

Entwicklung einer *in-vitro* Messmethode zur  
quantitativen Bestimmung der Zelladhäsion von  
Knochenzellen auf Implantatoberflächen

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum humanarum (Dr. rer. hum.)

an der Orthopädische Klinik und Poliklinik

der Universitätsmedizin Rostock

Rostock, 2015

**vorgelegt von:**

Andreas Rathay (geb. Fritsche)

aus Norderstedt

geboren am 10.02.1978 in Rostock

**Gutachter:**

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Rainer Bader

Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Joachim Rychly

Arbeitsbereich Zellbiologie, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. Holger Notbohm

Institut für Virologie und Zellbiologie, Universität zu Lübeck

**Datum der Einreichung:** 02. Februar 2015

**Datum der Verteidigung:** 05. Januar 2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Stand der Forschung</b> .....	<b>3</b>
2.1	Implantatoberflächen in der Orthopädischen Chirurgie.....	3
2.2	Interaktion zwischen Knochenzelle und Biomaterial .....	5
2.2.1	Zelladhäsionsmessverfahren.....	7
2.2.2	Das „Spinning-Disk“-Prinzip .....	10
2.2.3	Hydrodynamische Betrachtung einer rotierenden Scheibe in einem ruhenden, viskösen Medium .....	11
2.3	Aufgabenstellung und Zielsetzung .....	16
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.1	Spinning-Disk-Adhäsionsmessstand .....	17
3.1.1	Probengeometrie und Probenvorbereitung.....	20
3.1.2	Versuchsdurchführung zur Ermittlung der Zelladhäsion .....	22
3.1.3	Scherspannungsermittlung.....	25
3.1.4	Approximation der Zelladhäsionskraft .....	27
3.2	<i>In-Vitro</i> Adhäsionsuntersuchungen mit MG-63 Zellen .....	29
3.2.1	Kultivierung von MG-63 Zellen .....	29
3.2.2	Variation der Einflussparameter auf die Adhäsion von MG-63 Zellen.....	30
3.2.3	Zelladhäsion auf unterschiedlich modifizierten Implantatoberflächen .....	32
3.2.4	Einfluss von fetalem Kälberserum auf die Zelladhäsion.....	33
3.3	<i>In-vitro</i> Zelladhäsionsuntersuchungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen .....	34
3.3.1	Kultivierung von hMSC-Zellkultur .....	34
3.3.2	hMSC Zelladhäsion auf polierten TiAl6V4-Proben.....	35
3.4	Mechanische Oberflächencharakterisierung der modifizierten Implantatoberflächen.....	35
3.4.1	Wasserkontaktwinkelmessung und Rauheit .....	35
3.4.2	Haftfestigkeit der Implantatbeschichtungen .....	36
3.5	Statistische Analyse .....	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
4.1	Auswirkung variierender Parameter auf die MG-63 Zelladhäsion .....	39
4.1.1	Einfluss der Rotationszeit auf das Ergebnis der Zelladhäsionsmessungen .....	39
4.1.2	Einfluss der Zellpassage auf die Zelladhäsionsmessungen von MG-63 Zellen.....	40
4.1.3	Einfluss der Inkubationszeit auf die Zelladhäsion von MG-63 Zellen .....	41
4.2	MG-63 Zelladhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen.....	43
4.2.1	Kontaktwinkel und Oberflächenrauheiten der unterschiedlichen Implantatoberflächen.....	43
4.2.2	Haftfestigkeit der unterschiedlichen Implantatoberflächen.....	44
4.2.3	Scherspannungen und Scherkräfte adhärierender MG-63 Zellen auf unterschiedlichen Implantatoberflächen .....	45
4.3	Untersuchung zum Einfluss von FKS auf die MG-63 Zelladhäsion.....	49
4.4	Zelladhäsion von humanen mesenchymaler Stammzellen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen .....	51
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b> .....	<b>72</b>

<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>

## 1 Einleitung

Allein in Deutschland wurden im Jahr 2010 etwa 210.000 Hüft- und 175.000 Knieendoprothesen eingesetzt [1], um die Bewegungsfreiheit für Patienten mit schmerzhaften Gelenken wiederherzustellen. Die Erhöhung von Implantatstandzeiten ist eine der großen Herausforderungen in der Implantattechnologie. In der Hüft- und Knieendoprothetik liegt die Standzeit bei ca. 90 % der Implantate über 10 Jahre [2, 3]. Einer der häufigsten Ausfall- bzw. Revisionsgründe mit etwa 75 % ist die aseptische Implantatlockerung [2], oftmals ausgelöst durch eine osteolytische Reaktion infolge von Abriebpartikeln im umliegenden Gewebe [4, 5]. Zudem können Infektionen (7 %), Dislokationen (6 %), Frakturen (5 %) [2] oder zunehmend auch Implantatallergien [6, 7] die Standzeiten erheblich kompromittieren.

Für eine erhöhte Implantatstandzeit ist eine optimale ossäre Integration der Endoprothese Grundvoraussetzung [8]. Diese wird unmittelbar postoperativ durch die Primärstabilität des Implantats im Implantatlager eingeleitet. Zu große Mikrobewegungen aufgrund von unzureichender Primärstabilität können das Anwachsen von Knochenzellen bei zementfreien Endoprothesen erschweren oder verhindern [9, 10], da sich lockeres Bindegewebe zwischen dem Implantat und den lasttragenden Knochen bilden kann [11]. Für zementierte Implantate ist der Formschluss ebenso wichtig, da erhöhte Mikrobewegungen mittelfristig zu erhöhtem Abrieb und somit zum Ausfall der Endoprothese führen können. Die ossäre Implantatverankerung (Sekundärstabilität) folgt bei ausreichender Primärstabilität durch das Ansiedeln von Knochenzellen auf der Implantatoberfläche, die in einem festen Verbund mit dem umliegenden Knochengewebe stehen und beugt somit der Implantatlockerung am effektivsten vor [12]. Eine vollständig besiedelte und sekundär stabile Endoprothese kann zudem das Risiko einer implantatassoziierten Infektion reduzieren [13].

Die durch Revisionsoperationen verursachte volkswirtschaftliche Belastung ist zudem enorm. Im Jahr 2005 wurden in den USA 79.100 Hüft- und Knieendoprothesen revidiert [14]. Die gesamten Behandlungskosten für diese Revisionen wurden mit ca. 2,4 Milliarden US-Dollar pro Jahr beziffert [15]. In Deutschland wurden im Jahr 2010 etwa 30.000 Hüft- und 23.000 Knierevisionen durchgeführt [1]. Mit einer Revision steigt das Infektionsrisiko auf ein Vielfaches an. Im gleichen Jahr wurden in den USA 360 Millionen US-Dollar zusätzliche jährliche Behandlungskosten für Infektionen, welche im direkten Zusammenhang mit einem künstlichen Gelenkersatz standen, aufgewendet [15]. Es besteht daher ein großes sozio-ökonomisches Interesse, endoprothetische Implantate zu optimieren und die Zahl der Revisionsoperationen zu reduzieren.

Demzufolge wurde in den vergangenen Jahren viel Forschungs- und Optimierungsaufwand betrieben, um die Standzeiten, von Endoprothesen, zu verbessern und somit die Anzahl von

Revisionen zu verringern. Die Auswahl an möglichen Implantatmaterialien ist aufgrund der hohen mechanischen und biokompatiblen Ansprüche [11] jedoch stark eingeschränkt. Auch hinsichtlich des Designs sind der Optimierung zugunsten von Funktionalität und Wirtschaftlichkeit Grenzen gesetzt. Daher fällt der Fokus zunehmend auf die Modifikation der Implantatoberflächen, um diese mechanisch, chemisch oder biologisch zu funktionalisieren [16].

## 2 Stand der Forschung

### 2.1 Implantatoberflächen in der Orthopädischen Chirurgie

In der Orthopädischen Chirurgie werden hauptsächlich zwei Arten von Implantaten eingesetzt. Einerseits werden temporäre Implantate, zumeist zur Stabilisierung von Knochenbrüchen in Form von Osteosyntheseplatten, Marknägeln oder Fixateur externe, verwendet, wobei eine ossäre Integration des Materials hier nicht erwünscht ist. Andererseits werden permanente Implantate, wie zum Beispiel Hüft-, Knie- oder Schulterendoprothesen, implantiert, dessen Osseointegration an den mit Knochen in Kontakt stehenden Oberflächen im zementfreien Einsatz eine Grundbedingung für die langfristige Implantatfunktionalität darstellt. Zudem müssen artikulierende Flächen möglichst verschleißarm gestaltet werden. Weiterhin besteht ein großes Interesse an anti-infektiösen Beschichtungstechnologien, um implantatassoziierte Infektionen zu minimieren. Je nach Anforderung werden Implantatoberflächen teilweise oder in Gänze entsprechend funktionalisiert.

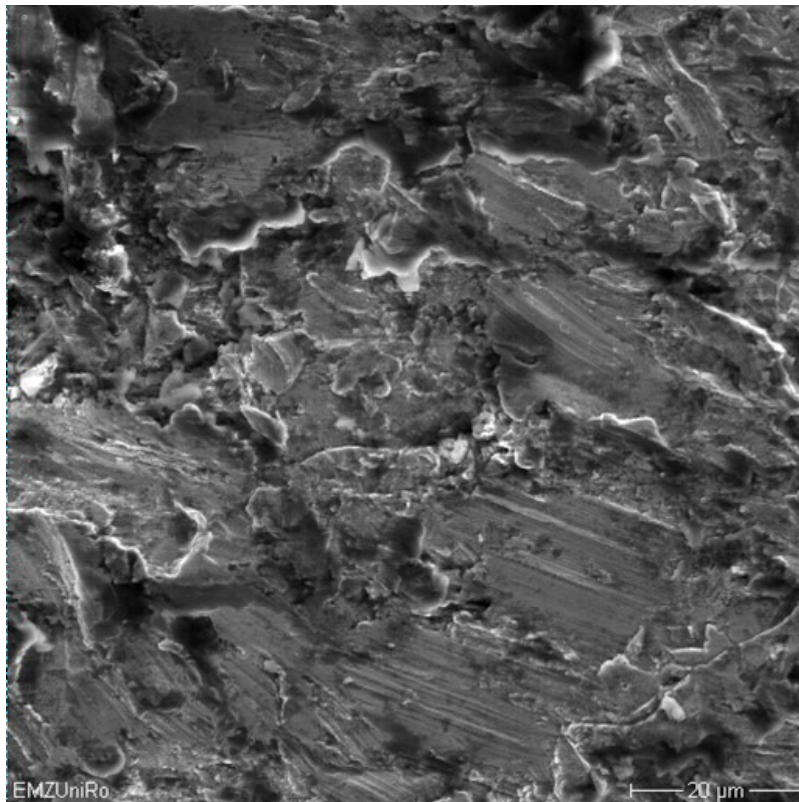


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer korundgestrahlten Probenoberfläche aus einer Titanlegierung (TiAl6V4).

Oberflächenfunktionalisierungen können durch mechanische Bearbeitung oder spezielle Beschichtungen in teilweise aufwendigen Verfahren realisiert werden. Für artikulierende

Flächen und temporäre Implantate werden Oberflächen mechanisch poliert, wobei Rauheiten ( $R_a$ ) von weniger als  $0,01\ \mu\text{m}$  erreicht werden. Durch anodische Oxidation in einem alkalischen Bad entstehen an den Oberflächen von Titanlegierungen gradierte Titanoxidschichten [17, 18], die das Einwachsen von Knochenzellen verhindern sollen. Eine Aufrauung mittels Druckluftstrahlen bewirkt hingegen eine Oberflächenvergrößerung (Abb. 1) und begünstigt eine ossäre Integration von Implantatmaterialien. Hierbei wird ein Strahlmittel über eine Düse mittels Druckluft mit einem Druck von bis zu 6 bar in einer Entfernung von ca. 100 mm auf die Oberfläche beschleunigt. Als Strahlmittel werden häufig Glasperlen mit einem Durchmesser von 90 bis  $250\ \mu\text{m}$  oder Korundpartikel mit Durchmessern bis zu  $400\ \mu\text{m}$  eingesetzt, wodurch Rauheiten ( $R_a$ ) von ca. 1 bis  $5\ \mu\text{m}$  erzielt werden [19, 20].

Größere Rauheiten werden beispielsweise durch die Titanplasmaspray-Beschichtung (TPS) erzielt. Die Beschichtungstechnologie ist ein Plasmaspray-Verfahren im Vakuum (VPS, engl. vacuum plasma spray), bei dem in einer Vakuumkammer Titanpulver durch eine Plasmaflamme gefördert und geschmolzen wird. Die so entstandenen Titantropfen werden auf die Implantatoberfläche beschleunigt und bauen eine poröse Titanschicht auf. Mittels TPS können Schichtdicken bis zu  $600\ \mu\text{m}$  und, je nach Pulverkörnung, Rauheiten bis zu einem  $R_a$ -Wert von  $40\ \mu\text{m}$  eingestellt werden [19, 21]. Um die Bioaktivität einer TPS-Beschichtung weiter zu erhöhen, werden beispielsweise ca.  $20\ \mu\text{m}$  dicke, resorbierbare Calcium-Phosphat-Beschichtungen (CaP) durch elektrochemische Abscheidungsverfahren zusätzlich auf die TPS-Oberflächen aufgebracht [19, 22]. CaP-Beschichtungen können jedoch auch mittels thermischer Spritzverfahren, Sputter-Coating, gepulster Laserabscheidungen oder Tauchprozessen realisiert werden [23, 24].

Die kristalline Struktur einiger CaP-Beschichtungen kann als Träger für Antibiotika, wie z.B. Gentamicin, dienen, um eine Infektionsprophylaxe des Implantats herbeizuführen [25]. In einem anderen Ansatz werden Antibiotika in einem Tauchprozess in einer resorbierbaren Milchsäurebeschichtung immobilisiert [26]. Aufgrund der steigenden Antibiotikaresistenzen setzen neuere anti-infektiöse Beschichtungstechnologien auf die Integration von Kupfer- [27, 28] oder Silberionen [29] in Implantatoberflächen. Zudem versprechen wenige Nanometer dicke plasmapolymersierte Allylamin- (PPAAm) oder Ethylendiamin- (PPEDA) Beschichtungen [30, 31] ein beschleunigtes Anwachsen von Knochenzellen auf den Implantatoberflächen, die den Wettlauf der Bakterien und Zellen zur Implantatoberfläche [13] zugunsten der Knochenzellen entscheiden sollen.

Auf artikulierenden Gelenkflächen werden beispielsweise Titanitrid- (TiN) oder Titanobnitrid- (TiNbN) Beschichtungen durch physikalische Gasphasenabscheidungen (PVD, engl. physical vapour deposition) auf die Oberflächen aufgebracht [32]. In einem Hochvakuum wird das Beschichtungsmaterial durch Elektronenbeschuss verdampft und auf die Implantatoberfläche beschleunigt, wo sich schließlich das verdampfte Material



niederschlägt und langsam eine Schicht von ca. 4 µm Dicke aufbaut. Die so entstehenden Schichten werden zugleich auch als anti-allergene Beschichtungen eingesetzt, da die Freisetzung von allergenen Metallionen, wie z.B.  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Cr}^{2+}$  [7], durch die geschlossene Schichtdecke stark verringert wird.

## 2.2 Interaktion zwischen Knochenzelle und Biomaterial

Für den Erfolg einer Oberflächenfunktionalisierung spielt die Interaktion an der Grenzfläche zwischen Knochen und Implantat eine entscheidende Rolle. Die Biokompatibilität einer Oberfläche kann beispielsweise mit Hilfe von Proliferations- und Zellausbreitungsuntersuchungen [33, 34] schnell und zuverlässig *in-vitro* nachgewiesen werden. Hierbei kann jedoch die Effektivität der Funktionalisierung, insbesondere für bioaktive Implantatmodifikationen, nicht ausreichend geklärt werden.

Die Zelladhäsion ist Bestandteil vieler natürlicher Prozesse im Organismus, wie beispielsweise der Embryogenese, der Wundheilung, dem Erhalt der Gewebestruktur, oder der Zellmigration [35]. Speziell bei der Gewebeintegration von Biomaterialien ist die Zelladhäsion für das Überleben der Knochenzellen, insbesondere für die Zellproliferation und -differenzierung, die Matrixmineralisierung sowie letztlich für die Knochenbildung, essenziell [36]. Bei der Integration von Implantatmaterialien gilt der Schnittstelle zwischen der Oberflächen und der Zelle besondere Aufmerksamkeit. Oberflächeneigenschaften, wie die chemische Zusammensetzung, Oberflächenenergie, Oberflächenrauheit und -topographie [37], tragen entscheidend zur Besiedlung der Oberfläche durch Osteoblasten bei [35, 38-41].

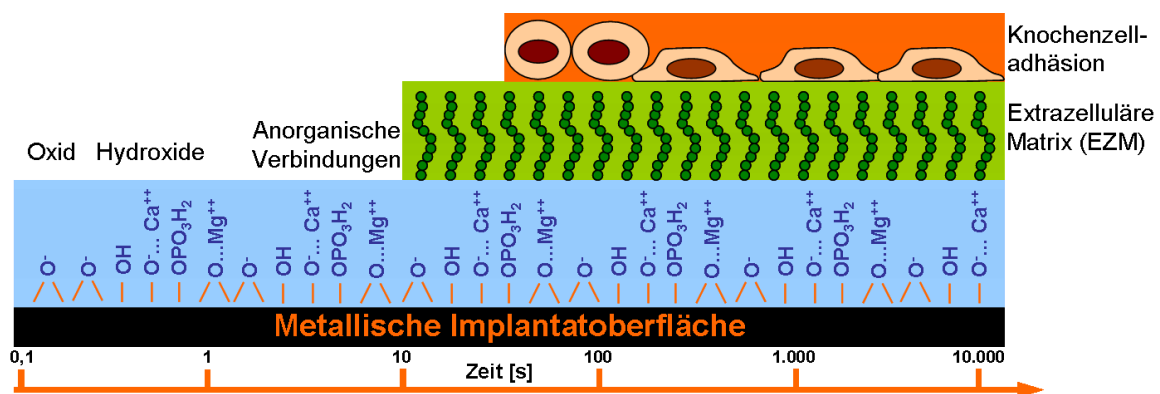


Abb. 2: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der initialen Knochenzellbesiedlung auf einer Implantatoberfläche (nach [11]).

Bei Kontakt eines Implantats mit dem Biosystem verändert sich je nach Material zunächst die chemische Zusammensetzung der Oberfläche. In weniger als einer Sekunde bilden sich

Oxide, Hydroxide sowie anorganische Verbindungen durch Wechselwirkungen mit den Körperflüssigkeiten. Nur einige Sekunden später adsorbieren, neben Zucker- und Fettverbindungen, unterschiedliche Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) an der Implantatoberfläche, die somit für die Zelladhäsion konditioniert wird (Abb. 2) [11, 42]. Die Proteinadsorption stellt damit ein Initialereignis bei der Zell-Material-Interaktion dar und ist letztlich essentiell für die Zellverankerung und -ausbreitung sowie alle nachfolgenden zellphysiologischen Prozesse. So sind die Knochenzellen erst nach erfolgter Zelladhäsion in der Lage, ihre eigene EZM zu synthetisieren [36, 40].

Im Knochengewebe besteht die EZM, genannt Osteoid, vorwiegend aus 90 % Kollagen Typ I und zu 10 % aus nichtkollagenen Proteinen, wie z.B. Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin, Fibronectin und verschiedenen Wachstumsfaktoren [35]. Zur mechanischen Stützung wird die EZM im Knochen hauptsächlich durch Hydroxylapatit (HA) kalzifiziert. Das Faserprotein Elastin verleiht dem Knochen eine hohe Verformungsfähigkeit und Dehnbarkeit. Einige nichtkollagene Matrixproteine (Liganden) werden über eine RGD-Erkennungssequenz (RGD: Arginin-Glycin-Asparaginsäure) [43, 44] spezifisch von Oberflächenrezeptoren der Knochenzellen, den sogenannten Integrinen, erkannt und so die Anheftung der Zellen an die EZM ermöglicht. Andere nicht-RGD-haltige Matrixproteine wie Kollagen und Laminin werden über andere Erkennungssequenzen spezifisch von Kollagen- und Laminin-Rezeptoren erkannt [36, 44-47]. Durch oberflächennahe Felder könnten EZM Proteine eine Veränderung erfahren, wodurch eine unspezifische zelluläre Abwehr des Körpers in Gang gesetzt werden kann [11, 42].

Integrine sind transmembrane Proteinmoleküle, die in der Zellmembran eukaryoter Zellen, mit Ausnahme der roten Blutkörperchen, verankert sind und neben anderen Adhäsionsmolekülen (z.B. Cadherine) die wichtigste Gruppe der Zelladhäsionsrezeptoren darstellen. Sie bestehen aus zwei nicht-kovalent gebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, den sogenannten Heterodimeren mit je einer langen extrazellulären, einer transmembranen und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne. Derzeit sind über 20 verschiedene Heterodimere bekannt, die sich aus verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und ihren Kombinationen zusammensetzen und so spezifisch an unterschiedliche Liganden binden können [35, 44, 48]. Mit der Bindung der Integrine an diverse Matrixproteine (z.B. Fibronectin) kommt es zur Bildung der sogenannten Fokalkontakte, wobei zwischen dem Integrin und diversen Adapterproteinen (z.B. Vinkulin, Paxillin) eine spezifische Verbindung mit dem Aktinfilament hergestellt wird [36, 49, 50]. Diese fokalen Komplexe bilden Verbindungen zwischen der Implantatoberfläche und der 10 bis 15 nm entfernten Zellmembran [35] und sind maßgeblich für die integrinvermittelte Zelladhäsion verantwortlich. Zudem enthalten sie strukturelle sowie signalgebende Moleküle (z.B. FAK), so dass Integrine als Adhäsionsmoleküle in der Lage sind sowohl mechanische Reize bidirektional zwischen

der EZM und der Zelle zu übertragen als auch biochemische Signalkaskaden zu aktivieren, wodurch z.B. Proliferation, Wachstum und Differenzierung gesteuert werden [36, 46].

### 2.2.1 Zelladhäsionsmessverfahren

Verschiedene Verfahren können zur Beurteilung der Zelladhäsion auf einer Oberfläche eingesetzt werden. Hierbei werden entweder die Haftzugfestigkeit oder die Scherfestigkeit der Verbindung zwischen Zelle und Substrat bewertet. Bei allen Methoden werden adhäsierende Zellen auf das zu untersuchende Substrat überführt und im Rahmen unterschiedlicher Fragestellungen, z.B. in Abhängigkeit unterschiedlicher Kulturbedingungen, entsprechend inkubiert. Im Folgenden werden verschiedene Adhäsionsmesssysteme vorgestellt.

Bei der „Abspül“-Methode nach García *et al.* [46] wird eine bekannte Anzahl von Zellen über einen kurzen Zeitraum inkubiert. Über einen Wasserstrahl werden dabei nicht-adhärenente Zellen von dem Substrat abgespült (Abb. 3a) und die verbleibenden adhärenenten Zellen gezählt. Diese sehr einfache und kostengünstige, jedoch ungenaue Methode, beschränkt sich auf die Kurzzeitadhäsion (< 60 min). Die Messergebnisse unterliegen großen Streuungen und erlauben keine quantitative Ermittlung der Adhäsionskraft, da die applizierten Kräfte unbekannt und schwankend sind [46].

Ein weiteres kostengünstiges Verfahren zur Untersuchung der Zelladhäsion wird mittels einer Zentrifuge (Abb. 3b) realisiert [51-56]. Durch die Rotationsbewegung wirkt eine Zentrifugalkraft auf die adhärenente Zellpopulation. Der Vorteil dieser Methodik liegt in der einfachen Handhabung des Systems, den geringen Kosten und der quantitativen Bestimmung der Zelladhäsionskräfte. Allerdings sind die wirkenden Zentrifugalkräfte für Langzeit-adhärenente Zellen zu gering [46], sodass, ähnlich dem Abwaschen, lediglich die Kurzzeitadhäsion analysiert werden kann.

Mittels Mikromanipulationsverfahren können Normal- oder Tangentialkräfte auf einzelne Zellen ausgeübt und somit die Zellanhaftung auf der Oberfläche quantitativ bestimmt werden. Die Bedienung solcher Messapparaturen bedarf eines erfahrenen, geschulten Personals und ist äußerst zeitintensiv [46]. Die erzielten Ergebnisse sind sehr präzise, beziehen sich jedoch immer nur auf die Adhäsionskraft einer einzelnen Zelle. Messungen an einem Zellverband oder einem Biofilm sind mit dieser Methodik nicht möglich. Zudem sind die Messapparaturen äußerst kostenintensiv. Zu den Mikromanipulationsverfahren gehören Mikropipetten, Laserpinzetten [57] oder Rasterkraftmikroskopausleger (AFM, engl. atomic force microscope) [58-60]. Über einen Unterdruck werden Zellen unter Verwendung von Mikropipetten (Abb. 3c) von einem Substrat abgesaugt [61-65]. Der benötigte Absaugdruck, um eine einzelne Zelle vom Substrat zu lösen, ist proportional zur Zelladhäsionskraft. Mit

AFM-basierter Single-Cell Force Spektroskopie (SCFS) kann ebenfalls die Zelladhäsion auf einer Materialoberfläche unter physiologischen Bedingungen lokal aufgelöst und gemessen werden [59, 66-68]. Hierbei wird eine lebende Zelle an einen AFM-Cantilever, der Messnadel eines AFM, angebracht und anschließend in Kontakt mit einem Substrat gebracht (Abb. 3d). Nach einem Adhäsions-zeitraum von 1 s bis max. 10 min wird der Cantilever von der Oberfläche zurückgezogen und die dabei auftretenden Kräfte aus der Auslenkung des Cantilevers abgeleitet. Die maximale Auslenkung des Cantilevers stellt dabei ein direktes Maß für die Adhäsionskraft dar. Untersuchungen von Bindungskräften zwischen zwei Zellen sind mit diesem Messverfahren ebenso möglich [69].

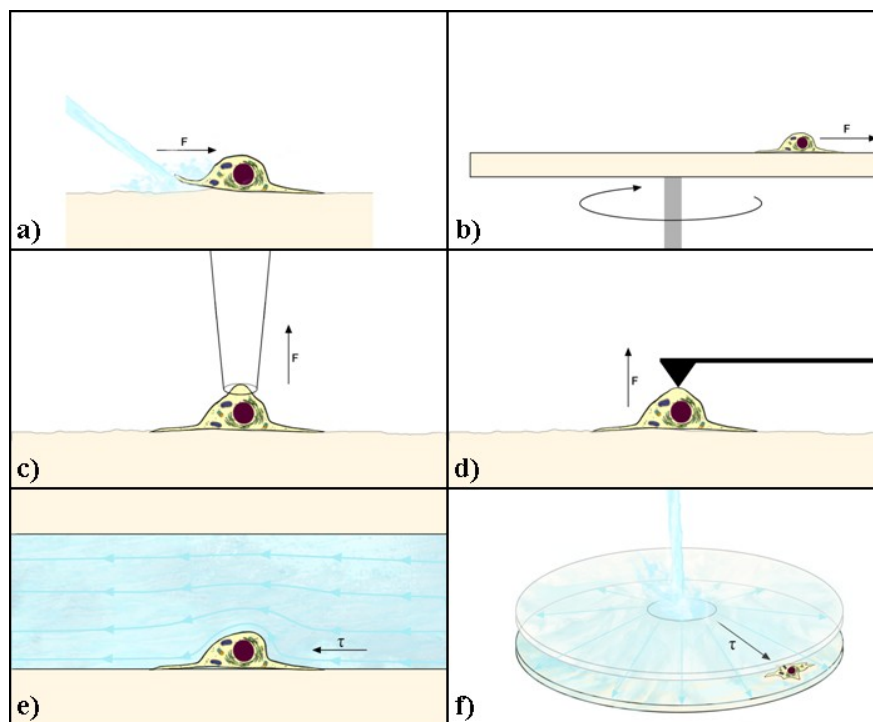


Abb. 3: Schematische Darstellung unterschiedlicher Messverfahren zur Bestimmung der Zelladhäsion; a) Waschen, b) Zentrifugieren, c) Mikropipettieren, d) Rasterkraftmikroskopieren, e) Strömung zwischen zwei parallelen Platten und f) radiale Strömung zwischen parallelen Kreisscheiben [16].

Yoshikawa *et al.* [70] setzen die Gesetzmäßigkeiten der Strömungsmechanik zur Adhäsionsuntersuchung ein. Mittels eines Pikosekundenlasers wird eine Schockwelle im Zellkulturmedium in unmittelbarer Nähe zu einer adhären Zelle ausgelöst. Über die Laserintensität kann der durch die Schockwelle erzeugte Druck gesteuert und somit die Adhäsion auf einem Substrat untersucht werden. Die Versuchsanordnung ist jedoch äußerst kostenintensiv und ermöglicht lediglich zeitintensive Einzelzelluntersuchungen.

Hydrodynamische Strömungsverfahren haben den Vorteil, dass sowohl die Kurzzeit- als auch die Langzeitadhäsion, entweder von einzelnen Zellen oder von Zellen eines

Zellverbandes, untersucht werden können. Im Allgemeinen basieren die verhältnismäßig einfachen Versuchsanordnungen auf einer Strömungskammer, in der eine Flüssigkeit über die auf einer ebenen Testfläche anhaftenden Zellen strömt. Die dabei entstehende hydrodynamische Scherspannung  $\tau_w$  (Kraft/Fläche) bzw. die daraus resultierende Scherkraft, die auf die Zellen wirkt, kann rechnerisch ermittelt werden. Jedoch sind insbesondere bei höheren Fließgeschwindigkeiten Turbulenzen möglich, so dass eine genaue Beschreibung der Strömungsverhältnisse in der Strömungskammer von großer Bedeutung ist. Zudem hängt die Scherkraft stark von der Größe und der Form der Zellen ab [71, 72]. Diese Einflüsse können jedoch bei der Berechnung der Adhäsionskraft berücksichtigt werden. Hydrodynamische Strömungsverfahren werden je nach Art der Erzeugung der Strömung bzw. dem Aufbau der Strömungskammer wie folgt unterteilt [46]:

- geradlinige Strömung zwischen parallelen Platten
- radiale Strömung zwischen feststehenden parallelen Kreisscheiben
- Strömung zwischen einem rotierenden Kegel und einer ruhenden Platte
- Grenzschichtströmung auf der Oberfläche einer rotierenden Kreisscheibe.

Diese Verfahren werden bis heute in der Forschung eingesetzt. Bei der linearen Flüssigkeitsströmung zwischen zwei parallel angeordneten Platten [73-76] bleibt die Strömungsgeschwindigkeit konstant (Abb. 3e). Da für jede Strömungsrate  $Q$  eine bestimmte Scherspannung auf die Zellen ausgeübt wird, müssen die Experimente mit unterschiedlichen Strömungsgeschwindigkeiten wiederholt werden, um die Adhäsionskraft der Zelle zu ermitteln [46]. Im Gegensatz dazu fließt die Flüssigkeit bei der Strömungszelle mit zwei parallelen starren Kreisscheiben zwischen den Scheiben radial von innen nach außen (Abb. 3f). Dadurch nimmt die Strömungsgeschwindigkeit und somit die Scherspannung mit zunehmendem Abstand vom zentralen Einspeisungspunkt der Flüssigkeit ab, wodurch mit einer Einzelmessung verschiedene Scherkräfte auf Zellen ausgeübt werden, sofern sie unterschiedliche radiale Positionen besitzen. Ein Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch in den komplizierten Strömungsbedingungen am Einspeisungspunkt im Scheibenmittelpunkt, die zu undefinierten Strömungszuständen in der Messzelle führen können (Turbulenzen) [46]. Bei der Strömung zwischen einem rotierenden Kegel und einer ruhenden Platte wird die Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Messkammer radial konstant gehalten [77-79]. Dies wird über den Winkel des Kegels eingestellt. Nachteil hierbei ist jedoch, dass für jede Geschwindigkeit ein anderer Winkel und somit ein anderer Kegel zum Einsatz kommt. Feine Abstufungen oder ein breites Geschwindigkeitsspektrum sind nur mit viel Aufwand zu realisieren. Das Verfahren der Grenzschichtströmung auf der Oberfläche

einer rotierenden Kreisscheibe nach dem „Spinning-Disk“-Prinzip wird im folgenden Abschnitt 2.2.2 gesondert betrachtet.

### 2.2.2 Das „Spinning-Disk“-Prinzip

Der in dieser Arbeit verwendete und in Kapitel 3.1 beschriebene Messstand zur Ermittlung der Adhäsionskräfte auf Implantatoberflächen beruht auf dem Prinzip einer sich drehenden Kreisscheibe in einem ruhenden Medium – dem „Spinning-Disk“-Prinzip [38, 80-84]. Hierbei wirkt während der Rotation der Kreisscheibe eine tangentielle Scherspannungen  $\tau$  auf eine Zelle (Abb. 4). Die Scherspannung hängt maßgeblich von der Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  und der radialen Position  $r$  der Zelle vom Zentrum ab. Mit zunehmendem Abstand vom Kreisscheibenzentrum erhöht sich die Scherspannung. Zudem müssen die Viskosität  $\eta$  und Dichte  $\rho$  des ruhenden Mediums berücksichtigt werden. Unter der Annahme idealer laminarer Strömungsverhältnisse kann die resultierende Scherspannung  $\tau_{\text{res}}$  folgendermaßen berechnet werden [85-88]:

$$\tau_{\text{res}} = 0,8r\sqrt{\eta\rho\omega^3}. \quad (1)$$

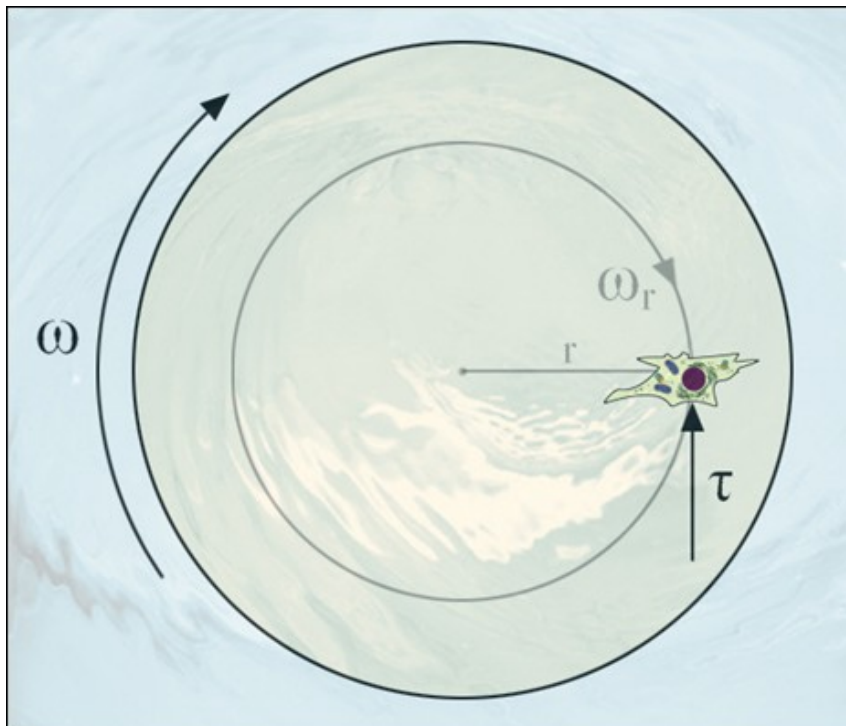


Abb. 4: Schematische Darstellung des Spinning-Disk-Prinzips zur quantitativen Bestimmung der Zelladhäsionskräfte [16].

Ein Vorteil dieser Versuchsanordnung besteht darin, dass die Zelladhäsion unter konstanten chemischen und biologischen Bedingungen ermittelt werden kann [46], ähnlich den in Kapitel 2.2.1 beschriebenen anderen hydrodynamischen Messverfahren. Durch die linear

zunehmende Scherspannung vom Scheibemittelpunkt zum Scheibenrand (Entfernung  $r$  von der Drehachse) bei konstanter Rotationsgeschwindigkeit, können unterschiedliche Scherspannungen in einem Experiment angewendet werden. Dadurch reduziert sich der Messaufwand während der anfänglichen Suche nach einer geeigneten Rotationsgeschwindigkeit, um Zellen vom Substrat zu lösen, erheblich. Zudem bleibt die Strömung, in der auf der Scheibenoberseite ausgebildeten Flüssigkeitsgrenzschicht, bis zu sehr hohen Strömungsgeschwindigkeiten (Rotationsgeschwindigkeiten) laminar.

### 2.2.3 Hydrodynamische Betrachtung einer rotierenden Scheibe in einem ruhenden, viskösen Medium

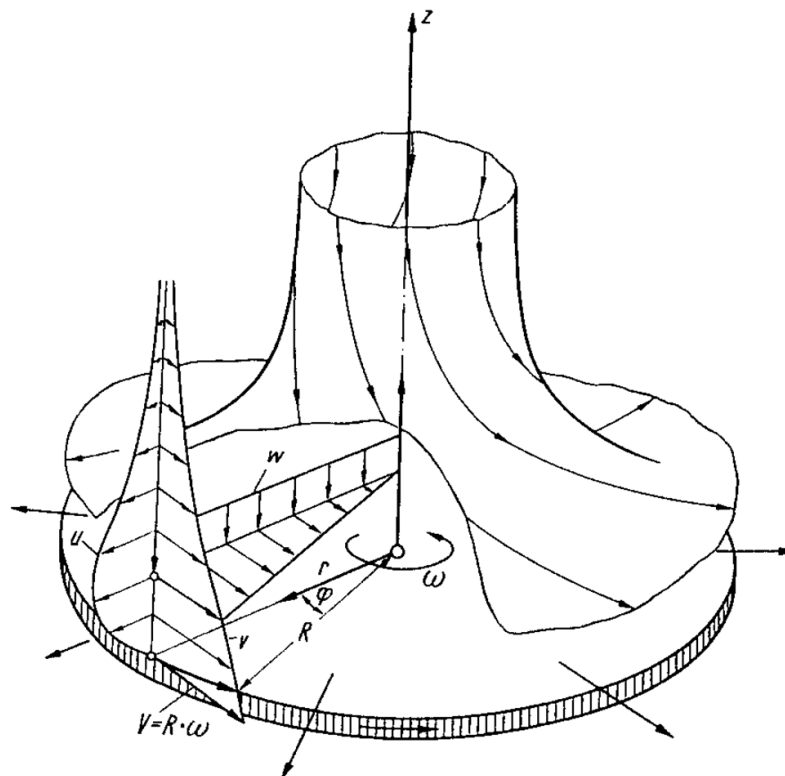


Abb. 5: Geschwindigkeitskomponenten der Strömung um eine Kreisscheibe, die in einem ruhenden Medium mit konstanter Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  um die  $z$ -Achse rotiert [87].

Rotiert eine Kreisscheibe mit einem Radius  $R$  und einer konstanten Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  in einer ruhenden Flüssigkeit, bildet sich eine Flüssigkeitsströmung mit verschiedenen Komponenten aus (Abb. 5). Durch die innere Reibung und der Haftung der Fluidmoleküle auf der Scheibenoberfläche ( $z = 0$ ) wird eine Flüssigkeitsschicht in unmittelbarer Scheibennähe azimutal mit der Geschwindigkeitskomponente  $v$  mit bewegt. Dadurch wirkt eine Zentrifugalkraft, welche die Flüssigkeitsteilchen mit der radialen Komponente  $u$  an den Scheibenrand treibt. Das nach außen strömende Medium muss nach der Massenerhaltung ersetzt werden, wodurch sich eine axiale Strömungskomponente  $w$  ausbildet. Es entfaltet

sich eine Pumpwirkung, bei der das entstehende Strömungssystem Fluidteilchen entlang der Drehachse entgegen der z-Richtung ansaugt und anschließend diese an den Scheibenrand befördert. Im Außenraum bildet sich ein geschlossenes konvektives Strömungsfeld im stationären Zustand aus, in dem das Medium erneut zur Scheibendrehachse zurückströmt und abermals angesaugt wird [85]. Mit zunehmendem Abstand z von der Scheibenoberfläche nimmt die azimutale Geschwindigkeit v der Flüssigkeitsteilchen ab.

Um die resultierende Scherspannung, die auf eine Zelle wirkt, berechnen zu können, müssen die Navier-Stokes-Gleichungen der Fluidmechanik unter Berücksichtigung der Strömungs- bzw. Scherspannungskomponente in radialer Richtung gelöst werden. Für eine rotierende Scheibe in einem ruhenden Medium sind diese Gleichungen numerisch lösbar. 1921 gelang von Kahrman [86] eine erste Näherungslösung und Cochran [88] ermittelte wenige Jahre später präzisere Werte. Rogers und Lance [89] führten zur Lösung des Problems einen dimensionslosen Wandabstand  $\zeta$  in Abhängigkeit des Abstandes z von der Scheibenoberfläche ein,

$$\zeta = z \sqrt{\frac{\rho\omega}{\eta}}. \quad (2)$$

Nach den Navier-Stokes-Gleichungen ergeben sich daraus für die einzelnen Geschwindigkeitskomponenten folgende Lösungen des Differentialgleichungssystems in Zylinderkoordinaten r,  $\varphi$  und z:

$$u = r\omega \cdot F(\zeta), \quad (3)$$

$$v = r\omega \cdot G(\zeta), \quad (4)$$

$$w = \sqrt{\frac{\rho\omega}{\eta}} \cdot H(\zeta). \quad (5)$$

Die Funktionen  $F(\zeta)$ ,  $G(\zeta)$  sowie  $H(\zeta)$  beschreiben die Absolutwerte der Geschwindigkeitskomponenten sowie deren Abklingverhalten als Funktion des Wandabstandes  $\zeta$  und liegen bereits numerisch bestimmt und tabellarisiert vor [89]. Die Verläufe von F, G und H in Abhängigkeit von  $\zeta$  sind in Abb. 6 dargestellt. Hieraus verdeutlicht sich, dass die radiale Komponente (Zentrifugalkomponente) im Vergleich zur azimutalen Geschwindigkeitskomponente auf der Scheibenoberfläche sehr gering ist. Jedoch ist der Betrag der resultierenden Scherspannung nicht proportional zur Geschwindigkeitskomponente, sondern zu deren ersten Ableitung bezüglich des Wandabstandes  $\zeta$ . Daraus



folgt, dass mit der Größe der Geschwindigkeitsdifferenz zwischen den in z-Richtung unterschiedlich schnell strömenden Schichten des viskösen Fluides auch die Scherspannungen in der Grenzschicht zwischen den einzelnen Flüssigkeitsschichten zunehmen. Aus Abb. 6 sind die Beträge der Geschwindigkeitsgradienten bezüglich  $\zeta$  aus den Kurvenanstiegen von  $F(\zeta)$  und  $G(\zeta)$  abzulesen. Die azimuthalen und radialen Scherspannungen in der Grenzschichtströmung überlagern sich somit vektoriell. Die resultierende Gesamtscherspannung weist schräg nach außen und ist für das Ablösen der Zellen auf der Oberfläche verantwortlich.

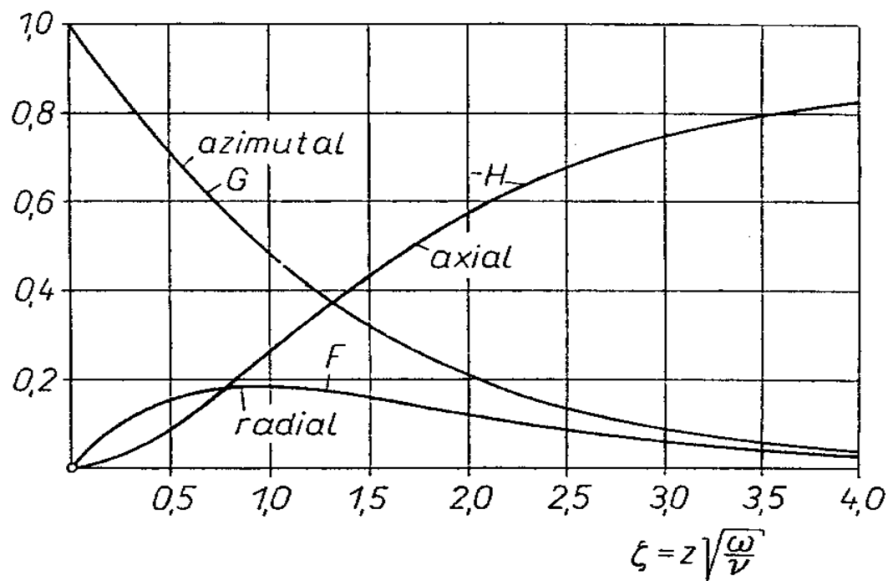


Abb. 6: Verlauf der Geschwindigkeitskomponenten einer Flüssigkeitsströmung in Abhängigkeit vom Wandabstand  $\zeta$  zur Scheibenoberfläche an einer mit konstanter Winkelgeschwindigkeit rotierenden Kreisscheibe in einem ruhenden Medium [87].

Für die Berechnung der Scherspannungen werden die ersten Ableitungen von  $F(\zeta)$  und  $G(\zeta)$  benötigt, deren Lösungen direkt auf der Scheibenoberfläche ( $z = 0$ ) und in großem Abstand ( $z = \infty$ ) in Tab. 1 aufgeführt sind. Die azimuthalen und radialen Scherspannungskomponenten ( $\tau_v$  und  $\tau_u$ ) werden nach Schlichting und Gersten [87] durch

$$\tau_v = |G'(0)| \cdot r \sqrt{\eta \rho \omega^3} \quad (6)$$

und

$$\tau_u = |F'(0)| \cdot r \sqrt{\eta \rho \omega^3} \quad (7)$$

beschrieben.

Mit den Werten aus Tab. 1 folgt schließlich die in (1) angegebene resultierende Scherspannung  $\tau_{\text{res}}$  an der Scheibenoberfläche:

$$\tau_{\text{res}} = \sqrt{\tau_v^2 + \tau_u^2} = 0,8 \cdot r \sqrt{\eta \rho \omega^3} . \quad (8)$$

Tab. 1: Funktionswerte für die Lösung laminarer Strömung in der Grenzschicht einer rotierenden Kreisscheibe direkt auf einer der Oberfläche ( $\zeta=0$ ) und im großen Abstand ( $\zeta=\infty$ ) davon [87, 89].

$\zeta = z \sqrt{\frac{\rho \omega}{\eta}}$	$F'(\zeta)$	$G'(\zeta)$	$H(\zeta)$
0	0,51023	-0,61592	0
$\infty$	0	0	-0,88446

Die oben genannten Gleichungen gelten nur bei laminarer Strömung in der Grenzschicht an der Scheibenoberfläche. Oberhalb einer bestimmten Strömungsgeschwindigkeit ereignet sich der Übergang zu einer turbulent umströmten Scheibe, wodurch die Grenzschicht gestört wird. Zudem wird den Berechnungen eine unendlich große Scheibe zugrunde gelegt und vorausgesetzt, dass die Zellen innerhalb der Grenzschichtdicke  $\delta$  liegen, um laminar umströmt werden zu können. Die Grenzschicht ist jedoch nicht statisch, sondern verändert sich mit der Rotationsgeschwindigkeit. Die Grenzen des Gültigkeitsbereichs von (1) bzw. (8) für die rotierende Scheibe in einem ruhenden Medium müssen demnach festgelegt werden. Mit Hilfe der Reynolds-Zahl  $Re$  (9) kann der Übergang von laminarer zu turbulenter Strömung experimentell bestimmt werden. Nach Schlichting und Gersten [87] wird die kritische Reynolds-Zahl  $Re_{\text{krit}}$ , bei der für das Spinning-Disk-Prinzip ein turbulentes Strömungsverhalten einsetzt, mit  $3 \cdot 10^5$  angegeben:

$$Re = \frac{R^2 \rho \omega}{\eta} , \quad (9)$$

$$Re_{\text{krit}} = 3 \cdot 10^5 = \frac{R^2 \rho \omega_{\text{krit}}}{\eta} , \quad (10)$$

$$\omega_{\text{krit}} = \frac{Re_{\text{krit}} \eta}{R^2 \rho} . \quad (11)$$

Für eine rotierende Kreisscheibe mit einem Radius von 15 mm im Zellkulturmedium mit einer Dichte  $\rho$  von  $996,77 \text{ kg/m}^3$  und einer Viskosität  $\eta$  von  $0,00094 \text{ Ns/m}^2$  bei Raumtemperatur [90] ergibt sich nach (11) aus (10) eine kritische Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{\text{krit}}$  von  $1.270,7 \text{ s}^{-1}$ , die in den Untersuchungen nicht überschritten werden darf.

Die Grenzschichtdicke  $\delta$  wird in der Literatur als die Entfernung definiert, bei der die Umfangsgeschwindigkeit  $u$  auf 1 % des Wertes an der Kreisscheibenoberfläche abgeklungen ist [87]. Durch Analysieren der exakten Lösung von  $F(\zeta)$  wird dieser Wert bei einem Wandabstand  $\zeta = 5,5$  erreicht [88]. Die Grenzschichtdicke  $\delta$  hängt von der Winkelgeschwindigkeit sowie der Dichte und Viskosität des Mediums ab und lässt sich durch Umstellen von Gleichung (2) nach  $z$  durch Gleichung (12) angeben.

$$\delta = z = 5,5 \sqrt{\frac{\eta}{\rho\omega}} . \quad (12)$$

Mit zunehmender Drehfrequenz verringert sich die Grenzschichtdicke. Mit der maximal zulässigen Winkelgeschwindigkeit  $\omega_{\text{krit}}$  für laminare Strömungen im System des Spinning-Disk-Prinzips bildet sich nach (12) eine Grenzschicht mit einer Mindesthöhe von ca. 150  $\mu\text{m}$  aus, wodurch sichergestellt ist, dass alle zu untersuchenden Zellen in einem Monolayer innerhalb der Grenzschicht liegen.

Die bereits beschriebene Konvektionsströmung kann sich nur dann ausbreiten und die laminare Strömung in der Grenzschicht nicht stören, wenn der Abstand  $L$  von der Kreisscheibenoberfläche zur nächsten Wand das 50-fache der Grenzschichtdicke überschreitet [86]. Da die Grenzschichtdicke mit abnehmender Rotationsgeschwindigkeit zunimmt, darf die Winkelgeschwindigkeit bei einem Abstand  $L$  von 25 mm nicht unter 120  $\text{s}^{-1}$  fallen, um die Gültigkeit von (1) bzw. (8) zu gewährleisten,

$$L = 50 \cdot \delta . \quad (13)$$

Zuletzt kann die Kreisscheibe als unendlich groß betrachtet werden, wenn das Verhältnis des Kreisscheibenradius zur Grenzschichtdicke ( $R/\delta$ ) ausreichend groß ist. Das Verhältnis  $R/\delta$  ist am kleinsten, wenn  $\delta$  am größten ist. Dies ist durch die geringste Winkelgeschwindigkeit im Gültigkeitsbereich gegeben. Demnach ist für eine Kreisscheibe, die sich durch ein ruhendes Medium mit einer Winkelgeschwindigkeit  $\omega$  von 120  $\text{s}^{-1}$  bewegt nach Gleichung (12)  $\delta = 0,488$  mm. Daraus ergibt sich ein Verhältnis  $R/\delta = 30,7$  für einen Kreisscheibenradius von 15 mm, das als ausreichend groß angesehen werden kann [87],

$$N = \frac{\omega}{2\pi} \cdot 60 . \quad (14)$$

Da Rotationsgeschwindigkeiten bei Motoren in der Praxis häufig als Drehzahl angegeben werden, liegt der Gültigkeitsbereich für die Berechnung der resultierenden Scherspannung  $\tau_{\text{res}}$  nach Gleichung (1), die für das Abreißen adhärenter Knochenzellen auf einer

Implantatoberfläche verantwortlich ist, nach Gleichung (14) in einem Drehzahlbereich (N) von ca.  $1.150 \text{ min}^{-1}$  ( $\omega = 120 \text{ s}^{-1}$ ) bis ca.  $12.100 \text{ min}^{-1}$  ( $\omega = 1.270,7 \text{ s}^{-1}$ ).

### **2.3 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Messverfahren auf Basis des Spinning-Disk-Prinzips zu entwickeln, mit dessen Hilfe *in-vitro* der Einfluss oberflächenfunktionalisierter Beschichtungen auf das Anwachsverhalten von Knochenzellen entwicklungsbegleitend auf Implantatoberflächen analysiert werden kann. Als Maß für die Effektivität einer Oberflächenmodifikation soll die Änderung der Zelladhäsion, d.h. die Kraft mit der Zellen auf einem Substrat anhaften, gegenüber unbeschichteten Referenzoberflächen dienen. Durch eine vielseitige Einsatzmöglichkeit des zu entwickelnden Messstandes sollen aufwendige, kostenintensive und ethisch umstrittene tierexperimentelle Untersuchungen in der Schichtentwicklung für medizinische Implantate reduziert werden. Zudem soll das Messverfahren in zukünftigen Untersuchungsreihen die Grundlagenforschung der Zelladhäsion unterstützen, um zelladhäsionsbeeinflussende Faktoren auf unterschiedliche Zelltypen zu analysieren.

### **3 Material und Methoden**

Ein Messstand nach dem Spinning-Disk-Prinzip stellt eine verhältnismäßig einfache Versuchsanordnung dar und bietet zudem die Möglichkeit, viele Zelltypen einzeln oder im Zellverband [46] mit unterschiedlichen Fragestellungen auf Implantatmaterialien hinsichtlich ihrer Adhäsionseigenschaften zu untersuchen. Die Lichtundurchlässigkeit vieler Implantatmaterialien erschwert dagegen die Ermittlung der Zelladhäsion und schließt die Nutzung der klassischen Hellfeldmikroskopie generell aus. Mittels der Fluoreszenzmikroskopie ist es jedoch möglich, fluoreszenzmarkierte Zellen auch auf herkömmlichen Implantatmaterialien darzustellen und zu untersuchen. Bei der Entwicklung eines Messstandes zur Ermittlung der Adhäsionskräfte von Knochenzellen auf Implantatoberflächen, welcher sich das Spinning-Disk-Prinzip zunutze macht, muss darauf geachtet werden, diesen an ein entsprechendes Mikroskop anzupassen und gleichzeitig die unter 2.2.3 beschriebenen Bedingungen zu erfüllen. Außerdem soll der Messstand das Arbeiten mit Zellen unter physiologischen Bedingungen ermöglichen. Daher wird für die Messungen mit lebenden Zellen ein inverses Mikroskop genutzt, da damit zwischen Kondensor und Mikroskop ein entsprechend großer Raum für ein Zellkulturgefäß gewährleistet ist.

Im Folgenden wird der Messstand beschrieben, welcher die oben aufgeführten Bedingungen erfüllt. Zusätzlich werden Methoden zur Validierung des Messstandes und zur Ermittlung von Zelladhäsionskräften unter unterschiedlichen Gesichtspunkten erläutert.

#### **3.1 Spinning-Disk-Adhäsionsmessstand**

Für die Untersuchungen mit vitalen Knochenzellen sind der Einsatz von Zellkulturmedium und die Verwendung von biokompatiblen Materialien erforderlich. Zudem werden durch den Einsatz von Zellkulturmedium anti-korrosive Materialien benötigt. Werkstoffe, wie z.B. Edelstahl (316L), Polyetheretherketon (PEEK) oder Glas, erfüllen diese Kriterien.

Für die Adhäsionsuntersuchungen steht ein inverses konfokales Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop (LSM 410 [Laser Scanning Microscope], Zeiss, Oberkochen, Deutschland) zur Verfügung. Das LSM regt einen in den Zellmembranen abgelagerten Fluoreszenzfarbstoff (siehe Abschnitt 3.2) mit einem Laserstrahl (Wellenlänge 543 nm) an. Das daraufhin emittierte Licht der fluoreszierenden Zellen gelangt über einen Scanner zum Strahlenteiler, wo es aufgeteilt und pixelweise über eine variable Lochblende und einen Emissionsfilter auf die einzelnen Detektoren verteilt wird. Der Vorteil eines konfokalen Lichtmikroskops liegt darin, dass mittels der Lochblende das Streulicht, welches ober- und unterhalb der Fokusebene erzeugt wird, ausgeblendet werden kann und so hochauflösende optische Schnitte eines Präparates in verschiedenen Ebenen abgebildet werden

können [91]. Durch das punktförmige Abrastern des Objektes wird zusätzlich das Streulicht reduziert und das resultierende Bild noch in Schärfe und Kontrast erhöht.

Bedingt durch das inverse Mikroskop, muss die zu analysierende Implantatoberfläche zum Objektiv gerichtet sein. Mittels eines Glasbodens im Messstand kann die Beobachtung der Oberfläche realisiert werden. Mit einer 10-fachen Vergrößerung, die zuvor experimentell mit diversen Maßstäben von Objektiven ermittelt wurde, kann eine geeignete Fluoreszenzbildgebung erzielt werden, um pro Bildausschnitt eine statistisch relevante Anzahl von Zellen zu erfassen. Am LSM erlaubt die Fokusebene des 10x-Objektivs einen maximalen Abstand der Probenoberfläche zum Glasboden von ca. 1 mm. In Abschnitt 2.2.3 wurde jedoch dargelegt, dass ein Abstand von 25 mm zur nächsten Wand während der Rotation gewährleistet werden muss. Um diesen Anspruch zu genügen, muss die Probe beweglich gelagert werden, sodass sie zum Mikroskopieren zum Glasboden hinbewegt und zum Anlegen der Scherspannungen vom Glasboden wegbewegt werden kann.

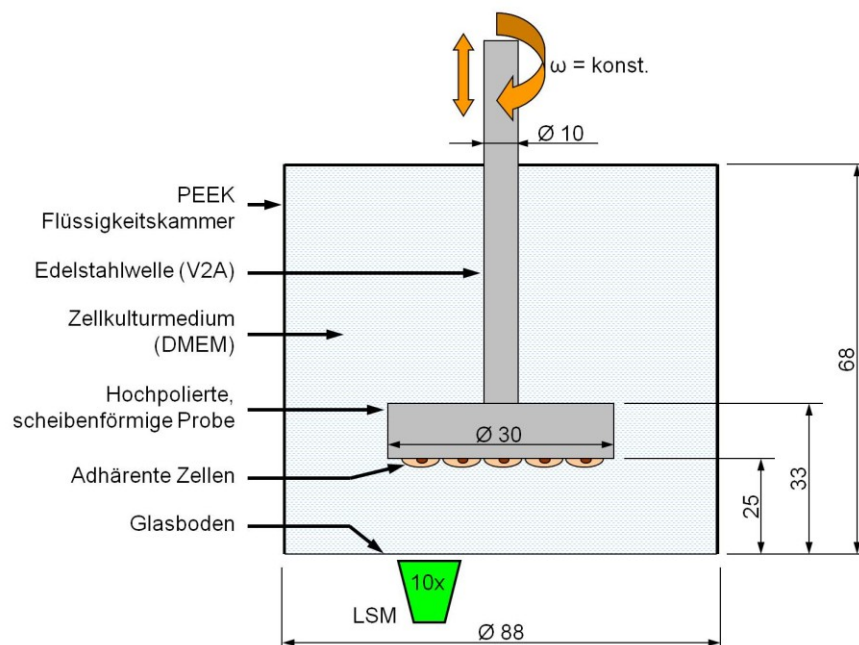


Abb. 7: Schematischer Aufbau des Messtandes mit integriertem Glasboden für Adhäsionsmessungen in Verbindung mit einem LSM. Darstellung in rotierender Position, alle Abmessungen in mm.

Die Abb. 7 zeigt schematisch den Aufbau und die Abmessungen des Adhäsionsmesstands für die Nutzung mit einem LSM unter Wahrung der Konvektionsströmung und der laminaren Strömung auf der Probenoberfläche, in Anlehnung an den Messtand von García *et al.* [82, 92]. Die Neuerung liegt vor allem in der Adaptation des Messtandes an das LSM, so dass ein Betrachten vitaler Zellen auch auf lichtundurchlässigen Materialien ermöglicht wird.

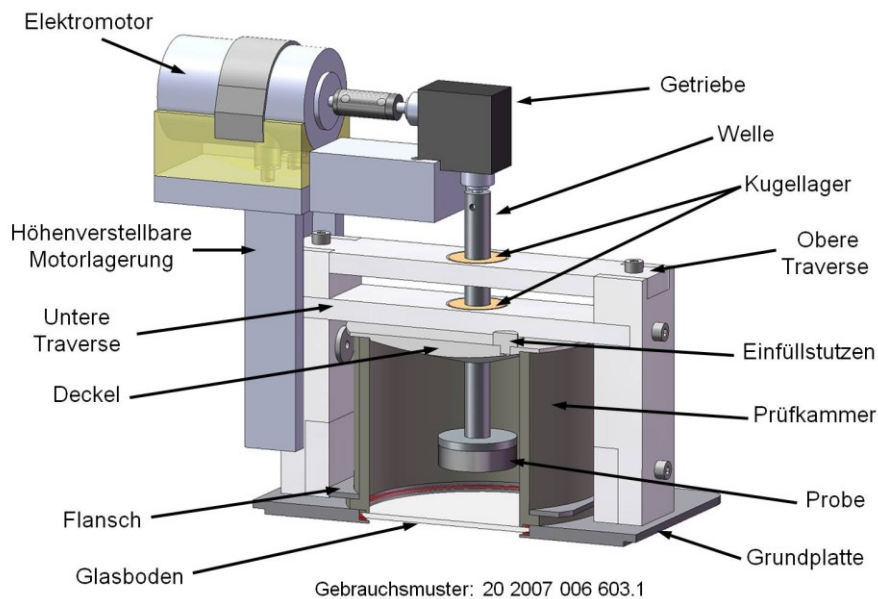


Abb. 8: 3D-CAD Darstellung des Adhäsionsmessstandes für den Einsatz in Verbindung mit einem inversen, konfokalen Fluoreszenzmikroskop (LSM 410).

Im Detail (Abb. 8) besteht der Messstand aus einem zylindrischen Flüssigkeitsbehälter aus PEEK mit einem Innendurchmesser von 88 mm. Dieser ist an der unteren, dem Mikroskop zugewandten Seite, mit einem 2 mm dicken Glasboden (Fensterglasscheibe) abgeschlossen. Das Flüssigkeitsreservoir wird über einen Flansch an der Außenwand auf eine Grundplatte aus Edelstahl mit dem dazwischen liegenden Glasboden gepresst. Für eine optimale Abdichtung sorgt je ein 1 mm dicker Gummidichtring ober- und unterhalb des Glasbodens. Die Grundplatte ist derartig gestaltet, dass sie auf den Objekttüchertisch des LSM fixiert werden kann. An der oberen Seite befindet sich ein Deckel aus Teflon (PTFE), der im Zentrum über einen Radial-Wellendichtring (Simmerring) verfügt und über einen weiteren Dichtring die Flüssigkeitskammer abdichtet. Eine M4-Gewindebohrung im Deckel ermöglicht das blasenfreie Auffüllen des Behälters mit Zellkulturmedium und kann während der Messung mit einem Verschluss abgedichtet werden. Durch den Simmerring führt eine Welle aus Edelstahl mit einem Durchmesser von 10 mm, an der die zu untersuchende Probe fixiert wird. Zwei Traversen führen die Welle senkrecht durch zwei Keramik-Kugellager. Die untere Traverse erzeugt bei der Befestigung auf die Seitenteile einen Druck auf den Deckel der Prüfkammer und dichtet diese somit ab. Ein Winkelgetriebe überträgt die Drehbewegung des waagrecht gelagerten Elektromotors (EC-max 40, Maxon Motor AG, Sachseln, Schweiz) an die Welle. Die Lagerung des Elektromotors ist ebenfalls seitlich und kann, über eine Nut geführt, in der Höhe verstellt werden, so dass Probe, Welle sowie Getriebe und Motor in der Höhe variierbar sind. Dadurch lassen sich ein Abstand der Probe von 1 mm

über dem Glasboden bei Aufliegen der Motorlagerung auf der oberen Traverse sowie ein Abstand von 25 mm in der höchsten Stellung für die Applikation der Scherspannungen einstellen. Eine Rändelschraube fixiert die Höheneinstellung.

Für die Motoransteuerung wird ein digitaler Servoverstärker (4-Q-EC, Maxon Motor AG, Sachseln, Schweiz) genutzt und über ein Labornetzgerät mit einer Spannung von 12 V und einem Strom von 5 A versorgt. Der Servoverstärker fungiert dabei als Schnittstelle zwischen der mitgelieferten Steuerungssoftware (Maxon Motor Control, Maxon Motor AG, Sachseln, Schweiz) und dem Elektromotor. Die Befehle der Software, z.B. die einzustellende Drehzahl, werden somit an den Motor übertragen. Gleichzeitig überwacht der Servoverstärker mittels der am Motor eingebauten Hallsensoren kontinuierlich die aktuelle Umdrehungszahl. Die Abb. 9 zeigt den Adhäsionsmesstand am LSM-Arbeitsplatz in der Mikroskopierstellung.

Für den oben beschriebenen Messstand wurde ein Gebrauchsmuster eingetragen (Nr. 20 2007 006 603.1).

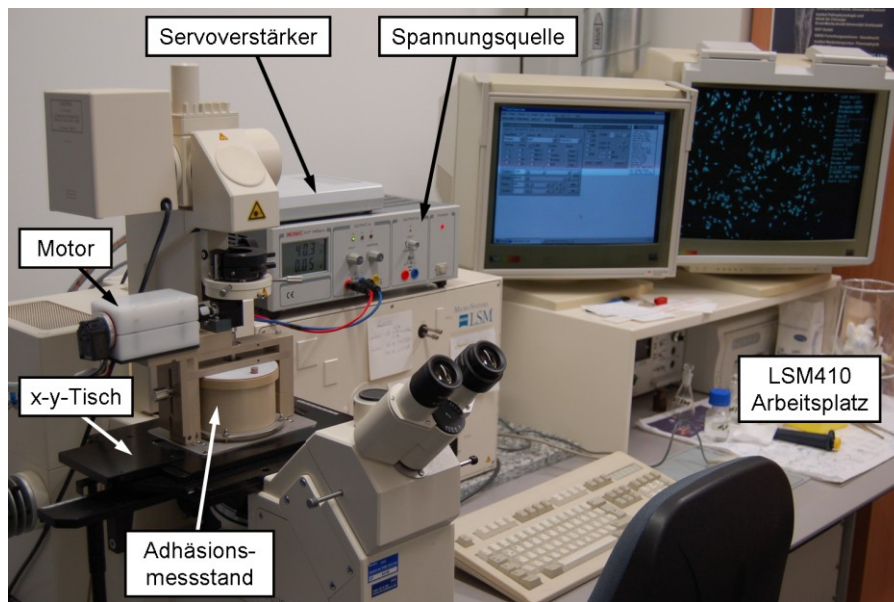


Abb. 9: LSM-Arbeitsplatz mit Adhäsionsmesstand auf dem x-y-Tisch in Mikroskopierstellung (Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

### 3.1.1 Probengeometrie und Probenvorbereitung

Für den Adhäsionsmesstand wurden scheibenförmige Proben (Ronden) mit einem Durchmesser von 30 mm und einer Dicke von 8 mm eingesetzt (Abb. 7). Die Testronden besitzen auf der Rückseite eine zentrale, 6 mm tiefe M6-Gewindebohrung, wodurch eine starre Verbindung zur Rotationsachse hergestellt wird. Im Allgemeinen bestehen die Proben aus einer Titanlegierung (TiAl6V4) und sind auf ihrer Vorderseite hochglanzpoliert ( $R_a < 0,02$ ). Für spezifische Fragestellungen wurden auch andere Materialien eingesetzt.



Zur Untersuchung des Einflusses einer Oberflächenfunktionalisierung können die Oberflächen im Anschluss durch unterschiedliche Oberflächenbeschichtungstechnologien modifiziert werden.

Mit Hilfe eines Lasers (VektorMark<sup>®</sup> compact, Trumpf, Ditzingen, Deutschland) wurden auf den modifizierten Oberflächen 20 diametrale Positionen und ein Zentrierkreuz markiert. Jede der 1,44 mm<sup>2</sup> großen quadratischen Positionen entspricht genau einem 512 x 512 Pixel großen Bildausschnitt auf dem Bildmonitor des LSM und ist durch eine Nummerierung eindeutig identifizierbar (Abb. 10). Die Markierungen dienen der exakten Zuordnung der adhärennten Zellen pro radialer Position in den Bildausschnitten vor und nach dem Anlegen einer Scherspannung (Rotation). Das zentrale Kreuz dient zur Ausrichtung der Probe vor und nach der Rotation (siehe Abschnitt 3.1.2).

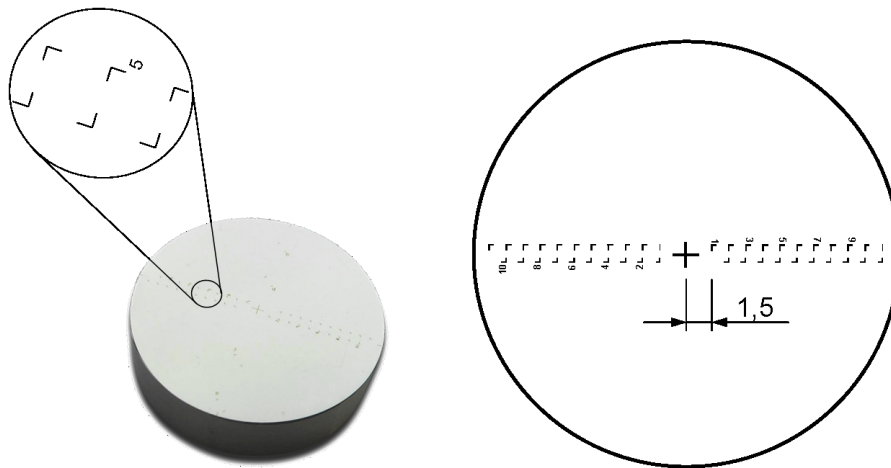


Abb. 10: TiAl6V4-Probe mit 20 diametralen lasermarkierten Positionen zur eindeutigen Positionsbestimmung der Zellen (links); schematische Darstellung der Lasermarkierungen (rechts).

Sofern es die Oberflächenmodifikation erlaubt, wurden alle Proben vor der Zellbesiedelung in einem Ultraschallbad (DT 52 H, Bandelin, Berlin, Deutschland) bei 80 °C in einer biodegradierbaren alkalischen Lösung, bestehend aus 2 % Galvex 17.30 (NGL Cleaning Technology, Nyon, Schweiz) und 98 % destilliertem Wasser, über einen Zeitraum von 10 min gereinigt. Mit Leitungs- sowie destilliertem Wasser wurden die Testronden im Anschluss abgespült und trocken geföhnt. Des Weiteren wurden die Proben zum Sterilisieren mit 70 %-igem Ethanol überschichtet und nachfolgend in einer Sterilbank an der Luft getrocknet. Der Umgang mit den Proben wurde bei allen Zwischenschritten grundsätzlich steril und mit Einmalletexhandschuhen vorgenommen, um eine Kontamination der Oberflächen zu vermeiden.

### 3.1.2 Versuchsdurchführung zur Ermittlung der Zelladhäsion

Vor der Adhäsionsmessung müssen die Zellen zur Visualisierung auf Implantatmaterialien fluoreszenzmarkiert und auf die Oberflächen ausgesät werden. Für die Färbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff PKH26-GL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) eingesetzt, der als aliphatisches Reporter-molekül in die Lipiddoppelschicht der Zellmembranen inkorporiert wird. Bei einer Anregung des Farbstoffs mit einer Wellenlänge von 551 nm, emittiert dieser stabil Licht einer Wellenlänge von 567 nm. Bevor auf konkrete Versuchsreihen kultivierten Zellen eingegangen wird, soll im Folgenden eine allgemeine Vorgehensweise der Zelladhäsionsmessung betrachtet werden. Zellkulturspezifische Abweichungen werden in den entsprechenden Abschnitten erläutert.

Ausgehend von einer konfluenten Zellkultur wurde diese zunächst zweifach mit Phosphat-gepufferter Saline (PBS, ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , 37°C) gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA], Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) für 2 min bei 37 °C inkubiert. Mit 5 ml Komplettmedium, bestehend aus Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 10 % fetalem Kälberserum (FKS, Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 1 % Gentamicin (Ratiopharm, Ulm, Deutschland), wurden die Zellen resuspendiert und mittels Zellzähler (CASY<sup>®</sup> Model DT, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) die Anzahl der Zellen bestimmt. Anschließend wurden mit einer entsprechenden Zellzahl (i.d.R. 2 Mio. Zellen) die resuspendierten Zellen für 5 min bei  $1200 \text{ min}^{-1}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das so erzeugte Zellpellet mit 500  $\mu\text{l}$  Diluent C resuspendiert, nachfolgend mit der PKH26-Färbelösung (498 ml Diluent C + 2  $\mu\text{l}$  PKH26) versetzt und für 5 min im Wasserbad unter zwischenzeitlichem Schwenken bei 37 °C inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 500  $\mu\text{l}$  FKS für 1 min hinzugegeben und anschließend mit 1 ml Komplettmedium überschichtet. Im weiteren Verlauf des Färbungsprozesses wurde die Zellsuspension erneut mit  $1200 \text{ min}^{-1}$  für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet in PBS gewaschen. Zuletzt wurde nochmals zentrifugiert und das Zellpellet in einem entsprechenden Volumen des Zellkulturmediums (i.d.R. 1 ml) resuspendiert.

Vor der Aussaat der Zellen auf die Oberflächen wurden die vorbereiteten Proben steril in 6-Wellplatten überführt. Je nach zur Verfügung stehender Zellzahl können wie folgt zwei Methoden zur Aufbringung der Zellen auf die Oberflächen angewendet werden:

1. Bei einer ausreichenden Zellzahl ( $\geq 2$  Mio. Zellen) wurden 400.000 Zellen in 4 ml Medium aufgenommen und je Well die Ronde mit der Zellsuspension überschichtet. Anschließend wurden die Proben bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  inkubiert. Obwohl Zellen am Wellrand verloren gehen, kann auf diese Weise eine gleichmäßige Verteilung von frei liegenden Zellen erzielt werden.

- Bei geringen Zellmengen (< 2 Mio. Zellen) wurden mit einer Mikropipette 2 µl große Zellsuspensionstropfen mit je 2.000 Zellen auf die radialen Markierungen der Ronden pipettiert. Insgesamt wurden je Radius 5 Tropfen entlang der Lasermarkierungen verteilt und anschließend miteinander zu einem Flüssigkeitsstreifen verbunden. Nach 20 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden die Wells vorsichtig mit 4 ml Medium überschichtet.

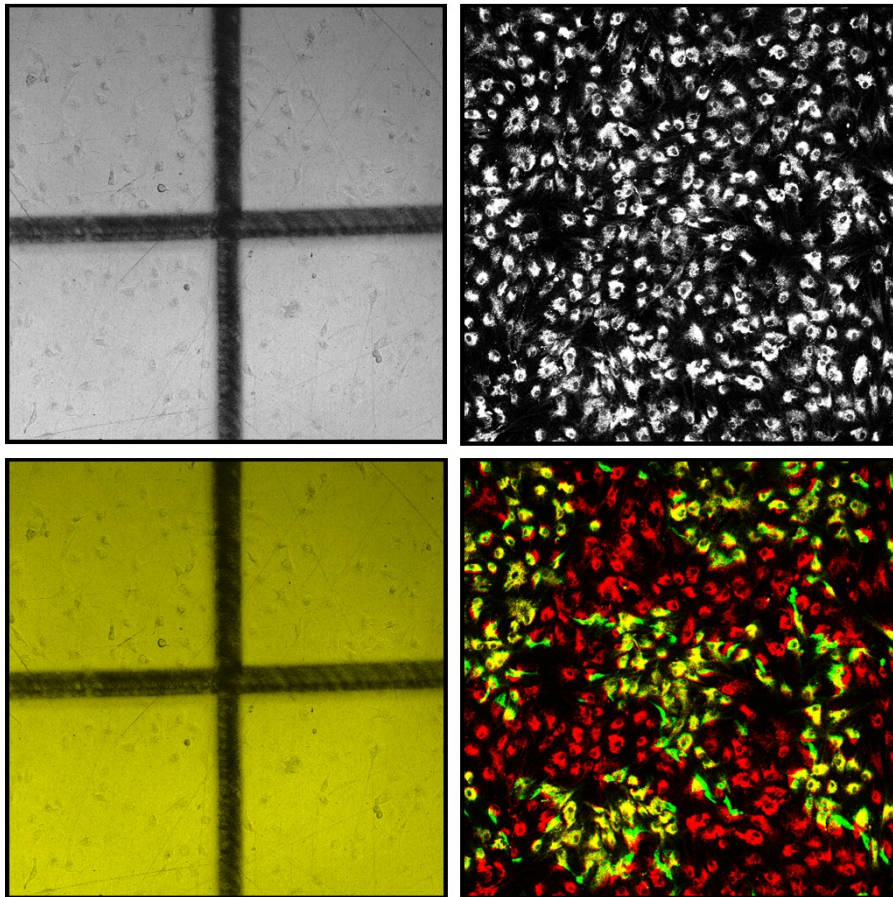


Abb. 11: Reflektionsbild einer zentralen Kreuzmarkierung auf einer CoCr28Mo6-Probe vor Rotation (oben links); Darstellung der zentralen Kreuzmarkierung zur Ausrichtung der Probe vor und nach der Rotation im RGB-Modus nach exakter Überlagerung (unten links); Graustufenbild von fluoreszenzmarkierten MG-63 Zellen auf der vierten radialen Position vom Proben-Zentrum vor der Adhäsionsmessung (oben rechts); Darstellung von fluoreszenzmarkierten MG-63 Zellen auf der vierten radialen Position vom Proben-Zentrum vor (rot) und nach der Rotation (gelb) im RGB-Modus. Die rot dargestellten Zellen dokumentieren den Zellabriss vom Substrat nach Rotation, grüne Zellen, die in ihrer Position verschoben wurden (unten rechts).

Nach der zu untersuchenden Adhäsionszeit der Zellen auf den Probekörpern wurden die Proben zum Entfernen des FKS-haltigen Mediums kurz in 4 ml DMEM ohne FKS gewaschen. Die Prüfkammer der Adhäsionsmesszelle (AMZ) wurde zuvor mit ca. 450 ml

DMEM (37 °C, ohne FKS) befüllt und ein Leerlauf mit einer unbesiedelten Probe bei ca. 6500 min<sup>-1</sup> durchgeführt. Anschließend wurde die zu untersuchende Probe an der Welle der AMZ fixiert und mit der Flüssigkeitskammer verbunden. Vor dem Anlegen einer Scherspannung zum Ablösen adhärenter Zellen vom Substrat wurden die lasermarkierten Positionen der Ronden entsprechend ihrer Reihenfolge nacheinander mit dem LSM dokumentiert. Dafür wurde der Messstand auf die Mikroskopierposition eingestellt und auf dem LSM-Tisch des Objektführers platziert. Zunächst wurde das zentral markierte Kreuz Proben im Reflektionsmodus auf den Bildmonitor ausgerichtet und als Bild gespeichert (Abb. 11). Anschließend wurde jede nummerierte Position der Oberfläche mit Hilfe des x-y-Objektführers im Reflektionsmodus auf dem Bildmonitor positioniert, die Zellen im Fluoreszenzmodus mikroskopiert und als 8 bit Graustufenbild mit einer vierfachen Mittelung (4x Average) gescannt und abgespeichert (Abb. 11). Somit wurde die Anzahl der adhärenen Zellen über den Radius vor der Applikation der Scherspannung festgehalten.

Der Messstand wurde nun in die Rotationsposition eingestellt (der Probenabstand zum Glasboden beträgt 25 mm) und die Flüssigkeitskammer über den Einfüllstutzen mittels Pipette vollständig mit DMEM luftblasenfrei aufgefüllt. Für die Rotation der Ronden wurde die AMZ um 180° in der Horizontalen mit dem Glasboden nach oben gedreht. Über die Maxon Motor Control Software wurde die für die jeweilige Untersuchung benötigte Drehfrequenz (in min<sup>-1</sup>) definiert und die Probe für 3 min rotiert. Nach Ablauf der Rotationszeit wurde die Probe erneut in die Mikroskopierposition zurückgestellt und der Messstand auf dem LSM-Objektführtisch positioniert.

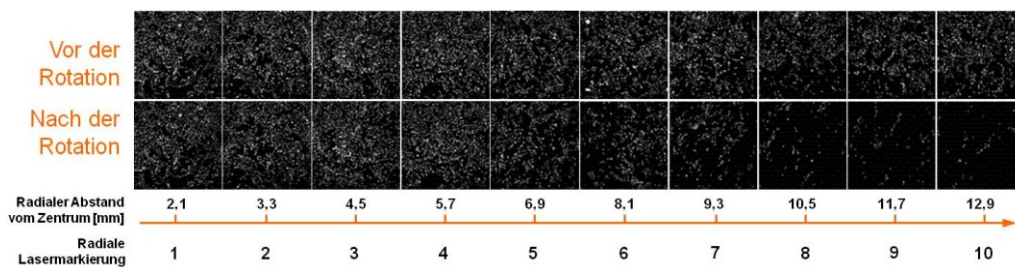


Abb. 12: Graustufen-Darstellung der radialen Zellverteilung von Knochenzellen auf TiAl6V4-Ronden vor und nach der Rotation unter Angabe der entsprechenden Position der radialen Lasermarkierung und des dazugehörigen radialen Abstandes in mm vom Probenzentrum zu den Zentren der einzelnen lasermarkierten Positionen.

Die LSM Software ermöglicht ein Übereinanderlegen eines bereits aufgenommenen Graustufenbildes mit einem Live-Bild in einer Falschfarbendarstellung (RGB-Modus), so dass nach der Rotation ein zuvor aufgenommenes Bild der Kreuzmarkierung einer Ronde mit der Kreuzmarkierung des Live-Bildes deckungsgleich ausgerichtet werden kann (Abb. 11). Dadurch wurde eine exakte Überlagerung der Bilder und somit der einzelnen

Zellen auf allen Positionen vor und nach der Adhäsionsmessung gewährleistet, wobei abgescherte Zellen rot, verbliebene gelb und aufgrund der Scherspannungseinwirkung verschobene Zellen grün dargestellt werden können (Abb. 11). Für die exakte Berechnung der abgescherten Zellen pro Position nach Rotation wurden von allen relevanten Positionen Graustufenbilder gespeichert (Abb. 12).

### 3.1.3 Scherspannungsermittlung

Die Aufnahmen der Graustufenbilder aus der Fluoreszenzdarstellung vor und nach der Rotation wurden mittels Bildbearbeitungssoftware hinsichtlich ihrer Zellzahl ausgewertet, z.B. mit ImageTool 3.0 (UTHSCSA, San Antonio, USA). Da sich die Auswertung mit ImageTool 3.0 als sehr zeitintensiv herausstellte, wurde mittels Python (Python Software Foundation, Wolfeboro Falls, NH, USA), einer „open source“ Programmiersprache, ein Bildanalysetool geschrieben, wodurch die Bildauswertung automatisiert und erheblich beschleunigt werden konnte (Quellcode siehe Anhang).

Das Bildanalysetool ist derartig gestaltet, dass die Namen der zu analysierenden Bilder in einer speziellen csv-Textdatei (files.csv) zunächst gespeichert werden müssen. Die Abkürzung „csv“ steht für „comma separated values“ und kann von vielen Datenverarbeitungsprogrammen, wie z.B. Excel, eingelesen werden. Hierbei ist eine bestimmte Form einzuhalten und darauf zu achten, dass die Bildtitel exakt übernommen werden. Die Bildernamen vor und nach der Rotation müssen untereinander im Wechsel für jede Position aufgeführt werden. Nicht relevante Zeilen oder Positionen können zur besseren Übersicht mittels Rautezeichen (#) markiert werden, so dass sie vom Analyseprogramm ignoriert werden. Die Bilder werden in Folge dessen vollautomatisch vom Programm eingelesen und in „portable network graphics“ Dateien (.png) umgewandelt. Die Umwandlung ist für die darauffolgende Bildanalyse notwendig.

Da es sich um Graustufenbilder handelt, besitzt jedes Bildpixel einen Grauwert zwischen 0 und 1, wobei der Wert 0 für schwarz und der Wert 1 für weiß steht. Die Zellen werden auf den Bildern in helleren Grautönen bzw. weiß dargestellt, wobei die Intensität der Fluoreszenz die Graustufe bestimmt. Durch einen festgelegten Schwellenwert (engl. threshold, z.B. ein Wert von 0,2), erkennt das Analysetool die Zellgrenze und zählt alle zusammenhängenden Pixel, die einen Grauwert besitzen, welcher über dem des eingestellten Schwellenwertes liegt. Zudem ist es möglich, eine Mindestgröße zusammenhängender Pixel vorzugeben, z.B. 15 px, um Artefakte von der Berechnung auszuschließen. Auf diese Weise rastert das Programm die Bilder ab und nimmt eine Zwischenspeicherung der Anzahl der Zellen bzw. der gefundenen zusammenhängenden Pixel vor.

Das Analysetool ist derart programmiert, dass es im ersten Schritt immer das Bild einer gegebenen radialen Position vor der Rotation und im unmittelbaren Anschluss das

dazugehörige Bild nach der Rotation analysiert. Die Anzahl der Pixel wird dann ins Verhältnis gesetzt und ein prozentualer Zellabriss für die jeweilige Position ermittelt. Die Einzelergebnisse für jede radiale Position werden bis zur Analyse des letzten Bildes im Zwischenspeicher abgelegt und letztlich in einer Textdatei (results.csv) ausgegeben. Innerhalb der Ausgabedatei werden zusätzlich zu den Ergebnissen des Zellabrisses auch die Probenbezeichnung, radiale Position in mm und die Drehfrequenz in  $\text{min}^{-1}$  aus den Dateinamen ausgelesen, sofern diese in einer bestimmten Kodierung vorliegen (Abb. 13).

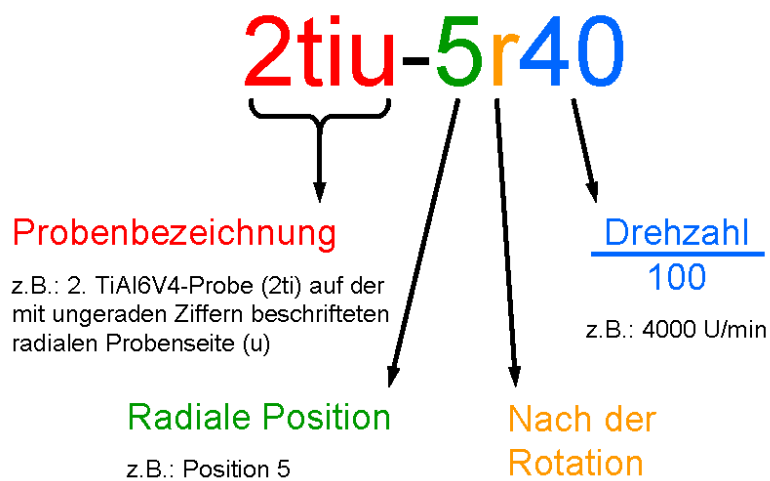


Abb. 13: Dateinamen-Kodierung für die Verwendung des Analysetools zur besseren Zuordnung der Ergebnisse in der Ausgabedatei. Im Beispiel wird ein zweiter TiAl6V4-Probekörper auf der fünften Position der lasermarkierten Seite mit ungerader Beschriftung nach einer applizierten Drehzahl von  $4000 \text{ min}^{-1}$  kodiert (Bilder vor der Rotation enden mit der radialen Position).

Zur Ermittlung der Scherspannung unterbreiten sowohl García *et al.* [82] als auch Engler *et al.* [93] die Verwendung der radialen Position, bei der mindestens 50 % der Zellen von der Oberfläche abgerissen werden, als Grundlage für die Berechnung der Scherspannung. Dies kann in der hier verwendeten Methode zu hohen Ungenauigkeiten führen, wenn beispielsweise auf einer Position 45 % Abriss und auf der folgenden 65 % Abriss ermittelt wurden. Für eine bessere Bestimmung der durchschnittlichen Scherspannung wurde daher analog zu Gallant *et al.* [94], ein mittlerer radialer Abstand vom Zentrum der Probe ermittelt, bei dem 50 % der Zellen vom Substrat abgelöst wurden. Durch das Auftragen des prozentualen Zellabrisses auf der Ordinate und des radialen Abstands vom Zentrum des Probekörpers zur Mitte der lasermarkierten Positionen auf der Abszisse in einem Diagramm, kann aus der entstandenen Kurve durch Interpolation ein genauere radialer Abstand bei 50 % Zellabriss ermittelt werden (Abb. 14).

Die zum Abriss von 50 % der adhärennten Zellen erforderliche Scherspannung wurde schließlich aus dem interpolierten durchschnittlichen radialen Abstand zum Probenzentrum, der Rotationsgeschwindigkeit sowie der Dichte und der Viskosität des Mediums nach (1) berechnet.

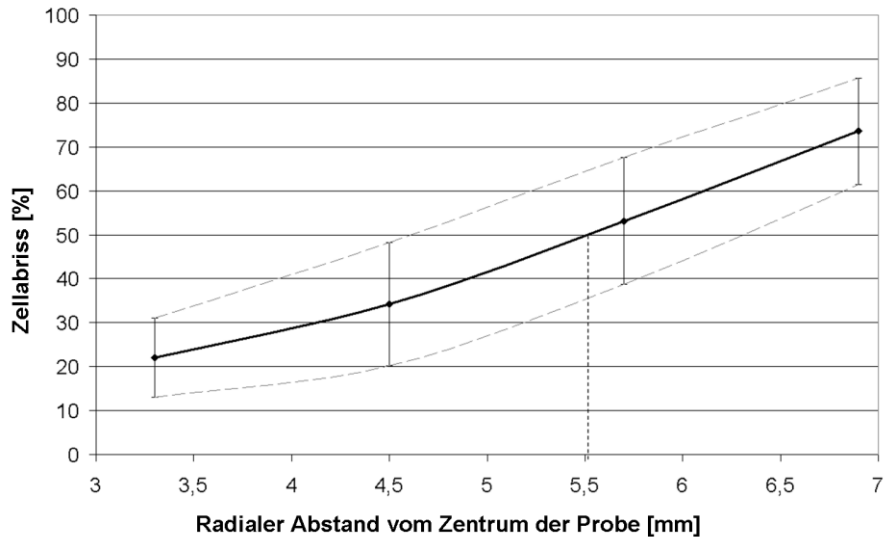


Abb. 14: Mittlerer prozentualer Zellabriss (durchgezogene Kurve) über vier radiale Positionen auf einer polierten TiAl6V4 Probe nach Rotation ( $\omega = 492 \text{ s}^{-1}$ ). Der durchschnittliche radiale Abstand vom Zentrum der Ronde wird durch Interpolation der Kurve bei 50 % Zellabriss ermittelt (senkrecht gestrichelte Linie).

### 3.1.4 Approximation der Zelladhäsionskraft

Die Scherspannung allein ist nicht immer eine hinreichende Bewertungsgrundlage für die Zelladhäsion unter verschiedenen Aspekten. Unterschiede in der Zellmorphologie können Aussagen hinsichtlich der Betrachtung der Scherspannung kompromittieren oder gar gänzlich verfälschen. So könnte beispielsweise dieselbe Scherspannung benötigt werden, um 50 % einer flach ausgebreiteten und einer abgerundeten Zellpopulation abzuscheren. Die unterschiedlichen Widerstände der verschiedenen Zellpopulationen im Scherspannungsfeld könnten jedoch zu einer Diskrepanz in der Zelladhäsionskraft führen, die mit der Betrachtung der Scherspannung alleine nicht zum Tragen käme.

Um die Zelladhäsionskraft, mit der Zellen an einer Oberfläche haften, approximieren zu können, müssen die komplexen Zellformen idealisiert werden. Truskey und Proulx [95] haben die Zellform als eine Kugelkappe (Abb. 15) idealisiert betrachtet und eine einfache Lösung des Gleichungssystems von in einer Strömungskammer abgescherten Zelle zur Abschätzung der Gesamtadhäsionskraft ( $F_T$ ) [71] hergeleitet. Unter der Annahme, dass das Zellvolumen für suspendierte und ausgebreitete Zellen konstant bleibt und die Zellpopulation

einen Monolayer aus frei liegenden Zellen bildet, können die Adhäsionskräfte berechnet werden. Zudem sind die Gleichungen nur unter laminaren Strömungsverhältnissen gültig. Die Anwendung des vereinfachten Gleichungssystems auf das Spinning-Disk-Prinzip wurde durch Engler *et al.* [93] bekräftigt.

Durch die hydrodynamische Umströmung der Zelle wirkt eine Scherspannung auf die Zelle, wodurch eine Schleppkraft  $F_D$  (15) induziert wird. Auf die Zellkontaktfläche wirken zudem eine Normalspannung durch das Moment der externen Flüssigkeit und ein durch die Schleppkraft auferlegtes Moment, welche zusammengefasst die Normalkraft  $F_y$  (16) ergeben. Die Resultierende beider Kräfte ergibt die approximierte Zelladhäsionskraft  $F_T$  (17),

$$F_D = 4,33\pi r_c^2 \tau_{res}, \quad (15)$$

$$F_y = \frac{3\pi}{4r_c} (2,44\pi r_c^2 h \tau_{res} + F_D h), \quad (16)$$

$$F_T = \sqrt{F_D^2 + F_y^2}. \quad (17)$$

Dabei repräsentieren  $r_c$  und  $h$  den Zellkontaktradius bzw. die Zellhöhe, welche experimentell für die jeweilige Versuchskonfigurationen zu bestimmen sind.

#### *Experimentelle Bestimmung des Zellkontaktradius und der Zellhöhe*

Für die Bestimmung des Zellkontaktradius und der Zellhöhe müssen die Zellen nach einer entsprechenden Adhäsionszeit zunächst auf den Proben fixiert werden. Hierfür wurden die Zellen für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) bei Raumtemperatur inkubiert, danach mit PBS gespült und anschließend mittels Eindeckmedium mit einem Deckglas über Nacht bei 4 °C eingebettet. Mittels konfokaler Laser-Raster-Mikroskopie wurden nachfolgend mit einer 63-fachen Vergrößerung (63x Plan-Neofluar, 1,25 Öl/0,17, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) von je dreißig einzelnen zufällig ausgewählten fluoreszenzmarkierten Zellen pro Materialoberfläche Graustufenbilder erstellt und anschließend mit Hilfe der LSM-Software (Version 3.98) die Kontaktfläche  $A_c$  und die Zellhöhe  $h$  bestimmt (Abb. 15). Die Kontaktfläche wurde in der x-y-Ebene mit der Funktion „Area Measure“ ermittelt, während mit einem z-scan die Zellquerschnittsflächen tangential zur Scherspannungsrichtung dargestellt und mit der Funktion „Measure“ die Zellhöhe gemessen werden konnte (Abb. 15). Aufgrund der idealisierten Zellform (Kugelkappe) wurde die gemessene Zellkontaktfläche  $A_c$  als ein idealer Kreis betrachtet, so dass der Zellkontaktradius  $r_c$  aus (18) berechnet werden konnte,



$$r_c = \sqrt{\frac{A_c}{\pi}} \quad (18)$$

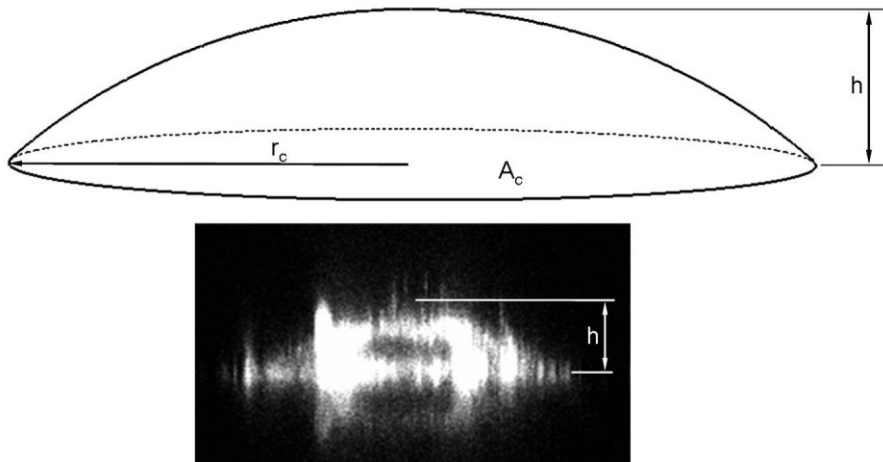


Abb. 15: Idealisierte Zellform (Kugelkappe) zur Approximation der Zelladhäsionskräfte mit Darstellung der Zellkontaktfläche  $A_c$  sowie des Zellkontaktradius  $r_c$  (oben) und experimentelle Ermittlung der Zellhöhe  $h$  einer MG-63 Zelle auf TiAl6V4 nach 18 h Inkubationszeit mittels x-z-Schnitt durch konfokale Mikroskopie (unten).

### 3.2 *In-Vitro* Adhäsionsuntersuchungen mit MG-63 Zellen

Der Adhäsionsmessstand ermöglicht Analysen verschiedener Zelltypen, wie z.B. humane Osteoblasten oder mesenchymale Stammzellen. Die Arbeit mit vitalen Zellen ist nicht trivial und stellt eine große Herausforderung dar, insbesondere bei heterogenen Zellpopulationen. Jede Zelle interagiert in Abhängigkeit von Zellcharge bzw. Zellspender, Zellpassage und Zellzyklus sehr individuell mit den jeweiligen Oberflächen. Mit Hinblick auf die Etablierung einer geeigneten Messmethode zur Ermittlung der Zelladhäsionskräfte ist die Reproduzierbarkeit eine entscheidende Grundlage für die Aussagekraft der Ergebnisse. Permanente Zelllinien stellen durch die Möglichkeiten der Klonierung (Isolierung aus Einzelzellen) eine sichere Quelle für homogene Zellpopulationen dar, die geeignet erscheinen, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Des Weiteren stehen Zelllinien im Gegensatz zu primären Zellen durch ihre uneingeschränkte Teilungsfähigkeit in großen Zellzahlen und damit in ausreichenden Mengen für Versuche zur Verfügung. In dieser Arbeit liegt der Fokus der Forschung auf dem Verhalten von Osteoblasten unter dem Einfluss von verschiedenen Biomaterialien bzw. Implantatoberflächen.

#### 3.2.1 Kultivierung von MG-63 Zellen

Für die folgenden Versuche wurde die Osteosarkom Zell-Linie MG-63 (CRL-1427, ATCC, Manassas, VA, USA) verwendet (Abb. 16). und in Zellkulturflaschen (TCPS, Greiner Bio-

One, 75 cm<sup>2</sup>, Frickenhausen, Deutschland) mit einer Zelldichte von  $6,0 \times 10^3$  Zellen pro Quadratcentimeter ausgesät. Die Zellen wurden im Folgenden sieben Tage in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Gentamicin bei 37 °C in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten feuchten Atmosphäre im Inkubator kultiviert. Anschließend wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche 5 min mit Trypsin-EDTA abgelöst. Sofern nicht weiter spezifiziert, wurden alle Versuche in der 96-ten Passage durchgeführt. Die zur Verfügung stehende MG-63 Zell-Linie befand sich beim Erwerb bereits in der 88. Passage.

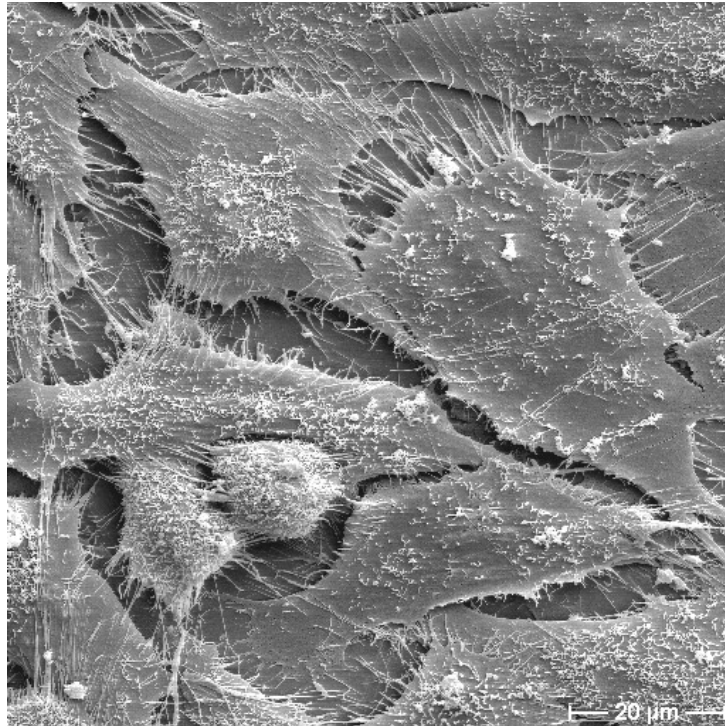


Abb. 16: Ausgebreitete MG-63 Zellen auf polierter TiAl6V4-Oberfläche bei 1000-facher Vergrößerung im REM.

### 3.2.2 Variation der Einflussparameter auf die Adhäsion von MG-63 Zellen

Die Zelladhäsion ist ein dynamischer Prozess und wird von vielen Parametern unterschiedlich beeinflusst. Zur Evaluierung und Optimierung der Messmethode sowie Einordnung der Messergebnisse wurden einige Einflussparameter eingehender untersucht.

#### *Auswirkung der Rotationszeit auf die Zelladhäsionsmessung*

Da die Dauer der Scherspannungseinwirkung auf die Zellen das Ergebnis beeinflussen könnte, wurde zunächst der Einfluss der Rotationszeit untersucht. Des Weiteren sollte diese Analyse Aufschluss über die standardmäßig zu verwendende Rotationsdauer der nachfolgenden Tests geben. Hierfür wurden Zellen für 18 h auf polierten TiAl6V4 Oberflächen ausgesät und anschließend verschiedenen Rotationszeiten bei konstanter

Rotationsgeschwindigkeit ausgesetzt. Bei einer Drehfrequenz von  $4000 \text{ min}^{-1}$  wurden Rotationszeiten von 30, 60, 180, 300 und 600 s für je eine Probe eingestellt. Nach jeder Rotation wurde der Zellabriss auf den radialen Probenpositionen 4, 5 und 6 ermittelt.

### *Einfluss der Zellpassage auf die Zelladhäsion*

Im alltäglichen Umgang mit MG-63 Zellen ist ein häufiges Passagieren weit verbreitet. In vielen Zelllaboren wird jedoch oft eine Obergrenze der Passagenzahl eingeführt, bevor eine Zellpopulation verworfen wird. Neben der Dauer der Rotation könnte sich ein häufiges Passagieren der Zellen ebenfalls auf die Zelladhäsion auswirken, ohne dass eine morphologische Änderung wahrgenommen wird. Um Aufschluss über das Adhäsionsverhalten nach unterschiedlichen Zellpassagen zu erzielen und eine geeignete Passage für spätere Routineuntersuchungen zu bestimmen, wurden für diese Versuchsreihe MG-63 Zellen bis zu den Passagen 95, 102, 103, 116, 143 und 149 in Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen wurden danach für weitere 18 h auf polierten TiAl6V4 Oberflächen ausgesät, sodass die Osteoblasten letztlich in den Passagen 96, 103, 104, 117, 144 und 150 hinsichtlich der Zelladhäsion untersucht wurden. Zum Ablösen der Zellen wurde mit Ausnahme der 144. Passage in allen Versuchen eine Drehzahl von  $4000 \text{ min}^{-1}$  appliziert. Für Passage 144 wurden Drehfrequenzen von  $2000$  bzw.  $2500 \text{ min}^{-1}$  eingestellt um ein Auswerten zu ermöglichen.

### *Auswirkung der Inkubationszeit auf die Zelladhäsion*

Die Zelladhäsion an Implantatoberflächen stellt einen komplexen, dynamischen Prozess dar [35, 39, 96], wodurch eine Änderung der Zelladhäsion mit zunehmender Inkubationsdauer zu erwarten ist. Je nach Messmethode und Zelltyp werden in der Literatur Inkubationszeiträume von 15 min bis zu 120 h [38, 79-82] beschrieben. Ein Vergleich dieser Daten untereinander könnte durch differierende Adhäsionsstärken nach verschiedenen Inkubationszeiten beeinträchtigt werden. Um eine verlässliche Aussage über das Adhäsionsverhalten von MG-63 Zellen mit zunehmender Inkubationsdauer zu erhalten, wurden polierte TiAl6V4 Probekörper mit MG-63 Zellen für je 1, 3, 6, 12, 18, 24 und 48 h besiedelt und anschließend die Scherspannungen ermittelt. Die verwendeten Drehfrequenzen wurden an die jeweiligen Versuchsbedingungen angepasst und die applizierten Scherspannungen für 50 % Zellabriss berechnet. Die Zellhöhe und der Zellkontaktradius können sich zum Teil erheblich mit zunehmender Inkubationszeit verändern, sodass die Zellmorphologie einen Einfluss auf die wirkenden Adhäsionskräfte bei einer vorgeschriebenen Scherspannung ausüben könnte. Daher wurden im Anschluss sowohl die Zellhöhe als auch der Zellkontaktradius zu den unterschiedlichen Zeiträumen untersucht, um letztlich die Zelladhäsionskräfte bestimmen zu können.

### 3.2.3 Zelladhäsion auf unterschiedlich modifizierten Implantatoberflächen

In der Biomaterialforschung ist die Ermittlung der Knochenzelladhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen von großem Interesse. Für die Untersuchungen der Zelladhäsionskräfte kamen zunächst Biomaterialien zur Anwendung, die, wie folgend, häufig in der Implantattechnologie eingesetzt werden: polierte Ronden ( $\varnothing$  30 mm, Höhe 8 mm,  $R_a < 0,02 \mu\text{m}$ ) aus einer Titanlegierung (TiAl6V4), Kobalt-Chrom-Legierung (CoCr28Mo6) und aus Edelstahl (316L). In Tab. 2 werden zusätzlich verschiedene und zum Teil neuartige Oberflächenmodifikationen und deren Beschichtungstechnologien aufgeführt. Zu den neuartigen Beschichtungen zählen eine Fluorkohlenstoffbeschichtung und eine Glaskeramik [97]. Die Fluorkohlenstoffbeschichtung wurde durch ein gepulstes Niederdruckplasma auf die Oberflächen abgeschieden und soll insbesondere für temporäre Implantate das Einwachsen von Zellen vermindern. Die Glaskeramik findet als Haftvermittler für keramische Kronen im Bereich des Zahnersatzes Anwendung. Die Schicht wurde mit Hilfe der DCM hotbond Technologie aufgebracht, wobei eine dünne Schicht aus ZirConnect (DCM, Rostock, Deutschland) auf die Oberfläche aufgesprüht und anschließend in einem Vakuumofen aufgebrannt wird. Als Haftvermittler wird die Glaskeramik normalerweise angeätzt, jedoch wurde für die Zelladhäsionsversuche auf diesen Schritt verzichtet, um eine Eignung als mögliche anti-adhäsive Funktionalisierungsschicht zu untersuchen.

Tab. 2: Analytierte Oberflächenbeschichtungen unter Angabe der Beschichtungstechnologie, Eigenschaften und des Anwendungsbereichs.

Beschichtung	Kurzbezeichnung	Beschichtungstechnologie	Eigenschaften / Anwendungsbereich
Titanoxid [17]	TiO <sub>2</sub>	Anodische Oxidation	Bioinert / temporäre Implantate
Titanniobnitrid [32]	TiNbN	Physikalische Dampfphasen Abscheidung (PVD)	Verschleißfest, Allergieschutz / Gleitflächen, z.B. Knieimplantate
Plasmapolymerisiertes Allylamin [30, 31]	PPAAm	Mikrowellen angeregte, gepulste, Niederdruck Plasma-Abscheidung	Bioaktiv / Einwachszone permanenter Implantate
Plasmapolymerisiertes Ethylendiamin [31]	PPEDA	Gepulste Niederdruck Plasma-Abscheidung	Bioaktiv / Einwachszone permanenter Implantate
Kalziumtitanat [98]	Ca <sub>4</sub> Ti <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	Salzschmelzverfahren	Bioaktiv / Einwachszone permanenter Implantate
Glaskeramik [97]	SiO <sub>2</sub>	Sintern	Haftvermittler / Zahnimplantate
Fluorkohlenstoff	C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	Gepulste Niederdruck Plasma-Abscheidung	Anti-adhäsiv / temporäre Implantate, OP-Instrumente

Für jedes Substrat wurde die einzustellende Drehzahl individuell angepasst, um eine Zellabscherung von 50 % auf eine der zehn lasermarkierten Positionen zu gewährleisten. Um den Einfluss der Zellmorphologie auf die Untersuchungsergebnisse einbeziehen zu können, wurden die Zellhöhe und der Zellkontaktradius auf jeder Oberfläche ermittelt und die Adhäsionskraft neben der Scherspannung bestimmt.

Plasmabeschichtungen können sich hinsichtlich ihrer chemischen Oberflächeneigenschaften mit der Zeit verändern [31] und somit altern. Im Falle der plasmapolymersierten Ethylendiamin- (PPEDA) Beschichtung wurde die Auswirkung der Schichtalterung auf die Zelladhäsion im Vergleich zu einer ungealterten Probe untersucht. Hierfür wurden 5 Proben über ein Jahr bei Raumtemperatur eingelagert und anschließend die Zelladhäsionskräfte ermittelt.

### **3.2.4 Einfluss von fetalem Kälberserum auf die Zelladhäsion**

Die Präsenz von fetalem Kälberserum (FKS) im Zellkulturmedium führt in Kontakt mit Biomaterialoberflächen innerhalb weniger Sekunden zur Adsorption von extrazellulären Matrixproteinen. Noch bevor Zellen an die Oberfläche adhären können, könnte die Proteinanbindung zu einer Maskierung der Probenoberfläche führen. Es lässt sich vermuten, dass dadurch mögliche potentielle Adhäsionsunterschiede allein durch die Oberflächenkonfiguration nicht zum Tragen kommen könnten.

In einer ersten Vorversuchsreihe mit den polierten Standardimplantatoberflächen TiAl6V4, CoCr26Mo8 und 316L wurden die Scherspannungen zum Ablösen der Zellen von den Substraten unter Abstinenz von FKS zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Hierfür wurde das Kompletmedium 24 h vor der Aussaat der Zellen auf die Proben durch FKS-freies Zellkulturmedium in der Zellkulturflasche ersetzt (FKS-Entzug). Anschließend wurden die Zellen 18 h bzw. 4 d auf den drei Oberflächen ebenfalls mit FKS-freiem DMEM inkubiert und die applizierten Scherspannungen ermittelt.

Um den Einfluss von FKS hinsichtlich der Zelladhäsion bzw. Maskierung des Substrats näher zu analysieren, wurden erste Versuche mit TiAl6V4-Probekörpern durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden folgende Inkubationsbedingungen festgelegt:

- a) Inkubation von MG-63 Zellen mit und ohne FKS-Entzug für 24 h vor Versuchsbeginn,
- b) Inkubation von MG-63 Zellen für 3h mit und ohne 10 % FKS-haltigem Medium,
- c) Vorkonditionierung der TiAl6V4-Oberflächen mit und ohne 10 % FKS-haltigem Medium vor Versuchsbeginn.

Die einzelnen Bedingungen wurden schlüssig miteinander kombiniert und die verschiedenen Ansätze in Tab. 3 mit der entsprechenden Testbezeichnung übersichtlich dargestellt. Die

Zellhöhen, Zellkontaktradien und die daraus zu ermittelnden Zelladhäsionskräfte wurden in diesen ersten Versuchen nicht ermittelt.

Tab. 3: Testbezeichnung verschiedener Kulturbedingungen zur Ermittlung des Einflusses von FKS auf die Adhäsion von MG-63 Zellen auf TiAl6V4-Proben nach 3 h Inkubation.

Kulturbedingungen für die MG-63 Zellen	10% FKS-Vorkonditionierung der TiAl6V4-Oberflächen 20h	0% FKS-Vorkonditionierung der TiAl6V4-Oberflächen 20h
vorab 20h FKS-Entzug & 3h FKS-freie Inkubation	V1.1	V1.2
kein FKS-Entzug & 3h FKS-freie Inkubation	V2.1	V2.2
kein FKS-Entzug & 3h Inkubation mit FKS	V3.1	V3.2

Für den FKS-Entzug vor dem Versuchsbeginn wurde bei laufenden MG-63 Zellkulturen das Komplettmedium durch FKS-freies DMEM ersetzt. Für jede Untersuchung der Osteoblasten auf den Oberflächen wurden diese für 3 h inkubiert und anschließend die Scherspannung unter Anpassung testspezifischer Drehfrequenzen ermittelt. Die FKS-Vorkonditionierung der TiAl6V4-Oberflächen wurde durch das Einlegen der Proben in Komplettmedium für 20 h vor Aussaat der Zellen auf die Oberflächen erzielt, während nicht konditionierte Proben für 20 h in DMEM ohne FKS im Inkubator gelagert wurden.

### 3.3 *In-vitro* Zelladhäsionsuntersuchungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen

Mittels des Adhäsionsmessstands ist es möglich, mit unterschiedlichen Zelltypen das Anhaften der Zellen an Oberflächen zu analysieren. Zur Demonstration wurden Versuche mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) als Machbarkeitsstudie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Zudem sollen Aussagen über etwaige zelltypspezifische Unterschiede in der Zelladhäsion getroffen werden.

#### 3.3.1 Kultivierung von hMSC-Zellkultur

Für die folgenden Versuche wurden humane mesenchymale Stammzellen (hMSC, engl. human mesenchymal stem cells, PT-2501, Lonza Group LT, Basel, Schweiz) verwendet und in Zellkulturflaschen (TCPS, Greiner Bio-One, 75 cm<sup>2</sup>, Frickenhausen, Deutschland) mit einer Zelldichte von  $6,0 \times 10^3$  Zellen pro cm<sup>2</sup> entsprechend der Herstellervorgaben ausgesät. Die Zellen wurden im Folgenden 7 Tage in Erhaltungsmedium (EM, PT-3001, Lonza Group LT, Basel, Schweiz) bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, wobei nach 4 Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Die subkonfluenten Zellen wurden mit PBS gespült, 5 min mit Trypsin-EDTA inkubiert und mit 5 ml EM resuspendiert. Anschließend erfolgte die

Zellfärbung entsprechend der genannten Methode in Abschnitt 3.1.2. Sofern nicht weiter spezifiziert, wurden alle Versuche in der 4. Passage durchgeführt.

### **3.3.2 hMSC Zelladhäsion auf polierten TiAl6V4-Proben**

Stammzellen haben das Potenzial, sich durch Differenzierung in Osteoblasten zu entwickeln, wodurch sich die Adhäsionseigenschaften verändern könnten. Durch osteogenes Differenzierungsmedium (ODM, PT-3002, Lonza Group LT, Basel, Schweiz) kann die Stammzellendifferenzierung eingeleitet werden. Daher wurde neben dem Einfluss der Inkubationszeit auch der Einfluss des Zellkulturmediums auf polierten TiAl6V4-Oberflächen analysiert. Hierfür wurden auf jeden Probekörper je 5x 1500 hMSC pro 2 µl Tropfen entlang der zwei lasermarkierten Radien aufgebracht und nach 20 min mit EM bzw. ODM überschichtet. Nach Inkubationszeiträumen von 3 h und 18 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Proben in den mit EM gefüllten Adhäsionsmesstand überführt und die radiale Position für eine Zellabscherung von 50 % nach Applikation versuchsspezifischer Rotationsgeschwindigkeiten ermittelt. Weiterhin wurden die Scherspannungen berechnet, die Zellmorphologie analysiert und die Adhäsionskraft der Stammzellen bestimmt.

## **3.4 Mechanische Oberflächencharakterisierung der modifizierten Implantatoberflächen**

Für eine bessere Beurteilung der aus den Zelladhäsionsversuchen gewonnenen Daten ist eine Charakterisierung der verwendeten Oberflächen hinsichtlich der Hydrophilie bzw. Hydrophobie und der Rauheit von Interesse. Zudem sollten Oberflächenbeschichtungen eine Mindestanforderung an die Haftfestigkeit für den Einsatz in der orthopädischen Chirurgie erfüllen.

### **3.4.1 Wasserkontaktwinkelmessung und Rauheit**

Die Wasserkontaktwinkelmessungen wurden mit einem Kontaktwinkelmessgerät (OCA30, Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) nach der Sessile-Drop-Methode durchgeführt. Hierbei wird der Winkel  $\alpha$ , den ein ruhender Wassertropfen auf einer Oberfläche bildet, bestimmt (Abb. 17). Im speziellen Fall eines Wassertropfens werden Oberflächen mit geringen Kontaktwinkeln als hydrophil und mit Kontaktwinkeln um 90 ° als hydrophob bezeichnet [99].

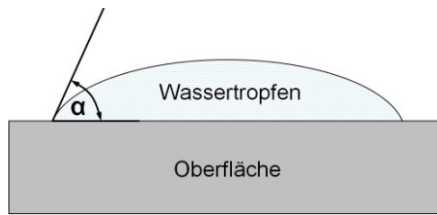


Abb. 17: Kontaktwinkelbestimmung eines ruhenden Wassertropfens auf einer Oberfläche nach der Sessile-Drop-Methode.

Die Oberflächenrauheit wurde nach ISO 4287 [100] mit einem Profilometer (Hommel Tester T1000, Hommel-Etamic GmbH, Villingen-Schwenningen, Deutschland) untersucht. Hierfür wurden der arithmetische Mittelwert aus den Beträgen aller Profilwerte ( $R_a$ ) und die gemittelte Rautiefe ( $R_z$ ) bestimmt (Abb. 18). Die gemittelte Rautiefe setzt sich aus fünf Einzelrautiefenbestimmungen innerhalb einer Gesamtmessstrecke  $l_n$  zusammen. Für die Untersuchungen wurde ein Taststab (TS1 KE2/60GD, Hommel-Etamic GmbH, Villingen-Schwenningen, Deutschland) mit einem Tastspitzenradius von  $2\ \mu\text{m}$  und einem Tastspitzenwinkel von  $60^\circ$  eingesetzt.

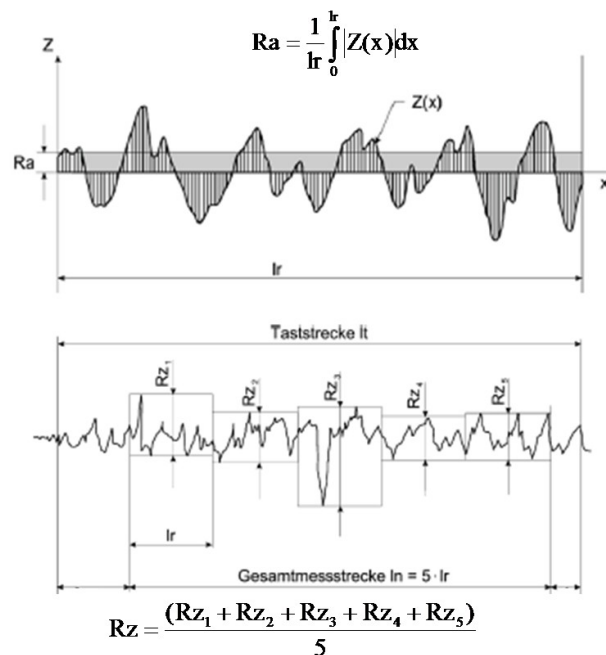


Abb. 18: Definition der Rauheitskenngrößen  $R_a$  und  $R_z$  nach ISO 4287 [100].

### 3.4.2 Haftfestigkeit der Implantatbeschichtungen

Neben der Bioverträglichkeit und Funktionalität einer Implantatbeschichtung ist dessen Haftfestigkeit auf dem Substrat für die orthopädische Anwendung von entscheidender



Bedeutung. Bei der Implantation von Endprothesen können zum Teil sehr hohe Scherspannungen auftreten, die durch die Reibung zwischen Oberfläche und Knochen beim Setzen des Implantats entstehen. Ein Versagen der Beschichtung würde bereits in einem sehr frühen Implantationsstadium Abriebpartikel als Drittkörper in das knöcherne Implantatlager einbringen und die Partikelkrankheit begünstigen [4, 5].

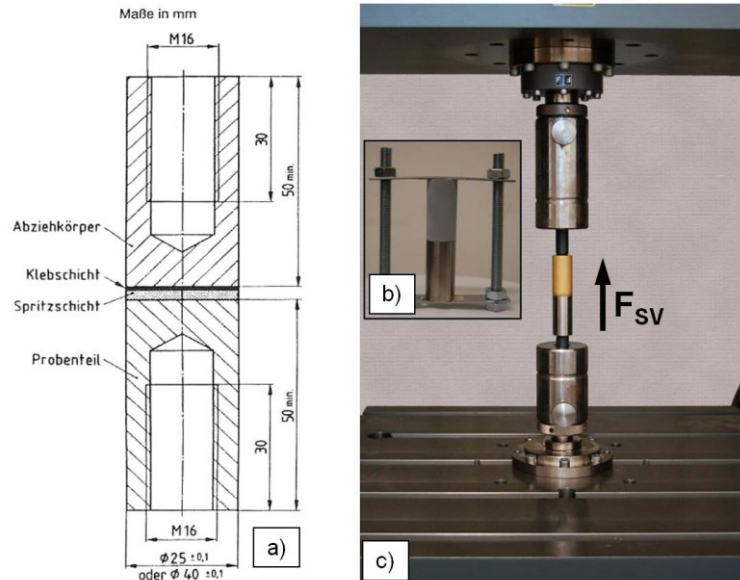


Abb. 19: Stirnabzugversuch nach DIN EN 528: a) Geometrie der Stirnabzugprobekörper [101], b) Klemmvorrichtung, c) Einspannung in Universalprüfmaschine.

Es werden unterschiedliche Verfahren zur Haftfestigkeitsprüfung von Beschichtungen eingesetzt. So werden beispielsweise in Ritzprüfungen mit Hilfe eines Ritzstichels Oberflächen angeritzt und die Ritzbilder qualitativ unter einem Mikroskop begutachtet [102, 103]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stirnabzugversuche nach DIN EN 582 [101] durchgeführt, die eine quantitative Beurteilung der Haftfestigkeit ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden zylindrische Probekörper ( $\phi 25$  mm, Abb. 19) an den korundgestrahlten Stirnflächen ( $A \approx 491 \text{ mm}^2$ ) beschichtet. Eine zweite, gleichartige und unbeschichtete Probe wurde auf der Stirnfläche mit einer hauchdünnen Schicht eines Industrieklebers (Klebbi, Sulzer Metco Europe GmbH, Hattersheim, Deutschland) versehen und unter Druck ( $0,25 \text{ N/mm}^2$ ) mittels einer Klemmvorrichtung auf die beschichtete Stirnfläche des ersten Probekörpers geklebt. Anschließend wurden die Proben samt Klemmvorrichtung in einen Ofen bei  $180 \text{ }^\circ\text{C}$  für 50 min zum Aushärten des Klebers gelegt. Nachdem die Probekörper auf Raumtemperatur abkühlten, wurden sie in eine statische Universalprüfmaschine (Z050, Zwick/Roell, Ulm, Deutschland) eingespannt und mit einer

Geschwindigkeit von 10 mm/min auseinander gezogen. Mit der dabei auftretenden Maximalkraft  $F_{SV}$  wurde die Stirnzugfestigkeit  $\sigma$  bestimmt [103],

$$\sigma = \frac{F_{SV}}{A}. \quad (19)$$

### 3.5 Statistische Analyse

Alle erhobenen Daten wurden gespeichert und mit SPSS 20.0.0 (IBM® SPSS®, Armonk, New York, USA) analysiert. Deskriptive Statistiken wurden für kontinuierliche und kategorisierte Variablen berechnet [104], die Mittelwerte und Standardabweichungen beinhalteten. Vergleiche zwischen unabhängigen Gruppen (Zellversuche) wurden mit dem Mann-Whitney Test (U-Test) durchgeführt, wohingegen die Methoden der Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen als Post-Hoc-Test (LSD) zum Vergleich der Mittelwerte für die Haftfestigkeitsprüfungen der Oberflächenbeschichtungen herangezogen wurden. Alle p-Werte resultieren aus zweiseitigen statistischen Tests, wobei p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant eingestuft wurden.

## 4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuchsreihen beschrieben und dargestellt. Dabei entsprechen alle im Text und in den Tabellen aufgeführten Messwerte den arithmetischen Mittelwerten.

### 4.1 Auswirkung variierender Parameter auf die MG-63 Zelladhäsion

#### 4.1.1 Einfluss der Rotationszeit auf das Ergebnis der Zelladhäsionsmessungen

Mit Zunahme des Abstandes vom Probenzentrum zum Probenrand (steigender radialer Position) erhöht sich die auf die Zellen einwirkende Scherspannung, so dass bei einer konstanten Drehfrequenz von  $4000 \text{ min}^{-1}$  für alle Rotationszeiten ein Anstieg der Zellabscherung zu verzeichnen ist. Besonders auffällig ist die Abrissrate bei einer Rotationszeit von 600 s, die auf allen Positionen immer einen erhöhten Zellabriss hervorruft (Abb. 20). Ein Anstieg der Rotationszeit von 30 s auf 300 s wirkte sich bei niedrigen Scherspannungen (Position 4 und 5) nicht sonderlich auf die Abrissrate aus. Jedoch gewinnt der Einfluss der Rotationszeit bei höheren Scherspannungen zunehmend an Bedeutung, da höhere Abrissraten auf Position 6 bei Rotationszeiten über 180 s verzeichnet werden konnten. Eine statistische Auswertung dieser Ergebnisse konnte aufgrund der zum Teil geringen Datenlage nicht ausreichend durchgeführt werden.

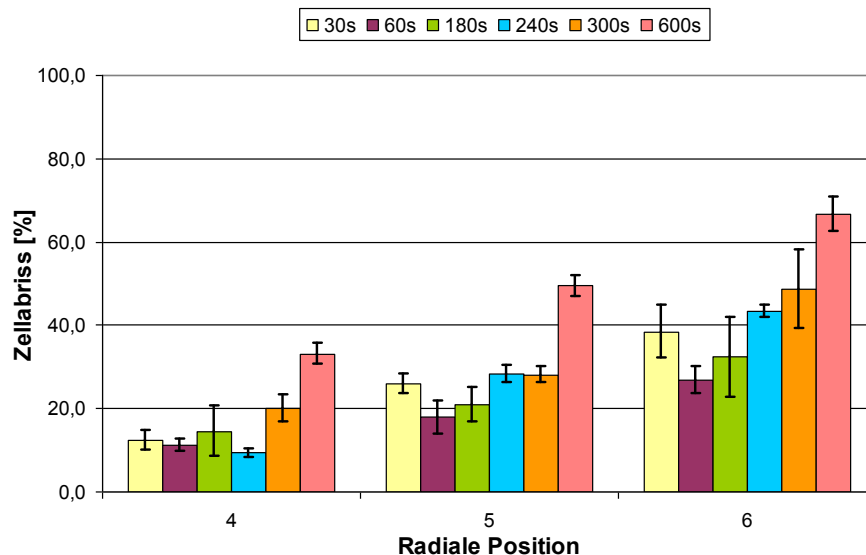


Abb. 20: Zeitlicher Einfluss der Scherspannung auf das Adhäsionsverhalten von MG-63 Zellen. Dargestellt wird der mittlere prozentuale Zellabriss bei konstanter Drehfrequenz von  $4000 \text{ min}^{-1}$  in Abhängigkeit zur radialen Position bei unterschiedlichen Rotationszeiten ( $2 \leq n \leq 4$ ).

#### 4.1.2 Einfluss der Zellpassage auf die Zelladhäsionsmessungen von MG-63 Zellen

Mit Ausnahme der 144. Passage wurden alle Versuche bei einer Drehzahl von  $4000 \text{ min}^{-1}$  durchgeführt. Für Passage 144 wurden  $2000$  bzw.  $2500 \text{ min}^{-1}$  appliziert. Zur Berechnung der Scherspannungen in Abb. 21, wurden die Positionen (Radien in mm)  $r$  für 50 % Zellabriss ermittelt und zusammen mit der Drehfrequenz  $\omega$  in Gleichung (1) eingesetzt.

Durch das Passagieren der MG-63 Zellen konnte eine zum Teil erhebliche Schwankung der Zelladhäsion hinsichtlich der Scherspannung ermittelt werden (Abb. 21). Zunächst steigt die Scherspannung signifikant von im Mittel  $44,2 \pm 9,0 \text{ N/m}^2$  ( $r = 6,8 \pm 1,3 \text{ mm}$ ) in der 96. Passage auf  $61,3 \pm 8,9 \text{ N/m}^2$  ( $r = 9,3 \pm 1,3 \text{ mm}$ ) in der 103. Passage ( $p = 0,007$ ), und fällt in der 104. Passage signifikant auf  $48,1 \pm 3,3 \text{ N/m}^2$  ( $r = 7,3 \pm 1,5 \text{ mm}$ ,  $p = 0,006$ ) ab. Die mittleren Scherspannungen der 104. Passage zeigen im Vergleich zur 96. ( $p = 0,387$ ) bzw. der 117. ( $p = 0,726$ ) keine statistisch signifikanten Unterschiede. Jedoch konnte ein signifikanter Abfall der Scherspannung auf  $20,6 \pm 3,4 \text{ N/m}^2$  ( $r = 9,5 \pm 0,1 \text{ mm}$  bzw.  $5,9 \pm 0,5 \text{ mm}$ ) in der 144. Passage beobachtet werden ( $p \leq 0,003$  im Vergleich zu allen anderen Passagen). Für die höchste untersuchte 150. Passage wurde eine mittlere Scherspannung von  $36,3 \pm 1,2 \text{ N/m}^2$  ( $r = 5,5 \pm 0,2 \text{ mm}$ ) ermittelt, die etwas unterhalb der 96. Passage lag, jedoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,088$ ) dazu aufweist. Die Scherkraft wurde für diese Untersuchungen nicht bestimmt.

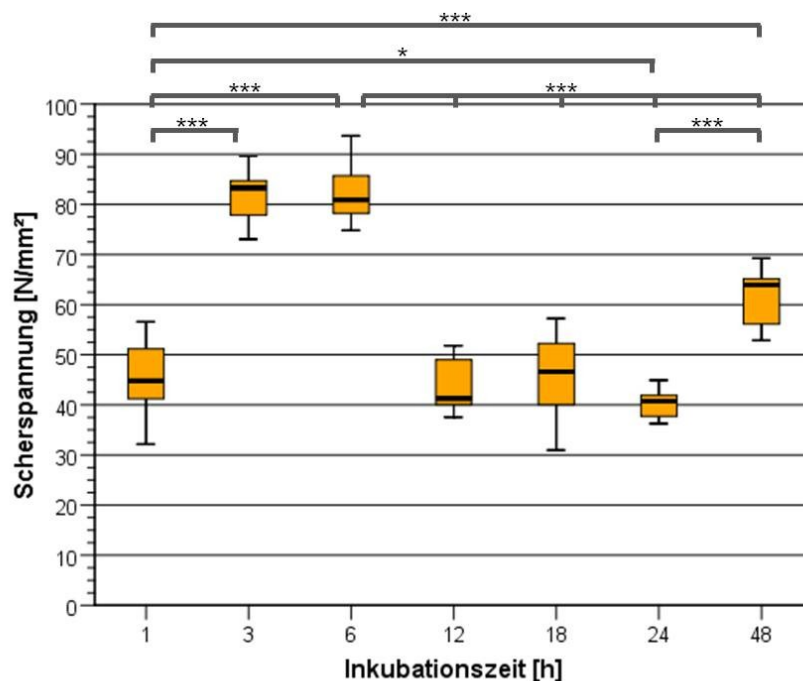


Abb. 21: Scherspannungen in Abhängigkeit zu unterschiedlichen Zellpassagen der Zelllinie MG-63 nach 18 h Inkubationszeit auf polierten TiAl6V4 Proben (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $4 \leq n \leq 20$ ).

### 4.1.3 Einfluss der Inkubationszeit auf die Zelladhäsion von MG-63 Zellen

In der Tab. 4 sind die für unterschiedliche Inkubationszeiten benötigten Drehzahlen sowie die entsprechenden mittleren radialen Abrisspositionen aufgeführt, die zu einem Abscheren von 50 % der MG-63 Zellen führten.

Tab. 4: Drehzahl, radiale Abrissposition, Zellkontaktradius sowie Zellhöhe für MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Proben in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (\*\*p ≤ 0,001).

Adhäsionszeit [h]	Drehfrequenz (f) [min <sup>-1</sup> ] / Rotationsgeschwindigkeit (ω) [s <sup>-1</sup> ]	Mittlere Abrissposition (r) [mm]	Mittlerer Zellkontaktradius (r <sub>c</sub> , n = 30) [μm]	Mittlere Zellhöhe (h, n = 30) [μm]
1	4000 / 419	6,9 ± 1,1	10,3*** ± 3,7	9,5*** ± 2,7
3	6000 / 628	6,7 ± 0,4	20,2 ± 4,4	5,8*** ± 1,1
6	6300 / 660	6,3 ± 0,5	20,9 ± 4,1	5,2 ± 0,7
12	3500 / 367	8,1 ± 0,9	23,6 ± 6,7	4,7 ± 0,9
18	4000 / 419	6,8 ± 1,3	24,8 ± 9,0	4,8 ± 0,7
24	3500 / 367	7,5 ± 0,5	23,1 ± 7,3	5,0 ± 0,7
48	4500 / 471	7,8 ± 0,8	21,7 ± 6,0	4,6 ± 0,6

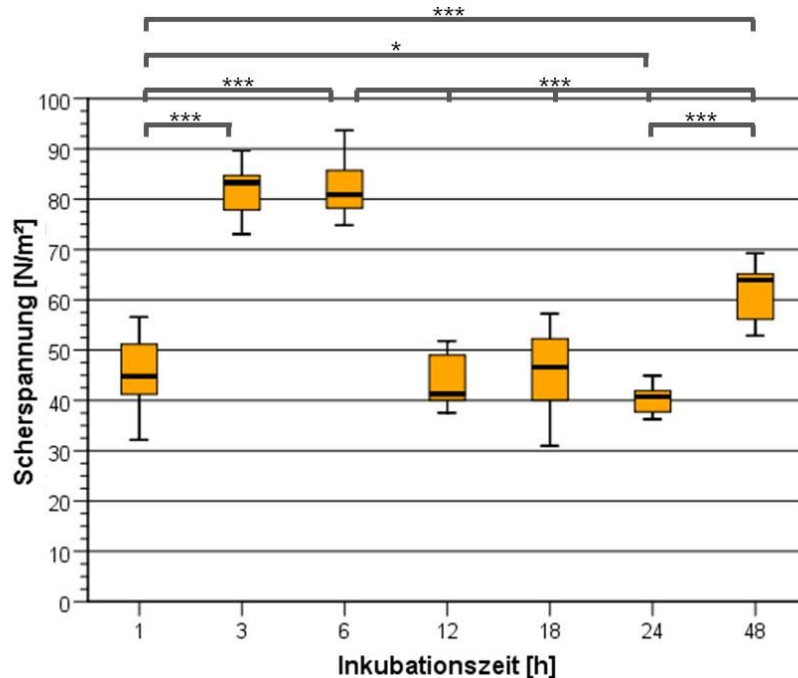


Abb. 22: Scherspannungen zu unterschiedlichen Inkubationszeiten von MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Proben (\*p < 0,05; \*\*\*p ≤ 0,001; 9 ≤ n ≤ 19).

Abb. 22 zeigt die resultierenden Scherspannungen bei 50 % Zellabriss. Hierbei wird die Zellmorphologie noch nicht mit einbezogen. Innerhalb der ersten 6 h konnte eine statistisch signifikante Erhöhung der mittleren Scherspannung von  $45,5 \pm 7,1 \text{ N/m}^2$  auf die höchste beobachtete Scherspannung von  $82,4 \pm 5,9 \text{ N/m}^2$  nach 6 h Inkubationszeit ( $p \leq 0,001$ ) verzeichnet werden. Nach 12 h Adhäsionszeit sank die Scherspannung auf das Niveau der ersten Stunde ab ( $p = 0,406$ ). Innerhalb der folgenden 12 h änderte sich die Scherspannung nicht signifikant, jedoch wurde bei 24 h der geringste Wert von  $40,4 \pm 2,8 \text{ N/m}^2$  ( $0,325 \geq p \geq 0,111$ ) erreicht. In den darauf folgenden 24 h stieg die ermittelte Scherspannung signifikant auf  $61,4 \pm 6,2 \text{ N/m}^2$  ( $p \leq 0,001$ ), wobei sich diese signifikant von allen anderen Messwerten unterscheidet ( $p \leq 0,001$ ).

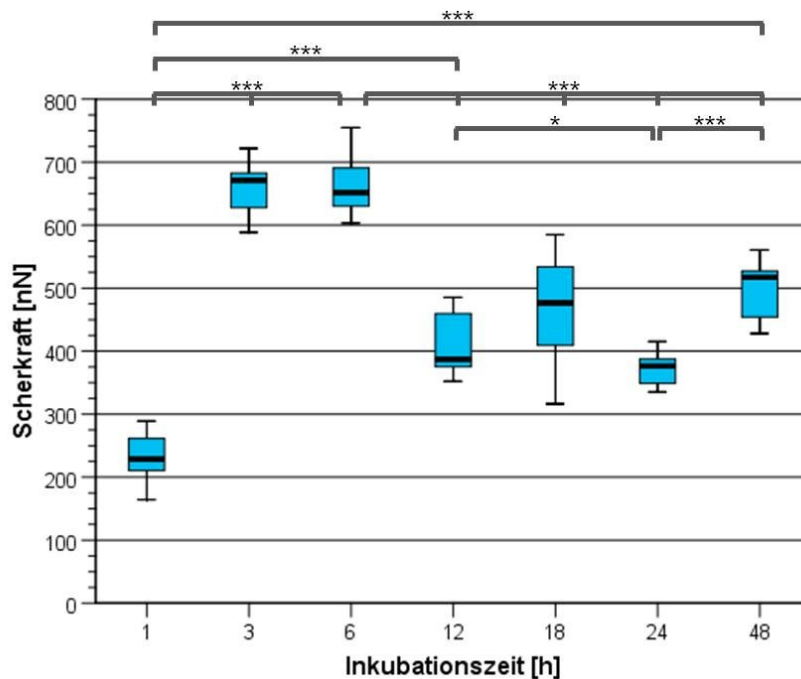


Abb. 23: Scherkräfte von MG-63 Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen auf polierten TiAl6V4 Proben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $9 \leq n \leq 19$ ).

Unter Einbezug der Zellmorphologie können mittels der Gleichung (18) die Zelladhäsionskräfte approximiert und analysiert werden. Die hierfür ermittelten Zellkontaktradien und Zellhöhen sind in der Tab. 4 angegeben. Ab der dritten Stunde ist ein nahezu verdoppelter Zellkontaktradius zu beobachten, während sich die Zellhöhe nach 6 h in etwa halbiert. Danach verändert sich die Zellausbreitung nur geringfügig und zumeist ohne statistische Relevanz. Die daraus resultierenden Scherkräfte folgen dem Trend der evaluierten Scherspannungen über die verschiedenen Adhäsionszeiträume. Zunächst ist

ebenfalls ein stark signifikanter Anstieg der Scherkraft innerhalb der ersten 6 h von  $232 \pm 32$  nN auf einen mittleren Maximalwert von  $664 \pm 48$  nN zu verzeichnen ( $p \leq 0,001$ ). Der anschließende Abfall der Scherkraft auf  $411 \pm 47$  nN nach 12 h Inkubationszeit ist analog zur Scherspannung stark signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Anders als bei der Scherspannungsermittlung ist dieser Wert jedoch signifikant höher als die Scherkraftapproximation der ersten Stunde ( $p \leq 0,001$ ). Im Anschluss variiert die Scherkraft im Mittel zwischen 373 und 497 nN.

### **4.2 MG-63 Zelladhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen**

Um mögliche Unterschiede im Adhäsionsverhalten der Zellen auf den unterschiedlichen Implantatoberflächen besser einordnen zu können, ist eine nähere Untersuchung der unmittelbaren Kontaktfläche erforderlich. Daher sollen im Folgenden zunächst die Ergebnisse der Kontaktwinkel- und Rauigkeitsmessungen dargestellt werden, bevor die Zelladhäsion näher betrachtet wird. Zudem werden Stirnabzugsversuche aufgeführt, die eine für Implantatbeschichtungen unerlässliche Beurteilung der Haftfestigkeit auf dem Substrat ermöglichen.

#### **4.2.1 Kontaktwinkel und Oberflächenrauheiten der unterschiedlichen Implantatoberflächen**

Die verschiedenen Oberflächen weisen unterschiedliche Wasserkontaktwinkel auf (Tab. 5). Die Oberfläche mit den wasserabweisendsten (hydrophobe) Eigenschaften wurde mit einem Kontaktwinkel von  $110^\circ$  auf der C3F8 Beschichtung bestimmt. Für die 316L und CoCr28Mo6 Oberflächen wurden Wasserkontaktwinkel mit  $90^\circ$  bzw.  $85^\circ$  ermittelt. TiAl6V4, TiNbN sowie Ca4Ti3O10 liegen etwas darunter. Deutlich geringere Kontaktwinkel wurden für PPAAm und TiO2 gemessen. Die geringsten Kontaktwinkel konnten für die SiO2 und PPEDA Beschichtungen mit  $18^\circ$  bzw.  $15^\circ$  bestimmt werden, die somit die stärksten hydrophilen Oberflächeneigenschaften aufweisen.

Bei den überwiegend polierten Oberflächen wurden kaum Unterschiede in der mittleren Rauigkeit (Ra) gemessen (Tab. 5). Lediglich die TiO2 und SiO2 Beschichtungen weisen mit einem Ra-Wert von 0,27 bzw. 0,49  $\mu\text{m}$  eine deutlich höhere Rauigkeit auf. Beide Werte liegen signifikant über der mittleren Rauigkeit von ca. 0,02  $\mu\text{m}$  der restlichen Oberflächen ( $p < 0,05$ ).

Tab. 5: Übersicht über die Wasserkontaktwinkel- und Rauheitsmessungen unterschiedlicher Oberflächen (\*p < 0,05).

Oberfläche	Wasserkontaktwinkel (n = 3) [°]	Rauheit Ra / Rz (n = 5) [µm]
TiAl6V4	75 ± 1	0,02 ± 0,00 / 0,13 ± 0,02
CoCr28Mo6	85 ± 2	0,02 ± 0,00 / 0,10 ± 0,01
316L	90 ± 2	0,01 ± 0,00 / 0,10 ± 0,02
TiO <sub>2</sub>	41 ± 3	0,27* ± 0,01 / 2,62 ± 0,09
TiNbN	74 (nach Serro <i>et al.</i> [32])	0,03 ± 0,01 / 0,41 ± 0,01
PPAAm	43 ± 3	0,02 ± 0,00 / 0,16 ± 0,02
PPEDA	15 ± 5	0,02 ± 0,00 / 0,18 ± 0,06
Ca <sub>4</sub> Ti <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	69 ± 1	0,02 ± 0,00 / 0,19 ± 0,06
SiO <sub>2</sub>	18 ± 2	0,49* ± 0,12 / 1,76 ± 0,46
C3F8	110 ± 5	0,03 ± 0,00 / 0,15 ± 0,02

#### 4.2.2 Haftfestigkeit der unterschiedlichen Implantatoberflächen

Die Stirnabzugsversuche der untersuchten Beschichtungen zeigten ein durchweg hohes Stirnzugfestigkeitsniveau mit Stirnzugfestigkeiten im Mittel zwischen 74,7 und 89,6 N/mm<sup>2</sup> (siehe Abb. 24). Für die C3F8 Beschichtung konnte kein Messwert ermittelt werden, da der verwendete Industriekleber nicht auf der stark hydrophoben Oberfläche haftete.

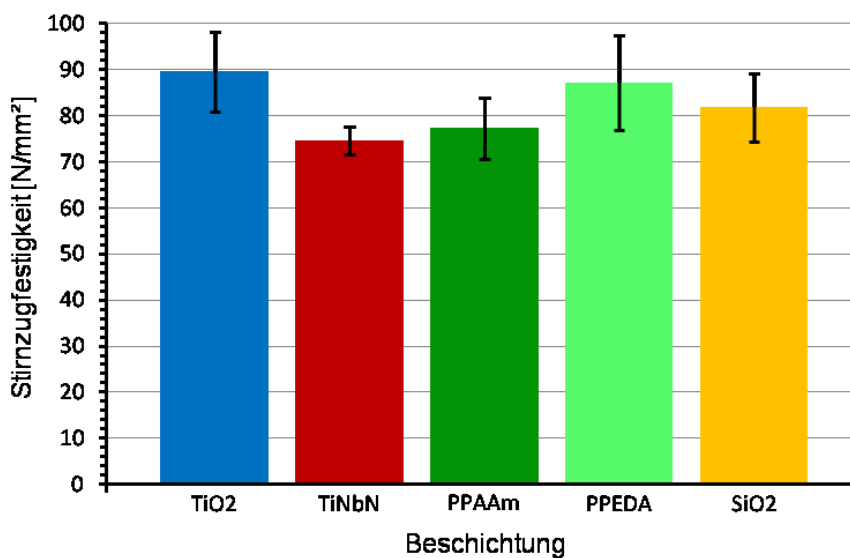


Abb. 24: Ergebnisse der Stirnabzugsversuche unterschiedlicher Beschichtungen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen (n = 5).



#### 4.2.3 Scherspannungen und Scherkräfte adhärerender MG-63 Zellen auf unterschiedlichen Implantatoberflächen

Die Tab. 6 zeigt die zum Ablösen der MG-63 Zellen von verschiedenen Implantatoberflächen applizierten Rotationsgeschwindigkeiten und die daraus resultierenden mittleren Abrisspositionen. Mit Ausnahme der Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub> und C3F<sub>8</sub> beschichteten Proben wurde auf alle Proben eine über alle Versuchsreihen gleichbleibende Drehzahl von 4000 bzw. 5000 min<sup>-1</sup> ausgeübt. Die geringsten Drehfrequenzen von 1500 bzw. 1800 min<sup>-1</sup> wurden bei der Untersuchung der C3F<sub>8</sub> beschichteten Probe mit der höchsten Hydrophobie appliziert.

Tab. 6: Drehzahl, radiale Abrissposition, Zellkontaktradius sowie Zellhöhe für MG-63 Zellen nach 18 h Zelladhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen.

Oberfläche	Drehfrequenz (f) [min <sup>-1</sup> ] / Rotationsgeschwindigkeit (ω) [s <sup>-1</sup> ]	Mittlere Abrissposition (r) [mm]	Mittlerer Zellkontaktradius (r <sub>c</sub> , n = 30) [μm]	Mittlere Zellhöhe (h, n = 30) [μm]
TiAl6V4	4000 / 419	6,7 ± 1,4	26,3 ± 6,8	5,2 ± 0,6
CoCr28Mo6	4000 / 419	7,2 ± 1,0	22,7 ± 6,8	4,5 ± 0,8
316L	4000 / 419	8,2 ± 0,8	25,2 ± 6,8	5,5 ± 0,7
TiO <sub>2</sub>	4000 / 419	6,8 ± 0,8	16,5 ± 3,3	5,5 ± 0,8
TiNbN	4000 / 419	7,6 ± 0,3	19,1 ± 4,1	4,9 ± 0,8
PPAAm	5000 / 524	6,9 ± 1,3	24,1 ± 7,0	5,5 ± 0,8
PPEDA_alt	5000 / 524	5,9 ± 0,5	25,7 ± 8,0	5,8 ± 0,6
PPEDA_neu	5000 / 524	5,8 ± 0,9	27,9 ± 3,8	4,9 ± 0,8
Ca <sub>4</sub> Ti <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	4000 / 419 bzw. 3500 / 367	6,7 ± 0,3 bzw. 5,6 ± 0,4	28,6 ± 3,9	5,6 ± 0,8
SiO <sub>2</sub>	4000 / 419	5,1 ± 0,3	25,4 ± 2,8	6,3 ± 0,6
C3F <sub>8</sub>	1500 / 157 bzw. 1800 / 188	5,6 ± 0,6 bzw. 5,6 ± 1,5	21,1 ± 3,9	6,9 ± 1,3

Die Ergebnisse der Scherspannungsberechnungen sind in Abb. 25 dargestellt. Für die Referenzoberfläche TiAl6V4 wurde dabei eine Scherspannung von 44,2 ± 9,0 N/m<sup>2</sup> ermittelt, die sich nicht signifikant von dem 18 h Wert (45,5 ± 7,1 N/m<sup>2</sup>) der Adhäsionszeitversuche aus dem Abschnitt 4.1.3 unterscheidet (p = 0,800). Im Vergleich zu den CoCr28Mo6, TiO<sub>2</sub> und TiNbN Oberflächen konnte kein signifikanter Unterschied zur TiAl6V4 festgestellt werden (0,234 ≤ p ≤ 0,834). Hoch signifikante Anstiege der Scherspannung konnten jedoch für 316L, PPAAm, PPEDA\_alt und PPEDA\_neu, (p ≤ 0,004) verzeichnet werden, wobei zum Ablösen von 50 % der MG-63 Zellen von der PPAAm Beschichtung die höchste mittlere Scherspannung von 62,8 ± 12,0 N/m<sup>2</sup> beobachtet wurde. Mit 53,9 ± 5,4 N/m<sup>2</sup> lag die

ermittelte Scherspannung für die polierte Oberfläche der 316L Probe auf dem Niveau der TiNbN und der alten wie neuen plasmapolymersierten Beschichtung PPEDA ( $p \geq 0,062$ ). Lediglich zur PPAAm Beschichtung besteht ein geringer signifikanter Unterschied ( $p = 0,036$ ). Die benötigten mittleren Scherspannungen, um 50 % der MG-63 Zellen von den Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub>, SiO<sub>2</sub> und C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> zu lösen, waren signifikant geringer als die der restlichen Oberflächen ( $p \leq 0,022$ ). Dabei wurde die geringste Scherspannung von  $9,3 \pm 2,1$  N/m<sup>2</sup> für die hydrophobe C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> Beschichtung bestimmt.

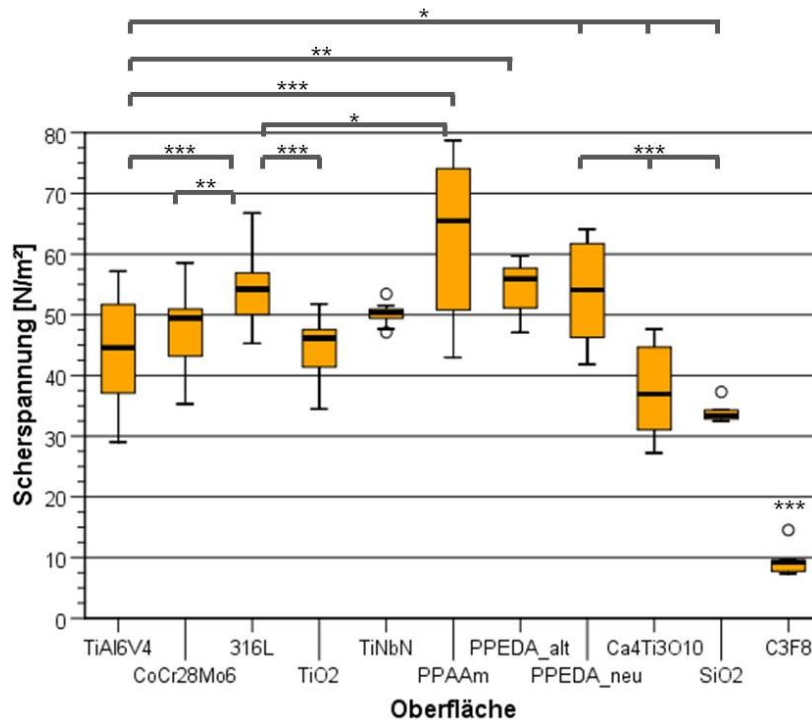


Abb. 25: Applizierte Scherspannungen für 50 % Zellabriss von MG-63 Zellen nach 18 h auf unterschiedlichen Implantatoberflächen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $6 \leq n \leq 22$ ).

Zur Approximation der Adhäsionskräfte bei 50 % Zellabriss ist eine Evaluierung von Zellkontaktradius und Zellhöhe notwendig. Hierfür wurden je 30 Zellen auf jeder Oberfläche nach 18 h Zelladhäsion ausgewertet (Tab. 6). Die in Abb. 26 und Abb. 27 aufgeführten Zellkontaktradien bzw. Zellhöhen unterliegen teilweise enormen Streuungen. Die geringste Zellausbreitung bzw. der geringste mittlere Zellkontaktradius wurde mit  $16,5 \pm 3,3$   $\mu\text{m}$  auf der TiO<sub>2</sub> beschichteten Probe gemessen, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied zum Kontaktradius auf der polierten TiAl6V4 Oberfläche vorliegt ( $p \leq 0,001$ ). Jedoch konnte keine statistische Signifikanz in der Zellhöhe festgestellt werden ( $p = 0,171$ ). Anders verhält es sich auf der C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> Oberfläche. Die Zellausbreitung mit einem Zellkontaktradius von  $21,1 \pm 3,9$   $\mu\text{m}$  ist ebenfalls hoch signifikant geringer als die der TiAl6V4 Oberfläche ( $p \leq 0,001$ ). Jedoch wurde für die Zellhöhe mit  $6,9 \pm 1,3$   $\mu\text{m}$  der signifikant größte Wert ermittelt ( $p \leq 0,001$ ).

Lediglich zur Zellhöhe auf der SiO<sub>2</sub> Schicht besteht kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,087$ ). Desweiteren konnte keine signifikante Differenz im Zellkontaktradius zwischen der gealterten bzw. neuen PPEDA Beschichtung verzeichnet werden ( $p = 0,329$ ). Allerdings wurde ein hoch signifikanter Unterschied in der Zellhöhe bestimmt ( $p \leq 0,001$ ).

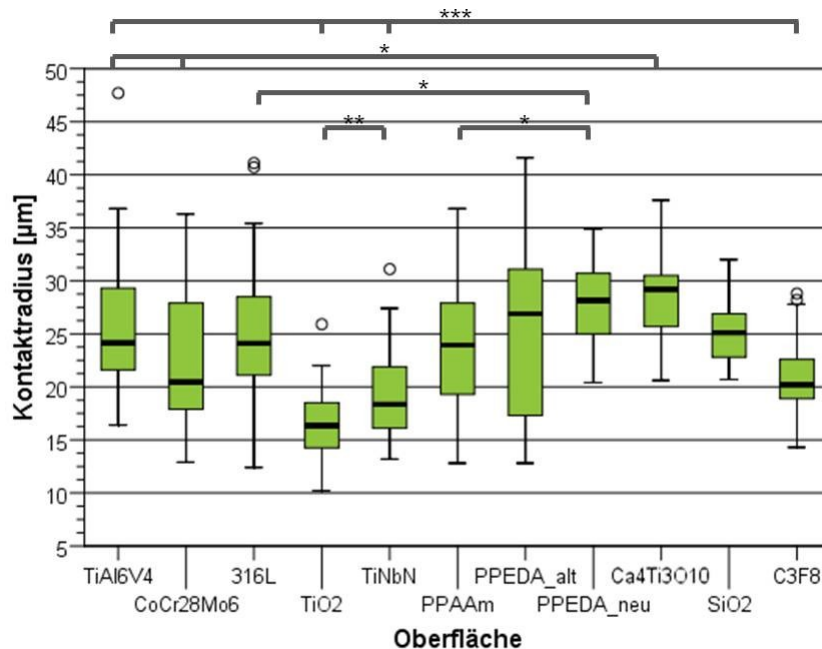


Abb. 26: Kontaktradien von MG-63 Zellen auf unterschiedlichen Implantatoberflächen nach einer Inkubationszeit von 18 h (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n = 30$ ).

Ähnlich wie bei den Adhäsionszeitversuchen aus Abschnitt 4.1.3 entsteht unter der Betrachtung der approximierten Scherkräfte (Abb. 28) eine differenzierte Ergebnislage im Vergleich zu den Scherspannungsbetrachtungen (Abb. 25). Anders als bei der Scherspannungsermittlung ist die berechnete Scherkraft für die TiAl6V4 Oberfläche von  $516 \pm 105$  nN auf dem gleichen Niveau wie die Scherkräfte, die auf den 316L und Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub> Oberflächen ermittelt wurden ( $p = 0,426$  bzw.  $p = 0,824$ ). Zudem ist die Scherkraft auf der CoCr28Mo6 Oberfläche mit  $416 \pm 59$  nN signifikant geringer als die auf TiAl6V4 und 316L ( $p \leq 0,009$ ). Darüber hinaus besteht kein signifikanter Unterschied der Scherkraft auf der TiAl6V4 im Vergleich zum 18 h Versuch aus der Zeitreihe im Abschnitt 4.1.3 ( $p = 0,077$ ). Die größte berechnete Scherkraft von  $668 \pm 104$  nN wurde für die neuere PPEDA Beschichtung bestimmt, die sich analog zur Scherspannungsbetrachtung nicht signifikant von den PPAAm ( $646 \pm 123$  nN) und gealterten PPEDA ( $637 \pm 52$  nN) Beschichtungen unterscheidet ( $p = 0,629$  bzw.  $p = 0,477$ ). Im Vergleich zur TiAl6V4 Oberfläche sind die ermittelten Scherkräfte auf allen plasmapolymersierten Beschichtungen signifikant höher ( $p \leq 0,004$ ). Die höchst signifikant geringste Scherkraft konnte auf der C3F8

Beschichtung mit  $88 \pm 19$  nN verzeichnet werden ( $p \leq 0,001$ ). Eine etwa dreifach höhere Scherkraft von  $261 \pm 29$  nN wurde auf der TiO<sub>2</sub> Oberfläche ermittelt, die sich wie die Scherkraft auf der TiNbN Beschichtung höchst signifikant von der TiAl6V4 Oberfläche unterscheidet ( $p \leq 0,001$ ). Dies steht im Kontrast zu den Scherspannungsbetrachtungen, die keinen statistisch signifikanten Unterschied ergaben.

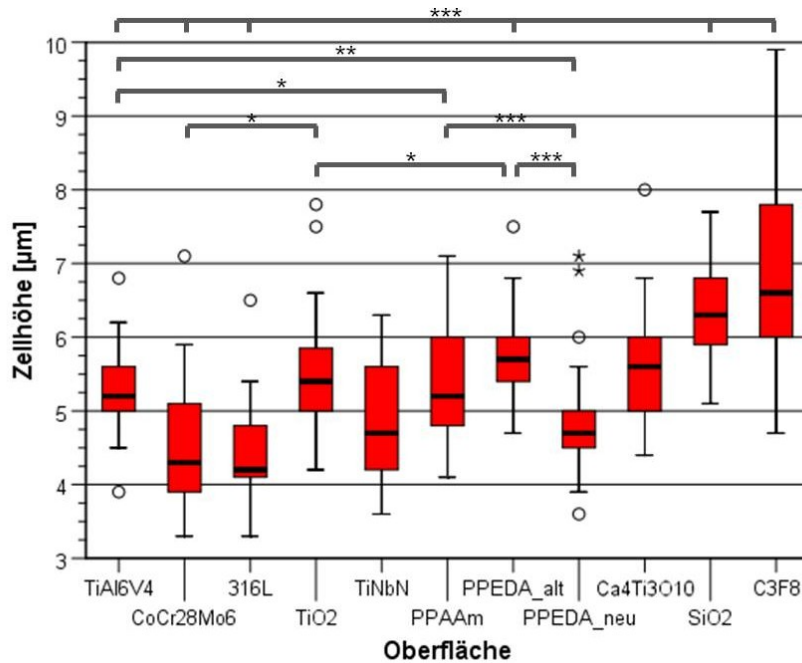


Abb. 27: Zellhöhe von MG-63 Zellen nach 18 h Adhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n = 30$ ).

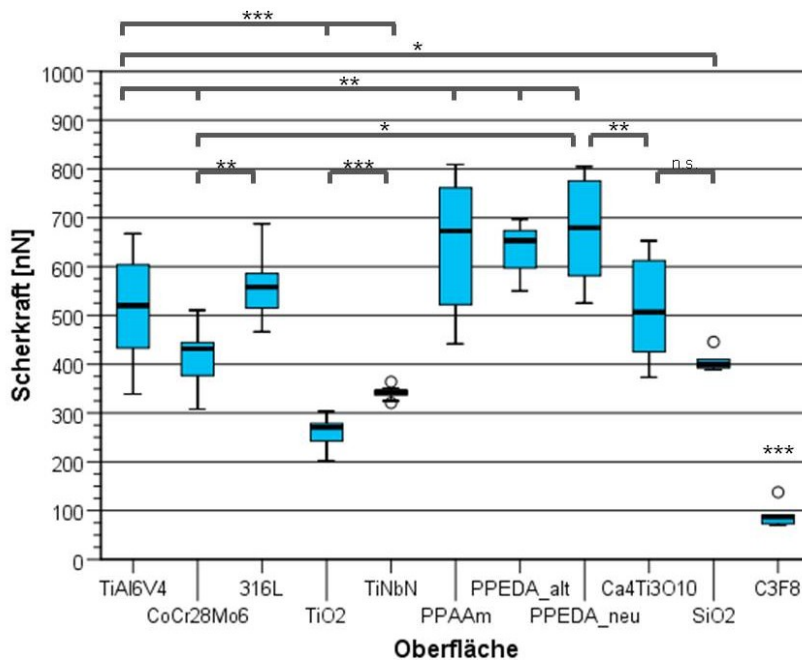


Abb. 28: Ermittelte Scherkräfte für 50 % Zellabriss von MG-63 Zellen auf unterschiedlichen Implantatoberflächen nach 18 h Inkubation (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; n.s. = nicht signifikant;  $6 \leq n \leq 22$ ).

### 4.3 Untersuchung zum Einfluss von FKS auf die MG-63 Zelladhäsion

Zunächst wurden MG-63 Zellen auf den drei polierten Standardimplantatoberflächen (TiAl6V4, CoCr26Mo6 und 316L) für Zeiträume von 18 h und 4 d ohne Zusatz von FKS im Zellkulturmedium ausgesät. In einigen der Versuche wurden bereits auf den kleinsten untersuchten radialen Positionen, mit dem geringsten Abstand zum Scheibenzentrum (Positionen 1 bis 3), teilweise Abrissraten > 50 % erzielt. Somit war eine Untersuchung der Zelladhäsion bei 50 % Zellabriss nicht möglich. Um zumindest eine relative Aussage bezüglich der untersuchten Proben und Zeiträume treffen zu können, wurden die Scherspannungen anstelle der üblichen 50 % für 70 % Zellabriss bestimmt. Die applizierten Drehzahlen variierten teilweise innerhalb einer Gruppe. Für die 18 h Versuche wurden Drehzahlen von  $5500 \text{ min}^{-1}$ ,  $4000 \text{ min}^{-1}$  und  $6500 \text{ min}^{-1}$  für die TiAl6V4, CoCr28Mo6 bzw. 316L Oberflächen verwendet. Für die 4 d Versuche wurden bei der TiAl6V4 Oberfläche Drehzahlen von  $5500 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $6500 \text{ min}^{-1}$ , bei der CoCr26Mo6 Probe  $3700 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $4000 \text{ min}^{-1}$  und bei der 316L Probe  $3200 \text{ min}^{-1}$  bzw.  $3500 \text{ min}^{-1}$  appliziert.

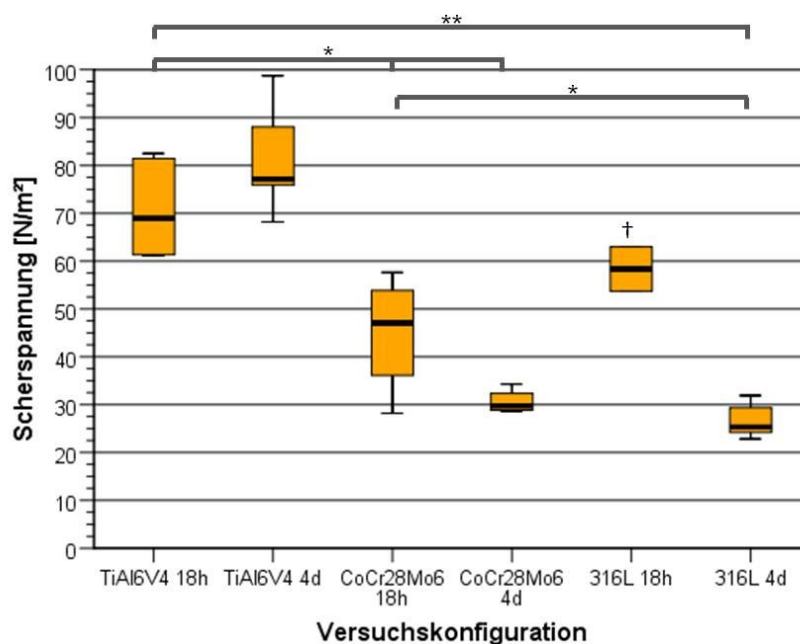


Abb. 29: Applizierte Scherspannung für 70 % Zellabriss von MG-63 Zellen auf diversen Implantatoberflächen nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen ohne FKS (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ;  $4 \leq n \leq 6$ ; † $n = 2$ ).

Abb. 29 zeigt die ermittelten Scherspannungen unter Abstinenz von FKS in diversen Versuchskonfigurationen. Vergleiche zu vorangegangenen Untersuchungen sind nicht möglich, da die Scherspannungen bei einer Abrissrate von 70 % ermittelt werden mussten. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die Inkubationszeit der Zellen (Vergleich zwischen 18 und 4 h) auf den TiAl6V4 und CoCr28Mo6 Oberflächen keinen signifikanten Einfluss auf die

Zelladhäsion hat ( $p = 0,144$  bzw.  $p = 0,248$ ). Auf der 316L halbiert sich in etwa die Scherspannung nach 4 d. Aufgrund der geringen Daten für den 18 h Versuch ist jedoch keine statistische Auswertung möglich. Die Scherspannungen auf der TiAl6V4 Oberfläche sind zu beiden Zeitpunkten (18 h bzw. 4 d) im Vergleich zu den anderen Oberflächen mit  $70,7 \pm 9,5 \text{ N/m}^2$  bzw.  $81,6 \pm 11,9 \text{ N/m}^2$  am höchsten. Zudem konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der CoCr28Mo6 Probe nach 18 h und der nach 4 d festgestellt werden ( $p = 0,248$ ).

Ein weiterer Vorversuch zielte darauf ab, den Einfluss einer Oberflächenmaskierung durch die Adsorption von extrazellulären Matrixproteinen aus dem FKS im Zellkulturmedium näher zu evaluieren. Die entsprechenden Versuchskombinationen wurden bereits in Tab. 3 in Abschnitt 3.2.4 näher erläutert. Die dafür applizierten Drehzahlen lagen zwischen  $5000 \text{ min}^{-1}$  und  $6200 \text{ min}^{-1}$ .

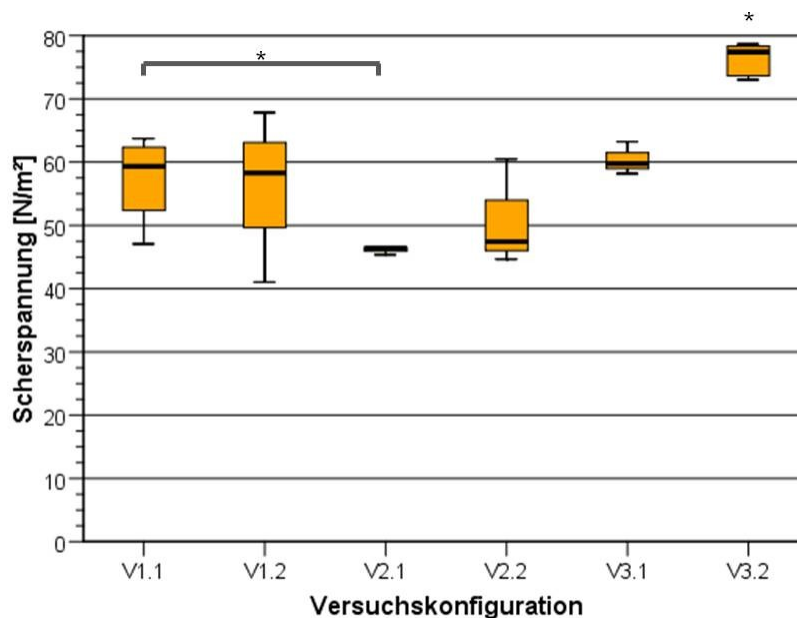


Abb. 30: Applizierte Scherspannung für 50 % Zellabriss von MG-63 Zellen nach 3 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben in unterschiedlichen Versuchskonfigurationen zur Evaluierung des Einflusses von FKS auf die Zelladhäsion (\* $p < 0,05$ ;  $3 \leq n \leq 10$ ).

Die im Vergleich zu allen anderen Konfigurationen signifikant höchste Scherspannung von  $76,2 \pm 2,6 \text{ N/m}^2$  konnte für die Versuchskonfiguration V3.2 ermittelt werden (Abb. 30), bei der MG-63 Zellen ohne FKS Entzug zuvor kultiviert und im Anschluss mit FKS auf einer unkonditionierten Oberfläche ausgesät wurden ( $p \geq 0,014$ ). Das Ergebnis dieser Versuchskonfiguration entspricht dem 3 h Versuch aus der Adhäsionszeitreihe in Abschnitt 4.1.3 und zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied in der applizierten Scherspannung ( $p = 0,064$ ). Der geringste Wert wurde mit  $46,1 \pm 0,7 \text{ N/m}^2$  für die Konfiguration V2.1 ermittelt, der sich jedoch lediglich zu V1.1 geringfügig signifikant

unterscheidet ( $p = 0,034$ ). Der Unterschied zwischen beiden Versuchsreihen liegt darin, dass im Vorfeld bei V2.1 im Gegensatz zu V1.1 den Zellen kein FKS entzogen wurde. Alle weiteren Versuchsreihen befinden sich statistisch auf dem gleichen Niveau und schwanken im Mittel zwischen 50,0 und 60,4 N/m<sup>2</sup>.

#### 4.4 Zelladhäsion von humanen mesenchymaler Stammzellen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen

Die für die Versuche benötigten Drehfrequenzen und die daraus resultierenden mittleren Abrisspositionen sind in Tab. 7 aufgeführt. Da in den ersten Versuchen die Abrissposition für 50 % der Zellen näher am Rand der Scheibe (Position 8) lag als üblich, wurde die Drehzahl innerhalb der Versuche von 7030 min<sup>-1</sup> auf 7300 min<sup>-1</sup> erhöht. Aus den gewonnenen Daten ergeben sich die in Abb. 31 dargestellten Scherspannungen. Die höchste mittlere Scherspannung von 115,5 ± 12,5 N/m<sup>2</sup> wurde nach 3 h mit EM ermittelt, welche sich nicht signifikant von der Scherspannung nach 3 h in ODM unterscheidet ( $p = 0,439$ ). Nach 18 h fällt die applizierte Scherspannung im Erhaltungsmedium analog zu den Zeitreihen mit MG-63 Zellen (siehe Abschnitt 4.1.3) im Mittel signifikant auf 77,8 ± 7,0 N/m<sup>2</sup> ab ( $p = 0,001$ ). Beide Scherspannungsergebnisse in EM liegen zudem hoch signifikant über den Ergebnissen der MG-63 Zellen im gleichen Zeitraum ( $p \leq 0,001$ ). In ODM konnte nur eine geringfügige, nicht signifikante Reduktion der Scherspannung von 111,4 ± 7,6 N/m<sup>2</sup> auf 98,7 ± 17,4 N/m<sup>2</sup> zwischen den 3 und 18 h Versuchen beobachtet werden ( $p = 0,179$ ).

Tab. 7: Drehzahl, radiale Abrissposition, Zellkontaktradius sowie Zellhöhe für hMSC nach 3 bzw. 18 h Zelladhäsion in EM bzw. ODM auf polierten TiAl6V4 Oberflächen.

Versuchsbedingung	Drehfrequenz (f) [min <sup>-1</sup> ] / Rotationsgeschwindigkeit (ω) [s <sup>-1</sup> ]	Mittlere Abrissposition (r) [mm]	Mittlerer Zellkontaktradius (r <sub>c</sub> , n = 30) [μm]	Mittlere Zellhöhe (h, n = 30) [μm]
3h EM	7030 / 736 bzw. 7300 / 764	8,1 ± 0,2 bzw. 6,5 ± 0,7	32,6 ± 6,8	4,8 ± 1,2
18h EM	5000 / 524	8,4 ± 0,8	37,8 ± 6,2	2,7 ± 0,5
3h ODM	7000 / 733	7,3 ± 0,5	30,5 ± 8,0	5,2 ± 2,0
18h ODM	7000 / 733	6,5 ± 1,1	37,3 ± 5,1	3,4 ± 0,4

Zur Berechnung der wirkenden Scherkräfte muss zunächst erneut die Zellmorphologie betrachtet werden. Im Vergleich zu den MG-63 Zellen sind hMSC in EM deutlich größer in ihrer Zellfläche und geringer in ihrer Zellhöhe ( $p \leq 0,001$ ). Ähnlich dem Trend aus der Zeitreihe in Abschnitt 4.1.3 sind die Zellen sowohl in EM als auch in ODM nach 3 h signifikant höher und weniger stark ausgebreitet als nach 18 h ( $p \leq 0,005$ ). Abb. 32 und Abb. 33 zeigen, dass die Wahl des Zellkulturmediums nach 3 h Inkubationszeit keinen

Einfluss auf Zellkontaktradius oder -höhe ( $p > 0,231$ ) hat. Nach 18 h wurde mit  $3,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$  eine signifikant größere Zellhöhe für Zellen in ODM im Vergleich zu Zellen in EM beobachtet, die im Mittel eine Zellhöhe von  $2,7 \pm 0,5 \mu\text{m}$  aufwiesen ( $p \leq 0,001$ ). Die Zellkontaktradien nach 18 h in ODM oder EM unterscheiden sich hingegen nicht signifikant ( $p = 0,739$ ).

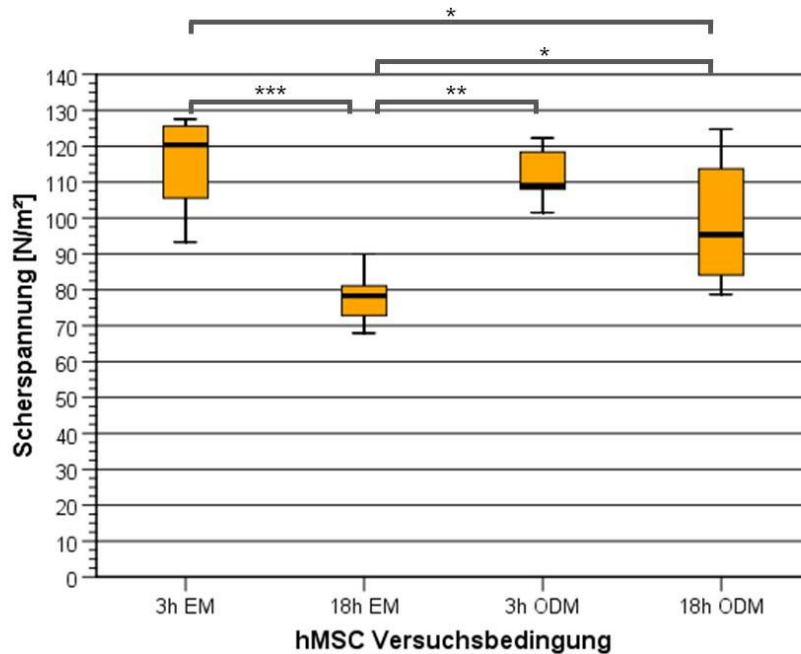


Abb. 31: Applizierte Scherspannung für 50 % Zellabriss von hMSC Zellen nach 3 h bzw. 18 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ,  $p \leq 0,001$ ;  $6 \leq n \leq 8$ ).

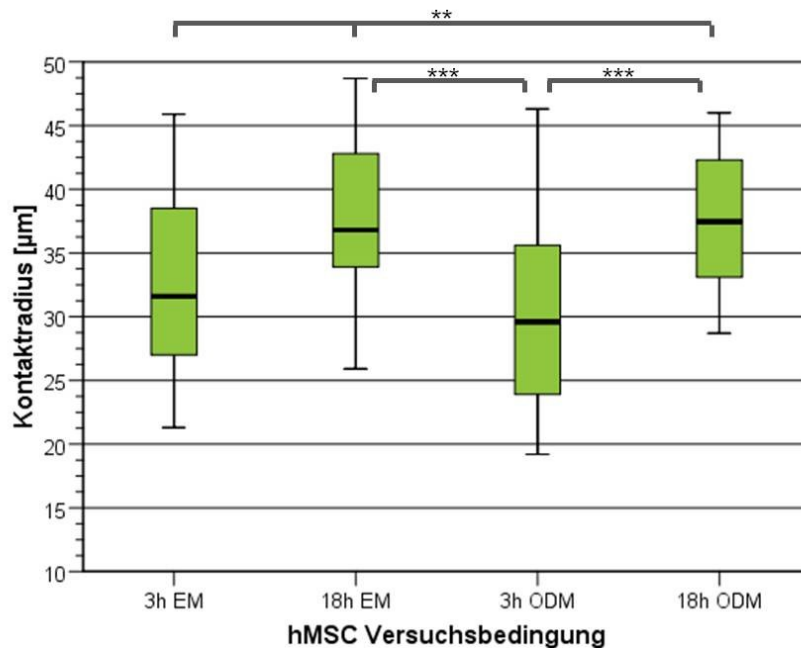


Abb. 32: Zellkontaktradien von hMSC Zellen nach 3 h bzw. 18 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ;  $n = 30$ ).



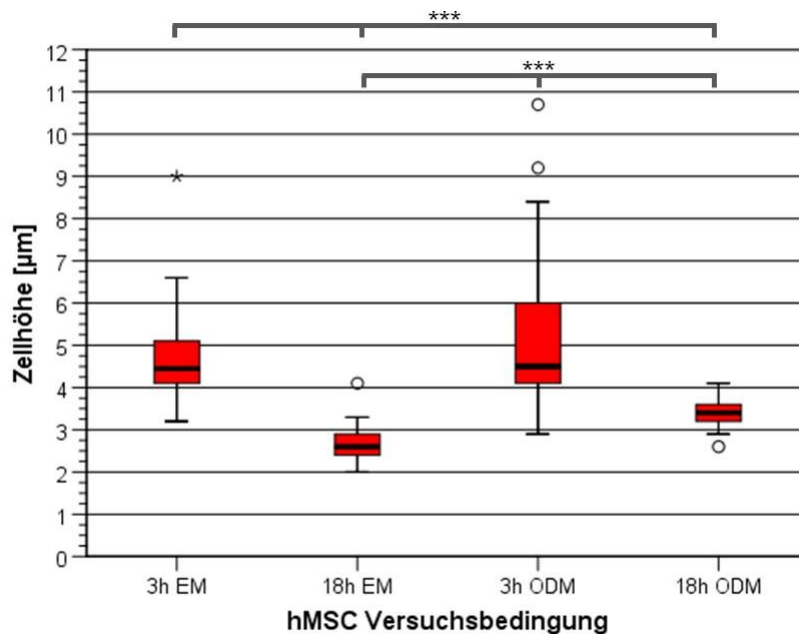


Abb. 33: Stammzellhöhe (hMSC) nach 3 h bzw. 18 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (\*\*\*)  $p \leq 0,001$ ;  $n = 30$ ).

Durch die Einbeziehung der Zellmorphologie in die Zelladhäsionsbetrachtung verschieben sich in der Adhäsionsscherkraftanalyse die Messergebnisse relativ zueinander im Vergleich zur Scherspannungsbetrachtung. Auffällig ist das insgesamt sehr hohe Niveau der Scherkräfte im Vergleich zu den Versuchen der MG-63 Zellen. Nach 3 h Stunden übersteigt die ermittelte Scherkraft der hMSC Zellen in EM das der MG-63 Zellen im Mittel um das nahezu Dreifache ( $p \leq 0,001$ ). Nach 18 h ist die mittlere Scherkraft der hMSC Zellen um das 3,5-fache höher als das der MG-63 Zellen ( $p \leq 0,001$ ).

Die höchste Scherkraft wurde mit  $2006 \pm 353$  nN nach 18 h in ODM ermittelt. Damit liegt dieser Wert leicht signifikant über der Scherkraft des 18 h Versuchs in EM, der geringste Messwert war. Entgegen des Trends aus den MG-63 sowie den hMSC Versuchen in EM ist die Scherkraft nach 18 h in ODM im Mittel leicht erhöht gegenüber dem 3 h Versuch in ODM, jedoch analog zu den Scherspannungsergebnissen ohne eine statistische Signifikanz ( $p = 0,093$ ). In EM hingegen folgen die hMSC Zellen dem Trend aus den Zeitversuchen mit MG-63 Zellen (Abschnitt 4.1.3). Hierbei fällt die Scherkraft im Mittel leicht signifikant von  $1902 \pm 206$  nN auf  $1603 \pm 143$  nN ab ( $p = 0,012$ ). Innerhalb der ersten 3 Stunden konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchen in EM und ODM beobachtet werden ( $p = 0,053$ ) obwohl eine Reduktion der Scherkraft um 243 nN für den Versuch in ODM gegenüber dem in EM ermittelt wurde.

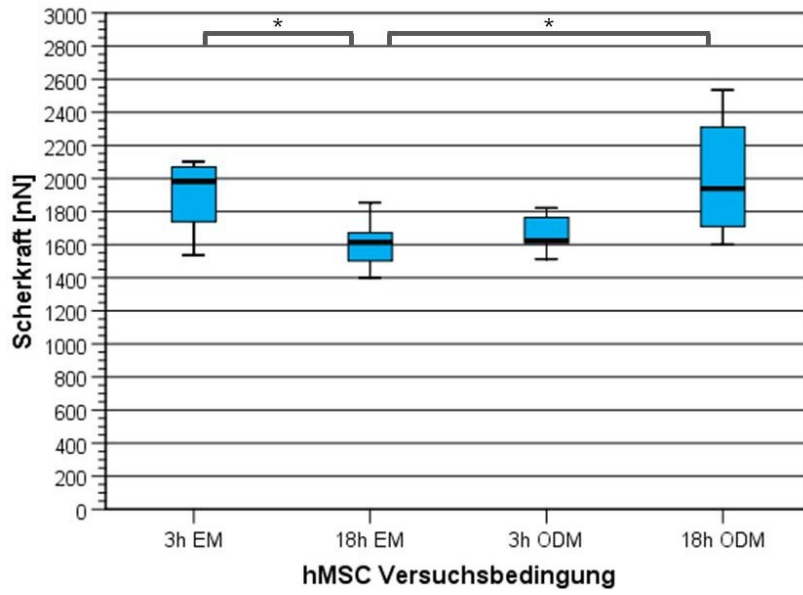


Abb. 34: Scherkraft nach 3 h bzw. 18 h hMSC Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (\*\*\*) $p \leq 0,001$ ;  $6 \leq n \leq 8$ ).

## 5 Diskussion

Um die Grundlagenforschung an modifizierten bzw. funktionalisierten Implantatoberflächen voranzutreiben, wurde ein Messstand zur Ermittlung der Zelladhäsion auf Implantatoberflächen entwickelt. Mittels lasermarkierten scheibenförmigen Proben und einer Adhäsionsmesszelle in Kombination mit einem konfokalen Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop konnte ein Messverfahren aufgebaut werden, mit dessen Hilfe Scherspannungen ermittelt werden, die zum Abriss unterschiedlicher Zelltypen auf überwiegend glatten Implantatoberflächen führen. Zudem wurde eine Approximation der wirkenden Scherkräfte eingeführt, um den oft vernachlässigten Einfluss der Zellmorphologie zu berücksichtigen. Die in dieser Arbeit erzielten Versuchsergebnisse zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit, auch über längere Zeiträume. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass unabhängig voneinander durchgeführte Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Proben nach 3 h bzw. 18 h Inkubation keinen signifikanten Unterschied in den Ergebnissen aufweisen (vgl.  $81,6 \pm 5,3 \text{ N/m}^2$  zu  $76,2 \pm 2,7 \text{ N/m}^2$  bzw.  $459 \pm 89 \text{ nN}$  zu  $516 \pm 105 \text{ nN}$ ). Der Messstand zeichnet sich darüber hinaus durch flexible und vielfältige Anwendungsmöglichkeiten aus. So konnten unterschiedliche Zelltypen, Oberflächenmodifikationen und Inkubationszeiträume erfolgreich untersucht werden. Allerdings sind *in-vitro* Untersuchungen mit längeren Inkubationszeiträumen Grenzen gesetzt und unter normalen Bedingungen kaum länger als 48 h möglich. Die *in-vitro* Inkubationszeit ist im Vergleich zum Verbleib von Implantaten über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Jahren sehr gering. Dennoch können die Ergebnisse aussagekräftig sein, da sich der Prozess der Zelladhäsion auch *in-vivo* innerhalb weniger Stunden ereignet. Ferner konnte die Auswirkung einer Konditionierung der Oberflächen sowie der Einfluss des Inkubationsmediums auf die Zelladhäsion in ersten Versuchen betrachtet werden.

Ein großer Vorteil dieser Versuchsanordnung ist die Möglichkeit, Zellen auf lichtundurchlässigen Proben, vorzugsweise Implantatmaterialien, im vitalen Zustand zu untersuchen. Durch die Verwendung des LSM und der vorgestellten Versuchsmethodik ist es nicht notwendig, Zellen vor dem Auszählen zu fixieren, wie es beispielsweise bei García *et al.* [82] der Fall ist. Zudem kann mit Unterstützung des bildgebenden Verfahrens die exakte Zellzahl vor und nach der Rotation bestimmt werden. Zukünftig könnte die Färbung der Zellkerne anstelle der Zellmembranen die Auswertung erleichtern und insbesondere bei dichter Besiedelung ein geringeres Fehlerpotential des Zellauswertungsprogramms bewirken. Arbeitsgruppen, die mit einem Spinning-Disk-Verfahren arbeiteten, müssen die Zellpopulation in der Mitte der Kreisscheibe analysieren, um auf die Verteilung an den unterschiedlichen radialen Positionen zu schließen [77, 93, 105]. Diese Methodik kann

jedoch fehlerbehaftet sein, da die Annahme einer gleichmäßigen Zellverteilung auf der Oberfläche nicht immer exakt ist.

Eine weitere Optimierung der Messmethode stellt die Einführung der Scherkraftbetrachtung dar, die eine genauere Analyse des Adhäsionsverhaltens auf den Oberflächen ermöglicht. Allerdings handelt es sich lediglich um eine Approximation der Scherkräfte, die sehr zeitintensive Messungen der Zellkontaktradien und -höhen nach sich ziehen. Für die Berechnung wurden die Zellen als ideale Kugelabschnitte mit einer kreisrunden Kontaktfläche vereinfacht betrachtet. Knochenzellen besitzen jedoch eine unregelmäßige Form, die im Querschnitt eher dem Querschnitt eines „Spiegeleis“ als eines Kugelabschnitts gleicht. Dies könnte zu einem fehlerbehafteten absoluten Scherkraftergebnis führen, dessen Wert nicht dem realen Wert entspricht. Durch die experimentelle Bestimmung der Zellkontaktradien und Zellhöhen an den untersuchten Zelltypen, Zeiträumen oder Oberflächen bleiben hingegen die relativen Fehler klein und erlauben somit eine verbesserte Adhäsionsbetrachtung im Vergleich zur alleinigen Scherspannungsbetrachtung.

### *Einfluss der Rotationszeit*

Zunächst mussten grundlegende Parameter für die Versuchsdurchführung festgelegt werden. Um den Stress der Zellen möglichst gering zu halten, wurden die Versuche, ähnlich denen von Deligianni *et al.* [38], in Zellkulturmedium durchgeführt. Allerdings musste auf den Zusatz von FKS verzichtet werden, da das Aufschäumen des Mediums durch das FKS während der Rotation die Ergebnisse hätte beeinflussen können. Horbett *et al.* [80] verwendeten eine Pufferlösung über einen Rotationszeitraum von 20 min. Der Einsatz einer Pufferlösung, insbesondere über einen längeren Zeitraum, könnte sich jedoch stark auf die Zellen bzw. deren Adhäsionsverhalten auswirken. Zudem zeigen die Vorversuche zum Einfluss der Rotationszeit auf die Zelladhäsion, dass bereits Scherspannungseinwirkungen länger als 3 min einen erhöhten Zellabriss zur Folge haben können. Demnach würden bei gleicher applizierter Scherspannung mit steigender Einwirkzeit (Rotationszeit) zunehmend mehr Zellen abreißen. Dies führt wiederum zu einem geringeren Zelladhäsionsergebnis. Die Versuchsmethoden von Schnittler *et al.* [77], Hoepken *et al.* [79] und Deligianni *et al.* [38] belegen ebenfalls eine zunehmende Zellabrissrate bei gleichbleibender Scherspannung unter dem Einfluss der Zeit. Jedoch kann damit die Zelladhäsion nicht quantitativ bestimmt werden, da die Zellen ab einem gewissen Schwellwert mit genügend lang andauernder Scherspannungsapplikation früher oder später immer von der Oberfläche gelöst werden können. Dennoch werden in der Literatur Rotationszeiten bis zu 30 min und länger beschrieben [79-81, 83]. Es ist daher wichtig, Rotationszeiten zur quantitativen Ermittlung der Adhäsion möglichst kurz zu halten und bei Ergebnisvergleichen zu berücksichtigen. Da die Versuche zum Einfluss der Rotationszeit bei gleicher Scherspannung eine erhöhte

Zellabscherung bei Rotationsdauern größer 3 min zeigten, wurde die Rotationsdauer auf 3 min für alle Versuchsreihen dieser Arbeit beschränkt und als feste Einstellgröße bei der Versuchsdurchführung definiert.

### *Einfluss der Zellpassage*

Weiterhin erschweren unterschiedliche Zelltypen, Zellpassagen, Inkubationszeiträume sowie Substrate einen direkten Vergleich mit ähnlich aufgebauten Versuchsreihen. In der Literatur wurden Versuche mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) [77, 79, 83, 106], Mausfibroblasten (3T3) [75, 80, 94, 95], Rattenosteosarkomzellen (ROS) [82, 105], Fibrosarkomzellen (HT1080) [93], Knochenmarkzellen [38], einer Leukämie-Zelllinie [92] oder Endothelzellen der Aorta [81] beschrieben. Adhäsionsversuche mit humanen Knochenzellen oder Knochenzelllinien sind aus der Literatur nicht bekannt. Da der Fokus der vorliegenden Untersuchungen auf im Knochenkontakt einzusetzenden Oberflächen lag, wurden die Versuche überwiegend mit der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Osteosarkom-Zelllinie MG-63 durchgeführt.

MG-63 Zellen werden im Allgemeinen aus ökonomischen Gründen häufig passagiert, bevor sie ihre endgültige Verwendung finden. Die Ergebnisse zum Einfluss der Zellpassage zeigen zum Teil erhebliche Schwankungen im Adhäsionsverhalten der MG-63 Zellen, wobei kein eindeutiger Trend identifiziert werden konnte. Eine Betrachtung der Scherkräfte durch Ermittlung der Zellmorphologie könnte die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit möglicherweise etwas relativieren. Jedoch sind die Scherspannungsversuche sehr zeitaufwendig, sodass eine zusätzliche Berücksichtigung der Zellmorphologie und somit der Scherkraft aus Zeitgründen leider nicht realisiert werden konnte. Untersuchungen von Radomsiki *et al.* [107] mit unterschiedlichen Zellpassagen wiesen hingegen keine Zellverhaltensänderungen in der initialen Adhäsionsphase innerhalb der ersten 24 h auf. Pratt *et al.* [81] adressierten einen möglichen Einfluss der Zellpassage auf die Adhäsionsergebnisse und beschränkten die Verwendung der Aortenendothelzellen auf unter 25 Passagen, nachdem auffiel, dass ältere Passagen schlechtere Adhäsionseigenschaften besaßen.

Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der MG-63 Zellversuche zu gewährleisten, wurde daher die 96. Passage als die zulässig zu verwendende Zellpassage definiert. Hallab *et al.* [108] gaben an, mit Fibroblastengenerationen der 5. bis 10. Passage zu arbeiten. Zumeist finden die verwendeten Zellpassagen jedoch keine Erwähnung. Einige Arbeitsgruppen die mit frischen HUVEC oder Knochenmarkzellen arbeiteten, beschrieben den Einsatz von Zellen, die bis zu 4-mal passagiert wurden [38, 79, 106]. Zudem sind keine Veröffentlichungen bekannt, die einen Zusammenhang zwischen der Zellpassage und dem Adhäsionsverhalten herstellen.

### *Einfluss der Inkubationszeit*

Der Einfluss des Inkubationszeitraums auf die Zelladhäsion hingegen wurde häufiger betrachtet. Analog zu den Versuchen von Pratt *et al.* [81], Engler *et al.* [93] und Gallant *et al.* [94] wurde zunächst ein Anstieg der applizierten Scherspannungen innerhalb der ersten 6 h verzeichnet. Die dabei ermittelten Scherspannungen entsprechen in der Größenordnung in etwa denen von Engler *et al.* [93] und Gallant *et al.* [94], die jedoch ihre Versuchsreihen bereits nach 10 bzw. 16 h abbrachen. Pratt *et al.* [81] untersuchten lediglich den Zeitraum in den ersten 30 min. Ein Vergleich der Ergebnisse ist durch die Verwendung einer statischen Scherspannung von maximal  $9 \text{ N/m}^2$  über einen Zeitraum von 30 min nicht möglich.

Im Unterschied zu den in der Literatur durchgeführten Versuchen konnte bei den vorliegenden Untersuchungen mit MG-63 Zellen ein Abfall der Scherspannungen nach 12 h ermittelt werden, bevor die Scherspannungen in dem Zeitraum von 24 h auf 48 h wieder stiegen. Darüber hinaus wurde durch die Betrachtung der Zellmorphologie die Scherkraftberechnung im Anschluss an die unterschiedlichen Inkubationszeiträume eingeführt. Der generelle Trend der beiden Betrachtungsweisen blieb gleich, wobei sich im Detail Differenzen in der Zelladhäsion nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen herausstellten. Daraus folgt, dass die reine Betrachtung der Scherspannung nicht immer mit der Scherkraft korreliert und somit zu Fehlinterpretationen führen kann. Daher sollte die Zellmorphologie mit berücksichtigt werden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten. Der Vergleich zwischen den Ergebnissen der 1 und 12 h Versuche verdeutlicht diesen Aspekt sehr anschaulich. Während bei der Scherspannungsanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Werten ermittelt wurde, zeigte die Scherkraftanalyse eine fast doppelt so hohe Scherkraft nach 12 h im Vergleich zu der Scherkraft nach 1 h.

Die ermittelten Daten in den Zeitreihenversuchen unterstreichen das unregelmäßige Adhäsionsverhalten der MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen mit fortschreitender Inkubationszeit. Die Zelladhäsion durchläuft an einer Substratoberfläche verschiedene Bindungsphasen [35, 39]. In der initialen Adhäsionsphase sind überwiegend physikochemische Verbindungen wie ionische und van der Waals Kräfte für den ersten Materialkontakt verantwortlich. Anschließend regulieren unterschiedliche biologische Moleküle, wie z.B. EZM-Proteine, Zellmembran oder Zytoskelettproteine, das physiologische Verhalten der Zellen in Abhängigkeit von den Substrateigenschaften [35]. Während der aktiven Adhäsionsphase bilden die Zellen Kontakte mit dem Substrat, formieren durch Rezeptoren hervorgerufene Bindungen und beginnen sich auszubreiten. Über diesen Prozess wurde ein stetiger Anstieg der Zelladhäsion bis zu einem stationären Maximum ähnlich denen von Engler *et al.* [93] und Gallant *et al.* [94] beschriebenen

Untersuchungsergebnissen erwartet. Unterstützt wurde diese Erwartung durch die gleichbleibende Zellmorphologie (Zellkontaktradius und Zellhöhe) nach 12 h Inkubation. Allerdings konnte nach einem Anstieg der Zelladhäsion innerhalb der ersten 6 h ein deutlicher Einbruch der Scherkraft nach 12 h Inkubation festgestellt werden. Die Ergebnisse der Zeitreihenversuche deuten darauf hin, dass die Zellinteraktion mit dem Substrat einen dynamischen Prozess darstellt, der Änderungen in der Zelladhäsion einschließt [109]. Diese Änderungen könnten für das funktionelle Verhalten von Zellen, wie der Zellausbreitung (Spreading) oder Zellmigration, von großer Bedeutung sein. Mitose-Prozesse, bei denen die Zellen sich abrunden und um der drohenden Apoptose zu begegnen in dieser Zeit vermutlich eine erhöhte Zelladhäsion aufweisen, könnten ebenfalls zu diesem zeitlich veränderten und begrenzten Adhäsionsverhalten führen. Unterschiede in der Zelladhäsion könnten infolge einer Affinitätsänderung gegenüber Integrinbindungen auftreten [44, 96, 110]. Modifikationen in der Konformation der EZM-Proteine, wie beispielsweise via Fibronectin, steuern die Affinität der Integrinrezeptoren und können somit die ermittelten Scherkräfte mitbestimmen [35, 111, 112].

### *Zelladhäsionsuntersuchungen an unterschiedlichen Implantatoberflächen*

Neben dem zeitlichen Einfluss belegen die Untersuchungen an verschiedenen Implantatoberflächen, dass sich auch das Substrat auf die Zelladhäsion auswirken kann. Für die Versuche wurde eine Inkubationszeit der Zellen auf den Oberflächen von 18 h gewählt. In der Literatur wurden meist deutlich kürzere Inkubationszeiträume verwendet, wobei sich am häufigsten für 15 min [81, 82, 92, 105] oder bis zu 3 h [75, 80, 93] entschieden wurde. Es gibt jedoch auch Arbeitsgruppen, die einen längeren Inkubationszeitraum wählten [38, 77, 83, 94, 106]. Je nach Fragestellung kann es sinnvoll sein, unterschiedliche Inkubationszeiträume zu betrachten. Zellen können ihre eigene EZM bilden. Soll der Einfluss unterschiedlicher Proteine auf die initiale Zelladhäsion untersucht werden, ist ein kurzer Inkubationszeitraum ideal, da kein Einfluss der zelleigenen EZM zu erwarten ist. Im Hinblick auf Implantate, die mehrere Monate oder Jahre im Körper verbleiben, sind hingegen längere Zeiträume bei der Betrachtung der Zelladhäsion von größerem Interesse. Darüber hinaus geht aus den vorangegangenen Zeitreihenversuchen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen hervor, dass sich die Zellen in dem Zeitraum um 18 h in einer stabilen Phase bezüglich der Zelladhäsion befinden. Eine Inkubationszeit von 18 h ist logistisch gut zu handhaben und ermöglicht eine effiziente Versuchsdurchführung, insbesondere bei mehreren aufeinanderfolgenden Versuchen. Daher wurden 18 Stunden als Standardinkubationszeit für die Testmethode definiert.

Im Folgenden werden zunächst die ermittelten Scherkräfte anstelle der Scherspannungen diskutiert, da die oberflächenspezifische Zellmorphologie auf den verschiedenen

Implantatoberflächen das Ergebnis analog zu den Adhäsionszeitversuchen teilweise signifikant beeinflusste. Auf den unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen schwankte die mittlere Scherkraft von  $88 \pm 19$  nN auf der C3F8 Beschichtung bis zu einem maximalen Mittelwert von  $668 \pm 104$  nN auf der neueren PPEDA Beschichtung. Das ausgesprochen niedrige Scherkraftergebnis auf der C3F8 Beschichtung ist durch die hohe Hydrophobie der Oberfläche mit einem Wasserkontaktwinkel von  $110^\circ$  zu begründen. Die C3F8 Beschichtung diente der Negativkontrolle, um zeigen zu können, dass offensichtlich ungeeignete Oberflächenbedingungen zu einem niedrigen Adhäsionsergebnis führen. Als Referenzoberflächen dienten die polierten TiAl6V4 ( $516 \pm 105$  nN) und 316L ( $555 \pm 55$  nN) Oberflächen, welche die häufigsten Implantatmaterialien in direktem Knochenkontakt darstellen. Für eine temporäre Anwendung werden häufig polierte TiAl6V4 oder 316L Implantate eingesetzt. Jedoch wurden Komplikationen durch knöchernen Integration bei Entfernung der temporären Implantate beschrieben [113]. Um das Anwachsen von Knochen zu verringern, werden beispielsweise intramedulläre Implantatnägel anodisch oxidiert (TiO<sub>2</sub>). Die Analyse der TiO<sub>2</sub> Oberfläche zeigt *in-vitro* eine deutliche Reduktion der Zelladhäsion nach 18 h trotz erheblich höherer Oberflächenrauheit. Ein Einwachsen der Endoprothese kann durch die Oberflächenmodifikation höchstwahrscheinlich nicht verhindert werden, jedoch unterstützen die erhobenen Daten, dass diese Anwendung eine Entfernung des Implantats erleichtern könnte. Demnach wäre auch TiNbN als mögliche alternative Beschichtung zur erleichterten Entfernung temporärer Implantate denkbar, auch wenn im Vergleich zur TiO<sub>2</sub> Modifikation eine etwas erhöhte Scherkraft ermittelt wurde. Bislang wird diese Beschichtung als anti-allergische bzw. verschleißreduzierende Oberflächenmodifikation eingesetzt [32]. CoCr28Mo6 wird seltener im direkten Knochenkontakt eingesetzt und zeigte den Referenzoberflächen gegenüber eine geringere Scherkraft. Auffällig hohe Scherkräfte konnten auf den hydrophilen plasmapolymersierten Beschichtungen beobachtet werden, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen PPAAm und PPEDA zu verzeichnen war. In tierexperimentellen Untersuchungen mit Sprague-Dawley Ratten konnten Gabler *et al.* [114] einen erhöhten Knochen-Implantat-Kontakt gegenüber TiAl6V4 Proben für die PPAAm und PPEDA Beschichtungen feststellen. Dabei stellte sich der Knochen-Implantat-Kontakt nach 6 Wochen für PPEDA als signifikant höher heraus als der an TiAl6V4. Die *in-vitro* Ergebnisse folgen demnach den Ergebnissen der *in-vivo* Studie. Auch eine Alterung der PPEDA Beschichtung von einem Jahr bewirkte keine Adhäsionsänderung und weist somit auf eine stabile Lagerfähigkeit der Beschichtung hin. Die Ergebnisse legen daher nahe, dass sich ein Einsatz der plasmapolymersierten Beschichtungen auf Implantatoberflächen auch im Menschen positiv auf die knöchernen Integration auswirken könnte.



Da in der Literatur nur selten Adhäsionskräfte, stattdessen aber Scherspannungen aufgeführt werden, unterstützt die Betrachtung der Scherspannung eine bessere Einordnung der Ergebnisse auf den unterschiedlichen Oberflächen. Wie bereits erwähnt, erschweren die Versuchsbedingungen einen direkten Vergleich der Untersuchungsergebnisse. Zudem sind keine Analysen auf Implantatmaterialien aus der Literatur bekannt. Am häufigsten wurden Objektträgergläser eingesetzt, die in ihren Oberflächeneigenschaften manipuliert oder mit spezifischen EZM-Proteinen, wie Fibronectin oder Laminin, beschichtet wurden [75, 78, 82, 84, 92-94, 105, 106]. Einige Forschungsgruppen haben auch das Adhäsionsverhalten auf unterschiedlichen Polymeren und Copolymeren, die ebenfalls auf einem Glasobjektträger aufgebracht wurden, beobachtet [79-81]. Die erhobenen Scherspannungen stimmen in der Größenordnung mit denen in der Literatur beschriebenen (ca. 20 – 140 N/m<sup>2</sup>) überein [93, 94, 115]. Die dargestellten Scherspannungsergebnisse von Garcia *et al.* [38, 82, 92, 105] liegen hingegen in etwa eine Zehnerpotenz unter den ermittelten Werten der vorliegenden Arbeit (im Maximum 3,9 – 6,5 N/m<sup>2</sup>). Dies lässt sich jedoch durch die sehr kurze Inkubationszeit von nur 15 min und die verhältnismäßig lange Rotationszeit von 10 min erklären. Ähnliches gilt für die Versuche von Pratt *et al.* [81].

Neben der PPAAM Beschichtung nimmt auch die Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub> Beschichtung eine besondere Stellung in den Oberflächenuntersuchungen ein, da diese ebenfalls tierexperimentell untersucht wurde [116]. Dadurch lässt sich eine weitere direkte Beziehung der *in-vitro* Versuche zu den *in-vivo* Untersuchungen herstellen, die den Ergebnissen aus den Adhäsionsversuchen Nachdruck verleihen kann. Im Vergleich zu TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> wurde auf den Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub> kein signifikanter Unterschied in den Adhäsionsscherkräften ermittelt. Dieses Resultat deckt sich mit Tierversuchsuntersuchungen mit weißen Neuseeland Kaninchen, in dessen Anfangsphase nach 4 Wochen kein erhöhtes Einwachsen gegenüber unbeschichteten TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> Proben in Auszugversuchen festgestellt werden konnte [116]. Erst nach 12 Wochen wurde ein signifikant höherer Unterschied gemessen, der jedoch nach 36 Wochen wieder auf das Niveau der TiAl<sub>6</sub>V<sub>4</sub> Proben abfiel. Die Ergebnisse aus den *in-vitro* Adhäsionsmessversuchen könnten demnach valide Rückschlüsse über mögliche kurzzeitige *in-vivo* Ergebnisse liefern, wodurch Tierversuche reduziert werden könnten.

#### *Oberflächencharakterisierung im Kontext zur Zelladhäsion*

Für die Verwendung auf Implantatmaterialien müssen Beschichtungen oder Oberflächenmodifikationen fest mit dem Substrat verbunden sein, um einen möglichen Effekt auch nach dem Einsetzen des Implantats zu gewährleisten. Die Stirnzugfestigkeitsanalyse der unterschiedlich beschichteten Oberflächen ergab, dass die untersuchten Oberflächen den Mindestanforderungen der ASTM 1147 von 22 MPa entsprachen und somit theoretisch für den Einsatz auf Implantaten geeignet sind. Ein Abscheren der

Oberflächenbeschichtungen während der Rotation in den Versuchen ist aufgrund der sehr viel größeren Stirnzugfestigkeit der Schichten gegenüber den applizierten Scherspannungen auszuschließen. Für die C3F8 und Ca4Ti3O10 Oberflächen konnten keine Messdaten erhoben werden.

Die Zelladhäsion kann auch durch die Oberflächenenergien und -rauheiten beeinflusst werden [108]. Daher wurden Wasserkontaktwinkel- und Rauheitsmessungen durchgeführt. Auf den verschiedenen Oberflächen wurden vielfältige Wasserkontaktwinkel, die von sehr hydrophil ( $18^\circ$ ) bis sehr hydrophob reichten ( $110^\circ$ ), festgestellt. Mit Ausnahme der TiO<sub>2</sub> und der SiO<sub>2</sub> Oberflächen, die im Vergleich zu den anderen eine hohe Rauheit aufwiesen, lagen alle anderen Oberflächen bei einem Ra-Wert von ca.  $0,02 \pm 0,01 \mu\text{m}$ . Dies entspricht einem Ra-Wert einer Hochglanzpolitur. Obwohl Arima und Iwata [117] eine eindeutige Abhängigkeit der Zelladhäsion von HUVEC Zellen zur Oberflächenenergie herstellen konnten, ergaben die hier durchgeführten Oberflächenversuche keinen klaren Trend auch auf gleich rauen Oberflächen. Die höhere Rauheit der TiO<sub>2</sub> und SiO<sub>2</sub> Beschichtungen könnte die Zelladhäsion beeinflusst haben. Elter *et al.* [59] konnten in unterschiedlichen Oberflächenbereichen einer Mikrostruktur variierende Zelladhäsionskräfte mittels Einzelzell-AFM bestimmen. Jedoch stellten Hallab *et al.* [108] fest, dass auf hydrophilen Oberflächen (Wasserkontaktwinkel  $< 90^\circ$ ) die Oberflächenrauheit keinen größeren Einfluss auf die Zelladhäsion hat. Daher müssen andere Faktoren, wie beispielsweise die chemische Zusammensetzung der Oberfläche und die damit einhergehende Bildung der EZM, eine entscheidende Rolle spielen.

### *Einfluss des Zellmediums*

Um die Bedeutung der innerhalb weniger Sekunden bildenden Proteinabsorption [11, 42] zu untersuchen, wurden erste Vorversuche auf verschiedenen Oberflächen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten ohne den Zusatz von FKS durchgeführt. Um diesen Effekt zu verstärken, wurden die Zellen zuvor über einen Zeitraum von 24 h ohne FKS inkubiert. Die Untersuchungen ohne FKS stellen den Einfluss der Oberflächenchemie und -energie der Substrate in den Vordergrund. Um adhären zu können, müssen die Zellen ihre eigene EZM synthetisieren. In den Ergebnissen zeigten sich aufgrund der für die Zellen unphysiologischen Bedingungen hohe Streuungen. Durch den Einfluss der unterschiedlichen Materialien erhalten die Zellen verschiedene biochemische Signale, wodurch die Zusammensetzung der synthetisierten EZM reguliert wird. Auf TiAl6V4 ist diese EZM Zusammensetzung im Vergleich zu CoCr28Mo6 und 316L hinsichtlich der Zelladhäsion am vorteilhaftesten. Auf CoCr28Mo6 und 316L scheint die Zelladhäsion vermindert zu sein, was sich nach 4 d Inkubation weiter verdeutlicht. Durch die Unterschiede zu den Versuchen mit FKS-Zusatz (vgl. Oberflächenuntersuchungen nach 18 h) weist diese Versuchsreihe darauf

hin, dass die EZM, die sich aus dem FKS des Zellkulturmediums innerhalb weniger Sekunden auf den Proben bildet, die Oberflächen in Teilen maskiert und somit eine Zelladhäsion auch auf unbeschichteten Oberflächen begünstigen kann. Ähnliche Effekte beobachteten beispielsweise auch Reutelingsperger *et al.* [83], Schneider und Burridge [118], Roehlecke *et al.* [119] oder Geissler *et al.* [120]. Da es sich in vorliegender Arbeit zu dieser Fragestellung bislang lediglich um Vorversuche handelt, sollten weitere Untersuchungen erfolgen, unter anderem unter Beachtung der Zellmorphologie.

Jedoch sollten die Vorversuche klären, inwieweit eine vorhandene EZM aus FKS zugesetztem Medium die Zelladhäsion beeinflusst. Da die Zellen selbst in der Lage sind, eine eigene EZM zu synthetisieren, wurde die Zelladhäsion bereits nach 3 h untersucht, in der Annahme, dass der Einfluss der zelleigenen EZM zu diesem Zeitpunkt noch eine untergeordnete Rolle spielt. Die für diese Inkubationszeit ermittelten Daten führten zu keinen klaren Aussagen hinsichtlich der Zelladhäsion. Außerdem ist die reine Betrachtung der Scherspannungen in diesen Vorversuchsreihen für die Beurteilung des Einflusses einer Maskierung der Oberflächen durch FKS auf die Zelladhäsion nicht hinreichend. Für eine bessere Charakterisierung der Zelladhäsion in den unterschiedlichen Versuchskonfigurationen sollte, wie bereits erwähnt, die Zellmorphologie zur Ermittlung der Scherkräfte einbezogen werden. Zudem könnte der Zeitraum von 3 h bereits zu lang gewählt sein, so dass eine Reduzierung des Betrachtungszeitraums auf beispielsweise 1 h einen verbesserten Einblick gewähren könnte. Zudem würde eine Inkubationszeitreihe mit den unterschiedlichen Versuchskonfigurationen dazu beitragen, den Einfluss einer Oberflächenmaskierung genauer beurteilen zu können. Darüber hinaus sollten die sich formierenden EZM-Schichten auf den Oberflächen näher untersucht werden. Hier könnten AFM-Untersuchungen, wie sie beispielsweise Elter *et al.* [121] durchgeführt haben, wertvolle Informationen liefern.

### *Einfluss von EM und ODM auf hMSC*

Mit dem Adhäsionsmessstand sollten verschiedene Zelltypen hinsichtlich ihres Zelladhäsionsverhaltens analysiert werden. Als Machbarkeitsstudie im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) durchgeführt. Es konnten sowohl hoch signifikant höhere Scherspannungsmesswerte als auch Scherkraftapproximationen der hMSC im Vergleich zu den MG-63 Zellen beobachtet werden. Dies könnte durch die deutlich größeren Zelladhäsionsflächen der hMSC im Vergleich zu den MG-63 begründet sein. Dieser Größenunterschied konnte durch die Erhebung der Zellmorphologie bestätigt werden. Bei der Scherkraftapproximation wurde die Annahme einer konstanten Anzahl von Fokalkontakten pro Flächeneinheit getroffen [71]. Demnach würden hMSC, aufgrund der erhöhten Kontaktfläche mit dem Substrat (größerer

Zellkontaktradius), insgesamt auch mehr Fokalkontaktbindungen mit der Oberfläche eingehen. In der Summe steigt somit die Zelladhäsion mit zunehmender Kontaktfläche. Die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen unterstützen die Annahme, dass ein Ergebnisvergleich mit der Literatur unter Verwendung unterschiedlicher Zelltypen erschwert wird. Allerdings wurden in den Arbeiten von García *et al.*, in denen ebenfalls unterschiedliche Zelltypen (Rattenosteosarkomzellen [82] und eine Leukämie-Zelllinie [92]) zum Einsatz kamen, keine nennenswerten Adhäsionsunterschiede in der initialen Adhäsionsphase von 15 min festgestellt.

In EM verhalten sich hMSC ähnlich wie die MG-63 Zellen. Nach einer stärkeren Adhäsionsphase folgt eine Phase geringerer Zelladhäsionskräfte. In ODM konnte dieser Trend nicht festgestellt werden. Immerhin führt die Inkubation der hMSC in ODM nach 18 h zu einer leichten Adhäsionssteigerung im Vergleich zu den Versuchen in EM bei gleicher Inkubationsdauer. ODM enthält die Zusätze Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerophosphat, die eine Differenzierung der hMSC induzieren können [122]. In einer Untersuchung verschiedene Differenzierungsmarker nach unterschiedlichen Zeiträumen in ODM mit hMSC konnten Ilmer *et al.* [122] erst nach 4 Tagen einen ersten signifikanten Anstieg spezifischer Marker gegenüber Versuchen nach einem Tag im Vergleich zu EM feststellen. Es ist daher unwahrscheinlich, wenn auch nicht gänzlich auszuschließen, dass der ermittelte Unterschied in der Zelladhäsion nach 18 h auf eine induzierte Differenzierung bzw. hervorgerufene Veränderungen zellphysiologischer Prozesse zurückzuführen ist. Möglicherweise könnten die Zusätze im ODM eine Ladungsänderung oder Änderung der Proteinkonformation auf der Oberfläche hervorrufen, die sich auf die Zelladhäsion auswirkt. Für eine detailliertere Aussage zum Einfluss von ODM auf die Adhäsionskraft der Stammzellen sollten weitere Untersuchungen hinsichtlich des Inkubationszeitraums und Differenzierungsgrades der hMSC in ODM, sowie beispielsweise Zetapotentialmessungen oder Untersuchungen der EZM auf den Oberflächen erfolgen.

### *Ausblick*

In den durchgeführten Untersuchungen wurden mehrere Aspekte der Zelladhäsion von Knochenzellen auf Implantatoberflächen beleuchtet. Neben der Vertiefung von Versuchsreihen mit MG-63 Zellen und hMSC sollten zukünftig auch primäre Osteoblasten für Untersuchungen im Hinblick auf die klinische Anwendung der funktionalisierten Implantate eingesetzt werden. Mehrere der untersuchten Oberflächen haben durch das Glattpolieren einen Modellcharakter, da *in-vivo* deutlich rauere Oberflächen im direkten Knochenkontakt zum Einsatz kommen. Bei den Messungen mit dem Adhäsionsmessstand wurde bislang auf raue Oberflächen bewusst verzichtet, um die Einflussparameter möglichst gering zu halten und die Messmethodik zu etablieren. Die zukünftige Untersuchung rauere Oberflächen wird

eine Ermittlung des Einflusses der Topographie auf die Zelladhäsion ermöglichen. Deligianni *et al.* [38] haben bereits Hydroxylapatit-Proben bis zu einer Rauheit von  $R_a = 0,43 \mu\text{m}$  in einem Spinning-Disk-System verwendet. Mit den untersuchten  $\text{TiO}_2$  und  $\text{SiO}_2$  Proben wurden bereits in der vorliegenden Arbeit ebenfalls höhere Rauheiten betrachtet.

Des Weiteren könnte der Adhäsionsmessstand für die Entwicklung neuer bioaktiver oder antimikrobieller Oberflächen wertvolle Daten über das Verhalten der Zelladhäsion liefern. In diesem Zusammenhang könnten z.B. die Auswirkungen unterschiedlicher Kupferionenkonzentrationen auf die Zelladhäsion von hMSC untersucht werden. Auch der Einfluss anderer Metallionen, wie z.B. Silberionen, könnte analysiert werden. Ferner würden weitere *in-vivo* Untersuchungen bereits getesteter oder zukünftig zu analysierender Oberflächenbeschichtungen zur Validierung der *in-vitro* Messergebnisse beitragen. Darüber hinaus könnten Grundlagenuntersuchungen zum besseren Verständnis der Zelladhäsionsmechanismen und deren Steuerung, beispielsweise durch das Blockieren spezifischer Integrine oder Matrixproteine (z.B. Fibronectin oder Laminin), beitragen.

## 6 Zusammenfassung

In Deutschland werden pro Jahr etwa 210.000 Hüft- und 175.000 Knieendoprothesen eingesetzt. Dabei werden heute Implantatstandzeiten von über 90 % innerhalb der ersten 10 Jahre erreicht. Die häufigste Komplikation bzw. Ursache für den Implantatwechsel beruht auf einer aseptischen Implantatlockerung. Für erhöhte Standzeiten von Endoprothesen ist eine optimale Sekundärstabilität durch ossäre Integration der Implantate entscheidend. Dies erfolgt bei ausreichender Primärstabilität durch das Ansiedeln von Knochenzellen auf der Implantatoberfläche. Derzeit wird viel Forschungsarbeit unternommen, um die Standzeiten von Endoprothesen über eine Modifikation bzw. Funktionalisierung der Implantatoberfläche erhöhen zu können. Um Ansiedeln von Knochenzellen auf der Implantatoberflächen beurteilen zu können, sollte in dieser Arbeit ein Messverfahren neu entwickelt werden, mit dessen Hilfe *in-vitro* der Einfluss funktionalisierter Oberflächen bzw. Beschichtungen auf das Anwachsverhalten von Knochenzellen quantitativ analysiert werden kann.

Zur Analyse vitaler Knochenzellen auf lichtundurchlässigen Proben wurde ein Adhäsionsmessstand nach dem Spinning-Disk-Prinzip konzipiert und mit einem konfokalen Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop gekoppelt. Für die Untersuchungen wurden humane Zellen (MG-63 und hMSC) verwendet, mittels PKH26-GL fluoreszenzmarkiert und auf lasermarkierten radialen Positionen der kreisförmigen Proben ausgesät. Je nach Versuchskonfiguration wurden die Proben für einen bestimmten Inkubationszeitraum bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM mit 10 % FKS inkubiert. Zur Ermittlung der Zelladhäsion wurden die Proben in den Adhäsionsmessstand überführt und 3 min lang einer konstanten Winkelgeschwindigkeit in einem FKS-freien DMEM ausgesetzt. Durch die Bestimmung der radialen Position bei 50 % Zellabriss, konnte die resultierende Scherspannung als ein Maß für die Zelladhäsion ermittelt werden. Zudem wurde in einigen Versuchsreihen die Zellmorphologie berücksichtigt, so dass eine Adhäsionskraftapproximation durchgeführt werden konnte.

Für die Untersuchungen wurden eine Osteosarkom-Zelllinie (MG-63) und mesenchymale Stammzellen (hMSC) verwendet. Mit Hilfe der MG-63 Zelllinie wurden zunächst grundlegende zelladhäsionsbeeinflussende Parameter wie Zellpassage (zwischen Passage 96 und 150) nach 18 h Inkubation und der Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiträume zwischen 3 und 48 h auf polierten TiAl6V4 Proben analysiert. Im Anschluss folgten Zelladhäsionsuntersuchungen auf unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen (PPAAm, PPEDA, TiNbN, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub>, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>) im Vergleich zu Standardoberflächen von Implantatmaterialien (TiAl6V4, CoCr28Mo6 und 316L). Der Einfluss von Erhaltungsmedium (EM) und osteogenen Differenzierungsmedium (ODM) wurde mit hMSC auf polierten

## Zusammenfassung

TiAl6V4 Oberflächen durchgeführt. Dabei wurden die Scherspannungen sowie die Scherkräfte nach je 3 und 18 h in EM und ODM ermittelt.

Die Untersuchungen zum Einfluss der Zellpassage ergaben zum Teil erhebliche, signifikante Unterschiede in den ermittelten Scherspannungen, die zwischen  $61,3 \pm 8,9 \text{ N/m}^2$  in der 103. und  $20,6 \pm 3,4 \text{ N/m}^2$  in der 144. Passage schwankten. Die Analyse der Inkubationszeiträume ergab einen deutlichen Anstieg der Scherspannungen und -kräfte innerhalb der ersten 3 h. Die Maximalwerte wurden nach 6 h mit  $82,4 \pm 5,9 \text{ N/m}^2$  bzw.  $664 \pm 48 \text{ nN}$  ermittelt, die sich jedoch nicht signifikant von den 3 h Versuchen unterschieden. Nach 12 h zeigte die Messreihe eine signifikante Reduktion der Zelladhäsion, wobei die Scherspannung mit  $43,8 \pm 5,1 \text{ N/m}^2$  auf das Niveau nach 1 h Inkubation fiel. Die Reduktion der Scherkräfte auf  $411 \pm 47 \text{ nN}$  nach 12 h überstiegen hingegen die ermittelte Scherkraft des 1 h Versuchs um etwa das zweifache. In den nachfolgenden Zeiträumen konnte ein leichter Abfall der Zelladhäsion nach 24 h verzeichnet werden.

Die Auswertung der unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen zeigten die höchsten Scherspannungen und -kräfte auf den plasmapolymersierten Oberflächen. Dabei wurde die höchste Scherspannung mit  $62,8 \pm 12,0 \text{ N/m}^2$  auf der PPAAm und die höchste Scherkraft mit  $668 \pm 104 \text{ nN}$  auf der nicht gealterten PPEDA Beschichtung verzeichnet. Diese unterschieden sich signifikant zu der Standardimplantatoberfläche TiAl6V4, die im Mittel  $44,2 \pm 9,0 \text{ N/m}^2$  bzw.  $516 \pm 105 \text{ nN}$  aufwies. Die Scherkraft für die unbehandelte TiAl6V4 Oberfläche lag auf dem gleichen Niveau wie für die 316L und Ca4Ti3O10 Oberflächen, war jedoch signifikant höher als für die CoCr28Mo6 Oberfläche. Es konnten signifikant geringere Scherkräfte für die TiO<sub>2</sub> und TiNbN Beschichtungen im Vergleich zu TiAl6V4 ermittelt werden. Die anti-adhäsive C3F8 Oberfläche zeigte mit  $9,3 \pm 2,1 \text{ N/m}^2$  bzw.  $88 \pm 19 \text{ nN}$  die signifikant niedrigste Scherspannung sowie Scherkraft.

Stammzellen wiesen im Vergleich zu MG-63 Zellen signifikant höhere Werte zu allen analysierten Zeitpunkten auf. Dabei verhielten sich hMSC in EM analog zu MG-63 Zellen in DMEM, wobei sich die Scherkraft signifikant von  $1902 \pm 206 \text{ nN}$  nach 3 h auf  $1603 \pm 143 \text{ nN}$  nach 18 h verringerte. Im Vergleich zwischen EM und ODM konnte lediglich nach 18 h eine schwach signifikante Zunahme der Scherkraft in ODM auf  $2006 \pm 353 \text{ nN}$  beobachtet werden.

Der Adhäsionsmessstand ermöglicht eine quantitative Untersuchung der Zelladhäsion auf Implantatoberflächen. Dabei wurden stark streuende Scherspannungen mit zunehmender Zellpassage beobachtet, die zu einer Fokussierung auf die 96. Zellpassage als geeignete Passage für die Adhäsionsversuche führte. Die beobachtete Abhängigkeit der Zelladhäsion mit zunehmender Inkubationszeit deutet auf dynamische Interaktionsprozesse der Zellen mit dem Substrat hin, die von großer Bedeutung für die Zellausbreitung, Zellmigration oder Mitose sein können. Zudem konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die reine

## Zusammenfassung

Betrachtung der Scherspannung ohne Einbezug der Zellmorphologie, wie es meist in der Fachliteratur der Fall ist, zu Fehlinterpretationen führen kann. Des Weiteren zeigten die Versuche, dass aufgrund der unterschiedlichen Einflussgrößen ein direkter Vergleich von Messdaten zur Zelladhäsion anderer Arbeitsgruppen und methodischer Aufbauten nur schwierig herzustellen ist.

Die Untersuchungen mit den unterschiedlichen Oberflächen zeigten erhöhte Zelladhäsionen auf den plasmapolymersierten Beschichtungen (PPAAm, PPEDA) gegenüber den Standardimplantatmaterialien (TiAl6V4, 316L), was sich positiv auf das Einwachsverhalten von Implantaten auswirken könnte. Die *in-vitro* Ergebnisse aus den TiAl6V4, PPAAm, PPEDA und Ca4Ti3O10 Versuchen decken sich weitestgehend mit tierexperimentellen Untersuchungen. Die geringere Zelladhäsion auf TiO<sub>2</sub>, TiNbN und Fluorkohlenstoff C3F8 Oberflächen lässt ein reduziertes Einwachsverhalten und somit eine erleichterte Explantation von temporären Implantaten aus dem Knochenlager erwarten.

Die Versuche mit Stammzellen in EM zeigten ein ähnliches zeitliches Adhäsionsverhalten auf TiAl6V4 Oberfläche wie die Versuche mit MG-63 Zellen, jedoch ergaben sich deutlich höhere Scherspannungen und Scherkräfte. Dies ist u.a. durch die Größe der Zellen zu erklären, wodurch mehr Fokalkontakte mit dem Substrat gebildet werden konnten.

Zukünftige Untersuchungen könnten für die Entwicklung neuer bioaktiver oder antimikrobieller Oberflächen wertvolle Daten über das Verhalten der Zelladhäsion liefern. Zudem sollten Versuche zum Verständnis der Zelladhäsionsmechanismen und deren Steuerung, beispielsweise durch das Blockieren spezifischer Integrine oder Matrixproteine (z.B. Fibronectin oder Laminin), durchgeführt werden.



## 7 Abstract

In Germany approximately 210,000 hip and 175,000 knee endoprostheses are implanted every year. Today survival rates of more than 90 % within the first 10 years are achieved. The most common complication or reason for implant revision is due to aseptic implant loosening. To improve survival rates, optimal secondary implant stability, as a result of osseous integration, is essential. A sufficient primary stability provided, the settlement (adhesion) of bone cells on the implant surface can take place resulting in an optimal secondary stability. Nowadays a great deal of research is undertaken to improve survival rates by modifying or functionalizing implant surfaces. In order to evaluate bone cell adhesion on implant material surfaces a new *in-vitro* measuring method was developed to analyse bone cell ongrowth onto functionalized surfaces quantitatively.

For the analysis of vital bone cells on samples impervious to light an adhesion measuring device following the spinning disc principal was build and combined with a laser scanning microscope. Human cells (MG-63 and hMSC) were fluorescently dyed with PKH26-GL and seeded on disc-shaped, along the radius laser marked test samples. Depending on the experimental configuration the test samples were incubated at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> in DMEM with 10 % FCS for a certain time period. For the adhesion assessment the test samples were mounted on the adhesion measuring device and spun at a constant angular velocity in FCS-free DMEM for 3 min. As a measurement for cell adhesion the resulting shear stress was assessed by determining the radial position for 50 % cell detachment. Further, for some experimental series the cell morphology was taken into account in order to conduct an approximation of the shear forces acting on the cells.

An osteosarcoma cell line (MG-63) and human mesenchymal stem cells (hMSC) were deployed in the analyses. To begin with, fundamental adhesion influencing parameters on polished Ti6Al4V samples such as cell passage (between the 96<sup>th</sup> and 150<sup>th</sup> passage) after an incubation period of 18 h as well as the influence of different incubation time periods between 3 and 48 h were assessed using the MG-63 cell line. Subsequently, bone cell adhesion was determined for different surface modifications (PPAAm, PPEDA, TiNbN, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub> and C3F8) in comparison to standard implant materials (Ti6Al4V, Co<sub>28</sub>Cr<sub>6</sub>Mo and 316L). The influence of expansion and osteogenic medium (EM and OM, respectively) was investigated on polished Ti6Al4V test samples using hMSC. Shear stress and shear force was determined for EM and OM after incubation time periods of 3 h and 18 h.

The studies concerning the cell passage revealed to some extend significant differences regarding the shear stress needed for cell detachment, which varied between  $61.3 \pm 8.9 \text{ N/m}^2$  and  $20.6 \pm 3.4 \text{ N/m}^2$  for the 103<sup>rd</sup> and 144<sup>th</sup> cell passages, respectively. The

## Abstract

incubation time period analyses showed a considerable increase in shear stress and force within the first 3 hours. A maximum of  $82.4 \pm 5.9 \text{ N/m}^2$  and  $664 \pm 48 \text{ nN}$ , respectively, was determined after 6 h incubation, however, with no statistical significance compared to the 3 h incubation period. After 12 h a significant reduction in cell adhesion was assessed, whereby the shear stress decreased to  $43.8 \pm 5.1 \text{ N/m}^2$ , the level of the 1 h value. However, the reduction in shear force to  $411 \pm 47 \text{ nN}$  after 12 h was almost twice the shear force after 1 h. Up to 24 h incubation, the following time periods showed further reduction in cell adhesion.

The analyses of different surface modifications exhibited the highest shear stresses and forces needed to detach cells from the substrate on plasma polymerised surface coatings. The highest shear stress was obtained on PPAAm measuring  $62.8 \pm 12.0 \text{ N/m}^2$ , whereas the highest shear force of  $668 \pm 104 \text{ nN}$  was determined on the non-aged PPEDA surface. Both showed significant differences to the polished standard implant surface Ti6Al4V, which averaged  $44.2 \pm 9.0 \text{ N/m}^2$  or  $516 \pm 105 \text{ nN}$ . The determined shear stress for cell detachment on the Ti6Al4V surface was similar to the 316L and Ca4Ti3O10 surfaces but significantly higher compared to the Co28Cr6Mo surface. Further, significantly reduced shear forces were obtained for TiO<sub>2</sub> and TiNbN coatings in comparison with Ti6Al4V. The anti-adhesive C3F8 surface coating showed the significantly lowest determined shear stress and force of  $9.3 \pm 2.1 \text{ N/m}^2$  and  $88 \pm 19 \text{ nN}$ , respectively.

In comparison to MG-63 cells stem cells exhibited significantly higher shear stresses and forces on polished Ti6Al4V for all analysed incubation time periods. Thereby, a similar behaviour of hMSC in EM compared to MG-63 cells in DMEM was assessed. A significant reduction in shear force from  $1902 \pm 206 \text{ nN}$  after 3 h to  $1603 \pm 143 \text{ nN}$  after 18 h was determined. Comparing EM and OM, only a small significant increase in shear force to  $2006 \pm 353 \text{ nN}$  after 18 h in OM was observed.

The adhesion measuring device allows quantitative analyses of cell adhesion on implant surfaces. Measurements showed strongly diverging shear stress with increasing cell passages, which led to the 96<sup>th</sup> passage of MG-63 cells as a suitable cell passage for cell adhesion analyses. The observed dependence of cell adhesion with regard to increasing incubation time periods point to dynamic cell-substrate interaction processes which may be of great importance to cell proliferation, migration or mitosis. Furthermore, the incubation time period analyses showed that the examination of shear stress alone without taking the cell morphology into consideration can lead to false conclusions. In addition, a direct comparison of the data to other workgroups can be very difficult due to the different influencing factors and methodological setups.

The study of different surfaces revealed increased cell adhesion on plasma polymerised coatings (PPAAm, PPEDA) compared to standard implant materials (Ti6Al4V, 316L), which may affect bony ongrowth positively. *In-vitro* results of Ti6Al4V, PPAAm, PPEDA and

## Abstract

Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub> surfaces correlate with animal studies. The decreased cell adhesion on TiO<sub>2</sub>, TiNbN and C3F8 surfaces point to reduced bony ongrowth which may lead to easier explantation of temporary implants.

Examinations of stem cells in EM showed similar cell adhesion behaviour to MG-63 cells with regard to incubation time on polished Ti6Al4V surfaces. However, significantly higher shear stresses and forces were obtained which can be explained by the larger size of the hMSC compared to the MG-63 cells, whereby more focal adhesions are formed with the substrate.

Future investigations could provide valuable data of cell adhesion behavior for the development of new bioactive or anti-microbial surfaces. Moreover, further studies to gain a detailed understanding of cell adhesion mechanisms and regulations should be conducted, e.g., by blocking specific integrins or ECM proteins such as fibronectin or laminin.

## 8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Abbildungen

Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer korundgestrahlten Probenoberfläche aus einer Titanlegierung (TiAl6V4). .....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der initialen Knochenzellbesiedelung auf einer Implantatoberfläche (nach [11]). .....	5
Abb. 3: Schematische Darstellung unterschiedlicher Messverfahren zur Bestimmung der Zelladhäsion; a) Waschen, b) Zentrifugieren, c) Mikropipettieren, d) Rasterkraftmikroskopieren, e) Strömung zwischen zwei parallelen Platten und f) radiale Strömung zwischen parallelen Kreisscheiben [16]. .....	8
Abb. 4: Schematische Darstellung des Spinning-Disk-Prinzips zur quantitativen Bestimmung der Zelladhäsionskräfte [16]. .....	10
Abb. 5: Geschwindigkeitskomponenten der Strömung um eine Kreisscheibe, die in einem ruhenden Medium mit konstanter Winkelgeschwindigkeit $\omega$ um die z-Achse rotiert [87]. .....	11
Abb. 6: Verlauf der Geschwindigkeitskomponenten einer Flüssigkeitsströmung in Abhängigkeit vom Wandabstand $\zeta$ zur Scheibenoberfläche an einer mit konstanter Winkelgeschwindigkeit rotierenden Kreisscheibe in einem ruhenden Medium [87]. .....	13
Abb. 7: Schematischer Aufbau des Messstandes mit integriertem Glasboden für Adhäsionsmessungen in Verbindung mit einem LSM. Darstellung in rotierender Position, alle Abmessungen in mm. ....	18
Abb. 8: 3D-CAD Darstellung des Adhäsionsmessstandes für den Einsatz in Verbindung mit einem inversen, konfokalen Fluoreszenzmikroskop (LSM 410). .....	19
Abb. 9: LSM-Arbeitsplatz mit Adhäsionsmessstand auf dem x-y-Tisch in Mikroskopierstellung (Zeiss, Oberkochen, Deutschland). .....	20
Abb. 10: TiAl6V4-Probe mit 20 diametralen lasermarkierten Positionen zur eindeutigen Positionsbestimmung der Zellen (links); schematische Darstellung der Lasermarkierungen (rechts). .....	21
Abb. 11: Reflektionsbild einer zentralen Kreuzmarkierung auf einer CoCr28Mo6-Probe vor Rotation (oben links); Darstellung der zentralen Kreuzmarkierung zur Ausrichtung der Probe vor und nach der Rotation im RGB-Modus nach exakter Überlagerung (unten links); Graustufenbild von fluoreszenzmarkierten MG-63 Zellen auf der vierten radialen Position vom Proben-Zentrum vor der Adhäsionsmessung (oben rechts); Darstellung von fluoreszenzmarkierten MG-63 Zellen auf der vierten radialen Position vom Proben-Zentrum vor (rot) und nach der Rotation (gelb) im RGB-Modus. Die rot dargestellten	

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Zellen dokumentieren den Zellabriss vom Substrat nach Rotation, grüne Zellen, die in ihrer Position verschoben wurden (unten rechts).....	23
Abb. 12: Graustufen-Darstellung der radialen Zellverteilung von Knochenzellen auf TiAl6V4-Ronden vor und nach der Rotation unter Angabe der entsprechenden Position der radialen Lasermarkierung und des dazugehörigen radialen Abstandes in mm vom Probenzentrum zu den Zentren der einzelnen lasermarkierten Positionen. ....	24
Abb. 13: Dateinamen-Kodierung für die Verwendung des Analysetools zur besseren Zuordnung der Ergebnisse in der Ausgabedatei. Im Beispiel wird ein zweiter TiAl6V4-Probekörper auf der fünften Position der lasermarkierten Seite mit ungerader Beschriftung nach einer applizierten Drehzahl von $4000 \text{ min}^{-1}$ kodiert (Bilder vor der Rotation enden mit der radialen Position). ....	26
Abb. 14: Mittlerer prozentualer Zellabriss (durchgezogene Kurve) über vier radiale Positionen auf einer polierten TiAl6V4 Probe nach Rotation ( $\omega = 492 \text{ s}^{-1}$ ). Der durchschnittliche radiale Abstand vom Zentrum der Ronde wird durch Interpolation der Kurve bei 50 % Zellabriss ermittelt (senkrecht gestrichelte Linie). ....	27
Abb. 15: Idealisierte Zellform (Kugelkappe) zur Approximierung der Zelladhäsionskräfte mit Darstellung der Zellkontaktfläche $A_c$ sowie des Zellkontaktradius $r_c$ (oben) und experimentelle Ermittlung der Zellhöhe $h$ einer MG-63 Zelle auf TiAl6V4 nach 18 h Inkubationszeit mittels x-z-Schnitt durch konfokale Mikroskopie (unten).....	29
Abb. 16: Ausgebreitete MG-63 Zellen auf polierter TiAl6V4-Oberfläche bei 1000-facher Vergrößerung im REM.....	30
Abb. 17: Kontaktwinkelbestimmung eines ruhenden Wassertropfens auf einer Oberfläche nach der Sessile-Drop-Methode. ....	36
Abb. 18: Definition der Rauheitskenngrößen $R_a$ und $R_z$ nach ISO 4287 [100]. ....	36
Abb. 19: Stirnabzugversuch nach DIN EN 528: a) Geometrie der Stirnabzugprobekörper [101], b) Klemmvorrichtung, c) Einspannung in Universalprüfmaschine. ....	37
Abb. 20: Zeitlicher Einfluss der Scherspannung auf das Adhäsionsverhalten von MG-63 Zellen. Dargestellt wird der mittlere prozentuale Zellabriss bei konstanter Drehfrequenz von $4000 \text{ min}^{-1}$ in Abhängigkeit zur radialen Position bei unterschiedlichen Rotationszeiten ( $2 \leq n \leq 4$ ). ....	39
Abb. 21: Scherspannungen in Abhängigkeit zu unterschiedlichen Zellpassagen der Zelllinie MG-63 nach 18 h Inkubationszeit auf polierten TiAl6V4 Proben (* $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p \leq 0,001$ ; $4 \leq n \leq 20$ ). ....	40
Abb. 22: Scherspannungen zu unterschiedlichen Inkubationszeiten von MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Proben (* $p < 0,05$ ; *** $p \leq 0,001$ ; $9 \leq n \leq 19$ ). ....	41
Abb. 23: Scherkräfte von MG-63 Zellen nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen auf polierten TiAl6V4 Proben (* $p < 0,05$ ; *** $p \leq 0,001$ ; $9 \leq n \leq 19$ ). ....	42

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 24: Ergebnisse der Stirnabzugsversuche unterschiedlicher Beschichtungen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen (n = 5). .....	44
Abb. 25: Applizierte Scherspannungen für 50 % Zellabriss von MG-63 Zellen nach 18 h auf unterschiedlichen Implantatoberflächen (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p ≤ 0,001; 6 ≤ n ≤ 22). .....	46
Abb. 26: Kontaktradien von MG-63 Zellen auf unterschiedlichen Implantatoberflächen nach einer Inkubationszeit von 18 h (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p ≤ 0,001; n = 30). .....	47
Abb. 27: Zellhöhe von MG-63 Zellen nach 18 h Adhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p ≤ 0,001; n = 30). .....	48
Abb. 28: Ermittelte Scherkräfte für 50 % Zellabriss von MG-63 Zellen auf unterschiedlichen Implantatoberflächen nach 18 h Inkubation (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p ≤ 0,001; n.s. = nicht signifikant; 6 ≤ n ≤ 22). .....	48
Abb. 29: Applizierte Scherspannung für 70 % Zellabriss von MG-63 Zellen auf diversen Implantatoberflächen nach unterschiedlichen Inkubationszeiträumen ohne FKS (*p < 0,05; **p < 0,01; 4 ≤ n ≤ 6; †n = 2). .....	49
Abb. 30: Applizierte Scherspannung für 50 % Zellabriss von MG-63 Zellen nach 3 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben in unterschiedlichen Versuchskonfigurationen zur Evaluierung des Einflusses von FKS auf die Zelladhäsion (*p < 0,05; 3 ≤ n ≤ 10). ..	50
Abb. 31: Applizierte Scherspannung für 50 % Zellabriss von hMSC Zellen nach 3 h bzw. 18 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (*p < 0,05, **p < 0,01, p ≤ 0,001; 6 ≤ n ≤ 8). .....	52
Abb. 32: Zellkontaktradien von hMSC Zellen nach 3 h bzw. 18 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (**p < 0,01, ***p ≤ 0,001; n = 30). .....	52
Abb. 33: Stammzellhöhe (hMSC) nach 3 h bzw. 18 h Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (***p ≤ 0,001; n = 30). .....	53
Abb. 34: Scherkraft nach 3 h bzw. 18 h hMSC Inkubation auf polierten TiAl6V4-Proben unter dem Einfluss von Erhaltungs- bzw. osteogenem Differenzierungsmedium (***p ≤ 0,001; 6 ≤ n ≤ 8). .....	54

## Tabellen

Tab. 1: Funktionswerte für die Lösung laminarer Strömung in der Grenzschicht einer rotierenden Kreisscheibe direkt auf einer der Oberfläche ( $\zeta=0$ ) und im großen Abstand ( $\zeta=\infty$ ) davon [87, 89]. .....	14
Tab. 2: Analytierte Oberflächenbeschichtungen unter Angabe der Beschichtungstechnologie, Eigenschaften und des Anwendungsbereichs. ....	32

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Tab. 3: Testbezeichnung verschiedener Kulturbedingungen zur Ermittlung des Einflusses von FKS auf die Adhäsion von MG-63 Zellen auf TiAl6V4-Proben nach 3 h Inkubation.	34
Tab. 4: Drehzahl, radiale Abrissposition, Zellkontaktradius sowie Zellhöhe für MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Proben in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (** $p \leq 0,001$ ). ...	41
Tab. 5: Übersicht über die Wasserkontaktwinkel- und Rauheitsmessungen unterschiedlicher Oberflächen (* $p < 0,05$ ). .....	44
Tab. 6: Drehzahl, radiale Abrissposition, Zellkontaktradius sowie Zellhöhe für MG-63 Zellen nach 18 h Zelladhäsion auf unterschiedlichen Implantatoberflächen. ....	45
Tab. 7: Drehzahl, radiale Abrissposition, Zellkontaktradius sowie Zellhöhe für hMSC nach 3 bzw. 18 h Zelladhäsion in EM bzw. ODM auf polierten TiAl6V4 Oberflächen. ....	51

## 9 Abkürzungsverzeichnis

316L	Chirurgischer Edelstahl
$A_c$	Zellkontaktfläche
AFM	Atomic Force Microscope (dt. Rasterkraftmikroskop)
AMZ	Adhäsionsmesszelle
ASTM	American Society for Testing and Materials
C3F8	Fluorkohlenstoff
$Ca^{2+}$	Kalziumion
$Ca_4Ti_3O_{10}$	Kalziumtitanat
CaP	Kalziumphosphat
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
$Co^{2+}$	Kobaltion
CoCr28Mo6	Kobalt-Chrom-Molybdän-Legierung
$Cr^{2+}$	Chromion
csv	Comma separated values (dt. kommaseparierte Werte)
DEMEM	Dulbecco's modified eagle medium (Zellkulturmedium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Erhaltungsmedium
EZM	Extrazelluläre Matrix
$F_D$	Schleppkraft
$F_T$	Approximierte resultierende Zelladhäsionskraft
$F_y$	Normalkraft
FKS	Fetales Kälberserum
h	Zellquerschnittshöhe
HA	Hydroxylapatit
hMSC	Human mesenchymal stem cell (dt. humane mesenchymale Stammzellen)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (dt. humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen)
LSM	Laser scanning microscope (dt. Laser-Raster-Fluoreszenzmikroskop)
MG-63	Osteosarkom Zell-Linie
$Mg^{2+}$	Magnesiumion
$Ni^{2+}$	Nickelion
ODM	Osteogenes Differenzierungsmedium
PBS	Phosphate buffered saline (dt. Phosphat gepufferte Saline)



## Abkürzungsverzeichnis

PEEK	Polyetheretherketon
PFA	Paraformaldehyd
png	Portable network graphics
PPAAm	Plasmapolymerisiertes Allylamin
PPEDA	Plasmapolymerisiertes Ethylendiamin
PTFE	Polytetrafluorethen (Teflon)
PVD	Physical vapour deposition (dt. physikalische Gasphasenabscheidung)
px	Pixel
r	Radiale Zellabrissposition auf der Probe
$r_c$	Zellkontaktradius
Ra	Arithmetische Mittenrauheit
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGB	Rot-Grün-Blau
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROS	Rattenosteosarkomzellen
SCFS	Single cell force spectroscopy (dt. Einzelzellkraftspektroskopie)
SiO <sub>2</sub>	Siliziumoxid (Glas)
TiAl <sub>6</sub> V <sub>4</sub>	Titan-Aluminium-Vanadium-Legierung
TiN	Titannitrid
TiNbN	Titanniobnitrid
TiO <sub>2</sub>	Titanoxid
TPS	Titanium plasma spray
VPS	Vacuum plasma spray
$\eta$	Viskosität des Zellkulturmediums
$\rho$	Dichte des Zellkulturmediums
$T_{res}$	Resultierende Scherspannung
$\omega$	Winkelgeschwindigkeit

## 10 Literaturverzeichnis

- [1] Bitzer EM, Grobe TG, Neusser S, Schneider A, Dörning H, Schwartz FW. BARMER GEK Report Krankenhaus 2010. St. Augustin: Asgard-Verlag; 2010, p. 1-277.
- [2] Malchau H, Herberts P, Eisler T, Garellick G, Soderman P. The Swedish Total Hip Replacement Register. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A Suppl 2:2-20.
- [3] Robertsson O, Knutson K, Lewold S, Lidgren L. The Swedish Knee Arthroplasty Register 1975-1997 - An update with special emphasis on 41,223 knees operated on in 1988-1997. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 2001;72:503-13.
- [4] Zeiler G, Distler A. *Biomaterialien* 2000;1:19-24.
- [5] Schuh A, Thomas P, Holzwarth U, Zeiler G. Bilaterale umschriebene Osteolyse nach zementierter Hüfttotalendoprothesenimplantation. *Der Orthopäde* 2004;33:727-32.
- [6] Holzwarth U, Thomas P, Kachler W, Goske J, Schuh A. Metallurgical differentiation of cobalt-chromium alloys for implants. *Orthopäde* 2005;34:1046-51.
- [7] Schuh A, Thomas P, Kachler W, Goske J, Wagner L, Holzwarth U *et al.* Allergic potential of titanium implants. *Orthopäde* 2005;34:327-3.
- [8] Doehring TC, Rubash HE, Dore DE. Micromotion measurements with hip center and modular neck length alterations. *Clin Orthop Relat Res* 1999:230-9.
- [9] Burke DW, O'Connor DO, Zalenski EB, Jasty M, Harris WH. Micromotion of cemented and uncemented femoral components. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73:33-7.
- [10] Goodman S, Aspenberg P. Effect of amplitude of micromotion on bone ingrowth into titanium chambers implanted in the rabbit tibia. *Biomaterials* 1992;13:944-8.
- [11] Thull R. Surface modifications to improve biocompatibility and mechanical properties of orthopedic implants. *Orthopäde* 2003;32:51-9.
- [12] Widmer KH, Zurfluh B, Morscher EW. Contact surface and pressure load at implant-bone interface in press-fit cups compared to natural hip joints. *Orthopäde* 1997;26:181-9.
- [13] Gristina AG. Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987;237:1588-95.
- [14] Kurtz S, Ong K, Lau E, Mowat F, Halpern M. Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89:780-5.
- [15] Darouiche RO. Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med* 2004;350:1422-9.
- [16] Fritsche A, Luethen F, Nebe B, Rychly J, Lembke U, Zietz C *et al.* Bone Cell Adhesion: An Important Aspect of Cell Biomechanics in the Development of Surface Modifications for Orthopaedic Implants. In: Jerrod H. Levy, editor. *Biomechanics: Principles, Trends and Applications*: Nova Science Publishers, Inc.; 2010.

- [17] Aladjem A. Anodic oxidation of titanium and its alloys. *J Mater Sci* 1973;8:688-704.
- [18] Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Mater Sci Eng: R: Reports* 2004;47:49-121.
- [19] Schwarz MLR, Kowarsch M, Rose S, Becker K, Lenz T, Jani L. Effect of surface roughness, porosity, and a resorbable calcium phosphate coating on osseointegration of titanium in a minipig model. *J Biomed Mater Res Part A* 2009;89A:667-78.
- [20] Wong M, Eulenberger J, Schenk R, Hunziker E. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *J Biomed Mater Res* 1995;29:1567-75.
- [21] Vercaigne S, Wolke JGC, Naert I, Jansen JA. Histomorphometrical and mechanical evaluation of titanium plasma-spray-coated implants placed in the cortical bone of goats. *J Biomed Mater Res* 1998;41:41-8.
- [22] Becker P, Neumann HG, Nebe B, Lüthen F, Rychly J. Cellular investigations on electrochemically deposited calcium phosphate composites. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:437-40.
- [23] Sun L, Berndt CC, Gross KA, Kucuk A. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *J Biomed Mater Res* 2001;58:570-92.
- [24] Yang Y, Kim KH, Ong JL. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process - an alternative to plasma spraying. *Biomaterials* 2005;26:327-37.
- [25] Rauschmann MA, Wichelhaus TA, Stirnal V, Dingeldein E, Zichner L, Schnettler R *et al.* Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials* 2005;26:2677-84.
- [26] Gollwitzer H, Ibrahim K, Meyer H, Mittelmeier W, Busch R, Stemberger A. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:585-91.
- [27] Heidenau F, Mittelmeier W, Detsch R, Haenle M, Stenzel F, Ziegler G *et al.* A novel antibacterial titania coating: metal ion toxicity and *in vitro* surface colonization. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:883-8.
- [28] Schröder K, Finke B, Polak M, Lüthen F, Nebe BJ, Rychly J *et al.* Gas-discharge plasma-assisted functionalization of titanium implant surfaces. *Mat Sci Forum* 2010;638-642:700-5.
- [29] Schierholz JM, Lucas LJ, Rump A, Pulverer G. Efficacy of silver-coated medical devices. *J Hospital Inf* 1998;40:257-62.
- [30] Finke B, Luethen F, Schroeder K, Mueller PD, Bergemann C, Frant M *et al.* The effect of positively charged plasma polymerization on initial osteoblastic focal adhesion on titanium surfaces. *Biomaterials* 2007;28:4521-34.
- [31] Finke B, Hempel F, Testrich H, Artemenko A, Rebl H, Kylián O *et al.* Plasma processes for cell-adhesive titanium surfaces based on nitrogen-containing coatings. *Surf Coat Tech* 2011;205, Supplement 2:S520-S524.

- [32] Serro AP, Completo C, Colaco R, dos Santos F, da Silva CL, Cabral JMS *et al.* A comparative study of titanium nitrides, TiN, TiNbN and TiCN, as coatings for biomedical applications. *Surf Coat Tech* 2009;203:3701-7.
- [33] Nebe B, Finke B, Lüthen F, Bergemann C, Schröder K, Rychly J *et al.* Improved initial osteoblast functions on amino-functionalized titanium surfaces. *Biomol Eng* 2007;24:447-54.
- [34] Lüthen F, Lange R, Becker P, Rychly J, Beck U, Nebe B. The influence of surface roughness of titanium on beta1- and beta3-integrin adhesion and the organization of fibronectin in human osteoblastic cells. *Biomaterials* 2005;26:2423-40.
- [35] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000;21:667-81.
- [36] Garcia AJ, Reyes CD. Bio-adhesive surfaces to promote osteoblast differentiation and bone formation. *J Dent Res* 2005;84:407-13.
- [37] Schwartz Z, Boyan BD. Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface. *J Cell Biochem* 1994;56:340-7.
- [38] Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG, Missirlis YF. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 2001;22:87-96.
- [39] Thull R. Physicochemical principles of tissue material interactions. *Biomol Eng* 2002;19:43-50.
- [40] Kieswetter K, Schwartz Z, Hummert TW, Cochran DL, Simpson J, Dean DD *et al.* Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *J Biomed Mater Res* 1996;32:55-63.
- [41] Anselme K, Linez P, Bigerelle M, Le MD, Le MA, Hardouin P *et al.* The relative influence of the topography and chemistry of TiAl6V4 surfaces on osteoblastic cell behaviour. *Biomaterials* 2000;21:1567-77.
- [42] Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996;17:137-46.
- [43] Cavalcanti-Adam EA, Aydin D, Hirschfeld-Warneken VC, Spatz JP. Cell adhesion and response to synthetic nanopatterned environments by steering receptor clustering and spatial location. *HFSP J* 2008;2:276-85.
- [44] Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987;48:549-54.
- [45] Grzesik WJ, Robey PG. Bone matrix RGD glycoproteins: immunolocalization and interaction with human primary osteoblastic bone cells *in vitro*. *J Bone Miner Res* 1994;9:487-96.
- [46] Garcia AJ, Gallant ND. Stick and grip. *Cell Biochem Biophys* 2003;39:61-73.
- [47] Hynes RO, Lively JC, McCarty JH, Taverna D, Francis SE, Hodivala-Dilke K *et al.* The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:143-53.
- [48] Campbell ID, Humphries MJ. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.

- [49] Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:793-805.
- [50] Zamir E, Geiger B. Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci* 2001;114:3577-9.
- [51] McClay DR, Wessel GM, Marchase RB. Intercellular recognition: quantitation of initial binding events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:4975-9.
- [52] Chu L, Tempelman LA, Miller C, Hammer DA. Centrifugation assay of IgE-mediated cell adhesion to antigen-coated gels. *AIChE Journal* 1994;40:692-703.
- [53] Giacomello E, Neumayer J, Colombatti A, Perris R. Centrifugal assay for fluorescence-based cell adhesion adapted to the analysis of ex vivo cells and capable of determining relative binding strengths. *Biotechniques* 1999;26:758-6.
- [54] Reyes CD, Garcia AJ. A centrifugation cell adhesion assay for high-throughput screening of biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2003;67:328-33.
- [55] Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res Part A* 2003;66A:247-59.
- [56] Thie M, Herter P, Pommerenke H, Durr F, Sieckmann F, Nebe B *et al.* Adhesiveness of the free surface of a human endometrial monolayer for trophoblast as related to actin cytoskeleton. *Mol Hum Reprod* 1997;3:275-83.
- [57] Litvinov RI, Shuman H, Bennett JS, Weisel JW. Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:7426-31.
- [58] McKeever PE. Methods to study pulmonary alveolar macrophage adhesion: micromanipulation and quantitation. *J Reticuloendothelial Soc* 1974;16:313-7.
- [59] Elter P, Weihe T, Lange R, Gimsa J, Beck U. The influence of topographic microstructures on the initial adhesion of L929 fibroblasts studied by single-cell force spectroscopy. *Europ Biophys J* 2011;40:317-27.
- [60] Thie M, Rospel R, Dettmann W, Benoit M, Ludwig M, Gaub HE *et al.* Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces. *Hum Reprod* 1998;13:3211-9.
- [61] Tozeren A, Sung KL, Sung LA, Dustin ML, Chan PY, Springer TA *et al.* Micromanipulation of adhesion of a Jurkat cell to a planar bilayer membrane containing lymphocyte function-associated antigen 3 molecules. *J Cell Biol* 1992;116:997-1006.
- [62] Tozeren A, Sung KL, Chien S. Theoretical and experimental studies on cross-bridge migration during cell disaggregation. *Biophys J* 1989;55:479-87.
- [63] Evans E, Berk D, Leung A. Detachment of agglutinin-bonded red blood cells. I. Forces to rupture molecular-point attachments. *Biophys J* 1991;59:838-48.
- [64] Prectel K, Bausch AR, Marchi-Artzner V, Kantlehner M, Kessler H, Merkel R. Dynamic force spectroscopy to probe adhesion strength of living cells. *Phys Rev Lett* 2002;89:028101.

- [65] Shao JY, Hochmuth RM. Mechanical anchoring strength of L-selectin, beta2 integrins, and CD45 to neutrophil cytoskeleton and membrane. *Biophys J* 1999;77:587-96.
- [66] Benoit M, Gaub HE. Measuring Cell Adhesion Forces with the Atomic Force Microscope at the Molecular Level. *Cells Tissue Organ* 2002;172:174-89.
- [67] Taubenberger A, Cisneros DA, Friedrichs J, Puech PH, Muller DJ, Franz CM. Revealing early steps of alpha2beta1 integrin-mediated adhesion to collagen type I by using single-cell force spectroscopy. *Mol Biol Cell* 2007;18:1634-44.
- [68] Helenius J, Heisenberg CP, Gaub HE, Muller DJ. Single-cell force spectroscopy. *J Cell Sci* 2008;121:1785-91.
- [69] Benoit M, Gabriel D, Gerisch G, Gaub HE. Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol* 2000;2:313-7.
- [70] Yoshikawa HY, Rossetti FF, Kaufmann S, Kaindl T, Madsen J, Engel U *et al.* Quantitative Evaluation of Mechanosensing of Cells on Dynamically Tunable Hydrogels. *J Am Chem Soc* 2011;133:1367-74.
- [71] Hammer DA, Lauffenburger DA. A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys J* 1987;52:475-87.
- [72] Xiao Y, Truskey GA. Effect of receptor-ligand affinity on the strength of endothelial cell adhesion. *Biophys J* 1996;71:2869-84.
- [73] Doroszewski J, Skierski J, Przaadka L. Interaction of neoplastic cells with glass surface under flow conditions. *Exp Cell Res* 1977;104:335-43.
- [74] Lawrence MB, McIntire LV, Eskin SG. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 1987;70:1284-90.
- [75] Truskey GA, Pirone JS. The effect of fluid shear stress upon cell adhesion to fibronectin-treated surfaces. *J Biomed Mater Res* 1990;24:1333-53.
- [76] van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Busscher HJ. Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces. *J Biomed Mater Res* 1992;26:725-38.
- [77] Schnittler HJ, Franke RP, Akbay U, Mrowietz C, Drenckhahn D. Improved *in vitro* rheological system for studying the effect of fluid shear stress on cultured cells. *Am J Physiol* 1993;265:289-98.
- [78] Buschmann MH, Dieterich P, Adams NA, Schnittler HJ. Analysis of flow in a cone-and-plate apparatus with respect to spatial and temporal effects on endothelial cells. *Biotechnol Bioeng* 2005;89:493-502.
- [79] Hoepken S, Fuhrmann R, Jung F, Franke RP. Shear resistance of human umbilical endothelial cells on different materials covered with or without extracellular matrix: controlled *in-vitro* study. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009;43:157-66.
- [80] Horbett TA, Waldburger JJ, Ratner BD, Hoffman AS. Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus. *J Biomed Mater Res* 1988;22:383-404.

- [81] Pratt KJ, Williams SK, Jarrell BE. Enhanced adherence of human adult endothelial cells to plasma discharge modified polyethylene terephthalate. *J Biomed Mater Res* 1989;23:1131-47.
- [82] Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D. Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials. *Biomaterials* 1997;18:1091-8.
- [83] Reutelingsperger CPM, Gool RGJ, Heijnen V, Frederik P, Lindhout T. The rotating disc as a device to study the adhesive properties of endothelial cells under differential shear stresses. *J Mater Sci: Mater Med* 1994;5:361-7.
- [84] Gallant ND, Garcia AJ. Quantitative Analyses of Cell Adhesion Strength. In: Coutts AS, editor. *Adhesion Protein Protocols*: Humana Press; 2007; p. 83-95.
- [85] Piva M, Meiburg E. Steady axisymmetric flow in an open cylindrical container with a partially rotating bottom wall. *Physics of Fluids* 2005;17:063603-12.
- [86] von Karmann T. Über laminare und turbulente Reibung. *ZAMM - Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik* 1921;1:233-52.
- [87] Schlichting H, Gersten K. *Grenzschicht-Theorie*. Berlin: Springer; 1997.
- [88] Cochran WG. The flow due to a rotating disc. *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* 1934;30:365-75.
- [89] Rogers MH, Lance GN. The rotationally symmetric flow of a viscous fluid in the presence of an infinite rotating disk. *J Fluid Mech Digital Archive* 1960;7:617-31.
- [90] Fritsche A, Luethen F, Lembke U, Finke B, Zietz C, Rychly J *et al*. Measuring bone cell adhesion on implant surfaces using a spinning disc device. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2010;41:83-8.
- [91] Rost FWD. *Quantitative fluorescence microscopy*. Cambridge: Cambridge University Press; 1991.
- [92] Garcia AJ, Francois H, Boettiger D. Force Required to Break  $\alpha 5\beta 1$  Integrin-Fibronectin Bonds in Intact Adherent Cells Is Sensitive to Integrin Activation State. *J Biol Chem* 1998;273:10988-93.
- [93] Engler AJ, Chan M, Boettiger D, Schwarzbauer JE. A novel mode of cell detachment from fibrillar fibronectin matrix under shear. *J Cell Sci* 2009;122:1647-53.
- [94] Gallant ND, Michael KE, Garcia AJ. Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol Biol Cell* 2005;16:4329-40.
- [95] Truskey GA, Proulx TL. Relationship between 3T3 cell spreading and the strength of adhesion on glass and silane surfaces. *Biomaterials* 1993;14:243-54.
- [96] Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. Ligand Binding to Integrins. *J Biol Chem* 2000;275:21785-8.
- [97] Zothner A, Moss C, Hopp M, Friedrich R, Hoppe U, Blöcker TO *et al*. Oberflächenkonditionierung von Zirkoniumdioxid zur Verbesserung des Klebverbundes. *Quintessenz Zahntech* 2009;35:874-86.

- [98] Ploska U, Berger G, Willfahrt M. A new procedure of a calcium-containing coating on implants of titanium alloy. *Key Eng Mater* 2004;254-256:411-4.
- [99] Young T. An essay on the cohesion of fluids. *Phil Trans R Soc* 1805;95:65-87.
- [100] ISO 4287. Geometrische Produktspezifikation (GPS) - Oberflächenbeschaffenheit: Tastschnittverfahren - Benennungen, Definitionen und Kenngrößen der Oberflächenbeschaffenheit. 1997.
- [101] DIN EN 582. Ermittlung der Haftzugfestigkeit. 1994.
- [102] Fritsche A, Haenle M, Mittelmeier W, Neumann H-G, Heidenau F, Fulda G *et al.* Methoden zur mechanischen Charakterisierung von modifizierten Implantatoberflächen in der Orthopädischen Chirurgie. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2008;39:659-64.
- [103] Fritsche A, Haenle M, Zietz C, Mittelmeier W, Neumann H-G, Heidenau F *et al.* Mechanical characterization of anti-infectious, anti-allergic, and bioactive coatings on orthopedic implant surfaces. *J Mater Sci* 2009;44:5544-51.
- [104] Ruth M, Peri E, GABRIEL KR. On closed testing procedures with special reference to ordered analysis of variance. *Biometrika* 1976;63:655-60.
- [105] Garcia AJ, Ducheyne P, Boettiger D. Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass. *J Biomed Mater Res* 1998;40:48-56.
- [106] van Kooten TG, Schakenraad JM, van der Mei HC, Dekker A, Kirkpatrick CJ, Busscher HJ. Fluid shear induced endothelial cell detachment from glass--influence of adhesion time and shear stress. *Med Eng Phys* 1994;16:506-12.
- [107] Radomski JS, Jarrell BE, Pratt KJ, Williams SK. Effects of *in vitro* aging on human endothelial cell adherence to dacron vascular graft material. *J Surg Res* 1989;47:173-7.
- [108] Hallab NJ, Bundy KJ, O'Connor K, Moses RL, Jacobs JJ. Evaluation of metallic and polymeric biomaterial surface energy and surface roughness characteristics for directed cell adhesion. *Tissue Eng* 2001;7:55-71.
- [109] Fritsche A, Luethen F, Lembke U, Zietz C, Rychly J, Mittelmeier W *et al.* Time-dependent adhesive interaction of osteoblastic cells with polished titanium alloyed implant surfaces. *J Appl Biomater Funct Mater* 2012:0.
- [110] Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87:1-5.
- [111] Friedland JC, Lee MH, Boettiger D. Mechanically Activated Integrin Switch Controls  $\alpha_5\beta_1$  Function. *Science* 2009;323:642-4.
- [112] Garcia AJ, Boettiger D. Integrin-fibronectin interactions at the cell-material interface: initial integrin binding and signaling. *Biomaterials* 1999;20:2427-33.
- [113] Hayes JS, Vos DI, Hahn J, Pearce SG, Richards RG. An *in vivo* evaluation of surface polishing of TAN intermedullary nails for ease of removal. *ECM* 2009;18:15-26.



- [114] Gabler C, Zietz C, Göhler R, Fritsche A, Lindner T, Haenle M *et al.* Evaluation of Osseointegration of Titanium Alloyed Implants Modified by Plasma Polymerization. *Int J Mol Sci* 2014;15:2454-64.
- [115] Ma G, Cai N, Tan S, Mhaisalkar PS, Chian KS, Chan V *et al.* Adhesion behavior of porcine esophageal fibroblasts on extra-cellular matrix protein-immobilized polylactic acid surface. *J Biomech* 2006;39:226.
- [116] Haenle M, Lindner T, Ellenrieder M, Willfahrt M, Schell H, Mittelmeier W *et al.* Bony integration of titanium implants with a novel bioactive calcium titanate (Ca<sub>4</sub>Ti<sub>3</sub>O<sub>10</sub>) surface treatment in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A* 2012;100:2710-6.
- [117] Arima Y, Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2007;28:3074-82.
- [118] Schneider G, Burrige K. Formation of focal adhesions by osteoblasts adhering to different substrata. *Exp Cell Res* 1994;214:264-9.
- [119] Roehlecke C, Witt M, Kasper M, Schulze E, Wolf C, Hofer A *et al.* Synergistic effect of titanium alloy and collagen type I on cell adhesion, proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs* 2001;168:178-87.
- [120] Geissler U, Hempel U, Wolf C, Scharnweber D, Worch H, Wenzel K. Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2000;51:752-60.
- [121] Elter P, Lange R, Beck U. Atomic force microscopy studies of the influence of convex and concave nanostructures on the adsorption of fibronectin. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;89:139-46.
- [122] Ilmer M, Karow M, Geissler C, Jochum M, Neth P. Human osteoblast-derived factors induce early osteogenic markers in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009;15:2397-409.

## **Selbständigkeitserklärung**

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

Norderstedt, 02. Februar 2015

Dipl.-Ing. Andreas Rathay (geb. Fritsche)

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen oder um eine Zulassung zu solchem beworben habe. Die eingereichte Schrift wurde an keiner anderen Hochschule vorgelegt.

Norderstedt, 02. Februar 2015

Dipl.-Ing. Andreas Rathay (geb. Fritsche)

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Rainer Bader dafür bedanken, dass er mir die Bearbeitung dieses Themas ermöglicht hat. In meiner Zeit am FORBIOMIT hat er mich gezielt gefördert und gefordert. Sein Vertrauen in mich und die Methodik führte zu mehreren Publikationen und die Aufnahme der Zelladhäsionsuntersuchungen in mehreren Forschungsprojekten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Lüthen für seine langjährige Unterstützung bei der Durchführung der Versuchsreihen. Zudem konnte ich sehr von seiner Expertise im Umgang mit dem LSM und den Zellen profitieren, die es uns ermöglichte eine handhabbare Methodik zur Messung der Zelladhäsion zu entwickeln. Zudem war Herr Dr. Lüthen jederzeit bereit alle Ideen, insbesondere nach Rückschlägen, zu unterstützen und begleitete die Erstellung der Dissertation tatkräftig.

Herr Prof. Rychly stellte bereitwillig Ressourcen und das LSM für die Entwicklung und Untersuchungen in seinen Räumlichkeiten zur Verfügung. Er unterstützte die Interpretation der Ergebnisse und investierte Zeit für das Korrekturlesen diverser Veröffentlichungen zum Thema. Dafür möchte mich ausdrücklich bedanken.

Ein weiterer ausdrücklicher Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Lembke der mir insbesondere in der Anfangsphase bei der Machbarkeitsstudie und der Konzeption des Messstandes mit seinem Wissen zur Seite stand.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Harald Körmann und Herrn Falk Tofaute für den fertigungstechnischen Input beim Bau und den Bau des Messstandes bedanken, sowie Herrn Michael Kreutzer für die elektrotechnische Unterstützung bei der Anbindung des Messstandes an die Hard- und Software.

## **Thesen der Dissertation:**

„Entwicklung einer *in-vitro* Messmethode zur quantitativen Bestimmung der Zelladhäsion von Knochenzellen auf Implantatoberflächen“

1. Mit Hilfe des neu konzipierten Adhäsionsmessstandes, basierend auf dem Spinning-Disk-Prinzip und gekoppelt an ein konfokales LSM, können verschiedene Einflussparameter sowie unterschiedliche Zelltypen hinsichtlich der Zelladhäsion auf lichtundurchlässigen Implantatmaterialien analysiert werden.
2. Die Adhäsionsuntersuchungen werden auf lasermarkierten Proben durchgeführt, die eine eindeutige Positionierung und Rückverfolgung der Zellen vor und nach den applizierten Rotationen ermöglichen. Dadurch ist die Scherspannung für den Zellabriss von exakt 50 % der Zellen direkt möglich.
3. Über die Idealisierung der Zelle als Kugelabschnitt mit einer kreisrunden Kontaktfläche zum Substrat und einer konstanten Anzahl an Fokalkontakten kann die Zelladhäsionskraft einer durch ein Medium umströmten Zelle approximiert werden.
4. Die Betrachtung von Scherspannungen kann zu Fehlinterpretationen der Messergebnisse führen. Dem kann durch die Approximation der Scherkräfte unter Einbezug der Zellmorphologie entgegengewirkt werden.
5. Eine Einwirkzeit (Inkubationsdauer) ab 3 min hat einen deutlichen Einfluss auf die untersuchte Scherspannung, wobei mit zunehmender Einwirkzeit eine erhöhte Zelladhäsion ermittelt wird.
6. Mit zunehmender Passage verändert sich das Adhäsionsverhalten von MG-63 Zellen auf polierten TiAl6V4 Oberflächen, wobei keine klare Abhängigkeit zwischen Zellpassage und Zelladhäsion hergestellt werden konnte. Stattdessen unterliegt die Zelladhäsion mit fortlaufender Zellpassage zum Teil erheblichen Schwankungen.
7. Die Zelladhäsion ist ein dynamischer Prozess, der auf polierten TiAl6V4 Oberflächen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zu unterschiedlichen Zelladhäsionskräften führt. So steigt die Zelladhäsion zunächst innerhalb der ersten 12 Stunden an und nimmt nachfolgend signifikant ab, ohne jedoch das Niveau der ersten Stunde zu erreichen.

8. Die Zelladhäsion variiert auf unterschiedlichen, unbeschichteten Implantatoberflächen, wobei im Vergleich zu TiAl6V4 und 316L die Zelladhäsion auf CoCr28Mo6 am geringsten ist.
9. Oberflächenmodifikationen können die Zelladhäsion sowohl positiv als auch negativ im Vergleich zur TiAl6V4 Kontrolle beeinflussen. Dabei erhöhen plasmapolymersierte Beschichtungen die Zelladhäsion, wohingegen anodisierte Titanoxidschichten oder Titaniobernitritbeschichtungen die Zelladhäsion verringern können. Bei einer Kalziumtitanatbeschichtung konnte hingegen kein signifikanter Effekt hinsichtlich der Zelladhäsion nachgewiesen werden.
10. Der Adhäsionsmessstand erlaubt die Untersuchung unterschiedlicher Versuchsparameter. Es kann der Einfluss von fetalem Kälberserum im Zellkulturmedium auf die Zelladhäsion ermittelt werden.
11. Verschiedene Zelltypen weisen unterschiedliche Zelladhäsionskräfte auf. Dabei beeinflusst die Zellkontaktfläche mit dem Substrat die Zelladhäsion maßgeblich. Je größer die Fläche umso stärker die Zelladhäsion.
12. Die Zelladhäsion von hMSC Zellen auf TiAl6V4 in Expansionsmedium ist gegenüber den deutlich kleineren MG-63 Zellen stark erhöht.
13. Die Zusätze in osteogenen Differenzierungsmedium (ODM) können sich auf die Zelladhäsion auswirken. Es ist jedoch innerhalb der kurzen untersuchten Zeitspanne von 3 bzw. 18 h nicht geklärt, inwieweit die Zusätze im ODM bereits einen Einfluss auf die zellmorphologischen Prozesse ausüben und somit eine frühe Zelldifferenzierung stattfindet, oder ob die Präsenz der Zusätze Änderungen an Ladungen oder Proteinkonformationen an der Oberfläche zur Folge haben und somit eine Zelladhäsionsänderung hervorrufen.

## Anhang

### Python Script zur prozentualen Ermittlung abgescherter Zellen

```
import matplotlib.pyplot as plt
import matplotlib.image as mpimg
import time
import csv
import Image

#Benutzer definierte Variablen
threshold = 0.2 #Grauwert
min_size = 15 #Minimale Zellgröße in Pixel

#Feste Variablen
pxlcount = []
objectno = []
procimages = []
transport = ()
pics = []
images = []
tstart=time.time() #Zeiterfassung

#Bestimmung aller zusammenhängender Pixel eines Objektes
#Randerkennung einbezogen
def obj_detect(i,j,threshold,min_size,img,pxlcount,objects):
    append_found=True
    append_check=True
    edge=False
    pxlkoord=[i,j]
    pxl2check=[pxlkoord] #Pixel Koordinate
    pxl_found=[pxlkoord] #Sammlung aller zusammenhängenden Koordinaten
    while len(pxl2check)>0:
        i=pxl2check[0][0]
        j=pxl2check[0][1]
        for n in range (len(pxl_found)):
            #Überprüfung ob Pixel bereits erfasst
            if pxl_found[n][0]==i and pxl_found[n][1]==j:
                append_found=False
            #Wenn noch nicht vorhanden, dann an „pxl_found“ anhängen
        if append_found:
            pxlkoord=[i,j]
            pxl_found.append(pxlkoord)
            append_found=True

        #Eine Zeile Tiefer überprüfen (i+1), aber nur wenn nicht am unteren Rand
        if i != img.shape[0]-1:
            if img[i+1,j,0]==img[i+1,j,1]==img[i+1,j,2]>=threshold:
                #Überprüfen ob Koordinate bereits in „pxl_found“ vorhanden
                for n in range (len(pxl_found)):
                    if pxl_found[n][0]==i+1 and pxl_found[n][1]==j:
                        append_check=False
                #Wenn nicht in „pxl_found“, dann überprüfen ob in „pxl2check“
                if append_check:
                    for n in range (len(pxl2check)):
                        if pxl2check[n][0]==i+1 and pxl2check[n][1]==j:
                            append_check=False
                #Wenn in keiner der beiden Listen, dann an „pxl2check“ anhängen
                if append_check:
                    pxl2check.append([i+1,j])
                    append_check=True

        #Eine Zeile höher überprüfen (i-1), aber nur wenn nicht am oberen Rand
        if i != 0:
            if img[i-1,j,0]==img[i-1,j,1]==img[i-1,j,2]>=threshold:
                for n in range (len(pxl_found)):
                    if pxl_found[n][0]==i-1 and pxl_found[n][1]==j:
                        append_check=False
                if append_check:
                    for n in range (len(pxl2check)):
```

```

        if pxl2check[n][0]==i-1 and pxl2check[n][1]==j:
            append_check=False
    if append_check:
        pxl2check.append([i-1,j])
    append_check=True

#Eine Spalte weiter überprüfen (j+1), aber nur wenn nicht am rechten Rand
if j != img.shape[1]-1:
    if img[i,j+1,0]==img[i,j+1,1]==img[i,j+1,2]>=threshold:
        for n in range (len(pxl_found)):
            if pxl_found[n][0]==i and pxl_found[n][1]==j+1:
                append_check=False
    if append_check:
        for n in range (len(pxl2check)):
            if pxl2check[n][0]==i and pxl2check[n][1]==j+1:
                append_check=False
    if append_check:
        pxl2check.append([i,j+1])
    append_check=True

#Eine Spalte vorher überprüfen (j-1), aber nur wenn nicht am linken Rand
if j != 0:
    if img[i,j-1,0]==img[i,j-1,1]==img[i,j-1,2]>=threshold:
        for n in range (len(pxl_found)):
            if pxl_found[n][0]==i and pxl_found[n][1]==j-1:
                append_check=False
    if append_check:
        for n in range (len(pxl2check)):
            if pxl2check[n][0]==i and pxl2check[n][1]==j-1:
                append_check=False
    if append_check:
        pxl2check.append([i,j-1])
    append_check=True

del pxl2check[0] #ersten Eintrag aus „pxl2check“ löschen --> abgearbeitet

# Randerkennung (ausgeschaltet)
# for m in range (len(pxl_found)): #Überprüfe ob Objekt den Rand berührt
#     if pxl_found[m][0]==0:
#         edge=True
#     elif pxl_found[m][0]==img.shape[0]-1:
#         edge=True
#     elif pxl_found[m][1]==0:
#         edge=True
#     elif pxl_found[m][1]==img.shape[1]-1:
#         edge=True

if edge:
    print'Object touches the edge. Object is excluded!'
    for m in range (len(pxl_found)):
        img[pxl_found[m][0],pxl_found[m][1,:]=(1.0,0,0) #Alle Randpixel rot einfärben (nur bei aktivierter Randerkennung)
    else:
        if len(pxl_found) < min_size:
            for m in range (len(pxl_found)):
                img[pxl_found[m][0],pxl_found[m][1,:]=(1.0,0,0) #Alle zu kleinen Objekte rot einfärben
        else:
            objects=objects+1
            for m in range (len(pxl_found)):
                img[pxl_found[m][0],pxl_found[m][1,:]=(0,1.0,0) #Alle anderen, als Zellen erkannte, Objekte grün einfärben
                pixcount=pixcount+1
    return (pixcount,objects)

#tif Dateinamen aus „files.csv“ Datei einlesen
filetransfer = csv.reader(open("files.csv", "r"))
for row in filetransfer:
    transport = row
    raute = transport[0].count('#') #Zeilen beginnend mit „#“ ignorieren
    if raute == 0:
        pics.append(transport[0])

#Dateien ins .png Format Konvertieren & ggf. eine Fehlermeldung ausgeben
for i in range(len(pics)):
    halt=0
    haltstart=time.time()
    infile=pics[i]
    ending=infile.rsplit(".",1)
    outfile=ending[0]+".png"

```



```

if infile!=outfile:
    try:
        print 'converting', infile, 'to', outfile
        Image.open(infile).convert("RGB").save(outfile)
    except IOError:
        print "cannot convert to", outfile
while halt < 3:
    halt=time.time()-haltstart

#Pixel & Informationen der Bilder auslesen
for i in range(len(pics)):
    picname=pics[i].rsplit(".",1)
    picname=picname[0]
    picname=picname+".png"
    pic=mpimg.imread(picname)
    images.append(pic)

#Bilder Analysieren
for i in range(len(images)):
    pixcount=0
    objects=0
    img=images[i]
    if img.shape[2]>= 3:
        img = img[:, :, 0:3] #cut alpha channel if present
    temp=pics[i].rsplit(".",1)
    print 'Processing image %s. Please Wait!' %temp[0]

#i entspricht der Zeile
#j entspricht der Spalte

for i in range (img.shape[0]):
    for j in range (img.shape[1]):
        #for k in range (img.shape[2]):
        if img[i,j,0] == img[i,j,1] == img[i,j,2] >= threshold:
            #print'Found object'
            trans_tupel=obj_detect(i,j,threshold,min_size,img,pixcount,objects)
            pixcount=trans_tupel[0]
            objects=trans_tupel[1]
        # else:
        #     img[i,j,:]=(0,0,0)
    pxlcount.append(pixcount)
    objectno.append(objects)
    procimages.append(img)

#Berechnung des prozentualen Abrisses und speichern der Ergebnisse in „results.csv“ Datei
i=-1
resultwriter=csv.writer(open('results.csv', 'w'), delimiter=',')
resultwriter.writerow(['name', 'vel [U/min]', 'radpos [mm]', 'detachment [%]'])
while len(pxlcount)>0:
    percentage=((float(pxlcount[0])-float(pxlcount[1]))/float(pxlcount[0]))*100
    i=i+2
    picname=pics[i].rsplit(".",1)
    temp=picname[0].rsplit("-",1)
    data=temp[1]
    rotvel=int(data[-2])*1000+int(data[-1])*100
    print 'Detachment at %i U/min on %s at radial position %s is %1.2f %%.' %(rotvel, temp[0], data[0], percentage)
    radpos=0.9+int(data[0])*1.2
    percentage=str(percentage).replace('.',',')
    radpos=str(radpos).replace('.',',')
    rowdata=[temp[0],rotvel,radpos,percentage]
    resultwriter.writerow(rowdata)
    del pxlcount[1]
    del pxlcount[0]
print 'Total files analysed %i.' % len(pics)
print 'Total time taken: %1.1f min.' % ((time.time()-tstart)/60)
print 'Done'

```