

Entwicklung von Life-on-a-Chip Systemen zur Charakterisierung und Manipulation dynamischer Effekte adhärenter Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität Augsburg

von

Melanie Elisabeth Maria Stamp

Augsburg, März 2017



Erstgutachter: Prof. Dr. Achim Wixforth
Zweitgutachter: Prof. Dr. Bernd Stritzker

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 2017

Abstract

The understanding of cell adhesion, migration and proliferation is of great importance in the field of biomedical applications, regenerative tissue growth and optimizing medical implants. When implementing a foreign subject into living tissue, it is first colonized by cells. Whether those cells are able to stick onto the substrate depends on the adhesiveness of the cells as well as the interactions between cell and substrate. Afterwards, the migration in combination with the proliferation sets in, which combines the implant or artificial tissue with the surrounding tissue. This thesis examines the adhesion, as well as the advanced and directed migration of cells, and considers the three fundamental challenges

- Cell adhesion on medical implants under static and dynamic conditions
- Manipulation of cell migration applying acoustic surface waves towards the aim of enhanced wound healing
- Cell guidance on structured surfaces

A lab-on-a-chip system based on the effect of acoustic flow is used to characterize the adhesion of cells on medical implants in which physiological conditions such as pH and temperature as well as the implant material can be varied as desired. Thus, infections during the healing of the implant can be simulated and various substrates can be investigated. By analyzing the effect of the applied shear forces on the time dependent detachment rates, the individual adhesive strength of the cells on the substrate can be determined. The maximum adhesion under static conditions is found at 37 ° C. and a pH of 7.4 as well as a surface roughness of $R_q = 3.76 \mu\text{m}$ on titanium implants. Under dynamic, i.e. flow conditions, the cells are more strongly detached at high temperatures and lower pH values. At shear rates of up to approx. 7000 s^{-1} , an exponential decay of the area occupied by cells is shown. The second part of this thesis introduces a new ultrasound-like technique for the dynamic stimulation of cell migration, which accelerates wound healing in a life-on-a-chip system. Apart of the primal phenomenological characterization of this effect, it was shown that both, the direct impact of the mechanical as well as the electrical part of the surface acoustic waves contribute to the advanced wound healing. Preliminary inquiries showed the potential to transfer this concept of fast wound healing to flexible materials in the future. These studies constitute the basis for novel active implants in the field of advanced regeneration of damaged tissue. The last part of the work is devoted to the production of structured surfaces for cell guidance. Here, the scope of hydrophilic structures on hydrophobic substrates and ferroelectrically polarized domains is investigated in order to move cells along a prescribed path. Neither are the surfaces topographically textured nor are the cells chemotactically or durotactically directed. It was shown that the cells migrate along the hydrophilic structure while avoiding

hydrophobic areas. The positive ferroelectric structuring could be demonstrated by various methods. Furthermore, by selective etching of the domains, 80 nm-deep regions could be produced which are suitable as nanochannels or nanobarriers. These techniques can be further developed for systematical structuring of implants. The systems developed in this work have been successfully used for the characterization and active manipulation of cell adhesion and migration. They thus make a decisive contribution to the research and development of implants and biomedical applications for the selected and rapid regeneration of living tissue.

Kurzdarstellung

Im Bereich biomedizinischer Anwendungen hinsichtlich regenerativem Gewebewachstum sowie optimierter medizinischer Implantate ist das Verständnis der Zelladhäsion, -migration und -proliferation von großer Bedeutung. Wird ein Fremdkörper ins Gewebe eingebracht, so wird dieser zunächst von Zellen besiedelt. Ob diese darauf anhaften können, liegt im Adhäsionsvermögen der Zellen und den Wechselwirkungen zwischen Zelle und Substrat. Anschließend erfolgt die Migration in Kombination mit der Proliferation, bei der das Implantat oder künstliche Gewebe mit dem umliegenden Gewebe verwächst. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Adhäsion sowie der beschleunigten und gerichteten Migration von Zellen und betrachtet dabei die drei elementaren Herausforderungen

- Zelladhäsion auf medizinischen Implantaten unter statischen und dynamischen Bedingungen
- Manipulation der Zellmigration durch akustische Oberflächenwellen mit dem Ziel beschleunigter Wundheilung
- Gerichtetes Wachstum von Zellen auf strukturierten Oberflächen

Zur Charakterisierung der Adhäsion von Zellen auf Implantaten dient ein auf dem Effekt akustischer Strömung basierendes Lab-on-a-Chip System, bei dem physiologische Bedingungen wie pH-Wert und Temperatur, sowie das Implantatmaterial beliebig variiert werden können. Somit lassen sich zum einen Infektionen bei der Einheilung des Implantats simulieren als auch verschiedene Substrate testen. Durch Analyse des Effekts der einwirkenden Scherkräfte auf die zeitliche Ablöserate lässt sich weiterhin das individuelle Adhäsionsvermögen der Zellen auf dem Substrat bestimmen. Es zeigt sich, dass die maximale Adhäsion unter statischen Bedingungen bei 37 °C und einem pH-Wert von 7,4 sowie einer Oberflächenrauigkeit von $R_q = 3,76 \mu\text{m}$ auf Titanimplantaten vorliegt. Unter dynamischen, sprich Flussbedingungen findet eine stärkere Ablösung der Zellen bei hohen Temperaturen und niedrigeren pH-Werten statt. Bei Scherraten von bis zu ca. 7000 s^{-1} zeigt sich ein exponentieller Abfall der mit Zellen belegten Fläche.

Im zweiten Teil der Arbeit wird eine neue Technik zur dynamischen Stimulation der Zellmigration vorgestellt, welche die Wundheilung in einem Life-on-a-Chip System beschleunigt. Neben der erstmaligen phänomenologischen Charakterisierung des Effekts, wurde gezeigt, dass sowohl die direkte Einwirkung des mechanischen, sowie elektrischen Anteils der akustischen Oberflächenwellen zur künstliche Wundheilung beitragen. In Voruntersuchungen wurde das Potential gezeigt, dieses Prinzip zukünftig auf flexible Materialien zu übertragen. Diese stellen somit den Grundstein für neuartige aktive Implantate zur beschleunigten Regeneration von beschädigtem Gewebe dar.

Der letzte Teil der Arbeit widmet sich der Herstellung strukturierter Oberflächen für gerichtetes Zellwachstum. Hierbei wird das Potential hydrophiler Strukturen auf hydrophobem Untergrund sowie ferroelektrisch polarisierten Domänen untersucht, um Zellen entlang eines vorgegebenen Pfades zu führen. Die Oberflächen sind dabei weder topographisch geprägt noch werden die Zellen chemotaktisch oder durotaktisch gelenkt. Dabei zeigte sich, dass die Zellen entlang der hydrophilen Struktur wandern, während hydrophobe Bereiche gemieden werden. Die positive ferroelektrische Strukturierung konnte durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Weiterhin konnte durch selektives Ätzen der Domänen 80 nm tiefe Bereiche hergestellt werden, welche sich als Nanokanäle bzw. Nanobarrieren eignen. Diese Techniken können zur gezielten Strukturierung von Implantaten weiterentwickelt werden. Die in dieser Arbeit entwickelten Systeme konnten erfolgreich zur Charakterisierung sowie aktiven Manipulation der Zelladhäsion und -migration verwendet werden. Sie liefern somit einen entscheidenden Beitrag zur Forschung und Entwicklung von Implantaten und biomedizinischen Anwendungen zur gezielten und beschleunigten Regeneration von Gewebe.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Zelladhäsion und -migration als essentielle Mechanismen zur Erhaltung und Regeneration zellulärer Organismen	1
2 Theoretische Grundlagen	5
2.1 Akustische Oberflächenwellen	5
2.1.1 Akustische Wellenausbreitung in einem Festkörper	5
2.1.2 Rayleighwelle	8
2.1.3 Erzeugung von SAW	10
2.1.4 Dämpfung akustischer Oberflächenwellen	11
2.1.5 Beugung akustischer Oberflächenwellen	11
2.2 Hydrodynamik und akustische Oberflächenwellen	12
2.2.1 SAW- Streaming	12
2.2.2 Akustischer Druck	14
2.3 Die Zelle	15
2.3.1 Der Zellzyklus	16
2.3.2 Zelladhäsion	18
2.3.3 Zellmigration	19
2.3.4 Die SaOs-2 Zelllinie	20
3 Zelladhäsion unter Scherfluss	21
3.1 Einführung	21
3.2 Versuchskomponenten und Präparation	23
3.3 Ergebnisse und Diskussion	28
3.3.1 Zeitabhängige Ablösung der Zellen unter Fluss	28
3.3.2 Einfluss von Temperatur, pH und Oberflächenrauigkeit auf die Zelladhäsion	29
3.3.3 Einfluss der Scherrate	39
3.3.4 Modellentwicklung zur scherraten abhängigen Ablösung	42
3.3.5 Anwendung auf neuartige Implantatmaterialien	45
3.4 Zusammenfassung und Ausblick	49
4 Stimulation der Zellmigration zur Wundheilung mit akustischen Oberflächenwellen	55
4.1 Einleitung	55

4.2	Versuchskomponenten und Präparation	57
4.3	Ergebnisse und Diskussion	61
4.3.1	Auswirkung von SAW auf die Zellmigration	61
4.3.2	Charakterisierung der möglichen Einflussfaktoren	66
4.3.3	Übertragung der Zellstimulation auf flexible Materialien	71
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	77
5	Gerichtetes Zellwachstum	79
5.1	Einführung	79
5.2	Zellwachstum auf hydrophil und hydrophob strukturierten Flächen	80
5.2.1	Einführung	80
5.2.2	Versuchskomponenten und Präparation	81
5.2.3	Ergebnisse und Diskussion	82
5.2.4	Zusammenfassung	86
5.3	Ferroelektrische Strukturierung	88
5.3.1	Einführung	88
5.3.2	Versuchskomponenten und Präparation	89
5.3.3	Polarisation und Nachweis der Domänen	90
5.3.4	Zellwachstum auf ferroelektrisch gepolten Domänen	93
5.3.5	Zusammenfassung	94
5.4	Zusammenfassung und Ausblick	96
6	Zusammenfassung und Ausblick	97
	Anhänge	101
	Anhang A - Probenherstellung	101
	Anhang B - Zellkultur	111
	Anhang C - Experimentdurchführung	112
	Anhang D - Software	117
	Danksagung	137

Abbildungsverzeichnis

	Seite
2.1 Phasengeschwindigkeit in LiNbO ₃	7
2.2 Slownesskurve von LiNbO ₃ 128 ° rot Y-Cut	8
2.3 Skizze einer Oberflächenwelle	9
2.4 Skizze eines IDT	10
2.5 SAW an der Grenzfläche Substrat zu Flüssigkeit	14
2.6 Zellzyklus	16
2.7 Phasen der Zelladhäsion	18
2.8 Phasen der Zellmigration	20
3.1 Skizze DANI Aufbau	24
3.2 Mikroskopbild De-Adhäsion	27
3.3 Zeitverlauf von $A_{c,t}$	29
3.4 Temperaturkurven der Zelladhäsion	31
3.5 Zelladhäsion unter physiologischen Variationen	38
3.6 PIVDAC	40
3.7 Thermodynamisches Ratenmodell	42
3.8 Vergleich der Scherfluss Regime	44
3.9 Adhäsion und Scherkraftabhängigkeit der Materialien	51
3.10 Materialspezifisches Ablöseverhalten	52
3.11 Pearson Korrelation	53
4.1 Aufbau Zellmanipulation	59
4.2 Mikroskopaufnahmen des Wundschlusses	62
4.3 Normierte Migrationsfläche als Funktion der Zeit	63
4.4 Vergleich der Flächenbelegungsrate	64
4.5 Verhältnisse der Migrationsraten	64
4.6 Vergleich der Migrationsgeschwindigkeiten von oberer und unterer Zellfront	65
4.7 Trajektorien von behandelter und unbehandelter Probe	65
4.8 Strömungsprofil des IDT Chips	69
4.9 Temperaturentwicklung als Funktion der angelegten Spannung	69
4.10 Amplitude der SAW	70
4.11 Flächenbelegungsrate ohne E-Feld	70
4.12 Graphische Skizze des möglichen Implantats	71
4.13 Komponenten des aktiven Implantats	72

4.14	Topographie der ZnO-Schichten auf verschiedenen Substraten	74
4.15	Frequenzspektren des S11-Signals	78
5.1	Strukturen für gerichtetes Zellwachstum	81
5.2	Nachweis der hydrophilen Strukturen	84
5.3	Zelladhäsion auf hydrophiler Linienstruktur	85
5.4	Zelladhäsion auf Ratschenstruktur	85
5.5	Zellorientierung auf hydrophilen Strukturen	86
5.6	Hysteresekurve	88
5.7	Polarisationskammer	90
5.8	UI-Verlauf der automatischen Polarisation	92
5.9	Nachweis der Polarisation mit Polfilter	93
5.10	AFM Aufnahmen von HF geätztem, polarisiertem LiNbO ₃	95
5.11	Zelladhäsion auf polarisiertem LiNbO ₃	95

Tabellenverzeichnis

	Seite
3.1 Scherraten der jeweiligen Zonen und Sigma Verteilung	39
3.2 Rauigkeit R_q und Kontaktwinkel α der verschiedenen Materialien	47
4.1 Materialien und Parameter für flexible Implantate	73

1 Zelladhäsion und -migration als essentielle Mechanismen zur Erhaltung und Regeneration zellulärer Organismen

Sucht man im Internet nach dem Begriff *künstliches Gewebe*, tauchen sofort Artikel mit wunderlichen Titeln wie: "Wir züchten uns ein Herz"[1] oder "Frankenstein-Technik: In Zukunft kommen Organe aus dem Drucker"[2] auf. Dies verdeutlicht, dass künstliche Organe und beschleunigte Wundheilung schon lange nicht mehr nur in Science Fiction Filmen oder Computer Spielen vorkommen, sondern ein verheißungsvolles und stetig wachsendes Forschungsgebiet darstellen. Als Beispiel dazu, startete die Softwareentwicklungsfirma Konami 2012 das Projekt *Phantom Arm*. Dabei handelt es sich um einen prostetischen Arm, der mit allerhand spielerischer Technik ausgestattet wurde und durch Sensoren, die auf Muskelbewegungen am Rücken des Patienten reagieren gesteuert wird [3]. Auch gelang es erst kürzlich einer Gruppe von Forschern des Swiss Federal Institute of Technology (EPFL), Lausanne, Switzerland durch Implantation eines Computerchips in das Hirn eines durch eine Rückenmarksverletzung gelähmten Rhesusaffen, die Nervenbahnen zu überbrücken, so dass dieser wieder laufen konnte [4]. Auch im Bereich der Wundheilung und der Herstellung künstlicher Haut konnten Forschern des Massachusetts Institute of Technology (MIT), Cambridge, USA erhebliche Fortschritte erzielen. Hier wird an einer Art zweiten Haut gearbeitet die sich in ihrer spezifischen Elastizität, Kontraktilität, Adhäsion und Zugfestigkeit wie menschliche Haut verhält [5].

Dies sind nur drei Beispiele für künstliche Gewebe und Implantate. Die Ideen und Anwendungen im Bereich der Biomedizin und dem Bioengineering sind nahezu unbegrenzt und verschmelzen sogar. Unabhängig von ihrer Komplexität haben sie jedoch eine grundlegende Voraussetzung gemein: Die Biokompatibilität der Implantate und künstlichen Organe für die Integration im menschlichen Körper.

Hier spielen Kernfaktoren wie eine gute Adhäsion und eine schnelle und idealerweise gerichtete Migration von Zellen eine wichtige Rolle, was die Erhaltung und Regenerierung des umliegenden Gewebes betrifft. Aus diesem Grund ist das Verständnis der biologischen Adhäsions- und Migrationsprozesse unabdingbar um die Einheilung aktiv zu unterstützen.

Gerade im Bereich der Implantatsforschung werden neue, funktionale Materialien mit antibakterieller Wirkung entwickelt um in invasiven Verfahren eine möglichst schnelle und infektionsfreie Einheilung der Implantate in das Knochengewebe zu erzielen [6, 7]. Neben den antibakteriellen Eigenschaften ist in allererster Linie eine sehr gute Adhäsion der Zellen auf den Materialien zwingend erforderlich, z.B. damit der Implantatschaft eines künstlichen Hüftgelenks in den Femur einwachsen kann. Hier gibt es bereits verschiedene Verfahren um das Adhäsionsvermögen unter statischen [8, 9] und dynamischen Bedingungen

zu untersuchen [10–14]. Jedoch werden dabei Faktoren wie infektionsbedingte Entzündungen oder Abrieb der Implantate vernachlässigt [15, 16].

Betrachtet man dazu die Herstellung von künstlichem Gewebe, welche aus einem Polymergerüst aufgebaut sind und durch entsprechende Zellen besiedelt werden, spielt hier neben der Adhäsion auch die Migration eine wichtige Rolle [17, 18]. Um eine gute Verteilung der Zellen im inneren der porösen Gerüste zu erhalten, werden hier beispielsweise mikrofluidische Techniken verwendet, um so die Zellen aktiv in das Gewebe zu bringen und dort migrieren und proliferieren zu lassen [18]. Auch auf dem Gebiet der beschleunigten Wundheilung ist eine schnelle Migration in das verletzte Gewebe unabdingbar. Hier gibt es Ansätze die durch Verwendung von therapeutischem Ultraschall [19–22], elektrischen Feldern [23, 24] oder Magnetfeldtherapie [25] eine schnellere Regeneration nach Verletzung oder operativem Eingriff erzielen. Darüber hinaus ist neben der normalen, beschleunigten Migration auch die kontrollierte bzw. gerichtete Migration ein interessanter Aspekt für biomedizinische Anwendungen. Eine Verbesserung der Zell-Substrat Wechselwirkung durch Modifikationen der Oberfläche kann hier ein gezieltes Wachstum erreichen. Unterschiedliche Steifigkeiten, topographische Strukturierung und chemische Gradienten auf den Substraten werden dabei zur Manipulation der migrierenden Zellen verwendet [26–31].

Diese Arbeiten belegen die Notwendigkeit und Möglichkeit die essentiellen Mechanismen der Zelladhäsion und -migration zu verstehen und zu beeinflussen. Das Konzept der akustischen Oberflächenwelle (Surface Acoustic Wave, SAW), sowie die erzeugte akustische Strömung soll dazu verwendet werden, um die Zelladhäsion auf neuartigen Implantatmaterialien zu untersuchen, und die Migrationsrate und -richtung durch direkte Stimulation der Zellen zu beeinflussen.

Der thematische Einstieg ist in Kapitel 2 gegeben. Hier werden zunächst die theoretischen Grundlagen zum Verständnis akustischer Schwingungen in einem Festkörper und die Erzeugung von Oberflächenwellen zusammengefasst. Auch die Interaktion der Welle an der Grenzfläche zu einer Flüssigkeit und das dabei entstehende 'Acoustic Streaming' durch das Einkoppeln der Welle in das Medium wird kurz erläutert. Da sich die Studien dieser Arbeit mit den drei Aspekten Adhäsion, Migrationsgeschwindigkeit und -richtung von Zellen beschäftigen, werden die grundlegenden Begriffe des Zellzyklus aufgeführt.

Zwingend notwendig für die Osseointegration ist in erster Linie die Adhäsion, bzw. das Adhäsionsvermögen von Zellen auf entsprechenden Materialien. So soll in Kapitel 3 mit Hilfe eines mikrofluidischen Aufbaus, das Anhaften der Knochenzellen an Implantaten unter statischen und dynamischen Bedingungen untersucht werden. Da es nach operativen Eingriffen häufig zu Infektionen oder Fieberausbrüchen kommen kann, werden in dieser Studie durch Veränderung des pH-Wertes und der Temperatur erschwerte physiologische Bedingungen simuliert. Die zentrale Fragestellung ist hier, wie sich Zellen hinsichtlich ihres Verhaltens durch Veränderung der Umgebungsbedingungen ändern und wie dieses sich jenseits physiologischer Grenzen verhält. Weiterhin hat eine Vielzahl von Studien ergeben, dass die Topographie des Substrates ebenfalls einen starken Einfluss auf die Haftung von Zellen hat. Um dies nun in dem vorgestellten Aufbau zu untersuchen, dient eine Reihe von Proben mit unterschiedlicher Rauigkeit als Substrat. Eine eigens entwickelte Software soll mit Hilfe einer Partikel Tracking Methode die Scherkräfte ermitteln und das zeitlich dokumentierte Ablösen der Zellen mit den dort vorherrschenden Scherkräfte korrelieren.

Darüber hinaus gilt es ein thermodynamisches Modell für diesen hydrodynamisch induzierten Deadhäsionsprozess aufzustellen und experimentell zu verifizieren.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Wundheilung durch z.B. elektrische Felder oder Ultraschallbehandlung deutlich gesteigert werden kann [21, 22, 32, 33]. Die Migration ist dabei ausschlaggebend für die schnelle Regeneration. Da SAW über eine mechanische Auslenkung der Oberfläche und ein elektrisches Feld, senkrecht und parallel zur Ausbreitungsrichtung der Welle besitzen, stellt sich die Frage, ob und wie sich SAW auf die Migration von Zellen auswirken. In Kapitel 4 werden die Zellen direkt auf dem SAW-Chip inkubiert und über ein 'Wound Healing Assay' die Migrationsgeschwindigkeiten ermittelt um die Frage zu beantworten, ob Zellmigration mittels SAW stimuliert werden kann. Dieser Effekt wird klar hinsichtlich auftretender möglichen Nebeneffekt der SAW untersucht. Weiter noch stellt sich die Frage, ob das Konzept der positiven Stimulation zur Konstruktion eines 'SAW healing patches', also eines aktiven Implantats zur beschleunigten Wundheilung übertragen werden kann. Hierfür werden verschiedene flexible Materialien mit dem piezoelektrischen ZnO beschichtet und die Erzeugung von SAW darauf untersucht.

Neben der Adhäsion und einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit ist auch die gezielte Steuerung der Migrationsrichtung für die Erhaltung und Regeneration von Gewebe von besonderem Interesse. Dazu sollen neben den bereits bekannten Methoden der Chemotaxis und Durotaxis, weitere Verfahren zur Beeinflussung der Migrationsrichtung entwickelt werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die Affinität adhärenter Zellen für hydrophile Oberflächen zu nutzen. So soll Kapitel 5 darüber Aufschluss geben, ob und wie Zellen auf hydrophil und hydrophob strukturierter Glassubstraten anhaften und sich dann auf diesen entlang eines definierten Pfades fortbewegen. Ein zweites Verfahren zur gezielten Migration soll dann basierend auf der Mikrostrukturierung des Oberflächenpotentials entwickelt werden. Anhand des ferroelektrischen Materials LiNbO_3 stellt sich hier die Frage wie eine mikrostrukturierte Polarisierung durchgeführt und nachgewiesen werden kann und ob Zellen auf diese Domänenstruktur reagieren.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Akustische Oberflächenwellen

Akustische Oberflächenwellen werden bereits seit den 60er Jahren für verschiedene elektronische Anwendungen und seit geraumer Zeit auch in der Mikrofluidik verwendet. Sei es in der Sensorik, als Frequenzfilter oder in mikrofluidischen Aufbauten, basiert die Technik immer auf dem piezoelektrischem Effekt und der daraus resultierenden Wellenausbreitung in einem Festkörper. Lord Rayleigh, Namensgeber der Rayleighwelle, fertigte bereits 1885 seine mathematische Abhandlung über die Ausbreitung von Wellen entlang von Oberflächen elastischer Festkörper an [34].

In dieser Arbeit wurden akustische Oberflächenwellen zur direkten Manipulation von Zellen, hinsichtlich ihrer Migration und Proliferation, sowie zur Untersuchung der Adhäsion von Zellen, verwendet. An dieser Stelle werden die Grundlagen der Festkörperschwingungen anhand der Kontinuumtheorie beschrieben. Anschließend wird auf die Wellenausbreitung in einem Piezoelektrikum eingegangen. Die verwendeten Gleichungen sind den Quellen [35–37] entnommen.

2.1.1 Akustische Wellenausbreitung in einem Festkörper

Die Ausbreitung akustischer Oberflächenwellen lässt sich mit Hilfe der Kontinuumtheorie beschreiben. Ein Festkörper besteht aus infinitesimalen Volumenelementen dV mit den Koordinaten x_i . Bei Auslenkung um den Verschiebungsvektor u_i durch Anlegen einer Kraft, erhält das Volumenelement die neuen Koordinaten $x'_i = x_i + u_i$. Die Auslenkung wird durch Druck- bzw. Zugkräfte parallel in Richtung x_i , sowie durch Scherkräfte senkrecht in Richtung x_k mit $k \neq i$, erzeugt. Mit der Einsteinsche Summenkonvention, d.h. der Summierung über doppelt auftretende Indizes, lässt sich die Newtonsche Bewegungsgleichung entsprechend

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j} \quad (2.1)$$

aufstellen, mit ρ als der Dichte des Materials. T_{ij} ist der Spannungstensor zweiter Stufe und beschreibt die Druck- und Zugspannungskomponenten in den Diagonalelementen T_{ii} , sowie die Scherkräfte in den Elementen $T_{ij, i \neq j}$. Bei elastischer Verformung des Festkörpers durch eine Spannung, lässt sich die Deformation über das verallgemeinerte Hooke'sche Gesetz

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl} \quad (2.2)$$

beschreiben. S_{kl} bezeichnet den symmetrischen Deformations- und Verzerrungstensor:

$$S_{kl} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_k}{\partial x_l} + \frac{\partial u_l}{\partial x_k} \right) \quad (2.3)$$

und c_{ijkl} den Elastizitätstensor vierter Stufe. Dieser enthält 81 Komponenten und lässt sich aufgrund der Symmetrie des Spannungs- und Verzerrungstensors, sowie über das Poynting Theorem, auf 21 unabhängige Komponenten reduzieren. Kombiniert man die Gleichungen (2.1) bis (2.3), so ergibt sich das Differentialgleichungssystem (DGL):

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = c_{ijkl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_j \partial x_l} \quad (2.4)$$

Die Lösungen des DGL beschreiben ebene Wellen mit transversalen und longitudinalen Komponenten.

Bisher wurden nur die mechanischen Eigenschaften berücksichtigt. Da in dieser Arbeit das piezoelektrische LiNbO_3 verwendet wurde, wird das Hooke'sche Gesetz durch den piezoelektrischen Tensor p_{kij} und das elektrische Feld E_k zu

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl} - p_{kij} E_k \quad (2.5)$$

erweitert. Für die dielektrische Verschiebung D_i der permanenten Dipolmomente gilt entsprechend

$$D_i = \epsilon_{ij} E_j + p_{ijk} S_{jk} \quad (2.6)$$

ϵ_{ij} beschreibt hier den dielektrischen Tensor und E_j die elektrische Feldstärke, welche sich in quasi-statischer Näherung (für $v_{SAW} \ll c$) durch das elektrische Potential Φ gemäß

$$E_i = -\nabla\Phi = \frac{\partial\Phi}{\partial x_i} \quad (2.7)$$

ausdrücken lässt. Das Material gilt dabei als quellenfreies Medium ($\nabla \cdot D = 0$), ohne freie Ladungsträger. Setzt man nun das erweiterte Hooke'sche Gesetz (Gleichung (2.5)) und den Deformationstensor S_{kl} (Gleichung (2.3)) in die Bewegungsgleichung (2.1) ein, so erhält man vier gekoppelte Wellengleichungen. Die mechanische Auslenkung u_j wird durch drei Wellengleichungen über:

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} - c_{ijkl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_j \partial x_l} - p_{kij} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_k \partial x_l} = 0 \quad (2.8)$$

beschrieben. Die vierte Wellengleichung

$$p_{ikl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_j \partial x_l} - \epsilon_{ij} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_k \partial x_l} = 0 \quad (2.9)$$

beschreibt das Potential. In einem Festkörper, also in Abwesenheit von Grenzflächen, handelt es sich bei der Lösung der Wellengleichungen (2.8) und (2.9) um akustische Volumenwellen (bulk acoustic waves, BAW). Bei einer Grenzfläche zum Vakuum treten weitere Randbedingungen auf. Bei Betrachtung einer Oberfläche in x_3 -Richtung müssen die Einträge des Spannungstensors T_{ij} in den Flächen der Volumenelemente dV verschwinden. So gilt:

$$T_{31} = T_{32} = T_{33} = 0 \text{ für } x_3 = 0. \quad (2.10)$$

Für die Wellengleichungen (2.8) und (2.9) ergeben sich als spezielle Lösungen akustische Oberflächenwellen (surface acoustic waves, SAW). Die Wellen propagieren mit der Phasengeschwindigkeit v_{SAW} parallel zur Grenzfläche. Im Volumen klingt die mechanische Auslenkung der Potentiale schon nach wenigen Wellenlängen ab und die Energie der SAW ist weitgehend auf die Materialoberfläche beschränkt.

In einem anisotropen Material hängt die Auslenkung der Welle, die Phasengeschwindigkeit (Slowness) und die Gruppengeschwindigkeit von der Wahl der freien Oberfläche und der Ausbreitungsrichtung, sowie von den Randbedingungen der Piezoelektrizität ab. Bei nicht leitenden Oberflächen kommt es aufgrund der Piezoelektrizität zu einer Versteifung des Materials. Folglich ist die Phasengeschwindigkeit $v_{SAW} = v_{frei}$ einer freien Oberfläche höher als die Phasengeschwindigkeit $v_{SAW} = v_{s.c.}$ einer kurzgeschlossenen (engl. short circuit, s.c.), also nicht-piezoelektrischen Oberfläche. Die Phasengeschwindigkeit der SAW hängt dabei von der gewählten Ausbreitungsrichtung \vec{b} ab und ist in X-Richtung am größten. In Abb. 2.1 sind die Phasengeschwindigkeiten von LiNbO_3 128 ° rot Y-Cut für freie (v_{frei}) und kurzgeschlossene Oberflächen ($v_{s.c.}$) in Abhängigkeit vom Ausbreitungswinkel zur X-Richtung dargestellt.

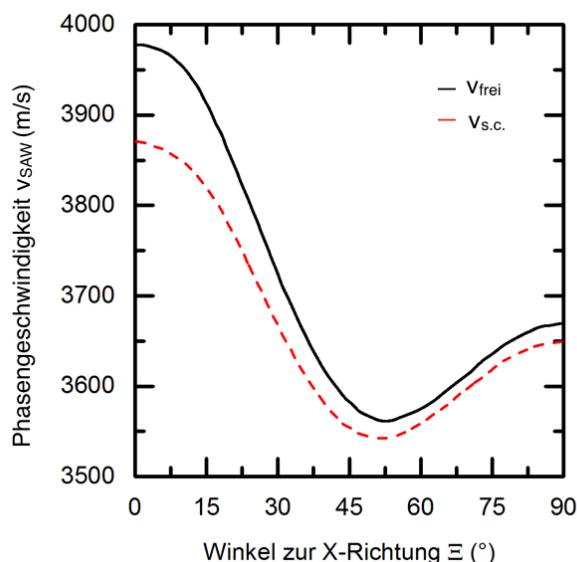


Abbildung 2.1: Phasengeschwindigkeit der SAW auf LiNbO_3 128 ° rot Y-Cut in Abhängigkeit vom Winkel der Ausbreitungsrichtung zur X-Achse für freie (schwarz) und kurzgeschlossene (rot) Oberflächen aus [38].

Die Maximalgeschwindigkeit wird bei der Ausbreitung in Y-Richtung mit $v_{frei} = 3979 \text{ ms}^{-1}$ erreicht. Aus den beiden Phasengeschwindigkeiten v_{frei} und $v_{s.c.}$ lässt sich der elektromechanische Kopplungskoeffizient k_{eff}^2 über

$$k_{eff}^2 = \frac{v_{frei} - v_{s.c.}}{v_{frei}} \quad (2.11)$$

bestimmen und beschreibt die Effizienz der Wellenanregung durch ein elektrisches Feld.

Bei der Betrachtung von anisotropen Materialien ist die Auslenkung der Welle und ihrer Phasengeschwindigkeit von der Ausbreitungsrichtung \vec{b} und der Oberfläche abhängig. Die Energieflussrichtung \vec{W} verläuft dabei aber nicht zwingend parallel zu \vec{b} . Die Abweichung davon kann durch den Winkel Ψ (Power-Flow-Angle) beschrieben werden. Dieser wird durch Auftragen der Ausbreitungsrichtung \vec{b} und der Normalen in einer Slowness Kurve, als Polardiagramm der inversen Phasengeschwindigkeit $1/v$ bestimmt (z.B von LiNbO_3 128° rot Y-Cut vgl. Abb. 2.2).

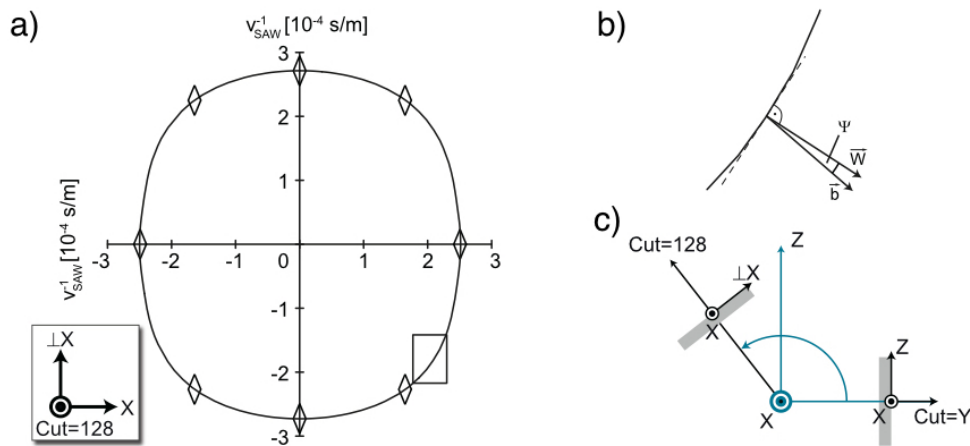


Abbildung 2.2: a) Slowness-Kurve von LiNbO_3 128° rot Y-Cut. Die Anregung von reinen Moden ist in X- und $\perp X$ Richtung möglich (Achsenschnitt durch \diamond markiert). b) Ausschnitt einer Anregungsmode mit Ausbreitungsrichtung \vec{b} . Der Power-Flow-Angle Ψ beschreibt den Winkel zwischen \vec{b} und der Richtung des Energieflusses \vec{W} . c) Kristallschnittachse des verwendeten LiNbO_3 128° rot Y-Cut aus [35].

Liegt ein Extrempunkt vor (vgl. Abb. 2.2 a) \diamond), d.h. verläuft die Richtung des Energieflusses \vec{W} parallel zur Ausbreitungsrichtung der Welle \vec{b} , entspricht $\Psi = 0$ und eine reine Mode wird angeregt. In den anderen Richtungen kommt es zur Überlagerung der Moden [39].

2.1.2 Rayleighwelle

Abhängig von dem Material und den Randbedingungen können in einem Festkörper unterschiedliche Schwingungsmoden erzeugt werden. Bei akustischen Oberflächenwellen wird hauptsächlich zwischen Rayleigh- und Scherwelle unterschieden. Da in dieser Arbeit nur Rayleighwellen verwendet werden, wird im folgenden kurz auf diese eingegangen. Weiterführende Literatur ist in [40–42] zu finden.

Wenn keine Kraft senkrecht zur Substratoberfläche ($T_{3j}|_{x_3} = 0$) wirkt, und das elektrische Feld entweder kurzgeschlossen ist oder sich frei im Raum ausbreitet, kann die Rayleighwelle propagieren [42]. Die Wellengleichungen (2.8) und (2.9) können für den isotropen Fall

analytisch gelöst werden. Für $x_3 \leq 0$ entspricht die Auslenkung u_i [37]:

$$u_1 = A(e^{k\beta_1 x_3} - \gamma e^{k\beta_2 x_3})e^{ik(x_1 - v_R t)} \quad (2.12)$$

$$u_2 = 0 \quad (2.13)$$

$$u_3 = -ik\beta_1 A(e^{k\beta_1 x_3} - \gamma^{-1} e^{k\beta_2 x_3})e^{ik(x_1 - v_R t)} \quad (2.14)$$

mit $\beta_1 = \sqrt{1 - \frac{v_R^2}{v_l^2}}$, $\beta_2 = \sqrt{1 - \frac{v_R^2}{v_t^2}}$, $\gamma = \sqrt{\beta_1 \beta_2}$, $v_l = \sqrt{\frac{c_{11}}{\rho}}$, $v_t = \sqrt{\frac{c_{44}}{\rho}}$, dem Wellenvektor k , der Rayleighwellengeschwindigkeit v_R und der Amplitude A . Die Geschwindigkeit der Rayleighwelle ist durch

$$(\beta_2^2 + 1)^2 = 4\beta_1 \beta_2 \quad (2.15)$$

definiert.

Die SAW ist eine harmonische, transversale Welle mit geringem longitudinalem Anteil, die sich entlang der Substratoberfläche ausbreitet (siehe Abb. 2.3). Die Energie der Welle

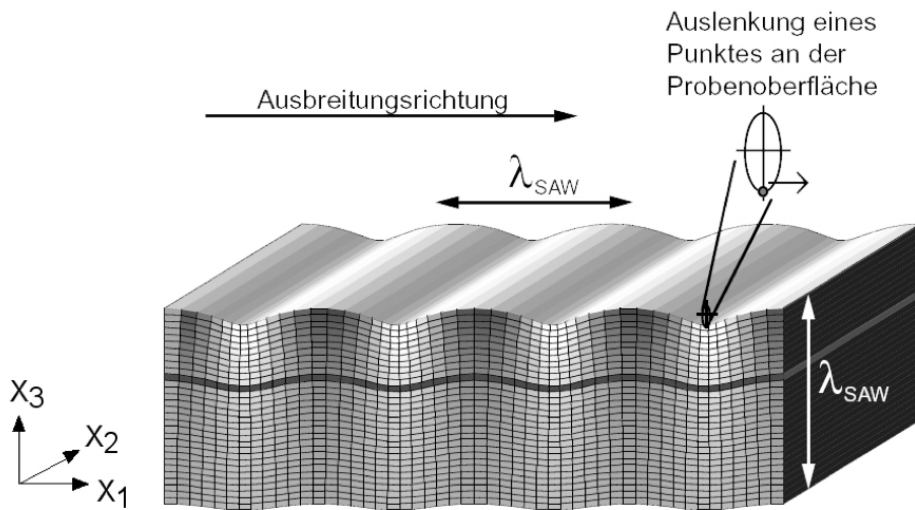


Abbildung 2.3: Skizze einer Oberflächenwelle. Entnommen aus [37].

ist hauptsächlich auf die Oberfläche beschränkt und die Amplitude nimmt mit der Tiefe ins Substrat näherungsweise exponentiell, überlagert von einer Anisotropiefunktion, auf der Längenskala einer Wellenlänge ab. Die Volumenelemente der Oberfläche bewegen sich rücklaufend auf Ellipsenbahnen. Das elektrische Potential Φ bei $x_3 \leq 0$ lässt sich durch

$$\Phi = \Phi_0 e^{kbx_3} e^{i(kx_1 - \omega t)} \quad (2.16)$$

mit komplexem b , $\text{Re}(b) > 0$ und $\omega = v_R k$ annähern. Das elektrische Feld ergibt sich aus

$$E = -\nabla\Phi = -k\Phi_0 \cdot e^{kbx_3} e^{i(kx_1 - \omega t)} \cdot \begin{pmatrix} i \\ 0 \\ b \end{pmatrix}. \quad (2.17)$$

Die typischen Auslenkungen der Oberflächen liegen bei 0.1 nm bis 1 nm für Wellenlängen von 10 μm bis 100 μm . Das elektrische Feld liegt in einer Größenordnung von 10^6 - 10^7 Vm^{-1} .

2.1.3 Erzeugung von SAW

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes an einen Piezokristall kommt es aufgrund des inversen piezoelektrischen Effekts zu einer Verzerrung der Gitterstruktur. Diese breitet sich nach Abschalten des Feldes mit der Phasengeschwindigkeit v_{SAW} entlang der Oberfläche aus. Durch Anlegen einer Wechselspannung am Ort x_0 mit der Frequenz f wird eine periodische Störung $T = 1/f$ erzeugt. Nach Umlauf einer Periode, hat das Signal eine Strecke von

$$\lambda_{SAW} = \frac{v_{SAW}}{f} \quad (2.18)$$

zurückgelegt. Durch erneute Anregung an diesem Punkt wird das Störsignal verstärkt. Die Anregung kann durch interdigitale Schallwandler (interdigitaltransducer - IDT) erfolgen. Diese bestehen aus zwei kammartigen Metallstrukturen, deren Finger ineinander greifen. Sie sind auf der Kristalloberfläche aufgebracht (vgl. Abb. 2.4).

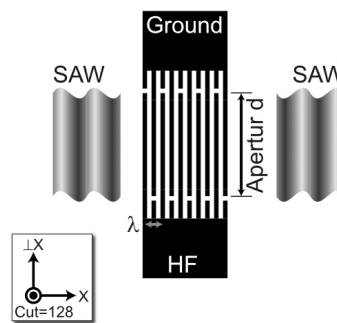


Abbildung 2.4: Skizze eines IDT zur Erzeugung einer Wellenfront mit Breite d und Wellenlänge $\lambda_{SAW} = \lambda$. Aus [35].

Die Finger werden alternierend mit einem hochfrequenten Wechselspannungssignal (HF) und der Masse (Ground) kontaktiert. Die erzeugte SAW strahlt zu beiden Seiten ab. Meist wird jedoch nur eine Richtung der erzeugten Welle verwendet und die halbe Leistung bleibt ungenutzt. Durch Aufbringen von Braggreflektoren kann die Welle der anderen Richtung zurückreflektiert werden und so doch genutzt werden. Die Anzahl der Finger ist material- und wellenlängenabhängig und richtet sich nach der Größe von k_{eff}^2 . In LiNbO_3 , einem besonders starken Piezoelektrikum, sind ca. 40-50 Fingerpaare ausreichend um eine gute Anregung der SAW zu erhalten [35]. Neben dem geraden IDT gibt es auch zahlreiche andere Formen, wie fokussierende, verjüngte oder Split-IDT. Da in dieser Arbeit jedoch nur die gerade IDT-Form zum Einsatz kommt, soll hier nicht näher auf die anderen IDT eingegangen werden.

Die Leistung P wird in der HF-Technik häufig in der logarithmischen Einheit dBm

angegeben und lässt sich entsprechend

$$P(dBm) = 10 \log_{10} \left(\frac{P(W)}{1mW} \right) \quad (2.19)$$

bestimmen. Für die Dämpfung und Transmission der Leistung gelten entsprechend

$$T(dB) = 10 \log_{10} \left(\frac{P_2(W)}{P_1(W)} \right), \quad (2.20)$$

mit P_1 als Eingangs- und P_2 als Ausgangsleistung.

2.1.4 Dämpfung akustischer Oberflächenwellen

Ist die Dicke eines auf die freie Oberfläche aufgetragenen Mediums (z.B. Wasser) gegenüber der Wellenlänge λ_{SAW} nicht mehr vernachlässigbar, unterliegt die Welle einer Dämpfung, welche die SAW-Geschwindigkeit und Amplitude durch die Wellenabstrahlung beeinflussen. Die Kopplung an das Medium ist von der Bewegungskomponente der Welle abhängig. Im Fall einer Rayleighwelle erzeugen die transversalen und longitudinalen Anteile longitudinale akustische Wellen (out-of-plane Dämpfung α_{op}) in der Flüssigkeit und Scherwellen (in-plane Dämpfung α_{ip}) an der Grenzfläche (deutlich geringer). Nach [43] lässt sich der Energieverlust durch

$$\alpha_{op} = \frac{\rho_F \nu_F}{\rho_{SAW} \nu_{SAW} \lambda_{SAW}} \quad (2.21)$$

$$\alpha_{ip} = \left(\frac{\eta \rho_F}{4\pi \rho_{SAW}^2 \nu_{SAW}} \right)^{1/2} \lambda_{SAW}^{-3/2} \quad (2.22)$$

mit der Dichte ρ_F , der Schallgeschwindigkeit ν_F und der Viskosität η der Flüssigkeit, sowie ρ_{SAW} und ν_{SAW} als Dichte und Schallgeschwindigkeit der Oberflächenwellen mit Wellenlänge λ_{SAW} berechnen. Für LiNbO₃ 128 ° rot Y-Cut in X-Richtung ergibt sich eine 1/e-Abklinglänge der SAW-Intensität in Wasser von $l_{op} = 12.5 \lambda_{SAW}$ und $l_{ip} = 1.04 \times 10^6 \lambda_{SAW}^{3/2}$. Prinzipiell gilt $l_{op} \ll l_{ip}$ und so kann die 1/e-Abklinglänge für l_{ip} in mikrofluidischen Aufbauten vernachlässigt werden.

2.1.5 Beugung akustischer Oberflächenwellen

Mit einem ebenen IDT mit endlicher Breite erzeugte Oberflächenwellen propagieren nur eine bestimmte Strecke als ebene Wellenfront. Dieser Propagationsbereich wird auch Fresnelzone genannt. Überschreitet die Welle diesen Bereich, nimmt die Breite der Wellenfront kontinuierlich zu, bis sie kreisförmig wird. Dieses Phänomen wird als Beugung bezeichnet und findet in der Fraunhoferzone statt. Die kritische Länge x_c der Fresnelzone ist abhängig von der Aperturbreite d , der Wellenlänge λ_{SAW} und dem Anisotropiefaktor γ des Substrats und lässt sich gemäß

$$x_c = (1 + \gamma) \frac{d^2}{\lambda} \quad (2.23)$$

berechnen. In isotropen Materialien gilt $\gamma = 0$, während sich γ für anisotrope Materialien über die Beziehung

$$\nu(\Xi) \approx \nu_0 \left[1 + \frac{\gamma}{2} (\Xi - \Xi_0)^2 \right] \quad (2.24)$$

[44] mit dem Winkel Ξ_0 einer reinen Mode und der Schallgeschwindigkeit ν_0 bestimmen lässt. Die Beziehung gilt für kleine Winkelunterschiede von Ξ_0 und Ξ für eine parabolische Näherung der Schallgeschwindigkeit. Für die Kleinwinkelnäherung lässt sich γ auch über den Power-Flow-Angle Ψ entsprechend

$$\Psi = \gamma(\Xi - \Xi_0) \equiv \gamma \Xi' \quad (2.25)$$

bestimmen.

2.2 Hydrodynamik und akustische Oberflächenwellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden akustische Oberflächenwellen u.a. verwendet, um eine Strömung in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen zu erzeugen, und die dabei generierte fluidische Scherkraft zur Ablösung von Zellen auf einer Implantatprobe zu nutzen. Im folgenden Abschnitt sollen die physikalischen Grundlagen dazu kurz erläutert werden. Weiterführende Literatur kann den Quellen [45–47] entnommen werden, aus denen die nachfolgenden Formeln stammen.

2.2.1 SAW- Streaming

Befindet sich ein Flüssigkeitstropfen im Schallpfad der SAW, so koppelt diese an der Grenzfläche in die Flüssigkeit ein und erzeugt dort eine Strömung (SAW Streaming). Das Phänomen kann anhand der Theorie der akustischen Strömung erläutert werden.

Über die Navier-Stokes-Gleichung lässt sich die Dynamik einer inkompressiblen, viskosen Flüssigkeit beschreiben:

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho(\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} = -\nabla(p) + \eta \Delta \vec{v} + \vec{f} \quad (2.26)$$

mit dem Viskositätskoeffizienten η , der Dichte ρ und der Geschwindigkeit \vec{v} der Masseteilchen. p bezeichnet den äußeren Druck und f eine externe Kraft, die auf den Fluss wirkt. Sie zeigt die substantielle Beschleunigung des Systems $\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t}$ sowie trägheitsbedingte Scheinkräfte $\rho(\vec{v} \times \nabla) \vec{v}$, die sich aus dem vom Fluid erfahrenen Druckunterschied $-\nabla(p)$, dem Viskositätsterm $\eta \Delta \vec{v}$ und einer zusätzlich einwirkenden Kraft \vec{f} ergibt. Das Strömungsverhalten, bedingt durch die Wechselwirkungen zwischen einer Kammer und dem darin eingeschlossenen Fluid, kann durch die Reynoldszahl

$$Re = \frac{\rho v^2 l^2}{l \eta v} = \frac{\rho v l}{\eta} \quad (2.27)$$

beschrieben werden. l bezeichnet dabei die typische Länge des Systems. In mikrofluidischen Systemen liegen vorallem kleine Reynolds Zahlen vor. Somit können Trägheitseffekte vernachlässigt werden.

Unter Hinzunahme der Kontinuitätsgleichung

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla}(\rho \vec{v}) \quad (2.28)$$

und unter Vernachlässigung der Viskosität und ohne äußeren Druckgradienten, ergibt sich so für Gleichung (2.26):

$$\frac{\partial(\rho \vec{v})}{\partial t} + \rho(\vec{v}\vec{\nabla})\vec{v} + \vec{v}\vec{\nabla}\rho \vec{v} = \vec{f}_0 - \vec{f}_1 = 0 \quad (2.29)$$

mit

$$\vec{f}_0 = \frac{\partial(\rho \vec{v})}{\partial t} \quad (2.30)$$

und

$$-\vec{f}_1 = \rho(\vec{v}\vec{\nabla})\vec{v} + \vec{v}\vec{\nabla}\rho \vec{v} \quad (2.31)$$

Unter der Annahme, dass die Schallwelle sinusförmig mit der Frequenz ω schwingt, und unter Vernachlässigung der Terme dritter und höherer Ordnung, verschwindet das zeitliche Mittel von \vec{f}_0 für hinreichend große Zeiten. Für $-\vec{f}_1$ gilt dann

$$-\langle \vec{f}_1 \rangle = \langle \rho(\vec{v} \times \vec{\nabla})\vec{v} + \vec{v}\vec{\nabla} \times \rho \vec{v} \rangle \quad (2.32)$$

mit $-\langle \vec{f}_1 \rangle = \langle -\vec{f}_1 \rangle$.

An der Grenzfläche zu einer Flüssigkeit, koppelt die akustische Oberflächenwellen unter dem Rayleigh Winkel Θ_R zur Flächennormale in die Flüssigkeit ein. Der Winkel hängt dabei, wie für Brechungsphänomene üblich, von der Schallgeschwindigkeit in der Flüssigkeit v_F und im Substrat v_S über die folgende Beziehung

$$\Theta_R = \arcsin \frac{v_F}{v_S} \quad (2.33)$$

ab (vgl. Abb. 2.5). Bei Wasser ($v_F = 1484 \text{ ms}^{-1}$) auf LiNbO₃ 128 ° rot Y-Cut ($v_S = 3979 \text{ ms}^{-1}$ in X-Richtung) ergibt sich der Winkel zu $\Theta_R = 21,9^\circ$.

Die Leaky-SAW beschreibt die eingekoppelte Welle und besitzt den komplexen Wellenvektor k_L , der im Gegensatz zur Rayleigh-Welle k_R einen imaginären Anteil hat. k_L lässt sich nach Campbell und Jones aus k_R [48] bestimmen. In der Flüssigkeit wird die Auslenkung eines Volumenelements mit der Amplitude in Abhängigkeit von Zeit und Ort über

$$u_x = A e^{i\omega t} e^{-ik_L x} e^{-\alpha k_L z} \quad (2.34)$$

$$u_z = -i\alpha A e^{i\omega t} e^{-ik_L x} e^{-\alpha k_L z} \quad (2.35)$$

mit dem Dämpfungsterm

$$\alpha = \sqrt{1 - \frac{u_R}{u_F}}^2 \quad (2.36)$$

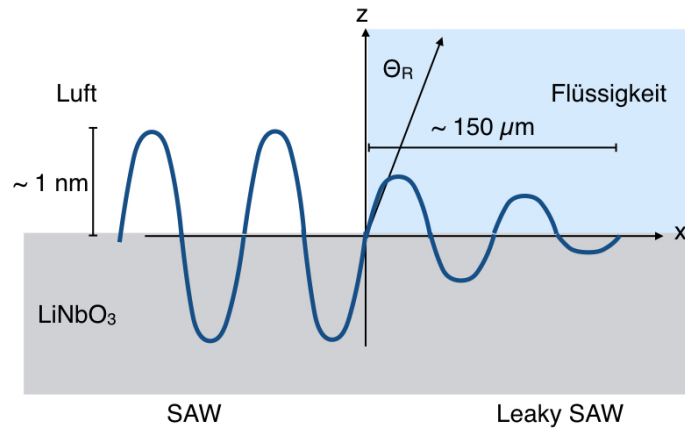


Abbildung 2.5: Einkopplung der SAW an der Grenzfläche Substrat zu Wasser unter dem Rayleigh-Winkel Θ_R . Auf der Substratoberfläche klingt die propagierende Welle mit einer 1/e-Abklinglänge ab und wird als Leaky SAW bezeichnet. Entnommen aus [13]. Die Abklinglänge ist Wellenlängenabhängig.

ausgedrückt. Die Geschwindigkeit des Volumenelements kann aus der zeitlichen Ableitung mit Hilfe der Gleichungen (2.34) und (2.35) bestimmt werden. Das Einsetzen in Gleichung (2.33) liefert für die Kraft \vec{f}_1 die Vektorkomponenten

$$f_x = -\rho(1 + \alpha_L^2)A^2\omega^2 k_i e^{2(k_i x + \alpha_L k_i z)} \quad (2.37)$$

und

$$f_z = -\rho(1 + \alpha_L^2)A^2\omega^2 \alpha_L k_i e^{2(k_i x + \alpha_L k_i z)} \quad (2.38)$$

mit $\alpha_L = i\alpha$ und $k_L = k_R + i k_i$. So gilt für den Betrag der Kraft $|\vec{f}_1|$:

$$|\vec{f}_1| = -\rho(1 + \alpha_L^2)^{\frac{3}{2}} A^2 \omega^2 k_i e^{2(k_i x + \alpha_L k_i z)} \quad (2.39)$$

Die Kraft \vec{f}_1 wirkt parallel zur Ausbreitungsrichtung der longitudinalen Schallwelle. Die SAW kann so als longitudinale Schallwelle beschrieben werden, die an der Grenzfläche zu einer Flüssigkeit, in diese einkoppelt, und so einen Materiefluss bewirkt. Mit zunehmender Leistung der Oberflächenwellen nimmt auch die Strömung zu.

2.2.2 Akustischer Druck

Wird eine akustische Strömung in einer Flüssigkeit erzeugt, so wirkt eine Kraft und ein akustischer Druck auf Objekte ein, die sich in der Flüssigkeit befinden. In dieser Arbeit soll die Manipulation von Zellen durch die mechanische Stimulation von Oberflächenwellen untersucht werden. Da sich die Zellen in einem flüssigen Nährmedium befinden, wird hier eine Strömung induziert, die sich gegebenenfalls als Druck auf die adhärenierten Zellen auswirken kann. Anhand der Arbeiten von Wiklund und Hertz [49, 50], sowie Rambach

[51], sollen der einwirkende akustische Druck auf sphärische Objekte im Folgenden kurz erläutert werden. Eine longitudinale, harmonische Druckwelle, die in x -Richtung propagiert, übt einen Druck

$$p(x', t) = p_0 + \rho_0 c_0 v_0 \sin(\omega t - kx') \quad (2.40)$$

auf ein Volumenelement aus, mit dem statischen Druck p_0 im Gleichgewicht, der Geschwindigkeit v_0 des Volumenelements, der Schallgeschwindigkeit c_0 in der Flüssigkeit mit der Dichte ρ_0 , der Kreisfrequenz ω und der entsprechenden Wellenzahl $k = \omega/c$. Die Position x des Volumenelements im ursprünglichen Zustand, zusammen mit der Verschiebung $s(x', t)$ ergibt die neue Position

$$x' = x + s(x', t). \quad (2.41)$$

Bei kleinen Verschiebungen gilt für das zeitliche Mittel des Drucks $\langle p(x) \rangle = p_0$. Bei großen Verschiebungen $s(x', t)$, d.h. wenn die endliche Kompressibilität des Wassers wichtig wird, lässt sich, durch die Integration der Zeitdauer einer Periode, das zeitliche Mittel $\langle p(x) \rangle$ in zweiter Näherung entsprechend

$$\langle p(x) \rangle = p_0 - \frac{1}{2} \rho_0 v_0^2 \quad (2.42)$$

berechnen und den akustischen Strahlungsdruck als zweiten Faktor hineinbringen. Dieser ist äquivalent zum Staudruck in der Bernoulli-Gleichung

$$\frac{1}{2} \rho_0 v_0^2 + p = c \quad (2.43)$$

mit dem hydrostatischen Druck p und dem Gesamtdruck c . Folglich verringert sich der statische Druck p_0 mit zunehmender Geschwindigkeit des Volumenelements V_0 der fortschreitenden Welle. Durch Näherung von x' zu

$$x' = x + s(x', t) \approx x + s(x, t) = x + \frac{v_0}{\omega} \sin(\omega t + kx) \quad (2.44)$$

und dem Einsetzen in Gleichung (2.34), ergibt sich ein Gesamtdruck von

$$p(x, t) = p_0 + \rho_0 c_0 v_0 \sin \left[\omega t - k \left(x + \frac{v_0}{\omega} \sin(\omega t + kx) \right) \right]. \quad (2.45)$$

Die auf die adhärenen Zellen wirkende Scherkraft und der Druck werden in den entsprechenden Kapiteln in dieser Arbeit in den Abschnitte 3.3.3 und 4.3.2, an konkreten Beispielen genauer erörtert.

2.3 Die Zelle

Rücken wir bis an die letzten Grenzen vor, an denen es noch Elemente mit dem Charakter der Totalität oder wenn man will, der Einheit gibt, so bleiben wir bei den Zellen stehen. ... Ich kann nicht anders sagen, als dass sie die vitalen Elemente sind, aus denen sich die Gewebe, die Organe, die Systeme, das ganze Individuum zusammensetzen (Rudolf Virchow, 1858 [52]).

Wie diese Doktrin bereits verdeutlicht, basiert der Ursprung und die Entwicklung des Lebens auf der Zelle. Als kleinste lebende Einheit ist sie in der Lage, Nahrung aufzunehmen, sich durch Zellteilung zu vermehren, und im Verbund komplexe Organismen zu formen. An dieser Stelle soll nun zunächst der Zellzyklus, von der Proliferation zum Zelltod, sowie die Anhaftung (Adhäsion) und Fortbewegung (Migration) beschrieben werden. Zum Schluss wird die SaOs-2 Zelllinie vorgestellt, welche in dieser Arbeit als Modell zur Manipulation der Zelladhäsion, der Migrationsgeschwindigkeit, und -richtung dient.

2.3.1 Der Zellzyklus

Die Reproduktion einer Zelle folgt einer geordneten Reihenfolge von Ereignissen, bei der sie sich dupliziert und teilt. Dieser sich wiederholende Prozess wird als Zellzyklus bezeichnet und ist der wesentliche Mechanismus, mit dem sich Lebewesen vermehren. Im lebendem Organismus sterben täglich milliarden Zellen durch programmierten Zelltod ab und werden neu gebildet [53]. Diese Gegenspieler sollen nun kurz erläutert werden. Weiterführende Literatur ist in [53, 54] zu finden.

Zellproliferation

Als Zellproliferation (lateinisch, proles: Nachwuchs, Sprößling und ferre : tragen) bezeichnet man die schnelle Teilung von Zellen zur Bildung von Gewebe. Sie wird in Zellteilung und -wachstum unterteilt. 1950 von Howard und Pelc beobachtet, lies sich der Ablauf der Zellteilung in Form eines Zellzykluskonzeptes beschreiben, das in mehrere Phasen unterteilt ist (vgl. Abb. 2.6) [53]. In der M-Phase findet die Mitose, also die Aufspaltung

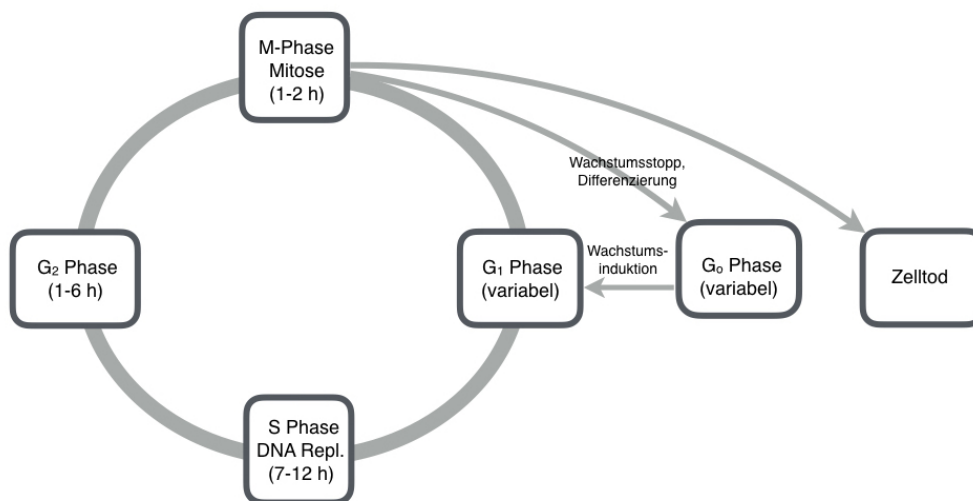


Abbildung 2.6: Zellzyklus mit den verschiedenen Phasen der Zellteilung (Mitose, G₁, DNA Replikation S, G₂) sowie der Ruhephase G₀ und Apoptose (= programmierter Zelltod). Graphik angelehnt an [53, 55]

der Mutterzelle in zwei Tochterzellen, statt. Dies geschieht innerhalb von ca. 1-2 h. Auf sie folgt die erste Interphase, die G_1 - Phase (G von englisch "gap"), welche die M-Phase von der S-Phase trennt und zeitlich unbegrenzt ist. In der Synthese-Phase (S-Phase) wird die DNA synthetisiert und verdoppelt. Dieser Prozess kann bis zu 12 h benötigen. Auf die S-Phase folgt eine zweite Interphase, die G_2 -Phase, welche vor der nächsten Mitose stattfindet und ebenfalls zeitlich unbegrenzt ist [55]. Neben dem zyklischen Teil gibt es noch eine weitere Phase (G_0 -Phase), in der sich die Zellen in einem Ruhezustand (Quieszenz) befinden. Hier liegt das Genom im diploiden Chromosomensatz vor, wird jedoch nicht repliziert. Die meisten Zellen befinden sich für lange Zeit in diesem Zustand und können durch extrazelluläre Stimuli wieder in den proliferierenden Zustand überführt werden [54]. Um die homöostatische Balance zwischen zellulärer Proliferation und Quieszenz zu erhalten, dienen genetische Mechanismen, zu denen auch die Apoptose, der programmierte Zelltod gehört [54].

Apoptose

In einem multizellulären Organismus ist die Anzahl der Zellen strikt reguliert. Dies erfolgt nicht nur über kontrollierte Zellteilung, sondern auch über den kontrollierten Zelltod. Werden Zellen in ihrer Funktion nicht mehr benötigt, so wird ein intrazelluläres Sterbeprogramm aktiviert und die Zelle begeht 'Suizid'. Dieser programmierte Zelltod wird als Apoptose (griechisch: apo = ab oder los und ptosis = Senkung oder Niedergang) bezeichnet und beschreibt das natürliche Ende des Zellzyklus einer Zelle. Bei dem Ablauf zerteilt sich die DNA, das Zytoplasma schrumpft und die Zellmembran verändert sich, löst sich jedoch nicht auf. Folglich treten keine Membranschäden auf und das intrazelluläre Medium tritt nicht aus. Auch werden benachbarte Zellen nicht beschädigt. Die abgestorbenen Zellen, auch als apoptotische Körperchen bezeichnet, werden durch Phagozyten (z.B. Makrophagen) abgebaut. Die Anzahl an Apoptosis in einem erwachsenen Organismus ist dabei bemerkenswert. So sterben bei der Bildung des Nervensystems von Wirbeltieren mehr als die Hälfte der Nervenzellen direkt nachdem sie gebildet wurden. Die Apoptose kann aber auch durch äußere Faktoren wie Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, oder UV-Strahlung und Hitze eingeleitet werden [53, 56].

Nekrose

Sterben Zellen durch externe Einflüsse, wie z.B. akute Verletzungen, Vergiftung oder thermische Schädigung, spricht man von Nekrose. Dabei werden die Zellen durch exogene Noxen so stark geschädigt, dass die natürliche Apoptose nicht mehr möglich ist. Durch die Schädigung der Zellmembran schwellen die Zellen zuerst an, und platzen anschließend. Dabei kommt es zur Lyse. Die Zellmembran zerfällt vollständig und der Zellinhalt wird freigesetzt. Dieser kommt in Kontakt mit den benachbarten Zellen und führt zu einer schädlichen Entzündungsreaktion [53, 56]. In reinen Zellkulturen *in vitro* kommt es aufgrund von nicht vorhandenen Phagozyten zu einer sekundären Nekrose. Zellen die durch Apoptose abgestorben sind, werden nicht phagozytiert und lysieren folglich [57].

2.3.2 Zelladhäsion

In der Zellkommunikation und Regulation spielt die Zelladhäsion eine fundamentale Rolle. Sie kontrolliert das Zellverhalten und die Zellfunktionen durch ihre mechanische Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix (EZM). Dabei ist sie maßgeblich an der Stimulation der Zelldifferenzierung, dem Zellzyklus und der Zellmigration beteiligt und damit ein wichtiger Faktor für die Funktionsfähigkeit von Gewebe [58]. Die Zelladhäsion wirkt zwischen zwei Zellen oder zwischen einer Zelle und einem Substrat oder Gewebe [59]. Dabei treten verschiedene Komponenten wie attraktive spezifische Kräfte, generische Grenzflächenkräfte und elastische Spannungen auf. Die Adhäsion kann prinzipiell in drei Phasen unterteilt werden (vgl. Abb. 2.7) und wird durch das Modell der weichen Schale (engl. soft shell adhesion) beschrieben [59, 60]: Der Ausgangszustand, bei dem die Zellmembran auf dem Substrat anhaftet, dem Abflachen des Zellkörpers mit Beginn des Spreitens und der dritten Phase, bei der sich die Zelle über Adhäsionsmoleküle mit dem Untergrund fest verbindet [59, 61].



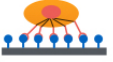



Zelladhäsions-Phasen	Phase I	Phase II	Phase III
Schematische Darstellung der Zelladhäsion	Zelle EZM 	Zelle EZM 	Zelle EZM 
Schematische Darstellung der Transformation der Zellform	 Initiale Anhaftung	 Abflachen der Zelle	 Spreizung und strukturelle Neuorganisation
Bindungen der Zelladhäsion	Elektrostatistische Wechselwirkung	Integrin Bindung	Fokale Adhäsionspunkte
Adhäsionszustand	Sedimentation	Zellhaftung	Spreizung und stabile Adhäsion

Abbildung 2.7: Tabellarische Darstellung der verschiedenen Phasen der Zelladhäsion. Abgewandelt aus [59]

In Lösung weisen die meisten Zelle eine runde Form auf. Bevor die Zelle an einem Substrat adhären kann, muss sie mit diesem in Kontakt kommen. Hier spricht man von der Kontaktphase, in der die Haftung durch unspezifische Wechselwirkungen, wie elektrostatische Wechselwirkungen, Van der Waals Kräfte und die Gravitation, zustande kommt [10]. Hier treten auch die ersten spezifischen Bindungen auf, bei der die Zelladhäsionsmoleküle (ZAM) an anderen ZAM oder an die extrazelluläre Matrix (EZM) ankoppeln und dabei Rezeptor-Ligandenpaare ausbilden [62]. Die ZAM lassen sich in vier verschiedene Familien einteilen (Cadherine, IgCAMs, Selektine und Integrine) und verbinden sich entsprechend über das Schlüssel-Schloss-Prinzip. Die Bindung kann entweder direkt über homophile (Cadherine) und heterogene (Selektine) Rezeptoren oder indirekt, wie bei den Integrinen, über weitere Linker-Proteine (z.B. Fibronogen, von Willebrand Faktor oder Fibronektin) erfolgen. Bei der Zell-EZM-Adhäsion sind die Integrine für die meisten Bindungen verantwortlich

und vermitteln die fokale Zelladhäsion [56]. Die EZM ist aus strukturellen Makromolekülen aufgebaut, welche aus Proteoglykanen, Faserproteinen (z.B. Kollagen) und Adhäsionsmolekülen (z.B. Fibronectin) besteht. Ein Teil der Proteine befindet sich bereits vor einem Zellkontakt durch Anlagerungen aus dem Nährmedium oder durch Oberflächenbeschichtung auf dem Substrat [56]. Bei Zellkontakt werden weitere Makromoleküle sezerniert [63]. Die dabei freiwerdende Energie kann einige $10 k_B T$ betragen [64]. In der zweiten Phase beginnt die Zelle auf der Oberfläche zu spreiten und vergrößert so die Kontaktfläche zum Substrat. Es werden weitere spezifische Bindungen ausgebildet und der Zellkörper flacht ab. Hier treten durch die Deformation der Zellmembran repulsive Kräfte, wie entropische Undulationskräfte und polymerinduzierte Kräfte auf. Die repulsiven Kräfte werden durch die attraktiven Adhäsionsenergien kompensiert [65] und die Zellen befinden sich in einem Abstand von ca. 50 nm zur Substratoberfläche [66]. In der dritten und letzten Phase folgt die Anordnung der Integrinrezeptoren zu fokalen Adhäsionsmolekülen. Das Zytoskelett koppelt durch biochemische Signalprozesse an die Innenseite dieser Adhäsionsmoleküle und die Zelle wird stabilisiert [59]. Die Adhäsionskraft nimmt dabei im zeitlichen Verlauf zu und kann bei Fibroblasten Werte von bis zu 1200 nN erreichen [67]. Neben den bisherigen Komponenten spielt bei der Zell-Substrat-Adhäsion auch der Benetzungsübergang eine wichtige Rolle. Er bezeichnet das Spreiten eines Flüssigkeitstropfens auf einer planaren Oberfläche. Mit Hilfe der Oberflächenenergie des Substrats σ_{13} , der Grenzflächenenergie zwischen Substrat und Zelle σ_{12} und der Oberflächenspannung der Zelle σ_{23} lässt sich der Kontaktwinkel Θ über die Youngsche Gleichung

$$\cos(\Theta) = \frac{\sigma_{13} - \sigma_{12}}{\sigma_{23}} \quad (2.46)$$

berechnen. Liegt ein Kontaktwinkel von $\Theta \leq 45^\circ$ vor, liegt eine gute Benetzung vor [68, 69].

2.3.3 Zellmigration

Our liaison with cell migration, as humans, begins shortly after conception, accompanies us throughout life, and often contributes to our death [27].

Wie dieser Satz deutlich auf den Punkt bringt, ist die Zellmigration (lat. migrare : wandern) ein wichtiger Bestandteil in der Zellbiologie. Je nach Art der Zelle kann zwischen drei verschiedenen Fortbewegungsmechanismen unterschieden werden: Der wellenförmigen (z.B. Ziliarkörper, Flagellarmotor), der muskulären (z.B. Muskelkontraktion) und der amöboiden (z.B. Lymphozyten) Bewegung [70]. Die meisten Körperzellen migrieren in einer amöboiden Bewegung [27]. Bei dieser Art der Fortbewegung kriechen die Zellen über die Oberfläche, in dem sie das aus Aktin bestehende Zytoskelett verändern [64]. Die einzelnen Schritte dieser Migration sind in Abb. 2.8 schematisch dargestellt und folgen einem dreiteiligen, zyklischen Vorgang [27, 29, 61].

Im ersten Schritt der Zellpolarisierung bilden sich durch Aktinpolymerisation F-Aktin reiche Ausstülpungen (Filopodien, Lamellipodien) in Migrationsrichtung aus. Anschließend folgt die Translation (protrusion) der Zelle, bei der die entstandenen Pseudofüßchen durch die Adhäsion an der EZM, sowie der Bildung von fokalen Komplexen aus Integrinen, Zytoskelett-

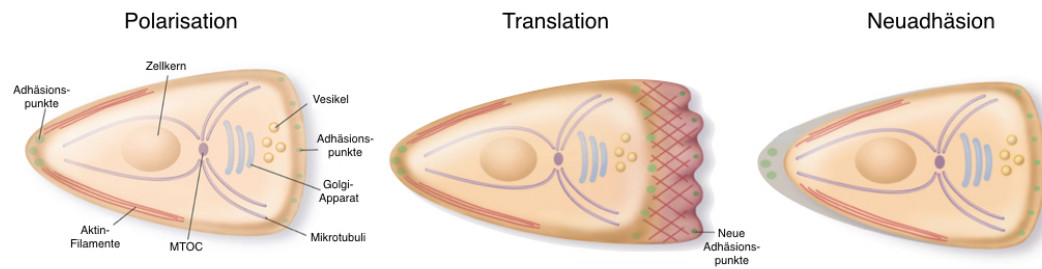


Abbildung 2.8: Graphische Darstellung der drei Phasen der Zellmigration. Zunächst polarisiert die Zelle und dehnt sich. Anschließend stößt sie vor und bildet neue Adhäsionspunkte. Im dritten Schritt, wird der Zellkörper nachgezogen und die Zelle adhärert fest auf ihrer neuen Position. Angelehnt an [27]

und Signalproteinen stabilisiert werden. Im letzten Schritt folgt die Ablösung der hinteren, fokalen Adhäsionsdomäne durch Deaktivierung der Integrinbindungen (retraction). Hier kommt es zur Aktivierung der Oberflächenprotease der EZM-Kontakte und das Aktin-Myosin-Netzwerk wird aktiviert, welches für die fokale Proteolyse verantwortlich ist. Über das Myosin-II wird das Aktinzytoskelett verändert und die Zelle zieht sich zusammen. Der hintere Teil der Zelle löst sich vom Substrat und wird nachgezogen [27, 30, 71].

Die Migration (Lokomotion) kann sowohl als ungerichtete Spontanbewegung (random migration), als auch durch externe Einflüsse in einer gerichteten Bewegung (guided migration) stattfinden. Diese kann unter anderem durch Chemotaxis, bei der die Zellen einem chemischen Gradienten, wie zum Beispiel einem Nährstoffgradienten folgen [27–29], oder durch Durotaxis, also über die Steifigkeit des Materials [26], gesteuert werden. Fibroblasten zeigen hier meist ein gerichtetes Wachstum zum steiferen Untergrund hin oder können durch weiche Barrieren gezielt in ihrer Migrationsrichtung beeinflusst werden [72, 73]. Durotaxis wird dabei häufig für die künstlichen Gewebezüchtung genutzt [26].

2.3.4 Die SaOs-2 Zelllinie

Osteoblasten sind ein wichtiger Bestandteil der Knochenmatrix. Sie lagern sich schichtartig an den wachsenden Knochen an und füllen ihn durch Ausscheidung von Kalziumphosphaten und -carbonaten aus. [74]. In der Forschung wird die SaOs-2 (Sarcoma Osteogenic) Zelllinie häufig als osteoblastisches Modell verwendet, da sie, wie Osteoblasten die EZM Proteine des Osteoids sezernieren und so als Grundgerüst des Knochens dienen. Die adhären Epithelzellen wachsen in Monoschichten und haben eine Generationszeit von 43 h [75]. *In vitro* ist die Lebensdauer der Zellkultur nicht limitiert [76].

3 Zelladhäsion unter Scherfluss

Dieses Kapitel basiert in weiten Teilen auf dem Fachartikel 'Exploring the Limits of Cell Adhesion under Shear Stress within Physiological Conditions and beyond on a Chip' [77].

3.1 Einführung

Mit einer immer älter werdenden Gesellschaft nimmt auch die Nachfrage nach medizinischen Implantaten deutlich zu. So hat eine Studie der 'Organization for Economic Cooperation and Development' (OECD) von 2015 gezeigt, dass pro Jahr 282 von 100 000 Einwohnern der OECD Länder ein künstliches Knie- oder Hüftgelenk benötigen [78]. Prognosen besagen, dass die Zahl der arthroplastischen Eingriffe bis zum Jahr 2030 auf jährlich über 4 Millionen steigen werden [79]. Infektbedingte Revisionen sind dabei nicht mitgerechnet.

Das Einwachsen der Implantate in den Knochen wird als Osseointegration bezeichnet. Dabei adhären Zellen auf dem Implantat und bilden so direkte strukturelle und funktionale Verbindungen zwischen eigenem Knochen und Implantat. Wichtig bei der Osseointegration ist vor allem der Zell-Substrat Kontakt. Die entstehende, unspezifische Bindung ist ein komplexer Mechanismus, der eine Vielzahl von Proteinen sowie deren Wechselwirkung mit dem Implantat beinhaltet. Die wichtigsten dabei sind die extrazellulären Matrixproteine (ECM, v.a. Fibronectin, Kollagen, Laminin, Vitronectin), Zytoskeletale Proteine (Aktin, Talin, Vinculin) und Integrine, die als Membranrezeptoren dienen [80]. Der Prozess der Zelladhäsion lässt sich in drei Abschnitten beschreiben. Im ersten Schritt (Ausgangszustand) haftet die Zellmembran über physikalisch-chemische Wechselwirkungen, wie z.B. ionische und van der Waals Kräfte, an dem Substrat an [61]. Anschließend flacht sich der Zellkörper ab und beginnt zu spreiten. Dabei bilden sich Adhäsionspunkte über die Integrine aus, welche die Zelle über Adhäsionsmoleküle auf dem Untergrund oder mit anderen Zellen verbinden [59]. In der dritten Phase beginnt sich das Aktinskelett zu ordnen und bildet fokale Adhäsionen zwischen der Zelle und dem Substrat aus [81]. Ein Teil der fokalen Adhäsionen löst sich auf, während andere sich vergrößern und Stressfasern ausbilden, die es nichtmuskulären Zellen ermöglichen, Scherströmungen in Blutgefäßen zu widerstehen [82]. Diese Stressfasern bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten, welche überwiegend durch das Aktinvernetzungsmolekül α -Aktinin zusammengehalten werden. Die Stressfasern sind von besonderer Bedeutung für die zelluläre Beweglichkeit, da Kontraktionen dieser Fasern die Endothelzellen in der Strömung flach halten und damit die einwirkenden Scherkräfte der Flüssigkeiten reduzieren [83].

Nach einer Operation kann es zu entzündlichen Reaktionen im Gewebe um das Implantat kommen. Diese entstehen zum Beispiel durch Abriebpartikel [15] oder durch von Makrophagen erzeugte Zytokine, die in die Gelenkflüssigkeit eindringen und die Umwandlung von

Knochenmarkszellen zu Osteoklasten anregen. Dies führt dann zu einer Knochenresorption [84]. Weiterhin führt auch bakterielle Kontamination zu Infektionen des umliegenden Gewebes, das zum Zellsterben führen kann [16]. Abhängig vom Ausmaß der Infektion kann es zum Versagen des Implantats kommen, was zu hohen Kosten bei Revisionsoperationen und unnötigem Stress und Leid für den Patienten führt [16].

Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, die Funktionsfähigkeit und Beständigkeit von medizinischen Implantaten zu gewährleisten. Dazu muss vor allem die Stärke der Zelladhäsion im Detail untersucht werden, um die grundlegenden Prozesse bei der Einheilung des Implantats zu verstehen. Einige Forschungsgruppen haben bereits die Zelladhäsion unter statischen und dynamischen Bedingungen erforscht [8–14]. Einer der ersten Ansätze für dynamische Zelladhäsionsstudien basiert auf der Verwendung von rotierenden Scheiben (rotating disk) in einer Flüssigkeit über einem Substrat mit den adhären Zellen [10]. Mit diesem Aufbau demonstrierte Weiss et al., dass die wirkende Scherspannung einen starken Einfluss auf die Zelladhäsion hat. Aufgrund der Konstruktionsweise erlaubt diese Methode allerdings nicht, die Zellen *in situ* zu untersuchen. Somit ist eine detaillierte, zeitabhängige Untersuchung ausgeschlossen. Zudem benötigt der Versuchsaufbau im derzeitigen Entwicklungsstadium noch große Probenvolumina [11]. Verglichen damit, hat die Methode eine Strömung mit akustischen Oberflächenwellen (SAW) zu erzeugen, den Vorteil, dass sich kleinere Apparaturen zur Zelladhäsionsmessung unter Scherfluss konstruieren lassen [12–14]. Bussonnière et al. untersuchte dazu die Deadhäsion von Zellen auf dem piezoelektrischen Substrat direkt [14]. Sie zeigten, dass SAW induzierte Flussprofile genutzt werden können, um Zellen in einem Tropfen selektiv zu lösen und zu sortieren. Da die Zellen jedoch direkt auf dem piezoelektrischen Substrat anhaften, kann eine materialspezifische Zelladhäsion auf unterschiedlichen Substraten nicht untersucht werden. Weiterhin sind die Zellen bei dieser Methode nicht nur dem Scherfluss ausgesetzt sondern werden auch durch elektrische, thermische und mechanische Effekte der sich ausbreitenden SAW beeinflusst. Diese können ebenfalls eine Beeinflussung des Zellverhaltens mit sich bringen (vgl. Kapitel 4) [85]. Das von uns entwickelte SAW-getriebene System arbeitet mit kleinen Probenvolumina und ist in der Lage verschiedene Umgebungsbedingungen unabhängig voneinander zu untersuchen. Zusätzlich bietet es auch die Möglichkeit die Zellen *in situ* zu beobachten und verschiedene Substrate zu verwenden [12, 86].

In dieser Studie dient der Lab-on-a-chip Aufbau zur Untersuchung und detaillierten Evaluation der Zelladhäsion und ihrer Grenzen unter physiologischen Bedingungen, sowie deren scherratenabhängigen Ablösung und materialspezifischer Wechselwirkungen. Dazu wird zunächst das Anwachs- und Ablöseverhalten der Zellen unter statischen und dynamischen Bedingungen für $T = 37\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7.4$ auf Standard Titanimplantaten betrachtet, um so das System zu kalibrieren. Anschließend werden physiologische Bedingungen wie Temperatur und pH-Wert variiert, um die Grenzen der Zelladhäsion *in vitro* zu untersuchen. Weiterhin soll auch der Einfluss der Oberflächentopographie erforscht werden. Eine genaue Einteilung und Charakterisierung der Scherratenabhängigkeit wird anschließend durch die entwickelte Software: 'Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation' (PIVDAC) evaluiert. Hiermit werden Zellablöseraten als Funktion der wirkenden Scherkraft und im zeitlichen Verlauf bestimmt. Das daraus erstellte Modell der Ablöserate wird dann in einem thermodynamischen Modell diskutiert. Abschließend wird die scherratenabhängige Ablöserate auf

Implantatmaterialien mit diamantähnlichem Kohlenstoff (Diamond Like Carbon - DLC) modifizierter Oberfläche ermittelt und verschiedene Parameter, wie der Anteil gravitationsbedingter Ablösung, eine charakteristische, erforderliche Scherkraft, sowie die intrinsische Ablöserate, ermittelt.

3.2 Versuchskomponenten und Präparation

Der De-Adhesion Number Investigator DANI

Für die Deadhäsionsmessungen unter dynamischen Bedingungen wurde der in Abb. 3.1 dargestellte mikrofluidische Aufbau ‘De-Adhesion Number Investigator’ (DANI) verwendet. Kurz zusammengefasst: Er besteht aus einer zylindrischen Polydimethylsiloxan (PDMS) Kammer mit einem Füllvolumen von $V \approx 160 \mu\text{l}$ und einem runden Substrat aus beliebigem Material mit den adhärenierten Zellen, der als Deckel dient. Die Kammer liegt auf dem piezoelektrischen LiNbO_3 -Chip, der die Strömung erzeugt und gleichzeitig den transparenten Boden darstellt. Der gesamte Aufbau wird durch eine Messingbrücke fixiert, welche gleichzeitig thermisch mit externen Wärmebad verbunden ist und so das gesamte System temperiert. Das Wärmebad ist um $\Delta T = 7 \text{ }^\circ\text{C}$ niedriger als die gewünschte Temperatur eingestellt. Zusammen mit der durch die SAW erzeugte Wärme ergibt sich so eine Gesamttemperatur wie im Nachfolgenden beschrieben. Durch Anlegen des Hochfrequenzsignals (HF) an den interdigitalen Schallwandler (IDT) auf dem Chip wird die akustische Oberflächenwelle generiert. Diese bewirkt eine akustische Strömung unter einem Winkel von $\alpha = 21 \text{ }^\circ$ zur Oberflächennormale auf die Zellen [87]. Die zeitabhängige Ablösung der Zellen lässt sich dann mit der wirkenden Scherkraft korrelieren.

Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation (PIVDAC)

Die einwirkende Scherrate wurde über das ‘Scanning Particle Image Velocimetry’-Verfahren (SPIV) [88] bestimmt. Damit lässt sich die Scherkraft mit der Zellablösung korrelieren. Zur kurzen Beschreibung: SPIV ist ein automatisierter Analyseansatz der auf dem PIV-lab Toolkit von Thielicke basiert [89–91]. Es scannt automatisch eine große Fläche durch kleine Einzelaufnahmen und kombiniert die vielfachen ‘micro-particle image velocimetry’ Messungen (μPIV , weitere Information [92]) zu einem gesamten Geschwindigkeitsfeld. Das Programm kann diesen Prozess in verschiedenen Höhen wiederholen und die Daten anschließend höhenspezifisch korrelieren. So lässt sich eine halbautomatische Bestimmung eines dreidimensionalen Geschwindigkeitsfelds großer Bereiche erreichen. Dazu werden Mikrokügelchen aus Latex (Durchmesser $3 \mu\text{m}$, Polybead, Polysciences Inc.) als Tracerpartikel in die Flüssigkeit gegeben und Videos mit einer Hochgeschwindigkeitskamera (FASTCAM 1024PCI, Photron) aufgezeichnet. So lässt sich das Flussprofil in XY-Richtung in der Ebene direkt an der Substratoberfläche bestimmen. In diesen Messungen wurde eine Leistung von $P = 28 \text{ dBm}$ an den IDT angelegt, was zu einer durchschnittlichen Scherrate von $\dot{\gamma} = 4314 \text{ s}^{-1}$ führt. Um die Zelladhäsion in Abhängigkeit von der Oberflächenrauigkeit zu untersuchen, und daraus die optimale Struktur zu ermitteln, wurde eine schwächere Leistung von $P = 25 \text{ dBm}$ und somit eine schwächere Strömung mit einer mittleren Scherrate von

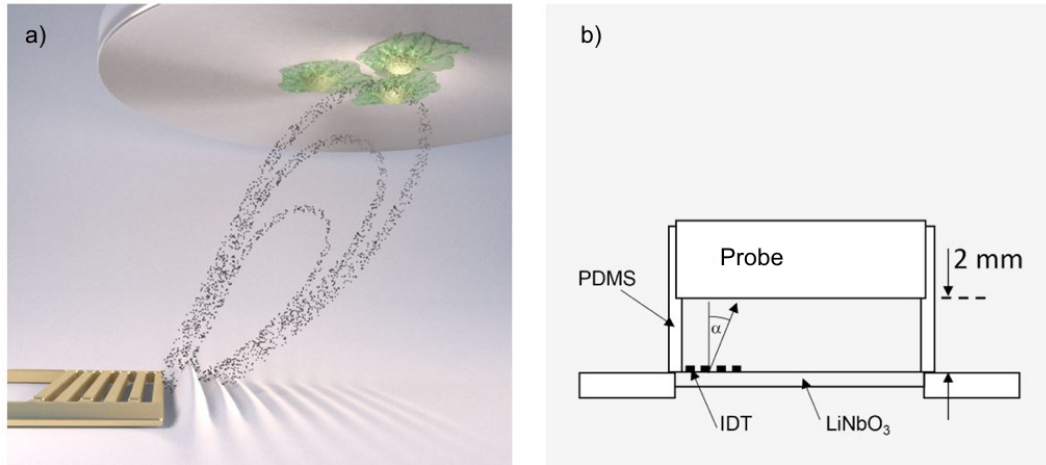


Abbildung 3.1: a) Computeranimation des DANI Aufbaus mit induzierter akustischer Strömung (schwarze Punkte) in der Kammer in Richtung der Probe. Auf der Probe befinden sich die adhärenierten Zellen. Die Strömung wird durch den IDT (goldene Kammstruktur) induziert (mit freundlicher Genehmigung von C. Hohmann Nanosystems Initiative Munich). b) Schematische Zeichnung des Aufbaus. Der IDT befindet sich auf dem LiNbO_3 -Chip innerhalb der PDMS-Kammer. Die Probe wird in einem Ring in einer Höhe von 2 mm über dem Chip gehalten. Die Strömung trifft unter dem Rayleigh Winkel von $\alpha = 21^\circ$ zur Normalen auf die Probe und wird nach links und rechts abgelenkt. Ein Strömungsprofil ist in Abb. 3.6 bei einer angelegten Leistung von 28 dBm. Auf Chiphöhe wird am IDT Flüssigkeit angesaugt. Das Strömungsprofil für diese Ebene bei 6 dBm Leistung kann in Abb. 4.8 betrachtet werden.

$\dot{\gamma} = 2157 \text{ s}^{-1}$ angelegt. Dies ist von besonderem Interesses, da aus der Literatur bekannt ist, dass insbesondere Endothelzellen stark auf geringe Scherraten zwischen 0.1 - 0.9 Pa reagieren [93].

Weiterhin galt es eine Korrelation der lokalen Scherraten mit der Ablösung der Zellen als Funktion der Zeit von den Substraten zu finden. Dazu wird im folgenden der auf MATLAB[®] basierte Algorithmus mit dem Name 'Particle Image Velocimetry De-Adhesion Correlation' (PIVDAC) vorgestellt. Er erleichtert die zeitaufwändige Korrelation der SPIV Messungen mit den Aufnahmen der Zelladhäsionsmessungen. Dafür teilt PIVDAC die mit SPIV ermittelten Scherraten in einzelne Zonen mit identischer Scherrate ein und berechnet automatisch den Anteil aus zellbelegter Fläche $A_c(t)$ aus den Daten der Adhäsionsmessungen. Anschließend werden beide Informationen miteinander verknüpft. Somit lässt sich der zeitliche Verlauf der Zelladhäsion in Bezug zur lokalen Scherrate setzen. Eine detaillierte Beschreibung der Anwendung der PIVDAC Software erfolgt in Kap. 3.3.3. In allen Adhäsionsexperimenten und SPIV Messungen befand sich der IDT auf der linken Seite mittig, außerhalb der Bildaufnahmenzone.

Probenvorbereitung

Für die Adhäsionsexperimente wurden verschiedene Substrate verwendet. Zur Untersuchung der Zelladhäsion unter physiologischen Parameter bis an die Grenzen, sowie des Einflusses der Scherraten, dienten Standard Proben aus medizinischer Titanlegierung (Ti Gr.5 -ELI) von der Firma Valbruna Edel Inox GmbH. Das Material wurde in Scheiben geschnitten ($r = 5 \text{ mm}$, $h = 2 \text{ mm}$) und von der Firma Aesculap AG sandgestrahlt. Die Oberflächenrauigkeit lies sich mittels Profilometrie (Dektak 8 Advanced Development Profiler, Veeco Instruments Inc) bestimmen und beträgt $R_q = 3.76 \text{ }\mu\text{m}$. Um die Abhängigkeit der Zelladhäsion mit der Oberflächentopographie zu untersuchen und die daraus resultierende optimale Oberfläche für die Zellhaftung zu ermitteln, wurden Proben mit sieben verschiedenen Rauigkeiten hergestellt. Dazu wurde die Probe in Technovit® 5071 (Heraeus Kunzer GmbH) eingebettet und mit der automatischen Schleif- und Poliermaschine AutoMet® 250 (Buehler, Illinois Tool Works Inc.), sowie Schleifpapier mit unterschiedlicher Körnung (60, 320, 1000, 2500, und 4000), gefolgt von einer polykristallinen Diamantpolitur (Korngröße $1 \text{ }\mu\text{m}$) bearbeitet. Die Oberflächentopographie wurde mittels Atomrasterkraftmikroskopie (NanoWizard® AFM, JPK Instruments AG) ermittelt. Die behandelten Proben haben eine Oberflächenrauigkeit von $R_q = 640 \text{ nm}$, 150 nm , 70 nm , 30 nm , 22 nm , 10 nm und 2 nm . Zur materialspezifischen Untersuchung der Zelladhäsion wurden verschiedene Proben aus 'Ultra High Molecular Weight Poly Ethylen' (UHMWPE,U) und durch ein Vitamin E-Komplex stabilisiertes Polyethylen (Vitelene,V) verwendet. Diese wurden von der Firma Aesculap AG jeweils in unbehandelter Form (U bzw. V), unter reiner Sauerstoffatmosphäre bei 5 bar und $70 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 Wochen chemisch gealtert (UA bzw. VD), mit Oberflächenumwandlung zu DLC (UD bzw. VD) [6], sowie mit DLC Umwandlung und chemisch gealtert (UDA bzw. VDA) zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden in einem Ultraschallbad für 10 min in einer Ethanol-Wasser Mischung (im Verhältnis 70 : 30) gereinigt und anschließend in einem Autoklaven bei $121 \text{ }^\circ\text{C}$ für 20 min sterilisiert.

Zellkultur

Für die Experimente wurde die menschliche Osteosarkom Zellkulturlinie SaOs-2 von CLS Cell Line Service GmbH erworben. Die Zellen wurden in 'Dulbecco's modified eagle medium' (DMEM) mit stabilem Glutamin, 3.7 g/l NaHCO_3 , $1.0 \text{ g/l D-Glukose}$ (Biochrom AG) unter Hinzugabe von 50 ml fetalem Kälberserum (FBS Superior, S 0615, Biochrom AG), 10 ml Hepes Puffer 1 M (L 1613, Biochrom AG), 5 ml L-Glutamin 200 mM (K 0283, Biochrom AG), 5 ml MEM Vitamins $100\times$ (K 0373, Biochrom) und 1 ml Primocin (ant-pm-2, InvivoGen) unter wassergesättigter Atmosphäre mit $5 \text{ }\%$ CO_2 bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert. Das Zellpassagieren erfolgte gemäß der Standardtrypsinisierung unter Verwendung von 1 ml Trypsin / EDTA Lösung und PBS (w/o Ca^{2+} , w/o Mg^{2+}) (Biochrom AG). Anschließend wurde die Lösung zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet mit frischem Medium mit einer entsprechenden Zelldichte von $300\,000$ Zellen pro ml resuspendiert.

Zelladhäsion und Fluoreszenzmikroskopie

Zur hergestellten Zellsuspension wurden pro ml 1 μg des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein Green Acetoxymethyl (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), welcher in 1 μl Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst ist, hinzugegeben. In lebenden Zellen spalten sich die Acetoxymethylestergruppe durch die intrazelluläre Esterase ab und das gesamte Farbmolekül beginnt zu fluoreszieren. Auf diese Weise sind nur lebende Zellen in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar. Nach einer anschließenden Inkubationszeit von 30 min, wurden 200 μl der Zellsuspension auf die Substrate gegeben, die bereits in den PDMS Zylinder eingebaut waren. Die Zellen wurden anschließend für $t_{inc} = 60$ min inkubiert. So können sie absinken und auf dem Substrat anhaften. Unter Standardbedingungen ($T = 37$ °C, $\text{pH} = 7.4$, $R_q = 3.76$ μm) adhären circa 50 % der aufgebrachten Zellen. Während dieser Inkubationszeit wurde entweder der pH-Wert auf $\text{pH} = 7.4$ konstant gehalten und bei unterschiedlichen Temperaturen $T = 27$ °C, 33 °C, 37 °C, 39°C, 41°C, 42 °C und 47 °C inkubiert, oder die Temperatur auf $T = 37$ °C konstant gehalten und der pH-Wert von $\text{pH} = 4.5$; 5.5; 6.5; 7.4; 8.0 und 9.0 variiert. Um den pH-Wert zu verändern, wurde dem Zellkulturmedium HCl zur Ansäuerung und NaOH zur Alkalisierung hinzugefügt. Dasselbe Medium wurde entsprechend während des gesamten Experimentes verwendet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand vorsichtig entfernt und durch ein zellfreies Medium ersetzt, um so freie Zellen zu entfernen. Die Montage des Aufbaus auf dem Mikroskop, sowie das Anbringen des Heizsystems, nahm 10 min in Anspruch, bevor die eigentliche Messung gestartet wurde.

Mit einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss), einem 2.5-fach Objektiv und einer Digitalkamera (Orca 5G, Hamamatsu Photonics), wurde eine Fläche $A_{tot} = 3.48$ mm x 2.65 mm = 9.22 mm² der Probe betrachtet (siehe Abb. 3.2). Vor dem Einschalten der akustischen Strömung wurde ein Bild der Zellen aufgenommen (statische Messung, $t = 0$ min = t_{0min}). Anschließend wurden alle 5 min während einer permanenten Strömung, über einen Zeitraum von 60 min jeweils ein Bild aufgenommen ($0 < t_i \leq 60$ min) und die Anzahl der adhären Zellen als Anteil der Gesamtfläche quantifiziert.

$$A_c(t) = \frac{A_{covered}}{A_{tot}} \quad (3.1)$$

Die statische Messung entspricht dabei dem Anfangswert von $A_c(t_{0min}) = A_{c,0min}$. Beim Vergleich der seriellen Aufnahmen mit dem Anfangsbild, wurde die Migration der Zellen auf dem Substrat (mit Zellen belegte Fläche bei $t_i > 0$ min, nicht aber bei t_{0min}) und deren Ablösung (mit Zellen belegte Fläche bei t_{0min} , nicht aber bei $t_i > t_{0min}$) zeitabhängig bis zu $A_c(t = 60 \text{ min}) = A_{c,60min}$ bestimmt. Abb. 3.2 zeigt den Bildanalyseprozess. Die vergrößerten Bilder zeigen den Anfangs- und Endzustand sowie deren Superposition, berechnet mit dem ImageJ Makro 'Colocalization Finder' [94]. In der Superpositionsgraphik stellen die gelben Zellen die Zellen dar, die während des gesamten Experiments auf ihrer Position verweilen. Zellen, die sich abgelöst haben, sind rot gefärbt, während Zellen, die sich im Verlauf der Messung bewegen oder neu anhaften, grün markiert sind.

Zur zeitabhängigen Bestimmung von $A_{c,t}$ wurden die Mikroskopaufnahmen mit der Software ImageJ [94] in 8 bit schwarz-weiß Bilder umgewandelt. Für jede Messung wurde ein individueller, aber konstanter Schwellenwert gesetzt, um so die adhären Zellen vom

Hintergrund klar zu unterscheiden. Anschließend wurden die Bilder invertiert und die mit Zellen belegten Flächen (schwarz) auf freiem Untergrund (weiß) über die ImageJ ‘particle analysis’ Funktion quantifiziert und auf den Startwert $A_{c,0min}$ normiert um die Ablösung der Zellen zu bestimmen.

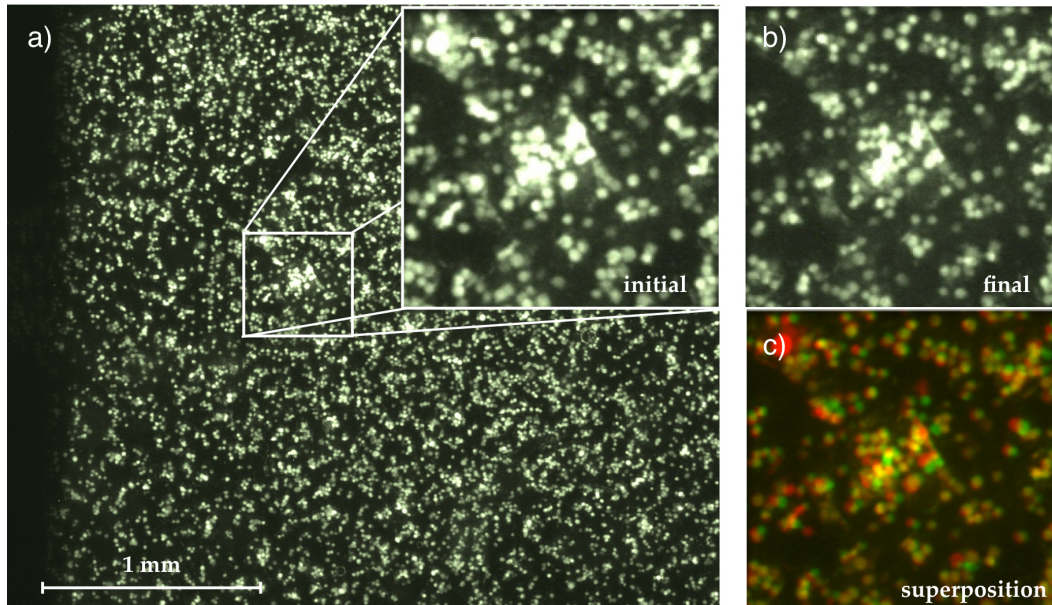


Abbildung 3.2: Mikroskopaufnahme der adhärenierten Zellen auf dem Substrat mit Vergrößerung von a) ursprünglicher Zustand zum Zeitpunkt $t(0) = 0$ min und b) Endzustand bei $t = 60$ min. c) Superposition beider Bilder durch Verwendung des Makros ‘colocalization finder’ von ImageJ [94]. Zellen die während der gesamten Messung auf der Probe bleiben sind gelb gefärbt, abgelöste Zellen sind rot und Zellen die sich bewegen oder neu anwachsen sind in grün dargestellt.

3.3 Ergebnisse und Diskussion

Einer der Hauptgründe für die Revisionsoperationen von Gelenkimplantaten liegt darin, dass sich das Implantat aufgrund von Entzündungen lockert. Diese kommen durch die Osteoclasten induzierte Knochenauflösung aufgrund von Abriebpartikeln oder bakteriellen Infektionen zustande [10, 84, 93]. Diese Infektionen oder Entzündungsreaktionen äußern sich durch Anstieg der lokalen Temperatur, insbesondere fieberartigen Zuständen [74] oder Veränderungen des interzellulären pHs [95].

Mit Hilfe des DANI-Aufbaus wurde die Adhäsion von SaOs-2 Zellen auf Titansubstraten untersucht und die Ablösung unter statischen und dynamischen Bedingungen betrachtet. Zuerst sollten statische Messungen Aufschluss über die gravitationsbedingte Zellablösung, sowie Artefakte durch Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs geben. Anschließend wurde entweder die Temperatur, der pH oder die Oberflächenrauigkeit variiert, während die anderen beiden Parameter konstant gehalten wurden. Im nächsten Schritt sollte die angelegte Scherspannung Information über die Zelladhäsion und den Einfluss der veränderten Parameter geben. Weiterhin wird auch der Einfluss der lokalen Scherrate als Funktion der Zeit untersucht und mit einem thermodynamischen Modell verglichen. Zum Schluss gilt, es die zeit- und orts aufgelöste Scherratenabhängigkeit der Zellen auf verschiedenen Materialien zu testen. Die SAW induzierte Scherrate wurde hier nicht genutzt um biologische Flussbedingungen im menschlichen Körper zu simulieren sondern um ein Maß zur Untersuchung und Charakterisierung der Fähigkeit und Stärke der Zelladhäsion (im Hinblick auf Änderungen der Temperatur, des pHs sowie der Oberflächentopographie) zu bestimmen.

3.3.1 Zeitabhängige Ablösung der Zellen unter Fluss

Zur Ermittlung der zeitabhängigen Zelladhäsion unter statischen und dynamischen Bedingungen wird hier das Standardsubstrat (Titan) mit $R_q = 3.76 \mu\text{m}$ bei $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $\text{pH} = 7.4$ verwendet. Zunächst muss dazu die gravitationsbedingte Zellablösung bestimmt und der systematische Einfluss des Ausbleichens des Farbstoffs charakterisiert werden. Die gravitationsbedingte Zellablösung spielt hier eine Rolle, da die Zellen auf der Unterseite des Kammerdeckels haften (vgl. Abb. 3.1). Somit lösen sich die Zellen im Verlauf der Zeit vom Substrat. Da lebende Zellen den Farbstoff Calcein Green AM laufend verstoffwechseln, kommt es zum Ausbleichen und somit zur Abnahme des Fluoreszenzsignals im zeitlichen Verlauf. Folglich fallen kleine Auswüchse am Rand der Zelle unter den festgesetzten Schwellenwert. Zur Quantifizierung beider Effekte wird die zellbesetzte Fläche $A_{c,t}$ in Zeitintervallen von 5 min über eine Gesamtzeit von 60 min unter statischen Bedingungen ermittelt. A_{c,t_i} wird dann zum Ausgangswert, der mit Zellen belegten Flächen $A_{c,0min} = 31 \% \pm 3 \%$ normiert und über den Verlauf der Zeit aufgetragen. Ein typischer Verlauf ist in Abb. 3.3 a) gezeigt.

Unter statischen Bedingungen zeigt sich eine lineare Abnahme für $A_{c,60min} = (0.94 \pm 0.03) * A_{c,0min}$. Folglich führt die Gravitation und das Ausbleichen zu einer Abnahme bei $A_{c,t}$ auf ca. 29 % nach 60 min. Die Experimente werden mindestens fünfmal wiederholt, um Abweichungen von der anfänglich ausgesäten Zellanzahl und der Vitalität der Zellen auszugleichen. Bei den dynamischen Experimenten ist der Einfluss der Scherraten auf die

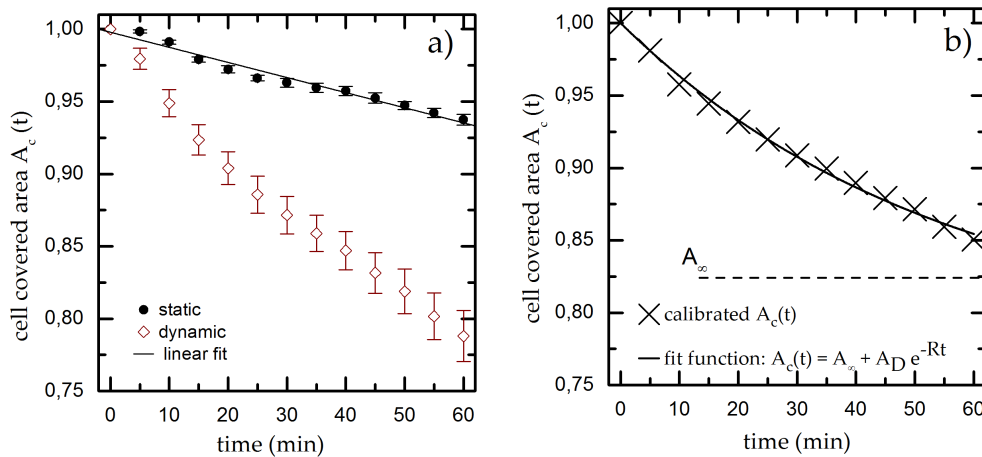


Abbildung 3.3: a) Zellbelegte Flächen im Zeitverlauf unter statischen und dynamischen Bedingungen bei $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7.4$ und $R_q = 3.76 \text{ } \mu\text{m}$. Eine lineare Fitfunktion beschreibt die statischen Messwerte (schwarze Linie), welche in späteren Messungen zur Kalibrierung der Basislinie dienen. Somit lässt sich die strömungsbedingte Ablösung von Nebeneffekten, wie Gravitation und Ausbleichen, trennen. b) Dynamische Messung von a), normiert auf den linearen Fit aus den statischen Experimenten.

Zelladhäsion zu beobachten (vgl. Abb. 3.3 a). Hier lässt sich eine exponentielle Abnahme für $A_{c,t}$ bis zu $A_{c,60\text{min}} = (0.79 \pm 0.03) \cdot A_{c,0\text{min}}$ ermitteln. Um den Gravitations- und Bleicheffekt von dem Einfluss des Scherflusses zu trennen, werden die Ergebnisse der dynamischen Messungen so normiert, dass die lineare Fitfunktion aus den statischen Messungen als Basiswert abgezogen wird. Dieser dient in allen weiteren dynamischen Messungen als Kalibrierkurve. Der daraus resultierende Graph (vgl. Abb. 3.3 b) zeigt dann nur noch die Ablösung durch die Scherkraft. Eine exponentielle Fitfunktion der normierten dynamischen Messungen beschreibt den zeitlichen Verlauf über

$$A_{c,t} = A_\infty + (1 - A_\infty) \times e^{-Rt}. \quad (3.2)$$

mit A die zellbelegte Fläche für $t \rightarrow \infty$ und $A_d = (1 - A_\infty)$ den Anteil der abgelösten Zellen. R beschreibt die Ablöserate, um die von Zellen belegte Fläche $A_{c,t}$ zum Zeitpunkt t zu bestimmen. Der kalibrierte, scherflussabhängige Verlauf führt zu einem Wert von $A_{c,60\text{min}} = (0.85 \pm 0.03) \cdot A_{c,0\text{min}}$.

3.3.2 Einfluss von Temperatur, pH und Oberflächenrauigkeit auf die Zelladhäsion

Wie bereits zuvor erwähnt, können entzündungsbedingte Zustände zu Änderungen der Temperatur und des pH-Wertes führen. Aus diesem Grund wird im folgenden das Ablösen der Zellen unter statischen und dynamischen Bedingungen unter Variation der Temperatur, des

pH-Wertes, sowie der Oberflächenrauigkeit untersucht. Die jeweiligen Einflüsse werden untersucht und sind in Abb. 3.5 aufgetragen. Dazu werden individuell, sowohl die statischen Ergebnisse bezüglich der anfänglichen Adhäsion $A_{c,0min}$ als auch die dynamischen Ergebnisse bezüglich der finalen Adhäsion $A_{c,60min}$ und der normierten finalen Adhäsion $A_{c,60min} / A_{c,0min}$ als Verlauf der Temperatur (vgl. Abb. 3.5 a, d und Abb. 3.5 g), des pH (Abb. 3.5 b, e und Abb. 3.5 h) und der Oberflächenrauigkeit (vgl. Abb. 3.5 c, f und Abb. 3.5 i) betrachtet.

Temperatur

Die normale menschliche Körperkerntemperatur beträgt 37 °C und kann zwischen 33 °C, bei therapeutischer Abkühlung bis hin zu 42 °C, bei hohem Fieber als Reaktion des Körpers auf Infektionen und Entzündungen [74], variieren. Aus diesem Grund wurden für das Experiment verschiedene Temperaturen innerhalb des physiologischen Bereichs und darüber hinaus gewählt, um die Zelladhäsion und ihre Grenzen zu erkunden. Während der Inkubationszeit und im Experiment wird die Temperatur jeweils auf $T = 27$ °C, 33 °C, 37 °C, 39 °C, 41 °C, 43 °C und 47 °C eingestellt, während pH bei 7.4, sowie die Oberflächenrauigkeit bei $R_q = 3.76$ µm konstant sind. Die Ergebnisse unter statischen Bedingungen sind in Abb. 3.5 a) gezeigt. Ein asymmetrisches Verhalten von A_c im Bezug zu T ist zu erkennen und weist ein klares Maximum von $A_{c,0min} = 31 \% \pm 3 \%$ bei $T = 37$ °C auf. Für niedrigere Temperaturen sinkt $A_{c,0min}$ nur gering auf $A_{c,0min} = 26 \% \pm 5 \%$ bei $T = 33$ °C für den unteren Grenzwert des physiologischen Bereichs ab. Selbst bei sehr niedrigen Temperaturen wie $T = 27$ °C besteht eine Adhäsion von $A_{c,0min} = 24 \% \pm 3 \%$, entsprechend 78 % des Maximalwerts bei 37 °C. Für $T \geq 37$ °C nimmt $A_{c,0min}$ deutlich stärker ab. Für den oberen Grenzwert im physiologischen Bereich bei $T = 41$ °C zeigen sich Werte von $A_{c,0min} = 22 \% \pm 4 \%$. Eine signifikante Änderung wird bei $T = 43$ °C beobachtet, bei dem die zellbelegte Fläche auf $A_{c,0min} = 13 \% \pm 5 \%$ fällt (entsprechend 32 % vom Maximalwert). Die höchste Temperatur $T = 47$ °C weist nur noch wenige adhärenzte Zellen mit $A_{c,0min} = 3 \% \pm 1 \%$ auf.

Die Ergebnisse unter Scherfluss zum Zeitpunkt $t = 60$ min sind in Abb. 3.5 d) gezeigt. Hier tritt ein Maximum bei $A_{c,60min} = 27 \% \pm 3 \%$ bei $T = 37$ °C auf. Geringere Temperaturen haben eine Adhäsion von $A_{c,60min} = 23 \% \pm 3 \%$ bei $T = 27$ °C und $A_{c,60min} = 26 \% \pm 5 \%$ bei $T = 33$ °C. Selbst bei 39 °C und 41 °C mit entsprechend $A_{c,60min} = 21 \% \pm 3 \%$ und $A_{c,60min} = 19 \% \pm 2 \%$ treten hier keine signifikanten Ablösungen unter Scherfluss auf. Erst bei hohen Temperaturen mit $T \geq 43$ °C fällt die finale Adhäsion auf einen Wert von $A_{c,60min} = 5 \% \pm 1 \%$. Bei $T = 47$ °C können nach dem Scherflussexperiment keine Zellen mehr gefunden werden. Um die individuellen Änderungen unter Scherfluss vergleichen zu können, wird die zeitabhängige Zelladhäsion auf den Adhäsionswert zu Beginn der Messung normiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.9) zu sehen. Unter dynamischen Bedingungen zeigt sich eine exponentielle Abnahme der zellbelegten Fläche $A_{c,t}$ im zeitlichen Verlauf. Unter Anwendung des Ratenmodells (Gleichung 3.2) im physiologischen Bereich (33 °C $\geq T \geq 41$ °C), lässt sich die Ablöserate R und A_∞ berechnen. Betrachtet man hingegen extreme Bedingungen ($T = 27$ °C und $T \geq 43$ °C), lässt sich das Ratenmodell nicht mehr anwenden. Für $T = 27$ °C zeigt sich zu Beginn nur eine geringe Ablösung, die ab $t = 40$ min zunimmt und zum Schluss Werte von $A_\infty = 0$ annimmt. Diese Ergebnisse sind nicht realistisch und kommen durch die flache Steigung und den gleichzeitig bestehenden großen Fehler des

Fits zustande. Bei $T = 43\text{ °C}$ zeigt sich für $A_{c,t}$ eine nahezu lineare Abnahme, die dann bei $t = 40\text{ min}$ abrupt abfällt. Für $T = 47\text{ °C}$ ist derselbe Effekt mit einem stärkeren Abfall zu beobachten. Zudem lösen sich alle Zellen bis zum Zeitpunkt $t = 60\text{ min}$ vom Substrat. Durch den abrupten Wechsel in der Ablöserate lassen sich die Messwerte nicht mehr durch die Fitfunktion 3.2 annähern.

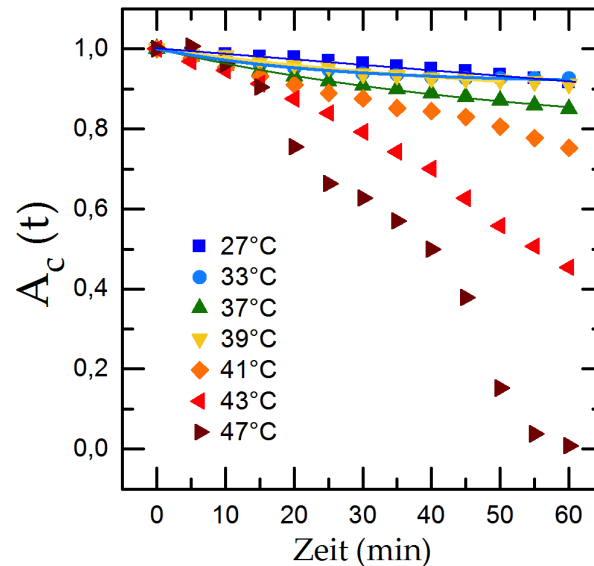


Abbildung 3.4: Temperaturabhängige Ablösung der Zellen im Verlauf der Zeit und exponentieller Fit zur Bestimmung der Ablöserate im physiologischen Bereich von $33\text{ °C} \leq T \leq 39\text{ °C}$.

Um in den nachfolgenden Ausführungen die Ergebnisse quantitativ zu diskutieren und einzuordnen, wird hier die finale Adhäsion $A_{c,60min}$ (siehe Abb. 3.5 d) sowie die normierte finale Adhäsion $A_{c,60min} / A_{c,0min}$ (siehe Abb. 3.5 g) anstelle von A_∞ verwendet. Somit ist eine maximale Zelladhäsion bei $T = 33\text{ °C}$ ($A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.92 \pm 0.09$) und ebenfalls $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.91 \pm 0.06$ bei $T = 27\text{ °C}$ zu finden. Beide Werte liegen höher als der Vergleichswert bei $T = 37\text{ °C}$ ($A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.85 \pm 0.07$). Dennoch liegen alle Werte im selben Fehlerbereich wie $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.92 \pm 0.05$ bei $T = 39\text{ °C}$. Daraus lässt sich schließen, dass Temperaturen knapp unter und im physiologischen Bereich nahe der idealen Körpertemperatur keine signifikanten Auswirkung auf die Zelladhäsion haben. Für Temperaturen ab $T \geq 41\text{ °C}$, die im oberen Bereich der physiologischen Grenze liegen, ist eine Abnahme des Adhäsionsvermögens auf einen Wert von $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.72 \pm 0.04$ zu verzeichnen. Hier zeigt sich eine Erhöhung der Ablöserate um den Faktor 1.2 verglichen mit $T = 37\text{ °C}$. Das Überschreiten der physiologischen Grenze ($T = 43\text{ °C}$) bewirkt eine stark erhöhte Ablöserate, die nur noch einen Bruchteil von etwa 40 % der anfänglich adhären Zellen mit $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.45 \pm 0.05$ auf dem Substrat zurücklässt. Das entspricht in etwa der Hälfte der bei $T = 37\text{ °C}$ adhären Zellen. Bei $T = 47\text{ °C}$ sind nach Ablauf des Experiments keine Zellen mehr vorhanden. Das Verhalten von $A_{c,60min} / A_{c,0min}$ als

Funktion der Temperatur entspricht qualitativ den Ergebnissen aus den statischen Messungen (vgl Abb. 3.5 a und Abb. 3.5 b).

Bis heute existiert keine detaillierte Studie zur temperaturabhängigen Zelladhäsion. Daher sollen die hier gefundenen Ergebnisse mit Studien zur Vitalität der Zellen und der Proteinstabilität verglichen werden, da beide Faktoren zur Zelladhäsion beitragen. Der geringe Einfluss der Temperaturen unter dem physiologischen Standard kann so verstanden werden, dass die Zellvitalität zwar stark eingeschränkt ist, jedoch noch nicht vollständig zum Erliegen kommt. Zusätzlich bleiben einige Proteine bei tiefen Temperaturen funktionstüchtig. Diese Aussage wird durch eine Langzeitstudie gestützt, die besagt, dass die Kultivierung von Zellen bei niedrigeren Temperaturen unter $T = 37\text{ °C}$ kaum Auswirkungen auf die Proliferation hat [96]. Obwohl die Glukoseaufnahme und Laktatproduktion im Metabolismus sinken, verringert sich die Wachstumsrate bei $T = 33.5\text{ °C}$ nur um 8 % im Vergleich zu 37 °C [96]. Weiterhin wurden niedrigere Kultivierungstemperaturen von $T < 30\text{ °C}$ vorgeschlagen, um die Zellproliferation zu kontrollieren [97]. Diese Studien besagen, dass eine kontrollierte Wachstumsrate zur Hemmung der Laktatdehydrogenase Aktivität (LDH) führt, welche wiederum direkt die Viabilität der Zellen beeinflusst [98]. Kombiniert und vergleicht man diese Studien mit den hier vorgestellten Ergebnissen, zeigt sich, dass die geringe anfängliche Zellbelegung bei $T = 33\text{ °C}$ sogar die Zelladhäsion unter Fluss begünstigen kann. Diese Studien stützen also die Annahme, dass geringe Abweichungen von der idealen Temperatur bei $T = 37\text{ °C}$ die Zelladhäsion nicht beeinflusst.

Die Experimente verdeutlichen weiterhin, dass mittlere Temperaturen von $27\text{ °C} \leq T \leq 41\text{ °C}$ exzellente Umgebungsbedingungen für Zellen, sowohl zum Anwachsen, als auch um dem Scherfluss zu widerstehen, bieten. Die zeitabhängige Ablösung in Abb. 4.9 weist eine Änderung im Ablöseverhalten bei hohen Temperaturen ($T \geq 43\text{ °C}$) und eine totale Ablösung nach 60 Minuten für $T = 47\text{ °C}$ auf. Dieses Verhalten ist durch einen zytotoxischen Effekt bei hohen Temperaturen zu erklären und wird durch medizinische Studien über hyperthermische Behandlungen in der Krebstherapie gestützt. Diese konzentrieren sich auf die Belastung von Zellen durch thermische Dosierungen [99]. Hier wurde ein Zusammenhang zwischen dem thermisch zytotoxizitätsinduzierten Zellsterben im Hinblick auf Temperatur und Einwirkungszeit gefunden. In der Studie konnte nahezu keine Veränderung der Viabilität bei $T = 41\text{ °C}$, selbst nach 6 h, festgestellt werden. Bei $T > 42.5\text{ °C}$ zeigte sich jedoch eine wärmebedingte Zytotoxizität [100].

Die erhöhte Zellablösung bei hohen Temperaturen ($T \geq 41\text{ °C}$) lässt sich durch die temperaturbedingte Denaturierung der Proteine erklären, welche zur Auflösung der Bindungen zwischen Zellen und Substrat bis hin zum Zelltod führt [101]. Weiterhin beeinflussen thermische Änderungen auch die Membranfluidität und -stabilität der Zellen und beeinträchtigen damit die Funktionalität von transmembranösen Transportproteinen, sowie den Rezeptoren an den Zelloberflächen, was zu zytotoxischen Einwirkungen und sogar Zelltod führen kann [102]. So basiert der unter Hyperthermie auftretende zytotoxische Effekt hauptsächlich auf der Denaturierung des Zytoplasmas und der Membranproteine [100]. Für die Zelladhäsion spielt hier hauptsächlich die thermische Zerstörung der Integrine [103], sowie des Zytoskeletts [104], eine Rolle. Folglich lässt sich sagen, dass der temperaturbedingte, zytotoxische Effekt auch der Grund für den abrupten Anstieg der Ablöserate mit der Zeit, besonders bei hohen Temperaturen, sowie für die totale Ablösung bei $T = 47\text{ °C}$ ist.

Im Bezug auf medizinische Implantate belegt diese Studie, dass eine Osseointegration unter Flussbedingungen für Temperaturen unter 41 °C erfolgreich ist. Bei höheren Temperaturen, die z.B. durch Entzündungen zustande kommen, kann es bei der Zelladhäsion und entsprechend bei der Osseointegration zu starken Problemen kommen.

pH-Wert

Der physiologische pH-Wert interzellulärer Körperflüssigkeiten liegt bei $\text{pH} = 7.4$. Trotz Schwankungen im Bereich von $6.8 \leq \text{pH} \leq 7.8$, die durch Infektionen, Entzündungen oder Medikamente auftreten können, sind Zellen in der Lage diese Bedingungen zu überleben [105]. Dennoch kann es bei starken Infektionen zum Absinken des interzellulären pHs auf $\text{pH} = 6$ kommen [95]. In dieser Studie wird der pH-Wert des Nährmediums im Bereich von $4.0 \leq \text{pH} \leq 10.0$, wie in Kap 3.2 beschrieben, variiert. Temperatur und Rauigkeit liegen konstant bei $T = 37 \text{ °C}$ und $R_q = 3.76 \text{ }\mu\text{m}$. Auch hier lässt sich das Ratenmodell (siehe Gleichung 3.2) nur im physiologischen Bereich anwenden, so dass auch hier $A_{c,60\text{min}}$ und $A_{c,60\text{min}} / A_{c,0\text{min}}$ verwendet werden, um die Zelladhäsion unter dynamischen Bedingungen zu quantifizieren.

Abb. 3.5 b) zeigt die Ergebnisse der statischen Messung von $A_{c,0\text{min}}$ in Abhängigkeit vom pH-Wert. Qualitativ lässt sich eine asymmetrische Verteilung von $A_{c,0\text{min}}$ mit einer schwächeren Adhäsion bei sauren pH Werten als bei alkalischen beobachten. Bei einer quantitativen Analyse findet sich ein Maximum für $A_{c,0\text{min}}^{\text{max}} = 31 \% \pm 3 \%$ bei $\text{pH} = 7.4$. Im sauren Milieu zeigt sich ein starker Rückgang auf $A_{c,0\text{min}} = 17 \% \pm 3 \% = 0.54 * A_{c,0\text{min}}^{\text{max}}$ an der Grenze zum physiologischen Bereich ($\text{pH} = 6.5$). Noch niedrigere pH-Werte führen zu einer starken Hemmung der Zelladhäsion mit geringen Werten von $A_{c,0\text{min}} = 4 \% \pm 1 \%$ bei $\text{pH} = 4.5$. Als untere Grenze der Zelladhäsion wird $\text{pH} = 4$ bestimmt, da hier keine Zellen auf dem Substrat anwachsen können. Im alkalischen Milieu ($\text{pH} = 8.0$) liegt das Adhäsionsvermögen bei $A_{c,0\text{min}} = 22 \% \pm 4 \% = 0.7 * A_{c,0\text{min}}^{\text{max}}$. Höhere pH Werte von 9.0 resultieren in $A_{c,0\text{min}} = 11 \% \pm 2 \% = 0.35 * A_{c,0\text{min}}^{\text{max}}$. Die Obergrenze der pH-abhängigen Zelladhäsion liegt bei $\text{pH} = 10$.

Nach Anwendung des Scherrflusses für eine Dauer von 60 min zeigt sich eine verbleibende Adhäsion von $A_{c,60\text{min}} = 27 \% \pm 3 \%$ bei $\text{pH} = 7.4$ wie sie in Abb. 3.5 e) zu sehen ist. Im sauren Milieu sind noch $A_{c,60\text{min}} = 15 \% \pm 3 \%$ bei $\text{pH} = 6.5$ und nur noch $A_{c,60\text{min}} = 3 \% \pm 1 \%$ bei der Untergrenze mit $\text{pH} = 4.5$ vorhanden. Abweichungen vom idealen pH-Wert ins alkalische Milieu bewirken eine stärkere Ablösung der Zellen und zeigen bei $\text{pH} = 8.0$ nur noch eine verbleibende belegte Fläche $A_{c,60\text{min}} = 17 \% \pm 3 \%$ und $A_{c,60\text{min}} = 8 \% \pm 5 \%$ bei $\text{pH} = 9$ auf.

In den auf den Anfangswert normierten dynamischen Messungen (vgl Abb. 3.5 h) zeigt sich eine Verschiebung des Maximalwerts von der zu Beginn belegten Fläche bei $\text{pH} = 7.4$ ($A_{c,60\text{min}} / A_{c,0\text{min}} = 0.85 \pm 0.03$) zu $\text{pH} = 6.5$ auf $A_{c,60\text{min}} / A_{c,0\text{min}} = 0.87 \pm 0.07$. Aufgrund der zu Beginn leicht geringeren Anzahl an adhärenierten Zellen haben diese bei $\text{pH} = 6.5$ mehr Fläche zur Verfügung und können so entsprechend stärker spreiten und so auf dem Substrat besser verankern. Unter Flussbedingungen benötigt es somit mehr Kraft, also höhere Scherraten, um die Zellen schließlich abzulösen. Dennoch überschneiden sich die Werte stark in ihrer Standardabweichung. Im alkalischen Milieu kann nur eine geringe

Abnahme der Zelladhäsion auf einen Wert von $A_{c,60min} = 0.79 \pm 0.07$ bei pH = 9 gemessen werden. Im Vergleich dazu, weist ein saures Milieu eine starke Erhöhung der Zellablösung ($A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.67 \pm 0.09$ bei pH = 4.5) auf. Nichtsdestotrotz ist der Effekt bei starker Abweichung vom optimalen pH-Wert schwächer ausgeprägt als der Temperatureinfluss. Sowohl statische als auch dynamische Messungen zeigen, dass eine Übersäuerung der Umgebung zur verstärkten Hemmung der Zelladhäsion führt, im Vergleich zur Alkalisierung. Weiterhin weisen Zellen eine bessere Resistenz gegenüber pH-Wert Änderungen außerhalb physiologischer Bereiche, im Vergleich zu Temperaturabweichungen auf. Dieses Verhalten kann durch die Zellmechanismen zur Regulierung des intrazellulären pH über Ionen-Austausch-Prozesse erklärt werden [106]. Die größte Herausforderung bei diesen pH-Regulierungsmechanismen liegt darin, die Zellen von überschüssigen Protonen zu befreien, die über die Anreicherung von im Metabolismus erzeugten Säuren und durch Diffusion von H^+ in die Zelle aufgrund des inneren negative Membranpotentials, herrühren [107]. Dazu haben Zellen diverse Methoden zur pH-Regulierung entwickelt. So zum Beispielt Na^+ / H^+ -Antiporter und Na^+ -abhängige HCO_3^- / Cl^- Austauscher zur Säureregulierung, sowie Na^+ unabhängige HCO_3^- / Cl^- Austauscher für alkalische pH [108]. Es wird davon ausgegangen, dass der Zellmetabolismus vom intrazellulären (zytoplasmatischen) pH beeinflusst wird, der wiederum durch Na^+ / H^+ -Tauscher reguliert wird. Diese wirken sich auf das Enzym Phosphofruktokinase aus, dass für die Mengenregulierung im Glukosestoffwechsel verantwortlich ist. Eine irreversible, zytoplasmische Übersäuerung beginnt ab pH = 6.8, da hier der saure pH zur Inaktivität der Enzyme führt [107] und damit auch zu einer Reduktion der Produktion von Adhäsionsmolekülen, welche für nichtspezifische Bindungsprozesse verantwortlich sind [109].

Die hier aufgeführten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die pH Regulierung im physiologischen Bereich einer Zelle aktiv ist, da sich die beste Zelladhäsion bei pH = 7.4 findet. Unter statischen Bedingungen nimmt $A_{c,0min}$ ab, da die Produktion der Adhäsionsmoleküle abnimmt. Trotzdem sind die unspezifischen Bindungsmechanismen in der Lage, dem Scherfluss standzuhalten.

Eine Studie von Serrano et al. [109], untersuchte die pH Abhängigkeit der Adhäsionsmoleküle an Endothelzellen unter statischen Bedingungen im Bereich von $6.5 \leq pH \leq 8.4$. Dabei stellte sich heraus, dass vaskuläre Adhäsionsmoleküle keine pH-Abhängigkeit aufweisen. Im Vergleich dazu nimmt aber die Anzahl an interzellulären Adhäsionsmolekülen mit zunehmender Abweichung von pH = 7.4 stark ab. Da das Augenmerk dieser Studie auf Zell-Substrat-Wechselwirkungen gerichtet war, bestätigen diese Resultate, die hier vorgelegten Ergebnisse bezüglich nichtspezifischer Bindungen. Daraus lässt sich folgern, dass die Zelladhäsion für kleine Abweichungen des pH kaum beeinflusst wird, da innerhalb dieser Bereiche die pH Regulierungsmechanismen vitaler Zellen aktiv sind.

In Bezug der Zelladhäsion von menschlichen Zelllinien unter dynamischen Bedingungen existieren keine Vergleichsstudien, die sich mit dem Einfluss von pH Änderungen beschäftigten. Dennoch sind die hier aufgeführten Ergebnisse in qualitativ guter Übereinstimmung mit Messungen von Crouch et al. [110], die sich mit dem Effekt des pH auf Nierenzellen von Babyhamstern (BHK) auf Glass unter statischen Bedingungen beschäftigten. Dabei konnte die stärkste Adhäsion bei pH = 7.6, sowie ein ähnlicher Verlauf, wie in der hier vorgelegten Studie, festgestellt werden. Eine Langzeitstudie der Zellen mit der hier vorgestellten Methode

lässt sich aufgrund des Bleichens von Calcein Green nicht realisieren. Für die Zukunft könnten jedoch grün fluoreszierendes Protein (GFP) transfizierte Zelllinien eingesetzt werden, um die Reaktion von Zellen auf extreme pH Bedingungen auch für längere Zeitspannen zu untersuchen.

Oberflächenrauigkeit

Neben der Temperatur und dem pH-Wert, spielt auch die Oberflächenstruktur eine wichtige Rolle bei der kontrollierten Zelladhäsion, vor allem bei der schnellen und erfolgreichen Osseointegration der Implantate und ihrer dauerhaften Stabilität. Die Bioaktivität der Knochen besteht aus physiochemischen Oberflächenreaktionen und zellulären Mechanismen. Dabei beeinflusst die Oberflächenzusammensetzung und -struktur der Knochen die Reaktionskinetik der Proteinadsorption, die zur Ausbildung von Bindungen und Spreiten der Zellen führt [111]. So hat die Oberflächenmorphologie einen direkten Einfluss auf die Zelladhäsion. Im folgenden soll die Funktion der Oberflächenrauigkeit auf die Zelladhäsion analysiert werden. Dazu dient eine Reihe von präparierten Proben mit unterschiedlicher Rauigkeit (vgl. Kap. 3.2). Bei allen Messungen werden hier der pH-Wert und die Temperatur bei $\text{pH} = 7.4$ und $T = 37^\circ\text{C}$ konstant gehalten.

In Abb. 3.5 c) ist der Einfluss der Oberflächenstruktur auf die anfängliche Zelladhäsion unter statischen Bedingungen zu sehen. Das Maximum an Zelldichte ($A_{c,0min} = 31\% \pm 3\%$) wird bei den sandgestrahlten Proben mit $R_q = 3.76\ \mu\text{m}$ verzeichnet. Die polierten Oberflächen führen zu einer Abnahme der Zelladhäsion von $A_{c,0min} \approx 15\%$, nahezu unabhängig von der Oberflächenrauigkeit.

Im Vergleich dazu, zeigt sich unter dynamischen Bedingungen ein Maximum für $R_q = 22\ \text{nm}$ ($A_{c,60minmax} = 14\% \pm 4\%$), wie in Abb. 3.5 f) zusehen ist und entsprechend der verbleibenden Zellen bleibt ein Anteil von $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.96 \pm 0.04$ normiert auf die ursprüngliche Adhäsion bestehen (vgl. Abb. 3.5 i). Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Werten ist eine Abnahme von $A_{c,60min}$ zu erkennen. Dennoch zeigt sich bei der glattesten Probe ($R_q = 2\ \text{nm}$) eine verbleibende Zellmenge von $A_{c,60min} = 8\% \pm 7\%$ und entsprechend $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.84 \pm 0.08$. Betrachtet man die rauen Oberflächen, liegt hier eine Abnahme der verbleibenden Zellen mit höherer Rauigkeit bis zu einem Minimum bei $R_q = 640\ \text{nm}$ mit $A_{c,60min} = 10\% \pm 3\%$ bzw. $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.68 \pm 0.12 = (0.8 \pm 0.14) \cdot A_{c,0minmax}$ vor. Die unbehandelte Standardprobe mit $R_q = 3.76\ \mu\text{m}$ zeigt wieder eine finale Adhäsion von $A_{c,60min} = 27\% \pm 3\%$, und entsprechend $A_{c,60min} / A_{c,0min} = 0.85 \pm 0.03 = (0.90 \pm 0.03) \cdot A_{c,0minmax}$. Somit zeigt sich hier eine mittlere normierte Endadhäsion im Vergleich zu den anderen Proben.

Das beobachtete Verhalten kann durch die Interaktion der Zellen mit dem Substrat erklärt werden, die über subzelluläre Mikrostrukturen vermittelt werden, welche zu fokalen Anhaftungen führen [112]. Die Fokalkontakte sind im Zytoskelett der Zelle verankert und erlauben dieser, an eine extrazelluläre Matrix über Integrine zu binden [113]. Bei einer hohen Anzahl von Integrinbindungen weisen diese Fokalkontakte eine spezifische Länge auf, um möglichst effizient die Adhäsion zu fördern und den Kontakt zwischen Zelle und Substrat zu maximieren [81]. Dazu richten sich die Zellen entsprechend der Topographie des Untergrundes so aus, dass eine Verkrümmung des Zytoskeletts minimiert wird [114].

Aus diesem Grund beeinflussen Veränderungen der Mikrostruktur der Substrate die zelluläre Adhäsion auf den Implantaten direkt. Dabei ist allerdings zu beachten, dass die bevorzugte Rauigkeit vom Zelltyp abhängt. So haften Osteoblasten eher an rauen Oberflächen, wohingegen Fibroblasten glatte Strukturen bevorzugen [113]. In den Studien zeigte ein Osteoblast ein ähnliches Verhalten wie die hier verwendeten SaOs-2 Zellen mit einem Maximum bei $R_q = 22$ nm. Beim Vergleich der Ergebnisse mit Huang et al. [8], die die Zelladhäsion von osteoblast-ähnlichen Zellen unter statischen Bedingungen auf einer Reihe Proben mit unterschiedlicher Rauigkeit untersuchten, zeigte sich, dass die Zellablösung stark mit der Oberflächenrauigkeit im Bereich von $50 \text{ nm} \leq R_a \leq 1.20 \text{ }\mu\text{m}$ variiert. Dabei wies $R_a = 150$ nm die höchste Zelladhäsion auf, im Vergleich zu glatten ($R_a \leq 70$ nm) oder rauen ($R_a \geq 330$ nm) Substraten. Auch in der hier gezeigten Studie ist ein Anstieg der Zelladhäsion mit höherer Rauigkeit bis zu $R_q = 150$ nm zu erkennen. Für $R_q = 640$ nm bleibt der Wert konstant. Daraus lässt sich schließen, dass eine angepasste Oberflächenrauigkeit bei einer idealen Verteilung von $R_q = 150$ nm vorteilhafte mechanische Verzahnungen zu Beginn der Adhäsion erzeugen und die weitere Zellanhaftung fördern kann [115]. Im Vergleich dazu, zeigt sich unter dynamischen Bedingungen eine erhöhte Ablösung mit zunehmender Rauigkeit R_q . Diese Beobachtung kann durch die scherflussinduzierte Aktivierung der fokalen Adhäsionspunkte erklärt werden, die dazu führt, dass sich die Anzahl der Stressfasern erhöht [82]. Integrinrezeptoren funktionieren als Mechanosensoren und führen zur Aktivierung von Signalproteinen, die auf zytoskelettale Verankerungen einwirken [116]. Es wird berichtet, dass die Oberflächentopographie mit der Anbindung der fokalen Adhäsion und mit der Ausbildung von Stressfasern korrelieren. Der ideale Abstand der Fokalkontakte liegt bei ca. 30 nm [81] und steht im guten Einklang mit den hier gefundenen Ergebnisse für maximale Zelladhäsion unter dynamischen Bedingungen mit $R_q = 22 \pm 5$ nm. In gleicher Weise sollen diese Befunde mit den Ergebnissen von Cavalcanti-Adam et al. [9] verglichen werden. Diese Gruppe verwendete nanostrukturierte Oberflächen, um den Einfluss der Ligandenabstände bei der Zelladhäsion unter statischen Bedingungen zu vermessen. Dabei stellte sich heraus, dass das anfängliche Anhaften der Zellen unabhängig von der Oberflächenstruktur ist, jedoch zur Ausbildung von stabilen Fokaladhäsionen und einem anhaltenden Spreiten, eine kritische Ligandendichte mit einem Abstand von < 70 nm nötig ist. Obwohl in dieser Studie die Topographie der Proben und nicht die Ligandendichte verändert wurde, zeigen sich ähnliche Ergebnisse. Fasst man alle Resultate zusammen, lässt sich folgern, dass die Oberflächenrauigkeit in der Größenordnung der Filopodiengröße (≈ 70 nm) das höchste Adhäsionsvermögen unter Flussbedingungen auf glatten Oberflächen bietet. Eine Erhöhung der Oberflächenrauigkeit im Bereich von Mikrometern kann noch weitere Effekte wie eine Abschirmung bewirken. Daraus ergibt sich, dass bei der Verwendung von glatten Implantaten die Oberflächenstruktur mit einer Rauigkeit von $R_q = 22 \pm 5$ nm die besten Voraussetzung zur Osseointegration bietet. Die Existenz eines Optimums lässt sich leicht nachvollziehen, da eine glatte, polierte Oberfläche kaum Kontaktpunkte für die Zellen liefert, um sich fest auf dem Substrat zu verankern. Stark unebene Profile hingegen führen dazu, dass eine Zellmembran sich verformen muss, um eine möglichst große Kontaktfläche zu erzeugen. So bietet eine moderate Rauigkeit die besten Bedingungen zur schnellen Regeneration von verletztem Gewebe oder kleinen Knochenbrüchen, da hier Adhäsion und Wachstum neuer Knochenzellen essenziell ist. Unter Betrachtung aller vermessenen Proben zeigt sich folglich

das lokale Maximum bei $R_q = 22 \pm 5$ nm, dennoch liegt die höchste Adhäsion bei den sandgestrahlten Proben vor.

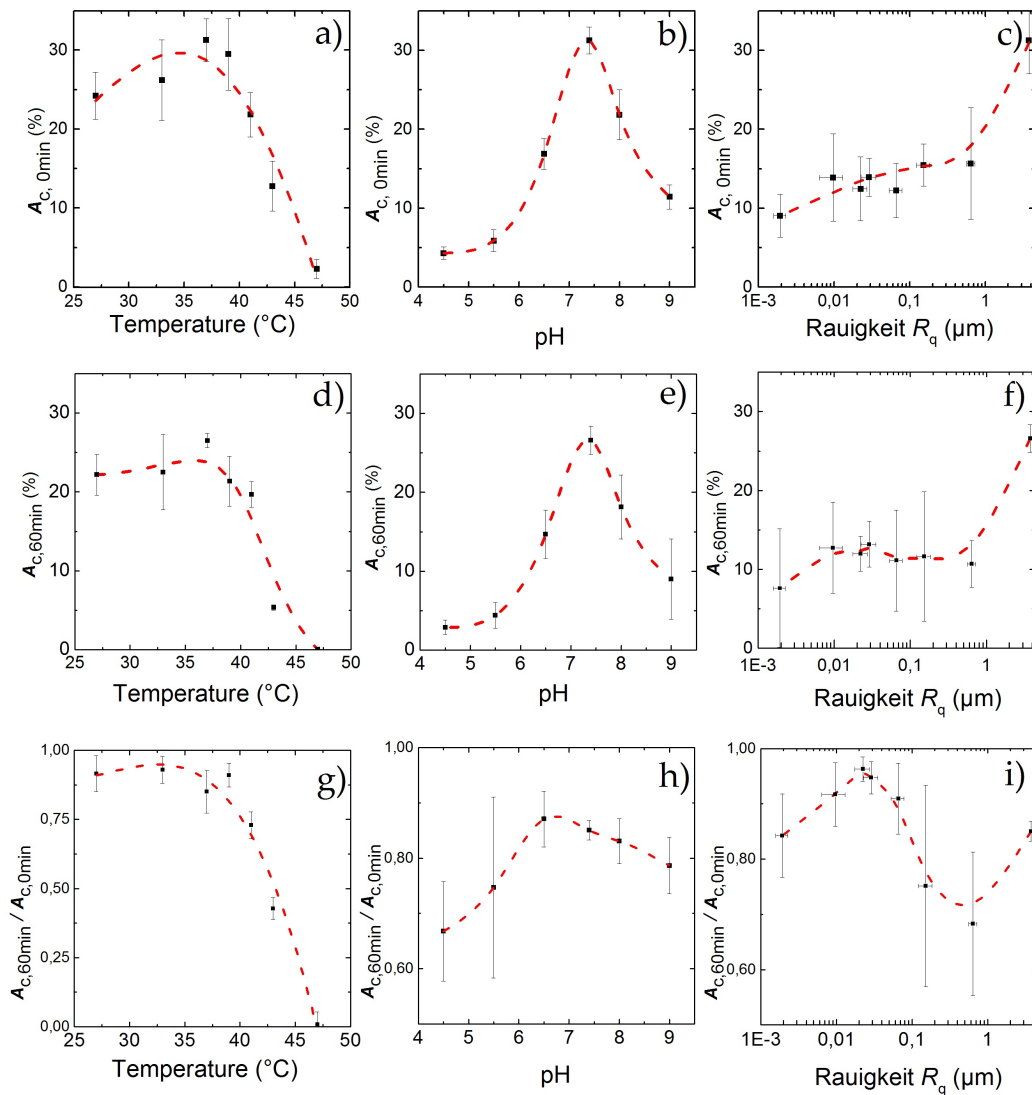


Abbildung 3.5: a) Prozentsatz der mit Zellen belegten Fläche nach einer Inkubationszeit von 60 min bei Standardbedingungen unter Variation der Temperatur (a), pH (b) und Oberflächenrauigkeit (c). Die physiologischen Standardbedingungen mit $T = 37\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7.4$ zeigen die höchste Adhäsion $A_{c,0min}$ auf, während eine Erhöhung der Oberflächenrauigkeit zu höherer $A_{c,0min}$ führt. Nach Anwendung des Scherflusses für 60 min, führt die Zellablösung zu einer Restadhäsion von $A_{c,60min}$ bei unterschiedlichen Temperaturen (d), pH-Werten (e) und Oberflächenrauigkeiten (f). Während niedrige Temperaturen kaum einen Effekt auf die Zellen haben, zeigt sich bei hohen Temperaturen und bei Abweichungen vom physiologisch optimalem $\text{pH} = 7.4$ eine starke Ablösung. Der Einfluss der Oberflächenrauigkeit zeigt sich in einem Maximalwert bei $R_q = 22\text{ nm}$. Trotzdem kann die höchste finale Adhäsion bei $R_q = 3.76\text{ }\mu\text{m}$ gefunden werden. $A_{c,60min} / A_{c,0min}$ bezeichnet den Anteil des Sichtfeldes der nach 60 min Scherfluss noch mit Zellen besetzt ist. $A_{c,fin}$ bezeichnet den mit Zellen belegten Anteil des Sichtfelds nach Scherfluss. Identisch zu den statischen Bedingungen weist der Temperatureinfluss (g) und der pH (h) im physiologischen Bereich keine großen Auswirkungen auf $A_{c,60min} / A_{c,0min}$ aus. Hohe Temperaturen und ein geringer pH zeigen einen starken Effekt. $A_{c,60min} / A_{c,0min}$ als Funktion der Oberflächenrauheit (i) weist ein Maximum bei $R_q = 22\text{ nm}$ auf. Die gestrichelte Linie dient als Leitfaden und die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für $n \geq 5$ Messungen.

3.3.3 Einfluss der Scherrate

Im folgenden soll die Ablöserate der Zellen in Bezug auf die lokale Scherrate, sowie deren Einwirkzeit untersucht werden. Für die detaillierte Bestimmung der scherratenabhängigen Ablösung wird hier das auf MATLAB[®] basierte PIVDAC-Skript verwendet. Die Funktionsweise soll hier kurz mit Hilfe Abb. 3.6 erläutert werden. In Abb. 3.6 a) ist die Scherratenkarte direkt an der Substratoberfläche (Deckel der Kammer) zu sehen. Die höchste Scherrate mit $\dot{\gamma} = 6882 \text{ s}^{-1}$ entsteht an der Stelle, wo die akustische Strömung direkt auf das Substrat auftrifft und dann zu den Seiten abfließt. Hier fällt die vertikale Flussgeschwindigkeit auf 0 m s^{-1} . Die asymmetrische Verteilung der Scherraten kommt durch den relativ zur vertikalen Ebene gekippten Strahl, sowie durch die laterale Apertur des IDT (Breite = $600 \mu\text{m}$) zustande. Die kleinsten Scherraten liegen bei $\dot{\gamma} = 300 \text{ s}^{-1}$ und befinden sich an den Ecken der Scherkarte. Im nächsten Schritt der PIVDAC Software wird die Scherkarte interpoliert und in vier Zonen mit gleichmäßig verteilten Scherraten geteilt. Die mittleren Scherraten der Zonen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. σ_{Scher} gibt dabei die mittlere Verteilung um die Scherrate an.

Tabelle 3.1: Scherraten der jeweiligen Zonen und Sigma Verteilung

Zone	Scherrate (s^{-1})	σ_{Scher} (s^{-1})
1	6882	± 367
2	5132	± 552
3	3231	± 570
4	1746	± 505

Anschließend wird die Ablösung der Zellen im Verlauf der Zeit für jede Zone bestimmt. Dazu wird die Scherzonenkarte mit den schwarz-weiß Aufnahmen der adhärenierten Zellen für jeden einzelnen Zeitschritt separat verknüpft und die vorhandenen Zellen ermittelt. Abb. 3.6 b) zeigt die Superposition von erstem und letztem Mikroskopbild und der Scherzonenkarte. Die vier Scherzonen sind durch die weiß gestrichelten Linien angedeutet. Die Veränderungen nach 60 min Scherfluss sind folgendermaßen gekennzeichnet: Zellen, die während der gesamten Messung auf ihrer Position bleiben sind rot gefärbt. Hellblaue Bereiche stellen die abgelösten Zellen dar. Bedingt durch das Flussprofil und den milden Scherfluss bewegen sich einige Zellen (orange) über das Substrat, dennoch reichen die Kräfte nicht aus, um diese von der Oberfläche abzulösen. Bei der Betrachtung von $A_c(t)$ lässt sich eine zeit- und scherratenabhängige Ablösung ermitteln, die einen exponentiellen Verlauf zeigt. Wie in Abb. 3.6 c) gezeigt ist, kann aus dem Verlauf ein scherratenabhängiger Sättigungswert A_∞ und eine finale Adhäsionszeit τ angenähert werden. Wie bereits zuvor wird die zellbelegte Fläche zur ursprünglichen Adhäsion $A_{c,ini}$ normiert. Die separaten Scherzonen zeigen einen klaren Unterschied in der Ablösung im zeitlichen Verlauf. Während die höchsten Scherwerte zu einer schnellen und starken Abnahme der anhaftenden Zellen von bis zu $(82 \pm 2) \%$ führen, weist die niedrigste Scherzone eine Reduktion auf $(88 \pm 2) \%$ auf. Daraus lässt sich folgern, dass die Ablöserate bei einer Vervierfachung der Scherrate von 1750 s^{-1} auf 6900 s^{-1} auf das 1.5-fache steigt. A_∞ und τ können durch analysieren und annähern des exponentiellen Verlaufs bestimmt werden. Bei der Auswertung der Ablöserate $R(\dot{\gamma}) = 1 / \tau(\dot{\gamma})$ ergibt sich

ein linearer Zusammenhang zur Scherrate (vgl. Abb. 3.6 d). Die spontane Ablösung ist von der Scherkraft unabhängigen Ablösung der Zellen vom Substrat durch Gravitation und das natürliche Ablösen der Filopodien und Lamellen der Zellen während der Migration bedingt.

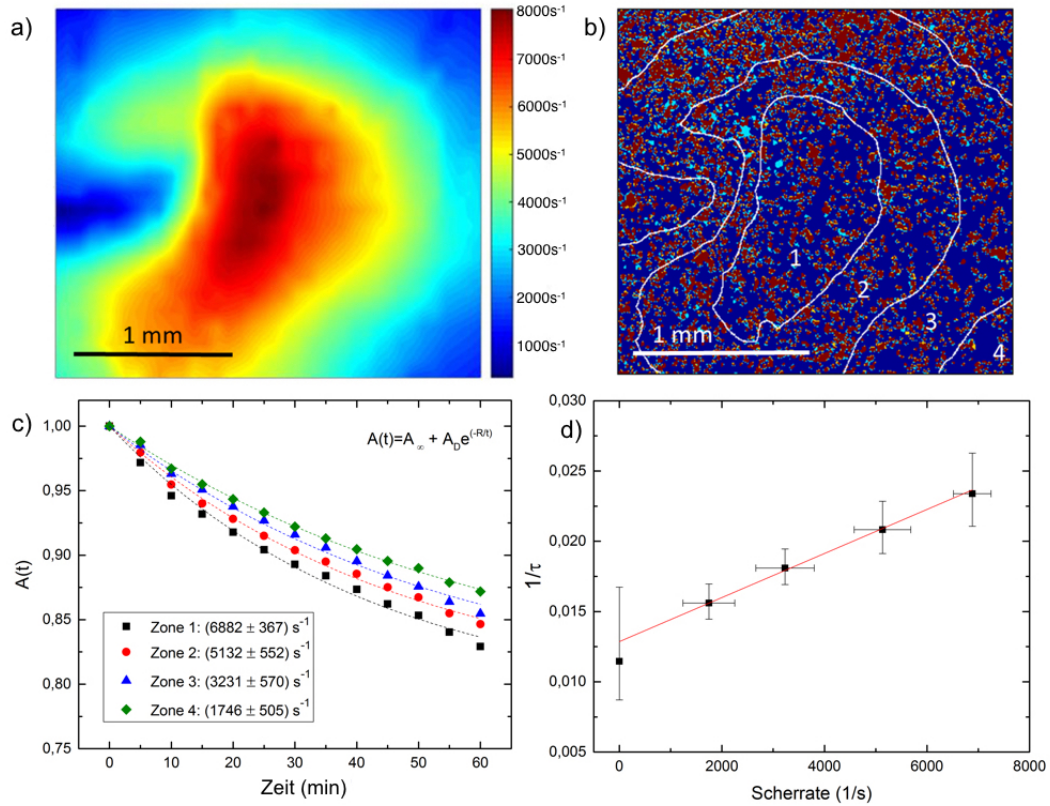


Abbildung 3.6: a) Scherkarte bei einer angelegten Leistung von $P = 28$ dBm. Die Werte decken einen Bereich von $\dot{\gamma}_{min} = 300 \text{ s}^{-1}$ bis $\dot{\gamma}_{max} = 8000 \text{ s}^{-1}$ ab und werden aus den PIV Daten interpoliert um die Scherkarte der Fläche zu erhalten. b) Darstellung der Superpositionen von Scherzonen und Ablösung der Zellen (Bildunterschied von $0 \leq T \leq 60$ min). Zellen die während der gesamten Messung an ihrer Position bleiben sind rot gefärbt, abgelöste Zellen sind in grün dargestellt und orange gefärbte Zellen stellen die migrierten oder neuadhärierten Zellen dar. c) Zeitverlauf von $A_c(t)$ aller vier Zonen. d) Ablöserate $R = 1/\tau$ bezogen auf die Scherrate γ .

Um die Größenordnung der scherratenabhängigen Ablösung in diesem Aufbau einzuordnen, werden die auftretenden Scherkräfte zunächst mit Literaturwerten verglichen. Im Anschluss sollen das entwickelte Scherratenmodell in Abschnitt 3.3.5 auf verschiedene Materialien angewendet werden. Zur Beschreibung der Scherratenabhängigkeit, werden die bisher beschriebenen Ergebnisse mit den Studien von Garcia et al. [111, 117], Dècavè et al. [118] und Fritsche et al. [119] verglichen. Alle Studien zeigen unabhängig vom Zelltyp ein ähnliches Verhalten in ihrem Adhäsionsvermögen. Werden alle Ergebnisse zusammenge-

fasst, kann der Ablösevorgang entsprechend dem in Abb. 3.8 gezeigten Verlauf beschrieben werden: Linearer Anstieg bei niedrigen Scherraten, ein exponentieller Anstieg ab einem Schwellenwert und linearer Verlauf bei sehr hohen Scherraten. Garcia et al. [111, 117] untersuchten quantitativ die Adhäsion von Osteosarkomazellen von Ratten unter Verwendung der 'Spinning Disk' Methode, ein weitverbreitetes Verfahren, bei dem die adhären Zellen durch die Rotation des Substrates und die umgebende, Flüssigkeit abgelöst werden. Die Ergebnisse zeigen eine symmetrische, exponentielle Abnahme der adhären Zellen unter Scherspannung im Bereich von 0 - 9 Pa. In der hier vorgestellten Studie werden ähnliche Scherspannungen von 0.2 - 5.6 Pa untersucht. Der Vorteil bei der Verwendung akustischer Strömungen im Gegensatz zur 'Spinning Disk'-Methode liegt in der Möglichkeit, nicht nur die scherabhängige Ablösung, sondern auch die zeitabhängige Adhäsion der Zellpopulation zu betrachten. Um einen Einblick in die Zelladhäsion unter hohen Scherraten zu gewinnen, können die Befunde mit den Ergebnissen von Dècavè et al. [118], die die scherflussabhängige Ablösung separater D. Discoideum Zellen von Glas betrachteten (Zell-Substrat Adhäsion), verglichen werden. Wie bei den anderen Gruppen, wurde auch hier eine exponentiell verlaufende Ablöserate unter hohen Scherspannungen bis 20 Pa festgestellt. Um eine annähernde Vorstellung zu erhalten, wie die Studien von Dècavè von D. Discoideum Zellen auf Glas, sowie die Osteosarkomazellen von Ratten auf Fibronectin beschichtetem Glas, mit den hier vorgestellten Studien von SaOs-2 Zellen auf sandgestrahltem Titan einzuordnen sind, soll die intrinsische Ablöserate $1/\tau$ unter statischen Bedingungen verglichen werden. Dècavè et al. gibt eine Rate von $1/\tau = 1.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ an, während die Rate hier in der Größenordnung von $1/\tau = 2.6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ liegt, also nur 22 % davon beträgt. Weiterhin ist bekannt, dass Zellen in der Lage sind, sich Scherkräften anzupassen. Integrine an der Grenze zum extrazellulären Bereich reagieren mit hoher Affinität auf Scherspannung [62, 120]. Als Reaktion auf einen schwachen Scherfluss bilden Zellen mehr Filopodien im Vergleich zu statischen Bedingungen aus. Die Anzahl der Filopodien steigt mit höherem Scherfluss [121]. Dieses Phänomen trägt maßgeblich zu den hier beschriebenen Ergebnissen bei und führt zu einer Abnahme der zunehmenden Ablöserate bei höherer Scherrate.

Fritsche et al. [119] untersuchten die Ablösung von Zellen im Fluss in einem ähnlichen wie dem hier verwendeten System. Die Autoren betrachteten die Adhäsion von Knochenzellen unter Verwendung der 'Spinning Disc' Methode. Als Substrat wurde hier poliertes Titan bei sehr hohen Scherraten betrachtet ($\approx 50 \text{ Pa}$). Dabei zeigte die Ablösung ein lineares Verhalten. Dècavè et al. [118] beschrieb weiterhin einen Schwellenwert bei der Zelladhäsion. Dieser ist durch die Adhäsionskraft zwischen Zellen und Substrat, sowie der Verteilung und Dichte der Zellpopulation definiert. Die hier vorgestellten Experimente finden bei relativ geringen Scherflüssen statt. Dieses ist durchaus vorteilhaft, da der dynamische Prozess von Zellen unter Fluss erforscht werden kann und nicht nur das direkte Abreißen der Zellen von verschiedenen Substraten, bei dem sich die Zellen nicht an die erhöhten Scherkräfte anpassen können. Weiterhin zeigt diese Methode auch eine zeitabhängige Ablösung der Zellen, wobei verschiedene Parameter wie Deformation, Migration und Neudahäsion unter dynamischen Flussbedingungen im Detail untersucht werden können. Weiterhin erscheint diese Methode im Hinblick auf Endothelzellen interessant zu sein, da diese eine starke Reaktion auf sehr geringe Scherspannungen zwischen 0.1 - 0.8 Pa zeigen [93].

3.3.4 Modellentwicklung zur scherraten abhängigen Ablösung

Um ein Verständnis der Ablöserate im Hinblick auf die einwirkende Scherspannung (vgl. Abb. 3.6 d) zu bekommen, soll ein Modell entwickelt werden, das die statistische Zellablösung als einen thermodynamischen Prozess beschreibt. Dazu wird angenommen, dass sich die Bindungsproteine der Zellen entweder in einem adhärenen oder ungebundenen Zustand befinden. Das Potential der freien Enthalpie einer einzelnen, adhäsiven Bindung kann mit zwei Minima entsprechend des gebundenen und ungebundenen Zustands beschrieben werden. Weiterhin kommt ein zusätzliches Potential hinzu, das der einwirkenden konstanten Scherkraft (bedingt durch die Strömungen) entspricht (vgl. Abb. 3.7 rot). Um den Adhäsions- und Deadhäsionsprozess zu beschreiben, wird die Theorie eines Übergangszustands in der Reaktionskinetik verwendet [122].

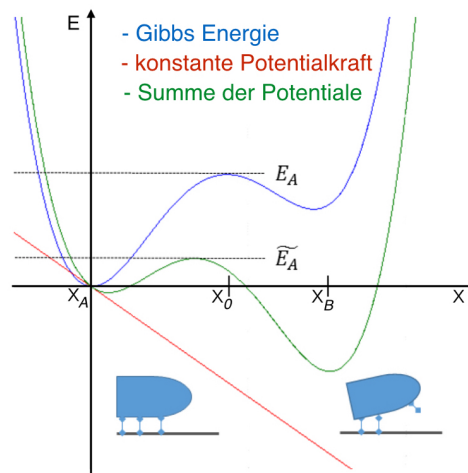


Abbildung 3.7: Freie Enthalpie als Funktion der Reaktionskoordinate x . Die beiden lokalen Minima bezeichnen den gebundenen und ungebundenen Zustand der Bindungsproteine.

Im Gleichgewichtszustand von adhärenen (A) und freien (B) Bindungen, lautet die Reaktionsgleichung der Koeffizienten k_{on} für Adhäsion und k_{off} für Ablösung:



Daraus wird eine Gleichgewichtsablösekonstante K_e definiert mit:

$$K_e = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (3.4)$$

Unter der Annahme einer homogen verteilten Bindungsdichte im Adhäsionsgürtel der Zelle, verändert sich die Anzahl an Bindungen im Zustand A als Funktion der Zeit

$$\frac{dn_A}{dt} = -k_{off}n_A + k_{on}n_B \quad (3.5)$$

Wird eine konstante externe Kraft F angelegt, trägt diese linear zum effektiven Potential $\tilde{G} = G - Fx$ bei. Die Reaktionskoordinate x wird hier so gewählt, dass sie der typischen Bindungslänge x_0 entspricht. Die Aktivierungsenergie entspricht folglich $\tilde{E}_A \approx E_A - Fx_0$ (vgl. Abb. 3.7). Daraus ergibt sich die neue Ratenkonstante \tilde{k}_{off} zu

$$\tilde{k}_{off} = e^{-\frac{\tilde{E}_A}{k_B T}} \approx e^{-\frac{E_A - Fx_0}{k_B T}} = k_{off} e^{\frac{Fx_0}{k_B T}} \quad (3.6)$$

F wirkt hier auf eine einzelne Bindung und bezeichnet die allgemeine Scherkraft, welche die Zellen spüren. Entsprechend des Ansatzes von Garrivier et al. wird hier die Ablöserate k_{off} , der Bindungen einer Zelle, zu der Ablöserate K der gesamten Zellpopulation korreliert [123]. Die Autoren leiten so einen charakteristischen Zusammenhang zwischen Ablösung der Zellen und einer von außen einwirkenden Kraft her, bei der angenommen wird, dass eine nicht homogene Verteilung der Ankerproteine entlang der Membran vorliegt. Auf diese Weise erhöht der Adhäsionsgürtel seine Fähigkeit, zunehmenden, äußeren Kräften zu widerstehen. Im folgenden werden die Vorstellungen und Konsequenzen dieses theoretischen Ansatzes zusammengefasst. Die angreifende Scherkraft hängt linear von dem Gradienten der Flussgeschwindigkeit zusammen mit:

$$F_{Scher} = \eta\beta\dot{\gamma} \quad (3.7)$$

Mit der Scherrate $\dot{\gamma}$, der Viskosität η und der Fläche β der adhärenen Zellen parallel zum Fluss. Im weiteren wird die Ablösegeschwindigkeit ν der Zellen als Hilfsgröße zur Modellberechnung eingeführt. Sie setzt sich zusammen aus dem Durchmesser der anhaftenden Zelle geteilt durch die Zeitkonstante des Ablöseprozesses. Garrivier et al. [123] beschreibt drei Bereiche unterschiedlicher Stärken der einwirkenden Kraft F_{Scher} , die sich durch den Einfluss auf die Ablösegeschwindigkeit ν unterscheiden. Kräfte unter einem bestimmten Schwellenwert F_C werden als schwache Kräfte bezeichnet. Der Schwellenwert ist somit definiert als die minimale Kraft, die benötigt wird, um die Zelle durch den Scherfluss abzulösen. Hier erhöht sich der Ablöseprozess linear mit dem Bereich der Strömungsgeschwindigkeit und skaliert mit einem konstanten Faktor, der abhängig von K_e ist. Bei mittleren Kräften treten thermisch aktivierte Prozesse auf, die eine exponentielle Relation von Scherkraft und Ablösegeschwindigkeit aufzeigen. Erreicht die Scherkraft einen Wert, bei dem die Potentialbarriere \tilde{E}_A praktisch verschwindet (starke Kräfte), lassen sich die Zellen direkt vom Fluss ablösen und die Ablöserate steigt wieder linear an (vgl. Abb. 3.7). Der Zusammenhang der Ablöserate mit der angreifenden Scherkraft gliedert sich somit in drei Bereiche auf. Schwache Scherkräfte führen zu einer linearen Ablöserate $K(\dot{\gamma})$ (vgl. Gleichung (3.8)). Mit zunehmender Scherrate, zeigt sich ein exponentieller Anstieg der Ablöserate (vgl. Gleichung (3.9)). Bei hohen Scherraten, werden die Zellen direkt mitgerissen und $K(\dot{\gamma})$ verhält sich entsprechend linear steigend (vgl. Gleichung (3.10)).

$$\text{niedrige Scherrate} \quad K(\dot{\gamma}) = K_0(\dot{\gamma} - \dot{\gamma}_C) \quad (3.8)$$

$$\text{mittlere Scherrate} \quad K(\dot{\gamma}) = K_0 \left(\frac{\dot{\gamma}_0}{\dot{\gamma}} \right)^{1/4} e^{\left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_0} \right)^{1/2}} \quad (3.9)$$

$$\text{hohe Scherrate} \quad K(\dot{\gamma}) \sim \frac{\dot{\gamma}}{\eta_{hydro}} \quad (3.10)$$

Zur einfacheren Beschreibung wird hier die charakteristische Scherrate $\dot{\gamma}_C$ eingeführt. Die zeitliche Entwicklung der adhärenierten Zellen bei niedrigen Scherraten zeigt somit einen exponentiell abnehmenden Verlauf, dessen konstante K von der Scherrate linear abhängt.

$$A(t) = A_{\infty} + A_D e^{-K(\dot{\gamma})t} \quad (3.11)$$

Diese theoretische Beschreibung stimmt gut mit den hier vorgestellten Befunden überein. Unter Verwendung der Identität

$$K(\dot{\gamma}) = \frac{1}{\tau(\dot{\gamma})} =: m\eta\dot{\gamma} \quad (3.12)$$

bezeichnet der Parameter m die Steigung des Fits in Abb. 3.6 d) geteilt durch die Viskosität des Mediums und kann als Gütewert zur Beschreibung der Sensitivität von Zell-Substrat-Kombinationen dienen. Folglich wird m als Schersensitivität bezeichnet. Für das betrachtete Beispiel, der SaOs-2 Zellen auf sandgestrahltem Titan, folgt daraus $m \approx \frac{2 \cdot 10^{-3}}{Pa}$. Wird dieser Ansatz auf weitere Substrat-Zell Kombinationen angewendet, muss zunächst ermittelt werden, welcher Scherratenbereich (Gleichung 3.8,3.9,3.10) vorliegt. Bezieht man weiterhin noch die in Abschnitt 3.3.3 aufgeführten Vergleichsstudien in die Modellentwicklung ein, so lässt sich die Zellablösung als Funktion der Scherrate wie in dem in Abb. 3.8 dargestellten Verlauf experimentell belegen.

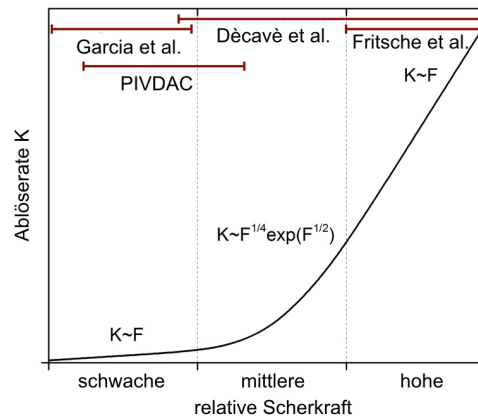


Abbildung 3.8: Modellvorschlag der Verhaltens der Ablöserate als Funktion im Scherfluss über einen weiten Bereich der Scherspannungen. Die von oben zitierten Studien abgedeckten Bereiche sind im Diagramm gekennzeichnet mit Garcia $0 \text{ Pa} \leq \gamma \leq 9 \text{ Pa}$, DANI $0.2 \text{ Pa} \leq \gamma \leq 5.6 \text{ Pa}$, Dècavè $1.8 \text{ Pa} \leq \gamma \leq 25 \text{ Pa}$, Pa, Fritsche $47.1 \text{ Pa} \leq \gamma \leq 53.2 \text{ Pa}$.

3.3.5 Anwendung auf neuartige Implantatmaterialien

Wie bereits in Kap. 3 erwähnt, kann es im Körper zu periprothetischen Infektionen durch Abriebpartikel kommen, die durch Implantatabnutzung an den Gleitflächen oder in den Gelenken entstehen, was wiederum zu einer Osteolyse führen kann und so zum Versagen des Implantats [15]. Daher ist die medizinische Forschung ständig auf der Suche nach neuen Materialien, um die Anzahl an Revisionsoperationen zu verringern. Hier wird vor allem an neuen Werkstoffen gearbeitet, die sowohl abriebfest sind, wie auch antibakterielle Eigenschaften aufweisen. Von besonderem Interesse sind dabei Materialien aus Polymeren, die einer Oberflächenumwandlung zu DLC unterzogen wurden. Diese eignen sich gut als Implantatmaterial, da sie eine hohe Härte aufweisen und damit widerstandsfähig gegen Reibung sind und zugleich durch zusätzlich implantierte Silberionen eine antibakterielle Wirkung zeigen [6, 7]. Im folgenden soll das Modell der scherratenabhängigen Ablöseraten $R = 1/\tau$ auf zwei dieser Materialien übertragen werden. Dazu wird hier das Anwachs- und Ablöseverhalten der Zellen auf den beiden Polymeren UHMWPE und Vitelene[®] (Aesculap AG), sowie auf zu DLC oberflächenmodifizierte PE und Vitelene untersucht. Darüber hinaus, werden von diesen Proben jeweils künstlich gealterte Varianten untersucht (siehe 3.2). Anschließend soll die Oberfläche der verschiedenen Proben hinsichtlich ihrer Topographie, sowie der Benetzungswinkel untersucht werden.

In Abbildung Abb. 3.9 a) ist das Anwachsverhalten $A_{c,0min}$ aller Materialien gezeigt. Hier fällt vor allem auf, dass die Umwandlung zu DLC, sowohl für UHMWPE, als auch für Vitelene[®], eine fast doppelt so hohe anfängliche Adhäsion aufweist. So ergibt sich für UHMWPE ein Wert von $A_{c,0min} = (17 \pm 3) \%$ und $A_{c,0min} = (28 \pm 2) \%$ für die DLC-Modifikation. Unbehandeltes Vitelene[®] weist einen Wert von $A_{c,0min} = (19 \pm 1) \%$ auf und die entsprechenden DLC-Modifikation $A_{c,0min} = (35 \pm 4) \%$. Insgesamt ist festzustellen, dass Vitelene[®] über eine leicht höhere Zellanhaftung verfügt. Die chemische Alterung der Schichten bewirkt eine geringe Zunahme der Adhäsion an den unbehandelten Proben, jedoch hemmt sie das Anwachsvermögen nach DLC-Modifikation. Die Ablösung der Zellen vom Substrat unter dynamischen Bedingungen wurde hier über die PIVDAC Software und anschließende Evaluierung der scherratenabhängigen Ablöserate $1/\tau$ bestimmt. Dazu ist der Verlauf der Ablöserate in den 4 Scherzonen der UHMWPE Reihe in Abb. 3.9 b) sowie der Vitelene[®] Reihe in Abb. 3.9 c) aufgetragen. Bei den UHMWPE Proben ist, sowohl für reines UHMWPE, als auch für die gealterten Proben, ein stark exponentieller Anstieg von $1/\tau$ mit zunehmender Scherrate zu beobachten, wobei die unbehandelten Proben die höchste Ablösung von $1/\tau = 0.030 \text{ s}^{-1}$ bei maximaler Scherrate $\dot{\gamma} = 6882 \text{ s}^{-1}$ aufweisen. Die Umwandlung zu DLC liefert um 70 % geringere Ablöseraten von $1/\tau = 0,021 \text{ s}^{-1}$ bei der höchsten untersuchten Scherrate $\dot{\gamma} = 6882 \text{ s}^{-1}$. Und auch der exponentielle Anstieg ist deutlich schwächer. Weiterhin gilt für den Verlauf der Ablöseraten mit steigender Scherrate, dass die Alterung des unbehandelten UHMWPE zwar zu einer Verbesserung des Adhäsionsvermögens unter dynamischen Bedingungen führt, bei DLC-modifizierten Proben die Anhaftung der Zellen jedoch leicht hemmt. Betrachtet man die scherratenabhängige Deadhäsion auf den Vitelene[®] Proben (vgl Abb. 3.9 c), ist auch hier ein exponentieller Anstieg der Ablöserate mit zunehmender Scherkraft zu sehen. Die maximale Ablösung mit $1/\tau = 0,022 \text{ s}^{-1}$ liegt auch hier für das unbehandelte Substrat bei maximaler Scherrate vor. Diese

beträgt jedoch nur 73 % der Ablöserate von reinem UHMPWE. Ein weiterer Unterschied zu den UHMWPE Proben zeigt sich bei der Modifikation zur DLC-Oberfläche. Hier beträgt $1/\tau_{max} = 0,018 \text{ s}^{-1}$ und ist damit um 81 % geringer als bei reinem Vitelene[®]. Eine Alterung der Proben liefert, sowohl für das unbehandelte, als auch für die DLC-Probe, eine geringe Minderung der Ablöserate und somit eine bessere Anhaftung der Zellen.

Zur Bestimmung der gravitationsbedingten Ablösung auf dem Substrat Y_0 (ohne Scherkraft), der kritischen Scherkraft $\dot{\gamma}_0$, sowie der kritischen Ablöserate R_0 , werden die Graphen in Abb. 3.9 b) und c) über eine nichtlineare Fitfunktion,

$$Y = K_0 \left(\frac{\dot{\gamma}_0}{\dot{\gamma}} \right)^{1/4} * \exp \left(\frac{\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}_0} \right)^{1/2} + Y_0 \quad (3.13)$$

bestimmt, wie sie bereits in Gleichung (3.9) für mittlere Scherraten Anwendung findet. Entsprechend der Gleichung 3.9 für mittlere Scherkräfte mit der Software Origin (Origin-Pro 2015G 64Bit – Originlab) analysiert und die entsprechenden Parameter ermittelt. Die entsprechenden Werte aller Proben sind in Abb. 3.10 a) für die natürliche Ablösung, in Abb. 3.10 b) für die kritische Scherrate und in Abb. 3.10 c) für die kritische Ablöserate im Vergleich aufgetragen. Für die natürliche Ablösung der Zellen Y_0 lässt sich, sowohl für die UHMWPE Proben, als auch für Vitelene[®], erkennen, dass die DLC Umwandlung die Anhaftung der Zellen deutlich verbessert, eine Alterung der DLC-Schicht jedoch schlechter für die Adhäsion ist. So zeigt sich im Vergleich der UHMWPE Proben eine Verbesserung der Adhäsion durch die DLC-Modifikation auf knapp das Doppelte mit $Y_{0,U} = 0.0124 \pm 0.003$ auf $Y_{0,UD} = 0.0640 \pm 0.0029$, bei Vitelene nimmt die natürliche Ablösung der Zellen nur auf 75 % von $Y_{0,V} = 0.0088 \pm 0.0011$ % auf $Y_{0,VD} = 0.0066 \pm 0.0012$ % ab. Eine Alterung der unbehandelten Probe bewirkt bei beiden Substraten eine Verringerung der Ablösung, welche zwar bei Vitelene[®] nur geringfügig (um ca. 4 %) ausfällt, jedoch bei UHMWPE 70 % ausmacht. Betrachtet man die kritische Scherrate $\dot{\gamma}_0$ aller Substrate (vgl. Abb. 3.10 b), sind starke Schwankungen für die UHMWPE Proben zu sehen. Vor allem der extreme Wert mit $\dot{\gamma}_{0,UD} = 413 \text{ s}^{-1}$ für das modifizierte UHMWPE ist besonders auffällig. Vergleicht man den Verlauf der scherzonenspezifischen Ablöserate (Abb. 3.9 b), zeigt sich ein sehr schwacher, exponentieller Verlauf. Folglich werden hohe Scherraten benötigt, um die Zellen vom Substrat zu lösen, da die Wechselwirkungen zwischen Zellen und Substrat deutlich stärker sind. So würde bei Anwendung des Ratenmodells (Kap. 3.3.4) eher der niedrige Scherkraftbereich (3.8), und damit eine lineare Zunahme der Deadhäsion mit steigender Scherrate, gelten. Für die gealterten Proben von DLC-Vitelene[®] und DLC-UHMPWE liegt die Relation aus Scherrate und Zell-Substrat Wechselwirkung genau zwischen den beiden Scherkraftbereichen (Gleichung 3.8 und 3.9). So lassen sich hier beide Näherungen anwenden. Vergleicht man die Alterung der Proben mit den unbehandelten UHMWPE und Vitelene[®], zeigen sich bei beiden Proben eine Erhöhung der Scherrate durch den Alterungsprozess. Die DLC Umwandlung der Vitelene[®] Probe bewirkt auch eine Zunahme der kritischen Scherrate $\dot{\gamma}_0$.

Der letzte Parameter beschreibt die kritische Ablöserate K_0 und ist gleichzusetzen mit der intrinsischen Ablöserate in Gleichung 3.9. Diese liegt für die UHMWPE-Proben und deren Modifikationen um mindestens zwei Größenordnungen höher als für Vitelene[®]. Dies zeigt sich beim Vergleich der unbehandelten Probe $K_{0,U} = 1.67 \cdot 10^{-6}$ für UHMWPE, $K_{0,V} = 1,32 \cdot 10^{-8}$ für Vitelene[®], für die DLC-Modifikation $K_{0,UD} = 1,38 \cdot 10^{-7}$ und $K_{0,VD} = 7,2$

10^{-8} entsprechend. Das bedeutet, dass für die DLC Umwandlung beider Substrate eine Verringerung der Ablöserate K_0 auf 12 % für UHMWPE und 18 % für Vitelene im Vergleich zum ursprünglichen Material vorliegen. Die gealterten DLC Proben zeigen ebenfalls eine niedrigere Ablöserate im Vergleich zu den unbehandelten, gealterten Proben. Hier bewirkt die DLC Modifikation eine Verringerung der Ablöserate von $K_{0,UA} = 2.24 \cdot 10^{-6}$ auf $K_{0,UDA} = 3.52 \cdot 10^{-5}$ für UHMWPE und $K_{0,VA} = 2.91 \cdot 10^{-7}$ auf $K_{0,VDA} = 1.54 \cdot 10^{-5}$ für Vitelene[®].

Aus den Messungen lässt sich schließen, dass die Oberflächenmodifikation zu DLC, sowohl für UHMWPE, als auch für Vitelene[®] eine Verbesserung der Anhaftung für Zellen bewirkt. Die Zellen scheinen höheren Scherspannungen besser standhalten zu können und weisen ein annähernd lineares Verhalten mit zunehmendem Fluss auf. Weiterhin zeigt sich auch bei den chemisch gealterten Substrate, dass die DLC modifizierten Proben eine höhere Adhäsion aufweisen. Um zu erforschen, was den positiven Effekt der DLC Umwandlung hervorruft und zur Charakterisierung der Polymerproben, wird die Topographie und die Hydrophobizität der Proben analysiert. Die Oberflächenrauigkeiten wurden mit dem Profilometer (Dektak 8 Advanced Development Profiler, Veeco Instruments Inc) bestimmt. Die entsprechenden R_q Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.2: Rauigkeit R_q und Kontaktwinkel α der verschiedenen Materialien

Material	R_q (nm)	Std. Abw. R_q (nm)	Winkel α	Std. Abw α
U	657.1	± 24.4	78.7	± 5.6
UA	611.1	± 52.1	65.1	± 9.7
UD	713	± 41.9	60.5	± 15.2
UDA	907.4	$\pm 64,7$	65.0	± 4.8
V	348.4	± 40.1	71.5	± 13.4
VA	759.4	± 54.5	67.4	± 16.1
VD	648.9	± 49.8	41.7	± 11.1
VDA	571.4	$\pm 53,4$	46.4	± 9.9

Betrachtet man die Oberflächenstruktur der Proben, liegen alle bis auf das gealterte, DLC-modifizierte UHMWPE und das Vitelene nahe dem Wert von $R_q = 650 \text{ nm} + 50 \text{ nm}$. Die extremen Schwankungen in der Rauigkeit rühren von der Herstellung der Proben her, da diese nur aus einem Materialblock heraus gefräst und nicht nachträglich abgeschliffen wurden. Beim Vergleich mit $A_{c,0min}$ (siehe Abb. 3.9 a) lässt sich jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen Oberflächenrauigkeit und Adhäsion feststellen. Gleiches gilt für die berechneten Parameter wie natürliche Ablösung Y_0 , kritische Scherrate $\dot{\gamma}_0$ und kritische Ablöserate K_0 (vgl. Abb. 3.10). Im Hinblick auf den Zusammenhang von Oberflächenrauigkeit und Adhäsion unter statischen und dynamischen Bedingungen (vgl. Kap. 3.3.2), liegen die vermessenen Polymerproben im mittleren Rauigkeitenbereich der Titanproben. Folglich zeigt sich eine ähnlich hohe Zelldichte. Die anfänglich belegte Fläche liegt im Mittel bei ca 25 % und durch die angelegte Scherspannung abgelöste Zellen variieren zwischen 50-60 % von $A_{c,60min}$ (Daten nicht gezeigt). Dieses beobachtete Phänomen lässt sich mit Hilfe der bereits erläuterten Studien von Huang et al. [8] und Cavalcanti-Adam et al. [9] erklären. Es lässt kein Einfluss der Topographie auf das unterschiedliche Anwachs- und Ablöseverhalten

zwischen UHMPWE und Vitelene[®] finden.

Ein weiterer Aspekt, der die Adhäsion beeinflusst, stellt die Hydrophobizität bzw. Hydrophilie des Substrats dar. Da die SaOs-2 Zellen wie auch das Zellkulturmedium einen stark hydrophilen Charakter haben [124, 125], kann das Anhaften und Spreiten der Zellen auf hydrophilen Oberflächen begünstigt werden. Um die Polymerproben auf ihre Hydrophilie zu untersuchen, wurden die Kontaktwinkel von destilliertem Wasser auf den Substraten mit einem Kontaktwinkelmessgerät (OCA 35, Dataphysics Instruments GmbH) bestimmt. Eine genaue Anleitung zur Bestimmung des Kontaktwinkels befindet sich in [126, 127]. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Grundsätzlich gilt, je höher der gemessene Winkel, desto hydrophober ist die Oberfläche. Ein Vergleich des Kontaktwinkels α zeigt sowohl für die UHMWPE als auch für die Vitelene[®] Proben, dass eine Umwandlung zu DLC den Kontaktwinkel verkleinert. Der hydrophile Charakter der Proben erhöht sich. Die hydrophilste Oberfläche mit einem Winkel von $\alpha = 41,7^\circ \pm 11,1^\circ$ ist bei DLC modifiziertem Vitelene[®] zu finden. Vergleicht man damit die ursprüngliche Adhäsion $A_{c,0min}$ (vgl. Abb. 3.9 a), so zeigt sich auch hier die dichteste Zellpopulation auf der Probe. Der höchste Winkel mit $\alpha = 78,7^\circ \pm 5,6^\circ$, also die stärksten hydrophoben Eigenschaften, tauchen bei der unbehandelten UHMWPE Probe auf. Auch hier lässt sich eine Korrelation zwischen hydrophober Oberfläche und Adhäsion feststellen, da die Probe mit $A_{c,0min} = (17 \pm 3) \%$ die geringste Zelldichte aufweist. Betrachtet man alle Werte von $A_{c,0min}$ und den entsprechenden Kontaktwinkeln α , (Abb. 3.11) lässt sich eine starke Abhängigkeit des Adhäsionsverhaltens zum hydrophilen Charakter der Proben erkennen. Eine quantitative Analyse der Messdaten zeigt, dass die Umwandlung von UHMWPE zur DLC modifizierten Struktur zu einer Zunahme von $A_{c,0min}$ um 60,7 % und einen um 33 % kleineren Kontaktwinkel führt. Verglichen mit Vitelene[®], ist hier eine Erhöhung von $A_{c,0min}$ um 55,8 % und eine Kontaktwinkelverkleinerung um 58 % zu erkennen. Beim Vergleich der unbehandelten Proben weist UHMPWE eine um 90 % geringere Adhäsion als Vitelene[®] auf, bei einem Unterschied im Kontaktwinkel von $\Delta\alpha = 7,2^\circ$. Vergleicht man dazu die DLC Proben der beiden Werkstoffe, so zeigt sich auch hier eine um 17,4 % geringere Adhäsion für UHMWPE bei einem um $18,8^\circ$ höheren Winkel α . Die Berechnung des Pearsonschen Korrelationskoeffizienten ergibt hier einen Wert von $R = -0,65$ und weist somit auf einen näherungsweise linearen Zusammenhang aus Adhäsionsvermögen der Zellen und Hydrophilie des Materials hin.

Der Befund lässt sich durch zwei Phänomene erklären. Zum einen wird durch die Umwandlung des Polymers in DLC das Verhältnis der sp^3 zu sp^2 Hybridisierung erhöht und folglich können mehr polare OH-Gruppen an das Substrat binden. Der hydrophile Charakter in a:CH-DLC Filmen kann sogar bis zur Superhydrophilie zunehmen [128]. Der zweite Faktor ist der direkte Einfluss der hydrophilen Proben auf den Prozess der Adhäsion. Da bei den unspezifischen Wechselwirkungen von Zellen und Substrat vor allem die Hydratationsenergie eine wichtige Rolle spielt, kann eine hydrophobe Oberfläche das Anhaften und Spreiten der Zellen hemmen und so das Adhäsionsvermögen im Allgemeinen verringern [125]. Entsprechend der Oberflächenenergien wird die Form der Zelle und Organisation des Zytoskelettes beeinflusst. Webb et al. [129] fanden bei einer Studie zur Abhängigkeit der Anhaftung und Spreitung von Fibroblasten in Bezug zur Oberflächenbenetzung, dass Kontaktwinkel zwischen $20-40^\circ$ die höchste Zelladhäsion bewirken. Derselbe Befund geht aus dem Vergleich der substratspezifische $A_{c,ini}$ und entsprechendem Kontaktwinkel in der

hier vorgestellten Studie hervor. Das Adhäsionsvermögen nimmt mit steigendem Winkel α ab. In dieser Messreihe hat sich gezeigt, dass die entwickelte PIVDAC Software auf verschiedene Materialien angewendet werden kann und sich die Zelladhäsion, in Abhängigkeit der lokalen Scherrate und dem zeitlichen Verlauf, bestimmen lässt. Aus den ermittelten Werten kann dann die kritische Scherspannung, intrinsische Ablöserate und die natürliche Ablösung bestimmt werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse spielen jedoch nicht nur die lokale Scherrate, sondern auch die Wechselwirkungen zwischen Substrat und Zelle, vor allem hinsichtlich der Hydrophilie, eine entscheidende Rolle. Entsprechend muss zunächst der Verlauf von Zelladhäsion und Scherraten beobachtet werden, um dann einen linearen Zusammenhang für geringe Scherkraft und/oder hohe Zell-Substrat Affinität (vgl Gleichung 3.8), oder einen exponentiellen Zusammenhang bei mittlerer Scherrate und/oder schwächerer Zell-Substrat Affinität (vgl Gleichung 3.9) zu finden.

3.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie wurde die Zelladhäsion von SaOs-2 Zellen auf medizinischen Implantatmaterialien untersucht. Dabei wurde das Anhaftungs- und Ablöseverhalten der Zellen in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und der Topographie evaluiert. Die statistischen Experimente haben gezeigt, dass sich die höchste Adhäsion auf Titansubstraten mit einer Rauigkeit von $R_q = 3.76 \mu\text{m}$, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ und $\text{pH} = 7.4$ beobachten lässt. Werden die Zellen einem Scherfluss ausgesetzt, zeigt sich eine stärkere Ablösung der Zellen mit zunehmender Abweichung von den idealen Bedingungen. So sind vor allem hohe Temperaturen und niedrige pH-Werte kritisch. Unter diesen extremen Bedingungen versagt das entwickelte Ratenmodell aufgrund von erhöhtem Zellsterben. Bei der Betrachtung der Oberflächenrauigkeit zeigt sich ein lokales Maximum der Adhäsion bei einer mittleren Rauigkeit von $R_q = 22 \text{ nm}$. Für weiterführende Studien wäre hierbei von großem Interesse, den Einfluss der Zelldichte auf die Ablöserate zu untersuchen, da die Zellen zum Beispiel durch umgebende Zellen von der Strömung abgeschirmt werden. Weiterhin wurden adhäsive interzelluläre Wechselwirkungen bislang außer Acht gelassen.

Um den Einfluss der Flussbedingungen zu erläutern, wurde hier das auf MATLAB® basierende Skript PIVDAC entwickelt, das die lokale Scherrate mit der zeitabhängigen Ablösung der Zellen von verschiedenen Oberflächen korreliert. Die Verwendung von μ PIV ermöglicht eine genaue Information der lokalen Scherraten. Die in diesem Aufbau ermittelten Raten liegen im Bereich physiologischer Kräfte, die im menschlichen Körper, z.B. im Blutfluss oder unter mechanischer Belastung im Knochen (0.25 Pa - 4.6 Pa) [130] auftreten. Gerade bei der Betrachtung von Implantaten sind die Bereiche ausschlaggebend. Weiterhin lassen sich die Daten mit der De-Adhäsion unter Fluss kombinieren und unter Anwendung einer Übergangszustandstheorie der Reaktionskinetik im Ablösevorgang, kann daraus eine Zeitkonstante $\tau(\dot{\gamma})$, eine scherratenabhängige Konstante $K(\dot{\gamma})$, sowie die natürliche Ablösung Y_0 ohne Scherströmung bestimmt werden.

Die theoretische Modellentwicklung wurde, neben dem Literaturvergleich auch durch Messungen auf neuen Implantatmaterialien überprüft. Hier zeigte sich bei den Polymeren UHMWPE und Vitelene, sowie DLC modifizierten UHMWPE und Vitelene, dass neben

dem Strömungsprofil und Scherratenbereich auch Wechselwirkungen zwischen Zellen und Substrat, wie etwa die Topographie und Hydrophobizität einen entscheidenden Einfluss haben. So zeigte sich, dass die Umwandlung der Proben zu DLC eine Veränderung der Oberflächenenergien bewirkte. Der hydrophile Charakter der Proben wurden erhöht, was zu einem stärkeren Adhäsionsvermögen der Zellen auf den Substraten führte. In zukünftigen Studien wäre es von großem Interesse, weitere Zelllinien, sowie substratspezifische Eigenschaften unter Scherfluss zu untersuchen. So könnte der Einfluss von antibakteriellen, modifizierten Oberflächen zur Vorbeugung gegen bakterielle Entzündungen (z.B. Silber dotiertes DLC [131]) untersucht werden.

Auf der anderen Seite wäre der Reaktor auch für Zellbiologen interessant, um Einblicke in die adaptiven Prozesse der adhärenen Zellen unter Fluss zu bekommen. So könnte die Bildung und Beweglichkeit von Adhäsionsbrücken, die Bildung von reaktiven Oxiden oder die Struktur und Orientierung des Zytoskeletts *in situ* unter Flussbedingungen untersucht werden. Letztlich wäre ein Vergleich der Ergebnisse mit *in vivo* Experimenten für die biologische Relevanz der Studie von großem Nutzen.

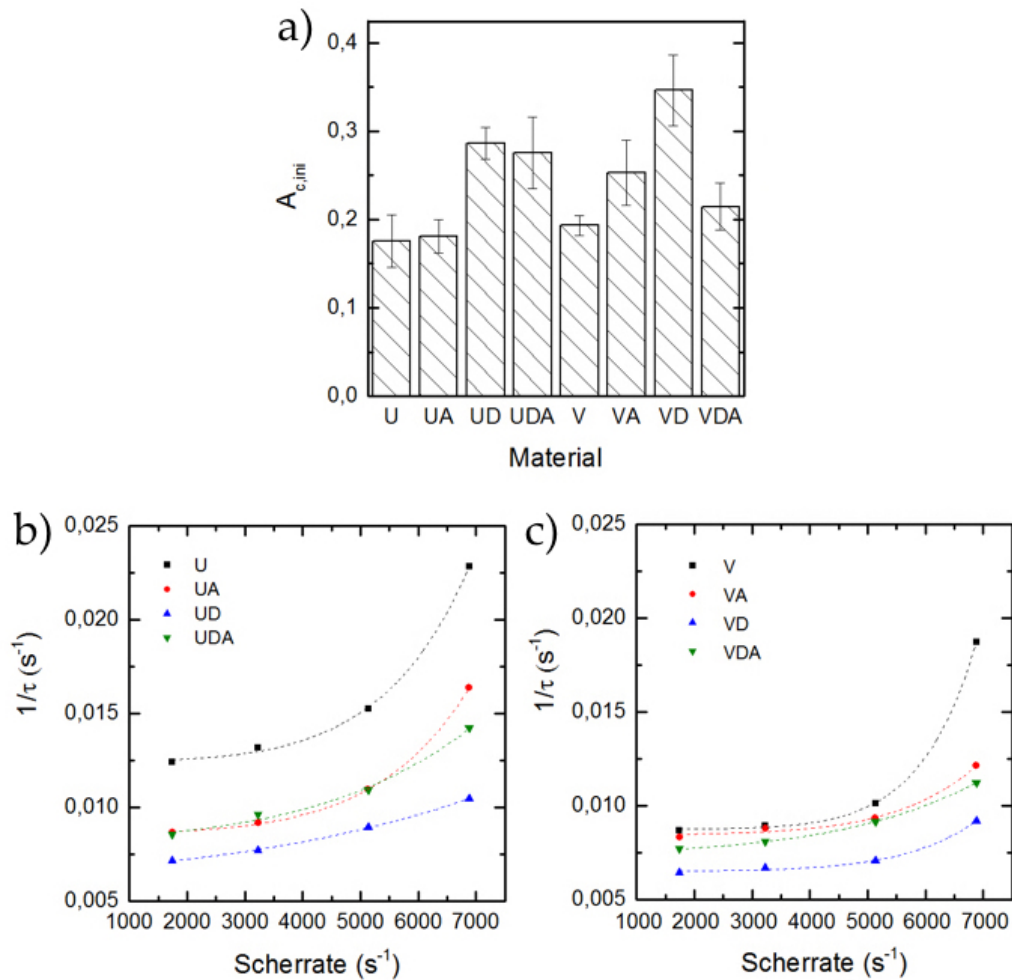


Abbildung 3.9: a) Vergleich des Adhäsionsverhaltens $A_{c,ini}$ auf UHMPWE (U), UHMWPE gealtert (UA), UHMWPE mit DLC Umwandlung (UD), UHMWPE mit DLC Umwandlung gealtert (UDA), Vitelene (V), Vitelene gealtert (VA), Vitelene mit DLC Umwandlung (VD), Vitelene mit DLC Umwandlung gealtert (VDA). b) Ablöserate $1/\tau$ als Funktion der Scherrate auf den UHMWPE Proben. c) Ablöserate $1/\tau$ als Funktion der Scherrate auf Vitelene.

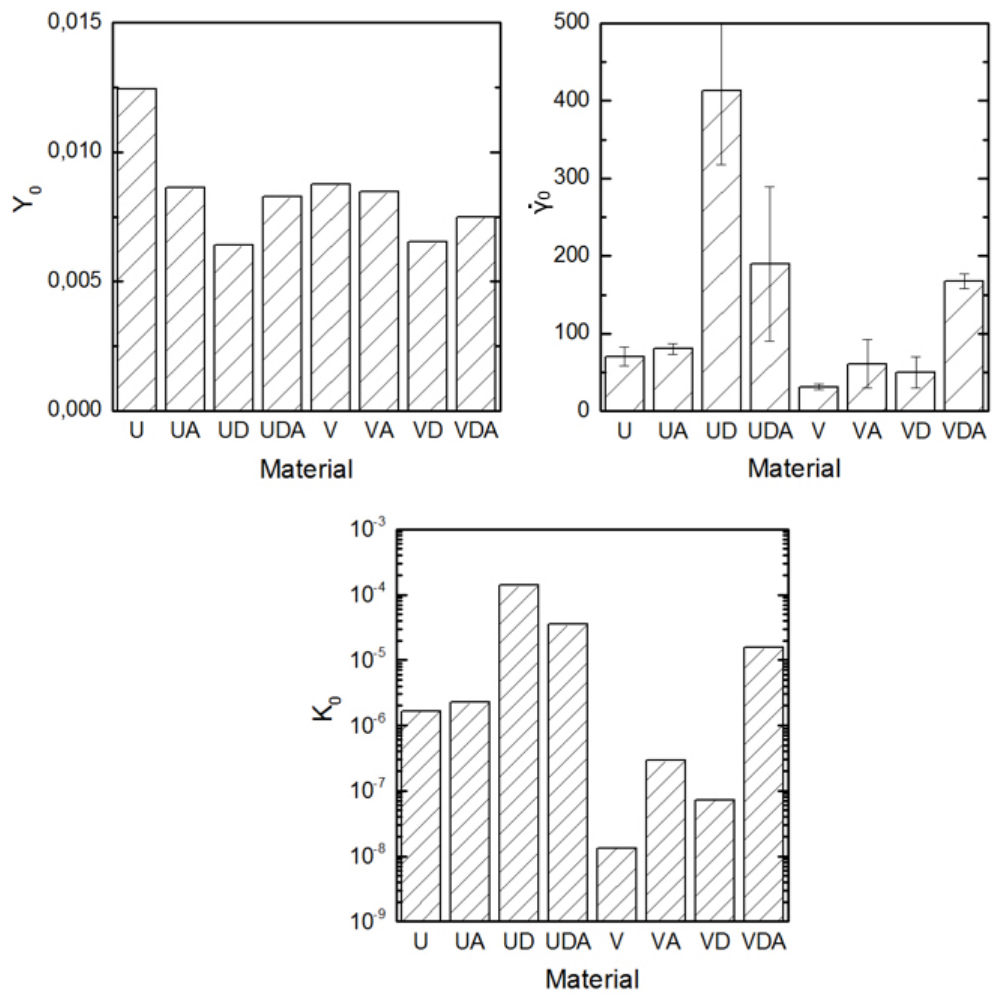


Abbildung 3.10: Fitparameter der materialspezifischen Deadhäsion. Betrachtung der a) natürlichen Ablösung Y_0 , b) kritischen Scherrate $\dot{\gamma}_0$ sowie c) der intrinsischen Ablöserate K_0 .

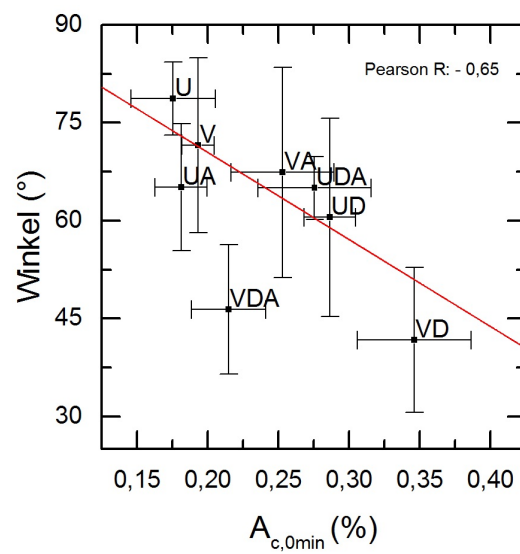


Abbildung 3.11: Korrelation der anfänglichen Adhäsion $A_{c,0min}$ und dem Kontaktwinkel α der verschiedenen Materialien. Mit einem Pearsonkorrelationskoeffizienten von $R = -0,65$ liegt ein linearer Zusammenhang von Oberflächenbenetzung aufgrund der hydrophilen Oberfläche und der Zellhaftung vor.

4 Stimulation der Zellmigration zur Wundheilung mit akustischen Oberflächenwellen

Dieses Kapitel basiert in weiten Teilen auf dem Fachartikel 'Acoustotaxis – in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves' [85].

4.1 Einleitung

Im Bereich der Biomedizin gibt es bereits die verschiedensten Anwendungen für Gewebezüchtung und -heilung. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind Techniken deren Augenmerk auf der gezielten und schnellen Wundbehandlung liegt. So zum Beispiel dem Heilungsprozess nach einer Verletzung oder Operation. Die in den 1960ern erstmal von Knoch und Klug [19, 20] vorgestellte Anwendung von therapeutischem Ultraschall (US) ist im Gesundheitswesen mittlerweile weit verbreitet. Diese Behandlungsmethode hat einen beachtlichen Einfluss auf die wichtigen Prozesse wie die Regeneration von hartem und weichem Bindegewebe [21, 22] und zeigt sogar eine beschleunigte Heilungsdauer von Knochenbrüchen von bis zu 40 % [132]. Andere Studien berichteten von dem positiven Einfluss durch die Anwendung von Hochleistungsultraschall mit einer einwirkenden Intensität von $I_{US} = 30 \text{ mW cm}^{-2}$ [32] bis hin zu $I_{US} = 500 \text{ mW cm}^{-2}$ [33]. Neben dem heilungsfördernden Effekt, zeigte sich auch, dass Scanning Ultrasound (SUS) in der Alzheimer Forschung eine erfolgsversprechende Anwendung ist. An APP2 wildtype Mäusen konnte durch das nicht invasive Verfahren die Bluthirn-Schranke geöffnet und so das Alzheimerfördernde Amyloid- β Peptid entfernt werden [133, 134].

Auf der anderen Seite jedoch führte eine Erhöhung der Intensität auf $I_{US} = 1 \text{ W cm}^{-2}$ zur Unterdrückung der Bruchheilung [135]. Eine mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen der schnelleren Wundheilung liegt in der erhöhten Prostaglandin E2 Produktion [136]. Dieses Hormon stimuliert die Osteoklasten, die für die Knochenresorption verantwortlich sind [137]. Weitere Studien belegten, dass US die Expression von Osteonektin, Osteopontin und Fibronektin steigerte. Diese drei Proteine stehen im direkten Zusammenhang mit der Integrität und der Funktionalität des Knochengewebes [138, 139]. Trotz dieses eindeutig positiven Effekts, unterliegt eine US-Behandlung Limitierungen. Hier sind vor allem thermische Effekte zu nennen. Neuste Untersuchungen zeigen, dass eine Behandlung mit einer Leistung von $I = 1 \text{ W cm}^{-2}$ bei einer Frequenz von $f = 1 \text{ MHz}$ im Gewebe zu einem Temperaturanstieg von 0.86 K min^{-1} führt [140]. Dem entsprechend kann eine zu lange Einwirkzeit der induzierten Wärme bis zur Gewebenekrose führen [141]. Aus diesem Grund ist die therapeutische US Anwendung meist auf kurze Impulse bei niedrigen Intensitäten

von $I_{US} = 30 \text{ mW cm}^2$ begrenzt [142]. Weiterhin benötigt die Behandlung mit therapeutischem US eine medizinische Betreuung, da Spezialkenntnisse zur richtigen Anwendung grundlegend sind und eine Behandlung auf einzelne Sitzungen beschränkt ist. Somit kann keine dauerhafte US Behandlung des verletzten Gewebes erfolgen, was die nachhaltige Wachstumsförderung und schnellere Genesung verhindert. Aus diesem Grund wäre eine Technik erstrebenswert, die eine Langzeitbehandlung mit US ohne Gewebeschädigung und ständige Betreuung ermöglicht.

Mit der Verwendung von akustischen Oberflächenwellen wird hier ein neues Konzept zur Gewebezüchtung und Regenerierung vorgestellt, welches potenzielle Nachteile konventioneller US-Behandlungen umgehen könnte. Zwar finden SAW im Bereich der Mikrofluidik und Biomedizin seit vielen Jahren rege Anwendungen [47, 143–146], dennoch sind bisher keine Studien bekannt, die sich mit der Zellstimulation durch direkten Einfluss der SAW befassen. In der hier vorgestellten Studie wurden die Auswirkungen von SAW auf die Zellmigration und Proliferation phänomenologisch untersucht und charakterisiert. Dazu diente ein eigens entwickelter Versuchsaufbau, bei dem eine künstliche Wunde auf dem piezoelektrischen LiNbO_3 mit einer 200 nm dicken SiO_2 -Schicht, mithilfe von 'Wound Healing Assay' gezüchtet wurde. Sobald sich eine konfluente Zellschicht aus Knochenkrebszellen (SaOs-2) ausbildete, wurde ein Spalt erzeugt, der die Fraktur darstellt. Anschließend wurden die Zellen mit den induzierten Oberflächenwellen behandelt und der Verschluss des Wundspalts mithilfe eines Mikroskops dokumentiert. Zunächst sollten in einer Reihe von Experimenten der Wundschluss des behandelten gegenüber dem unbehandelten künstlichen Gewebes untersucht und verglichen werden. Die Oberflächenwellen liegen dabei mit einer Wellenlänge von $\lambda = 25 \text{ }\mu\text{m}$ in der Größenordnung von Zellen (20–30 μm). Anschließend wurde sicher gestellt, dass diese Stimulation auf die SAW zurückzuführen ist und nicht etwaige Nebeneffekte, wie erhöhtes Nährstoffaufkommen durch fluidische Strömungen oder Anregungen der Proliferation durch minimale Temperaturerhöhungen, ausschlaggebend sind. Ein Vergleich der mechanischen und elektrischen Anteile der eingekoppelten Welle sollten Aufschluss darüber geben, wie stark die einzelnen Faktoren die Wundheilung beeinflussen. Basierend auf den Beobachtungen der erhöhten Migration, wurden zum Schluss erste Methoden entwickelt, um das Konzept der Oberflächenwellenstimulation auf flexible Materialien zu übertragen, um so Ansätze für aktive Implantate zur Knochenbruchbehandlung oder aktive Pflaster zur schnelleren Wundheilung und Regeneration zu finden.

4.2 Versuchskomponenten und Präparation

SAW Chip

Der Grundgedanke dieser Ultraschallstimulation des Zellwachstums ist es, die SAW direkt auf dem Substrat zu erzeugen, auf dem die Zellen adhären und proliferieren. Daher wurde hier das piezoelektrische LiNbO_3 128° Y-cut verwendet. Die Geometrie der IDT Struktur besteht aus 42 Fingerpaaren mit einem Abstand von $25 \mu\text{m}$, was einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{SAW}} = 25 \mu\text{m}$ entspricht, und einer Aperturlänge von $650 \mu\text{m}$. Basierend auf der Schallgeschwindigkeit $c_{\text{LiNbO}_3} = 3980 \text{ m s}^{-1}$ ergibt sich daraus eine Anregungsfrequenz von $f = 159 \text{ MHz}$. Der Chip hat eine Gesamtfläche von $1.7 \text{ cm} \times 1.7 \text{ cm} = 2.89 \text{ cm}^2$. Durch thermisches Verdampfen wird auf den Chip eine 200 nm dicke SiO-Schicht aufgebracht. Sie dient auf der einen Seite zum Schutz der IDT-Struktur vor den Zellen und biologischen Ablagerungen. Auf der anderen Seite ist so auch die Biokompatibilität des Chips gesichert.

Dosimetrie

Um die tatsächliche akustische Leistung des Chips als Funktion der angelegten Signalleistung bestimmen zu können, wurde vor Beginn jedes Experiments die Frequenz und die reflektierte Leistung mit einem Network Analyzer (Rhode & Schwarz GmbH & Co.KG) bestimmt. Der Vierpolreflexionskoeffizient S_{11} ist ein Maß für das logarithmische Verhältnis der Amplitude b_1 des reflektierten Signals und der Amplitude a_1 des eingehenden HF-Signals am IDT. Somit kommt die Erzeugung der SAW bei einer entsprechenden Frequenz aus einer erhöhten Transmission und folglich einer schwindenden Reflexion zustande. Betrachtet man S_{11} als Funktion der angelegten Frequenz, so lässt sich daraus die Resonanzfrequenz und die Transkonduktanz oder Impedanz des IDT bestimmen

$$S_{11}(\text{dB}) = 20 \log_{10} \left(\frac{b_1}{a_1} \right) \quad (4.1)$$

Die angelegte HF-Leistung kann sowohl in mW als auch in dB angegeben werden. Die beiden Einheiten sind über die folgende Gleichung verbunden

$$P_{IN}(\text{dBm}) = 10 \log_{10} \left(\frac{P_{IN}(\text{mW})}{1 \text{ mW}} \right) \quad (4.2)$$

Da der IDT bidirektional abstrahlt, kommt es zu einer gleichzeitigen SAW Erzeugung in beide Richtungen, was zu einer Aufteilung der eingekoppelten Leistung führt. Die maximale Reflexion S_{11} bei einer Resonanzfrequenz von f_{SAW} liegt für unbeladene Chips üblicherweise unter $S_{11} = -20 \text{ dB}$. Aufgrund der Bidirektionalität lässt sich der geringe Reflexionswert S_{11} und die Einfügungsdämpfung IL des IDT bei einer Eingangsleistung von $P_{IN} = 3 \text{ dBm}$ auf $IL \approx 1/4 P_{IN}$ abschätzen. Die Schallpfadbreite ist durch die Länge W der Apertur bestimmt. In allen Experimenten sind die Komponenten auf eine Impedanz von $Z = 50 \Omega$ angepasst. Lässt sich die Schichtdicke des Mediums (z.B. Wasser) auf dem SAW-Chip im Vergleich zur Wellenlänge der SAW nicht vernachlässigen, erfährt die SAW eine Dämpfung aufgrund von Energieabsorption, was zu einer sogenannten 'leaky SAW' mit entsprechender

‘out-of-plane-’ und ‘in-plane-’ Dämpfung führt. Die bei der Rayleigh-Welle auftretende ‘out-of-plane-’ Dämpfung führt zur berechneten $1/e$ -Abklinglänge in X- und $\perp X$ -Richtung mit $l_{op}^{Calc} \perp X = 11.5 \times \lambda_{SAW \perp X} = 287.5 \mu\text{m}$ und $l_{op}^{Calc} X = 11.5 \times \lambda_{SAW X} = 331 \mu\text{m}$ [43]. Folglich kann die angelegte Leistungsdichte entsprechend für $P_{SAW} = 0 \text{ dBm}$ abgeschätzt werden zu

$$I_{SAW} = \frac{P_{SAW} \left(1 - \frac{1}{e}\right)}{W \times l_{op}^{Calc} X} \approx 300 \frac{mW}{cm^2} \quad (4.3)$$

Die Auslegungen für den SAW-Chip sind entsprechend der folgenden Überlegungen gewählt: (i) die Wellenlänge soll mit der Zellgröße vergleichbar sein, (ii) Die verwendeten Leistungen von $P_{IN} = 3 \text{ dBm} - 6 \text{ dBm}$ entspricht leer (ohne Zellen) einer angelegten Leistungsdichte vergleichbar einer Leistungsdichte der erwähnten US Behandlungen und (iii) die wirkende Kraft soll weit unter dem Schwellenwert für ballistische Verschiebung der Zellen liegen. Die Amplitude der Wellen wurde mit einem Ultra High Frequency Vibrometer (UHF-120, Polytec GmbH) und einem Nd:YAG-Laser mit einer Wellenlänge von $\lambda = 532 \text{ nm}$ ermittelt. Dazu wurde die Oberfläche des Chips direkt vor dem IDT in Luft und in Wasser bei einer angelegten Leistung von $P_{IN} = 3 \text{ dBm}$ und $P_{IN} = 6 \text{ dBm}$ und der Resonanzfrequenz von $f = 159 \text{ MHz}$ abgerastert.

Zellkultur

Für das Experiment wurde die SaOs-2 Zelllinie verwendet. Die Kultivierung und Präparation war identisch mit der in Abschnitt 3.2 beschriebenen mit dem Unterschied, dass die Dichte der Zellsuspension hier $50\,000 \text{ Zellen} / 70 \mu\text{l}$ betrug.

Wound Healing Assay

Zur Untersuchung der Zellmigration wurde hier das Standardverfahren des ‘Wound Healing Assay’ verwendet. Nach Ausbildung eines konfluenten Zellrasens, wird das ‘Culture Insert’ (Ibidi GmbH, Breite $500 \mu\text{m} \pm 50 \mu\text{m}$) entfernt, damit eine künstliche Wunde entsteht. Da nun die Zellkontakthemmung an den Randbereichen aufgehoben ist, beginnen die Zellen nach kurzer Zeit, in die freien Flächen zu migrieren. Dies führt zu einer Bewegung der gesamten Zellfront bei konstanter Geschwindigkeit [147]. Die zellfreie Fläche $F(t)$ wird dabei als Funktion der Zeit betrachtet und auf die zellfreie Fläche $F(0)$ zu Beginn der Messung normiert. Der Verlauf wird anschließend über einen linearen Fit angepasst. Da die Zellen erst nach einer kurzen Verweildauer mit der Migration beginnen, wird der Anstieg des Messwerts von Migrationsbeginn bis zum letzten Messwert vor vollständigem Wundschluss bestimmt. Diese Maß ist im folgenden als Flächenmigrationsrate $A_{mig} (\%/h)$ definiert.

Experimenteller Aufbau

Der Aufbau zur Untersuchung der SAW Stimulation ist in Abb. 4.1 zu sehen. Als Substrat dient hier der gleiche SAW-Chip, der bereits in Kapitel 3 beschrieben ist. Auf dem SAW-Chip befindet sich eine kleine, rechteckige Kammer aus PDMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer,

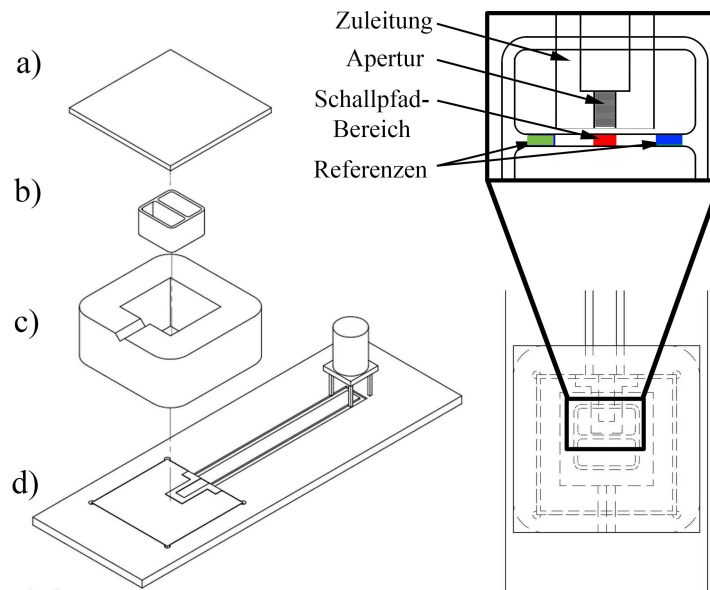


Abbildung 4.1: Technische Skizze des experimentellen Aufbaus. Links: Explosionsansicht der Bestandteile mit a) Deckglas, b) Cultur Insert, c) PDMS-Kammer und d) Platine mit SAW-Chip. Rechts: Aufsicht des Aufbaus mit der Position des 'Culture Insert' relative zum IDT. In der vergrößerten Darstellung sind die im Experiment behandelten Bereiche gekennzeichnet. Die rote Fläche markiert den Bereich direkt vor dem IDT, bei dem die Zellen im Schallpfad der SAW liegen. Die grünen und blauen Flächen dienen als interne Referenz und werden nicht von der SAW beeinflusst. Aus [148]

Dow Corning), die ein Füllvolumen von $V = 1.2 \text{ ml}$ fasst. Diese dient als Becken für Zellen und Nährmedium. Um eventuelles Auslaufen zu vermeiden, wird die Fläche zwischen Chip und PDMS-Kammer mit einer hochviskosen Silikonpaste (Baysilone-Paste, GE Bayer Silicones) bestrichen und abgedichtet. Nach dem Autoklavieren bei $134 \text{ }^\circ\text{C}$, wird das sterile 'Culture Insert' parallel zum IDT, in einem Abstand von $d = 50 \text{ }\mu\text{m}$ eingesetzt. Beide Kammern werden mit jeweils $70 \text{ }\mu\text{l}$ Zellsuspension befüllt, nach einer Adhäsionszeit ($t = 4 \text{ h}$) mit zellfreiem Medium aufgefüllt und mit einem Deckglas bedeckt, um eine Kontamination zu vermeiden. Nach Ausbildung eines konfluenter Zellrasens, wird das 'Culture Insert' entfernt. Die Zellschichten werden vorsichtig mit PBS gereinigt. Anschließend wird die gesamte Kammer mit frischem, zellfreiem Medium befüllt. Die Proben befinden sich in einer Mikroskopheizkammer (HT 200, Ibidi GmbH) mit einem Gasinkubations System (the Brick, Live Imaging Services). Die Zellen werden während des gesamten Versuchs unter wassergesättigter Atmosphäre mit 5 \% CO_2 bei $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Der gesamte Aufbau ist auf einer motorisierte Halterung (LUDL Stage) des Mikroskops (Axiovert 200, Zeiss) montiert und mit dem HF-Generator verkabelt. Um den Wundheilungsprozess zu beobachten, werden für 72 h im Abstand von 5 min Phasenkontrastaufnahmen mit einem

10-fach vergrößernden Objektiv von der Wunde erstellt.

Zytotoxische Analyse

Um etwaige Zellschäden durch die SAW-Behandlung auszuschließen, kommt das LDH-Assay (Cytotoxicity Detection KitPlus, Roche Diagnostics GmbH) zum Einsatz. Nach Ende des Experiments wird die LDH-Aktivität mittels einer Probe des zellfreien Überstands bestimmt. Dazu wird die optische Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 492$ nm mit einem Plate Reader (Infinity 200 Pro series, Tecan Group Ltd) relativ zu einer Tiefkontrolle (reines Medium) und einer Hochkontrolle (alle Zellen lysiert) bestimmt [149].

4.3 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Versuchsaufbau wird die Zellmigration und -proliferation durch aktive Stimulation mit akustischen Oberflächenwellen untersucht. Dazu werden zunächst die Migrationsrate, die Flächenbelegungsdichte sowie die Trajektorien der Zellen von SAW-behandelten Proben mit Referenzproben (ohne SAW-Stimulation) verglichen und analysiert. Anschließend werden mögliche Nebeneffekte der SAW und deren Auswirkung auf das Zellwachstum diskutiert und die Ursachen der Stimulation charakterisiert.

4.3.1 Auswirkung von SAW auf die Zellmigration

In Abb. 4.2 ist der Wundheilungsprozess nach dem Entfernen des ‘Culture Inserts’ zu verschiedenen Zeitpunkten zu sehen. Die Zeit bis zum vollständigen Wundverschluss beträgt circa 69.5 h. Auffällig ist hier, dass die freie Fläche (rot) unmittelbar vor dem IDT direkt (orange Box) komplett von Zellen bewachsen ist. Der optische Vergleich von behandelter und unbehandelter externer Probe (nicht gezeigt), sowie die zytotoxische Analyse beweisen, dass keine ausgeprägte Apoptose anzunehmen ist. Die LDH Aktivität der SAW behandelten Proben entspricht der Referenzprobe, sowie regulär kultivierter Zellkulturen und zeigen keine Auffälligkeiten der Zellviabilität. Beide Proben weisen 24 h nach Experimentbeginn eine relative LDH Konzentration von $10 \% \pm 3 \%$ im Vergleich zur Hochkontrolle auf.

Da die Breite des Schallpfades durch die Länge der Apertur des IDTs bestimmt ist, werden ausschließlich adhärierte Zellen in diesem Bereich der SAW ausgesetzt (vgl. Abb. 4.3, rote Fläche) [35]. Dieser Bereich wird im folgenden als *Apertur* bezeichnet. Die Zellen, die sich in den Bereichen neben der elektrischen Zuleitung und somit außerhalb des Schallpfades befinden (vgl. Abb. 4.3, grüner und blauer Bereich), erfahren keine Beeinflussung durch die SAW. Sie dienen deshalb als interne, natürliche Referenz um das Zellwachstumsverhalten unter physiologisch absolut identischen Bedingungen (Nährstoffangebot, Temperatur, Zelldichte, etc.) zu vergleichen. Um den wissenschaftlichen Gehalt der Aufnahmen zu evaluieren, wird die zellfreie Fläche als Funktion der Zeit analysiert. Die mit der Zeit schrumpfende Fläche $F(t)$ ist auf die zellfreie Fläche $F(0)$ zu Beginn des Experiments normiert. Abb. 4.3 zeigt das zeitabhängige Verhältnis von $F(t)/F(0)$ sowie eine mikroskopische Aufnahmen zum Zeitpunkt $t = 0$ min mit den markierten Bereichen von Probe und interner Referenz. Zusammen mit Abb. 4.2 lässt sich der Verlauf folgendermaßen beschreiben: Nach einer anfänglichen Verweildauer beginnen die Zellen mit einer konstanten Geschwindigkeit zu spreiten und zu wandern, was zu einer linearen Abnahme von $F(t)$ führt. Abhängig von der Position der Zellschicht bezogen auf den Wundbereich können verschiedene Steigungen im linearen Verlauf beobachtet werden. Dabei weisen direkt im Schallpfad der SAW liegende Zellen die höchste Steigung auf. Die mittleren Werte der Steigung von SAW behandelte Probe (*Apertur*) bei entsprechenden Leistungen ($P_{IN} = 3$ dBm und $P_{IN} = 6$ dBm) und interner Referenz sind in Abb. 4.4 zu sehen. Sie werden im folgenden als Flächenmigrationsrate A_{mig} bezeichnet. A_{mig} der SAW behandelten Zellen weist deutlich höhere Werte als die Referenzprobe auf. Dies lässt auf eine signifikant höhere Heilungsrate im Schallpfad schließen. Abb. 4.5 zeigt das Verhältnis aus A_{mig} der Apertur zur internen Referenz. Unabhängig von der angelegten Leistung ist zu beobachten, dass ein durchschnittlicher Anstieg

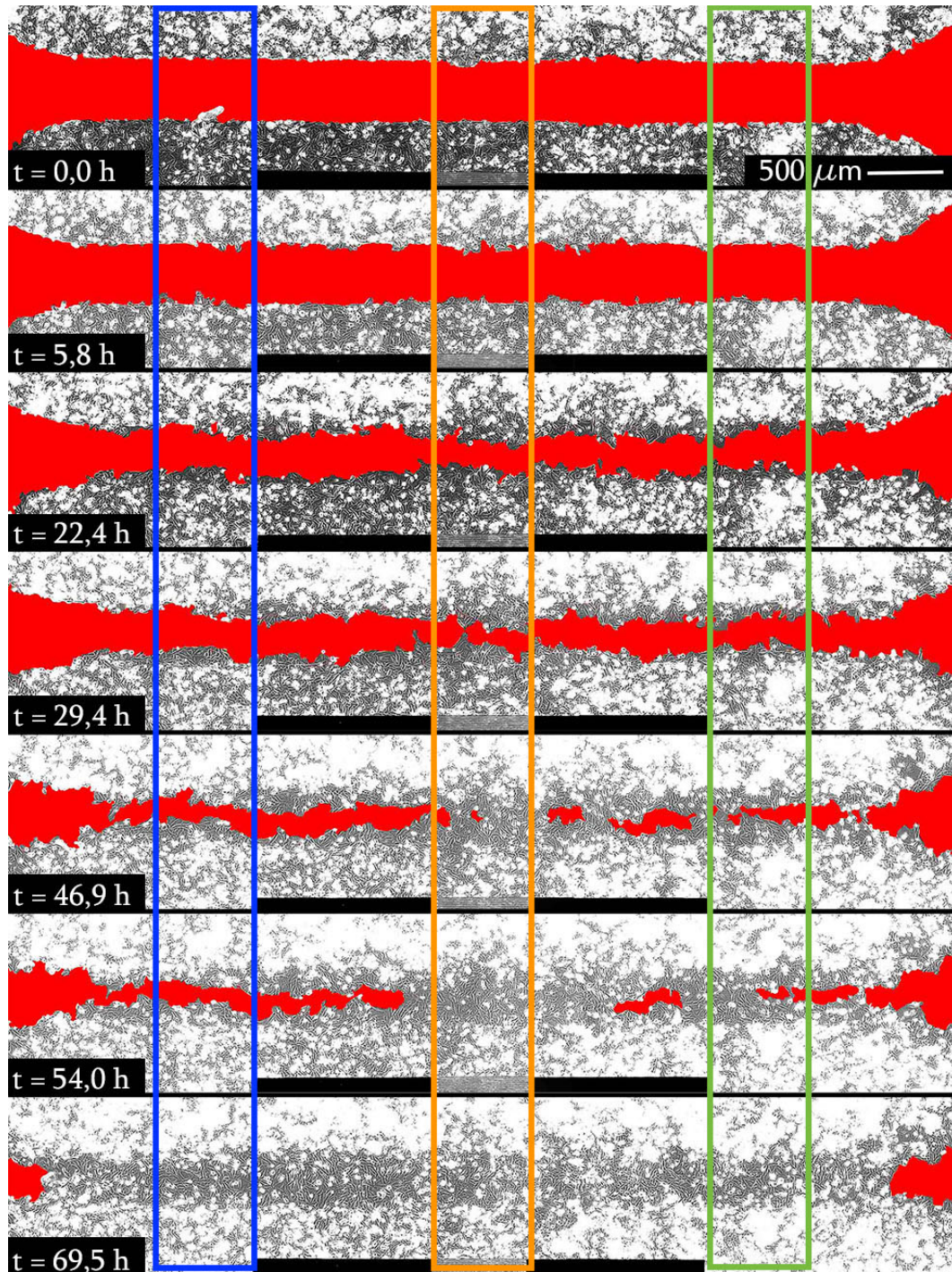


Abbildung 4.2: Graphische Evaluation der SAW behandelten Proben im zeitlichen Verlauf. Die rote Fläche stellt die zellfreie Fläche (künstliche Wunde) dar. Der Bereich der Apertur (Schallpfadbereich) ist durch ein oranges Rechteck gekennzeichnet. Die internen Referenzbereiche sind durch das blaue und grüne Rechteck markiert. Zu den Zeitpunkten $t = 29,4$ h und $t = 46,9$ h ist eine deutlich erhöhte Zellmigration im Bereich der Apertur zu sehen. Zum Zeitpunkt $t = 54,0$ h hat sich die Wunde im Schallpfad geschlossen, bei $t = 69,5$ h ist die gesamte Fläche besiedelt.

von $15.2\% \pm 1.7\%$ beim Vergleich von $A_{mig,Apertur}$ zu $A_{mig,Referenz}$ vorliegt. Die 90 % Konfidenzintervalle für $A_{mig,Apertur} / A_{mig,Referenz}$ bei den Leistungen $P_{IN} = 3$ dBm und $P_{IN} = 6$ dBm betragen [1.02;1.25] sowie [1.06;1.27]. In keinem der durchgeführten Experimente lag die Geschwindigkeit der unbehandelten Probe höher als die der behandelten.

Um die Migrationsgeschwindigkeit der sich aufeinander zu bewegend Zellfronten zu ermitteln und zu vergleichen, wird die zellfreie Fläche vor der Apertur in zwei gleichgroße Bereiche geteilt und A_{mig} dabei separat für ‘oben’ und ‘unten’ analysiert. Dabei zeigt sich, dass beide Zellfronten mit gleicher Geschwindigkeit migrieren. In Abb. 4.6 ist die Migrationsgeschwindigkeit der einzelnen Zellfronten im Vergleich zueinander dargestellt. Die Tatsache, dass die Punkte symmetrisch um die Mittelachse streuen, verdeutlicht das Migrationsverhältnis von 1:1. Bei genauer Betrachtung der Trajektorien einzelner Zellen (vgl. Abb. 4.7a) ist zu erkennen, dass keine bevorzugte Ausbreitungsrichtung in der zellfreie Fläche vorliegt. Im Speziellen ist hier nicht ersichtlich, ob Zellen aus dem Schallpfad heraus wandern oder Zellen von außen eindringen. Auch der Vergleich der Migrationsrichtungen von behandelter (vgl. Abb. 4.7a) und unbehandelter Probe (vgl. Abb. 4.7b) lässt keine signifikante Bewegungsrichtung erkennen. Aus den ausgeführten Beobachtungen lässt sich somit folgern, dass eine Behandlung mit SAW zu einer verbesserten Wundheilung gegenüber unbehandelten Zellen *in vitro* von bis zu $15.2\% \pm 1.7\%$ führt.

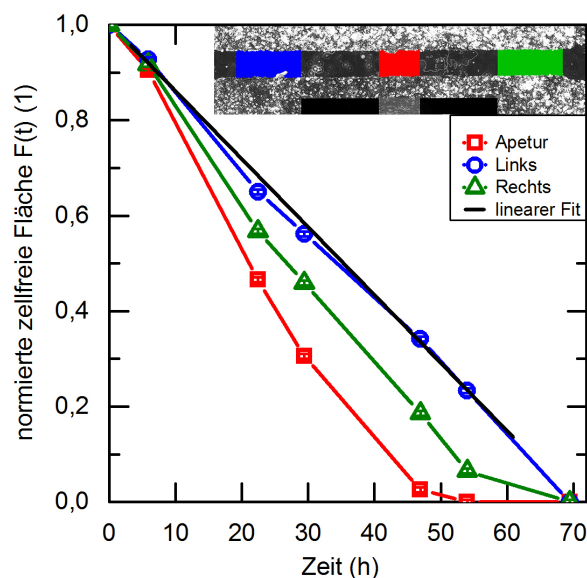


Abbildung 4.3: Bestimmung der zellfreien Fläche als Funktion der Zeit . Die zellfreie Fläche $F(t)$ ist auf die ursprüngliche Fläche $F(0)$ normiert. Die eingesetzte Graphik zeigt eine mikroskopische Aufnahme mit linker (blau) und rechter (grüner) Referenz sowie der behandelten Fläche (rot). Die durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit an der Apertur beträgt $3.8 \pm 1.2 \mu\text{m h}^{-1}$ im Vergleich zur Referenzprobe mit $3.1 \pm 1.4 \mu\text{m h}^{-1}$.

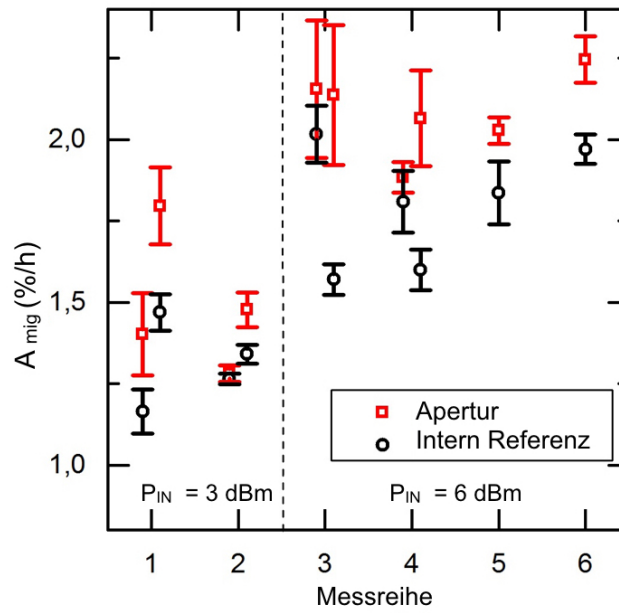


Abbildung 4.4: Vergleich der Flächenbelegungsrate A_{mig} von der Apertur und internen Referenz bei verschiedenen Leistungen $P_{IN} = 3$ dBm und 6 dBm. In allen Messungen liegt A_{mig} der behandelten Probe über dem Referenzwert.

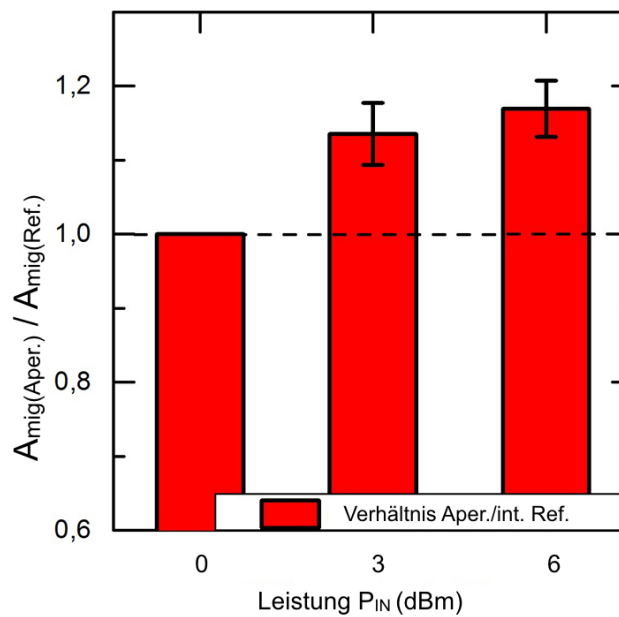


Abbildung 4.5: Verhältnis der Flächenbelegungsrate von behandelter zu unbehandelter Probe bei einer Leistung von $P_{IN} = 3$ dBm und 6 dBm. Die SAW-Behandlung führt zu einer schnelleren Wachstumsrate von $13.5 \% \pm 4.1\%$, bzw. $16.9 \% \pm 3.8\%$ gegenüber der Referenz

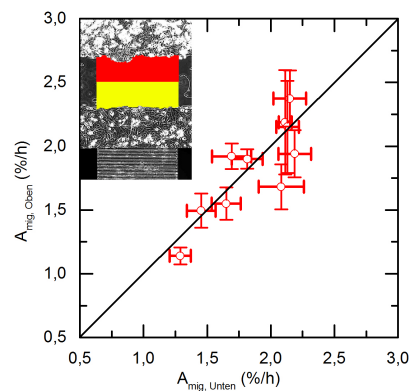


Abbildung 4.6: Vergleich der migrierenden Zellfronten im SAW behandelten Bereich. Abhängig von den Ausgangsbedingungen (Zellzyklus, Zelldichte, Zellaktivität) können sich die Geschwindigkeiten der einzelnen Messreihen unterscheiden. Die Verhältnisse aus oberer (rot) zu unterer (gelb) Zellfront liegen alle im Bereich der Winkelhalbierenden, somit ist das Verhältnis die Migrationsgeschwindigkeit der beiden Zellfronten 1:1.

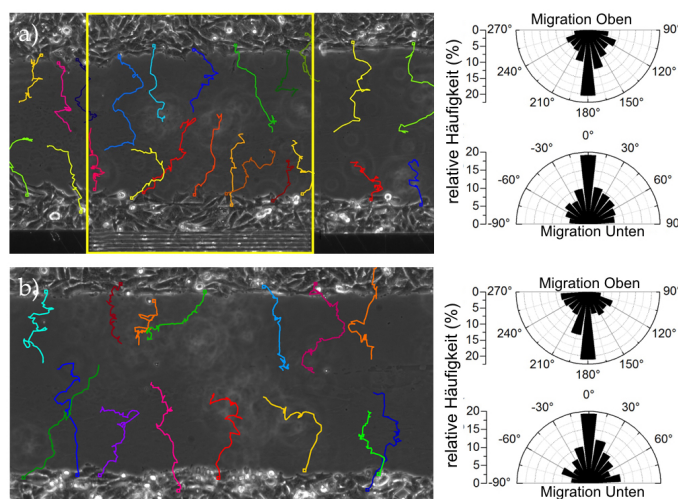


Abbildung 4.7: Betrachtung der Trajektorien und relativer Häufigkeit von a) behandelter Probe. Im linken Bild ist eine mikroskopische Aufnahme der Migrationswege einzelner Zellen dargestellt. In der rechten Graphik sind die relativen Häufigkeiten der Schritte der Migrationsbewegung als Polardiagramm zu sehen. Die Zellen migrieren direkt in die zellfreie Fläche. Es lässt sich keine bevorzugte Wachstumsrichtung, weder aus dem Schallpfad heraus, noch in ihn hinein feststellen. b) Trajektorien und relative Häufigkeiten der unbehandelten Probe. Auch hier dominiert die direkte Migration in die zellfreie Fläche.

4.3.2 Charakterisierung der möglichen Einflussfaktoren

Aus den bisherigen Ergebnissen kann die Oberflächenbelegungsrate der Zellfronten beobachtet werden, dennoch lassen sich damit keine Rückschlüsse ziehen, inwieweit das beobachtete Phänomen durch Zellproliferation oder -migration zustande kommt. Dennoch sollen in den folgenden Ausführungen die möglichen Mechanismen der Stimulation untersucht werden. Aus diesem Grund müssen zunächst alle durch die SAW auftretenden möglichen Begleit-effekte ermittelt werden, welche die Wachstumsrate beeinflussen könnten.

Ballistische Verschiebung

Durch Einkoppeln der SAW in eine Flüssigkeit entsteht eine akustische Strömung [150], die zu einer mechanischen Verformung bis zur Verschiebung der in der Nähe des IDT adhären Zellen führen kann. Um das Strömungs- und Geschwindkeitsprofil im Medium zu charakterisieren, wird hier μ PIV verwendet. Aus Abb. 4.8 geht hervor, dass das Flussprofil in einer Höhe von $30\ \mu\text{m}$ über dem Substrat, also direkt an den Zellen im Experiment, zu dem IDT hin zeigt. Die Flüssigkeit wird unter dem Rayleigh Winkel nach oben geströmt und direkt auf der Substratoberfläche in Richtung IDT angesaugt. Bei einer maximalen Geschwindigkeit von $v = 25\ \mu\text{m s}^{-1}$ entspricht das einem dynamischen Druck von

$$q = \frac{\rho}{2} \times v^2 = 3.125 \times 10^{-7} \text{ Pa}$$

unter der Annahme der Dichte von Wasser $\rho = 1.0\ \text{kg m}^{-3}$. Änderungen der Zellstruktur sowie Ausdehnung oder Bewegungen unter Flussbedingungen treten jedoch erst in Bereichen ab $0.5 - 1\ \text{Pa}$ auf [151]. Somit kann eine schnellere Wundheilung aufgrund von ballistischer Verschiebung hier ausgeschlossen werden.

Lokal erhöhtes Nährstoffaufkommen

Bei der normalen Zellkultivierung in "Flasks" befinden sich die Zellen in ruhendem Nährmedium. Dabei ist die lokale Nährstoffkonzentration durch Diffusion bedingt. Im Vergleich dazu, wird das Nährmedium im Experiment durch die akustische Strömung ständig umgewälzt, was zu einem höheren lokalen Nährstoffangebot für die Zellen über den gesamten Verlauf der Messung führen kann. Obwohl bereits bewiesen wurde, dass erhöhtes Nährstoffaufkommen das Zellwachstum *in vitro* nicht fördert [152], soll im Folgenden die Wundheilung mit und ohne Umwälzung untersucht werden. Dazu dient der IDT als Pumpe ($P_{IN} = 6\ \text{dBm}$) und ist am Ende des Zellspalts an der Seite platziert. So wird sichergestellt, dass die Zellen keinen direkten Einfluss der SAW spüren. Im Vergleich von A_{mig} der ruhenden und umströmten Proben ist kein Unterschied zu erkennen. Folglich besteht keine Korrelation zwischen erhöhtem Nährstoffangebot und beschleunigter Wundheilung.

Temperatureinfluss und lokale Erhitzung

Die Erzeugung von SAW ist mit zahlreichen Verlusten (u.a. Dämpfung) behaftet [153]. Um einen Eindruck bezüglich der durch die SAW induzierten Wärmeentwicklung zu erhalten,

wird die Temperaturänderung des verwendeten Chips jeweils im unbeladenen (an Luft) und im beladenen (mit Wasser) Zustand bei Raumtemperatur mittels Infrarot-Mikroskopie gemessen. In Abb. 4.9 ist die Temperaturänderung in Abhängigkeit von der angelegten Leistung des beladenen bzw. unbeladenen Chips zu sehen. Die Temperaturerhöhung weist bis zu einer angelegten Leistung von $P_{IN} = 100$ mW einen linearen Anstieg sowohl im beladenen ($\Delta T / \Delta P = 37$ mK mW⁻¹) als auch im unbeladenen ($\Delta T / \Delta P = 80$ mK mW⁻¹) Zustand auf. Für die Zellen in direkter Umgebung des IDT resultiert daraus ein maximaler Temperaturanstieg von $\Delta T \leq 0.32$ K ($P_{IN} = 6$ dBm). Da die Temperatur bereits *in vivo* fieberfrei um 1K schwankt, kann eine temperaturinduzierte Steigerung der Zellproliferation und -migration ausgeschlossen werden.

Mechanische Stimulation

Die sich ausbreitende SAW verfügt über einen mechanischen und einen elektrischen Anteil. Die angelegte HF Leistung P_{SAW} spaltet sich dabei in diese beiden Anteile auf. Die Amplitude u_z der mechanischen Welle kann hierbei durch eine Vibrometermessung quantifiziert werden. Bei diesem Messverfahren wird ein Laser auf die zu messenden Substratoberfläche fokussiert. Durch die Bewegung des Substrats wird die Frequenz des reflektierten Laserstrahls durch den Doppler-Effekt verschoben. Durch Analyse der Interferenz in einem Interferometer, lässt sich anschließend die Amplitude und die Frequenz der Schwingung bestimmen. Bei einer angelegten Spannung von $P_{IN} = 6$ dBm beträgt die maximale Auslenkung der Welle $u_z = 0.42$ nm (siehe Abb. 4.10). Während die SAW sich auf dem freien Substrat nahezu ungedämpft entlang der Oberfläche ausbreitet, tritt auf dem mit Wasser beladenem Chip wie zu erwarten eine starke Dämpfung auf. Die bestimmte 1/e-Abklinglänge mit $l = 243$ μ m ist im Einklang mit den berechneten Werten.

In der Literatur ist die US Behandlung meist als eine mechanische Stimulation beschrieben. Diese führt zu einer erhöhten Kalzium Aufnahme in den Zellen [153], welche dann eine entscheidende Rolle in der Zellkommunikation spielt [154]. Weiterhin wird berichtet, dass die Zellproliferation unter diesen Bedingungen zwischen 35 % - 52 % gesteigert wird und die Synthese von Kollagen und nichtkollagenhaltigen Proteinen auf bis zu 112 % gesteigert wird. Zusätzlich fördert eine US Behandlung die Angiogenese, durch Zytokine (Interleukin IL-1 β , IL-6, IL-8) unterstützt [154]. Basierend auf den hier präsentierten Ergebnissen liegt die Vermutung nahe, dass die SAW Behandlung, ähnlich wie die US, auf die inter- und intrazellulären Regulierungsmechanismen durch mechanische Stimulation einwirkt. Die genaue Art dieser Wechselwirkungen verlangt jedoch ausführliche Studien im Bereich der Mechanotransduktion, wie zum Beispiel die Untersuchung der Zellantwort im Bereich der Genexpression sowie Auswirkungen auf das Zytoskelett. Andere mechanische Stimulationen haben gezeigt, dass sich Aktin-Myosin Stressfasern, abhängig von externen Kräften, ausbilden die dann durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden können [26].

Elektrische Stimulation

Neben den bereits erwähnten mechanischen Stimulationen durch US, zeigen mehrere klinische Studien, dass auch elektrische Felder eine Zellstimulation bewirken. Schnelleres

Abheilen von Knochenbrüchen konnte durch den Einsatz von niederfrequenten (10-90 Hz), elektromagnetischen Feldern erreicht werden [155, 156]. Auch HF-Felder (27 MHz) können eine entzündungshemmende und heilungsfördernde Auswirkung auf das Gewebe haben [157]. Durch das angelegte HF-Signal wird am IDT ein elektrisches Feld in der Größenordnung von mehreren kV cm^{-1} erzeugt, welches somit direkt auf die Zellen wirkt. Um das Oberflächenpotential der SAW Amplitude u_z abzuschätzen, werden hier theoretische Überlegungen angestellt. Bei dem von Datta 1986 beschriebenen Model [158] ist die Amplitude u_z schon an sich an das Oberflächenpotential über den Zusammenhang $u_z = \phi \times c_z$ gebunden, mit $|c_z| = 1.8 \text{ \AA V}^{-1}$ als relative Verschiebung in z-Richtung. Zusammen mit den Werten aus Abb. 4.10 ergibt sich somit ein Oberflächenpotential von $\phi = 2.3 \text{ V}$ bei $P_{IN} = 6 \text{ dBm}$. Um nun experimentell den Anteil der elektrischen Stimulation auf die Zellen zu ermitteln, wird die Wundheilung im Folgenden auf einem SAW-Chip durchgeführt, bei dem das laterale elektrische Feld durch aufbringen einer dünnen, leitfähigen Schicht aus Titan (Schichtdicke 15 nm) kurzgeschlossen ist. Somit erfahren die Zellen nur den mechanischen Anteil der Welle. Eine Versuchsreihe besteht aus jeweils zwei separat angelegten Proben mit eigener interner Referenz. In Abb. 4.11 a) sind die Flächenbelegungsrate $A_{mig,Apertur}$ der behandelten Probe sowie der Referenz gezeigt. Bei einer angelegten Eingangsleistung von $P_{IN} = 2 \text{ mW}$ (3 dBm) zeigt sich eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit für die behandelten Zellen in beiden Proben. Wird die Leistung auf $P_{IN} = 4 \text{ mW}$ (6 dBm) verdoppelt treten jedoch starke Schwankungen auf. So ist $A_{mig,Apertur}$ in zwei Versuchen höher, einmal gleich und sogar einmal geringer als $A_{mig,Referenz}$. Betrachtet man nun die mikroskopischen Aufnahmen (nicht gezeigt) der einzelnen Messungen, lässt sich beobachten, dass die Zellfronten zu Beginn des Experimentes nicht immer gleichmäßig dicht besiedelt sind. Weiterhin spielen die Zellvitalität und Schwankungen im Zellzyklus eine wichtige Rolle. Diese Initialbedingungen wirken sich stark auf die einzelnen Messungen aus. So kann es nach Aufhebung der Kontakthemmung (Entfernen des 'Culture Inserts') zu anfänglichen, unterschiedlichen Migrationszeiten kommen. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren lässt sich dennoch auch für die Proben bei $P_{IN} = 4 \text{ mW}$ im Mittel sagen, dass die Zellen im Bereich der Apertur eine höhere Migrationsgeschwindigkeit aufweisen. Beim Vergleich der Mittelwerte aus den Verhältnissen von $A_{mig,Apertur}$ zu $A_{mig,Referenz}$ (vgl. Abb. 4.11 b) zeigt sich, dass sowohl bei einer Leistung von $P_{IN} = 2 \text{ mW}$ als auch $P_{IN} = 4 \text{ mW}$ A_{mig} durch die SAW-Behandlung um bis zu $7.9 \% \pm 4.5 \%$ bzw. $16.4 \% \pm 4.5 \%$ zunimmt.

Aus den Messreihen geht hervor, dass die SAW Behandlung einen deutlichen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit der Zellen hat. Zwar ist die Heilungsrate mit $7.9 \% \pm 4.5 \%$ bzw. $16.4 \% \pm 4.5 \%$ (für 2 und 4 mW) geringer als bei der SAW ohne Abschirmung des E-Felds (vgl. Abb. 4.5 mit $13.5 \% \pm 4.1 \%$ bzw. $16.9 \% \pm 3.8 \%$, dennoch werden die Zellen auch durch die mechanischen Anteile der SAW stimuliert. Wie stark sich jedoch die einzelnen Faktoren aus mechanischer oder elektrischer Stimulation auf das Zellwachstum auswirken, kann den Messungen nicht entnommen werden. Durch das Aufbringen der Titan-Schicht, kann zwar das elektrische Feld in u_z - Richtung abgeschirmt werden, das laterale, elektrische Potential ist jedoch weiterhin vorhanden und kann somit die Migrationsgeschwindigkeit beeinflussen.

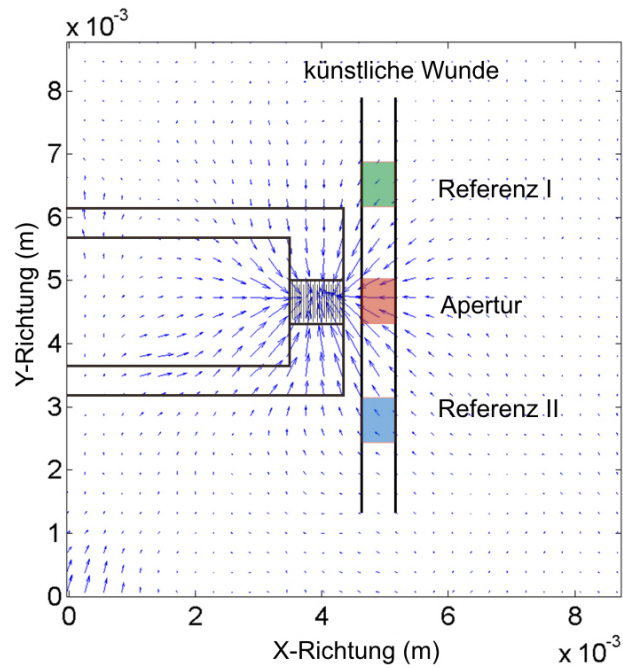


Abbildung 4.8: Geschwindigkeitsprofil in einer Höhe von $30 \mu\text{m}$ über der Substratoberfläche. Die maximal Geschwindigkeit beträgt $v = 25 \mu\text{m}$

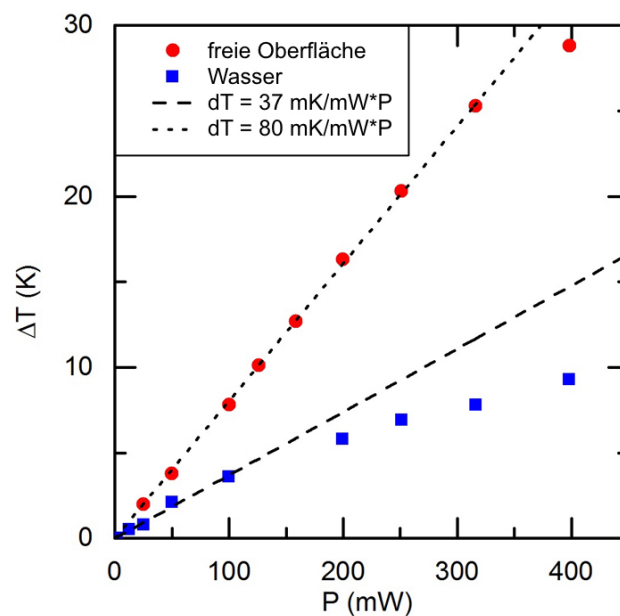


Abbildung 4.9: Temperaturentwicklung als Funktion der angelegten Spannung P_{IN} im unbeladenen (rot) und mit ca. 1 ml Wasser beladenem Zustand (blau).

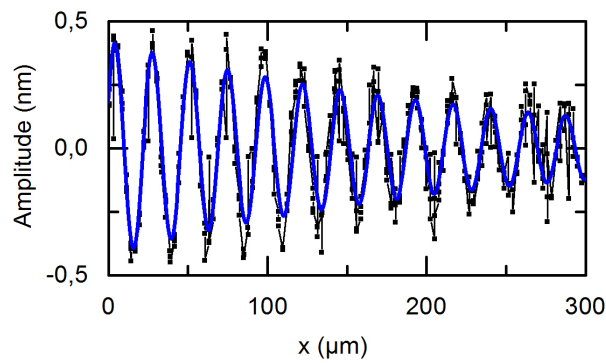


Abbildung 4.10: Amplitude der durch Wasser gedämpften SAW bei einer eingekoppelten Leistung von $P_{IN} = 6$ dBm mit einer $1/e$ - Abklinglänge von $l = 243$ μm .

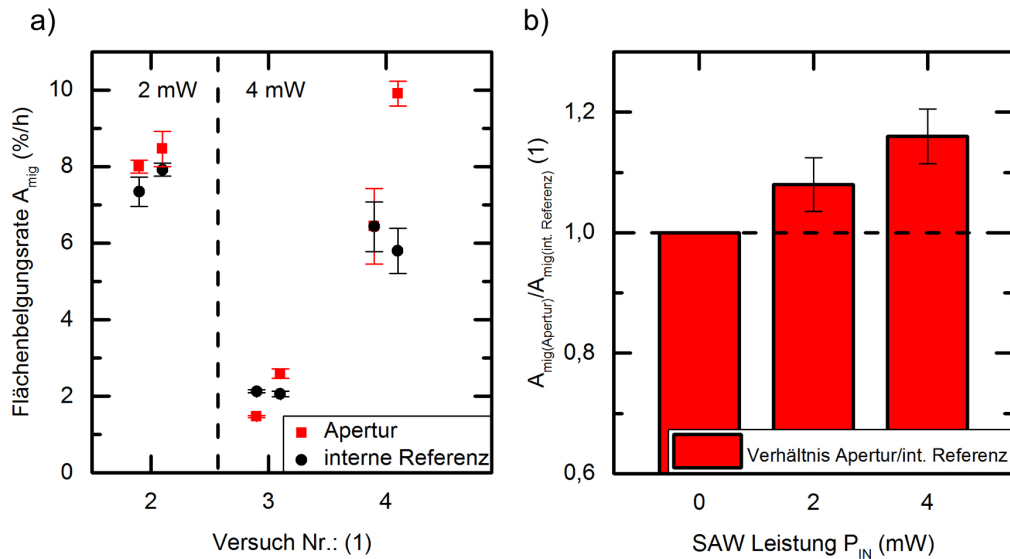


Abbildung 4.11: Vergleich der Flächenbelegungsrate von SAW behandelten Zellen mit elektrischer Feldabschirmung. a) Flächenbelegungsrate A_{mig} von der Apertur und internen Referenz aller Versuchsreihen. b) Mittelwerte der Verhältnisse von A_{mig} aus der behandelten Probe zu Referenz bei einer Leistung von $P_{IN} = 0, 2$ und 4 mW.

4.3.3 Übertragung der Zellstimulation auf flexible Materialien

Basierend auf den Beobachtungen schnellerer Wundheilung um fast 17 %, welche sowohl auf die mechanischen als auch die elektrischen Anteile der SAW zurückzuführen sind, liegt der Gedanke nahe, Behandlungsmethoden zu finden, um diese Art der Zellstimulation auf reale Wundverhältnisse und Knochenbrüche anzuwenden. Ein erster Schritt in Richtung aktiver medizinischer Implantate könnte es daher sein, die SAW auf flexiblen, biokompatiblen Oberflächen zu erzeugen, die direkt in den Körper eingebracht oder als Pflaster auf Wunden platziert werden (siehe Abb. 4.12). Während die Stromversorgung äußerlich durch einfaches Verkabeln gewährleistet ist, kann für den Gebrauch im Körper ein bioinertes, flexibles SAW-Chip (SAW Healing Patch) induktiv und somit kabellos mit Spannung versorgt werden.

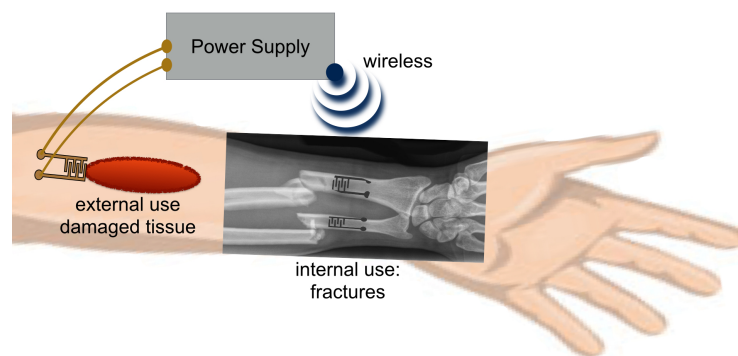


Abbildung 4.12: Graphische Darstellung eines möglichen Implantats. Im Körper kann das Implantat direkt auf die gebrochene Knochenstelle aufgebracht werden und per Induktion durch eine externe Stromquelle versorgt werden. Äußerlich wird es als Pflaster auf Wunden aufgeklebt.

Doch zunächst stellt sich die Frage, wie in einem flexiblen Substrat eine SAW erzeugt werden kann. Eine Lösung hierbei liefert die Herstellung von dünnen, piezoelektrischen ZnO-Schichten. Diese werden schon seit geraumer Zeit für die auf akustischen Wellen basierenden mikrofluidischen Anwendungen und Biosensoren genutzt [159]. Ein großer Vorteil der ZnO Schichten ist hier unter anderem die richtungsunabhängige Ausbreitung der Welle. Auch lassen sich die Schallgeschwindigkeit und folglich die Frequenz der SAW über die Schichtdicke modulieren [160]. Neben zahlreichen Herstellungsverfahren, dient vor allem HF Magnetron Sputtering dazu, dünne, transparente, sowie stark piezoelektrische ZnO-Schichten zu erzeugen. Dabei können die unterschiedlichsten Substrate zur Beschichtung verwendet werden [161]. Neben der Beschichtung von harten Materialien, gibt es mittlerweile Techniken um auf flexiblen Substraten piezoelektrische ZnO-Schichten aufzubringen. So konnte ultradünnes Glas (100 μm) als biegbares Substrat für SAW Sensoren erfolgreich eingesetzt werden [162] und sogar Kunststoffe wie Polyimid (PI) oder Polyethylenterephthalat (PET) lassen sich erfolgreich als Trägermaterial für flexible Elektronik und in Lab-on-a-Chip Einheiten verwenden [163, 164].

Die nachfolgende Idee besteht darin, das Verfahren für zukünftige aktiven Stimulationen von Zellen mit SAW auf flexiblen Materialien zu nutzen. Im folgenden werden verschiedene Materialien vorgestellt, die als Grundgerüst des aktiven Implantats dienen könnten. Dabei gilt es zunächst die Topographie der ZnO-Schicht sowie die Biokompatibilität zu untersuchen, bevor die Einkopplung des elektrischen Signals und die Erzeugung von Oberflächenwellen überprüft wird. Die verschiedenen Substrate wurden an der Cambridge University, England hergestellt.

Struktureller Aufbau des SAW Healing Patches

Die Anforderung für ein aktives Implantat zur schnellen Regeneration sind vielschichtig. Da sich das Implantat im Körper befindet, muss der gesamte Aufbau zum einen beweglich sein, oder sich der Struktur des Untergrundes anpassen können und zum anderen inert gegen das biologische Umfeld sein. Neben den bioinerten Eigenschaften ist auch die Biokompatibilität gefordert, sodass es im umliegenden Gewebe nicht zu Unverträglichkeitserscheinungen oder Absterben aufgrund von zytotoxischen Vergiftungen z.B. durch abgelöste ZnO Partikel kommt [165]. Ein möglicher Aufbau eines solchen Implantats ist in Abb. 4.13 zu sehen.

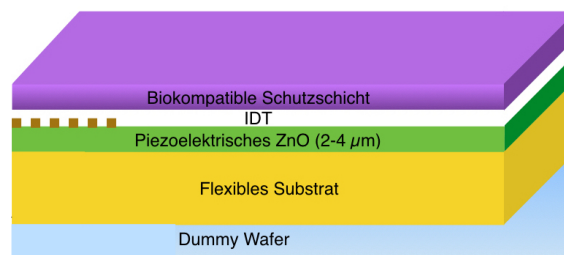


Abbildung 4.13: Skizze des Aufbaus eines aktiven Implantats. Ein flexibles Substrat ist auf einem Träger aufgebracht. Eine dünne Schicht (2-4 μm) des piezoelektrischen ZnO wird per HF-Magnetron Sputtern aufgetragen, gefolgt von lithographischer Strukturierung der Elektroden (IDT). Zum Schluss dient eine biokompatible Deckschicht sowohl als Schutz vor Beschädigungen des Implantats als auch zur Vermeidung von Zellsterben durch die ZnO-Schicht.

Als mögliche Trägersubstanz dienten in diesem Experiment sowohl harte als auch flexible Materialien. Zudem wurden verschiedenen ZnO-Schichtdicken von 0.5 - 4 μm mit einer HF-Magnetron Sputteranlage (HiTUS : High Target Utilisation Sputtering, Plasma Quest Ltd) und die strukturierten Elektroden mittels thermischen Verdampfens aufgebracht. Die entsprechenden Kombinationen sind in Tabelle 4.1 aufgeführt.

Tabelle 4.1: Materialien und Parameter für flexible Implantate

Trägermaterial	ZnO	IDT
Corning Glas (Corning Incorporate)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP $\lambda = 25$ nm, 42 FP Al 70 nm $\lambda = 50$ nm, 54 FP
Silizium Wafer	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP $\lambda = 25$ nm, 42 FP
Aluminium Folie (Carl Roth GmbH)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP $\lambda = 25$ nm, 42 FP
Teonex [®] (Dupont)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP $\lambda = 25$ nm, 42 FP
PDMS > 2 μm Sylgard 184 (Dow Corning GmbH)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP $\lambda = 25$ nm, 42 FP
PDMS < 2 μm Sylgard 184 (Dow Corning GmbH)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP $\lambda = 25$ nm, 42 FP
PLLA (GoodFellow Cambridge Limited)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP
PE (GoodFellow Cambridge Limited)	0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μm	Ti-Au-Ti 10-50-10 nm, $\lambda = 50$ nm, 54 FP

Die verschiedenen Proben wurden alle identisch hergestellt, jedoch ließen sich einige Kombinationen im Fabrikationsprozess nicht realisieren. Aus diesem Grund wurden nur die Erfolgversprechenden weiter verfolgt. Bis auf das biodegradable Poly-L-Lactid-Acid (PLLA) und das Polyethylen (PE) eigneten sich alle Substrate als Trägermaterial für ZnO. Die verwendete PE Proben verfügen über eine zu rauhe Oberfläche, sodass hier das ZnO keine gleichmäßige Schicht ausbilden kann. PLLA wird durch die Beschichtung spröde, so dass die ZnO Schicht absplittert. Während auf Corning Glas und Silizium die Schichtdicke von ZnO keine Auswirkungen hat, eignen sich bei PDMS, Teonex[®] und Aluminium-Folie nur 2 μm dicke Schichten, um eine Deformation des Trägersubstrates ($d < 2 \mu\text{m}$) oder brüchige ZnO Schichten ($d > 0.5 \mu\text{m}$) zu vermeiden. Beim Wachstum von epitaxialem ZnO auf einem Trägersubstrat kann es durch Gitterverzerrung zu Spannungen sowohl an der Grenzschicht von ZnO und Substrat als auch im ZnO selbst kommen [166]. Handelt es sich bei dem Substrat um ein hartes Material kann es passieren, dass die ZnO Schicht absplittert (PLLA) oder sich gar nicht erst ausbildet (PE). Bei flexiblen Substraten zeigt sich die Oberflächenspannung durch Deformationen im Substrat selbst (PDMS, Al-Folie).

Diesem könnte für künftige Proben unter anderem durch Tempern der Dünnschichtstrukturen entgegengewirkt werden [167].

Bestimmung der Topographie

Nach der Beschichtung der Substrate mit ZnO, soll nun die Oberflächenstruktur ermittelt werden. Dazu wird die Rauigkeit R_q der Proben mit einem AFM (NanoWizard® AFM, JPK Instruments AG) vermessen. In Abb. 4.14 sind die Oberflächenprofile von Corning Glass (Corning Incorporated), Aluminium Folie und PDMS, mit jeweils 2 μm dicken ZnO-Schicht zu sehen. Aus der Bestimmung der Oberflächenrauigkeit R_q geht hervor, je flexibler ein Material ist, desto stärker lässt es sich durch die ZnO-Schicht verformen und R_q nimmt zu. Während bei Corning Glass eine nahezu glatte Fläche mit $R_q = 5.01 \text{ nm} \pm 1.21 \text{ nm}$ gemessen wird, ist eine leichte Erhöhung von $R_q = 7.36 \text{ nm} \pm 2.09 \text{ nm}$ für Teonex zu sehen. Diese Substrate haben vor der ZnO-Beschichten eine Oberflächenrauigkeit von $R_q = 2 \text{ nm}$ [168, 169]. Betrachtet man die Al-Folie, so beginnt diese sich durch die Beschichtung zu verformen und erreicht Werte von $R_q = 22.82 \text{ nm} \pm 4.53 \text{ nm}$. In PDMS kommt es zu so starken Verspannungen im ZnO, dass die Oberfläche des PDMS Wellen schlägt, die sogar mit einem Lichtmikroskop und einem 4-fach Objektiv zu sehen sind (siehe Abb. 4.14 e). Diese Wölbungen nehmen mit Dicke des PDMS deutlich zu.

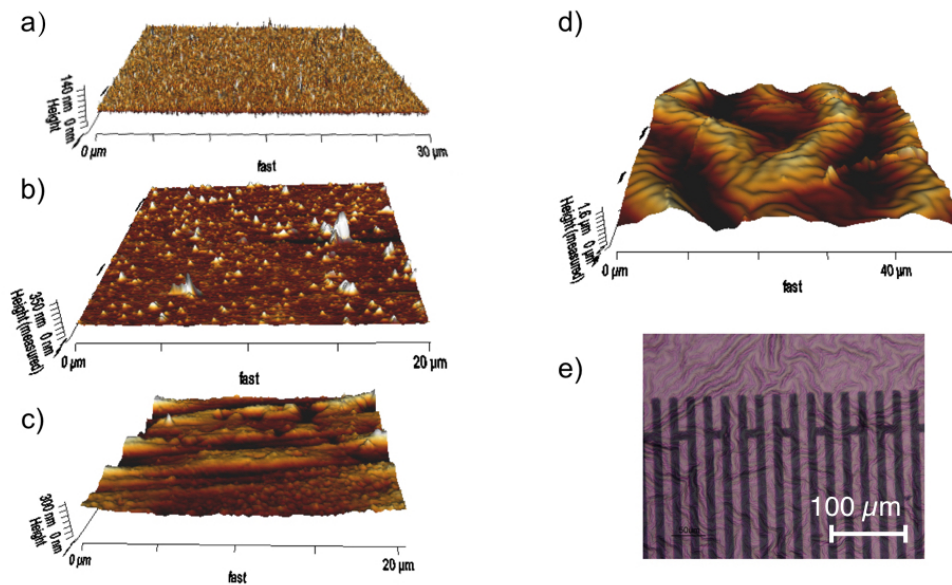


Abbildung 4.14: AFM Aufnahmen der 2 μm dicken ZnO-Schichten auf verschiedenen Substraten a) Corning Glass b) Teonex c) Al-Folie d) PDMS (1 mm) sowie e) Mikroskopaufnahme der PDMS Schicht.

Bisher wurden nur ZnO-Schichten mit $d = 2.0 \mu\text{m}$ diskutiert. Eine Messreihe mit $d = 0.5 \mu\text{m}$, $1.0 \mu\text{m}$, $2.0 \mu\text{m}$ und $4.0 \mu\text{m}$ auf Corning Glass zeigt, dass mit zunehmender Schichtdicke R_q steigt. So ergeben sich für die entsprechenden Schichtdicken R_q von $R_{q,0.5}$

$= 3.23 \text{ nm}$, $R_{q,1.0} = 4.46 \text{ nm}$, $R_{q,2.0} = 5.09 \text{ nm}$, $R_{q,4.0} = 34.71 \text{ nm}$. Das beobachtete Phänomen lässt sich dadurch begründen, dass sich mit zunehmender Schichtdicke die hexagonale Wurtzitstruktur des ZnO ausbildet. Die Kristallite werden folglich größer und die Rauigkeit nimmt zu [170]. Aus diesem Grund, sollten für weiterführende Studien ZnO-Schichten mit $d = 2.0 \text{ }\mu\text{m}$ Verwendung finden. Somit lassen sich auch alle Substrate miteinander vergleichen.

Biokompatibilität

Da die aktiven Implantate in den menschlichen Körper implantiert werden sollen, ist es unabdingbar, dass diese verträglich sind und das umliegende Gewebe nicht beschädigt wird. Um toxische Effekte der ZnO-Schichten die auf die humanen Zellen wirken [165, 171] zu vermeiden, wird eine 100 nm dicke SiO-Schicht mit Hilfe thermischen Verdampfens auf die Proben aufgebracht. Die Kultivierung von SaOs-2 Zellen auf den SiO beschichteten Proben, reinen ZnO-Schichten sowie Glasobjektträgern als Referenzprobe und anschließender Messung der LDH-Aktivität (vgl. Abschnitt 4.2), diente zur Überprüfung der Viabilität und Bioverträglichkeit der Zellen. Nach Kultivierung von 5 Tagen konnten optisch keine Unterschiede in den Zellkulturen beobachtet werden. Lediglich auf der unbeschichteten ZnO-Probe war ein leicht gehemmtes Zellwachstum zu sehen. Beim Vergleich der LDH-Messungen mit Hoch- und Tiefkontrolle, weisen alle SiO-beschichteten Proben relative Werte von $15 \% \pm 2 \%$ auf. Auch hier weist die reine ZnO-Schicht leicht erhöhte Werte von $23 \% \pm 4 \%$ auf. Auf den ersten Blick lässt sich aus beiden Experimenten folgern, dass keine der relevanten Proben eine toxische Wirkung auf die Zellen ausübt. Auch die piezoelektrische ZnO-Schicht scheint keinen deutlichen wachstumshemmenden Einfluss zu haben. Dennoch sollten weitere Experimente angestrebt werden, welche die einzelnen Bestandteile der Proben auf ihre Biokompatibilität und toxischen Effekte überprüfen.

Erzeugung von SAW

Nach Ermittlung der optimalen Schichtdicke von ZnO und Überprüfung der Biokompatibilität ist der nächste Schritt die Erzeugung der SAW auf den Proben. Dazu werden diese per lithographischem Verfahren mit der IDT Struktur versehen. Anders als bei LiNbO_3 (vgl. Kap. 4.2) dienen hier Strukturen mit $\lambda_{\text{SAW}} = d = 50 \text{ }\mu\text{m}$ und 54 Fingerpaaren als Elektrode. Durch die breitere Struktur haben kleine Risse in der ZnO-Oberfläche weniger Einfluss auf die lithographisch hergestellte IDT Struktur. Die Fingeranzahl leitet sich aus der Berechnung zur $50 \text{ }\Omega$ - Anpassung [172, 173] ab. Ob eine Einkopplung des Signals stattfindet, kann durch die Bestimmung des S_{11} - Signals bei Reflexionsmessungen mit einem Network Analyzer (E5062 RF Network Analyzer, Agilent Technologies) überprüft werden (siehe Kap. 4.2). Bei der Verwendung von ZnO ist weiterhin zu beachten, dass sich die Schallgeschwindigkeit mit abnehmender Schichtdicke erhöht. Bei einer ZnO-Schichtdicke von $d = 2 \text{ }\mu\text{m}$ beträgt sie $\approx 2900 \text{ m s}^{-1}$ [174, 175]. Somit ergibt sich aus der Relation $v = \lambda \times f$ eine Frequenz der Rayleigh Mode von $f_{\text{SAW}} = 58 \text{ MHz}$. Die Frequenzspektren der Proben sind in Abb. 4.15 dargestellt.

In allen Proben findet eine Signaleinkopplung statt. So sind bei Corning Glas (vgl. Abb. 4.15 a) zwei Minima bei 54 MHz und 87 MHz zu verzeichnen. Die Einkopplung ist in beiden

Fällen jedoch sehr gering und liegt hier deutlich unter -0.20 dB. Al-Folie hingegen (vgl. Abb. 4.15 b) zeigt eine deutlich bessere Reflexion bei $f = 56$ MHz mit -4.3 dB und $f = 82$ MHz mit -10.4 dB. Beim Betrachten der Polymere weist Teonex[®] (vgl. Abb. 4.15 c) im Vergleich zu PDMS (vgl. Abb. 4.15 d), neben $f = 88$ MHz noch ein zweites Signal bei $f = 57$ MHz auf. Jedoch sind sämtliche Einkopplungen so gering, dass nur schwache Signale von weniger als -0.1 dB gemessen werden. In allen Proben tritt neben der Rayleigh Mode noch ein weiteres Minimum bei ca. 90 MHz auf. Diese Minima deuten auf weitere Wellenmoden, wie z.B. Lamb oder Sezawa Wellen [159, 163].

Eine qualitative Analyse der mikrofluidischen Eigenschaften soll verifizieren, ob die gemessenen Signale auch tatsächlich eine propagierende Oberflächenwelle induzieren. Dazu werden die Substrate mit einer PDMS Kammer versehen, und diese mit einer Latexbeatlösung gefüllt (vgl. Abschnitt 3.3.3). Bei einer angelegten Leistung von $P_{IN} = 28$ dBm kann unter dem Mikroskop die charakteristische akustische Strömung (vgl. Abschnitt 3.3.3) beobachtet werden. Auf eine quantitative Analyse mit μ -PIV wurde hier verzichtet.

Diese Experimente haben gezeigt, dass durch HF-Magnetron sputtern dünne, piezoelektrische ZnO-Schichten auf festen (Corning Glas, Si-Wafer) wie auch auf flexiblen Substraten (Al-Folie, Teonex, PDMS) aufgebracht werden können. Die Signaleinkopplung durch die S_{11} Messungen und die induzierten akustischen Strömungen deuten auf die Erzeugung von Rayleigh-Wellen hin. Weiterhin ist durch eine abschließende Glasschicht die Biokompatibilität *in vitro* gegeben. Damit sind die ersten Grundsteine für eine aktive Zellstimulation auf flexiblen Substraten gelegt. Weiterführend müssten die verschiedenen Parameter wie ZnO-Schichtdicke, Substratdicke etc. angepasst werden. Zusätzliches Ausheilen des ZnO könnte die Kristallinität und damit den piezoelektrischen Effekt verbessern. Abschließend wäre es interessant, den Einfluss der Zellmigration in einem 'Wound Healing Assay' zu untersuchen und danach mit den Beobachtungen auf LiNbO₃ zu vergleichen.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie wurde eine neue und unkonventionelle Methode zur positiven Gewebe Stimulation vorgestellt, bei der der Einfluss von akustischen Oberflächenwellen auf SaOs-2 Zellen mittels eines 'Wound-Healing Assay' untersucht wurde. Es zeigte sich, dass adhärenente Zellen im Schallpfad der SAW positive Effekte in ihrem Migrationsverhalten aufwiesen. Erste Studien belegten hier eine erfolgreiche Auswirkung der akustischen Vibrationen auf eine künstliche Wunde und eine bis zu 17 % erhöhten Wundheilung. Nach gründlicher Untersuchung und Ausschluss von möglichen Nebeneffekten, wie ballistische Verschiebung, erhöhtes Nährstoffangebot oder lokale Temperaturerhöhungen, lässt sich darauf schließen, dass diese Steigerung der Zellmigration auf der mechanischen und elektrischen Stimulation der SAW beruht. Die nächste Herausforderung wird darin liegen die involvierten biochemischen Prozesse zu identifizieren. Aus diesem Grund sollten sich weiterführende Studien nicht nur mit Zellverbänden sondern einzelnen Zellen im Hinblick auf die intrazelluläre Reaktion durch die elektromechanischen Reize beschäftigen. Interessante Aspekte wären in diesem Zusammenhang die Zellaktivität, Änderungen im Zytoskelett, Produktion von oxidativen Stress und Ausschüttung von Biomarkern. Weiterhin könnte die Migrationsgeschwindigkeit und -richtung durch Modulation der Amplituden beeinflusst werden und somit als neue Methode zur Richtungsbeeinflussung, der sogenannte 'Acoustotaxis' dienen.

In dieser Studie wurde weiterhin gezeigt, dass ein direktes Aufbringen des piezoelektrischen ZnO sowie die Lithographie der Elektroden auf festen wie auch auf flexiblen biokompatiblen Materialien möglich ist und bei der Wahl der geeigneten Schichtdicke SAW induziert werden können. Dabei zeigte sich die beste Einkopplung und Generierung von SAW auf Al-Folie als flexiblem Substrat.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen eröffnen sich neue Perspektiven im Bereich der Gewebezüchtung. Diese kostengünstige und lokal anwendbare Technologie bietet eine Vielzahl an denkbaren Applikationen zur schnellen Genesung. Als langfristiges Ziel können diese Ansätze dazu genutzt werden, einen implantierbaren Biochip zur direkten Behandlung von geschädigtem Gewebe nach operativen Eingriffen oder zur schnellen Osseointegration von medizinischen Implantaten zu entwickeln. Diese Implantate und Biochips sind dabei direkt mit dem piezoelektrischen Material beschichtet [163, 176]. Die Stromversorgung erfolgt kabellos durch Induktion außerhalb des Körpers [177] um so auch in tiefe Gewebeschichten eindringen zu können. Da die hier verwendete RF-Technik bereits ein Standardverfahren in der Massenproduktion von z.B. Mobiltelefonen ist, lässt sich sowohl der Chip als auch das periphere Zubehör mühelos verkleinern. Weiterhin lässt sich auch, sofern erwünscht, eine lokale, therapeutische Hypothermie durch das Substrat erzeugen. Dazu könnten spezielle Verlustmechanismen, wie Wechselwirkungen von thermisch induzierten elastischen Wellen oder Streuung an Kristalldefekten, sowie makroskopische Risse des Substrats genutzt werden [178, 179].

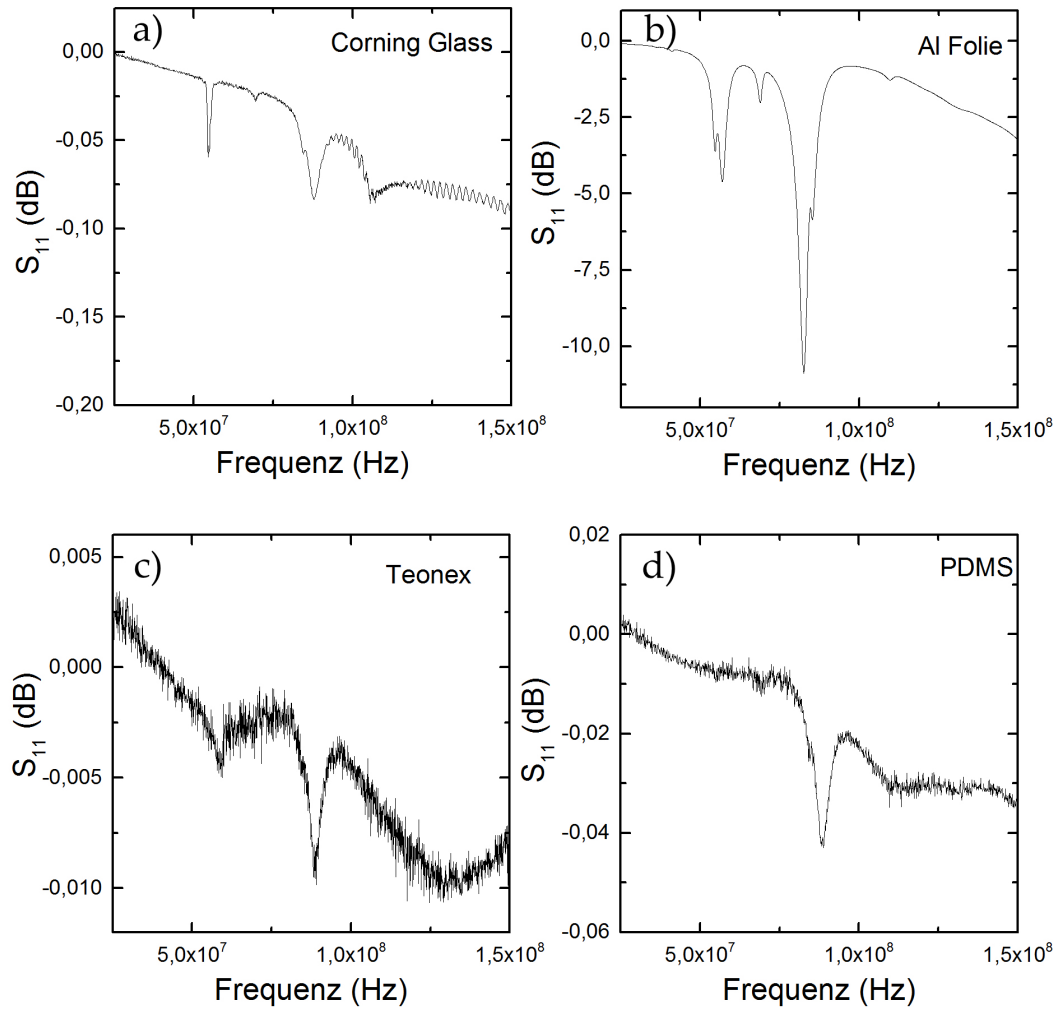


Abbildung 4.15: Frequenzspektren des S_{11} -Signals bei einer ZnO Schicht auf jeweils $d = 2 \mu\text{m}$ von a) Corning Glass, b) Al-Folie, c) Teonex, d) PDMS.

5 Gerichtetes Zellwachstum

5.1 Einführung

Neben der kontrollierten Zelladhäsion und -proliferation, ist auch eine kontrollierte und gerichtete Zellmigration schon seit langer Zeit ein wichtiger Bestandteil der Forschung. Gerade im Hinblick auf künstliches Gewebewachstum ist das Verständnis von Zellmigration und die Wechselwirkungen mit dem Untergrund von großer Bedeutung [27, 31, 180–182]. Für die Zellmigration ist dabei das Verständnis des Fortbewegungsablaufes wichtig. Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, geschieht dies in einem Migrationszyklus, dessen erster Schritt die Polarisation der Zellen ist [30]. Dabei bilden sich Auswölbungen in Migrationsrichtung aus (Protrusion). Im zweiten Schritt zieht der hintere Teil der Zelle langsam nach (Retraction) [30]. Über die Stärke der Polarisation, also dem Verhältnis aus Migrationsachse zu Querachse, kann die Geschwindigkeit der Zelle bestimmt werden und ist vom Zelltypus abhängig [27]. In der Forschung gibt es verschiedene Ansätze, um die Zellmigration gerichtet zu kontrollieren. So zeigt sich, dass in Anwesenheit von asymmetrischen Potentialen durch z.B. externe elektrische Felder [23, 24], geometrische Hindernisse [29, 30], oder chemisch modifizierte Oberflächen [180, 182] die Bewegung der Zellen gesteuert werden kann. Bei der Chemotaxis folgt die Zelle einem chemischen Gradienten und bewegt sich entsprechend entlang eines definierten Pfades [27–29]. Aber auch eine Oberflächenbehandlung durch Aufbringung von Bindungsproteinen, Hydrogelen oder Kollagenen in speziellen Mustern kann zur gezielten Zellbesiedelung von Substraten genutzt werden [180, 181]. Eine Alternative für ein gerichtetes Zellwachstum durch chemische Gradienten bieten Nano- oder Mikrobarrieren, bei denen die Zellen über die Kontaktführung durch die Topographie des Substrates gesteuert werden [30]. Hier wandern die Zellen über die Strukturen und polarisieren horizontal entlang der Barrieren [30]. Eine weitere Möglichkeit für gerichtetes Zellwachstum liefert der sogenannte Ratscheneffekt. Die Zellen werden dabei durch eine dreieckige Mikrostruktur die durch kleine Öffnungen verbunden ist (vgl Abb. 5.1 b) gesteuert, wodurch ihre internen Bewegungsapparate morphologischen Änderungen ausgesetzt sind und sie sich dann entsprechend durch den vorgelegten Pfad bewegen [31]. Es wird dabei angenommen, dass sich die Actinbündel durch den Symmetriebruch neu orientieren und so die Richtung der Lamellipodienfortbewegung steuern [183, 184]. Je nach Zelltyp kann diese Bewegung entsprechend in oder entgegen der Ratschenstruktur geschehen, was u.a. dazu genutzt werden kann unterschiedliche Zellpopulationen zu trennen [31]. Bei der Fortbewegung in Laufrichtung, wie es bei der Melanomzelllinie B16F1 oder Fibroblasten Rat2 Zellen auftritt, bilden sich eine große Lamellipodie aus die in das nachfolgende Dreieck vorstößt und so polarisiert. Anschließend zwängen sich die Lamellipodia durch den Spalt und verankern sich an den Kanten und Seiten des nachfolgenden Dreiecks. Anschließend zieht der Rest der Zelle nach [31]. So können die Zellen entlang der Ratschenstruktur gezielt klettern. In dieser Studie gilt es nun

verschiedene Ansätze zu finden, um die Zellmigration gezielt eines vorgegebenen Weges zu steuern. Dazu soll, zum Einen die Kontaktführung, wie sie durch nanostrukturierte Barrieren oder den Ratscheneffekt gegeben ist, für eine Methode genutzt werden, die dabei keine Veränderung der Oberflächentopographie benötigt. Hierzu soll das Benetzungsvermögen der Zellen auf den Substraten genutzt werden. Da die Hydrophobizität einer Oberfläche einen Einfluss auf das Vermögen der Zellen zu adhären und zu spreiten hat [129], werden für diese Studie Substrate mit hydrophilen Strukturen auf hydrophoben Oberflächen hergestellt. Erste Zellexperimente sollen dann einen Einblick in das Adhäsions- und Migrationsverhalten geben. Ein weiterer Ansatz für gerichtetes Zellwachstum, soll durch elektrisch polarisierte Domäne entwickelt werden. Dabei dient wiederum das ferroelektrische LiNbO_3 , das sich entlang der z-Achse in positiv und negative geladene Domänen polarisieren lässt. In diesem Teil der Studie soll nach der Polarisation die Struktur durch invasive und nicht-invasive Verfahren nachgewiesen werden und anschließend mögliche Wechselwirkungen der SaOs-2 Zellen mit den entsprechenden Domänen betrachtet werden.

5.2 Zellwachstum auf hydrophil und hydrophob strukturierten Flächen

5.2.1 Einführung

Veränderungen der Oberflächenmodifikation durch chemische Behandlungen werden schon in vielen Bereichen zu Zellstudien bis hin zur künstlichem Gewebezüchtung verwendet [27, 113, 129, 180, 185]. In der Chemotaxis zum Beispiel wird das Vermögen der Zellen entlang eines chemischen Gradienten zu migrieren genutzt, um die Zellgeschwindigkeit, die Zellkommunikation untereinander und die Orientierung im Kollektiv zu untersuchen [27, 28]. Ein weiterer Ansatz für gerichtetes Zellwachstum ist durch die Mikro- und Nanostrukturierung (micro- / nanopatterning) gegeben, bei dem die Substratoberfläche durch sensitives Ätzen modifiziert wird [30, 31]. Dabei können z.B Nanobarrieren zur gezielten Ausrichtung von Zellen genutzt werden. [30]. Weiterhin kann auch eine Ratschenstruktur für eine gerichtete Zellmigration oder sogar Sortierung von Zellen genutzt werden [31].

Ein weiterer Aspekt der Zellmigration ist die Benetzbarkeit der Oberfläche und deren Einfluss auf das Adhäsions-, Spreitungs- und Migrationsverhalten von Zellen [129]. Da das Benetzungsvermögen unmittelbar mit der Oberflächenenergie zusammenhängt und so einen direkten Einfluss auf die Zelladhäsion hat [186], lässt sich das präferierte Adhären von Zellen auf hydrophilen Flächen erklären. Je geringer also der Kontaktwinkel zwischen Zelle und Substrat ist, desto besser kann die Zelle auf der Oberfläche spreiten und adhären. In diesem Teil der Studie gilt es nun zunächst das Adhäsionsverhalten von Zellen auf hydrophob- und hydrophilstrukturierten Proben, auch im Hinblick auf ihre Proliferation zu untersuchen. Anschließend sollen erste Experimente mit Zellen nachweisen, ob der Ratscheneffekt auch auf silanisierten, glatten Oberflächen ohne Nano- oder Mikrostruktur erzielt werden kann.

5.2.2 Versuchskomponenten und Präparation

Strukturierung der Oberflächen

In Abb. 5.1 sind die zu untersuchenden hydrophilen/ -phoben Strukturen zu sehen. Zur generellen Charakterisierung des Adhäsions- und Proliferationsverhaltens dient hier eine 15 μm und 100 μm breite Linien-Struktur (vgl. Abb. 5.1 a) bei der die Streifen alternierend hydrophob (rot) und hydrophil (blau) sind. Als zweite Struktur wird eine fortlaufende Dreiecksform mit Aussaatpunkt gewählt (vgl. Abb. 5.1 b), bei der die Spitze des nachfolgenden Dreiecks mit der langen Kante des vorherigen verbunden ist. In verschiedenen Ansätzen wurden Strukturen mit einer Breite von je $b = 7.5 \mu\text{m}$, 15 μm , 22,5 μm , bis 90 μm hergestellt. Die Kantenlängen der Dreiecke betragen entsprechend $l = 100 \mu\text{m}$, 200 μm , 300 μm , bis 1300 μm .

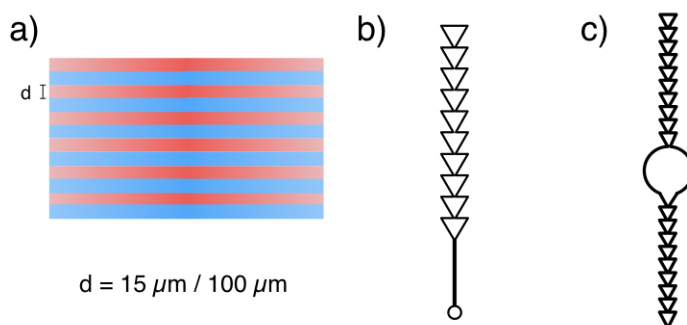


Abbildung 5.1: Strukturen für das gerichtete Zellwachstum. a) alternierende Linienstruktur mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen mit einer Linienbreite von $d = 15 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$, b) Dreiecksstruktur mit Startpunkt und c) Dreiecksstruktur mit Aussaatpunkt in der Mitte zur Untersuchung der bevorzugte Migrationsrichtung von Zellen (Ratscheneffekt).

Alle Proben werden so hergestellt, dass sich die hydrophile Struktur auf einem hydrophoben Untergrund befindet. Dazu werden mehrere Schritte benötigt. Als Substrat dienen hier Objektträger aus Glas (76x26x1mm, Marienfeld GmbH). Zunächst wird durch Photolithographie die entsprechende Struktur mit einer Folienmaske sowie einem Negativlack (ma-N 1420, micro resist technology GmbH) auf die gereinigten Glasplättchen mittels optischer Lithographie übertragen. Eine genaue Anleitung findet sich in Anhang A. Nach entwickeln der Probe, ist die nachfolgende hydrophile Struktur durch den Lack geschützt. Im nächsten Schritt folgt das Hydrophobieren der Probe. Dazu werden diese zusammen mit ca. 100 μl Perfluorodecyltrichlorosilan (abcr GmbH) in einen Exsikkator unter Vakuum für mindestens 24 h gelagert. Die Hydrophobierung erfolgt durch molekulare Dampfbeschichtung bei der die Silanmoleküle selbstorganisierende Monoschichten auf den Oxidoberflächen formen und somit kovalent an diese binden. Somit bildet sich eine hydrophobe Glasoberfläche aus. Dieses Verfahren wird zur Beschichtung von Mikro- und Nanotechnikbauteilen sowie für die Herstellung von Elektronik verwendet [187, 188].

Anschließend werden die Proben gereinigt und die Lackstruktur mit Aceton entfernt. Im

letzten Schritt folgt das Hydrophilisieren. Dazu werden die Proben mit (3-Glycidyoxypropyl)-trimethoxysilan (abc GmbH) in einen zweiten Exsikkator unter Vakuum für mindestens 48 h gelagert. Dabei binden die Epoxisilane kovalent an die nicht hydrophobierten Glasflächen und bilden dort eine hydrophile Oberfläche [189]. Zum Schluss werden die Substrate mit Isopropanol und destilliertem Wasser gereinigt um so alle adsorbierten Chemikalien von der Oberfläche zu entfernen. Die Proben weisen nun hydrophile Strukturen auf hydrophobem Untergrund auf und sind biokompatibel.

Zellkultur

Zur Überprüfungen des gerichteten Wachstums auf hydrophilen/-phoben Strukturen wird auch hier die SaOs-2 Zelllinie verwendet. Die Kultivierung sowie das Passagieren der Zellen erfolgt wie in Abschnitt 3.2 beschrieben. Um eine möglichst hohe Dichte an Zellen in der Suspension zu erhalten, wird hier nach dem zentrifugieren nur der Überstand entfernt und die Zellen in 1 ml zellfreiem Nährmedium resuspendiert. Eine genaue Zellkonzentration wird nicht ermittelt.

Versuchsaufbau

Auf die strukturierten Substrate wird eine 5 mm hohe PDMS-Kammer (Sylgard 184 Silicone Elastomer, Dow Corning) mit Silikonpaste (Baysilone-Paste, GE Bayer Silicones) geklebt. Sie dient als Becken für die Zellen und das Nährmedium. Die Zelladhäsion sowie die Proliferation wird über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Dazu wird die Zellsuspension zunächst auf die Substrate gegeben. Die Zellen haben 6 h Zeit sich auf dem Substrat abzusetzen und zu adhären. Dann wird die Zellsuspension entfernt und die adhären Zellen vorsichtig mit PBS gereinigt und mit frischem zellfreiem Medium befüllt und in einem Mikroskopinkubator (vgl. Abschnitt 4.2) kultiviert. Um das Wachstum zu beobachten, werden alle 10 min für 72 h Phasenkontrast Aufnahmen mit einem 10-fach vergrößernden Objektiv gemacht.

5.2.3 Ergebnisse und Diskussion

Für ein gezieltes Richtungswachstum von SaOs-2 Zellen wurden hier hydrophile Strukturen auf hydrophoben Substraten hergestellt. Im nachfolgenden soll der Beweis der erfolgreichen Strukturierung durch Messung des Kontakwinkels von Wassertropfen, sowie die Tröpfchenbildung auf den Substraten nachgewiesen werden. Anschließend wird das Adhäsions- und Proliferationsverhalten der Zellen bei zufälliger Aussaat auf den Strukturen diskutiert.

Nachweis der hydrophoben und hydrophilen Struktur

Nach der Herstellung der Proben galt es zunächst die hydrophile Struktur auf der hydrophoben Oberfläche zu überprüfen. Dazu wurden die Proben mit destilliertem Wasser befeuchtet und die Tröpfchenform und -größe auf dem Mikroskop (Zeiss Axiovert 200M) betrachtet. In Abb. 5.2 a) ist die 15 µm breite hydrophob/hydrophil alternierende Linienstruktur zu sehen. Hier ist ein klarer Unterschied in der Größe der Tropfen je nach Untergrund zu erkennen. So

bilden sich auf den hydrophilen Flächen längliche Tröpfchen aus, welche über die gesamte Breite des Streifens gehen. In den hydrophilen Bereiche ist die Grenzflächenenergie $\sigma_{s,l}$ zwischen Substrat und Flüssigkeit entsprechend gering und der Kontaktwinkel Θ nimmt ab. Folglich wird die Oberfläche benetzt [68]. Auf den hydrophoben Flächen hingegen, ist die Oberflächenspannung und somit der auftretende Kontaktwinkel Θ zwischen hydrophobem Substrat und Wassertropfen so groß, dass sich nur kleine Tröpfchen bilden können. Im späteren Zellexperiment kommt die silanisierte Oberfläche mit verschiedenen Flüssigkeiten, wie destilliertem Wasser, PBS und Zellmedium, in Berührung. Aus diesem Grund soll nun der Kontaktwinkel vor und nach der Behandlung mit den verschiedenen Flüssigkeiten, sowohl auf der hydrophilen, wie auch auf der hydrophoben Fläche vermessen werden. Dies geschieht mit Hilfe des in Abschnitt 3.3.5 erwähnten Kontaktwinkelmessgeräts OCA 35 (DataPhysics Instruments GmbH). Die gemessenen Winkel sind in Abb. 5.2 b) aufgetragen. Der Kontaktwinkel Θ bei destilliertem Wasser auf den hydrophilen Bereichen beträgt hier $73^\circ \pm 3^\circ$ sowie $110^\circ \pm 4^\circ$ auf den hydrophoben Flächen. Für den Benetzungszustand gilt, je kleiner Θ ist, desto besser ist die Benetzung mit der hydrophilen Flüssigkeit [68, 126]. Nach ausgiebigem Spülen der Oberflächen mit destilliertem Wasser verringert sich der Winkel auf $\theta = 62^\circ \pm 12^\circ$ für hydrophile und $\theta = 99^\circ \pm 3^\circ$ für hydrophobe Bereiche. Folglich verbessert sich der Benetzungsgrad. Im späteren Zellexperiment werden die adhärenierten Zellen mit PBS gereinigt bevor zellfreies Nährmedium in die Kammer gefüllt wird. Aus diesem Grund wurde der Kontaktwinkel nach Behandlung der Oberflächen mit PBS sowie mit Nährmedium vermessen. Hier zeigt sich im Vergleich zu destilliertem Wasser kaum ein Unterschied im Kontaktwinkel, sowohl für hydrophile ($\theta = 65^\circ \pm 5^\circ$) wie auch bei den hydrophoben Bereichen ($\theta = 97^\circ \pm 2^\circ$). Erst die Behandlung mit dem Nährmedium bewirkt eine Veränderung des Kontaktwinkels auf $\theta = 5^\circ \pm 5^\circ$ auf den hydrophilen bzw. $\theta = 33^\circ \pm 15^\circ$ auf den hydrophoben Flächen. Die Substrate werden durch die Behandlung superhydrophil.

Zelladhäsion und -Proliferation auf hydrophil-/hydrophob strukturierten Substraten

Nach erfolgreichem Nachweis der hydrophilen Strukturierung soll nun das Adhäsions- und Proliferationsverhalten der SaOs-2 Zellen auf den 100 μm breiten Linienmustern untersucht werden. Dazu wurden die Zellen in Lösung auf die Substrate gebracht und über einen Zeitraum von 72 h beobachtet. Abb. 5.3 a) zeigt die Probenoberfläche mit adhärenierten Zellen zu Beginn der Messung. Nur wenige Zellen sind vorhanden und die Strukturierung ist nicht zu erkennen. Im Vergleich dazu ist die Oberfläche nach 72 h (Abb. 5.3 b) dicht besiedelt. Hier ist klar zu sehen, dass die Zellen sich auf den hydrophilen Streifen anordnen und hydrophobe Bereich weitestgehend meiden. Dies liegt an dem Benetzungsvermögen der hydrophilen Zellen sowie dem Nährmedium [129].

Im Anschluss wird das gerichtet Wachstum sowie die Orientierung der Zellen im Verlauf der Zeit untersucht. Dazu wird hier das Substrat mit der Dreiecksstruktur (siehe Abb. 5.1 b) verwendet. Abb. 5.4 zeigt Mikroskopaufnahmen der Substratoberflächen ohne Silanisierung (a) sowie mit hydrophiler Dreieckstruktur auf hydrophoben Untergrund (b) nach einer Inkubationszeit von 24 h und die strukturierte Probe nach 48 h Inkubationszeit (c). Beim Vergleich der Zellanordnung fällt schnell auf, dass sich die Zellen auf den strukturierten

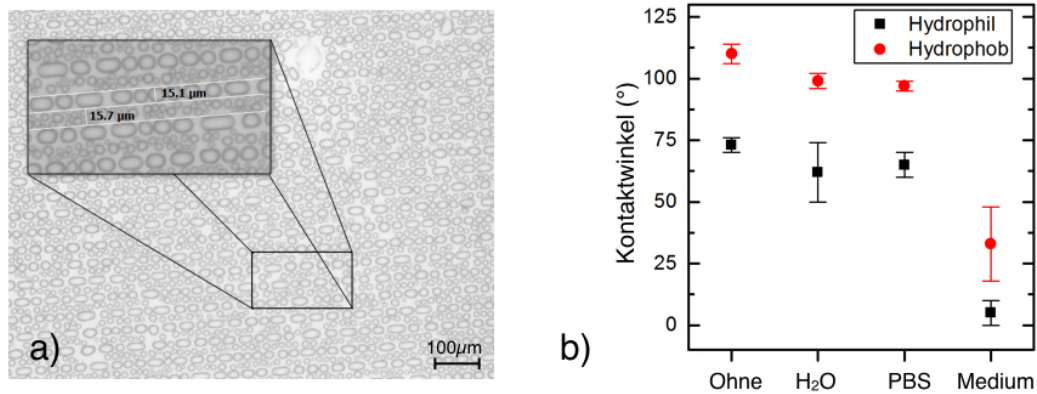


Abbildung 5.2: Nachweis und Vermessung der hydrophilen (schwarz) Strukturen auf hydrophoben (rot) Substraten. a) Betrachtung der Tröpfchenbildung auf der 15 µm breiten Linienstruktur. b) Messung des Kontaktwinkels von destilliertem Wasser auf den hydrophilen und hydrophoben Flächen nach reinigen mit PBS, Medium und Ethanol.

Substraten je nach Position in ihrer Form verändern. Zellen in der Mitte der hydrophilen Dreiecksstruktur haben keine oder nur eine geringe Ausrichtung, während die Zellen an den Grenzen zum hydrophoben Untergrund stark gestreckt (polarisiert) sind. Dies liegt daran, dass die Zellen hier nur im Teilkontakt mit anderen Zellen sind, richtungsspezifisch migrieren und entsprechend stark polarisieren. Vergleicht man hingegen die Referenzproben, so ordnen sich die Zellen zufällig an und die Zellen bewegen sich nicht in eine spezifische Richtung.

Betrachtet man das amöbenartige Fortbewegen der Zelle, bei der sie sich zunächst nach vorne streckt (protrusion) und anschließend mit dem Zellkörper nachrückt (retraction) [29], lässt sich daraus die Migrationsgeschwindigkeit bestimmen. Diese Zellgeschwindigkeit lässt sich mit der Zellpolarisation, welches als Maß für die Streckung der Zellen (Verhältnis aus Laufrichtung zu Querachse) korrelieren [27, 30]. Je stärker eine Zelle also polarisiert ist, desto schneller bewegt sie sich vorwärts. Folglich könnte durch die beobachtete Form der Zellen darauf geschlossen werden, dass die hydrophile Strukturierung einen Einfluss auf die Migrationsrichtung und -Geschwindigkeit hat.

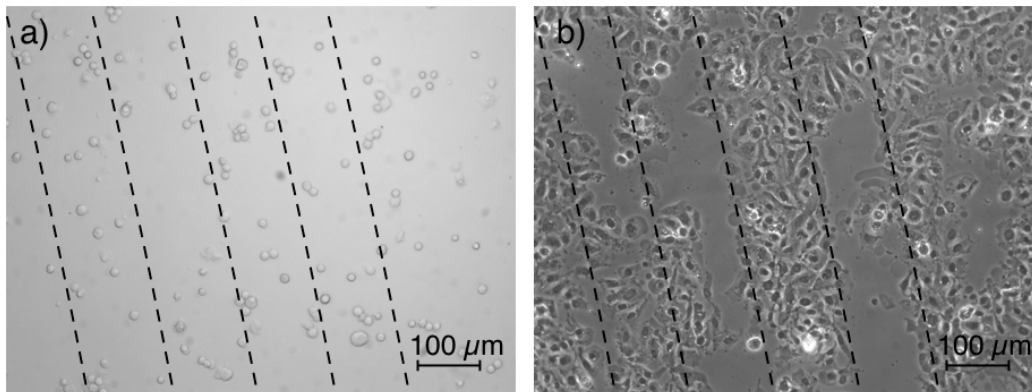


Abbildung 5.3: Betrachtung der adhärenierten Zellen auf der 100 µm Linienstruktur zu a) Beginn direkt nach Aussaat und b) zum Ende der Messung nach 72 h Inkubationszeit. Die Zellen lagern sich vermehrt auf den hydrophilen Strukturen an. Die gestrichelten Linien deuten die Grenzen zwischen den hydrophilen und hydrophoben Bereich an.

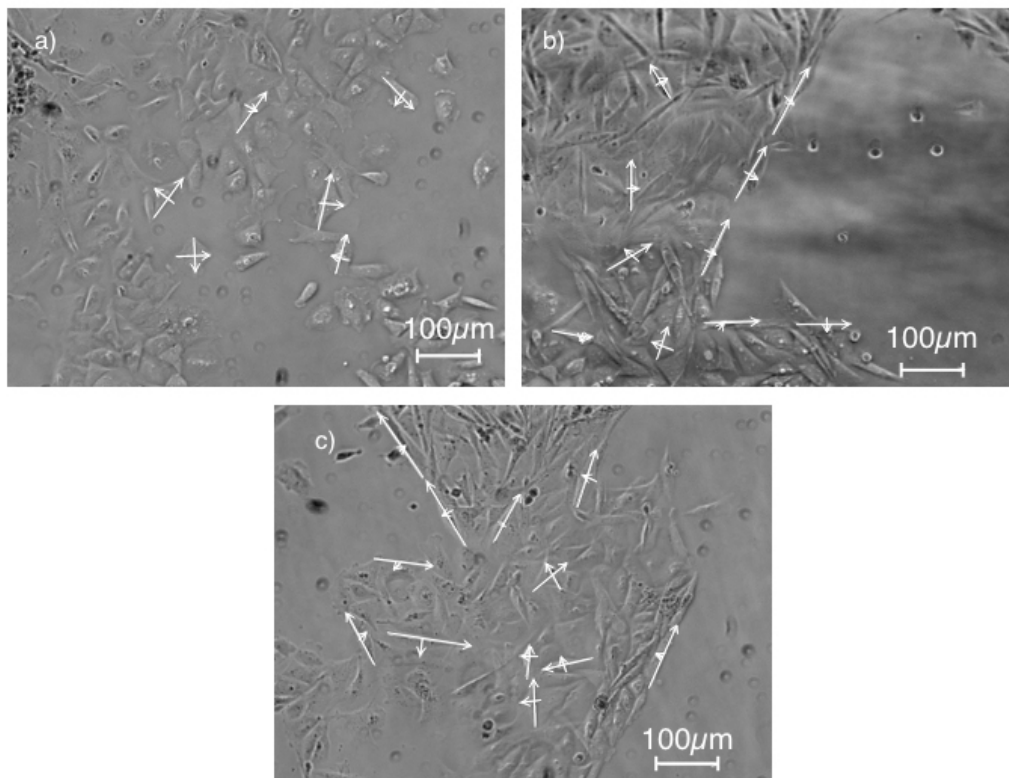


Abbildung 5.4: Betrachtung der adhärenierten Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 h auf einer a) Referenzprobe aus Glas mit unbehauelter Fläche und b) hydrophiler Ratschenstruktur auf hydrophobem Untergrund, sowie c) nach einer Inkubationszeit von 48 h auf den strukturierten Proben. Die eingezeichneten Pfeile symbolisieren die Längs- und Querachsenorientierung der Zellen.

Eine quantitative Analyse der Verhältnisse aus Längs- (Migrationsrichtung) zu Querachse der Zellen aus drei unabhängigen Messungen (vgl. Abb. 5.5) zeigt hier ein deutlich gerichtetes Wachstum mit einem Verhältnis von $V_{l/q} = 7.1 \pm 2.5$ an den Randbereichen. Zellen innerhalb der hydrophilen Struktur ($V_{l/q} = 2.7 \pm 1.2$) sowie auf den Referenzproben ($V_{l/q} = 2.1 \pm 0.6$) weisen kaum Unterschiede in ihrer Migrationsorientierung auf. Nach längerer Inkubationszeit (48 h) nimmt die Polarisation der Zellen an den Randgebieten ab. Das Verhältnis aus längs- und Querachse wird mit $V_{l/q} = 5.6 \pm 1.3$ geringer.

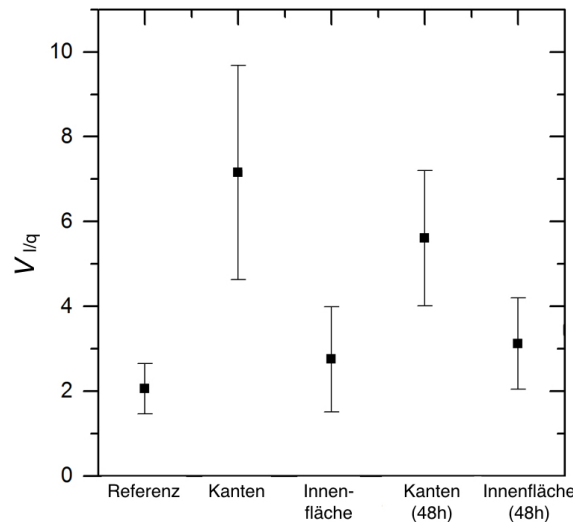


Abbildung 5.5: Verhältnis der Längs- zur Querachse von Zellen auf strukturierten Substraten. An den Randbereiche sind die Zellen stark gestreckt und weisen hier ein Wert von 7.1 ± 2.5 im Vergleich zum hydrophilen Innenbereich mit 2.7 ± 1.2 oder zur unbehandelten Probe 2.1 ± 0.6 auf.

Vergleicht man den Ratscheneffekt von nanostrukturierten Oberflächen [31] mit den hier vorgestellten Ergebnissen, so zeigt sich trotz statischer Aufnahmen dass auch durch hydrob-/hydrophile Strukturierung die Zellmigration kontrolliert werden kann ohne die Topographie der Oberfläche zu verändern. Diese Ansätze müssten jedoch in zeitaufgelösten Experimenten und mit gezielter Positionierung der Zellen zum Startpunkt der Messungen validiert werden.

5.2.4 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde gezeigt, dass durch die Verwendung von hydrophilen Strukturen auf hydrophobem Untergrund die Adhäsion sowie die Migration beeinflussen lassen. Aufgrund der schlechten Benetzung von Zellen auf dem hydrophobem Substrat können diese hier nicht gut adhärieren und wandern zu den hydrophilen Bereichen. Hier konnte wiederum gezeigt werden, dass Zellen an den Randgebieten zum hydrophoben Bereich eine bevorzugte Ausbreitungsrichtung aufweisen und sich entsprechend entlang der Kanten strecken. Für weitere Studien wäre es interessant, das gerichtete Zellwachstum von Beginn der Adhäsion

im zeitlichen Verlauf zu beobachten um so die Migrationsgeschwindigkeit an den Randgebieten und im inneren der hydrophilen Flächen zu charakterisieren. Weiterhin wäre es von großem Interesse, die von den Zellen bevorzugte Laufrichtung zu ermitteln. Dabei könnte eine Strukturierung wie in Abb. 5.1 c) verwendet werden, bei der die Zellen in die Mitte der Struktur gegeben werden. Anschließend könnten die Migrationsgeschwindigkeiten in Richtung der Dreieckstruktur und entgegengesetzt dazu über einen längeren Zeitraum beobachtet und analysiert werden.

5.3 Ferroelektrische Strukturierung

5.3.1 Einführung

In der regenerativen Gewebezüchtung ist ein kontrolliertes Zellwachstum auf den Oberflächen zwingend erforderlich, um verschiedene Eigenschaften des künstlichen Gewebes zu untersuchen [185, 190]. In Abschnitt 5.2 konnte ein gezieltes Zellwachstum durch hydrophile Strukturen auf hydrophoben Substraten bereits nachgewiesen werden. Nun gilt es, eine weitere Methode zur gezielten Adhäsion und Migration von Zellen zu untersuchen. Aus der Literatur ist bekannt, dass verschiedene Zellen auf externe elektrische Felder reagieren. Neuronen, Neuronalleistenzellen, sowie Fibroblasten und Epithelialzellen zeigen ein gerichtetes Wachstum zur Kathode, während sich Muskelzellen senkrecht zum E-Feld ausrichten [24]. Auch konnte nachgewiesen werden, dass sich Neurite bei angelegten elektrischen Feldstärken von $7 - 190 \text{ mV mm}^{-1}$ in Richtung der Kathoden ausbilden [23].

In dieser Arbeit gilt es nun, elektrisch polarisierte Strukturen für ein gerichtetes Zellwachstum zu entwickeln. Dazu eignen sich ferroelektrische Materialien. Bei Ferroelektrika handelt es sich um eine Untergruppe von Piezoelektrika, bei der auch in Abwesenheit einer mechanischen Spannung eine permanente dielektrische Polarisation auftritt. Die Trennung der Ladungsschwerpunkte führt zu einer Ausbildung von Dipolmomenten. Die Ausrichtung der remanenten Polarisation lässt sich durch ein äußeres angelegtes elektrisches Feld zwischen den stabilen Zuständen umschalten [191]. Ähnlich wie bei Ferromagneten weisen Ferroelektrika eine Hysteresekurve auf (siehe Abb. 5.6). Die Koerzitivfeldstärke E_c ist definiert als die Feldstärke bei einer Polarisation von $P = 0$. P_R beschreibt die remanente Polarisation ohne äußeres E-Feld. Die Spontanpolarisation P_S ergibt sich durch lineare Extrapolation bei großen angelegten Feldstärken und kann als remanente Polarisation einer Domäne gesehen werden.

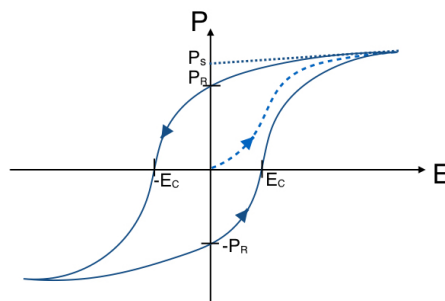


Abbildung 5.6: Hysteresekurve von Ferroelektrika mit Koerzitivfeldstärke E_c , remanenter Polarisation P_R und Spontanpolarisation P_S

Die auf der Oberfläche des polarisierten Substrats entstehenden Ladungen induzieren ein Depolarisationsfeld, welches der äußerlich angelegten Spannung entgegenwirkt. Bei Temperaturen unterhalb des Curie-Punktes bilden sich Teilvolumina mit unterschiedlich orientierter Spontanpolarisation aus (ferroelektrische Domänen). Dadurch lässt sich die elektrostatische Energie des Depolarisationsfeldes verringern. Gleichzeitig muss jedoch Energie aufgewendet

werden, um die Grenzbereiche zwischen zwei Domänen (Domänenwand) aufzubilden [192]. Die wichtigsten Polarisationsrichtungen in den Domänen sind Ausrichtungen parallel zur Substratoberfläche, welche als a-Domänen bezeichnet werden, sowie senkrecht dazu die c-Domänen. Hier wird zwischen c^+ -Domäne (Polarisationsvektor senkrecht zur Oberfläche nach außen orientiert) und c^- -Domäne (Polarisationsvektor senkrecht zur Oberfläche nach innen orientiert) unterschieden [193]. Soll nun ein ferroelektrischer Kristall entsprechend umgepolt werden, benötigt dies eine Umverteilung der Ladungsmenge Q über die Relation

$$Q = \int I(t) dt = 2 \times P_s \times A, \quad (5.1)$$

welche abhängig von der substratspezifischen Polarisationsfeldstärke P_s , sowie der Fläche A ist. Unter den Ferroelektrika weist LiNbO_3 mit $P_s = 0.78 \mu\text{m C mm}^{-2}$ eine der größten Polarisationsfeldstärken bei Raumtemperatur auf. Daher wird periodisch gepoltes LiNbO_3 (PPLN) auch im Bereich der Mikrostrukturierung oder für ferroelektrische Lithographie verwendet [193–196]. Für Anwendungen im Bereich der Biophysik ergaben neueste Forschungen, die sich mit der Adhäsion von Fibroblasten auf LiTaO_3 beschäftigten, dass Zellen Bereiche mit starken E-Feld Gradienten (Domänengrenzen) meiden [197]. Die Adhäsion von Fibroblasten auf polarisiertem LiNbO_3 ergab, trotz erhöhter Sterberate der Zellen, eine erhöhte Migrationsrate auf positiv gepolten c^+ -Domänen verglichen zu negativ gepolten c^- -Domänen [198]. In dieser Arbeit soll nun ein Ansatz zur Untersuchung der Adhäsion und gezielten Migration von SaOs-2 Zellen auf polarisierten Domänen entwickelt werden. Dazu wird zuerst durch manuelles und automatisiertes Polen die gewünschte Mikrostruktur in die entsprechenden Domänen auf das Substrat übertragen. Anschließend wird die erfolgreiche Polung über nichtinvasive Polarisationsmikroskopie, sowie invasives, selektives Ätzen der Domäne nachgewiesen. In einem ersten Experiment sollen dann die Wechselwirkungen der Domänen und Domänenwände auf das Zellverhalten untersucht werden.

5.3.2 Versuchskomponenten und Präparation

Strukturierung der Proben

Zur ferroelektrischen Polarisation wird hier LiNbO_3 Z-Cut verwendet. Die Proben haben eine Dicke von $d = 500 \mu\text{m}$ und eine Fläche von $17.5 \text{ mm} \times 17.5 \text{ mm}$. Die Strukturierung der Proben erfolgt durch ein photolithographisches Verfahren unter Verwendung eines Positivlacks (Microposit S1813 Photo Resist, Shipley) (siehe Kapitel 6). Die $1.3 \mu\text{m}$ dicke Lackstruktur dient während der Polarisation als Isolationsschicht und ist nur auf einer Seite der Probe aufgebracht. Als Struktur wird hier ein Mäander Muster mit einer Linienbreite von $b = 200 \mu\text{m}$ gewählt.

Polarisationskammer

Der Aufbau der Polarisationskammer ist in Abb. 5.7 zu sehen. Die vorbereitete Probe wird zwischen zwei Dichtungsringen eingebaut und die beiden inneren Kammern mit einer LiCl -Flüssigelektrode befüllt. Der Elektrolyt hat eine Ionenkonzentration von 750 g/l . Zwei Stabelektroden werden in die entsprechenden Öffnungen eingeführt und sind an ein Netzteil

angeschlossen. Zur Polarisation von LiNbO_3 wird eine hohe Spannung (10 - 12 kV) benötigt. Um Durchschläge zu vermeiden, ist die innere Polkammer mit Isolieröl (Silikon-Öl BTR 50, QUAX GmbH) umgeben und wird durch einen zweiten Dichtungsring abgedichtet. Die Polarisation kann, sowohl manuell, als auch automatisch (siehe Abschnitt 5.3.3) durchgeführt werden.

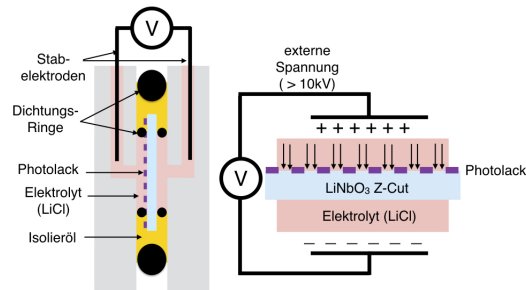


Abbildung 5.7: Schematischer Aufbau der Polarisationskammer. Das strukturierte Substrat wird in der Kammer durch zwei Dichtungsringe (rechts und links) positioniert. Der Elektrolyt wird in die Kammer gefüllt und mit Stabelektroden leitend versehen. Die innere Polkammer wird von einer zweiten Kammer, welche mit Isolieröl gefüllt ist, umgeben um Spannungsüberschläge zu vermeiden.

Zellkultur und Zellsuspension

Um das Verhalten der Zellen auf ferroelektrisch polarisierten Domänen zu untersuchen, wurde die gleiche Zellsuspension wie in 5.2.2 verwendet.

Auf den Proben wird mit Silikonpaste die PDMS-Kammer mit einem Füllvolumen von 1.2 ml (vgl Abschnitt 4.2) befestigt. Die Zellsuspension wird direkt in die Kammer gegeben. Danach haben die Zellen 6 h Zeit zu adhären. Anschließend wird die Zellsuspension entfernt, die Kammer mit frischem, zellfreiem Medium befüllt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Proben werden bei wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 bei $T = 37^\circ\text{C}$ inkubiert. Alle 6 h wird ein Mikroskopbild aufgenommen.

5.3.3 Polarisation und Nachweis der Domänen

In diesem Experiment soll das Verhalten von Zellen hinsichtlich ihrer Adhäsion und Migration auf ferroelektrisch polarisierten Domänen erforscht werden. Dafür eignet sich LiNbO_3 Z-Cut, welches sich entlang der Z-Achse in c^+ und c^- -Domäne polarisieren lässt. Im folgenden wird die Durchführung der automatischen Polarisation beschrieben. Anschließend sollen die polarisierten Domänen über zwei Methoden nachgewiesen werden. Der nicht-invasive Nachweis gelingt mit Hilfe von Polfiltern. Ein invasives Flußsäure(HF)-Ätzen und anschließendes Betrachten der Oberfläche mit einem AFM soll die verschiedenen Domänen sichtbar machen.

Polarisation

Um eine strukturierte Polarisation der Proben zu erhalten, wird hier ein Verfahren mit Flüssigelektroden verwendet, welches bereits vielfach Anwendung findet [195, 196, 199]. Die Polarisation der Proben soll zunächst manuell durchgeführt werden, um die Funktionsweise dieses Verfahrens zu testen, und die entsprechenden Parameter wie Polspannung, Stromstärke und Polzeit anzupassen. Als Spannungsquelle wird das Probus4 HCL 14-20000 (fug GmbH) Hochspannungsnetzwerkgerät verwendet. Die Koerzitivfeldstärke in LiNbO_3 beträgt 21 kV mm^{-1} [193]. Bei einer Substratdicke von $d = 0.5 \text{ mm}$ beträgt die Polspannung 10.5 kV . Weiterhin ist bei der Polung zu beachten, dass es nach Abschaltung des elektrischen Feldes zum Umklappen der Domäne kommen kann, und die Polarisation verloren geht. Um dieses Ereignis zu vermeiden, muss die Spannung während des Polvorgangs für eine bestimmte Zeit konstant gehalten werden. Diese Zeit ist abhängig von der Fläche und der Stromstärke. Bei der verwendeten Mäanderstruktur beträgt sie $A_{pol} = 0.26 \text{ mm}^2$. Daraus ergibt sich eine Ladung von $Q_{berechnet} = 2 \times 0.78 \text{ } \mu\text{C mm}^{-2} \times 0.26 \text{ mm}^2 = 0.406 \text{ } \mu\text{C}$ und bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA , eine Polzeit:

$$t = Q_{berechnet} / I_{Polung} = 0.369 \text{ } \mu\text{C} / 400 \text{ } \mu\text{A} = 0.92 \text{ ms.}$$

Eine Reihe von Experimenten ergab, dass eine Polarisation nur bei einer angelegten Spannung zwischen $10 - 12 \text{ kV}$ stattfand. Bei höheren Spannungen kam es zu Überschlügen und es konnte keine Polarisation beobachtet werden. Weiterhin führen die stark piezoelektrischen Eigenschaften von LiNbO_3 dazu, dass es durch Anlegen der Hochspannung zu einer Deformation des Kristalls kommt und dieser in der Kammer bricht. Folglich bedarf es einer kontinuierlichen Erhöhung der Spannung, um Risse im Substrat und somit Durchschläge zu vermeiden.

Aus diesen Ergebnissen wurde ein LabView Programm zur automatischen Polung entwickelt, bei dem die Polspannung V_{pol} , der Begrenzungsstrom I_{pol} (hier: $400 \text{ } \mu\text{A}$), die Spannungsrampe (hier: 25 V/s sowie die Polzeit (60 s) eingestellt werden. Eine genaue Anleitung findet sich in Kapitel 6. In Abb. 5.8 a) ist eine von dem LabView Programm aufgezeichnete Stromspannungs-Stromstärke-Kurve (UI-Kurve) für den Polungsvorgang einer Probe zu sehen. Während die Spannung kontinuierlich gesteigert wird steigt die Stromstärke nur gering an. Erst bei Beginn der Polung, ab circa 10 kV , beginnt der Strom durch die Probe zu fließen und I_{pol} steigt auf $200 \text{ } \mu\text{A}$. Es kommt zur Polarisation. Abb. 5.8 b) zeigt den UI-Verlauf einer defekten Probe. Während des Polungsvorgangs kommt es zu einem Durchschlag, was sichtbar wird in einem starken Anstieg der Stromstärke und dem rapiden Abfall der Polspannung.

Nachweis durch optische Polarisationsfilter

Ein Nachweis der Domänenstruktur ist durch optische Polarisationsmikroskopie möglich. Bei dieser Methode handelt es sich um ein nichtinvasives Verfahren, die Oberfläche der Proben wird folglich nicht beschädigt [200]. Die Probe wird dabei zwischen zwei um 90° verdrehte Polarisatoren gebracht. Aufgrund seiner doppelbrechenden Eigenschaften können transparente, ferroelektrische Materialien das einfallende, linear polarisierte Licht in eine elliptische Polarisation überführen. Folglich passiert nur noch ein Teil der Intensität den

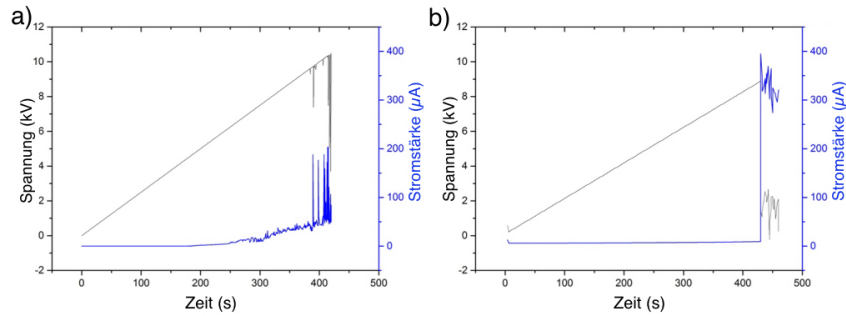


Abbildung 5.8: a) Stromspannung/-stärke Kennlinie (UI-Kennlinie) der automatischen Polarisation im zeitlichen Verlauf. b) UI-Kennlinie bei einem elektrischen Durchschlag in der Probe. Die Polarisation ist hier fehlgeschlagen.

zweiten Polfilter (Analysator). Wichtig ist dabei, dass sowohl Polarisations- als auch Ausbreitungsrichtung des einfallenden Strahls nicht mit der optischen Achse zusammenfallen. Für c^+ und c^- -Domänen entstehen in Abwesenheit externer elektrischer oder mechanischer Verspannungen kein Kontrast, da hier Einfallrichtung und Spontanpolarisation parallel auf dieselbe optische Achse fallen. Für das einfallende, linear polarisierte Licht wirkt der ordentliche Brechungsindex und der Polarisationszustand bleibt nach dem Durchlaufen des Mediums erhalten [201]. Zwar führt die Polarisation in LiNbO_3 entlang der Z -Achse nur zu c^+ und c^- -Domänen, dennoch kann über den elektrooptischen Effekt dieser Kontrastmechanismus genutzt werden. Während der Polarisation entstehen im Kristall elektrische Felder entlang der z -Achse, in denen sich der ordentliche Brechungsindex n_0 dann entsprechend auf $n_0 + \Delta n$ und $n_0 - \Delta n$ in beiden c -Domänen ändert. Die Domänenstruktur wird zu einem Phasenobjekt und kann abgebildet werden [202]. In Abb. 5.9 ist die Domänenstruktur einer polarisierten Probe bei 2.5-facher Vergrößerung zu sehen. Mit Hilfe der Durchlichtmikroskopie und den beiden Polfiltern können durch Betrachtung des Phasenkontrastes die Domänenwände als helle Linien beobachtet werden. Die hellen Flächen zeigen die polarisierten Domänen. Die vereinzelt hellen Punkte zeigen Mikrorisse und Defekte im Kristall. Ob es sich bei den Domänen um c^+ - oder c^- -Domänen handelt, ist mit diesem Verfahren nicht möglich, da die antiparallelen Domänen senkrecht zur Oberfläche liegen. Eine optische Unterscheidung kann erst durch mechanische Verformung des Kristalls, (z.B. durch anlegen eines elektrischen Feldes) oder durch beleuchten mit einem schräg einfallendem Lichtstrahl durchgeführt werden [203].

Nachweis durch domänensensitives Ätzen

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis der polarisierten Proben stellt das domänensensitive Ätzen dar. Hierbei handelt es sich um ein destruktives Verfahren, welches auch zur Mikrostrukturierung von ferroelektrischen Materialien genutzt wird [204, 205]. Die Proben werden dazu für 15 min in hochkonzentrierte (48 %) HF gelegt und anschließend mit destilliertem Wasser gereinigt. In LiNbO_3 liegt die Ätzrate (Materialabtrag pro Zeiteinheit) für die c^- -Domänen höher als für die c^+ -Domänen. Nicht polarisierte Bereiche sind

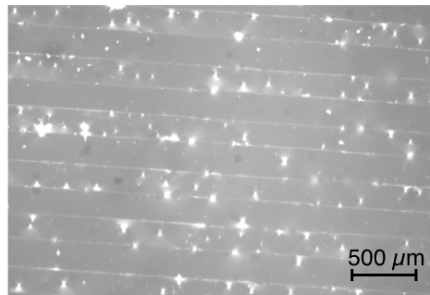


Abbildung 5.9: Mikroskopaufnahme der polarisierten Domänen. Durch die verwendeten Polfilter können die Domängrenzen der 200 μm breiten Mäanderstruktur sichtbar gemacht werden. Die einzelnen hellen Punkte sind Kristalldefekte und Risse an der Oberfläche.

nahezu resistent gegen HF. Als Ursache für das selektive Ätzen wird angenommen, dass die Aufnahme von Protonen aus der Säure und anschließende Reaktionen mit HF_2^- verstärkt an den c^- -Domänen stattfindet [206]. Folglich lässt sich die Domänstruktur auf eine korrespondierende Topographie der Oberfläche übertragen, welche dann mittels AFM vermessen wird. Abb. 5.10 zeigt einen Oberflächenscan mittels AFM der polarisierte und anschließend geätzte Probe. Obwohl beide Proben polarisiert wurden (Nachweis über Polarisationsfilter), zeigt nur die HF geätzte Probe eine Stufe an der Domängrenze von c^- zur neutralen Domäne auf. Diese Stufe hat einen Höhenunterschied von $84 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$. Für die unbehandelte Probe kann eine allgemeine Oberflächenrauigkeit von $R_q = 0.17 \text{ nm}$ bestimmt werden (AFM Aufnahmen nicht gezeigt). Folglich hat die Polarisation ohne anschließendes Ätzverfahren keine Auswirkung auf die Topographie.

Aus den vorgestellten Ergebnisse geht hervor, dass sich LiNbO_3 Z-Cut senkrecht zur Oberfläche mikrostrukturiert elektrisch polarisieren lässt. Dabei hat die Polarisation keinen direkten Einfluss auf die topographische Oberflächenstruktur. Dennoch können die Domänen durch selektives Ätzen sichtbar gemacht und so für topographische Mikrostrukturierungen genutzt werden.

5.3.4 Zellwachstum auf ferroelektrisch gepolten Domänen

Nach erfolgreichem Polarisieren der Substrate gilt es nun das Zellverhalten hinsichtlich ihrer Adhäsion und Migration auf den polarisierten Domänen zu untersuchen. Da Zellmembranen in der Regel ein negatives Zetapotential aufweisen [53, 74], soll hier erforscht werden, ob die Zellen die elektrischen Felder der Substrate spüren und sich entsprechend ausrichten oder Domängrenzen gar komplett meiden. Zunächst wird dafür die Zellsuspension auf dem Substrat verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 6 h sind die ersten Zellen auf dem gesamten Substrat adhärirt und beginnen zu spreiten. Aus den Mikroskopaufnahmen (siehe Abb. 5.11) geht hervor, dass durch zufälliges Aussäen der Zellen zunächst keine bevorzugte Adhäsion auf den polarisierten Domänen oder an den Domängrenzen beobachtet werden kann.

Die ersten Versuche, Zellen gezielt auf polarisierten Substraten zu kultivieren, konnten

keinen Aufschluss darüber geben, ob die Zellen das elektrische Feld der Domänen oder die Domänengrenzen spüren. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die entstandenen elektrischen Felder der polarisierten Bereiche nicht stark genug waren oder sogar durch die Ionen im Nährmedium abgeschirmt wurden. Mit der erfolgreichen Polarisation und den verschiedenen Nachweismethoden wurde eine gute Basis zur Untersuchung des Einflusses polarisierter Domäne auf das Zellverhalten gelegt. In weiterführenden Studien könnten diese Wechselwirkungen ausführlich erforscht und die Migration und Proliferation im Verlauf der Zeit beobachtet werden. Die ferroelektrische Lithographie lässt sich auch für Nanostrukturen und Barrieren weiterentwickeln.

5.3.5 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurden die ferroelektrischen Eigenschaften von LiNbO_3 genutzt, um strukturierte, polarisierte Domänen herzustellen, und diese als Pfad für gerichtetes Zellwachstum zu nutzen. Nach erfolgreichem Polarisieren, sowohl manuell als auch automatisch mit einem dafür entwickelten LabView Programm, wurden die Strukturen durch Polarisationsmikroskopie nachgewiesen. Weiterhin konnte nach der Polarisation durch domänenselektives HF-Ätzen die photolithographisch erstellte Struktur in eine 3D Topographie auf das Substrat übertragen werden. Die geätzten Domänen wiesen einen Höhenunterschied von bis zu 80 nm gegenüber nicht polarisierten Bereichen auf. Zum Schluss sollte die Zelladhäsion und -migration auf den polarisierten Substraten untersucht werden. Hier galt es herauszufinden, ob sich die SaOs-2 Zellen ähnlich wie Fibroblasten auf c^+ -Domänen anhaften oder Domängrenzen meiden. Zwar konnte in ersten Studien kein selektives Zellwachstum beobachtet werden, dennoch könnte ein punktuelleres Aussehen auf den Domängrenzen und eine längere Kultivierung der Zellen auf dem Substrat neue Erkenntnisse bezüglich einer präferierten Migrationsrichtung geben. Es wäre auch interessant, das Verhalten anderer Zellkulturen, wie Fibroblasten oder Neuronalzellen, bezüglich eines gerichteten Wachstums zu untersuchen. Weiterhin lässt sich die Mikrostrukturierung durch Polarisation und das HF-Ätzen als Technik für Nanokanälen und Barrieren zur gezielten Positionierung von Zellen bzw. gerichtetem Zellwachstum weiterentwickeln.

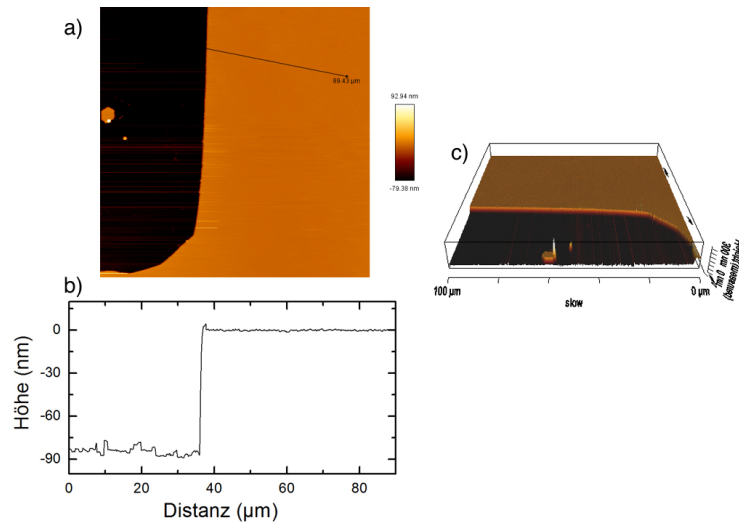


Abbildung 5.10: Nachweis der Polarisation durch selektives HF-Ätzen und Vermessung der Topographie mittels AFM. a) Oberflächenscan b) Rauigkeitsprofil und c) 3dimensionale Darstellung der polarisierten Probe nach HF-Ätzen. Die Proben zeigen an den Domänengrenzen eine Stufe von $84 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$. Ungeätzte Proben weisen trotz Polarisation keine Änderungen der Oberflächenstruktur auf.

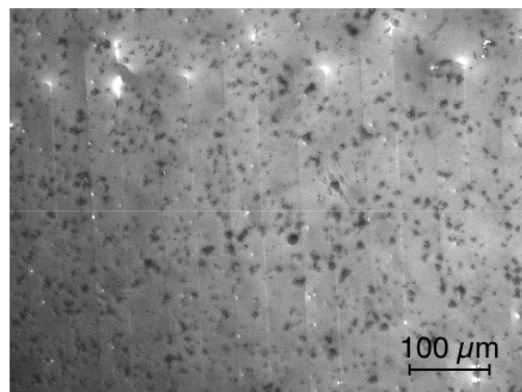


Abbildung 5.11: Adhärenz Zellen auf polarisiertem LiNbO₃ mit c^- -Domänen und neutralen Bereichen. Mikroskopaufnahme nach einer Inkubationszeit von $t_{Ink} = 24 \text{ h}$. Es kann kein selektives Verhalten der Zellen festgestellt werden.

5.4 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Studie wurden zwei Ansätze entwickelt um die gerichtete Zellmigration zu kontrollieren. Dazu galt es zwei unterschiedliche Verfahren anzuwenden. Zum einen wurden hydrophile Strukturen auf hydrophoben Oberflächen hergestellt und das Adhäsions- und Proliferationsverhalten von SaOs-2 Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, dass auf einer alternierenden Streifenstruktur die Zellen, bei zufälliger Aussaat, hydrophobe Bereiche meiden und nur auf den hydrophilen Linien adhären. Die Breite der Linien hatte keinen Einfluss, solange sie mindestens der Größe der Zellen entsprachen (15 μm). Als zweites Muster wurde eine Ratschenstruktur gewählt, welche bereits in nano- und mikrotopographischen Experimenten zu einer gerichteten Migration führte [31]. Hier wurde gezeigt, dass die Zellen wieder die hydrophoben Flächen meiden. Weiterhin wurde auch eine stärkere Polarisierung der Zellen an den Randgebieten der Dreiecksstruktur beobachtet. Die gefundenen Ergebnisse deuten auf eine erfolgreiche Anwendung für gerichtetes Zellwachstum hin. Als weiterführende Studie wäre es daher interessant, die Öffnungen und den Abstand der Ratschenstruktur zu verändern und in *in situ* Experimenten die Migration zeitaufgelöst zu untersuchen und daraus die Migrationsgeschwindigkeit zu charakterisieren. Der zweite Teil dieses Kapitels beschäftigte sich mit der elektrischen Polarisierung von ferroelektrischen Materialien und dem anschließenden Adhäsions- und Migrationsverhalten von Zellen auf den strukturierten Oberflächen. Hier wurde zunächst LiNbO_3 entlang seiner z-Achse polarisiert. Anschließend konnte die Polarisierung durch zwei verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Zum einen konnte über nichtinvasive optische Polarisationsfilter die Struktur betrachtet werden. Zum anderen konnten durch selektives HF-Ätzen die polarisierten Domäne auch topographisch mit einem AFM nachgewiesen werden. So bildeten sich auf den negativ gepolten c^- -Domänen ca. 80 nm tiefe Bereiche. Bei ersten Versuchen mit Zellen auf den polarisierten, ungeätzten Proben konnten jedoch keine Ergebnisse über eine domänenspezifische Adhäsion erbracht werden. Für zukünftige Studien wäre es auch hier interessant, eine Langzeitstudie zur Migration von verschiedenen Zellen auf polarisierten Substraten zu untersuchen. Gerade von Fibroblasten ist bekannt, dass diese, bei angelegten externen E-Feldern, in Richtung der Anoden wachsen [24]. Durch die domänensensitiven Ätzraten könnte dieses Verfahren auch dazu genutzt werden, um offene Nanokanäle oder Barrieren für gerichtetes Zellwachstum herzustellen. Die Erkenntnisse aus diesen Studien haben gezeigt, dass sowohl durch Veränderung der Benetzbarkeit einer Oberfläche, wie auch durch ferroelektrische Polarisierung Substrate in ihren Eigenschaften so verändert werden können, dass sie für ein gerichtetes Zellwachstum Verwendung finden. Diese Techniken könnten zum Beispiel für intelligente Implantate genutzt werden, um eine bestmögliche Osseointegration zu erzielen, aber auch im Bereich von künstlicher Gewebezüchtung, um ein kontrolliertes und gezieltes Besiedeln des Gerüsts zu erreichen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von SaOs-2 Zellen hinsichtlich ihrer Adhäsion und Migration zur Lösung biophysikalischer Fragestellungen und medizinischer Anwendungen untersucht. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Verwendung von akustische Oberflächenwellen als aktives Werkzeug zur Zellmanipulation. Hier wurden die mechanischen und elektrische Komponenten einer Welle zur direkten Zellmanipulation, sowie die induzierten akustischen Strömungen zur Generierung von Scherkräften auf adhärenzte Zellen verwendet.

Dazu wurde zunächst der mikrofluidische Messaufbau 'DANI' weiterentwickelt, um das Adhäsionsverhalten von SaOs-2 Zellen auf medizinischen Titanproben hinsichtlich Änderungen der physiologischen Bedingungen, wie pH-Wert und Temperatur zu untersuchen und das Verhalten über die physiologisch auftretenden Bereiche hinaus zu ermitteln. Das Optimum für adhärenzte Zellen ergab sich bei $T = 37\text{ °C}$ und $\text{pH} = 7.4$. Weiterhin zeigte sich, dass steigende Temperaturen und sinkender pH-Wert eine stärkere Ablösung der Zellen bewirken als niedrige Temperaturen oder hohe pH-Werte. Die Grenzen innerhalb derer überhaupt Zelladhäsion auf Titanimplantaten vorliegt, wurden bestimmt zu $4.5 < \text{pH} < 9.0$ und $T < 43\text{ °C}$. Der Einfluss der Oberflächenrauigkeit zeigte ein Maximum der Zelladhäsion bei $R_q = 3.76\text{ }\mu\text{m}$ unter statischen Bedingungen und die geringste Ablöserate bei $R_q = 22\text{ nm}$ unter dynamischen Bedingungen. Mit der entwickelten Software PIVDAC gelang es die zeitlich dokumentierte Ablösung der Zellen mit der lokal vorherrschenden Scherrate zu korrelieren und so scherratenspezifische Ablöseraten zu ermitteln. Aus dieser Größe konnte dann die kritische Scherrate $\dot{\gamma}_0$ bestimmt werden, die die minimale Scherrate beschreibt um die Zellen abzulösen. Diese Ergebnisse konnten dann in einem thermodynamischem Modell für diesen hydrodynamisch induzierten Deadhäsionsprozess aufgestellt werden, welches drei Bereiche der Ablöseraten (linear, exponentiell, linear steigend) mit steigender Scherrate beschreibt. Das Modell konnte zum Schluss an neuartigen Implantatmaterialien mit DLC-Modifikation verifiziert werden.

Bisher hatte sich die Adhäsionsstudie nur auf SaOs-2 Zellen *in vitro* gestützt. Aus diesem Grund sollten für weiterführende Forschungen und die Verifizierung der scherratenabhängige Ablösungen weitere adhärenzte Zelllinien untersucht werden. Da sich die hier vorgestellte Technik mit der Osseointegration von Implantaten ins Knochengewebe befasst, wäre die Verwendung von Osteoblasten und Fibroblasten naheliegend. Durch die knochenbildenden Osteoblasten könnte der Anhaftungsprozess *in vitro* modelliert, oder mit Fibroblasten die Auswirkungen der Implantatproben auf das Weichteilgewebe untersucht werden. Um Einblicke in die reale Osseointegration zu erhalten, würde es sich empfehlen, Vergleiche mit *in vivo* Studien zu ziehen und etwaige Korrelationen zu bestimmen. Bisher werden die meisten Implantate in verschiedenen Tierversuchen [207] oder durch Bewegungsexperimente am Patienten [208] getestet. Der vorgestellte Aufbau könnte so als Vorstudie für

neu entwickelte Materialien dienen und die Anzahl an Tierversuchen reduzieren. Aufgrund der einfachen Handhabung und des Anpassens der biologischen Umgebungsbedingungen (Variation von Temperatur und pH-Wert), könnte auch das Anhaften von Viren und Bakterien mit diesem Aufbau untersucht werden. Bakterien können schließlich durch die Ausbildung eines Biofilms auf den Implantatflächen Entzündungen und Infektionen hervorrufen und so zum Implantatversagen führen [209]. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung von Materialien mit modifizierten Oberflächen anzubringen. Hier wurden in detaillierten Studien DLC beschichtete Proben untersucht, die aufgrund von implantierten Silberionen und deren zeitlicher Freisetzung in das umliegende Medium, bakterielle Infektionen durch die antiseptischen Eigenschaften verhindern können [131]. Neben den bereits getesteten Silberionen sollte im weiteren Schritt die Verwendung von Zinkoxid oder Kupfer, die für ihre selektive Toxizität bekannt sind [165] untersucht werden. Daraus könnten sich dann neue Materialien für funktionale Implantate ergeben.

Bisher wurden nur die makroskopischen Eigenschaften der Zelladhäsion untersucht. Dabei wurden Wechselwirkungen zwischen den Zellen außer acht gelassen. Mit der hier verwendeten Zelldichte ist unter idealen Inkubationsbedingungen (37 °C , $\text{pH} = 7.4$, $R_1 = 3.76\text{ }\mu\text{m}$) ca. 30 % der Oberfläche einer Titanprobe mit Zellen besiedelt. Zellstudien, die sich mit der Adhäsion beschäftigten, haben jedoch gezeigt, dass die Zellen umso stärker spreiten können, je größer die freie Fläche ist [9, 61, 113]. Für eine genaue Studie des Adhäsionsprozesses einzelner Zellen wäre es hier angebracht, die Zelldichten zu variieren und so den Einfluss der Zellen untereinander zu bestimmen. Diese Ergebnisse könnten dann mit einer bereits existenten Modellierung (z.B. Comsol Multiphysics) über die Minderung der Scherkraft auf eine Zelle durch eine zweite oder mehrere Zellen verglichen werden [210]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der mikrofluidische Aufbau das Potential zur Untersuchung und Charakterisierung von Adhäsionsphänomenen verschiedener Organismen (Zellen, Bakterien, Viren) in physiologisch veränderbarer Umgebung, auf diversen Oberflächen und modifizierten Proben besitzt und somit ein großes Potential für die zukünftige Implantatsforschung bietet.

Neben der ausführlichen Studie zum Adhäsionsprozess von Zellen beschäftigte sich die hier vorgelegte Arbeit mit der Migration von Zellen und deren positiven Stimulation im Hinblick auf eine schnelle Regeneration von verletztem Gewebe. Aufgrund ihrer mechanischen Auslenkung der Oberfläche und dem erzeugten elektrischen Feld wurde die SAW zur Manipulation der Migration verwendet. Mit einem 'Wound Healing Assay' konnte hier gezeigt werden, dass Zellen, die sich im Schallpfad einer Oberflächenwelle (mit Wellenlänge $\lambda \approx 25\text{ }\mu\text{m} \sim$ Größe der Zellen) befinden, eine um bis zu 17 % höhere Migrationsgeschwindigkeit aufweisen als Zellen ohne direkte SAW Behandlung. In weiteren Experimente konnten sekundäre Einflussfaktoren der SAW, wie lokaler Temperaturanstieg, ballistische Verschiebung oder ein lokal erhöhtes Nährstoffangebot ausgeschlossen werden. Um das Potential dieser neu entdeckten Stimulation für extra- und intrakorporale Anwendungen zu nutzen, wurden Ansätze zur Übertragung der aktiven Zellstimulation mittels SAW auf flexible Substrate entwickelt. Durch Aufbringen einer piezoelektrischen ZnO-Schicht konnten SAW auf diversen Materialien erzeugt und ihre Biokompatibilität experimentell bestätigt werden.

Bislang zeigte sich nur eine optimale Einkopplung der Erzeugung von SAW auf ZnO-

Schichten auf einem Trägermaterial aus Aluminiumfolie. Aluminium ist jedoch bekannt für seine Toxizität [211]. Für eine Weiterentwicklung des 'SAW-healing patches' müssten daher Ansätze für eine bessere Biointegration für Aluminium oder alternative Substrate gefunden werden. Eine Möglichkeit bestände darin, bioinerte Lacke oder Beschichtungen als Deckschicht aufzubringen, die gleichzeitig die IDT Struktur schützen. Auch Titan, welches sich als Hauptelement für Endoprothesen seit Jahren bewährt hat [212], könnte, als Folie verwendet, ein gutes Substrat zur aktiven Zellstimulation durch SAW darstellen. Möchte man hingegen auf silikonbasierten Werkstoffen weiterarbeiten, so wäre hier die Idee andere Wellenmoden als die Rayleigh Welle zu verwenden. Viele elektronische Anwendungen auf flexiblen Substraten basieren z.B. auf Lamb-Wellen, Scherwellen oder Sezawa-Wellen [163, 164]. Durch Verwendung dieser Herstellungsverfahren, könnte durch Anpassung der PDMS Schichtdicke und zusätzlichem Ausheilen der piezoelektrischen ZnO Schicht die SAW Einkopplung verbessert werden, vorausgesetzt, dass die Wellenmoden eine biologische Wirksamkeit zeigen.

Neben der beschleunigten Wundheilung könnte diese Life-on-a-Chip Technik auch auf andere Zellstudien ausgeweitet werden. So ließe sich der durch die SAW vibrierenden Untergrund auf mesenchymale Stammzellen anwenden. Diese differenzieren, je nach mechanischer und chemischer Beschaffenheit des Substrats, in Osteoblasten (bei hartem Untergrund) oder Fibroblasten (bei weichem Untergrund) [213, 214]. Die Fragestellung mit diesem Aufbau könnte folglich lauten, was mit Zellen passiert, die sich zwar auf einem harten Untergrund befinden, der jedoch durch die propagierende Wellen periodisch ausgelenkt wird. Da die Frequenz der Anregung abhängig von der Wellenlänge λ ist, könnte durch eine zusätzliche Modulationen der SAW-Amplitude, z.B. durch pulsatile Anregung die Differenzierung gezielt stimuliert werden.

In den Experimenten zeigte sich, dass sowohl die mechanische als auch die elektrische Komponente, einen Beitrag zum beschleunigten Zellwachstum liefern. Zudem ist bekannt, dass Neuronen die Anwesenheit von elektrischen Feldern spüren [24]. Die SAW generiert ein E-Feld, welches sowohl laterale als auch transversale Anteile enthält. So könnte die Kombination aus lateralem E-Feld und mechanischer Wellenausbreitung auf das richtungsorientierte Wachstum von z.B. Neuronen untersucht werden.

Um das Richtungswachstum der Zellen zu beeinflussen, könnte der SAW-Chip durch Verwendung anderer IDT Strukturen (verjüngter, fokussierender IDT) das Richtungswachstum der Zellen weiterentwickelt werden. Diese gezielte Manipulation der Migrationsrichtung kann für die Erhaltung und schnelle Regeneration von Gewebe einen entscheidenden Beitrag leisten. Dieser dritte Aspekt, die gezielte Migration, wurde durch die Entwicklung zweier weiteren Methoden beleuchtet. Für die erste Methode wurde dazu die Affinität adhärenter Zellen für hydrophile Substrate genutzt um ein gerichtetes Wachstum auf hydrophil/hydrophob strukturierten Oberflächen zu erzielen. Dabei konnte eine erhöhte Migration der Zellen auf den hydrophilen und eine Aversion vor hydrophoben Bereichen festgestellt werden. Die größte Herausforderung bei hydrophob/hydrophilen Strukturen ist die Sichtbarkeit der entsprechenden Bereiche, was eine gezielte Positionierung der Zellen erheblich erschwert. Weiterhin ist durch die konstruktionsbedingt offene Kammer eine Kontamination nicht ausgeschlossen. Um eine genaue Aussage über die Migrationsgeschwindigkeit und -richtung, sowie deren Beeinflussung treffen zu können, sollte für weitere Experimente das Design des

Aufbaus entsprechend angepasst werden. So könnte ein Kanalsystem aufgebracht werden, welches die Zellen zu den Migrationsstartpunkten führt.

Das zweite Verfahren zur gezielten Migration basierte auf der Mikrostrukturierung des Oberflächenpotentials. Dazu wurde ferroelektrisches LiNbO_3 polarisiert und die Domänenstrukturen durch invasive und nichtinvasive Verfahren nachgewiesen. Ob die Zellen die elektrischen Felder spüren, konnte bislang in dieser Studie nicht eindeutig nachgewiesen werden. Dennoch war ein HF selektives Ätzen der c^- -Domäne erfolgreich und so konnten mit dem AFM ca. 80 nm tiefe Stufen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten folglich zu einem neuen Herstellungsverfahren für Nanokanäle und Barrieren verwendet werden. Diese Barrieren könnten dann wiederum als Tracks zur genauen Zellpositionierung für die hydrophil strukturierten Substrat genutzt werden. Dabei basiert die Idee auf der bereits erfolgreichen Methode, Zellen durch Nanobarrieren und Mikrostrukturierung gerichtet migrieren zu lassen [30, 31]. Im Gegensatz zu diesen Techniken, würde die Silanisierung von Oberflächen weder die topographischen (Durotaxis) noch die chemischen (Chemotaxis) Eigenschaften beeinflussen. Auch sollte hier der Ratscheneffekt [31] mit unterschiedlichen Zellen auf hydrophil strukturierten Substraten näher untersucht werden, um eine Aussage über die bevorzugte Migrationsrichtung zu treffen. Dazu bietet es sich an, in weiterführenden Experimenten die Migrationsrichtung, unter Verwendung eines Mikroskopinkubators und punktueller Aufbringungen von Zellen in einem Langzeitexperiment zu untersuchen. Ferner noch, kann in weiterführenden Studien auch das Adhäsionsverhalten von unterschiedlichen Zellen auf den ferroelektrisch polarisierten Domänen betrachtet werden. Zeigt sich hier ein domäne selektives Anhaften, würde es sich anbieten diese Technik der Domänenhaftung für Life-on-a-Chip Anwendungen oder gegebenenfalls funktionale Implantate zu untersuchen.

Zusammenfassend hat die vorgelegte Arbeit gezeigt, dass durch die Verwendung von akustischen Oberflächenwellen, sowie den Einsatz von strukturierten Oberflächen, eine Manipulation von Zellen hinsichtlich der Adhäsion, Migrationsgeschwindigkeit und -richtung möglich ist. Die vorgestellten Ergebnisse lassen sich für biomedizinische Anwendungen weiterentwickeln und bieten so die Möglichkeit, medizinische Implantate in ihrer Osseointegration zu unterstützen und gleichzeitig die Wundheilung zu fördern. Sie können aber auch für mikroskopische Untersuchungen des Zellverhaltens verwendet werden und so zum Verständnis biologischer Prozesse beitragen.

Anhänge

Anhang A - Probenherstellung

Optische Lithographie

Zur Vorbereitung der IDT Strukturen und ferroelektrisch gepolten Domäne.

Auftragen des Photolacks:

- Shipley S 1813 Positivlack: Beleuchtetes wird beim entwickeln abgetragen
- ma-N 1420 (micro resist technology GmbH) Negativlack: Beleuchtetes bleibt beim entwickeln stehen
- Bei Verwendung von LiNbO_3 128 ° rot Y-Cut, Proben in X-Laufrichtung durch zwei Ecken (Pfeildarstellung) mit einem Glasschneider markieren
- Substrat mit Aceton, Isopropanol, dest. Wasser reinigen, anschließend mit N_2 trocknen.
- Substrat in der Lackschleuder (Spin Coater) mittig platzieren und Vakuumpumpe zum fixieren anschalten.
- Mit einer Glaspipette den Lack (aus eigener Flasche) auf das Substrat aufbringen. In den Ecken beginnen und alles zusammenfließen lassen.

Spin Coater

- Step: Programmteil mit den folgenden einstellbaren Eigenschaften:
 - RPM: Anzahl der Umdrehungen pro Minute
 - Stepping/Rampe: Anzahl der Sekunden in denen auf Maximalgeschwindigkeit beschleunigt wird
 - Time: Zeit in Sekunden auf MaximalgeschwindigkeitNicht benötigte Programmschritte werden durch Time = 0 ausgeschaltet. Nur die Programmreihenfolge muss beachtet werden, Programmplatz ist nicht wichtig.
- Einstellung für eine 1,3 μm dicke Lackschichte:
 1. RPM: 500, Rampe: 5, Time: 5
 2. RPM: 5000, Rampe: 9, Time: 30

Heizplatte

- Heizplatte vorheizen auf 120 °C für S 1813 oder 100 °C für ma-N 1420
- Nach dem Belacken können die Proben Lackreste an der Unterseite aufweisen. Diese können mit einem Reinraumtuch und Aceton vorsichtig entfernt werden
- Probe in eine Glasschale legen (vorher auf die Heizplatte legen)
- Probe für 2 Minuten backen, dann mit der Glasschale herunternehmen und ca. 5 min auskühlen lassen.
- Lackschicht auf Homogenität überprüfen. Bei Rückständen von Lösemitteln können Fettaugen entstehen. Dann Lack mit Aceton entfernen und wieder von vorne beginnen.

Mask-Aligner

- 30 min vor Gebrauch einschalten (ON/OFF Knopf) zur Vorheizung der Lampe.
- Vor Beginn, auf STANDBYE/WAKE-UP drücken (Pneumatisches Geräusch, Bereitschaft)
- Maske positionieren (Vorher mit Aceton, Isoprop., dest. Wasser und N₂ reinigen
 - Passenden Maskenhalter an Luftschlauch anstecken und VAKUUM MASK Taste betätigen
 - Verchromte oder beschichtete Seite immer nach Unten auf die Probe zeigend einbauen (Minimierung von Abbildungsfehlern)
- Ausgekühlte Probe auf die Probenhalterung legen
- Bei Proben ab einer Mindestgröße von 17.5 mm mit dem Lichtfokus (der Mikroskopteinheit) auf Kante anfangen. Verschiebung der XY-Einheit des Mask-Aligners ist auf 10 mm beschränkt.
- Proben aufeinander anpassen. LiNbO₃ ist als helle Kante im Mikroskop sichtbar.
- Z-Schraube auf Anschlag hochfahren, Soft- und Hardkontakt Hebel betätigen, bis KONTAKT Lampe leuchtet.
- Belichten: S1813 1x 23s / ma-N 1420 1x 90 s
- Hardkontakt- dann Softkontakthebel zurückstellen und Probe entnehmen.
- Maske nach jedem zweiten Belichten reinigen um Abbildungsfehler zu vermeiden.

Entwickeln der Probe

- Mit E351 für S1813

E351 wird in der Mischung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt, wenn nicht bereits angemischt (EP1 Lösemittelschrank)

Zum Entwickeln 1 x 20 s mit Pinzette im Entwickler schwenken, 20 s in dest. Wasser (als Stop-Bad), dann mit N₂ trocknen. Struktur unter dem Mikroskop kontrollieren.

- Mit D 533S

D 533S pur verwenden.

Zum entwickeln 1 x 60 s mit Pinzette in Entwickler schwenken, anschließend in dest. Wasser legen (als Stop-bad). Mit N₂ trocken und bei kleinen Strukturen unter dem Mikroskop betrachten. Wurde der Lack (an den späteren hydrophoben Bereichen) nicht vollständig entfernt, nochmals für 20 s entwickeln. Sind die Strukturen zu schmal, kann sich die Lackstruktur ablösen.

- Mit Chrometch für Chrommasken

Befindet sich im EP1 Schrank, unverdünnt verwenden

2 x je 30 s die Chromprobe, nach entwickeln wie S1813 in Chrometch schwenken. Dazwischen 30 s in dest. Wasser (als Stop Bad). Mit dest. Wasser abspülen und N₂ trocken.

Dünnschichtverfahren

Lab Ash

Zur Vorbereitung und Reinigung der Substrate für die anschließenden Dünnschichtverfahren.
Anleitung für LabAsh Reinraum Ebene 1

- Proben für 1 Minute bei 500 mTorr O₂ und 400 W Leistung plasmaätzen.
- Labash anschalten (Drehschalter) und unter 100 mTorr abpumpen lassen.
- Vac-Valve drücken (Licht aus), dann ist die Pumpe von der Kammer getrennt.
- Vent-Valve drücken (Licht an), Nadelventil nicht verstellen. Kammer wird belüftet.
- Kammer öffnen, Glasschale entnehmen. Proben auf die Glasschale legen. Achtung Proben sollten sich nicht überlagern! Proben anschließend in den Labash zurück legen und Kammer schließen.
- Vent-Valve drücken (Licht aus, Belüftung gestoppt), Vac-Valve an (Licht an, Kammer wird abgepumpt bis ein Vakuum unter 50 mTorr erreicht ist).

- Gashahn für gewünschtes Gas aufdrehen (O₂ für Probenreinigung), anschließend an der Konsole das entsprechende Gas-Valve öffnen (Licht an) und gewünschten Druck über das zugehörige Nadelventil einstellen.
- Plasmaleistung und Dauer einstellen, dann auf START drücken.
- Zusatz: Bei niedrigen Leistungen und Zeiten (P < 150 W, T < 20 s) kann das Plasma manchmal nicht zünden. Zur Vermeidung kann anfangs die Leistung manuell kurz erhöht werden, bis das Plasma zündet. Anschließend wird die Leistung wieder verringert.
- Nach Ablauf der Plasmazeit auf STOP drücken und das Gas-Valve schließen. Die Kammer kurz abpumpen lassen um Ätzgase (vor allem Ozon) abzuführen.
- Wird ein Vakuumdruck von ca. 50 mTorr erreicht, kann Vac-Valve wieder ausgeschaltet und die Kammer über Vent-Valve belüftet werden.
- Proben entnehmen und anschließend wieder Vent-Valve ausstellen und Kammer abpumpen (Vac-Valve) bis ca. 50 mTorr. Hauptschalter ausschalten und Ätzgas wieder abdrehen.

Elektronenstrahlverdampfen

Die Benutzung der Esther darf nicht OHNE Einweisung erfolgen und muss im Webkalender reserviert werden. Eine Kurzanleitung befindet sich in der Ablage bei der Esther.

- Esther zuerst belüften (Esther muss nach dem Gebrauch immer abgepumpt werden!). Dazu am Kontrollbildschirm auf 'vent' drücken.
- Die belackten und gelashten Proben auf den Probenhalter (Metallplatten 5x5cm) befestigen. Die Struktur darf dabei nicht bedeckt sein und zu den Bohrungen auf der Metallplatte ein paar mm Abstand halten.
- Lässt sich die Esther problemlos öffnen, können die Proben eingebaut werden. Diese werden an die mittlere Position mit einer kurzen Schraube (ca. 20 mm lang, Imbus) pro Metallplatte befestigt. Proben zur Seite drehen und Shutter so positionieren, dass die Öffnung unter der Kühlung ist.
- Überprüfen ob die Tiegel mit den aufzudampfenden Materialien (Au, Ti, ...) an der entsprechenden Stelle sind.
- Kammer reinigen: Aussaugen und mit einem Reinraumtuch mit Isoprop abwischen. Die Ränder der Esther, sowie das Dichtungsband reinigen. Achtung: Dichtungsband muss unbedingt überprüft und bei Wellenbildung zurecht gedrückt werden um Luftlecks zu vermeiden.
- Glasscheiben zusätzlich kontrollieren und bei starker Beschichtung austauschen.

- Esther schließen und im Kontrollbildschirm: 'seal' und 'cycle' drücken. Die Kammer wird nun abgepumpt. Sobald das System vom 'Rough Pumping' in den 'Fine Pumping' Modus wechselt (max. 10 min, erkennbar am Geräusch) kann der Reinraum verlassen werden.
- Vor Prozessbeginn den Druck überprüfen. Dieser sollte mindestens unter 10^{-5} mbar sein (Abpumpen für ca. 1 1/2h).
- Am Kontrollmonitor 'Process' betätigen. Der Druck steigt kurz an und sinkt dann wieder ab.
- Wobbler einschalten (XY), Dann auf 'Gun on' schalten. Sobald das Lämpchen brennt, kann die Spannung langsam aufgedreht werden. Anleitung zum Aufdampfen und Reihenfolge befindet sich im Tray der Esther
- Für die Herstellung von IDTs sollten die folgenden Parameter beachtet werden:
 - Aufdampfen von 10 nm Titan mit Rate 0.1 nm/s als Haftvermittler
 - Aufdampfen von 50 nm Titan mit Rate 0.1 nm/s
 - Optional: Aufdampfen von 10 nm Titan mit Rate 0.1 nm/s als Haftvermittler, wenn auf der Probe eine Glasschutzschicht aufgebracht werden soll.
- Nach dem Aufdampfen langsam die Spannung runter drehen und den Tiegel auskühlen lassen, bevor das nächste Material aufgedampft wird.
- Zum herausnehmen der Probe, die Esther wieder belüften. Dann Esther reinigen und erneut abpumpen.
- Für den Lift-off, die Proben für mindestens 6 h, am besten über Nacht in DMSO legen. Dabei die Proben schräg mit beschichteter Seite nach unten stellen.
- Anschließend das DMSO durch Isoprop. ersetzen. ACHTUNG! Die Proben sollten so kurz wie möglich an Luft sein, da sonst der Lift-off Prozess gestoppt und die Struktur nicht frei wird. Proben in Isoprop. für ca. 5 Minuten ins Ultraschallbad stellen, anschließend mit Isoprop und dest. Wasser abspülen und mit N₂ trocknen.
- Vor dem Vermessen mit dem Networkanalyser (Oder danach wenn das Signal nur schwach ausgeprägt ist) können die Probe kurz durch Anlegen einer Gleichspannung mit 5 V (auch 12 V möglich) an die Zuleitungen von Überresten der aufgedampften Schichten frei gebrannt werden.

Thermisches Aufdampfen

Auch für das thermische Aufdampfen gilt, dass die Esther Nutzung erst nach Einweisung erlaubt ist und im Webkalender reserviert werden muss! Wie beim e-Strahl Verdampfen, muss auch hier entsprechend die Esther gereinigt und abgepumpt werden.

- Die Proben werden hier identisch zum e-Strahl aufdampfen auf den Probenhaltern befestigt. Die Zuleitungen müssen allerdings zuvor für die spätere Kontaktierung entweder mit Alufolie oder Photolack abgedeckt werden.
- Die Proben werden so auf der Aufhängung positioniert, dass sie möglichst nahe am Schwingquarz 2 (Schichtdickenmesser) sind. Der Shutter wird beim thermischen Verdampfen ausgebaut.
- Für das thermische Verdampfen wird ein Schiffchen verwendet. Dabei darauf achten, dass sich nur SiO Pulver (schwarz, glänzend) in dem SiO-Schiffchen befindet. Sonst kann es zu Kontaminationen und entsprechend Nichtausbildung der Glasschicht kommen. Lässt sich beim therm. Verdampfen durch extrem hohe benötigte Stromstärke feststellen.
- Das Schiffchen wird in die Halterung eingeschraubt. Die Schmelztiegel für das e-Strahlverdampfen abdecken.
- Kammer reinigen, schließen und abpumpen.
- Nach Erreichen des Prozessdrucks ($< 10^{-5}$ mbar, kann die Stromstärke langsam hochgedreht werden. Bei einer Stromstärke von 50-60 A sollte eine Aufdampfrate von 0.3 nm/s vorliegen, wobei die Rate je nach Füllstand des Schiffchens Schwankungen unterliegt.
- Nach aufdampfen der SiO-Schicht (am besten schon ca. 20 nm vor Erreichen der gewünschten Schichtdicke stoppen), die Spannung langsam herunterdrehen und die Kammer noch für ein paar Minuten auskühlen lassen, bevor die Probe entnommen wird.
- Zwar existiert eine Abdeckung für das SiO-Schiffchen, dennoch empfiehlt es sich, das Schiffchen auszubauen um Kontaminationen der Tiegel beim e-Strahl Verdampfen zu vermeiden.
- Shutter zurückbauen, Esther reinigen und abpumpen.

HF Sputtern

Durch HF-Sputtern lassen sich piezoelektrische ZnO-Schichten auf verschiedenen Substraten aufbringen. Dieses Dünnschichtverfahren wurde an der Cambridge University in der 'Electrical Engineering Division' mit der RF-Sputteranlage HiTUS gemacht (siehe Anleitung [215]). Hier werden nur die prinzipiellen Schritte aufgeführt.

- Da die Sputteranlage über keinen Schichtdickenmesser verfügt, muss zuerst auf einer Silizium-Wafer Probe eine dünne Schicht für eine bestimmte Zeit (ca. 15min) aufgetragen und diese anhand eines Proliferometers vermessen werden. Aus der Schichtdicke und der Sputterzeit lässt sich entsprechend die Sputterrate ermitteln. Diese muss bei jedem Einsetzen eines neuen Targets (Zn für ZnO) erledigt werden.

- Zur Vorbereitung der Proben müssen diese gründlich mit Aceton, Isoprop und dest. Wasser gereinigt und mit N₂ getrocknet werden.
- Gereinigte Proben auf den Probenhaltern mit Kapton[®] Klebeband an den Ecken befestigen.
- Wenn sich die Probenkammer öffnen lässt (belüftet), kann die Probe in der Mitte über dem Target eingebaut werden. Vor dem Schließen der Kammer überprüfen, ob der Shutter auch geschlossen ist. Dies führt sonst zu falschen Sputterraten und möglichen Kontaminationen in der aufgesputterten ZnO -Schicht durch die Oxidschicht auf dem Zn-Target.
- Anschließend die Kammer bis auf einen Druck von $p \leq 10^{-6}$ bar abgepumpen.
- Vor Sputterbeginn das Prozessgas (O₂ für ZnO) einschalten.
- Im Modul den entsprechenden Prozess einstellen und die Sputterzeit eingeben. Prozess starten.
- Nach zünden des Plasmas wird zu Beginn das Target durch abputtern der Oxid-Schicht gereinigt. Nach ca. 10 min öffnet sich der Shutter automatisch und der Sputterprozess beginnt für die eingestellte Zeit.
- Ist die Sputterzeit abgelaufen, schließt die Maschine automatisch den Shutter und das Plasma schaltet sich aus.
- Die Kammer kann belüftet und die Probe anschließend entnommen werden.
- Kammer wieder reinigen, schließen und abpumpen.

Hydrophobe und hydrophile Strukturen

Zur Herstellung von hydrophilen und hydrophoben Strukturen, muss stets zuerst die hydrophobe Behandlung erfolgen! Wird nur eine Oberflächenmodifikation benötigt, kann das Protokoll an gegebener Stellen beachtet werden.

Herstellung hydrophober Oberflächen

- Handschuhe verwenden und nicht in die Kammer atmen. Die Chemikalien sind ätzende Flüssigkeiten und Gase!
- Anschalten der Pumpe und abpumpen des Aufbaus bis < 1mbar bei geschlossenem Exsikkator.
- Schläuche 2-3 mal mit N₂ spülen und wieder abpumpen
- Exsikkatorbelüftung öffnen und restliche Dämpfe abpumpen lassen. Nochmals 1-2 mal mit N₂ spülen.

- Pumpe ausschalten und den Exsikkator mit N₂ spülen. Wurde Normaldruck (10³ mbar) erreicht, kann der Deckel geöffnet werden. N₂ Spülung nicht ausschalten!
- Mit einem Tuch den Exsikkator und das Uhrglas reinigen. Dichtungsring kontrollieren und gegebenenfalls mit Silikonpaste einschmieren (Sonst kann Luft in den Exsikkator eindringen und die Chemikalie flockt aus).
- Proben in einer Glasschale in den Exsikkator legen.
- ca. 500 µl Perfluorodecyltrichlorosilan (abcr GmbH) mit einer Glaspipette auf das Uhrglas tropfen. Die Chemikalie ist stark hygroskopisch und kann beim Kontakt mit Luft leicht ausflocken. Daher Flasche nur für kurze Zeit offen lassen.
- Exsikkator verschließen, N₂ abdrehen und Pumpe wieder anstellen. Ist der Unterdruck niedrig genug, 1-2 mal mit N₂ spülen und wieder abpumpen. Stellt sich schließlich ein Druck von max. 1 mbar ein, kann die Exsikkatorbelüftung verschlossen werden.
- Schläuche nochmal 2-3 mal mit N₂ spülen und System abpumpen. Dann Pumpe ausschalten.
- Die Proben müssen für mindestens 24 h im Exsikkator bleiben.
- Zum herausnehmen der Proben, die selben Schritte wie beim Einbauen beachten. Befindet sich noch Restflüssigkeit auf dem Uhrglas, wird diese mit einem Tuch aufgewischt und der Exsikkator gereinigt. Ist die Flüssigkeit weiß oder ausgeflockt, hat sie vermutlich Wasser gezogen. Die Proben könnten dann entsprechend nicht ausreichend silanisiert sein.
- Die funktionsfähigen Proben können mit Isoprop. oder EtOH und dest. Wasser gereinigt werden, um Rückstände zu entfernen.

Herstellung hydrophiler Oberflächen

- Wird eine hydrophob/hydrophile Struktur hergestellt, kann nun der Lack, der sich auf den hydrophilen Bereichen befindet, mit Aceton entfernt werden. Die Proben dabei gründlich reinigen und von Fett- und Wasserflecken befreien.
- Soll die Probe komplett hydrophil sein, wird die gereinigte Probe direkt in den entsprechenden Exsikkator eingebaut.
- Die Vorgehensweise ist hier identisch zur hydrophoben Strukturierung.
- Als Chemikalie werden ca. 500 µl 3-Glycidyloxypropyl-)trimethoxysilan (abcr GmbH) verwendet.
- Die Hydrophilierung der Proben benötigt mindestens 2 Tage, bei reinen hydrophilen Proben und 3 Tage bei gemischten Strukturen.
- Nach dem Ausbau der Proben, können diese mit Isoprop oder EtOH gereinigt werden.

Die Strukturierung ist nur durch anhauchen oder bedampfen mit Wasser sichtbar.

Ferroelektrische Polarisation

- HCL 14-20000 starten und 'Programming' auf 'Digital' stellen.
- Das Programm befindet sich im Hauptorder mit dem Namen 'New with timing'. Die anderen Files werden zur Ausführung benötigt (bedingt durch LabView und Gerätehersteller)
- Nach Öffnen der Software, zuerst die Parameter einstellen, dann das Programm starten. Nach Programmstart können keine Änderungen mehr vorgenommen werden.
- Parameter
 - Gerät auf ON stellen.
 - Polarisation einstellen: Positiv (keine Änderungen). Negative Polung ist mit dem Probus 4 derzeit nicht möglich.
 - Address: Auf 8 stellen (default von Probus4)
 - Delay [*ms*]: beschreibt den Zeitunterschied zwischen Schreib- und Leseoperation und wird gebraucht, da die Steuerung sonst den Lesebefehl vor dem Schreibbefehl erhält und keine Funktionen ausführt. Am besten auf 25 ms stellen.
 - Voltage [*V*]: Maximale Spannung die während der Rampe erreicht werden soll.
 - Limiting Current [*A*]: ideal auf 0.0004 (0.4 mA) stellen.
 - Ramp [*V/s*]: 25 oder 50
 - Voltage Peak Time [*s*]: Dauer bei der die Maximalspannung während des Polungsvorgangs gehalten werden soll. Für optimale Ergebnisse 60 s.
 - File Name: Benennung der Messung. Sollte die Messung nicht umbenannt werden, wird die alte Messung überschrieben. Der default path ist im Unterordner 'data' im Hauptordner.
- Current Voltage Setting: zeigt die Stromspannung, welche das VI auf den Probus4 schreibt. Erhöht sich die Spannung, bleibt auf der Geräteanzeige jedoch konstant, ist ein Fehler aufgetreten (Undicht, etc.). Die Anzeigen müssen zur Kontrolle während des Polvorgangs kontrolliert werden.
- Der Polvorgang geschieht in 3 Etappen:
 - Ramping: Die Spannung steigt entsprechend der eingestellten Rampe. Ist die Maximalspannung erreicht, oder der 'Stop Ramping' Knopf wird betätigt, wird dieser Prozess beendet.
 - Polarisation: Die Spannung wird auf dem Maximalwert (oder Wert bei 'Stop Ramping') konstant gehalten, bis die Polarisationszeit: 'Voltage peak time' abgelaufen ist oder der Knopf 'Stop Polarisation' betätigt wird.
 - End: Die Spannung wird auf 0 zurückgefahren um die Polarisation zu beenden.

-
- ‘Stop Ramping’: Rampe wird unterbrochen um dann direkt zur Polarisierung zu schalten, wenn die eigentliche Polarisierung (Stromfluss bei ca. 250 mA) bereits vor Erreichen der Maximalspannung beginnt.
 - ‘Stop Polarisation’: beendet die konstant gehaltene Polspannung, wenn die Polung bereits abgeschlossen ist (Funkenbildung hat aufgehört), oder es zum Durchschlag bzw. Zerschlagen der Probe kommt.
 - Steigt die Stromstärke schnell an und die Spannung fällt dabei ab, ist die Polarisierung fehlgeschlagen.

Anhang B - Zellkultur

- UV Licht an Sterilbank ca. 15-30 min vor Betrieb anschalten (Schlüssel auf 2 drehen)
- Nährmedium DMEM und Trypsin in Wärmebad auf 37 °C erwärmen.
- Sterilbank öffnen, Lüftung einschalten (Schlüssel Position 1), UV Licht aus, die Lampe einschalten.
- Altes Medium vollständig mit einer Pipette (5/10 ml) entfernen
- Zellschicht mit ca. 3 ml DPBS spülen (vorsichtig von oben über die Zellen laufen lassen, kurz schwenken, aus unterer Ecke absaugen).
- 1ml Trypsin-EDTA Lösung (vwr tubes) auf die Zellen geben und auf dem gesamten Boden durch vorsichtiges Schwenken verteilen
- Inkubieren für 5-6 min bei 37°C, 5 % wassergesättigten Atmosphäre
- Neue Flask vorbereiten: 6ml Nährmedium einfüllen. Beschriftung: Datum/Zellname/Passage und Nummer/Teilungsverhältnis/Name
- Flask herausholen und leicht gegen die Handballen klopfen um die Zellen vollständig zu lösen
- Trypsin mit 4ml neuem Nährmedium ablöschen. Dazu: vorsichtig von oben über den Boden fließen lassen, untere Ecke aufsaugen und erneut drüber rinnen lassen (ca. 3-4 mal). Zellen anschließen in ein vwr Tube füllen.
- 500 µm der Zellsuspension in die neue Flask geben und zurück in den Inkubator stellen.

Anhang C - Experimentdurchführung

Zelladhäsion

Vorbereitung des Experiments

- 50 µl Zellsuspension in ein kleines Eppendorf Tube (500 µl) füllen und zum Zählen beiseite legen (Neubauer Zählkammer). Restliche Zellsuspension bei 300 rpm für 10 min zentrifugieren.
- Den Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernen. Dabei keinesfalls den Zellpellet berühren.
- Zellpellet anschließend in 1 ml Nährmedium vollständig resuspendieren
- 1 ml Flüssigkeit mit 300.000 Zellen herstellen (Mischung aus reinem Nährmedium und Zellsuspension) in Eppendorf 1.5 ml Tube mischen.
- 1-1,5 µl Farbstoff Calcein Green AM in die Tubes geben und bei offenem Deckel die Zellen für ca. 30min inkubieren.
- Probenkammer vorbereiten: steril verpackte Implantatprobe mit zu untersuchender Seite in den PDMS Ring stecken.
- 200 µl des angefärbten Zellmediums in die Probenkammer geben und für 60 min im Inkubator adhären lassen.
- Für die Messung jeweils 1,5 ml Nährmedium in Eppis abfüllen.

Überprüfung der Technik/ des Aufbaus

- IDT Test und Frequenzbestimmung: Frequenzanalysator einschalten, Channel 3 wählen. Modus wählen -> Reflexion Port 1 oder 2, je nach Anschluss, Startfrequenz :100 MHz, Stoppfrequenz : 200 MHz wählen, Rescale -> Autoscale, Marker search -> min Mode, Wert notieren. Reflexion sollte nie -10 dBm unterschreiten
- Mikroskop einschalten, Filter Blue wählen, Polfilter einschieben und auf 0 drehen, Bild auf links - camera schalten, Fluoreszenzlampe + XY-Tisch einschalten, Kamera aufbauen (Hamamatsu Fire Wire), Einlegscheiben Alu überprüfen, Frequenzgenerator Frequenz (Freq) sowie Leistung (Level) eingeben, Verstärker hat +18, Atenuator -3dBm => +13dBm am FG, Wärmebad auf eingestellte Temperatur und Endstück prüfen (28°C + 9°C durch IDT => 37°C). Ebenfalls empfehlenswert: Software HC Image öffnen und Messprogramm öffnen, Bild überprüfen (Software hängt sich hier gerne das erste mal auf), Belichtung anpassen Auto Gain/Exposure time.
- DANI Vorbereiten: IDT Chip einlegen, Halterung mit Schrauben vorbereiten, Anpassen der Messkammer mittels Feinjustierschrauben, IDT sollte in der Mitte der Probe sein.

Messvorbereitung

- Stopuhr auf 10 min stellen!
- Probe (Im PDMS Ring) aus dem Inkubator nehmen
- Zellsuspension vorsichtig absaugen, dabei möglichst nicht über die Oberfläche kratzen.
- Einmal die Kammer mit ca 100-200 µl reinem Nährmedium spülen und wieder absaugen
- Probenkammer in die Halterung geben und mit frischen Nährmedium befüllen, bis sich eine Kuppel bildet, ebenfalls 100 µl auf den IDT-Chip geben.
- Probekammer mit Halterung in DANI einbauen und fest verschrauben. Überprüfung auf Luftblasen. Sind welche zu sehen, erneut öffnen und von vorne beginnen.
- DANI ins Mikroskop einklemmen. Halterung muss einrastet, dann mit XY-Tisch so verfahren, dass das Objektiv 2.5 x (brauner Ring) in der Mitte der Kammer liegt. Wärmebad anschrauben und auf Dichtigkeit prüfen, Innenkammer mit dest. Wasser füllen. SMA Kabel an die Platine schrauben. Verstärker einstecken, Frequenzgenerator noch nicht anschalten.
- Software: Camera: Live: Am Mikroskop scharf stellen und Position anpassen (links ca. fingerbreiter Steg auf dem Kamera Bild, IDT Finger mittig). Belichtung anpassen: Auto Exposure, Camera Live: Abort.
- Speicherort der Messung wählen
- Zeit ist abgelaufen, Frequenzgenerator anschalten und danach direkt Messprogramm starten.

Abbau, Reinigung und Tipps

- Abbau: Frequenzgenerator Freq off, Verstärker ausstecken, Wärmebad abschalten; dann kann abgebaut werden.
- Reinigung: Probenkammer in EtOH + dest. Wasser ca. 70:30 (zum abtöten von Bakterien und Viren Mischungsverhältnis beachten) Gemisch für 10-15 min im Ultraschallbad reinigen. IDT nur mit EtOH und anschließend mit dest. Wasser abspülen. Mit N₂ trocken blasen. Sollten doch starke Reste zurückbleiben, vorsichtig mit einem Fussel-freien Tuch (bsp Sterilbank) und Isoprop oder EtOH abreiben. Anschließend wieder mit EtOH und Wasser abspülen und mit N₂ trocknen.
- Reinigung Sterilbank: Pipettenspitzen Behälter ausleeren und mit EtOH/H₂O ausspritzen. Eppendorf Pipetten mit Desinfektionsmittel abwischen. Desinfektionsmittel auf die Oberflächen geben und mit neuem Tuch abwischen, auch unter der Ablage wischen. Nährmedium und Trypsin fest verschließen und mit Parafilm abdichten - im

Kühlschrank lagern. Sterielbank schließen und UV Lampe für min. 30 min einschalten (Schlüssel auf Position 2 - Lüftung aus)

- Tipps: Bei mehreren Messungen kann ca. 10 min vor den Messvorbereitungen die nächste Probe angefärbt werden. Abbau und Reinigung benötigt ca. 10 Minuten, daher kann nach 15min Messbeginn bereits die nächste Probe zum Anwachsen gebracht werden.
- Da SaOs-2 Zellen stark adhären sind, verklumpen diese nach einer bestimmten Zeit. Beim anhaften auf dem Implantat tritt dann ein starkes Inselwachstum auf. Es empfiehlt sich mit einer Zellcharge nur 2 Messungen zu machen. Auch sollten pro Messtag die selben Parameter (pH, Temp, Probe, etc.) nur einmal vermessen werden.

Langzeit Zellexperimente

Für die Durchführung von Langzeit Zellexperimenten für Migrations- und Proliferationsstudien und gerichtetes Zellwachstum empfiehlt es sich den Mikroskopinkubator zu verwenden, um ideale Bedingungen für die Zellkultivierung zu gewährleisten (5 % CO₂, 37 °C, wassergesättigte Atmosphäre). Zur Aufnahme der einzelnen Bildausschnitte und für die anschließende Auswertung dient die Software HImage. Die Durchführung ist auf das Zeiss Axiovert 200M beschränkt.

Heizsystem

Zum Heizen wird das Ividi Heizsystem HT 200 verwendet und der entsprechende Mikroskopinkubator. Vor Messbeginn sollte die Probengröße überprüft werden.

- Anschalten des Mikroskops
- Die untere Heizplatte des Mikroskopinkubators auf dem XY-Tisch montieren und den Deckel zum Vorheizen aufsetzen. Bei den Kabeln darauf achten, dass diese ein Verfahren des Tisches nicht behindern.
- Kabel in das Kontrollgerät stecken und dieses einschalten. Der Deckel (Lid) sollte auf 46 °C und die Platte (plate) auf 37,5 °C gestellt sein, um ideale 37 °C in der Zellprobe zu erreichen und ein Beschlagen des Deckels zu vermeiden.
- Das Gaskubationssystem entsprechend der Anleitung [216] aufbauen. Den Druck entsprechend einstellen: CO₂ p = 5 bar, Druckluft p = 1 bar.
- Den Gasmischer einschalten und folgende Parameter einstellen:
 - % CO₂ = 5 %
 - % O₂ = 0 %
 - M l/h = 10 l/h
 - rh% = 105 % (so ist gewährleistet, dass die Luftfeuchtigkeit hoch genug ist)

- Das System benötigt ca. 1 h bis die idealen Inkubationsbedingungen erreicht sind. Dann kann mit dem Experiment begonnen werden.

Durchführung des Experiments

- Die Probe wird in den Inkubator gelegt
- Bei SAW Experimenten müssen die Koaxialkabel durch die entsprechende Öffnung geführt werden.
- Einrichten des Mikroskops: Die besten Zellabbildungen lassen sich über den Phasenkontrast Modus erreichen. Hier PH1 oder PH2 am Zeiss Mikroskop verwenden.
- HImage Software starten
- XY(Z)-Scan Einstellungen anpassen entsprechend:
 - 'Calibration Properties' öffnen
 - Einstellung: 'Units' zu Microns (μm) und 'length' auf 1.
 - Ja nach Vergrößerung, das Verhältnis von Pixel zu μm ('Original Factor') einsetzen. Diese Einstellungen sind wichtig für die Steuerung des XYZ-Tisches.
 - Einstellungen speichern und Tab schließen.
- 'Capture Pane' auswählen, auf 'live' klicken und die Helligkeit einstellen ('calibrate brightness').
- 'Sequence Pane' auswählen
 - 'Scan Type X Y (Z)' einstellen
 - Parameter bei 'Scan Settings' in den einzelnen Boxen anpassen:
 - 'Auto Save', 'CXD' und 'Live Image Display'. 'One file per Position' auswählen.
 - 'Enable Maximum', 'Multipass Scan' und 'Pass Delay' anklicken (Zeit auf 5 min stellen) anklicken
 - Bei Control: 'Continuous' wählen und Save to 'Disk'
- Das Panel 'XYZ Scan' auswählen
 - Zunächst 'Stage Marker' anklicken und testen, ob die 'Live Control' funktioniert. Ein blaues Kreuz markiert den betrachteten Bereich, lässt sich dieser nicht verfahren, muss das Programm neu gestartet werden oder die Voreinstellungen (Pre-settings) überprüft werden.
 - Die Pfeile der 'Stage Orientation' der 'Axis Orientation' müssen so positioniert sein, dass die Spitzen nach oben und links zeigen.
 - Die ROI manuell mit dem XY-Tisch anfahren.

Rechtsklick auf gewünschten Punkt und 'Create View Field' auswählen.

Zweites Sichtfeld erstellen und die XYZ Koordinaten anpassen. Diese sollten zur leichteren Nachbearbeitung immer auf ganze Werte gerundet sein.

Die gesamte ROI mit 'View Fields' abdecken. Eintippen der Koordinaten, platziert das neue Feld immer im Bezug auf das Erste. Die Z-Komponenten dürfen nicht vergessen werden. X und Y Werte für die Nachbearbeitung mit dem ImageJ Makro 'Photomerge' notieren.

Den 'Pfad' durch anklicken und verbinden der Felder definieren. Wichtig dabei ist, die Reihenfolge in der die Bildpositionen zu markiert, da das auch der Reihenfolge der späteren Aufnahmen entspricht.

Zum Schluss auf 'Start' klicken und noch die ersten beiden Messzeitpunkte überprüfen, ob alle Einstellungen und Bilder korrekt sind.

Anhang D - Software

PIVDAC

Der PIVDAC Algorithmus wurde entwickelt, um die zeit- und ortsabhängige Korrelation der Scherraten mit der Ablösung der Zellen vom Substrat im DANI Reaktor zu bestimmen. Die Auswertung erfolgt in 2 Schritten:

Bildbearbeitung mit ImageJ

- Die Aufnahmen werden als *.tiff* Dateien aus HImage exportiert.
- Öffnen von Fiji oder ImageJ und Importieren der Bilder als Stack.
- Anwendung des Makros BATCH_AUTO_TH.ijm auf die Bilder. Das Makro passt den Schwellenwert, den Kontrast, die Schärfe, die Umrechnung von Pixel auf μm an (wenn benötigt) und transformiert die Bilder in ein schwarz-weiß Bild des Stacks. Die Bilder sind jetzt als schwarze Pixel (Zellen) auf weißem Hintergrund gezeigt. Zur Weiterverarbeitung müssen sie noch invertiert werden.
- Den Stack als einzelne Bilder in einem neuen Unterordner (Auswertung) mit neuem Namen (z.B. Messung10.tif) speichern. Die Nummerierung der Bilder erfolgt dabei automatisch.

Scherraten- und Zellablösungs- Korrelation mit Matlab

Nach der Umwandlung der Bilder in sw 8-bit Dateien, kann die Matlab Software verwendet werden. Dazu müssen die entsprechenden Matlabcodes und Textdateien (AJ_Zoning_28dBm.m, SCM_DB_interpolation_03.m und PIV28dBm.txt) sich im selben Ordner befinden.

- Zum Start auf den AJ_Zoning_28dBm.m Code klicken.
 Der Code: SCM_DB_interpolation_03.m behinhaltet die interpolierten und berechneten Scherraten aus den 28 dBm μPIV -Messungen. Diesen nicht verändern.
 Der Code: AJ_Zoning_28dBm.m kombiniert die Bilder mit der Scherratenkarte. Hier können die nachfolgenden Parameter eingestellt werden.

Zeile 10 DI_target_file = Hier wird der Pfad angegeben, bei der sich das Textfile PIV28dBm.txt befindet (und auch die beiden Matlab Codes). Die txt-Datei ist die Scherratenkarte.

Zeile 63 Hier werden die Koordinaten (Aus ImageJ berechnet) entsprechend in Zeile 66 (Rechte Kante des IDTs) und 67 (Mitte der IDT Struktur) angegeben.

Zeile 89 Hier werden die Zelldaten importiert. Zeile 95 (Imagelist = dir) gibt den Namen der Zellbilder an. Die Nummerierung am Schluss der Bilder wird durch ein * ersetzt. In Zeile 96 (folder =) wird der Pfad angegeben wo sich der entsprechende Ordner befindet. Zeile 97 (pic_count) gibt die Anzahl an Bildern die sich im Ordner befinden

an. Ist sie auf 'numel(imagelist)' gestellt, werden alle darin befindlichen Bilder mit der entsprechenden Endung, wie in Zeile 95 angegeben, importiert.

Zeile 146 Hier kann die Anzahl an Scherzonen sowie deren Einteilung (linear, 1/x,...) eingegeben werden. Für eine gute Zellstatistik eignet sich die Einstellung '4' (Zonen) und linear am besten.

Zeile 327 Gibt den Namen des exportierten .txt-files an (Einstellungen und Benennung ab Zeile 360)

Zeile 328 Gibt den Speicherort des Textfiles an. Dieser ist durch 'folder DE_ tar_ filename' so gewählt, dass die Resultate im selben Ordner gespeichert werden, wo sich auch die eingelesenen Bilder befinden.

XX Betätigen des RUN Pfeils lässt die Berechnungen beginnen. Während des Prozesses werden die Einzelnen Bilder als .png Dateien angezeigt.

shear-map-raw: Rohe Scherratenkarte

shear-map-cut: Angepasste und interpolierte Scherrate

plain-shear-zones: Scherzonengraphik

sample-of-cell-start: Anfangsbild des Zellstacks in *sw*

differential-adhesion-and-zones: Superpositionsbild der Zellen zum Zeitpunkt $t = 0$ und $t = 60$ min sowie Überlagerung mit Scherzonen

adhesion-vs-time: Adhärenten Zellen der jeweiligen Zonen im Verlauf der Messzeit

analysis-export.txt: Text Datei mit Messpunkt, Zeit in Minuten, Scherrate, Sigma shear, Zonen mit jeweiligen *sw* Pixel.

Die .txt-Datei kann dann in Origin oder Excel importiert und entsprechend bearbeitet werden. Bei Verwendung des Farbstoffs Calcein-Green AM bleicht der Farbstoff im Verlauf der Messung aus. Um eine genaue Aussage über das Ablöseverhalten ohne natürliches Ausbleichen zu erhalten, muss deshalb die Kalibrierkurve (Zelladhäsion ohne Scherströmung) in Origin von den .txt-Daten abgezogen werden.

Bildbearbeitung zur Migrationsbestimmung

Bildextraktion

Die Einstellung 'One file per Position' wird ein Stack aus Bildern mit Endung .xcd erstellt. Diese kann nur in HImage geöffnet werden. Um die Bilder für die Weiterverarbeitung in .tiff Dateien umzuwandeln, muss HImage verwendet werden.

- File öffnen. Die aktive Ansicht zeigt den aktuellen Stack.
- Rechts klick auf das Bild → 'Export Image Sequence' → 'Display Image'

- Extraktion über folgende Parameter:

Type: 'Image Files'

Speicherort auswählen. Für jeden neuen Stack sollte ein eigener Unterordner verwendet werden. Bei mehreren ROI sollte für jede ROI ein separater Ordner in dem Unterordner erstellt werden. Zum Beispiel:

Folder: SAWChip1 →

Subfolders: Pos1 / Pos2 / Pos3...

Folder: SAWChip2 →

...

Anklicken 'Insert Leading Zone, Renumber Sequentially'

'Ok' klicken, dann werden die Bilder exportiert.

- Die Schritte müssen für jede Datei wiederholt werden.

Macros in ImageJ

Für die Bearbeitung der Bilder zum Sortieren nach Zeit, erstellen eines Gesamtbildes, Verfolgung des Migrationsweges einer Zelle und Auswählen eines Bereichs kann das Programm Fiji von ImageJ kostenfrei heruntergeladen werden. Die Makros müssen separat installiert werden. Dazu die Datei 'Cell-investigator.ijm' in Fiji über 'Plugins → Macros → Install' auswählen.

Macro Folderswitch Das Macro sortiert die Bildstacks aus dem Positionsordner in einen Zeitpunktordner, um so alle Bilder, die zur selben Zeit aufgenommen wurden, zusammenzuführen und entsprechend nach Zeitverlauf zu ordnen. Für die Neusortierung sollten Anfangs- und Zielordner verschieden benannt werden.

Macro Photomerch Mit dem Makro Photomerch werden die zum selben Zeitpunkt aufgenommenen Einzelbilder (Anordnung durch 'Folderswitch') entsprechend ihrer Position zu einem Gesamtbild kombiniert.

Macro Celltracker Mit diesem Makro lässt sich der Migrationsweg einzelner Zellen verfolgen. Dabei wird eine Zelle von Bild zu Bild markiert. Das Makro gibt dann den Migrationsweg wieder.

Macro Extractor Dieses Makro kann verwendet werden, wenn ein Bereich aus dem Bilderstack extrahiert werden soll. So können Filme von unterschiedlichen Positionen des selben Gesamtbildes erstellt werden.

Literatur

- [1] Zeit Online Gesundheit. *BIOTECHNOLOGIE: Wir züchten uns ein Herz*. 2015.
- [2] Welt.de. *Frankenstein-Technik: In Zukunft kommen Organe aus dem Drucker*. 2011.
- [3] The Independent. *Prosthetics: Amputee James Young unveils hi-tech synthetic arm inspired by Metal Gear Solid*. 2016.
- [4] M. Capogrosso u. a. „A brain–spine interface alleviating gait deficits after spinal cord injury in primates“. In: *Nature* 539.7628 (2016), S. 284–288.
- [5] B. Yu, S.-Y. Kang, A. Akthakul, N. Ramadurai, M. Pilkenton, A. Patel, A. Nashat, D. G. Anderson, F. H. Sakamoto, B. A. Gilchrest, R. R. Anderson und R. Langer. „An elastic second skin“. In: *Nature Materials* 15.8 (2016), S. 911–918.
- [6] R. Kmeth. „Ioneninduzierte Polymermodifikation zur Herstellung antimikrobiell wirksamer medizinischer Implantatbeschichtungen“. Diss. 2013.
- [7] N. Harrasser, S. Jüssen, I. J. Banke, R. Kmeth, R. von Eisenhart-Rothe, B. Stritzker, H. Gollwitzer und R. Burgkart. „Antibacterial efficacy of ultrahigh molecular weight polyethylene with silver containing diamond-like surface layers“. In: *AMB Express* 5.1 (2015), S. 64.
- [8] H.-H. Huang, C.-T. Ho, T.-H. Lee, T.-L. Lee, K.-K. Liao und F.-L. Chen. „Effect of surface roughness of ground titanium on initial cell adhesion“. In: *Biomolecular Engineering* 21.3-5 (2004), S. 93–97.
- [9] E. A. Cavalcanti-Adam, T. Volberg, A. Micoulet, H. Kessler, B. Geiger und J. P. Spatz. „Cell Spreading and Focal Adhesion Dynamics Are Regulated by Spacing of Integrin Ligands“. In: *Biophysical Journal* 92.8 (2007), S. 2964–2974.
- [10] L. Weiss. „Cell contact phenomena“. In: *In vitro* (1970), S. 48–78.
- [11] S. Usami, H.-H. Chen, Y. Zhao, S. Chien und R. Skalak. „Design and construction of a linear shear stress flow chamber“. In: *Annals of Biomedical Engineering* 21.1 (1993), S. 77–83.
- [12] A. Hartmann, M. Stamp, R. Kmeth, S. Buchegger, B. Stritzker, B. Saldamli, R. Burgkart, M. F. Schneider und A. Wixforth. „A novel tool for dynamic cell adhesion studies – the De-Adhesion Number Investigator DANI“. In: *Lab Chip* 14.3 (2014), S. 542–546.
- [13] M. F. Schneider, Z. Guttenberg, S. W. Schneider, K. Sritharan, V. M. Myles, U. Pamukci und A. Wixforth. „An Acoustically Driven Microliter Flow Chamber on a Chip (μ FCC) for Cell–Cell and Cell–Surface Interaction Studies“. In: *ChemPhysChem* 9.4 (2008), S. 641–645.

- [14] A. Bussonnière, Y. Miron, M. Baudoin, O. Bou Matar, M. Grandbois, P. Charette und A. Renaudin. „Cell detachment and label-free cell sorting using modulated surface acoustic waves (SAWs) in droplet-based microfluidics“. In: *Lab on a Chip* 14.18 (2014), S. 3556.
- [15] M. Nine, D. Choudhury, A. Hee, R. Mootanah und N. Osman. „Wear Debris Characterization and Corresponding Biological Response: Artificial Hip and Knee Joints“. In: *Materials* 7.2 (2014), S. 980–1016.
- [16] A. Pye, D. Lockhart, M. Dawson, C. Murray und A. Smith. „A review of dental implants and infection“. In: *Journal of Hospital Infection* 72.2 (2009), S. 104–110.
- [17] P. S. Malchesky. „Artificial Organs 2015: A Year in Review“. In: *Artificial Organs* 40.3 (2016), S. 294–321.
- [18] H. Li, J. R. Friend und L. Y. Yeo. „A scaffold cell seeding method driven by surface acoustic waves“. In: *Biomaterials* 28.28 (2007), S. 4098–4104.
- [19] H. G. Knoch. „Beitrag zur Wirkungsweise der Ultraschallenergie“. In: *Schriften der Med. Akademie Dresden* 6 (1967), S. 81–87.
- [20] W. Klug, W.-g. Franke und H.-g. Knoch. „Scintigraphic control of bone-fracture healing under ultrasonic stimulation : An animal experimental study“. In: (1986), S. 494–497.
- [21] T. K. Kristiansen, J. P. Ryaby, J. McCabe, J. J. Frey und L. R. Roe. „Accelerated Healing of Distal Radial Fractures with the Use of Specific, Low-Intensity Ultrasound. A Multicenter, Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study“. In: *The Journal of Bone and Joint surgery* 79.7 (1997), S. 961–973.
- [22] A. Binder, G. Hodge, A. M. Greenwood, B. L. Hazleman und D. P. Page Thomas. „Is therapeutic ultrasound effective in treating soft tissue lesions?“ In: *British medical journal* 290.6467 (1985), S. 512–514.
- [23] B. Y. L. Hinkle, C. D. Mccaig und K. R. Robinson. „THE DIRECTION OF GROWTH OF DIFFERENTIATING NEURONES AND MYOBLASTS FROM FROG EMBRYOS IN AN APPLIED ELECTRIC FIELD“. In: *Journal of physiology* 50.314 (1981), S. 121–135.
- [24] K. R. Robinson. „The responses of cells to electrical fields: a review“. In: *The Journal of Cell Biology* 101.6 (1985), S. 2023–2027.
- [25] D. Man, B. Man und H. Plosker. „The influence of permanent magnetic field therapy on wound healing in suction lipectomy patient; a double-blind study..pdf“. In: *Pastic and reconstructive Surgery* 104.07 (1999), S. 2261 –2266.
- [26] E. K. Paluch, C. M. Nelson, N. Biais, B. Fabry, J. Moeller, B. L. Pruitt, C. Wollnik, G. Kudryasheva, F. Rehfeldt und W. Federle. „Mechanotransduction: use the force(s)“. In: *BMC Biology* 13.1 (2015), S. 47.
- [27] A. J. Ridley. „Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back“. In: *Science* 302.5651 (2003), S. 1704–1709.

- [28] C. P. McCann, P. W. Kriebel, C. A. Parent und W. Losert. „Cell speed, persistence and information transmission during signal relay and collective migration“. In: *Journal of Cell Science* 123.10 (2010), S. 1724–1731.
- [29] M. K. Driscoll, C. McCann, R. Kopace, T. Homan, J. T. Fourkas, C. Parent und W. Losert. „Cell Shape Dynamics: From Waves to Migration“. In: *PLoS Computational Biology* 8.3 (2012). Hrsg. von J. M. Haugh, e1002392.
- [30] M. K. Driscoll, X. Sun, C. Guven, J. T. Fourkas und W. Losert. „Cellular Contact Guidance through Dynamic Sensing of Nanotopography“. In: *ACS Nano* 8.4 (2014), S. 3546–3555.
- [31] G. Mahmud, C. J. Campbell, K. J. M. Bishop, Y. a. Komarova, O. Chaga, S. Soh, S. Huda, K. Kandere-Grzybowska und B. a. Grzybowski. „Directing cell motions on micropatterned ratchets“. In: *Nature Physics* 5.8 (2009), S. 606–612.
- [32] A. A. Pilla, M. A. Mont, P. R. Nasser, S. A. Khan, M. Figueiredo, J. J. Kaufman und R. S. Siffert. „Non-invasive low-intensity pulsed ultrasound accelerates bone healing in the rabbit“. In: *Journal of Orthopaedic Trauma* 4.3 (1990), S. 246–253.
- [33] M. Dyson und M. Brookes. „Stimulation of bone repair by ultrasound“. In: *Ultrasound in Medicine & Biology* (1982), S. 61–66.
- [34] L. Rayleigh und J. W. Strutt. „On waves propagated along the plane surface of an elastic solid“. In: *Proceedings of the London Mathematical Society* 17.1 (1885), S. 4–11.
- [35] T. Frommelt. „Mischen und Sortieren mit SAW-Fluidik in Simulation und Experiment“. Dissertation. Augsburg, 2007, S. 165.
- [36] J. Neumann. „Sensorische und aktorische Anwendungen akustischer Oberflächenwellen“. Diss. Universität Augsburg, 2009.
- [37] C. J. Strobl. „Mikro- und Nanofluidik auf piezoelektrischen Substraten“. Diss. Ludwig-Maximilians-Universität München, 2005.
- [38] G. Kovacs, M. Anhorn, H. Engan, G. Visintini und C. Ruppel. „Improved material constants for LiNbO₃ and LiTaO₃“. In: *IEEE Symposium on Ultrasonics*. IEEE, 1990, S. 435–438.
- [39] F. J. R. Schülein. „Dynamische Kontrolle optisch aktiver Halbleiter-Quantenpunkte mittels akustischer Oberflächenwellen“. Phd. Augsburg, 2014, S. 210.
- [40] R. M. White und F. W. Voltmer. „Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves“. In: *Applied Physics Letters* 7.12 (1965), S. 314–316.
- [41] D. Ballantine, R. M. White, S. Martin, A. Ricco, E. Zellers, G. Frye und H. Wohltjen. *Acoustic Wave Sensors - Theory, Design, and Physico-Chemical Applications*. Hrsg. von R. Stern und M. Levy. Academic Press, 1997.
- [42] G. Farnell. *Elastic surface waves*. Hrsg. von H. Matthew. New York: Wiley-VCH Verlag GmbH, 1977.

- [43] K. Dransfeld und E. Salzmänn. „Excitation, detection, and attenuation of high-frequency elastic surface waves“. In: *Physical Acoustics* 7 (2012), S. 219–272.
- [44] M. G. Cohen. „Optical Study of Ultrasonic Diffraction and Focusing in Anisotropic Media“. In: *Journal of Applied Physics* 38.10 (1967), S. 3821.
- [45] L. D. Landau und E. M. Lifschitz. *Lehrbuch der theoretischen Physik Band VI - Hydrodynamik*. 1992.
- [46] S. Shiokawa, Y. Matsui und T. Ueda. „Liquid streaming and droplet formation caused by leaky Rayleigh waves“. In: *Proceedings., IEEE Ultrasonics Symposium*. IEEE, 1989, S. 643–646.
- [47] A. Wixforth. „Acoustically Driven Programmable Microfluidics for Biological and Chemical Applications“. In: *Journal of the Association for Laboratory Automation* 11.6 (2006), S. 399–405.
- [48] J. J. Campbell und W. R. Jones. „Propagation of Surface Waves at the Boundary Between a Piezoelectric Crystal and a Fluid Medium“. In: *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics* 17.2 (1970), S. 71–76.
- [49] M. Wiklund. „Ultrasonic Enrichment of Microparticles in Bioaffinity Assays“. Diss. Royal Institute of Technology Stockholm, Sweden, 2004.
- [50] M. Wiklund und H. M. Hertz. „Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays“. In: *Lab on a Chip* 6.10 (2006), S. 1279.
- [51] R. Rambach. „Superposition und Visualisierung von akustischen Oberflächenwellen“. Diplomarbeit. Technische Universität München, 2012.
- [52] R. Virchow. *DIE CELLULARPATHOLOGIE in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. Pathologisches Institut zu Berlin, 1858.
- [53] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter. *Molecular Biology of THE CELL*. Hrsg. von B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts und P. Walter. 4th editio. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2002.
- [54] B. Lüscher und A. Nordheim. „Zellproliferation, Zellzyklus und Apoptose“. In: *Kompendium Internistische Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006, S. 6–17.
- [55] P. a. Hall und D. a. Levison. „Review: assessment of cell proliferation in histological material.“ In: *Journal of Clinical Pathology* 43.3 (1990), S. 184–192.
- [56] S. Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2011.
- [57] T. V. Berghe, N. Vanlangenakker, E. Parthoens, W. Deckers, M. Devos, N. Festjens, C. J. Guerin, U. T. Brunk, W. Declercq und P. Vandenabeele. „Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features“. In: *Cell Death and Differentiation* 17.6 (2010), S. 922–930.

- [58] D. E. Ingber und S. Huang. „The structural and mechanical complexity of cell-growth control“. In: *Nature Cell Biology* 1.5 (1999), E131–E138.
- [59] A. Khalili und M. Ahmad. „A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 16.8 (2015), S. 18149–18184.
- [60] U Seifert und R. Lipowsky. „Morphology of Vesicles“. In: *Science*. Bd. 1. 1995, S. 403–463.
- [61] K. Anselme. „Osteoblast adhesion on biomaterials“. In: *Biomaterials* 21.7 (2000), S. 667–681.
- [62] C. Zhu. „Kinetics and mechanics of cell adhesion“. In: *Journal of Biomechanics* 33.1 (2000), S. 23–33.
- [63] S. Nagahara und T. Matsuda. „Cell-substrate and cell-cell interactions differently regulate cytoskeletal and extracellular matrix protein gene expression“. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 32.4 (1996), S. 677–686.
- [64] E. Sackmann und R. Merkel. *Lehrbuch der Biophysik*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [65] Z. v. Guttenberg. „Zelladhäsion als Benetzungsübergang : Mikrooptische und Mikro-mechanische Untersuchung eines biomimetischen Modellsystems“. Diss. Technische Universität München, 2001.
- [66] L. V. Belousov. „Scott F. Gilbert—Developmental Biology, 2010, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA Ninth Edition“. In: *Russian Journal of Developmental Biology* 42.5 (2011), S. 349–349.
- [67] K. Burton und L. Taylor. „Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata“. In: *Nature* 385.30 (1997), S. 450–454.
- [68] W. Demtröder. *Experimentalphysik Band 1, Mechanik und Wärme*. Kaiserslautern: Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [69] E. Sackmann. „Haftung für Zellen“. In: *Physik Journal* 5.8 (2006), S. 27–34.
- [70] O. Lowenstein. *Advances in Comparative Physiology and Biochemistry*. Hrsg. von F. edition. Elsevier Science, 2012.
- [71] D. Bray. *Cell Movements - from molecules to motility*. Hrsg. von M. Day. second edi. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2001.
- [72] S. V. Plotnikov, A. M. Pasapera, B. Sabass und C. M. Waterman. „Force Fluctuations within Focal Adhesions Mediate ECM-Rigidity Sensing to Guide Directed Cell Migration“. In: *Cell* 151.7 (2012), S. 1513–1527.
- [73] T. Kuboki, W. Chen und S. Kidoaki. „Time-Dependent Migratory Behaviors in the Long-Term Studies of Fibroblast Durotaxis on a Hydrogel Substrate Fabricated with a Soft Band“. In: *Langmuir* 30.21 (2014), S. 6187–6196.
- [74] R. F. Schmidt und G. Thews, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1997.

- [75] L.-I. D. GmbH. *SaOs-2 Zelllinie*.
- [76] K. Myllymaa, S. Myllymaa, H. Korhonen, M. J. Lammi, V. Tiitu und R. Lappalainen. „Interactions between Saos-2 cells and microtextured amorphous diamond or amorphous diamond hybrid coated surfaces with different wettability properties“. In: *Diamond and Related Materials* 18.10 (2009), S. 1294–1300.
- [77] M. Stamp, A. Jötten, P. Kudella, D. Breyer, F. Strobl, T. Geislinger, A. Wixforth und C. Westerhausen. „Exploring the Limits of Cell Adhesion under Shear Stress within Physiological Conditions and beyond on a Chip“. In: *Diagnostics* 6.4 (2016), S. 38.
- [78] O. Indicators. *Health at a Glance 2015*. Health at a Glance. OECD Publishing, 2015.
- [79] S. Kurtz. „Projections of Primary and Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States from 2005 to 2030“. In: *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)* 89.4 (2007), S. 780.
- [80] K. Anselme, M. Bigerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Iost und P. Hardouin. „Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses“. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 49.2 (2000), S. 155–166.
- [81] K. Burridge. „Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between The Extracellular Matrix And The Cytoskeleton“. In: *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 4.1 (1988), S. 487–525.
- [82] J. Y.-J. Shyy. „Role of Integrins in Endothelial Mechanosensing of Shear Stress“. In: *Circulation Research* 91.9 (2002), S. 769–775.
- [83] S. Pellegrin und H. Mellor. „Actin stress fibres“. In: *Journal of Cell Science* 120.20 (2007), S. 3491–3499.
- [84] Y. Hirashima, N. Ishiguro, S. Kondo und H. Iwata. „Osteoclast induction from bone marrow cells is due to pro-inflammatory mediators from macrophages exposed to polyethylene particles: A possible mechanism of osteolysis in failed THA“. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 56.2 (2001), S. 177–183.
- [85] M. E. M. Stamp, M. S. Brugger, A. Wixforth und C. Westerhausen. „Acoustotaxis – in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves“. In: *Biomater. Sci.* 4.7 (2016), S. 1092–1099.
- [86] M. Stamp. „Zelladhäsion auf Titanimplantaten unter dem Einfluss akustischer Mikroströmungen“. Diss. Universität Augsburg, 2012.
- [87] T. Frommelt, D. Gogel, M. Kostur, P. Talkner und P. Hänggi. „Flow Patterns and Transport in Rayleigh Surface Acoustic Wave Streaming : Combined Finite Element Method and Raytracing Numerics versus Experiments“. In: 55.10 (2008), S. 2298–2305.
- [88] F. G. Strobl, D. Breyer, P. Link, A. a. Torrano, C. Br?uchle, M. F. Schneider und A. Wixforth. „A surface acoustic wave-driven micropump for particle uptake investigation under physiological flow conditions in very small volumes“. In: *Beilstein Journal of Nanotechnology* 6 (2015), S. 414–419.

- [89] W. Thielicke und E. J. Stamhuis. „PIVlab – Towards User-friendly, Affordable and Accurate Digital Particle Image Velocimetry in MATLAB“. In: *Journal of Open Research Software* 2 (2014), e30.
- [90] E. J. Thielicke, W., Stamhuis. *PIVlab - Time-Resolved Digital Particle Image Velocimetry Tool for MATLAB (version: 1.4)*. 2015.
- [91] W. Thielicke. „The Flapping Flight of Birds - Analysis and Application. Phd thesis“. Diss. Rijksuniversiteit, Groningen, 2014.
- [92] R. Lindken, M. Rossi, S. Große und J. Westerweel. „Micro-Particle Image Velocimetry (μ PIV): Recent developments, applications, and guidelines“. In: *Lab on a Chip* 9.17 (2009), S. 2551.
- [93] P. F. Davies, C. F. Dewey, S. R. Bussolari, E. J. Gordon und M. a. Gimbrone. „Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells.“ In: *Journal of Clinical Investigation* 73.4 (1984), S. 1121–1129.
- [94] C. a. Schneider, W. S. Rasband und K. W. Eliceiri. „NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis“. In: *Nature Methods* 9.7 (2012), S. 671–675.
- [95] a Punnia-Moorthy. „Evaluation of pH changes in inflammation of the subcutaneous air pouch lining in the rat, induced by carrageenan, dextran and staphylococcus aureus“. In: *Journal of Oral Pathology and Medicine* 16.1 (1987), S. 36–44.
- [96] P. Ducommun, P.-A. Ruffieux, A. Kadouri, U. von Stockar und I. W. Marison. „Monitoring of temperature effects on animal cell metabolism in a packed bed process“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 77.7 (2002), S. 838–842.
- [97] H. Kaufmann, X. Mazur, M. Fussenegger und J. E. Bailey. „Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 63.5 (1999), S. 573–582.
- [98] J. L. Goergen, A. Marc und J. M. Engasser. „Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release“. In: *Cytotechnology* 11.3 (1993), S. 189–195.
- [99] P Wust, B Rau, J. Gellermann, W Pegios, J. Löffel, H Riess, R Felix und P. M. Schlag. „Radiochemotherapy and Hyperthermia in the Treatment of Rectal Cancer“. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*. Bd. 146. 1998, S. 175–191.
- [100] B. Hildebrandt. „The cellular and molecular basis of hyperthermia“. In: *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 43.1 (2002), S. 33–56.
- [101] T. A. Holme. *Denaturation*, <http://www.encyclopedia.com/topic/denaturation.aspx>. 2004.
- [102] A. W. T. Konings und A. C. C. Ruifrok. „Role of Membrane Lipids and Membrane Fluidity in Thermosensitivity and Thermotolerance of Mammalian Cells“. In: *Radiation Research* 102.1 (1985), S. 86.

- [103] J. A. Majda, E. W. Gerner, B. Vanlandingham, K. R. Gehlsen und A. E. Cress. „Heat Shock-Induced Shedding of Cell Surface Integrins in A549 Human Lung Tumor Cells in Culture“. In: *Experimental cell research* 210 (1994), S. 46–51.
- [104] R. a. Coss und W. A. M. Linnemans. „The effects of hyperthermia on the cytoskeleton: a review“. In: *International Journal of Hyperthermia* 12.2 (1996), S. 173–196.
- [105] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel und K. Starke, Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 7th editio. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verlag GmbH, 1996.
- [106] a McQueen und J. E. Bailey. „Effect of ammonium ion and extracellular pH of hybridoma cell metabolism and antibody production“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1990), S. 1067–1077.
- [107] I. Tannock und D Rotin. „Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation.“ In: *Cancer research* 49.13 (1989), S. 4373–4384.
- [108] H Modenaar. „Effects of growth factors on intracellular pH regulation“. In: *Annual Review of Physiology* 48 (1986), S. 363–376.
- [109] C. V. Serrano, a Fraticelli, R Paniccia, a Teti, B Noble, S Corda, T Faraggiana, R. C. Ziegelstein, J. L. Zweier und M. C. Capogrossi. „pH dependence of neutrophil-endothelial cell adhesion and adhesion molecule expression.“ In: *The American journal of physiology* 271 (1996), S. C962–C970.
- [110] C. F. Crouch, H. W. Fowler und R. E. Spier. „The adhesion of animal cells to surfaces: The measurement of critical surface shear stress permitting attachment or causing detachment“. In: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Biotechnology* 35.4 (1985), S. 273–281.
- [111] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos und Y. F. Missirlis. „Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength“. In: *Biomaterials* 22.1 (2000), S. 87–96.
- [112] J. Meyle, K. Gültig, H. Wolburg und A. F. von Recum. „Fibroblast anchorage to microtextured surfaces“. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 27.12 (1993), S. 1553–1557.
- [113] B Boyan. „Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response“. In: *Biomaterials* 17.2 (1996), S. 137–146.
- [114] C Oakley und D. M. Brunette. „The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata.“ In: *Journal of cell science* 106 (Pt 1 (1993), S. 343–354.
- [115] E. den Braber, J. de Ruijter, H. Smits, L. Ginsel, A. von Recum und J. Jansen. „Quantitative analysis of cell proliferation and orientation on substrata with uniform parallel surface micro-grooves“. In: *Biomaterials* 17.11 (1996), S. 1093–1099.
- [116] C. Schmidt. „Mechanical Stressing of Integrin Receptors Induces Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Cytoskeletally Anchored Proteins“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.9 (1998), S. 5081–5085.

- [117] A. J. Garcia, P. Ducheyne und D. Boettiger. „Quantification of cell adhesion using a spinning disc device and application to surface-reactive materials“. In: *Biomaterials* 18.16 (1997), S. 1091–1098.
- [118] E. Decave, D. Garrivier, Y. Brechet, B. Fourcade und F. Bruckert. „Shear Flow-Induced Detachment Kinetics of Dictyostelium discoideum Cells from Solid Substrate“. In: 82.May (2008), S. 2383–2395.
- [119] A. Fritsche, F. Luethen, U. Lembke, B. Finke, C. Zietz, J. Rychly, W. Mittelmeier und R. Bader. „Measuring bone cell adhesion on implant surfaces using a spinning disc device“. In: *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 41.2 (2010), S. 83–88.
- [120] T. Division und L. Alamos. „Estimate of the Sticking Probability for Cells in Uniform Shear Flow with Adhesion Caused by Specific Bonds“. In: 304 (1981), S. 289–304.
- [121] T. G. van Kooten, J. M. Schakenraad, H. C. Van der Mei und H. J. Busscher. „Development and use of a parallel-plate flow chamber for studying cellular adhesion to solid surfaces“. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 26.6 (1992), S. 725–738.
- [122] A. Cooper. „Kinetics (chapter)“. In: *Biophysical Chemistry (book) c* (2004), S. 123–142.
- [123] D Garrivier. „Peeling model for cell detachment“. In: *The European Physical Journal E* 97 (2002), S. 79–97.
- [124] K. Geckeler, R. Wacker, F. Martini, A. Hack und W. Aicher. „Enhanced Biocompatibility for SAOS-2 Osteosarcoma Cells by Surface Coating with Hydrophobic Epoxy Resins“. In: *Cellular Physiology and Biochemistry* 13.3 (2003), S. 155–164.
- [125] K. Myllymaa, S. Myllymaa, H. Korhonen, M. J. Lammi, H. Saarenpää, M. Suvanto, T. A. Pakkanen, V. Tiitu und R. Lappalainen. „Improved adherence and spreading of Saos-2 cells on polypropylene surfaces achieved by surface texturing and carbon nitride coating“. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20.11 (2009), S. 2337–2347.
- [126] J. Schroeter. „Electrowetting - Spannungsgesteuerte Benetzbarkeit von Flüssigkeiten auf unterschiedlichen Substratoberflächen“. Bachelor Thesis. Universität Augsburg, 2016.
- [127] D. I. GmbH. „OCA35 Manual, contact angle measuring and contour analysis instrument“. Filderstadt, Germany.
- [128] F. Marciano, L. Bonetti, N. Da-Silva, E. Corat und V. Trava-Airoldi. „Wettability and antibacterial activity of modified diamond-like carbon films“. In: *Applied Surface Science* 255.20 (2009), S. 8377–8382.
- [129] K. Webb, V. Hlady und P. A. Tresco. „Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization“. In: *Journal of Biomedical Materials Research* 5.41(3) (1998), S. 422–430.

- [130] S. Stress, S. Upregulates, I. Adhesion, T. Nagel, N. Resnick, W. J. Atkinson, C. F. Dewey und M. a. Gimbrone. „Shear Stress Selectively Upregulates Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression in Cultured Human Vascular Endothelial Cells“. In: 94.August (1994), S. 885–891.
- [131] S. Buchegger, C. Vogel, R. Herrmann, B. Stritzker, A. Wixforth und C. Westerhausen. „Antibacterial metal ion release from diamond-like carbon modified surfaces for novel multifunctional implant materials“. In: *Journal of Materials Research* 31.17 (2016), S. 2571–2577.
- [132] J. D. Heckman, J. P. Ryaby, J. McCabe, J. J. Frey und R. F. Kilcoyne. „Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound“. en. In: *The Journal of Bone and Joint surgery* 76.1 (1994), S. 26–34.
- [133] G. Leinenga und J. Gotz. „Scanning ultrasound removes amyloid- and restores memory in an Alzheimer’s disease mouse model“. In: *Science Translational Medicine* 7.278 (2015), 278ra33–278ra33.
- [134] R. J. Hatch, G. Leinenga und J. Götz. „Scanning Ultrasound (SUS) Causes No Changes to Neuronal Excitability and Prevents Age-Related Reductions in Hippocampal CA1 Dendritic Structure in Wild-Type Mice“. In: *PLOS ONE* 11.10 (2016). Hrsg. von M. M. Adams, e0164278.
- [135] C.-L. Tsai, W. H. Chang und T.-K. Liu. „Preliminary studies of duration and intensity of ultrasonic treatments on fracture repair“. In: *The Chinese Journal of Physiology* 35.1 (1992), S. 21–26.
- [136] T. Kokubu, N. Matsui, H. Fujioka, M. Tsunoda und K. Mizuno. „Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E₂ production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts“. In: *Biochemical and Biophysical research communications* 256.2 (1999), S. 284–287.
- [137] A. H. Tashjian, J. E. F. Voelkel, L. Levine und P. Goldhaber. „Evidence that the Bone Resorption-Stimulating Factor Produced by Mouse Fibrosarcoma Cells is Prostaglandin E₂“. In: *The Journal of Experimental Medicine* 136.1 (1972), S. 1329–1343.
- [138] T. Kreis und R. Vale. *Guidebook to the extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*. 2nd. New York: Oxford University Press, 1999, S. 563.
- [139] J. Harle, V. Salih, F. Mayia, J. C. Knowles und I. Olsen. „Effects of ultrasound on the growth and function of bone and periodontal ligament cells in vitro“. In: *Ultrasound in Medicine & Biology* 27.4 (2001), S. 579–586.
- [140] R. Williams. „Production and transmission of ultrasound“. In: *Physiotherapy* 73.3 (1987), S. 113–116.
- [141] N. B. Smith, J. M. Temkin, F. Shapiro und K. Hynynen. „Thermal effects of focused ultrasound energy on bone tissue“. In: *Ultrasound in Medicine and Biology* 27.10 (2001), S. 1427–1433.

- [142] D. L. Miller, N. B. Smith, M. R. Bailey, G. J. Czarnota, K. Hynynen und I. R. S. Makin. „Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations.“ In: *Journal of Ultrasound in Medicine* 31.4 (2012), S. 623–34.
- [143] A Rathgeber, C Strobl, H. J. Kutschera und A Wixforth. „Planar microfluidics - liquid handling without walls“. In: *Journal of Colloid and Interface Science* 357.2 (2001), S. 534–540.
- [144] J. Shi, D. Ahmed, X. Mao, S.-C. S. Lin, A. Lawit und T. J. Huang. „Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW).“ In: *Lab on a chip* 9.20 (2009), S. 2890–5.
- [145] A. Hartmann, M. Stamp, R. Kmeth, S. Buchegger, B. Stritzker, B. Saldamli, R. Burgkart, M. F. Schneider und A. Wixforth. „A novel tool for dynamic cell adhesion studies—the De-Adhesion Number Investigator DANI.“ In: *Lab on a chip* 14.3 (2014), S. 542–6.
- [146] X. Ding, S.-C. S. Lin, B. Kiraly, H. Yue, S. Li, I.-K. Chiang, J. Shi, S. J. Benkovic und T. J. Huang. „On-chip manipulation of single microparticles, cells, and organisms using surface acoustic waves“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.28 (2012), S. 11105–11109.
- [147] P. K. Maini, D. L. S. McElwain und D. Leavesley. „Travelling waves in a wound healing assay“. In: *Applied Mathematics Letters* 17.5 (2004), S. 575–580.
- [148] M. Brugger. „Acoustotaxis - In vitro Stimulation eines Wound-Healing-Assays durch akustische Oberflächenwellen“. Fachpraktikumsbericht. Universität Augsburg, 2016.
- [149] R. L. Science. „Cytotoxicity Detection Kit (LDH)“. 2011.
- [150] A. Wixforth. „Acoustically driven planar microfluidics“. In: *Superlattices and Microstructures* 33.5 (2003), S. 389–396.
- [151] C. F. Dewey, S. R Bussolari, M. A. Gimbrone und P. F. Davies. „The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress“. In: *Journal of Biomechanical Engineering* 103.3 (1981), S. 177–185.
- [152] A. S. Goldstein, T. M. Juarez, C. D. Helmke, M. C. Gustin und A. G. Mikos. „Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds“. In: *Biomaterials* 22.11 (2001), S. 1279–1288.
- [153] A. J. Mortimer und M. Dyson. „The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts“. In: *Ultrasound in Medicine & Biology* 14.6 (1988), S. 499–506.
- [154] C. M. Weaver und R. P. Heaney. *Calcium in Human Health*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2006, S. 442.
- [155] R. A. Luben, C. D. Cain, M. C.-Y. Chen, D. M. Rosen und W. R. Adey. „Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells in vitro: inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79.13 (1982), S. 4180–4184.

- [156] C. A. Bassett, R. J. Pawluk und A. A. Pilla. „Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields.“ In: *Science* 184.136 (1974), S. 575–577.
- [157] D. Foley-Nolan, K. Moore, M. Codd, C. Barry, P. O’Connor und R. J. Coughlan. „Low energy high frequency pulsed electromagnetic therapy for acute whiplash injuries“. In: *Scand J Rehabil Med* 24.1 (1992), S. 51–59.
- [158] S. Datta. *Surface acoustic wave devices*. Prentice Hall, 1986, S. 208.
- [159] Y. Fu, J. Luo, X. Du, A. Flewitt, Y. Li, G. Markx, A. Walton und W. Milne. „Recent developments on ZnO films for acoustic wave based bio-sensing and microfluidic applications: a review“. In: *Sensors and Actuators B: Chemical* 143.2 (2010), S. 606–619.
- [160] X. Y. Du, Y. Q. Fu, S. C. Tan, J. K. Luo, A. J. Flewitt, S. Maeng, S. H. Kim, Y. J. Choi, D. S. Lee, N. M. Park, J. Park und W. I. Milne. „ZnO film for application in surface acoustic wave device“. In: *Journal of Physics: Conference Series* 76 (2007), S. 012035.
- [161] C. Tsakonas, S. Wakeham, W. M. Cranton, M. Thwaites, G. Boutaud, C. Farrow, D. C. Koutsogeorgis und R. Ranson. „Transparent and Flexible Thin Film Electroluminescent Devices Using HiTUS Deposition and Laser Processing Fabrication“. In: *IEEE Journal of the Electron Devices Society* 4.1 (2016), S. 22–29.
- [162] J. Chen, H. Guo, X. He, W. Wang, W. Xuan, H. Jin, S. Dong, X. Wang, Y. Xu, S. Lin, S. Garner und J. Luo. „Development of flexible ZnO thin film surface acoustic wave strain sensors on ultrathin glass substrates“. In: *Journal of Micromechanics and Microengineering* 25.11 (2015), S. 115005.
- [163] H. Jin, J. Zhou, X. He, W. Wang, H. Guo, S. Dong, D. Wang, Y. Xu, J. Geng, J. K. Luo und W. I. Milne. „Flexible surface acoustic wave resonators built on disposable plastic film for electronics and lab-on-a-chip applications“. In: *Scientific Reports* 3.October 2015 (2013).
- [164] J. Luo, X. He, J. Zhou, W. Wang, W. Xuan, J. Chen, H. Jin, Y. Xu und S. Dong. „Flexible and Transparent Surface Acoustic Wave Microsensors and Microfluidics“. In: *Procedia Engineering* 120.JANUARY (2015), S. 717–720.
- [165] O. Bondarenko, K. Juganson, A. Ivask, K. Kasemets, M. Mortimer und A. Kahru. „Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review“. In: *Archives of Toxicology* 87.7 (2013), S. 1181–1200.
- [166] S. Trolier-McKinstry und P. Muralt. „Thin Film Piezoelectrics for MEMS“. In: *Journal of Electroceramics* 12.1/2 (2004), S. 7–17.
- [167] J. Lim, K. Shin und C. Lee. „Effects of annealing temperature on the carrier concentrations, the carrier mobilities and the quality of nitrogen doped ZnO films deposited by magnetron sputtering“. In: *Journal of Materials Science* 39.9 (2004), S. 3195–3197.
- [168] D. flex Elektro. „Teonex Q51 SYN FLEX Quality Network : Teonex Q51“. 2015.

- [169] C. Incorporated. „Corning microscopeslides, plain 2947 75x38“. New York.
- [170] X. Yu, J. Ma, F. Ji, Y. Wang, C. Cheng und H. Ma. „Thickness dependence of properties of ZnO:Ga films deposited by rf magnetron sputtering“. In: *Applied Surface Science* 245.1-4 (2005), S. 310–315.
- [171] K. M. Reddy, K. Feris, J. Bell, D. G. Wingett, C. Hanley und A. Punnoose. „Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems“. In: *Applied Physics Letters* 90.21 (2007), S. 213902.
- [172] M. Notebook. *IDT Designer NIDT und TIDT und FingerendenAusführen.nb*.
- [173] M. Notebook. *IDT Impedanz by Rocke DISS.NB*.
- [174] X. Y. Du, Y. Q. Fu, S. C. Tan, J. K. Luo, A. J. Flewitt, W. I. Milne, D. S. Lee, N. M. Park, J. Park, Y. J. Choi, S. H. Kim und S. Maeng. „ZnO film thickness effect on surface acoustic wave modes and acoustic streaming“. In: *Applied Physics Letters* 93.9 (2008), S. 094105.
- [175] N. Emanetoglu, C. Gorla, Y. Liu, S. Liang und Y. Lu. „Epitaxial ZnO piezoelectric thin films for saw filters“. In: *Materials Science in Semiconductor Processing* 2.3 (1999), S. 247–252.
- [176] B. T. Khuri-Yakub, G. S. Kino und P. Galle. „Studies of the optimum conditions for growth of rf-sputtered ZnO films“. In: *Journal of Applied Physics* 46.8 (1975), S. 3266.
- [177] A. Polh. „A review of wireless SAW sensors“. In: *IEEE transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control* 47.2 (2000), S. 317–332.
- [178] A. J. Slobodnik. „Microwave Frequency Acoustic Surface-Wave Loss Mechanisms on LiNbO₃“. In: *Journal of Applied Physics* 41.11 (1970), S. 4380.
- [179] S. Jyomura. „SAW propagation loss mechanism in piezoelectric ceramics“. In: *Journal of Applied Physics* 52.7 (1981), S. 4472.
- [180] S. Zhang, L. Yan, M. Altman, M. Lässle, H. Nugent, F. Frankel, D. A. Lauffenburger, G. M. Whitesides und A. Rich. „Biological surface engineering: a simple system for cell pattern formation“. In: *Biomaterials* 20.13 (1999), S. 1213–1220.
- [181] P. D. Dalton, L. Flynn und M. S. Shoichet. „Manufacture of poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-methyl methacrylate) hydrogel tubes for use as nerve guidance channels“. In: *Biomaterials* 23.18 (2002), S. 3843–3851.
- [182] F. S. M. Ismail, R. Rohanizadeh, S. Atwa, R. S. Mason, A. J. Ruys, P. J. Martin und A. Bendavid. „The influence of surface chemistry and topography on the contact guidance of MG63 osteoblast cells“. In: *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18.5 (2007), S. 705–714.
- [183] J. A. Theriot und T. J. Mitchison. „Actin microfilament dynamics in locomoting cells“. In: *Nature* 352.6331 (1991), S. 126–131.
- [184] A. Ponti. „Two Distinct Actin Networks Drive the Protrusion of Migrating Cells“. In: *Science* 305.5691 (2004), S. 1782–1786.

- [185] E Sachlos und J. T. Czernuszka. „Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds.“ In: *European Cells and Materials* 5 (2003), S. 29–40.
- [186] A. Ranella, M. Barberoglou, S. Bakogianni, C. Fotakis und E. Stratakis. „Tuning cell adhesion by controlling the roughness and wettability of 3D micro/nano silicon structures“. In: *Acta Biomaterialia* 6.7 (2010), S. 2711–2720.
- [187] W. Ashurst, C. Carraro und R. Maboudian. „Vapor phase anti-stiction coatings for MEMS“. In: *IEEE Transactions on Device and Materials Reliability* 3.4 (2003), S. 173–178.
- [188] P. E.-m. R. Lusignan. „United States Patent [19]“. In: (1986), S. 54–55.
- [189] G. B. Demirel, N. Dilsiz, M. Çakmak und T. Çaykara. „Molecular design of photoswitchable surfaces with controllable wettability“. In: *Journal of Materials Chemistry* 21.9 (2011), S. 3189.
- [190] K. Lee, E. A. Silva und D. J. Mooney. „Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments“. In: *Journal of The Royal Society Interface* 8.55 (2011), S. 153–170.
- [191] J. F. Scott. *Ferroelectric Memories*. Bd. 3. Springer Series in Advanced Microelectronics. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000.
- [192] M. E. Lines und A. Glass. *No Title Principles and Applications of Ferroelectrics and Related Materials*. Oxford University Press, 1977, S. 87–88.
- [193] A. Haussmann. „Ferroelektrische Lithografie auf magnesiumdotierten Lithiumniobat-Einkristallen“. Diss. Technische Universität Dresden, 2011.
- [194] V. Y. Shur, R. Batchko, E. Rumyantsev, G. Miller, M. Fejer und R. Byer. *Domain Engineering: Periodic Domain Patterning in Lithium Niobate*. 1988, S. 399–406.
- [195] M. J. Missey, S. Russell, V. Dominic, R. G. Batchko und K. L. Schepler. „Real-time visualization of domain formation in periodically poled lithium niobate“. In: *Optics Express* 6.10 (2000), S. 186.
- [196] L. E. Myers, W. R. Bosenberg, G. D. Miller, R. C. Eckardt, M. M. Fejer und R. L. Byer. „Quasi-phase-matched 1064- μm -pumped optical parametric oscillator in bulk periodically poled LiNbO₃“. In: *Optics Letters* 20.1 (1995), S. 52.
- [197] C. Christophis, E. A. Cavalcanti-Adam, M. Hanke, K. Kitamura, A. Gruverman, M. Grunze, P. a. Dowben und A. Rosenhahn. „Adherent cells avoid polarization gradients on periodically poled LiTaO₃ ferroelectrics.“ In: *Biointerphases* 8.1 (2013), S. 26.
- [198] V. Marchesano, O. Gennari, L. Mecozzi, S. Grilli und P. Ferraro. „Effects of Lithium Niobate Polarization on Cell Adhesion and Morphology“. In: *ACS Applied Materials & Interfaces* 7.32 (2015), S. 18113–18119.
- [199] J. R. Kurz. „Integrated optical-frequency mixers“. Diss. 2003, S. 131.

- [200] E. Soergel. „Visualization of ferroelectric domains in bulk single crystals“. In: *Applied Physics B* 81.6 (2005), S. 729–751.
- [201] W. J. Merz. „Domain Formation and Domain Wall Motions in Ferroelectric BaTiO₃ Single Crystals“. In: *Physical Review* 95.3 (1954), S. 690–698.
- [202] V. Y. Shur. „Kinetics of ferroelectric domains: Application of general approach to LiNbO₃ and LiTaO₃“. In: *Frontiers of Ferroelectricity*. Bd. 1. Boston, MA: Springer US, 2007, S. 199–210.
- [203] R. C. Miller und A. Savage. „Direct Observation of Antiparallel Domains During Polarization Reversal in Single-Crystal Barium Titanate“. In: *Physical Review Letters* 2.7 (1959), S. 294–296.
- [204] I. E. Barry, G. W. Ross, P. G. Smith, R. W. Eason und G. Cook. „Microstructuring of lithium niobate using differential etch-rate between inverted and non-inverted ferroelectric domains“. In: *Materials Letters* 37.4-5 (1998), S. 246–254.
- [205] S. Mailis, G. Ross, L. Reekie, J. Abernethy und R. Eason. „Fabrication of surface relief gratings on lithium niobate by combined UV laser and wet etching“. In: *Electronics Letters* 36.21 (2000), S. 1801.
- [206] C. L. Sones, S. Mailis, W. S. Brocklesby, R. W. Eason und J. R. Owen. „Differential etch rates in z-cut LiNbO₃ for variable HF/HNO₃ concentrations“. In: *Journal of Materials Chemistry* 12.2 (2002), S. 295–298.
- [207] S Milz und E Schneider. „Animal Models for Implant Biomaterial Research in Bone : a Review“. In: 13.0 (2007), S. 1–10.
- [208] G. Bergmann, F. Graichen und A. Rohlmann. „Hip joint loading during walking and running, measured in two patients“. In: *Journal of Biomechanics* 26.8 (1993), S. 969–990.
- [209] C. R. Arciola, D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro und J. W. Costerton. „Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials“. In: *Biomaterials* 33.26 (2012), S. 5967–5982.
- [210] M. Djukelic, A. Wixforth und C. Westerhausen. „Influence of neighboring adherent cells on laminar flow induced shear stress in vitro – a systematic study. Submitt.“ In: *Biomicrofluidics* ().
- [211] R. J. Ward, Y. Zhang und R. R. Crichton. „Aluminium toxicity and iron homeostasis“. In: *Journal of Inorganic Biochemistry* 87.1-2 (2001), S. 9–14.
- [212] M. Geetha, A. Singh, R. Asokamani und A. Gogia. „Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants – A review“. In: *Progress in Materials Science* 54.3 (2009), S. 397–425.
- [213] D. Khang, J. Choi, Y.-M. Im, Y.-J. Kim, J.-H. Jang, S. S. Kang, T.-H. Nam, J. Song und J.-W. Park. „Role of subnano-, nano- and submicron-surface features on osteoblast differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells“. In: *Biomaterials* 33.26 (2012), S. 5997–6007.

-
- [214] M. J. Dalby, N. Gadegaard, R. Tare, A. Andar, M. O. Riehle, P. Herzyk, C. D. W. Wilkinson und R. O. C. Oreffo. „The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder“. In: *Nature Materials* 6.12 (2007), S. 997–1003.
- [215] P. Q. Ltd. „HiTUS : High Target Utilisation Sputtering)“.
- [216] Ibidi. „Gas Incubation With Active Gas Mixer“. In: (2008), S. 1–19.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich beruflich und privat bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Dr. Achim Wixforth, für die Ermöglichung der Arbeit am Lehrstuhl, die angenehme Zusammenarbeit und motivierenden Diskussionen sowie die Unterstützung von Anfang an.
- Prof. Dr. Bernd Stritzker, für die Erstellung des Zweitgutachtens.
- Dr. Christoph Westerhausen, für die vielen wissenschaftlichen und informellen Diskussionen, die mathematische Beratung und das gemütliche und gleichzeitig erfolgreiche Leiten der Biophysics AG.

Die Zeit mit dir war schlau und froh,
da sagt der zukünftige Chef OHO!
Auch wenn wir manchmal scientific zankten,
zum Schluss doch immer einander fanden :)

- Meinen Master- und Bachelorstudenten: Anna Jötten, Eliane Blauth, Katharina Preißinger, Manuel Brugger, Mario 'Stricher' Djukelic, Patrick Kudella, Alessandro Susca und Rodolfo Molina für die hervorragende Zusammenarbeit, euer Engagement im Labor und bei EP1 repräsentativen Veranstaltungen an sämtlichen NIM- oder sonstigen Infotagen.
- ... und natürlich auch dem Rest der Biophysik Gruppe!
- Den ehemaligen Mitgliedern der Biophysik Gruppe, vor allem Dominik Breyer, für die Hilfestellung bei MatLab- (und Lebens-) Fragen, sowie Florian Strobl und Thomas Geislinger für die biophysikalische Beratung aus der Sicht von 'Nichtzellmenschen'.
- Dem technischen Personal: Alexander Hupfer, für die sofortige Problemlösung bei Computerproblemen, Sidonie Lieber, für das liebevolle Babysitten unserer kleinen Zellen und die stetigen Biolaborpflege sowie Andreas Spörhase und Adrian Mainka für die Wartung und Instandhaltung der Reinräume samt Equipment.
- Prof. Dr. Andrew Flewitt an der University of Cambridge für die erfolgreiche Zusammenarbeit und zur Verfügungstellung der Labore.
- Dr. Rab Wilson und Dr. Julien Rebound and der University of Glasgow, sowie Christian Huck, Epcos AG TDK für die zur Verfügungstellung der benötigten Messinstrumente.

- Dr. Thomas Stretz für die sprachlichen Korrekturen und die Beratung in medizinischen Fragen.
- Criss Hohmann für die 'Style'-Beratung bei Postern und Veröffentlichungen sowie auf allen NIM-Veranstaltungen.
- Raum 308 in seiner jetzigen Konstellation, für die hervorragende Stimmung, die offenen Ohren sowie das moralische Mitleiden, wenn die Zellen mal wieder nicht so wollten wie sie sollten.
- ... und natürlich dem gesamten Lehrstuhl für Experimentalphysik 1, für das angenehme Arbeitsklima und die entspannte Atmosphäre.
- Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Inge-Marie und Walter Stamp für die Unterstützung, Erziehung und Beratung seit Beginn meiner Zeitrechnung.
- Jessica Gaulocher, Nadine Salih und Holger Fuhrmann für eure langjährige Freundschaft mit allem was dazu gehört.
- Meinen BB-Ballettmädels sowie Birgit und Gunther Bender für die harten Trainingsstunden und die vielen gemeinsamen Jahre.
- All meinen Bandkollegen und Mitmusikern für die musikalische Ablenkung und die grandiosen Zeiten.