sich hier um eine echte Adaptation und nicht um die Kultivierung der neuen Zelllinien handelt, zeigte die in Abb. 20 dargestellte Möglichkeit, die typische Hemmung der ALP über einen Zeitraum von 8-10 Tagen wieder zurückzubilden. Wichtig ist ferner, dass trotz der offenkundigen Adaptation die Aktivität der ALP und die Möglichkeit der BMP-2 Stimulation unterdrückt bleibt. Daher ist klar, dass dieses Enzym im Gegensatz

zum Zellwachstum ein besonders wichtiger Bioindikator für die Wirkung von Nickel ist.

Im Vergleich zu murinen MC3T3-E1-Zellen reagierten humane Stromazellen (hBMSC) sehr ähnlich, da auch bei Ihnen eine erniedrigte BMP-2 stimulierte ALP-Aktivität nach Nickel-Exposition auftrat (Abb.25). Wie bei MC3T3-E1-Zellen war diese Hemmung nach Zusatz von Zink oder DTPA reversibel. Im Vergleich zu MC3T3-E1-Zellen war der durch BMP-2 hervorgerufene Effekt jedoch insgesamt geringer. Da auch die Fähigkeit der Zellen zur Steigerung der ALP-Aktivität unter Kontrollbedingungen gering war, könnten hBMSC hinsichtlich in ihrer Differenzierung weiter fortgeschritten sein (die Zellen stammten von adulten Spendern). Ähnliche Effekte beobachtet man bei MC3T3-E1-Zellen, deren Antwort auf BMP-2 mit zunehmender Passagenzahl abnimmt [Chung et al. 1999]. Auf Grund der abgeschwächten Reaktion der ALP auf BMP-2 Stimulation scheinen hBMSC keine idealen Zellen zur Testung von Metall-Ionen-Effekten auf BMP-2 zu sein. Dennoch zeigen diese Versuche, dass auch beim Menschen die gleichen Mechanismen einer kompetitiven Zink-Nickel-Inhibition der ALP vorliegen könnten, was für die Knochenbildung von Bedeutung sein könnte [Sugawara et al. 2002].

#### 4.4 pH-Messungen

Da der N<sub>2</sub>-haltige P2000-Stahl NH<sub>3</sub> in unbekanntem Mengen pro Zeiteinheit freisetzt, war eine Beeinflussung des extra- und intrazellulären Milieus aufwachsender Zellen nicht auszuschließen. Nun sind extrazelluläre pH-Werte nahe der Materialoberfläche nur mit aufwendiger Mikroelektrodenteknik zu prüfen. Daher wurden steady state pH<sub>i</sub>-Werte BCECF-AM gefüllter MC3T3-E1 Zellen analysiert. Diese ergaben jedoch keine Hinweise auf eine Veränderung des steady state pH<sub>i</sub> (unter bicarbonatfreien oder bicarbonatgepufferten Bedingungen) durch den Kontakt der Zellen zu P2000 oder 316L im Vergleich zu Zellen auf Glasobjektträgern (Tab.5). Dennoch wurden Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der intrazellulären Protonenkonzentration durch den Kontakt zu Metalloberflächen bei der Analyse der pH<sub>i</sub>-Regulation nach Ammoniumpuls gefunden. Wenngleich auch hier Zellen auf P2000 keine Unterschiede zu Kontrollzellen auf Glas aufwiesen, zeigte sich bei Zellen auf 316L-Stahl eine

herabgesetzte  $\text{pH}_i$ -Regulation unter bicarbonatfreien sowie eine gesteigerte  $\text{pH}_i$ -Regulation unter bicarbonatgepufferten Bedingungen. Für diesen Befund finden sich in der Literatur bislang keine Entsprechungen. Geht man jedoch von einer Belastung mit Nickel als möglicher Ursache aus, so scheint ein inhibitorischer Effekt auf Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) zu bestehen, der z. B. durch eine Hemmung von Calciumkanälen durch Nickel zustande kommen könnte [Borin et al. 1988, Zweifach and Lewis 1996]. Ursächlich muss man von einer Hemmung des NHE und einer möglicherweise kompensatorischen Steigerung des NCBE ausgehen, die sowohl durch Änderungen der Expression als auch durch direkte Hemmwirkung zustande kommen könnten. Wichtig ist, dass Änderungen des  $\text{pH}_i$  sicher eine Bedeutung für die Knochenbildung sowie für die Differenzierung von Zellen haben [Hazav et al. 1989, Silver et al. 2001], so dass der Befund für die Implantologie von Bedeutung sein könnte.

#### **4.5 CRAC (Calcium Release Activated Current)**

Ausgehend von Befunden, dass Nickel-Ionen den Influx von Calcium-Ionen durch so genannte CRAC-Kanäle hemmen [Zweifach und Lewis 1996], wurden der CRAC-vermittelten intrazellulären Calciumanstieg der MC3T3-E1 Zellen auf P2000- und 316L-Stahl untersucht. Das dazu eingesetzte Protokoll (vergleiche 2.4.3) führt durch die Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, die normalerweise bei allen Zellen nachweisbar ist [Wiemann et al. 1998]. Demgegenüber fiel dieser Calciumanstieg bei über 90% der Zellen auf 316L-Stahl völlig aus, während Zellen auf P2000 unbeeinträchtigt erschienen. Auch für diesen Effekt könnten Nickel-Ionen verantwortlich sein, doch sind weiterführende Untersuchungen notwendig, wenn zwischen direkter und indirekter Hemmung (z.B. Expression der Kanäle) unterschieden werden soll. Da Calcium ein universeller second messenger ist, könnte eine Änderung der intrazellulären Calciumregulation - ebenso wie Änderungen der  $\text{pH}_i$  Regulation - bei Zellen auf 316L-Stahl von großer Bedeutung sein. Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Calciumhomöostase und  $\text{pH}_i$ -Regulation wurde bereits im vorigen Abschnitt hingewiesen.

#### 4.6 Bewertung von P2000

Aus physiologischer Sicht scheint P2000 zumindest dem zur Zeit noch oft verwendeten 316L-Stahl überlegen zu sein, da er in allen über die DIN-ISO Norm hinausgehenden Versuchen gleich oder besser abschnitt als 316L-Stahl im Vergleich zur Kontrolle (Glas oder Polystyrol). In Zusammenschau aller Ergebnisse wird damit deutlich, dass P2000 ein vielversprechendes Implantatmaterial mit guter Biokompatibilität in vivo sein könnte, wie es in letzter Zeit auch für ähnliche nickelarme Stähle gezeigt wurde [Fini et al. 2003].

## 5. Ausführliche Zusammenfassung

Ziel der Doktorarbeit war zunächst, die Biokompatibilität des nickelfreien austenitischen Stahls P2000 unter Berücksichtigung der DIN ISO Norm 10993-5 (in vitro-Zytotoxizität) nachzuweisen. P2000 ist ein Stahl, der bezüglich Härte, Festigkeit und Korrosionsbeständigkeit ein viel versprechendes Material zur Herstellung von Knochenimplantaten ist. Dieser Stahl, sowie der nickelhaltige Vergleichsstahl 316L wurden von der Werkstofftechnik der Universität Essen (Prof. Fischer) zur Verfügung gestellt und im technischen Zentrallabor der Universitätsklinik Essen in eine Form gebracht, die für Zellkulturexperimente geeignet war. Verschiedene Qualitäten beider Stähle wurden dann in Zusammenarbeit mit dem Fachbereich Chemie (Prof. Schmidt) durch Elektropolieren gereinigt und anschließend mit Hilfe der Physiologischen Chemie der Universität Duisburg-Essen (Prof. Jennissen) weiter aufbereitet. Für Zellkulturuntersuchungen wurde die murine osteoblastäre Zelllinie MC3T3-E1 eingesetzt.

Versuche zum Zellwachstum und zur Morphologie (Auflicht-Fluoreszenz der MC3T3-E1-Zellen), die in direktem Materialkontakt über 3 Tage sowie über 6 Wochen durchgeführt wurden, ergaben zunächst keine Hinweise auf eine Schädigung der Zellen durch die Materialien, so dass P2000 gemäß der o.g. Norm als ein biokompatibles Material eingestuft werden muss.

Da P2000 ein Stickstoff-haltiger Stahl ist, der in Wasser  $\text{NH}_3$  abgibt, wurde geprüft, ob die intrazelluläre pH-Regulation ( $\text{pH}_i$ ) der aufwachsenden Zellen beeinträchtigt ist. Die Unterschiede des steady state  $\text{pH}_i$  waren jedoch gering. Auf nickelhaltigem 316L-Stahl, aber nicht auf P2000, war die Natrium-Protonen-Austauscher-vermittelte (NHE)  $\text{pH}_i$ -Regulation nach Säurebeladung der Zellen vermindert, die natriumabhängige Chlorid-Bicarbonat-Austauscher-vermittelte (NCBE)  $\text{pH}_i$  Regulation war jedoch erhöht.

Zellen auf nickelhaltigem 316L-Stahl wiesen im Vergleich zu Zellen auf P2000 oder auf Glas auch einen deutlich reduzierten bis fehlenden Calcium-Einstrom durch "Calcium Release Activated Current" (CRAC)-Kanäle auf. Solche wenig selektiven Kationenkanäle werden u.a. durch Nickel-Ionen blockiert, was indirekt auf eine Freisetzung von Nickel aus 316L-Stahl, nicht aber aus P2000 spricht.

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Umweltanalytik der Universität Essen (Prof. Hirner) gelang schließlich mit LA-ICP-MS Technik der direkte Nachweis, dass Zellen auf 316L schon nach 4 Tagen in vitro einen 10fach erhöhten Nickel-Gehalt besitzen. Bei Zellen auf P2000 war dieser Wert im Vergleich zur nominell nickelfreien Kontrolle 2-fach erhöht, was auf geringe Spuren von Nickel auch im P2000-Stahl deutet.

Im Rahmen der Arbeit wurde erstmals eine weitere indirekte Methode zur Erfassung von Nickel-Toxizitäten angewandt. Diese beruhte auf der Messung der BMP-2-(Bone Morphogenetic Protein-2) stimulierten Alkalischen Phosphatase (ALP) der Knochenzellen. ALP beinhaltet Zink im aktiven Zentrum und ist u.a. durch Nickel-Ionen direkt hemmbar. Darüber hinaus scheint Nickel auch mit dem intrazellulären Signalweg zu interferieren, der ausgehend von der Bindung des BMP-2 zur Expression der ALP führt. Zellen auf beiden Metallen zeigten im Vergleich zu Zellen auf Polystyrol eine Reduktion der BMP-2 induzierten ALP. Diese ALP-Verminderung war auf 316L-Stahl ausgeprägter als auf P2000. Unterschiedliche Rauigkeiten (gemessen von der Werkstofftechnik der Univ. Duisburg-Essen) kamen als Erklärung dafür nicht in Frage. Versuche mit weiteren, in P2000 und 316L enthaltenen Metall-Ionen (Fe, Cr, Mo, Mn) ließen erkennen, dass Nickel dasjenige Metall-Ion war, das den größten hemmenden Einfluss auf die BMP-2 induzierte ALP-Aktivität hatte. Ausgehend von diesen Befunden wurde versucht, die nickelbedingte Toxizität durch Metall-Ionen-Chelatoren wie DTPA zu hemmen. Überraschender Weise senkte DTPA jedoch die BMP-2 bedingte ALP der Zellen auf nickelhaltigen Stählen. Weitere Versuche zur Wirkung von Metall-Ionen konnten diesen Befund erklären: Es zeigte sich insgesamt, dass zur Stimulation der ALP durch BMP-2 auch Zink-Ionen beitragen. Fehlte dieses Spurenelement nach Chelatierung mit DTPA, so fiel die ALP-Induktion durch BMP-2 vollständig aus. Zink-Ionen waren zudem in der Lage, die Hemmung der BMP-2 bedingten ALP durch Nickel zu antagonisieren. Hypothetisch kann man daher von einem "Zink-Nickel-Schalter" ausgehen, der auch für die Sensitivität der Knochenzellen gegenüber Metallen bzw. Stählen verantwortlich sein könnte.

Die Frage nach toxischen Nickel-Konzentrationen führte auch zur Etablierung einer MC3T3-E1-Zelllinie, die in Anwesenheit von 50 µM Nickel dauerhaft proliferierte. Die ALP war bei diesen Zellen durch BMP-2 nicht mehr induzierbar, außer wenn zusätzlich gleiche Konzentrationen von Zink-Ionen zugesetzt wurden.

Dieser Befund verdeutlicht nicht nur den Zink-Nickel-Mechanismus, sondern zeigt auch, dass die Messung der Proliferation kein Kriterium ist, mit dem auf das eine Nickel-Belastung ausgeschlossen werden kann.

Schließlich wurden die an Mauszellen erarbeiteten Ergebnisse auf menschliche Zellen ausgedehnt. Weitere Untersuchungen wurden daher an humanen Knochenmarkszellen (hBMSC) durchgeführt, die uns von der Hämatologie des Universitätsklinikums Essen (Prof. Dührsen) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen zeigten ebenfalls eine mit BMP-2 stimulierbare ALP-Aktivität, die in ähnlicher Weise durch Zink, Nickel und DTPA beeinflusst wurde, so dass die beschriebenen Effekte mit großer Wahrscheinlichkeit auf den Menschen übertragbar sind.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass Zellen auf korrosionsbeständigen nickelhaltigen Stählen nachweislich Nickel aufnehmen. Obwohl die Proliferation und die Morphologie wenig betroffen sind, können andere zellphysiologische Vorgänge beeinträchtigt sein. Die aufgenommene Metall-Menge kann direkt massenspektroskopisch bestimmt werden. Indirekte Messung durch Bioindikatoren, wie die BMP-2 stimulierte ALP, sind jedoch einfacher durchzuführen und erscheinen ebenfalls geeignet, um die Biokompatibilität eines Stahls zu ermitteln, der in den Körper eingebracht werden soll.

## **6. Zusammenfassung**

P2000 ist ein neuer nickelfreier, stickstoffhaltiger Stahl mit sehr guter Festigkeit und Korrosionsbeständigkeit, der sich zur Fertigung von Knochenimplantaten anbietet und als mögliche Alternative zu nickelhaltigen 316L-Stählen anzusehen ist. In dieser Arbeit wurde P2000 erstmals auf seine in vitro-Biokompatibilität, seinen Einfluss auf die intrazelluläre pH-Regulation und auf den Kalzium-Flux durch wenig-selektive Kationenkanäle getestet.

Die Untersuchungen erfolgten an Osteoblasten-artigen MC3T3-E1-Zellen, die vergleichend auf Polystyrol sowie auf nickelhaltigem 316L-Stahl wuchsen. Im Vergleich zur Kontrolle adhärten und wuchsen die Zellen auf P2000 normal, so dass P2000 gemäß DIN ISO Norm 10993-5 als biokompatibler Stahl einzustufen ist. Die intrazelluläre pH-Regulation sowie der Calcium-Einstrom durch wenig selektive Kationen-Kanäle waren auf P2000 im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls normal. Auf nickelhaltigem 316L-Stahl war jedoch die Natrium-Protonen-Austauscher-vermittelte pH-Regulation der Zellen vermindert, während die Natrium-abhängige Chlorid-Bikarbonat-Austauscher-vermittelte pH-Regulation gesteigert war. Zudem war der Calcium-Flux durch o.g. Kanäle bei vielen Zellen nicht auslösbar. Mittels massenspektroskopischer Analysetechnik konnte gezeigt werden, dass Zellen auf 316L-Stahl im Vergleich zu P2000 oder zur Polystyrol-Kontrolle 5-10fach erhöhte Nickel-Gehalte aufwiesen. Zur weiteren Beurteilung von biologischen Nickel-Effekten wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase herangezogen, die zu diesem Zweck erstmals mit "bone morphogenetic protein-2" stimuliert wurde. Bei Zellen auf 316L-Stahl war die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Vergleich zur Kontrolle stärker herabgesetzt als bei Zellen auf P2000. Weiterführende Untersuchungen mit den in 316L enthaltenen Metall-Ionen zeigten wiederum, dass vornehmlich Nickel die Hemmung der alkalischen Phosphatase auslösen konnte. Versuche mit Metallionen-Chelatoren sowie mit Zink-Ionen ergaben Hinweise darauf, dass die Stimulation der alkalischen Phosphatase durch bone morphogenetic protein 2 die Anwesenheit von Zink erfordert und das Nickel mit Zink anscheinend um relevante Bindungsstellen konkurriert. Ähnliche Ergebnisse wurden mit menschlichen Knochenmarkszellen erhalten. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass der nickelfreie Stahl P2000 zelluläre Funktionen weniger stark beeinflusst als der nickelhaltige 316L Stahl.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1) Applebury ML., Johnson BP., Coleman JE. (1970):  
Phosphate binding to alkaline phosphatase. Metal ion dependence.  
J. Biol. Chem. 245, 4968-4976.
- 2) Bingmann D., Jones D., Tetsch P. (1990):  
Zellwachstum in Knochenexplantatkulturen.  
Z Zahnärztl. Implantol. VI, 57-63.
- 3) Bischoff U.W., Freeman M.A.R., Smith D., Tuke M.A., Gregson P.J. (1994):  
Wear induced by motion between bone and titanium or cobalt-chrome alloys.  
Journal Bone Jt. Surgery; 76-B, 713-716.
- 4) Bonnet U., Leniger T., Wiemann M. (2000):  
Moclobemide reduces intracellular pH and neuronal activity of CA3 neurons in  
guinea-pig hippocampal slices-implication for ist neuroprotective properties.  
Neuropharm. 39, 2067-2074.
- 5) Brayda Bruno M., Fini M., Pierini G., Giavaresi G., Rocca M., Giardino R. (2001):  
Evaluation of systemic metal diffusion after spinal pedicular fixation with titanium  
alloy and stainless steel system: a 36 month experimental study in sheep.  
Int. J. Artif. Organs 24, 41-49.
- 6) Breme H.J., Helsen J.A., Breme H.J., (1998):  
Selection of Materials: Metals as Biomaterials.  
Chichester, UK: John Wiley & Sons; 1-36.
- 7) Brunel C., Cathala G. (1973):  
Activation and inhibition processes of alkaline phosphatase from bovine brain  
by metal ions ( $Mg^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ ).  
Biochem. Biophys. Acta 309, 104-115.
- 8) Borin M.L., Pinelis V.G., Bykov S.S., Kudinov Iu.V., Azizova O.A. (1988):  
Relations between the changes in  $Na^+/H^+$ -exchange and cytoplasmic Ca levels  
in platelet activation.  
Biull. Eksp. Biol. Med. 106, 299-302.
- 9) Cartana J., Romeu AA. (1989):  
Characterisation of the inhibition effect induced by nickel on glucose-6-phosphate  
dehydrogenase and glutathion reductase.  
Enzyme 41, 1-5.
- 10) Chung C.Y., Iida-Klein A., Wyatt L.E. Rudkin G.H., Ishida K., Yamaguchi D.T.,  
Miller T.A. (1999):  
Serial passages of MC3T3-E1 cells alters osteoblastic function and responsiveness  
to transforming growth factor-beta1 and bone morphogenetic protein.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 265, 2451-2456.
- 11) Citeau A., Guicheux J., Vinatier C., Layrolle P., Nguyen T.P., Pilet P., Daculsi G. (2005):  
In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid  
blasting.  
Biomaterials 26, 157-165.

- 12) Conte D., Narindrasorasak S., Sakar B. (1996):  
In vivo and in vitro iron-replaced zinc-finger generates free radicals and causes DNA damage.  
*J. Biol. Chem.* 271, 5125-5130.
- 13) Dimai H. P., Hall S. L., Stilt-Coffing B., Farley J. R. (1998):  
Skeletal response to dietary zinc in adult female mice.  
*Calcified Tissue International* 62, 0309-0315.
- 14) Disegi J.A., Eschbach L. (2000):  
Stainless steel in bone surgery.  
*Injury* 31, 4-6.
- 15) Doran A., Law FC., Allen MJ., Rushton N. (1998):  
Neoplastic transformation of cells by soluble but not particulate forms of metal used in orthopaedic implants.  
*Biomaterials* 19, 751-759.
- 16) Ebendal T., Bengtsson H., Soderstrom S. (1998):  
Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain.  
*J. Neurosci Res.* 51, 139-146.
- 17) Egger M., Ruknudi A., Lipp P., Kofuji P., Lederer WJ., Schulze DH., Niggli E. (1999):  
Functional expression of the human cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in Sf9 cells: rapid and specific Ni<sup>2+</sup> transport.  
*Cell Calcium* 25, 9-17.
- 18) Fini M., Nicoli Aldini N., Torricelli P., Giavaresi G., Borsari V., Lenger H., Bernauer J., Giardino R., Chiesa R., Cigada A. (2003):  
A new austenitic stainless steel with negligible nickel content: an in vitro and in vivo comparative investigation.  
*Biomaterials* 24, 4929-4939.
- 19) Garrigues G.E., Cho D.R., Rubash H.E., Goldring S.R., Herdon J.H., Shanbag A.S. (2005):  
Gene Expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials.  
*Biomaterials* 26, 2933-2945.
- 20) Gawkrödger DJ.,(2003):  
Metal sensitivities and orthopaedic implants revisited: the potential for metal allergy with the new metal-on-metal joint prostheses.  
*Br. J. Dermatol.* 148, 1089-1093.
- 21) Hata A., Seoane J., Lagna G., Montalvo E., Hemmati-Brivanlou A., Massague J.(2000):  
OAZ uses distinct DNA- and protein-binding zinc fingers in separate BMP-Smad and OLF signaling pathways.  
*Cell* 100, 229-240.
- 22) Hall SL., Dimai HP., Farley JR. (1999):  
Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity in vitro.  
*Calcif. Tissue Int.* 64, 163-172.
- 23) Halsted JA, Smith Jr JC. (1970):  
Plasma zinc in health and disease.  
*Lancet* 14, 322-324.
- 24) Hazama M., Aono A., Ueno N., Fujisaja, Y. (1995):  
Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system.  
*Biophys. Biochem. Res. commun.* 209, 859-866.

- 25) Hazav P., Shany S., Moran A., Levy R. (1989):  
Involvement of intracellular pH elevation in the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on HL-60 cells.  
*Cancer Res.* 49, 72-75.
- 26) Hildebrand H., Veron C., Martin P. (1989):  
Non-precious metal dental alloys and allergy.  
*J. Biol. Buccale.* 17, 227-243.
- 27) Hillen U., Haude M., Erbel R., Goos M. (2002):  
Contact allergies to metal components of the 316L steel in patients with coronary heart disease.  
*Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 33, 701-808.
- 28) Hoffmann A., Gross G. (2001):  
BMP signaling pathways in cartilage and bone formation.  
*Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 11, 23-45.
- 29) Horton M.A. (1995):  
Interactions of connective tissue cells with the extracellular matrix.  
*Bone* 17, 51S-53S.
- 30) Hoth M., Penner R. (1993):  
Calcium release-activated calcium current in rat mast cells.  
*J. Physiology* 465, 359-386.
- 31) Referenz 31, Internetseite  
[tattoo4u.us.virtuserv.biz/materialkunde.html](http://tattoo4u.us.virtuserv.biz/materialkunde.html)  
World wide web
- 32) Keller J.C., Schneider G.B., Stanford C.M., Kellog B. (2003):  
Effects of implant microtopography on osteoblast cell attachment.  
*Implant. Dent.* 12, 175-181.
- 33) Kim K.J., Itoh T., Kotake S. (1997):  
Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on human bone marrow cells cultured with various biomaterials.  
*J. Biomed. Mater. Res.* 35, 279-285.
- 34) Koch S., Büscher R., Tikhovski I., Brauer H., Runiewicz A., Dudzinski W., Fischer, A. (2002):  
Mechanical, chemical and tribological properties of the nickel-free high-nitrogen steel X13CrMnMoN 18-14-3 (1.4452).  
*Mat.-wiss. u. Werkstofftech.* 33, 701-808.
- 35) Köster R., Vieluf D., Kiehn M., Sommerauer M., Kähler J., Baldus S., Meinertz T., Hamm C.W. (2000):  
Nickel and molybdenum contact allergies in patients with coronary in-stent re-stenoses.  
*Lancet* 356, 1895-1897.
- 36) Lewis CG., Sunderman FW. Jr. (1996):  
Metal carcinogenesis in total joint arthroplasty. Animal models.  
*Clin. Orthop.* 329, S264-268.
- 37) Lindl, T. (2000):  
*Zell-und Gewebekultur* (ISBN 3-8274-0803-2),  
Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag

- 38) Linez-Bataillon P., Monchau F., Bigerelle M., Hildebrand HF (2002):  
In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates.  
Biomol. Eng. 19, 133-141.
- 39) Liu Y.K., Nemoto A., Feng Y., Uemura T. (1997):  
The binding ability to matrix proteins and the inhibitory effects on cell adhesion of synthetic peptides derived from a conserved sequence of integrins.  
J. Biochem. 121, 961-968.
- 40) Lugowski S.J., Smith D.C., McHugh A.D., Van Loon C. (1991):  
Release of Metal Ions from dental implant material in vivo: determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in organ tissue.  
J. Biomed. Mater. Res. 25, 1443-1458.
- 41) Macnair R., Rodgers E.H., Macdonald C., Wykmann A., Goldie I., Grant M.H. (1997):  
The response of primary rat and human osteoblasts and an immortalized rat osteoblast cell line to orthopaedic materials: comparative sensitivity of several oxicity indices.  
J. Mater. Sci. Mater. Med. 8, 105-111.
- 42) McKay G.C., Macnair R., MacDonald C., Grant M. H. (1996):  
Interactions of orthopaedic metals with immortalized rat osteoblast cell line.  
Biomaterials 17, 1339-1344.
- 43) Michel R., Nolte M., Reich M., Loer F. (1991):  
Systemic effects of implanted prostheses made of cobalt-chromium alloys.  
Arch. Orthop. and Traum. Surgery 110, 61-74.
- 44) Misra M., Rodriguez RE., Kasprzak KS. (1990):  
Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defence systems.  
Toxicology 64, 1-17.
- 45) Morais S., Sousa JP., Fernandes MH., Carvalho GS. (1998a):  
In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I. Retardation of tissue mineralization by metal salts.  
Biomaterials 19, 13-21.
- 46) Morais S., Sousa JP., Fernandes MH., Carvalho GS., de Bruijn JD., Van Blitterswijk CA. (1998 b):  
Decreased consumption of Ca and P during in vitro biomaterilization and biologically induced deposition of Ni and Cr in presence of stainless steel corrosion products.  
Biomed. Mater. Res. 42, 199-212.
- 47) Morais S., Dias N., Sousa JP., Fernandes MH., Carvalho GS. (1999):  
In vitro osteoblastic differentiation of human bone marrow in the presence of metal ions.  
Biomed. Mater. Res. 44, 176-190.
- 48) Murata M., Gong P., Suzuki K., Koizumi S. (1999):  
Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes.  
J. Cell. Physiol. 180, 105-113.
- 49) Nohe A., Hassel S., Ehrlich M., Neubauer F., Sebald W., Hennis Y. I., Knaus P. (2002):  
The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways.  
J. Biol. Chem. 277, 5330-5338.

- 50) Normenausschuss Feinmechanik und Optik im Deutsche Institut für Normung e.V. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten, ISO 10993-1 bis -12  
Berlin: Beuth Verlag GmbH.
- 51) Ojha MS., Mahmood A. (1992):  
Effect of divalent metal ions on soluble and membrane-bound alkaline phosphatase activity in suckling rat intestine.  
Indian J. Exp. Biol. 30, 685-689.
- 52) Oshida Y., Miyazaki, S. (1991):  
Corrosion and biocompatibility of shape memory alloys.  
Corrosion Engineering 40 ,1009-1025
- 53) Pierini G., Fini M., Giavaresi G., Dallari S., Brayda Bruno M., Rocca M., Nicoli Aldiini N., Giardino R. (1999):  
Atomic absorption spectrophotometry (AAS) for the evaluation of metallosis in protheses and artificial organs use: new approach.  
Int. J. Artif. Organs. 7, 522-527.
- 54) Peretz A., Papadopoulos T., Willems D., Hotimsky A., Michiells N., Siderova V., Bergmann P., Neve J. (2001):  
Zinc supplementation increases bone alkaline phosphatase in healthy men.  
J. Trace Elem. Med. Biol. 15, 175-178.
- 55) Rodriguez RE., Misra M., Kasprzak KS. (1990):  
Effects of nickel on catalase activity in vitro and in vivo.  
Toxicology 63, 45-52.
- 56) Roos A., Boron W.F. (1981)  
Intracellular pH  
Physiol. Rev. 61, 296-434.
- 57) Rosenberg A., Gratz KW., Sailer HF. (1993):  
Should titanium miniplates be removed after bone healing is complete?  
Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 22, 185-188.
- 58) Sarkar B. (1995):  
Metal replacement in DNA-binding zinc finger proteins and it's relevance to mutagenicity and carcinogenicity through free radical generation.  
Nutrition 11, 646-649.
- 59) Schmidt C., Ignatius A., Claes L.E. (2001):  
Proliferation and differentiation parameters of human osteoblasts of titanium and steel surfaces.  
J. Biomed. Mater. Res. 54, 209-215.
- 60) Shen Z. J., Nakamoto T., Tsuji K., Nifuji A., Miyazono K., Komori T., Hirai H., Noda M. (2002):  
Negative Regulation of bone morphogenetic protein/Smad signaling by CAS-interacting zinc finger protein in osteoblasts.  
J. Biol. Chem. 277, 29840-29846.
- 61) Silver I.A., Deas J., Erecinska M. (2001):  
Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77 S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability.  
Biomaterials 22, 175-185.

- 62) Studeny M., Marini FC., Champlin RE., Zompetta C., Fidler IJ., Andreef M. (2002): Bonemarrow mesenchymal stem cells as vehicles for interleucin- $\beta$  delivery in tumors. *Cancer Res.* 62, 3603-3608.
- 63) Sudo H., Kodama H. A., Amagai Y., Yamamoto S., Kasai S., (1986): In vitro differentiation in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell. Biol.* 96, 191-198.
- 64) Sugawara Y., Suzuki K., Koshikawa M., Ando M., Iida J. (2002): Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn. J. Pharmacol.* 88, 262-269.
- 65) Sunderman F.W. J., Hopfer S.M., Swift T., Rezuke W.N., Ziebka L., Highman P., Edwards B., Folcik M., Gosling H.R. (1989): Cobalt, chromium and nickel concentrations in body fluids of patients with porous coated knee or hip prostheses. *J. Orthop. Res.* 7, 307-315.
- 66) Suresh S. (1992): *Fatigue of Materials*. Cambridge: University Press, Cambridge UK, 30-96
- 67) Suzuki Y., Morita I., Yamane Y., Murota S., (1989): Preventive effects of zinc on cadmium-induced inhibition of alkaline phosphatase activity and mineralization activity in osteoblast-like cells, MC3T3-E1. *J. Pharmacobiodyn.* 12, 94-99.
- 68) Takahashi K., Akaishi E., Abe Y., Ishikawa R., Tanaka S., Hosaka K., Kubohara Y. (2003): Zinc inhibits calcineurin activity in vitro by competing with nickel. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 307, 64-68.
- 69) Takuwa Y., Ohse C., Wang EA., Wozney JM., Yamashita K. (1991): Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 96-101.
- 70) Thomann U.I., Uggowitzer P.J. (2000): Wear-corrosion behaviour of biocompatible austenitic stainless steel. *Wear* 239, 48-58.
- 71) Tikhovski I., Brauer H., Mölders M., Wiemann M., Bingmann D., Fischer, A. (2003): *Fatigue Behaviour and in-vitro Biocompatibility of the Ni-Free Austenitic High-Nitrogen Steel X13CrMnMoN18-4-3*. *Stainless Steels for Medical and Surgical Applications ASTM STP 1438*, G. L. Winters and M. J. Nutt, Eds., ASTM International, West Conshohocken PA.
- 72) Torii Y., Hitomi K., Yamagishi Y., Tsukagoshi N., (1996): Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. *Cell Biol. Int.* 20, 459-464.
- 73) Vorpahl M., Wiemann M., Brauer H., Bingmann D. (2001): Effects of metal ions on proliferation on aortic smooth muscle cells and myoblastic cells in vitro. *Mat.-Wiss. u. Werkstofftech.* 32, 970-975.

- 74) Wiemann M., Büsselberg D., Schirmacher K., Bingmann, D. (1998):  
A calcium release activated calcium flux in primary cultures of rat osteoblast-like cells.  
Calcif. Tissue Int. 63, 154-159.
- 75) Wiemann, Schirmacher, K., M., Büsselberg, D. (1999):  
Interference of lead with the calcium release activated calcium flux of osteoblast-like cells.  
Calcif. Tiss. Int. 65, 479-485.
- 76) Wiemann M., Rumpf H. M., Bingmann D., Jennissen H. (2001):  
The binding of rhBMP-2 to the receptors of viable MC3-T3-E1 cells and the question of cooperativity.  
Mat.-wiss. u. Werkstofftech. 32, 931-936.
- 77) Wiemann M., Jennissen HP., Rumpf H., Winkler L., Chatzinikolaidou M., Schmitz I., Bingmann D. (2002):  
A reporter-cell assay for the detection of BMP-2 immobilized on porous and non-porous material.  
J. Biomed. Mat. Res. 62, 119-127.
- 78) Wind M., Feldmann I., Jakubowski N., Lehmann D. (2003):  
Spotting and quantification of phosphoproteins purified by electrophoresis and laser ablation-element mass spectrometry.  
Electrophoresis 24, 1276-1280.
- 79) Wintermantel E, Ha S-W  
Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen: Implantate für Medizin und Umwelt.  
2. Auflage, Berlin, Heidelberg: Springer (1998).
- 80) Yamaguchi M., Yamaguchi R., (1986):  
Action of zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content.  
Biochem. Pharmacol. 35, 773-777.
- 81) Yu Z., Li Y., Zheng A. (2002):  
Effects of zinc on bone development in mouse embryo in vitro.  
Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 36, 97-99.
- 82) Zweifach A., Lewis R.S. (1996):  
Calcium-dependent potentiation of store-operated calcium channels in T-lymphocytes.  
Gen. Physiol. 107, 597-610.

## **8. Danksagung**

Ich möchte mich für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit im Institut für Physiologie der Universität Duisburg-Essen in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Bingmann durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Wiemann, der mir stets mit Rat und Tat bei dieser Arbeit zur Seite stand, sowie für die Vergabe der Themenstellung.

Für viel Unterstützung und ein tolles Arbeitsklima möchte ich mich ferner bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Physiologischen Institutes bedanken.

Herrn Professor Fischer (Werkstofftechnik, Universität Duisburg-Essen) und Herrn Professor Jennissen (Institut für Physiologische Chemie, Universität Duisburg-Essen) danke ich für die Bereitstellung der Stähle, Herrn Professor Sebald (Universität Würzburg) und seinem Team für die großzügige Versorgung mit BMP-2, Herrn Professor Hirner und Herrn Felix (Institut für Umweltanalytik der Universität Duisburg-Essen) für die Messung der intrazellulären Nickelwerte. Frau Dr. Yuli (Hämatologie, Uniklinikum Essen) möchte ich für die Bereitstellung menschlicher Knochenmarkzellen (hBMSC) danken.

Ebenso geht mein Dank an die DFG, die diese Arbeit im Rahmen einer Studenten-Förderung (GK 689) finanziell unterstützt hat.

Danken möchte ich außerdem meiner Familie und meinen Freunden für ihren Zuspruch, der mir meinen bisherigen Werdegang erst ermöglicht hat.

## **9. Lebenslauf**

### **persönliche Daten:**

Name: Martina Monika Mölders

Wohnort: Mülheim an der Ruhr

Geburtsdaten: 16. November 1977,  
Mülheim an der Ruhr

### **Werdegang:**

Schule: *August 1984 bis Juli 1988*  
Städt. Grundschule am Steigerweg,  
Mülheim an der Ruhr

*August 1988 bis Juni 1997*  
Städt. Gymnasium Heißen, Mülheim an der Ruhr  
Abschluss: Abitur am 04.06.1997

Universität: *Wintersemester 1997*  
Medizinische Fakultät der  
Universität Duisburg-Essen)

Physikum: 16. März 2000  
1. Staatsexamen: 22. März 2001  
2. Staatsexamen: 01. April 2003  
3. Staatsexamen: 10. Mai 2004

Dissertationsförderung: Oktober 2001 bis April 2003  
Stipendiatin des vom DFG geförderten  
interdisziplinären Graduiertenkollegs  
"Reaktivität im oberflächennahen Bereich"

Beruf seit 01. Juli 2004 Ärztin in der chirurgischen  
Abteilung des Alfred Krupp von Bohlen  
und Halbach Krankenhaus gem. GmbH