

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Auswirkung unterschiedlicher PEEK Oberflächenmodifikationen
auf humane Osteoblasten - eine in vitro Studie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Surian Herrmann
aus Sao Lourenco

Datum der Promotion: 03.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis.....	3
Abstrakt.....	4
1. Einleitung	7
1. 1. <i>Dentale Implantologie</i>	7
1. 2. <i>Grundlagen und Definition der Osseointegration.....</i>	9
1.2.1. Osseointegration	9
1.2.2. Probleme konventioneller Implantate.....	11
1. 3. <i>Poly-Ether-Ether-Keton (PEEK).....</i>	12
1.3.1. Herstellung	13
1. 4. <i>Modifikationsmöglichkeiten der PEEK Oberfläche.....</i>	18
1.4.1 Oberflächenmodifizierung mit Niederdruckplasma.....	22
1.4.2. Oberflächenmodifizierung mit RGD-Peptid	23
1.4.3. Compound aus PEEK/Hydroxylapatit.....	24
1. 5. <i>Zellkulturparameter.....</i>	26
1.5.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung.....	27
1.5.2. Zellviabilität - Alamar Blue Assay.....	29
1.5.3. Zelldifferenzierung - Alkaline Phosphatase Assay	31
1. 6. <i>Fragestellung</i>	33
2. Material und Methode.....	34
2. 1. <i>Übersicht Versuchsaufbau</i>	34
2. 2. <i>Ausgangsmaterial.....</i>	36
2. 3. <i>Probekörperherstellung</i>	38
2.3.1. Oberflächenmodifizierung mit Niederdruckplasma	38
2.3.2. Oberflächenmodifizierung mit RGD-Peptid	39
2. 4. <i>Oberflächencharakterisierung</i>	40
2.4.1. Oberflächenrauheit	40
2.4.2. Randwinkelmessung	41
2. 5. <i>Zellkultivierung humaner Osteoblasten.....</i>	42
2. 6. <i>Auswertung der Zellkulturparameter</i>	45
2.6.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung.....	45
2.6.2. Zellviabilität - Alamar Blue Assay.....	47
2.6.3. Zelldifferenzierung - Alkaline Phosphatase Assay	48
3. Ergebnisse	50
3. 1. <i>Oberflächencharakterisierung - Oberflächenrauheit und Randwinkel</i>	50
3. 2. <i>Ergebnisse der Zellkulturparameter.....</i>	53
3.2.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung.....	53
3.2.2. Zellviabilität - Alamar Blue Assay.....	56
3.2.3. Zelldifferenzierung - Alkaline Phosphatase Assay	59
3. 3. <i>Statistik.....</i>	62

4. Diskussion	63
4. 1. Auswirkung der Polymerkettenlänge von PEEK auf die Zellreaktion	64
4. 2. Beurteilung der untersuchten Zellkulturparameter	66
4. 3. Beurteilung der Oberflächenmodifikationen von PEEK anhand der Zellkulturparameter	67
4.3.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung.....	67
4.3.2. Zellviabilität - Alamar Blue	69
4.3.3. Zelldifferenzierung - Alkalische Phosphatase Assay	70
4. 4. Beurteilung der Probekörpergruppen <i>i4rgd</i> , <i>i4u</i> und <i>ti</i> anhand der Zellkulturparameter	72
4.4.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung.....	72
4.4.2. Zellviabilität - Alamar Blue	74
4.4.3. Zelldifferenzierung - Alkalische Phosphatase Assay	75
4. 5. Methodenkritik	77
4.5.1. Zelllinie.....	77
4.5.2. Material	78
4.5.3. Methodik	78
4. 6. Fazit	81
4. 7. Perspektive	82
Literaturverzeichnis	83
Eidesstattliche Versicherung	90
Lebenslauf	91
Danksagung	92

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1 Referenzstudien von mit Plasma konditionierten Probekörpern/Implantaten	19
Tabelle 2 Referenzstudien von funktionalisierten Probekörpern/Implantaten durch Peptide/Proteine	20
Tabelle 3 Referenzstudien von Probekörpern/Implantaten aus PEEK/Hydroxylapatit	21
Tabelle 4 Unterschiedliche Ergebnisse der besten Zellreaktion je nach HA-Gehalt des untersuchten PEEK/HA Compounds	25
Tabelle 5 Materialeigenschaften des verwendeten PEEK Ausgangsmaterials ^{35,95}	37
Tabelle 6 Verlauf der Zellkultivierung vor Versuchsbeginn	43
Tabelle 7 Verlauf der Zellkultivierung ab Versuchsbeginn	44
Tabelle 8 Mittelwerte des Mittenrauwertes R_a und des Randwinkels θ	50
Tabelle 9 Mittelwerte und Standardabweichungen der Flächenbedeckung Tag 1 - Tag 21	54
Tabelle 10 Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellviabilität Tag 1 - Tag 21	57
Tabelle 11 Mittelwerte und Standardabweichungen der Zelldifferenzierung Tag 1 - Tag 21	60
Tabelle 12 Maximale Werte der untersuchten Zellkulturparameter von den Ausgangsmaterialien i2 und i4 an Tag 1 - Tag 21	64
Abbildung 1: Schema des elektrophilen Synthesewegs ³³	14
Abbildung 2: Schema des nukleophilen Synthesewegs ³³	15
Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Extrusionsgeräts zur Herstellung von stangenförmigen PEEK Halbzeugen ³⁵	17
Abbildung 4: Materialeigenschaften von PEEK aus Fließpressung und mit anschließendem Spanabtrag ³³	17
Abbildung 5 Valenzstrichformel von Neutralrot ⁷⁷	28
Abbildung 6 Alamar Blue Assay Redoxreaktion von Resazurin zu Resorufin ⁸²	29
Abbildung 7 Dephosphorylierung von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol (pNP) ⁹²	31
Abbildung 8: Schema der verschiedenen untersuchten Probekörpergruppen	34
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	35
Abbildung 10: Reaktionsschema der Oberflächenveredelung von PEEK durch RGD Peptid nach Becker et al. ⁴⁵	39
Abbildung 11: Alicona InfiniteFocus Mikroskop ⁹⁷	40
Abbildung 12: Schema der Randwinkelmessung ⁹⁸	41
Abbildung 13 Schema zum Ablauf der Auswertung der Flächenbedeckung	45
Abbildung 14: Beispiel einer Übersichtsaufnahme zur Bestimmung der Flächenbedeckung	46
Abbildung 15 Auswertung der Flächenbedeckung Keyence Software - Farbkontrastmessung mit Toleranzauswahl	46
Abbildung 16 Schema zum Ablauf der Auswertung der Zellviabilität	47
Abbildung 17 Schema zum Ablauf der Auswertung der Zelldifferenzierung	48
Abbildung 18 Mittenrauwert R_a [nm] der Probekörpergruppen	51
Abbildung 19 Randwinkel [grad] der Probekörpergruppen	52
Abbildung 20 Ergebnisse der berechneten FB [%] Tag 1- Tag 21	55

Abbildung 21 Ergebnisse der Absorptionsmessung AB [OD] Tag 1- Tag 21	58
Abbildung 22 Ergebnisse der Absorptionsmessung ALP [OD] Tag 1 - Tag 21	61
Abbildung 23 Initiale Adhäsion der Osteoblasten nach 24h anhand der Flächenbedeckung der Gruppen i4p, i4rgd und ha.....	68
Abbildung 24 Zellviabilität - AB von Tag 1 - Tag 21 der Gruppen i4p, i4rgd und ha.....	69
Abbildung 25 Zelldifferenzierung - ALP von Tag 10 bis Tag 21 der Gruppen i4p, i4rgd und ha	70
Abbildung 26 Initiale Adhäsion der Osteoblasten nach 24h anhand der Flächenbedeckung der Gruppen i4u, i4rgd und ti	72
Abbildung 27 Übersichtsaufnahmen der unterschiedlichen Flächenbedeckung an Tag 1	73
Abbildung 28 Zellviabilität - AB von Tag 1 - Tag 21 der Gruppen i4u, i4rgd und ti	74
Abbildung 29 Zelldifferenzierung - ALP von Tag 10 bis Tag 21 der Gruppen i4u, i4rgd und ti	75
Abbildung 30 Beispiele für die ungleiche Verteilung der Zellen auf den Probekörpern	80

Abkürzungsverzeichnis

AB	Alamar Blue Assay
ALP	Alkalische Phosphatase
FB	Flächenbedeckung
grd	Bogengrad
ha	PEEK/Hydroxylapatit Compound
HA	Hydroxylapatit
i2p	PEEK i2 plasmabehandelt
i2rgd	PEEK i2 RGD-gebunden
i2u	PEEK i2 unbehandelt
i4p	PEEK i4 plasmabehandelt
i4rgd	PEEK i4 RGD-gebunden
i4u	PEEK i4 unbehandelt
IGF-I	Insulin like growth factor 1
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH/H ⁺	Nicotinamidadeninukleotid
OD	optische Dichte
PAEK	Polyaryletherketone
PEEK	Polyetheretherketon
PMMA	Polymethylmethacrylat
SLA	Sandblasted and acid etched
TGF- β	tissue growth factor β
ti	Titan
UV	ultraviolett

Abstrakt

PEEK (Polyetheretherketon) könnte als Ausgangsmaterial für Dentalimplantate eine Alternative zu Titan und Zirkondioxid darstellen. Aufgrund seiner hydrophoben Oberfläche müsste PEEK jedoch modifiziert werden, um eine ausreichende Osseointegration zu erreichen. Für die Modifizierung der PEEK Oberfläche wird in der Literatur unter anderem die Plasmabehandlung der PEEK Oberfläche, die Compoundierung von PEEK mit Hydroxylapatit und die Funktionalisierung der PEEK Oberfläche durch die kovalente Bindung des RGD-Peptids beschrieben.

Ziel der Studie war es, die Zellreaktion humaner Osteoblasten auf unterschiedliche Polymerkettenlängen von PEEK sowie auf unterschiedliche Oberflächenmodifizierungen von PEEK zu untersuchen und mit der Zellreaktion auf Titan (Positivkontrolle) sowie unbehandeltes PEEK (Negativkontrolle) zu vergleichen.

Für die Probekörperherstellung wurden vier Ausgangsmaterialien verwendet, VESTAKEEP i2 mit einer niedrigen Viskosität und kürzeren Polymerketten, VESTAKEEP i4 mit einer höheren Viskosität und längeren Polymerketten, PEEK Optima HA (Compound aus 80% PEEK und 20% Hydroxylapatit) und Reintitan. Es wurden $n = 248$ scheibenförmige Probekörper hergestellt, bis zu einer Körnung von 4000 poliert und dann sterilisiert. Anschließend wurden die VESTAKEEP i2p/i4p-Probekörpergruppen für 35 min bei 70 °C und 0,2 bar mit Ar/O₂-Plasma behandelt und die VESTAKEEP i2rgd/i4rgd- Probekörpergruppen über eine Schiff'sche Base unter Verwendung von Ethylendiamin und Ethylen Glycol Diglycidyl Ether mit dem RGD-Peptid beschichtet. Es wurden die Probekörpergruppe Titan (ti), PEEK/Hydroxylapatit Compound (ha), PEEK i2/i4 unbehandelt (i2u/i4u), Ar/O₂-Plasma behandeltes PEEK (i2p/i4p) und PEEK mit kovalent gebundenen RGD-Peptiden (i2rgd/i4rgd) untersucht.

Dafür wurden die Probekörper bei 37 °C und 5 % CO₂ mit 1 ml Zellsuspension ($\cong 30.000$ humane Osteoblasten) inkubiert und an Tag 1, 3, 7, 10, 14 und 21 untersucht. Zur Beurteilung der Zellreaktion wurden die Zelladhäsion durch die Flächenbedeckung nach 24h, die Proliferation über die Zellviabilität mit Hilfe des AlamarBlue-Tests von Tag 1 - 21 und die Zelldifferenzierung anhand der alkalischen Phosphatase Aktivität von Tag 10 - 21 bestimmt.

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde deutlich, dass das Ausgangsmaterial PEEK i4 bezogen auf alle Zellkulturparameter mit 22,22 % höheren Ergebnissen abschneidet im Vergleich zu i2. Des Weiteren führten weder die Plasmabehandlung der PEEK Oberfläche noch die Compoundierung von PEEK mit Hydroxylapatit zu einer Steigerung der Zellreaktion. Vor allem in Bezug auf die initiale Zelladhäsion und die Zelldifferenzierung führt die Funktionalisierung der PEEK Oberfläche durch die kovalente Bindung des RGD-Peptids zu höheren Ergebnissen gegenüber unbehandelten PEEK, Titan und den anderen mituntersuchten Modifikationsmöglichkeiten von PEEK. Bezogen auf die Zellproliferation zeigte Titan signifikant höhere Ergebnisse im Vergleich zu alle PEEK Probekörpern.

Abstract

PEEK (polyetheretherketone) could be an alternative to titanium and zirconia as a base-material for dental implants. However, due to its hydrophobic surface, PEEK would have to be modified to achieve sufficient osseointegration. For the modification of the PEEK surface the plasma gas treatment of the PEEK surface, the compounding of PEEK with hydroxyapatite and the functionalization of the PEEK surface by the RGD-peptide are described in literature.

The aim of the study was to investigate the cell response of human osteoblasts to different polymer-chain-lengths of PEEK, different surface modifications of PEEK and to compare these results to the cell response to titanium (positive control) and untreated PEEK (negative control).

Four base-materials were used for the sample preparation as rod- and disk-material, VESTAKEEP i2 with a low viscosity and shorter polymer-chains, VESTAKEEP i4 with a higher viscosity and longer polymer-chains, PEEK Optima HA compound (80% PEEK and 20% hydroxyapatite) and pure titanium. N = 248 disc-shaped specimens were prepared, polished up to a grain size of 4000 and then sterilized. Afterwards, the VESTAKEEP i2p/i4p test-group was treated with Ar/O₂-plasma for 35 min at 70 °C and 0.2 bar and the VESTAKEEP i2rgd/i4rgd test-group was coated with the RGD-peptide via a Schiff-base using ethylenediamine and ethylene glycol diglycidyl ether. The test-groups titanium (ti), PEEK/hydroxyapatite compound (ha), PEEK i2/i4 untreated (i2u/i4u), Ar/O₂-plasma treated PEEK (i2p/i4p) and PEEK with covalently bound RGD-peptides (i2rgd/i4rgd) were investigated.

Therefore the samples were incubated at 37 °C and 5% CO₂ with 1 ml cell suspension (\approx 30,000 human osteoblasts) and examined on days 1, 3, 7, 10, 14 and 21. To assess the cell-response, cell-adhesion was determined by area coverage after 24 h, proliferation via cell-viability using the AlamarBlue-Assay from day 1 - 21 and cell-differentiation via alkaline phosphatase activity from day 10 - 21.

When evaluating the results, it became clear that the base-material PEEK i4 scored 22.22% higher in all cell parameters combined compared to i2. Furthermore, neither the plasma gas treatment of the PEEK surface nor the compounding of PEEK with hydroxyapatite led to an increase in cell-response. Especially with regard to initial cell-adhesion and cell-differentiation, the functionalization of the PEEK i4 surface by covalent binding of the RGD-peptide leads to higher results compared to untreated PEEK, titanium and the other co-examined modification possibilities of PEEK. In terms of cell-proliferation, titanium showed significantly higher results compared to all PEEK samples.

1. Einleitung

1. 1. Dentale Implantologie

Eines der Hauptziele der Zahnmedizin ist die Wiederherstellung von Funktion und Ästhetik des Kauapparates nach Zahnverlust. Obwohl die Kariesprävalenz in den letzten Jahren in Deutschland und anderen westlichen Industriestaaten drastisch zurückgegangen ist, besteht aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung und der Prävalenz für Parodontitis immer noch ein hoher Bedarf an Zahnersatz.¹ Da herausnehmbarer Zahnersatz meist komplikationsbehaftet ist und konventionelle prothetische Brückenkonstruktionen eine weitere Restaurationsspirale nach sich ziehen, ist der Bedarf an einer festsitzenden und zahnhartsubstanzschonenden Lösung größer denn je. Dies wird durch das durchschnittliche jährliche Wachstum von über 6% des dentalen Implantologie-Marktes zwischen 2010 und 2015 bestätigt.²

Extrahierte Zähne durch in den Knochen eingebrachte Materialien zu ersetzen wurden erstmals 600 n. Chr. durchgeführt. Maya Stämme inserierten Muschelsplitter in den Unterkieferknochen, um welche sich radiologischer Aufnahmen zufolge Knochen formierte.³ Während im 18. Jahrhundert noch nach osseointegrativen Materialien gesucht wurde, ist schließlich 1978 die moderne Implantologie von Titanimplantaten durch Dr. Brånemark eingeführt worden.⁴ Er entdeckte 1952 die Bindung von Knochen an Titanoberflächen und inserierte 1965 seinen ersten Prototypen aus Titan in den Unterkiefer eines Patienten.⁵ Diese Zeit war geprägt von der Suche nach einem geeigneten Implantatdesign. Zwischen Blatt- und Gerüstimplantaten hatte sich Ende der 80er Jahre das deutlich minimalinvasivere zylindrische Implantatdesign durchgesetzt und die Forschung konzentrierte sich nun auf die Oberflächenmodifizierung der Implantate, um eine bestmögliche Osseointegration zu erzielen.

Während das Implantatsystem von Brånemark eine gefräste und dann polierte also somit sehr glatte Oberfläche besaß, wurde durch unterschiedliche Methoden der Oberflächenaufrauung eine deutliche Verbesserung der Osseointegration geschaffen, die durch Buser et al. in der SLA und SLActive Oberfläche gipfelte. Dabei wird bei der SLA Technik die glatte Titanoberfläche durch Sandstrahlung und anschließende Säureätzung vergrößert (Sandblasted - large grit and acid etched) und es entsteht eine feinporige Titandioxid Oberfläche. Bei der SLActive Technik wird anschließend die Oberfläche mit Stickstoffgas bearbeitet und das Implantat in Kochsalzlösung gelagert um zusätzlich eine hydrophilere Oberfläche für die primäre Zelladhärenz zu schaffen.^{6,7}

Unentwegt wird nach weiteren Möglichkeiten zur Verbesserung der Osseointegration von dentalen und orthopädischen Implantaten gesucht. Die Beschichtungen der Implantatoberfläche sowie die Verwendung von alternativen Materialien stehen dabei im Fokus, wie zum Beispiel Zirkondioxid.⁷⁻⁹

1. 2. Grundlagen und Definition der Osseointegration

1.2.1. Osseointegration

Osseointegration bezeichnet histologisch die „direkte Verankerung eines Implantats durch Bildung von Knochengewebe um das Implantat herum, ohne das Wachstum von fibrösem Gewebe zwischen Knochen und der Implantatoberfläche“ und wurde erstmals 1966 durch Brånemark im Zusammenhang mit Implantaten beschrieben.^{4,10}

Bei der Implantation hängt die erfolgreiche Osseointegration des Implantates von mehreren Faktoren ab. Der Ablauf der Präparation des Implantatbettes, das Implantatmaterial und dessen Oberflächeneigenschaften, die primäre Stabilität des Implantates, eventuelle Allgemeinerkrankungen des Patienten sowie die Knochendichte sind dabei entscheidend. Dabei entspricht der Heilungsprozess, der zur Osseointegration eines dentalen Implantates führt, den Prinzipien der primären Frakturheilung.¹¹

Dabei unterscheidet man die primäre und die sekundäre Knochenheilung. Die sekundäre Knochenheilung erfolgt über die Bildung von Kallus und somit zu einer Knochenbildung durch Mineralisierung von Knorpelgewebe. Dabei kommt es bei größeren Frakturspalten mit Verletzung des Periosts zur Organisation des Frakturhämatoms aufgrund von einwachsendem Granulationsgewebe. Zunächst wird der aus Faserknorpel und Bindegewebe bestehende Knorpelkallus durch Chondrozyten und Fibroblasten gebildet. Schrittweise wird der Knorpel dann durch Chondroklasten aufgelöst, Gefäße wachsen ein und Osteoblasten beginnen mit der Anlagerung von Faserknochen, welcher nach Bildung eines Faserknochenkallus langsam zu Lamellenknochen umgebaut wird.¹¹

Bei der dentalen Implantation erfolgt, wie auch bei der geringen Frakturspaltbildung (< 1mm), die primäre Knochenheilung. Binnen 72 h wird in der ersten Phase durch die Läsion der intakten Knochenmatrix extrazelluläre Flüssigkeit frei, welche nicht-kollagene Proteine und Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β 1 und IGF-I) beinhaltet. Diese führen zur Migration von Zellen (Stammzellen, Präosteoblasten, Osteoklasten, Fibroblasten, Leukozyten), sodass nach 14 - 17 Tagen die zweite Phase mit der vollständigen Rekapillarisation und der Differenzierung von pluripotenten Stammzellen und Präosteoblasten zu Osteoblasten abgeschlossen ist. Spätestens nach dem 17. Tag folgt mit der Knochenanlagerung an den Frakturrenden durch Osteoblasten die dritte Phase. In der vierten Phase wird dann durch das Remodelling der zunächst gebildete Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt.^{12,13}

Bei der Osteogenese im Rahmen der primären Knochenheilung an Implantaten werden grundsätzlich zwei Formen unterschieden. Bei der Distanzosteogenese (Frakturspaltbildung < 1 mm) wird der Knochen in der Implantatperipherie gebildet und wächst in Richtung des Implantates, bis der Knochen das Implantat letztendlich umschließt. Bei der Kontaktosteogenese besiedeln die Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen die Implantatoberfläche und lagern die Knochenmatrix dort direkt ab.¹⁴

Die Oberflächenmodifikation von Implantaten durch Zytokine, dem RGD-Peptid (RGD steht dabei für den Buchstabencode der Aminosäuresequenz Arginin, Glycin und Asparaginsäure) oder Hydroxylapatit, führte in der Literatur mit dem Begriff der Verbundosteogenese zur Etablierung einer weiteren Osteogeneseform. Dabei werden die vorhandenen Oberflächenmoleküle teilweise in den Knochenstoffwechsel miteinbezogen.¹⁵⁻¹⁷

Nach Insertion des Implantates in den Knochen kommt es durch die vorrangigere Präparation des Implantatbettes über die Presspassung des Implantates zur Primärstabilität und zum direkten Knochen-Implantat-Kontakt (engl. bone-implant contact). Durch die Heilungsprozesse gehen die eingewanderten Osteoblasten einen direkten Kontakt mit der Implantatoberfläche ein. Dabei hat die Implantatoberfläche mit ihrer Mikrostruktur, chemischen Zusammensetzung und Morphologie einen direkten Einfluss auf die zelluläre Reaktion der Osteoblasten und damit auf die Osseointegration des Implantates.¹³

Interlocking, d.h. die direkte Bindung von Knochen an der Implantatoberfläche, kann als erfolgreiche Osseointegration angesehen werden. Dies führt beim gewaltsamen Ausstoßen der Implantate bei experimentellen Untersuchungen nicht zur Materiallösung zwischen Implantat und Knochen, sondern zur Fraktur innerhalb des perimplantären Lagerknochens.¹³

1.2.2. Probleme konventioneller Implantate

Nachgewiesene Hypersensibilitätsreaktionen auf Titanimplantate stellen ein Problem dar, welches in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Während mehrere Studien als Reaktion auf einen Titan-Knochenverbund (dentale Implantate und Osteosyntheseplatten) Schwellung, Hyperämie, Ekzembildung, beeinträchtigte Frakturheilung und T-Zell Hyperreagibilität nachwiesen, werden von anderen Autoren weitere Untersuchungen gefordert, um von einer Signifikanz der Hypersensibilitätsreaktion auf Titan sprechen zu können.¹⁸⁻²⁰ Mit einer Prävalenz von 0,06% bei Patienten mit Titanimplantaten, ist die T-Zell-vermittelte Reaktion auf geringe Korrosionsprozesse und/oder Abrieb von Titan während der Implantation zurückzuführen.²¹ Hier soll nach Jacobi-Gresser et al. eine genetische Prädisposition die Ursache für Hypersensibilitätsreaktion sein.²² Für Patienten dieser nachgewiesenen Fälle gibt es zurzeit lediglich die Möglichkeit auf Zirkondioxid als alternativen Implantatwerkstoff zurückzugreifen.

Ein weiterer Nachteil von Titan ist die Bildung von Artefakten im Rahmen bildgebender Diagnostikverfahren wie der Magnetresonanztomographie und der digitalen Volumentomographie.^{23,24} Hierdurch wird die Darstellung von angrenzenden anatomischen Strukturen wie beispielsweise periimplantären Knochens erschwert. Als weiteres Problem wird die Möglichkeit einer Überbelastung des Knochens diskutiert. Aufgrund der unterschiedlichen Elastizitätsmodule von Knochen (20 GPa) und Titan (110 GPa) kann es hier bei hohen Kaukräften zu Spannungsspitzen kommen, welche zu Knocheneinbrüchen an der Implantatschulter führen können.^{25,26} Hinzukommt die Problematik der grauen Eigenfarbe von Titanimplantaten, welche bei Gingivarezessionen sichtbar wird und somit das ästhetische Ergebnis stark verringert.

Zirkondioxidimplantate dienen aktuell als einzige metallfreie Alternative zu Titanimplantaten. Bezüglich der Osseointegration zeigt der Werkstoff vergleichbare klinische Ergebnisse, jedoch liegen dazu noch keine Langzeituntersuchungen vor.⁷⁻⁹ Aufgrund der geringeren Bruchfestigkeit im Vergleich zu Titan besteht eine erhöhte Frakturgefahr. Nach einer in vitro Studie von Kohal et al. lag die mittlere Kraft bis zum Bruch von einem zweiteiligen Implantatsystem aus Zirkondioxid bei 281.8 N. Im direkten Vergleich lag die Kraft bis zum Bruch eines zweiteiligen Implantatsystems aus Titan bei 595.2 N.²⁷ Gahlert et al. beschrieben passend dazu in einer retrospektiven Studie mit 170 inserierten Implantaten eine Verlustrate von 7,6 % aufgrund von Frakturen von einteiligen Zirkondioxidimplantaten nach 56 Monaten. Damit stellt das Krankheitsbild des Bruxismus aufgrund der hohen Kräfte eine Kontraindikation für Zirkondioxidimplantate dar.^{28,29}

1. 3. Poly-Ether-Ether-Keton (PEEK)

Nachdem Polyetheretherketon (PEEK), vor nunmehr 30 Jahren als biokompatibles Material eingestuft wurde, fand es immer mehr Anwendung im Bereich der Orthopädie und Traumatologie. PEEK ist ein thermoplastisches Hochleistungspolymer und stammt aus der Familie der Polyaryletherketone (PAEK).³⁰

Die Entwicklung stammt aus einer Zeit, in der die Nachfrage nach isoelastischen Implantaten, also solchen mit möglichst knochenähnlicher Elastizität, als Alternative zu dem sehr steifen Titan in den Interessensfokus der Forschung an biokompatiblen Materialien rückte. In Form von Osteosyntheseplatten oder Endoprothesen bewirken Materialien mit hoher Steifigkeit (wie z.B. Titan) eine Abschirmung auch von physiologischen Kräften, welche der Knochen jedoch auch für die Frakturheilung benötigt. Dieser Effekt des „stress shielding“ führt nach dem Wolff'schen Gesetz zu einem Abbau der Knochendichte im Bereich der Implantate, Osteosyntheseplatten oder Endoprothesen. Darüber hinaus kann ein hoher E-Modul bei Implantaten, die in den Knochen eingebracht und von extern belastet werden, zu hoher Spannung am Implantat-Knochen-Interface führen, aus der ebenfalls eine verminderte Osseointegration resultieren kann.²⁶

Die Materialeigenschaften von PEEK können durch verschiedene Zusatzstoffe unter Bildung eines Compounds oder Composites gezielt verändert werden. PEEK hat ein E-Modul von ca. 4 GPa. Dieser kann jedoch beispielsweise durch die Beimischung von Kohlefasern, abhängig von der Länge und dem Volumenanteil der Fasern, sehr viel höhere Werte annehmen. Des Weiteren kann Bariumsulfat zur Steigerung der Röntgenopazität genutzt werden. Füllstoffe wie z.B. Hydroxylapatit (HA) sollen die Osseointegration eines entsprechenden Compounds auf PEEK Basis steigern.^{30,31}

Hinzu kommt der Vorteil der chemischen Stabilität. PEEK ist bioinert und besitzt weder allergenes Potential noch zytotoxische Eigenschaften. Darüber hinaus ist es aufgrund der fehlenden paramagnetischen Eigenschaften kompatibel mit allen bildgebenden Verfahren und lässt sich problemlos mit allen gängigen Verfahren sterilisieren.²⁶

PEEK wird als ein lineares Homopolymer klassifiziert, d.h. es besteht aus einem, sich wiederholenden Monomer. Dabei besitzt ein Polymermolekül ein mittleres Gewicht von 80000 - 120000 g/mol und besteht aus ca. 100 Monomereinheiten, wobei Benzolringe durch funktionelle Keton- und Ethergruppen miteinander verbunden sind.^{32,33}

1.3.1. Herstellung

Bei der Synthese von PEEK gibt es zwei Ansätze, den elektrophilen und den nukleophilen Syntheseweg. Nach der Synthese wird das Polymer zu Pellets oder Pulver zerkleinert, welche als Vorpolymerisat für die thermoplastische Weiterverarbeitung benötigt werden.³³

Der elektrophile Syntheseweg beruht auf einer Reaktion durch Friedel-Crafts-Acylierung, bei der aromatische Ethergruppen mit Ketongruppen verbunden werden. Der zweite Syntheseweg beinhaltet eine nukleophile Austauschreaktion, bei der aromatische Ketongruppen mit Ethergruppen verbunden werden.³³

Ein Beispiel für die Synthese von PEEK über den elektrophilen Syntheseweg ist die in industriellen Prozessen angewandte Polykondensation von 4-(4-Phenoxyphenoxy) Benzoessäure (siehe Abbildung 1). Dabei wird Methansulfonsäure in Abwesenheit von Phosphorpentoxid als Lösungsmittel benutzt. Beim resultierenden Produkt muss jedoch ein sogenanntes „endcapping“ stattfinden, wobei reaktive endständige Gruppen abgetrennt werden. Findet dies nicht statt, entsteht bei der Polymerisation aufgrund der Verzweigung der Monomere an diesen Endgruppen ein nicht formstabiles Gel. Als „endcapping“-Reagenz kann z.B. 1,4-Diphenoxybenzen verwendet werden. Dieses bildet jedoch zum Teil Rückstände an der Oberfläche von PEEK, wodurch die Biokompatibilität negativ beeinflusst wird und somit PEEK nicht mehr als Implantatwerkstoff verwendet werden kann.³³

Einleitung

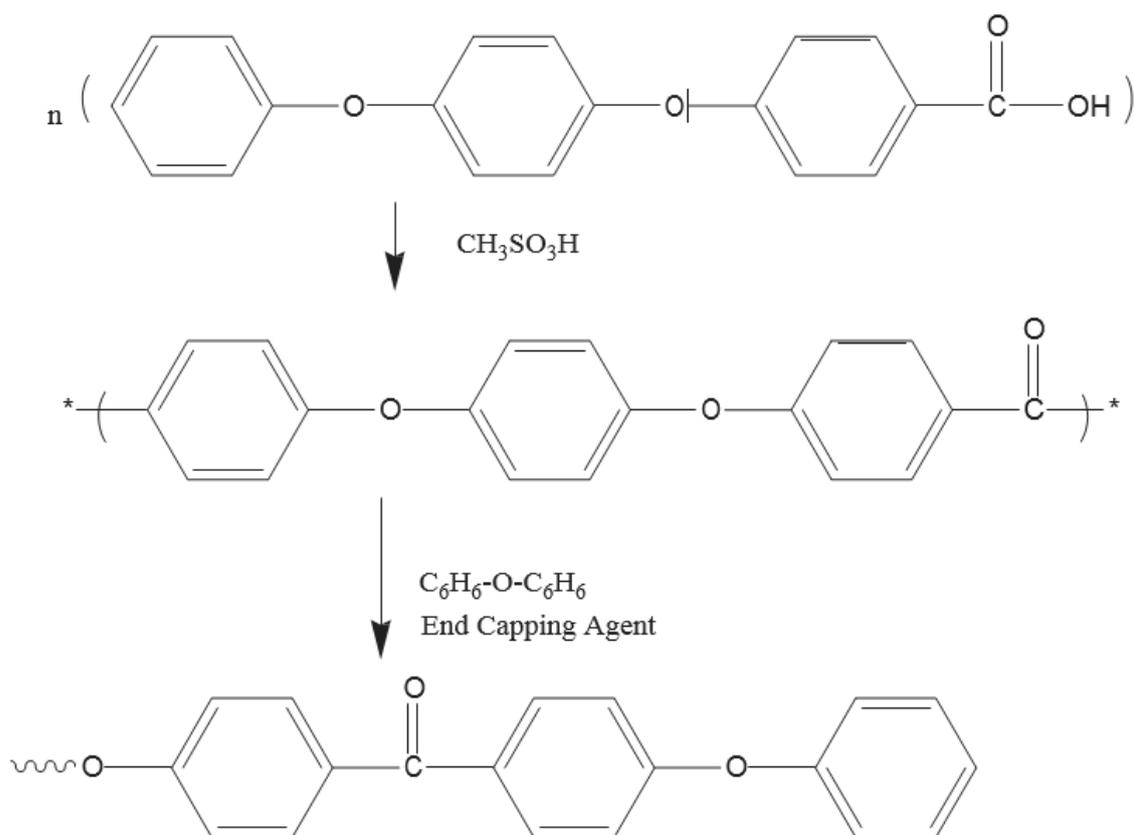


Abbildung 1: Schema des elektrophilen Synthesewegs³³

Implantierbares PEEK kann jedoch über den nukleophilen Syntheseweg hergestellt werden. Ein möglicher Weg ist die Dealkylierung von Bisphenol-Salzen, wie bei der Reaktion von 4,4'-Difluorbenzophenon mit Hydrochinon bei 300 °C in Anwesenheit von Diphenylsulfon als Lösungsmittel (siehe Abbildung 2).³³ Dabei besteht durch die Anpassung der Reaktionszeiten, die Möglichkeit unterschiedlich lange Polymerketten zu synthetisieren.

Einleitung

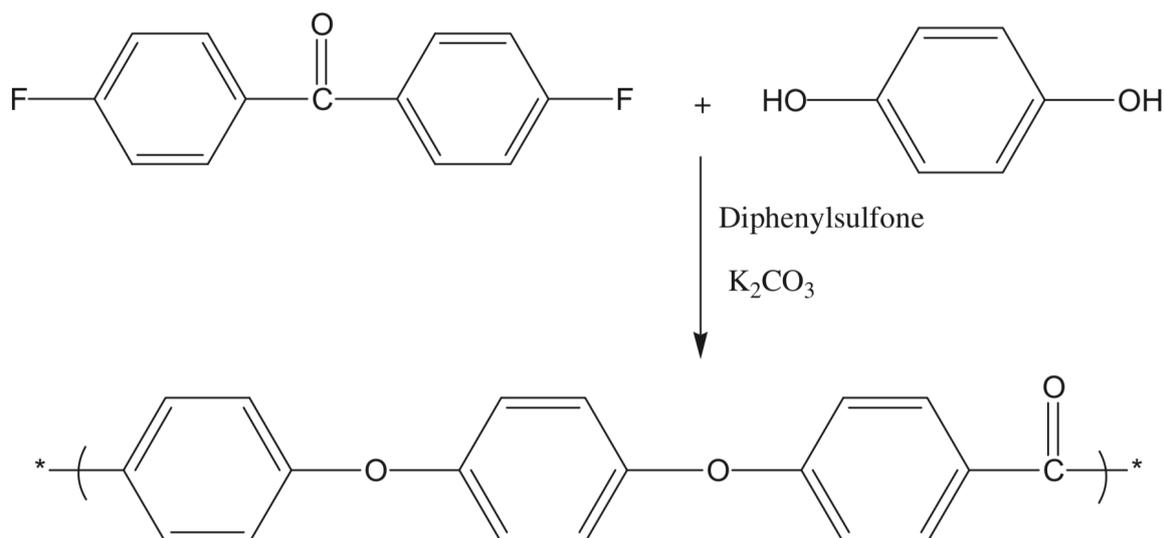


Abbildung 2: Schema des nukleophilen Syntheseweges³³

Das PEEK Molekül ist aufgrund der aromatischen Ringstrukturen nicht sehr beweglich, lediglich über die Ether- und Keton-Kohlenstoff-Verbindungen besteht axial eine gewisse Rotationsfreiheit. Nach der thermoplastischen Verformung kann die Polymerkette beim Abkühlen um ihre eigene Achse rotieren und geordnete Bereiche bilden. Diese werden als Kristalle bezeichnet. Diese kristallinen Bereiche sind in ungeordnete, als amorph bezeichnete Bereiche eingebettet, wodurch ein zweiphasiges semikristallines Polymer entsteht. Der kristalline Anteil wird durch den Abkühlungsprozess maßgeblich beeinflusst.³²

Beim Erhitzen von PEEK erfolgen mehrere Umwandlungen, die durch bestimmte Eigenschaften der Moleküle charakterisiert werden können. Diese werden je nach Temperaturschwelle in die Glasumwandlungstemperatur, die Schmelztemperatur und Fließumwandlungstemperatur unterteilt. Die hier genannten Werte beziehen sich auf die in der Literatur untersuchten PEEK Probekörper und können je nach Produktionsart leicht abweichen.³³

Die erste Umwandlung erfolgt bei einer Temperatur von 143 °C, sie wird als Glasumwandlungstemperatur (T_g) bezeichnet. Unterhalb der Glasumwandlungstemperatur reagiert PEEK auf mechanische Belastung mit einer Dehnung der kovalenten Bindungen, da die Polymerketten noch nicht genügend Wärmeenergie besitzen, um aneinander vorbeigleiten zu können. Oberhalb der T_g ändert sich dieser Zustand und die Moleküle der amorphen Regionen erlangen eine erhöhte Beweglichkeit. Sekundäre intermolekulare Kräfte wie z.B. Van-der-Waals-Kräfte beeinflussen das Fließ- und Beweglichkeitsverhalten der Polymerketten. Erhöht man die Temperatur weiter auf 343 °C, erreicht man die Schmelztemperatur (T_m). Sie beschreibt den Punkt, an dem der Großteil aller kristallinen Anteile geschmolzen sind. Je größer der kristalline Anteil ist, desto höher liegt die Schmelztemperatur von PEEK. Der Schmelztemperatur schließt sich die Fließumwandlungstemperatur (T_f) an, welche bei einer Temperatur von 390 °C erreicht wird. Hier ist die thermische Energie der Moleküle so hoch, dass auch sekundäre intermolekulare Kräfte keine Auswirkungen mehr auf die Moleküle besitzen, PEEK geht somit in den flüssigen Aggregatzustand über. In diesem Zustand wird PEEK meist verarbeitet. Je nach Produktionsverfahren kann es beim Abkühlen zu unterschiedlichen Verteilungen und Ausprägungen der Rekristallisationen kommen.³²⁻³⁴

Bei der Verarbeitung von PEEK Pellets zu Implantaten gibt es vier in der Kunststoffindustrie standardisierte Verarbeitungstechniken, welche sich ebenfalls auf die Materialeigenschaften auswirken. Spritzguss, Fließpressen, Kompressionsformung und Fräsen. Mit Ausnahme vom Fräsprozess haben sie alle gemeinsam, dass vorpolymerisiertes PEEK erhitzt wird, um anschließend eine Formgebung zu erhalten.³³

Beim Spritzguss (engl. „injection molding“) werden die PEEK Pellets automatisch durch eine auf ca. 400 °C erhitzte Schnecke vorangetrieben, wobei die so erzeugte Schmelze anschließend in die auf 175 - 205 °C vorgewärmten Formen gespritzt wird. Werden diese Produktionsvorgaben eingehalten, beschränkt sich das Schrumpfverhalten auf unter 0,05 %. Dies sollte beim Entwurf der Spritzgussform einkalkuliert werden.³³

Beim Fließpressen (engl. „extrusion moulding“) werden die PEEK Pellets im vorgeheizten Trichter (140 - 180 °C) zum Einzugsbereich geführt, der eine Schmelztemperatur von 350 - 360 °C besitzt. Durch die auf 380 - 390 °C erhitzte Düse werden die PEEK Halbzeuge in ihre Stangenform gebracht und über ein Fließband durch mehrere Abkühlungszonen langsam auf Zimmertemperatur abgekühlt um optimale Kristallisationsergebnisse zu erzielen (siehe Abbildung 3).^{33,35}



Abbildung 3: Schematischer Aufbau des Extrusionsgeräts zur Herstellung von stangenförmigen PEEK Halbzeugen ³⁵

Bei der Kompressionsformung werden die PEEK Pellets in einem Tiegel auf ca. 400 °C erhitzt und durch Zusammenpressen von zwei vorgewärmten Formen (Kavität und Druckstempel, auf ca. 175 - 205 °C erhitzt) ausgeformt. Durch das langsame Abkühlen werden ähnliche Materialeigenschaften wie beim Spritzguss erreicht. Das Verfahren wird hauptsächlich zur Herstellung von Folien oder von Prototypen angewandt.³³ Im medizinischen Bereich stellt die meist verwendete Produktionsart das Herausfräsen von Werkstücken aus polymerisierten PEEK Halberzeugnissen der Fließpressung dar. Die Unterschiede bzgl. der Materialeigenschaften nach Verarbeitung durch Spanabtrag nach Fließpressen im Vergleich zum Spritzguss sind in Abbildung 4 dargestellt. Während die Dehnfestigkeit, die Biegefestigkeit und der E-Modul ansteigen, nimmt die Kerbschlagzähigkeit und die Zugdehnung ab. Dies ist hauptsächlich auf die Kristallisationsveränderungen durch die thermale Beeinflussung durch den Spanabtrag zurückzuführen.^{33,34}

Materialeigenschaften von PEEK je nach Produktionsart

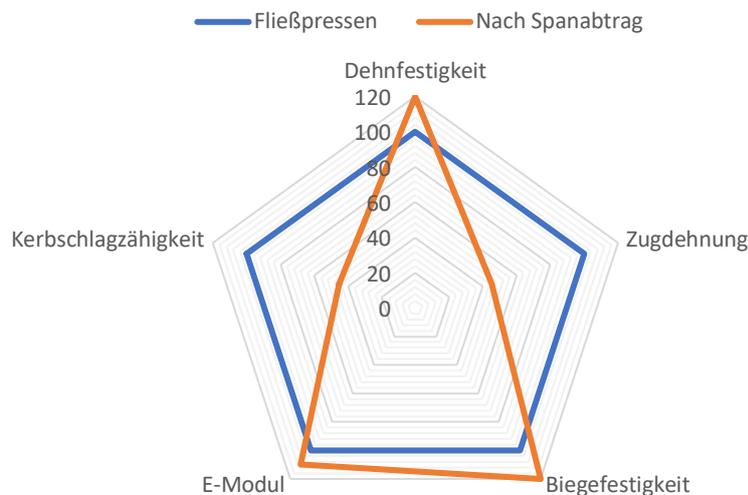


Abbildung 4: Materialeigenschaften von PEEK aus Fließpressung und mit anschließendem Spanabtrag³³

1. 4. Modifikationsmöglichkeiten der PEEK Oberfläche

Sowohl in vitro als auch in vivo Studien haben gezeigt, dass reines bzw. unbehandeltes PEEK hinsichtlich des Osseointegrationsverhaltens Titan als Goldstandard unterliegt. Dies wurde von Najeeb et al. in einer Übersichtsarbeit bzgl. Biokompatibilität und Osseointegration von unbehandeltem PEEK beschrieben.³⁶ Diese Schlussfolgerung basiert auf den Ergebnissen der vier von fünf in vitro Studien und der vier in vivo Studien, die in den Übersichtsartikel einbezogen wurden. Im Vordergrund steht dabei die Hydrophobie von unbehandelten PEEK aufgrund der geringen Oberflächenenergie.^{37,38} Ohne einen gewissen Grad an Hydrophilie können die Serumproteine nicht an die Oberfläche binden, somit bleibt auch eine Bindung der Integrine der Zelloberfläche aus. Ziel der Oberflächenmodifikation ist es über die Steigerung der Benetzbarkeit eine PEEK Oberfläche mit einer verbesserten Zelladhäsion bzw. generell verbesserter Zellreaktion zu schaffen.

Somit kann nur durch eine Modifizierung der Oberfläche bzw. des Materials an sich eine Osseointegration vergleichbar mit der von Titan erreicht werden, um gleichzeitig die vorteilhaften Materialeigenschaften von PEEK gegenüber Titan beizubehalten.³⁶

In der Literatur wird beispielsweise durch Walsh et al. der Ansatz beschrieben, PEEK mit Titan zu beschichten, um die Vorteile beider Materialien zu kombinieren.³⁹ Ein nachvollziehbarer Ansatz, jedoch wäre ein solches Implantat nicht mehr metallfrei.

Um ein gänzlich metallfreies Implantat auf PEEK Basis zu erhalten, schienen folgende Modifikationen vielversprechend:

- Plasmabehandlung der PEEK Oberfläche⁴⁰⁻⁴⁴ (siehe Tabelle 1)
- Kovalente Bindung spezieller Peptide an die PEEK Oberfläche⁴⁵⁻⁴⁷ (siehe Tabelle 2)
- Compoundierung von PEEK mit HA⁴⁸⁻⁵¹ (siehe Tabelle 3)

Einleitung

Tabelle 1 Referenzstudien von mit Plasma konditionierten Probekörpern/Implantaten

Param./ Artikel	Oberfläche	Oberflächen- rauheit	Wasser- kontakt- winkel	In vitro/in vivo	Zellansatz auf Probe/ Implantations- ort	I) Inkubations- zeit II) Tragedauer	Proliferations- Assay bzw. Zellzahl	ALP (Aktivität bzw. Nachweis)	In vivo Parameter I) BV/TV II) BIC
Briem et al. ⁴³	PEEK Plasma (NH ₄ ⁺ /Ar)	Nicht genannt	70 grd zu 59 grd	MC3T3-E1 Zellen	1,5x10 ⁴ Zellen/cm ²	I) 21d	Zellzählung erfolgte, jedoch kein Ergebnis beschrieben	Positiver Nachweis, keine Werte	-
Poullsson et al. ⁴²	PEEK Plasma (O ₂)	R _a 1) 126 nm (gespritztes PEEK) 2) 272 nm (gefrästes PEEK)	1)80 grd zu 52 grd 2)85 grd zu 60 grd	Schafe	Tibia corticalis proximal	II) 4 Wochen	-	-	II.A1)38% II.A2)53%
Zheng et al. ⁴¹	PEEK Plasma (AAc/Ar)	R _a 1) 0,082 µm (PEEK) 2) 1,43 µm (PEEK- COOH 5,9%)	87 grd zu 60 grd	MC3T3-E1 Zellen	2.1x10 ⁴ - 1.03x10 ⁵ Zellen/Probe	I.A) 3d I.B) 5d	CCK 8 Assay A) 1) 0,56 OD 2) 1,0 OD B) 1) 0,7 OD 2) 1,7 OD	-	-
Wang et al. ⁴⁰	PEEK Plasma (Ar/H ₂ O)	R _a 1) 11.41 nm (PEEK) 2) 14.71 nm (PEEK-A/W)	78 grd zu 15 grd	A) MC3T3- E1 Zellen B) RMSC	5x10 ⁴ Zellen/Probe 5x10 ³ Zellen/Probe	I.A) 7d I.B) 14d	AB Assay A) 1) 33% 2) 65% Reduction of AB	B) 1) 1,0 2) 1,3 µM/µg total Protein	-
Rochford et al. ⁴⁴	PEEK Plasma (O ₂)	R _a 1) 28 nm (PEEK) 2) 15 nm (PEEK- O ₂)	82 grd zu 51 grd	U-2 OS	6x10 ⁶ Zellen in 10ml Kulturmedium	I.) 48h	1) 6x10 ⁵ 2) 1x10 ⁵ Zellen pro cm ²	-	-

Einleitung

Tabelle 2 Referenzstudien von funktionalisierten Probekörpern/Implantaten durch Peptide/Proteine

Param./ Artikel	Oberfläche	Oberflächen- rauheit	Wasser- kontakt- winkel	In vitro/in vivo	Zellansatz auf Probe/ Implantationsort	I) Inkubations- zeit II) Tragedauer	Proliferations- Assay bzw. Zellzahl	ALP (Aktivität bzw. Nachweis)	In vivo Parameter I) BV/TV II) BIC
Becker et al. ⁴⁵	PEEK/ RGD-Peptid	R _q 1) 28 nm (PEEK) 2) 32 nm (PEEK-RGD)	90 grd zu 55 grd	Humane Osteo- blasten	5x10 ⁴ Zellen in 2ml Medium/Probe	I.A) 24h I.B) 7d	A) 1) 8 2) 112 B) 1) 2 2) 1281 Zellen/mm ²	-	-
Noiset et al. ⁵⁷	PEEK/ Fibronectin	R _a 1) 79 nm (PEEK) 2) - (PEEK-FN)	90 grd zu -	CoCa2 Zellen	5x10 ⁴ Zellen/Probe	I) 2h	1) <8000 2) 48700 Zellen/cm ²	-	-
Zheng et al. ⁴⁷	PEEK/ GRGD- Peptid	R _q 1) 2,34 μm (PEEK) 2) 2,65 μm (PEEK- GRGD)	90 grd zu 82,5 grd	MC3T3- E1 Zellen	5x10 ⁴ Zellen/Probe	I) 5d	MTT Assay 1) 0,35 OD 2) 0,39 OD	-	-

Tabelle 3 Referenzstudien von Probekörpern/Implantaten aus PEEK/Hydroxylapatit

Param./ Artikel	Oberfläche	Ober- flächen- rauheit	Wasser- kontakt- winkel	In vitro/in vivo	Zellansatz auf Probe/ Implantations- ort	I) Inkubations- zeit II) Tragedauer	Proliferations -Assay bzw. Zellzahl	ALP (Aktivität bzw. Nachweis)	In vivo Parameter I) BV/TV II) BIC
Wang et al. ⁵⁰	PEEK/n- FHA 40% FHA 60% PEEK	R _a 1) Smooth <0,2 µm 2) Rough 2-3 µm	83 grd zu 71 grd	osteoblast- like MG-63 Cells Hunde (Beagle)	1x10 ⁵ Zellen/Probe Prämolaren- Region im UK	I.A) 7d I.B) 14d II) 8 Wochen	WST-1 Assay A) 1) 1,31 OD 2) 1,18 OD B) 1) 1,37 OD 2) 1,36 OD	A) 1) 0,8 2) 0,9 B) 1) 8 2) 11 U/mg Protein	PEEK- FHA I) 70% (zu 56% bei PEEK) II) 38% (zu 14% bei PEEK)
Deng et al. ⁵¹	PEEK/n- HA/CF 25% n-HA 55% PEEK 20% CF	1) PEEK 2) PEEK/n- HA/CF Nicht genannt	87 grd zu 75 grd	osteoblast- like MG-63 Cells Hunde (Beagle)	2x10 ⁴ Zellen/Probe Prämolaren- Region im UK	I.A) 7d I.B) 14d II) 12 Wochen	WST-1 Assay A) 1) 1,1 OD 2) 1,3 OD B) 1) 1,5 OD 2) 1,6 OD	A) 1) 70 2) 70 B) 1) 108 2) 150 U grot	PEEK/n- HA/CF I) 69% (zu 58% bei PEEK)
Wei et al. ⁴⁸	PEEK/n- HA/CF 25% n-HA 55% PEEK 20% CF	R _a 1) 0,12 µm (control) 2) 1,93 µm (Gr. 2)	76 grd zu 32 grd	osteoblast- like MG-63 Cells Hunde (Beagle)	1x10 ⁵ Zellen/Probe Prämolaren- Region im UK	I.A) 7d I.B) 14d II) 8 Wochen	WST-1 Assay A) 1) 1,2 OD 2) 1,4 OD B) 1) 1,4 OD 2) 1,18 OD	A) 1) 9,8 2) 11,2 B) 1) 14,7 2) 17,3 U/mg Protein	PEEK/n- HA/CF I) 70% (zu 48% bei control)
Ma et al. ⁴⁹	PEEK/n- HA 40% HA 60% PEEK	R _a 1) 0,063 µm (PEEK) 2) 0,118 µm (PEEK/n- HA)	74 grd zu 51 grd	MC3T3-E1 Zellen	1-3x10 ⁴ Zellen/cm ²	I) 7d	CCK 8 Assay 1) 0,5 OD und 900 Zellen/Pk 2) 0,65 OD und 1200 Zellen/Pk	-	-

1.4.1 Oberflächenmodifizierung mit Niederdruckplasma

Plasma ist ein Aggregatzustand, der bei einem Teilchengemisch vorliegt, welches aus positiv geladenen Ionen umgeben von Elektronen besteht. Es entsteht, wenn einem Gas Energie z.B. in Form von hoher Spannung oder Wärme hinzugefügt wird. Durch die Energie werden die Gasmoleküle angeregt bis Elektronen die Atomhülle verlassen. Die Ionen im Plasma sind bestrebt, wieder elektrisch neutral zu werden. Die Reaktivität der Ionen ist dabei so stark, dass Elektronen aus chemischen Bindungen im Polymer von PEEK entfernt werden. Durch Anregung der Atome im Plasma kann zusätzlich Strahlung im Bereich von infrarot (IR) bis ultraviolett (UV) entstehen. Die UV-Strahlung ist energiereich genug, um ebenfalls Bindungen innerhalb des PEEK Polymers zu brechen. Bei der Plasmabehandlung von PEEK werden die Carbonylverbindungen, die Carboxylverbindungen und auch die aromatischen Ringstrukturen aufgebrochen, es kommt zur Radikalbildung und Reaktionen mit den im Plasma enthaltenen Ionen finden statt.^{43,52,53} Dies führt zu Polarisierung der Oberfläche und somit zur höheren Benetzbarkeit. Bei der Plasmabehandlung mit O₂ zeigt sich eine mit der Zeit wieder abnehmende Oberflächenbenetzbarkeit. Die Oberflächenbenetzbarkeit nimmt in den ersten 15 Tagen nach Plasmabehandlung ab und erreicht dann ein stabiles Plateau.⁴⁰ Es wird berichtet, dass nach dem initialen Abfall der Benetzbarkeit ein stabiler Zustand für 26 Monate erreicht werden kann, bevor eine erneute Abnahme der Benetzbarkeit auftritt.³⁸

In der Literatur werden verschiedenen Plasmavarianten zur Behandlung von PEEK beschrieben (NH₄⁺/Ar⁴³, O₂⁴², AAc/Ar⁴¹, Ar/H₂O⁴⁰). Die unterschiedlichen im Plasma enthaltenden Ionen führen nach Reaktion mit der Oberfläche von PEEK nachweislich zu einer verbesserten Zellreaktion gegenüber unbehandelten PEEK (siehe Tabelle 1). Eine Ausnahme stellt die Untersuchung von Rochford et al. dar, in der im Vergleich zu unbehandelten PEEK eine verminderte Zelladhärenz auf O₂ plasmabehandelten PEEK Oberflächen festgestellt wurde.⁴⁴

Man spricht bei der Anwendung von Plasma aus O₂, H₂O und NH₄⁺ von einer Funktionalisierung der Oberfläche durch Einbau von funktionellen Gruppen, welche als Bindungsstellen für die Zelladhäsion dienen sollen.⁵² Ein weiterer Effekt ist die topographische Modifikation der PEEK Oberfläche durch plasmachemische Ätzeffekte bei Plasmabehandlungen mit Edelgasen wie z.B. Argon.⁵⁴ Dabei stellt die Dauer der Plasmabehandlung einen wesentlichen Faktor dar. Ab einer Behandlung von ≥ 1800 s ist eine Veränderung des Mittenrauwertes R_a der Oberfläche nachweisbar.³⁸ Dabei werden bevorzugt amorphe Bereiche der Oberfläche abgetragen, was je nach Aufbau der Oberfläche zu unterschiedlich starken Ätzevorgängen führt.⁵⁵

1.4.2. Oberflächenmodifizierung mit RGD-Peptid

Die Aminosäuresequenz RGD wurde vermehrt in Proteinen zur Zellstabilisation und Zelladhäsion gefunden. Die Entdeckung machten 1984 Pierschbacher und Rouslahti in Proteinen wie z.B. Fibronectin oder Osteopontin. Diese zum großen Teil in der extrazellulären Matrix vorkommenden Proteine besitzen viele Funktionen im menschlichen Körper. Sie dienen unter anderem als Liganden für Oberflächen-Rezeptoren, sogenannte Integrine. Über die Integrine werden Zelladhäsion und zum Teil auch intrazelluläre Prozesse gesteuert. Sowohl die Gewinnung als auch die Synthese ganzer Proteine birgt eine Vielzahl von Komplikationen und Risiken, somit war die Feststellung, dass die RGD-Sequenz eine Schlüsselfunktion innerhalb eines ganzen Proteins besitzt ein Durchbruch für das Verständnis von Zelladhäsion.⁵⁶

Bis heute sind 24 Integrine bekannt, davon binden etwa die Hälfte an das RGD-Peptid. Durch die Bindung kommt es zu einem Ausbreiten der Zelle auf der Oberfläche und intrazelluläre Signalkaskaden werden gestartet, welche zur Proliferation und zur Differenzierung der Zelle führen. Diese Bindung vom RGD-Peptid an die gewünschte Oberfläche muss jedoch stärker sein als die kontraktile Kraft der Zelle, wie es z.B. bei einer kovalenten Bindung der Fall ist. Bei geringeren Kräften kann es sonst zu einem gegenteiligen Effekt kommen. Die Zelle bindet über die Integrine an den Liganden, wird dann jedoch losgelöst. Da die Rezeptoren besetzt sind, kann sie nicht mehr an anderen Strukturen binden; dieser Zustand führt zur Apoptose und wird als „anoikis“ bezeichnet. Der Begriff stammt aus dem Griechischen und bedeutet Heimatlosigkeit.⁵⁶ Dies wurde auch in der Untersuchung von Noiset et al.⁵⁷ deutlich. Sie beobachtete die Zelladhäsion von aus Osteosarkomen gewonnenen Zellen (CACo2) und kovalent an PEEK gebundenes Fibronectin.

Die Funktionalisierung der Oberfläche von Polymeren durch Proteine und Peptiden ist eine gängige Option zur Verbesserung ihrer Biokompatibilität und somit gut erforscht. Kantlehner et al.⁵⁸ untersuchten mit Peptidsequenzen (Arg-Gly-Asp-Phe-Lys) beschichtete PMMA Implantate an Kaninchen und verbesserte dadurch die Biokompatibilität von PMMA. Auch Eid et al.⁵⁹ hatten Erfolg als sie mit PepTite 2000TM (RGD-haltiges Peptid) beschichtete Polylactide/Polyglycolsäure-Scheiben in Rattenknochen implantierten und eine erhöhte Biokompatibilität feststellten.

In in vitro Versuchen von Becker et al.⁴⁵, Noiset et al.⁵⁷ und Zheng et al.⁴⁷ wurde eine verbesserte Biokompatibilität von kovalent an PEEK gebundenen Peptide oder Proteine im Vergleich zu unbehandelten PEEK festgestellt (siehe Tabelle 2).

Bei der Funktionalisierung spielt das Verfahren eine untergeordnete Rolle. Wie die betrachteten Studien zeigen, gibt es verschiedene Ansätze um Proteine/Peptide an PEEK zu binden. Wichtig ist nur, dass eine kovalente Bindung entsteht. Angriffspunkt ist bei allen Ansätzen die Reduktion der Carbonylgruppe, der sich wiederholenden Benzophenone. Bei der Funktionalisierung wurden Verfahren, die eine vorherige Beschichtung von PEEK voraussetzten, nicht mit in die Literaturrecherche einbezogen, wie z.B. bei Dennes et al.⁶⁰ der Fall. Sie beschichteten PEEK Probekörper mit einer Titan- und Zirconium Tetra(tert-butoxide)-Schicht, an welcher dann das RGD-Peptid kovalent gebunden wurde.

Die Sterilisation ist eine Grundvoraussetzung für Implantate nach DIN EN ISO 10993 bzw. DIN EN ISO 5832. Da dies beim Ansatz von Noiset et al.⁵⁷ aufgrund der Denaturierung des Proteins nicht möglich war, kommt diese Verfahren zur Steigerung der Biokompatibilität von Implantaten nicht in Frage.

1.4.3. Compound aus PEEK/Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (HA) ist ein natürlich vorkommendes Mineral mit der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Im menschlichen Körper kommt es in Form von carbonatsubstituiertem HA vor, welches in einer Matrix aus Proteinen (vornehmlich Kollagen) eingebettet ist.⁶¹ Im Vergleich zum reinen HA besitzt das des Knochens eine niedrigere Kristallinität, da Gitterplätze einzelner Ca^{2+} - oder OH^- -Ionen Fehlstellen enthalten bzw. durch Metallionen wie z.B. Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , CO_3^{2-} , F und/oder Cl substituiert wurden.⁶² Knochen besteht zu einem Anteil von etwa 40 %, Dentin zu einem Anteil von 70 % und Schmelz zu einem Anteil von 95 % aus HA.^{63,64}

Die Oberfläche von einem Compound aus PEEK und HA ist hydrophiler als reines, unbehandeltes PEEK. Dies zeigt sich in der Steigerung des Randwinkels und führt zu einer erhöhten Zelladhäsion von Osteoblasten (siehe Tabelle 3).^{48-51,65,66} Darüber hinaus führt die Präsentation von HA an der Oberfläche zu einer erhöhten Differenzierung der Osteoblasten, was durch die Aktivitätszunahme der alkalischen Phosphatase (ALP) nachgewiesen wurde.^{49,51,67} Zhao et al. führten die erhöhte ALP Aktivität und die erhöhte Zelladhäsion auf die höhere interzelluläre Ca^{2+} -Ionenkonzentration zurück. Die höhere Ca^{2+} -Ionenkonzentration führt zur Stimulation der Expression von Proteinen und Enzymen, die an der Zelladhäsion und der Zelldifferenzierung beteiligt sind.⁶⁷

Entsprechend wird in der Literatur Implantaten, die mit HA beschichtet sind sowie Implantaten aus PEEK/HA Compounds eine verbesserte Biokompatibilität zugeschrieben.^{48–51,68,69} Diese PEEK/HA Compounds hatten prozentual unterschiedliche HA-Anteile. Wang et al.⁵⁰ untersuchten einen Fluor-HA-Gehalt von 40%, während Deng et al.⁵¹ und Wei et al.⁴⁸ einen HA-Gehalt von 25% untersuchten (siehe Tabelle 1). Dabei lagen bei den Untersuchungen von Ma et al.^{49,65,66}, welcher prozentuale HA-Gehalt zur höchsten Biokompatibilität führt, keine Übereinstimmungen vor (siehe Tabelle 4). Daher kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass die Präsentation von HA-Partikeln an der Oberfläche zu einer verbesserten Zelladhäsion und Zelldifferenzierung führt.^{48–51,65,66}

Tabelle 4 Unterschiedliche Ergebnisse der besten Zellreaktion je nach HA-Gehalt des untersuchten PEEK/HA Compounds

Artikel	HA-Gehalt des Ausgangsmaterials	HA-Gehalt mit höchster Biokompatibilität
Ma et al. ⁶⁶ (2013)	2,6 %; 5,6 %; 13,4 %; 23,9 %	5,6 %
Ma et al. ⁴⁹ (2014)	20 %; 40 %; 60 %	40 %
Ma et al. ⁶⁵ (2019)	10 %; 20 %; 30 %; 40 %	30 %

Zusätzlich zu der verbesserten Biokompatibilität beschreiben Wang et al.⁵⁰ eine antibakterielle Wirkung unter Verwendung von PEEK/Fluor-Hydroxylapatit Compounds. Dies könnte in Bezug auf die Ätiologie von Periimplantitis ein zusätzlicher Vorteil gegenüber konventionellen Titanimplantaten darstellen.

Neben der veränderten Biokompatibilität zeigen Compounds mit HA auch veränderte mechanische Eigenschaften. Wang et al. beschreiben für PEEK/Fluor-HA im Vergleich zu ungefüllten PEEK eine Zunahme der Zugfestigkeit von 82,5 auf 137,6 MPa und des E-Moduls von 3,9 auf 12,1 GPa.⁵⁰

1. 5. Zellkulturparameter

Wie in der Literatur ersichtlich, führen alle in der Literaturrecherche erfassten Modifikationsmöglichkeiten nach Aussage der Autoren zu einer höheren Biokompatibilität/Osseointegration (siehe Tabelle 1 - 3). Da jedoch kein direkter Vergleich zwischen den unterschiedlich modifizierten Oberflächen im selben Versuch durchgeführt wurde und ein absoluter Vergleich der Studien untereinander nicht möglich ist, sollte eine Vergleichsstudie durchgeführt werden, um die optimale Oberflächenmodifizierung zu bestimmen. Dafür scheint zunächst ein *in vitro* Versuch anhand einer Zellkultur sinnvoll.

Untersuchungen mit isolierten humanen Osteoblasten schafft im Vergleich zu anderen Zelllinien (osteoblast-like MG-63, MC3T3-E1, CoCa2) die beste Übertragbarkeit auf die physiologischen Vorgänge bei der Implantateinheilung im menschlichen Knochen.⁷⁰ Solche *in vitro* Versuche dienen dazu, die Wechselwirkungen von Zellen auf verschiedenen Materialoberflächen mit kontrollierten, künstlichen und möglichst reproduzierbaren Bedingungen zu untersuchen.

Dabei sollten die Ergebnisse des *in vitro* Versuchs eine Orientierung für spätere *in vivo* Versuche ermöglichen, um überflüssige *in vivo* Versuche zu vermeiden. Grundvoraussetzung für die Osseointegration ist die Biokompatibilität einer Implantatoberfläche, welche vorliegt, wenn diese beim Kontakt mit Gewebe nicht zum Tod der Zellen oder zu einer Beeinträchtigung der zellulären Funktionen führt. Um eine hohe Übertragbarkeit vom *in vitro* Versuch auf die Prozesse der Implantateinheilung zu schaffen, wurden die Faktoren untersucht, welche bei dem Prozess der primären Knochenheilung beteiligt sind.¹² Vier physiologische Aspekte der Knochenheilung spielen bezogen auf den Osteoblasten eine wesentliche Rolle.

Nach der Entstehung eines Knochendefektes (Fraktur/Implantatbettbohrung) und die dadurch freigesetzten Zytokine (siehe 1.2.1. Osseointegration) kommt es als Erstes zur Rekrutierung von Osteoblasten. In vivo werden diese aus Restzellen am Frakturspalt und aus Osteoprogenitorzellen rekrutiert.^{71,72} In einem in vitro Versuch wird dieser Schritt durch das direkte pipettieren der Zellen auf die Probekörper imitiert. Es folgt das Attachment der Osteoblasten auf den Frakturspalten bzw. den Flächen des Knochen-Implantat-Interfaces. Diese Phase stellt eine Voraussetzung für die zwei folgenden Phasen der Proliferation und der Zelldifferenzierung dar. Das Attachment der Zellen kann nach dem Anfärben der Zellen und mehreren Spülvorgängen, welche die nicht adhärierenden Zellen entfernten, durch ein Digitalmikroskop nachgewiesen werden. Proliferierende Zellen haben einen aktiven Zellstoffwechsel, dieser kann über die Zellviabilität nachgewiesen werden. Je höher die Zellviabilität, desto mehr Zellen entstehen durch Zytokinese. Durch die zunehmende Proliferation der Zellen nimmt auch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche zur Zelldifferenzierung führen zu. Aus dem unreifen proliferierenden Osteoblast wird ein sekretorischer Osteoblast. Dabei spielen die Proteine Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin, Bone Sialoprotein, alkalische Phosphatase sowie die Synthese von Kollagen Typ I eine Rolle. Um diese Zelldifferenzierung nachzuweisen, kann die Aktivität dieser Enzyme gemessen und somit nachgewiesen werden.

1.5.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung

Die Zelladhäsion beschreibt die Bindung zwischen Zellen untereinander oder zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix. Im zweiten Fall wird sie über Adhäsionsproteine in der Zellmembran (hauptsächlich Integrine) und Moleküle der extrazellulären Matrixproteine (Fibronectin, Kollagen, Laminin und Fibrin) vermittelt. Bei der Zelladhäsion auf Fremdkörpern müssen die Moleküle der extrazellulären Matrixproteine auf der Oberfläche präsentiert werden, um es z.B. Osteoblasten zu ermöglichen an dem Fremdkörper zu binden.⁷³ Dabei stammen die Matrixproteine in in vitro Versuchen aus dem Kälberserum des Nährmediums und haften über kovalente Bindungen (Radikale an der Oberfläche), elektrostatische oder ionische Wechselwirkung an der Oberfläche des Fremdkörpers.⁷⁴

Die Topographie der Oberfläche spielt dabei eine wesentliche Rolle, da über die Rauheit und die Oberflächenbeschaffenheit die Abstände der möglichen Bindungsstelle eine mehr oder weniger günstige Konformation der Adhäsionsmoleküle ermöglicht. Die günstigsten Bedingungen für die Zelladhäsion weisen Oberflächen mit einem Randwinkel zwischen 40 grd und 70 grd und ein Mittenrauwert R_a von 240 nm bis 1900 nm auf, da in diesem Fall die räumliche Anordnung der Adhäsionsproteine erhalten bleibt.^{75,76}

Um die Zelladhäsion auf den verschiedenen Probekörpern zu quantifizieren werden Osteoblasten angefärbt, um dadurch die Zellbedeckung sichtbar zu machen. Ein gängiger Farbstoff zum Anfärben von Zellen ist Neutralrot. Neutralrot (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazin Hydrochlorid, siehe Abbildung 5) ist ein rötlicher und leicht kationischer Farbstoff. Bei einem pH-Wert von 7,4 ist er ungeladen und kann die Zellmembran der Osteoblasten durch Diffusion und Endozytose passieren. Das Molekül bindet an die anionischen Anteile der lysosomalen Membran und passiert sie. Aufgrund seiner Eigenschaft im sauren Milieu zum rötlichen Ion zu werden, färbt sich Neutralrot im sauren Milieu der Lysosomen. Als Ion kann der Farbstoff die lysosomale Membran nicht mehr passieren und verbleibt irreversibel. Dabei kommt es zu keinen Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und der Zelle. Tote Zellen werden aufgrund der beschädigten Lysosomen nicht gefärbt.⁷⁷

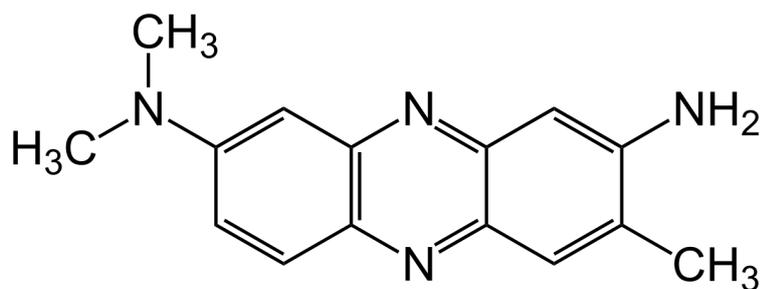


Abbildung 5 Valenzstrichformel von Neutralrot⁷⁷

Rot ist eine Grundfarbe im Wellenlängenbereich von 620 nm bis 780 nm. Durch eine Lichtquelle (wie z.B. Weißlicht LED) wird sichtbare elektromagnetische Strahlung in Form von Licht auf den Probekörper gegeben und mit einer bestimmten Wellenlänge von den rot gefärbten Zellen und dem farbigen Probekörper emittiert. Durch Farbsensoren, welche Photodioden mit Farbfiltern enthalten (Filter, welche nur für Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässig sind), wird das Licht zu einem elektrischen Signal übersetzt. So kann computergesteuert eine quantitative Auswertung der Farbbeschaffenheit der Probekörperoberfläche durchgeführt werden.⁷⁸

1.5.2. Zellviabilität - Alamar Blue Assay

Alamar Blue (Synonym: Resazurin, 7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one10-oxide) ist ein nicht zytotoxischer, wasserlöslicher, zellpermeabler, in der klinischen Chemie häufig verwendeter Farbstoff, der als Redoxindikator eingesetzt wird. Er wird zur Messung der Zellviabilität und zur Beurteilung der Proliferation verwendet.^{79,80} Der Farbstoff dient als Elektronenakzeptor im Stoffwechsel von lebenden Zellen. Als Indikatorfarbstoff nimmt das nicht-fluoreszierende blaue Resazurin im oxidierten Zustand Elektronen an und wird (hauptsächlich durch die mitochondriale Reduktase) irreversibel zum fluoreszierenden rosafarbenen Resorufin reduziert (siehe Abbildung 6).⁸¹

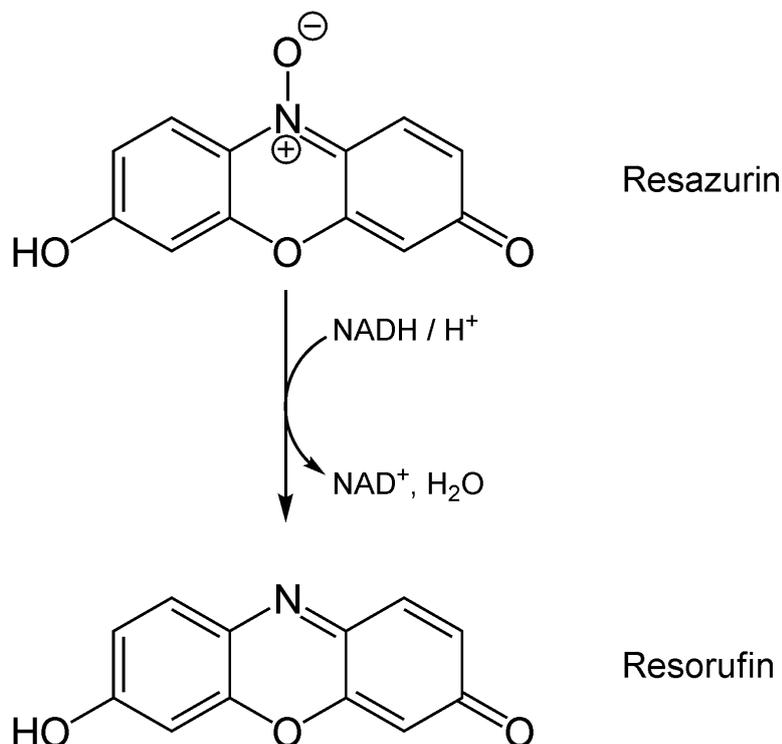


Abbildung 6 Alamar Blue Assay Redoxreaktion von Resazurin zu Resorufin⁸²

Die Reduktion von Resazurin erfordert NADH/H⁺, welches ein Produkt bei der ATP Synthese ist. Neben der oben beschriebenen mitochondrialen Reduktase können mehrere andere Enzyme, wie die Diaphorase, die Oxidoreductase und die Flavinreductase, sowohl im Zytoplasma als auch im Mitochondrium, ebenfalls Resazurin reduzieren.⁸³ Somit spiegelt die Reduktion nicht alleinig die mitochondriale Funktion wieder, sondern eher die Energiekapazität und Zellviabilität der Zelle.

Mittels Spektrophotometrie kann die Absorptionsmessung bei 570 nm und 600 nm Wellenlänge erfolgen. Dies bedeutet, dass die Intensität des monochromatischen Lichts der Wellenlängen 570 nm und 600 nm eine unterschiedlich starke Intensität vor und nach Durchdringen der Lösung besitzt. Bei unserem Versuch wurde die Extinktion gemessen. D.h. das Maß für die Abschwächung einer Strahlung nach Durchqueren eines Mediums. Die Extinktion nimmt exponentiell mit steigender Konzentration von Resofurin (Reduktionsprodukt von Resazurin) zu.

Das pH Optimum der Redoxreaktion liegt zwischen 7.0 und 7.4, daher sollte dem Medium ein pH Puffer hinzugefügt werden. Die optimale Temperatur für das Assay beträgt 37 °C und die Inkubation sollte aufgrund der Photosensitivität im dunklen stattfinden.⁸³ Bei zu langer Inkubation, beziehungsweise zu langer Lagerung kann eine weitere, reversible Reaktion stattfinden, die das farblose Produkt Dihydroresorufin zur Folge hat.⁷⁹ Mikrobielle Kontamination führt zu einer zusätzlichen Reduktion des Farbstoffes und könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen.⁸³

Die Anwendung des Alamar Blue Assays bei Zellversuchen mit Osteoblasten ist in der Literatur gut untersucht und aufgrund mehrerer Vorteile gegenüber anderen Proliferation-/Viabilität-Assays weit verbreitet.⁸⁴⁻⁸⁷ Andere Assays wie Tetrazolium-Verbindungen, z.B. MTT oder Assays mit an radioaktiven Molekülen gekoppelte Reagenzien, wie Assays mit Iododeoxyuridinen sind aufwändiger in ihrer Anwendung oder beinhalten radioaktive/toxische Substanzen.⁸⁸ Die Hauptvorteile von Alamar Blue sind die direkte Umsetzung von Resazurin ohne notwendige Zusätze sowie die Möglichkeit weitere Untersuchungen mit den Zellen durchführen zu können, da ihr Zellstoffwechsel nicht beeinflusst wird.

1.5.3. Zelldifferenzierung - Alkaline Phosphatase Assay

Alkalische Phosphatase (ALP) ist eine Gruppe von Enzymen, die Phosphatsäureester hydrolysieren können. Im menschlichen Körper können sie in höheren Konzentrationen vor allem in Leber, Knochen, Niere, Plazenta und in der intestinalen Mukosa nachgewiesen werden. Ihre Aufgabe besteht darin Phosphatreste von Molekülen zu entfernen (Dephosphorylierung). Alkalische Phosphatasen werden nach den Isoenzymen in drei Hauptgruppen eingeteilt, organspezifische ALP aus der intestinalen Mukosa, die aus der Plazenta und nicht spezifische ALP (Knochen/Leber/Niere).⁸⁹

Durch Gelelektrophorese ist es möglich, die nicht spezifische ALP je nach Herkunft zu trennen und somit zu unterscheiden. Grund dafür sind die unterschiedlich geladenen Kohlenhydratanteile des Polypeptidrückrats der Enzyme.⁹⁰ Die nicht spezifische, im Knochen anzufindende ALP spaltet z.B. Pyrophosphat auf, dabei wird das zum Einbau in den Knochen benötigte Phosphat gewonnen. Phosphat wiederum wird in Osteoblasten mit Kalzium zu Kalziumphosphat gebunden, dem Grundbaustein von Hydroxylapatit.⁹¹

Die Aktivitätsbestimmung von ALP erfolgt durch Dephosphorylierung des farblosen Substrats para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zum gelblichen Produkt para-Nitrophenol (pNP) (siehe Abbildung 7). Mittels Spektrophotometrie kann die Absorptionsmessung bei 405 nm Wellenlänge erfolgen. Dies bedeutet, dass die Intensität des monochromatischen Lichts der Wellenlängen 405 nm eine unterschiedlich starke Intensität vor und nach Durchdringen der Lösung besitzt. Bei unserem Versuch wurde die Extinktion gemessen. D.h. das Maß für die Abschwächung einer Strahlung nach Durchqueren eines Mediums. Die Extinktion nimmt exponentiell mit steigender Konzentration von para-Nitrophenol (pNP) zu.⁹²

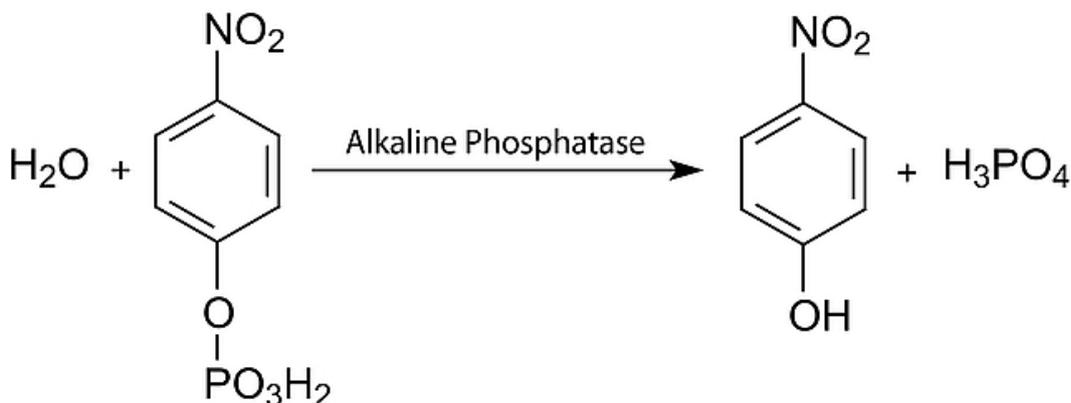


Abbildung 7 Dephosphorylierung von para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zu para-Nitrophenol (pNP)⁹²

Der komplexe Prozess der Zelldifferenzierung von Osteoblasten kann in drei Phasen eingeteilt werden: 1. schnelle Proliferation (Tag 1 - Tag 10), 2. Matrixmaturation (Tag 10 - Tag 21) und 3. Mineralisation (ab Tag 21).⁹³ Die Osteoblastendifferenzierung kann anhand einer Reihe von Parametern untersucht werden, durch Steigerung der Konzentration des jeweiligen Parameters kann die zugehörige Phase zugeordnet werden.⁹⁴

Während der Proliferationsphase ist die vermehrte Expression von extrazellulären Matrixproteinen (Prokollagen I, TGF- β und Fibronectin) nachweisbar. Die Phase der Matrixmaturation ist durch die maximale Expression der ALP charakterisiert. Die Phase der Mineralisation beginnt durch die steigende Expression von Proteinen die für die Mineralisation von Kollagenmatrix benötigt werden (Osteocalcin, Bone Sialoprotein und Osteopontin).^{93,94}

Somit spiegelt die ALP-Aktivität das Maß an Differenzierung der Osteoblasten wider, von proliferierenden Zellen hin zu funktionsfähigen, knochenbildenden Zellen. Daher ist die Messung der ALP-Aktivität ein gängiger Parameter zur Untersuchung der Zelldifferenzierung bei Osteoblastenkulturen.^{40,43,48,50,51,90}

1. 6. Fragestellung

Unter der Hypothese, dass PEEK Oberflächen, welche durch Plasma, kovalente Bindung von RGD-Peptiden oder Compoundierung mit HA funktionalisiert wurden eine vergleichbare Biokompatibilität zu Titan und eine höhere Biokompatibilität als unbehandelte PEEK Oberflächen aufweisen, war das Ziel des vorliegenden in vitro Versuchs, den Einfluss dieser Oberflächenmodifizierungen auf humane Osteoblasten im Vergleich zu unbehandelten PEEK und Titan zu untersuchen.

Entsprechend lagen der Untersuchung folgende Fragestellungen zugrunde:

- Welche Auswirkung hat die Auswahl des PEEK Ausgangsmaterial i2/i4 und damit die unterschiedlichen Polymerkettenlängen auf die untersuchten Zellkulturparameter?
- Können bei Betrachtung der unterschiedlichen Parameter Rückschlüsse daraus gezogen werden, welche Oberflächen-/Materialmodifizierungen von PEEK die beste Zellreaktion hinsichtlich einer osseointegrativen Eigenschaft besitzt?
- Welchen Einfluss auf die Zellreaktion haben die verschiedenen Oberflächen-/Materialmodifizierung im Vergleich zu unbehandeltem PEEK (Negativkontrolle) und Titan (Positivkontrolle)?

2. Material und Methode

2.1. Übersicht Versuchsaufbau

Insgesamt wurden 248 Probekörper [n = 248] in Form von runden Scheiben (Höhe 2,5 mm; Durchmesser 12 mm PEEK und 10 mm Titan) hergestellt poliert, sterilisiert und entsprechend des Ausgangsmaterials und der Oberflächenbehandlung in acht unterschiedlichen Probekörpergruppen eingeteilt (siehe Abbildung 8): ti (Titan (FRIATEC AG, Mannheim, Deutschland); n = 31), ha (PEEK Optima HA (Invibio Ltd, Thornton-Cleveleys, Vereinigtes Königreich) mit 20 % Hydroxylapatit; n = 31), i2u (VESTAKEEP i2 (Evonik Resource Efficiency GmbH, Darmstadt, Deutschland) unbehandelt; n = 31), i2p (VESTAKEEP i2 O₂/Ar plasmabehandelt; n = 31), i2rgd (VESTAKEEP i2 RGD-gebunden), i4u (VESTAKEEP i4 (Evonik Resource Efficiency GmbH, Darmstadt, Deutschland) unbehandelt; n = 31), i4p (VESTAKEEP i4 O₂/Ar plasmabehandelt; n = 31), i4rgd (VESTAKEEP i4 RGD-gebunden).

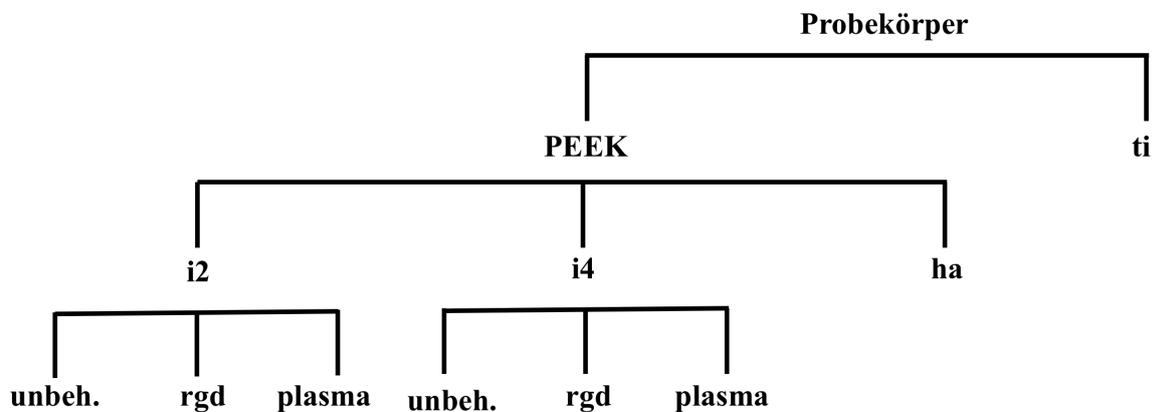


Abbildung 8: Schema der verschiedenen untersuchten Probekörpergruppen

Zur Oberflächencharakterisierung wurde der Mittenrauwert R_a und der Randwinkel θ aller Probekörper gemessen, teilweise nach einer durchgeführten Oberflächenmodifikation. Die Probekörper wurden dann über einen Zeitraum von 21 Tagen in Zellkulturen mit humanen Osteoblasten inkubiert und nach 1, 3, 7, 10 und 14 Tagen jeweils 5 Probekörper ($n = 5$) und nach 21 Tagen 6 Probekörper ($n = 6$) pro untersuchte Probekörpergruppe entnommen und die Zellkulturparameter (Alamar Blue Umsatz (AB), Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) und die Auswertung der Flächenbedeckung (FB)) bestimmt (siehe Abbildung 9).

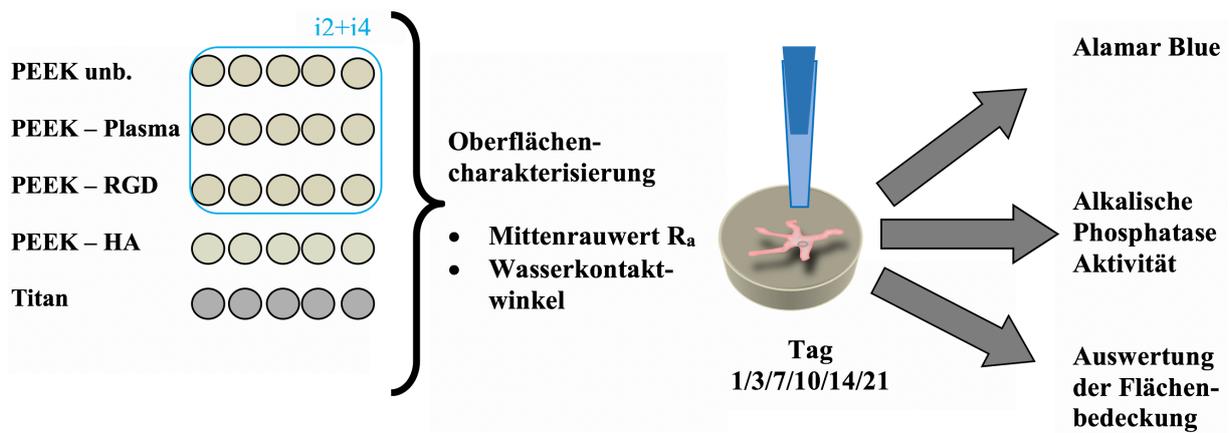


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

2. 2. Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial für die PEEK Probekörper dienten Halbzeuge in Form von Rundstangen aus implantierbaren PEEK (VESTAKEEP i2 und VESTAKEEP i4) mit einem Durchmesser von 50 mm sowie einer Länge von 50 cm die ursprünglich durch Extrusionsverfahren hergestellt wurden. Das Material diente vorliegendem Versuch als Negativkontrolle (PEEK unbehandelt) und zur weiteren Oberflächenmodifikation durch die Funktionalisierung über das RGD-Peptid und über die Plasmabehandlung.

Die VESTAKEEP Halbzeuge entstanden über den nukleophilen Syntheseweg durch die Reaktion von 4,4'-Difluorbenzophenon mit Hydrochinon, wobei Polymerketten mit einer definierten Kettenlänge gebildet werden können. Je länger diese Polymerketten sind desto höher ist die spätere Schmelzviskosität. Dies spielt beim Produktionsverfahren und für die spätere Verarbeitung eine Rolle. Das PEEK VESTAKEEP i2 und i4 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Schmelzviskosität. Die Auswirkungen auf die Materialeigenschaften sind in Tabelle 5 aufgeführt. Nach Angaben von Evonik Resource Efficiency GmbH besitzt i2 kürzere und i4 längere Polymerketten, genaue Angaben über die Polymerkettenlänge wurde hier vom Hersteller nicht genannt.

Daneben wurde mit PEEK Optima HA zusätzlich ein Compound aus PEEK und Hydroxylapatit verwendet. Die Produktion gleicht im wesentlichen dem des Ausgangsmaterials VESTAKEEP. Bei der Herstellung durch Extrusion der Rundstangen von PEEK Optima HA wird beim Einschmelzen der vorpolymerisierten PEEK Pellets 20 % Hydroxylapatit hinzugefügt. Dieses lagert sich homogen im Composite ein.^{95,96} Die Auswirkungen auf die Materialeigenschaften sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Im vorliegenden Versuch dienten Titanprobekörper aus Reintitan in Form von runden Scheiben mit einer von Höhe 2,5 mm und einem Durchmesser von 10 mm als Positivkontrolle, sie wurden von der FRIATEC AG geliefert. Im weiteren Verlauf wurden sie mit der gleichen Methodik wie die PEEK Probekörper vorbehandelt.

Tabelle 5 Materialeigenschaften des verwendeten PEEK Ausgangsmaterials ^{35,95}

Materialeigenschaft	PEEK i2 (Vestakeep)	PEEK i4 (Vestakeep)	PEEK/HA (PEEK Optima HA)
Zugfestigkeit [MPa]	100	109	90
Bruchfestigkeit [MPa]	70	70	70
Zugdehnung [%]	20	20	5
Biegefestigkeit [MPa]	165	165	150
E-Modul [GPa]	4	4	3,8
Kerbschlagzähigkeit [kJ/m ²]	6	5,5	4
Dichte [g/cc]	1,3	1,3	1,43 - 1,49
Glasübergangstemperatur [°C]	145	145	135 - 155
Rekristallisationstemperatur [°C]	285	285	270 - 310
Schmelztemperatur [°C]	340	340	330 - 350

2. 3. Probekörperherstellung

Die Rundstangen aus PEEK bzw. PEEK/HA wurde durch Spanabtrag sowie durch Teilung auf die gewünschten Maße von einem Durchmesser von 12 mm und einer Länge von 10 cm zur Probeherstellung reduziert und anschließend mit einer Präzisionssäge (Buehler IsoMet1000 Precision Saw; ITW Test & Measurement GmbH, Esslingen am Neckar, Deutschland) unter Wasserkühlung jeweils zu scheibenförmigen Probekörpern mit einer Höhe von 2,5 mm zugeschnitten. Die beiden entstandenen Oberflächen wurden bezüglich ihrer Funktionsweise unterschieden. Oberfläche A diente der späteren Besiedelung mit humanen Osteoblasten und Oberfläche B als Unterseite des Probekörpers. Im ersten Schritt wurden beide Seiten im Nassschleifverfahren (Struers LaboPol 25; Struers GmbH, Willich, Deutschland) für 2 min mit Schleifpapier (Buehler, MicroCut-Siliziumkarbid-Schleifpapiere; ITW Test & Measurement GmbH, Esslingen am Neckar, Deutschland) der Körnung 2500 entgratet. Die Fläche B wurde dann mit einem Rosenbohrer durch eine Einkerbung markiert und die Fläche A in einem weiteren Polierschritt wieder im Nassschleifverfahren für 4 min mit Schleifpapier der Körnung 4000 bearbeitet. Anschließend erfolgte eine Reinigung für 5 min im Ultraschallbad (REITEL Feinwerktechnik GmbH, Bad Essen, Deutschland) und die Desinfektion im Ethanolbad (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 5 min.

Die Sterilisation erfolgte durch das UV-Licht der Sicherheitswerkbank (HERAsafe KS; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) zunächst der Oberfläche B, dann der Oberfläche A für jeweils 5 min.

Für die Probekörper der Probekörpergruppen i2u, i4u, ha und ti erfolgte nach der Sterilisation keine weitere Oberflächenmodifikation, sondern direkt die Oberflächencharakterisierung (siehe Punkt 2. 4).

2.3.1. Oberflächenmodifizierung mit Niederdruckplasma

Je 31 Probekörper der Probekörpergruppe i2p und i4p wurden unter sterilen Bedingungen der Sicherheitswerkbank in das Plasmagerät (Plasma System FEMTO PCCE; Diener electronic GmbH, Ebhausen/Germany) gegeben und für 35 min bei 70 °C mit Argon/Sauerstoff Plasma (Verhältnis 1:1) bei 0,2 bar behandelt. Im Anschluss wurde 60 min gewartet, bevor die Zellsuspension auf die Probekörper appliziert wurde.

2.3.2. Oberflächenmodifizierung mit RGD-Peptid

Die kovalente Bindung des RGD-Peptids an die PEEK Oberflächen nach Becker et al.⁴⁵ begann damit, Ethylenediamin (EDA, Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kovalent an die Carbonylgruppe des PEEKs zu binden. Dies wurde durch mehrmaliges tauchen der Probekörper in das Ethylenediamin-Bad bei 120 °C für insgesamt 4 h erreicht. Gefolgt von einem Spülprozess mit steril filtriertem Laborwasser (Nowadest®; KSN-Wassertechnik, Nistertal, Deutschland) und 2-Propanol (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Im Anschluss wird das Fixierungsmolekül Ethylen-glycol-diglycidyl-ether (DGE, Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kovalent an das Ethylenediamin gebunden, indem die Probekörper für 2 h in DGE Lösung (5 % DGE und 50 mM Carbonat-Bicarbonat Puffer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)) gelagert werden, wiederum gefolgt von einem Spülprozess mit steril filtriertem Laborwasser. Als letzter Schritt wird das RGD-Peptid an das Ethylen-glycol-diglycidyl-ether gebunden. Dazu werden die Probekörper in einer Lösung mit 0,2 mg/ml RGD-Peptid (Abcam AG, Cambridge, Vereinigtes Königreich) und 50 mM Carbonat-Bicarbonat Puffer für 8 h gelagert (siehe Abbildung 10).⁴⁵

Die Funktionalisierung der PEEK Probekörper durch das RGD-Peptid wurde von Dr. Matthias Gabriel durchgeführt.

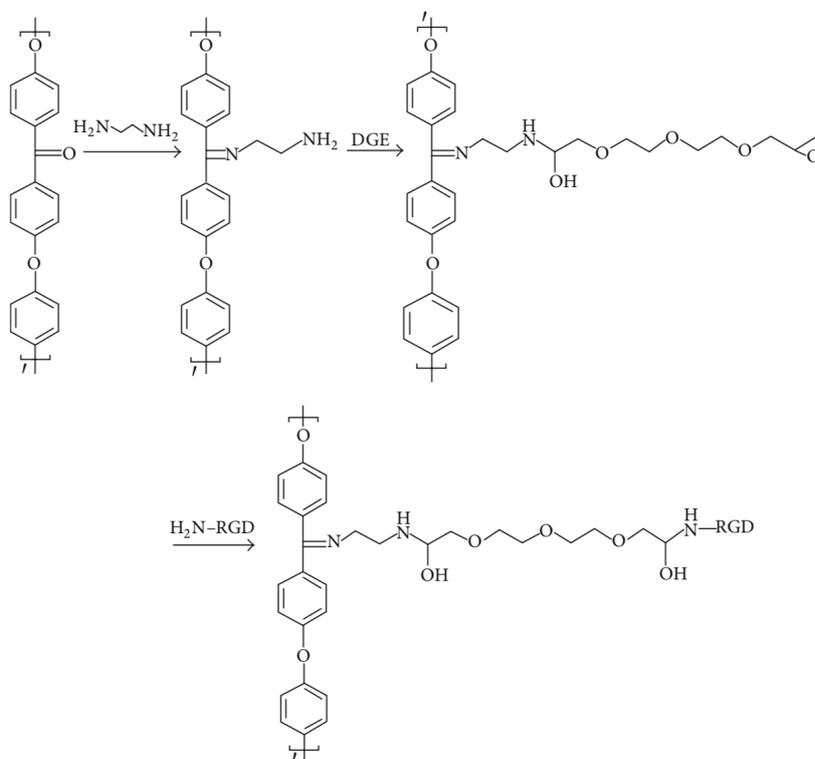


Abbildung 10: Reaktionsschema der Oberflächenveredelung von PEEK durch RGD Peptid nach Becker et al.⁴⁵

2. 4. Oberflächencharakterisierung

2.4.1. Oberflächenrauheit

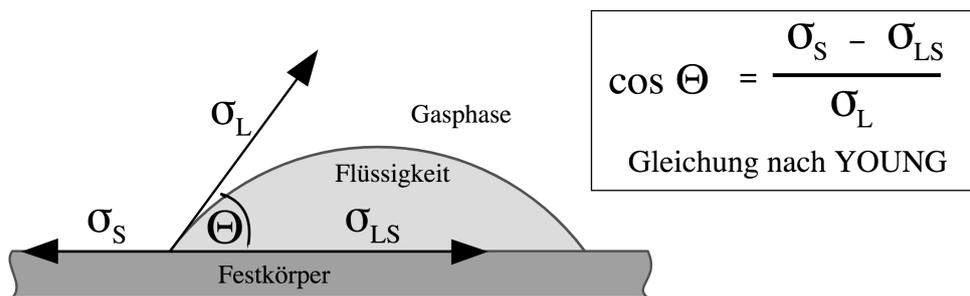
Mit einem Digitalmikroskop (Alicona InfiniteFocus Mikroskop, Alicona Imaging GmbH, Raaba, Österreich, siehe Abbildung 11) wurde durch Focus Variation der Mittenrauwert R_a der produzierten Probekörper bestimmt. Nachdem eine Aufnahme von der Oberfläche des jeweiligen Probekörpers mit 100-facher Vergrößerung gemacht wurde, erfolgte die Auswertung der Oberflächenrauheit mit der zugehörigen Software Measure Suite 5.3.1.



Abbildung 11: Alicona InfiniteFocus Mikroskop⁹⁷

2.4.2. Randwinkelmessung

Der Wasserkontaktwinkel θ (siehe Abbildung 12, im weiteren Verlauf als Randwinkel bezeichnet) wurde mit 10 μl H_2O bei 22 °C mit einem Rundwinkelmessgerät (Zeiss Mikroskop Axio Lab.A1 Pol HAL 35; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) optisch gemessen. Dabei wurde der Rundwinkel eines Tropfens steril filtrierten Laborwassers auf der Probekörperoberfläche nach 10 Sekunden und nach 60 Sekunden vom Durchsichtfeld abgelesen und anschließend gemittelt.



σ_L = Oberflächenspannung der Flüssigkeit

σ_S = Oberflächenenergie des Festkörpers

σ_{LS} = Grenzflächenenergie zwischen Flüssigkeit
und Festkörper

Θ = Kontaktwinkel

Abbildung 12: Schema der Randwinkelmessung⁹⁸

2. 5. Zellkultivierung humaner Osteoblasten

Bei -80°C gelagerte Humane Osteoblasten (provitro human osteoblasts (cryo) Store at 24.08.15, Cat No.:1210311, Lot No.:228P170815; Provitro AG, Berlin, Deutschland) wurden bei 20 °C aufgetaut und als zweite Passage zusammen mit 10 ml Nährmedium (Osteoblast growth medium, Provitro AG, Berlin, Deutschland) in eine 25 cm² Zellkulturflasche (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) pipettiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Heraeus Kulzer Brutschrank B 5028; Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) inkubiert.⁹⁹ Der Verlauf der Zellkultivierung ist in Tabelle 6 und Tabelle 7 aufgelistet.

Das verwendete Nährmedium wurde nach dem Protokoll zur Kultivierung von humanen Osteoblasten der Firma Provitro angewandt. Das Nährmedium wurde 24 h nach dem Umsetzen der Zellen sowie, wenn nicht durch den Umsetzvorgang unterbrochen, alle 72 h ausgetauscht.¹⁰⁰

Die Zellkulturflaschen wurden täglich unter dem Durchlichtmikroskop bei 50-facher Vergrößerung untersucht. Wenn die Zellen ca. 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurden sie in zwei neue Zellkulturflaschen umgesetzt.

Bei der Passage von einer besiedelten auf zwei neue Zellkulturflaschen (75 cm²) wurde zunächst das Nährmedium aspiriert und 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf den Boden der Flasche gegeben, welche nach fünf Minuten wieder aspiriert wurden. Im Anschluss wurde 1,5 ml Trypsinlösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in die besiedelte Zellkulturflasche pipettiert und für fünf Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen. Um den Vorgang zu beenden, wurde 10 ml Nährmedium hinzugefügt. Nun erfolgte das Überführen der Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen, welches dann bei 1000 Umdrehungen/min für 5 min zentrifugiert wurde (Heraeus Minifuge RF; Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland). Die überstehende Flüssigkeit wurde vorsichtig aspiriert, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und erneut bei 1000 Umdrehungen/min für 5 min zentrifugiert. Das überstehende PBS wurde ebenfalls aspiriert und im Anschluss wurden 10 ml Nährmedium hinzugefügt. Das durch das Zentrifugieren entstandene Zellpellet wurde durch mehrmaliges langsames Schwenken des Zentrifugenröhrchens aufgelöst. Die nun entstandene Zelllösung wurde auf zwei neue Zellkulturflaschen mit zusätzlich jeweils 5 ml Nährmedium verteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank als fortlaufende Passage inkubiert.

Tabelle 6 Verlauf der Zellkultivierung vor Versuchsbeginn

Zellzyklus	Kultivierungsphase
Tag 1	Ansetzen der zweiten Passage P2
Tag 2	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 3	Proliferationsphase
Tag 4	Proliferationsphase
Tag 5	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 6	Proliferationsphase
Tag 7	Passage zu P3
Tag 8	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 9	Proliferationsphase
Tag 10	Proliferationsphase
Tag 11	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 12	Proliferationsphase
Tag 13	Passage zu P4
Tag 14	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 15	Proliferationsphase
Tag 16	Proliferationsphase
Tag 17	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 18	Proliferationsphase
Tag 19	Proliferationsphase
Tag 20	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 21	Proliferationsphase
Tag 22	Proliferationsphase
Tag 23	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 24	Proliferationsphase
Tag 25	Proliferationsphase
Tag 26	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 27	Passage zu P5
Tag 28	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 29	Proliferationsphase
Tag 30	Proliferationsphase
Tag 31	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 32	Proliferationsphase
Tag 33	Passage zu P6
Tag 34	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 35	Proliferationsphase
Tag 36	Proliferationsphase
Tag 37	Nährmedium gewechselt, Proliferationsphase
Tag 38	Proliferationsphase
Tag 39	Versuchsbeginn mit P6, Passage in Well mit Probeköper P7

Nach 39 Tagen wurde mit der 6. Passage eine Zellsuspension von 30.000 humanen Osteoblasten pro ml angesetzt. Die Zellanzahl der Zellsuspension wurde durch Entnahme von 50 µl, Zellfärbung mit 50 µl 0,4%ige Lösung Trypanblau (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und anschließender Zellzählung in einer Neubauerzählkammer (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Im Anschluss wurde je 1 ml der Zellsuspension auf jeden Probekörper appliziert und als 7. Passage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Nährmedium wurde ab diesem Zeitpunkt nicht mehr ausgetauscht und nach 1, 3, 7, 10, und 14 Tagen wurden jeweils fünf Probekörper sowie nach 21 Tagen jeweils sechs Probekörper pro Probekörpergruppe zur Bewertung der Zellreaktion untersucht. Dabei erfolgte vor der Untersuchung eine Sichtkontrolle unter dem Mikroskop, um eine Sporenbildung bzw. eine Besiedlung durch Bakterien ausschließen zu können.

Tabelle 7 Verlauf der Zellkultivierung ab Versuchsbeginn

Zellzyklus	Kultivierungsphase
Tag 40	Auswertung nach 24h - Versuch Tag 1, Proliferationsphase
Tag 41	Proliferationsphase
Tag 42	Auswertung nach 72h - Versuch Tag 3, Proliferationsphase
Tag 43	Proliferationsphase
Tag 44	Proliferationsphase
Tag 45	Proliferationsphase
Tag 46	Auswertung nach 7d - Versuch Tag 7, Proliferationsphase
Tag 47	Proliferationsphase
Tag 48	Proliferationsphase
Tag 49	Auswertung nach 10d - Versuch Tag 10, Proliferationsphase
Tag 50	Proliferationsphase
Tag 51	Proliferationsphase
Tag 52	Proliferationsphase
Tag 53	Auswertung nach 14d - Versuch Tag 14, Proliferationsphase
Tag 54	Proliferationsphase
Tag 55	Proliferationsphase
Tag 56	Proliferationsphase
Tag 57	Proliferationsphase
Tag 58	Proliferationsphase
Tag 59	Proliferationsphase
Tag 60	Auswertung nach 21d - Versuch Tag 21

2. 6. Auswertung der Zellkulturparameter

2.6.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung

Die Zelladhäsion wurde anhand der Flächenbedeckung quantifiziert. Dafür wurden die humanen Osteoblasten mit jeweils 30 µl Neutralrot Lösung (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) pro Probekörper angefärbt und nach 1 min Einwirkzeit mit einem Deckglas abgedeckt. Anschließend wurde von dem Probekörpern einem weiteren Digitalmikroskop (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme und ein 3D Bild aufgenommen (siehe Abbildung 13 und Abbildung 14), das Deckglas entfernt und die Probekörper in einem Well mit 1 ml PBS für weitere Untersuchungen gelagert, um eine Austrocknung zu verhindern.

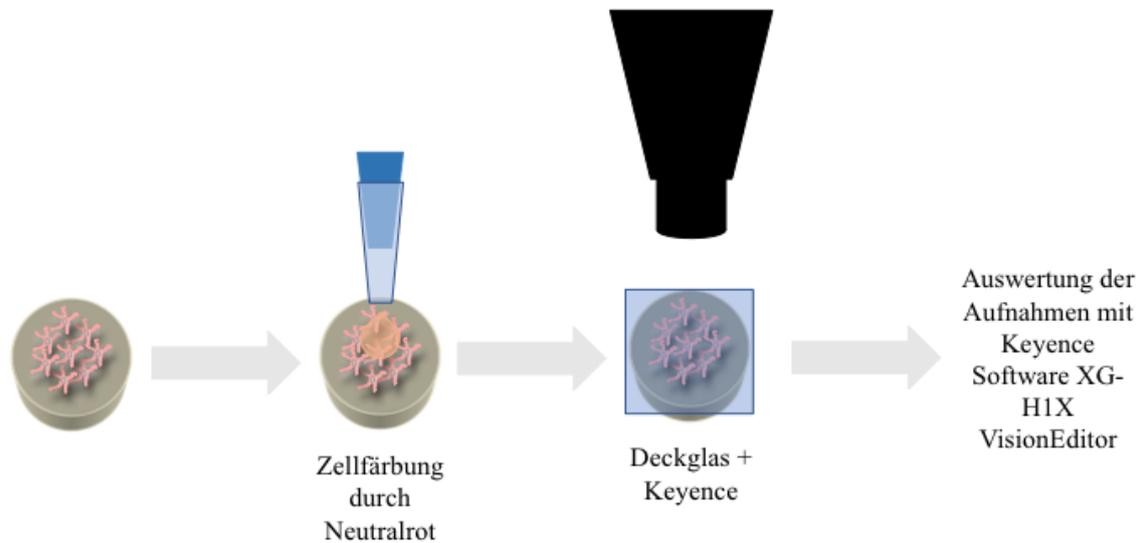


Abbildung 13 Schema zum Ablauf der Auswertung der Flächenbedeckung

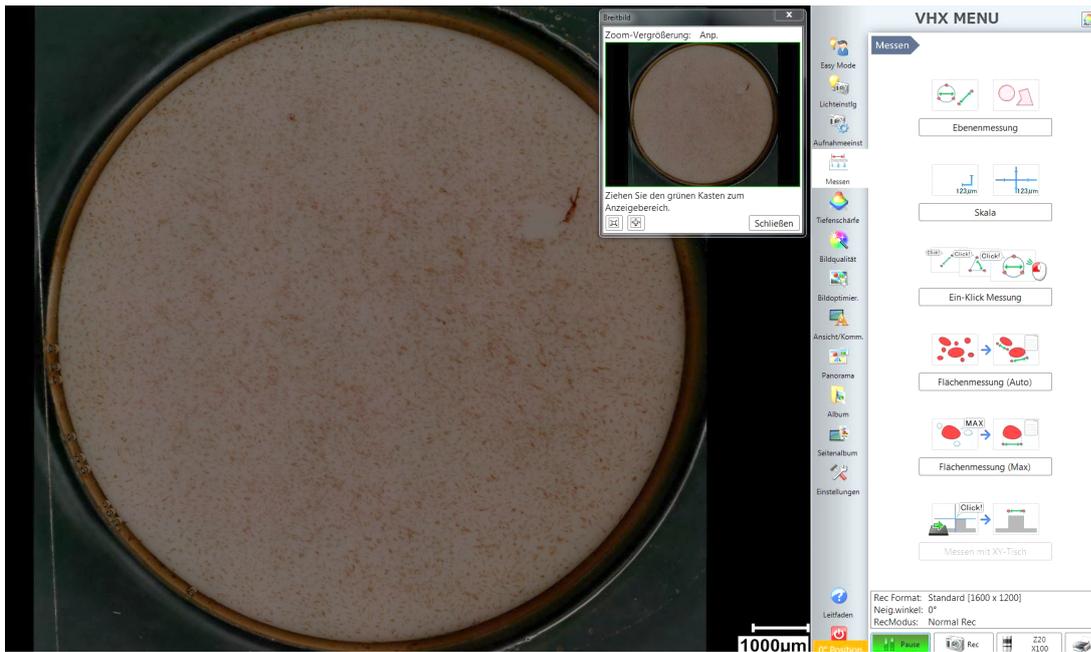


Abbildung 14: Beispiel einer Übersichtsaufnahme zur Bestimmung der Flächenbedeckung

Mit der zugehörigen Software Keyence XG-H1X VisionEditor Ver.1.3.0001 (Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) wurde für die Messung der Flächenbedeckung eine Kreisfläche mit einem Radius von 4,5 mm im Zentrum der Probe festgelegt. Durch Auswahl der Farbe im Wellenlängenbereich von 620 nm bis 780 nm konnten die durch Neutralrot rötlich gefärbten Zellen visualisiert und so deren prozentuale Flächenbedeckung von der Software errechnet werden (siehe Abbildung 15). Dabei wurde eine Farbtoleranz von max. 15 % zugelassen.

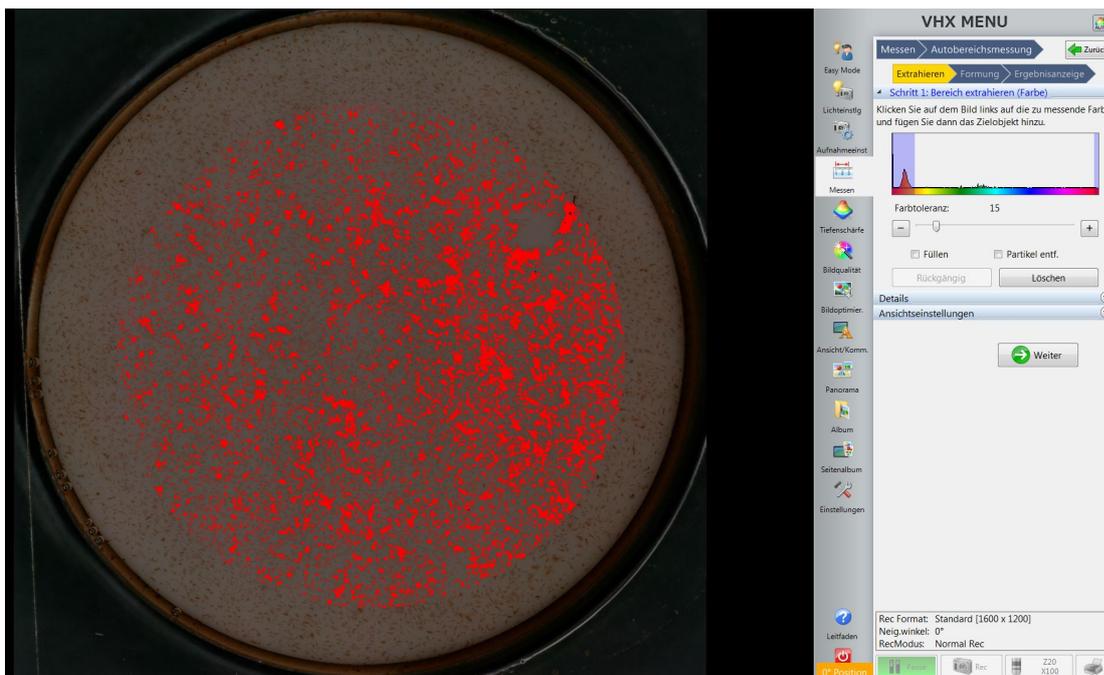


Abbildung 15 Auswertung der Flächenbedeckung Keyence Software - Farbkontrastmessung mit Toleranzauswahl

2.6.2. Zellviabilität - Alamar Blue Assay

Die Alamar Blue Zellviabilitätsbestimmung erfolgte nach dem Protokoll des Alamar Blue Assays der Invitrogen Corporation, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA (siehe Abbildung 16). Alamar Blue (Resazurin) wurde mit frischem Nährmedium im Verhältnis 1:10 angesetzt (4,3 ml auf 43 ml). Anschließend wurden die Probekörper aus ihrem ursprünglichen Well (mit 1 ml Nährlösung/Well) in ein neues Well mit 1 ml Alamar Blue Lösung/Well umgesetzt, um nur die auf dem Probekörper adhärierenden Zellen zu untersuchen. Nach 4,5 h in Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Probekörper wieder entnommen und in ein neues Well mit 1 ml Nährmedium/Well gesetzt, um die Reaktion (Redoxreaktion von Resazurin) zu stoppen. Zur Untersuchung der Zellviabilität erfolgte die Entnahme von 450 µl der veränderten Alamar Blue Lösung/Well. Diese wurde auf drei Wells á 150 µl einer 96-Well-Platte verteilt. Die Absorptionsmessung erfolgte mit einem Spektrophotometer (Multiskan GO; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 570 nm.

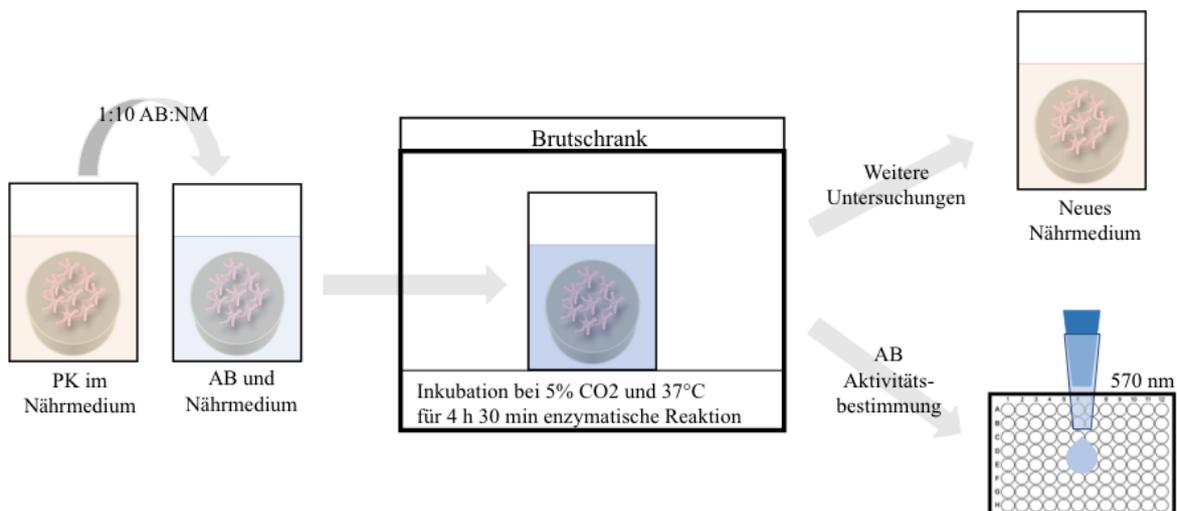


Abbildung 16 Schema zum Ablauf der Auswertung der Zellviabilität

2.6.3. Zelldifferenzierung - Alkaline Phosphatase Assay

Die ALP-Aktivitätsbestimmung erfolgte nach dem modifizierten Protokoll des Alkaline Phosphatase Activity Assays der ScienCell Research Laboratories Inc. Carlsbad, USA (siehe Abbildung 17).

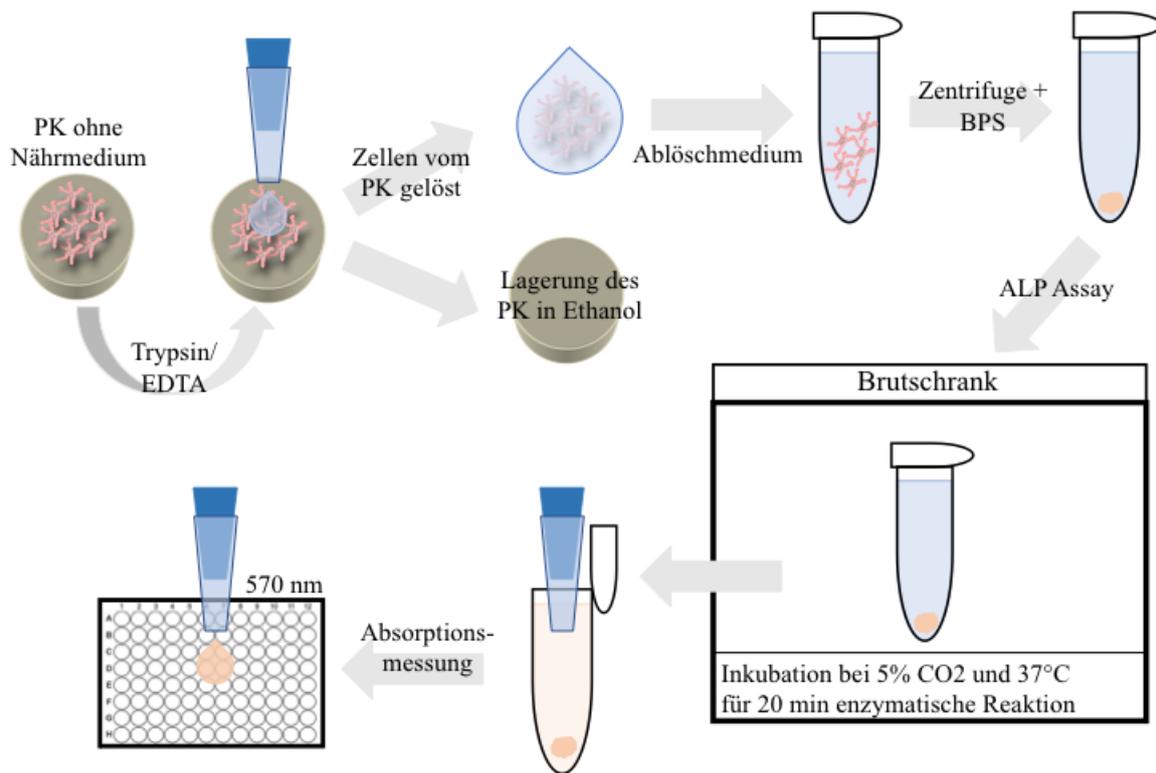


Abbildung 17 Schema zum Ablauf der Auswertung der Zelldifferenzierung

Auf jeden Probekörper wurden 100 µl Trypsin Lösung pipettiert, um die Zelladhäsionen am Probekörper zu lösen. Nach 5 min Inkubation im Brutschrank 37 °C und 5 % CO₂ wurde die Lösung mit 900 µl Nährmedium neutralisiert und die Zellen so vom Probekörper gewaschen. Der Probekörper wurde in 2-Propanol desinfiziert und gelagert. Die Zellsuspension wurde in einem Eppendorfgefäß (1,5 ml) bei 4 °C und 12100 Umdrehungen/min für 5 min zentrifugiert (Hettich Mikroliterzentrifuge MIKRO 220 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland), der Überstand aspiriert und das verbliebene Zellpellet mit 1 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (BPS) gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden 985 µl Überstand aspiriert.

Nun folgte die Durchführung des modifizierten Assay Protokolls, wonach dem verbliebenen 15 μl Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) und dem Zellpellet 50 μl Zelllyse Puffer und 50 μl vom ALP-Substrat (400 μl Stammlösung mit para-Nitrophenylphosphat (pNPP) auf 2000 μl Assay-Puffer) hinzugefügt wurde, um die Lösung und das Zellpellet anschließend für 20 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ zu inkubieren. Durch die Zugabe von 50 μl der Stopp-Lösung wurde die enzymatische Reaktion (Dephosphorylierung von para-Nitrophenylphosphat) der alkalischen Phosphatase gestoppt. Die Lösung wurde vorsichtig entnommen und pro Probekörper in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Die Absorptionsmessung erfolgte mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 405nm.

3. Ergebnisse

3.1. Oberflächencharakterisierung - Oberflächenrauheit und Randwinkel

Der Mittelwert sowie die dazugehörige Standardabweichung sind für den Mittenrauwert R_a und den Randwinkel der jeweiligen Probekörpergruppen in Tabelle 8 aufgeführt. Zur Übersicht der Verteilung der Ergebnisse sind die Ergebnisse für den Mittenrauwert R_a in Abbildung 18 und für den Randwinkel θ in Abbildung 19 als Box-Plot dargestellt.

Tabelle 8 Mittelwerte des Mittenrauwertes R_a und des Randwinkels θ

Probekörpergruppe	Mittenrauwert R_a [nm]	Randwinkel θ [grad]
i2u	250,26 ± 78,50	71,887 ± 4,271
i2p	178,98 ± 46,85	0,0 ± 0,0
i2rgd	275,49 ± 44,23	67,726 ± 2,807
i4u	268,01 ± 88,20	69,823 ± 2,185
i4p	205,61 ± 51,66	0,0 ± 0,0
i4rgd	270,41 ± 51,14	68,306 ± 4,364
ha	217,63 ± 40,66	72,855 ± 2,226
ti	233,27 ± 44,15	52,694 ± 10,295

Der mittlere Mittenrauwert R_a der verschiedenen Probekörpergruppen lag zwischen 275,49 nm und 178,98 nm mit einer maximalen Differenz von 96,51 nm. Die Ergebnisse lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- 1.) $R_a > 250$ nm (i2u, i2rgd, i4u und i4rgd)
- 2.) $R_a < 250$ nm (i2p, i4p, ha und ti).

Dabei gab es innerhalb des dreifachen Interquartilsabstands milde Ausreißer der Probekörpergruppen i4u mit Probekörper Nr. 11 (547,56 nm) und Titan mit Probekörper Nr. 5 (351,62 nm) über und i4rgd mit Probekörper Nr. 15 (132,54 nm) unter dem Median.

Ergebnisse

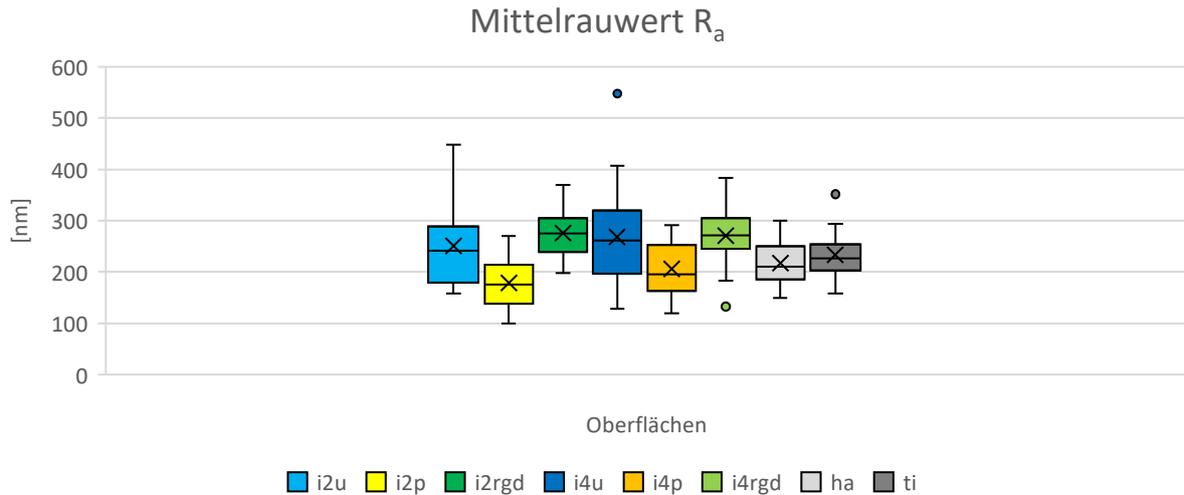


Abbildung 18 Mittenrauwert R_a [nm] der Probekörpergruppen

Während der Randwinkel der Probekörper von i2u, i2rgd, i4u, i4rgd und ha mit Werten zwischen 52,69 grd und 72,85 grd lag und eine maximale Differenz von 20,16 betrug, fiel der Wert der Probekörper von i2p und i4p mit dem Wert von 0 grd am geringsten und signifikant davon abweichend aus. Die Ergebnisse lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- 1.) <40 grd (i2p und i4p)
- 2.) 40 grd - 70 grd (i2rgd, i4u, i4rgd und ti)
- 3.) >70 grd (ha und i2u).

Dabei gab es innerhalb des dreifachen Interquartilsabstands milde Ausreißer der Probekörpergruppen i4rgd mit Probekörper Nr. 10 (271,5 nm) und Titan mit Probekörper Nr. 19 (199,71 nm) über und i4rgd mit Probekörper Nr. 18 (383,15 nm) und ha mit Probekörper Nr. 21 (166,44 nm) unter dem Median.

Ergebnisse

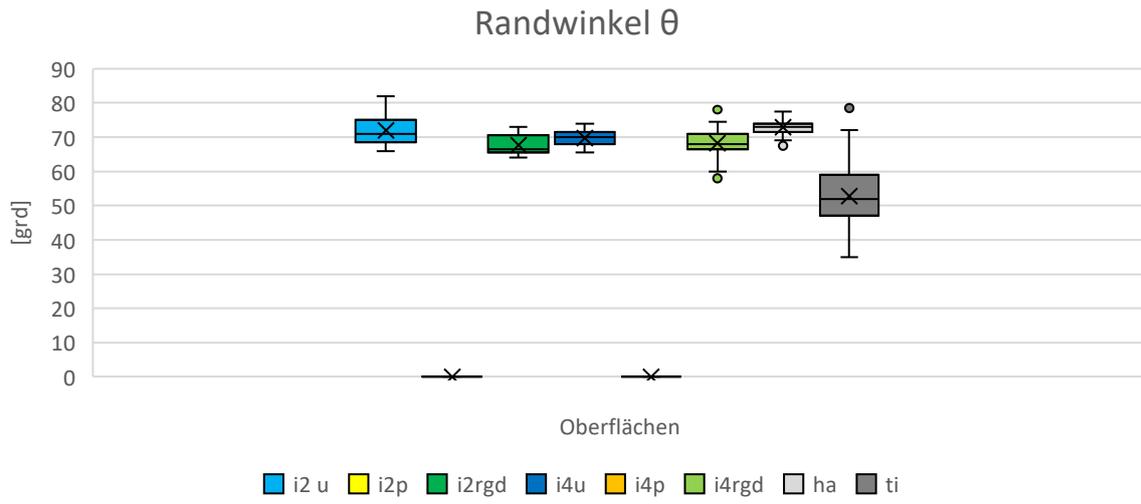


Abbildung 19 Randwinkel [θ] der Probekörpergruppen

3. 2. Ergebnisse der Zellkulturparameter

3.2.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung

Die Flächenbedeckung ergab am Tag 1 der Auswertung bei den Probekörpern eins bis fünf der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $21,4 \pm 5,8$ % Flächenbedeckung für i2 unbehandelt (i2u), $21,2 \pm 9,0$ % Flächenbedeckung für i2 plasmabehandelt (i2p), $14,8 \pm 1,6$ % Flächenbedeckung für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $22 \pm 6,5$ % Flächenbedeckung für i4 unbehandelt (i4u), $18 \pm 2,8$ % Flächenbedeckung für i4 plasmabehandelt (i4p), $24,8 \pm 4,5$ % Flächenbedeckung für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $9,6 \pm 4,7$ % Flächenbedeckung für PEEK-Hydroxylapatit (ha) und $7,6 \pm 3,5$ % Flächenbedeckung für Titan (ti).

Am Tag 3 der Auswertung ergab die Messung bei den Probekörpern sechs bis zehn der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $20,8 \pm 5,8$ % Flächenbedeckung für i2 unbehandelt (i2u), $17,8 \pm 5,9$ % Flächenbedeckung für i2 plasmabehandelt (i2p), $19,4 \pm 5,5$ % Flächenbedeckung für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $26,8 \pm 7,9$ % Flächenbedeckung für i4 unbehandelt (i4u), $21,6 \pm 4,3$ % Flächenbedeckung für i4 plasmabehandelt (i4p), $17 \pm 4,1$ % Flächenbedeckung für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $19,4 \pm 13,3$ % Flächenbedeckung für PEEK-Hydroxylapatit (ha) und $27 \pm 10,7$ % Flächenbedeckung für Titan (ti).

Am Tag 7 der Auswertung ergab die Messung bei den Probekörpern elf bis 15 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $34,2 \pm 3,1$ % Flächenbedeckung für i2 unbehandelt (i2u), $23 \pm 4,4$ % Flächenbedeckung für i2 plasmabehandelt (i2p), $20,2 \pm 5,1$ % Flächenbedeckung für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $17,8 \pm 8,8$ % Flächenbedeckung für i4 unbehandelt (i4u), $20,6 \pm 3,2$ % Flächenbedeckung für i4 plasmabehandelt (i4p), $12,2 \pm 4,0$ % Flächenbedeckung für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $9,6 \pm 4,3$ % Flächenbedeckung für PEEK-Hydroxylapatit (ha) und $27,2 \pm 7,2$ % Flächenbedeckung für Titan.

Am Tag 10 der Auswertung ergab die Messung bei den Probekörpern 16 bis 20 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $28 \pm 21,5$ % Flächenbedeckung für i2 unbehandelt (i2u), $23,6 \pm 3,5$ % Flächenbedeckung für i2 plasmabehandelt (i2p), $24,6 \pm 7,8$ % Flächenbedeckung für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $36,6 \pm 3,0$ % Flächenbedeckung für i4 unbehandelt (i4u), $24,6 \pm 8,2$ % Flächenbedeckung für i4 plasmabehandelt (i4p), $19,6 \pm 6,0$ % Flächenbedeckung für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $11,8 \pm 2,4$ % Flächenbedeckung für PEEK-Hydroxylapatit (ha) und $29,8 \pm 11,8$ % Flächenbedeckung für Titan (ti).

Am Tag 14 der Auswertung ergab die Messung bei den Probekörpern 21 bis 25 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $23,8 \pm 5,0$ % Flächenbedeckung für i2 unbehandelt (i2u), $15,6 \pm 2,6$ % Flächenbedeckung für i2 plasmabehandelt (i2p), $20,2 \pm 9,8$ % Flächenbedeckung für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $21,2 \pm 8,1$ % Flächenbedeckung für i4 unbehandelt (i4u), $21,4 \pm 11,1$ % Flächenbedeckung für i4 plasmabehandelt (i4p), $23,2 \pm 7,0$ % Flächenbedeckung für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $21,2 \pm 13,8$ % Flächenbedeckung für PEEK-Hydroxylapatit (ha) und $30,8 \pm 12,9$ % Flächenbedeckung für Titan (ti).

Am Tag 21 der Auswertung ergab die Messung bei den Probekörpern 26 bis 31 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $36,8 \pm 17$ % Flächenbedeckung für i2 unbehandelt (i2u), $29,2 \pm 8,7$ % Flächenbedeckung für i2 plasmabehandelt (i2p), $33 \pm 4,3$ % Flächenbedeckung für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $37,5 \pm 13,2$ % Flächenbedeckung für i4 unbehandelt (i4u), $28,3 \pm 13,1$ % Flächenbedeckung für i4 plasmabehandelt (i4p), $34,8 \pm 20,7$ % Flächenbedeckung für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $31,5 \pm 12,1$ % Flächenbedeckung für PEEK-Hydroxylapatit (ha) und $31,00 \pm 12,664$ % Flächenbedeckung für Titan (ti).

Die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen der Flächenbedeckung der Probekörpergruppen für Tag 1 - Tag 21 sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9 Mittelwerte und Standardabweichungen der Flächenbedeckung Tag 1 - Tag 21

Probekörpergruppen	Tag 1	Tag 3	Tag 7
i2u	$21,40 \pm 5,814$	$20,80 \pm 5,762$	$34,20 \pm 3,114$
i2p	$21,20 \pm 9,039$	$17,80 \pm 5,891$	$23,00 \pm 4,416$
i2rgd	$14,80 \pm 1,643$	$19,40 \pm 5,505$	$20,20 \pm 5,070$
i4u	$22,00 \pm 6,481$	$26,80 \pm 7,950$	$17,80 \pm 8,786$
i4p	$18,00 \pm 2,828$	$21,60 \pm 4,278$	$20,60 \pm 3,209$
i4rgd	$24,80 \pm 4,550$	$17,00 \pm 4,123$	$12,20 \pm 3,962$
ha	$9,60 \pm 4,722$	$19,40 \pm 13,297$	$9,60 \pm 4,336$
ti	$7,60 \pm 3,507$	$27,00 \pm 10,677$	$27,20 \pm 7,190$
	Tag 10	Tag 14	Tag 21
i2u	$28,00 \pm 21,529$	$23,80 \pm 4,970$	$36,83 \pm 17,464$
i2p	$23,60 \pm 3,507$	$15,60 \pm 2,608$	$29,17 \pm 8,672$
i2rgd	$24,60 \pm 7,829$	$20,20 \pm 9,783$	$33,00 \pm 4,324$
i4u	$36,60 \pm 2,966$	$21,20 \pm 8,106$	$37,50 \pm 13,240$
i4p	$24,60 \pm 8,204$	$21,40 \pm 11,104$	$28,33 \pm 13,084$
i4rgd	$19,60 \pm 6,025$	$23,20 \pm 6,979$	$34,83 \pm 20,671$
ha	$11,80 \pm 2,387$	$21,20 \pm 13,828$	$31,50 \pm 12,145$
ti	$29,80 \pm 11,777$	$30,80 \pm 12,911$	$31,00 \pm 12,664$

Betrachtet man die Ergebnisse der prozentualen Flächenbedeckung bezogen auf die Zeit der Untersuchung von Tag 1 - Tag 21 zwischen den verschiedenen modifizierten PEEK Oberflächen und Titan wird deutlich, dass bei den Probekörpergruppen i2u und i4u, sehr erhebliche Schwankungen vorliegen, wohingegen im Falle der übrigen Probekörpergruppen eine kontinuierliche Zunahme der Flächenbedeckung festgestellt wurde (siehe Abbildung 20). Zwischen Tag 1 und Tag 3 zeigen die Graphen von i2rgd, i4u, i4p, ha und ti eine Steigung. Zwischen Tag 3 und 7 zeigen die Graphen von i2u, i2p, i2rgd und ti eine Steigerung. Zwischen Tag 7 und Tag 10 zeigen alle Graphen außer i2u eine Steigung. Zwischen Tag 10 und Tag 14 zeigen nur die Graphen von ha und ti eine Steigung. Zwischen Tag 14 und Tag 21 zeigen alle Graphen eine Steigung.

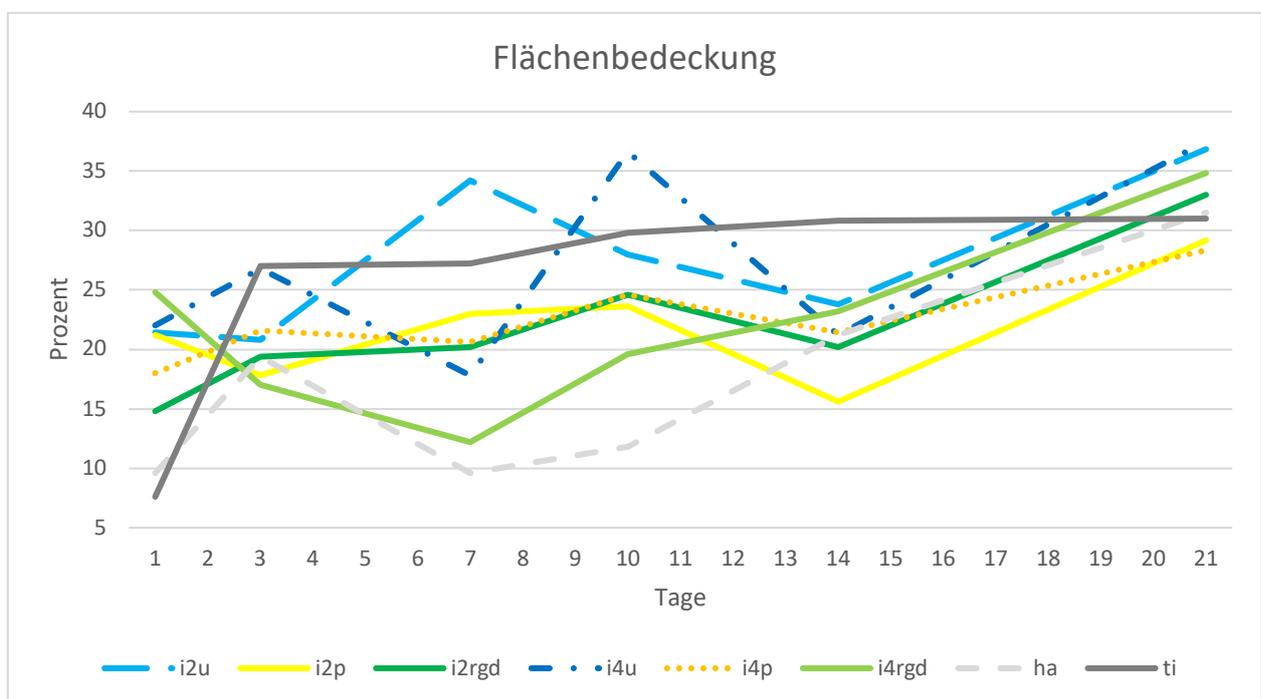


Abbildung 20 Ergebnisse der berechneten FB [%] Tag 1- Tag 21

3.2.2. Zellviabilität - Alamar Blue Assay

Die Zellviabilität ergab am Tag 1 der Auswertung bei den Probekörpern 1 bis 5 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,8870 \pm 0,0626$ OD (optische Dichte) für i2 unbehandelt (i2u), $0,9775 \pm 0,0521$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,8681 \pm 0,0590$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,8881 \pm 0,0199$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,9569 \pm 0,1686$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,8764 \pm 0,0580$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $0,8641 \pm 0,0409$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $1,1426 \pm 0,178$ OD.

Am Tag 3 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 6 bis 10 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $1,0139 \pm 0,1310$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,9489 \pm 0,0913$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,9547 \pm 0,0335$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $1,1218 \pm 0,1274$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $1,0074 \pm 0,1560$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,9564 \pm 0,0277$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,9796 \pm 0,0875$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $1,0782 \pm 0,0622$ OD.

Am Tag 7 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 11 bis Nummer 15 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $1,1982 \pm 0,1535$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $1,0583 \pm 0,2989$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,9783 \pm 0,0740$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,9732 \pm 0,1477$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $1,0441 \pm 0,2236$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,8978 \pm 0,0485$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,9075 \pm 0,0627$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $1,1715 \pm 0,0675$ OD.

Am Tag 10 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 16 bis 20 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $1,0709 \pm 0,0893$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $1,0138 \pm 0,1098$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $1,0404 \pm 0,0891$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $1,2271 \pm 0,2622$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $1,0418 \pm 0,1476$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,9927 \pm 0,0198$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,8137 \pm 0,0091$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $1,1743 \pm 0,0231$ OD.

Am Tag 14 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 21 bis 25 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $1,0480 \pm 0,0253$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,9529 \pm 0,0266$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,9823 \pm 0,0401$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $1,0059 \pm 0,0093$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $1,0084 \pm 0,0321$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $1,0076 \pm 0,0189$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,9993 \pm 0,0378$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $1,2257 \pm 0,0239$ OD.

Am Tag 21 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 26 bis 31 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $1,2255 \pm 0,0560$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $1,1470 \pm 0,0127$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $1,1846 \pm 0,0243$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $1,1915 \pm 0,0244$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $1,1486 \pm 0,0195$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $1,1919 \pm 0,0323$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $1,1723 \pm 0,0220$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $1,3757 \pm 0,0769$ OD.

Die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen der Zellviabilität der Probekörpergruppen für Tag 1 - Tag 21 sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10 Mittelwerte und Standardabweichungen der Zellviabilität Tag 1 - Tag 21

Probekörpergruppen	Tag 1	Tag 3	Tag 7
i2u	$0,8870 \pm 0,063$	$1,0139 \pm 0,131$	$1,1982 \pm 0,153$
i2p	$0,9775 \pm 0,052$	$0,9489 \pm 0,091$	$1,0583 \pm 0,299$
i2rgd	$0,8681 \pm 0,059$	$0,9547 \pm 0,034$	$0,9783 \pm 0,074$
i4u	$0,8881 \pm 0,020$	$1,1218 \pm 0,127$	$0,9732 \pm 0,148$
i4p	$0,9569 \pm 0,169$	$1,0074 \pm 0,156$	$1,0441 \pm 0,224$
i4rgd	$0,8764 \pm 0,058$	$0,9564 \pm 0,028$	$0,8978 \pm 0,049$
ha	$0,8641 \pm 0,041$	$0,9796 \pm 0,087$	$0,9075 \pm 0,063$
ti *1,2	$1,1426 \pm 0,178$	$1,0782 \pm 0,062$	$1,1715 \pm 0,067$
	Tag 10	Tag 14	Tag 21
i2u	$1,0709 \pm 0,089$	$1,0480 \pm 0,025$	$1,2255 \pm 0,056$
i2p	$1,0138 \pm 0,110$	$0,9529 \pm 0,027$	$1,1470 \pm 0,013$
i2rgd	$1,0404 \pm 0,089$	$0,9823 \pm 0,040$	$1,1846 \pm 0,024$
i4u	$1,2271 \pm 0,262$	$1,0059 \pm 0,009$	$1,1915 \pm 0,024$
i4p	$1,0418 \pm 0,148$	$1,0084 \pm 0,032$	$1,1486 \pm 0,020$
i4rgd	$0,9927 \pm 0,020$	$1,0076 \pm 0,019$	$1,1919 \pm 0,032$
ha	$0,8137 \pm 0,009$	$0,9993 \pm 0,038$	$1,1723 \pm 0,022$
ti *1,2	$1,1743 \pm 0,023$	$1,2257 \pm 0,024$	$1,3757 \pm 0,077$

Ergebnisse

Betrachtet man die Ergebnisse der Zellviabilität bezogen auf die Zeit der Kultivierung von Tag 1 - Tag 21 zwischen den verschiedenen Probekörpergruppen wird deutlich, dass Schwankungen insbesondere zwischen den Tagen 1 und 10 festzustellen sind (siehe Abbildung 21). Zum Ende der Beobachtungszeit, 21 Tage, wird ein leichter Anstieg der Zellviabilität aller Probekörpergruppen beobachtet. Zwischen Tag 1 und Tag 3 zeigen die Graphen von den Probekörpergruppen i2u, i2rgd, i4u, i4p, i4rgd und ha eine Steigung. Zwischen Tag 3 und 7 zeigen alle Graphen außer i4u und i4rgd eine Steigerung. Zwischen Tag 7 und Tag 10 zeigen die Graphen von i2rgd, i4u, i4rgd und ti eine Steigung. Zwischen Tag 10 und Tag 14 zeigen nur die Graphen von i4rgd und ha eine Steigung. Zwischen Tag 14 und Tag 21 zeigen alle Graphen eine Steigung.

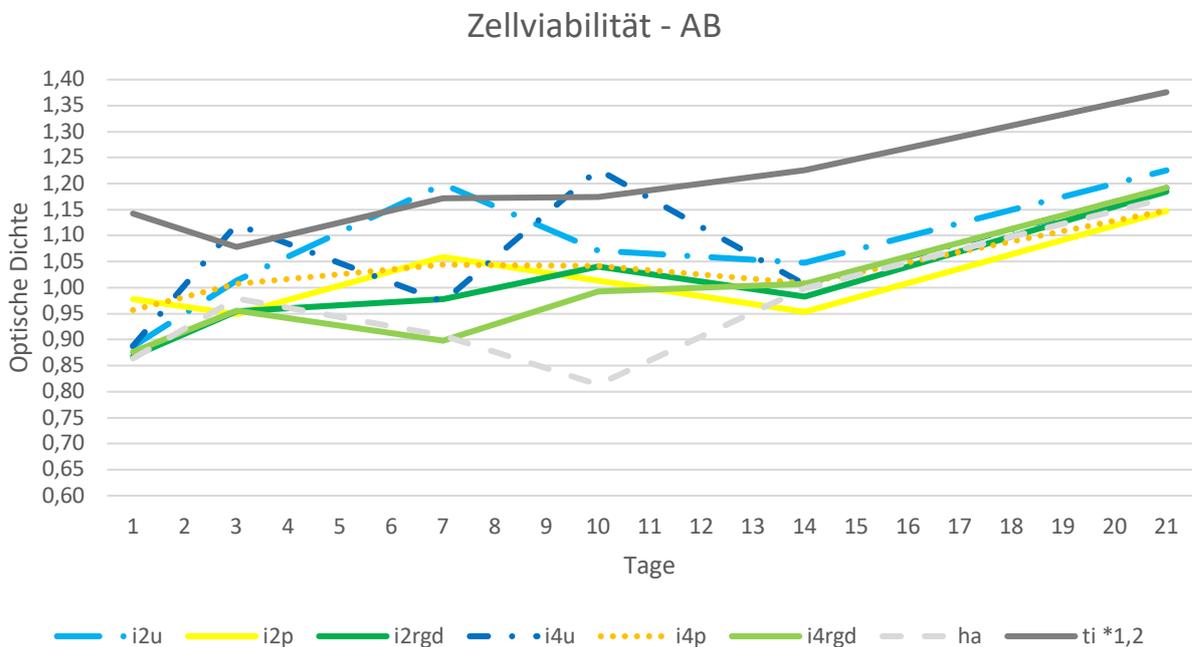


Abbildung 21 Ergebnisse der Absorptionsmessung AB [OD] Tag 1- Tag 21

3.2.3. Zelldifferenzierung - Alkaline Phosphatase Assay

Die Zelldifferenzierung ergab am Tag 1 der Auswertung bei den Probekörpern 1 bis 5 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,1993 \pm 0,0139$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,1548 \pm 0,0517$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,1857 \pm 0,0353$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,2368 \pm 0,0593$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,1475 \pm 0,0274$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,1818 \pm 0,0329$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd), $0,1686 \pm 0,0488$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $0,1068 \pm 0,0103$ OD.

Am Tag 3 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 6 bis 10 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,2395 \pm 0,0236$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,1916 \pm 0,0293$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,2074 \pm 0,0262$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,2595 \pm 0,0575$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,2008 \pm 0,0157$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,1810 \pm 0,0113$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,2062 \pm 0,0262$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $0,2307 \pm 0,0297$ OD.

Am Tag 7 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 11 bis 15 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,2369 \pm 0,0468$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,2473 \pm 0,0256$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,2174 \pm 0,0273$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,2631 \pm 0,0265$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,2574 \pm 0,0430$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,2746 \pm 0,0534$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,4026 \pm 0,0527$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $0,2571 \pm 0,0156$ OD.

Am Tag 10 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 16 bis 20 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,3150 \pm 0,0498$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,3299 \pm 0,0460$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,2433 \pm 0,0342$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,3504 \pm 0,0269$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,3514 \pm 0,0680$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,2545 \pm 0,0385$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,2941 \pm 0,0543$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $0,2418 \pm 0,0814$ OD.

Am Tag 14 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 21 bis 25 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,3441 \pm 0,0659$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,3842 \pm 0,1121$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,3889 \pm 0,0992$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,3114 \pm 0,0442$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,2890 \pm 0,1370$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,4138 \pm 0,1041$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,5279 \pm 0,2717$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $0,3258 \pm 0,1321$ OD.

Am Tag 21 der Auswertung ergab die Absorptionsmessung bei den Probekörpern 26 bis 31 der Probekörpergruppen einen gemittelten Wert von $0,3875 \pm 0,1533$ OD für i2 unbehandelt (i2u), $0,2558 \pm 0,1335$ OD für i2 plasmabehandelt (i2p), $0,5725 \pm 0,2023$ OD für i2 RGD-gebunden (i2rgd), $0,3260 \pm 0,0339$ OD für i4 unbehandelt (i4u), $0,2973 \pm 0,0592$ OD für i4 plasmabehandelt (i4p), $0,4900 \pm 0,1354$ OD für i4 RGD-gebunden (i4rgd) und $0,4042 \pm 0,1740$ OD für PEEK-Hydroxylapatit (ha). Der gemittelte Wert für Titan (ti) wurde mit dem Faktor 1,2 multipliziert, um die Flächendifferenz auszugleichen, das Produkt ergab den Wert $0,3709 \pm 0,1160$ OD.

Die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen der Zelldifferenzierung der Probekörpergruppen für Tag 1 - Tag 21 sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11 Mittelwerte und Standardabweichungen der Zelldifferenzierung Tag 1 - Tag 21

Probekörpergruppen	Tag 1	Tag 3	Tag 7
i2u	$0,1993 \pm 0,013$	$0,2395 \pm 0,023$	$0,2369 \pm 0,046$
i2p	$0,1548 \pm 0,051$	$0,1916 \pm 0,029$	$0,2473 \pm 0,025$
i2rgd	$0,1857 \pm 0,035$	$0,2074 \pm 0,026$	$0,2174 \pm 0,027$
i4u	$0,2368 \pm 0,059$	$0,2595 \pm 0,057$	$0,2631 \pm 0,026$
i4p	$0,1475 \pm 0,027$	$0,2008 \pm 0,015$	$0,2574 \pm 0,043$
i4rgd	$0,1818 \pm 0,032$	$0,1810 \pm 0,011$	$0,2746 \pm 0,053$
ha	$0,1686 \pm 0,048$	$0,2062 \pm 0,026$	$0,4026 \pm 0,052$
ti *1,2	$0,1068 \pm 0,010$	$0,2307 \pm 0,029$	$0,2571 \pm 0,015$
	Tag 10	Tag 14	Tag 21
i2u	$0,3150 \pm 0,049$	$0,3441 \pm 0,065$	$0,3875 \pm 0,153$
i2p	$0,3299 \pm 0,046$	$0,3842 \pm 0,112$	$0,2558 \pm 0,133$
i2rgd	$0,2433 \pm 0,034$	$0,3889 \pm 0,099$	$0,5725 \pm 0,202$
i4u	$0,3504 \pm 0,026$	$0,3114 \pm 0,044$	$0,3260 \pm 0,033$
i4p	$0,3514 \pm 0,068$	$0,2890 \pm 0,137$	$0,2973 \pm 0,059$
i4rgd	$0,2545 \pm 0,038$	$0,4138 \pm 0,104$	$0,4900 \pm 0,135$
ha	$0,2941 \pm 0,054$	$0,5279 \pm 0,271$	$0,4042 \pm 0,174$
ti *1,2	$0,2418 \pm 0,081$	$0,3258 \pm 0,132$	$0,3709 \pm 0,116$

Betrachtet man die Ergebnisse der Zelldifferenzierung bezogen auf die Zeit der Kultivierung von Tag 1 - Tag 21 zwischen den verschiedenen Probekörpergruppen wird deutlich, dass mit Ausnahmen von einzelnen Abweichungen eine kontinuierliche Zunahme der gemessenen optischen Dichte vorliegt (siehe Abbildung 22). Die Ausnahme stellt ha dar, welches deutliche Schwankungen in der OD zeigt. Zwischen Tag 1 und Tag 3 zeigen alle Graphen außer i4rgd eine Steigung. Zwischen Tag 3 und 7 zeigen alle Graphen eine Steigerung. Zwischen Tag 7 und Tag 10 zeigen alle Graphen außer i4rgd und ha eine Steigung. Zwischen Tag 10 und Tag 14 zeigen alle Graphen außer i4u und i4p eine Steigung. Zwischen Tag 14 und Tag 21 zeigen alle Graphen außer i2p und ha eine Steigung.

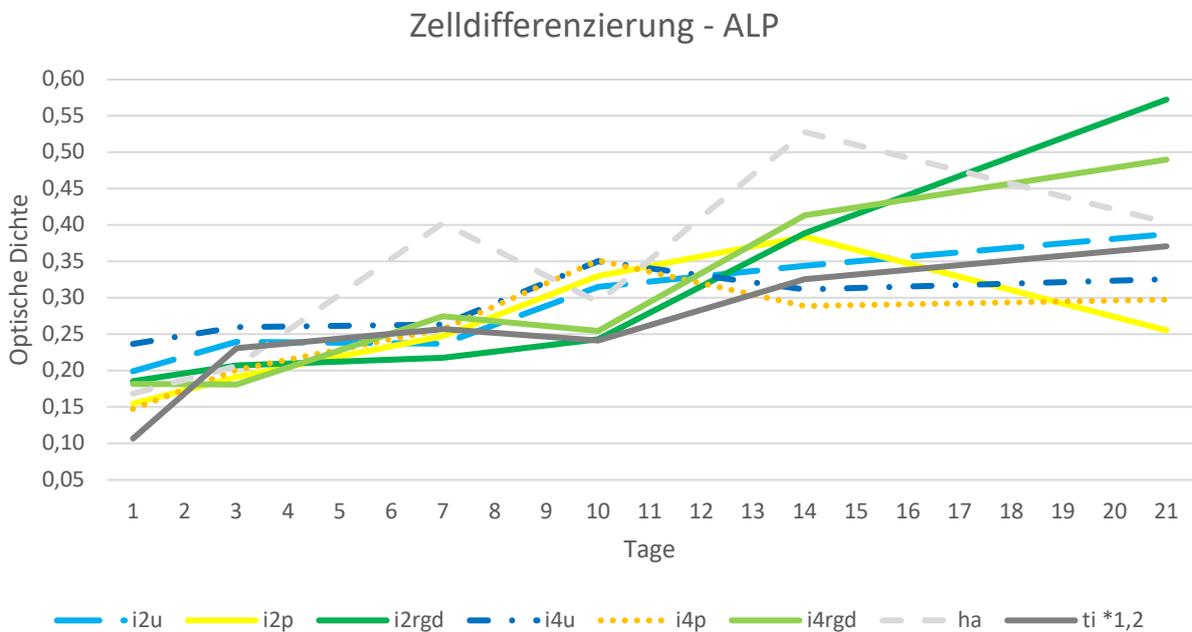


Abbildung 22 Ergebnisse der Absorptionsmessung ALP [OD] Tag 1 - Tag 21

3. 3. Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit der Software IBM SPSS Statistics 24 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA) durchgeführt und der Grad der statistischen Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert. Alle Experimente wurden mit fünf bzw. sechs Probekörpern durchgeführt (Tag 1, 3, 7, 10, 14 $n = 5$; Tag 21 $n = 6$). Die Daten für den jeweiligen Auswertungstag wurden für die untersuchten Parameter gemittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

Als statistisches Mittel diente eine univariate Varianzanalyse im allgemeinen linearen Modell. Die Zellkulturparameter Zellviabilität (Alamar Blue Assay), Zelldifferenzierung (Alkalische Phosphatase Aktivität) und die Zelladhäsion (Flächenbedeckung) wurden als abhängige Variablen gewählt. Die unabhängigen kategorialen Variablen des Auswertungstages und der untersuchten Probekörpergruppen wurden als feste Faktoren und die unabhängigen metrischen Variablen der Mittenrauwert R_a und Randwinkel wurden als Kovariablen gewählt.

Um zu prüfen, ob zwischen den drei Variablen AB, ALP und FB Zusammenhänge bestehen, wurden paarweise Korrelationen berechnet. Da die drei Variablen ein metrisches Messniveau aufweisen, ist hierzu der Korrelationskoeffizient nach Pearson die geeignete Methode. Alle drei Korrelationen waren signifikant ($p < 0,05$) und wiesen einen positiven Korrelationskoeffizienten auf. D.h. je höher die Werte von AB sind, desto höher sind auch die Werte von ALP und FB und umgekehrt.

Darüber hinaus wurden für die acht verschiedene Probekörpergruppen mittels Signifikanztests überprüft, welche Signifikanz die Ergebnisse in Bezug auf die Zielvariablen AB, ALP und FB zwischen den einzelnen Untersuchungstagen und den unterschiedlichen Probekörpergruppen untereinander besitzen. Zur Signifikanztestung wurde die LSD-Methode verwendet. Diese Methode wird auch als paarweiser t-Test bezeichnet. Als Grenzwert wurde $p < 0,05$ definiert. Auf signifikante Unterschiede $p < 0,05$ beim Vergleich der Ergebnisse wurde durch den Zusatz „signifikant“ bei der Beschreibung der entsprechende Werte verwiesen.

4. Diskussion

Titan entwickelte sich aufgrund der überlegenen Biokompatibilität und Osseointegration zum Goldstandard der dentalen Implantologie. Infolge von Hypersensibilitätsreaktionen auf Titan, Knochenabbauprozessen aufgrund der unterschiedlichen Elastizitätsmodule von Knochen (ca. 20 GPa) und Titan (110 GPa) sowie Bildung von Artefakten im Rahmen bildgebender Diagnostikverfahren werden zunehmend metallfreie Materialien für die dentale Implantologie gesucht. Ziel ist es dabei, ein metallfreies Material zu finden, welches ein ähnliches Elastizitätsmodul wie Knochen besitzt und mindestens eine gleichwertige Biokompatibilität und Osseointegration im Vergleich zu Titan aufweist.

PEEK besitzt die gewünschten Materialeigenschaften, hat jedoch in seiner reinen Form eine hydrophobe Oberfläche, die zu einer verminderten Biokompatibilität führt.³⁶ So besteht einzig durch die Modifizierung der hydrophoben Oberfläche die Möglichkeit eine Biokompatibilität vergleichbar mit der von Titan zu erreichen und dabei gleichzeitig die vorteilhaften Materialeigenschaften von PEEK beizubehalten. In der Literatur wurden zahlreiche Methoden untersucht, um die Oberfläche von PEEK zu modifizieren. Dabei zeigten die Plasmabehandlung der PEEK Oberfläche⁴⁰⁻⁴⁴, die kovalente Bindung des RGD-Peptids an die PEEK Oberfläche⁴⁵⁻⁴⁷ und die Compoundierung von PEEK mit Hydroxylapatit⁴⁸⁻⁵¹ die vielversprechendsten Ergebnisse.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand eines in vitro Modells den Einfluss unterschiedlich modifizierter PEEK Oberflächen auf die Zellreaktionen von humanen Osteoblasten (HOB) im Vergleich zu unbehandeltem PEEK als Negativkontrolle und zu Titan als Positivkontrolle zu untersuchen, um auf deren Osseointegrationsverhalten in vivo rückschließen zu können.

Entsprechend sollen im Folgenden die Ergebnisse in Bezug auf die eingangs formulierten Fragestellungen diskutiert werden. Dazu wurden die verschiedenen Probekörpergruppen gegenübergestellt und anhand der Ergebnisse der Zellkulturparameter miteinander verglichen. Vorerst wurden die Ergebnisse der zwei Ausgangsmaterialien PEEK VESTAKEEP i2 und i4 verglichen, dann die Oberflächenmodifikationen untereinander und letztendlich die vielversprechendste Oberflächenmodifikation mit den Kontrollgruppen unbehandeltes PEEK und Titan.

4. 1. Auswirkung der Polymerkettenlänge von PEEK auf die Zellreaktion

Um eine klare Aussage darüber treffen zu können, inwiefern die unterschiedlichen Polymerkettenlängen einen Einfluss auf die Zellreaktionen hatten, mussten alle Einzelergebnisse der Zellkulturparameter (FB, AB und ALP) an Tag 1, 3, 7, 10, 14 und 21 gegenübergestellt werden. Dabei wurden die Ergebnisse der jeweiligen Probekörpergruppen hinsichtlich der Ausgangsmaterialien gegenübergestellt (i2u vs. i4u, i2p vs. i4p und i2rgd vs. i4rgd; siehe Tabelle 12). Bzgl. der Flächenbedeckung (FB) zeigten die i2-basierten Gruppen an 8 Messpunkten (44,44 %) und die i4-basierten an 10 Messpunkten (55,56 %) einen jeweils höheren Wert. Hinsichtlich der Zellviabilität (AB) zeigten die i2-basierten Gruppen an 7 Messpunkten (38,89 %) und die i4-basierten Gruppen an 11 Messpunkten (61,11 %) einen jeweils höheren Wert. In Bezug auf die Zelldifferenzierung (ALP) zeigten die i2-basierten Gruppen an 6 Messpunkten (33,33 %) und die i4-basierten Gruppen an 12 Messpunkten (66,67 %) einen jeweils höheren Wert.

Von insgesamt 54 Messpunkten zur Beurteilung der Zellkulturparameter zeigten somit die i2-basierten Gruppen an 21 Messpunkten (38,89 %) einen höheren Wert als die i4-basierten Gruppen und i4-basierten Gruppen zeigten an 33 Messpunkten (61,11 %) einen höheren Wert als die i2-basierten Gruppen. Somit scheint die PEEK i4 mit der höheren Viskosität und den längeren Polymerketten im Vergleich zu i2 vorteilhaftere Ergebnisse in Bezug auf die Zellreaktionen zu liefern, was sich entsprechend auch in ihrem Osseointegrationsverhalten in vivo widerspiegeln könnte.

Tabelle 12 Maximale Werte der untersuchten Zellkulturparameter von den Ausgangsmaterialien i2 und i4 an Tag 1 - Tag 21

Gruppen/Zellkulturparameter	FB	AB	ALP
i2u	2	3	1
i4u	4	3	5
i2p	3	2	2
i4p	3	4	4
i2rgd	3	2	3
i4rgd	3	4	3
Summe je Zellkulturparameter			
i2	8 (44,44%)	7 (38,89%)	6 (33,33%)
i4	10 (55,56%)	11 (61,11%)	12 (66,67%)
Ausgangsmaterial	i2	i4	
Summe aller Ergebnisse	21 (38,89%)	33 (61,11%)	

Dies würde der aufgestellten Hypothese entsprechen, dass längere Polymerketten zu einer höheren Anzahl an Bindungsmöglichkeiten an der Oberfläche führen.

Inwiefern lässt sich die höhere Anzahl an höheren Werten von $i4u$ für die Zellkulturparameter erklären?

Längere Polymerketten können regelmäßiger und öfter um ihre eigenen Achsen rotieren und so geordnete kristalline Bereiche ausbilden, in welchen die Carbonylgruppen in homogenen Abständen zueinander vorliegen.³² Diese funktionellen Gruppen stellen den hauptsächlichen Ansatzpunkt für die Modifikation der PEEK Oberfläche dar, somit besteht durch die Homogenität der $i4$ -basierten Gruppen ein Vorteil für die Proteinadsorption und damit für die Bindung von Zellen.

Somit werden zur weiteren Beantwortung der Fragestellungen und zur Beurteilung der PEEK Oberflächenmodifikationen in Bezug auf die Zellkulturparameter lediglich die Ergebnisse der $i4$ -basierten Gruppen herangezogen.

4. 2. Beurteilung der untersuchten Zellkulturparameter

Zur Beurteilung der Zellreaktionen wurden drei definierte Parameter der zellulären Reaktion untersucht, um Erkenntnisse über die Auswirkungen von modifizierten PEEK Oberflächen auf den Prozess der Osseointegration gewinnen zu können.

Zur Beurteilung der Adhäsion, der Proliferation sowie der Differenzierung der kultivierten Osteoblasten wurde das Differenzierungsmodell von Owen et al. herangezogen. Es beschreibt das Verhalten von Vorläuferzellen der Osteoblasten bis hin zu reifen knochensezernierenden Osteoblasten in Mäusen.⁹³ Die Übertragbarkeit dieses Modelles auf humane Osteoblasten wurde von Siggelkow et al. nachgewiesen, wobei das Modell reproduziert werden konnte.⁹⁴ Das Modell diente als Vorlage zur Auswertung der Zellreaktion und beschreibt folgende Zellreaktionen:

Grundvoraussetzung: Initialen Zelladhäsion (innerhalb der ersten Stunden)

Phase 1: Tag 1 - Tag 10, die schnelle Proliferation

Phase 2: Tag 10 - Tag 21, die Zelldifferenzierung

Phase 3: ab Tag 21, die Mineralisation

Die Limitation des hier beschriebenen in vitro Versuchs lag in der qualitativen/quantitativen Untersuchung der Mineralisationsprozesse (Phase 3). Die initiale Adhäsion wurde anhand der Flächenbedeckung der Osteoblasten auf den Probekörpern an Tag 1, die Proliferation anhand der Zellviabilität mittels Alamar Blue Assays im gesamten Zeitraum von Tag 1 bis Tag 21 und die Zelldifferenzierung anhand der alkalischen Phosphatase Aktivität zwischen Tag 10 und Tag 21 beurteilt. Für das Proliferationsverhalten wurde abweichend vom Differenzierungsmodell der gesamte Zeitraum beurteilt, da nach der ersten Phase der schnellen Proliferation beobachtet werden sollte, wie das Proliferationsverhalten der differenzierten Osteoblasten voranschreitet.

4. 3. Beurteilung der Oberflächenmodifikationen von PEEK anhand der Zellkulturparameter

4.3.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung

Direkt zu Beginn des Zellkulturtests finden bereits die ersten Wechselwirkungen der Probekörper Oberflächen mit den Inhaltsstoffen des Nährmediums statt. Die darin enthaltenen Proteine binden an die Oberfläche. Die dadurch resultierende Proteinadsorption hängt neben der Oberflächenrauheit, der Oberflächenbenetzbarkeit und der Oberflächenenergie auch von dem Vorhandensein von funktionellen Gruppen ab. Die Zellen binden nicht direkt kovalent über Integrine an die Oberfläche des PEEK Probekörpers, sondern an die adsorbierte Proteinschicht und an gegebenenfalls vorhandene funktionelle Gruppen.^{37,38} Vereinzelt erfolgt die Zelladhäsion auch über elektrostatische oder ionische Wechselwirkungen an die Oberfläche des Probekörpers. Die Zelladhäsion wurde nach 24 h durch die prozentuale Bedeckung der Probekörperoberfläche von Osteoblasten gemessen (siehe Abbildung 23).

Die günstigsten Bedingungen für die Proteinadsorption und die damit zusammenhängende Zelladhäsion weisen Oberflächen mit einem Randwinkel zwischen 40 grd und 70 grd und einem Mittenrauwert R_a von 240 nm bis 1900 nm auf, da in diesem Fall die räumliche Anordnung der Adhäsionsproteine erhalten bleibt.^{75,76}

Daher wurden die Probekörper bezogen auf ihren Randwinkel in drei Gruppen eingeteilt:

- 1.) <40 grd (i4p)
- 2.) 40 grd - 70 grd (rgd)
- 3.) >70 grd (ha)

Daraus lässt sich eine direkte Korrelation in Bezug auf die initiale Zelladhäsion ableiten (siehe Abbildung 23).

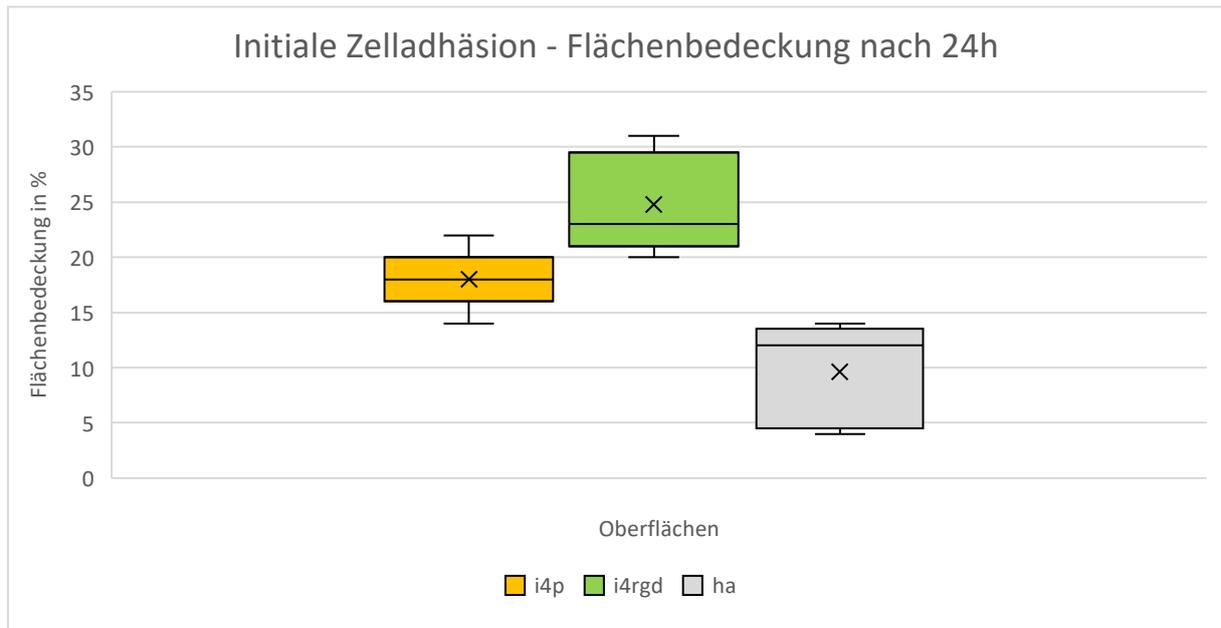


Abbildung 23 Initiale Adhäsion der Osteoblasten nach 24h anhand der Flächenbedeckung der Gruppen i4p, i4rgd und ha

Der relativ geringe Wert der Flächenbedeckung nach 24 h für i4p könnte durch die Oberflächenmodifizierung verursacht worden sein. Denn grundsätzlich liegt bei dieser Gruppe der geringe Randwinkel von 0 grd deutlich außerhalb des idealen Spektrums zwischen 40 grd und 70 grd, welches zu einer optimalen Osseointegration führen soll. Die Messung des Randwinkels erfolgte 60 s, die Besiedlung mit Osteoblasten ca. 60 min nach der Plasmabehandlung. Es ist davon auszugehen, dass die Oberflächen der Probekörper trotzdem noch so hydrophil waren, dass es zu einer unvorteilhaften Konfiguration der Adhäsionsproteine kam. Daraus ergibt sich eine mögliche Erklärung für die geringen Werte der Zelladhäsion auf den plasmabehandelten Probekörpern.^{101,102} Hinzukommt die Oberflächenrauheit von 205,61 nm, welche zusätzlich zu einer ungünstigen Oberflächentopographie beiträgt.

Des Weiteren wird in der Literatur beschrieben, dass bei Plasmabehandlungen von einer Dauer >250 s flüchtige Photolyseprodukten entstehen. Dabei handelt es sich um Materialrückstände des Probekörpers mit geringem Molekulargewicht. Diese Rückstände können sich auf der Oberfläche ablagern und führen zu einer verminderten Zelladhäsion.^{38,103,104} Da die Probekörper im vorliegenden Versuch 35 min mit Sauerstoff/Argon Plasma behandelt wurden, könnte dies zu entsprechenden Ablagerungen niedermolekularer Materialrückstände an den Oberflächen geführt haben. Bestätigt wird dies durch den niedrigsten Wert für die Oberflächenrauheit aller PEEK Oberflächen, welche auf einen Materialabtrag durch die Plasmabehandlung hinweist.

Den höchsten Wert bezogen auf die Zelladhäsion nach 24 h besitzt i4rgd, die Oberfläche ist von der Proteinadsorption relativ unabhängig, da die RGD-Peptide für die Integrine der Osteoblasten an der Oberfläche präsentiert werden. Somit spielt der für die Proteinadsorption relevante Randwinkel hier nur eine untergeordnete Rolle. Darüber hinaus beweist es, dass die angewandte Methode zur Funktionalisierung der PEEK Oberfläche dazu führt, dass die RGD-Peptide kovalent an der Oberfläche gebunden sind, sonst würde es über die kontraktilen Kräfte der Zellen zu einem Loslösen der Zellen von der Oberfläche kommen.^{46,105}

Der geringe Wert der Flächenbedeckung für ha nach 24 h könnte entsprechend mit dem hohen Randwinkel von 72,8 grad bei gleichzeitig niedriger Oberflächenrauheit von 217,63 nm erklären werden, dabei ist die Oberflächentopographie ungünstig für die Proteinadsorption und die damit zusammenhängenden Zelladhäsion.

4.3.2. Zellviabilität - Alamar Blue

Über die Beurteilung der Zellviabilität anhand des Alamar Blue Assays kann eine Aussage bzgl. des Proliferationsverhaltens über die Zeit getroffen werden (siehe Abbildung 24).

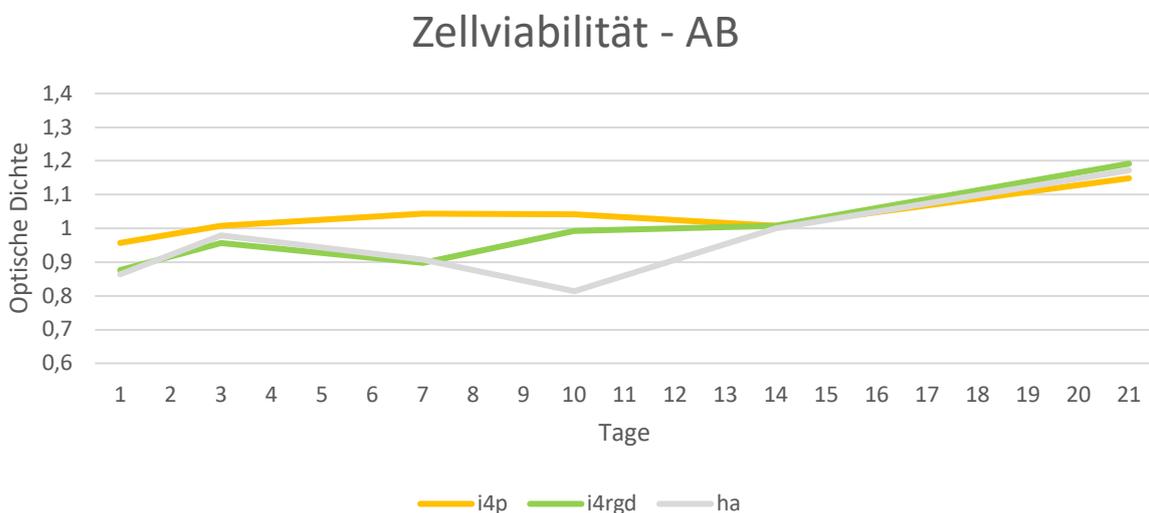


Abbildung 24 Zellviabilität - AB von Tag 1 - Tag 21 der Gruppen i4p, i4rgd und ha

Bezogen auf die Zellviabilität scheint die hydrophile Oberfläche von i4p von Vorteil zu sein. Obwohl die Zelladhäsion dadurch gehemmt wurde, zeigt i4p hohe Werte bzgl. der Zellviabilität. Dies entspricht den Aussagen der Literatur, dass die Zellproliferation durch die erhöhte Oberflächenenergie stimuliert werden kann.⁴⁰⁻⁴³

Betrachtet man die Werte von i4rgd wird ersichtlich, dass die Werte erst ab Tag 7 stetig zunehmen und von Tag 14 auf Tag 21 die höchsten Werte bzgl. der Zellviabilität zeigt, auch wenn nur mit einem geringfügigen Unterschied. Somit könnte die initiale Zelladhäsion einen positiven Einfluss auf die Proliferation gehabt haben.

Die geringen Werte für ha könnten auf eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration und damit zusammenhängende erhöhte ALP-Aktivität zurückgeführt werden, da dies zu einer verminderten Zellproliferation führen würde. Die Ca²⁺-Konzentration hemmt die Expression von für die Zellproliferation spezifischen Proteinen.⁹³

4.3.3. Zelldifferenzierung - Alkalische Phosphatase Assay

Über die Beurteilung der Aktivität der alkalischen Phosphatase kann eine Aussage über das Differenzierungsverhalten der Osteoblasten im relevanten Zeitraum von Tag 10 bis Tag 21 getroffen werden (siehe Abbildung 25).

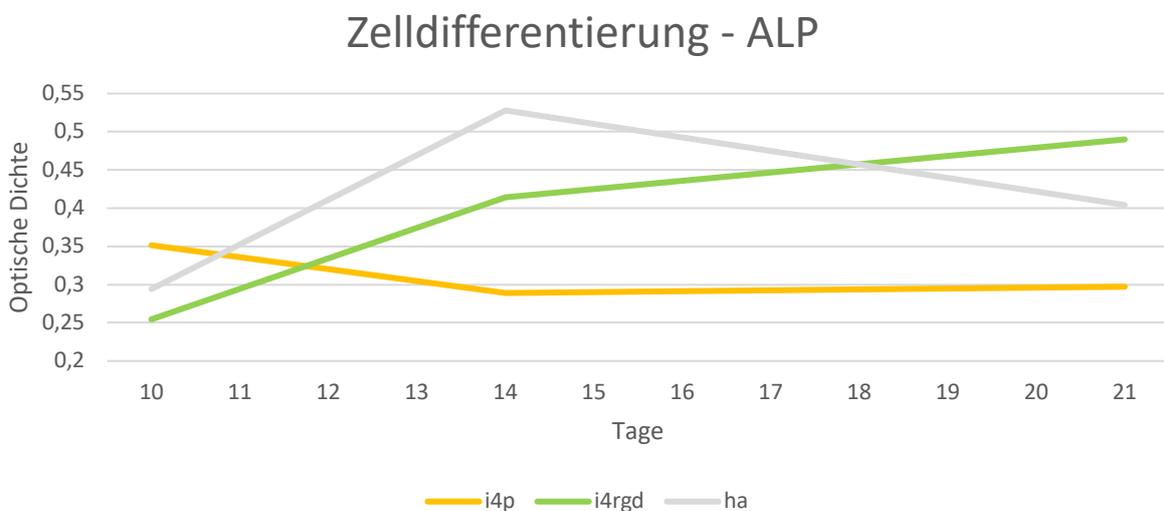


Abbildung 25 Zelldifferenzierung - ALP von Tag 10 bis Tag 21 der Gruppen i4p, i4rgd und ha

Das Das Compound ha zeigte wie oben erwähnt die höchste ALP Aktivität, was evtl. auf eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zurückgeführt werden könnte. Die an der Oberfläche präsentierten Hydroxylapatitpartikel führen nach Zhao et al. zu einer deutlichen Stimulierung der Genexpression von Ca^{2+} -Kanälen und ALP spezifischen Proteinen. Dies führt zu einer verminderten Proliferation und einer erhöhten ALP-Aktivität.⁶⁷ Die Gründe der erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration werden kontrovers diskutiert. Während einige Autoren von einer geringfügigen Wasserlöslichkeit des Hydroxylapatits ausgehen, führen andere Autoren diese lediglich auf die erhöhte Anzahl an Ca^{2+} -Kanälen zurück.^{67,106} Daher ist der Parameter ALP-Aktivität wohl nicht für die Beurteilung der Zelldifferenzierung an der Oberfläche des PEEK/Hydroxylapatit Compounds geeignet.

So wie auch auf die Zelladhäsion und die Zellviabilität wirkt sich i4rgd auch positiv auf die ALP-Aktivität aus. Die kovalent gebundenen RGD-Peptide wirken stimulierend auf die Zelldifferenzierung, scheinen dabei jedoch nicht die Zellviabilität nicht zu stimulieren.

Eine mögliche Ursache für die geringe ALP-Aktivität von i4p könnten die bei der Plasmabehandlung entstandenen niedermolekularen Materialrückstände sein. Da diese jedoch die Zellviabilität und somit das Proliferationsverhalten nicht gestört hat, könnte es über die stimulierte Zellviabilität auch zu einer gehemmten Zelldifferenzierung gekommen sein.

Der Einfluss durch die Makro-, Mikro-, und Nanomorphologie der Probekörperoberflächen auf die Zelldifferenzierung von Osteoblasten wird kontrovers diskutiert. Während einige Autoren aufgrund der unterschiedlichen Datenlage von einer Empfehlung für eine vorteilhafte Oberflächenrauheit absehen, empfehlen andere Autoren einen Mittenrauwert R_a von 1 - 4 μm .¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Der Mittenrauwert R_a der untersuchten Probekörpergruppen lagen zwischen 0,178 und 0,275 μm und somit deutlich unter der empfohlenen Oberflächenrauheit. Somit konnte in der vorliegenden Untersuchung eine Beeinflussung der Zelldifferenzierung durch die Oberflächenrauheit lediglich eine untergeordnete Rolle gespielt haben.

Zusammenfassend scheint somit i4rgd, also die kovalente Anbindung von RGD-Peptid als vielversprechendste Oberflächenmodifikation von PEEK zur Erzielung einer suffizienten Osseointegration darzustellen. Somit sollen die darauf basierenden Ergebnisse im Folgenden mit denen von unbehandeltem PEEK (i4u, Negativkontrolle) und von Titan (ti, Positivkontrolle) verglichen werden.

4. 4. Beurteilung der Probekörpergruppen i4rgd, i4u und ti anhand der Zellkulturparameter

In Bezug auf unbehandeltes PEEK wurde erwartet, dass dieses, wie in der Literatur beschrieben, aufgrund der fehlenden Benetzbarkeit im Vergleich zu i4rgd deutlich geringere Werte für die Zellreaktion zeigt. Mit dem Ziel ein Material mit vergleichbaren osseointegrativen Eigenschaften wie Titan zu finden, wurde eingangs die Hypothese aufgestellt, dass i4rgd sowie die anderen Modifikationen von PEEK bzgl. der Zellkulturparameter vergleichbare Ergebnisse wie Titan zeigen würden.

4.4.1. Zelladhäsion - Flächenbedeckung

Alle drei Probekörpergruppen zeigten bezüglich der Proteinadsorption günstige Randwinkel zwischen 40 grd und 70 grd.^{75,76} Dennoch zeigte Titan trotz des geringen Randwinkel von $52,7 \pm 10,2$ grd nach 24 h eine signifikant geringere Zelladhäsion als i4u und i4rgd (siehe Abbildung 26).

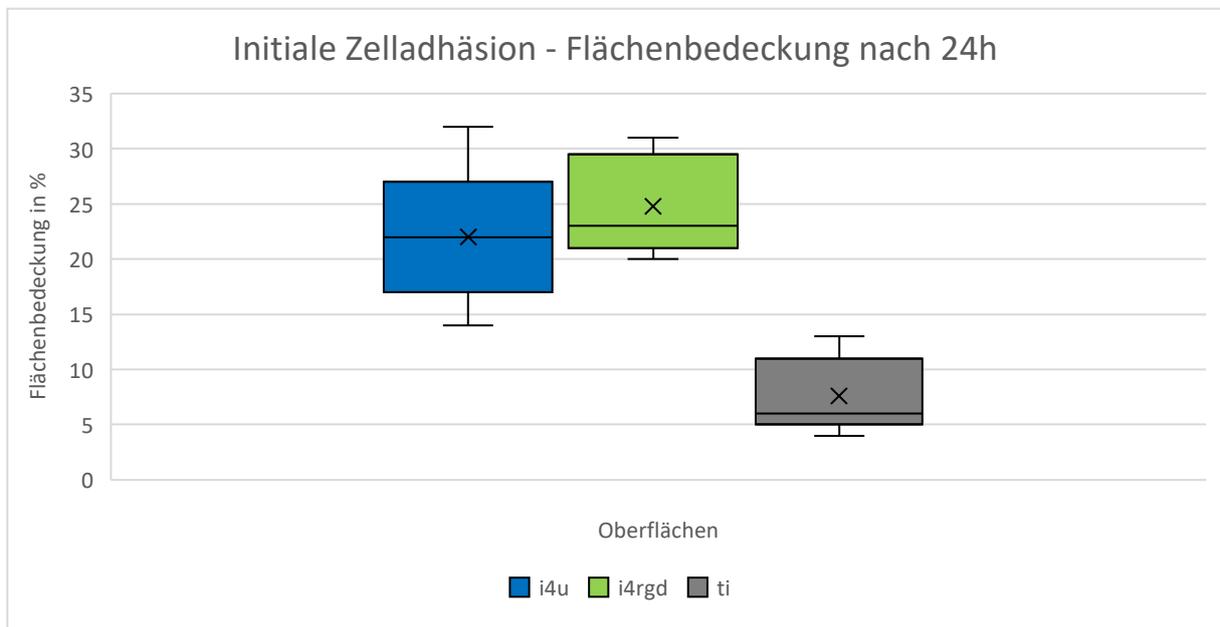


Abbildung 26 Initiale Adhäsion der Osteoblasten nach 24h anhand der Flächenbedeckung der Gruppen i4u, i4rgd und ti

Im Vergleich zu Tag 3 relativierte sich der geringe Wert für Titan, da es hier den höchsten Wert bzgl. der Zelladhäsion zeigte. Bei eingehender Betrachtung der Ergebnisse an Tag 1 zeigten sich insbesondere für die Titan Probekörper Nr. 1 Nr. 2 (siehe Abbildung 27) und Nr. 5 eine deutlich geringere Besiedlung der Oberfläche. Eine Sporenbildung oder bakterielle Besiedlung konnte durch mikroskopische Sichtkontrolle vor Erhebung der Zellkulturparameter als Ursache dafür ausgeschlossen werden. Als mögliche Ursache könnte eine lokal zu geringe Anzahl an Osteoblasten in der angesetzten Zellsuspension in Frage kommen, die für die initiale Besiedlung der Probekörper verwendet wurde.

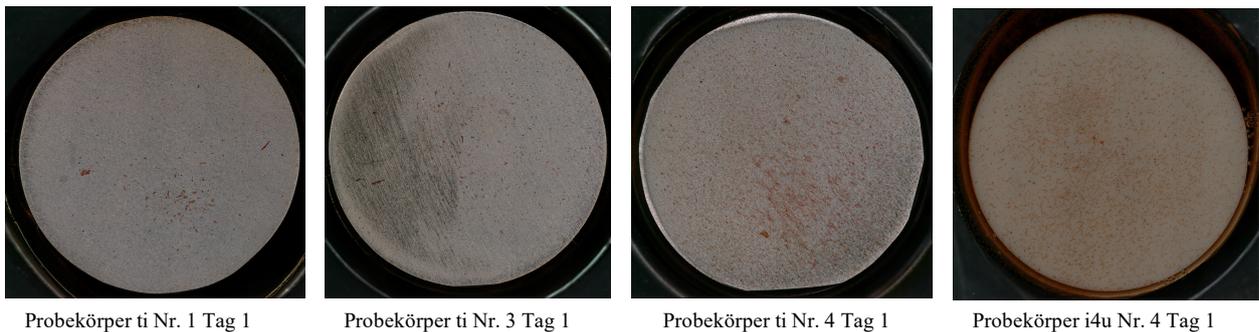


Abbildung 27 Übersichtsaufnahmen der unterschiedlichen Flächenbedeckung an Tag 1

Ebenso überraschend war der hohe Wert von i4u für die Zelladhäsion, da das unbehandelte, reine PEEK als Negativkontrolle gemäß Literatur deutlich geringere Werte hätte zeigen müssen. Eine Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Randwinkel sein. Während in der Literatur Randwinkel von bis zu 90 grd angegeben werden fällt der Randwinkel für i4u mit 69,8 grd relativ gering aus.⁴⁵⁻⁴⁷ Auch im direkten Vergleich mit i4p zeigte unbehandeltes PEEK eine höhere Zelladhäsion (Flächenbedeckung i4p 18,00 % \pm 2,8 % zu i4u 22,00 % \pm 6,5 %). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Rochford et al., die eine höhere Zelladhäsion auf unbehandelten PEEK im Vergleich zu O₂ plasmabehandelten Probekörpern zeigten.⁴⁴

Beim Vergleich von i4rgd mit Titan kann offenbar keine zuverlässige Aussage getroffen werden, da das Ergebnis von Titan an Tag 1 fehlerhaft zu sein scheint.

4.4.2. Zellviabilität - Alamar Blue

Über die Beurteilung der Zellviabilität anhand des Alamar Blue Assays kann eine Aussage bzgl. des Proliferationsverhaltens über die Zeit getroffen werden (siehe Abbildung 28).

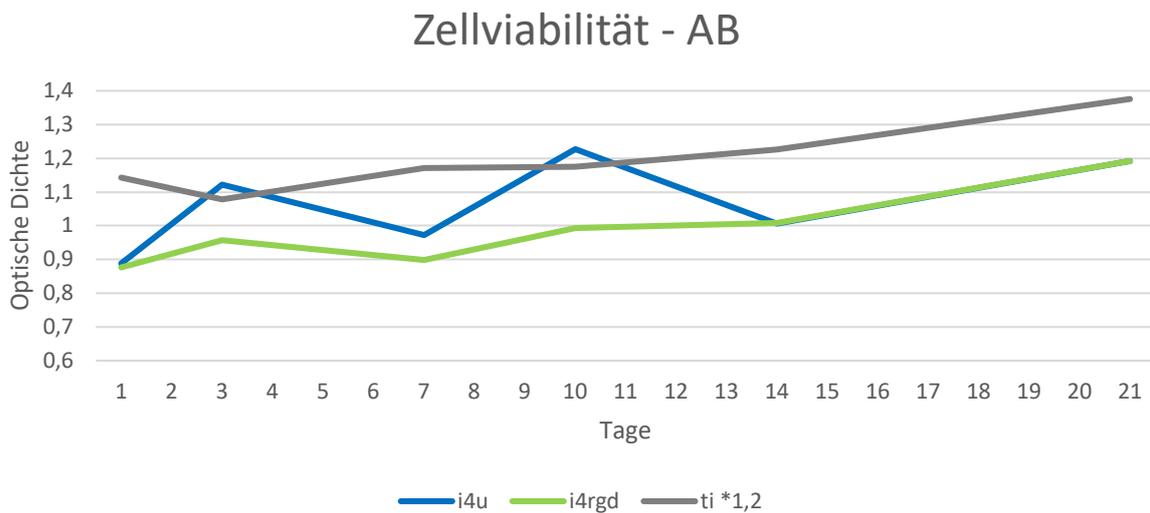


Abbildung 28 Zellviabilität - AB von Tag 1 - Tag 21 der Gruppen i4u, i4rgd und ti

Auch hier zeigte i4u unerwartet hohe Ergebnisse, insbesondere im Zeitraum zwischen Tag 3 und Tag 14. Dies lässt auf ein erhöhtes Proliferationsverhalten der undifferenzierten Zellen auf unbehandelten PEEK im Vergleich zu i4rgd schließen. Dies könnte auch hier auf den im Vergleich zur Literatur deutlich niedrigeren Randwinkel zurückgeführt werden, der sich grundsätzlich ebenfalls positiv auf die Zellproliferation auswirken sollte.

Mit dem geringsten Randwinkel der drei Probekörpergruppen hat Titan als Positivkontrolle mit 69,8 grad die beste Voraussetzung für die höchste Zellviabilität/Zellproliferation. Bestätigt wird dies durch die überwiegend signifikant höheren Werte der Zellviabilität im Vergleich zu den Probekörpergruppen i4u und i4rgd. Sowohl die undifferenzierten als auch die reifen Osteoblasten haben das höchste Proliferationspotential auf Titan.

Die Probekörpergruppe i4rgd zeigte im Vergleich zu Titan und i4u niedrigere Werte bezogen auf die Proliferation. Trotz der hohen für die Zelladhäsion, scheinen die auf der Oberfläche präsentierten Peptide im Vergleich keinen deutlich stimulierenden Effekt auf die Proliferation gehabt zu haben.

4.4.3. Zelldifferenzierung - Alkalische Phosphatase Assay

Über die Beurteilung der Aktivität der alkalischen Phosphatase kann eine Aussage über das Differenzierungsverhalten der Osteoblasten im relevanten Zeitraum von Tag 10 bis Tag 21 getroffen werden (siehe Abbildung 29).

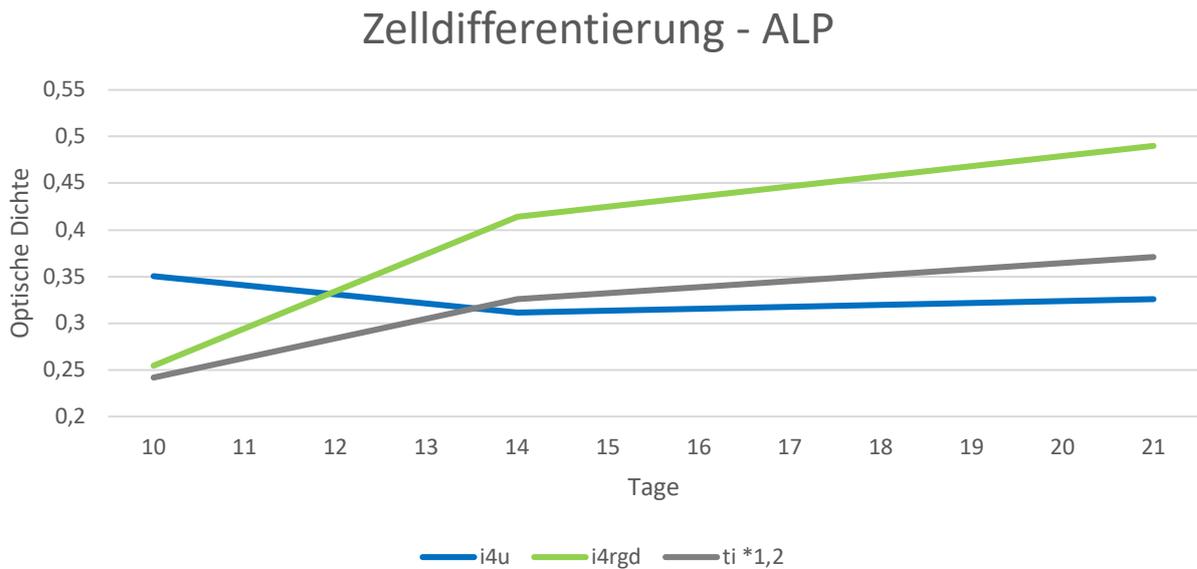


Abbildung 29 Zelldifferenzierung - ALP von Tag 10 bis Tag 21 der Gruppen i4u, i4rgd und ti

Diesbezüglich decken sich die Ergebnisse von i4u mit den Angaben der Literatur, obwohl diese Probekörpergruppe einen vergleichsweise niedrigen Randwinkel zeigte. Im Vergleich zu Titan und i4rgd zeigte i4u initial einen höheren Wert. Dieser nahm zunächst kontinuierlich ab, so dass i4u ab Tag 14 die niedrigsten Werte zeigte.

Titan zeigte initial den niedrigsten Wert, der dann kontinuierlich anstieg, so dass Titan an Tag 21 einen signifikant höheren Wert als i4u zeigte. Insofern unterlag das unbehandelte PEEK Titan bezogen auf das Differenzierungsverhalten der Osteoblasten zum Zeitpunkt, an dem die Mineralisation beginnen würde. Dies deckt sich auch mit Angaben in der Literatur.

Die kovalent gebundenen RGD-Peptide wirkten offenbar stimulierend auf die Zelldifferenzierung, da i4rgd im Vergleich zu Titan und unbehandelten PEEK an Tag 21 ein höheres Ergebnis zeigte. Somit scheint i4rgd bezogen auf die Zelldifferenzierung Vorteile gegenüber Titan und i4u zu besitzen. Ab Tag 21 beginnt die Phase der Mineralisation. Je höhere also die ALP-Aktivität und somit der Differenzierungsgrad der Osteoblasten zu diesem Zeitpunkt ist, desto höher ist die Mineralisation von neu gebildeten Knochen. Somit wirkt sich die ALP-Aktivität direkt auf die Knochenqualität aus.¹¹¹

4. 5. Methodenkritik

Im Vergleich mit der Literatur stechen insgesamt vor allem die Zellreaktionen auf den unbehandelten PEEK Probekörpern als Negativkontrolle deutlich hervor. Daher muss der Versuchsaufbau reevaluiert werden, da dieser selbst ursächlich für etwaige Abweichungen gewesen sein könnte.

4.5.1. Zelllinie

In der Literatur ist die Reaktion auf verschiedene PEEK Oberflächen unterschiedlicher Zelllinien beschrieben worden.

Der Vorteil an in vitro Versuchen mit humanen Osteoblasten ist die Möglichkeit, direkte Rückschlüsse auf das Verhalten von Osteoblasten und somit die Osseointegration in vivo ziehen zu können. Nachteile sind neben der aufwändigen Gewinnung der Zellen und der hohen Anfälligkeit bei ihrer in vitro Kultivierung, dass der Zellphänotyp stark vom Alter und Geschlecht des Spenders und von der Lokalisation des Spenderknochens abhängt. Somit sind in vitro Versuche mit humanen Osteoblasten nicht immer miteinander vergleichbar.¹¹²⁻¹¹⁴ Die aufwändige Kultivierung ist vermutlich der Grund dafür, dass in der Literatur lediglich Becker et al.⁴⁵ humane Osteoblasten untersucht haben. Andere Autoren nutzten vermutlich aufgrund der leichteren Verfügbarkeit und der geringeren Anfälligkeit Zelllinien, die aus Tierknochen oder Tumorzellen gewonnen wurden (siehe Tabelle 1 - 3).

Aus Tieren gewonnene Zellen wie der „MC3T3-E1“-Zelllinie aus Mäusen^{40,41,43,47,49} oder auch der „RMSC“-Zelllinie (rat mesenchymal stem cells) aus Ratten⁴⁰, besitzen speziesspezifische Merkmale bzgl. Zellaufbau und Genexpression. Darüber hinaus zeigen die Zellen bei der Kultivierung gewisse Alterserscheinungen.⁷⁰ Somit haben deren Zellreaktion eine geringere Relevanz verglichen mit der von primären humanen Osteoblasten.

Aus humanen Osteosarkomen gewonnene Zellen, haben unterschiedliche Nachteile. Während die Zellen der „osteoblast-like MG-63“-Zelllinie^{48,50,51} im Zustand von Präosteoblasten verbleiben, durchlaufen die Zelllinien „SaOs-2“¹¹⁵ und „U2Os“⁴⁴ nicht das gesamte Spektrum der phänotypischen Veränderungen von primären humanen Osteoblasten.⁷⁰ Auch hier ist der Vergleich mit humanen Osteoblasten nur bedingt möglich.

Die aus Adenokarzinomen gewonnene „Caco-2“-Zelllinie⁵⁷ besteht nicht aus Knochenzellen, daher ist ein Vergleich der Zellreaktion von primären humanen Osteoblasten nicht möglich.⁷⁰

4.5.2. Material

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Literatur, zeigt sich hinsichtlich der Materialeigenschaften von unbehandelten PEEK ein deutlicher Unterschied. Während in der Literatur der Randwinkel bei acht von zwölf Studien ≥ 80 grad betrug, lagen in der vorliegenden Arbeit die Werte für i_{2u} bei 71,8 grad und für i_{4u} bei 69,8 grad. Ein Wert von < 70 grad konnte in der Literatur nicht gefunden werden (siehe Tabelle 1 - 3). Der niedrigere Randwinkel könnte ein Grund für die im Vergleich zur Literatur deutlich höheren Ergebnisse der Zellkulturparameter von unbehandelten PEEK sein.

Um Rückschlüsse auf die Osseointegration von Materialien ziehen zu können sind in vitro Versuche eine häufig angewandte Methodik. Bei der Untersuchung von metallfreien Materialien, die in der dentalen Implantologie als Ersatz für Titan dienen sollen, sollte im Versuchsaufbau Titan als Positivkontrolle mituntersucht werden. Da Titan derzeit als Goldstandard gilt, erlaubt dieser Vergleich eine Wertung der Ergebnisse auch außerhalb des Versuches.

4.5.3. Methodik

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigten sich potentielle Fehlerquellen, die gegebenenfalls in Zukunft vermieden werden könnten.

Bei der Zellreaktion von Osteoblasten auf unterschiedliche Oberflächen ist bekannt, dass die Oberflächentopografie einer der wichtigsten Faktoren für die Adhäsion und Proliferation von humanen Osteoblasten darstellt. Da die Probekörper vor der Modifizierung in diesem Versuch alle nach einem standardisierten Protokoll gleich bearbeitet wurden, sollten die Ergebnisse untereinander vergleichbar sein.

Bei der Oberflächenmodifizierung durch Argon/Sauerstoff Plasma wäre evtl. eine längere Lagerungszeit der Probekörper nach der Plasmabehandlung ratsam gewesen. Der Randwinkel konnte aufgrund der hohen Oberflächenenergie nicht ermittelt werden. Dies lässt vermuten, dass dadurch auch die Zelladhäsion nicht im vollen Maße möglich war. Die Oberflächenmodifikation durch Plasma soll bis zu 26 Monate Bestand haben, daher kann und sollte mindestens 24 h abgewartet werden, bevor die Probekörper mit Osteoblasten besiedelt werden.³⁸ Hinzu kommen etwaige Photolyseprodukte auf der Oberfläche, die zu einer verminderten Zelladhäsion geführt haben könnten.^{103,104} Durch einen erneuten Waschvorgang mit NaCl im Ultraschallbad hätten diese vermutlich beseitigt werden können.

Bei Versuchsbeginn wurde die Zählkammer nach Neugebauer zur Herstellung einer Zellsuspension (30.000 HOB/ml) verwendet. Die Zellsuspension wurde vor dem Pipettieren von jeweils 1 ml pro Probekörper gut durchmischt. Trotzdem kann eine ungleichmäßige Verteilung auf den Probekörpern nicht ausgeschlossen werden. Der Verdacht besteht bei dem deutlich niedrigeren Wert einzelner Titan Probekörpern an Tag 1 (siehe Abbildung 27).

Bei der Kultivierung der Zellen auf den Probekörpern wurde nach Versuchsbeginn das Nährmedium nicht erneut ausgetauscht. Bei der Fortführung des zuvor angewandten Protokolls zur Kultivierung der Zellen hätte das Nährmedium jeden zweiten Tag ausgetauscht werden müssen. Aufgrund der ausgewählten Auswertungstage wäre es dabei zu Schwankungen in den Ergebnissen gekommen. Ein Austausch des Nährmediums hätte einen Anstieg der Konzentration des Kälberserums nach sich gezogen und somit ggf. zu einem Anstieg der Zellviabilität und damit der Zellproliferation geführt. Zusätzlich wäre ein Austausch des Nährmediums mit einem erhöhten Risiko einer potentiellen Verunreinigung trotz aller Vorsichtsmaßnahmen einhergegangen. Jeder zusätzliche Kontakt gefährdet die Keimfreiheit der Zellkultur, wobei humane Osteoblasten sehr anfällig für Pilzsporen und Bakterien sind. Trotzdem sollte ein Protokoll angewandt werden, welches einen regelmäßigen Austausch des Nährmediums vorsieht und die Auswertungstage so gewählt sind, dass es dadurch nicht zu Schwankungen der Ergebnisse kommt.

Ein weiterer Punkt ist die ungleiche Verteilung der Zellen auf dem Probekörper. Wie in den Übersichtsaufnahmen in Abbildung 30 zu sehen ist, haben sich die Osteoblasten bei mehreren Probekörpern punktuell vermehrt angereichert. Dies führt bei der Auswertung der Zellzählung oder der Flächenbedeckung unweigerlich zu Fehlern. Durch Überlagerung von Zellen können einzelne Nuklei in der Übersichtsaufnahme nicht mehr unterschieden werden. Dies könnte beispielsweise durch eine reduzierte Zellzahl bei Versuchsbeginn und durch die Anwendung eines Titanringes verhindert werden. Der Titanring würde beim Pipettieren die Zellsuspension zentral eingrenzen und so eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleisten. Je gleichmäßiger die Zellen auf dem Probekörper verteilt sind desto genauer ist die Auswertung, unabhängig ob durch eine manuelle/automatisierte Zellzählung/Messung der Flächenbedeckung.

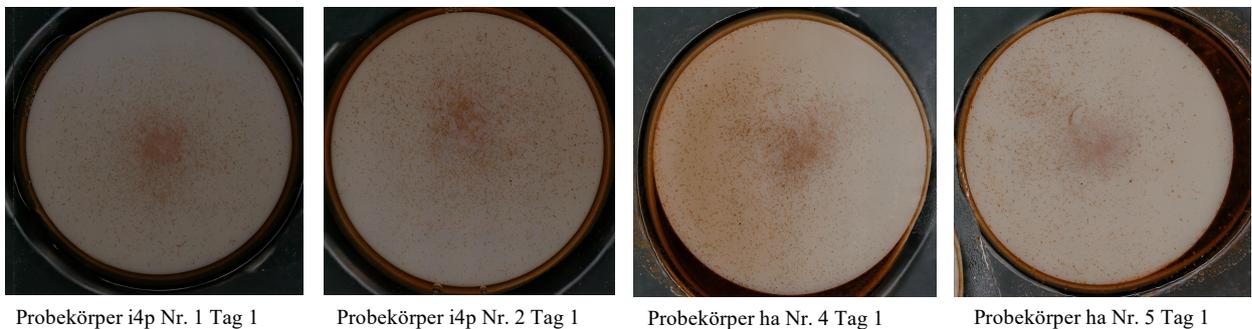


Abbildung 30 Beispiele für die ungleiche Verteilung der Zellen auf den Probekörpern

Die Auswertung der Zelldifferenzierung über die ALP Aktivität kann nicht bei Probekörpern angewandt werden, bei welchen Hydroxylapatit an der Oberfläche präsentiert wird. Durch die erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wird die ALP-Aktivität stimuliert. Alternativ könnte in Zukunft z.B. Osteocalcin quantitativ nachgewiesen werden. Dies würde zusätzlich die Limitation des Versuchsmodells erweitern, da die Mineralisationsprozesse ebenfalls untersucht werden würden.⁹⁴

Die Limitation des vorliegenden in vitro Versuchs lag vornehmlich im Nachweis der Zelldifferenzierung. Auf die Supplementierung von für den Knochenstoffwechsel notwendigen Zusatzstoffen (Ca^{2+} , PO, Zytokinen und Wachstumsfaktoren) wurde verzichtet, da eine qualitative/quantitative Untersuchung der Mineralisationsprozesse nicht durchgeführt wurde. Dies hätte jedoch genauere Auskunft über die Qualität der Zelldifferenzierung geben können.

4. 6. Fazit

PEEK besitzt in seiner unbehandelten Form keine ausreichende Biokompatibilität, um in der dentalen Implantologie eine mögliche Alternative zu Titan darzustellen.

Es wurde gezeigt, dass durch längere Polymerketten des PEEK Polymers über die Vergrößerung der kristallinen Bereiche eine Steigerung der Biokompatibilität erreicht werden kann.

Die vorliegende in vitro Studie ergab, dass die Plasmabehandlung mit Ar/O₂ der PEEK Oberfläche und die Compoundierung von PEEK mit Hydroxylapatit nicht zu einer ausreichenden Steigerung der Zellreaktion führen.

Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass i4rgd die höchste Zellreaktion hinsichtlich einer osseointegrativen Eigenschaft aufzeigt. Vor allem in Bezug auf die initiale Zelladhäsion und die Zelldifferenzierung war die Funktionalisierung der PEEK Oberfläche durch die kovalente Bindung des RGD-Peptids vorteilhaft gegenüber unbehandelten PEEK, Titan und den anderen mituntersuchten Modifikationsmöglichkeiten von PEEK.

In Bezug auf die Zellproliferation zeigte Titan signifikant höhere Ergebnisse. Die Zelldifferenzierung fiel jedoch geringer aus als bei i4rgd. Daher kann die Aussage für diese in vitro Untersuchung getroffen werden, dass Titan quantitativ zu mehr Zellen auf der Probekörperoberfläche führt, diese jedoch qualitativ den Zellen der i4rgd Oberfläche unterliegen. Dies könnte bei der Einheilung von PEEK Implantaten einen Einfluss auf die Dauer der Osseointegration sowie auf den Verbund von Knochen und Implantat haben.

4. 7. Perspektive

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass PEEK als metallfreie alternative zu Titan ein vielversprechendes Material darstellen kann. Deshalb wird PEEK auch bereits seit einiger Zeit beispielsweise in der Wirbelsäulen Chirurgie eingesetzt. Die besonderen Anforderungen eines dentalen Implantates erfordern jedoch noch weitere Untersuchungen in Bezug auf die Zellreaktion von Osteoblasten und Fibroblasten. Dabei ist es unumgänglich Titan als Referenz mit zu untersuchen, um die Relevanz der jeweiligen Modifikationen herauszustellen.

Die Funktionalisierung von PEEK mit dem RGD-Peptid zeigte bereits eine deutliche Verbesserung der Zellreaktion im Vergleich zu unbehandelten PEEK. Die kovalent an die Oberfläche gebundenen Peptide sind weniger anfällig als ganze Proteine und scheinen eine zuverlässige Bindungsstelle für Osteoblasten darzustellen. Dies muss letztendlich durch in vivo Untersuchungen bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

1. Gesundheitsberichterstattung des Bundes (2009). Kariesprävalenz und Kariesrisiko 2000-2009, [online] http://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid=gast&p_aid=0&p_knoten=FID&p_sprache=D&p_suchstring=9177#tab1 [20.08.2019].
2. MarketsandMarkets (2016). Dental Implants Market (2010-2015), [online] <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/Dental-Implants-Market-241.html> [21.08.2019].
3. Ring ME. Dentistry: an illustrated history. 2nd ed. New York: Harry N. Abrams, Inc.; 1985.
4. Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T, Rosen HM. Tissue-Integrated Prosthesis. Osseointegration in Clinical Dentistry. Vol. 77, Plastic and Reconstructive Surgery. Chicago: Quintessence Publishing; 1986.
5. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. J Prosthet Dent. 1983 Sep 1;50(3):399–410.
6. Buser D, Schenk RK, G. Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. Vol. 25, Journal of biomedical materials research. 1991. 889–902 p.
7. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, Hoffmann B, Lussi A, Steinemann SG. Enhanced Bone Apposition to a Chemically Modified SLA Titanium Surface. J Dent Res. 2004 Aug 1;83:529–33.
8. Cionca N, Hashim D, Mombelli A. Zirconia dental implants: where are we now, and where are we heading? Periodontol 2000. 2017;73(1):241–58.
9. Haro Adánez M, Nishihara H, Att W. A systematic review and meta-analysis on the clinical outcome of zirconia implant–restoration complex. J Prosthodont Res. 2018 Oct 1;62(4):397–406.
10. Dorlands Illustrated Medical Dictionary. 32nd ed. Oxford: Elsevier Ltd; 2011. 2147 p.
11. Biology THE, Fracture OF. NIH Public Access. 2012;42(6):551–5.
12. Schenk RK, Buser D. Osseointegration: a reality. Periodontol 2000. 17(1):22–35.
13. Bergler M, Kessler P, Nkenke E, Rupprecht S, Schlegel A, Schultze-Mosgau S, Vairaktaris E. Wundheilung im Bereich des Implant-Knochen- Interfaces (Osseointegration). 1st ed. Stuttgart: Thieme Verlagsgruppe; 207AD. 244 p.
14. Davies J. Understanding peri-implant endosseous healing. J Dent Educ. 2003;67(8):932–49.
15. Gottlander M, Albrektsson T. Histomorphometric studies of hydroxylapatite-coated and uncoated CP titanium threaded implants in bone. 1991;6:1–12.
16. Elmengaard B, Bechtold JE, Søballe K. In vivo study of the effect of RGD treatment on bone ongrowth on press-fit titanium alloy implants. Biomaterials. 2005;26(17):3521–6.
17. Abraham CM. A Brief Historical Perspective on Dental Implants, Their Surface Coatings and Treatments. Open Dent J. 2014 May 16;8:50–5.
18. Müller K, Valentine-Thon E. Hypersensitivity to titanium: Clinical and laboratory evidence. Neuroendocrinol Lett. 2006;27(SUPPL. 1):31–5.
19. Thomas P, Bandl W-D, Maier S, Summer B, Przybilla B. Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing , eczema , and T - cell hyperresponsiveness in vitro : case report and review of the literature. Contact Dermatitis. 2006;55:199–202.
20. Javed F, Al-Hezaimi K, Almas K, Romanos GE. Is Titanium Sensitivity Associated with

- Allergic Reactions in Patients with Dental Implants? A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res.* 15(1):47–52.
21. Sicilia A, Cuesta S, Coma G, Arregui I, Guisasola C, Ruiz E, Maestro A. Titanium allergy in dental implant patients: A clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(8):823–35.
 22. Jacobi-Gresser E, Huesker K, Schütt S. Genetic and immunological markers predict titanium implant failure: A retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2013 Apr 1;42(4):537–43.
 23. Costa ALF, Appenzeller S, Yasuda CL, Pereira FR, Zanardi VA, Cendes F. Artifacts in brain magnetic resonance imaging due to metallic dental objects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(6):278–82.
 24. Litzenburger F, Heck K, Pitchika V, Neuhaus KW, Jost FN, Hickel R, Jablonski-momeni A, Welk A, Lederer A, Fontenele RC, Nascimento EHL, Vasconcelos T V, Noujeim M, Freitas DQ. Magnitude of cone beam computed tomography image artifacts related to zirconium and titanium implants: impact on image quality. *Dentomaxillofacial Radiology.* 2017.
 25. Kerschhofer D, Gundapaneni D, Christof S, Goswami T. Applicability of PEEK and its composites in total ankle replacement devices and wear rate predictions. *Biomed Phys Eng Express.* 2016;2(6).
 26. Sagomonyants KB, Jarman-Smith ML, Devine JN, Aronow MS, Gronowicz GA. The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials.* 2008;29(11):1563–72.
 27. Kohal RJ, Finke HC, Klaus G. Stability of prototype two-piece zirconia and titanium implants after artificial aging: An in vitro pilot study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2009;11(4):323–9.
 28. Gahlert M, Burtscher D, Grunert I, Kniha H, Steinhauser E. Failure analysis of fractured dental zirconia implants. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(3):287–93.
 29. Pizolato RA, Gavião MBD, Berretin-Felix G, Sampaio ACM, Trindade Junior AS. Maximal bite force in young adults with temporomandibular disorders and bruxism. *Braz Oral Res.* 2007 Sep;21(3):278–83.
 30. Kurtz SM. An Overview of PEEK Biomaterials. In: *PEEK Biomaterials Handbook.* Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 1–7.
 31. Schwitalla A, Müller W-D. PEEK Dental Implants: A Review of the Literature. *J Oral Implantol.* 2013;39(6):743–9.
 32. Reitman M, Jaekel D, Siskey R, Kurtz SM. Morphology and Crystalline Architecture of Polyaryletherketones. In: *PEEK Biomaterials Handbook.* Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 49–60.
 33. Kurtz SM. Synthesis and Processing of PEEK for Surgical Implants. In: *PEEK Biomaterials Handbook.* Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 9–22.
 34. Sobieraj MC, Rimnac CM. Fracture, Fatigue, and Notch Behavior of PEEK. In: *PEEK Biomaterials Handbook.* Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 61–73.
 35. Evonik Recource Efficiency GmbH (2016). Vestakeep® Peek Broschüre, [online] <https://industrial.vestakeep.com/product/peek-industrial/de/pages/produktinformationen.aspx> [25.08.2016].
 36. Najeeb S, Zohaib K, Sana Z, Muhammad Sohail Z. Bioactivity and Osseointegration of PEEK Are Inferior to Those of Titanium: A Systematic Review. *J Oral Implantol.* 2016;42(6):512–6.
 37. Toth JM. Biocompatibility of Polyaryletheretherketone Polymers. In: *PEEK Biomaterials Handbook.* Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 81–92.
 38. Poulsson AHC, Richards RG. Surface Modification Techniques of Polyetheretherketone,

- Including Plasma Surface Treatment. In: PEEK Biomaterials Handbook. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 145–61.
39. Walsh WR, Bertollo N, Christou C, Schaffner D, Mobbs RJ. Plasma-sprayed titanium coating to polyetheretherketone improves the bone-implant interface. *Spine J*. 2015;15(5):1041–9.
 40. Wang H, Lu T, Meng F, Zhu H, Liu X. Enhanced osteoblast responses to poly ether ether ketone surface modified by water plasma immersion ion implantation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2014;117:89–97.
 41. Zheng Y, Xiong C, Zhang L. Dose-dependent enhancement of osteoblast cell adhesion, spreading and proliferation on plasma-carboxylated poly(etheretherketone) surface. *Mater Lett*. 2016;164:60–3.
 42. Poulsson AHC, Eglin D, Zeiter S, Camenisch K, Sprecher C, Agarwal Y, Nehrbass D, Wilson J, Richards RG. Biomaterials Osseointegration of machined , injection moulded and oxygen plasma modified PEEK implants in a sheep model. *Biomaterials*. 2014;35(12):3717–28.
 43. Briem D, Strametz S, Schröder K, Meenen NM, Lehmann W, Linhart W, Ohl A, Rueger JM. Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 2005;16(7):671–7.
 44. Rochford ETJ, Subbiahdoss G, Moriarty TF, Poulsson AHC, Van Der Mei HC, Busscher HJ, Richards RG. An in vitro investigation of bacteria-osteoblast competition on oxygen plasma-modified PEEK. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2014;102(12):4427–34.
 45. Becker M, Lorenz S, Strand D, Vahl C, Gabriel M. Covalent grafting of the RGD-peptide onto polyetheretherketone-surfaces via Schiff base formation Short title : PEEK modification Keywords. 2013;2013:1–10.
 46. Noiset O, Schneider YJ, Marchand-Brynaert J. Fibronectin adsorption or/and covalent grafting on chemically modified PEEK film surfaces. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1999;10(6):657–77.
 47. Zheng Y, Xiong C, Li X, Zhang L. Covalent attachment of cell-adhesive peptide Gly-Arg-Gly-Asp (GRGD) to poly(etheretherketone) surface by tailored silanization layers technique. *Appl Surf Sci*. 2014;320:93–101.
 48. Wei S, Deng Y, Liu X, Xu A, Wang L, Luo Z, Zheng Y, Deng F, Tang Z, Wei J. Effect of surface roughness on osteogenesis in vitro and osseointegration in vivo of carbon fiber-reinforced polyetheretherketone & nanohydroxyapatite composite. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:1425.
 49. Ma R, Tang S, Tan H, Lin W, Wang Y, Wei J, Zhao L, Tang T. Preparation, characterization, and in vitro osteoblast functions of a nano-hydroxyapatite/polyetheretherketone biocomposite as orthopedic implant material. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):3949–61.
 50. Wang L, He S, Wu X, Liang S, Mu Z, Wei J, Deng F, Deng Y, Wei S. Polyetheretherketone/nano-fluorohydroxyapatite composite with antimicrobial activity and osseointegration properties. *Biomaterials*. 2014;35(25):6758–75.
 51. Deng Y, Zhou P, Liu X, Wang L, Xiong X, Tang Z, Wei J, Wei S. Preparation, characterization, cellular response and in vivo osseointegration of polyetheretherketone/nano-hydroxyapatite/carbon fiber ternary biocomposite. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;136:64–73.
 52. Ha SW, Kirch M, Birchler F, Eckert KL, Mayer J, Wintermantel E, Sittig C, Pfund-Klingenfuss I, Textor M, Spencer ND, Guecheva M, Vonmont H. Surface activation of polyetheretherketone (PEEK) and formation of calcium phosphate coatings by precipitation. *J Mater Sci Mater Med*. 1997;8(11):683–90.
 53. Brennan WJ, Feast WJ, Munro HS, Walker SA. Investigation of the ageing of plasma

- oxidized PEEK. *Polymer (Guildf)*. 1991 Jan 1;32(8):1527–30.
54. Tsai PP, Wadsworth LC, Roth JR. Surface Modification of Fabrics Using a One-Atmosphere Glow Discharge Plasma to Improve Fabric Wettability. *Text Res J*. 1997 May 1;67(5):359–69.
 55. Garton A, Sturgeon PZ, Carlsson DJ, Wiles DM. Plasma etching of polypropylene films and fibres. *J Mater Sci*. 1978 Oct;13(10):2205–10.
 56. Ruoslahti E, Pierschbacher M. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (80-)*. 1987;238(4826):491–7.
 57. Noiset O, Schneider YJ, Marchand-Brynaert J. Adhesion and growth of CaCo2 cells on surface-modified PEEK substrata. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000;11(7):767–86.
 58. Kantlehner M, Schaffner P, Finsinger D, Meyer J, Jonczyk A, Diefenbach B, Nies B, Hölzemann G, Goodman SL, Kessler H. Surface coating with cyclic RGD peptides stimulates osteoblast adhesion and proliferation as well as bone formation. *Chembiochem*. 2000;1(2):107–14.
 59. Eid K, Chen E, Griffith L, Glowacki J. Effect of RGD coating on osteocompatibility of PLGA-polymer disks in a rat tibial wound. *J Biomed Mater Res*. 2001;57(2):224–31.
 60. Joseph Dennes T, Schwartz J. A nanoscale adhesion layer to promote cell attachment on PEEK. *J Am Chem Soc*. 2009;131(10):3456–7.
 61. Dorozhkin S V., Epple M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew Chemie*. 2002 Sep 2;114(17):3260–77.
 62. Liu Q, Huang S, Matinlinna JP, Chen Z, Pan H. Insight into biological apatite: physiochemical properties and preparation approaches. *Biomed Res Int*. 2013;2013:929748.
 63. Bertazzo S, Bertran CA. Morphological and Dimensional Characteristics of Bone Mineral Crystals. *Key Eng Mater*. 2006 May;309–311:3–6.
 64. Deutzmann R, Bruckner P. Knorpel- und Knochengewebe. In: Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin; 2014. p. 952–60.
 65. Ma R, Guo D. Evaluating the bioactivity of a hydroxyapatite-incorporated polyetheretherketone biocomposite. *J Orthop Surg Res*. 2019 Dec 25;14(1):32.
 66. Ma R, Weng L, Bao X, Song S, Zhang Y. In vivo biocompatibility and bioactivity of in situ synthesized hydroxyapatite/polyetheretherketone composite materials. *J Appl Polym Sci*. 2013;127(4):2581–7.
 67. Zhao M, Li H, Liu X, Wei J, Ji J, Yang S, Hu Z, Wei S. Response of Human Osteoblast to n-HA/PEEK-Quantitative Proteomic Study of Bio-effects of Nano-Hydroxyapatite Composite. *Sci Rep*. 2016 Mar 9;6:22832.
 68. Yang H-W, Tang X-S, Tian Z-W, Wang Y, Yang W-Y, Hu J-Z. Effects of Nano-Hydroxyapatite/Polyetheretherketone-Coated, Sandblasted, Large-Grit, and Acid-Etched Implants on Inflammatory Cytokines and Osseointegration in a Peri-Implantitis Model in Beagle Dogs. *Med Sci Monit*. 2017 Sep 25;23:4601–11.
 69. Durham JW, Montelongo SA, Ong JL, Guda T, Allen MJ, Rabiei A. Hydroxyapatite coating on PEEK implants: Biomechanical and histological study in a rabbit model. *Mater Sci Eng C*. 2016 Nov 1;68:723–31.
 70. Czekanska EM, Stoddart MJ, Richards RG, Hayes JS. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cell Mater*. 2012 Jul 9;24:1–17.
 71. Davies JE. In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec*. 1996 Jun 1;245(2):426–45.
 72. Mundy GR. Local control of bone formation by osteoblasts. *Clin Orthop Relat Res*. 1995 Apr;(313):19–26.
 73. Brynda E, Pacherník J, Houska M, Pientka Z, Dvořák P. Surface Immobilized Protein Multilayers for Cell Seeding. *Langmuir*. 2005;21(16):7877–83.

74. Bačáková L, Filová E, Rypáček F, Švorčík V, Starý V. Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering. *Physiol Res*. 2004;53:35–45.
75. Oliveira SM, Alves NM, Mano JF. Cell interactions with superhydrophilic and superhydrophobic surfaces. *J Adhes Sci Technol*. 2014 Apr 18;28(8–9):843–63.
76. Vandrovcová M, Bačáková L. Adhesion, Growth and Differentiation of Osteoblasts on Surface-Modified Materials Developed for Bone Implants. *Physiol Res*. 2011;60:403–17.
77. Nemes Z, Dietz R, Lüth JB, Gomba S, Hackenthal E, Gross F. The pharmacological relevance of vital staining with neutral red. *Experientia*. 1979 Nov 15;35(11):1475–6.
78. Wego A, Geske G. Korrekte Erkennung von Farben und Oberflächen mit Farbsensoren. *Photonik*. 2010 Oct;S. 38–42.
79. Twigg RS. Oxidation-reduction aspects of Resazurin. *Nature*. 1945;155(3935):401–2.
80. Czekanska EM. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol Biol*. 2011;740:27–32.
81. Page B, Page M, Noel C. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *Int J Oncol*. 1993 Sep 1;3(3):473–6.
82. Wikipedia 2018. Abbildung Resazurin zu Resorufin, [online] <https://en.wikipedia.org/wiki/Resazurin> [31.09.2018].
83. Rampersad SN. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*. 2012;12(9):12347–60.
84. Jonsson KB, Frost A, Larsson R, Ljunghall S, Ljunggren Ö. A new fluorometric assay for determination of osteoblastic proliferation: Effects of glucocorticoids and insulin-like growth factor-I. *Calcif Tissue Int*. 1997;60(1):30–6.
85. Frost A, Jonsson KB, Brändström H, Ohlsson C, Ljunghall S, Ljunggren Ö. Interleukin-13 inhibits cell proliferation and stimulates interleukin-6 formation in isolated human osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3285–9.
86. Moursi AM, Winnard PL, Winnard A V., Rubenstrunk JM, Mooney MP. Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. *Cleft Palate-Craniofacial J*. 2002;39(5):487–96.
87. Guo XY, Gough J, Xiao P, Liu J, Shen ZJ. Initial in Vitro Interaction of Human Osteoblasts With Nanostructured Hydroxyapatite (Nha). *Adv Bioceram Biocomposites II*. 2007;27(6):3–14.
88. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods*. 1997;204(2):205–8.
89. Le Du M-H, Millan JL. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49808–14.
90. Sabokbar A, Millett PJ, Myer B, Rushton N. A rapid, quantitative assay for measuring alkaline phosphatase activity in osteoblastic cells in vitro. *Bone Miner*. 1994;27(1):57–67.
91. Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol*. 2009;57(4):318–23.
92. Lorenz U. Protein Tyrosine Phosphatase Assays. In: *Current Protocols in Immunology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. p. 11.7.1-11.7.12.
93. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*. 1990 Jun 1;143(3):420–30.
94. Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W, Niedhart C, Engel I, Schulz H, Atkinson MJ, Hüfner M. Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*.

- 1999 Oct 1;75(1):22–35.
95. Invibio Ltd. (2018). Invibio PEEK OPTIMA HA Enhanced Spine Broschüre German, [online] <https://invibio.com/materials/peek-optima-ha-enhanced> [03.04.2018].
 96. Green S. Compounds and Composite Materials. In: PEEK Biomaterials Handbook. Amsterdam: Elsevier Inc.; 2012. p. 23–48.
 97. Alicona Imaging GmbH (2016). Infinitofocus Abbildung, [online] <https://www.alicon.com/de/produkte/oberflaechenmessgeraet-fuer-rauheit-form/> [25.08.2016].
 98. WEKA Business Medien GmbH (2016). Abbildung Kontaktwinkelmessung, [online] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2d/Kontaktwinkel.svg> [25.08.2016].
 99. Provitro GmbH (2017). Human Osteoblasts (HOB), [online] https://www.provitro.de/fileadmin/provitro-data/Cell_Cultures/1210311.HOB.cryo.v.3.0.pdf [17.04.2017].
 100. Provitro GmbH (2017). Osteoblast growth medium, [online] https://www.provitro.de/fileadmin/provitro-data/Culture_Media/2010301.FCS.v3.0.pdf [17.04.2017].
 101. Lee JH, Khang G, Lee JW, Lee HB. Interaction of Different Types of Cells on Polymer Surfaces with Wettability Gradient. *J Colloid Interface Sci.* 1998 Sep 15;205(2):323–30.
 102. Altankov G, Grinnell F, Groth T. Studies on the biocompatibility of materials: Fibroblast reorganization of substratum-bound fibronectin on surfaces varying in wettability. *J Biomed Mater Res.* 1996 Mar;30(3):385–91.
 103. Teare DOH, Emmison N, Ton-That C, Bradley RH. Cellular Attachment to Ultraviolet Ozone Modified Polystyrene Surfaces. *Langmuir.* 2000;16(6):2818–24.
 104. Poulsson AHC, Richards RG. Polymer surface modification. Switzerland patent WO2009/149827A1, 2009.
 105. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. RGD modified polymers: Biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials.* 2003;24(24):4385–415.
 106. Rootare HM, Deitz VR, Carpenter FG. Solubility product phenomena in hydroxyapatite-water systems. *J Colloid Sci.* 1962;17(3):179–206.
 107. Kim M-J, Kim C-W, Lim Y-J, Heo S-J. Microrough titanium surface affects biologic response in MG63 osteoblast-like cells. *J Biomed Mater Res Part A.* 2006 Oct 10;79A(4):1023–32.
 108. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, Cheng A, Anderson DM, McLachlan T, Stephan I, Geis-Gerstorfer J, Sandhage KH, Fedorov AG, Rupp F, Boyan BD, Tannenbaum R, Schwartz Z. The roles of titanium surface micro/nanotopography and wettability on the differential response of human osteoblast lineage cells. *Acta Biomater.* 2013;9(4):6268–77.
 109. Bachle M, Kohal RJ. A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells. *Clin Oral Implants Res.* 2004 Dec;15(6):683–92.
 110. Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Belcastro S, Guerra M, Calvitti M, Lilli C, Calvi EM, Locci P. Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 21(5):719–25.
 111. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop.* 2007 Sep;18(5):444–8.
 112. Zhang H, Lewis CG, Aronow MS, Gronowicz GA. The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti–6Al–4V implants in vitro. *J Orthop Res.* 2004 Jan;22(1):30–8.
 113. Bergot C, Wu Y, Jolivet E, Zhou LQ, Laredo JD, Bousson V. The degree and distribution of cortical bone mineralization in the human femoral shaft change with age and sex in a microradiographic study. *Bone.* 2009 Sep;45(3):435–42.

114. Voegele T, Voegele-Kadletz M, Esposito V, Macfelda K, Oberndorfer U, Vecsei V, Schabus R. The effect of different isolation techniques on human osteoblast-like cell growth. *Anticancer Res.* 2000 Sep 1;20(5B):3575–81.
115. Li K, Yeung CY, Yeung KWK, Tjong SC. Sintered Hydroxyapatite/Polyetheretherketone Nanocomposites: Mechanical Behavior and Biocompatibility. *Adv Eng Mater.* 2012 Apr;14(4):B155–65.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Surian Herrmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkung unterschiedlicher PEEK Oberflächenmodifikationen auf humane Osteoblasten – eine in vitro Studie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum 03.12.2021 Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil, Prof. (UH) Wolf-Dieter Müller für die Betreuung und die Überlassung des Themas danken und die damit verbundene Geduld. Er hat mir gezeigt, dass die Grundlagenforschung ein spannendes, wenn auch zeitaufwändiges Feld der Wissenschaft darstellt.

Darüber hinaus gilt mein ganz besonderer Dank meiner Mutter, Margarete Herrmann, sowie meiner Großmutter, Wanda Iwko, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.