

M.O. Klein¹, F. Tapety¹, F. Sandhöfer¹, H. Götz², B. Schäfer³, W. Wagner¹, H. Duschner², B. Al-Nawas¹

Visualisierung vitaler osteoblastärer Zellen auf unterschiedlich behandelten Titanoberflächen mittels Confokaler Laser Scanning Mikroskopie (CLSM) – eine Pilotstudie

Der Stellenwert kontinuierlicher Beobachtung vitaler Osteoblasten auf Implantatoberflächen liegt in der Erfassung früher Zell-Biomaterial-Interaktionen. Ziel dieser Pilotstudie war die Evaluierung von zwei Vitalfarbstoffen zur Visualisierung humaner osteoblastärer Zellen auf unterschiedlich behandelten Titanscheiben mit Hilfe konfokaler Laser Raster Mikroskopie (CLSM: confocal laser scanning microscopy) über einen Zeitraum von acht Tagen.

Verwendet wurden gedrehte, geleppte und hochglanzpolierte Titanscheiben, die zuvor profilometrisch untersucht wurden. Für eine humane osteoblastäre Linie wurden die Färbungen DiOC₆(3) (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum) und Syto61 (Kernregion) etabliert. Nach 24 Stunden bzw. nach acht Tagen erfolgte die Sichtbarmachung durch CLSM mit synchroner Darstellung der beiden Farbstoffe und des Untergrundes.

Die untersuchten Vitalfarbstoffe zeichneten sich, auch bei wiederholten Laserdurchläufen, durch eine hohe Farbkonzanz und Zellkompatibilität aus und erlaubten eine plastische Visualisierung der Osteoblastenmorphologie. Hierbei wurden auf der gedrehten und der hochglanzpolierten Oberfläche flache und lang gestreckte Osteoblasten beobachtet, während die geleppte Oberfläche in einem rundlichen Phänotyp resultierte. Unterschiedliche Zellmorphologien auf verschiedenen Oberflächenstrukturen ließen sich somit eindeutig identifizieren.

Mit dieser Pilotstudie konnte eine Methodik etabliert werden, die prospektiv eine kontinuierliche Darstellung der frühen Zellreaktionen auf lichtundurchlässigen Materialien ermöglicht und aufbereitungsbedingte Artefakte minimiert.

Schlüsselworte: Osteoblastäre Zellen, Implantatoberflächen, Zellattachement, Vitalfärbung, Confokale Laser Scanning Mikroskopie

Visualization of vital osteogenic cells on differently treated titanium surfaces using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) – a pilot study

Continuous observation of vital osteoblasts on implant surfaces is significant in determining early cell-biomaterial interactions. The aim of this pilot study was to evaluate two vital dyes for visualizing human osteogenic cells on differently treated titanium discs over a period of eight days using Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

The titanium discs used were machined, lapped or polished and had been subjected to profilometric analysis. Standard dyes DiOC₆(3) (mitochondria and endoplasmic reticulum) and Syto61 (nuclear region) were established for one human osteogenic cell line. Cells were visualized using CLSM after 24 hours and eight days respectively with synchronous visualization of the dyes and the disc surfaces.

Even after repeated laser scanning, the vital dyes tested exhibited excellent color stability and cell compatibility and provided visualization of the osteoblast morphology. Flat, elongated osteoblasts were observed on machined and polished surfaces, while a more spherical phenotype was observed on the lapped surface. Differences in cell morphology were clearly attributable to the different surface structures.

This pilot study established a methodology that will allow continuous visualization of early cell response on solid materials and minimize preparation artifacts.

Keywords: osteogenic cells, implant surfaces, cell attachment, vital staining, Confocal Laser Scanning Microscopy

¹ Zentrum für zahnärztliche Verbundforschung, Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Johannes Gutenberg- Universität Mainz,
² Zentrum für zahnärztliche Verbundforschung, Angewandte Struktur- und Mikroanalytik, Johannes Gutenberg- Universität Mainz,
³ Geistlich Pharma AG, Biomaterials, Bahnhofstr. 40, 6110 Wolhusen, Schweiz

¹ Dental Compounds Research Center, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany
² Dental Compounds Research Center, Applied Structure and Microanalysis, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany
³ Geistlich Pharma AG, Biomaterials, Bahnhofstr. 40, 6110 Wolhusen, Switzerland

Einleitung

Während die Primärstabilität dentaler endostaler Implantate im Wesentlichen von Implantatgeometrie bzw. -makrostruktur sowie mechanischer Qualität des Knochenlagers abhängt, sind die Sekundärstabilität bzw. eine erfolgreiche Osseointegration Ergebnisse einer suffizienten Reaktion und Adaption osteoblastärer Zellen. Eine herausragende Rolle spielen hierbei Mikrostrukturierung und Zellkompatibilität der Implantatoberflächen.

Man geht davon aus, dass einer erfolgreichen Osseointegration zunächst die aktive Migration potenter osteoblastärer Zellen zur Implantatoberfläche mit konsekutivem Attachment vorausgeht, gefolgt von Ausdifferenzierung und Matrixsynthese [10]. Zahlreiche aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit der Optimierung von Titanimplantatoberflächen mit dem Ziel einer verbesserten primären Zellantwort, sei es durch Modifikation der Mikrostruktur [6, 22, 32], der Hydrophilität [8, 30], der Protein- bzw. Zytokinbeschichtung von Titanoberflächen [20, 22, 24] bzw. durch chemische Modifizierung (z. B. Fluoridierung) [12, 9]. Ergänzend zur molekularbiologischen Evaluation der Zelldifferenzierung gibt die Betrachtung der Zellmorphologie wertvolle Rückschlüsse auf die primäre Zell-Implantat-Interaktion. So führen „biologisch aktive“, zellkompatible Oberflächen zu einem ausgestreckten, spindelförmigen osteoblastären Phänotyp mit Ausbildung von Lamellipodien und/oder Filopodien, während weniger kompatible Oberflächen eher rundliche Zellformen begünstigen [23, 15, 22]. Auf soliden, nicht lichtdurchlässigen Oberflächen wie Implantatmaterialien sind die Visualisierungsmethoden der Wahl nach wie vor Untersuchungen auf der Basis der Elektronenmikroskopie, mit dem Risiko von Präparations- und Trocknungsartefakten. Teilweise können diese mit modernen Verfahren der Elektronenmikroskopie umgangen werden, z.B. der „Environmental Scanning Electron Microscopy“ (ESEM); allerdings sind auch hiermit keine Untersuchungen an lebenden Zellen möglich [27]. Ein weiterer Ansatz ist die Darstellung der Osteoblastenmorphologie und Zytoskeletorganisation durch immunhistochemische Färbemethoden [2, 31]. Bei beiden Visualisierungsmethoden sind die Zellen der untersuchten Proben jedoch avital und entziehen sich folglich der kontinuierlichen Beobachtung dynamischer Eigenschaften wie Attachment, Zellteilung und Migration. Denkbar wäre auch eine stabile Transfektion osteoblastärer Zellen mit Expression fluoreszierender Zytoskelettfilamente [19]. Dies ist aufgrund der sehr heterogenen Osteoblastenpopulation sehr schwierig und kann eher an Osteosarkomlinien durchgeführt werden [11].

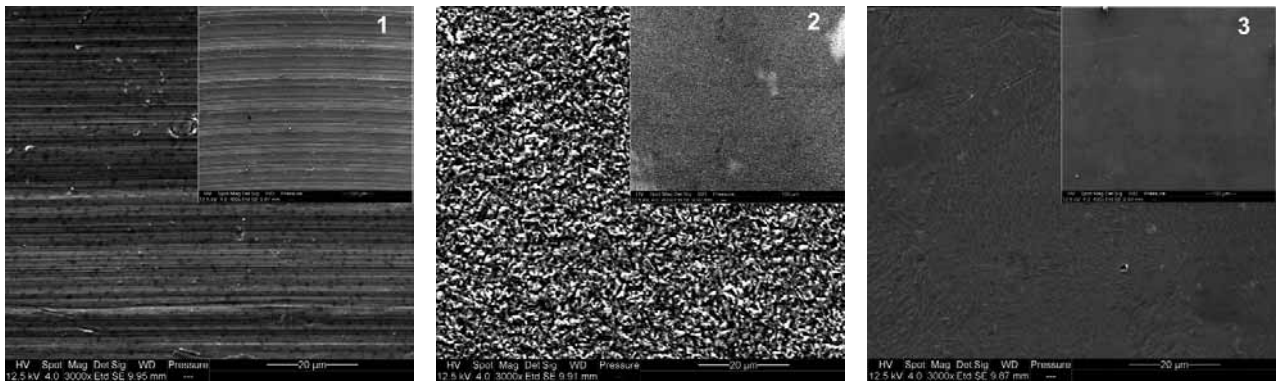
Zur aussagekräftigen Erfassung früher Osteoblast-Biomaterial-Interaktion ist eine kontinuierliche Methode zur Beobachtung vitaler (!) Zellen auf „lichtundurchlässigen“ Materialien erforderlich. Eine kontinuierliche Beobachtungsmethode vitaler osteoblastärer Zellen auf „lichtdurchlässigen“ Materialien wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben [16]. Eine Möglichkeit zur Darstellung lebender Zellen auf lichtundurchlässigen Materialien bieten Vitalfärbungen. Zahlreiche fluoreszierende Vitalfarbstoffe wurden etabliert, um lebende Zellen zu detektieren oder auch subzelluläre Vorgänge zu visualisieren und zu beschreiben. Ein unspezifischer intra- oder extrazellulärer Vitalmarker ist das grün fluoreszie-

Introduction

While the primary stability of dental endosteal implants depends mainly on the geometry and macrostructure of the implant and the mechanical quality of the bone site, secondary stability and successful osseointegration depend on adequate reaction and adaptation of osteogenic cells. Microstructuring and cell compatibility of implant surfaces play a significant part in this process.

It is assumed that the basis for successful osseointegration is active migration of potent osteogenic cells to the implant surface with consecutive cell attachment, followed by cell differentiation and matrix synthesis [10]. Numerous current studies deal with optimizing titanium implant surfaces with the aim of improving primary cell response either by modification of the microstructure [6, 22, 32], hydrophilic properties [8, 30], protein or cytokine coating of the titanium surface [20, 22, 24] or by chemical modification (e.g. fluoridating) [12, 9]. In addition to conventional molecular biological evaluation of cell differentiation, observation of the cell morphology provides valuable information on primary cell-implant interaction. Biologically active, cell-compatible surfaces produce an elongated, spindle-shaped osteoblastic phenotype with the formation of lamellipodia and/or filopodia, while less compatible surfaces tend to favor spherical cell shapes [23, 15, 22]. The visualization method of choice on solid surfaces, such as the surface of an implant material, remains electron microscopic examination, with the risk of preparation and fixation artifacts. These risks can sometimes be avoided by using modern electron microscopy techniques, e.g. environmental scanning electron microscopy (ESEM), though vital cells cannot be examined using this technique [27]. Another option is visualization of the osteoblast morphology and cytoskeletal organization using immunohistochemical staining methods [2, 31]. With both visualization techniques the cells of the examined specimens are avital and cannot therefore be used for continuous observation of dynamic characteristics such as cell attachment, cell proliferation and cell migration. Another option would be stable transfection of osteogenic cells with expression of fluorescent cytoskeletal filaments [19]. This is very difficult due to the highly heterogeneous osteogenic cell population and is more easily completed using osteosarcoma lines [11].

A continuous method for the observation of vital (!) cells on solid materials is required to allow significant detection of early osteoblast-biomaterial interaction. A continuous observation method for vital osteogenic cells on translucent materials has already been described by our working group [16]. Vital staining provides a means of detecting vital cells on solid materials. There are numerous fluorescent vital dyes for detecting vital cells or visualizing and describing subcellular processes. Green fluorescent calcein (calcium chelate) is a non-specific intracellular or extracellular vital marker [13], while specific fluorescent cell compartment markers and organelle markers (e.g. mitochondria and ER specific car-



Abbildungen 1-3 Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der gedrehten, gelepten und polierten Titanoberflächen. Kleiner Bildausschnitt: 400fache Vergrößerung. Großer Ausschnitt: 3000fache Vergrößerung.

Figures 1-3 Scanning electron micrographic (SEM) images of the machined, lapped and polished titanium surfaces. Small display window: 400 x magnification. Large section: 3000 x magnification.

rende Calcein (Kalziumchelate) [13], während spezifische fluoreszierende Zellkompartiment- bzw. Organellenfärbungen (z.B. die mitochondrien- und ER-spezifischen Carbocyanine) sich dazu eignen, spezielle Zellvorgänge zu analysieren [28]. Unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren erlauben die simultane Applikation von zwei oder mehreren Farbstoffen mit der Möglichkeit der gleichzeitigen Detektion. DiOC₆(3) (DiOC) ist ein Vertreter der oben schon erwähnten Carbocyanine, welche spezifisch endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien färben und grün fluoreszieren lassen [28]. Syto61 (Syto) färbt spezifisch Nucleinsäuren an und zeigt neben einer Anreicherung im Nucleus auch Affinität zu Mitochondrien und Zytoplasma [7]. Das Emissionsspektrum liegt im roten Bereich. Die konfokale Laser Raster Mikroskopie bietet die Möglichkeit der dreidimensionalen Visualisierung sowohl im Rahmen der Hartgewebsdiagnostik [14, 1] als auch bei der Visualisierung fluoreszenzmarkierter Zellen [3].

Ziel dieser Pilotstudie war die Evaluierung dieser beiden Vitalfarbstoffe zur Visualisierung vitaler humaner osteoblastärer Zellen auf unterschiedlich behandelten Titanscheiben mit Hilfe der konfokalen Laser Raster Mikroskopie über einen Zeitraum von acht Tagen.

Material und Methoden

Herstellung und Charakterisierung der Titanscheiben:

Aus einem Stab (Durchmesser: 12,7 mm) handelsüblichen reinen Titans Gr. 4 (Implantatzulassung ASTM F67) wurden durch Spanen bzw. Polieren Scheiben (Dicke: 1 mm) mit folgenden Oberflächen hergestellt:

- Gruppe 1: gedreht (Abb. 1),
- Gruppe 2: gelept (Abb. 2),
- Gruppe 3: hochglanzpoliert (Abb. 3).

Die Scheiben wurden in Aceton entfettet, in entionisiertem Wasser gewaschen und bei 121°C dampfsterilisiert. Zur Bestimmung der Oberflächentopographie wurde Rasterelektronenmikroskopie (SE-Modus; FEI Quanta 200F) sowie

bocyanines) are suitable for analyzing specific cell processes [28]. Different absorption and emission spectra enable simultaneous application of two or more markers with the option of simultaneous detection. DiOC₆(3) (DiOC) is an example of the carbocyanines mentioned above, which specifically stain endoplasmic reticulum and mitochondria fluorescent green [28]. Syto61 (Syto) specifically stains nucleic acids and exhibits an affinity to mitochondria and cytoplasm as well as enrichment in the nucleus [7]. The emission spectrum is in the red range. Confocal Laser Scanning Microscopy provides the option of 3-dimensional visualization both in hard tissue diagnosis [14, 1] and in the visualization of fluorescent tagged cells [3].

The aim of this pilot study was to evaluate these two vital dyes for visualizing vital human osteogenic cells on differently prepared titanium discs using Confocal Laser Scanning Microscopy over a period of eight days.

Materials and methods

Fabricating and characterizing the titanium discs:

Discs (thickness: 1 mm) were fabricated from a rod (diameter: 12.7 mm) of standard grade 4 pure titanium (implant approved ASTM F67) by machining or polishing to produce the following surfaces:

- Group 1: machined (Fig. 1),
- Group 2: lapped (Fig. 2),
- Group 3: polished (Fig. 3).

The discs were degreased in acetone, washed in deionized water and steam sterilized at 121°C. Scanning electron microscopy (SE mode; FEI Quanta 200F) and CLSM profilometric visualization were used to determine the

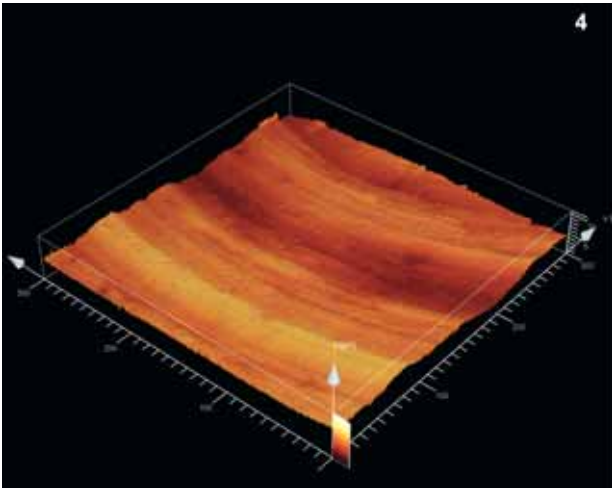


Abbildung 4 CLSM-Topographie der gedrehten Titanoberfläche.

Figure 4 CLSM topography of the machined titanium surface.

CLSM-Profilaufnahmen verwendet. Als Maß für die Mikro-
rauhigkeit der Oberflächen erfolgte die Bestimmung der Sq-
Werte (Leica LCS-Software).

Kultivierung osteoblastärer Zellen auf den Scheiben:

Für die Versuche wurde die kommerzielle osteoblastäre Linie HHOB-c verwendet (PromoCell, Heidelberg). Die Kultivierung erfolgte in Standard-Osteoblastenmedium [5] ohne Zusatz von b-Glycerolphosphat bei 37°C (gesättigte Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂). Vor der Zellbesiedlung wurden die Titanscheiben für 24 Stunden im Medium inkubiert. Eine definierte Anzahl von Zellen (20.000/ml) wurde auf die Scheiben appliziert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Petrischalenböden (Nunc, Wiesbaden). Nach weiteren 24 Stunden erfolgten die Vitalfärbungen.

Vitalfärbungen:

Getestet wurden die bereits oben erwähnten fluoreszierenden Vitalfarbstoffe DiOC und Syto (beide MoBiTec, Göttingen), sowohl einzeln als auch in Kombination, wobei die Färbung mit Syto vor der mit DiOC erfolgte. Das Protokoll erforderte zunächst für beide Farbstoffe die Herstellung einer Gebrauchslösung aus der Stammlösung (Syto: 1:5000; DiOC: 1:100.000). Damit wurden die Zellen unter Brutschrankbedingungen für 60 min (Syto) bzw. 5 min (DiOC) inkubiert. Zeitgleich erfolgte die Inkorporation des jeweiligen Farbstoffes durch die Zellen. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Bis zur Visualisierung wurden die Zellen weiter unter Brutschrankbedingungen kultiviert.

CLSM-Darstellung:

Die Visualisierung der auf den Titanscheiben kultivierten Osteoblasten wurde 24h bzw. acht Tage nach stattgehabter Zellbesiedlung durch konfokale Laser Raster Mikroskopie (Leica TCS SP2 X1) in aufrechter Anordnung durchgeführt. In Vorversuchen erfolgten Kultivierungen auf Petrischalenböden (bis zu 16 Tage) für den Farbstoff DiOC vor der CLSM-Visualisierung. Eintauchobjektive ermöglichten ein Arbeiten im Osteoblastenmedium, was die Zellen vor dem Austrocknen schützte und

surface topography. The Sq value was determined (Leica LCS software) as a measurement for the microroughness of the surfaces.

Cultivation of osteogenic cells on the discs:

The commercial osteoblastic line HHOB-c (PromoCell, Heidelberg) was used for the tests. The cells were cultivated in a standard osteogenic culture medium [5] without the addition of b-glycerol phosphate at 37°C (saturated humidity, 5% CO₂). The titanium discs were incubated for 24 hours in the medium before cell colonization. A defined number of cells (20,000/ml) was applied to the discs. Untreated culture petri dishes (Nunc, Wiesbaden) were used as references. Vital staining was carried out after a further 24 hours.

Vital staining:

The above-mentioned fluorescent vital dyes DiOC and Syto (both MoBiTec, Göttingen) were tested separately and in combination, with Syto staining being completed before DiOC staining. The protocol initially required a working solution to be prepared from the stock solution for both dyes (Syto: 1:5000; DiOC: 1:100,000). The cells were incubated with this solution under constant culture conditions for 60 min. (Syto) and 5 min. (DiOC). Each dye was simultaneously incorporated by the cells. Finally the cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS). Cultivation of the cells was continued under incubator conditions until visualization.

CLSM visualization:

The osteogenic cells cultivated on the titanium discs were visualized 24 hrs and eight days after cell colonization using Confocal Laser Scanning Microscopy (Leica TCS SP2 X1) arranged upright. In preliminary tests cells were cultivated on petri dishes (up to 16 days) for the DiOC dye before CLSM visualization. Immersion lenses allowed cell visualization without removal of the culture medium; this protected the cells against dehydration

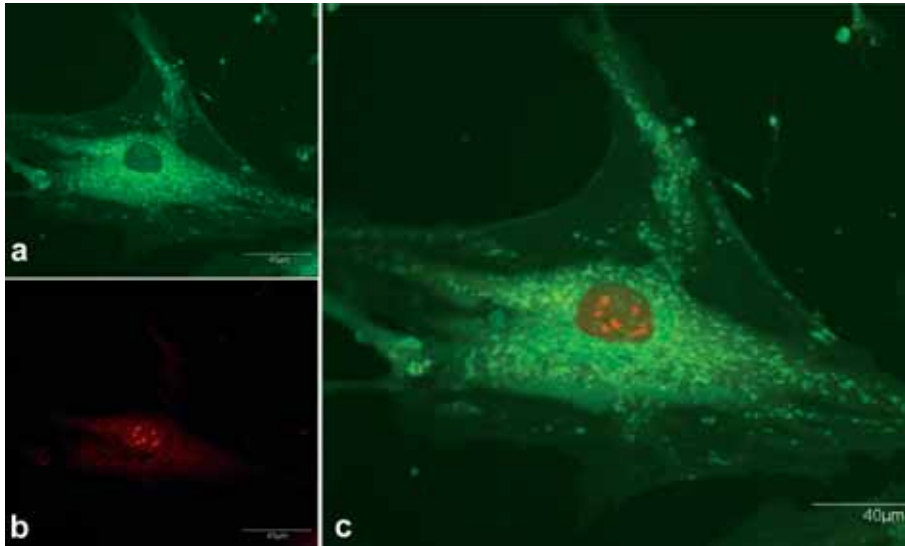


Abbildung 5 Humaner Osteoblast auf unbehandeltem Petrischalenboden 24 Stunden nach Doppelfärbung mit DiOC und Syto. a) Darstellung des endoplasmatischen Retikulum sowie von Mitochondrien mittels DiOC-Vitalfärbung. b) Darstellung der Kernregion mittels Syto-Vitalfärbung. c) Synchron Darstellung beider Farbstoffe.

Figure 5 Human osteoblast on an untreated culture petri dish 24 hours after double vital staining with DiOC and Syto. a) Visualization of the endoplasmic reticulum and mitochondria using DiOC vital staining b) Visualization of the nuclear region using Syto vital staining c) Synchronous visualization of both dyes.

Homöostase über den Untersuchungszeitraum gewährleistete. Standardisierte Aufnahmen mit einem zehnfach-Objektiv (HCX APO L 10x/0,3W) sowie einem 40fach-Objektiv (HCX APO L 40x/0,8W) erlaubten die Darstellung von 1,5 mm x 1,5 mm bzw. 375 µm x 375 µm großen Arealen. Für DiOC lag der Detektionsbereich der Fluoreszenz bei 500 bis 550 nm nach Anregung im Blauen (Argon-Laser: 488 nm). Syto wurde nach Anregung im Roten (Helium-Neon-Laser: 633 nm) im Bereich von 650 bis 700 nm detektiert. Die unterschiedlichen Detektionsbereiche beider Farbstoffe erlaubten die gleichzeitige, interferenzfreie Detektion. Zur Optimierung des Fluoreszenznachweises war das CLSM an Stelle der Farbfilter mit einem akustooptischen Beamsplitter (AOBS) ausgestattet. Synchron durchgeführte CLSM-Aufnahmen im Reflexionsmodus (Helium-Neon-Laser: 594 nm) ermöglichten die gleichzeitige Visualisierung der Titanoberflächenstruktur und erlaubten durch Überlagerung mit den Fluoreszenzaufnahmen eine exakte topographische Zuordnung der Zellen.

Ergebnisse

Die rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Oberflächentopographie ergab für die Titanscheiben der Gruppe 1 ein durch die Herstellung (Drehen) bedingtes konzentrisches Rillenmuster (Abb.1). Bei der Bestimmung der CLSM-Topographie (Abb.4) wurde ein Sq-Wert für die Mikrorauigkeit von 0,17 µm erhalten. Die REM-Darstellungen Titanscheiben der Gruppen 2 und 3 (Abb. 2 und 3) zeigten ein homogenes Oberflächenprofil unterschiedlicher Rauigkeiten auf (Gruppe 2: Sq = 0,33 µm; Gruppe 3: Sq = 0,09 µm). Die Rauigkeitswerte nahmen somit in der Reihenfolge geleppt > gedreht > poliert ab.

Alle besiedelten Titanflächen zeichneten sich durch hohe Zellverträglichkeit aus; im Überstand ließen sich keine abgestorbenen Zellen detektieren. Die gefärbten Osteoblasten auf den Scheiben blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum vital. Die beiden untersuchten Vitalfärbungen DiOC und Syto zeichneten sich durch gute Farbkonzanz und Zellkompatibilität aus. Ein signifikantes

and ensured homeostasis over the whole observation period. By using a 10fold objective (HCX APO L 10x/0.3W) and a 40fold objective (HCX APO L 40x/0.8W), we were able to visualize areas of 1.5 mm x 1.5 mm and 375 µm x 375 µm, respectively. The detection range for DiOC fluorescence was 500 to 550 nm after blue excitation (argon laser: 488 nm). Syto was detected in a range of 650 to 700 nm after red excitation (helium-neon laser: 633 nm). The different detection areas of the two dyes allowed simultaneous, interference-free detection. The CLSM color filter was fitted with an acousto-optical beamsplitter (AOBS) to optimize fluorescence detection. Synchronized CLSM reflexion mode images (helium-neon laser: 594 nm) enabled simultaneous visualization of the titanium surface structure and allowed exact topographic mapping of the cells by superimposition with the fluorescent images.

Results

Scanning electron microscopic visualization of the surface topography produced a concentric groove pattern due to the mode of manufacture (machining) for the titanium discs in Group 1 (Fig.1). In determining the CLSM topography (Fig.4) a Sq value of 0.17 µm was obtained for the microroughness. SEM visualization of the titanium discs in Group 2 and 3 (Fig. 2 and 3) demonstrated homogeneous surface profiles of varying roughnesses (Group 2: Sq = 0.33 µm; Group 3: Sq = 0.09 µm). Roughness decreased according to the following sequence lapped > machined > polished.

A feature of all colonized titanium surfaces was high cell compatibility; there were no dead cells detected in the supernatant. The stained osteogenic cells on the discs remained vital during the entire test period. The two vital dyes tested, DiOC and Syto, exhibited excellent color stability and cell compatibility. Bleaching of the stains was only significant after repeated laser scanning (n > 50).

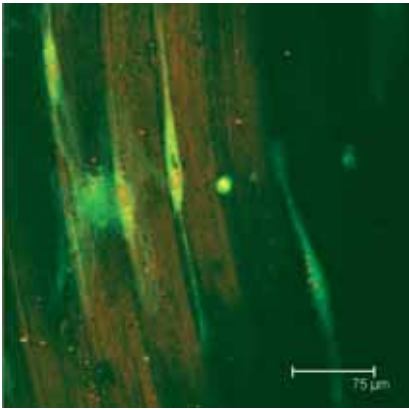


Abbildung 6 Detailaufnahme flacher, lang gestreckter humaner Osteoblasten auf einer gedrehten Titanoberfläche nach acht Tagen. Die Zellmorphologie passt sich den Oberflächenverhältnissen an.

Figure 6 Close-up image of flat, elongated human osteoblasts on a machined titanium surface after eight days. Cell morphology adapts to the surface structure.

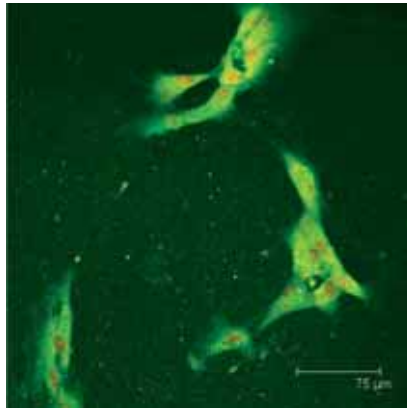


Abbildung 7 Detailaufnahme der Zellaggregate auf einer gelepten Titanoberfläche nach acht Tagen mit kompakten einzelnen Osteoblasten.

Figure 7 Close-up image of cell aggregates on a lapped titanium surface after eight days with compact individual osteoblasts.



Abbildung 8 Detailaufnahme von flachen und lang gestreckten osteoblastären Zellen acht Tage nach der Besiedlung auf hochglanzpoliertem Titan.

Figure 8 Close-up image of flat, elongated osteogenic cells eight days after colonization on polished titanium.

Ausbleichen der Farbstoffe erfolgte erst nach wiederholten Laserscans ($n > 50$).

Die isolierte Darstellung des grün fluoreszierenden Farbstoffes DiOC zeigt ein retikuläres Netzwerk mit prominenten runden Strukturen, die mit dem endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien korreliert werden konnten. Aussparungen in der Zellmitte geben indirekte Hinweise auf die Lokalisation des Kernes (Abb. 5a). Eine alleinige Färbung mit Syto (rot fluoreszierend) stellt neben der Kernregion auch perinukleäre Kompartimente (Mitochondrien) dar; hierbei kommt es zu Überlappungen mit DiOC. Auffallend ist die regelmäßige Darstellung mehrerer Kernkörperchen (Abb. 5b). Die gleichzeitige Detektion beider Vitalfarbstoffe ermöglicht eine gute Diskriminierung der Kernregion (Abb. 5c). Doppelt angefärbte Regionen wie Mitochondrien erscheinen durch den Summationseffekt gelblich, so dass von einer (Pseudo-) Dreifachfärbung gesprochen werden kann. In Vorversuchen zeigte sich der Farbstoff DiOC auf unbehandeltem Petrischalenboden über 14 Tage stabil und ließ sich bei einer signifikanten Zunahme der Zellzahl ohne zwischenzeitlichen Signalverlust gut detektieren.

Übersichtsaufnahmen (zehnfach-Objektiv) der gedrehten Titanoberflächen (Gruppe 1) nach acht Tagen zeigen eine konzentrische, gestreckte Ausrichtung der osteoblastären Zellen, diese war auch schon nach 24 Stunden zu beobachten. Eine Detailaufnahme (Abb. 6) unterstreicht die lang gezogene, sehr flache Zellmorphologie mit z. T. spindelförmigen Ausläufern. Die gleichzeitige Visualisierung des Untergrundes erlaubt die topographische Zuordnung der Zellen. Detailaufnahmen der gelepten Oberfläche (Gruppe 2) zeigen eine regelmäßige, ungerichtete Verteilung von Zellaggregaten (Abb. 7). Die Zellen sind kleiner als auf der Oberfläche der Gruppe 1 und erscheinen weniger gut verankert. Durch die Möglichkeit der konfokalen Mikroskopie, optisch-tomographische Schnittaufnahmen darzustellen,

Separate visualization of the green fluorescent dye DiOC showed a reticular network with prominent round structures, which could be correlated with the endoplasmic reticulum and mitochondria, respectively. Open areas in the centre of the cell provided indirect evidence of the localization of the nucleus (Fig. 5a). Separate staining with Syto (red fluorescent) also detected perinuclear compartments (mitochondria) adjacent to the nucleus; in this case there was an overlapping with the DiOC dye. Regular visualization of several nucleoli was noticeable (Fig. 5b). Simultaneous detection of the two vital dyes enabled clear discrimination of the nucleus region (Fig. 5c). Double stained regions such as mitochondria appeared yellowish due to the summation effect so that this could be described as a (pseudo) triple staining. In preliminary tests the DiOC stain on untreated culture petri dishes was stable over 14 days and was easily detected with a significant increase in the cell count in the meantime without noticeable loss of signal.

Overviews (10fold objective) of the machined titanium surfaces (Group 1) after eight days exhibited a concentric, elongated alignment of the osteogenic cells; this could even be observed after just 24 hours. A close-up (Fig. 6) highlights the elongated, very flat cell morphology with some spindle-shaped extensions. Simultaneous visualization of the disc surface allows topographic orientation of the cells. Close-up images of the lapped surface (Group 2) exhibit a regular, non-aligned distribution of cell aggregates (Fig. 7). The cells are smaller than on the surface of Group 1 and do not seem to be as well attached. As Confocal Laser Scanning Microscopy provides the option to visualize tomographic sections of the specimen, we were able to gain evidence of an increased, more spherical cell morphology for these cell aggregates. In the examination of the polished titanium

gewinnt man für diese Zellaggregate Hinweise auf eine höhere, rundlichere Zellmorphologie. Bei der Untersuchung der hochglanzpolierten Titanoberfläche (Gruppe 3) imponiert ein osteoblastärer Phänotyp, welcher demjenigen auf der gedrehten Titanoberfläche ähnelt. Die Zellen erscheinen wiederum als flach ausgestreckt und gut verankert; die Zellorientierung ist allerdings stochastisch (Abbildung 8).

Diskussion

Der Visualisierung von Osteoblastenpopulationen auf Implantatoberflächen kommt eine zentrale Rolle bei der Abschätzung der primären Zellantwort zu. Die Zellmorphologie korreliert hierbei mit der Zelldifferenzierung und gibt Hinweise auf den Aktivitätszustand der Zellen [15]. Als gut adaptiert und aktiv betrachtet werden flache, elongierte Osteoblasten mit vielen Zellausläufern gegenüber einem sphärischen Phänotyp mit wenig Zellausläufern [4, 18, 15]. Stabiles und großflächiges Zellattachement ist unabdingbare Voraussetzung zur Initiierung der Matrixsynthese und schlussendlich für eine erfolgreiche Osseointegration [25, 26]. Neben hoch auflösenden Methoden basierend auf der Rasterelektronenmikroskopie finden insbesondere immunhistochemische Darstellungen der Zellmorphologie eine breite Anwendung. Bei Letzteren geben vor allem spezifische Färbungen des Aktin-Zytoskelettes und der sogenannten „focal adhesions“ wertvolle Hinweise auf die Zell-Oberflächen-Interaktion [31, 21]. Bereits in der Einleitung erwähnte Nachteile dieser Methodik sind das zwangsweise Abtöten der Zellpopulation sowie die Gefahr von Fixierungsartefakten. Die Applikation von Vitalfarbstoffen mit – wie hier beschrieben – konsekutiver CLSM-Visualisierung erlaubt hingegen die Darstellung vitaler Zellen auf soliden Oberflächen. Die in dieser Untersuchung verwendeten Eintauchobjektive gewährleisten eine Aufrechterhaltung der Homöostase, zumindest über einen kurzen Beobachtungszeitraum. Danach können sich die beobachteten Zellen im Brutschrank erholen. Auf diese Weise sind wiederholte Rasterdurchläufe einer Probe zu beliebigen Zeitpunkten möglich, was die Menge der Versuchsansätze drastisch reduziert. In unserer Studie verwendeten wir pro Gruppe nur jeweils drei Scheiben. In Zukunft werden spezielle Mikroskopaufsätze konstante Kulturbedingungen über mindestens 24 Stunden ermöglichen und so eine kontinuierliche Beobachtung primärer dynamischer Zellattribute wie Migration und Zellattachement gewährleisten.

Die in dieser Pilotstudie verwendeten Vitalfarbstoffe DiOC und Syto weisen zwar keine Spezifität zum Zytoskelett oder gar zu „focal adhesions“ auf, vermitteln jedoch einen dreidimensionalen Eindruck der Zellmorphologie und erlauben erste Aussagen über Zell-Implantat-Interaktion vitaler Osteoblasten. Unsere Untersuchungen zeigen insbesondere für DiOC eine gute Farbkonstanz, auch 14 Tage nach erfolgter Färbung bzw. nach wiederholten Rasterdurchläufen ($n > 50$). Diskutiert werden müssen eventuelle phototoxische Effekte bei lang andauernder Laserillumination mit konsekutiven Alterationen des Zellhaushaltes. So wurde in der von uns gesichteten Literatur einmalig für DiOC über eine lokalisierte Störung der Mikrotubuliorganisation im Rahmen

surface (Group 3) an osteoblastic phenotype was predominant, which was similar to that on the machined surface. The cells again appeared flat, elongated and well attached: cell orientation was however stochastic (Figure 8).

Discussion

Visualization of osteogenic cell populations on implant surfaces plays a central role in the assessment of primary cell response. Cell morphology correlates with cell differentiation and gives an indication of cell activity [15]. Flat, elongated osteoblasts with numerous cell extensions are regarded as well adapted and active compared to a spherical phenotype with few cell extensions [4, 18, 15]. Stable, extensive cell attachment is essential for initiating matrix synthesis and consequently for successful osseointegration [25, 26]. Immunohistochemical visualization of cell morphology in particular is widely used as well as high-resolution techniques based on scanning electron microscopy. In immunohistochemical visualization valuable information on cell-surface interaction is mainly provided by specific staining of the actin cytoskeleton and focal adhesion sites [31, 21]. Disadvantages of this method already mentioned in the introduction are the inevitable destruction of the cell population and the risk of fixation artifacts. The application of vital dyes – as described here – using consecutive CLSM visualization allows detection of vital cells on solid surfaces. The dipping objectives used in this study ensure that homeostasis is maintained, at least for a brief observation period. Afterwards the observed cells can recover in the incubator. This method allows repeated scans of a specimen at any time, which drastically reduces the number of specimens. In our study we only used three discs per group respectively. In future special microscope attachments will enable constant culture conditions for at least 24 hours, ensuring consecutive observation of primary dynamic cell attributes such as migration and cell attachment.

The DiOC and Syto vital dyes used in this pilot study did not exhibit any specificity to the cytoskeleton or even to focal adhesion sites, but provided a three-dimensional impression of the cell morphology and initial information about cell-implant interaction of vital osteogenic cells. Our tests demonstrated, particularly for DiOC, excellent color stability, even after 14 days following staining and repeated scans ($n > 50$). Possible phototoxic effects during extended laser illumination with consecutive alterations to cell homeostasis should be discussed. In our references we have therefore included one report on localized disruption of microtubule organization in photodynamic treatments specifically related to DiOC [17]. On the other hand in our specimens we were able to observe continuous cell proliferation over 14 days. Studies by other working groups confirm that repeated CLSM scans are well tolerated by vital cells

photodynamischer Therapieansätze berichtet [17]. Auf der anderen Seite konnten wir in unseren Ansätzen eine Fortsetzung der Zellproliferation über 14 Tage beobachten. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen belegen, dass wiederholte CLSM-Mikroskopie von lebenden Zellen gut toleriert wird [29]. Die in unserer Studie untersuchten Titanoberflächen wiesen unterschiedliche Mikrorauigkeiten auf (geleppt > gedreht > poliert). Es sollte allerdings darauf hingewiesen werden, dass die von uns verwendete CLSM-Profilometrie die Mikrostrukturierung der Titanoberflächen nur grob wiedergibt. Genauere Bestimmungen, z.B. mit „Atomic Force Microscopy“ (AFM) sind geplant. Osteoblasten sowohl auf der gedrehten Oberfläche ($Sq = 0,17 \mu\text{m}$) als auch auf der polierten Oberfläche ($Sq = 0,09 \mu\text{m}$) zeigten einen flachen, lang ausgestreckten Phänotyp mit offensichtlich guter Haftung auf dem Untergrund. Zellen auf der gelepten Oberfläche ($Sq = 0,33 \mu\text{m}$) waren eher rundlich und schienen weniger gut zu haften.

Schlussfolgerung

Mit dieser Pilotstudie konnte eine Methodik erprobt werden, die prospektiv eine kontinuierliche Darstellung vitaler Osteoblasten auf lichtundurchlässigen Biomaterialien ermöglicht. Unterschiedliche Zellmorphologien auf verschiedenen Oberflächenstrukturen ließen sich eindeutig identifizieren. Der Wert dieser Methode liegt in der Evaluation früher Zell-Biomaterial-Interaktionen unter Minimierung aufbereitungsbedingter Artefakte.

Danksagung

Wir danken der Versuchswerkstatt des Max-Planck-Institutes für Chemie der Universität Mainz (Leiter: Herr Bückart) für die freundliche Anfertigung der Titanscheiben.

Literatur:

- Al-Nawas B, Duschner H, Grotz KA: Early cellular alterations in bone after radiation therapy and its relation to osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:1045
- Anselme K, Bigerelle M, Loison I, Noel B, Hardouin P: Kinetic study of the expression of beta-catenin, actin and vinculin during osteoblastic adhesion on grooved titanium substrates. *Biomed Mater Eng* 2004;14:545-556
- Attawia MA, Devin JE, Laurencin CT: Immunofluorescence and confocal laser scanning microscopy studies of osteoblast growth and phenotypic expression in three-dimensional degradable synthetic matrices. *J Biomed Mater Res* 1995;29:843-848
- Baxter LC, Frauchiger V, Textor M, ap Gwynn I, Richards RG: Fibroblast and osteoblast adhesion and morphology on calcium phosphate surfaces. *Eur Cell Mater* 2002;4:1-17
- Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN: Physiological concentrations of glucocorticoids stimulate formation of bone nodules from isolated rat calvaria cells in vitro. *Endocrinology* 1987;121:1985-1992
- Boyan BD, Lissdorfer S, Wang L, Zhao G, Lohmann CH, Cochran DL, et al.: Osteoblasts generate an osteogenic microenvironment when grown on surfaces with rough microtopographies. *Eur Cell Mater* 2003;6:22-27
- Bruce JI, Giovannucci DR, Blinder G, Shuttleworth TJ, Yule DI: Modulation of $[Ca^{2+}]_i$ signaling dynamics and metabolism by perinuclear mitochondria in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem* 2004;279:12909-12917
- Buser D, Brogginini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al.: Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent Res* 2004;83:529-533
- Cooper LF, Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al.: Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO2 grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. *Biomaterials* 2006;27:926-936
- Davies JE: Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;67:932-949
- Diener A, Nebe B, Luthen F, Becker P, Beck U, Neumann HG, et al.: Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics. *Biomaterials* 2005;26:383-392
- Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmen A: Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19:659-666
- Frenkel SR, Simon J, Alexander H, Dennis M, Ricci JL: Osseointegration on metallic implant surfaces: effects of microgeometry and growth factor treatment. *J Biomed Mater Res* 2002;63:706-713
- Grotz KA, Piepkorn B, Al-Nawas B, Duschner H, Bittinger F, Kann P, et al.: Confocal laser scanning microscopy: A nondestructive subsurface histotomography of healthy human bone. *Calcif Tissue Int* 1999;65:8-10
- Kim HJ, Kim SH, Kim MS, Lee EJ, Oh HG, Oh WM, et al.: Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res A* 2005; SEITE ????????????
- Klein MO, Reichert C, Al-Nawas B: Continuous migration and proliferation of osteoblasts on ECM-proteins vs. Emdogain. 83rd General Session & Exhibition of the IADR 2005;
- Lee C, Wu SS, Chen LB: Photosensitization by 3,3'-dihexyloxycarbonyl iodide: specific disruption of microtubules and inactivation of organelle motility. *Cancer Res* 1995;55:2063-2069
- Lee TM, Tsai RS, Chang E, Yang CY, Yang MR: The cell attachment and morphology of neonatal rat calvarial osteoblasts on the surface of Ti-6Al-4V and plasma-sprayed HA coating: effect of surface roughness and serum contents. *J Mater Sci Mater Med* 2002;13:341-350
- Lippincott-Schwartz J, Patterson GH: Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 2003;300:87-91

20. Liu Y, de Groot K, Hunziker EB: BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model. *Bone* 2005;36:745-757
21. Luthen F, Lange R, Becker P, Rychly J, Beck U, Nebe JG: The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2005;26:2423-2440
22. Park BS, Heo SJ, Kim CS, Oh JE, Kim JM, Lee G, et al.: Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2005; SEITE ????
23. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al.: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003;302:1704-1709
24. Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S: Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;73:88-96
25. Schwartz Z, Boyan BD: Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994;56:340-347
26. Schwartz Z, Lohmann CH, Oefinger J, Bonewald LF, Dean DD, Boyan BD: Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Adv Dent Res* 1999;13:38-48
27. Stokes DJ, Rea SM, Best SM, Bonfield W: Electron microscopy of mammalian cells in the absence of fixing, freezing, dehydration, or specimen coating. *Scanning* 2003;25:181-184
28. Terasaki M, Song J, Wong JR, Weiss MJ, Chen LB: Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* 1984;38:101-108
29. Windoffer R, Woll S, Strnad P, Leube RE: Identification of novel principles of keratin filament network turnover in living cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:2436-2448
30. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorf J, Cochran DL, et al.: High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49-58
31. Zinger O, Anselme K, Denzer A, Habersetzer P, Wieland M, Jeanfils J, et al.: Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography. *Biomaterials* 2004;25:2695-2711
32. Zinger O, Zhao G, Schwartz Z, Simpson J, Wieland M, Landolt D, et al.: Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005;26:1837-1847

Korrespondenzadresse:

Dr. Michael Klein
 Zentrum für zahnärztliche Verbundforschung
 1 Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
 Johannes Gutenberg-Universität Mainz
 Fachbereich Medizin
 Augustusplatz 2
 55131 Mainz
 E-Mail: klein@mkg.klinik.uni-mainz.de