

**Anwendung der Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie zur
Charakterisierung der Struktur von Zähnen und von
oberflächenmodifiziertem Titan für Knochenimplantate**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz**

**Matthias Gabriel
geb. in Kirn**

Mainz 2000

per aspera ad astra

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung & Problemstellung	1
2. Theoretische Aspekte	4
2.1 Zahnhistologie	4
2.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	7
2.3 Fluoreszenz & Fluoreszenzfarbstoffe	12
2.3.1 Theorie der Fluoreszenz	12
2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe	14
2.4 ESCA: Electron Spectroscopy for Chemical Analysis	17
2.5 Implantate	19
3. Methodischer Teil	26
3.1 Fluoreszenzmikroskopische Techniken	26
3.1.1 Fluoreszenznachweis der Proteinkomponente im Zahngewebe	26
3.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Detektion der Odontoblastenfortsätze	28
3.1.2 Diskussion zu 3.1.1 und 3.1.2	32
3.1.3 Nachweis der Penetration von Wasserstoffperoxid in Zahnschmelz und Dentin	34
3.1.3.1 Fluoreszenz als Oxidationsindikator	34
3.1.3.2 Nachweis der Penetration	35
3.1.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung	37
3.1.3.1 Diskussion zu 3.1.3	41
3.1.4 Ratiometrische pH-Bestimmung im Zahninnern mittels Fluoreszenzfarbstoffen	42
3.1.4.1 Doppelmarkierung von BSA	48
3.1.4.2 Dextranekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe	52
3.1.4.3 Diskussion zu 3.1.4	54
3.2 Kovalente Modifizierung von Titanoberflächen durch Peptide und Proteine zur Adhäsionsvermittlung bindegewebiger Zellen	58

3.2.1 Probenpräparation und mechanische Bearbeitung	58
3.2.2 Elektropolieren	58
3.2.3 Profilometrie	60
3.2.4 Oberflächenoxidation	61
3.2.5 ESCA-Analyse	62
3.2.6 Silanisierung	65
3.2.7 Spezifischer Nachweis der Silanaminogruppen mit Fluorescamin	66
3.2.8 Kopplung	68
3.2.9 Sterilisierung beschichteter Titanproben und Zellkultur	70
3.2.10 Detektion adhärenter Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen	71
3.2.11 Diskussion zu 3.2	75
4. Zusammenfassung	78
5. Geräte & Reagentien	80
6. Literatur	82
7. Danksagungen	97

1. Einleitung und Problemstellung

Einführung in die Problematik

Die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen in der Mikroskopie hat im Laufe der Zeit beachtliche Verbreitung erlangt. Die große Palette unterschiedlichster Fluorophore erlaubt die einfache Darstellung komplexer Strukturen, beispielsweise durch Immunfluoreszenz-techniken. Weiterhin lassen sich Informationen über die lokalen Gegebenheiten innerhalb der Probe, wie Lösemiteleinflüsse, pH-Wert und Ionenkonzentrationen gewinnen, da die Fluoreszenz vieler dieser Farbstoffe von ihrer „chemischen Umgebung“ moduliert werden.

Die Konfokale Laser Raster Mikroskopie (CLSM; engl.: *confocal laser scanning microscopy*) zeichnet sich gegenüber der konventionellen Mikroskopie vor allem in der Möglichkeit aus, Abbildungen von Bereichen innerhalb eines Präparates zu erstellen, d.h. mit dieser Technik lassen sich tomographische Bilder erzeugen, die die Struktur unter der Probenoberfläche wiedergeben; sogar dreidimensionale Abbildungen sind möglich. Aufwendige Probenvorbereitungen, wie sie für die Licht- und Elektronenmikroskopie nötig sind und die die Probe denaturieren oder auch zerstören können, entfallen.

Die CLSM-Technik ist in den letzten Jahren in zunehmendem Maße zur Untersuchung von Hartgeweben – Knochen und Zähne - eingesetzt worden. Sie eignet sich besonders zur Aufklärung der Morphologie dieser Gewebe. Die CLSM-Technik läßt sich einfach mit Fluoreszenzmarkierungsmethoden kombinieren, und erlaubt so neben den Oberflächeneigenschaften weitere Komponenten innerhalb von Zähnen bzw. Knochens zu bestimmen.

Ein weiterer zahnheilkundlicher Aspekt liegt in Modifikationen von Titanoberflächen, die ein verbessertes Einwachsverhalten von Implantaten bewirken sollen. Durch kovalente Immobilisierung von adhäsionsvermittelnden Molekülen (Proteinen und Peptiden) sollen die natürlichen Verhältnisse imitiert werden, die bei der natürlichen Knochenfrakturheilung – dieser Vorgang entspricht weitgehend der Implantatintegration- eine maßgebliche Rolle spielen.

Iststand

Weitverbreitete Techniken in der Mikroskopie sind die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen als Kontrastmittel bei der Untersuchung von Zahnstrukturen und der Einsatz der Immunofluoreszenz bei demineralisierten Präparaten. Noch in der Entwicklung steckt die Verwendung dieser Farbstoffe zur direkten Beobachtung der Hartgewebe. Die Untersuchung von Oberflächen mittels CLSM dient bisher vorwiegend der Beschreibung der Oberflächenmorphologie und weniger dem Nachweis adsorbierter und kovalent immobilisierter Substanzen. So lassen sich durch CLSM-Untersuchungen, kombiniert mit geeigneten Rechenoperationen, beispielsweise Oberflächenrauigkeiten bestimmen.

Chemische Oberflächenmodifikationen, die das Integrationsverhalten von Implantatmaterialien verbessern sollen, sind bisher nur wenig beschrieben, eigentlich überraschend, da die Chemie zur Funktionalisierung von Titanoberflächen weitgehend analog ist zu den Methoden, derer man sich bei der Silanisierung von Silizium oder Glas bedient.

Definition der Ziele und des Arbeitsprogrammes

Grundmotive dieser Arbeit sind die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und kovalente Kopplungen von Biomolekülen an Oberflächen im Zusammenhang mit Zähnen.

Zunächst war ein Ziel die weiterführende Entwicklung fluoreszenzmikroskopischer Methoden zu verschiedenen Aspekten der Zahnheilkunde. Dazu konnte auf bereits in der Arbeitsgruppe etablierte Methoden und Ausrüstung aufgebaut werden, insbesondere auf die konfokale Mikroskopie als Untersuchungsmethode.

Die Entwicklung eines vollständigen Schemas zur biochemischen Oberflächenmodifizierung von Implantatwerkstoffen auf Titanbasis und die Charakterisierung der einzelnen Arbeitsschritte u.a. durch fluoreszenztechnische Methoden stellt den zweiten Bestandteil dieser Arbeit dar. Dieser Teil konnte besonders von der vielfältigen analytischen Ausstattung profitieren, die zur Verfügung stand.

Im Rahmen der Tätigkeit am Institut für Organische Chemie der Johannes Gutenberg Universität Mainz und der Angewandten Struktur- und Mikroanalytik des Klinikums der Johannes Gutenberg Universität Mainz wurden Verfahren zu folgenden Gebieten entwickelt:

- Chemische Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Nachweis des Proteinanteils im Zahngewebe
- Spezifische fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Zellausläufern an der Schmelz-Dentin-Grenze
- Fluorimetrischer Nachweis und mikroskopische Visualisierung der Penetration von Bleichmitteln in die Zahnhartsubstanz
- pH-Bestimmung innerhalb des Zahngewebes durch ratiometrische Fluoreszenzmessungen
- Biochemische Modifizierung von Titanoberflächen zur Verbesserung des Einwachsverhaltens von Implantaten, Charakterisierung der einzelnen Arbeitsschritte durch fluoreszenztechnische, und weitere oberflächenanalytische Methoden und erste Zellkulturtests.

2.Theoretische Aspekte

2.1 Zahnhistologie

Mineralisierte Gewebe, neben Knochen vor allem Zähne, sind eine sehr alte Entwicklung in der Stammesgeschichte; bereits bei Wirbellosen finden sich Vorläuferformen. Zähne erfüllen mannigfaltige Aufgaben: Vielen Fischen und Reptilien dienen sie zum Packen und Festhalten der Beute. Fleischfresser verfügen über Reiß- bzw. Eckzähne, mit denen die Nahrung grob zerteilt werden kann und bei Wiederkäuern übernehmen breite Mahlzähne die Aufbereitung des Pflanzennahrungsbreies. Trotz der Adaption an die speziellen Anforderungen und die jeweilige Anatomie ist innerhalb der Säuger ein generelles Bauprinzip der Zähne erkennbar. Dies sei stellvertretend am menschlichen Molar (= Backenzahn) erläutert:

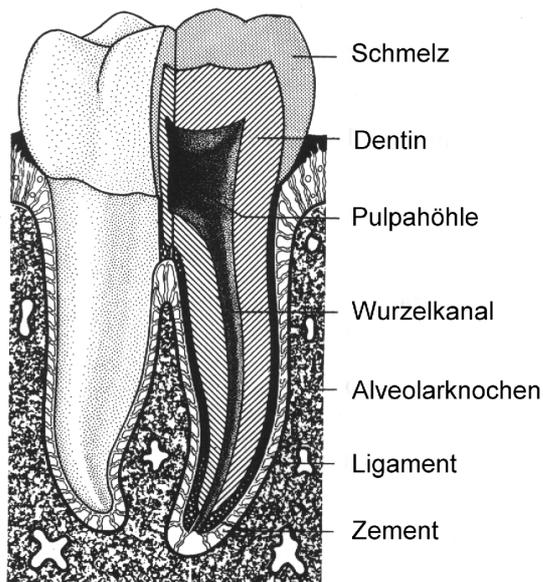


Abb.2.1.1 Molar (Quelle: Schumacher 1990)

Den sichtbaren, in die Mundhöhle hineinragenden Teil eines Zahns bezeichnet man als Krone. Über den Zahnhals erfolgt der Übergang in die Zahnwurzel. Im Inneren des Zahnes liegt die Pulpakammer, die im Bereich der Wurzel in die Wurzelkanäle übergeht. Über diese erfolgt die Blutversorgung und Enervierung der Pulpa. Die Krone wird vom Zahnschmelz (*engl. enamel*) bedeckt, der Zahnwurzel liegt eine Schicht aus Zahnzement (*engl. cementum*) auf,

das über das Ligament - Bündel kollagener Fasern - die elastische Verankerung im Kieferknochen herstellt. Schmelz und Zement bilden zusammen die Verkleidung des darunterliegenden Zahnbeines, des Dentins. Spezialisierte Zellen, sog. Odontoblasten sind für die Bildung des Dentins während der Zahnentwicklung verantwortlich und kleiden die Pulpahöhle des aus-gebildeten Zahnes aus. Im Gegensatz dazu geht die für die Schmelzbildung verantwortliche Zellart, die Ameloblasten nach abgeschlossener Zahnreife zu Grunde. Dendritische Ausläufer der Odontoblasten erstrecken sich in Dentinkanälchen bis zur Schmelz-Dentin- Grenze und scheinen neben der Versorgung des Hartgewebes auch immunologischen Aufgaben zu dienen.

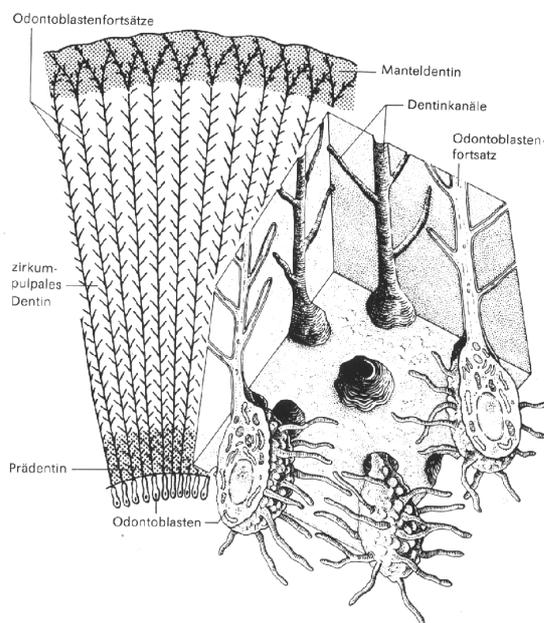


Abb.2.1.2 Dentinkanal und Odontoblasten (Quelle: Schuhmacher 1990)

Dentin und Schmelz setzen sich aus organischer Substanz (wenige Prozent), d.h. Proteinen und einer mineralischen Komponente zusammen. Bei dieser handelt es sich um Hydroxylapatit (ungefähr: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), der jedoch nicht als stöchiometrische Phase vorliegt. Zudem sind Hydroxylionen teilweise durch Fluorid- und Carbonationen substituiert. Die hervorragenden mechanischen Eigenschaften dieser Materialien lassen sich auf die Auslegung als Kompositmaterialien zurückführen, ein Verfahren, das ebenfalls technische Anwendung findet. Dentin ähnelt in seiner Zusammensetzung sehr dem Knochen, besonders augenfällig ist die Parallele bezüglich des maßgeblichen Proteins bei der Mineralisation, dem fibrillären Kollagen Typ I (Boskey 1998, Wiesmann 1998). Im Gegensatz hierzu wird die

Entstehung erster Apatitkristallite im entstehenden Schmelz durch eine Reihe globulärer Proteine vermittelt, die als Amelogenine bezeichnet werden, und die letztlich zur Bildung der Schmelzprismen führt (Fincham 1999). Dieser Umstand mag auch erklären, daß Schmelz eine höhere Sprödigkeit aufweist als Dentin.

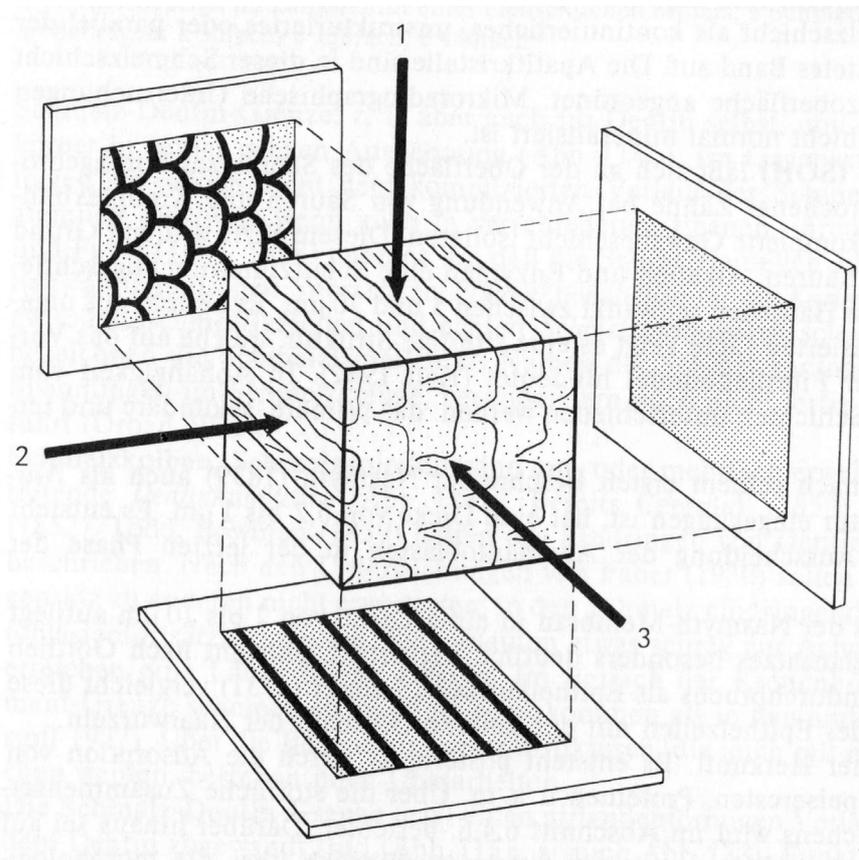


Abb.2.1.3 Verschiedene Projektionen der Schmelzprismen (Quelle: Schuhmacher 1990)

Die Details der primären Schritte des als Biomineralisation bezeichneten Prozesses sind bisher unzureichend verstanden. Ein allgemeines Prinzip scheint die Mitwirkung saurer Funktionen, besonders die von Phosphat- und bestimmten Aminosäureresten zu sein. Es wird angenommen, daß die besondere räumliche Anordnung dieser Gruppen die kritische Größe der Keimbildung beeinflusst, und so eine Präzipitation einleitet (Simmer 1995). Diese Annahme trifft wohl auch zu für die gerichtete Kristallisation von Calciumcarbonaten z.B. in Muschelschalen, Kieselsäure in Radiolaren oder Magnetit in bestimmten Bakterien (Weiss 2000, Kroger 1996, Schuler 1999). Biomineralisation tritt bei vielen weiteren Spezies bzw. Gattungen auf: Calcit in Foraminiferen, in Schwämmen (Aizenberg 1996), u.v.m..

2.2 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Als Tomographie (von gr.: tomos = Schnitt, Scheibe) bezeichnet man ein Bildgebungsverfahren, das in der medizinischen Diagnostik vielfältige Anwendung findet, und das in letzter Konsequenz durch Kombination vieler Tomogramme auch dreidimensionale Darstellungen ermöglicht. Für den mikroskopischen Bereich, d.h. in der Größenordnung einiger Micrometer gestattet die Technik der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) die räumliche Darstellung von Strukturen. Hiermit eröffnen sich neue Optionen gegenüber der konventionellen Lichtmikroskopie, die letztlich nur eine zweidimensionale Projektion der abzubildenden Präparate gestattet. Das konfokale Verfahren läßt sich vereinfacht beschreiben:

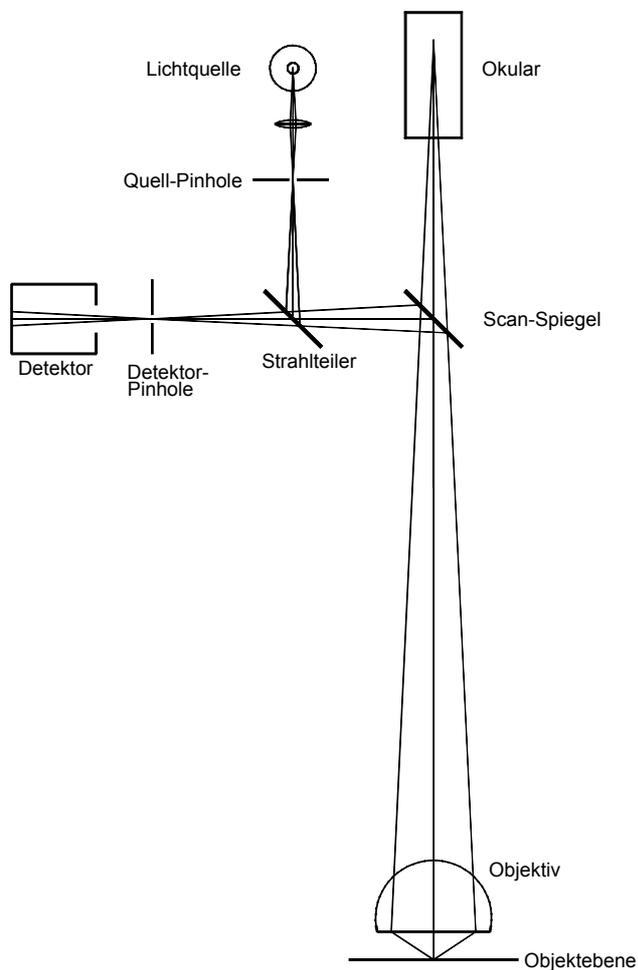


Abb. 2.2.1 Strahlengang im CLSM

Laserlicht tritt durch eine Lochblende (Quellpinhole) und wird über einen kardanischn aufgehängten Spiegel (Galvanospiegel) über die Probe geführt. Eine elektronische Steuerung ermöglicht es, den Strahl zeilenweise – ähnlich dem Bildaufbau bei der Braunschen Röhre -

über das Objekt zu rastern (scannen). Reflektiertes Licht trifft wieder auf den Rasterspiegel und erreicht nach Passage einer zweiten Lochblende (Detektorpinhole) einen Detektor (z.B. Photomultiplier). Man spricht in diesem Zusammenhang von Punkt-zu-Punkt-Abbildung. Das Bild wird letztlich im Rechner durch Korrelation des mechanischen Rastervorganges mit den Lichtintensitäten erzeugt. Entscheidend ist, daß einfallender und reflektierter Strahl über denselben beweglichen Spiegel geführt werden.

Die Abbildung zeigt in schematischer Weise den Aufbau und die einzelnen Komponenten eines CLSM .

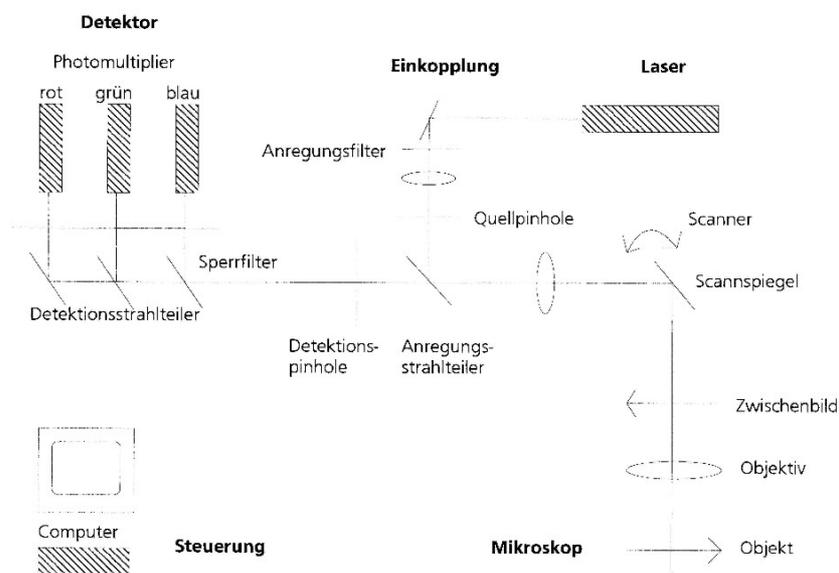


Abb. 2.2.2 Aufbau und Komponenten eines CLSM (Quelle: Engelhardt 1993)

Besondere Bedeutung kommt dem Detektorpinhole zu. Bei geöffneter Blende registriert der Detektor Licht, das aus der gesamten Tiefe des jeweils "gescannten" Areals stammt. Die erhaltene Abbildung des Objektes entspricht in ihrem Informationsgehalt im wesentlichen der einer konventionellen Aufnahme; die Intensitäten werden in Falschfarbendarstellung wiedergegeben. Wird jedoch der Pinhole-Durchmesser zunehmend verringert, erfolgt die Ausblendung von Licht, das aus Bereichen stammt, die ober- und unterhalb der Fokalebene liegen. Im konfokalen Betriebsmodus erhält man durch die sehr kleine Blende bedingt immer ein "scharfes" Bild. Typischerweise wählt man den pinhole-Durchmesser (in μm) in der Größe der (betragsmäßigen) Objektivvergrößerung.

Diese Technik erlaubt daher eine präzise Tiefendiskriminierung, die mit anderen lichtmikroskopischen Methoden unmöglich ist. Auf die geringfügig verbesserte Annäherung an die, durch die bekannte $\lambda/2$ -Beziehung vorgegebene theoretische Auflösung sei hier nicht näher eingegangen (Engelhardt 1993).

Ein weiterer Vorteil der CLSM-Technik ist die Unterdrückung von störenden Streulichtanteilen aus anderen als den gescannten Arealen der Probe. Zudem erlaubt die Kombination des CLSM mit Fluoreszenztechniken ein schonendes Untersuchen von lebenden Zellen, da die Strahlungsbelastung nur lokal und dort nur kurzzeitig auftritt. Insbesondere der Einsatz fluoreszenzmarkierter Antikörper bietet völlig neue Optionen zur gleichzeitigen Visualisierung mehrerer antigener Strukturen. Hier gilt das eben Gesagte über die geringe Strahlenschädigung im besonderen Maße, denn durch den Rastervorgang wird die unerwünschte Zerstörung der Fluorochrome (engl.: *photobleaching*) bedeutend reduziert (Engelhardt 1993).

Das Mikroskopieren von Hartgeweben – also Knochen und Zahn - (Duschner 1997, Piepkorn 1997, Grotz 1999) erfordert im Allgemeinen eine aufwendige Probenpräparation, d.h. neben Sägen sind verschiedene Schleif- und Poliergänge nötig, um Feinstrukturen lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. In der konfokalen Mikroskopie läßt sich diese Arbeit auf wenige Schritte begrenzen, wie die Bildserie auf der folgenden Seite veranschaulichen soll:

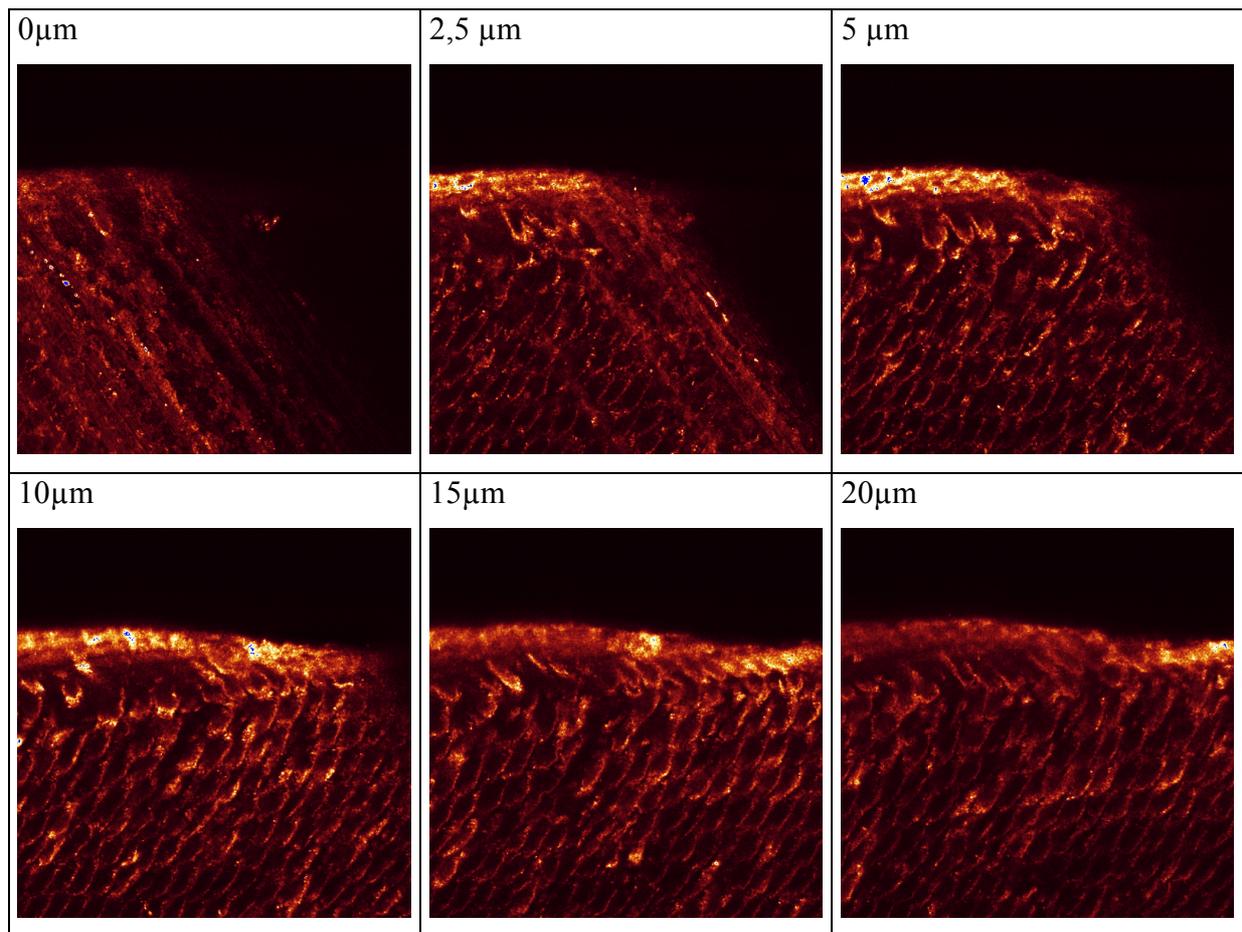


Abb. 2.2.3 Schrittweises Durchfahren einer Zahnprobe; Objektiv x40; Bildgröße 125x125µm

Die Aufnahmen zeigen einen Schnitt durch den Schmelz eines menschlichen Zahnes. Nach dem Auftrennen des Präparates mittels einer Diamantsäge erfolgten lediglich zwei Schleifvorgänge (600 bzw. 1200 Korn) von Hand. Die bei dieser Behandlung unvermeidlichen Kratzer und Beeinträchtigungen der Probenoberfläche sind nur an der Oberfläche des Präparates sichtbar. Wird die abzubildende Ebene in die Probe hinein verfahren, d.h. in z-Richtung, verschwinden die unerwünschten Artefakte, und man erhält eine Darstellung des Zahninneren dicht unterhalb der Oberfläche (100 bis max. 200µm Tiefe).

Technisch realisiert wird diese Option durch ein elektronisch gesteuertes Verfahren des Objektisches. Ein weiterer Betriebsmodus des Gerätes ermöglicht beim Scannen auf nur einer Linie und gleichzeitigem Verstellen der z-Position einen zerstörungsfreien optischen “Schnitt” senkrecht zur Probenoberfläche.

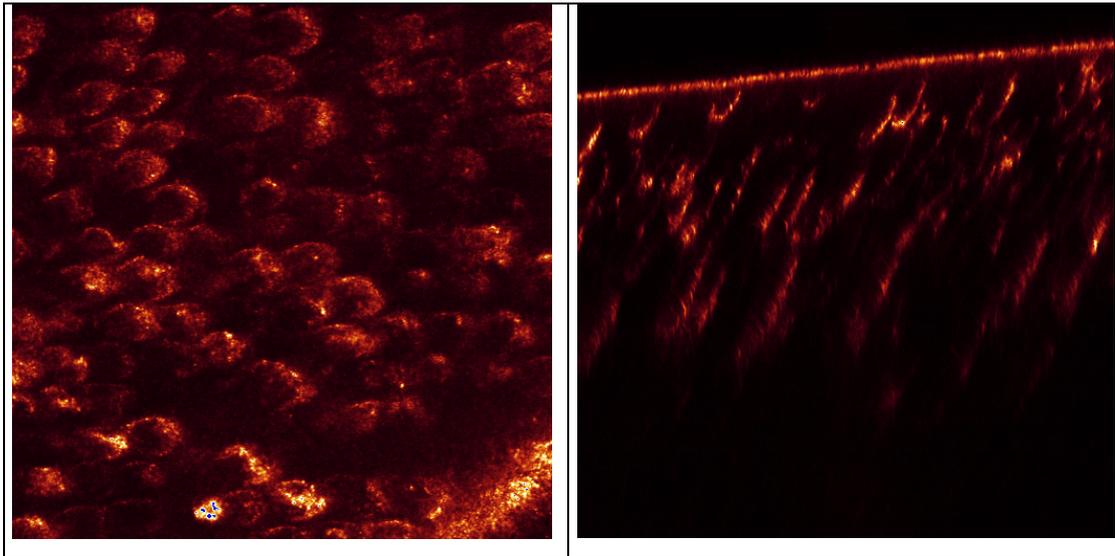


Abb 2.2.4 Typische CLSM-Aufnahmen unterschiedlicher Präparate: Schmelz; links xy-Ebene, Schnitt ungefähr senkrecht zur Prismenlängsachse, rechts z-Schnitt, längs der Prismenachse. deutlich zu erkennen sind die Schmelzprismen; Objektiv x40, Bildgröße 125x125 μ m

Die Vorteile der CLSM-Technik zusammengefaßt:

- Durch punktförmige Ausleuchtung wird Streulicht unterdrückt und das “photobleaching” minimiert
- Im konfokalen Modus erzeugte Bilder zeigen keine Unschärfe
- Licht aus Bereichen außerhalb der Fokusebene wird diskriminiert
- Dreidimensionale Aufnahmen sind möglich
- Seitenansichten, d.h. optische Schnitte parallel zur z-Achse können zerstörungsfrei gewonnen werden

2.3 Fluoreszenz & Fluoreszenzfarbstoffe

2.3.1 Theorie der Fluoreszenz

Nimmt ein Molekül, Atom oder Ion elektromagnetische Strahlungsenergie auf, kann diese in Form thermischer Energie abgegeben oder wiederum emittiert werden. Im letzteren Fall unterscheidet man zwischen der Fluoreszenz (von lat. fluere = fließen; dieser Effekt wurde zuerst bei Flußspat, einem Flußmittel entdeckt) und der Phosphoreszenz. Beide Lumineszenzphänomene unterscheiden sich in einem quantenmechanischen Prinzip, der sogenannten Spinnmultiplizität und besonders in der Lebensdauer der angeregten Zustände. Typischerweise liegt diese bei der Fluoreszenz in der Größenordnung von 10^{-12} s, bei der Phosphoreszenz 10^{-9} s (bis Tage). Die elektronischen und energetischen Beziehungen beschreibt man meist mit Hilfe des Jablonski-Diagramms:

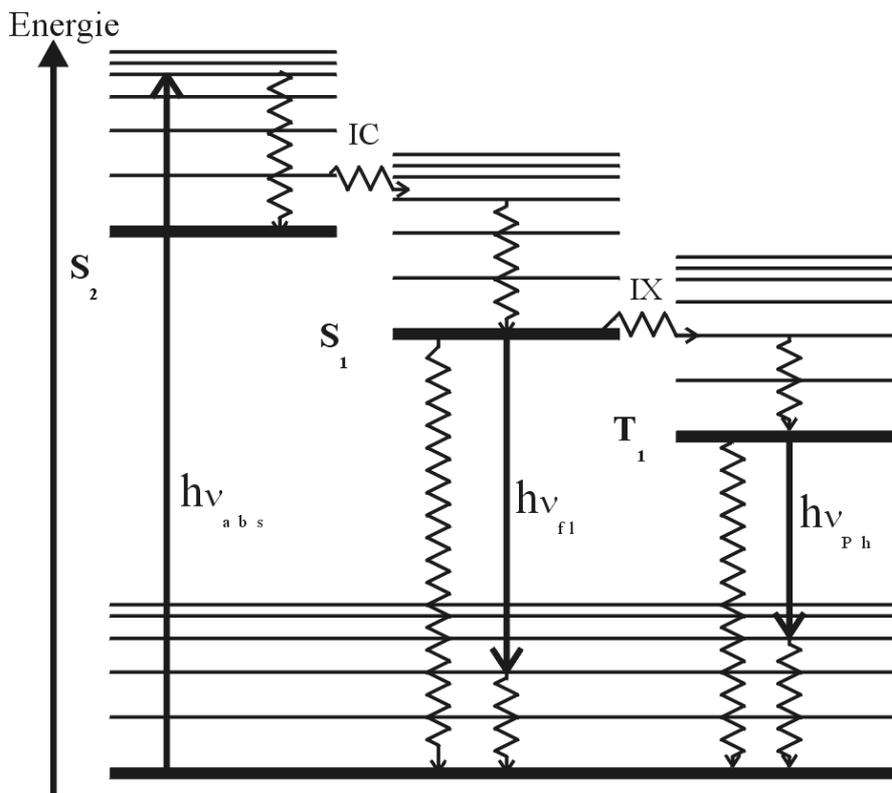


Abb. 2.3.1 Jablonski-Diagramm

Die Symbole S_0 , S_1 und S_2 bezeichnen elektronische Singulettzustände, T_0 , T_1 und T_2 Triplettzustände. Zu jedem elektronischen Niveau existieren mehrere vibratorische Niveaus v . Das Molekül wird durch Absorption eines Photons $h\nu_{abs}$ (in bestimmten Fällen auch von zwei

Photonen) auf das angeregte Niveau S_2 gebracht. Hierbei werden auch vibratorische Zustände angeregt. Im Allgemeinen emittiert das Molekül nicht aus S_2 , sondern überträgt die Anregungsenergie auf ein energetisch gleichwertiges Niveau des elektronischen Zustandes S_1 durch einen Prozeß, der als *internal conversion* (IC) bezeichnet wird. Strahlungslose Abregung, z.B. Stöße bringen das Molekül auf das S_1 -Grundniveau. Von hier aus gelangt es durch Emission eines Fluoreszenzquantens $h\nu_{fl}$ zum S_0 -Grundzustand. Die Energie des Fluoreszenzquantens ist wegen der strahlungslosen Übergänge S_2/S_1 und der vibratorischen Abregung geringer als die des absorbierten Photons. Das Fluoreszenzlicht ist demnach stets "rotverschoben", d.h. energieärmer.

Ein weiterer Desaktivierungsvorgang des angeregten Moleküls auf den hier nicht näher eingegangen sei ist die Phosphoreszenz. Dieser Prozeß verläuft wesentlich langsamer und stellt daher in Flüssigkeiten kein Konkurrenzvorgang zur Fluoreszenz dar. Tatsächlich beobachtet man diesen Effekt nur in Festkörpern.

2.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenzfarbstoffe sind aromatische und hochkonjugierte Verbindungen von besonderem Interesse, deren Anregung im nahen UV-Bereich oder mit sichtbarem Licht erfolgen kann.

Daneben werden in zunehmendem Maße fluoreszente Chelatkomplexe (Acetylacetonate mit f-Elementen; Europium, Samarium) verwendet. Deren angeregte Zustände besitzen teilweise Lebensdauern von einigen Mikrosekunden.

Konventionelle Lichtmikroskopie ist bei biologischen Objekten lediglich in der Lage, Strukturen unterschiedlicher Brechungsindizes darzustellen. Um verschiedene Bestandteile (Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, DNA, etc.) gezielt nachzuweisen, bedient man sich klassisch organischer und anorganischer Reagentien, die mit den entsprechenden Komponenten spezifische Farbreaktionen eingehen (Romeis 1988). Ein weiterer bedeutender Entwicklungssprung fand mit der Einführung immunologischer Färbetechniken statt. Spezifische Antikörper sind in der Lage, selektiv sogenannte Epitope zu erkennen und daran zu binden. Epitope können z.B. Strukturelemente aus Proteinen oder Polysacchariden oder auch einzelne organische Moleküle sein. Antikörper lassen sich heute gegen nahezu jede Stoffklasse generieren und können kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Besondere Vorteile dieser Methode sind der große Signal-Hintergrund Abstand und die Möglichkeit, Doppel- oder Mehrfachfärbungen durchzuführen (Paddock 1999).

Fluorophore wurden für einen breiten Absorptions- bzw. Emissionsbereich synthetisiert. Farbstoffe, die im nahen UV-Bereich angeregt werden (z.B. Pyrenderivate, DAPI) sind aus mehreren Gründen weniger geeignet, bei der Mikroskopie biologischer Präparate Anwendung zu finden. Ultraviolette Strahlung ist bereits ausreichend energiereich, um viele Biomoleküle zu schädigen. So absorbiert DNA bei ca. 260 nm, aromatische Aminosäuren bei ca. 290 nm Wellenlänge; das bedeutet, daß mit einer Schädigung besonders lebender Objekte zu rechnen ist. Zudem sind Optiken für UV-Licht ein weiterer Kostenfaktor. Eine neue interessante Technik, um generell das Problem der strahleninduzierten Schädigung zu mindern oder zu umgehen ist die Zweiphotonenanregung. Kurzzeitgepulste Laserstrahlung relativ niedriger Energie (nahes IR; im Bereich 800-1100nm existiert in wäßrigen biologischen Lösungen ein optisches "Fenster") bewirken bei hinreichender Leistungsdichte eine quasi gleichzeitige Absorption zweier Photonen, deren summierte Energie zur Anregung des Farbstoffes eben ausreicht. Dieser nichtlineare optische Effekt erlaubt zudem, die Fluoreszenzemission auf die Fokalebene des Mikroskopes zu begrenzen. Wie bereits erwähnt, finden Laser zunehmende

Anwendung in der Fluoreszenztechnik. Als sehr intensive Lichtquellen halten sie ebenfalls Einzug in die Mikroskopie. Die weiteste Verbreitung besitzen heute Argon-Ionen- (488, 514 nm) und Argon-Krypton-Ionen-Laser (488, 568, 647 nm). Die begrenzte Auswahl an Emissionswellenlängen wirkt sich jedoch nachteilig auf die Palette der verwendbaren Fluoreszenzfarbstoffe geeigneter Absorptionslinien aus. Die beiden vorherrschenden Klassen der in Frage kommenden Farbstoffe leiten sich von Fluorescein und Rhodamin ab. Als molekulare Chimäre der beiden Substanzen läßt sich Rhodol betrachten.

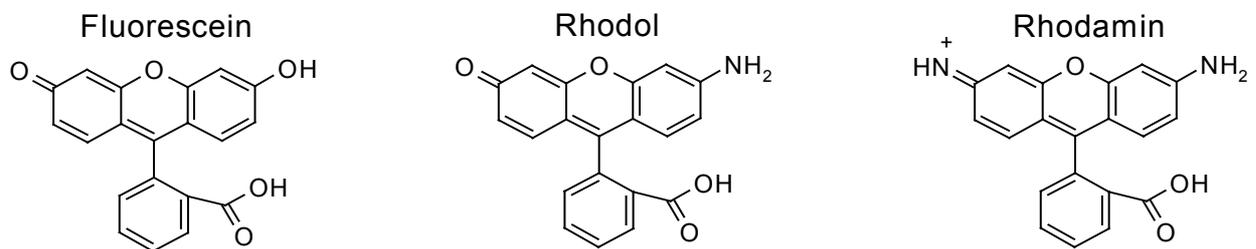


Abb. 2.3.2 Grundtypen häufig verwendeter Fluorophore: Fluorescein, Rhodol, Rhodamin

Für viele Anwendungen ist es erforderlich, den Farbstoff kovalent an eine Oberfläche, an ein Protein (z.B. Antikörper) oder ein Kohlenhydrat (z.B. Dextran) binden zu können. Besonders verbreitet sind folgende Kopplungsreagenzien:

- N-Hydroxy-succinimidylester, sog. Aktivester; Kopplung an Amine
- N-substituierte Maleinimide; binden an Thiole
- Isothiocyanate; reagieren mit primären Aminen

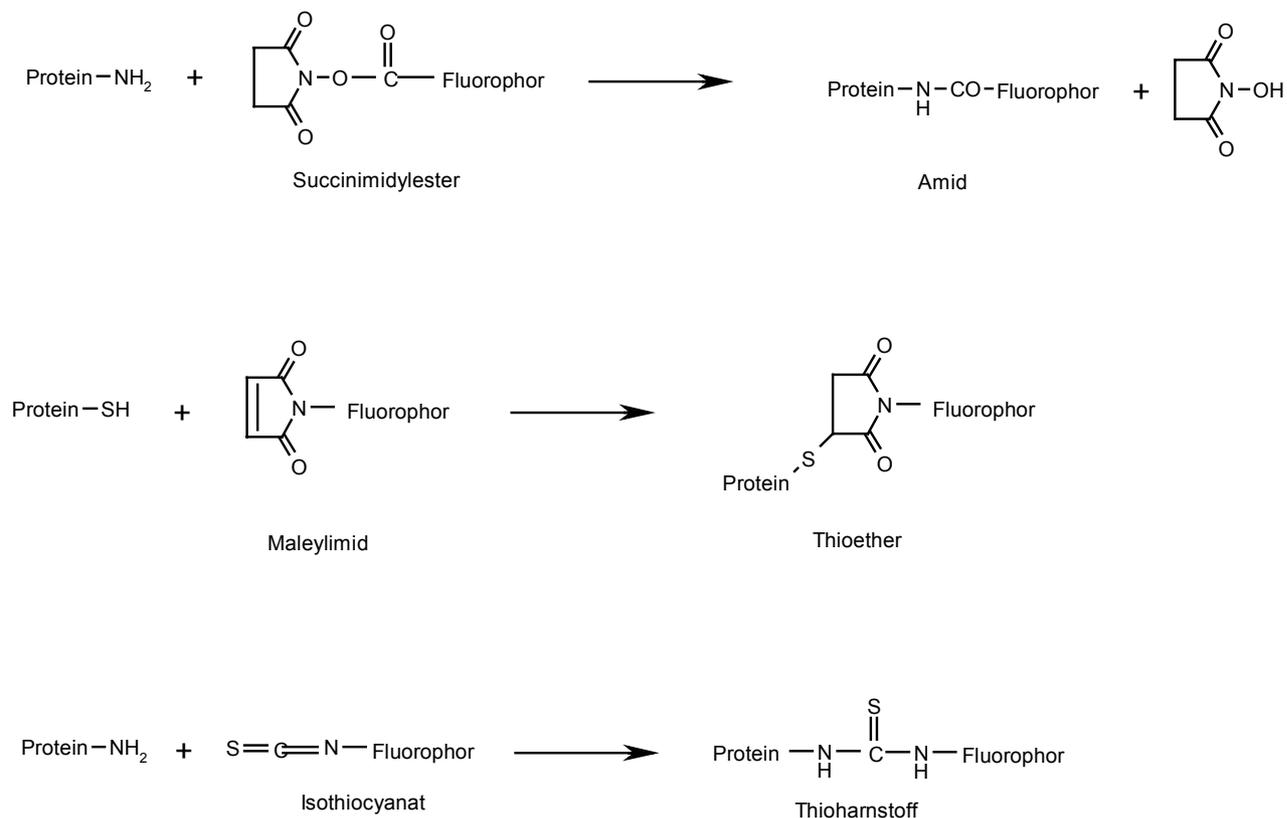


Abb. 2.3.3 Verbreitete Kopplungsgruppen

Daneben finden jedoch viele weitere Verbindungsklassen Anwendung (z.B. Carbo-cyaninfarbstoffe, Pyrenderivate). Komplexverbindungen der Seltenerdelemente Europium und Samarium, besonders Acetylacetonate sind in der zeitaufgelösten Fluoreszenztechnik gebräuchlich. Diese Methode – nicht zu verwechseln mit der zeitaufgelösten Korrelations-spektroskopie (s.u.) - nutzt die extrem langen Fluoreszenzabklingzeiten dieser Farbstoffe, die mehrere hundert Mikrosekunden betragen können (Ci 1995, Cummings 1999). Dieser Umstand erlaubt eine sehr gute zeitliche Trennung von Anregung und Detektion, wodurch Hintergrundeinflüsse weitgehend ausgeschlossen werden können.

Durch Derivatisierung der Farbstoffmoleküle können deren chemisch-physikalische und spektrale Eigenschaften variiert werden. Analog den hypso- bzw. bathochromen Substituierungen von Absorptionsfarbstoffen lassen sich Anregungs- und Emissionsverhalten verändern. Eine weitere Möglichkeit, neben dem Fluoreszenzverhalten zusätzliche Eigenschaften der Fluorophore zu steuern, ist die Modifizierung der Moleküle mit ionenselektiven Gruppen. Mittlerweile existiert ein ganzes Sortiment kommerziell erhältlicher Farbstoffe, mit denen sich spezifisch Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cl^- , u.v.m. detektieren lassen (Haughland 1996).

Fluorophore, die mit langen Alkylresten (C_{16} , C_{18}) ausgestattet sind, lagern sich bevorzugt in Lipidmembranen ein; so können mit dem Carbocyaninfarbstoff DiI₁₈ gezielt Membranen, auch intrazellulär gefärbt werden (Mukherjee 1999).

Allgemein formuliert läßt sich sagen, daß die spektralen Eigenschaften der meisten Fluorophore sehr empfindlich sind gegenüber der "chemischen Umgebung" des Moleküls .

Neben den erwähnten ionenselektiven Effekten üben Hydrophobizität, Ionenstärke der gelösten Salze und Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels einen teilweise beträchtlichen Einfluß auf Lage und Intensität der Absorptions- bzw. Emissionsmaxima aus. So ist die Fluoreszenz der meisten Fluoresceinabkömmlinge stark pH-abhängig.

Ein experimentell schwer zugänglicher Parameter ist die Fluoreszenzlebensdauer. Gegenüber den obengenannten spektralen Effekten wirken sich hier Umgebungseinflüsse besonders stark aus; mittlere Lebensdauern angeregter Zustände können um bis zu zwei Größenordnungen variieren (Berland 1995). Die zur Detektion erforderliche schnelle Elektronik und der beträchtliche Rechneraufwand bei dieser, als Korrelationsspektroskopie bezeichneten Methode erlauben derzeit noch keine bildgebende, d.h. mikroskopische Anwendung

2.4 ESCA: Electron Spectroscopy for Chemical Analysis

ESCA-Analysen (engl. *electron spectroscopy for chemical analysis*; XPS) sind besonders geeignet, um chemische Zusammensetzung und andere oberflächenbezogene Eigenschaften zu untersuchen (Moulder 1992). Vereinfacht dargestellt, wird bei dieser Analysenmethode die Oberfläche einer Probe mit Röntgenstrahlung beschossen und austretende Photoelektronen werden detektiert. Als Quelle dienen Röntgenröhren mit Magnesium- und Aluminium-Targets (Mg bzw. Al K_{α} -Strahlung). Zur Aufnahme hochaufgelöster Spektren kann zusätzlich ein Mono-chromator eingesetzt werden. Die Energie der Röntgenquanten ist ausreichend, Elektronen der inneren Schalen (K-,L-Schale) herauszuschlagen, um bei diesem einfachen Modell zu bleiben. Von diesen treten jedoch nur diejenigen aus oberflächennahen Atomlagen aus der Probe aus, da ihre mittlere Reichweite im Festkörper sehr gering ist (wenige Nanometer). Die Detektion der Elektronen diskriminiert nach ihrer kinetischen Energie, die ein Maß ist für deren ursprünglichen Bindungszustand, einer elementspezifischen Größe. Bei geeigneter Auflösung – z.B. unter Verwendung monochromatischen Röntgenlichtes - kann zudem Information über die chemische Umgebung der betreffenden Atomsorte gewonnen werden (sog. chem. Verschiebung), da die Lage der energetischen Niveaus von umliegenden Atomen und Bindungspartnern beeinflusst wird.

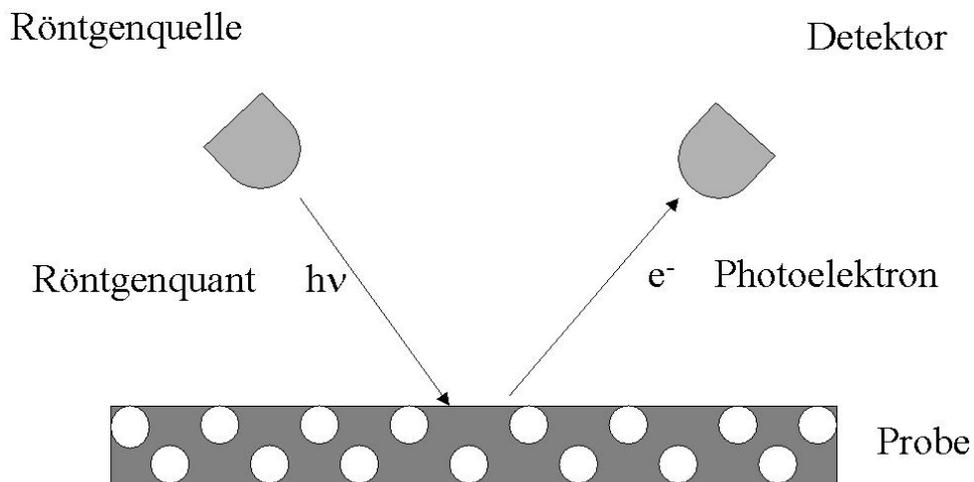


Abb. 2.4.1 Schematische Funktionsweise des ESCA

Da Oberflächen unter atmosphärischen Bedingungen immer von Adsorbaten oder Oxidschichten belegt sind, benutzt man bei der ESCA-Technik einen Argonionenstrahl zum Abtragen (engl. *sputtering*) der störenden Verunreinigungen. Durch abwechselnde Sputter- und Meßzyklen gelangt man zu Tiefenprofilen, mit denen sich der Verlauf der Stöchiometrie auch in der Tiefe der Probe verfolgen läßt.

2.5 Implantate

Wie an anderer Stelle bereits erwähnt, haben Zähne im Gegensatz zu anderen Hartgeweben, nur ein eingeschränktes Regenerationspotential. Während Knochensubstanz unter Einfluß mechanischer, hormoneller und weiterer Faktoren durch Osteoblasten auf- bzw. durch Osteoclasten abgebaut wird, sind Zähne nach der endgültigen Ausbildung nur bedingt in der Lage, Defekte zu regenerieren. Als Beispiel seien die Remineralisierung des Schmelzes durch Speichelbestandteile und die Bildung von Sekundärdentin seitens der Odontoblasten genannt (Schuhmacher 1990).

Im Falle eines vollständigen Zahnverlustes (Unfall, Abnutzung, Karies, u.a.) steht daher kein Ersatz mehr zur Verfügung. Neben "ästhetischen" Aspekten wird die Funktion des Kauapparates auch durch weitere Faktoren beeinträchtigt. So erfolgt am unbelasteten Kiefer eine Atrophie, d.h. ein Abbau des Knochenmaterials (Buser 1995).

Bereits aus der Antike – wohl eher aus erstgenanntem Grunde - sind Versuche überliefert, durch Prothesen Ersatz für Zahnverlust zu schaffen. Ernsthaftige und systematische Anstrengungen zur Entwicklung echter Implantate sind jedoch erst dem 20. Jahrhundert zuzuordnen (Koeck 1996). Die Hauptrichtung der Entwicklung bilden sogenannte "endossale" Implantate, die im Knochengewebe verbleiben, und – im Falle der Kieferimplantate - über geeignete Verbindungen die Zahnprothesen tragen. Ziel der meisten Verfahren ist die vollständige Osseointegration, d.h. das feste Einwachsen des Implantates, im Gegensatz zur Verwendung von Klebstoffen (Acrylatzement) bei z.B. künstlichen Hüftgelenken.

Geeignete Implantatmaterialien sollten/müssen einige Eigenschaften erfüllen:

- kein toxisches oder antigenes Verhalten
- hinreichende mechanische Stabilität
- geringe Korrosionsanfälligkeit
- Sterilisierbarkeit

Von den metallischen Werkstoffen eignen sich nur wenige Materialien. Vom Einsatz rostfreier Stähle wurde weitgehend abgegangen, da der hohe Gehalt an Chrom und insbesondere an Nickel ein hohes allergenes Potential birgt. Das Hauptaugenmerk liegt beim klinischen

Einsatz wie in der Entwicklung neuer Implantate auf der Verwendung von Reintitan bzw. Titanlegierungen (z.B. TiAl6V4).

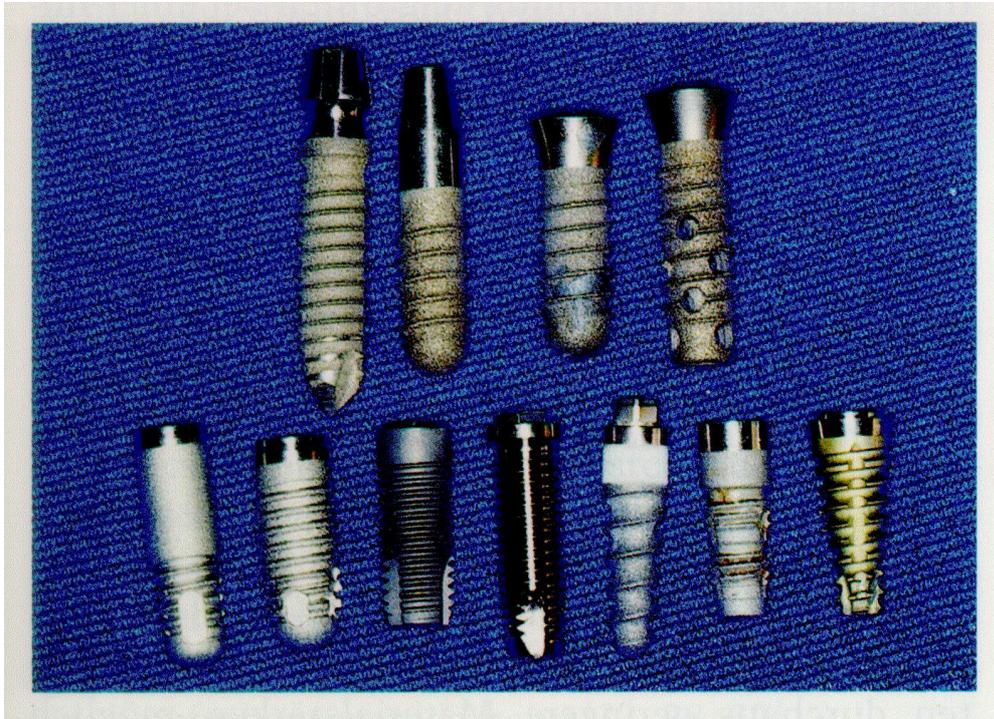


Abb. 2.5.1 Kommerzielle Implantate (Quelle: Implantologie; B.Koeck, W.Wagner 1996)

Titan vereinigt die geforderten Materialeigenschaften in geradezu idealer Weise. Das Metall besitzt bei geringer Dichte ($4,5 \text{ g/cm}^3$) eine beachtliche Festigkeit ($\text{ca.} 110 \text{ N/mm}^2$; zum Vergleich: Stahl $\text{ca.} 150 \text{ N/mm}^2$, Aluminiumlegierungen $\text{ca.} 70 \text{ N/mm}^2$). Reintitan wird in unterschiedlichen Qualitäten angeboten, z.B. als sog. *grade IV* mit folgenden maximalen Anteilen anderer Elemente: 0,35%Fe, 0,3%O, 0,07%N, 0,1%C, 0,013%H. Titan verhält sich unter physiologischen Bedingungen äußerst inert und es gilt zudem als nichttoxisch. Dies ist auf die oberflächliche Passivierung zurückzuführen. Eine festhaftende Oxidschicht bildet sich sofort an der Luft, wie auch in wässrigem Milieu aus. Diese wenige Atomlagen dicke Oxidhaut läßt sich mittels anodischer Oxidation – ähnlich dem Eloxalverfahren für Aluminium - oder durch Einwirkung geeigneter Oxidationsmittel verstärken. In diesem Zusammenhang sei der Begriff der Biokompatibilität angesprochen. Dieser Ausdruck ist in der Literatur nicht eindeutig definiert, doch wird darunter wohl einhellig die Eigenschaft von Materialien nichtbiologischen Ursprungs verstanden, neben der geforderten Verträglichkeit

auch das Gewebeintegrationsverhalten günstig zu beeinflussen und eine Abstoßungsreaktion des Wirtsorganismus zu verhindern.

Titan scheint in dieser Hinsicht ein besonders vielversprechendes Material als Implantatwerkstoff zu sein, denn die - im wäßrigen Milieu hydratisierte - Oberfläche wird meist sehr gut akzeptiert. Teilweise wurde auch eine spontane Präzipitation von Calciumphosphaten an derartigen Proben beobachtet (Eliades 1997).

Der Prozeß der Implantateinheilung ist kein Vorgang, der vom biologischen Organismus "vorgesehen" wurde. Man geht davon aus, daß hier "vergleichbare Phänomene wie bei der regulären Knochenbruchheilung" auftreten (Koeck 1996). Die Frakturheilung ist histologisch seit langem sehr gut beschrieben. Beteiligte Zellarten und Proteine sind ebenfalls bekannt. Über Einzelheiten der Organisation dieses Vorgangs und der exakten biochemischen Abläufe herrscht aber noch immer Unklarheit; jedoch stellt man sich nach heutigem Kenntnisstand folgenden Ablauf vor:

In den nach einer Knochenfraktur entstandenen Spalt tritt zunächst Blut ein und bildet das sog. Koagulum, welches mit Fibrinfasern durchsetzt ist. Entlang dieser Fasern oder Fibrillen – so die Vorstellung - wandern unter anderen die knochenbildenden Zellen, die Osteoblasten ein) (Davies 1997). Die Herkunft dieser Zellart wird kontrovers diskutiert (Davies 1998). Möglicherweise stammen sie ab von pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks; andere Befunde legen nahe, daß Osteocyten – ausdifferenzierte Knochenzellen - aus dem, den Spalt umgebenden Knochen reaktiviert werden können.

Diese Zellen beginnen nun mit der Biosynthese der sogenannten extrazellulären Matrix (EZM), einer komplexen Mischung vieler Proteine, deren Hauptkomponente Kollagen ist. An diesen Kollagenfasern setzt im Anschluß die Einlagerung mineralischen Materials ein; hierbei handelt es sich im wesentlichen um Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, der als nichtstöchiometrische Phase vorliegt.

Osteoblasten sind in der Lage, verschiedene Bindegewebsproteine zu sezernieren. Zu diesen gehört unter anderem das genannte Kollagen (Typ I), ein fibrilläres Protein, das aus in der Zelle gebildeten Einheiten extrazellulär zu sehr großen Netzwerken verknüpft wird und das ebenfalls das RGD-Tripeptid enthält. Ein weiteres wichtiges globuläres Protein ist das BSP (engl. *bone sialo protein*), dem eine entscheidende Rolle bei der Mineralisierung der EZM zugesprochen wird (Nanci 1999). Einige weitere Bindegewebsproteine seien hier kurz erwähnt:

Laminin, der membranbildende Hauptbestandteil der sog. Basallamina, Fibronectin und Osteopontin. Alle genannten – die Aufzählung ist bei weitem nicht vollständig - Proteine

zeigen zwei auffällige Gemeinsamkeiten: Sie tragen alle das sogenannte RGD-Motiv; RGD steht für die Tripeptidsequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure. Zudem sind diese Proteine mehr oder weniger stark phosphoryliert, meist trägt ein Serinrest die Phosphatgruppe (Adamson 1993).

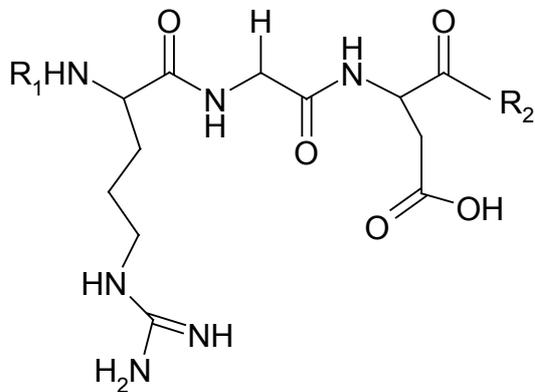


Abb. 2.5.2 RGD-Motif (Arg-Gly-Asp)

Das RGD-Motiv dient als Ligand einer Gruppe besonderer Rezeptoren: den Integrinen. Diese finden sich bei allen Bindegewebszellen, so z.B. bei Fibroblasten und Osteoblasten. Integrinmoleküle sind Transmembranmoleküle und bestehen aus zwei Untereinheiten den α - und β -Ketten. Beide Ketten existieren in verschiedenen Varianten, sodaß sich durch Kombination Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität ergeben (Cox 1998, Graber 1999).

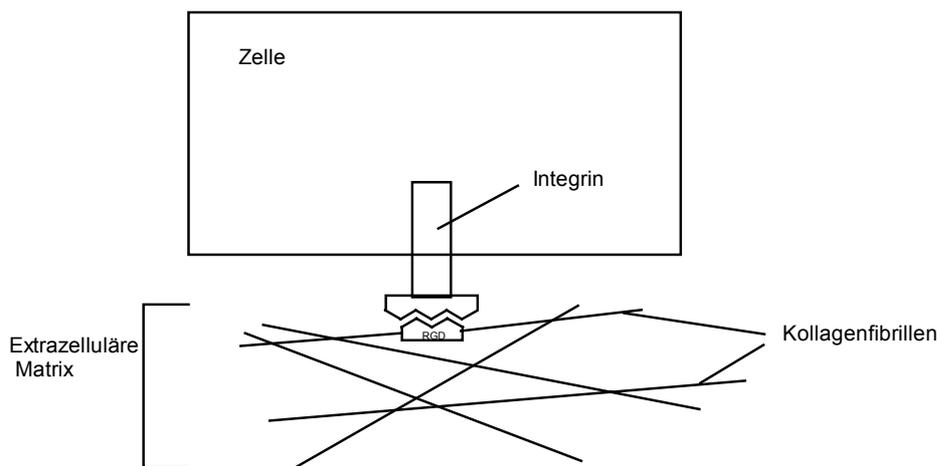


Abb. 2.5.3 Schema der Wechselwirkung Zelle-Integrin

Integrine dienen – daher ihre Bezeichnung - der Integration der Zellen in die sie umgebende extrazelluläre Matrix, d.h. in das komplexe Netzwerk aus Kollagen und anderen Binde-

gewebsproteinen. Hinreichend für Rezeptor-Ligandbindungen ist das Erkennen des RGD-Motivs. Wenig ist bekannt über die Bedeutung flankierender Aminosäuresequenzen zusätzlich zu RGD nicht allein auf die Bindung, sondern auch auf die Vermittlung von Signalen ins Zellinnere. Die Signaltransduktion mittels Integrinen hat neben Auswirkungen auf die Zellmorphologie, z.B. Veränderungen des Zytoskeletts, ebenfalls Einfluß auf die Biosyntheseleistung und –art der Zelle (Sinha 1996). Osteoblasten sezernieren während ihrer Migration durch das Fibringeflecht des Koagulum unter anderem BSP (engl. *bone sialo protein*), von dem man annimmt, daß es an den Apatit der Bruchstellen bindet (Davies 1998). Dort stellen diese Moleküle ihrerseits “Andockstellen” für Integrine der Osteoblasten dar; die Zellen bilden nach dieser Auffassung demnach ihre eigenen “Haftvermittler”. Kollagene scheinen in dieser frühen Phase der Frakturheilung keine Rolle zu spielen; nach elektronenmikroskopischen Befunden ist die erste Schicht der remineralisierten Zone frei von Fibrillen (sog. cement line) (Bain 1990). Anschließend setzt eine komplexe, bisher unzureichend verstandene Maschinerie ein, die den Frakturspalt mit mineralisiertem Gewebe auffüllt und letztlich wieder funktionales Knochengewebe herstellt. Bestimmte Einzelaspekte dieses Prozesses dienen als Markerereignisse des fortschreitenden Heilungsverlaufes. Phosphat z.B. wird durch das Enzym Alkalische Phosphatase aus organischen Phosphaten (ATP, β -Glycerinphosphat u.a.) bereitgestellt. Daher kann der Nachweis des Enzyms – immunologisch oder mittels einer Farbreaktion - als Indiz für die einsetzende Mineralisierung gelten. Weitere beteiligte Markerproteine weist man meist immunologisch, also durch spezifische Antikörper nach (Chentoufi 1993).

Das Einwachsen, die Osseointegration des Implantates läßt sich mit der Frakturheilung vergleichen. Einschränkungen sind nach heutigem Kenntnisstand besonders bezüglich der Grenzschicht Titanoxidhaut/biologisches System zu machen. Ob z.B. Proteine wie BSP an Titanoberflächen gleiches oder ähnliches Verhalten zeigen wie an natürlichem Apatit kann bisher nur gemutmaßt werden. Ansätze, die zu kommerziellen Produkten geführt haben, versuchen durch Beschichtung der Implantate mit synthetischem Apatit die biologischen Gegebenheiten nachzuahmen. Bei dem Plasmasprayverfahren wird das Mineral im Lichtbogen verdampft und schlägt sich als teilkristalline Schicht auf der Titanoberfläche nieder. Nach dem Einsetzen derartiger Implantate erfolgt meist eine Resorption der Beschichtung. Eine plausible Erklärung dieses Phänomens ergibt sich aus der Annahme, daß eben keine rein kristalline Phase vorliegt; das vorwiegend amorphe Material (Phosphatglas) wird nicht als körpereigen erkannt und durch spezialisierte Zellen, sog. Osteoclasten abgebaut.

In weiterführenden Experimenten zur Verbesserung der Biokompatibilität von Implantatmaterialien bedient man sich verschiedener Methoden. Die an der Grenzfläche Knochen/Koagulum beteiligten Proteine sollen als Maskierung der künstlichen Oberfläche dienen; dies wird in der Literatur als Biomimetik bezeichnet.

Erste Versuche bei Polymeren (Polyethylen, Polyurethan) gehen von der Beobachtung aus, daß Proteine allgemein dazu neigen, an diesen Oberflächen zu adhären. Diese unspezifische Bindung zwischen Protein und Polymer wird durch v.d.Waals und ionische Wechselwirkungen vermittelt. Beschichtete Polymere zeigen tatsächlich in Zellkultur ein verbessertes Adhäsionsverhalten gegenüber "nackten" Vergleichsproben (Cox 1998). Um Größenordnungen stärker sind allerdings kovalente Kopplungen und folgerichtig wurden in der weiteren Entwicklung funktionalisierte Polymere chemisch mit Proteinen beschichtet. Tatsächlich läßt sich mit dieser Technik das Haftverhalten von Zellen weiter verbessern. Biokompatible Polymere unterliegen allerdings einigen wichtigen Einschränkungen in ihrer Anwendung. Zum einen reichen Kunststoffe in ihren mechanischen Eigenschaften bei weitem nicht an diejenigen von Metallen heran. Aus toxikologischer Sicht gilt die Freisetzung von Restmonomeren als bedenklich. Problematisch scheint auch die immunologische Reaktion des Wirtsorganismus auf feinste Abriebpartikel zu sein (Daniels 2000, Sabokbar 1998, Oh 1996).

Die biomimetische Funktionalisierung von Titanimplantaten würde nach dem bisher gesagten mehrere gewünschte Aspekte in sich vereinigen:

- sehr günstige mechanische Eigenschaften
- geringe toxikologische bzw. immunologische Risiken
- gezielt induzierte Integration

Die Technik der Funktionalisierung von Titanoberflächen kann sich der langen Erfahrung bedienen, die auf dem Gebiet der kovalenten Immobilisierung von Biomolekülen auf Silizium besteht (You 1996).

Die Si-O-Bindung besitzt weitgehend kovalenten Charakter; ähnliches gilt für die Bindung Titan-Sauerstoff. Überraschenderweise erscheinen Versuche zur Silanisierung von Titanoberflächen erst in jüngerer Vergangenheit in der Literatur (Sukenic 1990).

Die Methodik ist durchaus vergleichbar mit dem Siliziumäquivalent. Die Arbeitsschritte lassen sich zusammen-fassen:

- Reinigung der Titanproben durch geeignete Ätzverfahren oder elektrochemische Methoden, z.B. Elektropolitur
- Oxidation, anodisch oder naßchemisch
- Silanisierung mit Aminosilanen
- Reaktion mit sog. Crosslinker, z.B. Glutaraldehyd
- Kopplung mit Biomolekülen, z.B. Peptid, Protein

Diese Technik bietet eine Fülle denkbarer Anwendungen. Durch Einsatz nicht nur einzelner Proteine sondern durch Kombination mehrerer Substanzen auf einem Implantat ließen sich erwünschte Effekte kombinieren: Während eine Beschichtungskomponente die Zelladhäsion vermittelt, sorgen weitere Faktoren (Wachstumsfaktoren, Hormone, etc.) für ein gesteuertes Wachstum vor Ort.

3. Methodischer Teil

3.1 Fluoreszenzmikroskopische Techniken

3.1.1 Fluoreszenznachweis der Proteinkomponente im Zahngewebe

Zur Unterscheidung, ob Farbstoffe an Proteine des Zahngewebes chemisch binden oder nur an der Oberfläche der mineralischen Komponente adhären, können die organischen Bestandteile enzymatisch degradiert werden (Kitazawa 1999).

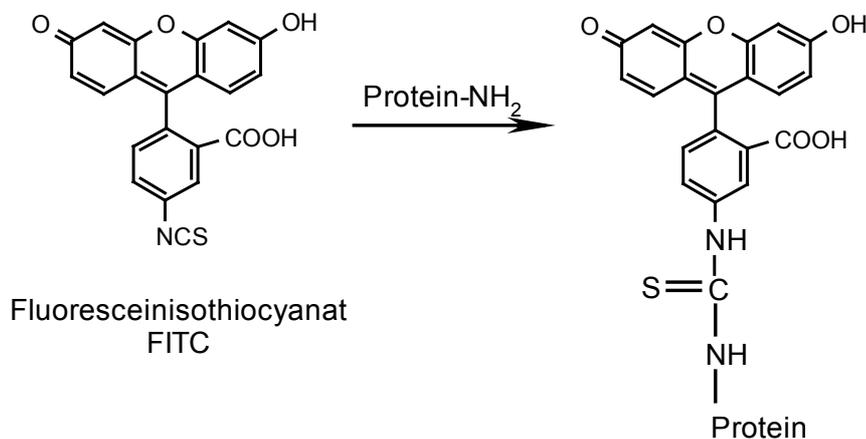


Abb. 3.1.1.1 Kopplung von Protein und Fluoresceinisothiocyanat

Sehr gut geeignet hierzu ist das Enzym Proteinase K aus *Tritirachium album*, einem humanpathogenen Bakterium. Proteinase K verdaut Eiweiße sehr unspezifisch, d.h. es wird ohne Aminosäurespezifität weitgehend jedes Protein abgebaut (z.B. Kollagen, Keratin der Haare). Die Bruchstücke eines solchen enzymatischen Verdaus sind im Allgemeinen löslich und können aus dem Präparat gespült werden, gegebenenfalls unter Verwendung eines Detergents. Im Vergleich einer Schmelz-Probe, die mit Proteinase K behandelt wird und einem nativen Präparat ist zu erwarten, daß ein koppelbarer Farbstoff, beispielsweise FITC, nur im letzteren Fall bindet.

Durchführung:

Intakte, nichtkariöse Zähne wurden umgehend nach der Extraktion in Phosphatpuffer (PBS) überführt, dem gegen Verkeimung 0,01% (w/v) NaN_3 zugesetzt wurden. In jedem Fall wurde gewährleistet, daß die Proben nie austrockneten. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Auf der Bandsäge wurden Zahnscheibchen (2mm) in Zahn längsrichtung geschnitten, und beidseitig mit Nassschleifpapier (1200 Korn) bearbeitet. Die relativ geringe Dicke wurde gewählt, um zu gewährleisten, daß die Enzymlösung ausreichend eindringen kann. Einige der Proben blieben unbehandelt und wurde in PBS aufbewahrt. Die andere Gruppe wurde bei 50°C für 24 Stunden in einer Lösung von Proteinase K in PBS (100 µg/ml) inkubiert. Nach dem Verdau wurden diese Präparate fünfmal in PBS unter Zusatz einiger Tropfen Spülmittel gewaschen. FITC wurde zunächst in 50 µl DMSO gelöst, und mit 0,1 M Carbonatpuffer pH 8,3 auf eine Endkonzentration von 20 µg/ml eingestellt. Die Zahnscheiben beider Gruppen wurden nun 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit Ethanol (je 1 min) gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen; aufbewahrt wurden die Proben in PBS.

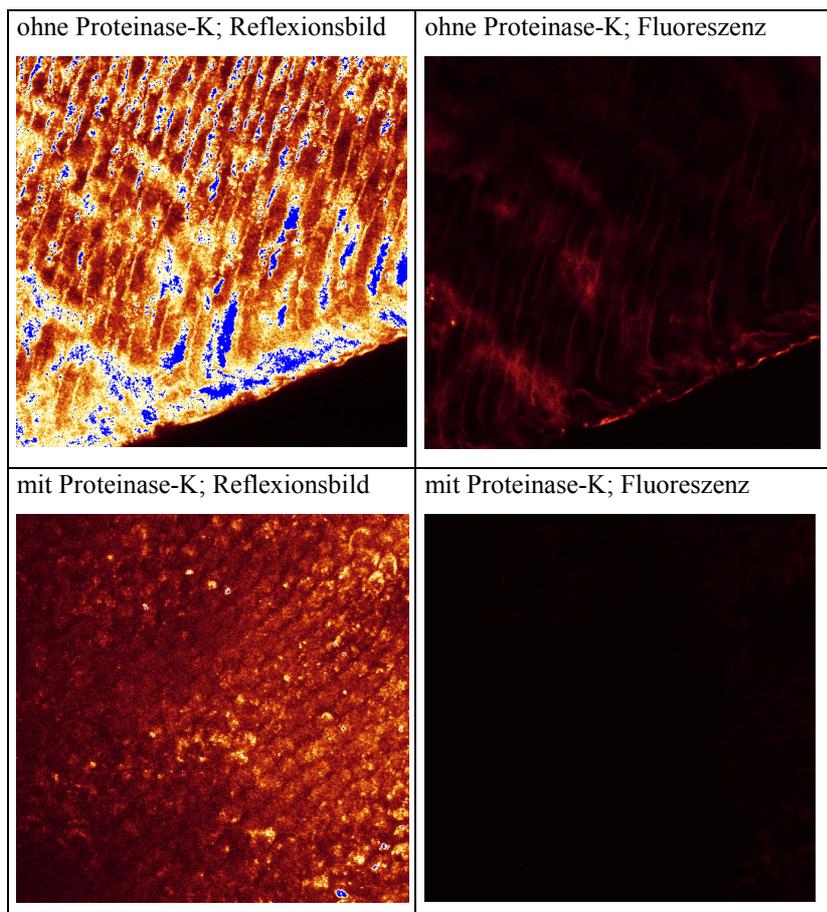


Abb. 3.1.1.2 Effekt der Proteinase-K-Behandlung auf den Proteinanteil im Zahngewebe (Schmelz)

Fluoreszenz: Ex 488nm; Em Langpaß >515nm; Objektiv x40; Bildgröße 125x125µm

Obere Bilder: Schnitt parallel zu Schmelzprismen; unteres Bildpaar: Schnitt ca. senkrecht zu Prismen

Die Abbildungen verdeutlichen den Effekt des Proteaseverdau. Die Kontrollproben zeigen relativ starke Fluoreszenz, die enzymatisch behandelten Zahnscheiben keine. Durch Waschschrirte mit Ethanol wird die Anwesenheit freien Fabstoffes ausgeschlossen. Daraus kann geschlossen werden, daß Fluorescein über die Isothiocyanatgruppe nur mit primären Aminofunktionen des Proteins reagiert und nicht einfach am Hydroxylapatit absorbiert werden kann.

3.1.2 Fluoreszenzmikroskopische Detektion der Odontoblastenfortsätze

In der Einleitung wurde bei der allgemeinen Beschreibung der Zahnhistologie auf die Bedeutung der Odontoblastenfortsätze eingegangen. Neben ihrer Rolle bei der Zahnentwicklung erfüllen diese Zellausläufer im ausgebildeten Zahn weitere Funktionen:

Die Pulpahöhle ist mit einer Monolage der Odontoblasten ausgekleidet. Jede einzelne der Zellen schickt einen Ausläufer (engl. *process*) bis zur Schmelz-Dentin-Grenze. Die Fortsätze liegen in den Dentinkanälchen und sind an ihren Enden häufig verzweigt (sog. Ramifikation).

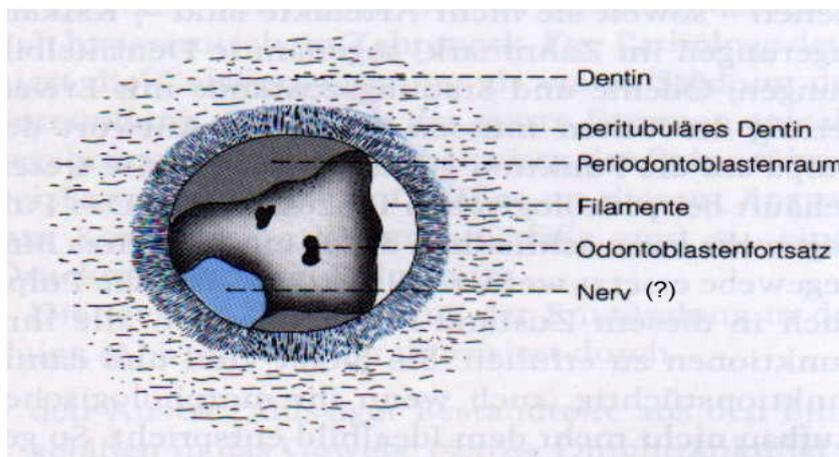


Abb. 3.1.2.1 Odontoblastenfortsätze und Dentinkanäle

Die Odontoblastenfortsätze dienen offenbar mehreren Aufgaben. Zunächst besteht eine ihrer Funktionen in der Versorgung des Zahngewebes; hierzu gehört auch die Bildung von Sekundärdentin, die durch äußerere Stimuli induziert werden kann, etwa durch Injektion von

Ca(OH)_2 (Kardos 1998). Die Odontoblasten stehen in engem Kontakt mit Zellen des Immunsystems (D'Souza 1998), und vermitteln Reize an diese, wie sie bei Infektionen (Karies) auftreten (Fristad 1995). Möglicherweise sind diese Zellen auch bei der Weiterleitung von Signalen beteiligt, die durch mechanische oder thermische Einflüsse verursacht werden; bisher gelang kein zweifelsfreier Nachweis sensorischer Nervenendigungen in den Dentinkanälen (Naftel 1994). Eine weitere ungeklärte Frage befaßt sich mit der Ausdehnung der Odontoblastenfortsätze im Bereich der Grenze Schmelz-Dentin. Die meisten Arbeiten hierzu beziehen sich auf elektronenmikroskopische Untersuchungen, mit den üblichen Einschränkungen hinsichtlich der Artefaktbildung während der Probenpräparation (Koeck 1996).

Bei der konfokalen Mikroskopie lassen sich die Präparate in ihrem nativen, unveränderten Zustand darstellen, die Voraussetzung um Aussagen über Lage und Erstreckung der Fortsätze machen zu können. CLSM-Bilder im Reflexionsmodus basieren letzten Endes auf unterschiedlichen Bechungsindizes innerhalb der Probe. Im hier betrachteten Fall werden Strukturen abgebildet, die den Grenzflächen zwischen Mineral (Hydroxylapatit) und flüssigkeitgefüllten Hohlräumen (Dentinkanal) entsprechen. Organische, zelluläre Bestandteile sind innerhalb des Zahnes in dieser Hinsicht wegen der relativ kleinen Unterschiede kaum voneinander zu unterscheiden. Daraus folgt, daß zwischen Dentinkanälen und den Zellausläufern ohne weitere Ergänzungen kaum unterschieden werden kann. Deshalb wurden zelluläre Komponenten markiert, z.B. Proteine des Zytoskeletts (Aktinfilamente), die mit spezifischen Antikörpern sichtbar gemacht werden konnten. Dabei gelangte man jedoch zu verschiedenen Aussagen über die Erstreckung der Odontoblastenausläufer.

Ein universeller, da unverzichtbarer Bestandteil jeder Zelle ist die Lipidmembran, die prinzipiell anfärbbar ist. Für diese Anwendung interessante Techniken wurden für eine andere Zellart mit dendritischen Fortsätzen entwickelt: die Nervenzellen oder Neuronen.

Als besonders vorteilhaft für den vorliegenden Fall haben sich Fluoreszenzfarbstoffe erwiesen, die lange Alkylketten ($\text{C}_{16}, \text{C}_{18}$) besitzen. Diese Ketten entsprechen in ihrer Länge gerade den beiden häufigsten Fettsäuren der Zellmembran (Stearin-, Palmitinsäure), daher erwartet man eine bevorzugte Anreicherung dieser Substanzen in den Membranen.

Breite Verwendung besitzen die Carbocyaninfarbstoffe DiO und DiI. Die Kettenlänge hat einen vernachlässigbaren Einfluß auf deren spektrale Eigenschaften (Haughland 1996).

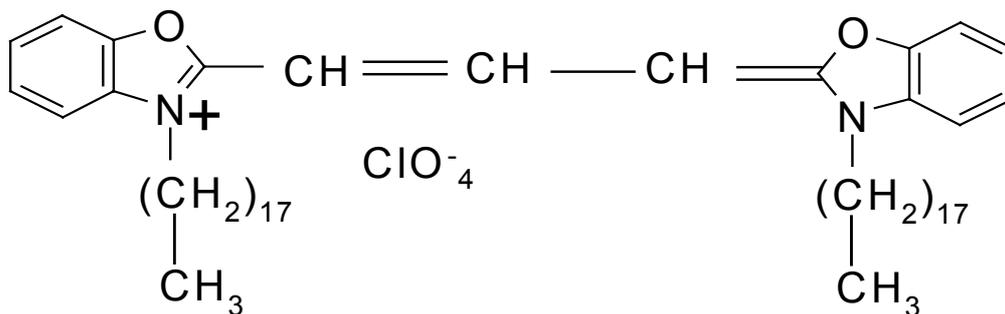
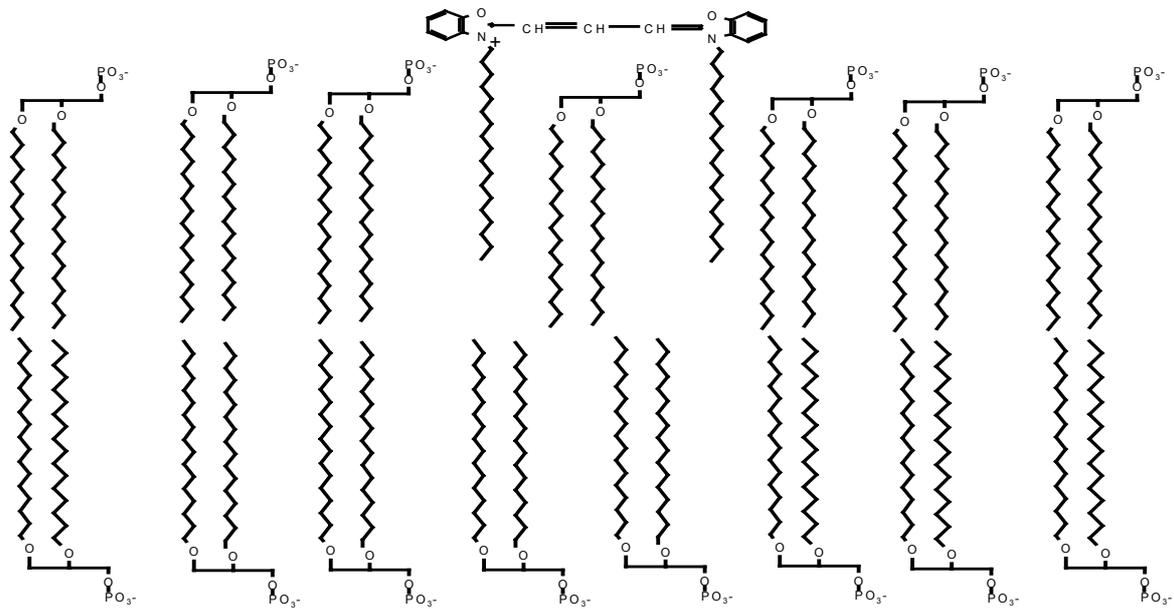


Abb. 3.1.2.2 Fluoreszenzfarbstoff DiO in einem Membranausschnitt

Durchführung:

Die Farbstoffstammlösung (1 mg/ml DiO in wenigen Tropfen DMSO), wurden mit PBS auf eine Endkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Im ersten Ansatz wurden Zahnscheiben (2 mm Dicke) 48 Stunden in Aceton gegeben zum Herauslösen der Lipidbestandteile und danach in PBS gelagert. Gefärbt wurde für 2h bei RT und anschließend dreifach mit PBS gewaschen. Zweidimensionale CLSM-Aufnahmen (ca. 10 μm u.O.) wurden paarweise im Reflexions- und Fluoreszenzmodus durchgeführt.

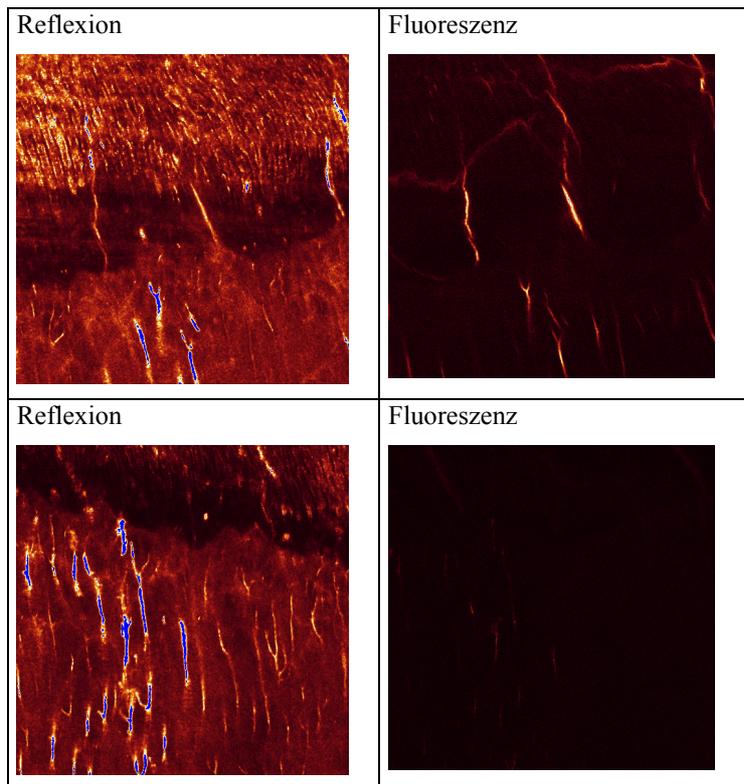


Abb. 3.1.2.3 DiO-Färbung; Zwei Beispiele zum Einfluß der Acetonbehandlung auf die Anfärbbarkeit der Odontoblasten-ausläufer. tomographischer Schnitt; der obere Bereich jedes Bildes stellt Schmelz, die jeweils untere Hälfte Dentin dar. Auch die Acetonbehandlung kann färbbare Lipidreste in der Probe belassen (Bild rechts oben). ca. 10µm u.O., Objektiv x40, Bildgröße 125x125µm², Reflexion: 488nm; Fluoreszenz: Ex: 488nm Em: Bandpaß 515±15nm

Im zweiten Ansatz wurden Zahnproben von unbehandelten Zähnen für zwei Stunden in der Färbelösung inkubiert und dann dreimal mit Puffer (PBS) gespült. Als Kontrolle dienten Zahnpräparate, die zuvor einem Proteinase-K-Verdau unterzogen wurden. Zu diesem Zweck wurden 1mm dicke Scheiben –zur der besseren Zugänglichkeit der Enzymlösung- bei 50°C für 24 Stunden in Proteinase-K-Lösung inkubiert (0,1 mg/ml in PBS). Nach drei Waschschritten mit PBS unter Zusatz einiger Tropfen Spülmittel wurde mit Aceton und Ethanol gespült, um restliche Membranbestandteile zu entfernen. Die Lagerung erfolgte in PBS. Diese Proben wurden derselben Färbung unterzogen.

Zur Veranschaulichung wurden Bereiche der Schmelz-Dentin-Grenze dreidimensional dargestellt. Hierzu wurden Bildstapel (ca.120 je Probe; Abstand 0,25 µm) aufgenommen, die mit einer speziellen Software (Leica TCS NT) in eine räumliche Abbildung des Probenvolumens umgesetzt wurden.

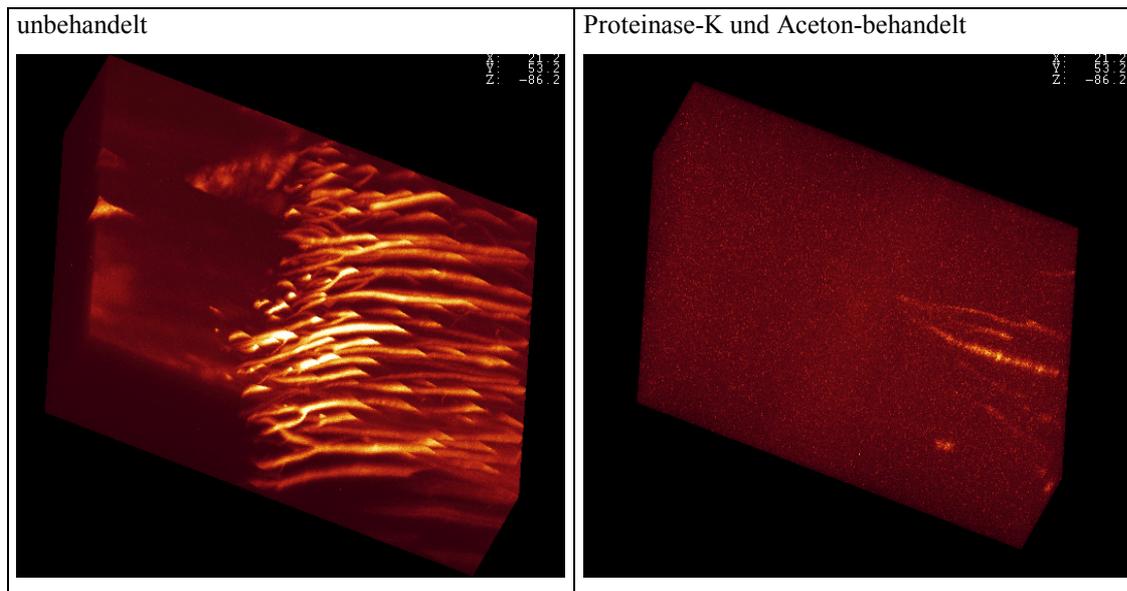


Abb. 3.1.2.4 Pseudodreidimensionale CLSM-Aufnahmen mit und ohne Proteinase-K-Verdau, DiO-gefärbt; jeweils linke Bildhälfte Schmelz, rechts Dentin. Die Odontoblastenausläufer reichen bis zur Schmelz-Dentingrenze, wo sie meist verzweigt enden (sog. Ramifikationen). Fluoreszenz: Ex: 488nm Em: Bandpaß 515±15nm, Objektiv x40, Bildgröße 125x125µm²

3.1.2.1 Diskussion zu 3.1.1 und 3.1.2

Die mikroskopische Darstellung der Proteinkomponente des Zahnhartgewebes sollte mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes erfolgen. Durch chemische Kopplung des Farbstoffes kann zwischen einfacher Adsorption an Hydroxylapatit und der kovalenten Bindung an organische Bestandteile unterschieden werden. Die Isothiocyanatgruppe reagiert nur mit freien Aminofunktionen zu stabilen Thioestern. Dies sind in Proteinen die ε-Aminogruppe der Lysinreste und die N-Termini. Dagegen kann lose gebundenes Fluorescein aus dem Präparat ausgewaschen werden. Der Proteinaseverdau beseitigt weitgehend die potentiellen Bindungsstellen für die FITC-Kopplung. Die Fragmente der enzymatischen Degradation sind offenbar ausreichend klein, um während des Spülens aus dem Zahnabschnitt zu gelangen. Der Vergleich der Aufnahmen mit/ohne Enzymbehandlung zeigt deutlich, daß die Fluoreszenzintensität nach dem Verdau stark reduziert ist, d.h. es handelt sich bei der färbbaren Komponente im Zahn um Proteine.

Die vorrangig diskutierte Methode der selektiven Färbung einzelner Komponenten mit anschließender „Negativkontrolle“ durch Entfernung der zu markierenden Substanzen läßt sich erweitern:

Odontoblastenfortsätze, die dendritischen Ausläufer der dentinbildenden Zellen besitzen mehrere Bestandteile, die sich spezifisch detektieren lassen. Neben Proteinen des Cytosols (und der Membranen) sind dies die Phospholipide der äußeren Zellmembran. Lipide sind keine im eigentlichen Sinne „kopplungsfähige“ Substanzklasse, allerdings werden sich stark hydrophobe Verbindungen oder Reste, wie Alkylketten bevorzugt in den Membranen anreichern.

Der Fluoreszenzfarbstoff DiO mit seinen beiden C₁₈-Ketten kann daher selektiv Lipidmembranen färben. Unter der Annahme, daß der Fettlöser Aceton die markierbaren Membranbestandteile vollständig entfernt, wurden die zweidimensional-tomographischen Bilder gewonnen (Abb.3.1.2.3). Der Effekt variiert jedoch deutlich – wie hier an zwei Beispielen illustriert - d.h. die mutmaßlich mit den Zellmembranen korrelierte Fluoreszenz kann je nach Präparat verschieden sein und verschwindet u.U. nicht vollständig.

Die Kombination Proteinase-K mit folgender Acetonbehandlung kann zur Beseitigung der Odontoblastenfortsätze dienen. Die CLSM-Darstellungen belegen, daß nach der Enzymbehandlung und dem „Entfetten“ durch Aceton keine anfärbbaren Komponenten der Odontoblastenfortsätze zu erkennen sind, oder zumindest die Fluoreszenz der Probe sehr stark vermindert ist. Besonders eindrucksvoll veranschaulichen dreidimensionale Aufnahmen – die nur mittels CLSM möglich sind - diesen Befund (Abb.3.1.2.4).

Die dreidimensionalen Aufnahmen zeigen deutlich die angefärbten Ausläufer mitsamt Ramifikationen. Der fluoreszente Anteil im Probenvolumen ist nach der kombinierten Anwendung von Enzym und Lösungsmittel weitgehend verschwunden.

Die in der Literatur kontrovers diskutierten Aussagen bezüglich der Ausdehnung der Odontoblastenfortsätze erscheinen zur Zeit nicht vereinbar. Dies zeigt sich besonders in den unterschiedlichen Verfahren:

Harsche Bedingungen während der Probenvorbereitung, z.B. Demineralisierung mit EDTA (Goracci 1999) können Artefaktbildung beinhalten. Unbehandelte Zahnproben in CLSM-Untersuchungen (Grotz 1998) sind zwar keinen histologischen Veränderungen durch die Präparation unterworfen, wegen der geringen Reflektivität der organischen Komponenten (Lipide, Proteine, etc.) gegenüber dem mineralischen Anteil des Zahnes ist deren Unterscheidung schwierig. Das Problem läuft auf die Frage hinaus, ob die Ausdehnung der Ausläufer identisch sind mit den Dentinkanälchen? Der erste Ansatz, zellmembranspezifische Fluoreszenzfärbung zur Charakterisierung der Ausläufer zu nutzen (Byers 1995), bedient

sich bei der Präparation einer Ameisensäurebehandlung und Fixierungstechniken die Änderungen im Gewebeaufbau ebenfalls nicht ausschließen. Die vorgestellte Methode versuchte durch Kombination von schonender Färbung und CLSM-Technik die Nachteile der üblichen Demineralisierungsmethoden zu vermeiden, konnte jedoch ebenfalls keine eindeutige Aussage über die Erstreckung der Odontoblastenausläufer machen, da die Färbungen sehr unterschiedliche Resultate lieferten.

Zur Klärung der langdiskutierten Frage könnte ein *in vivo* durchgeführtes Experiment dienen, indem Fluoreszenzfarbstoff in die Pulpahöhle eines lebenden Zahnes eingebracht wird, wobei toxologische Fragen geklärt werden müßten. Die lipophilen Farbstoffmoleküle würden sich in den Membranen anreichern und durch Diffusion bis in die letzten Ausläufer der Zellen vordringen, und dies unter physiologischen Bedingungen. Nach der Extraktion könnte unmittelbar die Untersuchung der nativen Proben im CLSM erfolgen.

3.1.3 Nachweis der Penetration von Wasserstoffperoxid in Zahnschmelz und Dentin

3.1.3.1 Fluoreszenz als Oxidationsindikator

Schädigungen des Zahngewebes können neben „natürlichen“ Ursachen (Karies, hohe Konzentration an Fruchtsäuren) durch weitere Einflüsse bedingt sein. Der Einsatz von Bleichmitteln, insbesondere zu ästhetischen Zwecken, stellt eine potentielle Gefährdung des Zahnes dar. Zur Aufhellung von Zähnen sind Zubereitungen von Natriumperborat und Wasserstoffsuperoxid in gelbildenden Polymerlösungen verbreitet (Haywood 1991, Rotstein 1991, Ruse 1990). Im Schmelz, bedingt durch den niedrigen Proteingehalt, ist keine wesentliche Veränderung durch Oxidationsmittel zu erwarten. Verfärbungen des Zahnes liegen meist im Dentin vor, sind aber durch den transparenten Schmelz nach außen sichtbar. Eine Quelle der farblichen Veränderung sind möglicherweise die Reaktionsprodukte von Proteinen mit reduzierenden Zuckern (z.B. Glucose). Diese Substanzen werden als Amadori- oder auch als AGE-Produkte (*engl. advanced glycation endproducts*) bezeichnet (Kleter 1997, Kleter 1998).

Bleichmittel müssen demnach im Dentin wirken. Neben Proteinen wie Kollagen befinden sich hier allerdings auch die Fortsätze der Odontoblasten, von denen angenommen werden kann, daß sie gegenüber Oxidantien sehr empfindlich reagieren. Weiterhin wäre abzuklären, ob das Eindringen des Peroxids bis zur Pulpahöhle erfolgt. Dort finden sich die Zellen (Odontoblasten, Neuronen, Immunzellen), die für den Erhalt und die Versorgung des Zahnes verantwortlich sind.

Bestimmte nichtfluoreszente Derivate des Fluorescein- und Rhodamintyps werden sehr schnell zu fluoreszenten Farbstoffen oxidiert. Die Oxidation der Indikatoren erfolgt besonders leicht, da mit dieser Reaktion das hochkonjugierte chinoide System der Farbstoffe wiederhergestellt wird.

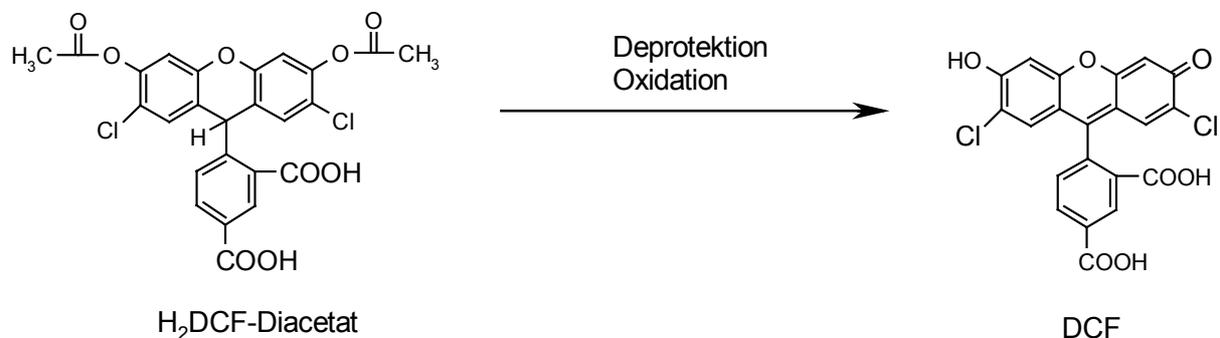


Abb.3.1.3.1 Dihydrodichlorfluorescein-Diacetat (H₂DCF-Diacetat) und Umsetzung zu Dichlorfluorescein

Mit diesen Substanzen läßt sich beispielsweise die Aktivität von Peroxidasen in speziellen Zellkompartimenten, den Peroxisomen nachweisen (Fahimi 1969, Hempel 1999).

3.1.3.2 Nachweis der Penetration

Zunächst sollte der qualitative Nachweis geführt werden, ob Wasserstoffperoxid in der Lage ist, durch Schmelz und Dentin bis zur Pulpahöhle zu diffundieren.

Durchführung:

Bei senkrecht zur Längsachse geschnittenen Zahnscheiben (4mm Dicke) wurde die Pulpahöhle mechanisch erweitert. Mit einer Schnittfläche wurden die Proben auf ein Deckglas

geklebt (Sekundenkleber). Die Bohrung wurde mit einer Lösung von H_2DCF -Diacetat in PBS (mit Argon entgaster Puffer, $50 \mu\text{g/ml}$) aufgefüllt und mit einem weiteren Deckglas zugeklebt. Dieses Konstrukt kam in eine Kunststoffaufnahme und wurde anstelle des Küvettenhalters im Strahlengang eines Fluorimeters positioniert.

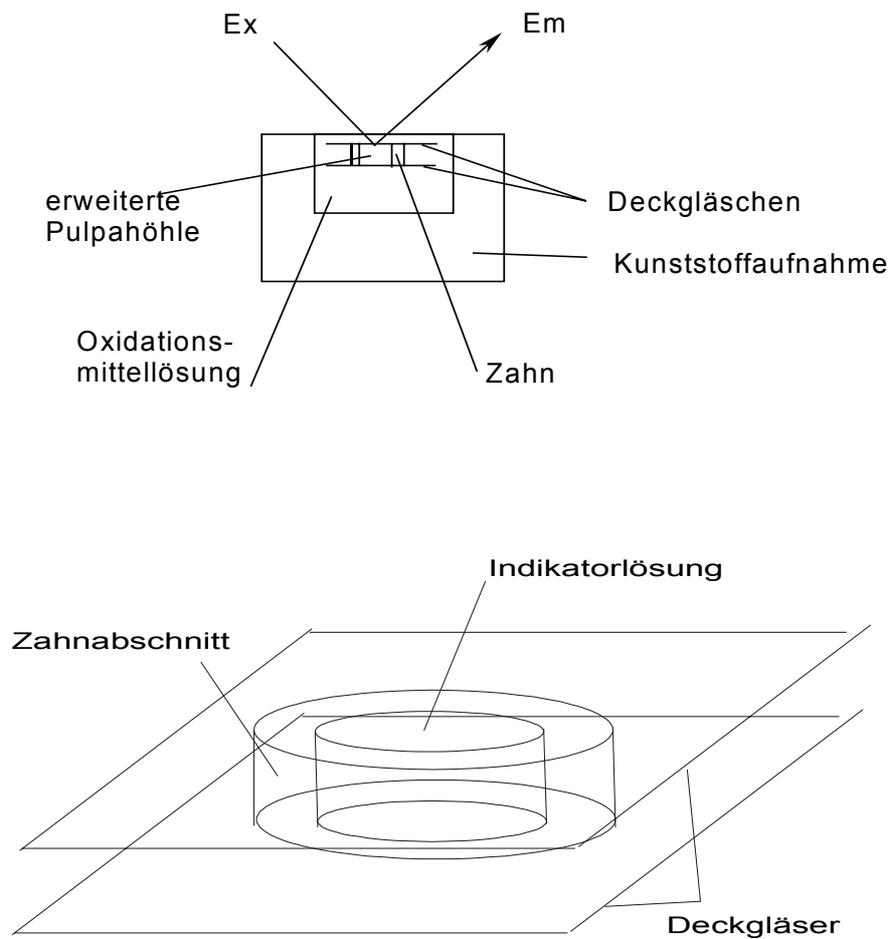


Abb. 3.1.3.2 Probenhalterung; Wandstärke des verbleibenden Zahnmaterials ca. 2mm

Nach Zugabe der H_2O_2 -Lösung (10% in Wasser) in den Außenbereich der Vorrichtung konnte der zeitliche Verlauf der Fluoreszenz im Inneren des Zahnes verfolgt werden.

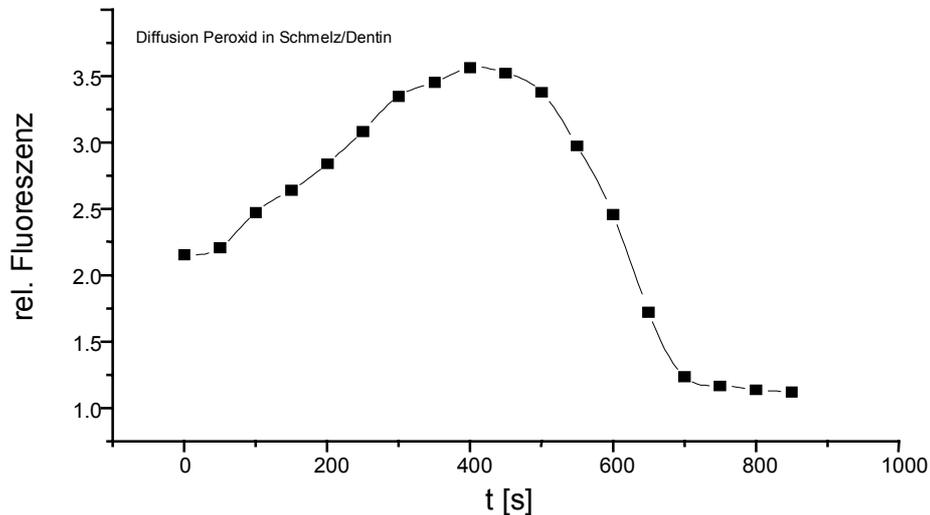


Abb. 3.1.3.3 Zeitlicher Verlauf der oxidationsbedingten Fluoreszenz im Zahninneren

Die Interpretation des Kurvenverlaufes zeigt eindeutig, daß Wasserstoffsuperoxid nicht nur in die Zahnhöhle gelangt, sondern daß dies auch ein relativ rascher Prozeß ist; das Maximum der Fluoreszenz liegt nach ca. 7 Minuten vor. Bei gebräuchlichen Einwirkzeiten kommerzieller Bleichmittel von 15-20 Minuten ist daher ein Einfluß auf die Pulpazellen nicht auszuschließen.

Das Abklingen der Fluoreszenz nach dem Maximum bei ca. 400 s kann mit der oxidativen Zerstörung des gebildeten Fluorochromes erklärt werden.

3.1.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung

Der Proteinanteil insbesondere des Dentins läßt sich, wie bereits erwähnt wurde, zur chemischen Fixierung von Farbstoffen oder deren Derivaten verwenden. Dieser Weg wurde gewählt, um ein Ausschwemmen bzw. Wegdiffundieren des Oxidationsindikators zu verhindern. Es wurde nicht direkt der kuppelfähige, reduzierte Indikator verwendet, sondern sein Diacetat das den Vorteil hat, gegen Oxidation unempfindlich zu sein. Die Abspaltung der

Acetylreste kann mit Hydroxylamin oder Kaliumhydroxid durchgeführt werden. Die Kopplung, Lagerung und Deprotektionierung wurden unter Argonatmosphäre ausgeführt.

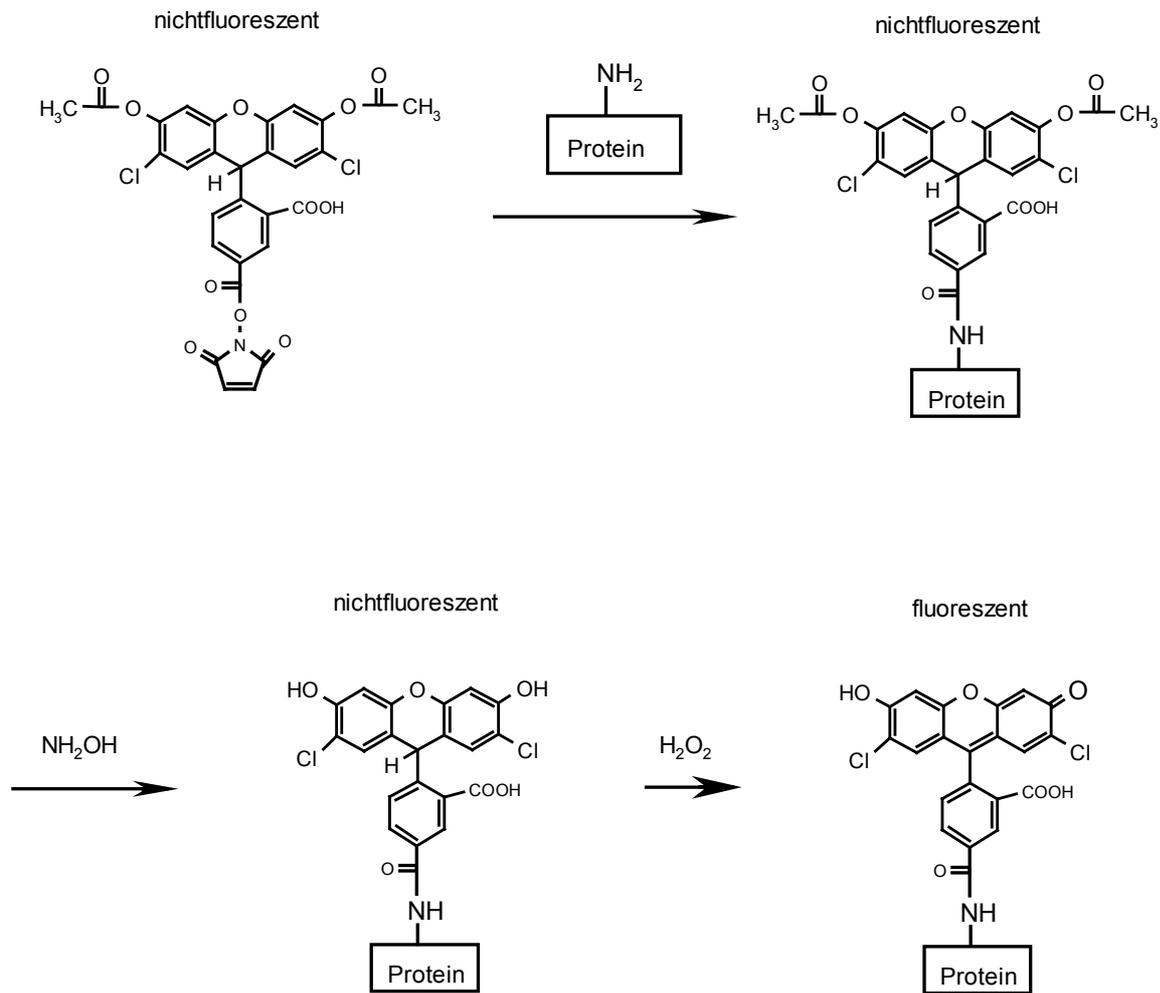


Abb. 3.1.3.4 Reaktionsschema der Kopplung von H₂DCF-Diacetat an zahneigenes Protein, Deprotektion und oxidative Umsetzung zu Dichlorfluorescein.

Die konventionelle Ausstattung eines Mikroskopes sieht im Allgemeinen keine Einrichtung zur Untersuchung von Proben in wässrigem Medium vor. Daher wurde eine Aufnahme konstruiert, die auf dem Objektisch angebracht, das Mikroskopieren von feuchten Präparaten auch mit Ölimmersion erlaubt und gleichzeitig einen Medienwechsel gestattet.

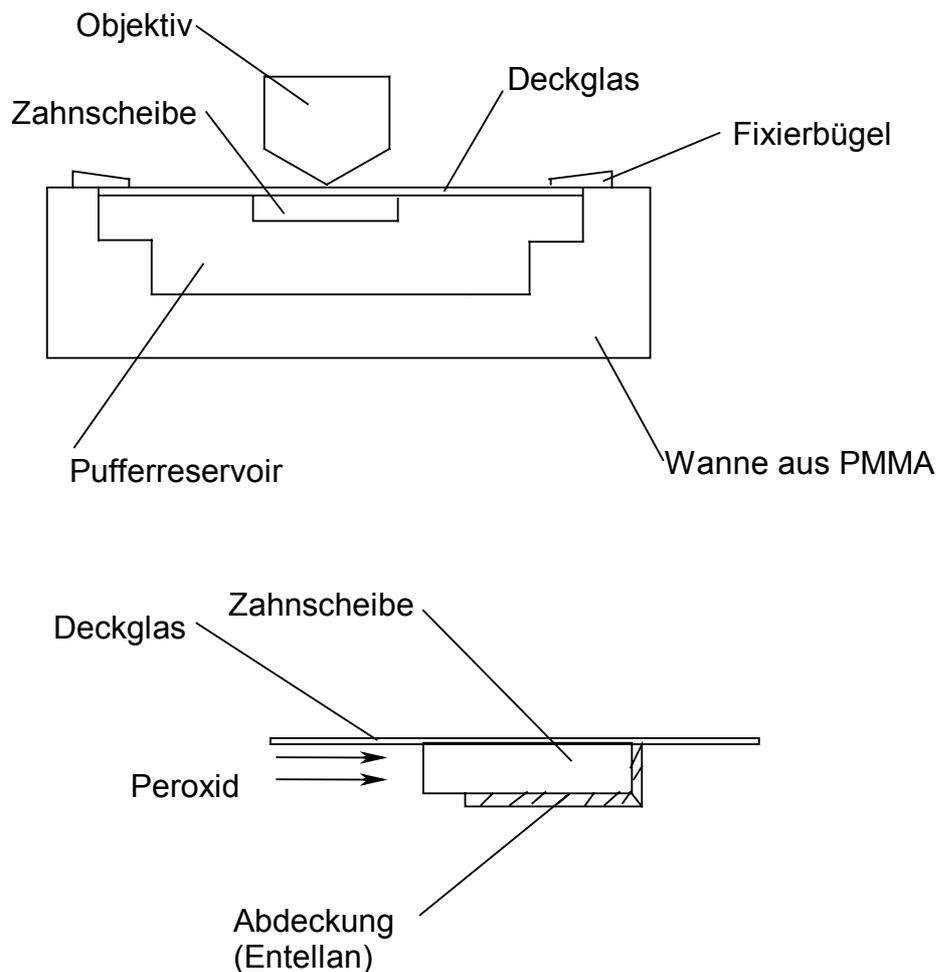


Abb. 3.1.3.5 Mikroskopiervorrichtung und Fixierung der Zahnprobe

Durchführung:

Die Zahnscheiben wurden durch Auftrennen parallel zur Zahn­längsrichtung gewonnen. Die Färbung erfolgte mit dem H₂DCF-Diacetat-Succinimidylester, um den Farbstoff zu immobilisieren. H₂DCF-Diacetat-Succinimidylester - in wenigen Tropfen DMSO gelöst - wurde mit Carbonatpuffer (0,1M; pH 8,3; mit Argon entgast) auf eine Konzentration von 50µg/ml verdünnt. Die Proben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert, und anschließend dreimal mit PBS gespült. Zur Deprotektionierung diente eine 1M Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid in H₂O (pH 8,7); nach 2 Stunden Einwirkzeit erfolgten 3 Waschschr­itte mit PBS. Gefärbte Zahnproben wurden mit einem, nicht mit Wasser mischbaren Einbettmittel (Entellan) auf ein Deckglas geheftet. Diese Art der Eindeckelung wurde gewählt, um ein Eindringen des Mittels in den Zahn zu verhindern. Das Präparat wurde

an zwei Punkten durch Sekundenkleber fixiert, und die Bereiche, die nicht dem Medium direkt zugänglich sein sollten mit Entellan abgedeckt. Das Deckglas wurde nun mit der Probe nach unten in die "Mikroskopierwanne" eingelegt und mittels kleiner Bügel festgeklemmt. Der Hohlraum gestattet die Zugabe oder den Austausch der Medien, ohne die Probe wechseln zu müssen.

Erste Vorversuche zeigten, daß derart präparierte Zahnproben bereits vor der Zugabe des Oxidationsmittels eine erhebliche Grundfluoreszenz aufwiesen, trotz Schutzgasatmosphäre. Eine wahrscheinliche Ursache dieses Phänomens kann das Vorhandensein zahneigener bzw. im Speichel vorliegender Peroxidasen sein (Rosin 1999). Für weitere Versuche wurden die Zahnscheiben deshalb vor der Färbung autoklaviert (121°C; 15 Minuten), um jede Enzymtätigkeit auszuschließen. Die Aufnahmen wurden nach bestimmten Zeitintervallen gewonnen. Am Anfang der Bildserie steht eine Aufnahme ohne H₂O₂-Lösung (10%).

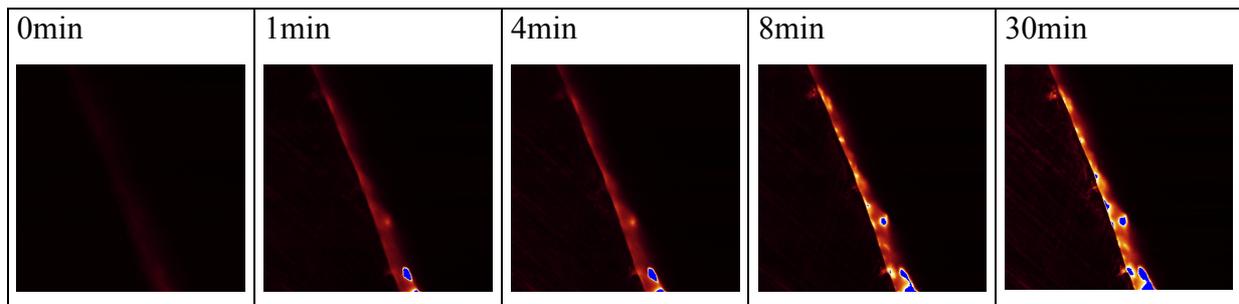


Abb. 3.1.3.6 Zeitliche Entwicklung der H₂O₂-induzierten Fluoreszenz von H₂DCF-gefärbten Zahnscheiben (Schmelz, Dicke 2 mm). Die Einwirkung des Oxidationsmittels erfolgt von rechts. Erst in der Aufnahme nach 30 min sind im linken Bildbereich Schmelzstrukturen zu erkennen. Die stark angefärbten Areale sind daher wohl Pelikelkomponenten. Aufnahmen ca. 10 µm u.O., Objektiv x40, Bildgröße 125x125µm²

Die Bilderfolge gibt die zeitliche Zunahme der Fluoreszenz wieder, die durch das Eindiffundieren des Peroxids verursacht wird.

3.1.3.4 Diskussion zu 3.1.3

Dieses Experiment diente dem fluoreszenzmikroskopischen Nachweis des Eindringens von Oxidationsmitteln in die Zahnhartsubstanz. Idealerweise sollte die Diffusion des hier verwendeten H_2O_2 sich direkt in einer Wanderungsfront der Fluoreszenz darstellen. Die ursprünglichen Erwartungen wurden nicht vollständig erfüllt.

Die Wahl des Indikators erfolgte nach zwei Gesichtspunkten: Der Fluoreszenzfarbstoff mußte bei einer zur Verfügung stehenden Wellenlänge absorbieren; alle Fluoresceinderivate können mehr oder weniger optimal mit der 488nm Linie angeregt werden. Außerdem sollte die Fluoreszenz sehr rasch bei Zugabe des Peroxids auftreten. Die reduzierte und daher nicht-fluoreszente Form des Dichlorfluoresceins erfüllt diese Anforderung. Der rein qualitative Nachweis, daß Wasserstoffperoxid bis in die Pulpahöhle vorzudringen in der Lage ist, erwies sich als unkompliziert. Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung erforderte zusätzlichen apparativen Aufwand, um das Vordringen des Oxidationsmittels *in situ* sichtbar zu machen. Zudem traten einige Probleme mit dem Farbstoff auf:

Zum Schutz vor vorzeitiger Oxidation dient die Acetylierung des Moleküls. Bei etablierten Anwendungen in der Zellbiologie werden Acetatreste durch zelluläre Esterasen entfernt.

Die Abspaltung der Schutzgruppen nach vorangegangener Kopplung an zahneigene Proteine hatte, was nicht gezeigt wurde, ein sehr schnelles Auftreten von Hintergrundfluoreszenz zur Folge, obwohl die verwendeten Lösungsmittel und Chemikalien sorgfältig mit Argon von Sauerstoff befreit wurden. Die oxidationsbedingte Fluoreszenz im Bereich der Zahnoberfläche tritt viel stärker hervor als im Zahninneren, wo zudem vermutlich weniger Farbstoff bzw. dessen Vorstufe gebunden vorliegt. Plausibel erscheint die Annahme, daß auf der Oberfläche die Proteine des Pellikel besonders viel Farbstoff (bzw. dessen Vorstufe) gebunden haben.

Schmelz bzw. Dentin stellen keine homogenen Diffusionsbarrieren dar, wie dies beispielsweise bei einem Gel (Agarose o.ä.) der Fall ist. Die Lücken zwischen den Schmelzprismen und besonders die Dentinkanäle sind für die Ausbreitung des Oxidationsmittels ein wesentlich geringeres Hemmnis, als die mineralisierten Bereiche der Probe. Daher tritt keine einheitliche Wanderungsfront der oxidationsinduzierten Fluoreszenz auf. Überraschend ist die Beobachtung, daß in Lösung – hier in der mit Indikatorlösung gefüllten Pulpakammer – die Fluoreszenz nach Zugabe des H_2O_2 rascher eintritt (Abb. 3.1.3.3) als dies bei der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Fall war (bis zu 30

Minuten in Abb. 3.1.3.6). Möglicherweise existiert hier ein Mechanismus, der die Oxidation verzögert.

Kommerzielle Zahnbleichmittel und die in der Literatur beschriebenen Ansätze enthalten zwar deutlich weniger H_2O_2 (bis ca. 5 %) als die hier verwendete 10%ige Lösung, jedoch geht aus diesen Experimenten hervor, daß mit dem Einsatz von H_2O_2 -haltigen Bleichmitteln eine nicht vernachlässigbare Gefährdung der Pulpazellen einhergeht, denn Wasserstoffperoxid wirkt schädigend auf alle Zelltypen, besonders auf Zellen des Immunsystems (Bechoua 1999), die wichtige Funktionen in der Zahnhöhle erfüllen.

3.1.4 Ratiometrische pH-Bestimmung in Zähnen

Der Zahnschmelz stellt, wie eingangs erwähnt, ein mechanisch, wie chemisch äußerst widerstandsfähiges Material dar. Dennoch gelingt es verschiedenen Mikroorganismen der Mundhöhle, auch die Zahnhartsubstanz anzugreifen. Neben einer großen Anzahl von Keimen – ihre Zahl wird auf ca. 500 geschätzt - spielt das Bakterium *Streptococcus mutans* eine besondere Rolle (Anderson 1992), denn dieser Erreger ist in der Lage, bei sehr niedrigem pH zu existieren. Kapselschleim (komplexe Polysaccharide), dient der Adhäsion an die Zahnoberfläche (Douglas 1994). Hydroxylapatit geht bei pH-Werten unter pH 4,5 in Lösung. Die für die mikrobielle Lyse verantwortlichen Säuren, insbesondere Milch- und Zitronensäure, sind Stoffwechselprodukte des Bakteriums und werden aus leichtverdaulichen Kohlenhydraten (Stärke) und Zuckern (Glucose, Saccharose) gebildet. Lactat und Zitrat wirken nicht nur in ihrer Eigenschaft als Säuren demineralisierend, sie sind zudem gute Komplexbildner für Ca^{2+} -Ionen. Einige Bakterien bilden zusätzlich Substanzen, sogenannte Phosphoteicholsäuren, die ebenfalls sehr effektiv Calcium binden (Rose 1997). Niedrige pH-Werte führen außerdem zu einer Aktivierung zahneigener Enzyme, die spezifisch das Kollagen des Dentins degradieren können (Clarkson 1986). So ist der Abbau der organischen Matrix wohl ein Zusammenspiel körpereigener und bakterieller Kollagenasen.

Der vollständige Prozeß, Abbau der mineralischen und organischen Komponenten des Schmelzes und Dentins durch bakteriellen Angriff, wird als Karies (lat.: Fäulnis) bezeichnet. Demnach kommt dem Säureangriff die entscheidende Rolle beim Kariesgeschehen zu. Aus diesem Grund ist eine pH-Bestimmung vor Ort, z.B. in den kariösen Läsionen von Interesse.

PH-Messungen des Speichels sind einfach durchzuführen, liefern aber nur gemittelte Werte für die gesamte Mundhöhle. Daher wurden miniaturisierte pH-Elektroden entwickelt und in Zähne eingesetzt (Hall 1997). Diese Technik berücksichtigt allerdings nicht hinreichend den Umstand, daß in derart kleinen Volumina die elektrochemischen Vorgänge an der Elektrodenoberfläche ihrerseits die Wasserstoffionenkonzentration verändern können. Bei Messungen in großen Flüssigkeitsmengen, z.B. im Speichel kann dieser Effekt vernachlässigt werden. Das grundsätzliche Problem der Störung des zu messenden Systems durch die Messung selbst wird man dann umgehen können, wenn man die "Sonde" um Größenordnungen kleiner wählt als das zu untersuchende Objekt.

Eine Methode, dieser Vorgabe zu entsprechen stammt aus der Zellbiologie. Bestimmte Fluoresceinderivate (z.B. BCECF, Acetoxymethylester eines Fluoresceinderivates) sind in der Lage, durch die Zellmembran zu diffundieren, und gelangen unter anderem in bestimmte Zellorganellen, die Lysosomen. Dort werden enzymatisch die Acetatreste abgespalten und damit das nun polare, geladene Farbstoffmolekül festgehalten (Haughland 1996). In den Lysosomen findet die Degradation aufgenommener Proteine durch Enzyme statt, die erst bei niedrigem pH aktiviert werden (Deng 1995, Richo 1994). Dies bewirken Protonenpumpen der Organellmembran. Die Fluoreszenzintensität des eingeschlossenen Farbstoffes ändert sich im Intervall pH 6-7,5 sehr stark, und kann daher als Maß des Säuregrades dienen. Der Bereich, für den ein fluoreszenter pH-Indikator genutzt werden kann, hängt von seinem pK_S -Wert ab (Fluorescein $pK_S \sim 6,8$). Die Palette der Fluorophore, die geeignet sind, zwischen pH 3-5 zu detektieren ist jedoch sehr gering, zudem gelten Einschränkungen bezüglich der Anregungslinien des CLSM (488+568nm). Unter den bisher zur Verfügung stehenden kommerziellen Farbstoffen eignen sich letztlich nur zwei Substanzen, beide Rhodolabkömmlinge:

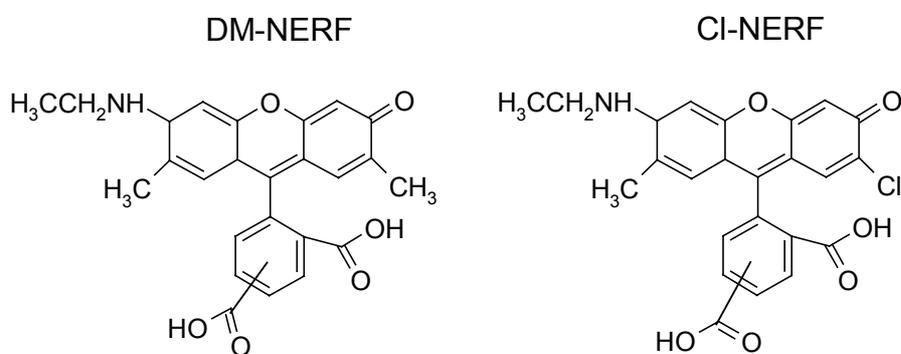


Abb.3.1.4.1 Strukturformeln: DM-NERF und CI-NERF

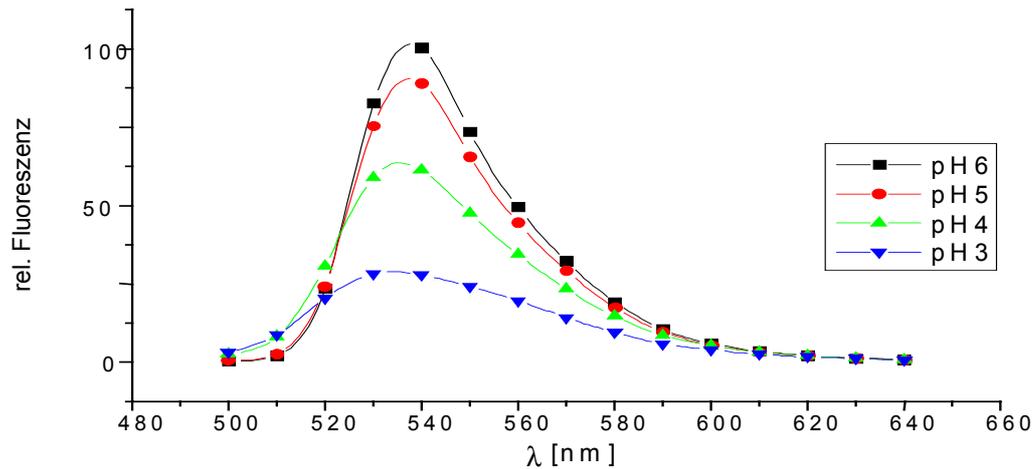


Abb. 3.1.4.2 pH-abhängiges Emissionsspektrum DM-NERF; Anregung: 488nm

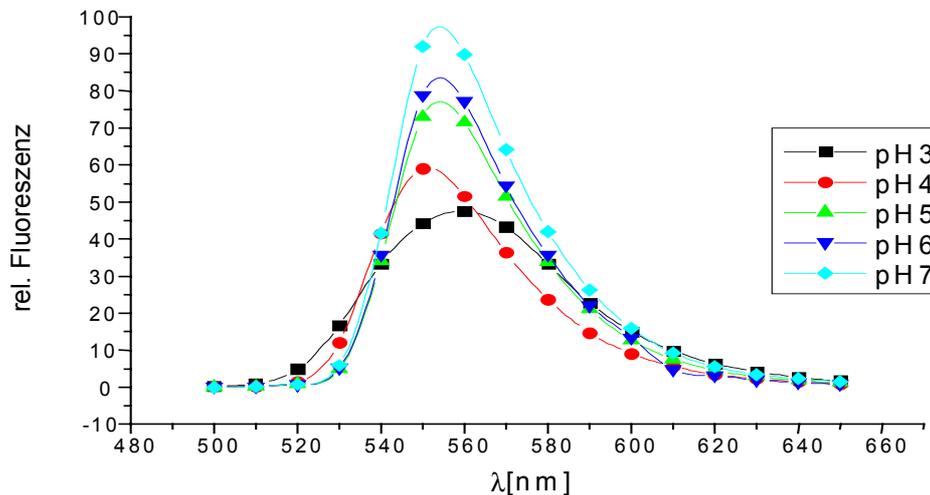


Abb. 3.1.4.3 pH-abhängiges Emissionsspektrum Cl-NERF, Anregung: 488nm

Der Graph zeigt den Unterschied der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Cl-NERF bzw. DM-NERF bei verschiedenen pH-Werten. Die Fluoreszenzstärke bzw. das Fluoreszenzlicht, das der Detektor des Mikroskopes registriert, hängt in unserem Beispiel nicht allein vom pH des Puffersystems, sondern natürlich von der absoluten Farbstoffmenge in einem gegebenen Volumen ab. Daher wird bei biologischen Präparaten zur Quantifizierung des pH-Wertes immer eine Kalibrierung der Messung durchgeführt. Bei Zellen verwendet man u.a. Ionophore – porenbildende Proteine - die einen Ausgleich der Ionenkonzentration des Zellinneren mit der des umgebenden Mediums herbeiführen (Boyarski 1996).

Eleganter erscheint eine Technik, die als “internen Standard” nicht die absolute Fluoreszenzintensität, sondern das Verhältnis der Absorption bzw. Emission bei

unterschiedlichen Wellenlängen nutzt; dies bezeichnet man als ratiometrische Messung (engl.: *ratiometric measurement*). Bei der *dual-excitation ratio*-Methode, auf die hier nicht näher eingegangen sei, regt man bei zwei unterschiedlichen Wellenlängen an und registriert bei einer festen Emissionswellenlänge. Aus apparativen Gründen (begrenzte Anzahl von Laserlinien) wurde im sog. *dual-emission-ratio*-Modus gearbeitet. Viele Farbstoffe weisen in ihrem Emissionsspektrum eine Stelle auf -den sog. isosbestischen Punkt- dessen Lage unabhängig von Lösungsmiteleinflüssen ist. Bei dieser Wellenlänge ändert sich die Fluoreszenzintensität (im Idealfall) nicht in Abhängigkeit von äußeren Bedingungen, wie hier dem pH-Wert. Die Intensitäten der lokalen Maxima bei kleinerer und größerer Wellenlänge lassen sich in Relation zueinander setzen. Dieses Verhältnis, der Quotient aus beiden Werten ist nun aber unabhängig von der absoluten Fluoreszenz. Damit wird die Kenntnis der Farbstoffkonzentration überflüssig.

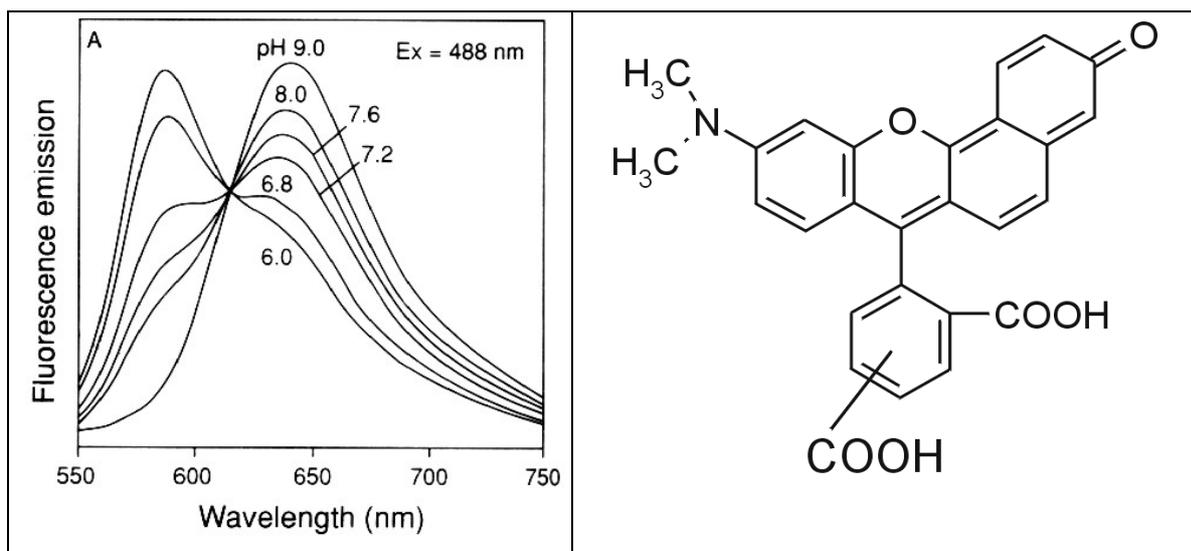


Abb. 3.1.4.4 Struktur und pH-abhängiges Emissionsspektrum Carboxy-SNARF
(Quelle: molecular probes)

Bei dem gezeigten Fluoreszenzfarbstoff (Abb. 3.1.4.4) sind die Intensitätsänderungen der beiden lokalen Emissionsmaxima (bei ca. 585 bzw. 645 nm) in Abhängigkeit vom pH sehr deutlich zu erkennen, er ist aber für den stark aciden Bereich nicht geeignet.

Cl-NERF erscheint als der am besten geeignete Indikator für die vorgesehene Anwendung; zum einen wegen des niedrigeren pKs-Wertes, zum anderen liegt hier das Absorptionsmaximum näher an der 488nm Laserlinie. Der Farbstoff Cl-NERF ist alleine nur

für die *dual-excitation-ratio*-Methode geeignet. Mit einem Kunstgriff läßt sich dieser pH-Indikator dennoch für die *dual-emission-ratio*-Technik nutzen:

Bei gleichzeitiger Verwendung eines pH-indifferenten Farbstoffes (z.B. Texas Red) läßt sich eine Referenz zur Cl-NERF-Fluoreszenz schaffen, vorausgesetzt, es liegt in der gesamten Probe ein konstantes Konzentrationsverhältnis der beiden Farbstoffe vor.

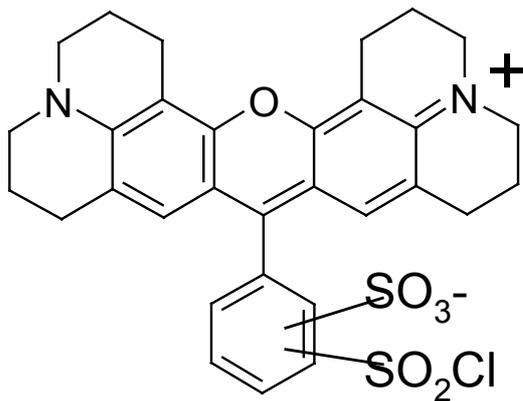


Abb. 3.1.4.5 Struktur TexasRed (Sulfonylchlorid)

Nachteilig bei der Verwendung von Texas Red in der konfokalen Mikroskopie ist die fehlende Laserlinie für die optimale Anregung des Fluorophors. Mit der zur Verfügung stehenden Wellenlänge (568nm) läßt sich der Farbstoff nur zu etwa 54% des Maximums (bei 587nm) anregen. Dies kann man durch Erhöhung der Konzentration kompensieren.

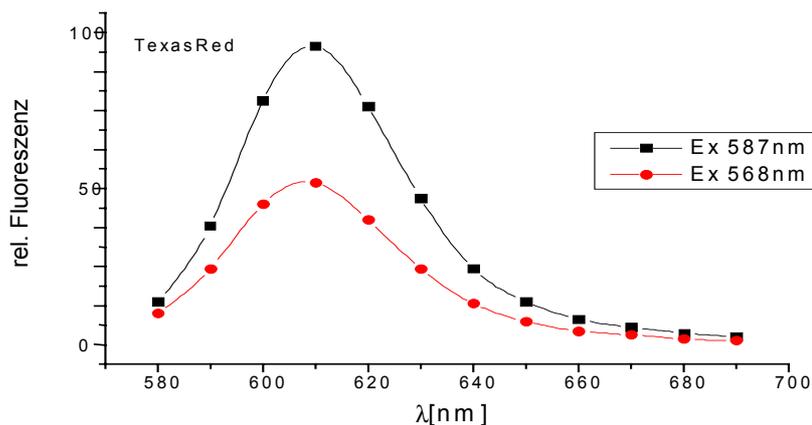


Abb. 3.1.4.6 TexasRed: Verhältnis der Anregungseffizienz 568/596nm

Die gleiche Einschränkung gilt auch für Cl-NERF, die Anregung ist bei 488 nm nur 74% des optimalen Wertes (bei 516 nm).

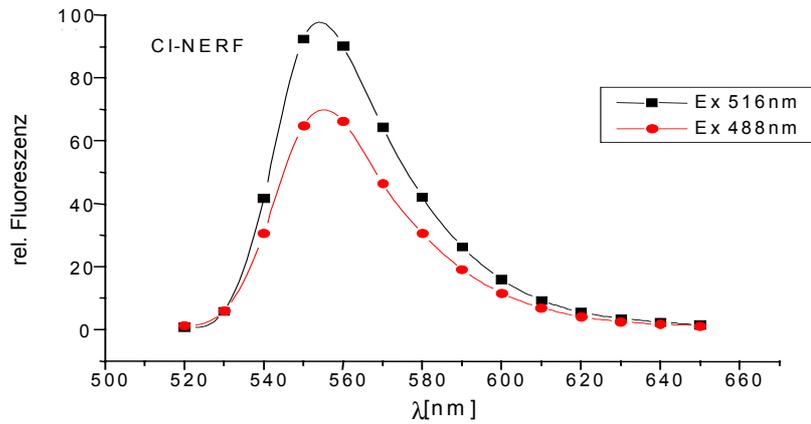


Abb. 3.1.4.7 CI-NERF: Verhältnis der Anregungseffizienz 488/516nm

Im überlagerten Emissionsspektrum der beiden Fluoreszenzfarbstoffe erkennt man einerseits die starke pH-Abhängigkeit der CI-NERF-Fluoreszenz (Ex 488nm) gegenüber der konstanten Emission von Texas Red (Ex 568nm).

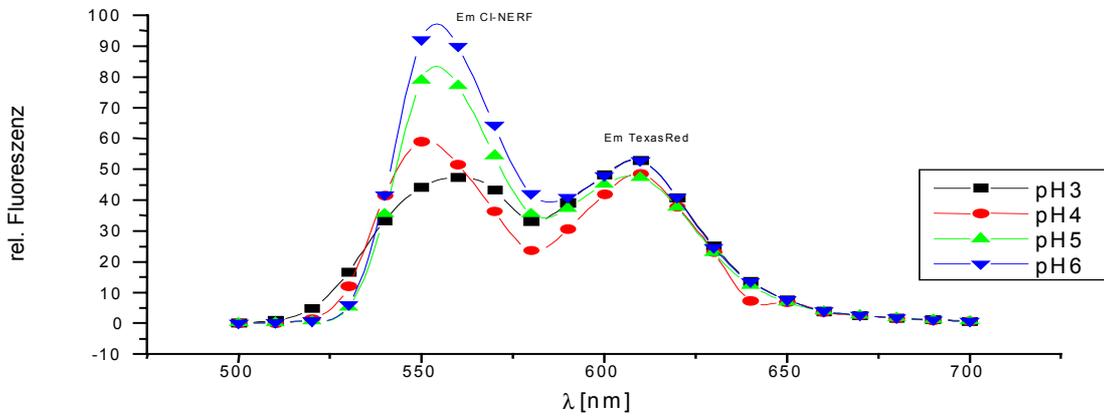


Abb. 3.1.4.8 Überlagertes pH-abhängiges Emissionsspektrum CI-NERF/TexasRed

Der Zusammenhang zwischen pH-Wert und dem Emissionsquotienten wird anschaulich, wenn das Verhältnis der beiden maximalen Fluoreszenzemissionen gegen den pH aufgetragen wird.

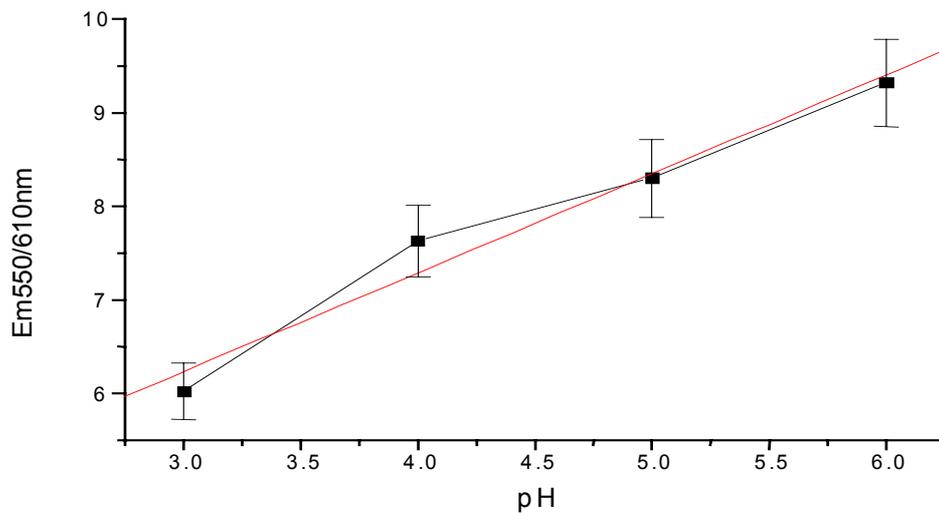


Abb. 3.1.4.9 PH-abhängiges Emissionsverhältnis CI-NERF/TexasRed; hier wird lediglich der Zusammenhang zwischen dem pH-Wert und dem Quotienten der Emissionsintensitäten gezeigt.

Farbstoff	Anregung [nm]	Emission [nm]
DM-NERF	517	540
CI-NERF	519	544
TexasRed	595	615

Zusammenstellung: CI-NERF, TexasRed, DM-NERF

Im Grunde sollte diese Technik nach dem bisher gesagten als *dual-excitation-dual-emission-ratio* bezeichnet werden. Die Übertragung dieser Methode auf die Mikroskopie besteht letztlich darin, das Verfahren auf jedes Pixel der aufgenommenen Bilder anzuwenden, d.h. jedes Pixel entspricht einer Küvette im Fluorometer.

3.1.4.1 Doppelmarkierung von BSA

Der einfachste Weg, ein, über die gesamte Probe festes Verhältnis der beiden Farbstoffe zu sichern, ist die Bindung an einen Träger. Aus diesem Grund wurden beide Farbstoffe auf ein Trägermolekül gekoppelt. Verbreitet ist die Bindung von Farbstoffen an Proteine, wie beispielsweise BSA (engl.: *bovine serum albumin*). BSA besitzt ein Molekulargewicht von ca. 47kDa, gute Löslichkeit in wässrigen Medien und ist zudem kostengünstig.

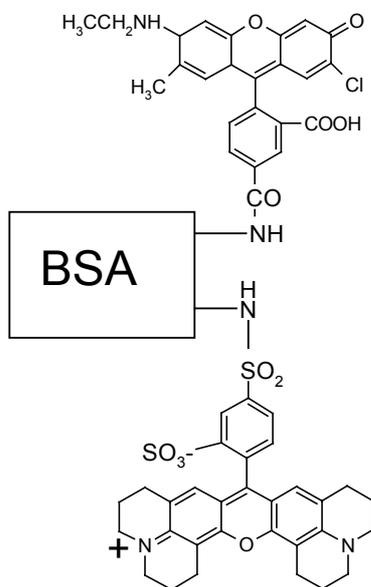
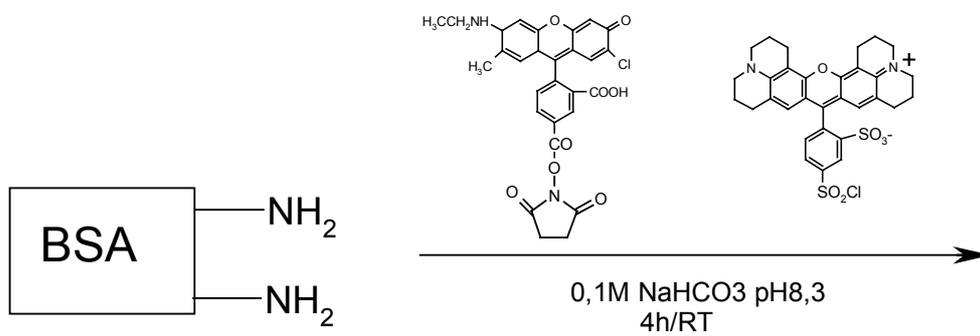
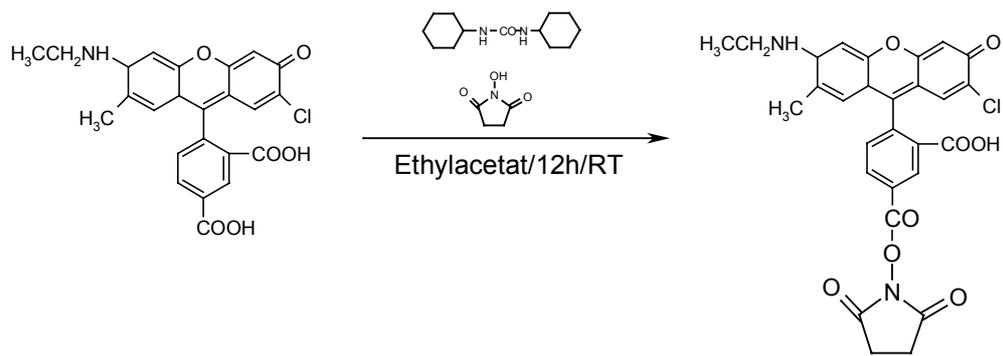


Abb. 3.1.4.10 Kopplungsschema: BSA-Cl-NERF-TexasRed-Konjugat

Durchführung (Fiechtner 1990):

1mg (2,2 µmol) Cl-NERF, 0,41mg (1,98 µmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 0,23 mg (1,98 µmol) N-Hydroxysuccinimid (NHS) wurden in 10 ml trockenem Ethylacetat gelöst, und abgedunkelt über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Ausgefallener Dicyclohexylharnstoff wurde abzentrifugiert und das Lösungsmittel abgedampft. Der so gewonnene rohe Succinimidylester wurde sofort weiter verwendet. DCC und NHS wurden in geringem Unterschub eingesetzt, um Kreuzvernetzung des zu markierenden Serumalbumins (BSA) bei der Weiterverarbeitung zu vermeiden.

500 µg Cl-NERF-Succinimidylester und 500 µg TexasRed-Sulfonylchlorid, beide in je 25 µl DMF gelöst, wurden zu 20 ml einer Lösung von BSA (20 mg/ml) in Carbonatpuffer (0,1 M pH 8,3) gegeben und bei Raumtemperatur 4 Stunden (abgedunkelt) geschüttelt. Markiertes Protein wurde über eine PD10 Gelfiltrationssäule (Ausschlußvolumen ca. 5kD) von nichtgebundenem Farbstoff gereinigt, und gleichzeitig auf PBS (0,01 % NaN₃) umgepuffert. Die Proteinkonzentration nach diesem Schritt betrug ca. 14.3 mg/ml.

Durch UV/VIS-Spektroskopie wurden die charakteristischen Absorptionen für Protein (280nm), Cl-Nerf (519nm) und TexasRed (595nm) identifiziert. Weiterhin konnte hiermit der Beladungsgrad der BSA-Moleküle abgeschätzt werden:

Lambert-Beer:

$$E = \varepsilon \cdot C \cdot d \rightarrow C = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$

mit: E=Extinktion, C= Konzentration, d= Schichtdicke; i.A. 1cm, ε=molarer Extinktionskoeffizient und:

$$M_{BSA}=47000 \text{ g/mol}$$

$$M_{Cl-NERF}=451,86 \text{ g/mol}$$

$$M_{TexasRed}=625,44 \text{ g/mol}$$

und:

$$E_{BSA}= 0,2241$$

$$E_{Cl-NERF}= 0,0963$$

$$E_{TexasRed}= 0,0189$$

und den molaren Extinktionskoeffizienten:

$$\varepsilon(BSA) \approx 56400 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

$$\varepsilon(Cl - NERF) = 39000 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \quad (\text{pH} \geq 6)$$

$$\varepsilon(Texas Red) = 112000 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}}$$

ergeben sich:

$$C_{\text{BSA}} = 3,97 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$C_{\text{CI-NERF}} = 2,47 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$$

$$C_{\text{TexasRed}} = 1,69 \cdot 10^{-7} \text{ mol/l}$$

die Anzahl der Moleküle verhält sich wie 3,97:2,47:0,17, d.h. in Mittel sind pro BSA-Molekül etwa 0,62 Moleküle CI-NERF bzw. 0,04 Moleküle TexasRed gebunden.

2mm dicke Zahnscheiben wurden über Nacht in dieser Lösung inkubiert, mittels Sekundenkleber auf Objektträgern fixiert und anschließend mikroskopiert.

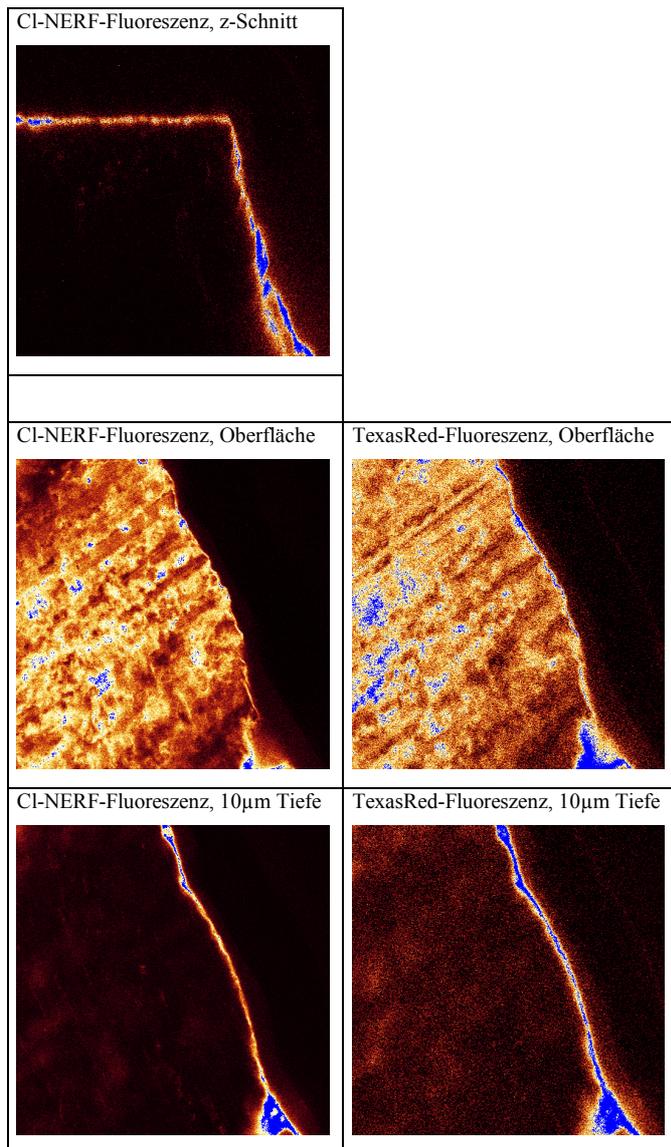


Abb. 3.1.4.11 Zahnprobe mit BSA-CI-NERF-TexasRed-Konjugat behandelt. Die obere Aufnahme zeigt einen Schnitt entlang der z-Achse; rechts ist die Bruchkante der Zahnscheibe zu erkennen. Die linke untere Hälfte des jeweiligen Bildes ist Zahngewebe. Ex/Em: CI-NERF 488nm/ 535nm Bandpaß ($\pm 15\text{nm}$), Ex/Em: TexasRed 568nm/Langpaß ($>590\text{nm}$), Objektiv x40; Bildgröße $125 \times 125 \mu\text{m}^2$

In den Aufnahmen ist zu erkennen, daß markiertes BSA fast vollständig an der Oberfläche des Präparates gebunden wurde, und kaum in das Zahninnere (hier ca. 10µm Tiefe) vorgedrungen ist. Dieses Verhalten des fluoreszenzmarkierten Proteins schließt diese Methode für die vorgesehene Anwendung aus.

3.1.4.2 Dextranekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe

Alternativ zur chemischen Fixierung der Farbstoffe an, wie oben beschrieben, ein Trägerprotein bzw. zahneigene Proteine um ein Wegdiffundieren zu unterbinden, können ebenfalls Konjugate aus Fluorophor und anderen hochmolekularen Komponenten (z.B. Dextranen) eingesetzt werden.

Dextrane sind Polysaccharide der Leuconostoc-Bakterien, bei denen Glukoseeinheiten vorwiegend 1,6- α -, aber auch 1,3- α - und 1,4- α -glykosidisch verknüpft sind.

Die kommerziell erhältlichen Konjugate CI-NERF-Dextran bzw. TexasRed-Dextran (beide ca. 10kDa) sind klein genug, um die Proben zu penetrieren, sollten jedoch ausreichend lange innerhalb der Poren verbleiben, um Messungen zu gestatten.

Das Eindringen der beiden, mit den Farbstoffen CI-NERF bzw. TexasRed markierten Dextrane in das Zahngewebe soll unter der Prämisse erfolgen, daß deren Diffusionsverhalten (annähernd) identisch ist. Bei durchschnittlichen Beladungsgraden von nur 0,5-2 Farbstoffmolekülen je Dextranmolekül und einer Bruttoladung der Farbstoffe von null darf angenommen werden, daß diese Prämisse gilt.

Durchführung:

CI-NERF-Dextran bzw. TexasRed-Dextran wurden zunächst in je 50 µl DMSO gelöst und mit Pufferlösung (pH 7,0) auf eine Konzentration von 0.5 mg/ml bzw. 1 mg/ml eingestellt. Zahnscheiben (2mm) wurden für 24 Stunden in dieser Lösung inkubiert.

Der Einfluß äußerer Säureeinwirkung sollte beobachtet werden. Dies wurde durch Aufbringen einer kleinen Menge Zitronensäure (pH \leq 1) auf die Zahnoberfläche simuliert.

Entnommene Proben wurden möglichst rasch auf Objektträger mittels Sekundenkleber an zwei Punkten fixiert und mikroskopiert (Ölimmersion). Es wurden je Präparat drei Aufnahmen gewonnen. Der Farbstoff CI-NERF wurde bei 488nm angeregt, die Emission mit

Bandpaßfilter 535nm (15nm Bandbreite) registriert. Die 568nm-Linie diene zur Anregung des TexasRed-Fluorophors, dessen Fluoreszenz wurde mittels Langpaß (>590nm) detektiert. Das Quotientenbild entsteht durch Division der Werte entsprechender Pixel eines Bildpaares (TexasRed/CI-NERF). Diese Operationen wurden mit dem Programm Ratioimager (Kohnle 2000) durchgeführt.

Funktionweise: Jedes Pixel eines Bildes kann 256 Intensitätsstufen (8bit) besitzen, die durch eine Tabelle bestimmten Falschfarben zugeordnet werden. Damit wird der Bildkontrast für das menschliche Auge besser erkennbar, im Vergleich zu Graustufen. Es ist zu erwarten, daß Werte zweier korrespondierender Pixel (d.h. der beiden Fluoreszenzbilder) sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Daraus folgt, daß der Quotient dieser Werte im Bereich der ersten aller möglichen 256 Intensitäten zu erwarten ist, d.h. es dürfte sich um die Zahlen 0-10 handeln. Dies bedeutet, daß der Kontrast im Quotientenbild für das Betrachterauge nicht zu erkennen wäre. Daher werden die erhaltenen Werte auf die 256 möglichen Stufen eines 8bit-Bildes gespreizt.

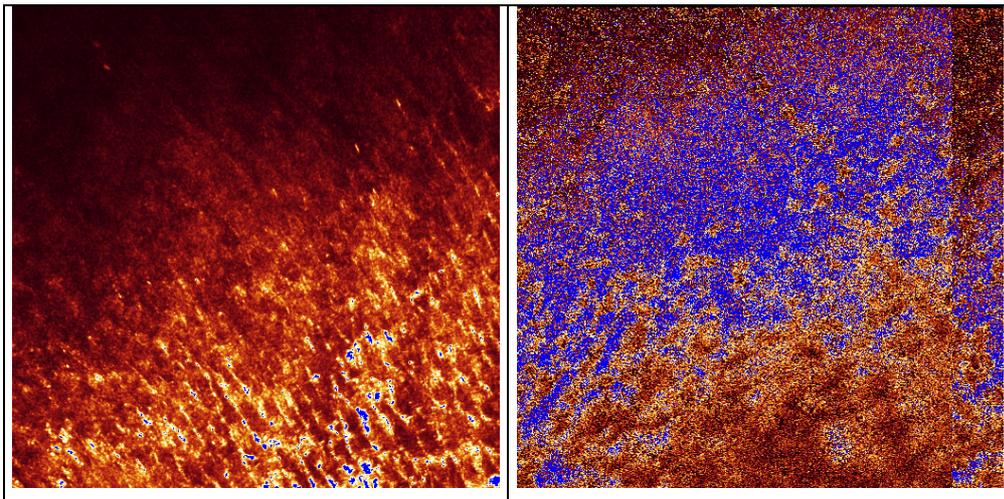


Abb. 3.1.4.12 CLSM-Aufnahmen einer Zahnprobe (Schmelz), die in einem pH 4-Puffer äquilibriert wurde. Linke Seite: Reflexionsbild; rechte Seite: Quotientenbild. Anregung: TexasRed 568nm, Emission: Langpaß (>590nm), Objektiv x40; Bildgröße 125x125µm; ca. 10µm u.O.

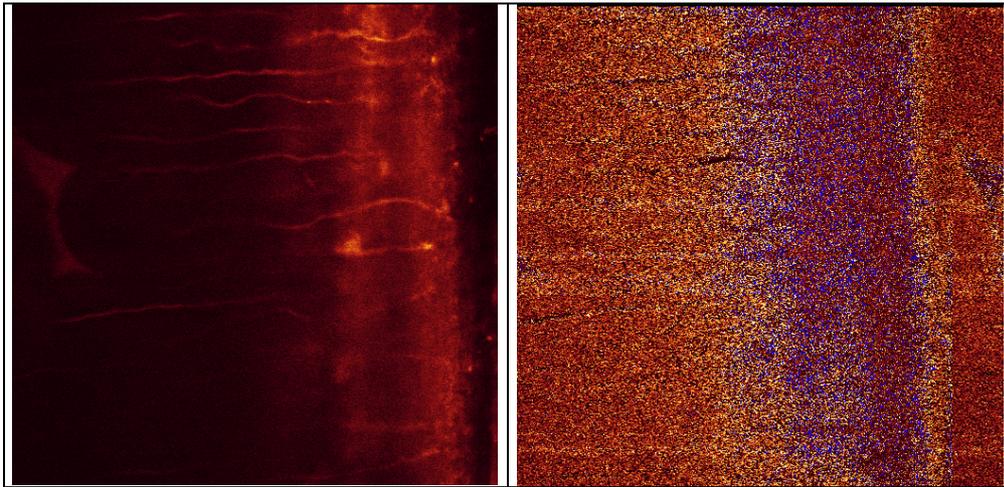


Abb. 3.1.4.13 CLSM-Aufnahmen einer Zahnprobe (Schmelz-Dentin-Grenze), die in einem pH 5-Puffer äquilibriert wurde. Linke Seite: Reflexionsbild; rechte Seite: Quotientenbild. TexasRed 568nm, Emission: Langpaß (>590nm), Objektiv x40; Bildgröße 125x125µm; ca. 10µm u.O.

Die obigen Aufnahmen, bei denen auf eine Quantifizierung verzichtet wurde, zeigen allerdings nicht das erwartete Resultat. Die hier als Beispiele ausgewählten Quotientenbilder der Zahnproben weisen keine homogene pH-Verteilung auf, d.h. eine Kalibrierung bei unterschiedlichen pH-Werten, die zur Eichung notwendig wäre, ließ sich nicht durchführen. Das jeweilige Reflexionsbild gibt die räumliche Struktur wieder, während das Quotientenbild die qualitative pH-Verteilung zeigt. Blaue Areale entsprechen Bereichen mit sehr niedrigem pH.

3.1.4.4 Diskussion zu 3.1.4

Ratiometrisch-mikroskopische Verfahren stellen im Prinzip elegante Methoden dar, bestimmte Parameter biologischer Proben zu untersuchen. Sie bieten die Möglichkeit, unabhängig von absoluten Farbstoffkonzentrationen Messungen durchzuführen. Der Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der pH-abhängigen und der pH-unabhängigen Fluoreszenz der beiden Farbstoffe Cl-NERF und TexasRed ist im Vorversuch mittels “Küvette” deutlich dargelegt worden. Die Durchführung als mikroskopische Anwendung erforderte jedoch einige Modifikationen. Im Kapitel über die Penetration von Bleichmitteln in das Zahngewebe wurde die Vorstufe des Fluorophors kovalent an Proteine des Zahnes gekoppelt, um den Farbstoff (bzw. das nichtfluoreszente Derivat) vor Ort zu fixieren. Für die letztlich gedachte Anwendung der vorgestellten Methode –fluoreszenzmikroskopische pH-Messungen *in vivo*- ist dieser Ansatz jedoch ungeeignet, allein unter dem Aspekt der Durch-

führung einer solchen Markierung an Probanden. Aktivester dürften toxikologisch äußerst bedenklich sein, nicht zu reden von den weiteren erforderlichen Reagentien. Daher kam nur in Betracht, die Farbstoffe an einen (bzw. zwei) Träger zu binden, um sie besser "handhabbar" zu machen, besonders in Hinblick auf Diffusionsverhalten. Übliche Trägermoleküle für Farbstoffe sind leicht zugängliche Proteine, hier BSA und biochemisch weitgehend inerte Dextrane.

Die kovalente Bindung der beiden Farbstoffe an BSA erfüllte die Erwartungen nur teilweise. Der (abgeschätzte) Beladungsgrad (0,6 bzw. 0,04 Moleküle Farbstoff pro Molekül Dextran) ist nicht recht zufriedenstellend. Erwünscht wäre, daß im Mittel jedes BSA-Molekül mehrere der beiden Fluorophore trägt. Die photometrisch ermittelte Beladung ist allerdings keine sonderlich zuverlässige Aussage, den verschiedene Effekte können eine scheinbar geringere Farbstoffkonzentration vortäuschen. Hierzu gehören besonders die Fluoreszenzlöschung (engl.: *quenching*), die bei höheren Farbstoffkonzentrationen auftreten kann. Die CLSM-Aufnahmen der Zahnprobe lassen aber deutlich beide Fluoreszenzen erkennen, was für die Annahme spräche, daß der tatsächliche Beladungsgrad höher anzusetzen ist, als rechnerisch abgeschätzt. Die wahre oder vermeintlich niedrige Kopplungseffizienz liegt möglicherweise auch an dem Umstand, daß Sulfochloride optimal bei $\text{pH} > 9$ und Succinimidylester am besten bei $\text{pH} 8$ reagieren. Ein unerwarteter Effekt war jedoch die fast ausschließliche Adsorption des Konjugates an die Probenoberfläche. Die Größe des Proteins (ca. 47 kDa) sollte nicht verantwortlich sein für diese Beobachtung, denn weitaus größere Moleküle, Antikörper (ca. 90-150 kDa) werden in der Immunhistologie verwendet. Hydroxylapatit bindet unspezifisch und sehr affin die unterschiedlichsten Speichelkomponenten, insbesondere Proteine. Nach einer Reinigung der Zahnoberfläche durch z.B. Zähneputzen bildet sich innerhalb kurzer Zeit das sog. Schmelzoberhäutchen oder Pelikel, ein komplexes Adsorbat, von dem angenommen wird, daß es eine wichtige Rolle bei der Remineralisierung und dem Schutz vor bakteriellen Säureangriffen darstellt (Bradway 1992). Die Vermutung liegt nahe, daß eben diese Pelikelbildung mit dem BSA-Konjugat erfolgte. Für Messungen im Zahninneren ist diese Technik daher ungeeignet, reine Oberflächenuntersuchungen sollten möglich sein.

Der zweite Ansatz zur ratiometrischen pH-Messung ging von folgenden Annahmen aus: Das Trägermolekül Dextran (hier ca. 10 kDa) bildet keine pelikelartigen Beläge. Die Belegung des Moleküls mit Fluorophoren ist recht gering (nach Herstellerangaben 0,5-2 Farbstoffmoleküle pro Dextran) und deren Molekulargewicht (Cl-NERF 451,86 g/mol, TexasRed 625,15 g/mol) ist vernachlässigbar gegenüber dem Polymer. Die Bruttoladung der Farbstoffe ist null.

Aus diesem Grund ist zu erwarten, daß die Diffusionseigenschaften der Konjugate im wesentlichen durch die Dextran-Komponente (deren Masse zudem einer Verteilung unterliegt) bestimmt wird. Deshalb wurden die kommerziell erhältlichen Konjugate der beiden Farbstoffe eingesetzt. Bei gegebenem Mischungsverhältnis gilt nach dem Gesagten, daß an jedem Ort innerhalb der Probe ein konstantes Verhältnis der beiden Fluorophore angenommen werden kann. Ziel der CLSM-Untersuchungen war es, Quotientenbilder bei unterschiedlichen pH-Werten zu generieren.

Diese Bilder zeigen eine inhomogene Intensitätsverteilung innerhalb des Präparates. Dies läßt sich dahingehend interpretieren, daß die Konjugatmoleküle nicht überall hingelangen (nicht, daß sich deren Konzentrationsverhältnis zueinander ändert) oder, daß sich in diesen Bereichen pH-Änderungen vollziehen, die auf Reaktionen des Apatits mit der Säure beruhen. In Frage kommen Neutralisationsreaktionen der Wasserstoffionen mit Hydroxylionen, in geringerem Umfang vorhandenen Carbonat- und Phosphationen. Letztere Annahme wird als die plausibelste betrachtet, woraus sich Konsequenzen für die Nutzbarkeit dieser Technik für diese spezielle Anwendung ergeben:

Die Abb. 3.1.4.12 zeigt eine Zahnprobe, die vor der Aufnahme in einem Puffer (pH 4) äquilibriert wurde. Im linken Bild (Reflexion) sind die Schmelzprismen zu erkennen, die bei diesem Präparat schräg angeschnitten wurden. Die rechte Aufnahme, das Quotientenbild zeigt deutlich, daß nach dem beschriebenen Verfahren keine einheitliche pH-Verteilung zu beobachten ist. Diese Aussage läßt sich auch für Abb. 3.1.4.13 (pH 5, Schmelz-Dentin-Grenze) machen, hier erscheinen die am stärksten acidifizierte Areal im Bereich der , Schmelz-Dentin-Grenze.

Üblicherweise werden derartige Bilder durch Kalibrierung geeicht, d.h. bei genau definierten pH-Stufen gewinnt man Aufnahmen, mit denen sich durch Vergleich der pH-Wert in Proben unbekannter pH-Verteilung ermitteln läßt. Die Inhomogenität der pH-Verteilung bei den beiden aufgeführten Beispielen (und bei den nichtgezeigten) schließt dies aus.

Eine weitere Konsequenz, die sich aus den genannten Überlegungen ergibt, ist die Frage, ob im nativen Zahn (intakt, nichtkariös in der Mundhöhle) überhaupt eine homogene pH-Verteilung existiert. Frühe kariöse Läsionen treten jedoch nur nach andauerndem Säureangriff im äußeren Schmelzbereich auf, d.h. es müßte im Zahninneren einen effektiven Puffermechanismus geben, der Demineralisierung im inneren Schmelz und Dentin – die bei der raschen Diffusion der H^+ -Ionen zu erwarten ist – verhindert.

Das hier vorgestellte ratiometrische Verfahren ist aus den oben genannten Gründen für die pH-Messung in Zahnpräparaten so nicht anwendbar.

Der letztendlich gedachte Zweck soll die pH-Detektion in kariösen Läsionen sein. Grundsätzlich müßten diese Verfahren *in vivo* durchgeführt werden, d.h. die Färbung muß entweder in der Mundhöhle oder bei explantierten Zähnen durchgeführt werden, die dann im Mund den „natürlichen“ kariogenen Bedingungen ausgesetzt werden.

Es wären daher weitere Punkte zu klären:

- Die potentielle Toxizität der Konjugate muß bestimmt werden
- Idealerweise sollten je Trägermolekül beide Farbstoffe vorliegen
- Die Untersuchung der Zahnproben muß *in vivo* erfolgen

3.2 Modifizierung von Titanoberflächen

Unter den verschiedenen Knochenimplantatmaterialien kommt heute im wesentlichen nur noch Titan und seinen Legierungen (z.B. Ti6Al4V) Bedeutung zu. Das vorgestellte Verfahren beschränkt sich auf die Verwendung von Reintitan (cpTi; von engl.: *commercially pure*), um Einflüsse weiterer Legierungsbestandteile auf das chemische Verhalten der Proben auszuschließen.

3.2.1 Probenpräparation und mechanische Bearbeitung

Rundmaterial aus Reintitan (\varnothing 15mm) wurde auf einer mit Diamantsägeband ausgestatteten Bandsäge in Scheiben von 2mm Dicke gesägt. In zwei Arbeitsschritten wurden diese Scheiben auf einer kombinierten Schleif-Poliermaschine einseitig bearbeitet. Nach einem Schleifgang (600 Korn) zur Beseitigung der Sägespuren erfolgte die Nachbearbeitung (1200 Korn). Mit dem bloßen Auge sind danach keine Kratzer oder Riefen zu erkennen. Eine weitere mechanische Oberflächenbehandlung ist für das anschließende Elektropolieren nicht nötig.

3.2.2 Elektropolieren

Elektropolieren, das elektrolytische Abtragen von Metallen bzw. deren Legierungen, dient der Gewinnung einer chemisch und kristallographisch einwandfreien Probenoberfläche. Rein mechanische Verfahren, wie das Polieren liefern Oberflächen sehr niedriger Rauhtiefe, bei diesem Prozeß werden jedoch meist Verunreinigungen in die obersten Schichten eingebracht und der Aufbau der Kristallite gestört. Die Elektropolitur hingegen legt das Gefüge frei. Dies bedingt eine höhere Rauigkeit der Oberfläche – sie erscheint eher mattglänzend – gegenüber mechanisch polierten Werkstücken, gewährleistet aber eine optimale Grundlage für eine anschließende chemische Behandlung. Die Abbildung zeigt eine Vorrichtung zum Elektropolieren.

Die Apparatur besteht aus den Komponenten:

- Stromversorgung
- Probenaufnahme aus Teflon
- Kontaktierung aus Titan
- Gegenelektrode aus Goldblech
- heizbares Elektrolytbad mit Magnetrührer

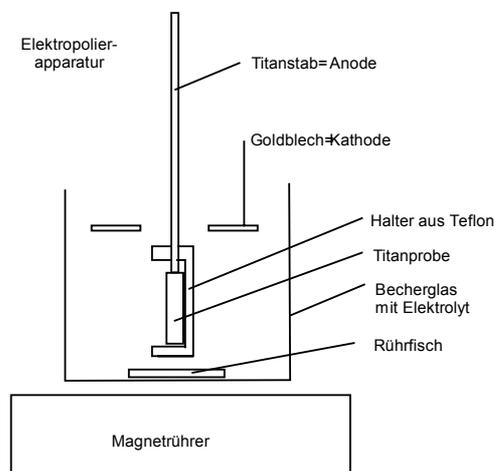


Abb. 3.2.2.1 Elektropolier-Apparatur

Es erwiesen sich erwiesen sich folgende Parameter als geeignet (persönliche Mitteilung Hr. Knoblich, MPI f. Chemie):

- Stromdichte ca. 300 mA/cm^2
- Temperatur 40°C
- Elektrolyt: wäßrige Lösung von 9 % NH_4xHF (w/v), 8,5 % H_2SO_4 konz. (v/v), 0,5 % Urotropin (w/v)
- Dauer: 120 s

Der Elektrolyt ist nur begrenzt haltbar, d.h. er muß jeweils frisch angesetzt werden.

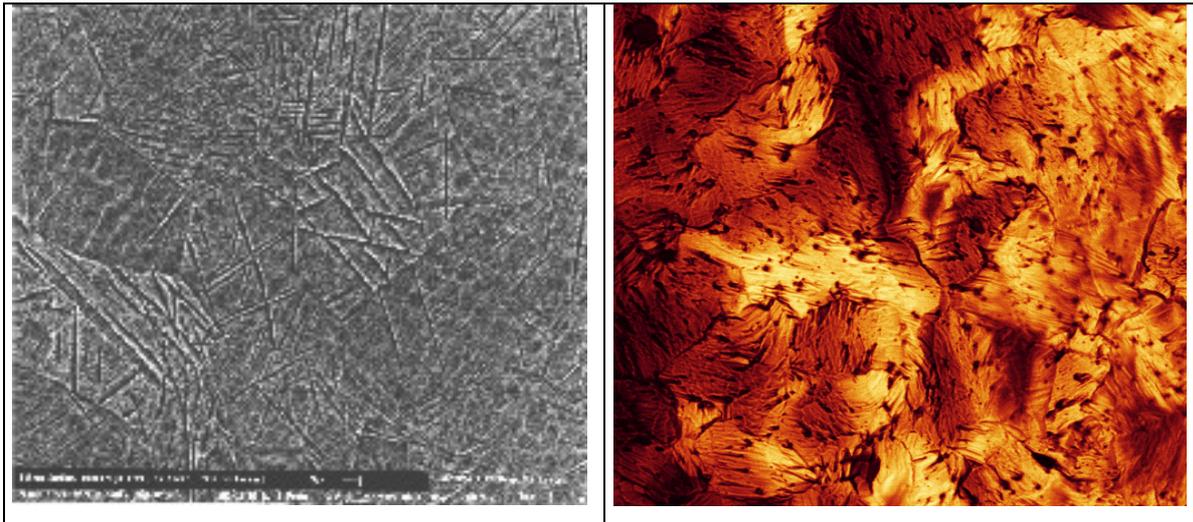


Abb. 3.2.1.2 EM- bzw. CLSM-Aufnahme elektropolierter Titanoberflächen Bildgröße 125X125 μm^2

3.2.3 Profilometrie

Das Rasterelektronenmikroskop LEO 435VP erlaubt mittels einer besonderen Softwareoption die Quantifizierung von Oberflächenrauigkeiten. Ein gebräuchlicher Parameter in diesem Zusammenhang ist der arithmetische Mittelrauhwert R_a . Diese Größe wird in DIN 4768 bzw. ISO 4288 beschrieben: “Der Mittenrauhwert R_a entspricht der Höhe eines Rechteckes, dessen Länge gleich der Gesamtmeßstrecke l_m ist. Das Rechteck muß gleich mit der Summe der zwischen Rauheitsprofil und mittlerer Linie eingeschlossenen Flächen sein.” (Tabellenbuch Metall 1987).

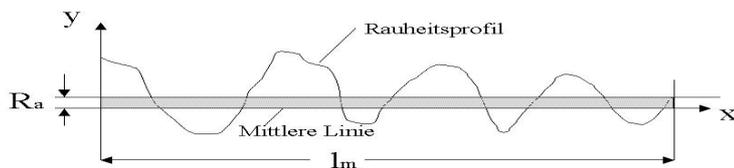


Abb. 3.2.3.1 Skizze zum R_a -Wert

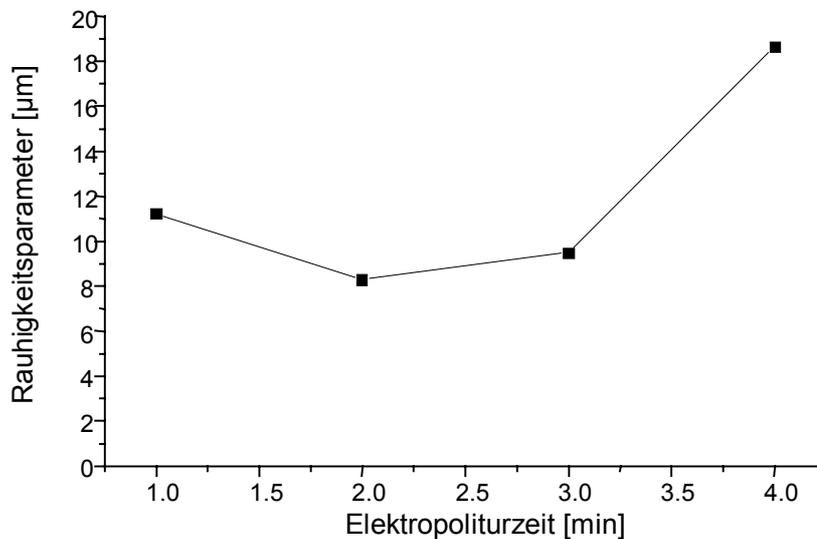


Abb. 3.2.3.2 Rauigkeitsprofil (R_a -Profil) als Funktion der Behandlungsdauer

Vielfach wird in der Literatur der Einfluß der Oberflächenmorphologie auf das Adhäsionsverhalten von Zellen beschrieben (Noth 1999). Die Ergebnisse vieler Untersuchungen deuten darauf hin, daß Rauigkeiten in der Größe einiger Mikrometer – dies entspricht gerade dem Durchmesser eukariontischer Zellen - ein beschleunigtes Anwachsverhalten begünstigen. Daher ist die, durch Elektropolitur erhaltene Oberfläche, unter diesem Gesichtspunkt als günstig zu bewerten.

3.2.4 Oberflächenoxidation

Die Bildung einer Oxidschicht auf Titan erfolgt bereits unter atmosphärischen bzw. physiologischen Bedingungen, d.h. Titan passiviert sehr rasch. Die fest haftende Oxidhaut besitzt keine stöchiometrische Zusammensetzung, wie etwa TiO_2 , und wird allenfalls dem Rutiltyp zugeordnet (Bess 1999).

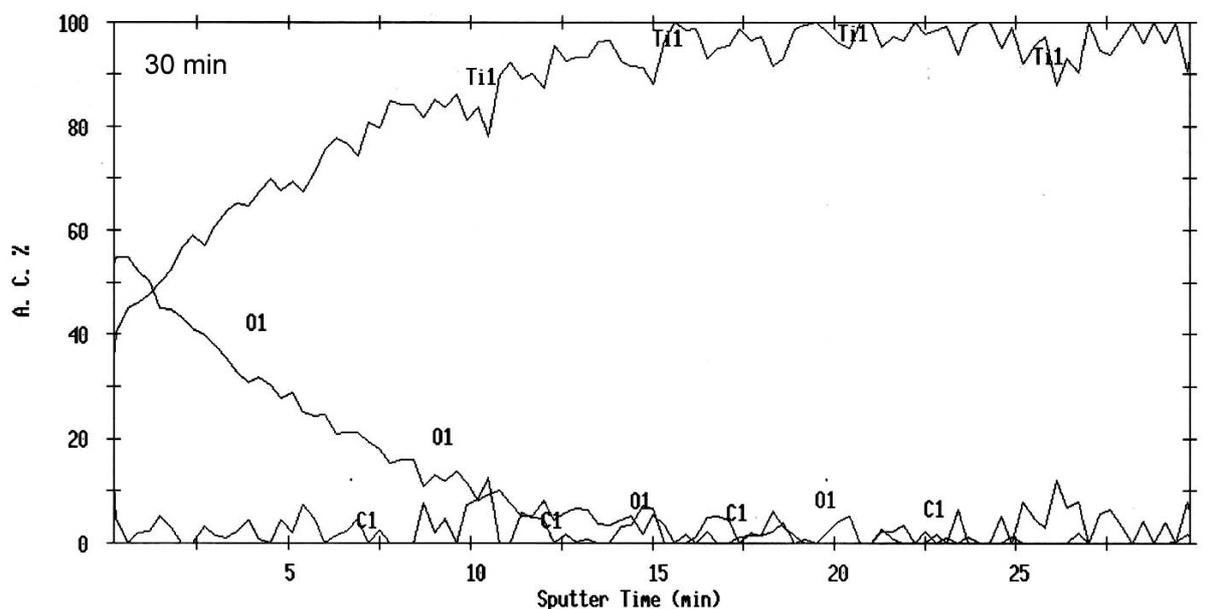
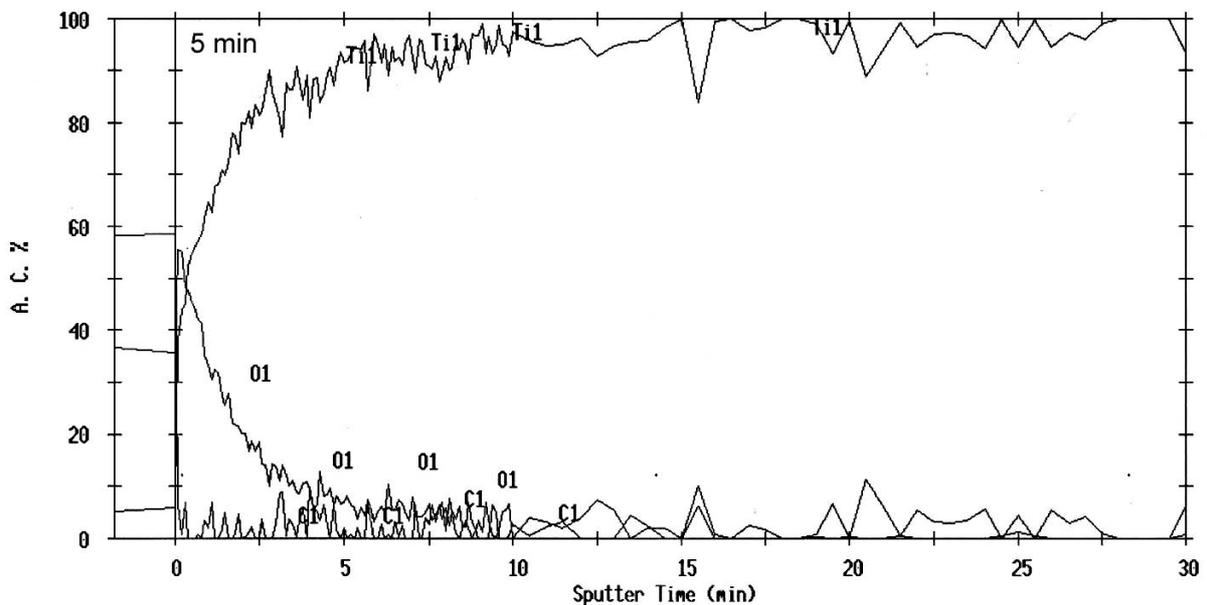
Zur Verstärkung dieser Schicht kann man sich grundsätzlich zweier Methoden bedienen:

- der anodischen Oxidation; analog dem Eloxalverfahren beim Aluminium
- der naßchemischen Oxidation mit starken Oxidationsmitteln (HNO_3 , H_2SO_4 , H_2O_2)

Aus praktischen Erwägungen fiel die Wahl auf ein Verfahren, das eine Mischung aus konz. H_2SO_4 und H_2O_2 (30%) verwendet (Nanci 1998). Zur Optimierung der Methode wurde eine Reihe mit unterschiedlichen Oxidationszeiten durchgeführt. Die elektropolierten Titanscheiben wurden mit einer frisch zubereiteten, aber auf Raumtemperatur gekühlten Mischung (50/50 v/v) aus H_2SO_4 konz. und H_2O_2 (30% v/v) für 5, 30, 60 und 120 Minuten behandelt, mit H_2O gespült und getrocknet.

3.2.5 ESCA-Analyse

Sputterprofile der oxidierten Titanoberfläche zeigen erwartungsgemäß eine Abnahme der Sauerstoff- bzw. ein Ansteigen der Titankonzentration mit zunehmender Sputtertiefe.



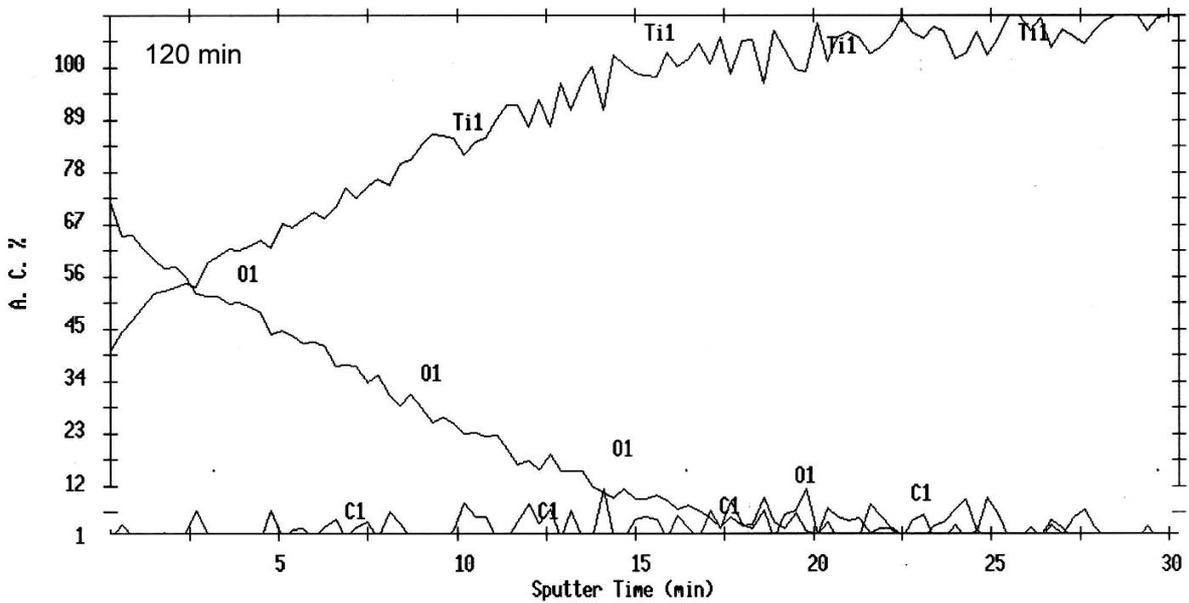
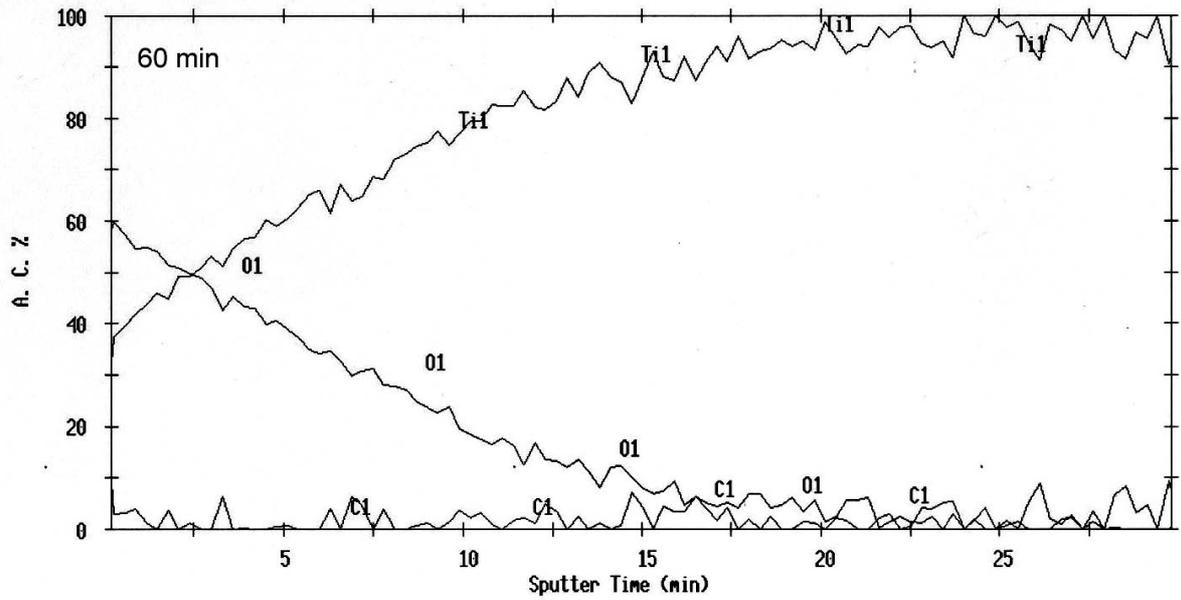


Abb. 3.2.5.1 ESCA-Sputterprofile von oxidiertem Titan. Qualitativer Verlauf der Titan- bzw. Sauerstoffkonzentrationen in Abhängigkeit von der Oxidationszeit. (O1=Sauerstoff, Ti1=Titan, C1=Kohlenstoff). Kohlenstoff wird als allgegenwärtiges, oberflächlich adsorbiertes CO_2 detektiert.

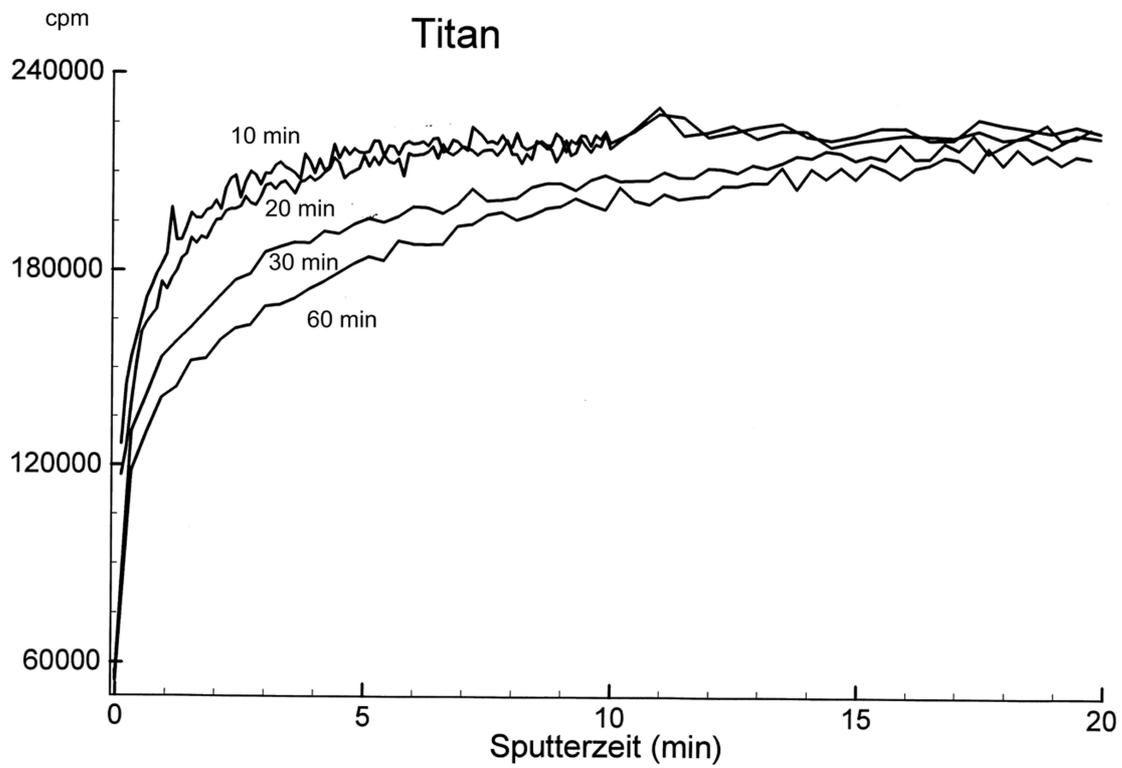
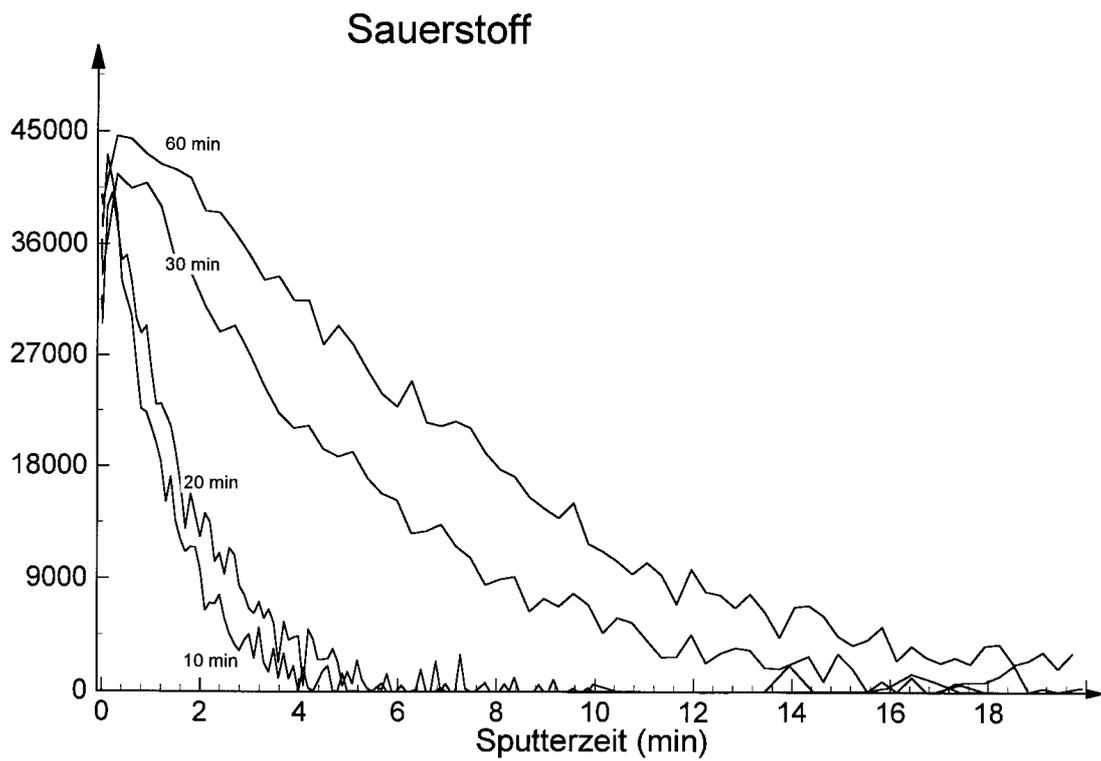


Abb. 3.2.5.2 ESCA-Sputterprofil der Sauerstoff- bzw. Titankonzentrationen bei verschiedenen Oxidationszeiten

Die beiden Graphiken verdeutlichen den qualitativen Zusammenhang zwischen zunehmender Titankonzentration mit fortschreitendem Abtragen der Oxidschicht und dem Absinken der Sauerstoffkonzentration. Eine Schichtdickenbestimmung wurde nicht durchgeführt, da diese nur bei ebenen Objekten sinnvoll und möglich ist.

Ein Grenzwert der Oxidschicht stellt sich zwischen 30-60 Minuten ein, das bedeutet, längere Behandlungszeiten als eine Stunde sind nicht notwendig.

3.2.6 Silanisierung

Erste Ansätze, Titanoberflächen zu funktionalisieren sind recht jungen Datums (Sukenik 1990). Die Vorgehensweise entspricht weitgehend der Silanisierung oxidierten Siliziums bzw. von Quarz oder Glas.

Durchführung:

Elektropolierte und oxidierte Titanplättchen wurden 3 Stunden unter Rückfluß in einer 10%igen Lösung von 3-Aminopropyl-triethoxysilan in Toluol (über Molekularsieb 3Å getrocknet) unter Rückfluß gekocht. Anschließend wurde zunächst mit trockenem Toluol gewaschen, dann erfolgten 2 weitere Waschschrte mit trockenem Isopropanol. Die derart behandelten Proben wurden im Exikator über Trockenmittel bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

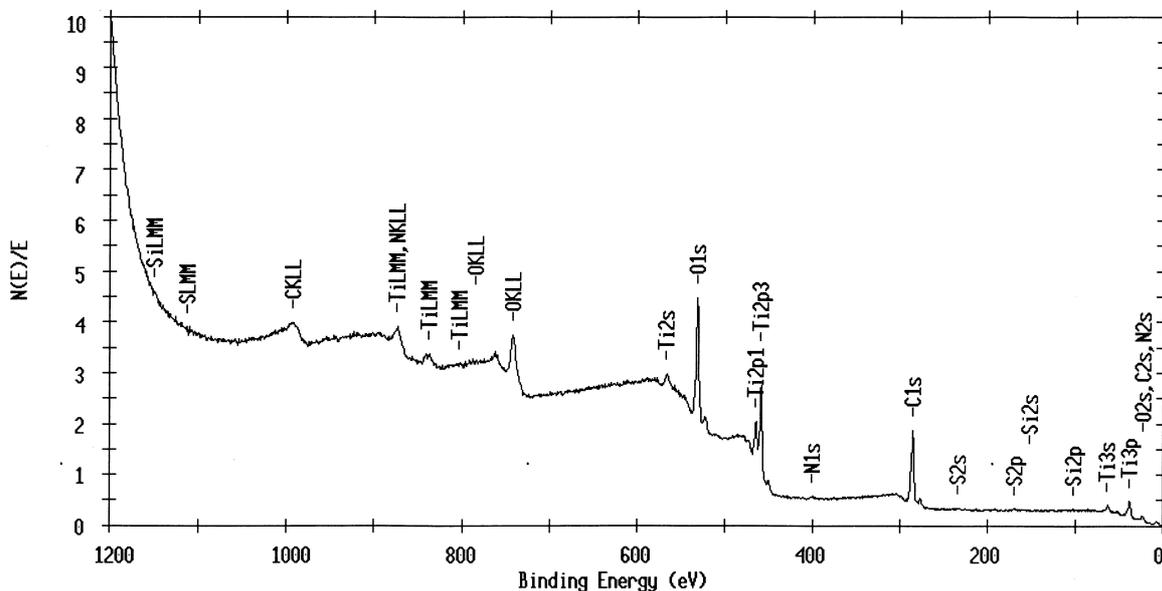


Abb. 3.2.6.1 ESCA-Profil Titan, mit $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ oxidiert und silanisiert mit 3-Aminopropyltriethoxysilan

In dem ESCA-Spektrum lassen sich alle zu erwartenden Elemente identifizieren: Silizium und Stickstoff sind dem Aminosilan zuzuordnen. Der Kohlenstoff-peak läßt sich auf adsorbiertes CO_2 und Silankohlenstoff zurückführen. Das Vorliegen von Schwefel läßt sich durch die Verwendung von H_2SO_4 erklären.

3.2.7 Spezifischer Nachweis der Silanaminogruppen mit Fluorescamin

Der spezifische Nachweis von Aminogruppen gelingt besonders elegant mit dem nichtfluoreszenten Fluorescamin (Udenfriend 1972). Diese Substanz dient vor allem in der Säulenchromatographie zur Derivatisierung von Aminen, um diese fluorometrisch detektieren zu können. Der besondere Vorteil dieses Reagenz liegt in dem Umstand, daß ausschließlich dessen Reaktionsprodukte mit primären Aminen fluoreszieren, Hydrolyseprodukte sind farblos. Fluorescamin reagiert außerordentlich schnell (Millisekunden) in einer, der Ninhydrin-Reaktion ähnlichen Weise:

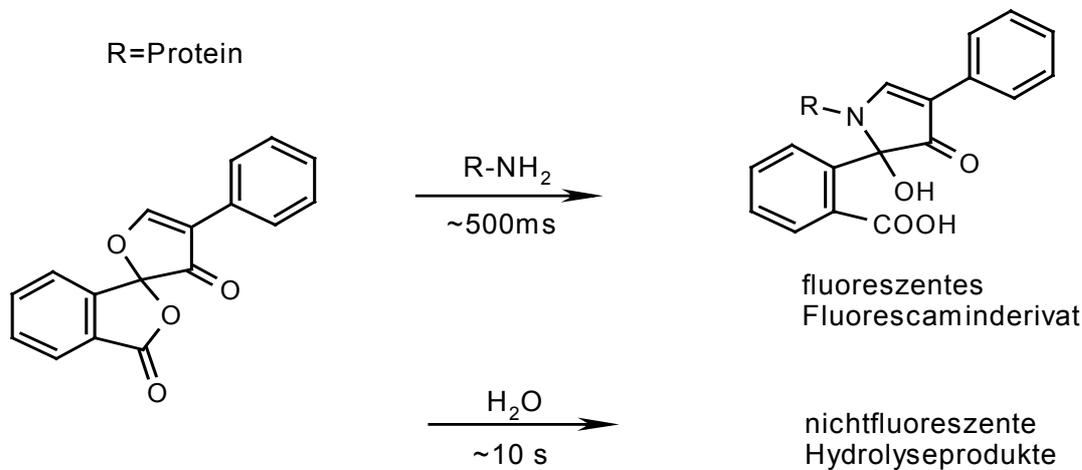


Abb. 3.2.7.1 Reaktionsschema: Fluorescamin und primäres Amin

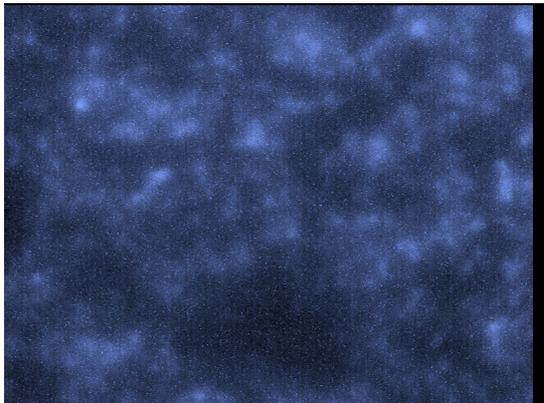


Abb. 3.2.7.2 Fluoreszenzdetektion primärer Aminogruppen auf Titan mittels Fluorescamin; Objektiv x10

Nachteil dieser Methode ist die erforderliche Anregung im nahen UV-Licht ($\lambda_{\text{abs}} = 390\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 475\text{ nm}$). Dies beschränkt die Anwendung auf konventionelle Fluoreszenzmikroskope mit Anregung durch Quecksilberdampf lampen, es lassen sich z.B. Anregungs- bzw. Emissionsfilter für UV-Farbstoffe wie DAPI (DNA-Färbung) verwenden. Die Abbildung zeigt die, mit der Anwesenheit primärer Aminogruppen korrelierte, Fluoreszenz des Fluorescaminderivates. Möglicherweise erfolgt die Reaktion de Aminosilans nicht gleichmäßig an den verschiedenen Flächen der Kristallite des Titans.

3.2.8 Kopplung

Zur chemischen Kopplung von Proteinen mit anderen Molekülen kann man sich unterschiedlicher Methoden bedienen. Zu den funktionellen Gruppen, die an einer Kopplungsreaktion teilnehmen können, gehören verschiedene Aminosäurereste: Carboxylgruppen von Asparagin- und Glutaminsäure, die primäre Aminogruppe des Lysins und die Thiolfunktion des Cysteins. Carboxylgruppen lassen sich unter Zuhilfenahme von Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) mit Aminofunktionen verknüpfen; dies entspricht der Merrifield-Synthese von Peptiden. Thiole binden unmittelbar an Goldoberflächen oder können in einer Michael-Addition mit Maleinimidresten reagieren. Die Kopplung zweier Aminofunktionen läßt sich sehr leicht durch Verwendung von Dialdehyden (z.B. Glutaraldehyd) durchführen. Befinden sich beide Bindungspartner, z.B. Proteine, in Lösung, ergeben sich Probleme, da die Bildung von Aggregaten nur schwer zu vermeiden ist. Stellt ein Bindungspartner jedoch eine "feste Phase" dar – wie im vorliegenden Fall die aminosilanisierte Oberfläche - läßt sich die Kopplung in zwei Schritte aufteilen: Zuerst reagiert die Silanaminogruppe mit dem Dialdehyd, anschließend bindet das Protein (bzw. Peptid) an die verbliebene Aldehydfunktion. Die, bei dieser Reaktion entstehenden Schiff'schen Basen sind unter physiologischen Bedingungen (ca. pH7, 37°C) stabil (Neff 1999).

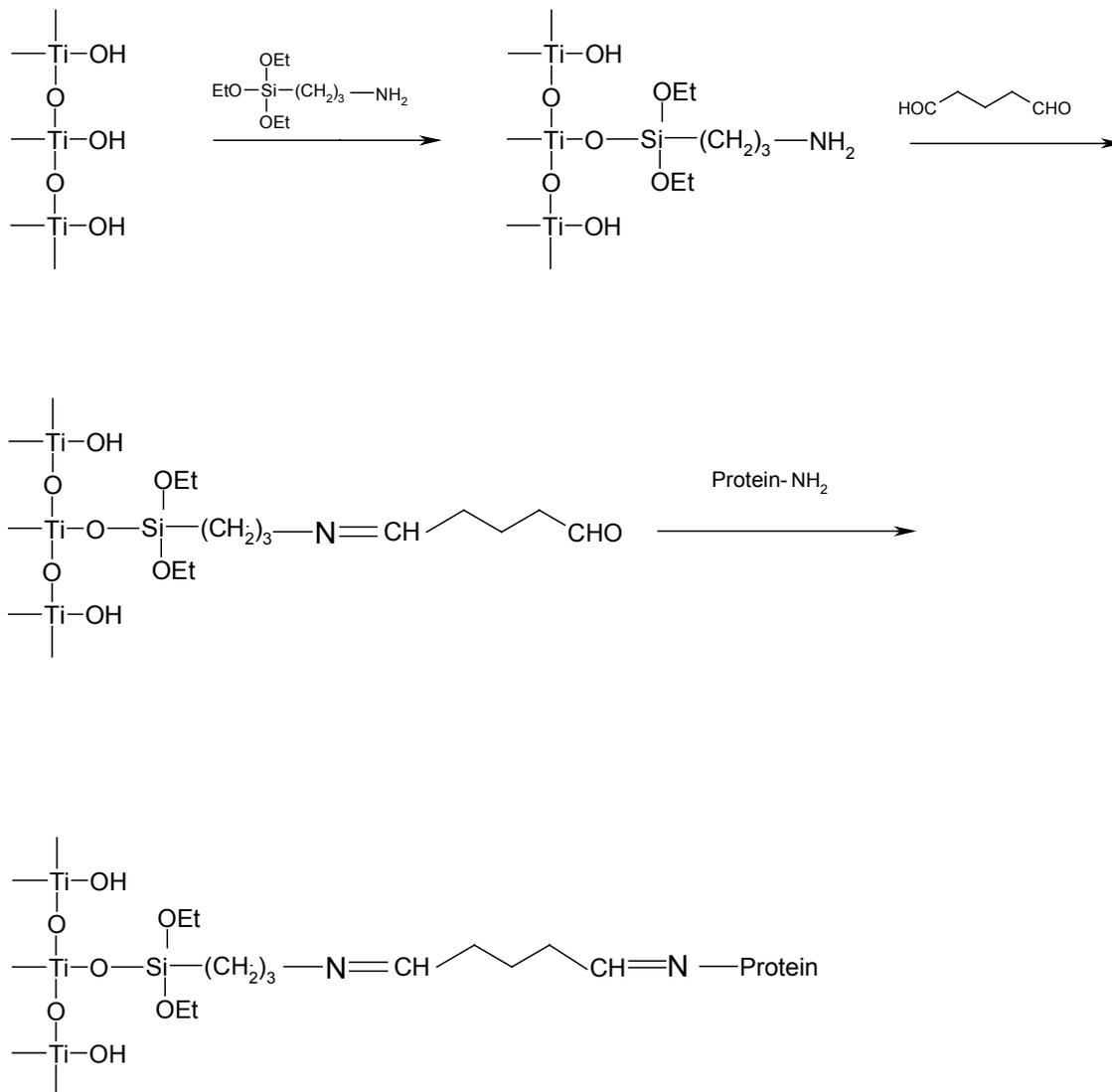


Abb. 3.2.8.1 Kopplungsschema von Protein an silanisiertes Titan

Durchführung:

Aminosilanisierte Titanscheibchen wurden bei Raumtemperatur (25°C) 2 Stunden in Glutaraldehydlösung (1 % in Carbonatpuffer pH 8,3) inkubiert und anschließend mit demselben Puffer drei mal gewaschen, um überschüssigen Aldehyd zu entfernen. Das jeweilige Protein bzw. Peptid (10 µg/ml in Carbonatpuffer) wurde auf die "aktivierten" Plättchen gegeben und weitere 2 Stunden inkubiert. Es folgten 3 Waschschrirte mit Phosphatpuffer (PBS pH 7,3). Derartig modifizierte Titanproben wurden in PBS mit einem Zusatz von 0.01 % NaN_3 bei 4°C aufbewahrt. Das Azid bietet Schutz vor Verkeimung. Der Lagerung in wäßrigem Medium gegenüber einer Trocknung wurde der Vorzug gegeben, um eventuelle Veränderungen der Proteine auszuschließen.

3.2.9 Sterilisierung der beschichteten Titanproben und Zellkultur

Für den Einsatz in Zellkulturexperimenten ist es erforderlich, die Proben keimfrei zu erhalten. Übliche Methoden der Sterilisierung, wie UV-Bestrahlung, Autoklavieren und Sterilfiltration von Proteinlösungen scheiden für diese Anwendung aus. Zum einen sind für die UV-Sterilisierung transparente Präparate erforderlich, die üblichen Bedingungen im Autoklaven (typischerweise 120°C, 2-3 bar) lassen eine Veränderung der Proteine befürchten. In der Säulenchromatographie von Proteinen finden häufig wäßrige Lösungen von Acetonitril Verwendung. Acetonitril gilt als nicht denaturierend, im Gegensatz zu unpolaren Lösungsmitteln. Auch Ethanol- und Isopropanol/Wasser Mischungen eignen sich zur Sterilisation von beschichteten Oberflächen.

In einem Vorversuch wurden unsterile, unbeschichtete Titanplättchen 15 Minuten in

- Acetonitril/Wasser (50 Vol%)
- Isopropanol/Wasser (50 Vol%)

inkubiert und anschließend unter der Sterilbank mit sterilem Wasser mehrfach gespült. Die Plättchen wurden in eine 6-Loch Zellkulturschale übergeführt und mit Zellkulturmedium (IMDMS) überschichtet. Nach drei Tagen Inkubation im Brutschrank (37°C, 95% rel. Luftfeuchte, 5%CO₂) konnte keine Verkeimung der Proben beobachtet werden.

Endgültige Aussagen über die Eignung enossaler Implantate können letztlich nur Einpflanzungsstudien liefern. Vorab sind jedoch Zellkulturexperimente sehr hilfreich, besonders, um abzuschätzen, wie sich Oberflächenmodifizierungen auf Proliferation (Vermehrung) und Adhärenz der verwendeten Zellen auswirken. Idealerweise sollten in einem derartigen Experiment native, also "echte" Osteoblasten eingesetzt werden. Deren Gewinnung ist allerdings recht aufwendig und an die Verfügbarkeit von Spenderknochen geknüpft. Besonders bei humanen Proben ist man hierzu auf ein dementsprechendes Institut oder eine Klinik angewiesen. Alternativ können Osteoblastenzelllinien (d.h. Tumorzellen) oder, da es sich um eine sehr frühe Untersuchung handelt, Endothelzellen eingesetzt werden.

Durchführung:

Auf protein- bzw. peptidmodifizierte, sterilisierte Titanscheiben wurden in 6-Loch-Kulturschalen Zellsuspension (Zelllinie ECV 304 (Brizzi 1999); $1,5 \times 10^5$ Zellen/ Scheibe) gegeben und vorsichtig mit Kulturmedium ECGM (siehe Reagentien) unter Zusatz von 5% FCS (fötales Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin überschichtet. Nach 4 Tagen im Brutschrank (95% rel. Luftfeuchte, 5% CO₂, 37°C) wurde das Medium entnommen, und zur Fixierung der mutmaßlich adhärenierten Zellen eine Behandlung mit Formaldehydlösung (Paraformaldehyd 2% (w/v), 20 min) durchgeführt. Anschließend erfolgten 3 Waschschrritte mit PBS; Lagerung in PBS (0,01 % NaN₃) im Kühlschrank.

3.2.10 Detektion der adhärenierten Zellen mit DiO

Hierzu wurde wiederum eine spezifische Fluoreszenzfärbung gewählt. Der Farbstoff DiO lagert sich, wie bereits erwähnt, in Membranen ein und wird als geeignet beschrieben, um bereits fixierte Zellen zu markieren (Mukherjee1999). Im konventionellen Fluoreszenzmikroskop können die üblichen Filter für Fluorescein benutzt werden.

Durchführung:

10 µl DiO-Stammlösung (1 mg/ml in DMF) wurde mit 1 ml PBS auf eine Konzentration von 0.01 mg/ml verdünnt. Die besiedelten Titanscheiben wurden mit saugfähigem Papier vorsichtig von überschüssigem Puffer befreit und dann 100 µl der Färbelösung aufgebracht. Nach 20 Minuten wurde dreimal mit PBS gespült und sofort mikroskopiert. Von jeder Scheibe wurden willkürlich drei Areale (ca. $160 \times 125 \mu\text{m}^2$) ausgewählt und die fluoreszierenden Stellen, die den markierten Zellen entsprechen, ausgezählt.

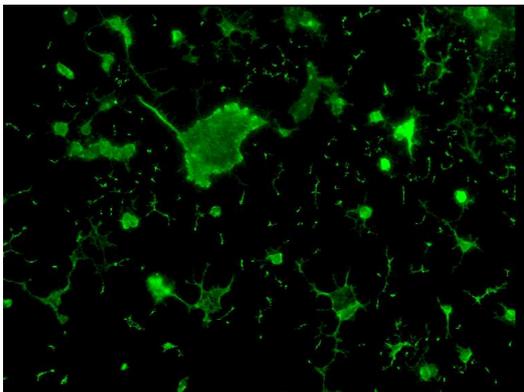


Abb. 3.2.10.1 Zellen auf Titan mit DiO gefärbt; Objektiv x40; Bildgröße $125 \times 125 \mu\text{m}^2$

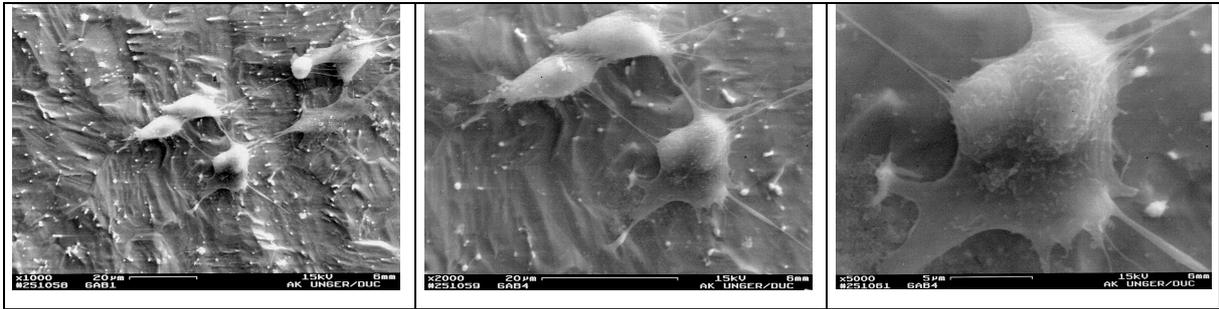


Abb. 3.2.10.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen adhärenter Zellen auf Titan.

Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (70, 85, 95, 100% Ethanol, je 10 min). Dann wurden die Proben 5 min in Hexamethyldisilazan inkubiert, an der Luft getrocknet, goldgesputtert und im Exikator gelagert (Kühnel 1989).

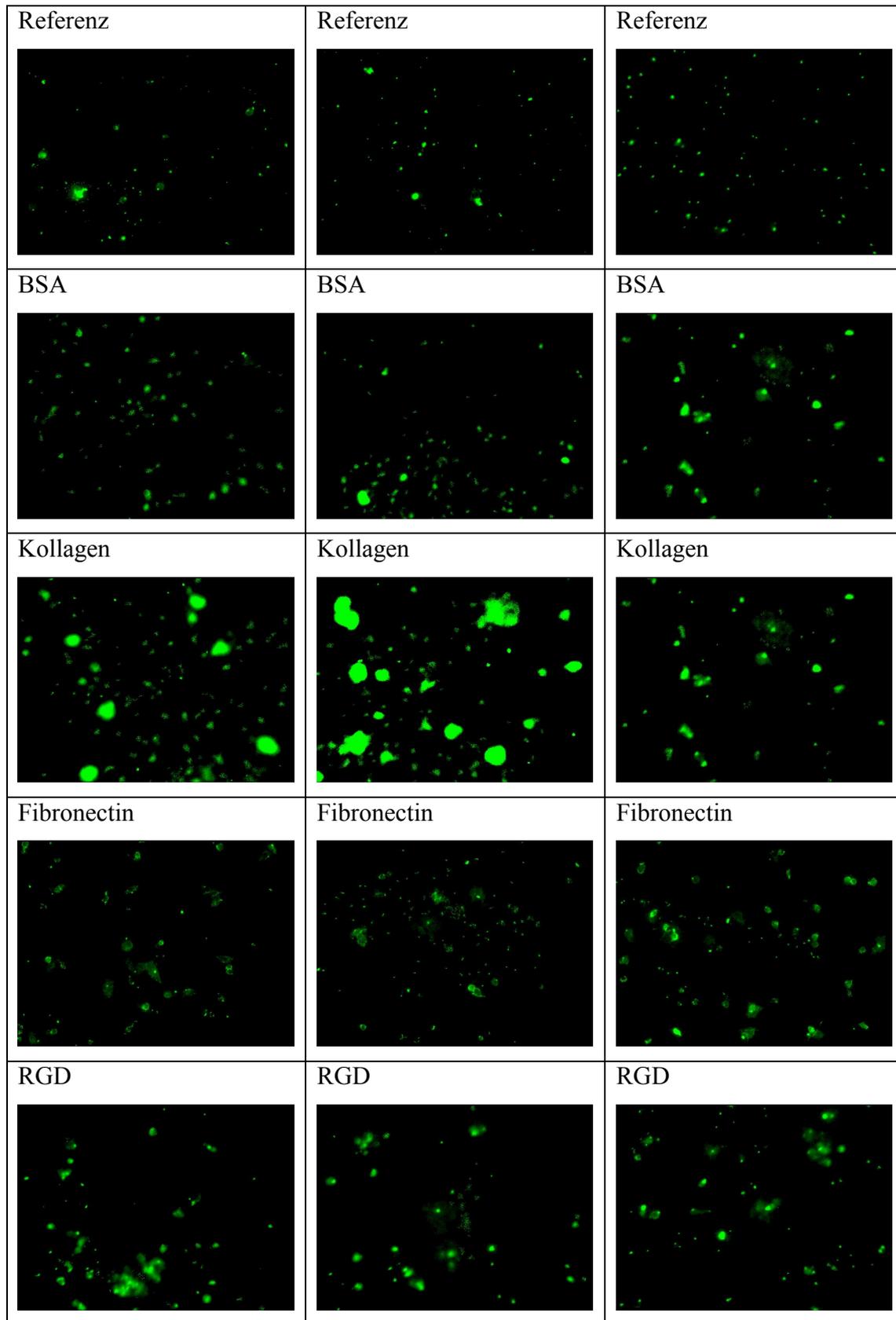


Abb. 3.2.10.3 Fluoreszenzaufnahmen zur Zellzahlbestimmung mit DiO;
 Objektiv x10, Bildgröße 160x125µm²

In diesem Zusammenhang ist nur die relative Zelldichte von Interesse, um die unterschiedlichen Einflüsse der jeweiligen Oberflächenbeschichtung zu beurteilen.

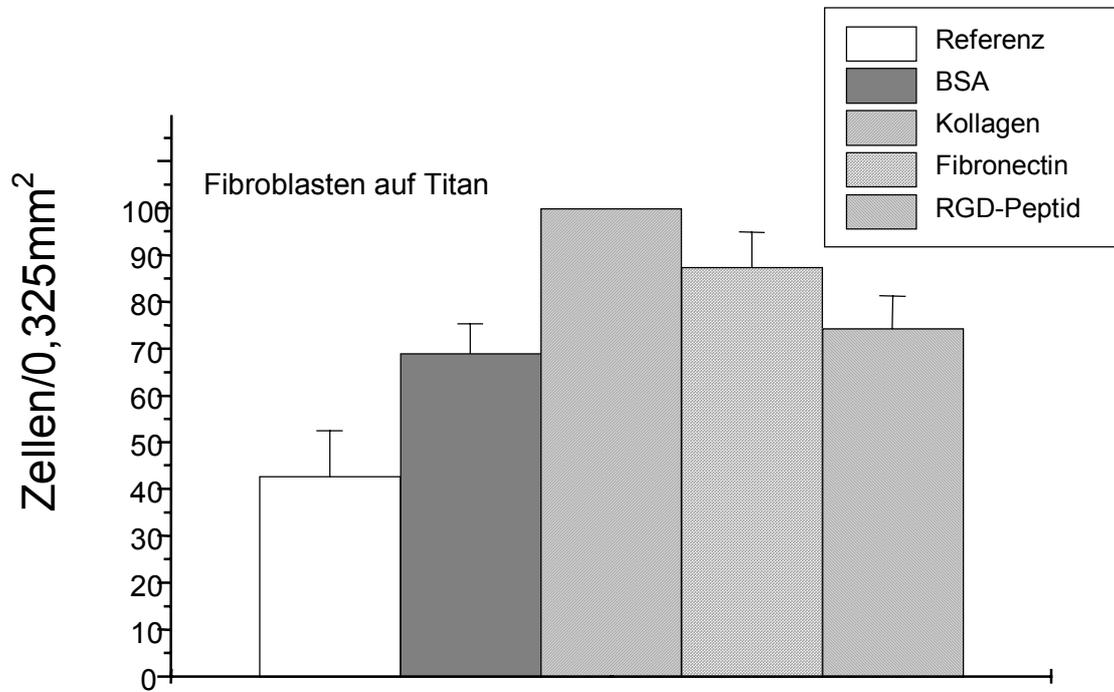


Abb. 3.2.10.4 Rel. Zelldichte auf modifizierten Titanoberflächen

3.2.11 Diskussion zu 3.2

Grundmotive dieser Arbeit sind die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen und kovalente Kopplungen mit Biomolekülen. Bei dem beschriebenen Verfahren zur „Biologiesierung“ der Titanestkörper kamen Techniken aus beiden Bereichen zum Einsatz.

Die elektrochemische Oberflächenbearbeitung durch Elektropolitur ist zwar apparativ aufwendiger als rein chemische Ätzung, ergab jedoch bessere Resultate. Die Titanoberfläche konnte so auf eine Rauigkeit eingestellt werden, die als –wie eingangs erwähnt- ideal angesehen wird, das Anwachsen von Zellen zu fördern, allein hinsichtlich der Oberflächenbeschaffenheit. Vorangehende Ätzversuche mit Ammoniumhydrogendifluorid bewirkten nur ein Freilegen der Kristallite (nicht gezeigt). Die bei der Elektropolitur entstehenden Hinterschneidungen (senkrecht zur Längsachse gesehen) am Implantatkörper bedingen zudem einen sog. Formscluß zum umliegenden Knochen, d.h. diese Teile können nicht ohne weiteres aus dem Hartgewebe ausgezogen werden. Wünschenswert wäre eine teilweise Automatisierung des Verfahrens, besonders im Hinblick auf die Stromsteuerung, um besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Eine Verstärkung der Oxidhaut ließ sich auf einfache Art naßchemisch erreichen; Fremdionen, wie beispielsweise „eingebackene“ Sulfationen stammen aus der Oxidationslösung, können jedoch wohl als unbedenklich betrachtet werden. Es wurde keine Dickenbestimmung dieser Oxidhaut durchgeführt.

Zur Messung von Oberflächenbelegung bzw. von Schichtdicken auf Oberflächen werden vor allem zwei Methoden benutzt: die Plasmonenresonanzspektroskopie und die Ellipsometrie. Beide Untersuchungstechniken lassen sich jedoch nur bei ebenen Objekten sinnvoll einsetzen und scheiden daher für die hier beschriebene Anwendung aus. Denkbar wären Versuche, mit Messungen an ebenen Proben auf unregelmäßig gestaltete Präparate zu schließen, jedoch ist fraglich, ob die Ergebnisse übertragbar sind. Durch ESCA-Analysen konnte qualitativ der Konzentrationsverlauf der an der Oxidschicht beteiligten Elemente gezeigt werden. Wie zu erwarten, ändert sich die Stöchiometrie des Oxids je nach Distanz zum reinen Titangrundmaterial. Silizium und Stickstoff, Bestandteile des Aminosilans ließen sich ebenfalls nachweisen. Erwartungen, chemische Verschiebungen einzelner Elemente nach der Kopplung zeigen zu können, wurden nicht erfüllt. Infrarotspektroskopie (FT-IR) konnte lediglich die Si-O-Bande identifizieren wurde hier aber nicht dokumentiert. Der Fluoreszenznachweis der primären Aminogruppen auf dem silanisierten Titan durch Fluorescamin diente auch hier nur als qualitativer Nachweis. Erkennbar ist jedoch, daß die Oberfläche nicht homogen beladen ist, unter Umständen ist die Kopplung mit der Verteilung der Kristallite korreliert. Die Frage, ob eine flächendeckende Belegung des Titans mit

Aminofunktionen bzw. letztlich mit Peptid oder Protein überhaupt erforderlich ist, um eine verbesserte Adhäsion zu erzielen, läßt sich mit einigen Annahmen über die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen (Integrin/immobilisiertes Protein) beantworten: Integrine, diejenigen Rezeptoren, die RGD-Motiv-vermittelt die Adhäsion bewirken, sind auf der Zelle in relativ geringer Anzahl vorhanden (ca. einige hundert), und lagern sich bei Kontakt -da in der Membran beweglich- zu sog. *focal contacts* zusammen. Dieses Verhalten der Zellen erfordert aber nur punktuell größere Ligandkonzentrationen.

Grundlegend ergaben sich Probleme, den direkten Nachweis der jeweiligen Modifizierung zu führen. Dem entspricht die Tatsache, daß in der bisherigen Literatur bei ähnlichen Problemen ebenfalls darauf verzichtet wird; meist begnügt man sich mit der Aussage, daß nach bestimmten Zeiträumen bei Testkörpern, die in Puffern gelagert werden keine Substanzen in Lösung geht und im Überstand zu finden sind.

Die aus der Glutaraldehydkopplung resultierenden Schiff'schen Basen waren nicht zu detektieren, wohl wegen der geringen Konzentration. Ein spezifischer Nachweis der gebundenen Proteine kann prinzipiell immunologisch, d.h. mit Antikörpern erfolgen, wurde aber nicht durchgeführt.

Die hier verwendeten Proteine bzw. das Peptid bestätigten in ihrer Wirkung auf das Wachstumsverhalten der Zellen die Annahme, die am Anfang stand. Nichtbehandeltes Titan, lediglich oxidiert, zeigt –im Vergleich mit den anderen, beschichteten Proben – die geringste Zelldichte. Das irrelevante Protein BSA (irrelevant bedeutet, daß es für den betrachteten RGD-Integrin-Mechanismus ohne Einfluß ist) besitzt offenbar einen günstigen Effekt, der vergleichbar mit dem des RGD-Peptides ist. Erstere Beobachtung läßt sich auf die bekannte Tatsache zurückführen, daß proteinbelegte Oberflächen, unabhängig von der Art des Proteins, von Zellen gegenüber “nackten” Flächen bevorzugt werden. Vermuten kann man, daß die relativ geringe Auswirkung des Peptides auf Zellproliferation darauf beruht, daß andere Einflüsse (z.B. flankierende Aminosäuresequenzen) eine wichtige Rolle spielen.

Der Zellkulturtest, der am Ende einer Reihe von Bearbeitungsschritten zur Oberflächenmodifizierung von Titan stand, erfüllte insofern die Erwartungen, da hier der vorhergesagte adhäsionsfördernde Effekt dieser Technik gezeigt werden konnte, obwohl dieses Experiment mit Endothelzellen durchgeführt wurde, da “echte” Osteoblasten nicht verfügbar waren.

Das letztlich angestrebte Ergebnis dieses Ansatzes kann nur im Tierexperiment abgeklärt werden. Dies bedeutet, daß eingesetzte Implantate oder Testkörper fest in das Knochenmaterial eingebunden werden unter Ausbildung einer sog. *cement line* und keine bindegewebigen Verkapselungen (Fibrosen) auftreten, die u.U. ein Versagen des Implantates bedeuten.

Für anwendungsorientierte Entwicklung auf diesem Gebiet müßten weitere Voraussetzungen geschaffen werden:

- Zellkulturexperimente sollten mit Osteoblastenkulturen erfolgen.
- Relevante RGD-Motiv-tragende Peptide aus unterschiedlichen Bindegewebsproteinen könnten vergleichend getestet werden.
- Die Bewertung der Zellaktivität sollte nicht nur auf Zellwachstum hin untersucht werden, sondern auf bestimmte Marker des Zellwachstums (Enzyme, Biosyntheseleistung, Mineralisierung, Zellmorphologie, u.a.).
- Tierexperiment

4. Zusammenfassung

Mittels Fluoreszenzfarbstoffen können Strukturen sichtbar gemacht werden, die auf konventionellem Weg nicht, oder nur schwer darzustellen sind. Besonders in Kombination mit der Konfokalen Laser Scanning Mikroskopie eröffnen sich neue Wege zum spezifischen Nachweis unterschiedlichster Komponenten biologischer Proben und gegebenenfalls deren dreidimensionale Wiedergabe.

Die Visualisierung des Proteinanteils des Zahnhartgewebes kann mit Hilfe chemisch kopplungsfähiger Fluorochrome durchgeführt werden. Um zu zeigen, daß es sich bei dieser Markierung nicht um unspezifische Adsorption des Farbstoffes handelt, wurde zur Kontrolle die Proteinkomponente der Zahnproben durch enzymatischen Verdau beseitigt. Derartig behandelte Präparate wiesen eine sehr geringe Anfärbbarkeit auf.

Weiterführend diente diese enzymatische Methode als Negativkontrolle zum Nachweis der Odontoblastenfortsätze im Dentin bzw. im Bereich der Schmelz-Dentin-Grenze. Hiermit konnte differenziert werden zwischen reinen Reflexionsbildern der Dentinkanäle und den Zellausläufern deren Membranen gezielt durch lipophile Fluoreszenzfarbstoffe markiert wurden.

In einem weiteren Ansatz konnte gezeigt werden, daß reduzierte und daher nichtfluoreszente Fluoresceinabkömmlinge geeignet sind, die Penetration von Oxidationsmitteln (hier H_2O_2) in den Zahn nachzuweisen. Durch Oxidation dieser Verbindungen werden fluoreszierende Produkte generiert, die den Nachweis lieferten, daß die als Zahnbleichmittel eingesetzten Mittel rasch durch Schmelz und Dentin bis in die Pulpahöhle gelangen können.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenz bestimmter Fluorochrome von deren chemischer Umgebung, im vorliegenden Fall dem pH-Wert, sollte eingesetzt werden, um den Säuregrad im Zahninneren fluoreszenzmikroskopisch darzustellen. Hierbei wurde versucht, ein ratio-metrisches Verfahren zu entwickeln, mit dem die pH-Bestimmung unter Verwendung eines pH-abhängigen und eines pH-unabhängigen Fluorochroms erfolgt. Diese Methode konnte nicht für diese spezielle Anwendung verifiziert werden, da Neutralisationseffekte der mineralischen Zahnschubstanz (Hydroxylapatit) die pH-Verteilung innerhalb der Probe beeinflussen.

Fluoreszenztechniken wurden ebenfalls ergänzend eingesetzt zur Charakterisierung von kovalent modifizierten Implantatoberflächen. Die, durch Silanisierung von Titantestkörpern mit Triethoxyaminopropylsilan eingeführten freien Aminogruppen konnten qualitativ durch den Einsatz eines aminspezifischen Farbstoffes identifiziert werden.

Diese Art der Funktionalisierung dient dem Zweck, Implantatoberflächen durch chemische Kopplung adhäsionsvermittelnder Proteine bzw. Peptide dem Einheilungsprozeß von Implantaten in den Knochen zugänglicher zu machen, indem knochenbildende Zellen zu verbessertem Anwachsverhalten stimuliert werden. Die Zellzahlbestimmung im Adhäsionstest wurde ebenfalls mittels Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt und lieferte Ergebnisse, die belegen, daß die durchgeführte Modifizierung einen günstigen Einfluß auf die Zelladhäsion besitzt.

5. Geräte & Reagentien

Die Bezeichnungen der Fluoreszenzfarbstoffe nach Nomenklatur wurden nicht in den Text der Arbeit übernommen.

Reagentien:

(soweit nicht anders erwähnt: Fluka, Sigma. Fluoreszenzfarbstoffe: Molecular Probes; Eugene, OR)

BCECF; 3',6'-bis(Acetyloxy)-5(oder6)-[[[(acetyloxy)methoxy]carbonyl]-3-oxo-bis[(acetyloxy)methyl] spiro(isobenzofuran-1(3H), 9'-(9H)xanthene)-2',7'-dipropansäureester

CI-NERF; 4-(2-Chloro-6-ethylamino-7-methyl-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-isophthalsäure

DAPI; 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid

DiI; 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'- tetramethylindocarbocyanin-perchlorat

DiO; 3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanin-perchlorat

DM-NERF; 4-(2,7-Dichloro-6-ethylamino-3-oxo-3H-xanthen-9-yl)-isophthalsäure

FITC; Fluorescein-6-isothiocyanat

Fluorescamin; 4-Phenyl-spiro(furan-2(3H),1'(3'H)-isobenzofuran)-3,3'-dion,

H₂DCF-Diacetat-succinimidylester;

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat

SNARF; 2(oder 4)-[10-(Dimethylamino)-3-oxo-3H-benzo[c]xanthene-7-yl]-benzencarbonsäure

TRITC; Tetramethylrhodamin-5-(und- 6)-isothiocyanat

Puffer

McIlvaine-Puffer: nach Staffoerd et al. Biochim. Biophys. Acta, 18, 319 (1955)

PBS; Phosphatpuffer (engl.: *phosphate buffer saline*), NaCl 0,8%, KCl 0,02%, Na₂HPO₄ x 2H₂O 0,13%, KH₂PO₄ 0,02% (w/v)

ECGM; (*endothelial cell growth medium*) Zellkulturmedium (Promocell, Heidelberg)

Ringer-Lösung: NaCl 0,86%, KCl 0,03%, CaCl₂ x 2H₂O 0,033% (w/v)

Carbonatpuffer: 0,1M NaHCO₃ pH 8,3

Proteine,Peptide

BSA; Rinderserumalbumin (engl.: *bovine serum albumin*) (Sigma, Deisenhofen)

Fibronectin; (Sigma, Deisenhofen)

Kollagen TypI; (Sigma, Deisenhofen)

RGD (Arg-Gly-Asp); (Sigma, Deisenhofen)

Geräte

ESCA; Multitechnique 5600 ci (Physical Electronics,)

CLSM; Aristoplan (Leica, Bensheim)

Rasterelektronenmikroskop; Leo 435VP (Leica, Bensheim)

Fluoreszenzmikroskop; Leica DMRBE (Leica, Bensheim)

FT-IR-Spektrometer; Bio-Rad Digilab FTS-175 gekoppelt mit IR-Mikroskop Bio-Rad
Digilab UMA 250 (Bio-Rad, München)

Bandsäge; Exact 435 VP (Exakt, Norderstedt)

Polier-/ Schleifmaschine; Struers Labopol-5 (Struers, Willich)

Fluoreszenzspektrometer; Hitachi Spektralfluorometer F-2000 (Colora, Lorch)

Sonstiges

Einbettmittel; Entellan (Merck, Darmstadt)

Proteinase K; (Sigma, Deisenhofen)

6. Literatur

(Adamson 1993)

The analysis of multiple phosphoseryl-containing casein peptides using capillary zone electrophoresis.

Adamson-N; Riley-PF; Reynolds-EC

J-Chromatogr. 1993 Sep 3; 646(2): 391-6

(Aizenberg 1996)

Intracrystalline macromolecules are involved in the morphogenesis of calcitic sponge spicules

Aizenberg-J; Ilan-N; Weiner-S; Addadi-L

Connective Tissue Research. 1996; 35 (1-4) : 17-23

(Allemand 1998)

Organic matrix synthesis in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: Role in biomineralization and potential target of the organotin tributyltin

Allemand-D; Tambutte-E; Girard-JP; Jaubert-J

J. Exp. Biol. JUL 1998; 201 (13) : 2001-2009

(Anderson 1992)

Changing paradigms in caries management. Caries diagnosis and risk assessment. A review of preventive strategies and management.

Anderson-MH

Curr-Opin-Dent. 1992 Mar; 2: 157-62

J-Am-Dent-Assoc. 1995 Jun; 126 Suppl: 1S-24S

(Aubin 1995)

Osteoblast and chondroblast differentiation.

Aubin-JE; Liu-F; Malaval-L; Gupta-AK

Bone. 1995 Aug; 17(2 Suppl): 77S-83S

(Bain 1990)

Cement line staining in undecalcified thin sections of cortical bone.

Bain-SD; Impeduglia-TM; Rubin-CT

Stain-Technol. 1990; 65(4): 159-63

(Bechoua 1999)

Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes.

Bechoua-S; Dubois-M; Dominguez-Z; Goncalves-A; Nemoz-G; Lagarde-M; Prigent-AF

Biochem-Pharmacol. 1999 May 1; 57(9): 1021-30

(Belichenko 1995)

Confocal laser scanning microscopy and 3-D reconstructions of neuronal structures in human brain cortex.

Belichenko-PV; Dahlstrom-A

Neuroimage. 1995 Sep; 2(3): 201-7

(Berland 1995)

Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment.

Berland-KM; So-PT; Gratton-E

Biophys-J. 1995 Feb; 68(2): 694-701

(Bess 1999)

Protein adsorption and osteoblast responses to heat-treated titanium surfaces.

Bess-E; Cavin-R; Ma-K; Ong-JL

Implant-Dent. 1999; 8(2): 126-32

(Boskey 1998)

Biom mineralization: conflicts, challenges, and opportunities.

Boskey-AL

J-Cell-Biochem-Suppl. 1998; 30-31: 83-91

(Boyarsky 1996)

Inadequacy of high K⁺/nigericin for calibrating BCECF. I. Estimating steady-state intracellular pH.

Boyarsky-G; Hanssen-C; Clyne-LA

Am-J-Physiol. 1996 Oct; 271(4 Pt 1): C1131-45

(Bradway 1992)

Formation of salivary-mucosal pellicle: the role of transglutaminase.

Bradway-SD; Bergey-EJ; Scannapieco-FA; Ramasubbu-N; Zawacki-S; Levine-MJ

Biochem-J. 1992 Jun 1; 284 (Pt 2): 557-64

(Braun 1995)

A structural assignment for a stable acetaldehyde-lysine adduct.

Braun-KP; Cody-RB Jr; Jones-DR; Peterson-CM

J-Biol-Chem. 1995 May 12; 270(19): 11263-6

(Buser 1995)

Osseointegration of titanium implants in bone regenerated in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible.

Buser-D; Ruskin-J; Higginbottom-F; Hardwick-R; Dahlin-C; Schenk-RK

Int-J-Oral-Maxillofac-Implants. 1995 Nov-Dec; 10(6): 666-81

(Brizzi 1999)

Brizzi-MF; Defilippi-P; Rosso-A; Venturino-M; Garbarino-G; Miyajima-A; Silengo-L;

Tarone-G; Pegoraro-L

Mol-Biol-Cell. 1999 Oct; 10(10): 3463-71

(Byers 1995)

Odontoblast processes in dentin revealed by fluorescent Di-I.

Byers-MR; Sugaya-A

J-Histochem-Cytochem. 1995 Feb; 43(2): 159-68

(Chentoufi 1993)

Kinetics of in vitro mineralization by an osteogenic clonal cell line (C1) derived from mouse teratocarcinoma.

Chentoufi-J; Hott-M; Lamblin-D; Buc-Caron-MH; Marie-PJ; Kellermann-O

Differentiation. 1993 Jul; 53(3): 181-9

(Ci 1995)

Fluorescence labelling with europium chelate of beta-diketones and application in time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA).

Ci-YX; Yang-XD; Chang-WB

J-Immunol-Methods. 1995 Feb 27; 179(2): 233-41

(Clarkson 1986)

Effect of proteolytic enzymes on caries lesion formation in vitro.

Clarkson-BH; Hall-DL; Heilman-JR; Wefel-JS

J-Oral-Pathol. 1986 Sep; 15(8): 423-9

(Cox 1998)

Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration.

Cox-EA; Huttenlocher-A

Microsc-Res-Tech. 1998 Dec 1; 43(5): 412-9

(Cummings 1999)

Use of a phosphotyrosine-antibody pair as a general detection method in homogeneous time-resolved fluorescence: application to human immunodeficiency viral protease.

Cummings-RT; McGovern-HM; Zheng-S; Park-YW; Hermes-JD

Anal-Biochem. 1999 Apr 10; 269(1): 79-93

(Daniels 2000)

Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro.

Daniels-AU; Barnes-FH; Charlebois-SJ; Smith-RA

J-Biomed-Mater-Res. 2000 Mar 15; 49(4): 469-78

(Davies 1997)

Scanning electron microscopy of the bone-bioactive implant interface.

Davies-JE; Baldan-N

J-Biomed-Mater-Res. 1997 Sep 15; 36(4): 429-40

(Davies 1998)

Mechanisms of endosseous integration.

Davies-JE

Int-J-Prosthodont. 1998 Sep-Oct; 11(5): 391-401

(Dearborn 1998)

Microinjection of mRNA encoding rat synapsin Ia alters synaptic physiology in identified motoneurons of the crayfish, *Procambarus clarkii*.

Dearborn-RE Jr; Szaro-BG; Lnenicka-GA

J-Neurobiol. 1998 Nov 5; 37(2): 224-36

(Deng 1995)

Lysosomal degradation and sorting of apolipoprotein E in macrophages.

Deng-J; Rudick-V; Dory-L

J-Lipid-Res. 1995 Oct; 36(10): 2129-40

(Douglas 1994)

Bacterial-protein interactions in the oral cavity.

Douglas-CW

Adv-Dent-Res. 1994 Jul; 8(2): 254-62

(D'Souza 1987)

Reconstitution of the lysosomal proton pump.

D'Souza-MP; Ambudkar-SV; August-JT; Maloney-PC

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1987 Oct; 84(20): 6980-4

(D'Souza 1998)

TGF-beta1 is essential for the homeostasis of the dentin-pulp complex.

D'Souza-RN; Cavender-A; Dickinson-D; Roberts-A; Letterio-J

Eur-J-Oral-Sci. 1998 Jan; 106 Suppl 1: 185-91

(Duschner 1997)

Fluoride-induced precipitates on enamel surface and subsurface areas visualised by electron microscopy and confocal laser scanning microscopy.

Duschner-H; Gotz-H; Ogaard-B

Eur-J-Oral-Sci. 1997 Oct; 105(5 Pt 2): 466-72

(Effah 1995)

Crystal structure of the surface oxide layer on titanium and its changes arising from immersion.

Effah-EA; Bianco-PD; Ducheyne-P

J-Biomed-Mater-Res. 1995 Jan; 29(1): 73-80

(Eliades 1997)

Passive film growth on titanium alloys: physicochemical and biologic considerations.

Eliades-T

Int-J-Oral-Maxillofac-Implants. 1997 Sep-Oct; 12(5): 621-7

(Engelhardt 1993)

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie.

Engelhardt-J, Werner-K.

Physik in unserer Zeit, **24**, 70-77

(Fahimi 1969)

Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes).

Fahimi-HD

J-Cell-Biol. 1969 Nov; 43(2): 275-88

(Fiechtner 1990)

US-Patent US 4,970,074

Fiechtner; 1990

(Fincham 1999)

The structural biology of the developing dental enamel matrix.

Fincham-AG; Moradian-Oldak-J; Simmer-JP

J-Struct-Biol. 1999 Jun 30; 126(3): 270-99

(Fristad 1995)

Effect of inferior alveolar nerve axotomy on immune cells and nerve fibres in young rat molars.

Fristad-I; Heyeraas-KJ; Jonsson-R; Kvinnsland-IH

Arch-Oral-Biol. 1995 Nov; 40(11): 1053-62

(George 1998)

The phosphophoryn gene family: identical domain structures at the carboxyl end.

George-A; Srinivasan-R; Thotakura-S; Veis-A

Eur-J-Oral-Sci. 1998 Jan; 106 Suppl 1: 221-6

(Goldbrunner 1997)

Transfection and dye premarking of human and rat glioma cell lines affects adhesion, migration and proliferation.

Goldbrunner-RH; Bouterfa-H; Vince-GH; Bernstein-JJ; Roosen-K; Tonn-JC

Anticancer-Res. 1997 Nov-Dec; 17(6D): 4467-71

(Goracci 1999)

Terminal end of the human odontoblast process: a study using SEM and confocal microscopy.

Goracci-G; Mori-G; Baldi-M

Clin-Oral-Investig. 1999 Sep; 99(3): 126-32

(Graber 1999)

Role of interactions between integrins and extracellular matrix components in healthy epithelial tissue and establishment of a long junctional epithelium during periodontal wound healing: a review.

Graber-HG; Conrads-G; Wilharm-J; Lampert-F
J-Periodontol. 1999 Dec; 70(12): 1511-22

(Grotz 1998)

Histotomography of the odontoblast processes at the dentine-enamel junction of permanent healthy human teeth in the confocal laser scanning microscope.

Grotz-KA; Duschner-H; Reichert-TE; de-Aguiar-EG; Gotz-H; Wagner-W
Clin-Oral-Investig. 1998 Mar; 2(1): 21-5

(Grotz 1999)

Confocal laser scanning microscopy: A nondestructive subsurface histotomography of healthy human bone.

Grotz-KA; Piepkorn-B; Al-Nawas-B; Duschner-H; Bittinger-F; Kann-P; Beyer-J; Wagner-W
Calcif-Tissue-Int. 1999 Jul; 65(1): 8-10

(Hall 1997)

Determination of plaque pH changes within the trough of an in situ appliance used to study mineral changes in early carious lesions.

Hall-AF; Creanor-SL; Strang-R; Foye-R
Caries-Res. 1997; 31(1): 50-4

(Haughland 1996)

Haughland-R.P. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6th Edition. 1996, Molecular Probes

(Haywood 1991)

Nightguard vital bleaching: how safe is it?

Haywood-VB; Heymann-HO
Quintessence-Int. 1991 Jul; 22(7): 515-23

(Hempel 1999)

Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123.

Hempel-SL; Buettner-GR; O'Malley-YQ; Wessels-DA; Flaherty-DM
Free-Radic-Biol-Med. 1999 Jul; 27(1-2): 146-59

(Heywood 1994)

Biom mineralization: new directions in crystal science.

Heywood-BR

Microsc-Res-Tech. 1994 Apr 1; 27(5): 376-88

(Hughes 1995)

Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus.

Hughes-SS; Hicks-DG; O'Keefe-RJ; Hurwitz-SR; Crabb-ID; Krasinskas-AM; Loveys-L;

Puzas-JE; Rosier-RN

J-Bone-Miner-Res. 1995 Apr; 10(4): 533-44

(Kardos 1998)

Odontoblast differentiation: a response to environmental calcium?

Kardos-TB; Hunter-AR; Hanlin-SM; Kirk-EE

Endod-Dent-Traumatol. 1998 Jun; 14(3): 105-11

(Kitazawa 1999)

In situ hybridization with polymerase chain reaction-derived single-stranded DNA probe and S1 nuclease.

Kitazawa-S; Kitazawa-R; Maeda-S

Histochem-Cell-Biol. 1999 Jan; 111(1): 7-12

(Kleter 1997)

The Maillard reaction in demineralized dentin in vitro.

Kleter-GA; Damen-JJ; Buijs-MJ; Ten-Cate-JM

Eur-J-Oral-Sci. 1997 Jun; 105(3): 278-84

(Kleter 1998)

Modification of amino acid residues in carious dentin matrix.

Kleter-GA; Damen-JJ; Buijs-MJ; Ten-Cate-JM

J-Dent-Res. 1998 Mar; 77(3): 488-95

(Koeck 1996)

Implantologie; B.Koeck, W.Wagner; 1996 Urban & Schwarzenberg ISBN 3-541-15351-2

(Kroger 1996)

Frustulins: domain conservation in a protein family associated with diatom cell walls.

Kroger-N; Bergsdorf-C; Sumper-M

Eur-J-Biochem. 1996 Jul 15; 239(2): 259-64

(Kühnel 1989)

HMDS-Trocknung- Eine zeitsparende Alternative zur Critical-Point-Methode.

Kühnel-T, Köveker-G, Müller-G.H. Handchir. Mikochir. Plast. Chir. 1989; 21: 164-166

(McAlarney 1996)

Effects of titanium dioxide passive film crystal structure, thickness, and crystallinity on C3 adsorption.

McAlarney-ME; Oshiro-MA; McAlarney-CV

Int-J-Oral-Maxillofac-Implants. 1996 Jan-Feb; 11(1): 73-80

(Moulder 1992)

Moulder-J.F. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy

Perkin-Elmer-Corporation 1992

(Mukherjee 1999)

Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails.

Mukherjee-S; Soe-TT; Maxfield-FR

J-Cell-Biol. 1999 Mar 22; 144(6): 1271-84

(Naftel 1994)

Quantitative study of the apical nerve fibers of adult and juvenile rat molars.

Naftel-JP; Bernanke-JM; Qian-XB

Anat-Rec. 1994 Apr; 238(4): 507-16

(Nanci 1999)

Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density.

Nanci-A

J-Struct-Biol. 1999 Jun 30; 126(3): 256-69

(Neff 1999)

Surface modification for controlled studies of cell-ligand interactions.

Neff-JA; Tresco-PA; Caldwell-KD

Biomaterials. 1999 Dec; 20(23-24): 2377-93

(Oh 1996)

Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes.

Oh-YK; Swanson-JA

J-Cell-Biol. 1996 Feb; 132(4): 585-93

(Paddock 1999)

Confocal laser scanning microscopy.

Paddock-SW

Biotechniques. 1999 Nov; 27(5): 992-6, 998-1002, 1004

(Piepkorn 1997)

[Confocal laser scanning microscopy (CLSM) of cortical bone--comparative imaging with conventional microscopy] Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) kortikalen Knochens--Vergleichende Darstellung mit konventioneller Mikroskopie.

Piepkorn-B; Grotz-KA; Bittinger-F; Duschner-H; Kann-P; Wagner-W; Beyer-J

Biomed-Tech-Berl. 1997; 42 Suppl: 171-4

(Reid 1998)

Carbonate recrystallization in shallow marine environments: A widespread diagenetic process forming micritized grains

Reid-RP; MacIntyre-IG

Journal of Sedimentary Research Sep 1998; 68 (5) Part A : 928-946

(Reynolds 1994)

A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoserine-containing peptides and methods for their identification.

Reynolds-EC; Riley-PF; Adamson-NJ

Anal-Biochem. 1994 Mar; 217(2): 277-84

(Richo 1994)

Structural requirements of procathepsin D activation and maturation.

Richo-GR; Conner-GE

J-Biol-Chem. 1994 May 20; 269(20): 14806-12

(Romeis 1988)

Romeis-B. Mikroskopische Technik. 15. Auflage. Urban & Schwarzenberg. München, Wien, Baltimore

(Rose 1997)

Investigation of calcium-binding sites on the surfaces of selected gram-positive oral organisms.

Rose-RK; Matthews-SP; Hall-RC

Arch-Oral-Biol. 1997 Sep; 42(9): 595-9

(Rosin 1999)

Activities of lysozyme and salivary peroxidase in unstimulated whole saliva in relation to plaque and gingivitis scores in healthy young males.

Rosin-M; Hanschke-M; Splieth-C; Kramer-A

Clin-Oral-Investig. 1999 Sep; 99(3): 133-7

(Rotstein 1991)

In vitro efficacy of sodium perborate preparations used for intracoronary bleaching of discolored non-vital teeth.

Rotstein-I; Zalkind-M; Mor-C; Tarabeah-A; Friedman-S
Endod-Dent-Traumatol. 1991 Aug; 7(4): 177-80

(Ruse 1990)

Preliminary surface analysis of etched, bleached, and normal bovine enamel.

Ruse-ND; Smith-DC; Torneck-CD; Titley-KC
J-Dent-Res. 1990 Sep; 69(9): 1610-3

(Sabokbar 1998)

Osteoclastic differentiation by mononuclear phagocytes containing biomaterial particles.

Sabokbar-A; Pandey-R; Quinn-JM; Athanasou-NA
Arch-Orthop-Trauma-Surg. 1998; 117(3): 136-40

(Schuhmacher 1990)

Schuhmacher-G.H., Schmidt-H. Anatomie und Biochemie der Zähne. 4.Auflage. Gustav-Fischer-Verlag. Jena. S. 87

(Schuler 1998)

Dynamics of iron uptake and Fe₃O₄ biomineralization during aerobic and microaerobic growth of *Magnetospirillum gryphiswaldense*.

Schuler-D; Baeuerlein-E
J-Bacteriol. 1998 Jan; 180(1): 159-62

(Schuler 1999)

Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications.

Schuler-D; Frankel-RB
Appl-Microbiol-Biotechnol. 1999 Oct; 52(4): 464-73

(Sibley 1985)

Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*.

Sibley-LD; Weidner-E; Krahenbuhl-JL

Nature. 1985 May 30-Jun 5; 315(6018): 416-9

(Simmer 1995)

Molecular mechanisms of dental enamel formation.

Simmer-JP; Fincham-AG

Crit-Rev-Oral-Biol-Med. 1995; 6(2): 84-108

(Sinha 1996)

Regulation of human osteoblast integrin expression by orthopedic implant materials.

Sinha-RK; Tuan-RS

Bone. 1996 May; 18(5): 451-7

(Steinberg 1994)

Measurement of phagosome-lysosome fusion and phagosomal pH.

Steinberg-TH; Swanson-JA

Methods-Enzymol. 1994; 236: 147-60

(Sukenik 1990)

Modulation of cell adhesion by modification of titanium surfaces with covalently attached self-assembled monolayers.

Sukenik-CN; Balachander-N; Culp-LA; Lewandowska-K; Merritt-K

J-Biomed-Mater-Res. 1990 Oct; 24(10): 1307-23

(Tabellenbuch Metall 1987)

Tabellenbuch Metall; Europa-Lehrmittel, Nourney, Vollmer GmbH & Co., Wuppertal

(Udenfriend 1972)

Fluorescamine: A reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in the picomole range

Udenfriend, et al.

Science 178, 871 (1972)

(Vrieling 1999)

Silicon deposition in diatoms: Control by the pH inside the silicon deposition vesicle

Vrieling-EG; Gieskes-WWC; Beelen-TPM

Vrieling, EG: e.g.vrieling@biol.rug.nl

JOURNAL-OF-PHYCOLOGY. JUN 1999; 35 (3) : 548-559

(Weiss 2000)

Purification and characterization of perlucin and perlustrin, two new proteins from the shell of the mollusc *Haliotis laevigata*.

Weiss-IM; Kaufmann-S; Mann-K; Fritz-M

Biochem-Biophys-Res-Commun. 2000 Jan 7; 267(1): 17-21

(Wiesmann 1998)

Sutural mineralization of rat calvaria characterized by atomic-force microscopy and transmission electron microscopy.

Wiesmann-HP; Chi-L; Stratmann-U; Plate-U; Fuchs-H; Joos-U; Hohling-HJ

Cell-Tissue-Res. 1998 Oct; 294(1): 93-7

(You 1996)

AFM studies of protein adsorption .2. Characterization of immunoglobulin G adsorption by detergent washing

You-HX; Lowe-CR

Journal of Colloid and Interfacial Science. Sep 25 1996; 182 (2) : 586-601