Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der

Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein)



Untersuchung stimulierter humaner Osteoblasten mit akustischer Rastermikroskopie

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Friedemann Klemenz

geboren am 26. Juni 1980 in Halle/Saale

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. W. Hein,

Prof. Dr. rer. nat. habil. A. Tárnok

Datum der Verteidigung: 08.01.2009

urn:nbn:de:gbv:3-000014915

REFERAT UND BIBLIOGRAFISCHE BESCHREIBUNG

Die hochauflösende Ultraschallmikroskopie gewinnt in der medizinischen Forschung zunehmend an Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Ascorbinsäure (50 μg/ml) und Vitamin D₃ (10 nmol/l) sowie der Kombination beider Substanzen stimulierte humane Osteoblasten mit dem akustischen Rastermikroskop KSI SAM 2000 bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz untersucht. Mit Hilfe des Cell-Analysis-Verfahrens wurde ein quantitatives Auswertungsverfahren zur Bestimmung der morphologischen und akustischen Parameter Zelldicke, Schallgeschwindigkeit und des Schallschwächungskoeffizienten in der nukleären, perinukleären und peripheren Zone erstmals an humanen Osteoblasten angewandt. Es wurde festgestellt, dass das Cell-Analysis-Verfahren eine sichere Zelldickenbestimmung nur für d > 1 µm gestattet. Eine signifikante Abhängigkeit der Zellparameter von der Kulturdauer konnte nicht festgestellt werden. Die deutlichsten Veränderungen der Zellparameter traten in der perinukleären Zone auf. Dabei verminderte sich bei Stimulation mit Vitamin D₃ die mittlere Zelldicke um 37 % und die mittlere Schallgeschwindigkeit erhöhte sich um 8 %. Der mittlere Schallschwächungskoeffizient der Kombinationsstimulation um 88 % zu. Mit der konfokalen Laserscanningmikroskopie wurde gezeigt, dass der Kalziumgehalt in der perinukleären Zone humaner Osteoblasten am größten ist. Es kann vermutet werden, dass die Veränderungen der Zellparameter sowohl durch strukturelle Änderungen wie eine Veränderung des Zytoskeletts als auch des Kalziumgehalts vor allem im Endoplasmatischen Retikulum verursacht werden. Weiterhin wurde mit allen verwendeten mikroskopischen Verfahren (Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, akustische Rastermikroskopie) in perinukleären Zone das Auftreten von Granulationen beobachtet. Eine Ursache dieser Granulationen und ein möglicher Einfluss auf die akustischen Zellparameter ließen sich nicht eindeutig feststellen.

Insgesamt steht mit der akustischen Rastermikroskopie in Kombination mit dem Cell-Analysis-Verfahren ein leistungsfähiges Instrument zur quantitativen Bestimmung morphologischer und akustischer Parameter von Zellen *in vitro* zur Verfügung.

Klemenz, Friedemann: Untersuchung stimulierter humaner Osteoblasten mit akustischer Rastermikroskopie

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 75 Seiten, 2008

INHALTSVERZEICHNIS

In	haltsverzeichnis	I
ΑŁ	bbildungen	III
Ta	abellen	V
Sy	vmbole	VI
ΑŁ	okürzungen	_ VIII
1	Einleitung	
	1.1 Die akustische Rastermikroskopie	
	1.2 Ziele der Arbeit	
	1.3 Der Osteoblast	2
	1.3.1 Der Kalziumstoffwechsel	
	1.3.2 Kalzifizierungstheorien	5
	1.4 Ausgewählte Untersuchungsverfahren von Zellen und deren Eigenschaften	5
	1.4.1 Ultraschallverfahren	5
	1.4.2 Fluoreszenzverfahren	
	1.4.3 Elektronenmikroskopische Verfahren	8
	1.5 Quantitative Kalziumbestimmung in Zellen	10
	1.6 Zelleffekte der Stimulanzien	10
	1.7 Ultraschallwirkungen auf Zellkulturen	12
	1.8 Mathematische und physikalische Grundlagen	12
2	Material und Methoden	15
	2.1 Aufbau und Funktionsweise des akustischen Rastermikroskops	15
	2.2 Aufbau und Funktionsweise des konfokalen Laserscanningmikroskops	18
	2.3 Lichtmikroskopie	19
	2.4 Zellkultur	20
	2.4.1 Anlegen einer Osteoblasten-Primärkultur aus humanem Knochenmaterial_	
	2.4.2 Separation der Osteoblasten	21
	2.4.3 Zellkultur für die akustische Mikroskopie	22
	2.4.4 Zellkultur für die konfokale Laserscanningmikroskopie	23
	2.5 Akustische Mikroskopie	23

2.5.1 Das Multi-Layer-Analysis-Verfahren	23
2.5.2 Das Cell-Analysis-Verfahren	26
2.5.3 Bestimmung der Zellparameter	31
2.5.4 Messwerte, gespeicherte Parameter	37
2.5.5 Geräteeinstellungen	37
2.6 Konfokale Laserscanningmikroskopie	37
2.6.1 Kalziumdarstellung	38
3 Ergebnisse	41
3.1.1 Vorversuche, Wahl des Substrats	41
3.2 Morphologie der Zellen	42
3.3 Akustische Rastermikroskopie	46
3.3.1 Zelldicke	46
3.3.2 Schallgeschwindigkeit	49
3.3.3 Schallschwächung	51
3.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie	53
4 Diskussion	56
5 Zusammenfassung und Ausblick	61
Literaturverzeichnis	64
Thesen	74
Curriculum vitae	i
Erklärung	iii
Veröffentlichungen	iv
Danksagung	V

ABBILDUNGEN

Abbildung 1-1 Amplitudenbild 0,98 GHz XTH-2 Zellen [59].	6
Abbildung 2-1 <i>SAM 2000 [83]</i>	15
Abbildung 2-2 <i>Leica DM IRE2 [4]</i>	18
Abbildung 2-3 Prinzip des konfokalen Laserscanningmikroskops [3]	18
Abbildung 2-4 <i>Olympus CK 40 [78]</i>	19
Abbildung 2-5 <i>Multi-Layer-Analyse nach</i> [84]	24
Abbildung 2-6 Der charakteristischer V(z)-Verlauf	25
Abbildung 2-7 Der elastische ,Material-Fingerabdruck' [86]	26
Abbildung 2-8 Strahlengang 1 <i>: Fokus auf Zelloberfläche</i>	27
Abbildung 2-9 Strahlengang 2: Konfokales Maximum	27
Abbildung 2-10 Strahlengang 3: Virtueller Fokus im Substrat, Anregung von	
Oberflächenwellen	28
Abbildung 2-11 <i>V(z)-Verlauf, Auswahl der ROI im Maximalwertbild</i>	29
Abbildung 2-12 Auswahl der Datensätze, Kategorie ,nicht verwendbar'	31
Abbildung 2-13 Zellhöhenbestimmung	33
Abbildung 2-14 Zellhöhenbestimmung am Zellkern [86]	33
Abbildung 2-15 Fokusshift [86]	35
Abbildung 2-16 Zellhöhenbestimmung für d < 1 μm in der Zellperipherie	36
Abbildung 3-1 Konfokales Maximum, Maximalwertbild	43
Abbildung 3-2 Interferenzmaximum vom Substrat- und Oberflächenwellen-Echo	44
Abbildung 3-3 Lichtmikroskopie, Granulationen und vesikuläre Strukturen	44
Abbildung 3-4 <i>Schallschwächungsbilder</i> [86]	45
Abbildung 3-5 Zelldicke in Abhängigkeit der Kulturdauer der perinukleären Zone,	
Ascorbinsäurestimulation	46
Abbildung 3-6 Zelldicke der verschiedenen Stimulationsgruppen in der nukleären Zone	48
Abbildung 3-7 Zelldicke der verschiedenen Stimulationsgruppen der perinukleären Zone.	48
Abbildung 3-8 Schallgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Kulturdauer der perinukleären	
Zone, Ascorbinsäurestimulation	49
Abbildung 3-9 Schallgeschwindigkeit vs. Stimulation in der nukleären Zone	50
Abbildung 3-10 Schallgeschwindigkeit vs. Stimulation in der perinukleären Zone	50
Abbildung 3-11 Schallschwächungskoeffizient in Abhängigkeit der Kulturdauer der	
perinukleären Zone, Ascorbinsäurestimulation	51
Abbildung 3-12 Schwächungskoeffizient vs. Stimulation in der nukleären Zone	52

Abbildung 3-13 Schwächungskoeffizient vs. Stimulation in der perinukleären Zone	52
Abbildung 3-14 Konfokale Laserscanningmikroskopie a: grüner und b: roter Kanal	54
Abbildung 3-15 Konfokale Laserscanningmikroskopie a: Additionsbild, b: Verhältnisbild	55

TABELLEN

Tabelle 1 Zelldicke	47
Tabelle 2 Schallgeschwindigkeit	49
Tabelle 3 Schallschwächungskoeffizient	51

Symbole

SYMBOLE

α Schallschwächung [dB]

 α_{coeff} Schallschwächungskoeffizient [dBµm⁻¹]

 $[Ca^{2+}]_i$ Intrazelluläre Kalziumionenkonzentration [mol I^{-1}]

c Schallgeschwindigkeit [ms⁻¹]

f Frequenz [MHz]

θ Einfallswinkel des Wellenbündels zur Probenoberflächennormalen [°]

 $\theta_{\rm m}$ halber Öffnungswinkel des Wandlers [°]

 θ_{SAW} kritischer Winkel zur Erzeugung von Oberflächenwellen [°]

Intensität des ersten Oberflächenmaximums des Zell-Signals [dB]

Intensität des ersten Oberflächenmaximums des Referenz-Signals [dB]

k Wellenvektor im Kopplungsmedium

K Kompressionsmodul [Pa]

KD Dissoziationskonstante des Farbstoffgemisches [mol I⁻¹]

N Anzahl der untersuchten Datensätze

λ Wellenlänge [m]

ρ Dichte [kgm⁻³]

 $P(\theta)$ Pupillenfunktion der Linse

R Reflexionsfaktor

,

Rt Ratio, engl. Verhältnis

Rt_{max} Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei maximaler

Kalziumkonzentration

Reflektanzfunktion

Rt_{min} Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei minimaler

Kalziumkonzentration

s Weg [m]

 $R(\theta)$

σ Standardabweichung

 Δt Signallaufzeit [s]

 $\Delta V(z)$ Differenz der quadrierten V(z)-Signale [V²] Δz räumliche Oszillation der Interferenzmaxima

 \overline{x} Mittelwert

*v*₀ Schallgeschwindigkeit im Kopplungsmedium [m/s]

Symbole

 V_{SAW} Oberflächenwellengeschwindigkeit [m/s]

z Wandler – Probenabstand [μm]

Z Akustische Impedanz [rayl] = $[kgm^{-2}s^{-1}]$

z_{max} maximale Defokussierung [μm]

*z*₀ Fokusshift [μm]

Abkürzungen

ABKÜRZUNGEN

3T3 Zellen Fibroblastenzelllinie

Al₂O₃ chemisches Zeichen für Aluminiumoxid

BMP Bone morphogenetic protein

C-Bild Scan in einer Ebene parallel zur Probenoberfläche

CLSM Konfokale Laserscanningmikroskopie

CIRAMC Centre for Imaging Research and Advanced Materials

Characterization, Windsor, Canada

CW Continuous Wave

CYP-450 Cytochrom P 450 Enzymsystem

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMEM/F12 Standardzellkulturmedium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonucleic Acid

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
EMS Elektronenstrahl-Mikrosonde

ER Endoplasmatisches Retikulum

ESEM Environmental Scanning Electron Microscope

et al. et alii

F525 Fluoreszenz bei der Wellenlänge von 525 nm F660 Fluoreszenz bei der Wellenlänge von 660 nm

FGF Fibroblast growth factor

GH Growth hormone (Wachstumshormon)

HBS HEPES- and EDTA-buffered salt solution

HEPES 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure

HF Hochfrequenz

IGF Insulin-like growth factor

II Interleukin

MLA Multi-Layer-Analyseverfahren

Max. Maximum

Abkürzungen

Min. Minimum

NewMLA Software zur Auswertung der SAM Daten
OCPC Ortho-cresolphthalein-complex method

OP Operation

PDGF Platelet-derived growth factor

PICP Procollagen Typ I carboxy-terminal Peptid

PKC Proteinkinase C
ROI Region of interest

Q-Bam Labor für quantitative B-Bild Sonografie und Akustische

Mikroskopie an der Martin-Luther-Universität Halle-

Wittenberg

SAM Scanning Acoustic Microscope

SAW Surface Acoustic Wave

SEM Scanning Electron Microscope

SiO₂ chemisches Zeichen für Siliziumdioxid

SOS Speed of Sound ST2 Stromazelllinie

TEP Total Endo Prothese

TGF-beta Transforming growth factor beta

Tif-format Tagged Image File Format
TNF-alpha Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha

VDR Vitamin D Rezeptor

VEGF Vascular endothelial growth factor

vs. versus

XTH-2 Xenopus Herzmuskelzelllinie

1 EINLEITUNG

1.1 Die akustische Rastermikroskopie

Die Verwendung von hochauflösendem Ultraschall in der medizinischen Forschung stellt eines der jüngeren Kapitel der mikroskopischen Verfahren dar. Erste experimentelle Versuche mit Hochfrequenzultraschall unternahm Sokolov [94] schon in den vierziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts in Leningrad. Das erste akustische Rastermikroskop (Scanning Acoustic Microscope, SAM) wurde 1974 von LEMONS und QUATE [63] an der Stanford University (United States of America) gebaut. Haupteinsatzgebiet der akustischen Rastermikroskopie war die Untersuchung Mikrostrukturen lichtundurchlässiger Stoffe von und elastomechanischen Eigenschaften, SO dass ihre Anwendung anfänglich hauptsächlich in der Werkstoffprüfung und Materialwissenschaft erfolgte. Das Verfahren wird bis in die Gegenwart weiterentwickelt und entsprechende Geräte von einigen Firmen kommerziell vertrieben. Eines dieser Systeme ist das in den vorliegenden Untersuchungen verwendete Mikroskop KSI SAM 2000 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland).

Die akustische Rastermikroskopie findet auch in der medizinischen Forschung, beispielsweise an Grenzflächenuntersuchungen künstlicher Implantate wie Gelenke oder Zähne [25] sowie Untersuchung von Knochen [61,83], zur Bestimmung der elastischen Materialeigenschaften Anwendung. Weiterhin kann sie Hinweise zur Biokompatibilität verschiedener Werkstoffe und Oberflächenformen liefern [99]. Ergebnisse aus diesen Studien fließen in das Design und die Materialauswahl für Endoprothesen maßgeblich mit ein.

Die Darstellung elastischer Eigenschaften von biologischem Gewebe durch die akustische Mikroskopie stellt insbesondere wegen ihres zerstörungsfreien Charakters für unterschiedliche Fachdisziplinen weitere interessante Anwendungsmöglichkeiten dar. Erste Untersuchungen von biologischen Zellen mittels akustischer Mikroskopie wurden schon 1975 beschrieben und insbesondere von Bereiter-Hahn [49,59,96] weiterentwickelt.

Da für die Untersuchung von Zellen oder Geweben mit der akustischen Rastermikroskopie keine Färbungen oder Fixierungen notwendig sind, können auch Verlaufsuntersuchungen an lebenden Zellen über einen längeren Beobachtungszeitraum durchgeführt werden. Dazu gehören die Untersuchung der

Motilität von Zellen [96], der zeitlichen Veränderungen des Zytoskeletts sowie auch der zellulären Reaktionen auf Vitamin-Stimulation, die in der vorliegenden Arbeit betrachtet werden sollen.

1.2 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erprobung eines quantitativen Verfahrens der akustischen Rastermikroskopie zur Bestimmung von morphologischen und akustischen Zellparametern wie Zelldicke, Schallgeschwindigkeit und des Schallschwächungskoeffizienten an stimulierten humanen Osteoblasten *in vitro*.

Fünf Schwerpunkte lassen sich zusammenfassen:

- Auswahl geeigneter Versuchs- und Kulturbedingungen zur Untersuchung von humanen Osteoblasten in Langzeitversuchen mit der akustischen Rastermikroskopie.
- 2. Auswahl geeigneter Stimulanzien zur Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration beziehungsweise einer extrazellulären Kalziumabscheidung.
- 3. Auswahl charakteristischer Zellorte zur Bestimmung von morphologischen und akustischen Parametern mit dem Cell-Analysis-Auswertungsverfahren.
- 4. Bestimmung der morphologischen und akustischen Parameter sowie Darstellung deren zeitlicher Veränderungen in stimulierten humanen Osteoblasten mit akustischer Rastermikroskopie.
- 5. Darstellung der Kalziumverteilung in stimulierten humanen Osteoblasten mit konfokaler Laserscanningmikroskopie.

1.3 Der Osteoblast

Osteoblasten (*griechisch:* ostéon = Knochen, blasteīn = bilden, hervorbringen) sind *in vivo* mit einer Länge von zirka 25 µm relativ große, einkernige Zellen [31]. Die Zellgröße variiert jedoch in unterschiedlichen Zellkulturen und unter verschiedenen Kulturbedingungen sehr stark. In der vorliegenden Untersuchung konnten Zelllängen von teilweise über 80 µm ermittelt werden. Das Zytoplasma der humanen Osteoblasten ist stark basophil. Im Verlauf der Synthesephasen wechselt ihre Form *in vivo* von einer bei Inaktivität flachen zu einer in der aktiven Phase iso- bis hochprismatischen Gestalt [57]. Osteoblasten sind durch eine hohe Aktivität der

alkalischen Phosphatase charakterisiert. Elektronenmikroskopisch fallen ihr stark ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum (ER), der Golgi-Apparat und freie Durch letztere erklärt sich die Basophilie der Zellen. Mit Ribosomen auf. Adhärenskontakte, bestehend aus Cadherin 11, N-Cadherin, Connexin 43 und Maculae occludentes, stehen die Zellen untereinander in Kontakt [9]. Diesen Kontakt ermöglichen feine zytoplasmatische Fortsätze (siehe Abbildung Die Vorläuferzellen der Osteoblasten sind die Osteoprogenitorzellen des mesenchymalen Stromazellsystems des Knochenmarks. Sie werden als fibroblastenähnliche Zellen bezeichnet.

Osteoblasten spielen eine bedeutende Syntheserolle. Sie synthetisieren unter anderem die organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz, Kollagen Typ I, Osteokalzin Proteoglykane, kollagene Proteine, wie und Osteonektin, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine und Kollagenasen. Ihre Lebenszeit beträgt zwischen einer und zehn Wochen [31]. Danach gehen sie durch Apoptose zugrunde oder leben als "bone lining cells", den so genannten "ruhenden Osteoblasten" weiter. Auch die Wandlung zu Vorläuferzellen der Osteoblastenreihe wird diskutiert [57]. Die Mehrheit der Osteoblasten mauern sich in vivo durch die weitere Produktion von Osteoid, der Knochengrundsubstanz, ein und werden dann Osteozyten genannt. Osteozyten werden definiert als vollständig vom Osteoid umgebene Osteoblasten. Sie längliche, sind mandelförmige und zytoplasmaärmere chromatinreichem Zellkern [57]. Im Gegensatz zu Osteoblasten besitzen sie eine verminderte Stoffwechselaktivität und Syntheseleistung, was sich in ihrem geringeren Gehalt an Zellorganellen wie das Ergastoplasma, der raue, mit Ribosomen besetzte Teil des Endoplasmatischen Retikulums, oder den Mitochondrien widerspiegelt [16]. Das Osteoid besteht zu etwa 50 % aus Mineralien, 25 % aus organischen Verbindungen und zu etwa 25 % aus Hydratationswasser. Die Mineralien enthalten zu zirka 50 % anorganisches Phosphat und 35 % Kalzium. Die übrigen Anteile verteilen sich auf Zitrat, Karbonat (6 - 7 %), Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor sowie Spurenelemente. Die Mineralien liegen als Apatitkristalle, den aufgebauten Kalziumphosphatverbindungen, vor. Den größten Anteil daran hat der Hydroxylapatit [57].

Osteoblasten besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, beispielsweise für Vitamin D₃, Parathormon, Glukokortikoide, Sexualhormone, Wachstumshormon,

Schilddrüsenhormone, für Zytokine wie Interleukine II-1, II-6, TNF-alpha, IGF, TGF-beta, BMP, FGF, PDGF und VEGF [81] sowie Prostaglandine.

1.3.1 Der Kalziumstoffwechsel

Die Aktivität von Osteoblasten kann durch verschiedene Hormone wie Parathormon, Wachstumshormon (GH), Östrogene, Androgene, Cortisol, Ascorbinsäure und 1α, 25-Dihydroxycholecalciferol beeinflusst werden [9]. Auch Fluoride können als osteoanabole Substanzen die Osteoblastenaktivität verändern Wachstumshormon fördert die Proliferation von osteogenen Zellen und die Mineralisation des Knochens [9,91], Östrogene und Androgene begünstigen ebenso eine Mineralisation [72,76]. Cortisol hat eine antiosteogene Wirkung, es wird aber zudem für die Triggerung der Osteoblastendifferenzierung essentiell verantwortlich gemacht [28]. Das Parathormon ist ein in der Glandula Parathyroidea gebildetes Polypeptid. Gemeinsam mit seinem Antagonisten Calcitonin reguliert es die Kalziumhomöostase. Bei zu niedrigem Kalziumspiegel werden durch das Parathormon die Osteoklasten zum Abbau des Knochens, dem größten Kalziumspeicher des Organismus, angeregt. In Folge kommt es zur Erhöhung des freien Kalziums im Blut. Weiterhin wird direkt in der Niere die tubuläre Resorption von Kalzium aefördert und indirekt über die Stimulation der 1,25-Dihydroxycholecalciferol-Synthese die intestinale Kalziumresorption begünstigt. Synergistisch zum Parathormon wirkt das Vitamin D₃ - Calcitriol. Es wird zu 80-90 % mit Hilfe des Sonnenlichtes in der Haut aus 7-Dehydrocholesterol, dem Provitamin D₃, gebildet. Der übrige Tagesbedarf kann durch die Nahrungsaufnahme gedeckt werden. Nach Transport in die Leber wird das Vitamin D₃ an Mikrosomen durch die 25-Hydroxylase zu 25-Hydroxycholecalciferol hydroxyliert. Anschließend erfolgt eine weitere Hydroxylierung in der 1α-Position in den proximalen Tubulusepithelien der Niere. Die 1α-Hydolase gehört zu den CYP-450 Isoenzymen (27B1) [82]. 1α-Hydroxylierung wurde in geringen Mengen auch in anderen Zellen und Geweben, wie zum Beispiel in Plazenta, Gehirn, Keratozyten [36], Makrophagen [8] und in nicht kleinzelligen Lungenkrebszellen [54] nachgewiesen. Man vermutet dabei unter anderem lokale und autokrine Wirkungen para-[12,48] bei der Gewebedifferenzierung. Die nach der Hydroxylierung entstandene Form ist die biologisch aktive Form des Vitamin D₃, das 1α, 25-Dihydroxycholecalciferol.

1.3.2 Kalzifizierungstheorien

Für den Kalzifizierungsprozess wurden in der Literatur zwei unterschiedliche Mechanismen vorgeschlagen. Bei der epitaktischen Mineralisierung kommt es zum Ausfallen der anorganischen Knochenbestandteile Hydroxylapatit als Hydroxylapatit-ähnlicher $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ oder Verbindungen an Kristallisationskeimen im submikroskopischen Bereich an den Kollagenfibrillen. Als Kristallisationskeime dienen kleine Kalziumphosphatkristalle. Diskutiert werden aber auch Matrixproteine, wie das Bone-Sialoprotein, welches durch seine chemische Struktur mit Hilfe seiner sauren Gruppen Kalziumionen konzentrieren kann und so als Kristallisationskern wirkt. Die Kristalle vergrößern sich (kleinere Kristalle haben eine Größe von zirka 20 x 5 x 1,5 nm [57]) und bilden immer größer werdende plättchenförmige Gebilde, die längs an oder in den Kollagenfibrillen verlaufen [16].

Ein anderer Weg der Kalzifizierung kann über die *Abschnürung von Matrix-Vesikeln* erfolgen [16,57]. Die Matrix-Vesikel enthalten unter anderem Kalzium bindende Proteine wie Calbindin-D_{9K} und Kalzium bindende Phospholipide wie Phosphatidylserin. Im Inneren der Vesikel wurden kristalline Kalzium-Phosphatverbindungen nachgewiesen. Diese vergrößern sich und können, nachdem sie die Vesikel gesprengt haben, wiederum als Kristallisationskeime dienen [9].

1.4 Ausgewählte Untersuchungsverfahren von Zellen und deren Eigenschaften

1.4.1 Ultraschallverfahren

Die Charakterisierung und Darstellung von biologischem Gewebe und Zellen kann durch verschiedene akustische Verfahren erreicht werden. Schon 1985 wurden mittels hochauflösender akustischer Mikroskopie XTH-2 Zellen durch BEREITER-HAHN dargestellt [49].

Durch Verwendung des Phasenkontrastverfahrens bestimmte BEREITER-HAHN mittels akustischer Mikroskopie im Gigahertzbereich zelluläre und akustische Parameter wie Zelldicke, Schallschwächung und Impedanz [65] an XTH-2- oder 3T3-Zellen. Dabei entstehen durch Interferenz der von der Zelloberfläche und der vom Substrat reflektierten Signale charakteristische Interferenzringe (Abbildung 1-1). Diese durch Schallauslöschung und Schallverstärkung aufeinander folgenden hellen und dunklen Ringe erscheinen immer bei einer Zelldickenänderung von einem Viertel

der akustischen Wellenlänge (λ/4). So konnte BEREITER-HAHN aus der Zahl der Interferenzringe unter bestimmten Bedingungen die Zelldicke bestimmen [49]. Voraussetzung für die Anwendung dieses Verfahrens ist die Differenzierbarkeit der einzelnen Interferenzringe. In den überwiegenden Zellbereichen mit langsam ansteigendem Profil sind die Interferenzringe gut differenzierbar. Damit ist eine genaue Höhenabschätzung möglich. An steilen Kanten wie in der Nähe des Zellkerns kann diese Vorrausetzung nicht erfüllt werden. Daher ist die Höhenbestimmung mit dieser Methode in der Nähe des Zellkerns oft nur eigeschränkt nutzbar.

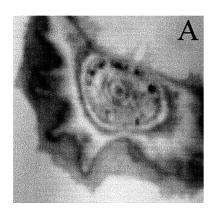


Abbildung 1-1 Amplitudenbild 0,98 GHz XTH-2 Zellen [59].

Die Bestimmung der Zelldicke kann auch mit dem so genannten Puls-Echo-Verfahren unter Verwendung kurzer Ultraschallpulse erreicht werden [98]. Dazu wurden Fibroblasten bei 450 beziehungsweise 500 MHz untersucht. Es erfolgt die zeitliche Auswertung der reflektierten Signale. Dabei wurde der Laufzeitunterschied zwischen Signalen der Zelle und Signalen des Substrats ausgewertet. Erreichbar ist durch eine zeitliche Auflösung von 4 ns eine longitudinale Auflösung von 3 μm.

Ein anderes Verfahren besteht in der Untersuchung der Frequenzabhängigkeit der reflektierten Signale. Dabei verwendeten Kundu et al. [59] phasen- und amplitudensensitive Ultraschallmikroskope. Die Proben wurden in einem Frequenzbereich von 980 - 1100 MHz in 20 MHz Schritten bei konstantem Abstand zwischen Linse und Objekt abgetastet. Für jede Position wurde eine V(f) Kurve (das bedeutet Signalspannung in Abhängigkeit von der Sendefrequenz) erstellt. Der Vorteil des Verfahrens besteht darin, dass die Signalqualität bei der Messung sehr hoch ist, weil die Messungen im Fokus der Linse erfolgen. Basis für die theoretische Beschreibung des Verfahrens ist die akustische Schallausbreitung an mehreren dünnen Schichten als Modell für biologische Zellen.

Die Kombination akustischem aus Mikroskop und konfokalem Laserscanningmikroskop an einem Untersuchungsplatz stellt ein weiteres Verfahren zur Untersuchung der elastomechanischen Eigenschaften dar. Das Verfahren wurde von Weiss et al. vorgestellt [100]. Es wurde entwickelt, um besonders dünne Zellen darzustellen. Bei diesen Zelldicken und (um 1 µm) nur geringen Zellhöhenänderungen ist zum Beispiel das Phasenkontrastverfahren nach BEREITER-HAHN (siehe oben) nicht mehr anwendbar. Das Untersuchungsobjekt kann mit diesem Versuchsaufbau gleichzeitig mit den beiden mikroskopischen Verfahren dargestellt werden. Mit Hilfe der Fluoreszenzuntersuchung kann beispielsweise die Zelldicke durch die Fokusverschiebung bestimmt werden. Bei bekannter Zelldicke wird dann mit dem akustischen Verfahren aus dem Laufzeitunterschied von Signalen des Substrats und Signalen des Substrats mit aufgelagerter Zelle der Kompressions-Modul K abgeleitet.

$$K = \rho \cdot c^2 \label{eq:rho}$$

$$\rho \dots \text{ Dichte,}$$

$$c \dots \text{ Schallgeschwindigkeit.}$$

Das Verfahren ist besonders geeignet, um Anteile des Zytoskeletts und subzelluläre Strukturen beziehungsweise deren Veränderungen darzustellen.

VESELY et al. nutzten ein Bildverarbeitungsverfahren, bei dem zeitliche Veränderungen in akustischen Bildern mit Hilfe den von Bildverarbeitungsalgorithmen ausgewertet wurden um die Zellmotilität untersuchen [96]. Hierzu wurden Bilder von XTH-2 Zellen im Abstand von 5 beziehungsweise 10 Sekunden aufgenommen. Dann wurden die Bilder, also deren Grauwerte, Pixel für Pixel voneinander subtrahiert (Subtraktionsverfahren), wodurch bewegte von unbewegten Strukturen getrennt werden können. Bei einer Arbeitsfrequenz von 1,0 GHz konnte eine maximale Ortsauflösung von 1,3 µm erreicht werden.

1.4.2 Fluoreszenzverfahren

Zelleigenschaften und Zellreaktionen können auch mit der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden. Die physikalische Grundlage dieses Verfahrens ist das Prinzip der Fluoreszenz. Dabei wird ein geeigneter Farbstoff mit Laserlicht bestimmter

stofftypischer Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt. Die Farbstoffe liegen als membrangängige Ester vor und werden passiv über die Zellmembran in die Zelle hinein transportiert. Dort erfolgt die Hydrolyse der Acetoxymethylester durch unspezifische intrazelluläre Esterasen. Die entstehende freie Säure bindet als Chelator sehr selektiv an spezifische lonen, zum Beispiel Kalziumionen und macht sie darstellbar. Durch die Spaltung wird der Farbstoff hydrophil und kann so die lipophile Zellmembran nicht mehr passieren. Es kommt zur Anreicherung des Farbstoffes in der Zelle, gleichzeitig führt die Spaltung zur Aktivierung der Farbstoffe. Fluoreszenzlicht hat prinzipiell eine größere Wellenlänge als das eingestrahlte Licht, dadurch kann eine Trennung des eingestrahlten vom Fluoreszenzlicht erfolgen.

Das Emissionsspektrum des Fluoreszenzlichtes verändert sich jedoch mit der Konzentration des zu untersuchenden Stoffes. Das bedeutet, Emissionsspektren bei unterschiedlichen Konzentrationen eine Kurvenschar bilden. Bei einigen Farbstoffen oder Farbstoffgemischen (beispielweise Fura-Red/Fluo-3, Indo 1) verlaufen alle Kurven durch einen Punkt, den so genannten isosbestischen Punkt. Bei dieser die Fluoreszenzintensität Wellenlänge ist unabhängig von der Konzentration. Bei höheren oder niedrigeren Wellenlängen, also links isosbestischen rechts und des Punktes. verhalten sich die Fluoreszenzintensitäten gegenläufig. Der Quotient zweier Fluoreszenzintensitäten rechts und links des isosbestischen Punktes ist dann unabhängig von der Farbstoffbeladung der Zellen, von Bleicheffekten und anderen Artefakten, da diese sich "heraus kürzen". Bei Farbstoffen oder Farbstoffgemischen, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (Fura-Red, Fluo-3), kann aus dem Verhältnis der für einen Farbstoff charakteristischen Emissionen zueinander ('Ratio-Methode'), mit Hilfe der Formel nach GRYNKIEWICZ et al. [39] (siehe Kapitel 2.6.1) und nach Kalibrierung des Systems, die intrazelluläre Konzentration verschiedener Ionen, wie zum Beispiel Kalzium, errechnet werden. Damit ist eine Darstellung der räumlichen Verteilung der zu untersuchenden Ionen innerhalb der Zelle mit lichtmikroskopischer Auflösung möglich.

1.4.3 Elektronenmikroskopische Verfahren

Das Prinzip der Transmissionselektronenmikroskopie ist ähnlich dem Prinzip der Lichtmikroskopie: Statt der Lichtquelle wird eine Elektronenquelle verwendet. Der Elektronenstrahl wird mit Hilfe von Magnetspulen, entsprechend den Linsen der Lichtmikroskopie, gebündelt. Nach Verstärkung des durch die rückgestreuten Elektronen mit einem Detektor erfassten Signals kann das entstehende Bild auf einem Leuchtschirm dargestellt werden. Die mögliche Auflösung dieses Verfahrens liegt im Bereich von 0,2 - 0,5 nm [2]. Die Probenvorbereitung ist jedoch sehr aufwändig. So müssen die Untersuchungsobjekte fixiert, entwässert und schließlich mit Gold oder Kupfer bedampft werden, damit die Probenoberfläche elektrisch leitfähig ist. Da die Untersuchung im Hochvakuum erfolgt, ist eine Untersuchung an vitalen Objekten daher nicht möglich. Mit Hilfe eines Rasterverfahrens, der Elektronenstrahl-Mikrosonde (EMS), lässt sich durch die quasi punktförmige Untersuchung der von der Probe emittierten charakteristischen Röntgenstrahlung durch eine spektrale Auswertung die räumliche Verteilung verschiedener Elemente innerhalb der Probe nachweisen. Dieses Verfahren wird "Elementmapping" genannt.

Ein anderes elektronenmikroskopisches Verfahren ist die Rasterelektronenmikroskopie (Scanning Electron Micoscopy - SEM). Dabei wird die Probe nicht wie bei der Transmissionselektronenmikroskopie durchstrahlt, sondern die Oberfläche Punkt für Punkt durch einen extrem gebündelten Elektronenstrahl abgetastet. Beim Auftreffen des Elektronenstrahls kommt es zur Anregung der Atome der Probe. Die dabei entstehenden Sekundärelektronen werden mit Hilfe eines Detektors aufgenommen, verstärkt und auf einem Schirm dargestellt. Es entstehen sehr plastisch aussehende Oberflächenbilder des Untersuchungsobjekts. Die Auflösung dieses Verfahrens beträgt etwa 0,6 nm [53].

Eine Weiterentwicklung des Rasterelektronenmikroskops ist das ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope). Dieses Verfahrens setzt nicht mehr Hochvakuum, elektrische Leitfähigkeit und absolute Trockenheit voraus, so dass auch lebende Objekte untersucht werden können. Der verwendete Druck liegt im Bereich des Dampfdrucks des Wassers bei etwa 0,1 - 10 Torr. Die Untersuchung von lebenden Objekten hat allerdings die Limitierung, dass die dauerhafte Elektronenbestrahlung auf vitales Gewebe und Zellen sehr schädigend wirkt. Somit können die Untersuchungssequenzen nur relativ kurz gehalten werden, um einen Untergang der Untersuchungsobjekte zu vermeiden. Die erreichte Auflösung liegt im Bereich von 2 nm [30].

1.5 Quantitative Kalziumbestimmung in Zellen

Die Kalziumbestimmung in Zellkulturen kann mit unterschiedlichen Methoden erreicht werden. Eine der gebräuchlichsten Methoden ist die fluoreszenzmikroskopische Kalziummessung mit den Farbstoffen Fura2 AM und Fura-Red beziehungsweise Fluo-3 (siehe Kapitel 1.4.2). Auch humane Osteoblasten wurden mit diesem Verfahren bereits untersucht [40,45].

Ein anderes Verfahren ist das in Kapitel 1.4.3 beschriebene elektronenmikroskopische "Elementmapping" mit der Elektronenstrahl-Mikrosonde.

Die photometrische ortho-Kresolphthalein Komplex Methode (OCPC) ist eine laborchemische Kalziumbestimmungsmethode [20]. Damit wurden beispielsweise von MATSUZAKA kultivierte Knochenmarkzellen untersucht [69]. Die Reaktion von Kalziumionen mit ortho-Kresolphthalein ergibt im alkalischen Medium bei der photometrischen Messung ein Absorptionsmaximum bei 575 nm. Die Farbintensität des gebildeten Komplexes aus Kalzium und ortho-Kresolphthalein ist direkt proportional zum Kalziumgehalt der Probe. Diese Labormethode kann zur Kalziumbestimmung von Zellkulturen [52], aber auch zur analytischen Serum-, Blutoder Urinkalziumbestimmung eingesetzt werden [21,80].

1.6 Zelleffekte der Stimulanzien

McClary et al. beschrieben die Effekte von unterschiedlichen Ascorbinsäurekonzentrationen auf Osteoblasten [70]. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Morphologie der über einen Zeitraum von 14 Tage kultivierten Osteoblasten bei unterschiedlichen Ascorbinsäurekonzentrationen nicht ändert, jedoch die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle zunimmt. Es änderten sich weiterhin die Aktivität der Membran-Alkalischen-Phosphatase und der Membranproteingehalt. Signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Stimulationskonzentrationen (5 μg/ml vs. 20 μg/ml) traten nicht auf.

Von Franceschi et al. wurde dargestellt, dass Ascorbinsäure für die Ausbildung des osteoblastären Phänotyps bei Vorläuferzellen nötig ist [33].

EKLOU-KALONJI et al. beschrieben die Effekte von unterschiedlichen extrazellulären Kalziumkonzentrationen auf Schweineosteoblasten [29]. In dieser Studie wählte man eine extrazelluläre Kalziumkonzentration von 2,2 mM als Kontrolle. Diese wurde dann auf 0,5 beziehungsweise 1 mM oder auf 3, 5, 7 und

verändert. In den Osteoblastenkulturen, die ein oder zwei Tage nach 10 mM Aussaat mit 3 beziehungsweise 5 mM Kalzium kultiviert wurden, wurde die PICP-(Procollagen Typ I carboxy-terminal Peptid) Freigabe gehemmt. Der DNA Gehalt und die Aktivität der alkalischen Phosphatase blieben mit Ausnahme der extrazellulären Kalziumkonzentration von 5 mM unverändert. Bei einer Inkubation mit 7 oder 10 mM Kalzium für 48 Stunden in der Kurzzeitkultur von subkonfluenten Osteoblasten wurde die Erhöhung des DNA-Gehalts gehemmt. Der DNA-Gehalt normalisierte sich wieder, wenn die Zellen in das Kontrollmedium zurück gebracht wurden, während die Hemmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase, die durch die extrazelluläre Kalziumkonzentration von 5, 7 oder 10 mM verursacht wurde, irreversibel war. Eine kurzfristige Kultivierung bei hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen beeinflusste die PICP-Freigabe nicht.

WALI et al. [97] beschrieben im Mausmodell die Rolle des nukleären Vitamin D Rezeptors (VDR) in Bezug auf die schnellen Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration. Dabei wurden Wildtyp- (VDR positiv) und knockout-Mäuse (VDR negativ) untersucht. Bei Stimulation der Mausosteoblasten mit 100 nM Vitamin D über eine Minute wurde eine Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration von 58 und von 53 nM (N = 3) im Wildtyp beziehungsweise knockout-Typ beobachtet. Diese Untersuchungen zeigten, dass der durch die Vitamin D Zugabe induzierte schnelle Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und PKC-Aktivität weder vermittelt noch abhängig von der Funktion des Vitamin D-Rezeptors im Mausosteoblast ist. Die intrazellulär fluoreszenzmikroskopisch ermittelten Kalziumkonzentrationen beliefen sich auf 49 bis 119 nM [97].

Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich durch die Zugabe Ascorbinsäure, β-Glyzerophosphat und Vitamin D (1α-OH-Vitamin D) Langzeitstimulation von bis zu 30 Tagen bei Vorläuferzellen die Zahl der mineralisierten Zellen [102], beziehungsweise die Zahl an mineralisierten Zellknötchen [93] erhöht. Langzeitstimulation von ST2-Zellen über 24 Tage mit Ascorbinsäure (50 µg/ml) fördert die Kalziumabscheidung beziehungsweise Bildung kalzifizierten Knötchen im Vergleich Kontrollgruppe von zur [79]. Kurzzeitstimulation (60 - 90s) mit 10 nM Vitamin D₃ erhöhte sich kurzzeitig die intrazelluläre Kalziumkonzentration [88,95].

Bei den Konzentrationen der eingesetzten Stimulanzien ergibt sich ein sehr Die verwendeten Ascorbinsäurekonzentrationen schwanken heterogenes Bild: zwischen 20 und 100 $\mu g/ml$ [13,17,19,22,23,24,51,55,77,79]. Bei Vitamin D₃ lagen Konzentrationen im Bereich die eingesetzten von 0.01 bis 100 nM [5,6,32,34,38,56,58,66,68,74,88,89,90,92,97]. Außerdem oftmals wurden Additive verschiedene wie **B-Glycerophosphat** und Dexamethason mit unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt.

In der vorliegenden Arbeit entschieden wir uns für die Stimulation der humanen Osteoblasten mit Ascorbinsäure (50 μ g/ml) und Vitamin D₃ (10 nM) sowie der Kombination aus beiden Substanzen.

1.7 Ultraschallwirkungen auf Zellkulturen

Die essentielle Frage, ob die Zellen durch die lang andauernde Anwendung von Ultraschall geschädigt werden, stand im Fokus der Untersuchungen von HOPPE und BEREITER-HAHN [49]. Als Ergebnis wurde festgestellt, dass bei den verwendeten Schallintensitäten im Gigahertzbereich bei einer Beschallungsdauer von bis zu 60 Minuten keine schädigenden Ultraschallwirkungen für die Zellkultur auftraten. Allerdings wird der Schallkopf aufgrund der geringen Brennweite der akustischen Linsen (sie beträgt im Gigahertzbereich zirka 40 µm) beim Scannen sehr dicht über die Probe geführt. Dadurch sind mechanische Irritationen der Untersuchungsobjekte, beispielweise von Zellkulturen, nicht immer ganz auszuschließen. Diese können dann zum Zelluntergang oder zum Ablösen der Zellen vom Untergrund führen. Kommt es zum Ablösen der Zellen vom Substrat, so sind diese mit akustischer Mikroskopie nicht mehr darstellbar. Bei der hier vorliegenden Untersuchung wurde das Ablösen jedoch nur bei bereits vorgeschädigten Zellen beobachtet.

1.8 Mathematische und physikalische Grundlagen

Die mathematischen und physikalischen Grundlagen der Ultraschallmikroskopie wurden von BRIGGS [15] zusammengefasst: Der Amplitudenkontrast entsteht bei allen akustischen Mikroskopie-Verfahren durch den Reflexionsfaktor R, mit welchem Ultraschall von einer Oberfläche zurück zum Empfänger reflektiert wird. R hängt von dem Unterschied der akustischen Impedanzen Z_1 und Z_2

$$Z = \rho \cdot c \tag{1-2}$$

(mit ρ = Dichte und c = Schallgeschwindigkeit) angrenzender Medien 1 und 2 ab. Als physikalische Voraussetzungen werden zwei hinreichend ausgedehnte Grenzflächen angenommen, diese kann man bei Zellen nur sehr eingeschränkt als erfüllt betrachten. Es gilt für senkrechten Schalleinfall und im Fokus der Linse [15]:

$$R = \frac{Z_1 - Z_2}{Z_1 + Z_2} \tag{1-3}$$

Das Reflexionsvermögen des Schalls von Zellen ist sehr gering, da der Unterschied der akustischen Impedanzen des Kulturmediums und der zu untersuchenden Zellen sehr gering ist. Der Dichteunterschied beträgt 4 - 10 %. Für Muskelzellen mit einer Dichte von $1,06 \text{ kgm}^{-3}$ [41] ergibt sich ein Dichteunterschied im Vergleich zu Wasser ($\rho = 1 \text{ kgm}^{-3}$) von 6 %.

Damit errechnet sich der Reflexionsfaktor R für Muskelzellen ($\rho_{\text{Wasser}} = 1 \text{ kgm}^{-3}$, $\rho_{\text{Muskelzellen}} = 1,06 \text{ kgm}^{-3}$, $c_{\text{Wasser}} = 1479 \text{ ms}^{-1}$ [60], $c_{\text{Myokard}} = 1587 \text{ ms}^{-1}$ [60])

$$R = \frac{(1,06kgm^{-3} \cdot 1587ms^{-1}) - (1,0kgm^{-3} \cdot 1479ms^{-1})}{(1,06kgm^{-3} \cdot 1587ms^{-1}) + (1,0kgm^{-3} \cdot 1479ms^{-1})} = 0,064$$
(1-4)

Der reflektierte Anteil der Ultraschallwellen beläuft sich um 6 % der eingestrahlten Wellen. Einflussfaktoren sind hierbei die Materialeigenschaften von Kopplungsmedium, Zelle und Substrat, Temperatur sowie die Zelldicke und der Abstand des akustischen Wandlers vom Untersuchungsobjekt.

Dagegen ist der Reflexionsfaktor R für Glas als das verwendete Substrat sehr hoch. Er errechnet sich ($\rho_{\text{Wasser}} = 1 \text{ kgm}^{-3}$, $\rho_{\text{Glas}} = 2200 \text{ kgm}^{-3}$ [15], $c_{\text{Wasser}} = 1479 \text{ ms}^{-1}$ [60], $c_{\text{Glas}} = 5970 \text{ ms}^{-1}$ [15])

$$R = \frac{(2200kgm^{-3} \cdot 5970ms^{-1}) - (1,0kgm^{-3} \cdot 1479ms^{-1})}{(2200kgm^{-3} \cdot 5970ms^{-1}) + (1,0kgm^{-3} \cdot 1479ms^{-1})} = 0,999$$
(1-5)

Der reflektierte Anteil beträgt für Glas 99,9 %. Daher erklärt sich auch die gegenüber der Oberflächenreflektion an der Zelle bedeutend größere Reflektion des Substrats, welches jedoch durch eine aufgelagerte Zelle moduliert wird.

Streng genommen gelten die obigen Grundlagen jedoch auch nur für ebene Wellen [15], diese Bedingung ist jedoch bei fokussierten Wellen wie in der vorliegenden Untersuchung nicht erfüllt. HIRSEKORN et al. [46,47] haben jedoch gezeigt, dass an Grenzflächen in der Fokusebene, die sich senkrecht zur Einstrahlungsrichtung befinden, Gleichung (1-3) auch für hochfokussierte Strahlen angewandt und die elastischen Eigenschaften relativ einfach bestimmt werden können.

Es gilt [15]:

$$V(z) = \int_{0}^{\pi/2} P(\theta)R(\theta)e^{-i2zk\cos\theta}\sin\theta\cos\theta d\theta$$
 (1-6)

 $P(\theta)$... Pupillenfunktion der Linse,

 $R(\theta)$... Reflektanzfunktion,

k... Wellenvektor im Kopplungsmedium mit $k = 2\pi / \lambda$,

λ... Wellenlänge [μm],

z... Wandler – Probenabstand [µm],

θ... Einfallswinkel des Wellenbündels zur Probenoberflächennormalen [°].

Die Spannungsamplitude des reflektierten Wellenbündels wird durch eine charakteristische V(z)-Funktion beschrieben. Diese hat bei unterschiedlichen z einen materialtypischen oszillierenden Verlauf und weist ein Hauptmaximum und bei Defokussierung periodisch mehrere Nebenmaxima auf (Abbildung 2-7). Aus der Veränderung des V(z)-Verlaufs lassen sich die morphologischen und akustischen Eigenschaften der Probe ableiten (Kapitel 2.5.1)

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Aufbau und Funktionsweise des akustischen Rastermikroskops



Abbildung 2-1 *SAM 2000 [83]*

Das akustische Rastermikroskop SAM 2000 der Q-Bam Gruppe im Ultraschalllabor an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Für die hier vorliegenden Untersuchungen an Osteoblasten wurde das akustische Rastermikroskop KSI SAM 2000 (Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland) verwendet. Der akustische Teil des Mikroskops wird durch ein integriertes optisches Mikroskop sowie eine computergestützte Auswertungseinheit ergänzt. Das akustische Mikroskop arbeitet im Puls-Echo-Betrieb. An den Ultraschallwandler wird eine hochfrequente Wechselspannung angelegt. Diese führt nach dem umgekehrten piezoelektrischen Effekt zu einer mechanischen Schwingung des Wandlers. Die vom Wandler erzeugten Schallwellen passieren zunächst den zylinderförmigen Saphirkristall (Al₂O₃) und treffen auf seine konkave, sphärische Kalotte, die als akustische Linse wirkt. Der Saphirkristall hat eine geringe akustische Dämpfung und eine hohe Schallgeschwindigkeit. Aufgrund der unterschiedlichen Schallausbreitungsgeschwindigkeiten im Saphirkristall und im angrenzenden flüssigen Kopplungsmedium (Osteoblastenmedium) werden die Schallwellen gebündelt. Um die bestmögliche Schalltransmission in das Kopplungsmedium zu

erreichen, ist auf die Kalotte zusätzlich eine Anpassungsschicht aus Siliziumdioxid (SiO₂) aufgebracht. So können die großen Impedanzunterschiede zwischen dem Saphir und dem wässrigen Kopplungsmedium ausgeglichen werden. Die Anpassungsschicht hat eine Dicke von einem Viertel der Wellenlänge. Für die Untersuchung wurde eine Breitbandlinse mit einem Frequenzbereich von 0,8 bis 1,3 GHz und einem Öffnungswinkel von 100° verwendet.

Die abgestrahlten Sendeimpulse werden an der Probenoberfläche und an Strukturen im Probeninneren in verschiedenen Tiefen reflektiert beziehungsweise gestreut. Der reflektierte Teil kehrt zum Wandler zurück und erzeugt durch den direkten piezoelektrischen Effekt eine elektrische Spannung, die elektronisch ausgewertet werden kann.

Short-Pulse-Verfahren

Bei niedrigen Anregungsfrequenzen (bis etwa 200 MHz), zum Beispiel im akustischen Rastermikroskop SAM 200EX (Q-Bam, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg) werden zur Tiefendifferenzierung zeitaufgelöste Methoden verwendet. Dabei wird ein sehr kurzer Ultraschallpuls (short-Pulse) ausgesendet und aus der Signallaufzeit Δt die Entfernung s des zu untersuchenden Objekts vom Wandler berechnet. Als Voraussetzung für diese Berechnung muss die Schallgeschwindigkeit c in der Probe beziehungsweise im Kopplungsmedium bekannt sein.

$$c = \frac{2s}{\Delta t} \tag{2-1}$$

Burst-Verfahren

Dagegen verwendet man bei höheren Frequenzen (im Gigahertzbereich), wie auch bei dem in dieser Studie verwendeten SAM 2000, zur Erhöhung der Empfindlichkeit längere Sendepulse, so genannte 'bursts'. Beim SAM 2000 hat ein 'burst' eine Länge von zirka 20 ns [84]. Dem entspricht eine longitudinale Auflösung von etwa:

$$c = \frac{2s}{t} \to s = \frac{ct}{2} = \frac{20 \cdot 10^{-9} \, \text{s}}{2} \cdot 1500 \frac{m}{\text{s}} = 15 \cdot 10^{-6} \, \text{m} = 15 \, \mu \text{m}$$
 (2-2)

Das longitudinale Auflösungsvermögen wird weiterhin wesentlich von der Form des Schallfeldes bestimmt. Durch die akustische Linse erfolgt wie oben beschrieben eine starke Fokussierung. Experimentell wurde durch RAUM [84] eine frequenzabhängige Fokuslänge von etwa 7 µm bei 900 MHz ermittelt. Die

ankommenden Signale werden digitalisiert aufgezeichnet. und Durch Führung mäanderförmige des Scanners über die Probe entsteht ein zweidimensionales Schnittbild senkrecht zur Einstrahlrichtung (der so genannte C-Scan).

Bei den gepulsten Verfahren wird nur eine Linse verwendet, die alternierend als Sender und Empfänger dient. Die Trennung der beiden Signale ist mit einem elektronisch einstellbaren Zeitfenster, dem so genannten "gate", möglich. Über das Zeitfenster wird der Erwartungszeitraum für den Empfang, der zum Wandler zurückkehrenden Signale ("gate position"), gesteuert. Ist die "gate"-Breite ("gate width") zu klein eingestellt, so werden keine Signale empfangen. Bei einer zu großen Einstellung können Signale aus unterschiedlichen Ebenen der Probe aufgezeichnet werden. Eine Zuordnung zu einer bestimmten Probentiefe ist dadurch nur bedingt möglich. Die Einstellungen für die "gate position" und "gate width" wurden in der vorliegenden Untersuchung hinsichtlich der Signalqualität optimiert und dann für alle Messungen beibehalten.

Die Scan-Bewegung des Wandlers wird mit einem elektromechanischen Schwingspulensystem in x- und y-Richtung (parallel zur Probenoberfläche) durchgeführt. Die Kantenlänge des quadratischen Scanfeldes ist beim SAM 2000 in 6 Stufen von etwa 65 μ m bis 1000 μ m wählbar. Zur Grob- und Feinjustierung in z-Richtung (in Richtung des Schallstrahles) wird eine elektronisch gesteuerte mechanische Höhenverstellung mit einer Ganggenauigkeit von zirka 0,1 μ m [1] verwendet. Die Einstellung erfolgt dabei durch die Steuerungssoftware ELIPS (entwickelt von A. DENISSOV, CIRAMC, University of Windsor, Kanada). Es sind Auflösungen von 64, 128, 256 und 512 Zeilen pro Bild möglich. Jedem Bildpunkt werden die Intensitäten der reflektierten Signale zugeordnet und als charakteristischer Grauwert auf dem Monitor ausgegeben.

Die entstehenden Bilder werden mit Hilfe des Multi-Layer-Analysis-Verfahrens [84] (siehe Kapitel 2.5.1) basierend auf der NewMLA Software, programmiert in Matlab[®] 6.5 (The MathWorks, Inc., Natick, United States of America) [84], weiterverarbeitet.

2.2 Aufbau und Funktionsweise des konfokalen Laserscanningmikroskops



Abbildung 2-2 Leica DM IRE2 [4]

Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop Leica DM IRE2 wurden am Institut für physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg vorgenommen.

Die konfokale Laserscanningmikroskopie (CLSM) ist ein lichtmikroskopisch bildgebendes Verfahren, das von MINSKY 1957 entwickelt wurde [73]. 1967 wurden von BOYDE und EGGER erstmals zweidimensionale Schnittbilder dargestellt [27]. Später entwickelten sie das Verfahren noch weiter [14].

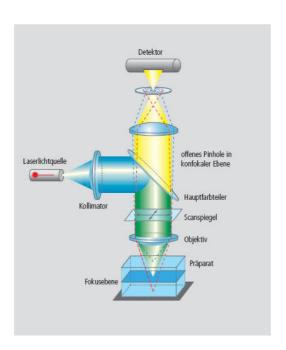


Abbildung 2-3 Prinzip des konfokalen Laserscanningmikroskops [3]

Konfokales Prinzip bedeutet, dass der Fokus der Beleuchtung des Objekts gleichzeitig der Fokus des Objektivs ist. Das heißt technisch, dass das Objektiv gleichzeitig Beleuchtungsquelle und Lichtempfänger ist. Die Trennung dieser beiden

Anteile erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Wellenlängen im Hauptfarbteiler. Die Signalintensität beläuft sich aufgrund des konfokalen Prinzips jedoch auf etwa nur 5 – 10 % der Signalintensität, die mit (Epi)-Fluoreszenzmikroskopie erhalten werden kann. Dafür erreichen die Bilder eine erhöhte Schärfe und können bei Scans in mehreren z-Ebenen dreidimensional rekonstruiert werden.

Strahlengang

Ein Laserstrahl wird durch eine Optik so aufgeweitet, dass er nach Passieren des Kollimators als paralleles Strahlenbündel von wenigen Millimetern Durchmesser auf den Hauptfarbteiler, einen dichromatischen Teilerspiegel, trifft. Das Strahlenbündel wird nun schrittweise in x- und in y-Richtung abgelenkt (Scanvorgang), bevor es durch das Objektiv gelangt. Das Objektiv fokussiert das Licht auf das Präparat. Da das vom Untersuchungsobjekt emittierte Fluoreszenzlicht eine größere Wellenlänge als das eingestrahlte Licht hat, kann es vom eingestrahlten Licht getrennt werden. Im weiteren Strahlengang befindet sich zur Erhöhung der axialen und lateralen Schärfe eine Lochblende (Pinhole). Das Licht gelangt dann auf einen lichtempfindlichen Detektor (Fotomultiplier) und wird in elektronische Signale umgewandelt. Diese Signale werden aufgezeichnet, archiviert und können mit der Auswertungssoftware weiterverarbeitet werden.

2.3 Lichtmikroskopie



Abbildung 2-4 Olympus CK 40 [78]

Zur optischen Darstellung der Zellkulturen wurde ein Auflicht-Mikroskop, das Olympus CK 40 (Olympus Optical Co. Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) mit 20- und 40-facher Objektivvergrößerung und zur Dokumentation eine Olympus DP 12 Digitalkamera (Olympus Optical Co. Europa GmbH, Hamburg, Deutschland) mit 3,24 M Pixeln verwendet. Von allen Versuchsreihen wurden so zusätzlich lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt und entsprechend digital archiviert.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Anlegen einer Osteoblasten-Primärkultur aus humanem Knochenmaterial

(modifiziert nach Freshney [35])

Verwendete Materialien

- Osteoblastenmedium (C27001 Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- L-15 Medium Leibovitz's Reagenz (E15-020 PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)
- PBS (L 182-1 biochrom AG-Seromed, Berlin Deutschland), versetzt mit Penicillin/Streptomycin (A2213 biochrom AG Seromed Berlin, Deutschland)
- Petrischalen 60 x 15 mm
- Pinzette, Skalpelle, Zellschaber
- Zellkulturflasche, Wachstumsfläche zirka 75 cm² (9075,00 TPP AG, Trasadingen, Schweiz)

Ablauf

Das Patientenknochenmaterial (gewonnen aus Femurkondylen von Rückständen aus Knie-TEP-OPs an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin, Klinikum der Medizinischen Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) wurde in L-15 Medium gegeben und mit PBS (kalzium-und magnesiumfrei) in einer Petrischale gespült. Um eine Keimfreiheit gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien zu erreichen ist das PBS prophylaktisch mit Penicillin und Streptomycin (10.000 IE = 10.000 μg/ml) versetzt. Mit einer Pinzette und einem Skalpell wurde der trabekuläre Knochen gelöst und grob zerkleinert. Die zerkleinerten Knochenfragmente wurden in eine Petrischale überführt

und abermals zerkleinert. Danach erfolgte die viermalige Spülung mit PBS und bei Bedarf eine erneute Zerkleinerung. Zum Abspülen des Fettes wurden die Knochenfragmente letztmalig mit Osteoblastenmedium gespült, eine in Zellkulturflasche gegeben und diese mit 7 - 8 ml Medium aufgefüllt. Die Zellkulturflaschen wurden dann im Brutschrank bei 37 ℃ und 5 % CO₂ - Atmosphäre inkubiert. Der Mediumwechsel mit jeweils 7 - 10 ml Medium erfolgte dreimal wöchentlich. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass es möglichst zu keiner Ablösung der Knochenstückchen vom Boden der Zellkulturflasche kommt. Gleichzeitig wurde beim Mediumwechsel die Zellkulturflasche, das Wachstum der Zellen und eventuelle Kontamination überprüft. Nach zirka 3 Wochen waren die Knochenstücke von Osteoblasten dicht umschlossen. Diese konnten nun abtrypsiniert und subkultiviert werden.

2.4.2 Separation der Osteoblasten

Verwendete Materialien

- 250 ml Zellkulturflaschen (9075 TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
- PBS (L 182-1 biochrom AG-Seromed, Berlin, Deutschland), 100 ml PBS und 1 ml Penicillin/Streptomycin (A2213 biochrom AG Seromed Berlin, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (L2143 biochrom AG-Seromed, Berlin, Deutschland)
- Saarstedt-Röhrchen (91015 TPP AG, Trasadingen, Schweiz)
- Osteoblastenmedium (C-27001 Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland)

Ablauf

Das Osteoblastenmedium wurde aus der 250 ml Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellkultur einmal mit PBS (kalzium- und magnesiumfrei) gespült. In der Folge wurde die Zellkultur dann mit 5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA versetzt und für drei bis vier Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dabei wurde das Ablösen der Zellen vom Flaschenboden beobachtet. Danach wurden 10 ml PBS hinzugegeben, die Zellsuspension aufgenommen und in ein Saarstedt-Röhrchen überführt, um dieses für 6 Minuten bei zirka 1100 U/min zu zentrifugieren. Der Überstand konnte nun abgesaugt und das Zellpellet mit Osteoblastenmedium resuspendiert werden.

2.4.3 Zellkultur für die akustische Mikroskopie

Verwendete Materialien

- Chamber Slides (Lab Tek™ II 154461, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)
- Osteoblastenmedium (C27001 Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Vitamin D₃ 10 nmol/l (D-1530, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Deutschland)
- Ascorbinsäure 50 $\mu g/ml$ (14030, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- PBS (L 182-1 biochrom AG-Seromed, Berlin, Deutschland)
- Standard Micro Test Tube (3810, Eppendorf AG, Hamburg Deutschland)

Ablauf

Nach dem Abtrypsinieren der Zellen wurden sie nach dem Auszählen und der Herstellung einer Zielkonzentration von etwa 3500 Zellen pro Milliliter in Chamber Slides mit Glasboden gegeben und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Ansatz erfolgte für eine Versuchsdauer von drei Wochen, wobei insgesamt 12 Chamber Slides angelegt wurden, je ein Chamber Slide für die Kontrolle, die Stimulation mit Ascorbinsäure, die Stimulation mit Vitamin D₃ sowie für die Kombination von Ascorbinsäure und Vitamin D₃ für jede Versuchswoche. Der Mediumwechsel erfolgte jeweils Montag, Mittwoch und Freitag. Hierbei wurde die Kultur jeweils, wie oben beschrieben, auf eine mögliche Kontamination geprüft.

Untersuchung der Proben

Die Untersuchung der Proben mit Hilfe des Ultraschallmikroskops (SAM 2000) erfolgte immer bei Raumtemperatur (25 °C). Die Proben wurden nach einer, zwei beziehungsweise drei Kulturwochen untersucht. Die Messung erfolgte an nicht konfluenten Zellen, da für die Aufnahme des Referenzsignals immer ein ebener und nicht bewachsener Untergrund in unmittelbarer Umgebung zu der untersuchenden Zelle Vorrausetzung ist (vergleiche Kapitel 2.5.2).

2.4.4 Zellkultur für die konfokale Laserscanningmikroskopie

Verwendete Materialien

- Chamber Slides (Lab Tek™ II 154461, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland)
- HPS HEPES [in mmol/l]: Glucose 5, NaCl 140, KCl 5, EDTA 0,2, CaCl $_2$ 1, MgCl $_2$ 1, HEPES 5 (pH 7,2)
- Fura Red (Molecular Probes, Eugene, USA / MoBiTec, Göttingen, Deutschland)
- Fluo-3 (Molecular Probes, Eugene, USA)
- Pluronic (20% in Dimethylsulfoxid) (Molecular Probes, Eugene, USA)
- Vitamin D₃ 10 nmol/l (D-1530, Sigma-Aldrich GmbH, Seelze, Deutschland)
- Ascorbinsäure 50 $\mu g/ml$ (14030, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- PBS (L 182-1 biochrom AG-Seromed, Berlin, Deutschland)

Ablauf

Die qualitative Darstellung der intrazellularen Kalziumkonzentration erfolgte durch Fluoreszenzmessung mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop. Die Osteoblasten wurden hierzu genau in derselben Art und Weise wie für die Ultraschallmikroskopie (siehe Kapitel 2.4.3) auf Chamber Slides mit Glasboden kultiviert. Als Versuchsgruppen wurden wiederum eine nicht stimulierte Kontrollgruppe, Osteoblastenkulturen, stimuliert mit Ascorbinsäure und Vitamin D₃, sowie eine Osteoblastenkultur, stimuliert mit der Kombination von Ascorbinsäure und Vitamin D₃, gewählt.

2.5 Akustische Mikroskopie

2.5.1 Das Multi-Layer-Analysis-Verfahren

Durch dieses Verfahren wird die quantitative Analyse der akustischen Eigenschaften aus den reflektierten Signalen ermöglicht. Prinzipiell ist diese Analyse nur möglich, wenn sich alle Punkte der Probenoberfläche im Fokus der Linse befinden. Dies erfordert ideal spiegelglatte Oberflächen, wobei zusätzlich Scanebene und Probenoberfläche parallel ausgerichtet sein müssen. Diese Bedingungen sind insbesondere für die Ableitung der akustischen Impedanz aus der konfokalen

Reflexionsamplitude notwendig. Mit biologischen Zellen bewachsene Oberflächen können die Bedingung der ideal glatten Oberfläche a priori nicht erfüllen. Sogar bei polierten, in Feststoffe eingebetteten Proben, ist das nur schwer zu erreichen [84]. Deshalb können bei strukturierten Proben, wie in den Osteoblastenkulturen in dieser Arbeit, das Oberflächenrelief und die akustischen Eigenschaften nicht aus einem einzelnen Bild abgeleitet werden und es wurde das durch RAUM entwickelte Multi-Layer-Analysis-Verfahren eingesetzt [84]. Dabei werden in unterschiedlicher Entfernung des Wandlers von der Probenoberfläche z mehrere C-Scans durchgeführt (siehe Abbildung 2-5) und das V(z)-Signal für jeden Messpunkt rekonstruiert.

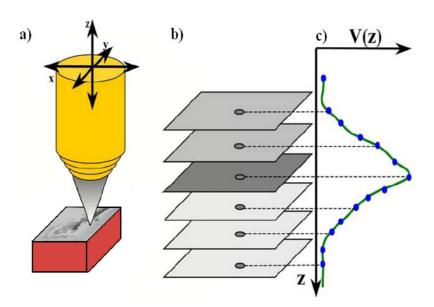


Abbildung 2-5 Multi-Layer-Analyse nach [84]

- a.) Prinzipskizze eines in x, y und z-Achse beweglichen Ultraschallscanners über einer Zellkultur.
- b.) Durch die Bewegung des Wandlers in z-Richtung kann für jeden Bildpunkt das V(z) Signal ermittelt und aufgezeichnet werden. Im akustischen Fokus der Linse ist das Signal maximal.
- c.) Rekonstruierter V(z)-Verlauf.

Die Abtastung begann bei einem Abstand zwischen der akustischen Linse und der Zelloberfläche deutlich oberhalb des Fokus, das heißt bei positiver Defokussierung und erstreckte sich bis hin zu einem Proben-Linsen Abstand deutlich unterhalb des Fokus (negative Defokussierung). Die Abstände der Einzelbilder in *z*-Richtung betrugen 1 μm. Für eine Messung wurden etwa 20 Einzelbilder aufgenommen, entsprechend einer Höhendifferenz von 20 μm. Der Scan einer Ebene dauerte etwa 12 Sekunden, für eine Bildserie ergaben sich zirka 4 Minuten. Da die Signalamplituden im Fokus immer ihr Maximum erreichen, befanden sich die

Signalmaxima der einzelnen Bildpunkte des jeweiligen Messpunkts bei einer nicht exakt ebenen Probe nicht in der gleichen Höhe z. Bestimmt man nun für jeden Bildpunkt die Tiefe z, in welcher das Empfangssignal maximal ist und stellt diese maximalen Signalintensitäten in einem weiteren Bild dar (dem so genannten Maximalwertbild), so erhält man Informationen der maximalen reflektierten Signalamplituden. Diese Signale sind jetzt von der Topographie der Probe unabhängig. Aus der Veränderung der z-Lage einer als eben anzunehmenden Fläche (beispielweise das Substrat) kann so ebenfalls eine Neigungsberechnung der durchgeführt werden. Für den einzelnen Bildpunkt charakteristische V(z)-Kurven mit einem Hauptmaximum im Fokus und mehreren Nebenmaxima bei positiver und negativer Defokussierung (siehe Abbildung 2-6). Dieser auch durch die Oberflächenwelleninterferenzen bedingte materialtypisch, man spricht daher von dem SO genannten elastischen "Fingerabdruck" (siehe Abbildung 2-7). Die Veränderungen des V(z)-Verlaufs können, wie im Folgenden beschrieben, zur Ableitung der akustischen Eigenschaften des zu untersuchenden Objekts verwendet werden.

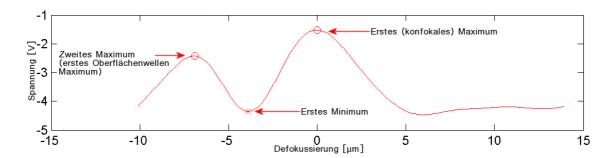


Abbildung 2-6 Der charakteristischer V(z)-Verlauf

Der charakteristische V(z)-Verlauf wird durch die Bewegung des Wandlers in z-Richtung zur Probe bestimmt. Es tritt ein erstes Maximum (konfokales Maximum), begleitet vom ersten Minimum auf. Es folgt nun das zweite, durch die Oberflächenwelle bestimmte Maximum, gefolgt von dessen Minimum (nicht dargestellt).

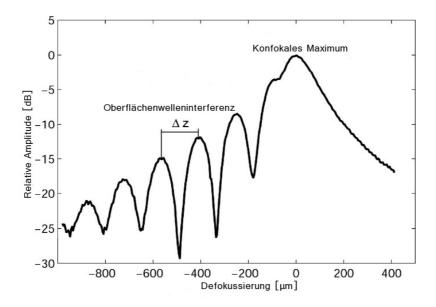


Abbildung 2-7 Der elastische "Material-Fingerabdruck" [86]

Die durch die Oberflächenwellen-Interferenz verursachte konfokale Reflektion stellt einen elastischen Fingerabdruck des Materials (Quartzglas, f = 50 MHz) [87] dar. Bei der Darstellung eines entsprechend großen z-Bereichs (Defokussierung) kommen mehrere Maxima und Minima neben dem konfokalen Maximum zur Darstellung.

2.5.2 Das Cell-Analysis-Verfahren

Das Cell-Analysis-Verfahren gestattet die Bestimmung von Zelldicke sowie Schallgeschwindigkeit und Schallschwächungskoeffizient in der zu untersuchenden Zelle. Dazu ist die Auswertung der Signale bei drei folgenden typischen Strahlengängen erforderlich:

- Ultraschallfokus auf der Zelloberfläche, Strahlengang 1 (Abbildung 2-8),
- Ultraschallfokus auf dem Substrat, Strahlengang 2 (Abbildung 2-9),
- Virtueller Ultraschallfokus im Substrat, das heißt unter der Substratoberfläche, Anregung von Oberflächenwellen, diese interferieren konstruktiv mit dem Substratecho, es entsteht das erste Oberflächenwellenmaxium, Strahlengang 3 (Abbildung 2-10).

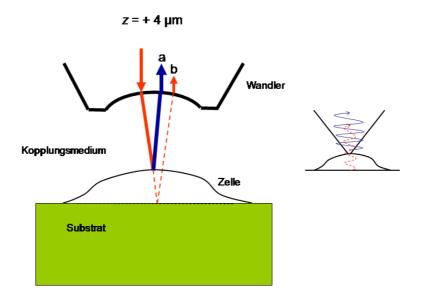


Abbildung 2-8 Strahlengang 1: Fokus auf Zelloberfläche

Die Fokusposition befindet sich auf der Zelloberfläche. Der von der Zelloberfläche reflektierte Strahl ist maximiert (a). Das entstehende Bild wird insbesondere vom Substratsignal bestimmt (b), welches jedoch in dieser Fokusposition stark durch die aufgelagerte Zelle moduliert wird.

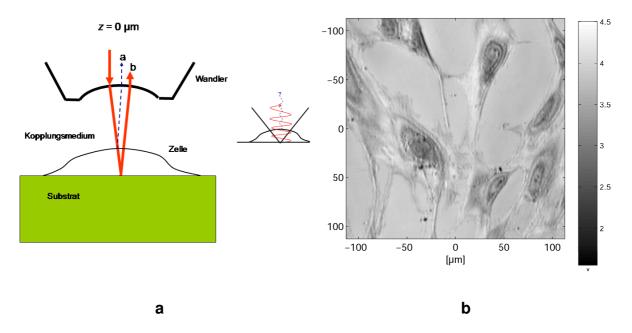


Abbildung 2-9 Strahlengang 2: Konfokales Maximum

- a.) Schematische Darstellung des Strahlenganges durch das Untersuchungsobjekt. Reflektierte Anteile: Signal der Zelloberfläche (a), Substratoberfläche (b).
- b.) Akustische Rastermikroskopie humaner Osteoblasten, 250 x 250 µm. Konfokales Maximum, Zellkonturen sind deutlich darstellbar, mehrere Zellen können mit ihren Ausläufern beobachtet werden.

Der Fokus befindet sich auf dem Substrat. Zur Bildentstehung trägt außerdem noch das schwache, defokussierte Signal der Zelloberfläche (a) bei. Durch die Interferenz entstehen typische Interferenzringe. Daraus lassen sich die Schallgeschwindigkeit und das Zellhöhenprofil abschätzen [49]. In der V(z)-Kurve wird dieses Signal als konfokales Maximum bezeichnet (siehe Abbildung 2-6).

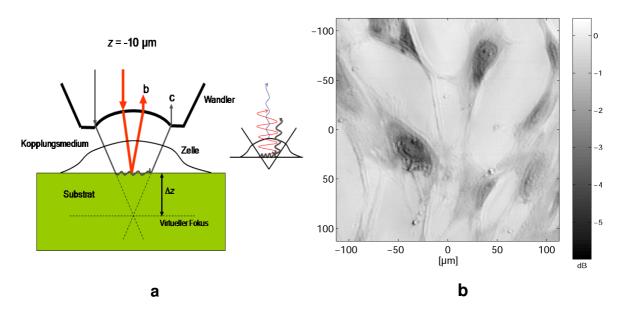


Abbildung 2-10 Strahlengang 3: Virtueller Fokus im Substrat, Anregung von Oberflächenwellen

- a.) Schematische Darstellung des Strahlenganges durch das Untersuchungsobjekt. Reflektierte Anteile: Substratoberfläche (b), Reflexion der Oberflächenwelle (c).
- b.) Akustische Rastermikroskopie humaner Osteoblasten, 250 x 250 μm. Maximale Interferenz der Oberflächenwelle und des Substratsignals, interne Zellstrukturen wie Nukleoli und vesikuläre Strukturen werden besser aufgelöst.

Die (virtuelle) Fokusposition befindet sich innerhalb des Substrates. Bedingt durch den schrägen Einfallswinkel der Strahlen, der vom Öffnungswinkel der akustischen Linse abhängt, entsteht bei einem Einfallswinkel von etwa 44° nach dem Gesetz von Snellius eine Oberflächenwelle. Obwohl sich Substrat beziehungsweise Zelloberfläche nicht im akustischen Fokus befinden, liefern sie jedoch auch reflektierende Signale, die mit der Oberflächenwelle interferieren. Im V(z)-Signal stellt dieser Fall den Bereich des ersten Oberflächenwellenmaximums (siehe Abbildung 2-6) dar.

Unabhängig von der Fokusposition liefert das Substrat sehr starke Signale (Strahlengang 1 und 2), die von der aufgelagerten Zelle modifiziert werden. In beiden Fällen ergibt sich das resultierende Signal durch Interferenz von den Signalen der Zelloberfläche und des Substrates. Abhängig von der Fokusposition ist die Wichtung dieser Signalanteile verschieden, so dass sich unterschiedliche Gesamtsignale Mit dem Strahlengang 3 wird berücksichtigt, dass ergeben. die Oberflächenwellengeschwindigkeit des Substrates durch eine aufgelagerte Zelle verändert wird.

Um aus den mit Hilfe des Multi-Layer-Analysis-Verfahrens gewonnenen quantitativen Daten Rückschlüsse auf die elastischen Zelleigenschaften ziehen zu können, wurde durch RAUM [87] eine Software auf Basis von Matlab[®] 6.5, das so genannte Cell-Analysis-Verfahren, entwickelt. Die MLA-Daten werden in den Cell-Analysis Programmteil von Matlab[®] 6.5 geladen, dazu wählt man im Maximalwertbild eine ROI des Substrats aus. Dieser Bereich muss eben sein und darf keine

Strukturen oder Oberflächenveränderungen enthalten, sondern ausschließlich das Substrat, da es sonst zu einer Veränderung des Referenzsignals kommt, welches die ermittelten Zellparameter verfälschen kann. Über die Einzelpunkte der ROI wird dann eine V(z)-Kurve gemittelt und diese dann rot markiert ausgegeben (siehe Abbildung 2-11a). Für die vorliegende Studie wurden drei charakteristische, unterschiedliche ROI zur Untersuchung ausgewählt (siehe Kapitel 3.4): der Zellkern (nukleäre Zone), die Region direkt um den Kern (perinukleäre Zone) und die Zellperipherie (periphere Zone). Bei der Auswahl der ROI ist zu beachten, immer einen möglichst in sich homogenen Zellbereich abzugrenzen, damit die V(z)-Signale der Einzelpunkte ähnlich sind. Dadurch erhöht sich die Messgenauigkeit der Methode. Für die weitere Signalauswertung wird davon ausgegangen, dass innerhalb der ROI annähernd konstante Signale vorliegen und deshalb eine Mittelwertbildung des V(z)-Verlaufs vorgenommen werden kann. Diese Signalkonstanz ist für die weitgehend homogene Substratfläche sicher gut erfüllt. Für die gesamte Zelle ist dies aber aus verschiedenen Gründen (Oberflächenprofil, interne Strukturen, Zellorganelle, Zytoskelett) im Allgemeinen nicht zutreffend. Deshalb wurde hier meist eine kleinflächige ROI ausgewählt und blau markiert über strukturell homogen erscheinenden Zellflächen platziert (Abbildung 2-11b).

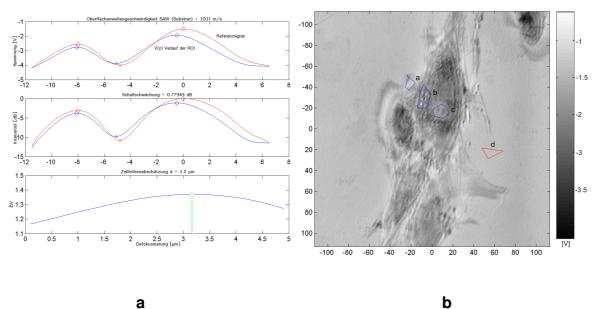


Abbildung 2-11 V(z)-Verlauf, Auswahl der ROI im Maximalwertbild

- a.) Farbcodierte Darstellung der V(z)-Verläufe für das Referenzsignal und die gewählte ROI und das daraus errechnete Zellhöhenprofil. Automatische Markierung der Maxima. Es kommt die Verschiebung des Maximums in z-Richtung zur Darstellung. Oben: V(z)-Verlauf, Mitte: Schallschwächung [dB], unten: Zellhöhe [µm].
- b.) Akustische Rastermikroskopie, 250 x 250 μ m: Konfokales Maximalwertbild eines humanen Osteoblasten, 1. Kulturwoche, Stimulation mit Vitamin D_3 , Auswahl der ROIs. a.) periphere

Zone, b.) periphere Zone, c.) Zellkern, d.) Referenzsignal des Substrats. Die Zellausläufer der Osteoblasten sind gut zu erkennen. Weiterhin fallen in der perinukleären Zone die Granulationen auf.

Die ermittelten V(z)-Verlaufskurven wurden jetzt rechentechnisch in einer Grafik übereinander gefügt und die Maxima und Minima der jeweiligen Kurvenverläufe automatisch markiert (siehe Abbildung 2-11a). Aus den Veränderungen des V(z)-Verlaufs des Referenzsignals und der (Zell-)ROI wurde die abgeschätzte Zellhöhe (siehe Kapitel 2.5.3 und Abbildung 2-11a) für die jeweilige ROI bestimmt und ausgegeben. Die gemessenen Daten wurden dann automatisch in eine Tabelle übergeben und archiviert (siehe Kapitel 2.5.4).

Referenzsignal und ROI-Signal sollten immer den in Abbildung 2-6 gezeigten typischen Verlauf haben. Dies konnte jedoch nicht bei allen Datensätzen erreicht werden. Um die Qualität des Datensatzes einzuschätzen, wurden zwei Kategorien festgelegt und diese mit dem Datensatz gespeichert. Die Datensätze wurden in die Rubriken ,sehr gut' oder ,nicht verwendbar' eingeteilt. Als Unterscheidungskriterium für diese Auswahl diente unter anderem der Amplitudenunterschied des Referenzsignals zum ROI-Signal. Betrug dieser mehr als 10 dB, so wurde der Datensatz verworfen. In Kapitel 1.8 wurde schon erwähnt, dass der Dichtebeziehungsweise Impedanzunterschied zwischen den Zellen im Vergleich zu Wasser nur sehr gering ist. Ein Signalunterschied des Referenzsignals zum Substrat von mehr als 10 dB erscheint physikalisch nicht sinnvoll. Dieser ist daher vermutlich durch Artefakte wie Substratunebenheiten und Verunreinigungen bedingt. Weiterhin wurde der V(z)-Verlauf von den Signalen der Zelle und des Substrates ausgewertet. Beide V(z)-Verläufe sollten einen homogenen, nahezu parallelen Verlauf aufweisen (vergleiche Abbildung 2-6 und Abbildung 2-12). Wenn diese Voraussetzung nicht erfüllt war, wurden die Versuche in die Kategorie ,nicht verwendbar' eingeteilt. In der statistischen Auswertung wurden ausschließlich Datensätze der Kategorie "sehr gut" verwendet, alle übrigen Datensätze wurden verworfen.

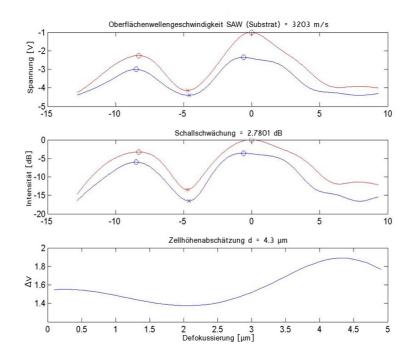


Abbildung 2-12 Auswahl der Datensätze, Kategorie ,nicht verwendbar'

Roter Kurvenverlauf: Referenzsignal, blauer Kurvenverlauf: gemessenes Signal. Die Kurven laufen weitgehend nicht parallel. Der Datensatz ist mangelhaft, die Bestimmung des Zellprofils kann nicht regelrecht erfolgen. Oben V(z)-Signal, Mitte: Schallschwächung [dB], unten: Zellhöhenprofil [µm]

2.5.3 Bestimmung der Zellparameter

Folgende Parameter wurden bestimmt: Zellhöhe, Schallgeschwindigkeit sowie Schallschwächung beziehungsweise Schallschwächungskoeffizient und die Oberflächenwellengeschwindigkeit. Um die quantitative Bestimmung der Zellparameter vorzunehmen, wurden charakteristische Strukturen der V(z)-Kurve ausgewertet. Das V(z)-Signal des reinen Substrates unterscheidet sich vom V(z)-Signal des Substrates mit aufgelagerter Zelle durch verschiedene Eigenschaften:

- Die Amplitude des Signals mit aufgelagerter Zelle ist in Strahlengang 3 geringer, weil das Signal beim Durchgang durch die Zelle geschwächt wird (Abbildung 2-11a Mitte).
- Die Maxima und Minima des Signals sind in z-Richtung örtlich verschoben (siehe Abbildung 2-11a). Die Ursache dafür ist die, verglichen mit dem Kopplungsmedium, höhere Schallgeschwindigkeit in der Zelle, wodurch es zu einer Veränderung der Fokusposition und des für die Generierung der Oberflächenwellen notwendigen Grenzwinkels kommt. Der Fokus wird durch die Schallbrechung an der Zelloberfläche zum Wandler hin verlagert. Aus

dieser Veränderung der Fokuslage kann man wie unten beschrieben die Zellhöhe ableiten (Abbildung 2-11a unten).

Wenn der Schall auf die Zelle mit ihrer gegenüber dem Kopplungsmedium unterschiedlichen Schallgeschwindigkeit trifft, kommt es an der Zelloberfläche zur Schallbrechung. Das heißt, die Ausbreitungsrichtung der Schallwellen ändert sich. Dadurch ändert sich auch die z-Entfernung des Schallfokus. Dies wird als Fokusshift z₀ bezeichnet. Durch Differenzbildung wird die Verschiebung des Schallfokus (unabhängig von der Substratneigung) bestimmt. Diese Fokusshift ist in Abbildung 2-15a für einen humanen Osteoblasten dargestellt.

Zellhöhe

Für die Bestimmung der Zellhöhe werden die vorgenannten V(z)-Kurven des Substrats beziehungsweise der ROI mit aufgelagerter Zelle verwendet und auf die maximale Amplitude (konfokales Maximum) normiert. Der maximale Einfluss der Zelle auf die V(z)-Kurve (Abbildung 2-13) ist bei Fokussierung auf die Zellmembran zu erwarten. Abbildung 2-13 zeigt die Referenz- und die Zellkurve der Signalintensitäten. Der Betrag des Kurvenunterschiedes z_{max} der beiden Kurven (bei positiver Defokussierung) ist in Abbildung 2-14 dargestellt. Das Maximum liegt bei 2,8 µm. Unter Berücksichtigung der Fokusverschiebung von z_0 = 0,3 µm ergibt sich eine Zelldicke d von

$$d+z_0=z_{\rm max}$$
 (2-3)
 $d...$ Zelldicke [μ m],
 $z_{\rm max}...$ defokussiertes Maximum [μ m],
 $z_0...$ Fokusshift [μ m].

Das heißt

$$d = z_{\text{max}} - z_0 = 2.8\mu m - 0.3\mu m = 2.5\mu m$$
 (2-4)

Für die Bestimmung der Zellhöhe müssen also folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- die hinreichend genaue Bestimmung der Fokusverschiebung
- ein deutliches Maximum des Kurvenunterschiedes (Abbildung 2-14)
- Homogenität der Signale.

Dies ist in der Regel für eine Zellhöhe von d > 1 µm erfüllt (Abbildung 2-16).

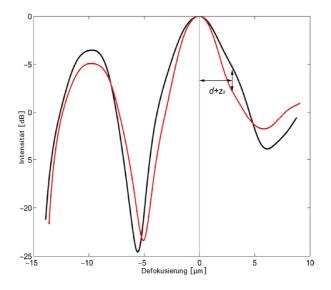


Abbildung 2-13 Zellhöhenbestimmung

a.) Schallschwächung des Referenzsignals und des Signals der ausgewählten ROI, Markierung der maximalen Differenz der beiden Verläufe. Schwarzer Kurvenverlauf: Referenzkurve I_{ref}, roter Kurvenverlauf Zellsignal I_{cell}

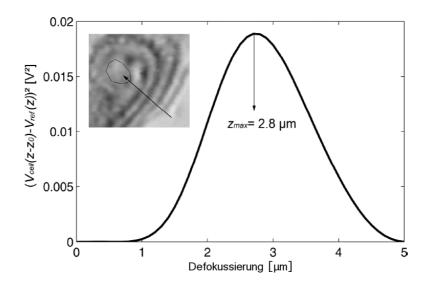


Abbildung 2-14 Zellhöhenbestimmung am Zellkern [86]

Zellhöhenbestimmung, Ermittlung der maximalen Zellhöhe am Zellkern mit Hilfe der akustischen Rastermikroskopie nach Gleichung 2-1

Schallgeschwindigkeit:

Die Schallgeschwindigkeit wurde aus der Zelldicke *d* und der Fokusshift errechnet. Nach MAEV [67] gilt:

$$z_0 = d \left[1 - \frac{v}{v_0} + \frac{1}{2} \cdot \frac{v}{v_0} \cdot \left(1 - \frac{v^2}{{v_0}^2} \right) \cdot \left(1 - \cos \theta_m \right) \right]$$
 (2-5)

d... Zelldicke [μm],

v... Schallgeschwindigkeit in der Zelle [m/s],

*v*₀... Schallgeschwindigkeit im Kopplungsmedium [m/s],

z₀... Fokusshift [μm],

 $\theta_{\rm m}$... halber Öffnungswinkel des Wandlers [°].

Die Messunsicherheit der Geschwindigkeitsberechnung betrug etwa 1,8 %.

Schallschwächung

Die Schallschwächung innerhalb der Zelle wurde durch die Differenz der Intensitäten des ersten Oberflächenwellenmaximums (SAW) des Referenz- beziehungsweise Zellsignals errechnet [86]:

$$\alpha = I_{ref} - I_{cell} \tag{2-6}$$

α...Schallschwächung [dB],

 I_{ref} ... Intensität des ersten Oberflächenwellenmaximums des Referenz-Signals [dB],

 I_{cell} ... Intensität des ersten Oberflächenwellenmaximums des Zell-Signals [dB].

Die Messunsicherheit wurde mit 0,15 % bestimmt. Ein Schallschwächungsbild von humanen Osteoblasten ist in Abbildung 2-10b dargestellt. Das Schallschwächungsbild ist aufgrund der Defokussierung zwar im Vergleich zu dem konfokalen Bild etwas unschärfer, es treten jedoch keine Interferenzringe auf. Damit ließen sich interne Zellstrukturen wie der Nukleus und Granulationen besser auflösen.

Schallschwächungskoeffizient

Der Schallschwächungskoeffizient α_{coeff} errechnet sich bei bekannter Zelldicke d durch

$$\alpha_{coeff} = \frac{\alpha}{2d} [dB/\mu m] \tag{2-7}$$

 α_{coeff} ...Schallschwächungskoeffizient [dB/ μ m],

α...Schallschwächung [dB],

d... Zelldicke [µm].

 α_{coeff} ist frequenzabhängig, so dass sich die in dieser Arbeit angegebenen Werte alle auf die Arbeitsfrequenz f = 900 MHz beziehen.

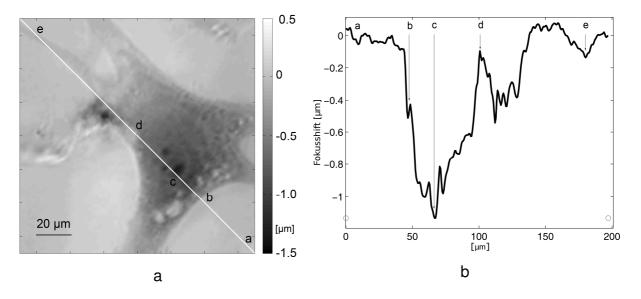


Abbildung 2-15 Fokusshift [86]

Die Abbildung zeigt die Veränderung des Fokus (z₀) über ein Zellprofil humaner Osteoblasten.

- a. Substrat, b. Zytoplasmagrenze, c. Zellkern mit Nukleoli, d. Rand der perinukleären Zone,
- e. Zytoplasmafortsätze und Substrat.
 - a.) Akustische Rastermikroskopie, humaner Osteoblast, Ebene der Fokusverschiebung
 - b.) Fokusshiftschnittbild entlang der Schnittlinie in a.)

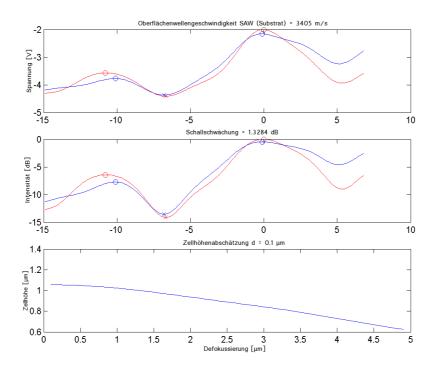


Abbildung 2-16 Zellhöhenbestimmung für d < 1 μm in der Zellperipherie

Roter Kurvenverlauf: Referenzsignal, blauer Kurvenverlauf gemessenes Signal über der ROI. Der Datensatz lässt keine Bestimmung der Zelldicke zu.

Oberflächenwellengeschwindigkeit

Die Oberflächenwellengeschwindigkeit V_{SAW} lässt sich aus der räumlichen Oszillation der Interferenzmaxima Δz (Abbildung 2-7) bestimmen [85].

Es gilt:

$$\frac{1}{\Delta z} = \frac{2f}{v_0} \left(1 - \cos \theta_{SAW} \right) \quad \text{und daraus folgt:}$$
 (2-8)

$$v_{SAW} = \frac{v_0}{\sin \theta_{SAW}} \tag{2-9}$$

f... Anregungsfrequenz [Hz],

*v*₀... Schallgeschwindigkeit im Kopplungsmedium [m/s],

V_{SAW}... Oberflächenwellengeschwindigkeit [m/s],

 z_0 ... Fokusshift [µm],

 θ_{SAW} ... kritischer Winkel zur Erzeugung von Oberflächenwellen [°],

Δz... räumliche Oszillation der Interferenzmaxima.

2.5.4 Messwerte, gespeicherte Parameter

Als Messwerte wurden immer Position und Amplitude des ersten Maximums (konfokales Maximum), des ersten Minimums, des zweiten Maximums (Maximum der Oberflächenwellengeschwindigkeit) und wenn möglich noch des zweiten Minimums registriert (siehe Abbildung 2-6). Zur Auswertung wurden über die Zellen wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben drei ROI gelegt: über die nukleäre Zone, über die perinukleäre Zone und über die periphere Zone. Für diese ROI wurden die jeweiligen Messwerte in Form einer Tabelle archiviert. Als Messdaten wurden gespeichert: Verläufe V(z)-Kurven, die Schallgeschwindigkeit, Dateiname, der Schallschwächung, der Schallschwächungskoeffizient, die Oberflächenwellendes Versuchs in geschwindigkeit, Dauer Wochen, Lokalisation Untersuchungsbereichs in der Zelle, Behandlungsgruppe und die Qualität der Messung. Das Maximalwertbild mit den ausgewählten ROI und ein Bild der V(z)-Kurvenverläufe wurden automatisch als Grafikdatei im *.tif Format gespeichert.

2.5.5 Geräteeinstellungen

Alle Messreihen wurden mit den gleichen Geräteeinstellungen aufgenommen. Als akustischer Wandler verwendeten wir den 0.8 - 1.3 GHz Breitbandwandler (100° Öffnungswinkel, KSI, Herborn, Deutschland) bei einer Arbeitsfrequenz von 900 MHz. In der ELIPS-Steuerungssoftware des SAM 2000 wurden folgende Geräteparameter eingestellt: RF Gain: 100, Offset: 94, Video-Gain: 255 und Gate Position: 90. Die Bildgröße betrug $250 \times 250 \ \mu m$, bei einer Auflösung von 512×512 Bildpunkten. Alle Messungen fanden bei Raumtemperatur ($25 \, ^{\circ}$ C) statt.

2.6 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Mit der CLSM sollte ein quantitatives Verfahren zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration angewendet werden. Für die Kalziumdarstellung wurden die zu untersuchenden Osteoblasten zunächst mit dem unten genannten Farbstoffgemisch beladen. Die Beladung der Zellen erfolgte in HBS [37]. Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fura-Red (2 μΜ) und Fluo-3 (1μΜ), wie von LIPP und NIGGLI [64] beschrieben, verwendet und zusätzlich Pluronic eingesetzt. Die Zugabe von Pluronic sollte das mögliche Ausfällen des Farbstoffes verhindern. Alle Farbstoffe lagen in Form ihrer membrangängigen Acetoxymethylester vor. Es erfolgte die Beladung der Zellen durch Aufnahme des Farbstoffgemischs für 30 min. Danach wurden die Kulturen weitere 30 min in farbstofffreiem HBS bei 37 °C bei Dunkelheit

im Brutschrank inkubiert. Nun wurden die umgebenden Zellkammern entfernt und die Objektträger mit einem Deckglas bedeckt.

Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop (Leica DM IRE2, Leica, Bensheim, Deutschland) bei Raumtemperatur (25 °C). Die Farbstoffe wurden mit einem Argonlaser bei 488 nm angeregt und das Fluoreszenzlicht bei 510-540 nm ("F525", grüner Farbkanal) und 640-670 nm ("F660", roter Farbkanal) erfasst. Als optisches Objektiv wurde das HCX PL APO BL 63.0 x 1.40 Öl-Immersionsobjektiv von Leica verwendet.

Bei einer Messung wurden immer die beiden Farbkanäle rot und grün, sowie das von der Software errechnete Additions- und Verhältnisbild der beiden Farbkanäle aufgezeichnet und archiviert.

2.6.1 Kalziumdarstellung

Um die Untersuchungen vergleichbar zu gestalten, sollten sowohl für die akustische als auch für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung gleiche Zellkulturbedingungen herrschen. Allerdings kann das Zellwachstum unterschiedlichen Substraten beziehungsweise Materialen und Oberflächen nicht als gleich vorausgesetzt werden. Weiterhin spielt bei der Fluoreszenzmikroskopie die Dicke der Zellkulturschalen beziehungsweise Objektträger eine entscheidende Rolle. Aufgrund der relativ kurzen Brennweiten der zur Verfügung stehenden Objektive sind dabei dünne Böden der Objektträger erforderlich. In Vorversuchen mit der akustischen Mikroskopie hat sich andererseits gezeigt, dass der Signalkontrast des akustischen Verfahrens maßgeblich von der Reflexion der Schallwellen am Substrat bestimmt wird (siehe Kapitel 2.5.2), was bei möglichst dicken Böden gegeben ist. Ein für beide bildgebende Verfahren gleichermaßen geeigneter Objektträger konnte nicht gefunden werden. Um dennoch vergleichbare Zellkulturbedingungen zu erhalten, wurden bei beiden Verfahren Zellkulturschalen des Typs Chamber Slides (Lab Tek™ II 154461, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) verwendet, die aus einem Glasobjektträger mit aufgesetzter Zellkulturkammer (ohne Boden) bestand. Für die CLSM-Untersuchungen wurde die Zellkulturkammer entfernt, ein Deckglas aufgesetzt und der Objektträger um 180° gedreht ("hängend") auf den Präparatetisch des Mikroskops gelegt. Da die Vorlaufstrecke nun nur noch aus dem dünnen Deckglas bestand, konnten die CLSM-Untersuchungen mit den zur Verfügung stehenden Objektiven durchgeführt werden.

Mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht direkt gemessen werden, sondern errechnet sich aus der relativen Veränderung der Fluoreszenzintensitäten. Dabei führt ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration bei den verwendeten Farbstoffen zu einer Zunahme der grünen Fluoreszenz (525 nm) und einer gleichzeitigen Abnahme der roten Fluoreszenz (660 nm) und umgekehrt. Die Berechnung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen erfolgt dann über Verhältnis das der (F525/F660). Fluoreszenzintensitäten Zur quantitativen Bestimmung der Kalziumkonzentration ist eine Kalibrierung des Systems notwendig. Die vorhandene Steuerungs- und Auswertungssoftware (Leica, Bensheim, Deutschland) erlaubt eine direkte Kalibrierung der Messergebnisse. Vorrausetzung hierfür ist jedoch, dass die Messdaten auch Werte für die minimale und für die maximale Kalziumanreicherung enthalten und der KD-Wert des Farbstoff-Kalzium-Komplexes bekannt sind. Die Kalziumkonzentration [mM] errechnet sich mit Hilfe der Formel nach GRYNKIEWICZ [39]:

$$[Ca^{2+}] = KD \cdot \frac{Rt - Rt_{\min}}{Rt_{\max} - Rt}$$
(2-10)

Rt... Quotient der Fluoreszenzintensität (F525/F660),

Rt_{max}.. Quotient der Fluoreszenzintensität (F525/F660) bei maximaler Kalziumbeladung,

Rt_{min}.. Quotient der Fluoreszenzintensität (F525/F660) bei minimaler Kalziumbeladung,

KD... Dissoziationskonstante des Farbstoffgemischs = 381 nM (in vitro).

Zur Kalibrierung des Systems ist, wie oben beschrieben, sowohl die Zugabe von kalziumbindenden Stoffen wie Chelatoren als auch von Stoffen, die die Penetration von Kalziumionen in die Zelle fördern (beispielsweise Ionomycin) zu den zu untersuchenden Zellen notwendig. Durch die hängende Probenanordnung war eine Zugabe von Substanzen jedoch nicht möglich. Daher erfolate fluoreszenzmikroskopische Messung als qualitative Kalziummessung. Damit konnten in einer gemessenen Kultur zwar Änderungen der Kalziumverteilung innerhalb einer Zelle werden, ein quantitativer insbesondere dargestellt Vergleich, von unterschiedlichen Versuchen oder Versuchsgruppen, ist aber mit dieser Methode nicht möglich.

<u>Ergebnisse</u>

3 ERGEBNISSE

3.1.1 Vorversuche, Wahl des Substrats

Durch verschiedene Vorversuche konnten wir feststellen, dass die Osteoblasten auf nahezu allen Oberflächen wie unbeschichtetem Kunststoff, Glas, beschichteten Membranen oder biologischen Oberflächen wie Fischschuppen gut wachsen. Um ihnen möglichst natürliche Wachstumsbedingungen zu ermöglichen, wurde zunächst ein Substrat aus Fischschuppen vom Hecht (Esox lucius) gewählt. Fischschuppen sollten sich gut als Substrat für eine Osteoblastenkultur eignen, da diese, wie zum Beispiel an der Seebrasse (Pagrus major) gezeigt, reich an Kollagen Typ I sind [50] und somit naturnahe Wachstumsbedingungen ermöglichen. Weiterhin können Fischschuppen in erster Näherung als ebene Fläche betrachtet werden, und sie schienen damit gut als Substrat für die Untersuchungen mit dem akustischen Rastermikroskop geeignet. Zur Aufbereitung wurden die Fischschuppen gesäubert und in 60-prozentigem Alkohol gespült, anschließend bei 80 ℃ im Wasserbad erhitzt. Nach NAGAI et al. beginnt bei der Japanischen Sardine (Sardinops melanostictus) jedoch bereits ab 25 °C der Denaturierungsprozess des Kollagens, bei zirka 40 °C ist das Kollagen der Fischschuppen nahezu vollständig denaturiert [75], was vermutlich auch auf Esox lucius zutrifft. Die Fischschuppen als Substrat stellten sich schließlich jedoch als nicht praktikabel heraus, da sie sich nur schwer hinreichend steril aufbereiten ließen, ohne dabei das Kollagen zu denaturieren. Es kam folglich zum Keimbefall der Osteoblastenkultur. Weiterhin erwies sich die Oberfläche dachziegelartig aufgebauten Fischschuppen SAMder für Untersuchungen als nicht hinreichend eben.

Auch mit Kollagen beschichtete oder unbeschichtete Membranen (zum Beispiel Tissue Culture Insert, Anopore Membran, Nunc 136773, Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland), als ein der natürlichen Umgebung angepasstes Substrat, brachten in der Darstellung mit dem akustischen Rastermikroskop leider nicht den gewünschten Erfolg. Es entstand ein sehr kleines Substratsignal, so dass das Cell-Analysis-Verfahren nicht angewendet werden konnte. Günstig erwiesen sich dagegen unbeschichtete Glasobjektträger. Diese eigneten sich besonders gut zur Kultivierung der Zellen, und das akustische Signal war gut darstellbar. Zudem wies der Untergrund vernachlässigbar geringe Unebenheiten auf. Die so entstandenen Bilder (Abbildung 3-1) zeigten die untersuchten Zellen in hoher Detaildichte und

gutem Kontrast bei guter Auflösung der subzellulären Strukturen und nahezu ohne Interferenzringe (vergleiche mit Abbildung 1-1).

3.2 Morphologie der Zellen

Mit allen verwendeten mikroskopischen Verfahren konnten die Zellen und zum Teil auch deren subzelluläre Strukturen gut aufgelöst werden. Es fiel auf, dass die meisten am Substrat anhaftenden Zellen eine längliche teilweise auch polygonal verbreiterte Form haben. Im Verlauf der Kultivierung nahm bei der Mehrzahl der Zellkulturen die Zellzahl zu. Zellkulturen, bei denen keine Proliferation auftrat, waren möglicherweise verunreinigt oder durch Keimbefall geschädigt und wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Innerhalb der Zellen kann man verschiedene subzelluläre Strukturen wie der Zellkern (Abbildung 3-1, Abbildung 3-2) mit Nukleoli (Abbildung 3-1, Abbildung 3-2), Anteile des Zytoplasmas und auch Zellfortsätze als Kontakt zu anderen Zellen erkennen. Weiterhin zeigen manche Zellen innerhalb des Zytoplasmas deutlich sichtbare Granulationen (vergleiche Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2). In Gebieten mit Granulationen ändern sich die gemessenen akustischen Parameter gegenüber dem reinen Zytoplasma. Oftmals fallen insbesondere die größeren Granulationen durch Verringerung der Schallschwächung auf. Weiterhin lässt sich aber auch. insbesondere bei den kleinen eher scholligen Granulationen (vergleiche Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4) eine Erhöhung der Schallschwächung feststellen. Die Granulationen sind in allen Versuchsgruppen teilweise in unterschiedlicher sichtbar. Auch in der fluoreszenz- und Ausprägung lichtmikroskopischen Untersuchung kamen sie zur Darstellung (Abbildung 3-3, Abbildung 3-15). In einem Stimulationsversuche Teil zeigen sich diskrete Umverteilungen Granulationen. Nach Stimulation mit Vitamin D₃ erscheinen die Granulationen sehr stark um den Zellkern verdichtet und grobschollig. In den Zellen, die mit Ascorbinsäure stimuliert wurden, stellen sich die Granulationen feiner und großflächiger über das Zytoplasma verteilt dar. Die Kombinationsstimulation erbrachte oftmals ebenfalls eine eher großflächigere Verteilung der Granulationen.

Die Auflösung des akustischen Rastermikroskops mit der zur Verfügung stehenden akustischen Linse gestattet keine Auswertung der akustischen Eigenschaften einzelner Granula.

Abbildung 3-4 zeigt eine Zusammenstellung der Schallschwächungsbilder über einen Zeitraum von zwei Wochen der einzelnen Versuchsgruppen. Mit Ausnahme der Granulationen sind keine deutlichen morphologischen Veränderungen der unterschiedlichen Versuchsgruppen sowohl fluoreszenz- und lichtmikroskopisch als auch mit der akustischen Mikroskopie auffällig.

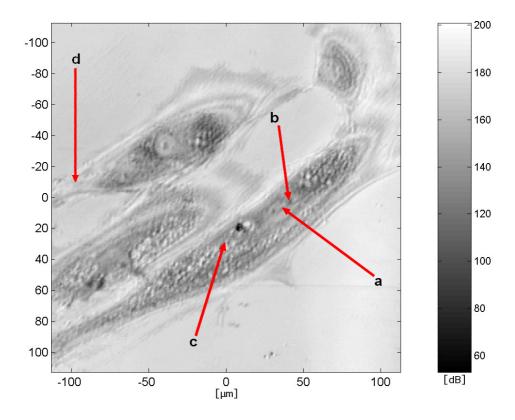


Abbildung 3-1 Konfokales Maximum, Maximalwertbild

Humane Osteoblasten dargestellt mit akustischer Rastermikroskopie, konfokales Maximum. Kulturdauer 1 Woche, Stimulation mit Ascorbinsäure. 250 x 250 μm, a.) Zellkern b.) Nukleolus, c.) Zytoplasma, d.) Zellfortsatz

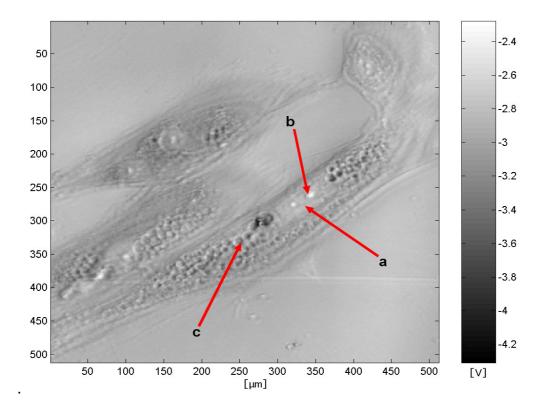


Abbildung 3-2 Interferenzmaximum vom Substrat- und Oberflächenwellen-Echo Humane Osteoblasten dargestellt mit akustischer Rastermikroskopie, Kulturdauer 1 Woche, Stimulation mit Ascorbinsäure. 250 x 250 μm, a.) Zellkern, b.) Nukleolus, c.) Zytoplasma

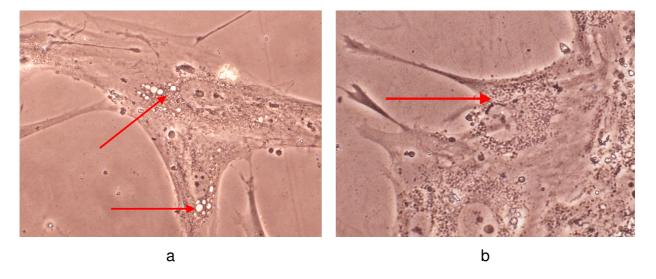


Abbildung 3-3 Lichtmikroskopie, Granulationen und vesikuläre Strukturen

Lichtmikroskopie, 40x Vergrößerung, 1. Woche a. Stimulation mit Ascorbinsäure, b. Stimulation mit Vitamin D_3 , Pfeile markieren die zum Teil vakuolenartigen Granulationen um den Zellkern. Diese sind nach Stimulation mit Vitamin D_3 sehr grobschollig und perinukleär verdichtet angeordnet.

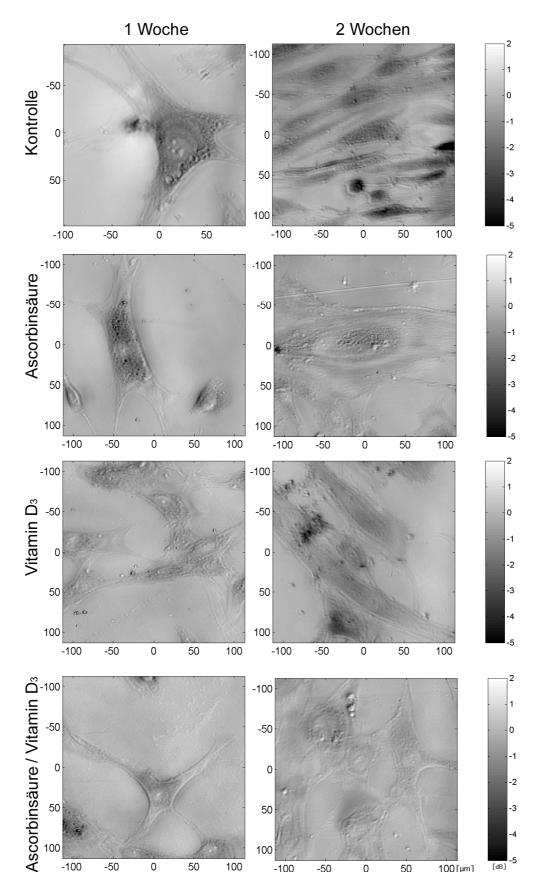


Abbildung 3-4 Schallschwächungsbilder [86]

Darstellung der Interferenzmaxima von Substrat- und Oberflächenwellenreflexionen der Stimulationsversuche über zwei Wochen, 250 x 250 μm. Die räumliche Ausdehnung ist in [μm] angegeben, die Grauwertskala entspricht der Schallschwächung in [dB].

3.3 Akustische Rastermikroskopie

3.3.1 Zelldicke

Die Zelldicke wurde aus den Maximalwertsignalen durch Vergleich des Referenzsignals $V_{ref}(z)$ beziehungsweise des Zellsignals $V_{cell}(z)$ in den spezifischen ROI bestimmt (siehe Kapitel 2.5.3). Dargestellt ist die Veränderung der Zelldicke in der nukleären und perinukleären Zone. Da mit dem Cell-Analysis-Verfahren nur Zelldicken von d > 1 µm zuverlässig bestimmt werden können, dieser Wert in der Zellperipherie jedoch häufig unterschritten wird, stammen die aus dieser Region ausgewerteten Daten von einer (nicht repräsentativen) Auswahl sehr dicker Zellen. Auf ihre Darstellung wird daher im weiteren Verlauf verzichtet.

Als nächstes wurde geklärt, ob ein Einfluss der Zellkulturdauer auf die morphologischen und akustischen Zellparameter nachweisbar ist. Dazu wurden zunächst die Stimulationsgruppe und die ROI ausgesucht, bei denen in allen drei Kulturwochen ausreichend viele Untersuchungen an nicht konfluent gewachsenen Zellen vorhanden waren. Dies trifft für die Ascorbinsäurestimulation und die perinukleäre Zone zu. Hier ändert sich die mittlere Zelldicke während der gesamten Kulturdauer nur unwesentlich (Abbildung 3-5). Dies traf auch für die Stimulation mit Vitamin D₃ und die Kombinationsstimulation zu (Daten nicht gezeigt). Daher wurde die Kulturdauer in die folgenden Auswertungen bewusst nicht mit einbezogen.

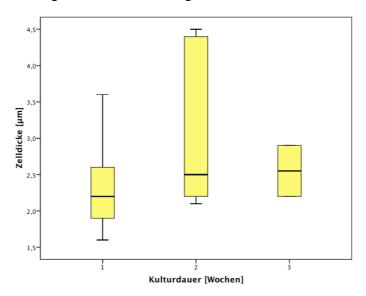


Abbildung 3-5 Zelldicke in Abhängigkeit der Kulturdauer der perinukleären Zone, Ascorbinsäurestimulation

In allen Boxplots sind der Median als waagerechte schwarze Linie und die 25 beziehungsweise 75 % Perzentile dargestellt. Die kleinen Kreise zeigen so genannte *outliers* (Ausreißer) an – Werte, die mehr als 1,5 Box-Längen vom 75. Perzentil entfernt liegen. Die dünnen, waagrechten Striche zeigen

die höchsten und niedrigsten beobachteten Werte, die keine Ausreißer sind. Aufgrund der teilweise geringen Fallzahlen wurden die Ausreißer bewusst mit dargestellt.

	nukleäre Zone					perinukleäre Zone					
	N	\overline{x} [µm]	Max. [μm]	Min. [μm]	σ [μm]	N	\overline{x} [µm]	Max. [μm]	Min. [μm]	σ [μm]	
Kontrolle	10	2,61	4,5	1,6	0,84	11	3,26	4,9	1,6	1,22	
Ascorbinsäure	17	2,61	4,3	1,5	1,00	18	2,58	4,5	1,6	0,83	
Vitamin D ₃	6	2,03	2,6	1,1	0,51	6	2,05	2,6	1,1	0,53	
Kombination	4	2,97	4,4	2,0	1,02	5	2,48	4,0	1,3	1,01	

Tabelle 1 Zelldicke

Vergleicht man die mittleren Zelldicken der verschiedenen ROI, ergibt sich folgendes Bild: In der Kontrollgruppe ist die mittlere Zelldicke der perinukleären Zone etwas größer als in der nukleären Zone, der Unterschied ist nicht signifikant (ANOVA F = 1,9; p = 0,17). Die nukleären beziehungsweise perinukleären Zelldicken waren für das jeweilige Stimulans (Ascorbinsäure, Vitamin D_3) nahezu identisch. Bei der Kombinationsstimulation war die mittlere Zelldicke in der perinukleären Zone gegenüber der nukleären Zone nicht signifikant vermindert (Tabelle 1).

Bei der Auswertung des Einflusses der unterschiedlichen Stimulanzien auf die Zelldicke ergaben sich für die nukleäre Zone bei den mit Ascorbinsäure und Vitamin D₃ stimulierten Zellen kaum Veränderungen zur Kontrollgruppe. Bei der Kombinationsstimulation nahm die Zelldicke geringfügig zu. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Abbildung 3-6).

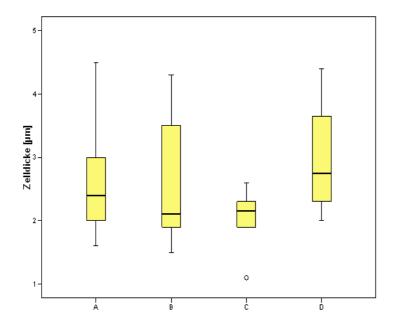


Abbildung 3-6 Zelldicke der verschiedenen Stimulationsgruppen in der nukleären Zone

Die folgenden Diagramme sind wie folgt bezeichnet A: Kontrolle, B: Ascorbinsäure, C: Vitamin D_3 , D: Kombination aus Ascorbinsäure und Vitamin D_3 .

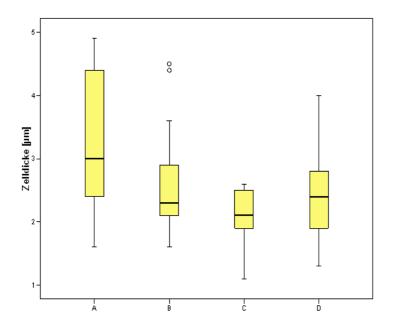


Abbildung 3-7 Zelldicke der verschiedenen Stimulationsgruppen der perinukleären Zone

In der perinukleären Zone ist die mittlere Zelldicke in den stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe generell vermindert. Sie ist bei den mit Vitamin D₃ stimulierten Zellen am kleinsten und nähert sich bei der Kombinationsstimulation wieder dem Wert bei Ascorbinsäurestimulation (Abbildung 3-7). Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Vitamin D₃-stimulierten Zellgruppe ist signifikant

(ANOVA F = 5.2, p = 0.03). Es trat eine Verminderung um 37 % gegenüber der Kontrollgruppe auf. Bei der Stimulation mit Ascorbinsäure wurde das Signifikanzniveau von 0.05 knapp verfehlt (ANOVA F = 3.1, p = 0.08). Die Verminderung beträgt hier 21 %.

3.3.2 Schallgeschwindigkeit

Um eine zeitliche Abhängigkeit der Schallgeschwindigkeit zu untersuchen wurden erneut als Referenzdaten die Ascorbinsäurestimulation und die perinukleäre ROI gewählt (siehe Kapitel 3.3.1). Die mittlere Schallgeschwindigkeit nimmt zunächst in der zweiten Kulturwoche leicht zu, um dann in der dritten Kulturwoche unter das Ausgangsniveau der ersten Kulturwoche abzufallen. Die Unterschiede sind nicht signifikant (Abbildung 3-8). Dies traf ebenfalls auf die Vitamin D₃ Stimulation und Kombinationsstimulation zu. Daher wurde auch hier die Kulturdauer für die folgenden Auswertungen nicht berücksichtigt.

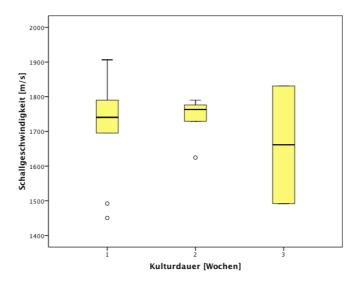


Abbildung 3-8 Schallgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Kulturdauer der perinukleären Zone, Ascorbinsäurestimulation

	nukleäre Zone					perinukleäre Zone						
	N	\overline{x} [m/s]	Max. [m/s]	Min. [m/s]	σ [m/s]	N	\overline{x} [m/s]	Max. [m/s]	Min. [m/s]	σ [m/s]		
Kontrolle	7	1706,8	1884,6	1591,5	93,1	9	1634,5	1734,9	1492,0	81,4		
Ascorbinsäure	12	1710,5	1893,7	1455,6	148,5	16	1715,7	1906,4	1450,6	133,9		
Vitamin D ₃	3	1783,7	1836,3	1751,5	45,9	5	1767,1	1865,0	1695,5	65,8		
Kombination	3	1696,0	1778,9	1559,8	118,8	3	1628,2	1740,7	1492,0	126,0		

Tabelle 2 Schallgeschwindigkeit

Vergleicht man die Schallgeschwindigkeiten in der nukleären und perinukleären Zone, so ergibt sich für die vier Untersuchungsgruppen ein heterogenes Bild: Während sich in der Kontrollgruppe und der Kombinationsstimulation die mittlere Schallgeschwindigkeit in der perinukleären Zone gegenüber der nukleären Zone nicht signifikant verringert, ist diese bei den Stimulationen mit Ascorbinsäure und Vitamin D₃ nahezu gleich (Tabelle 2).

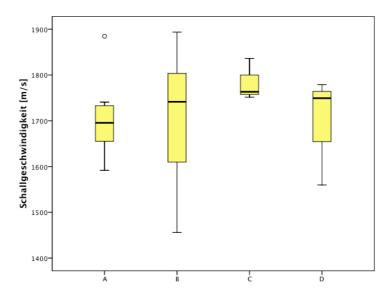


Abbildung 3-9 Schallgeschwindigkeit vs. Stimulation in der nukleären Zone

In der nukleären Zone ist die mittlere Schallgeschwindigkeit der unterschiedlich stimulierten Zellen generell gegenüber der Kontrolle erhöht. Der Anstieg ist bei der Vitamin D₃ Stimulation am größten. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 3-9).

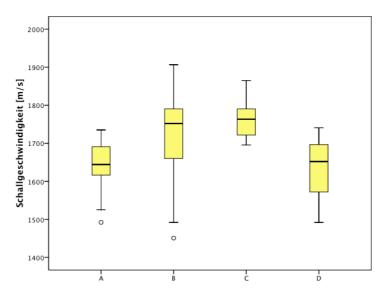


Abbildung 3-10 Schallgeschwindigkeit vs. Stimulation in der perinukleären Zone

Auch in der perinukleären Zone sind die Schallgeschwindigkeiten der stimulierten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöht. Eine Ausnahme bildet hier die Kombinationsstimulation. Insbesondere bei der Vitamin D_3 Stimulation erhöhte sich die mittlere Schallgeschwindigkeit um 8 % gegenüber der Kontrollgruppe. Der Unterschied ist signifikant (ANOVA F = 9.6, p = 0.009, Abbildung 3-10).

3.3.3 Schallschwächung

Bei der Untersuchung des Schallschwächungskoeffizienten in Abhängigkeit der Kulturdauer ließen sich erneut keine signifikanten Veränderungen nachweisen. Der mittlere Schallschwächungskoeffizient verminderte sich zwischen der ersten und zweiten Kulturwoche, danach trat ein Anstieg über das Niveau von Woche eins auf (Abbildung 3-11) ohne dass Signifikanz erreicht wurde. Für die folgenden Ergebnisse wurde daher wiederum auf die Auswirkung des Einflusses der Kulturdauer verzichtet.

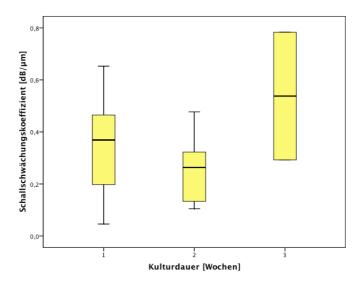


Abbildung 3-11 Schallschwächungskoeffizient in Abhängigkeit der Kulturdauer der perinukleären Zone, Ascorbinsäurestimulation

	nukleäre Zone					perinukleäre Zone					
	N	\overline{X} [db/ μ m]	Max. [db/μm]	Min. [db/μm]	σ [db/μm]	N	$\frac{\overline{\chi}}{\chi}$ [db/ μ m]	Max. [db/μm]	Min. [db/μm]	σ [db/μm]	
Kontrolle	10	0,21	0,54	0,03	0,15	11	0,25	0,59	0,03	0,18	
Ascorbinsäure	11	0,27	0,53	0,01	0,14	18	0,33	0,78	0,04	0,20	
Vitamin D ₃	6	0,23	0,56	0,05	0,21	6	0,34	0,65	0,16	0,18	
Kombination	5	0,38	0,62	0,14	0,19	5	0,47	0,77	0,30	0,19	

Tabelle 3 Schallschwächungskoeffizient

Der mittlere Schallschwächungskoeffizient ist in allen Untersuchungsgruppen in der perinukleären Zone gegenüber der nukleären Zone nicht signifikant erhöht (Tabelle 3).

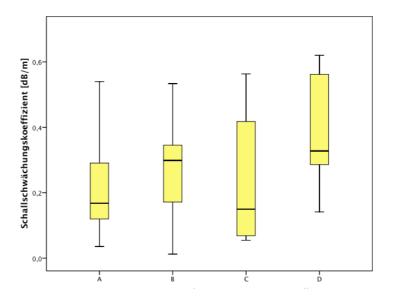


Abbildung 3-12 Schwächungskoeffizient vs. Stimulation in der nukleären Zone

Bei den unterschiedlichen Stimulationen ergibt sich für den Schwächungskoeffizienten ein uneinheitliches Bild. In der nukleären Zone traten die höchsten Abweichungen von der Kontrolle in der Ascorbinsäure- beziehungsweise Kombinationsstimulation auf. In der Vitamin D_3 -Versuchsgruppe wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe nahezu keine Veränderung festgestellt. Das Signifikanzniveau $p \le 0,05$ wurde bei keiner Stimulation erreicht (Abbildung 3-12).

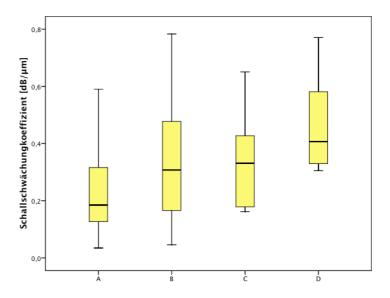


Abbildung 3-13 Schwächungskoeffizient vs. Stimulation in der perinukleären Zone

<u>Ergebnisse</u>

In der perinukleären Zone erhöht sich der mittlere Schwächungskoeffizienten bei allen Stimulationen. Der höchste Wert (Steigerung um 88 % im Vergleich zur Kontrollgruppe) wurde in der Kombinationsstimulation gemessen. Dieser Unterschied ist signifikant (ANOVA F=4.9, p=0.04, Abbildung 3-13). Bei Stimulation mit Ascorbinsäure und Vitamin D_3 traten vergleichbare mittlere Schallschwächungskoeffizienten auf.

3.4 Konfokale Laserscanningmikroskopie

Die Untersuchungen mit konfokaler Laserscanningmikroskopie wurden wie bei den akustischen Messungen an nichtstimulierten Zellen (Kontrolle) beziehungsweise mit Ascorbinsäure, Vitamin D₃ sowie der Kombination aus Ascorbinsäure und Vitamin D₃ stimulierten Zellen durchgeführt. Abbildung 3-14a, b zeigen einen stimulierten humanen Osteoblasten bei zwei verschiedenen Fluoreszenzwellenlängen. Die Farbintensität gibt Aufschluss über die Kalziumkonzentration. Aus diesen Rohbildern werden durch Addition beziehungsweise Division der Farbsignale neue Bilder berechnet. Abbildung 3-15a zeigt das Additionsbild, Abbildung 3-15b das Verhältnisbild. Ein hoher Kalziumgehalt wird in Abbildung 3-15a durch eine intensive gelbe Farbe und in Abbildung 3-15b durch eine intensive grüne Farbe dargestellt.

Fluoreszenzmikroskopisch wiesen die Osteoblasten sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den stimulierten Zellen charakteristische abgrenzbare Bereiche unterschiedlichen Kalziumgehalts auf. Der nukleäre Bereich hatte jeweils einen relativ geringen Kalziumgehalt, perinukleär schloss sich ein Gebiet höheren Kalziumgehalts an. In der Zellperipherie folgte wieder ein Bereich mit geringerem Kalziumgehalt (siehe Abbildung 3-15a). Im äußersten Randbereich der Zelle können keine Aussagen über die Kalziumverteilung getroffen werden, da hier die zytoplasmatische Farbstoffaufnahme unzureichend ist. Diese unterschiedliche Kalziumverteilung veranlasste uns, die Zellen zur Auswertung mit der akustischen Rastermikroskopie in die drei bereits bekannten ROI zu gliedern: Die nukleäre Zone, die perinukleäre Zone und die periphere Zone.

Durch die fluoreszenzmikroskopischen Bilder konnten innerhalb der Zellen verschiedene subzelluläre Strukturen mit unterschiedlichem Kalziumgehalt aufgelöst werden. In vielen Zellen ließen sich Granulationen nachweisen, deren Kalziumgehalt häufig höher als der der Umgebung war (Abbildung 3-15a oberer Pfeil).

Ein quantitativer Nachweis von Kalziumkonzentrationsänderungen sowohl zwischen den Versuchsgruppen als auch versuchsdauerabhängig war allerdings nicht möglich, da wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben der gewählte Versuchsaufbau mit der hängenden Probenaufnahme die notwenige Kalibrierung des Systems durch die Zugabe von Stoffen wie beispielweise Chelatoren oder Ionophoren nicht zuließ.

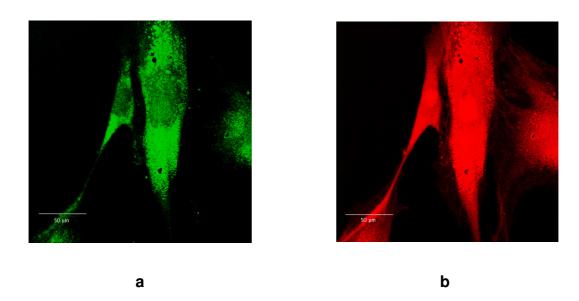
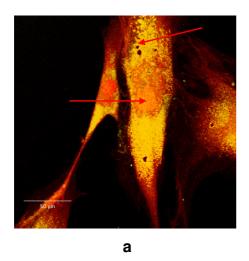


Abbildung 3-14 Konfokale Laserscanningmikroskopie a: grüner und b: roter Kanal Humane Osteoblasten, Ascorbinsäure, erste Versuchswoche, Vergrößerung 63x

- a.) Abgebildet sind die Emissionen des Fluoreszenzfarbstoffs im Bereich des grünen Lichts. Grün dargestellt sind Orte erhöhter Kalziumkonzentration. Die nukleäre Zone weist eine geringere Kalziumkonzentration als die umgebende perinukleäre Zone auf. In der Zellperipherie ist die Kalziumkonzentration deutlich geringer.
- b.) Darstellung des emittierten roten Lichts. Je größer die Farbintensität ist, umso geringer ist die Kalziumkonzentration. Der Zellkern ist als Gebiet geringer Kalziumkonzentration zu erkennen, perinukleär ist die Kalziumkonzentration höher.



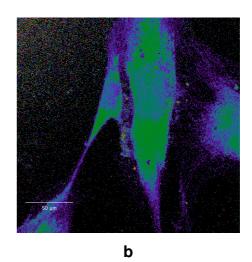


Abbildung 3-15 Konfokale Laserscanningmikroskopie a: Additionsbild, b: Verhältnisbild

Humane Osteoblasten, Ascorbinsäure, erste Versuchswoche, Vergrößerung 63x

- a.) Additionsbild der beider Einzelkanäle aus Abbildung 3-14. Rote gefärbte Zellanteile zeigen Bereiche niedriger, gelbe erhöhter Kalziumkonzentration. Deutlich erkennbar sind Granulationen in der perinukleären Zone (Pfeil oben). Der Zellkern stellt sich als Bereich geringer Kalziumkonzentration dar (Pfeil unten).
- b.) Verhältnisbild der beiden Einzelkanäle aus Abbildung 3-14. Die grüne Farbe stellt Bereiche hoher, die blaue Farbe Bereiche niedriger Kalziumkonzentration dar.

Diskussion

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden stimulierte humane Osteoblasten mit der akustischen Rastermikroskopie und der konfokalen Laserscanningmikroskopie untersucht. Insgesamt wurden mehr als 11.000 Einzelbilder mit dem MLA-Verfahren aufgenommen. Dem entsprechen mehr als 450 Datensätze gemessener Zellen. Unter Berücksichtigung der Ausschlusskriterien (siehe Kapitel 2.5.2) gelangten etwa 200 Datensätze in die statistische Auswertung. Die Gründe für die Datenreduktion sind die zum Teil zu geringe Zelldicke insbesondere in der Zellperipherie und eine nicht ausreichende Qualität und Homogenität der Daten.

Mit der akustischen Rastermikroskopie wurden folgende Zellparameter bestimmt und ausgewertet:

- Zelldicke,
- Schallgeschwindigkeit,
- Schallschwächungskoeffizient.

Die Osteoblasten wurden über einen Zeitraum von drei Wochen kultiviert. Es wurde untersucht, ob sich die obigen Parameter durch die Stimulation der Zellen mit Ascorbinsäure und Vitamin D₃ sowie der Kombinationsstimulation aus den beiden Substanzen verändern.

Für das Cell-Analysis-Verfahren wurden die obigen Parameter in drei ausgewählten ROI bestimmt:

- ROI 1: nukleäre Zone,

- ROI 2: perinukleäre Zone,

- ROI 3: periphere Zone.

Kulturdauer

Obwohl eine Versuchsdauer von mehr als drei Wochen geplant war, zeigte es sich, dass nach drei Wochen ein großer Teil der Kulturen konfluent gewachsen waren und deshalb nicht mehr ausgewertet werden konnten. Osteoblastenkulturen wurden zwar in anderen Studien über längere Versuchszeiträume untersucht [18,19,101,102], die Grundvoraussetzung der nicht-konfluenten Zellkultur war in diesen Studien jedoch nicht erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit konnten für die verschiedenen Kulturdauern keine signifikanten Unterschiede der morphologischen und akustischen Parameter Zelldicke, Schallgeschwindigkeit und Schallschwächung sowohl in der nukleären als

perinukleären Zone sowie für die unterschiedlichen Stimulationen auch nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entsprach zunächst nicht den Erwartungen. Allerdings konnte wegen der unsterilen akustischen Messungen die zeitliche Entwicklung der akustischen und zellulären Eigenschaften ein und derselben Zellkultur beziehungsweise Zelle nicht verfolgt werden. Desweiteren kommt es während der mehrwöchigen Kultivierung zur Zellteilung, deren Rate durch die Stimulanzien teilweise sogar erhöht werden kann [70]. Obwohl immer Zellen mit deutlich sichtbarem Zellkern und dem typischen Soma ausgewählt wurden, entsprach letztendlich das tatsächliche Alter der untersuchten Zelle nicht notwendigerweise der Kultivierungsdauer. In der dritten Versuchswoche traten bei der Schallgeschwindigkeit und -schwächung scheinbar deutliche Änderungen auf (Abbildung 3-8, Abbildung 3-11), diese können jedoch nicht als repräsentativ angesehen werden, da durch die oftmals konfluent gewachsenen Zellen nur insgesamt Messwerte von zwei Kulturen für die Ascorbinsäurestimulation der perinukleären Zone erhoben werden konnten.

Zelldicke

Die in der nukleären und perinukleären Zone gemessenen Zelldicken entsprechen den aus morphologischer Sicht erwarteten Werten um 3 µm [11]. Einschränkungen gibt es bei der Bestimmung der Zelldicke in der Zellperipherie, weil mit dem Cell-Analysis-Verfahren nur Zelldicken größer 1 µm sicher erfasst werden können. Da die zu erwartenden peripheren Zelldicken auch kleiner als 1 µm sein können, wurde auf eine Zelldickenbestimmung in dieser ROI verzichtet. Daraus folgt, dass sowohl die Schallgeschwindigkeit als auch der Schallschwächungskoeffizient in der peripheren Zone nicht angegeben werden können.

Die Zelldicke in der nukleären Zone verändert sich bei den verschiedenen Stimulanzien nicht signifikant. Eine leichte Erhöhung trat in der Kombinationsstimulation auf. In der perinukleären Zone nahm die Zelldicke bei allen Stimulanzien gegenüber der Kontrollgruppe ab. Insbesondere war die Abnahme der Zelldicke bei den mit Vitamin D₃ stimulierten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant. Die Zelldickenabnahme in der perinukleären Zone war so nicht zu erwarten. Möglicherweise ist sie auch Folge eines strukturellen Umbaus der Zellen bedingt durch eine Kalziumeinlagerung (siehe unten).

Diskussion

Schallgeschwindigkeit

Die Veränderungen der Schallgeschwindigkeit waren nach den verschiedenen Stimulationen gegenüber der Kontrollgruppe in der nukleären Zone insgesamt sehr gering. Bei keiner der gemessenen Größen konnte das Signifikanzniveau p ≤ 0,05 erreicht werden. Die Absolutwerte der Schallgeschwindigkeiten sind mit einer Ausnahme (Ascorbinsäurestimulation) größer als in der perinukleärern Zone. Dies könnte auf die deutlich höhere Dichte des Zellkerns gegenüber dem umgebenden Soma aufgrund des unterschiedlichen Protein- und DNA-Gehaltes zurückzuführen sein [71]. Dadurch sind im Bereich des Zellkerns höhere Schallgeschwindigkeiten als in der perinukleären Zone zu erwarten. Dies wurde in der vorliegenden Untersuchung bestätigt. Da Schallgeschwindigkeitsuntersuchungen an humanen Osteoblasten bisher nicht bekannt sind, wurden zur Einordnung der ermittelten Schallgeschwindigkeiten isolierte DNA [26,43] beziehungsweise Muskelzellen [10] herangezogen. Gegenüber den Literaturwerten anderer Zelluntersuchungen sind die gemessenen Schallgeschwindigkeiten in der vorliegenden Untersuchung generell erhöht [7,100]. Für die nukleären Schallgeschwindigkeiten gibt es zum Vergleich nur Daten von isolierter DNA, deren Schallgeschwindigkeit gegenüber den vorliegenden Untersuchungen größer ist. Allerdings kann der direkte Vergleich der Werte von isolierter DNA zu der nukleären Region einer intakten Zelle in vitro beziehungsweise bei der unterschiedlichen Zellart bestenfalls als Orientierung betrachtet werden. Es dass die Varianz der in der Literatur kommt hinzu, angegebenen Schallgeschwindigkeiten sehr groß ist.

Die größten Veränderungen der Schallgeschwindigkeit nach den verschiedenen Stimulationen traten in der perinukleären Zone der Osteoblasten auf. Bei der Stimulation mit Vitamin D₃ wurde eine signifikante Erhöhung der Schallgeschwindigkeit beobachtet. Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten zytoplasmatischen Schallgeschwindigkeiten sind gegenüber den in der Literatur für Muskelzellen angegebenen [10] generell erhöht. Möglicherweise ist dies auf die bei den Osteoblasten perinukleär sowohl lichtmikroskopisch als auch mit akustischer Rastermikroskopie beobachtete Ansammlung von Granulationen zurückzuführen (Abbildung 3-2, Abbildung 3-3). Aufgrund der unterschiedlichen Zellart ist der Vergleich jedoch erneut nur orientierend zu betrachten.

Eine abweichende Schallgeschwindigkeit resultiert vermutlich aus einer veränderten Elastizität des beschallten Zellvolumens und kann mit einer

Veränderung der Dichte verbunden sein. Es ist also anzunehmen, dass insbesondere durch die Stimulation mit Vitamin D₃ ein deutlicher Elastizitätsunterschied gegenüber der Kontrollgruppe auftritt.

Schallschwächungskoeffizient

Für den Schallschwächungskoeffizienten ergibt sich in der nukleären Zone bei den verschiedenen Stimulationen kein einheitliches Bild. Insbesondere eine Stimulation mit Ascorbinsäure bewirkt eine Zunahme des Schallschwächungskoeffizienten. Diese bestätigt sich auch in der Kombinationsstimulation. Dagegen tritt bei einer Stimulation mit Vitamin D₃ keine Veränderung auf. In der perinukleären Zone stellt sich ein anderes Bild dar: Bei den stimulierten Zellen erhöht sich der Schwächungskoeffizient jeweils in etwa gleicher Weise. Die höchste Schallschwächung wurde bei der Kombinationsstimulation ermittelt. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war dabei signifikant.

Eine Veränderung der Schallschwächung kann aus einer strukturellen Veränderung der subzellulären Morphologie, zum Beispiel durch Änderung des makromolekularen Aufbaus auch durch eine kalziumbedingte Strukturänderung, resultieren.

Morphologie

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die stärksten Änderungen der gemessenen Parameter in der perinukleären Zone auftraten. Möglicherweise führen die Stimulationen hier zu den deutlichsten strukturellen Umbauten in der Zelle. Worin diese bestehen, kann nur vermutet werden. Denkbar wären Veränderungen im Aufbau zusätzliche des Zytoskeletts, eine Kalziumspeicherung Endoplasmatischen Retikulum beziehungsweise in den Mitochondrien oder eine Kalziumabscheidung in den Raum zwischen Zelle und Substrat. Letzteres ließe eine Änderung der akustischen Eigenschaften über die gesamte Zelle erwarten, die nachgewiesen werden konnte. Daher ist eine mögliche iedoch nicht Kalziumspeicherung innerhalb der Zelle anzunehmen. Wie WALI et al. zeigten, erhöht sich bei Kurzzeitstimulationsversuchen die zytoplasmatische Kalziumkonzentration von 61 nM auf 119 nM [97]. Es kann jedoch mit hoher Sicherheit angenommen Langzeitstimulation werden. dass eine nicht zu einer Erhöhuna zytoplasmatischen Kalziumkonzentration führt, da innerhalb der Zelle keine

Diskussion

unphysiologisch hohen Kalziumkonzentrationen entstehen dürfen, um das zelluläre Gleichgewicht nicht zu gefährden.

Morphologisch wurde unter den Stimulationen eine Umverteilung und Veränderung der Struktur der Granulationen in der Zelle beobachtet (Kapitel 3.2). Es zeigte sich bei einer Stimulation mit Ascorbinsäure und der Kombinationsstimulation ein ähnliches Bild (großflächige Verteilung, feine Granula), das sich von der (verdichtete Stimulation mit Vitamin D₃ deutlich unterschied grobscholliger Granula um den Zellkern). Betrachtet man unter diesem Gesichtspunkt die festgestellten Veränderungen von Schallgeschwindigkeit und schwächung, so können diese durch die morphologischen Änderungen nicht ausreichend erklärt werden, denn die Veränderung dieser Parameter betraf in vergleichbarer Weise die Stimulationen mit Ascorbinsäure und Vitamin D₃, während bei der Kombinationsstimulation Abweichungen auftraten (Abbildung 3-10, Abbildung 3-13). Allerdings ist die Fallzahl bei den Kombinationsstimulationen gering. Daher sollten diese Aussagen durch weiterführende Untersuchungen überprüft werden. Die Untersuchungen mit der konfokalen Laserscanningmikroskopie lassen den Schluss zu, dass die Granula Orte erhöhter Kalziumkonzentration sein könnten. Die von McClary [70] beschriebene Konstanz der Zellmorphologie unter Stimulation mit Ascorbinsäure konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

Die räumliche Anordnung der stärksten Veränderungen der morphologischen und der akustischen Eigenschaften fand sich, wie oben beschrieben, in der perinukleären Zone. Dort ist das Endoplasmatische Retikulum als der größte interne Kalziumspeicher der Zelle lokalisiert, während die Mitochondrien, ebenfalls ein zellulärer Kalziumspeicher, im Allgemeinen eher über das gesamte Zytosol verteilt sind. In dieser Zone könnte durch die Stimulation eine zusätzliche Kalziumeinlagerung im Endoplasmatischen Retikulum stattgefunden haben. Dies wird durch die fluoreszenzmikroskopischen Bilder unterstützt.

Cell-Analysis-Verfahren

Das Cell-Analysis-Verfahren wurde für die Bestimmung der morphologischen (Zelldicke) und akustischen Parameter (Schallgeschwindigkeit und Schallschwächungskoeffizient) entwickelt. Insbesondere bei den Schwächungsbildern werden die Zellkonturen gut aufgelöst und störende

Interferenzringe treten kaum auf (vergleiche Abbildung 1-1 und Abbildung 3-4). In der nukleären und perinukleären Zone können die morphologischen und akustischen Zellparameter sicher bestimmt werden. Allerdings ist das Verfahren nur bei Zelldicken d > 1 µm anwendbar. Damit ist die Bestimmung der Eigenschaften der Zellperipherie häufig nicht möglich. Dies stellt für die vorliegenden Untersuchungen jedoch keine bedeutende Einschränkung dar, da die durch die Stimulation bedingten Veränderungen vor allem in der perinukleären Zone beobachtet wurden. Unterstützt Annahme durch die Untersuchungen wird diese mit konfokaler Lasersanningmikroskopie, bei der in der Zellperipherie auch nach Stimulation keine deutlich über der Nachweisgrenze liegenden Kalziumkonzentrationen ermittelt werden konnten.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die akustische Rastermikroskopie ein geeignetes Verfahren zur Ermittlung ausgewählter Zelleigenschaften wie Zellhöhe, Schallgeschwindigkeit und Schallschwächung *in vitro* darstellt.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

In der hier vorliegenden Studie wurde das Cell-Analysis-Verfahren als ein neues quantitatives Verfahren der akustischen Rastermikroskopie zur Untersuchung von morphologischen und akustischen Zellparametern erstmals an humanen Osteoblasten *in vitro* angewandt.

- Es wurden die Parameter Zelldicke, Schallgeschwindigkeit und Schallschwächungskoeffizient in der nukleären, perinukleären und peripheren Zone der Osteoblasten bestimmt. Während der Auswertung hat sich ergeben, dass das Cell-Analysis-Verfahren eine sichere Zelldickenbestimmung nur für *d* > 1 μm gestattet. Daher erfolgte die Auswertung der Zellparameter nur in der nukleären und perinukleären Zone.
- Durch eine Stimulation der Osteoblasten mit Ascorbinsäure, Vitamin D₃ und der Kombination aus Ascorbinsäure und Vitamin D₃ wurde deren Einfluss auf die Zellparameter bei einer Zellkulturdauer von drei Wochen untersucht.
- Eine signifikante Abhängigkeit der Zellparameter von der Kulturdauer konnte nicht festgestellt werden. Allerdings war die Untersuchung einer bestimmten Zelle über den gesamten Kulturzeitraum nicht möglich.

- Die deutlichsten Veränderungen der Zellparameter traten in der perinukleären Zone bei Stimulation mit Vitamin D₃ auf. Dabei verminderte sich die mittlere Zelldicke um 37 % und die mittlere Schallgeschwindigkeit erhöhte sich um 8 %.
- Auch der mittlere Schallschwächungskoeffizient änderte sich am stärksten in der perinukleären Zone. Er nahm bei der Kombinationsstimulation um 88 % zu.
- Es kann vermutet werden, dass die Veränderungen der Zellparameter sowohl durch eine Veränderung des Zytoskeletts als auch des Kalziumgehalts von bestimmten Zellkompartimenten (in erster Linie im Endoplasmatischen Retikulum, weniger in den Mitochondrien) verursacht werden.
- Mit allen verwendeten mikroskopischen Verfahren (Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, akustische Rastermikroskopie) wurde in der perinukleären Zone das Auftreten von Granulationen beobachtet. Die Veränderungen der akustischen Eigenschaften einzelner Granula konnten nicht ermittelt werden, weil die Auflösung des verwendeten akustischen Rastermikroskops bei der zur Verfügung stehenden akustischen Linse mit einer Sendefrequenz von 900 MHz nicht ausreichte.
- Mit konfokaler Laserscanningmikroskopie wurde gezeigt, dass der Kalziumgehalt in der perinukleären Zone humaner Osteoblasten am größten ist.
- Eine gleichzeitige Untersuchung ein und derselben Zelle mit akustischer Rastermikroskopie und konfokaler Laserscanningmikroskopie war aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich. Bei der konfokalen Laserscanningmikroskopie konnte nur eine qualitative Analyse Kalziumkonzentration durchgeführt werden. Zukünftige Versuche sollten die simultane quantitative Untersuchung der Zellen mit der akustischen Rastermikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie an einem Arbeitsplatz ermöglichen.
- Für die Entwicklung der Zellparameter in Abhängigkeit von der Kulturdauer wären zukünftig zwei mögliche Versuchsansätze interessant: Einerseits eine Verkürzung der Versuchsdauer (so genannte Kurzzeitstimulation), andererseits Langzeitstimulation bis zu vier Wochen. In beiden Fällen sollte

- möglichst immer ein und dieselbe Zelle untersucht werden, mindestens jedoch Zellen aus demselben Zellkulturansatz.
- Um mögliche signifikante Änderungen der durch eine Zellstimulation bedingten Veränderungen der akustischen Eigenschaften zu ermitteln, sollte arößere Auswahl an auswertbaren Versuchen bei optimalen eine (steriler Versuchsbedingungen Versuchsaufbau bei einer Untersuchungstemperatur 37 °C unter 5 % CO₂ Atmosphäre bei konstantem pH-Wert) zur Verfügung stehen. Diese Bedingungen sind jedoch experimentell nur sehr schwer zu erreichen. Die Erfahrungen dieser Arbeit führten zu einer Erweiterung und Aufrüstung des Untersuchungsplatzes am SAM 2000 der Q-Bam-Gruppe der Martin-Luther-Universität Halle mit Ergänzung einer sterilen Untersuchungskammer, die eine Untersuchung mit CO₂-Atmosphäre bei einer frei wählbaren Untersuchungstemperatur ermöglicht. Weiterhin wurde das akustische Mikroskop durch ein Fluoreszenzmikroskop zur simultanen und automatisierten Untersuchung von Zellen ergänzt.
- Die histologischen Veränderungen bei der erhöhten Kalziumkonzentration (Umbau des Zytoskeletts, Kalziumspeicherung im Endoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien) sowie das morphologische Korrelat der Granulationen in der perinukleären Zone sollten elektronenmikroskopisch abgeklärt werden. Elektrophysiologische Messungen könnten Aufschluss über einen veränderten Kalziumeinstrom in die Zelle bei den verschiedenen Stimulanzien geben.
- Die Zellen können akustisch ohne besondere Vorbehandlungen wie Fixierung oder Färbung untersucht werden. Das Verfahren ist durch die geringen Schallintensitäten nahezu rückwirkungsfrei, vor allem ist eine intensive Bestrahlung mit Laserlicht oder Elektronen nicht notwendig [42,44].

Insgesamt steht mit der akustischen Rastermikroskopie ein leistungsfähiges Verfahren zur quantitativen Bestimmung morphologischer und akustischer Parameter *in vitro* zur Verfügung.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1. SAM2000-Betriebsanleitung, Krämer Scientific Instruments, Herborn, Deutschland, 1990
- 2. Rigden, John S.: Macmillan Encyclopedia of Physics, Simon & Schuster, New York, 1996, S. 452-454
- 3. Firma Leica, Broschüre zum LSM 510, Bensheim, Deutschland, 2001
- 4. Firma Leica, Broschüre zum Leica DMIRE2, Bensheim, Deutschland, 2002
- Angle, C. R., Thomas, D. J., und Swanson, S. A.: Lead inhibits the basal and stimulated responses of a rat osteoblast-like cell line ROS 17/2.8 to 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and IGF-I, Toxicol.Appl.Pharmacol. 103 (1990) 281-287
- 6. Angle, C. R., Thomas, D. J., und Swanson, S. A.: Toxicity of cadmium to rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8): protective effect of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3, Toxicol.Appl.Pharmacol. 103 (1990) 113-120
- 7. Baddour, R. E., Sherar, M. D., Hunt, J. W., Czarnota, G. J., und Kolios, M. C.: High-frequency ultrasound scattering from microspheres and single cells, J.Acoust.Soc.Am. 117 (2005) 934-943
- 8. Bell, N. H.: Renal and nonrenal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylases and their clinical significance, J.Bone Miner.Res. 13 (1998) 350-353
- 9. Benninghoff, A und Drenckhahn, D: Allgemeine Gewebslehre. In: Drenckhan, D (Ed): Anatomie. 16. Auflage, Urban & Fischer, München, 2003, S. 138-148
- 10. Berovic, N., Thomas, N., Thornhill, R. A., und Vaughan, J. M.: Observation of Brillouin scattering from single muscle fibres, Eur.Biophys.J. 17 (1989) 69-74
- 11. Bettega, D., Calzolari, P., Doglia, S. M., Dulio, B., Tallone, L., und Villa, A. M.: Technical report: Cell thickness measurements by confocal fluorescence microscopy on C3H10T1/2 and V79 cells, Int.J.Radiat.Biol. 74 (1998) 397-403
- 12. Bikle, D. D., Chang, S., Crumrine, D., Elalieh, H., Man, M. Q., Choi, E. H., Dardenne, O., Xie, Z., Arnaud, R. S., Feingold, K., und Elias, P. M.: 25 Hydroxyvitamin D 1 alpha-hydroxylase is required for optimal epidermal differentiation and permeability barrier homeostasis, J.Invest Dermatol. 122 (2004) 984-992
- 13. Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, M. R., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boyan, B., und Boskey, A.: von Kossa staining alone

- is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation, Calcif. Tissue Int. 72 (2003) 537-547
- 14. Boyde, A., Vesely, P., Gray, C., und Jones, S. J.: High temporal and spatial resolution studies of bone cells using real-time confocal reflection microscopy, Scanning 16 (1994) 285-294
- 15. Briggs, A.: A little elementary acoustic. In: R.Brook et al. (Ed): Acoustic Microscopy. Clarendon Press, Oxford, 1992, S. 78-103
- 16. Bucher, O und Wartenberg, H: Knochengewebe. In: Cytologie Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, 1997, S. 129-140
- 17. Chaudhary, L. R., Hofmeister, A. M., und Hruska, K. A.: Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation, Bone 34 (2004) 402-411
- 18. Coelho, M. J., Cabral, A. T., und Fernande, M. H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM, Biomaterials 21 (2000) 1087-1094
- 19. Coelho, M. J. und Fernandes, M. H.: Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation, Biomaterials 21 (2000) 1095-1102
- 20. Connerty, H. V. und Briggs, A. R.: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone, Am.J.Clin.Pathol. 45 (1966) 290-296
- 21. Connerty, H. V. und Briggs, A. R.: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone, Am.J.Clin.Pathol. 45 (1966) 290-296
- 22. D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., und Howard, G. A.: Agerelated osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow, J.Bone Miner.Res. 14 (1999) 1115-1122
- 23. Debiais, F., Hott, M., Graulet, A. M., und Marie, P. J.: The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific, J.Bone Miner.Res. 13 (1998) 645-654
- 24. Deng, M., Jin, Y., und Shi, J.: Induced differentiation of ectomesenchymal stem cells of human embryo facial process into osteoblast in vitro, Zhongguo Xiu.Fu Chong.Jian.Wai Ke.Za Zhi. 18 (2004) 314-317
- 25. Denissov, A., Maeva.E.Yu., Denisova, L., und Maev, R. Gr.: Ultrasonic visualization of healthy and pathological human dental tissue using acoustic microscopy, Proc.of the II Biophysical Congress, Vol.2, 1999 668-670

- 26. Edwards, G. S., Davis, C. C., Saffer, J. D., und Swicord, M. L.: Microwave-field-driven acoustic modes in DNA, Biophys.J. 47 (1985) 799-807
- 27. Egger, M. D. und Petran, M.: New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells, Science 157 (1967) 305-307
- 28. Eijken, M., Koedam, M., van, Driel M., Buurman, C. J., Pols, H. A., und van Leeuwen, J. P.: The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization, Mol.Cell Endocrinol. (2006)
- 29. Eklou-Kalonji, E., Denis, I., Lieberherr, M., und Pointillart, A.: Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro, Cell Tissue Res. 292 (1998) 163-171
- 30. FEI Company und Philips XL30 ESEM-FEG: Field-Emission Environmental Scanning Electron Microscope (ESEM-FEG), Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS) Produktinformationen, 2007
- 31. Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., obera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarron, M., und Blanco-Jerez, L.: Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue, Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal. 11 (2006) E47-E51
- 32. Finch, J. L., Dusso, A. S., Pavlopoulos, T., und Slatopolsky, E. A.: Relative potencies of 1,25-(OH)(2)D(3) and 19-Nor-1,25-(OH)(2)D(2) on inducing differentiation and markers of bone formation in MG-63 cells, J.Am.Soc.Nephrol. 12 (2001) 1468-1474
- 33. Franceschi, R. T., Wilson, J. X., und Dixon, S. J.: Requirement for Na(+)-dependent ascorbic acid transport in osteoblast function, Am.J.Physiol 268 (1995) C1430-C1439
- 34. Fratzl-Zelman, N., Glantschnig, H., Rumpler, M., Nader, A., Ellinger, A., und Varga, F.: The expression of matrix metalloproteinase-13 and osteocalcin in mouse osteoblasts is related to osteoblastic differentiation and is modulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and thyroid hormones, Cell Biol.Int. 27 (2003) 459-468
- 35. Freshney R.Ian: Kultivierung spezieller Zellarten. In: Tierische Zellkulturen. Ein Methoden-Handbuch. De Gruyter, Berlin, New York, 1990, S. 280-281
- 36. Fu, G. K., Lin, D., Zhang, M. Y., Bikle, D. D., Shackleton, C. H., Miller, W. L., und Portale, A. A.: Cloning of human 25-hydroxyvitamin D-1 alphahydroxylase and mutations causing vitamin D-dependent rickets type 1, Mol.Endocrinol. 11 (1997) 1961-1970
- 37. Glaesser, D., Iwig, M., Ngoli, D., und Udelnow, C.: Alkalinization stimulates Ca2+-dependent spreading during the activation of resting lens epithelial cells in primary culture, Cell Tissue Kinet. 17 (1984) 557-571

- 38. Gonzalez, Suarez, I, Fernandez Martin, J. L., Naves, Diaz M., und Cannata Andia, J. B.: Effect of desferrioxamine and deferiprone on osteocalcin secretion in osteoblast-type cells, Nefrologia. 23 Suppl 2 (2003) 27-31
- 39. Grynkiewicz, G., Poenie, M., und Tsien, R. Y.: A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties, J.Biol.Chem. 260 (1985) 3440-3450
- 40. Habel, B. und Glaser, R.: Human osteoblast-like cells respond not only to the extracellular calcium concentration but also to its changing rate, Eur.Biophys.J. 27 (1998) 411-416
- 41. Hack, A. A., Cordier, L., Shoturma, D. I., Lam, M. Y., Sweeney, H. L., und McNally, E. M.: Muscle degeneration without mechanical injury in sarcoglycan deficiency, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96 (1999) 10723-10728
- 42. Hafsteinsson, H. und Rizvi, S. S.: Acoustic microscopy--principles and applications in the studies of biomaterial microstructure, Scan Electron Microsc. (1984) 1237-1247
- 43. Hakim, M. B., Lindsay, S. M., und Powell, J.: The speed of sound in DNA, Biopolymers 23 (1984) 1185-1192
- 44. Hans, D., Schott, A. M., und Meunier, P. J.: Ultrasonic assessment of bone: a review, Eur.J.Med. 2 (1993) 157-163
- 45. Henriksen, Z., Hiken, J. F., Steinberg, T. H., und Jorgensen, N. R.: The predominant mechanism of intercellular calcium wave propagation changes during long-term culture of human osteoblast-like cells, Cell Calcium 39 (2006) 435-444
- 46. Hirsekorn, S., Pangraz, S., Weides, G., und Arnold, W.: Erratum:

 'Measurement of elastic impedance with high spatial resolution using acoustic microscopy", Appl.Phys.Lett. 69 (1996) 2138
- 47. Hirsekorn, S., Pangraz, S., Weides, G., und Arnold, W.: Measurement of elastic impedance with high spatial resolution using acoustic microscopy, Appl.Phys.Lett. 67 (1995) 745
- 48. Holick, M. F.: Vitamin D and bone health, J.Nutr. 126 (1996) 1159-1164
- 49. Hoppe, M. und Bereiter-Hahn, J.: Applications of Scanning Acoustic Microscopy-Survey and New Aspects, IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics SU-32(2) (1985) 289-301
- 50. Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., und Mann, S.: Physical properties of type I collagen extracted from fish scales of Pagrus major and Oreochromis niloticas, Int.J.Biol.Macromol. 32 (2003) 199-204
- 51. Inoue, M., LeGeros, R. Z., Inoue, M., Tsujigiwa, H., Nagatsuka, H., Yamamoto, T., und Nagai, N.: In vitro response of osteoblast-like and

- odontoblast-like cells to unsubstituted and substituted apatites, J.Biomed.Mater.Res.A 70 (2004) 585-593
- 52. Jaquiery, C., Schaeren, S., Farhadi, J., Mainil-Varlet, P., Kunz, C., Zeilhofer, H. F., Heberer, M., und Martin, I.: In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells, Ann.Surg. 242 (2005) 859-868
- 53. JEOL Ltd.: JSM-7700F Produktinformation, 2007
- 54. Jones, G., Ramshaw, H., Zhang, A., Cook, R., Byford, V., White, J., und Petkovich, M.: Expression and activity of vitamin D-metabolizing cytochrome P450s (CYP1alpha and CYP24) in human nonsmall cell lung carcinomas, Endocrinology 140 (1999) 3303-3310
- 55. Jonsson, K. B., Frost, A., Nilsson, O., Ljunghall, S., und Ljunggren, O.: Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison, Acta Orthop.Scand. 70 (1999) 365-373
- 56. Jorgensen, N. R., Henriksen, Z., Sorensen, O. H., und Civitelli, R.: Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts, Steroids 69 (2004) 219-226
- 57. Junqueira, Luiz C. U. und U.Carneiro, José: Knochen und Knochenverbindungen. In: Gratzl, Manfred (Ed): Histologie. 3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 1991, S. 191-195
- 58. Koshihara, Y. und Hoshi, K.: Vitamin K2 enhances osteocalcin accumulation in the extracellular matrix of human osteoblasts in vitro, J.Bone Miner.Res. 12 (1997) 431-438
- 59. Kundu, T., Bereiter-Hahn, J., und Karl, I.: Cell property determination from the acoustic microscope generated voltage versus frequency curves 1, Biophys.J. 78 (2000) 2270-2279
- 60. Kuo, I. Y., Hete, B., und Shung, K. K.: A novel method for the measurement of acoustic speed, J.Acoust.Soc.Am. 88 (1990) 1679-1682
- 61. Lakshmanan, S., Bodi, A., und Raum, K.: Assessment of anisotropic tissue elasticity of cortical bone from high-resolution, angular acoustic measurements, IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control 54 (2007) 1560-1570
- 62. Lau, K. H. und Baylink, D. J.: Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells, J.Bone Miner.Res. 13 (1998) 1660-1667
- 63. Lemons, R. A. und Quate, C. F.: Acoustic microscope-scanning version, Appl.Phys.Lett. 24 (1974) 163-165

- 64. Lipp, P. und Niggli, E.: Ratiometric confocal Ca(2+)-measurements with visible wavelength indicators in isolated cardiac myocytes, Cell Calcium 14 (1993) 359-372
- 65. Litniewski, J. und Bereiter-Hahn, J.: Measurements of cells in culture by scanning acoustic microscopy, J.Microsc. 158 (Pt 1) (1990) 95-107
- 66. Lohmann, C. H., Bonewald, L. F., Sisk, M. A., Sylvia, V. L., Cochran, D. L., Dean, D. D., Boyan, B. D., und Schwartz, Z.: Maturation state determines the response of osteogenic cells to surface roughness and 1,25-dihydroxyvitamin D3, J.Bone Miner.Res. 15 (2000) 1169-1180
- 67. Maev, R. G. und Levin, V. M.: Principles of local sound velocity and attenuation measurements using transmission acoustic microscope, IEEE Transactions On Ultrasonics Ferroelectrics And Frequency Control 44 (1997) 1224-1231
- 68. Matsumoto, T., Kawanobe, Y., Morita, K., und Ogata, E.: Effect of 1,25dihydroxyvitamin D3 on phospholipid metabolism in a clonal osteoblastlike rat osteogenic sarcoma cell line, J.Biol.Chem. 260 (1985) 13704-13709
- 69. Matsuzaka, K., Walboomers, F., de, Ruijter A., und Jansen, J. A.: Effect of microgrooved poly-l-lactic (PLA) surfaces on proliferation, cytoskeletal organization, and mineralized matrix formation of rat bone marrow cells, Clin.Oral Implants.Res. 11 (2000) 325-333
- 70. McClary, K, Pizziconi, V, und Pauken, C: The Effects of Ascorbic Acid on the Osteoblast Extracellular Matrix, Undergraduate Biology enrichment Program, Vol.8, 2001
- 71. Meselson, M. und Stahl, F. W.: The Replication of DNA in Escherichia coli, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 44 (1958) 671-682
- 72. Migliaccio, S., Newbold, R. R., McLachlan, J. A., und Korach, K. S.:
 Alterations in estrogen levels during development affects the skeleton:
 use of an animal model, Environ. Health Perspect. 103 Suppl 7 (1995)
 95-97
- 73. MINSKY, Marvin: Microscopy apparatus, Pat. Nr. US3013467, 1961
- 74. Miyake, N., Hoshi, K., Sano, Y., Kikuchi, K., Tadano, K., und Koshihara, Y.: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 promotes vitamin K2 metabolism in human osteoblasts, Osteoporos.Int. 12 (2001) 680-687
- 75. Nagai, Takeshi, Izumi, Masami, und Ishii, Masahide: Fish scale collagen.

 Preparation and partial characterization, International Journal of Food Science and Technology 39 (2004) 239-244
- 76. Notelovitz, M.: Androgen effects on bone and muscle, Fertil.Steril. 77 Suppl 4 (2002) 34-41

- 77. Olmsted, E. A., Blum, J. S., Rill, D., Yotnda, P., Gugala, Z., Lindsey, R. W., und Davis, A. R.: Adenovirus-mediated BMP2 expression in human bone marrow stromal cells, J.Cell Biochem. 82 (2001) 11-21
- 78. Olympus Life and Material Science Europa GmbH: Olympus CK 40, 2005
- 79. Otsuka, E., Yamaguchi, A., Hirose, S., und Hagiwara, H.: Characterization of osteoblastic differentiation of stromal cell line ST2 that is induced by ascorbic acid, Am.J.Physiol 277 (1999) C132-C138
- 80. Parentoni, Lucia Simas, Pozeti, Ronise Carla Sass, Figueiredo, Jos, und Faria, Eliana Cotta de: The determination of total calcium in urine: a comparison between the atomic absorption and the ortho-cresolphtalein complexone methods, Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 37 (2001) 235-238
- 81. Pfeilschifter, J., Diel, I., Pilz, U., Brunotte, K., Naumann, A., und Ziegler, R.: Mitogenic responsiveness of human bone cells in vitro to hormones and growth factors decreases with age, J.Bone Miner.Res. 8 (1993) 707-717
- 82. Prosser, D. E. und Jones, G.: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D, Trends Biochem.Sci. 29 (2004) 664-673
- 83. Raum, K.: Quantitative Akustische Rastermikroskopiemethoden zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften von Knochengewebe, Dissertation, 2002
- 84. Raum, K., Jenderka, K. V., Klemenz, A., und Brandt, J.: Multi layer analysis quantitative scanning acoustic microscopy for tissue characterization at a microscopic scale., IEEE Transactions On Ultrasonics Ferroelectrics And Frequency Control 50 (2003) 507-516
- 85. Raum, K., Kempf, K., Hein, H. J., Schubert, J., und Maurer, P.: Preservation of microelastic properties of dentin and tooth enamel in vitro--a scanning acoustic microscopy study, Dent.Mater. 23 (2007) 1221-1228
- 86. Raum, K., Klemenz, F, und Brandt, J.: Assessment of elastic properties of osteoblast cells using quantitative scanning acoustic microscopy, eingereicht in Ultrasonics (2007)
- 87. Raum, K., Klemenz, F, Hofmann, T, und Brandt, J.: Assessment of elastic properties of osteoblast cells using quantitative scanning acoustic microscopy, Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie (DGfZ) in Leipzig. Abstract in Cell Prolif. 38 (2005) 187
- 88. Said Ahmed, M. A., Walker, L. M., Publicover, S. J., und El Haj, A. J.:
 Hormonal regulation of [Ca(2+)](i) in periosteal-derived osteoblasts:
 effects of parathyroid hormone, 1,25(OH)(2)D(3) and prostaglandin
 E(2), J.Cell Physiol 183 (2000) 163-171
- 89. Schanne, F. A., Gupta, R. K., und Rosen, J. F.: Lead inhibits 1,25dihydroxyvitamin D-3 regulation of calcium metabolism in osteoblastic

- osteosarcoma cells (ROS 17/2.8), Biochim.Biophys.Acta 1180 (1992) 187-194
- Schwartz, Z., Lohmann, C. H., Sisk, M., Cochran, D. L., Sylvia, V. L., Simpson, J., Dean, D. D., und Boyan, B. D.: Local factor production by MG63 osteoblast-like cells in response to surface roughness and 1,25-(OH)2D3 is mediated via protein kinase C- and protein kinase Adependent pathways, Biomaterials 22 (2001) 731-741
- 91. Shalet, S. M., Shavrikova, E., Cromer, M., Child, C. J., Keller, E., Zapletalova, J., Moshang, T., Blum, W. F., Chipman, J. J., Quigley, C. A., und Attanasio, A. F.: Effect of growth hormone (GH) treatment on bone in postpubertal GH-deficient patients: a 2-year randomized, controlled, dose-ranging study, J.Clin.Endocrinol.Metab 88 (2003) 4124-4129
- 92. Shevde, N. K., Plum, L. A., Clagett-Dame, M., Yamamoto, H., Pike, J. W., und DeLuca, H. F.: A potent analog of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 selectively induces bone formation, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99 (2002) 13487-13491
- 93. Shevde, N. K., Plum, L. A., Clagett-Dame, M., Yamamoto, H., Pike, J. W., und DeLuca, H. F.: A potent analog of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 selectively induces bone formation, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 99 (2002) 13487-13491
- 94. Sokolov S: The ultrasonic microscope, Dokl. Akad. Nauk. Doklady Akademia Nauk SSSR 64 (1949) 333-336
- 95. Vazquez, G., Santillan, G., Boland, R., Roldan, E., und Perez-Lloret, A.:
 Modulation of cytosolic calcium levels in osteoblast-like osteosarcoma
 cells by olpadronate and its amino-derivative IG-9402, Calcif.Tissue
 Int. 72 (2003) 215-221
- 96. Vesely, P., Lucers, H., Riehle, M., und Bereiter-Hahn, J.: Subtraction scanning acoustic microscopy reveals motility domains in cells in vitro, Cell Motil.Cytoskeleton 29 (1994) 231-240
- 97. Wali, R. K., Kong, J., Sitrin, M. D., Bissonnette, M., und Li, Y. C.: Vitamin D receptor is not required for the rapid actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 to increase intracellular calcium and activate protein kinase C in mouse osteoblasts, J.Cell Biochem. 88 (2003) 794-801
- 98. Wang, J., Gundle, R., und Briggs, G. A.: The measurement of acoustic properties of living human cells. In: Trans.Royal Microscopical Soc., 1990, S. 91-94
- 99. Wang, R. R., Meyers, E., und Katz, J. L.: Scanning acoustic microscopy study of titanium-ceramic interface of dental restorations, J.Biomed.Mater.Res. 42 (1998) 508-516
- 100. Weiss, E. C., Anastasiadis, P., Pilarczyk, G., Lemor, R. M., und Zinin, P. V.: Mechanical properties of single cells by high-frequency time-resolved

- acoustic microscopy, IEEE Trans.Ultrason.Ferroelectr.Freq.Control 54 (2007) 2257-2271
- 101. Wiren, K. M., Chapman, Evans A., und Zhang, X. W.: Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and beta expression, J.Endocrinol. 175 (2002) 683-694
- zur Nieden, N. I., Kempka, G., und Ahr, H. J.: In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts, Differentiation 71 (2003) 18-27

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg

(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein)

Thesen der Dissertation

Untersuchung stimulierter humaner Osteoblasten mit Akustischer Rastermikroskopie

zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Friedemann Klemenz

geboren am 26. Juni 1980 in Halle/Saale

THESEN

- Die morphologischen und akustischen Parameter Zelldicke, Schallgeschwindigkeit und Schallschwächungskoeffizient k\u00f6nnen quantitativ mit akustischer Rastermikroskopie und dem Cell-Analysis-Verfahren in vitro bestimmt werden.
- Eine sichere Bestimmung der Zelldicke ist nur für d > 1 μm möglich. Daher erfolgte die Auswertung der Zellparameter nur in der nukleären und perinukleären Zone, nicht aber in der Zellperipherie.
- 3. Durch eine Stimulation der Osteoblasten mit Ascorbinsäure (50 μg/ml), Vitamin D₃ (10 nmol/l) und der Kombination aus Ascorbinsäure und Vitamin D₃ wurde deren Einfluss auf die Zellparameter bei einer Zellkulturdauer von drei Wochen untersucht. Eine signifikante Abhängigkeit der Zellparameter von der Kulturdauer konnte nicht festgestellt werden.
- 4. Die deutlichsten Veränderungen der Zellparameter traten in der perinukleären Zone bei Stimulation mit Vitamin D₃ auf. Dabei verminderte sich die mittlere Zelldicke um 37 % und die mittlere Schallgeschwindigkeit erhöhte sich um 8 %. Der mittlere Schallschwächungskoeffizient nahm bei der Kombinationsstimulation um 88 % zu. Es kann vermutet werden, dass die Veränderungen der Zellparameter sowohl durch strukturelle Änderungen wie eine Veränderung des Zytoskeletts als auch des Kalziumgehalts von bestimmten Zellkompartimenten, vor allem im Endoplasmatischen Retikulum, verursacht werden.
- 5. Mit allen verwendeten mikroskopischen Verfahren (Lichtmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie, akustische Rastermikroskopie) wurde in der perinukleären Zone das Auftreten von Granulationen beobachtet.
- 6. Mit konfokaler Laserscanningmikroskopie wurde gezeigt, dass der Kalziumgehalt in der perinukleären Zone humaner Osteoblasten am größten ist. Eine quantitative Bestimmung war jedoch aus versuchstechnischen Gründen nicht möglich.
- 7. Die Zellen k\u00f6nnen ohne besondere Vorbehandlungen wie Fixierung oder F\u00e4rbung untersucht werden. Das verwendete Verfahren kann durch die geringen Schallintensit\u00e4ten als r\u00fcckwirkungsfrei betrachtet werden. Vor allem ist eine intensive Bestrahlung mit Laserlicht oder Elektronen nicht notwendig.

Damit steht mit der akustischen Rastermikroskopie in Kombination mit dem Cell-Analysis-Verfahren eine leistungsfähige Methode zur quantitativen Bestimmung morphologischer und akustischer Zellparameter *in vitro* zur Verfügung.

Curriculum vitae

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Vor- und Zuname: Friedemann Klemenz

Geburtstag: 26. 06. 1980

Geburtsort: Halle/S.

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Religion: evangelisch

Berufliche Tätigkeit

Familienstand:

seit Dezember 2006 Assistenzarzt an der Klinik für Urologie am

verheiratet

Paul-Gerhardt-Stift in Lutherstadt Wittenberg

Praktisches Jahr

Mai 2006 - September 2006 Klinik für Urologie am Paul-Gerhardt-Stift in

Lutherstadt Wittenberg

Februar 2006 - Mai 2006 Klinik für Unfallchirurgie am Paul-Gerhardt-Stift in

Lutherstadt Wittenberg

Oktober 2005 – Februar 2006 Klinik für Innere Medizin am Paul-Gerhardt-Stift in

Lutherstadt Wittenberg

Famulaturen

Februar 2004 Orthopädische Gemeinschaftspraxis Thoma/Wuthe

Halle/S.

Februar 2004 Orthopädische Klinik an der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

September 2003 Herz-Thorax-Chirurgie an der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Februar 2003 Innere Medizin, Kardiologie an der

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

i

Curriculum vitae

Prüfungen

November 2006 Dritter Teil des Staatsexamens
September 2005 Zweiter Teil des Staatsexamens
September 2003 Erster Teil des Staatsexamens

September 2002 Physikum

Ausbildung

November 2006 Approbation

Oktober 2000 - November 2006 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen

Fakultät der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg in Halle/S.

Juli 1999 Abitur

1991 - 1999 "Thomas-Müntzer-Gymnasium" in Halle/S.1987 - 1991 Grundschule "Konstantinowna Krupskaja" in

Halle/S.

Zivildienst

Juli 1999 - August 2000 Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und

Physikalische Medizin der Martin-Luther-

Universität, Halle/S.

Erklärung

ERKLÄRUNG

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

Ich habe mich zuvor noch nicht um den Doktorgrad beworben.

Friedemann Klemenz

VERÖFFENTLICHUNGEN

- Präsentation von Teilen der Arbeit bei der "Langen Nacht der Wissenschaften" Halle/S., 2005
- Vortrag auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Zytometrie (DGFZ), Leipzig, 2005
- K. Raum, F. Klemenz, T. Hofmann, J. Brandt, Assessment of elastic properties of osteoblast cells using quantitative scanning acoustic microscopy, Cell Proliferation, 38, 2005, Abstract
- K. Raum, F. Klemenz, J. Brandt, Assessment of elastic properties of osteoblast cells using quantitative scanning acoustic microscopy, eingereicht in Ultrasonics, 2007

Danksagung

DANKSAGUNG

Nach Abschluss der vorliegenden Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Allen, die mich bei der Planung und Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben:

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. Werner Hein, Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg für die Überlassung des Themas und die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten. Materialien und Geräte bedanken. Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. rer. nat. Kay Raum für die enge und freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere bei der Auswertung der Daten und der Programmierung der dafür notwendigen Software, sowie für die vielen Hinweise und Anregungen. Weiterhin gilt mein Dank Herrn OA Dr. med. Jörg Brandt. Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Angela Rosemeier, die mit viel Engagement und unermüdlichem Einsatz die Osteoblasten kultiviert und somit "gehegt und gepflegt" hat. Für die Möglichkeit Untersuchungen am konfokalen Laserscanningmikroskop vorzunehmen und die damit verbundene Zeitaufwendung bis teilweise spät in den Abend, gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. Dagobert Glanz am Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Für die vielen Korrekturen und Bemerkungen sowie die ständigen aufmunternden Worte, wenn die Versuche oder Auswertungen nicht recht gelingen wollten, danke ich insbesondere meinen Eltern Cornelia und Dr. rer. nat. Albrecht Klemenz. Zuletzt möchte ich meiner Frau Dana von ganzem Herzen danken. Sie hat diese Arbeit etliche Male gelesen und mich mit ihren aufmunternden Worten immer wieder aufs Neue unterstützt.