

Aus dem Institut für Nutztierwissenschaften und Technologie der
Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

Antibakterielle Optimierung von Implantatoberflächen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor Agriculturae
der Agrar- und Umweltwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Cornelia Prinz M.A.
geboren in Sassnitz

Rostock, im September 2009

Datum der mündlichen Prüfung
1. April 2010

Gutachter: Prof. Dr. Axel Kramer (Universität Greifswald)
Prof. Dr. Elmar Mohr (Universität Rostock)
Prof. Dr. Hans-Georg Neumann (DOT GmbH, Rostock)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielstellung.....	1
2	Funktionalisierung von Implantatoberflächen.....	3
2.1	Strahlen und Ätzen.....	4
2.2	Beschichten.....	6
2.2.1	Physikalische Beschichtungen.....	6
2.2.2	Elektrochemische Beschichtungen.....	8
2.2.2.1	Calciumphosphat(CaP)-Beschichtungen.....	8
2.2.2.2	Plasmaelektrochemische Oxidation (PeO).....	11
2.2.3	Antibakteriell wirkende Oberflächen.....	13
2.2.3.1	Antibiotika-Beschichtung.....	15
2.2.3.2	Metallschichten.....	17
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Beschichtungsparameter.....	19
3.1.1	Galvanische Beschichtung.....	19
3.1.2	Chemische Kupferphosphatbeschichtung.....	23
3.1.3	Arc- / Sputter- Beschichtung.....	24
3.1.4	Staphylococcus aureus.....	26
3.2	Analytik.....	26
3.2.1	Physikalische Analysen.....	27
3.2.1.1	REM / EDX.....	27
3.2.1.2	Laser-Scanning-Mikroskopie.....	28
3.2.2	Chemische Analysen.....	29
3.2.2.1	Release-Untersuchungen.....	29
3.2.2.2	Kupferbestimmung.....	29
3.2.3	Biologische Untersuchungen.....	30
3.2.3.1	Versuche mit Bakterien.....	30
3.2.3.1.1	Versuche in Kupfer- und Silbersalzlösungen.....	31
3.2.3.1.2	Versuche in Kupfer/PBS-Pufferlösungen.....	32
3.2.3.1.3	Versuche mit kupfer- und silberbeladenen Oberflächen.....	32
3.2.3.2	Versuche mit Zellen.....	34
3.2.3.2.1	Zytotoxizität von Kupfersulfat- und Silbernitrat-Lösungen.....	34
3.2.3.2.2	Zytotoxizität von kupferbeschichteten Oberflächen.....	36

3.2.3.2.3	Einfluss von Kupfer auf die Angiogenese	37
4	Ergebnisse	38
4.1	Antibakterielle Wirkung von Metallionen	38
4.1.1	Kupfer- und Silberlösungen	38
4.1.2	Kupfer- bzw. silberbeladene Oberflächen.....	41
4.1.2.1	Massive Kupferproben.....	41
4.1.2.2	Oberflächenbeschichtungen	46
4.1.2.2.1	Galvanisch abgeschiedene Kupferschichten (PeO-gCu).....	47
4.1.2.2.2	Galvanisch abgeschiedene Silberschichten (PeO-gAg)	52
4.1.2.2.3	Calciumphosphat/Kupfer-Beschichtungen (CaP/cCuP und äCaP/cCuP).....	54
4.1.2.2.4	PVD- Kupfer beschichtete Proben (TiN-sCu)	60
4.1.3	Einfluss verschiedener Elutionsmedien	65
4.1.4	Einfluss von Bakterien auf die Kupferfreisetzung	70
4.2	Zytotoxizitätsuntersuchungen	73
4.2.1	Zytotoxizität von Kupfer- bzw. Silberionen.....	73
4.2.2	Zytotoxizität von kupferbeschichteten Oberflächen	77
4.3	<i>in vitro</i> -Untersuchungen zum Einfluss von Kupfer auf die Angiogenese.....	78
5	Diskussion	82
5.1	Einfluss von Kupfer- und Silberlösungen auf Bakterien und Zellen	82
5.2	Antibakterielle Optimierung von Implantatoberflächen	85
5.2.1	Ionenfreisetzung	86
5.2.1.1	Art des verwendeten Mediums	86
5.2.1.1.1	PBS-Pufferlösung	86
5.2.1.1.2	LB-Nährbouillon, Zellkulturmedium und Humanplasma.....	87
5.2.1.1.3	Häufigkeit des Mediumwechsels	87
5.2.1.2	Art der Beschichtung	89
5.2.2	Bakterienhemmung und Zellstimulation.....	91
6	Zusammenfassung.....	96
7	Literaturverzeichnis	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer elektrochemisch abgeschiedenen Bruschit-Schicht	10
Abb. 2	Hochporöse CaP-Schicht auf Zahnimplantaten	10
Abb. 3	Phasen der Biofilmbildung (www2.biologie.uni-halle.de).....	14
Abb. 4	Wirkorte von Antibiotika	16
Abb. 5	Oligodynamischer Effekt von Metallkationen	17
Abb. 6	Schematische Darstellung der galvanischen Kupferbeschichtung.....	20
Abb. 7	Versuchsaufbau bei galvanischer Kupferbeschichtung.....	21
Abb. 8	REM-Aufnahme der Oberfläche einer plasmaelektrochemisch oxidierten und nachfolgend galvanisch mit Kupfer beschichteten Titanprobe	22
Abb.9	Plasmaelektrochemisch oxidierte und galvanisch kupferbeschichtete Oberfläche nach dem Glaskugelstrahlen.....	22
Abb.10	Chemische Kupferbeschichtung auf einer Calciumphosphatoberfläche (CaP-cCuP)	23
Abb. 11	Probenanordnung in der PVD-Beschichtungsanlage HHB-6, rechts: Kupferquelle (Magnetron).....	24
Abb.12	Titannitrid-Kupfer-Beschichtung (TiN-sCu)	26
Abb. 13	EDX-Mapping einer (PeO-gCu)-Probe (glaskugelgestrahlt).....	28
Abb. 14	Wellplatte mit Probekörpern.....	33
Abb. 15	Staphylococcus aureus auf Mannit-Kochsalz-Agar	34
Abb. 16	Wachstum von Staphylococcus aureus bei 37 °C in mit Kupfersulfat, Kupferchlorid und Silbernitrat versetzten PBS-Pufferlösungen mit einem jeweiligen Metallionen-Anteil von 20 mg/l sowie als Positivkontrolle in reinem PBS-Puffer.....	39
Abb. 17:	Wachstum von Staphylococcus aureus bei 37 °C in mit Silbernitrat versetzten PBS-Pufferlösungen sowie als Positivkontrolle in reinem PBS-Puffer.....	39
Abb. 18	Wachstum von Staphylococcus aureus bei 37 °C in PBS-Pufferlösungen mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen sowie in reinem PBS-Puffer als Positivkontrolle	40
Abb. 19	Releaseverhalten einer massiven Kupferronde (20 mm Durchmesser, 1 mm dick) bei 37 °C in Tris-Puffer bei täglichem Mediumwechsel (5 ml) (kumuliert dargestellt)	41
Abb. 20	Kumulative Freisetzung von Kupferionen aus einer massiven Kupferronde (20 mm Durchmesser, 1 mm dick) bei 37 °C in PBS-Puffer bei täglichem Medienwechsel (5 ml).....	42
Abb. 21	Kupferronde nach Auslagerung in PBS-Puffer	42
Abb. 22	EDX-Mapping einer Kupferronde, ausgelagert in PBS-Pufferlösung	43

Abb. 23	Kupferronde nach Auslagerung in Tris- Puffer	43
Abb. 24	Kurzzeitrelease einer Kupferronde in PBS-Pufferlösung bei 2stündigem Mediumwechsel (kumuliert dargestellt).....	44
Abb. 25	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über einer massiven Kupferprobe und in PBS-Puffer als Positivkontrolle (PK PBS).....	45
Abb. 26	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK) sowie auf der massiven Kupferprobe	45
Abb. 27	Cu-Releaseverhalten einer (PeO-gCu)-modifizierten Titanprobe (20 mm Durchmesser) bei 37 °C in PBS-Puffer bei täglichem Mediumwechsel (5 ml), kumuliert dargestellt.....	47
Abb. 28	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über einer (PeO-gCu)- bzw. (PeO)-Probe und in PBS als Positivkontrolle (PK in PBS)	48
Abb. 29	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf (PeO-gCu)- und (PeO)-Proben.....	49
Abb. 30	a) Biofilm von Staphylococcus aureus auf einer plasmaelektrochemisch oxidierten Titan-Oberfläche (PeO), b) Staphylococcus aureus auf einer plasmaelektrochemisch oxidierten und galvanisch mit Kupfer beschichteten Oberfläche (PeO-gCu).....	49
Abb. 31	Kupferelution aus (PeO-gCu)-Proben in verschiedenen Medien (5 ml), kumuliert dargestellt	50
Abb. 32	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium über einer (PeO-gCu)-Probe und als Positivkontrolle in LB- Bouillon bzw. Zellkulturmedium (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium)	51
Abb. 33	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium) sowie auf (PeO-gCu)-Proben	51
Abb. 34	Silberrelease aus (PeO-gAg)-Proben in PBS-Puffer, bei täglichem Mediumwechsel (5 ml), kumuliert dargestellt.....	52
Abb. 35	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über (PeO-Ag)- und (PeO)-Proben sowie als Positivkontrolle in PBS Puffer (PK PBS)	53
Abb. 36	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf einer (PeO-Ag)- und einer (PeO)-Probe	53
Abb. 37	Staphylococcus aureus auf einer plasmaelektrochemisch oxidierten und galvanisch mit Silber beschichteten Titanoberfläche (PeO-gAg) ...	54
Abb. 38	Kupferrelease aus (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben in PBS-Puffer bei täglichem Mediumwechsel, kumuliert dargestellt	55

Abb. 39	Kurzzeitrelease aus (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben in PBS-Puffer bei 2stündigem Mediumwechsel, kumuliert dargestellt.....	56
Abb. 40	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über (CaP)-, (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben sowie als Positivkontrolle in PBS-Puffer (PK PBS)	56
Abb. 41	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf (CaP)-, (CaP/cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben.....	57
Abb. 42	Staphylococcus aureus - Biofilm a) auf einer Calciumphosphat-Oberfläche (CaP), b) auf einer Calciumphosphat/Kupfer-Oberfläche (CaP-cCuP)	58
Abb. 43	Kupferrelease aus (CaP-cCuP)-Proben in Zellkulturmedium, PBS-Puffer und LB-Bouillon, kumuliert dargestellt.....	58
Abb. 44	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium über (CaP-cCuP)-Proben sowie in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium als Positivkontrolle (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium)	59
Abb. 45	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK PBS) sowie auf (CaP-cCuP)-Proben.....	59
Abb. 46	Kupferrelease aus (TiN-sCu)-Proben in PBS-Puffer, täglicher Mediumwechsel (5 ml), kumuliert dargestellt.....	61
Abb. 47	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über (TiN)- und (TiN-sCu)-Proben sowie als Positivkontrolle in PBS-Puffer (PK PBS)	61
Abb. 48	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK PBS) sowie auf (TiN)- und (TiN-sCu)-Proben	62
Abb. 49	Staphylococcus aureus a) auf einer mit Titannitrid beschichteten Probe (TiN), b) auf einer mit Titannitrid und Kupfer beschichteten Probe (TiN-sCu)	62
Abb. 50	Kumulatives Kupferrelease einer (TiN-sCu)-Probe in Zellkulturmedium, in LB-Bouillon und in PBS-Puffer	63
Abb. 51	Staphylococcus aureus (planktonisch) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium über (TiN-sCu)-Proben sowie als Positivkontrolle in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium)	64
Abb. 52	Staphylococcus aureus (biofilmbildend) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf (TiN-sCu)-Proben.....	64
Abb. 53	Kumulative Freisetzung von Kupfer aus unterschiedlich hergestellten Proben (Tab. 3) in PBS Puffer, Zellkulturmedium und LB Nährbouillon	65

Abb. 54	Einfluss der Elutionsmedien auf das Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> (planktonisch) über kupferbeschichteten Proben.....	66
Abb. 55	Einfluss der Elutionsmedien auf das Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> (biofilmbildend) auf kupferbeschichteten Proben.....	66
Abb. 56	Kumulatives Cu-Release in Humanplasma (AAS)	67
Abb. 57	Kumulatives Cu-Release in Humanplasma (photometrische Messung).....	68
Abb. 58	<i>Staphylococcus aureus</i> (planktonisch) bei 37 °C in einem Humanplasma-PBS-Puffer-Gemisch über verschiedenen mit Kupfer beschichteten Oberflächen sowie in Plasma-PBS-Puffer-Gemisch als Positivkontrolle (PK)	69
Abb. 59	<i>Staphylococcus aureus</i> (biofilmbildend) bei 37 °C in Plasma/PBS-Puffer-Gemisch auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK PBS) sowie auf verschiedenen mit Kupfer beschichteten Oberflächen.....	69
Abb. 60	Kupferelution aus galvanisch bzw. mittels PVD beschichteten Titanoberflächen in PBS-Puffer ohne (a und c) und mit (b und d) Bakterien	70
Abb. 61	Kupferelution aus kupferbeschichteten Calciumphosphatschichten, in PBS-Puffer ohne (a und c) und mit (b und d) Bakterien	71
Abb. 62	Kupferelution aus: (PeO-gCu I) Elution nach Erstinkubation mit 100 µl Bakteriensuspension (10^7 KBE/ml); (PeO-gCu II) Elution nach erneuter Inkubation mit 50 µl Bakteriensuspension (10^7 KBE/ml).....	72
Abb. 63	<i>Staphylococcus aureus</i> (planktonisch bzw. biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer nach einmaliger Zugabe (PeO-gCu I) und Cu-Lösung (20 mg/l) I; nach erneuter Zugabe (PeO-gCu II) und Cu-Lösung (20 mg/l) II; (PK I-PBS, einmalig) und (PK II-PBS erneut) auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten.....	72
Abb. 64	MTS-Test: Einfluss von CuSO_4 -Lösungen verschiedener Konzentration auf MG-63/19. Passage-Zellen, 10^5 Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte).....	73
Abb. 65	MTS-Test: Einfluss von AgNO_3 -Lösungen verschiedener Konzentration auf MG-63/27. Passage, 10^5 Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte).....	74
Abb. 66	FACS-Analyse: Einfluss von CuSO_4 -Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 5. u. 7. Passage, 10^5 Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte), direkte Einsaat	75
Abb. 67	FACS-Analyse: Einfluss von CuSO_4 -Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 5. u. 8. Passage, 10^5 Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte), indirekte Einsaat.....	75
Abb. 68	FACS-Analyse: Einfluss von AgNO_3 -Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 25. Passage, 10^5 Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte), direkte Einsaat	76

Abb. 69	FACS-Analyse: Einfluss von AgNO ₃ -Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 25. Passage (10 ⁵ Zellen / 3ml /Well (6 Well-Platte), indirekte Einsaat.....	76
Abb. 70	MTS-Test: Einfluss von kupferbeschichteten Probekörpern auf MG-63/27.Passage, 10 ⁵ Zellen / 2ml / Well (12-Well-Platte)	77
Abb. 71	FACS-Analyse: Einfluss von kupferbeschichteten Oberflächen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 25. Passage, 10 ⁵ Zellen / 2 ml / Well (12-Well-Platte)	78
Abb. 72	Humane Endothelzellen im Kontakt zu a) Zellkultur-geeigneter Glasoberfläche, b) (PEO-gCu)-Beschichtung/2V_10s, c) (PEO-gCu)-Beschichtung/ 2V_30s und d) (PEO-gCu)-Beschichtung/2V_60s (Immunfluoreszenzmikros-kopie, CD31-Färbung, 24 h Kontakt zur Oberfläche).....	79
Abb. 73	in vitro-Modell zur Gefäßneubildung: Humane Endothelzellen eingebettet in ein Gel aus Typ I-Kollagen und Fibrin, Effekt verschiedener Gefäßneubildungsfaktoren (a: ohne Faktoren, b: mit bFGF (5 ng/ml Zellkulturmedium), c: mit VEGF (50 ng/ml Zellkulturmedium), d: bFGF+VEGF (Konzentrationen siehe b und c) ..	80
Abb. 74	Einfluss des Sauerstoffmangels (Hypoxie).....	81
Abb. 75	in vitro Effekt von (PeO-gCu)-Proben auf die Gefäßneubildung nach 5tägiger Stimulation mit Gefäßneubildungsfaktoren: a) unbehandelte Kontrolle, b und e) (PeO-gCu)-Proben ohne Vorinkubation, c und f) (PeO-gCu)-Proben mit Vorinkubation, d) (PeO)-Probe, ohne Kupfer ..	81
Abb. 76	Mit Kupfer beschichtete Titanoberfläche, in PBS-Puffer eluiert.....	86
Abb. 77	Kumulierte Kupferfreisetzung aus verschiedenen Beschichtungen in PBS-Puffer bei stündlichem Mediumwechsel nach 24 Stunden	88
Abb. 78	Kupferfreisetzung aus verschiedenen Beschichtungen in PBS-Puffer nach 24 Stunden ohne Mediumwechsel.....	89
Abb. 79	EDX-Mapping einer (PeO-gCu)-Schicht nach kurzem Glaskugelstrahlen.....	90
Abb. 80	EDX-Mapping einer (PeO-gCu)-Schicht nach längerem Glaskugelstrahlen.....	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Beschichtungen der verwendeten Titanprobekörper	19
Tabelle 2	Flächenkonzentration des in Oberflächenschichten eingetragenen Kupfers bzw. Silbers	46
Tabelle 3	Kupferbeladene Proben	65

1 Einleitung und Zielstellung

Im Mittelalter wurden die Menschen durchschnittlich nur etwa 35 Jahre alt. Bis zum Ende des 19. Jahrhunderts stieg die Lebenserwartung bereits auf rund 45 Jahre und heute liegen die Prognosen für Neugeborene bei 95 bis 100 Lebensjahren. Zu dieser Steigerung haben nicht zuletzt die großen Fortschritte in der Medizin, Naturwissenschaft und Technik beigetragen. Biomaterialien und maßgeschneiderte Implantate haben am medizinischen Fortschritt einen wichtigen Anteil. Implantate, wie künstliche Gelenke, werden auch in naher Zukunft nicht durch reines „tissue engineering“ ersetzt werden. Erfolgreiche Implantate setzen Werkstoffe voraus, die an den Anwendungsort und die Funktion bestmöglich angepasst sind. Patienten und Mediziner stellen zu Recht immer höhere Anforderungen an Implantate. Sie sollen mechanisch stabil sein, sich optimal und in kürzester Zeit mit dem körpereigenen Gewebe verbinden, keine Abstoßungsreaktionen oder gar Infektionen hervorrufen und möglichst ein Leben lang halten. Eine optimierte Anpassung insbesondere der Implantatoberfläche an das komplexe biologische Umfeld ist daher besonders wichtig (Ziegler 2004).

Die Modifizierung von Implantatoberflächen zur optimalen Integration der Implantate in das umgebende Körpergewebe erfordert, dass diese Oberflächen bioaktiv sind. Das heißt, dass Gewebe oder Zellen spezifisch, nämlich in Hinblick auf ihre Differenzierung und Proliferation, durch die Implantatoberfläche so beeinflusst werden, dass sie einen dauerhaften, kraftschlüssigen Verbund mit der Implantatoberfläche eingehen. Die ebenfalls maßgeblich durch die Merkmale der Oberfläche bestimmte Biokompatibilität von Implantaten ist durch die Forschungsbemühungen der letzten Jahre entscheidend verbessert worden. In vielen Fällen müssen diese Oberflächeneigenschaften unabhängig von den Eigenschaften des Implantatwerkstoffs gestaltet werden, beispielsweise durch eine Beschichtung.

Es werden weltweit jährlich ca. eine halbe Million Hüftendoprothesen implantiert. Dabei gehört eine implantatinduzierte Infektion nach wie vor zu den am meisten gefürchteten Komplikationen (van OSTEN et al. 2008). Es ist daher von großer Bedeutung, Implantatoberflächen so zu gestalten, dass sie nicht nur zellstimulierend sondern auch antibakteriell wirken.

Die zu lösende Aufgabe besteht demnach darin, eine optimierte Oberflächenbehandlung von Implantaten zu entwickeln, die einerseits einen ausreichend starken und hinreichend anhaltenden antibakteriellen Effekt erzielt, jedoch gleichzeitig die Besiedelung mit Körperzellen nicht nennenswert behindert.

In der vorliegenden Arbeit werden vornehmlich die bereits vielfach in der Literatur beschriebenen bakterienhemmenden Eigenschaften von Kupfer untersucht (HUBACHER et al. 2001). Die antibakterielle Wirkung von Kupfer bzw. Kupferionen wurde bisher hauptsächlich anhand von reinen Kupferoberflächen studiert. Gegenstand dieser Arbeit ist die antibakteriell wirksame Freisetzung von Kupferionen aus unterschiedlich modifizierten Oberflächen. Die Kupferionen sollen aus der Implantatoberfläche mit definierter Freisetzungsrate in das Körpergewebe wandern und dort die Vermehrung von klinischen Keimen wie *Staphylococcus aureus* verhindern. Der große Vorteil der Kupferionen im Gegensatz zu Antibiotika besteht darin, dass Bakterien gegen geringe, bereits bakterizid wirkende Konzentrationen nicht resistent sind. Resistenzen werden erst bei etwa 20fach erhöhter Kupferionenkonzentration, d.h. $> 3,25 \text{ mmol/l}$ bzw. $206,54 \text{ mg/l}$ ausgebildet (EGLER 2005). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Kupferionen in maßvollen Konzentrationen keine Zellschädigungen hervorrufen (HEIDENAU et al. 2005), sie sind hingegen für den Stoffwechsel der Zellen von essentieller Bedeutung und in den Körpermedien mit Konzentrationen von $11 - 24 \mu\text{mol/l}$ vorhanden (ANONYMUSa 2005). Dadurch bietet sich durch eine antiinfektiöse Oberflächenmodifizierung mit Kupfer die Chance, die bei der Operation eingebrachten Bakterien in ihrer Entwicklung zu hemmen, ohne die körpereigenen Gewebezellen nennenswert zu schädigen bzw. in ihrer Entwicklung zu beeinträchtigen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Herstellungsverfahren und das Elutionsverhalten sowie die bakterizide Wirkung verschiedener kupferbeladener Implantatoberflächen untersucht. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung und Struktur der Implantatoberflächen sollen optimale Kupferkonzentrationen ermittelt werden, welche das Bakterienwachstum hinreichend hemmen, das Zellwachstum jedoch nicht wesentlich beeinträchtigen. Da aus der Literatur silberbeladene Oberflächen für ihre antibakterielle Wirkung bekannt sind, werden in

dieser Arbeit anhand einer Beschichtungsvariante die Wirkungen von Kupfer- und Silberionen gegenübergestellt und bewertet.

2 Funktionalisierung von Implantatoberflächen

Für das erfolgreiche Einwachsen von Langzeitimplantaten ist die Wechselwirkung zwischen Implantat und Biosystem von entscheidender Bedeutung. Ein Implantat kann auf das umgebende Gewebe sowohl immunreaktive als auch das Zellwachstum stimulierende Wirkungen haben. Um die Antwort des Organismus dahingehend zu beeinflussen, dass unspezifische Immunreaktionen vermieden und eine gezielte Zellreaktion hervorgerufen wird, gilt die biokompatible Modifizierung von Implantatoberflächen als einer der zurzeit wichtigsten Forschungsschwerpunkte der Medizin. Kommen bei medizinischen Anwendungen körperfremde Materialien zum Einsatz, so führt das immer zu Zellreaktionen. Eine biologisch verträgliche, biokompatible Oberfläche ist für eine weitgehend problemlose Einheilung der Implantate von größter Bedeutung. Um chronische Entzündungen und Gewebsschädigungen zu vermeiden, wird bioinertes oder bioaktives Verhalten angestrebt. Sofern der verwendete Implantatwerkstoff diese Eigenschaften nicht oder in nicht ausreichendem Maße besitzt, können diese durch das Aufbringen einer haftfesten Schicht von zweckmäßiger Zusammensetzung und Struktur bereitgestellt werden. Abhängig von dem angewendeten Verfahren können unterschiedliche Schichtdicken und verschiedene Schichtstrukturen erreicht werden. Die Schichtstruktur kann amorph, kristallin oder teilkristallin sein.

Abgesehen von funktionellen Beschichtungen, beispielsweise auf den Gleitflächen von künstlichen Gelenken, werden auf der dem Körpergewebe zugewandten Implantatoberfläche in Abhängigkeit von der Art der medizinischen Anwendung unterschiedliche Modifikationen bzw. Beschichtungen vorgenommen. Die anzustrebende Eigenschaft der Beschichtung richtet sich danach, ob es sich um ein temporäres oder um ein permanentes Implantat handelt. Temporäre Implantate, wie Knochennägel oder Knochenschrauben, werden zur Heilungsunterstützung bei Knochenbrüchen eingesetzt. Da diese häufig nach einer bestimmten Zeit operativ wieder entfernt werden müssen, ist hier das Einwachsen des Implantates unerwünscht. Demzufolge muss in diesem Falle die Beschich-

tung ein Bewachsen des Implantats mit Körpergewebe möglichst verhindern oder zumindest deutlich vermindern. Im Gegensatz dazu werden die gewebe-seitigen Oberflächen permanenter Implantate, wie z.B. Hüftendoprothesen, mit bioaktiven Schichten so modifiziert, dass eine bestmögliche Verankerung mit dem Gewebe erreicht wird. Die direkte Bildung von Knochengewebe auf solchen Implantaten ist für die natürliche Fixierung sowie zur Vorbeugung einer aseptischen Lockerung des Implantates von großer Bedeutung (GIBBIS & WARNER 2005).

Für die Modifizierung von Implantatoberflächen werden unterschiedliche Verfahren eingesetzt, von denen die in dieser Arbeit verwendeten Methoden im Folgenden dargestellt werden.

2.1 Strahlen und Ätzen

Um die Verankerung des Implantats im Knochen zu verbessern und eine kraftschlüssige Verbindung herzustellen, eignet sich als sehr wirksame Methode die Veränderung der Oberflächenmorphologie auf mikroskopischer Größenskala. Dabei macht man sich die Erkenntnis zunutze, dass raue, zerklüftete Oberflächen in ihrem Profil Texturierungen aufweisen, die den typischen Dimensionen von Knochenzellen entsprechen und so besonders günstige Besiedelungsbedingungen für Knochengewebe bieten (MILLER et al. 2006). Hinzu kommt eine deutliche Vergrößerung der effektiven Kontaktfläche zwischen Implantat und Gewebe, wodurch diese belastbarer wird. Dass raue Oberflächen das Einwachsen des Implantates positiv beeinflussen, wird in der Literatur häufig beschrieben. So wurden bereits 1985 verschiedene Oberflächen hinsichtlich ihrer Osseointegration untersucht (THOMAS & COOK 1985). Bei diesen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass lediglich die Rauigkeitsparameter einen signifikanten Einfluss auf die Festigkeit des Verbundes zwischen Knochen und Implantat hatten. Durch eine topografische Bearbeitung von Implantaten wird eine Vergrößerung der Oberflächen erreicht, die dem Knochen mehr Fläche zum Anhaften bietet.

Die Morphologie der Implantatoberfläche kann auf verschiedene Art modifiziert werden. Insbesondere eignen sich mechanische Verfahren wie das Strahlen mit Partikeln aus unterschiedlichen Hartstoffen und das chemische Ätzen, um raue

Oberflächen herzustellen. Bei beiden Vorgängen werden Teile aus der Materialoberfläche herausgelöst.

Beim Partikelstrahlen wird mit Hilfe eines Gebläses ein Gasstrahl (Luft oder Inertgas) erzeugt, in dem das Strahlgut mit einem bestimmten Impuls auf eine Oberfläche geschossen wird. Dabei kommt es durch Stoßprozesse zur Zerstörung von Oberflächenbindungen und infolge dessen zur Abtragung und Aufrauung des Werkstoffs. Als Strahlgut können u.a. Korund (Al_2O_3), Glasperlen oder Glasbruch verwendet werden. Beim Strahlen mit Korund wird durch die scharfkantige Geometrie der Korundkörnchen die zu behandelnde Oberfläche aufgerissen und auf diese Weise vergrößert. Abhängig von der gewünschten Rauigkeit, werden grobe oder feine Korundkörnchen verwendet. Für extrem empfindliche Oberflächen können auch runde Glasperlen als Strahlmittel verwendet werden. Beim Strahlen mit Glasperlen wird die Oberfläche fast nicht angegriffen, die Glasperlen entfernen Verschmutzungen und hinterlassen eine glänzende Oberfläche. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass kleine Mengen des sehr harten Strahlgutes auf bzw. in der Oberfläche verbleiben, die auch durch Nachbehandlungen nur schwierig und daher unvollständig entfernt werden können. Diese nicht funktionellen Fremdkörper können bei Ablösung z.B. zwischen die Gleitflächen eines künstlichen Gelenkes gelangen und dort zu einem erhöhten Abrieb führen. Durch Verwendung von weniger harten und sowohl chemisch als auch biologisch abbaubaren Strahlmitteln wie Calciumphosphaten kann dieser störende Nebeneffekt reduziert oder sogar vermieden werden.

Als weitere Möglichkeit zur Aufrauung von Implantatoberflächen wird das chemische Ätzen eingesetzt. Dabei wird mit Hilfe von chemisch reaktiven Lösungen oder Schmelzen Material von der Oberfläche organischer oder anorganischer Materialien abgetragen. Aufgrund von Materialinhomogenitäten, z.B. bei geringfügigen Zusammensetzungsunterschieden im Gefüge polykristalliner Legierungen oder durch inhomogene Lösungen und Schmelzen, kommt es zu lokal unterschiedlichen Ätzraten, wodurch sich unterschiedlich ausgeprägte Vertiefungen ausbilden. Das sich einstellende Rauigkeitsprofil hängt somit von den Materialeigenschaften und den Ätzmedien ab. Ätzmittel werden auch als Beize oder Ätzflüssigkeit bezeichnet. Als Ätzmittel kommen chemische Stoffe zur Anwendung, die das zu ätzende Material in einer chemischen Reaktion

verändern (meistens oxidieren) und so in Lösung bringen. Ätzmittel sind in der Regel Säuren oder starke Oxidationsmittel (<http://wikipedia.org>)

2.2 Beschichten

Aus der Vielzahl technischer Beschichtungsverfahren eignet sich lediglich eine begrenzte Auswahl von Methoden für die Oberflächenmodifizierung von Implantaten. Dies ist vor allem durch die außerordentlich hohen Ansprüche der Medizintechnik an die Biokompatibilität, Haftfestigkeit und Funktionalität von Schichtsystemen auf Implantaten bedingt. Im Folgenden werden die Grundlagen ausgewählter Beschichtungstechnologien erläutert, deren Einsatz sich bei der Veredelung von Implantatoberflächen bewährt hat und die demzufolge auch die Basis der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Lösungsansätze darstellen.

2.2.1 Physikalische Beschichtungen

Der Begriff physikalische Gasphasenabscheidung (engl. Physical Vapour Deposition, PVD) bezeichnet eine Gruppe von vakuumbasierten Beschichtungsverfahren bzw. Dünnschichttechnologien, bei denen die Schicht direkt durch Kondensation des Materialdampfes eines Ausgangsstoffes gebildet wird. Der Materialdampf kann durch Erwärmen oder durch Ionenzerstäubung (Sputtering) des Beschichtungsmaterials erzeugt werden. Bis auf wenige Ausnahmen zeichnen sich moderne physikalische Beschichtungsverfahren dadurch aus, dass das abzuscheidende Material in fester Form in der meist evakuierten Beschichtungskammer vorliegt. Die Erwärmung des Materials erfolgt dabei durch Elektronen- oder Laserbestrahlung sowie durch Lichtbogenentladung, die Ionenzerstäubung durch Ionenbestrahlung, in den meisten Fällen mit Argonionen.

Mit den verschiedenen PVD-Varianten können fast alle Metalle und auch Kohlenstoff in sehr reiner Form abgeschieden werden. Führt man dem Prozess Reaktivgase wie Sauerstoff, Stickstoff oder Kohlenstoff zu, lassen sich auch Oxide, Nitride oder Carbide abscheiden. Die dabei entstehenden keramischen Hartstoffschichten werden in großem Umfang zur verschleißmindernden Veredelung von artikulierenden Oberflächen künstlicher Gelenke eingesetzt.

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PVD-Techniken beschrieben:

Beim Magnetron-Sputtern bildet das zu zerstäubende Material die Kathode (Target), während die Vakuumkammer und das Beschichtungsgut (Implantat) als Anode geschaltet werden. Durch Anlegen einer Gleichspannung von mehreren hundert Volt wird das Arbeitsgas (Argon) ionisiert. Die Arbeitsgas-Ionen werden im elektrischen Feld in Richtung der Kathode beschleunigt und zerstäuben durch Stoßprozesse an deren Oberfläche das Targetmaterial. Die Zerstäubungsrate wird entscheidend dadurch gesteigert, dass sich im Feld des hinter der Kathode angebrachten Permanentmagneten die Elektronenkonzentration vor der Kathode und damit die Ionisationsrate des Arbeitsgases deutlich erhöht. Die herausgeschlagenen Atome oder Atomaggregate des Targetmaterials bewegen sich in Richtung Substrat (Implantat) und lagern sich dort als Schicht ab. Da es sich im Wesentlichen um Neutralteilchen handelt, ist ihre Nachbeschleunigung mittels einer negativen Vorspannung des Substrats nur wenig effektiv. Jedoch kommt es zu einem Beschuss der aufwachsenden Schicht mit Ionen des Arbeitsgases, was die Haftfestigkeit und Dichte der Schicht positiv beeinflusst (STÜBER 1997).

Beim Arc-Verdampfen ist das metallische Target als Kathode und die Wand der Vakuumkammer als Anode geschaltet. Zwischen diesen Elektroden wird über einen Hochspannungsimpuls ein Lichtbogen gezündet, wobei ein kleiner Teil des Kathodenmaterials verdampft, ionisiert und somit in den Plasmazustand überführt wird. Dieses Plasma zeichnet sich durch eine extrem hohe Leiffähigkeit aus, so dass der Lichtbogen bei hoher Stromstärke (50-100A) und relativ geringer Spannung (20-30V) kontinuierlich weiter brennt. Im Fußpunkt des Lichtbogens (Brennfleck), der mikroskopisch klein ist und die Targetoberfläche zufällig abrastert, wird eine derartig hohe Energiedichte erreicht, dass es zu einer blitzartigen Verdampfung des Targetmaterials kommt, welches dabei fast vollständig ionisiert wird. Das Plasma besteht aus Ionen des Targetmaterials und Elektronen und kann somit leicht durch elektrische und magnetische Felder beeinflusst werden. Das wird zur Führung des Brennflecks, zur Filterung des Plasmas und zur Beschleunigung der Ionen ausgenutzt. Die kinetische Energie der Ionen kann durch Anlegen einer negativen Vorspannung am zu beschich-

tenden Substrat (Implantat) eingestellt werden. Dadurch können die Haftfestigkeit, die Dichte, die Härte und die Struktur der Schicht verbessert werden, die aus den neutralisierten und kondensierten Ionen des Targetmaterials entsteht. Werden während der Arc-Beschichtung geringe Mengen eines Reaktivgases zugeführt, so können die Ionen des Targetmaterials (z.B. Titan) mit den Ionen des Reaktivgases (z.B. Stickstoff) keramische Schichten (z.B. Titannitrid) ausbilden. Diese Schichten haben sich als biokompatible und sehr verschleißfeste Hartstoffschichten im artikulierenden Bereich von Implantaten bewährt.

2.2.2 Elektrochemische Beschichtungen

Ionenverbindungen dissoziieren in wässrigen Lösungen in frei bewegliche Anionen und Kationen. Werden in diese Elektrolytlösung zwei Elektroden (Anode und Kathode) getaucht und diese mit einer Gleichspannungsquelle verbunden, fließt ein elektrischer Strom. An der Kathode findet eine Elektronenaufnahme und an der Anode eine Elektronenabgabe statt, man spricht von kathodischer Reduktion bzw. anodischer Oxidation:

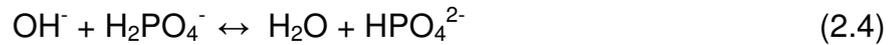


Durch die Kombination dieser elektrochemischen Reaktion mit einer Säure-Basen-Reaktion und einer Präzipitationsreaktion kommt es zu einer elektrochemischen Abscheidung aus dem Elektrolyten.

2.2.2.1 Calciumphosphat(CaP)-Beschichtungen

Calciumphosphate werden auf Grund ihrer hervorragenden Biokompatibilität nicht nur für Oberflächenbeschichtungen, sondern auch als Knochenregenerationswerkstoffe eingesetzt. Calciumphosphate begünstigen die Osteointegration und sorgen so für eine schnelle kraftschlüssige Verbindung zwischen Implantat und Biosystem. Für die knochenseitige Beschichtung von z. B. Gelenksimplantaten mit Calciumphosphat wird auf der basisch modifizierten Oberfläche des als Kathode geschalteten Implantats Calciumphosphat, z. B. Brushit ($\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$), aus einer Lösung abgeschieden, die Calcium- und Dihydrogenphosphatsalze enthält.

Chemisch kann dieser Vorgang durch folgende Reaktionen beschrieben werden:



Bei Stromfluss kommt es zur Bildung von gasförmigem Wasserstoff und Hydroxidionen, siehe Gleichung (2.3). Das bewirkt eine lokale pH-Wert-Erhöhung auf der Implantatoberfläche, der Wasserstoff entweicht, die OH⁻-Ionen reagieren mit den Dihydrogenphosphationen und gemäß Gleichung (2.4) entstehen an der Kathodenoberfläche Monohydrogenphosphationen. In Folge der lokalen pH-Wert-Erhöhung wird an der Kathodenoberfläche das Löslichkeitsprodukt des im stromlosen Zustand gesättigten Elektrolyten für Calciummonohydrogenphosphat überschritten und es kommt unter Einlagerung von Kristallwasser zur Präzipitation von Brushit, Gleichung (2.5). Wegen der günstigen Keimbildungsbedingungen auf der kathodischen Implantatoberfläche scheidet sich vornehmlich dort das Brushit als Schicht ab. Die so entstandene, vorwiegend auf Knochenimplantaten abgeschiedene, etwa 20 µm dicke Brushit-Schicht zeichnet sich durch eine feinkristalline Struktur aus, bei der die nadel- und plättchenförmigen Calciumphosphat-Kristalle bevorzugt vertikal zur Implantatoberfläche ausgerichtet sind (Abb.1). Diese Schichtmorphologie erzeugt einen starken Kapillareffekt, was nach Implantation das Eindringen von Körperflüssigkeiten, insbesondere von Blut, in die Räume zwischen den CaP-Kristallen bewirkt. Das schnelle und tiefe Eindringen des Blutes in diese poröse Schicht ermöglicht die Fixierung von Proteinen, Wachstumsfaktoren und Stammzellen auf der Implantatoberfläche und regt so die Einheilung der Implantate an (Abb. 2). Die durch die Schichtresorption freigesetzten Calcium- und Phosphationen werden in körpereigenen Knochen umgewandelt. Nach 6 Wochen ist die Schicht vollständig resorbiert und durch neu gebildeten Knochen ersetzt.

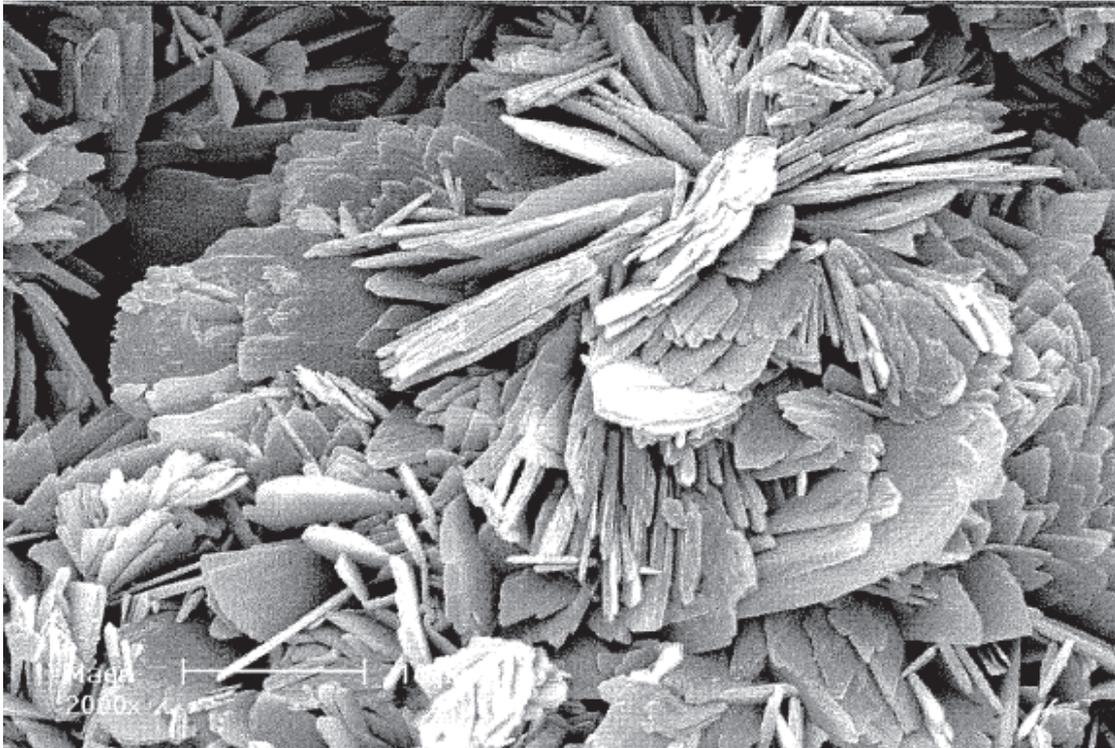


Abb. 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer elektrochemisch abgeschiedenen Brushit-Schicht

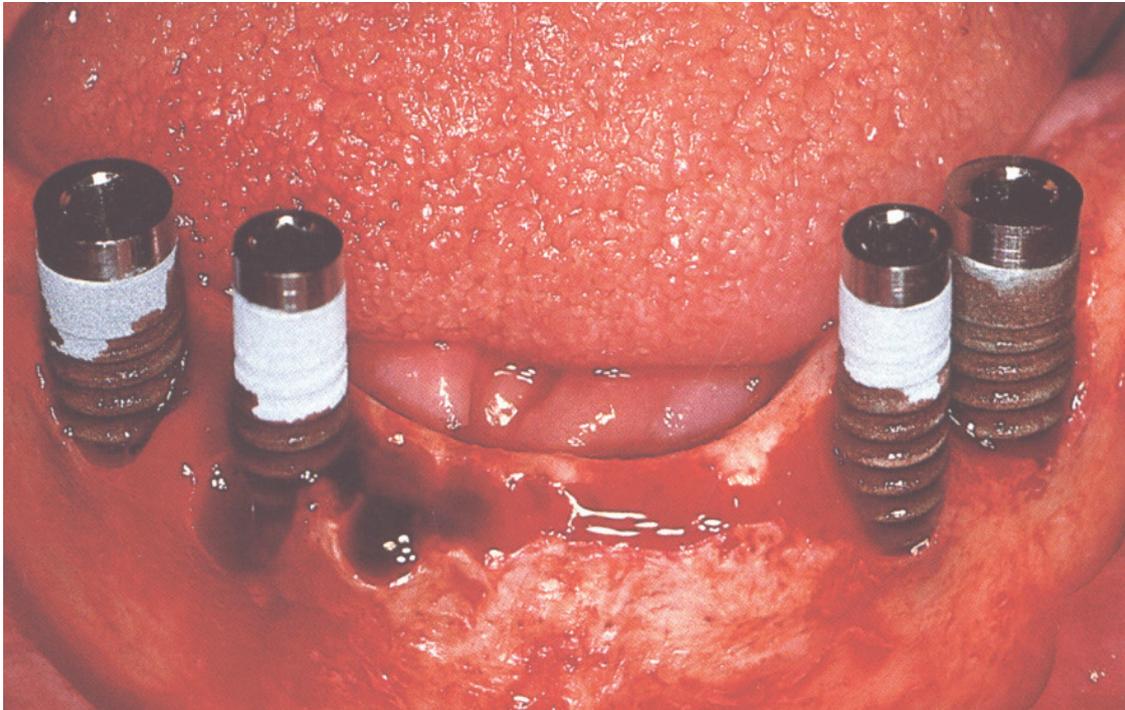


Abb. 2 Hochporöse CaP-Schicht auf Zahnimplantaten

Die Bedingungen für die elektrochemische Abscheidung von Calciumphosphaten können in weiten Grenzen variiert werden. So lassen sich sowohl die Dicke und die Morphologie der abgeschiedenen Schichten als auch die Rauigkeit der zu beschichtenden Oberfläche sehr einfach und damit wiederholbar modifizieren, was für die praktische Nutzung dieser Schichten von ausschlaggebender Bedeutung ist.

2.2.2.2 Plasmaelektrochemische Oxidation (PeO)

Titan ist ähnlich wie Aluminium auf Grund seiner äußerst hohen Reaktivität mit Sauerstoff in der Lage, an der Luft innerhalb kürzester Zeit eine nur wenige Nanometer dicke Oxidschicht auszubilden. Durch die Ausbildung dieser Oxidschicht wird die weitere Oxidation des Titans verhindert.

Bei der anodischen Oxidation wird eine elektrolytische Elektrodenreaktion genutzt, um die Dicke dieser durch Selbstpassivierung entstandenen TiO_2 -Schicht technisch um das bis zu 1000fache zu vergrößern. Dazu werden saure oder basische chloridfreie Elektrolytbäder genutzt, wobei das zu beschichtende Titanwerkstück als Anode geschaltet wird. Dabei kommt es zur Wasserzersetzung mit Freisetzung von Sauerstoff an der Anode. Die Anodenreaktion lässt sich in zwei Teilreaktionen aufteilen (LAUSMAA 2001):

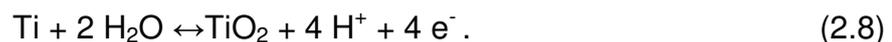
A) Grenzfläche Ti/TiO_2 :



B) Grenzfläche $\text{TiO}_2/\text{Elektrolyt}$:



woraus sich als Gesamtreaktion ergibt:



Zusätzlich wird ein beträchtlicher Teil des an der Anode gebildeten Sauerstoffs als Gas freigesetzt:



Der Ladungsausgleich erfolgt über die angeschlossene Gleichstromversorgung, indem die Elektronen über die Anode abfließen, während die entsprechende Menge Wasserstoffionen im Elektrolyten durch das elektrische Feld zur Kathode transportiert wird, wo sie unter Elektronenaufnahme neutralisiert werden und als gasförmiger Wasserstoff entweichen.

Das wesentliche Merkmal der anodischen Oxidation von Titan besteht darin, dass die Oxidbildung diffusionsgesteuert verläuft, weil die elektrolytisch gebildeten Sauerstoffionen, getrieben vom anliegenden elektrischen Feld, erst durch die bereits vorhandene Oxidschicht hindurch diffundieren müssen, bevor sie gemäß Gleichung (2.8) an der Grenzfläche Ti/TiO_2 mit dem metallischen Titan zum Titandioxid reagieren können. Infolge der sehr geringen Leitfähigkeit des TiO_2 fällt die angelegte Gleichspannung im Wesentlichen über die Oxidschicht ab, so dass die Oxidschichtdicke weiter anwächst, solange die zur angelegten Spannung proportionale elektrische Feldstärke in der Lage ist, die Sauerstoffionen durch die stetig wachsende Oxidschicht zu transportieren. Das führt schließlich zu einer, der angelegten Gleichspannung U annähernd proportionalen, maximal erreichbaren Oxidschichtdicke D_{TiO_2} , wobei K eine Konstante ist (LAUSMAA 2001):

$$D_{\text{TiO}_2} = K U . \quad (2.10)$$

Die in Gleichung (2.10) dargestellten Verhältnisse werden technisch genutzt, um TiO_2 -Schichten mit Dicken von bis zu einigen hundert Nanometern auf Titanimplantaten zu bilden. Infolge einer dickenabhängigen Auslöschunginterferenz entstehen dabei unterschiedlich farbige Schichten. Dies kann zur farblichen Kennzeichnung genutzt werden. Die anodische Oxidation gehorcht Gleichung (2.10) jedoch nur, solange die Gleichspannung U nicht ausreicht, um die isolierende TiO_2 -Schicht zu durchschlagen. In Abhängigkeit von der Elektrolytzusammensetzung und -konzentration kann es schon bei Spannungen von 30 V zum dielektrischen Durchschlag der Oxidschicht kommen, wodurch der Ladungstransport, die Sauerstoffionendiffusion und somit das Schichtwachstum auch bei größeren Oxidschichtdicken aufrechterhalten werden. Es kommt dabei zur so genannten Funken-Anodisierung, welche zu einer erheblichen Gasentwicklung und zu einer mit Leuchterscheinungen verbundenen Funkenentladung

in den Gasbläschen vor der Implantatoberfläche führt. Dabei handelt es sich um einen komplexen plasmachemischen Prozess, bei dem lokal sehr hohe Energieeinträge in das Material erfolgen. Diese beschleunigen zum einen den Ionentransport und erzeugen zum anderen - durch die fortwährende Bildung neuer, zufällig orientierter Strompfade infolge der elektrischen Durchschläge zum metallischen Werkstoff - eine inhomogene dreidimensionale Oxidschichtstruktur, die einen sehr porösen, offenporigen Charakter besitzt. In die sich bildenden Umwandlungsschichten relativ großer Dicke (bis zu 100 µm) können neben dem Sauerstoff weitere Ionen aus dem Elektrolyten eingelagert werden (LAUSMAA 2001).

Die in dieser Arbeit verwendeten, durch plasmaelektrochemische Anodisierung gebildeten Oxidschichten sind maximal 5 µm dick. Die durch die Anodisierung aufgehärtete Titanwerkstoff-Oberfläche reduziert die Neigung zur Kaltverschweißung und verbessert deren Ermüdungsfestigkeit.

2.2.3 Antibakteriell wirkende Oberflächen

In klinischen Umgebungen sind bakterielle Verunreinigungen eine latente und nicht vollständig zu vermeidende Gefahr. Bei chirurgischen Eingriffen, wie z.B. Implantationen, findet direkt nach dem Einbringen des Implantates ein in der Literatur als „race for the surface“ beschriebener Vorgang statt. Dabei findet ein „Wettlauf“ zwischen den körpereigenen Zellen und den während der Operation eingebrachten Mikroorganismen um die Besiedelung der zunächst sterilen Implantatoberfläche statt. Kommt es zu einer übermäßigen Erstbelegung mit Bakterienzellen und der Ausbildung eines so genannten Biofilms, kann das zu einer manifesten Infektion und zur Abstoßung des Implantates führen (GRISTINA 1987).

Die Entstehung eines Biofilms kann in verschiedene Phasen eingeteilt werden, die als Induktionsphase, Akkumulationsphase sowie Existenz- und Plateauphase bezeichnet werden (Abb. 3).

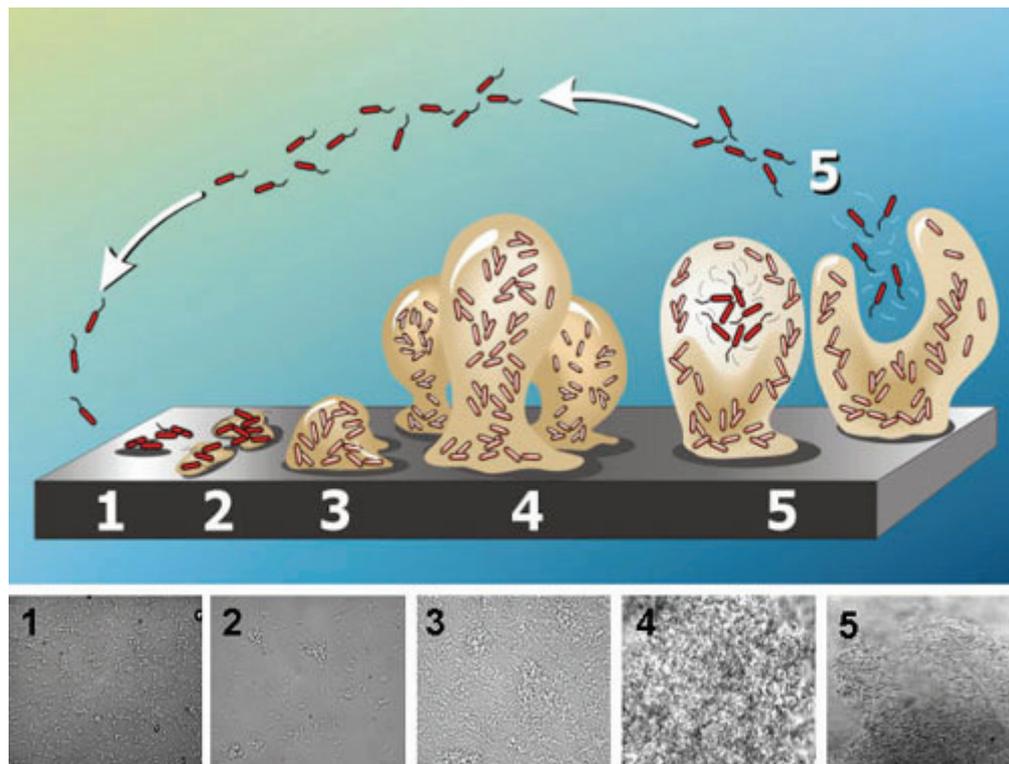


Abb. 3 Phasen der Biofilmbildung (www2.biologie.uni-halle.de)

Nach dem Eintrag (1) von Bakterien bildet sich in der Induktionsphase (2) eine dünne zähflüssige Schicht aus organischen Substanzen aus. Diese schleimartige Matrix des Biofilms entsteht durch die von den Mikroorganismen ausgeschiedenen extrazellulären polymeren Stoffe (EPS), die mit Wasser Hydrogele bilden (3/4). Die EPS bestehen aus Biopolymeren und geben dem Biofilm eine stabile Form. Diese organische Schicht wird in der Akkumulationsphase (5) von Keimen besiedelt, welche die organischen Substanzen als Nährstoffe nutzen. Ein intrazelluläres Kommunikationssystem dient den Mikroorganismen zur Verständigung, es wird auch als „Quorum sensing“ bezeichnet. Durch die Aktivierung genetischer Programme kann so eine Reihe von Vorgängen untereinander koordiniert werden (COSTERTON et al.1999). Durch die Vermehrung und Ausbreitung der Mikroorganismen kommt es zunächst zur flächigen Besiedelung, die später mehrschichtig wächst und so schließlich heterogene dreidimensionale Strukturen bildet. Liegt ein Gleichgewicht zwischen Zuwachs und Abbau des Biofilms vor, spricht man von der Existenz- und Plateauphase (5).

Es ist bekannt, dass Mikroorganismen, die in Biofilmen leben, sich deutlich von planktonischen Bakterien unterscheiden. Der Biofilm bietet den Mikroorganis-

men einen ausgezeichneten Schutz und ermöglicht ihnen, sich auf veränderte Bedingungen einzustellen. Die Toleranz gegenüber pH-Wert-Änderungen, Temperaturschwankungen oder Antibiotika steigt somit an. Zudem bietet die Matrix den Mikroorganismen mechanische Stabilität. Es können so langfristige synergetische Wechselbeziehungen aufgebaut werden, die es den Bakterien ermöglichen, Hungerperioden zu überstehen (GIBBIS & WARNER 2005).

2.2.3.1 Antibiotika-Beschichtung

Die Biofilmbildung kann unterdrückt werden, indem Antibiotika auf die Implantatoberfläche aufgebracht werden, die im Verlaufe eines bestimmten Zeitraums freigesetzt werden. Bisher wurden Antibiotika-Beschichtungen (z. B. auf Kathetern) beschrieben, die durch das Einbringen von Chlorhexidin und Silbersulfadiazin eine antibakterielle Wirkung zeigten (VEENSTRA et al. 1999). Daneben reduzierte eine Imprägnierung mit beispielsweise Minocyclin und Rifampicin die Infektionen ebenfalls signifikant, was prinzipiell auch für Implantate denkbar ist. Antibiotika blockieren lebensnotwendige Stoffwechselforgänge in der Bakterienzelle, sie richten sich z. B. gegen Zellwandsynthese, Funktionalität der Zellmembran, Nukleinsäuresynthese und Translation.

Ein Einsatz therapeutischer Antibiotika zur lokalen Infektionsprophylaxe ist jedoch umstritten, da die lokale Anwendung vermehrt zur Entwicklung von Antibiotikaresistenzen bei Bakterien führt. So wurde beinahe sofort nach der Einführung von Penicillin in Deutschland in den 50er Jahren die Resistenz einiger Staphylococcenstämme festgestellt. Heute sind 80% aller *Staphylococcus aureus* – Stämme gegenüber Antibiotika (<http://www.zum.de/Faecher/-Materialien/beck/13/bs13-7.html>) resistent. *Staphylococcus aureus* besitzt eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Trockenheit und Wärme, sein Wachstumsoptimum liegt bei 37 °C. Meist löst es keine Krankheitssymptome aus. Liegen jedoch Störungen im Immunsystem vor, findet der Keim günstige Bedingungen, um sich auszubreiten. In diesem Fall kann es z. B. zu Hautinfektionen, Lungenentzündungen, Endokarditis, zum Toxischen Schocksyndrom und zur Sepsis führen. Besonders die Stämme des *Staphylococcus aureus*, die Resistenzen gegen Antibiotika ausgebildet haben (so genannte MRSA = **M**ethicillin- oder **M**ulti-**R**esistenter-**S**taphylococcus *aureus*), stellen durch schlechte Behand-

barkeit eine echte Gefahr dar. MRSA-Bakterien zählen so zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen. Sie werden meist über die Hände des Krankenhauspersonals übertragen. Der Resistenzmechanismus, mit gravierenden Auswirkungen in Hinblick auf Prophylaxe und Therapie, liegt in der Fähigkeit des *Staphylococcus aureus*, das so genannte *mecA*-Gen zu erwerben. Dadurch werden alle Antibiotika der Klasse der Beta-Lactamantibiotika (Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme) unwirksam (BECKER & v. EIFF 2003). Gerade bei Langzeit-Implantaten kann die Antibiotika-Freisetzung nach einiger Zeit die minimale Hemmkonzentration (MHK) unterschreiten, wodurch die Resistenzbildung gefördert, die bakterielle Besiedlung der Implantatoberfläche sogar verstärkt und eine spätere Therapie selbst nach Explantation des Implantates unmöglich werden kann (GALLARDO et al. 2001). Haben Bakterien erst Resistenzen gegen ein Antibiotikum ausgebildet, so werden diese über so genannte Plasmide auf ihre Nachkommen vererbt. Resistenzbildungen beruhen u.a. auf Mutationen, bei denen das jeweilige bakterielle Enzym, dessen Produktion durch das Medikament gehemmt werden soll, so verändert wird, dass diese Hemmfunktion unwirksam wird (<http://encarta.msn.Antibiotika> 2008). Die Wirkorte der wichtigsten Antibiotika sind in Abbildung 4 dargestellt.

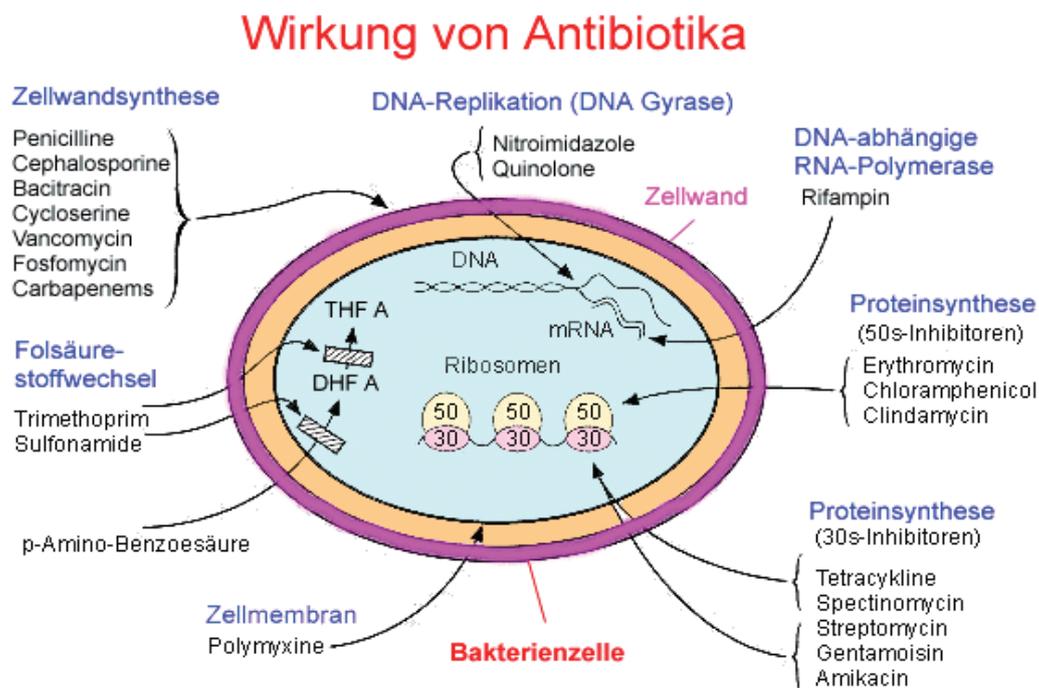


Abb. 4 Wirkorte von Antibiotika

(<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-7.htm>)

2.2.3.2 Metallschichten

Eine Alternative zur Verhinderung der Bakterienbesiedelung besteht in der Belegung der Implantatoberfläche mit Metallkationen. Der toxische Effekt von z. B. Kupfer- bzw. Silberionen auf Zellen oder Bakterien ist ein interessantes Phänomen, das bereits in zahlreichen Studien beschrieben wurde. Obwohl der Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, gilt als sicher, dass Metallkationen die Zellen an verschiedenen Stellen attackieren und so physiologische Funktionen, wie z. B. die Zellmembran-, die RNA- und die DNA-Synthese, die Translation oder die Proteinsynthese inaktivieren. Durch ihre hohe Affinität zu negativ geladenen Molekülgruppen wie Sulfid-, Carboxyl-, oder Phosphatgruppen und daraus resultierenden Bindungsreaktionen ändert sich die molekulare Struktur des Makromoleküls, welches dadurch für die Zelle wertlos wird. Ohne diese Vorgänge ist die Lebensfähigkeit des Bakteriums sehr eingeschränkt und das Bakterium stirbt ab (GIBBIS & WARNER 2005) (Abb.5). Diese Wirkung wird auch als oligodynamischer Effekt bezeichnet.

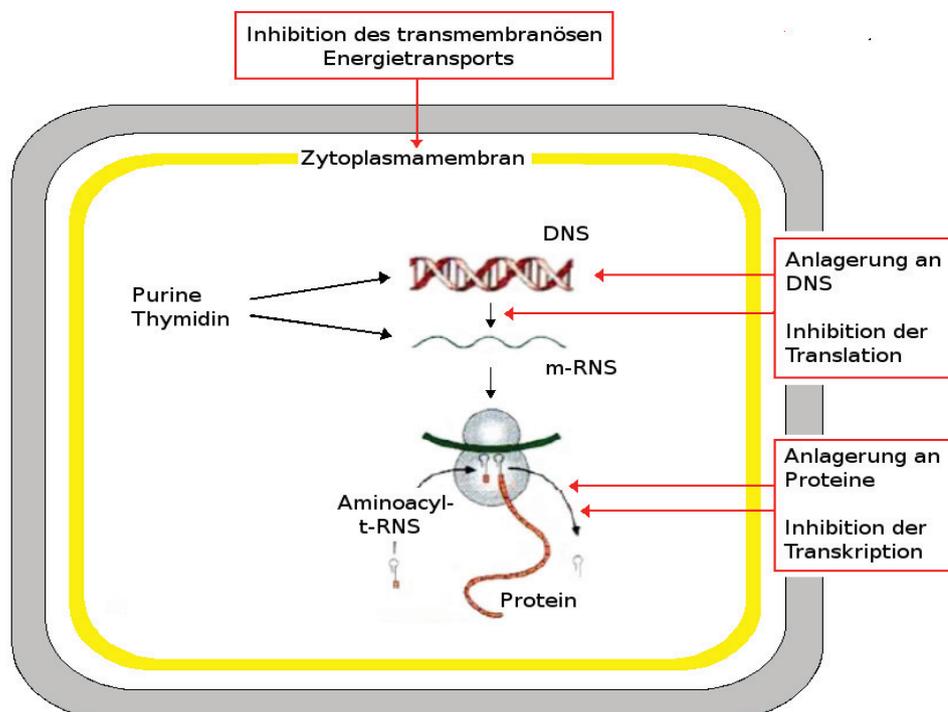


Abb. 5 Oligodynamischer Effekt von Metallkationen (WELZ 2008)

Allerdings ergibt sich daraus ein weiteres Problem: Werden die Implantatoberflächen stark toxisch gestaltet, so wird gleichzeitig die Belegung mit körpereigenen Zellen, die für die Integration des Implantates unbedingt notwendig ist, verhindert. Dies ist insbesondere bei Langzeitimplantaten, wie Hüftendoprothesen, ein unerwünschter Effekt. Eine schnelle Besiedelung mit vitalen Körperzellen fördert die Integration des Implantates und erschwert eine Infektion, weswegen sie durch eine bakterientoxisch wirkende Oberflächenmodifikation möglichst nicht unterdrückt werden darf.

Das Grundprinzip der meisten Verfahren zur Herstellung dünner Metallschichten besteht darin, das gewünschte Schichtmaterial in die Gasphase zu überführen und dieses Gas auf dem Substrat kondensieren zu lassen. Dieses Grundprinzip liegt auch dem bereits beschriebenen Sputterverfahren zu Grunde. Eine weitere Möglichkeit der Beschichtung ist die galvanotechnische Metallabscheidung. Bei letzterer handelt es sich um eine elektrochemische kathodische Abscheidung. Dabei wird das an der Anode in Lösung gehende positive Metallion im elektrischen Feld in Richtung Kathode bewegt und dort als Schicht abgeschieden. Als Elektrolyt werden wässrige Lösungen von Salzen des Anodenmaterials verwendet. Je länger der zu beschichtende Gegenstand im Bad verbleibt und je höher die Spannung und damit die Stromstärke ist, desto dicker wird die Metallschicht auf der Kathode (Faraday'sches Gesetz) (STÖCKER 1994).

3 Material und Methoden

Für die durchgeführten Versuche wurden die Oberflächen von Titanproben (Titan Grade 2, 20 mm Durchmesser, 1 mm Dicke) mit Hilfe verschiedener Beschichtungsverfahren modifiziert (Tab. 1)

Tabelle 1: Beschichtungen der verwendeten Titanprobekörper

Beschichtung	Bezeichnung
Plasmaelektrochemische Oxidation	PeO
Plasmaelektrochemische Oxidation + galvanische Kupfer-Beschichtung	PeO-gCu
Plasmaelektrochemische Oxidation + galvanische Silber-Beschichtung	PeO-gAg
Arc-Beschichtung (Titannitrid)	TiN
Arc-Beschichtung (Titannitrid) + Sputter-Beschichtung (Kupfer)	TiN-sCu
Elektrochemische Calciumphosphat-Beschichtung	CaP
Elektrochemische Calciumphosphat-Beschichtung + chemische Kupferphosphat-Beschichtung	CaP-cCuP
Oberfläche geätzt + Elektrochemische Calciumphosphat-Beschichtung	äCaP
Oberfläche geätzt + Elektrochemische Calciumphosphat-Beschichtung + chemische Kupferphosphat-Beschichtung	äCaP-cCuP
Massive Kupferprobe (Kupferronde)	Cu - Ronde

Des Weiteren wurden unterschiedliche Lösungen auf ihre antibakterielle Wirkung untersucht. Die verwendeten Salze wurden in destilliertem Wasser gelöst, die reine Kupferionen-Lösung wurde durch das Einlegen einer Kupferronde in PBS-Puffer gewonnen (Kap. 3.2.3.1.1).

3.1 Beschichtungsparameter

3.1.1 Galvanische Beschichtung

Die durch plasmaelektrochemische Oxidation (vgl. Kap. 2.2.2.2) beschichteten Probekörper wurden galvanisch mit Kupfer bzw. Silber beschichtet.

Als Elektrolyt wurde zur Kupfer-Beschichtung eine 10 %ige wässrige Kupfer-II-acetatlösung verwendet (Abb. 6).

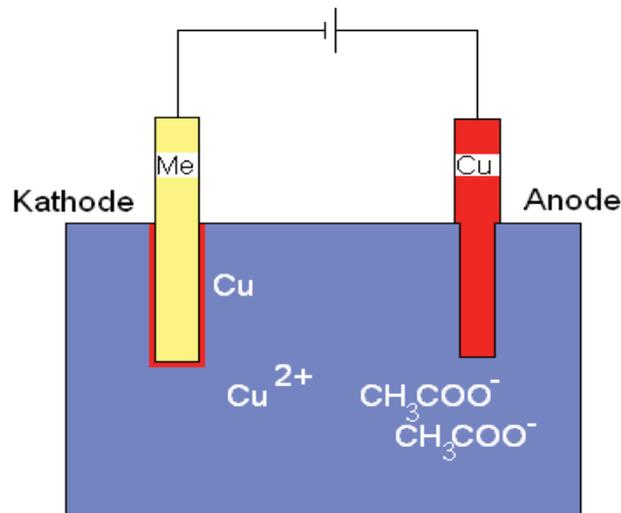


Abb. 6 Schematische Darstellung der galvanischen Kupferbeschichtung

Vor der galvanischen Beschichtung wurden die Probekörper mit Ethanol gereinigt. Ein Kupferblech mit den Maßen $170 \times 50 \times 5 \text{ mm}^3$ wurde als Anode in den Elektrolyten gestellt und kontaktiert. Die zu beschichtende Probe wurde mit Hilfe einer Klemme an den Minuspol der Spannungsquelle angeschlossen und vollständig in das Elektrolytbad eingetaucht. Dabei wurde die zu beschichtende Oberfläche parallel und stets im gleichen Abstand zur Anodenoberfläche angeordnet. Die Rückseiten der Proben wurden mit Kaptonband abgeklebt, um eine Metallbeschichtung zu vermeiden. Zur Beschichtung mit Kupfer wurde eine Spannung von 2 V angelegt und die Stromstärke auf 60 mA eingestellt. Die Beschichtungsdauer betrug 60 Sekunden (Abb. 7).

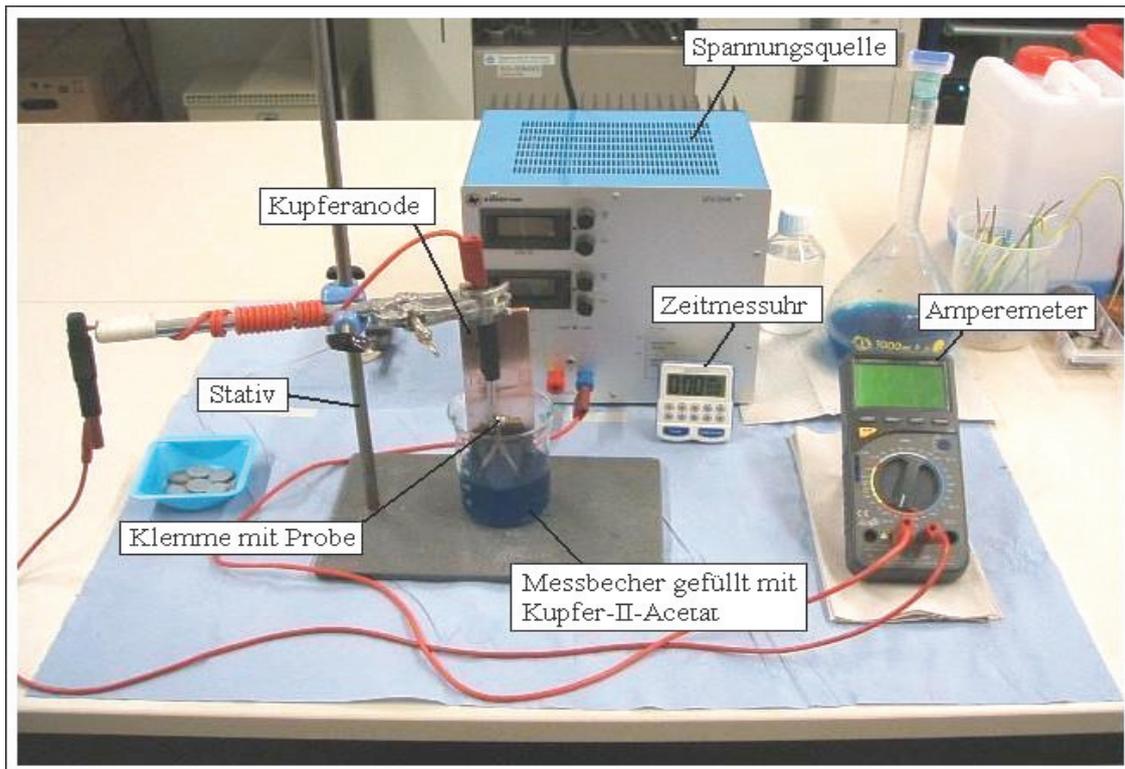


Abb. 7 Versuchsaufbau bei galvanischer Kupferbeschichtung

Die Silberbeschichtung wurde unter den gleichen Bedingungen wie bei der Kupferbeschichtung in einer 17 %igen wässrigen Silbernitratlösung unter Verwendung einer Silberanode bei einer Stromdichte von 3 mA/cm^2 durchgeführt.

Die nach der plasmaelektrochemischen Oxidation nicht mechanisch nachbehandelten Oberflächen der Probekörper sind auf Grund ihrer Herstellung von einer Vielzahl leitfähiger Kanäle durchzogen, die bis in das unveränderte Grundmaterial der Titanlegierung reichen. Bei der galvanischen Beschichtung füllen die Kupfer- bzw. Silberatome diese zerklüfteten Kanäle auf und bilden somit eine unregelmäßige (inhomogene) Metallschicht aus. Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde die so entstandene Schicht abschließend bei 2,5 bar glaskugelgestrahlt (Abb. 8 und 9).

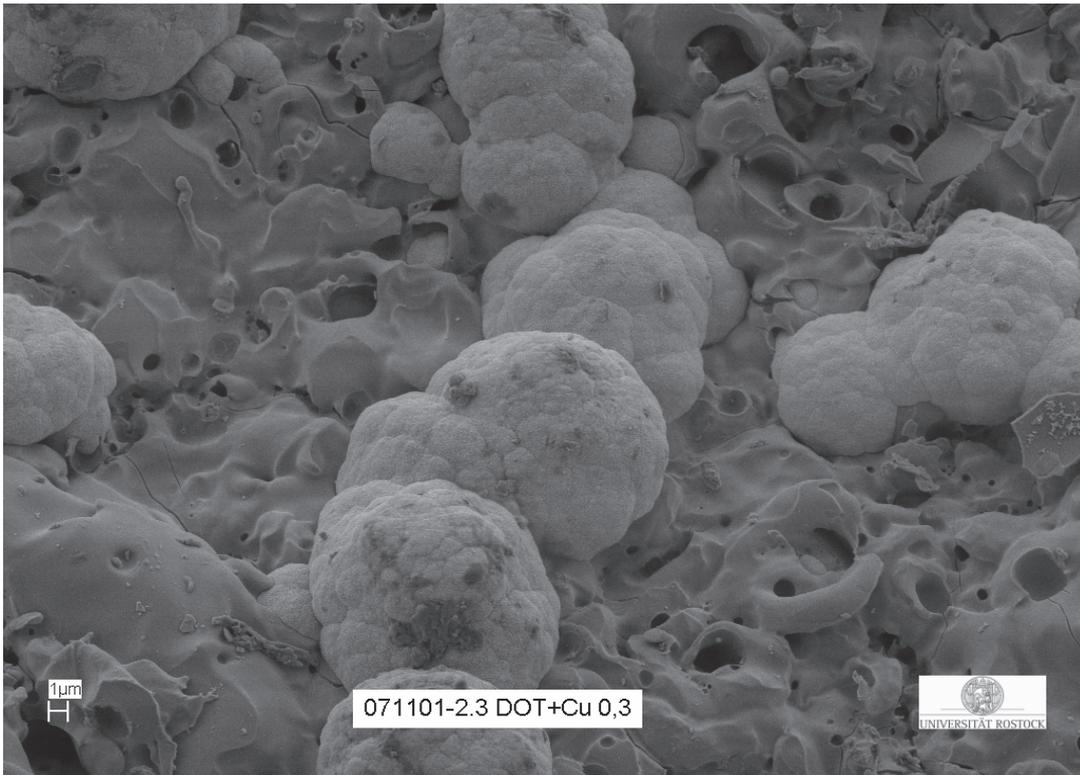


Abb. 8 REM-Aufnahme der Oberfläche einer plasmalektrochemisch oxidierten und nachfolgend galvanisch mit Kupfer beschichteten Titanprobe

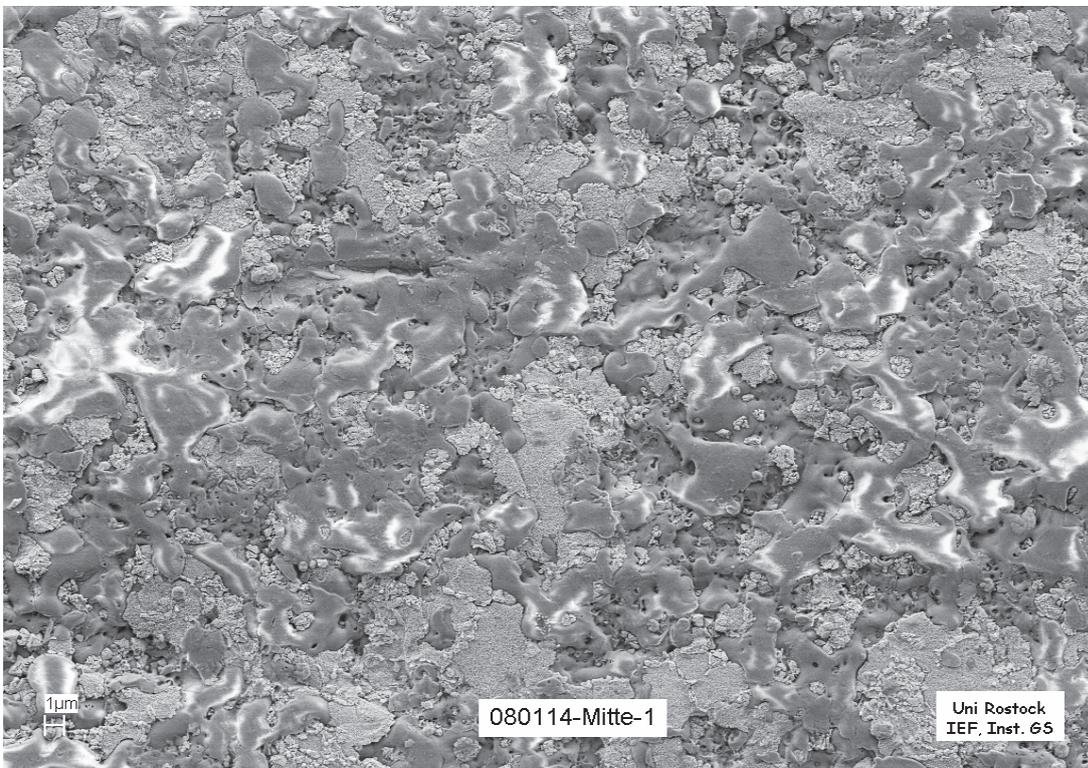


Abb.9 Plasmalektrochemisch oxidierte und galvanisch kupferbeschichtete Oberfläche nach dem Glaskugelstrahlen

3.1.2 Chemische Kupferphosphatbeschichtung

Als Substrate (CaP) für die chemische Kupferphosphat-Beschichtung wurden elektrochemisch abgeschiedene Bruschit-Schichten verwendet (Kap. 2.2.2.1). Zum Vergleich wurden leicht modifizierte Substrate (äCaP) verwendet. Zum einen wurden diese Proben durch Strahlen mit Calciumphosphat und chemisches Ätzen mikroskopisch aufgeraut, zum anderen die Dicke der Bruschit-Schicht auf 1/10 verringert. Zur Beladung dieser durch Beschichtung und Aufrauhung modifizierten Probenoberflächen mit Kupfer wurde zunächst durch Einlegen einer massiven Kupferronde in 0,2 molaren Tris-Puffer bei 37 °C eine relativ konzentrierte Kupferlösung von ca. 3 g/l hergestellt, die dann vierfach in PBS-Puffer verdünnt und auf die Oberfläche der (CaP)- und (äCaP)-Probekörper aufgebracht eine Flächenkonzentration von ca. 1 µg/mm² Kupfer ergab (Abb. 10).

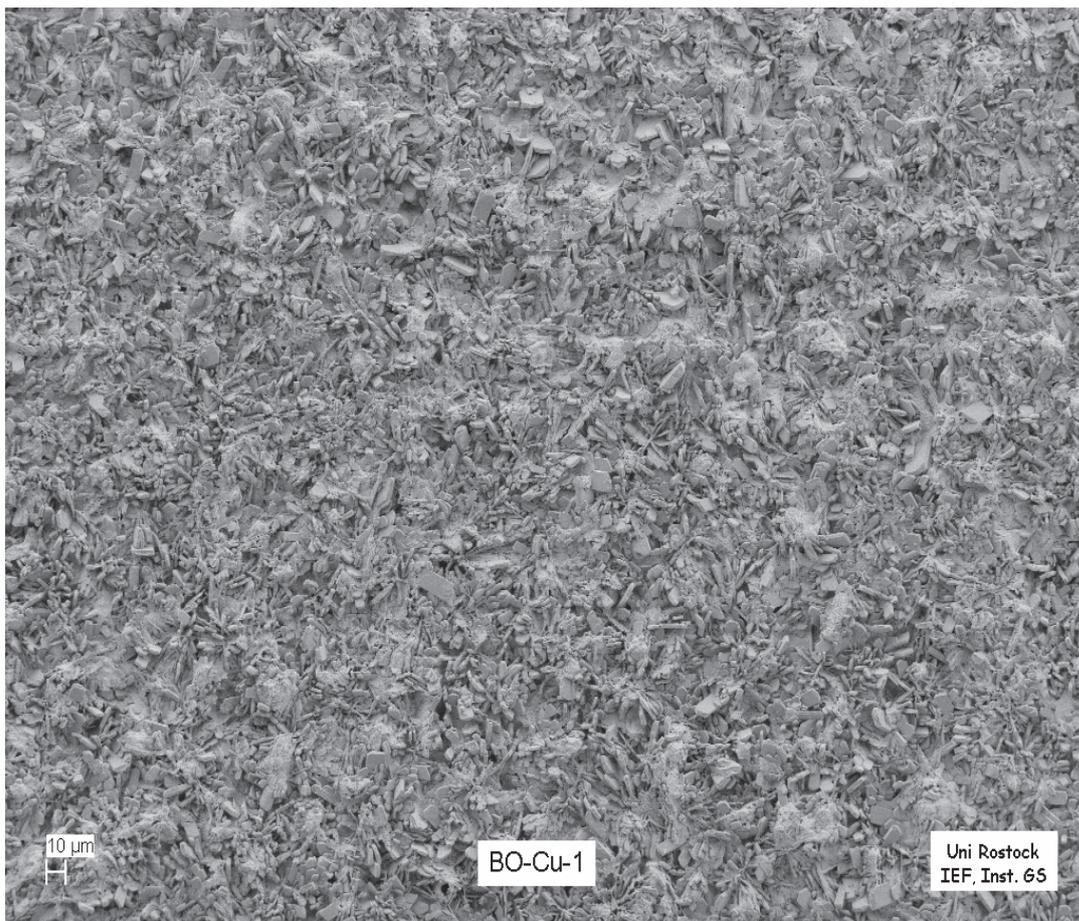


Abb.10 Chemische Kupferbeschichtung auf einer Calciumphosphatoberfläche (CaP-cCuP)

3.1.3 Arc- / Sputter- Beschichtung

Die Titanproben wurden mit einer 1,6 %igen wässrigen Galvex 17.30SNR-Lösung in einem Ultraschallbad gewaschen, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und mit Druckluft sowie danach im Trockenschrank bei 75 °C für 10 min getrocknet. Anschließend wurden die Proben in der Vakuumkammer der PVD-Anlage HHB-6 auf dem Drehteller platziert. Dabei wurden sie einzeln in Höhe der Quellenmitte in einem Abstand von 80 mm von der Drehachse des Halters entfernt und parallel zu dessen Drehtangente angeordnet (Abb. 11). Auf dem Drehteller vollziehen die Proben eine 2achsige Rotation, um eine homogene Beschichtung im gerichteten Strahl der Beschichtungsquelle zu gewährleisten.

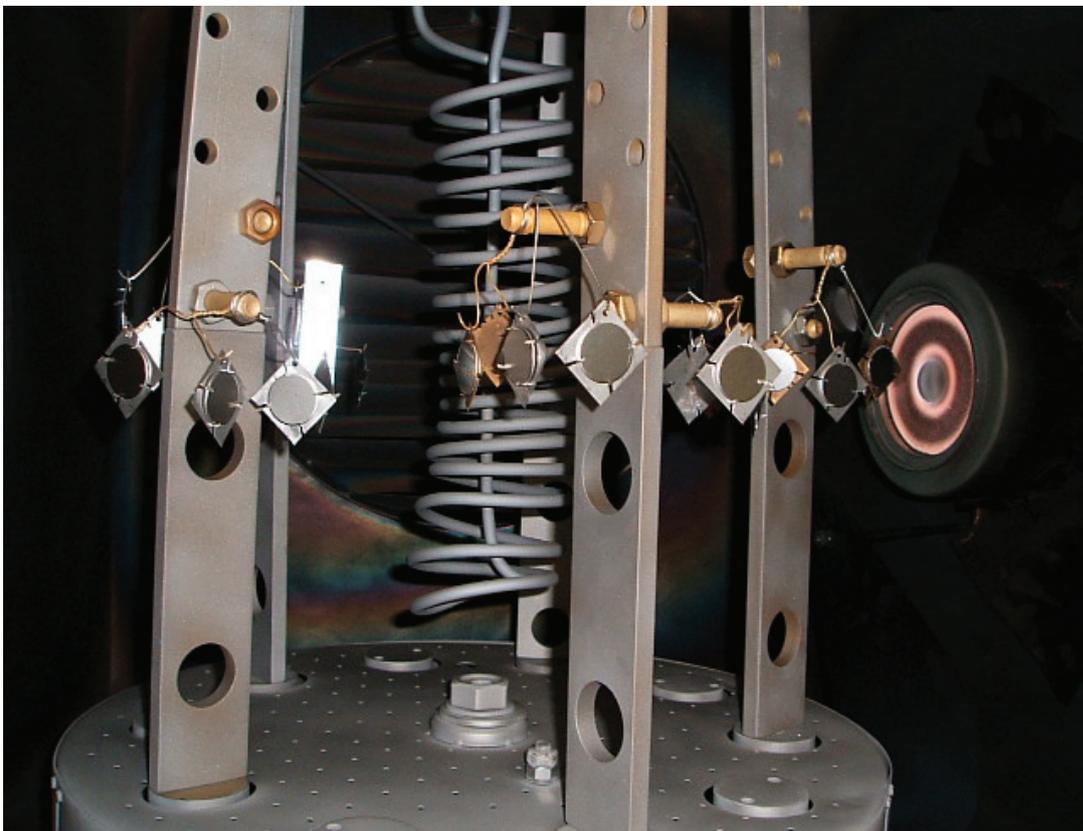


Abb. 11 Probenanordnung in der PVD-Beschichtungsanlage HHB-6, rechts: Kupferquelle (Magnetron)

Nach dem Abpumpen der Kammer wurden die Proben im Hochvakuum bei 300 °C für 45 min ausgeheizt. Anschließend erfolgte ein 2minütiger Sputterschritt, bei dem Titanionen aus dem Plasma der Arc-Quelle auf die mit 900V

negativ vorgespannte Probenoberfläche beschleunigt werden. Das Ausheizen und das Titansputtern dienen zur Reinigung und Aktivierung der Probenoberfläche. Nach Abschluss dieses Prozesses wurde mit Hilfe des Arc-Verfahrens (Kap. 2.2.1) zunächst eine Reintitan-Haftschrift aufgetragen (3 min, Substratvorspannung: -150 V, Verdampferstrom: 70 A). Nachfolgend wurde bei weiterlaufender Titan-Bogenentladung durch Einleitung einer definierten Rate des Reaktivgases Stickstoff in die Vakuumkammer eine Titannitridschicht (TiN) auf den Proben abgeschieden (10 min, Substratvorspannung: -150 V). Die negative Vorspannung der Proben beschleunigt dabei die positiven Titanionen auf die Probenoberfläche und sorgt dort nach Reaktion mit dem Stickstoff für die Ausbildung einer dichten, haftfesten Titannitridschicht.

Die TiN-sCu Probekörper wurden durch die Kombination des Arc- und des Sputterverfahrens hergestellt. Nach der oben beschriebenen TiN-Beschichtung (Beschichtungszeit: 10 min) wurde die Titan-Arc-Quelle abgeschaltet und gleichzeitig die mit einem Kupfertarget versehene Magnetron-Sputterquelle in Betrieb genommen. Der Kammer wurde bei gleich bleibender Flussrate das Reaktivgas Stickstoff als Arbeitsgas zugeführt. Mit einer Magnetronleistung von 500 W erfolgte nun für 2 min mit dem im Kapitel 2.2.1 beschriebenen Magnetronsputterverfahren die Beschichtung mit Kupfer. Zur Erzeugung einer gleichmäßigen TiN/Cu-Sandwichschicht wurden diese Prozesse 24 Mal wiederholt. Die Beschichtungszeiten betragen dabei jeweils 2 min. Als letzte Schicht wurde TiN abgeschieden. Abschließend wurden die Proben bei Hochvakuum über mindestens 60 min abgekühlt. Die so entstandene Schicht hat eine Kupferkonzentration von ca. $3,3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ (Abb. 12).

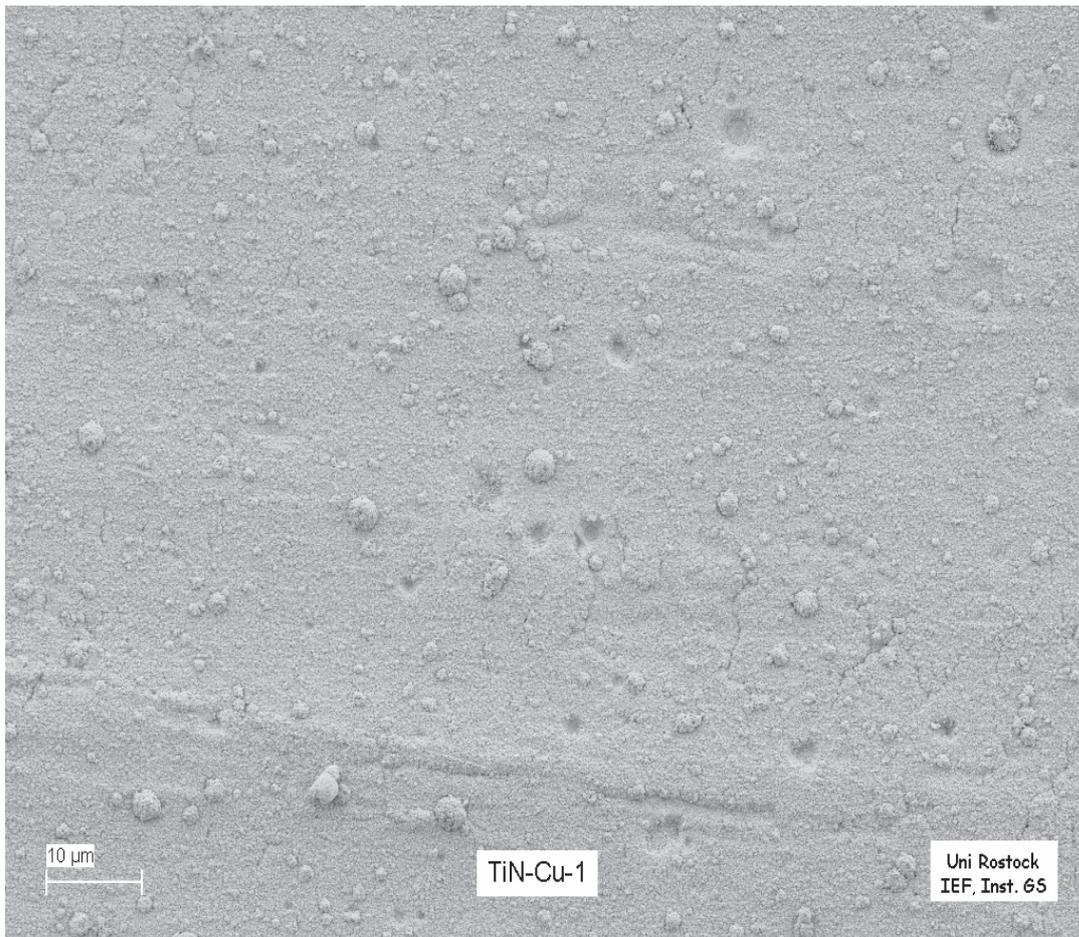


Abb.12 Titanitrid-Kupfer-Beschichtung (TiN-sCu)

3.1.4 *Staphylococcus aureus*

Zum Nachweis der antibakteriellen Wirkung der oben beschriebenen Kupfer- bzw. Silberbeschichtungen wurde das Epower *Staphylococcus aureus* ATCC25923 der Firma DOENITZ- PROLAB verwendet. *Staphylococcus aureus* ist ein kugelförmiges Bakterium (ca. 1 μm Durchmesser). Es ist unbeweglich und bildet keine Sporen.

3.2 Analytik

Die mit Kupfer bzw. Silber beschichteten Proben wurden verschiedenen Untersuchungen unterzogen. Zunächst wurde mit Hilfe von chemischen und physikalischen Analysen der Kupfer- bzw. Silbergehalt der Proben ermittelt.

3.2.1 Physikalische Analysen

Die kupfer- bzw. silberbeschichteten Proben wurden in 5 ml 0,1 molarer Salzsäure (HCl) eingelegt und für 2 Tage in einem 37 °C warmen Schüttelwasserbad entschichtet. Anschließend wurden die Proben einen Tag luftgetrocknet. Die entschichteten Proben wurden mit Hilfe von REM und EDX-Analyse auf Kupfer bzw. Silberrückstände untersucht. Der Ionen-Gehalt der Entschichtungs-lösungen wurde wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben ermittelt.

3.2.1.1 REM / EDX

Zur Charakterisierung der Oberflächenstrukturen der abgeschiedenen Schichten wurde das Feldemissionsrasterelektronenmikroskop SUPRA 25 der Firma Zeiss genutzt. Das Rasterelektronenmikroskop (REM) liefert Informationen über Oberflächenstrukturen mit einer Auflösung ≥ 1 nm und mit einer 1000x größeren Schärfentiefe im Vergleich zum Lichtmikroskop (www.uni-tuebingen.de).

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird ein fein gebündelter Elektronenstrahl in einem bestimmten Muster über ein zu untersuchendes Objekt geführt (gerastert). Der Vorgang findet im Hochvakuum statt. Der Elektronenstrahl wird in einer Elektronenquelle erzeugt und in einem elektrischen Feld mit einer Spannung zwischen 1 und 30 kV beschleunigt. Mit Hilfe von Magnetspulen wird der Elektronenstrahl auf einen Punkt des zu untersuchenden Objektes fokussiert. Trifft der Strahl auf das Objekt, sind verschiedene Wechselwirkungen möglich, deren Detektion Informationen über die Beschaffenheit des Objektes liefert. Die Intensität des Signals wird ausgewertet. Um aus den Proben die Elementzusammensetzung zu ermitteln, wird gleichzeitig eine EDX -(Energiedispersive Röntgenspektroskopie) Analyse durchgeführt. Dabei werden die Atome der Probe durch den Elektronenstrahl angeregt und senden Röntgenstrahlen mit einer elementspezifischen Energie aus, deren Intensität der Konzentration des Elements in der Probe proportional ist. Nach Korrektur der elementspezifischen Absorption dieser charakteristischen Röntgenstrahlung kann somit eine Analyse der Probenzusammensetzung mittels EDX erfolgen (<http://wikipedia.org>).

Die REM-Aufnahme und das anschließende Summen-EDX sind Voraussetzungen für das so genannte EDX-Mapping eines Oberflächenbereichs. Hierfür werden die elementspezifischen Röntgensignale dem Videoverstärker zugelei-

tet und ergeben somit ein Helligkeitsmoduliertes Bild. Diese energie-dispersive Aufnahme widerspiegelt die Verteilung des betreffenden Elements in der Oberfläche in Form der Intensitätsverteilung nur einer einzigen, dem Element zugeordneten Farbe. Die so gewonnenen Aufnahmen liefern einzeln oder als Mischung mit dem REM-Bild eine Fehlfarbdarstellung der Elementverteilung im untersuchten Oberflächenbereich (Abb. 13).

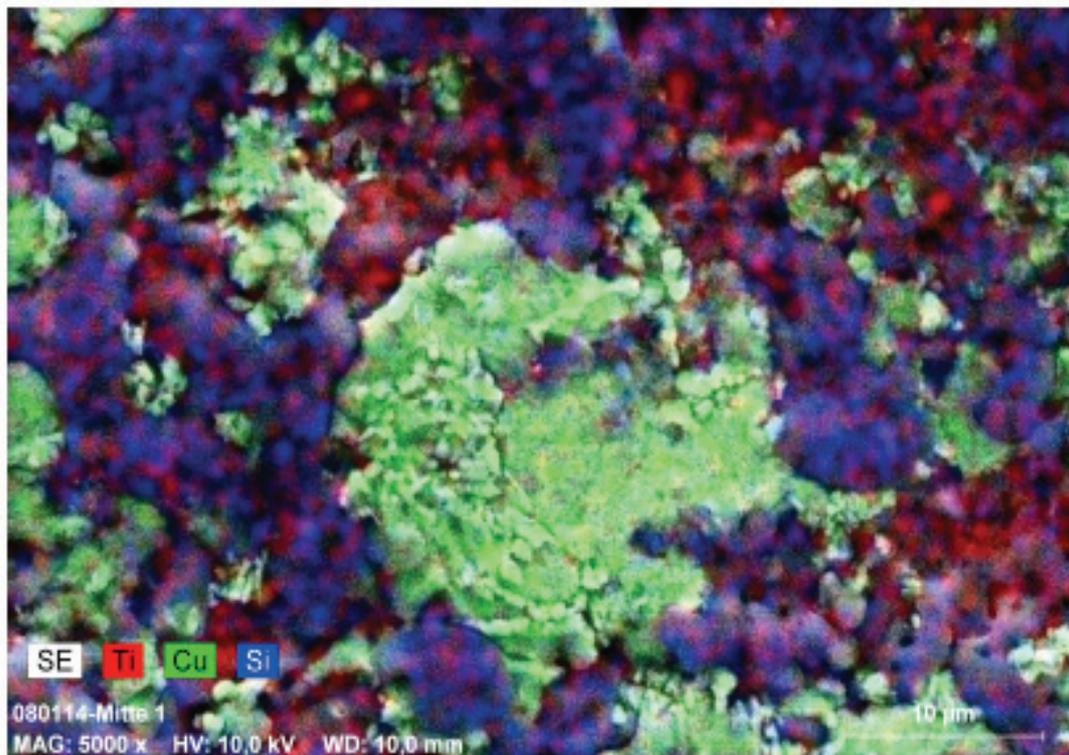


Abb. 13 EDX-Mapping einer (PeO-gCu)-Probe (glaskugelgestrahlt)

3.2.1.2 Laser-Scanning-Mikroskopie

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope (confocal laser scanning microscope, CLSM oder LSM) sind eine besondere Klasse von Lichtmikroskopen. Sie ermöglichen die dreidimensionale Abbildung von Strukturen. Sie sind in der Lage, optische Schnitte von Proben aufzunehmen. Diese können per Software zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammengefügt werden. Dadurch können Objekte real in drei Raumdimensionen abgebildet und dargestellt werden. LSM werden vorzugsweise im Fluoreszenzmodus betrieben, da durch verschiedene Techniken spezifische Probenkomponenten selektiv angefärbt und abgebildet werden können.

Als Lichtmikroskop hat ein LSM zwar ein deutlich geringeres Auflösungsvermögen als z. B. ein Elektronenmikroskop, zeichnet sich aber dadurch aus, dass Untersuchungen oder quantitative Messungen von Prozessen zerstörungsfrei im Inneren von Objekten und damit auch an lebenden Objekten möglich sind (Becker <http://www.thch.uni-bonn.de> 2009). Zur Darstellung der Biofilm- bzw. Gefäßbildung wurde das LSM (laser scanning microscope) Axio Observer Z1 der Firma Zeiss verwendet. Dem Axio Observer steht ein ganzes Spektrum leistungsfähiger Lichtquellen zur Verfügung. Für alle Standardanwendungen gut geeignet sind die selbstjustierende HBO-Lampe sowie verschiedene, langlebige Metallhalogenidlampen. Für schnellste Anregungswechsel im High Speed Imaging lässt sich die auf Xenonlampen basierende Lichtquelle Sutter Lambda DG-4 einkoppeln. Die innovative, auf Hochleistungs-LEDs basierende Lichtquelle Colibri empfiehlt sich ebenfalls für schnellste Anregungswechsel. Ihr Vorteil ist die kleine Bandbreite der LEDs, wodurch mit Hilfe von Colibri extrem kontrastreiche Bilder entstehen (ANONYMUSb 2008).

3.2.2 Chemische Analysen

3.2.2.1 Release-Untersuchungen

Um den Einfluss der verwendeten Medien auf das Freisetzungsvermögen der Kupferionen zu untersuchen, wurden folgende Release durchgeführt:

- reine Kupferproben in 5 ml Tris-Puffer und in PBS-Puffer bei täglichem Mediumwechsel
- (PeO-gCu)-, (TiN-sCu)- und (CaP-cCuP)-Proben in 5 ml PBS-Puffer bei täglichem Mediumwechsel
- (PeO-gCu)-, (TiN-sCu)- und (CaP-cCuP)-Proben in Zellkulturmedium, LB-Nährbouillon (Luria-Bertani-Medium nach Miller der Firma SIFIN Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin) und Humanplasma. Der Mediumwechsel erfolgte hier nach 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h.

3.2.2.2 Kupferbestimmung

Zur Ermittlung des Kupfergehaltes in den Entschichtungs- bzw. Releaselösungen wurden die photometrische Bestimmung und die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) verwendet. Die photometrische Kupferbestimmung erfolgte mit

Hilfe des NANO-COLOR[®]- Kupfer Tests der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co KG. Bei dieser Methode bilden Kupfer(II)-Ionen mit Cuprizon in schwach alkalischer Lösung einen blauen Cuprizon-Cu-Komplex. Für die Kupfermessung in der PBS-Pufferlösung wurde die Standardreihe ebenfalls mit PBS-Puffer angesetzt, um einen eventuellen Einfluss des PBS-Puffers auszuschließen. Für die Entschichtung der Proben wurde 0,1 molare HCl eingesetzt, deshalb wurde für die Standardreihe hier gleichfalls 0,1 molare HCl verwendet. Eine Messung mit dem oben genannten Testkit ist nur in wässrigen farblosen basischen Lösungen möglich. Die Proben wurden deshalb, wenn nötig, mit dem Reagenz 2 der Testpackung auf einen pH-Wert zwischen 8,5 und 9,5 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 10 min erfolgte die Messung des gebildeten blauen Farbkomplexes bei einer Wellenlänge von 585 nm. In den PBS-Pufferlösungen konnte in einigen Proben eine Ausfällung beobachtet werden. Bei diesen Proben wurde vor der Messung ein Kupfer-Aufschluss durchgeführt.

Die Humanplasma-Prüflösungen wurden photometrisch und über die AAS-Methode auf ihren Kupfergehalt geprüft. Da bei dem verwendeten Zellkulturmedium sowie bei der LB-Bouillon auf Grund ihrer Zusammensetzung keine photometrische Kupferbestimmung durchgeführt werden konnte, erfolgte die Bestimmung des Kupfergehaltes hier lediglich über die AAS-Methode.

3.2.3 Biologische Untersuchungen

3.2.3.1 Versuche mit Bakterien

Zur Untersuchung der Bakterienaktivität wurde der Bakterienkulturtest auf Nähragar verwendet. Dazu wurde zunächst ein Pellet lyophilisierter *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 der Firma DOENITZ-PROLAB mit der Bakterienkonzentration 5×10^3 KBE/ml in ein mit einem Milliliter sterilem Phosphatpuffer (PBS der Firma Sigma) gefülltes Probengefäß gegeben und bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Probengefäß für ca. 5 min geschüttelt, um das Pellet vollständig zu resuspendieren. Diese Suspension wurde in 10 ml LB-Nährbouillon gegeben und über Nacht (für ca. 16 h) bei 37 °C inkubiert. Vor der Verwendung der Übernachtskultur wurde mit Hilfe der optischen Dichte D_{600} die Bakteriendichte der Suspension ermittelt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass sich bei einer Keimzahl von etwa 10^5 pro Gramm Gewebe eine behandlungsbedürftige Infektion entwickelt (NIEDNER & VANSCHIEDT 1994). Diese Grenze sollte jedoch nicht als absolut gültig angesehen werden. Zu beachten ist dabei, dass die Erhöhung der Keimzahl von 10^4 auf 10^5 „nur“ 90 000, der Schritt von 10^5 auf 10^6 aber immerhin schon 900 000 Keime ausmacht. Abhängig von dem klinischen Zustand kann die Zahl 10^5 pro Gramm Gewebe aber durchaus als Richtschnur verwendet werden (NIEDNER & VANSCHIEDT 1994). In allen Versuchen wurden dementsprechend Bakterienkonzentrationen dieser Größenordnung eingesetzt.

Alle verwendeten Lösungen, Proben und Probengefäße wurden jeweils vor dem Beimpfen mit Bakterien im Autoklaven sterilisiert. Alle beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Sicherheitswerkbank) ausgeführt.

Aus jeweils 10 unabhängig durchgeführten Versuchsreihen ergab sich ein Vertrauensbereich von 68,3%, der in der Dimension der Symbolgröße liegt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Fehlerbalken verzichtet.

Für die Versuche mit Bakterienkulturen wurden die Medien PBS-Puffer, LB-Bouillon, Zellkulturmedium PC Komplett und Humanplasma eingesetzt.

3.2.3.1.1 Versuche in Kupfer- und Silbersalzlösungen

Diese Versuche wurden durchgeführt, um die für eine bakterizide Wirkung erforderlichen Metallionenkonzentrationen zu ermitteln. Die Lösungen wurden wie folgt hergestellt:

Silbernitratlösung (AgNO_3)

Es wurden 0,313 g AgNO_3 in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Dies entspricht einer Silberkonzentration von 2 g/l. Diese Lösung wurde mit PBS-Puffer auf Ag-Konzentrationen von 5 – 20 mg/l verdünnt (pH-Wert: 6,82).

Kupferchloridlösung (CuCl_2)

Es wurden 0,537 g CuCl_2 in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Dies entspricht einer Cu-Konzentration von 2 g/l. Diese Lösung wurde mit PBS-Puffer 1:100 auf eine Cu-Konzentration von 20 mg/l verdünnt (pH-Wert: 5,85)

Kupfersulfatlösung (CuSO₄)

Es wurden 0,786 g CuCl₂ in 100 ml destilliertem Wasser gelöst. Dies entspricht einer Cu-Konzentration von 2 g/l. Diese Lösung wurde mit PBS-Puffer 1:100 auf eine Cu-Konzentration von 20 mg/l verdünnt (pH-Wert: 5,75).

Je 4 ml der so hergestellten sterilisierten Lösungen und 4 ml PBS-Puffer als Kontrolle wurden in eine sterile 12-Well-Zellkulturplatte pipettiert. In jedes Well wurden 100 µl der beschriebenen Bakteriensuspension gegeben. Alle Mischungen wurden für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl der Verdünnungsstufen 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ auf Mannit-Kochsalz-Agar (Merck) ausplattiert. Die Platten wurden 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgezählt.

3.2.3.1.2 Versuche in Kupfer/PBS-Pufferlösungen

Um die Vorgänge in einem der Körperflüssigkeit des Menschen ähnlichen Medium zu simulieren, wurde ein Kupfereluat hergestellt. Dazu wurde eine Kupferrolle bei 37 °C 1 Woche in Tris-Puffer ausgelagert. Die so mit Kupfer angereicherte Tris-Pufferlösung mit einer Kupferkonzentration von ca. 3 g/l und einem pH-Wert von 7,5 wurde auf Kupferkonzentrationen von 5, 10, 20 und 25 mg/l mit PBS-Puffer verdünnt. Alle Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert. Vier Milliliter der so hergestellten Lösungen wurden in sterile 12-Well-Zellkulturplatten pipettiert und jeweils mit 100 µl Bakteriensuspension der Konzentration 10⁶ KBE/ml beimpft. Nach Inkubationszeiten von 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h bei 37 °C wurden die Verdünnungen 10⁰, 10⁻², 10⁻³ und 10⁻⁴ sowie PBS-Puffer als Kontrolle auf Mannit-Kochsalz-Agar ausplattiert. Nach 48stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die gebildeten Bakterienkolonien ausgezählt.

Durch das Einlegen eines Silberdrahtes in PBS-Puffer konnte keine reine Silberionenlösung der benötigten Konzentration gewonnen werden, auf die Untersuchung von in PBS-Puffer eluierten Silberionen wurde deshalb verzichtet.

3.2.3.1.3 Versuche mit kupfer- und silberbeladenen Oberflächen

Alle in Tabelle 1 aufgelisteten Proben wurden nach folgender Versuchsanordnung auf ihre bakterizide Wirkung untersucht. Die (PcO)-, (TiN)- und

(CaP)-Proben sowie die (äCaP)-Proben dienten dabei als Positivkontrollen. Alle Proben werden in folgenden Medien getestet:

PBS-Puffer

LB-Nährbouillon

Zellkulturmedium

Humanplasma + PBS-Puffer (1:3)

Dazu wurden die Proben mit einer sterilen Pipette in eine sterile 12-Well-Zellkulturplatte überführt und mit je 4 ml PBS-Puffer, LB-Nährbouillon, Zellkulturmedium bzw. Humanplasma/PBS-Puffermischung überschichtet. Jedes Well wurde anschließend mit 100 µl Keimsuspension beimpft. Die Wellplatten wurden dann für 2 h, 4 h, 6 h, 8 h und 24 h bei 37 °C inkubiert (Abb. 14).

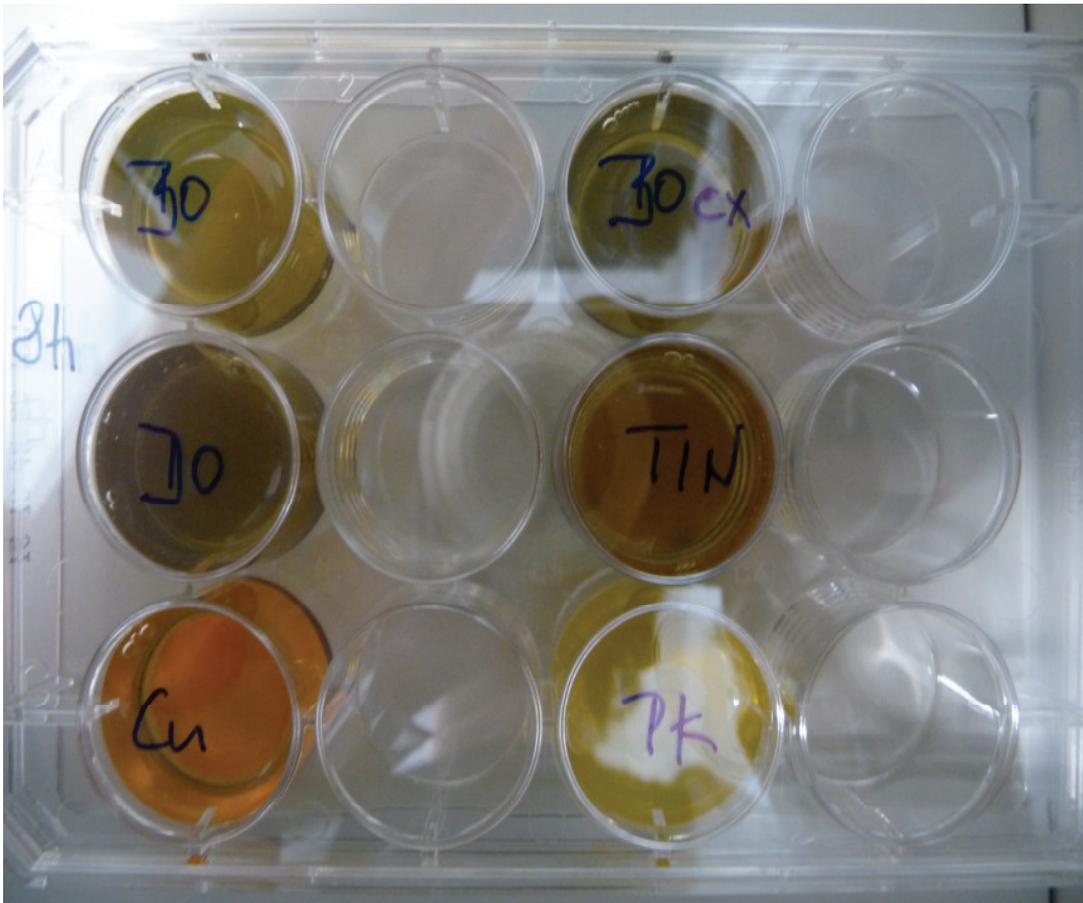


Abb. 14 Wellplatte mit Probekörpern

Zur Ermittlung der Anzahl der planktonischen Bakterien wurde nach der Inkubation zunächst das Medium über den Probekörpern vorsichtig abpipettiert und in

sterile Probengefäße überführt. Von jeder so gewonnenen Probe sowie von der Kontrolle wurden Verdünnungen der Stufen 10^{-3} - 10^{-6} in sterilem PBS-Puffer hergestellt. Alle Verdünnungen wurden auf Mannit-Kochsalz-Agar (Firma Merck) ausgespatelt und nach der Inkubation (48 h, 37 °C) ausgezählt. Um die Zahl der biofilmbildenden Bakterien zu ermitteln, wurden die in der Wellplatte verbliebenen Probekörper mit 10 ml sterilem PBS-Puffer mit Hilfe von Ultraschall abgewaschen. Von diesen Waschlösungen wurden ebenfalls Verdünnungen von 10^{-3} - 10^{-6} hergestellt und auf Mannit-Kochsalz-Agar ausgespatelt. Die Agarplatten wurden für 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgezählt. *Staphylococcus aureus* wachsen als große gelbe Kolonien und bilden einen gelben Hof (Abb. 15).

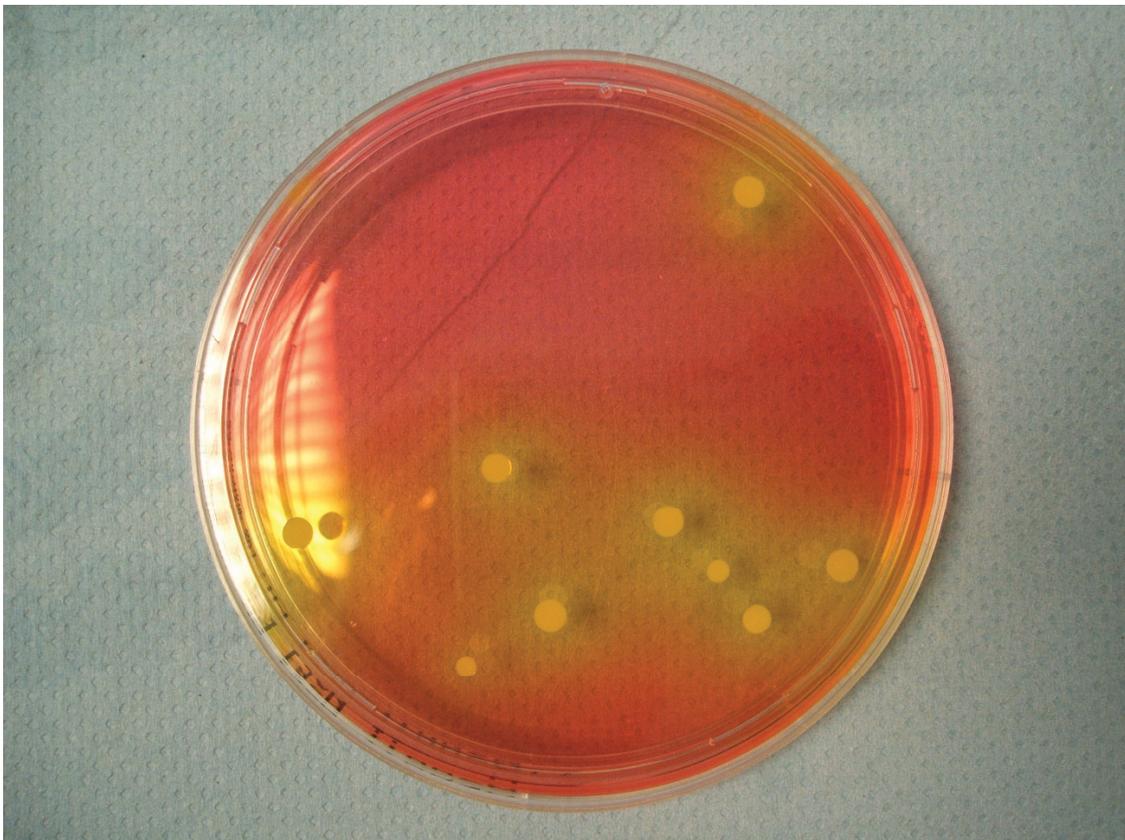


Abb. 15 *Staphylococcus aureus* auf Mannit-Kochsalz-Agar

3.2.3.2 Versuche mit Zellen

3.2.3.2.1 Zytotoxizität von Kupfersulfat- und Silbernitrat-Lösungen

Für die Ermittlung der zytotoxischen Eigenschaften von Kupfer- bzw. Silberionen wurden zunächst Versuche mit Kupfer- bzw. Silbersalzlösungen durchge-

führt. Dazu wurden 10^5 MG 63-Zellen direkt in 3 ml Kupfersulfat (CuSO_4)-Lösungen der Konzentrationen von 0,05; 0,1; 0,5; 1 und 5 mmol/l bzw. Silbernitrat (AgNO_3)-Lösungen mit Konzentrationen von 0,005; 0,01; 0,1; 0,5 und 1,0 mmol/l Zellkulturmedium für 48 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde mit Hilfe des MTS-Zytotoxizitätstestes CellTiter 96[®] AQ_{uenos} One Solution Cell Proliferation Assay der Firma Promega, USA, gemessen. Dieser Test misst die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen einer Zellpopulation als Maß einer intakten Atmungskette. Dabei reduzieren die Dehydrogenasen das Substrat MTS [3-(4,5-Dimethyldiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] zu löslichem Formazan. Die Umwandlung von MTS zur Formazan kann mit einem Plattenreader photometrisch bei einer Wellenlänge von 492 nm quantitativ bestimmt werden. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen.

Für die Bestimmung der Zellaktivität wurden 200 µl MTS-Reagenz pro Well direkt in das Zellmedium gegeben und geschwenkt. Die Zellen wurden anschließend für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Messung von je 100 µl der Proben in einer Dreifachbestimmung.

Zusätzlich zu dem Zellvitalitätstest wurde der Einfluss von Kupfer- bzw. Silberionen auf die Zellzyklusphasen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, „fluorescence activated cell sorting“) untersucht. Das Prinzip beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Bei der Analyse wird eine Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Unterdruck in die Messküvette eingesaugt. Beim Eintreten in die Messkammer werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit stark beschleunigt, wodurch sich Aggregate auftrennen und die Zellen sequenziell den Analysenpunkt erreichen. Der Analysenpunkt ist der Ort, an dem der Lichtstrahl (Laser) die Zellen im Bruchteil einer Sekunde erfasst, analysiert und klassifiziert. Die Lichtstreuung wird als physikalischer Prozess definiert, bei dem ein Partikel (Zelle) mit dem einfallenden Lichtstrahl interagiert. Dabei wird nur die Richtung, nicht die Wellenlänge des einfallenden Lichts verändert. Die Lichtstreuung wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. Das Licht wird dabei nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut, der größte Anteil wird in die Vorwärtsrichtung (Vorwärtsstreulicht oder

engl.: forward light scatter, FSC) gestreut und ist ein Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht wird als Seitwärtsstreulicht (engl.: side scatter, SSC) bezeichnet und ist ein Maß für die intrazelluläre Granularität der Zelle. Beim Passieren des Analysenpunktes werden Signale der Zellen von Detektoren empfangen und von elektronischen Schaltungen gemessen. Durch die gleichzeitige Messung der Fluoreszenz sind zusätzlich Messungen von Fluoreszenzfarbstoffen von spezifischen Farbstoffen oder Antikörpern möglich. Die Substanz Propidiumjodid durchdringt nur beschädigte Zellmembranen und interkaliert mit der DNA, weshalb dieser Farbstoff für Apoptose-Messungen und Zellzyklusphasen verwendet wird.

Die Aussaat der Zellen für die FACS-Analyse erfolgte zum einen direkt in das mit den entsprechenden Metallionen-Konzentrationen angereicherte Medium und zum anderen indirekt, nach 24stündiger Vorinkubation in kupfer- bzw. silberfreiem Medium. Nach der Fixierung der Zellen wurde eine RNA Verdau durchgeführt, um die Bindung von Propidiumjodid an die RNA zu verhindern. Dazu wurden die Proben 8 min bei 1800 U min^{-1} zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert und abermals 8 min bei 1800 U min^{-1} zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein 2. Mal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml RNase (1 mg/ml) resuspendiert und 20 - 30 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 8 min bei 1800 U min^{-1} zentrifugiert. Für die Färbung wurde das Pellet mit 500 μl Propidiumjodid (50 $\mu\text{g/ml}$) resuspendiert. Bis zur Messung wurden die Proben mindestens 24 h, aber maximal 7 d bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Messung erfolgte am BD Cytometer Type FACSCalibur. Es wurde das Auswerteprogramm ModFitLT Mac V3.0 verwendet.

3.2.3.2.2 Zytotoxizität von kupferbeschichteten Oberflächen

Für die Zytotoxizitätsprüfungen der beschichteten Oberflächen wurden (PeO-gCu)-, (TiN-sCu)-, (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben (vgl. Tabelle 1) eingesetzt. Für die direkte Aussaat wurden die Proben in einer 12-Well-Platte mit 2 ml Zellsuspension (10^5 Zellen/2 ml) überschichtet und 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Für die indirekte Zellaussaat wurden die Proben zunächst mit 2 ml Zellmedium 24 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubiert und anschließend in eine neue 12-Well-Platte überführt und mit 2 ml Zellsuspension (10^5 Zellen/2 ml) überschichtet und

ebenfalls 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Zytotoxizität wurde, wie beschrieben, mit Hilfe des MTS-Testes und der FACS- Analyse ermittelt (Kap. 3.2.3.2.1).

3.2.3.2.3 Einfluss von Kupfer auf die Angiogenese

Für diese Versuche wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen eingesetzt, weil diese Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Regeneration von Geweben besitzen. Mikrovaskuläre Endothelzellen sind sowohl an den Gefäßneubildungsprozessen als auch an der entzündlichen Reaktion bei der Wundheilung beteiligt. Für die *in vitro* Gefäßneubildungsversuche wurden HDM_{EC} (humane Endothelzellen der Haut, Passage 3/ca. 2 Wochen nach Isolation) verwendet. Die Zellen wurden in eine Lösung aus Fibrinogen (1 mg/ml) und säurelöslichem Typ I-Kollagen (0,75 mg/ml) eingebettet (ca. $0,7 \times 10^6$ Zellen/ml). Die Zugabe von Thrombin (1 U/ml) führte dann innerhalb von ca. 30 Minuten zur Entstehung eines Gels. Die Stimulation der Gefäßneubildung in diesem Gel wurde durch Zugabe von VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) und bFGF (5 ng/ml) induziert. Innerhalb von 5 - 7 Tagen, bei 2täglichem Wechsel des Zellkulturmediums, entstanden so *in vitro*-Kapillaren, welche mit 10 µmol/l Calcein-AM bei 37 °C für 30 min angefärbt wurden. Die so angefärbten Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Antibakterielle Wirkung von Metallionen

4.1.1 Kupfer- und Silberlösungen

In den durchgeführten Tests zur Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* wurde nachgewiesen, dass Kupfer- und Silberionen die Vermehrung der Bakterien unterschiedlich beeinflussen. In der Abb. 16 ist der Einfluss dieser Ionen bei jeweils gleicher Massekonzentration von 20 mg/l dargestellt. Obwohl hierbei die molare Konzentration der Silberionen mit 185 $\mu\text{mol/l}$ nur etwa 60 % der Konzentration der Kupferionen beträgt, bewirkt die Silberionen-Lösung eine deutlich stärkere Wachstumshemmung der Bakterien. Hingegen beeinflussen unterschiedliche Kupfersalz-Lösungen gleicher Konzentration die Vermehrung der Bakterien auf sehr ähnliche Weise. Die Abbildung 16 zeigt weiterhin eine etwa zweistündige Anlaufphase, in der die frische Bakterienkultur in ihrer weiteren Entwicklung gehemmt wird, die jedoch in Abhängigkeit von den Umgebungsbedingungen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Während in dieser Anlaufphase die Konzentration der Bakterien in der Positivkontrolle (PK PBS-Puffer) lediglich um zwei Zehnerpotenzen abfällt, sinken die Bakterienkonzentrationen in der Silbernitrat- und in der Kupfersulfatlösung bereits auf Null ab. Es setzt hier also bereits eine drastische Inhibierung der Bakterienvermehrung durch den Einfluss der Kupfer- bzw. Silberionen ein. In den Kupfersalzlösungen steigen die Bakterienkonzentrationen nach 2 Stunden wieder auf ca. 10^2 KBE/ml an. In dem mit Silbernitratlösung versetzten PBS-Puffer zeigt sich hingegen keine erneute Bakterienvermehrung. Bereits nach 2 Stunden Einwirkungszeit sind keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr nachzuweisen. Nach 6 Stunden beginnen in den Kupfersalzlösungen die Bakterienkonzentrationen zu sinken, bis auch hier nach 8 Stunden der Einfluss der Kupferionen die vollständige Hemmung der Bakterienvermehrung bewirkt.

Wird bei der Untersuchung der antibakteriellen Wirkung von Silberionen im Vergleich zu den in der Abb. 16 dargestellten Untersuchungen von einer höheren Bakterienkonzentration ausgegangen, beobachtet man, wie zu erwarten, bei der gleichen Silberkonzentration von 20 mg/l die völlige Inhibierung der Bakterienvermehrung erst nach 6 Stunden (Abb. 17).

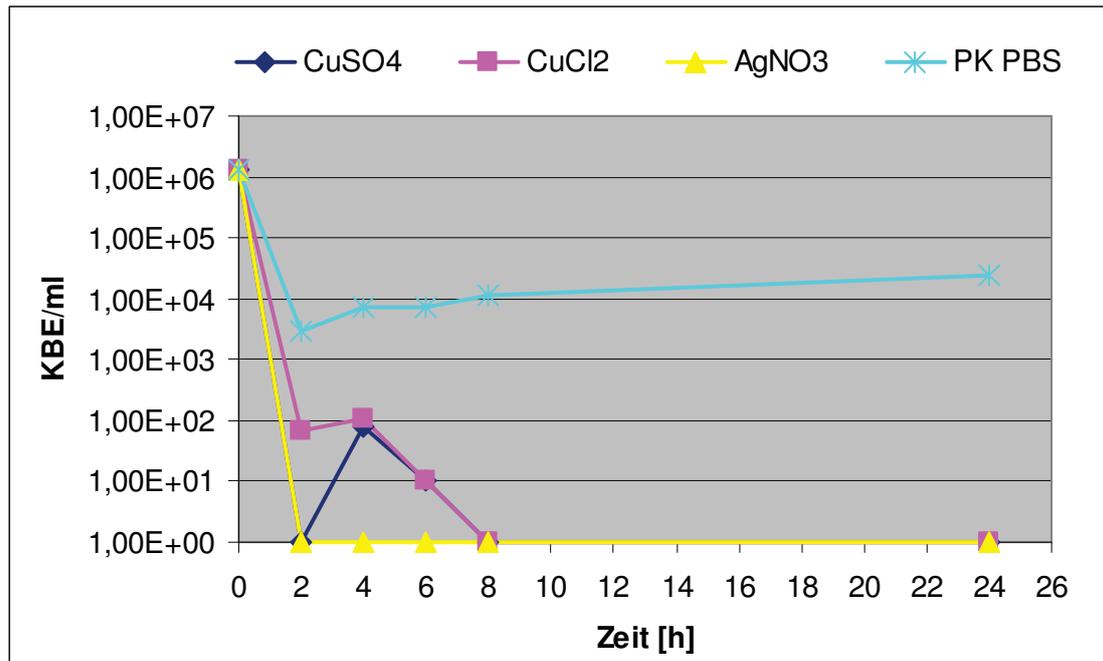


Abb. 16 Wachstum von *Staphylococcus aureus* bei 37 °C in mit Kupfersulfat, Kupferchlorid und Silbernitrat versetzten PBS-Pufferlösungen mit einem jeweiligen Metallionen-Anteil von 20 mg/l sowie als Positivkontrolle in reinem PBS-Puffer.

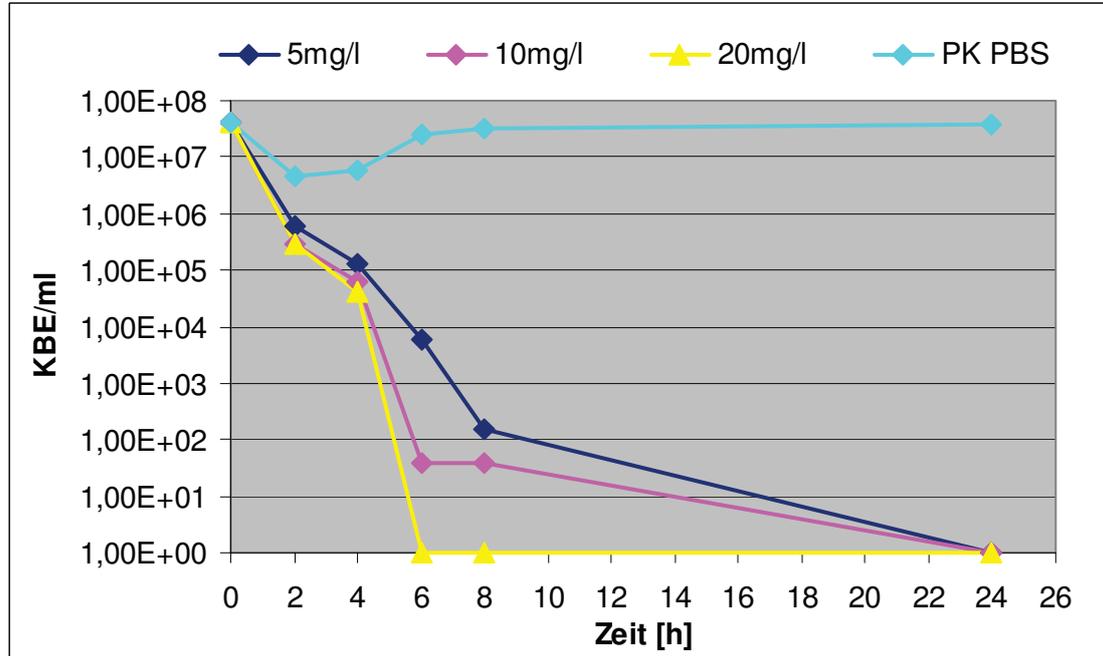


Abb. 17: Wachstum von *Staphylococcus aureus* bei 37 °C in mit Silbernitrat versetzten PBS-Pufferlösungen sowie als Positivkontrolle in reinem PBS-Puffer

Für die Anreicherung von PBS-Pufferlösungen mit Kupferionen und die Untersuchung der antibakteriellen Wirkung dieser Lösungen wurde, wie im Kap. 3.2.3 beschrieben, eine Kupferronde in eine Tris-Pufferlösung gegeben und 3,28 g Kupfer pro Liter Tris-Puffer herausgelöst. Durch Verdünnen dieser Lösung mit PBS-Pufferlösung wurden unterschiedliche Kupferionenkonzentrationen zwischen 10 und 25 mg/l bzw. 160 und 400 $\mu\text{mol/l}$ erhalten (Abb. 18). Für alle Kupferkonzentrationen kann eine Hemmung des Bakterienwachstums beobachtet werden. Nach 8 Stunden ist bei der geringsten Kupferionenkonzentration von 10 mg/l wieder eine Zunahme der Bakterienzahl zu beobachten, während für Kupferkonzentrationen von 15, 20 und 25 mg/l nach 24 Stunden keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr nachzuweisen sind. Aus den Abbildungen 16 und 18 wird also deutlich, dass eine Kupferkonzentration in PBS-Puffer von 20 mg/l bzw. 300 $\mu\text{mol/l}$ als bakterizid bezeichnet werden kann.

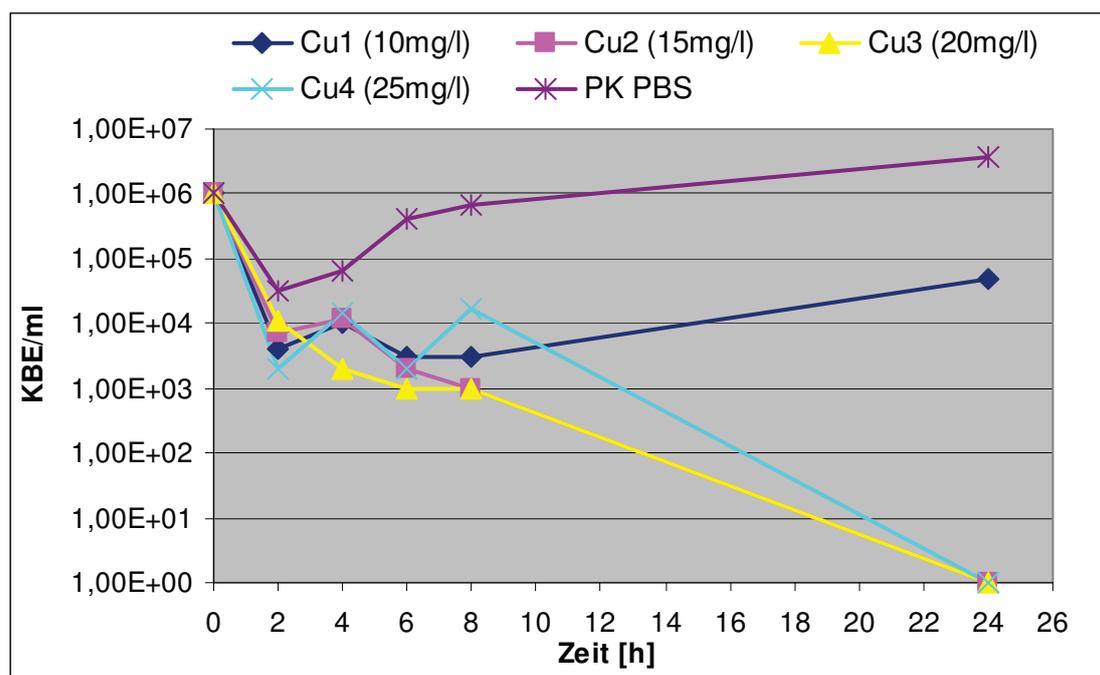


Abb. 18 Wachstum von *Staphylococcus aureus* bei 37 °C in PBS-Pufferlösungen mit unterschiedlichen Kupferkonzentrationen sowie in reinem PBS-Puffer als Positivkontrolle

4.1.2 Kupfer- bzw. silberbeladene Oberflächen

4.1.2.1 Massive Kupferproben

Die unter 4.1.1 und 4.1.2 dargestellte antibakterielle Wirkung wurde in Metallionen-Lösungen gleich bleibender Konzentration beobachtet. Werden metallische Oberflächen in eine Tris- oder PBS-Pufferlösung gegeben (vgl. Kap. 3.2.2.1), so hängt die Zahl der in Lösung gehenden Metallionen sowohl von der Struktur und der Zusammensetzung der Oberflächen als auch von der Zusammensetzung des Elutionsmediums ab. Die Abb. 19 zeigt das Releaseverhalten einer massiven Kupferprobe in Tris-Puffer. Es wird deutlich, dass aus der massiven Kupferprobe Kupferionen mit nahezu gleich bleibend hoher Konzentration von durchschnittlich 2,55 g/l bzw. 40 mmol/l pro Tag in Lösung gehen, sofern das Lösungsmittel täglich vollständig ausgetauscht wird.

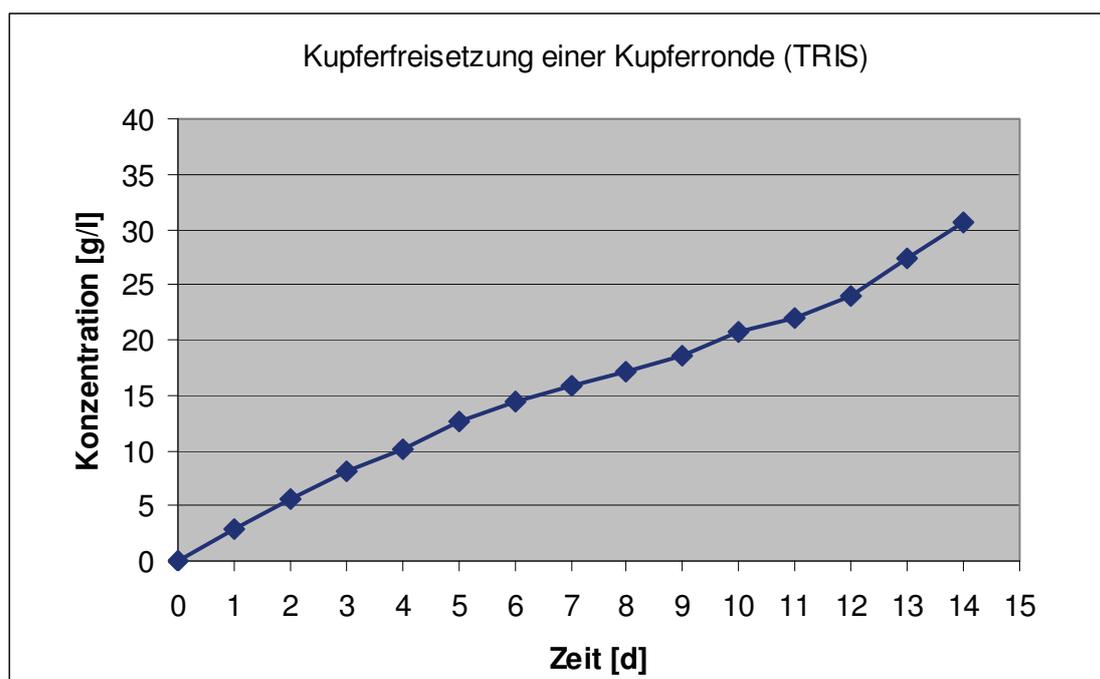


Abb. 19 Releaseverhalten einer massiven Kupferronde (20 mm Durchmesser, 1 mm dick) bei 37 °C in Tris-Puffer bei täglichem Mediumwechsel (5 ml) (kumuliert dargestellt)

Wird PBS-Pufferlösung verwendet, welche dem Körpermilieu weitaus stärker ähnelt als Tris-Pufferlösung, ergibt sich verglichen mit der Kupferfreisetzung im Tris-Puffer ein um den Faktor 100 bis 1000 geringerer Wert. Dieser nimmt mit wachsender Elutionsdauer sogar noch weiter ab (Abb. 20).

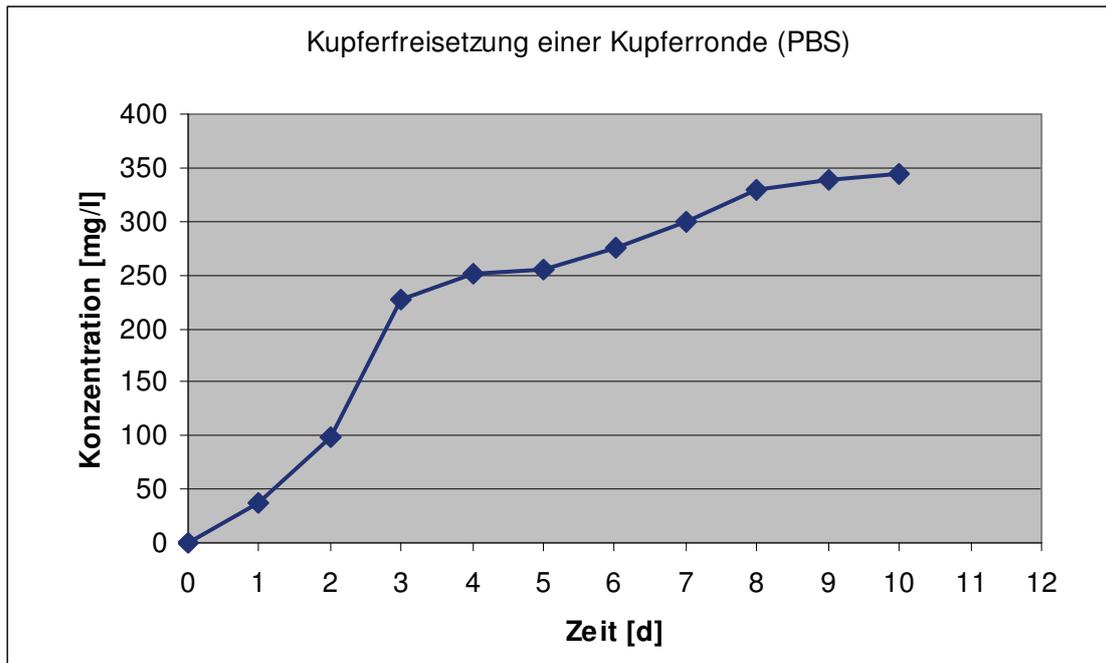


Abb. 20 Kumulative Freisetzung von Kupferionen aus einer massiven Kupferronde (20 mm Durchmesser, 1 mm dick) bei 37 °C in PBS-Puffer bei täglichem Medienwechsel (5 ml).

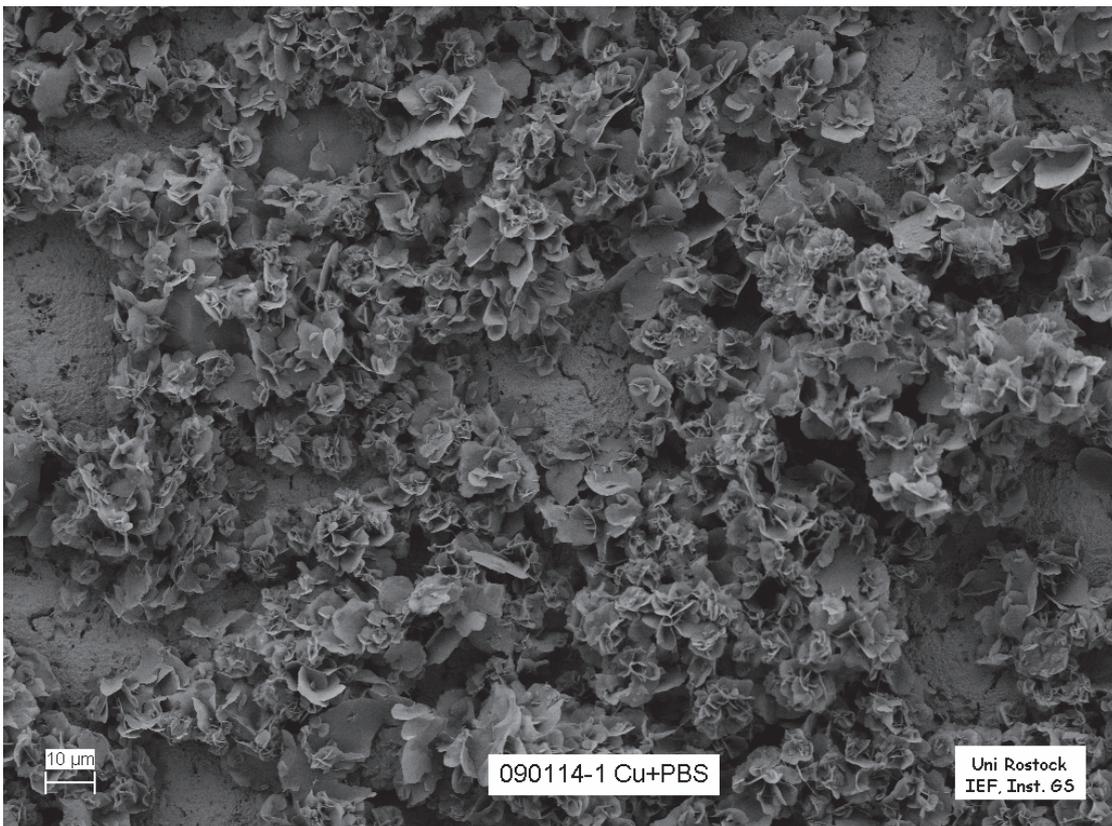


Abb. 21 Kupferronde nach Auslagerung in PBS-Puffer

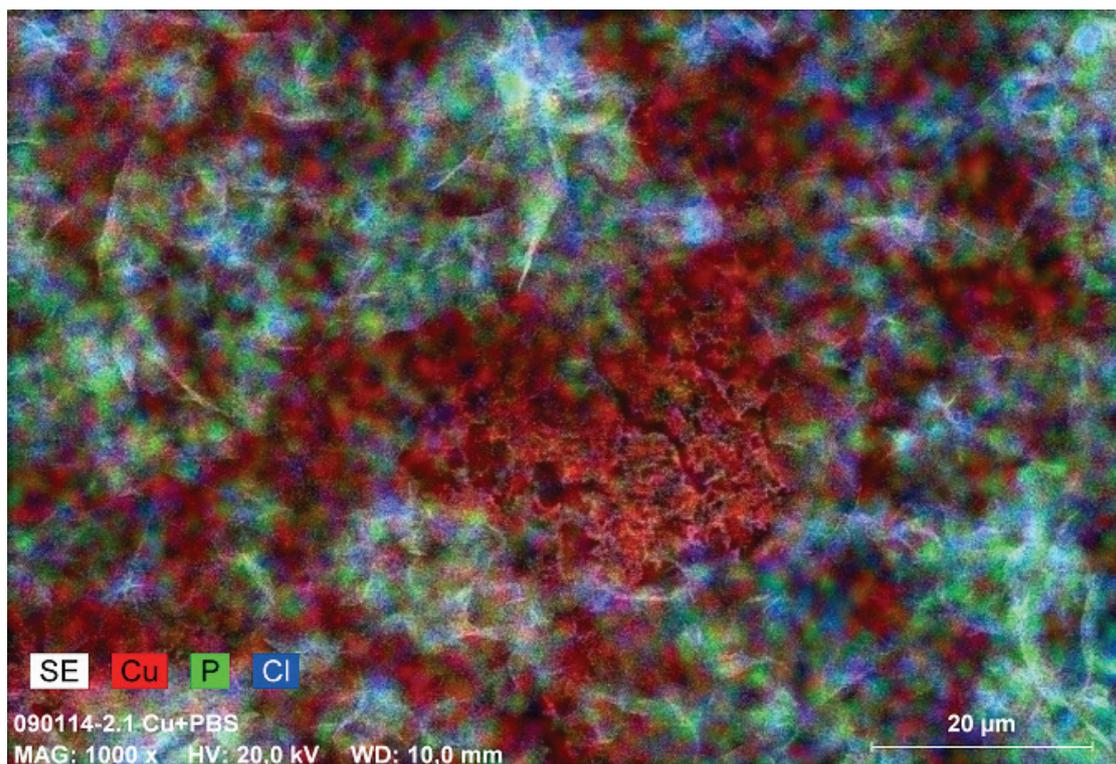


Abb. 22 EDX-Mapping einer Kupferronde, ausgelagert in PBS-Pufferlösung

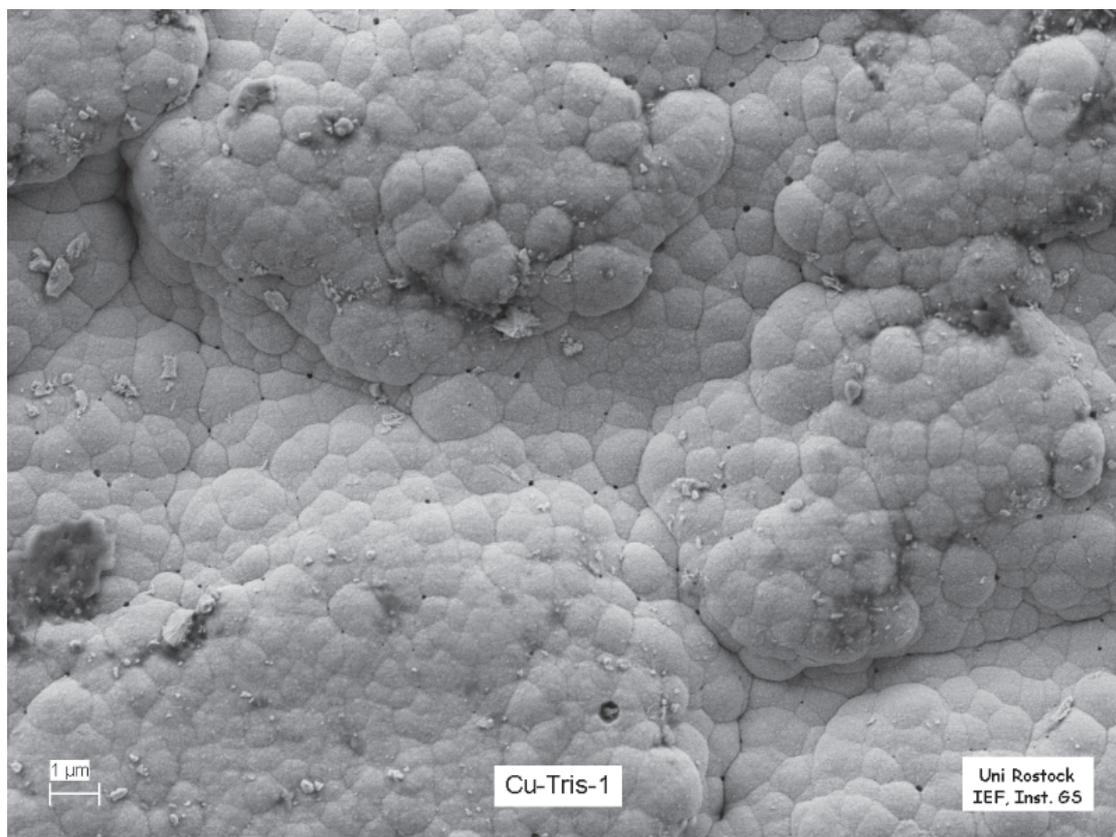


Abb. 23 Kupferronde nach Auslagerung in Tris- Puffer

Die Oberfläche der Probe zeigt eine dunkle Einfärbung, was auf eine Passivierung hindeutet. In den Abbildungen 21 und 22 sind die Oberflächenstruktur und die Elementverteilung in dieser Passivierungsschicht dargestellt. Sie besteht, wie aus Abb. 22 deutlich wird, aus ausgefälltem Kupferphosphat. Die Abb. 23 zeigt zum Vergleich die in Tris-Puffer stark angeätzte Oberfläche der Kupferronde. Eine für die Passivierung typische Schichtausbildung und Morphologie (siehe Abb. 21) ist hier nicht erkennbar.

Erfolgt der Mediumwechsel 2stündig, so wird innerhalb von 24 Stunden etwa die doppelte Menge an Kupfer freigesetzt, die Ausfällung von Kupferphosphaten verläuft hier verlangsamt bzw. findet nicht statt (Abb. 24).

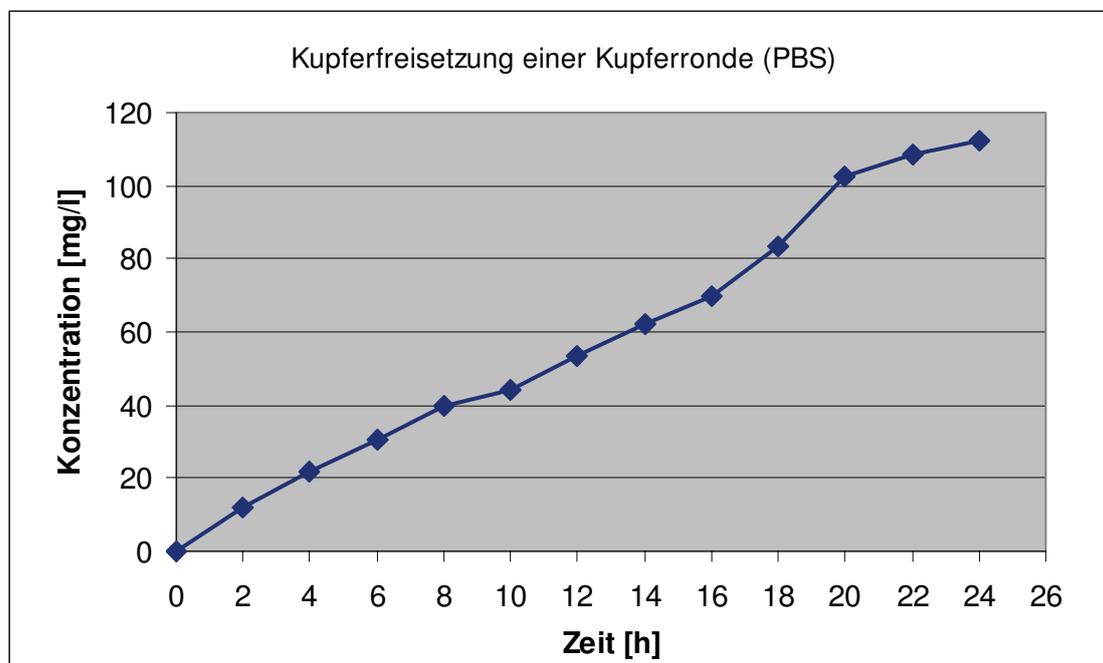


Abb. 24 Kurzzeitrelease einer Kupferronde in PBS-Pufferlösung bei 2stündigem Mediumwechsel (kumuliert dargestellt)

Sind in dem zunehmend mit Kupfer angereicherten PBS-Puffer von Beginn an Bakterien enthalten, führt das zu einer schnellen Abnahme ihrer Vermehrungsfähigkeit. Das innerhalb von 2 Stunden abgegebene Kupfer von 12 mg/l (180 $\mu\text{mol/l}$) lässt die Konzentration vermehrungsfähiger Bakterien in der gleichen Zeit um ca. 2 Zehnerpotenzen absinken (Abbn. 24 und 25). Nach 8 Stunden ist mit einer Kupferkonzentration von 40 mg/l (610 $\mu\text{mol/l}$) eine bakterizide Menge von zweiwertigen Kupferionen in Lösung gegangen (Abbn. 25 und 26).

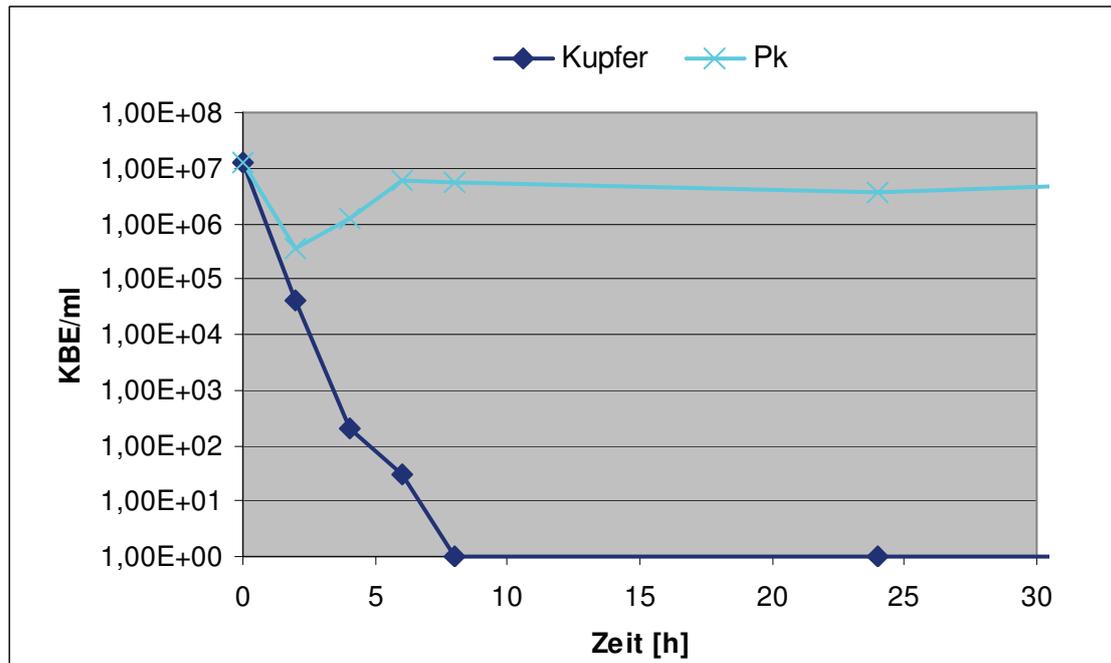


Abb. 25 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über einer massiven Kupferprobe und in PBS-Puffer als Positivkontrolle (PK PBS)

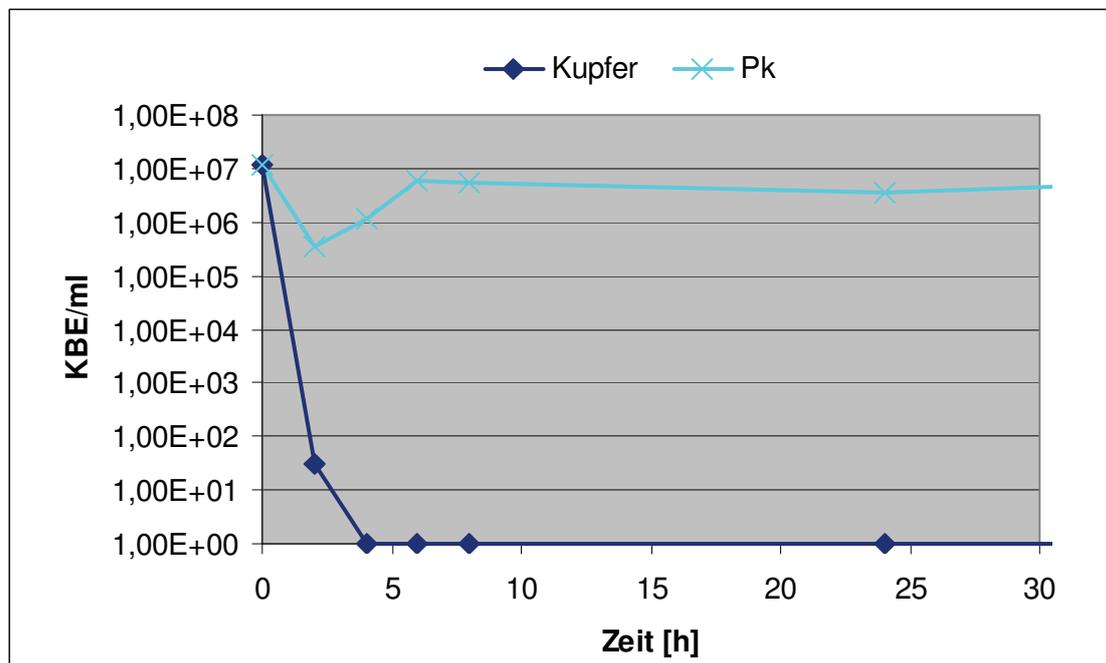


Abb. 26 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK) sowie auf der massiven Kupferprobe

Die mittlere Konzentration des eluierten Kupfers beträgt für die ersten 8 Stunden etwa 20 mg/l und entspricht damit der unter 4.1.1 ermittelten Konzentration für die völlig inhibierte Bakterienvermehrung.

4.1.2.2 Oberflächenbeschichtungen

Im Gegensatz zu einer massiven Metallprobe kann durch eine Metallbeschichtung die Zahl der in Lösung gehenden Metallionen begrenzt werden. Zum anderen ist mit Hilfe einer diskontinuierlichen Metallbeschichtung, zum Beispiel durch einen sandwichartigen Schichtaufbau oder durch die Abscheidung von Mischschichten, die zeitliche Abhängigkeit des Lösungsvorganges beeinflussbar.

Die Herstellung der verschiedenen untersuchten Oberflächenmodifikationen mit Kupfer und Silber ist unter 3.1 beschrieben worden. Die Oberflächenkonzentrationen wurden durch chemische Entschichtung und Bestimmung der Metallkonzentration im Entschichtungsmedium (vgl. 3.2.2.2) ermittelt (Tab. 2).

Tabelle 2: Flächenkonzentration des in Oberflächenschichten eingetragenen Kupfers bzw. Silbers

Probekörper	Flächenkonzentration	
	$\mu\text{mol}/\text{mm}^2$	$\mu\text{g}/\text{mm}^2$
Galvanische Abscheidung von Kupfer auf Titan (PeO-gCu)	0,016 - 0,05	1,06 - 3,20
Galvanische Abscheidung von Silber auf Titan (PeO-gAg)	0,0007 - 0,0016	0,08 - 0,17
Gesputterte Titannitrid-Kupfer-Schichten (TiN-sCu)	0,019 - 0,052	1,16 - 3,33
Mit Cu/PBS versetzte Calciumphosphat-Schichten (CaP-cCuP)	0,016	1,06

Mit den in Tabelle 2 aufgeführten Probekörpern wurden, wie in Kapitel 3.2.2.1 beschrieben, Releaseuntersuchungen durchgeführt, um die zeitliche Abhängigkeit der Metallionenfreisetzung zu bestimmen. Dabei betrug der in den Releaselösungen gemessene pH-Wert 6,8. In den folgenden Kapiteln werden das jewei-

lige Releaseverhalten sowie dessen antibakterielle Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* dargestellt.

4.1.2.2.1 Galvanisch abgeschiedene Kupferschichten (PeO-gCu)

Die in Kapitel 3.1.1 beschriebene partielle galvanische Kupferbeschichtung einer Titanprobe durch eine poröse Oxidschicht mit nachfolgendem Glaskugelstrahlen dieser Proben ist technologisch sicher umsetzbar und liefert Beschichtungen mit Kupfer-Flächenbelegungen von 1,06 - 3,20 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ bzw. 0,016 - 0,05 $\mu\text{mol}/\text{mm}^2$, was bei dem Probendurchmesser von 20 mm einer Beschichtungsmenge von 333 - 775 μg bzw. 5,24 - 12,2 μmol Kupfer entspricht.

Die (PeO-gCu)-Probe setzt ähnlich der massiven Kupferprobe am 3. Tag eine vergleichsweise hohe Kupfermenge frei. Die weitere Kupferabgabe verläuft gleichmäßig mit gleich bleibend geringen Konzentrationen (Abb. 27).

Um die bakterizide Wirkung des freigesetzten Kupfers zu beurteilen, wurden bei allen Versuchen das die Probe umgebende Medium auf die Zahl der planktonischen Bakterien und zusätzlich die Probenoberfläche auf die Zahl der biofilmbildenden Bakterien untersucht (vgl. Kap. 3.2.3.1.3).

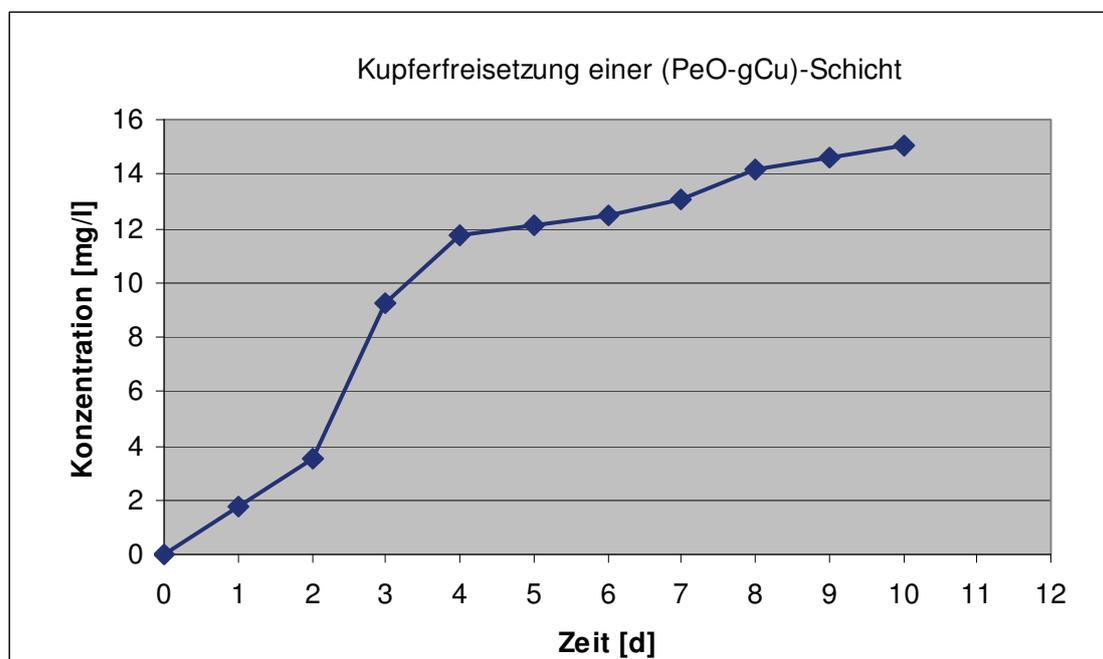


Abb. 27 Cu-Releaseverhalten einer (PeO-gCu)-modifizierten Titanprobe (20 mm Durchmesser) bei 37 °C in PBS-Puffer bei täglichem Mediumwechsel (5 ml), kumuliert dargestellt

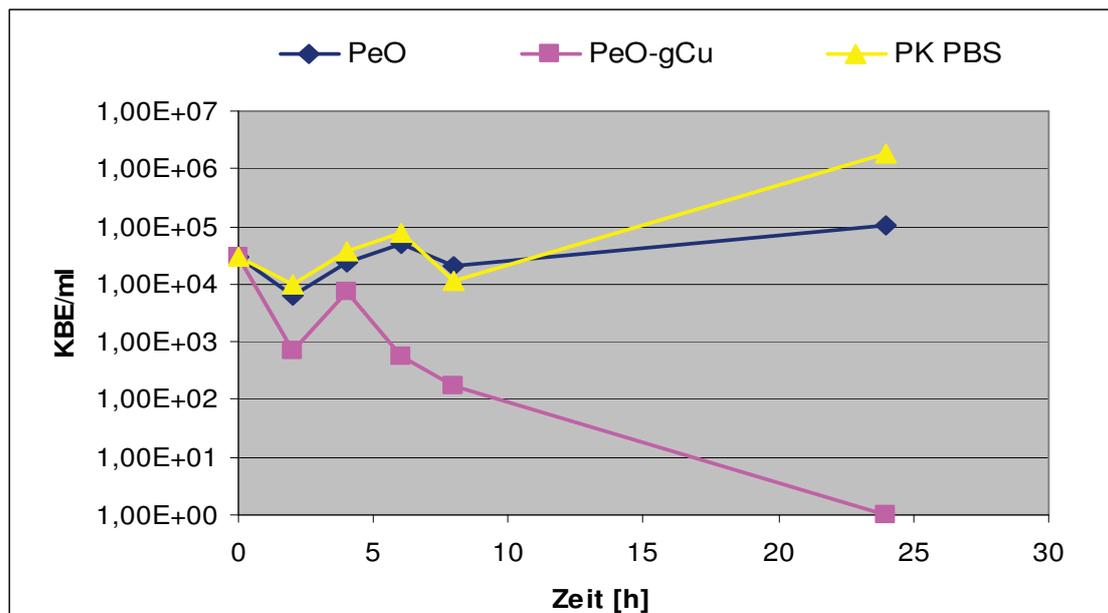


Abb. 28 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über einer (PeO-gCu)- bzw. (PeO)-Probe und in PBS als Positivkontrolle (PK in PBS)

Bei der Verwendung von PBS-Puffer bewirkte das mit Kupfer angereicherte Medium über der kupferbeschichteten Probe nach 8 Stunden eine Reduktion der Zahl der vermehrungsfähigen Bakterien um 2 Zehnerpotenzen gegenüber der Positivkontrolle. Nach 24 Stunden konnten keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr nachgewiesen werden (Abb. 28). Zum Vergleich ist das Verhalten einer anodisch oxidierten Titanprobe (PeO) dargestellt, die nicht mit Kupfer beschichtet worden war. Sie verhält sich ähnlich wie die Positivkontrolle.

Die Untersuchung der Wirkung des Kupfers auf der Probenoberfläche zeigte bereits nach 2 Stunden einen Rückgang der Zahl der vermehrungsfähigen biofilmbildenden Bakterien um mehr als 4 Größenordnungen auf Null, ohne dass anschließend ein Erholungseffekt und die damit verbundene erneute Bakterienvermehrung zu beobachten waren (Abb. 29). In einer Laserlicht-Fluoreszenz-Mikroskopaufnahme zeigt die unbeladene, also kupferfreie, plasmaelektrochemisch oxidierte Oberfläche deutlich die Ausbildung eines Biofilms (Abb. 30a). Im Gegensatz dazu weist die zusätzlich mit Kupfer beschichtete Oberfläche (Abb. 30b) keine Anzeichen für eine Biofilmbildung auf. Die sehr geringe Zahl sichtbarer roter Flecken deutet auf das Vorhandensein von abgetöteten Bakterien hin.

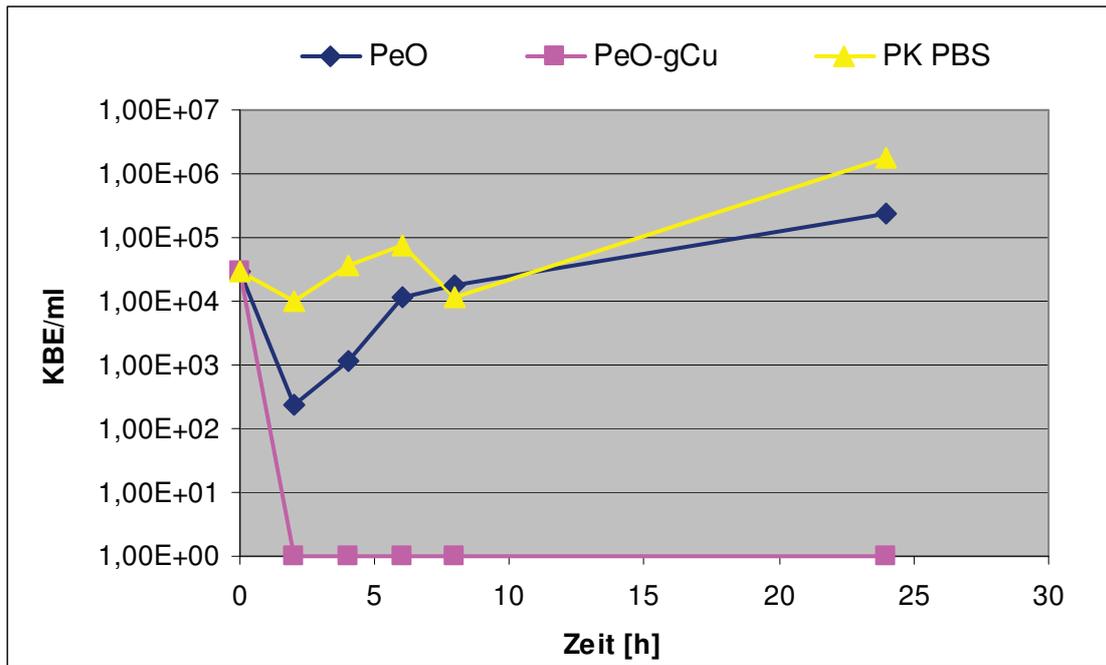


Abb. 29 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf (PeO-gCu)- und (PeO)-Proben

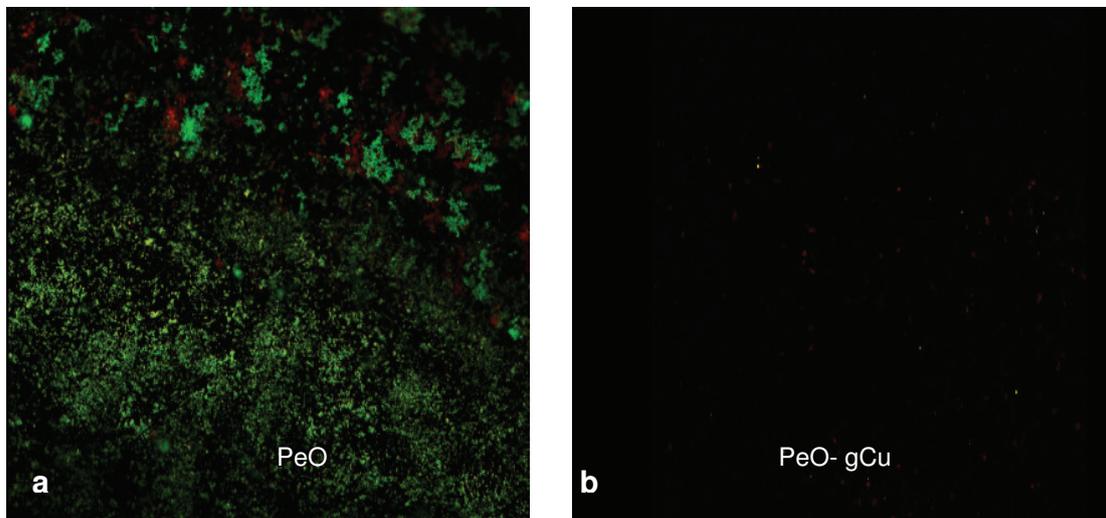


Abb. 30 a) Biofilm von *Staphylococcus aureus* auf einer plasmaelektrochemisch oxidierten Titan-Oberfläche (PeO), b) *Staphylococcus aureus* auf einer plasmaelektrochemisch oxidierten und galvanisch mit Kupfer beschichteten Oberfläche (PeO-gCu)

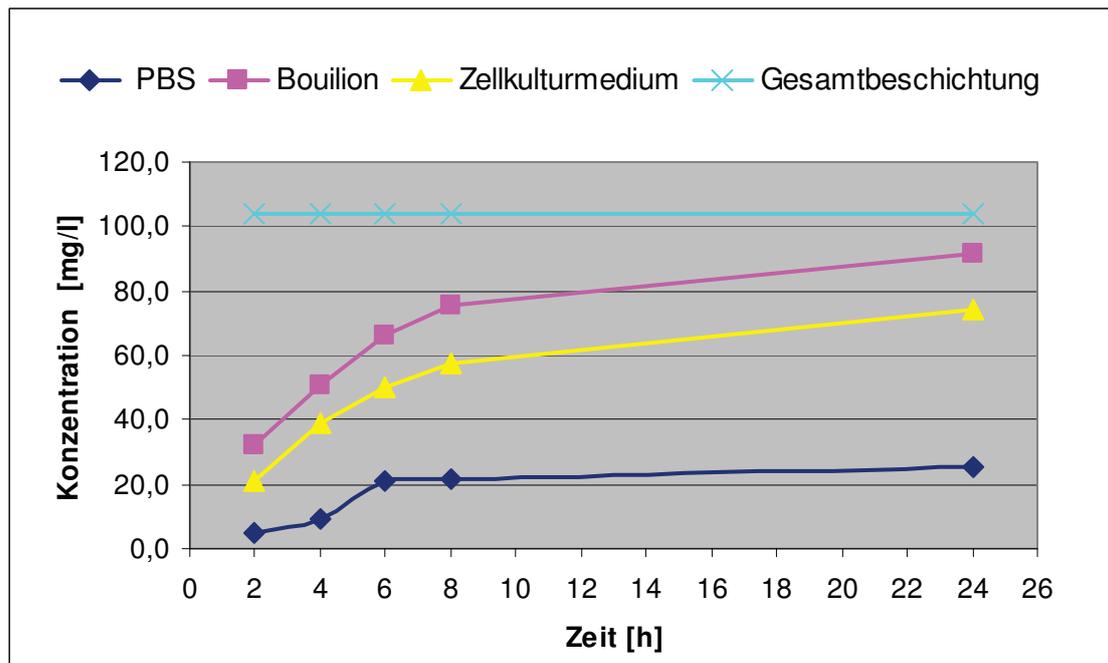


Abb. 31 Kupferelution aus (PeO-gCu)-Proben in verschiedenen Medien (5 ml), kumuliert dargestellt

Um den Einfluss des verwendeten Releasemediums auf das Elutionsvermögen von Kupferionen und die daraus resultierende bakterizide Wirkung der eluierten Ionenkonzentrationen zu ermitteln, wurden Kurzzeitrelease in PBS-Puffer, LB-Bouillon und Zellkulturmedium durchgeführt (Abb. 31). Es wird deutlich, dass das Releasevermögen des Kupfers wesentlich von dem verwendeten Medium abhängt. Bei allen Proben betrug die Gesamtbeschichtungsmasse an Kupfer jeweils $520 \mu\text{g}$ mit einer Flächenbelegung von $1,66 \mu\text{g}/\text{mm}^2$, was in 5 ml Medium einer Konzentration von 104 mg/l entspricht. Während im PBS-Puffer auch nach 24 Stunden nur knapp $25,6 \text{ mg/l}$ und damit nur ca. ein Viertel der Gesamtbeschichtungsmasse freigesetzt wurde, eluieren in der LB-Bouillon nach nur 8 Stunden 87% und im Zellkulturmedium nach 24 Stunden $71,5 \%$ des eingebrachten Kupfers.

In einem weiteren Versuch wurden LB-Bouillon und Zellkulturmedium als Inkubationsmedien für die Bakterien verwendet und die bakterizide Wirkung der Kupferfreisetzung in diesen Medien untersucht. Es wurde auch hier die Zahl der planktonischen und die Zahl der biofilmbildenden Bakterien betrachtet (Abbn. 32 und 33).

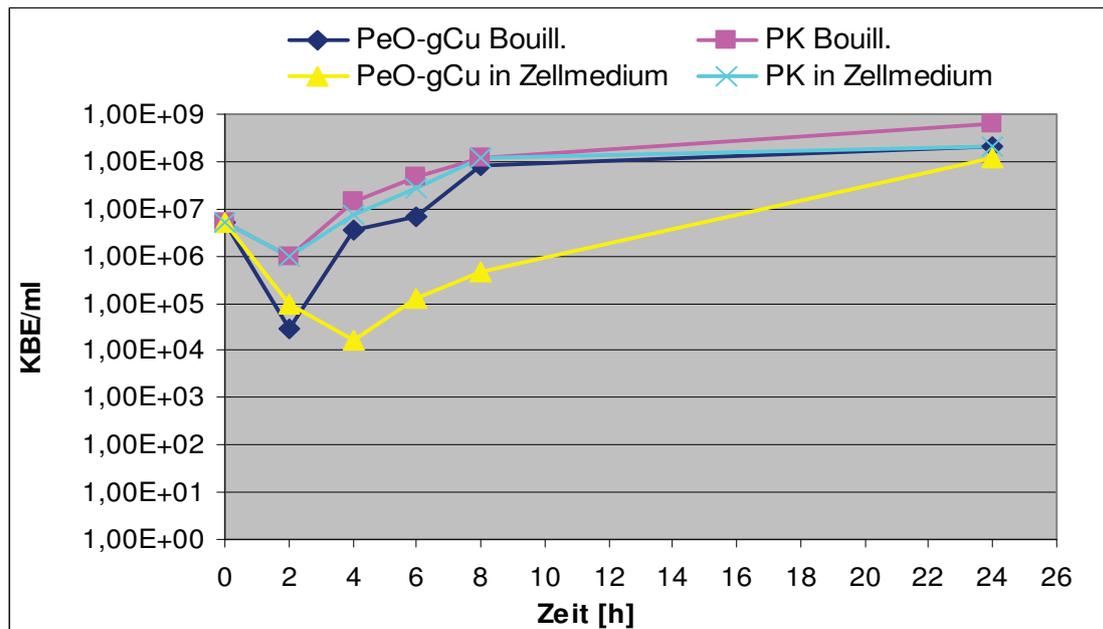


Abb. 32 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium über einer (PeO-gCu)-Probe und als Positivkontrolle in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium)

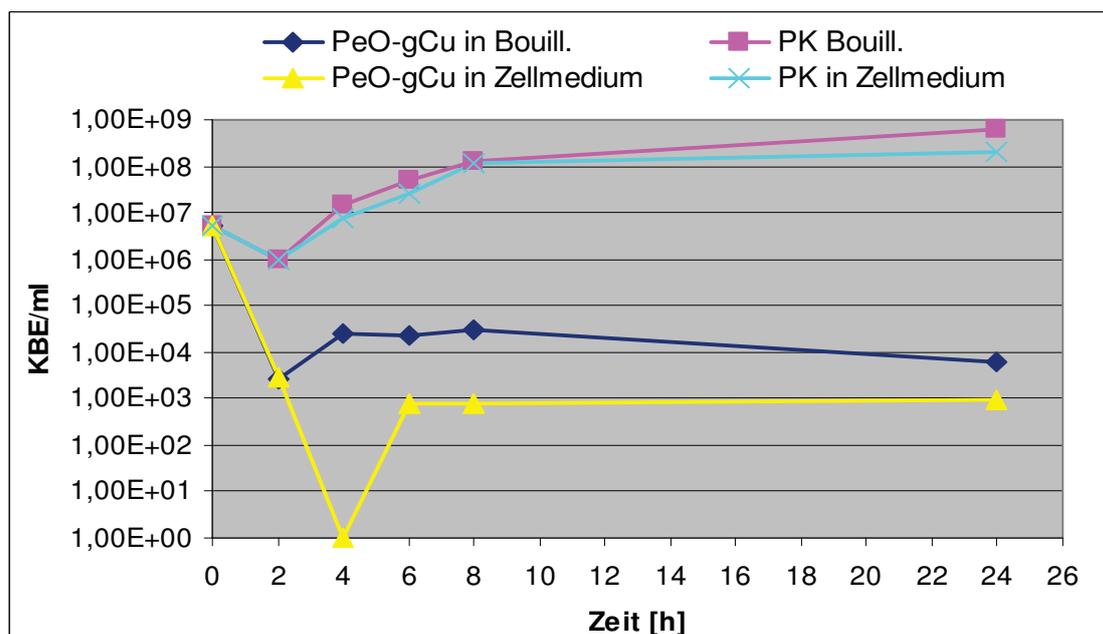


Abb. 33 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium) sowie auf (PeO-gCu)-Proben

Aus den Abbildungen 32 und 33 wird deutlich, dass trotz höherer Kupferfreisetzung in der LB-Bouillon und im Zellkulturmedium, verglichen mit der Kupferfreisetzung in PBS-Puffer (Abb. 31), keine entsprechend stärkere antibakterielle

Wirkung erreicht werden konnte. Es ist sogar eine Bakterienvermehrung ähnlich der in der Positivkontrolle festzustellen. Die direkte Wirkung des Kupfers auf der Oberfläche der Proben (Abb. 33) wurde sowohl im Zellkulturmedium als auch in der LB-Bouillon, verglichen mit der in PBS-Puffer (Abb. 29), erst nach 4 Stunden um 3 bzw. 4 Zehnerpotenzen herabgesetzt.

4.1.2.2 Galvanisch abgeschiedene Silberschichten (PeO-gAg)

Bei den Versuchen, die (PeO)-Oberfläche anstelle von Kupfer mit Silber zu beladen, konnte mit der in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Beschichtungsmethode lediglich eine Flächenkonzentration des Silbers von maximal $0,17 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ bzw. $0,0016 \mu\text{mol}/\text{mm}^2$ erreicht werden. Das Release einer so beschichteten (PeO-gAg)-Probe zeigt eine nahezu gleichmäßige Silberfreisetzung über 30 Tage (Abb. 34).

Auch in diesem Fall wurden zunächst die planktonischen Bakterien untersucht. In der Abbildung 35 wird deutlich, dass nach dem Absinken der Vermehrungsfähigkeit während der Anpassungsphase im Wesentlichen bakteriostatische Wirkungen zu verzeichnen sind. Bei den auf der Probenoberfläche biofilmbildenden Bakterien (Abb. 36) ist der direkte Kontakt der Bakterien mit der silberbeladenen Oberfläche nicht ausreichend, um die Ansätze einer Biofilmbildung zu verhindern.

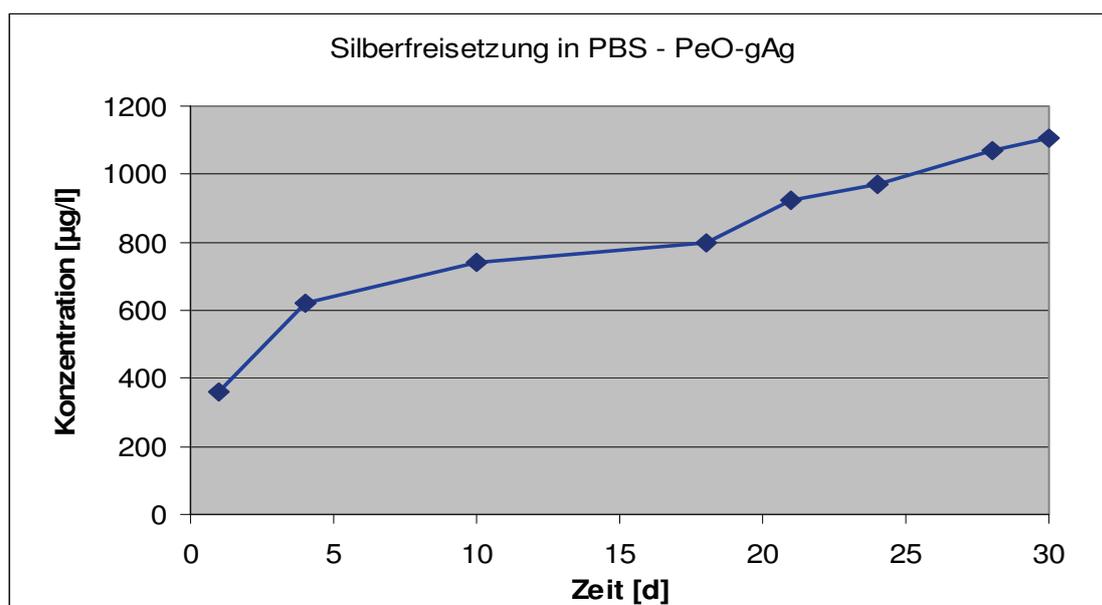


Abb. 34 Silberrelease aus (PeO-gAg)-Proben in PBS-Puffer, bei täglichem Mediumwechsel (5 ml), kumuliert dargestellt

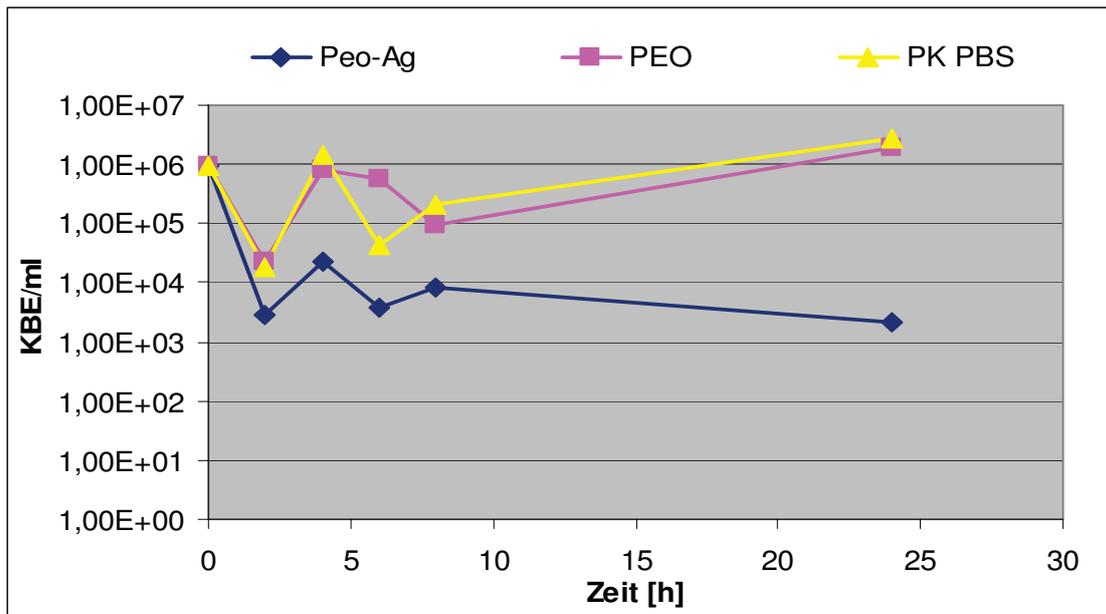


Abb. 35 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über (PeO-Ag)- und (PeO)-Proben sowie als Positivkontrolle in PBS Puffer (PK PBS)

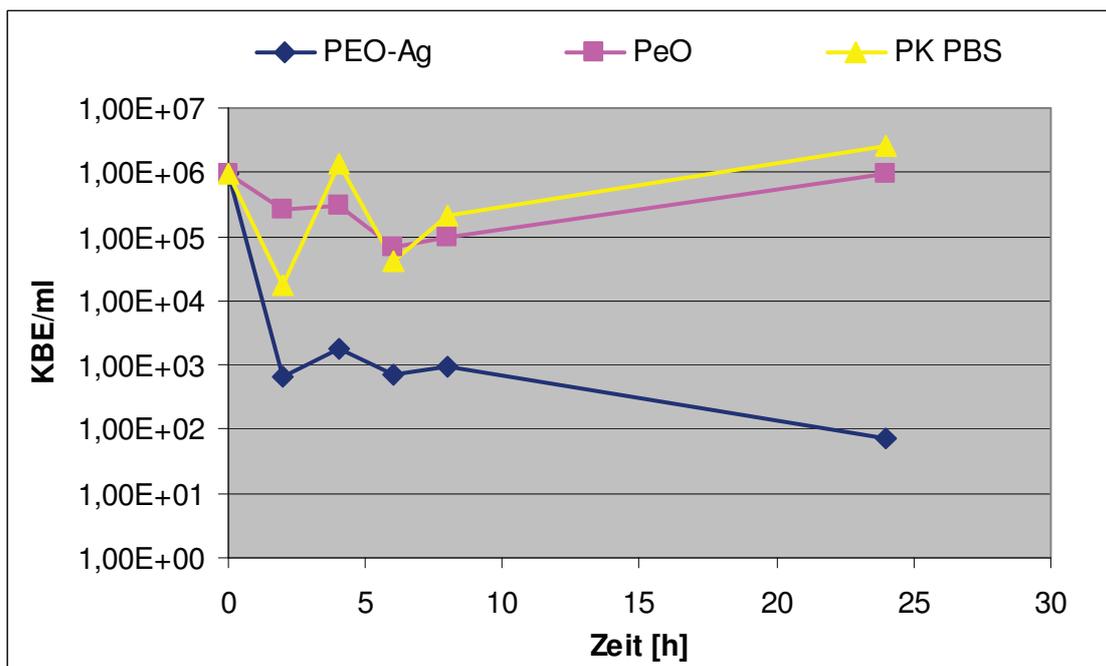


Abb. 36 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf einer (PeO-Ag)- und einer (PeO)-Probe

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt *Staphylococcus aureus* auf einer silberbeladenen plasma-elektrochemisch oxidierten Oberfläche (Abb. 37).

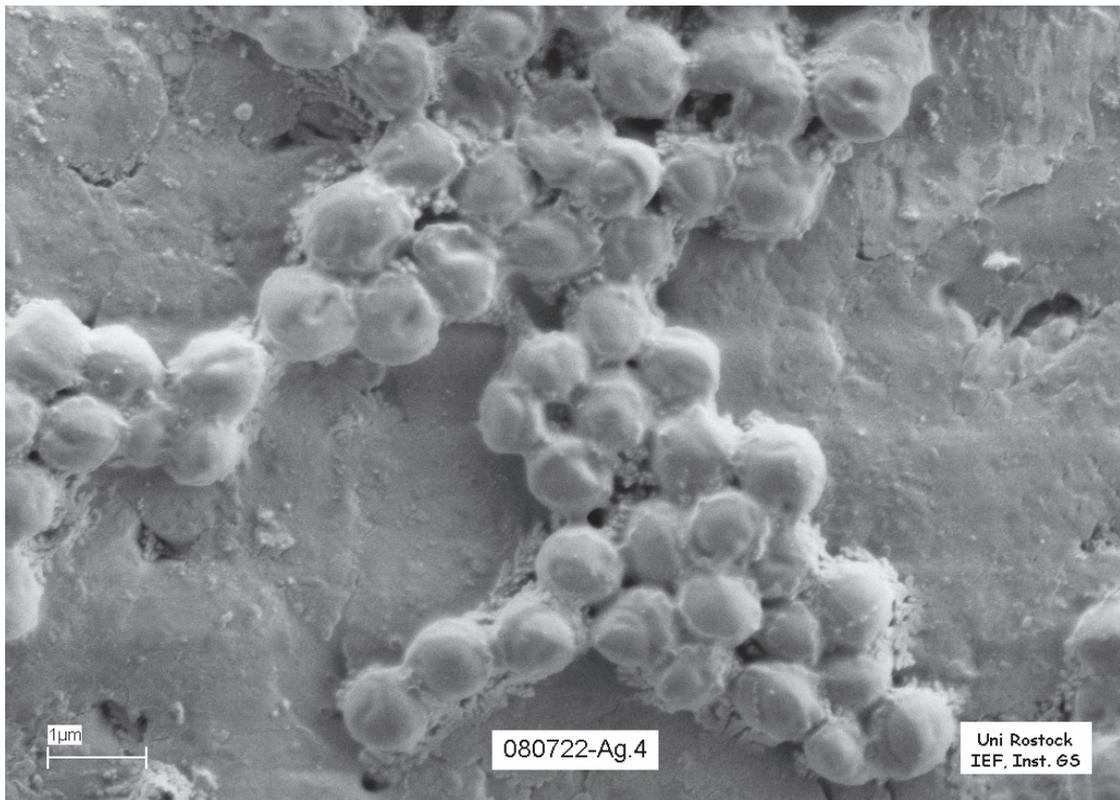


Abb. 37 *Staphylococcus aureus* auf einer plasmaelektrochemisch oxidierten und galvanisch mit Silber beschichteten Titanoberfläche (PeO-gAg)

4.1.2.2.3 Calciumphosphat/Kupfer-Beschichtungen (CaP/cCuP und äCaP/cCuP)

Bakterienadhäsions- und Koloniebildungsprozesse sind stark von der Oberflächenbeschaffenheit der Implantate abhängig. Sowohl die chemische Beschaffenheit, die hygroskopischen Eigenschaften als auch die Rauigkeit der Oberfläche spielen eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Bei den hier bewerteten rauen Oberflächen handelt es sich um Calciumphosphat-Beschichtungen, die auf Langzeitimplantaten Anwendung finden und ein schnelles Anwachsen von humanen Zellen begünstigen. Die dargestellten Beschichtungen unterscheiden sich, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, dadurch voneinander, dass bei den (ä-CaP-cCuP)-Proben vor der Beschichtung ein Säure-Ätzschritt durchgeführt wird und die Calciumphosphat-Schicht mit etwa 5 μm nur $\frac{1}{4}$ so dick wie die auf den (CaP-cCuP)-Proben ist. Um die Kupferfreisetzung zu ermitteln, wurden auch mit diesen Beschichtungen Tages- sowie Stundenrelease durchgeführt (Abbn. 38 und 39).

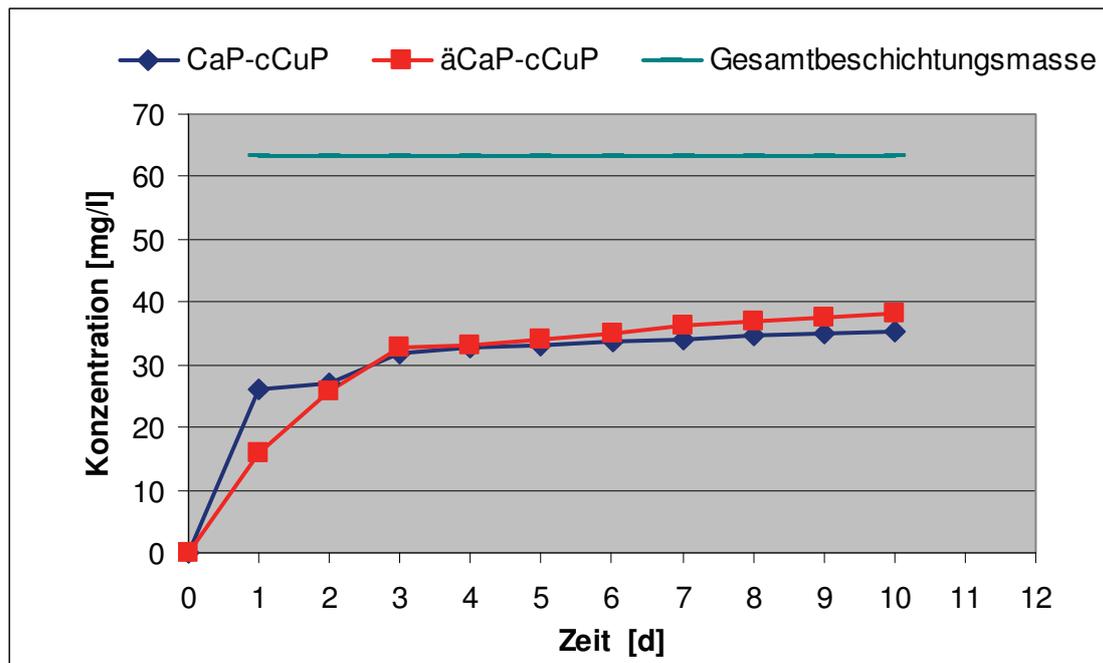


Abb. 38 Kupferrelease aus (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben in PBS-Puffer bei täglichem Mediumwechsel, kumuliert dargestellt

Bei der nicht geätzten (Ca-cCuP)-Probe, im Diagramm (Abb. 38) als blaue Linie dargestellt, sinkt der zunächst relativ hohe Elutionswert von 25 mg/l am 1. Releasetag auf ca. 1 mg/l am 2.Tag ab. Vom 3. bis zum 10.Tag verläuft die Kupferabgabe danach gleichmäßig mit Konzentrationen um 0,8 mg/l pro Tag. Die im Diagramm als rote Linie gekennzeichnete geätzte Probe (äCaP-cCuP) zeigt lediglich am 1. und 2.Tag geringe Unterschiede in der Cu-Elution. Ein ähnlicher Elutionsverlauf ist auch im Kurzzeitrelease zu beobachten (Abb. 39). Wegen des hierbei häufigeren Mediumwechsels wird vor der einsetzenden Passivierung in PBS-Puffer aber mehr Kupfer eluiert.

Bei der Beurteilung des antibakteriellen Verhaltens der planktonischen Bakterien lassen sich daher nur geringe Unterschiede erkennen. Die nicht geätzten (CaP-cCuP)-Proben zeigten nach 2 Stunden noch eine Bakterienkoloniezahl von ca. 103 KBE/ml, während bei den geätzten (äCaP-cCuP)-Proben nach dieser Zeit bereits keine Kolonie bildenden Einheiten mehr gezählt werden konnten. Erst nach weiteren 2 Stunden Einwirkzeit sind auch bei den (CaP-cCuP)-Proben keine vermehrungsfähigen Bakterien mehr nachzuweisen.

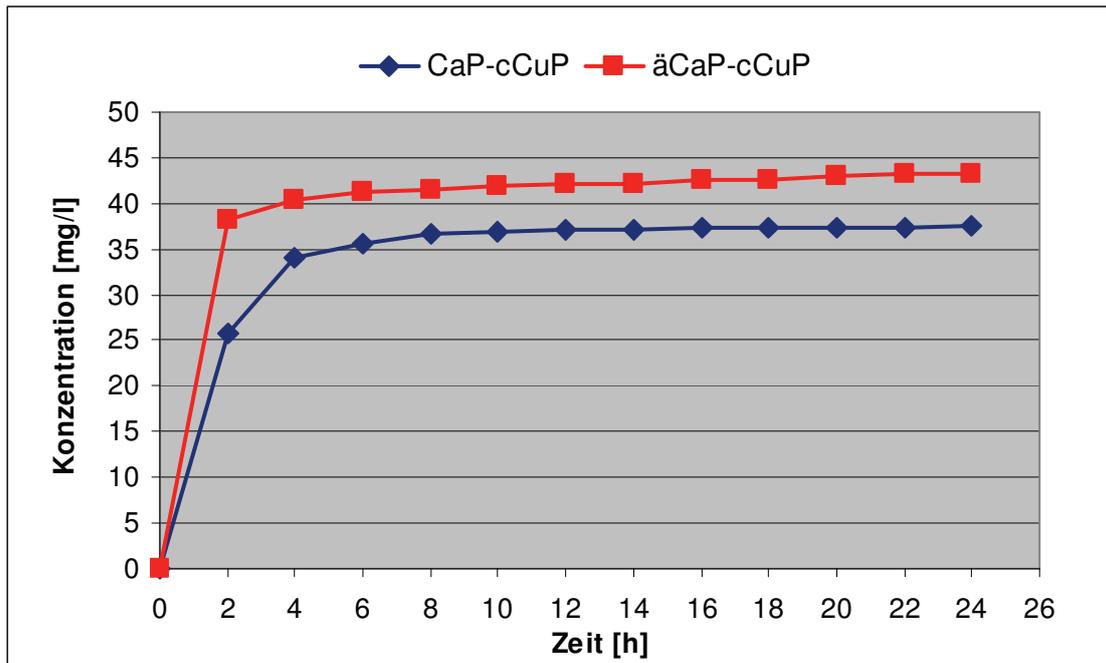


Abb. 39 Kurzzeitrelease aus (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben in PBS-Puffer bei 2stündigem Mediumwechsel, kumuliert dargestellt

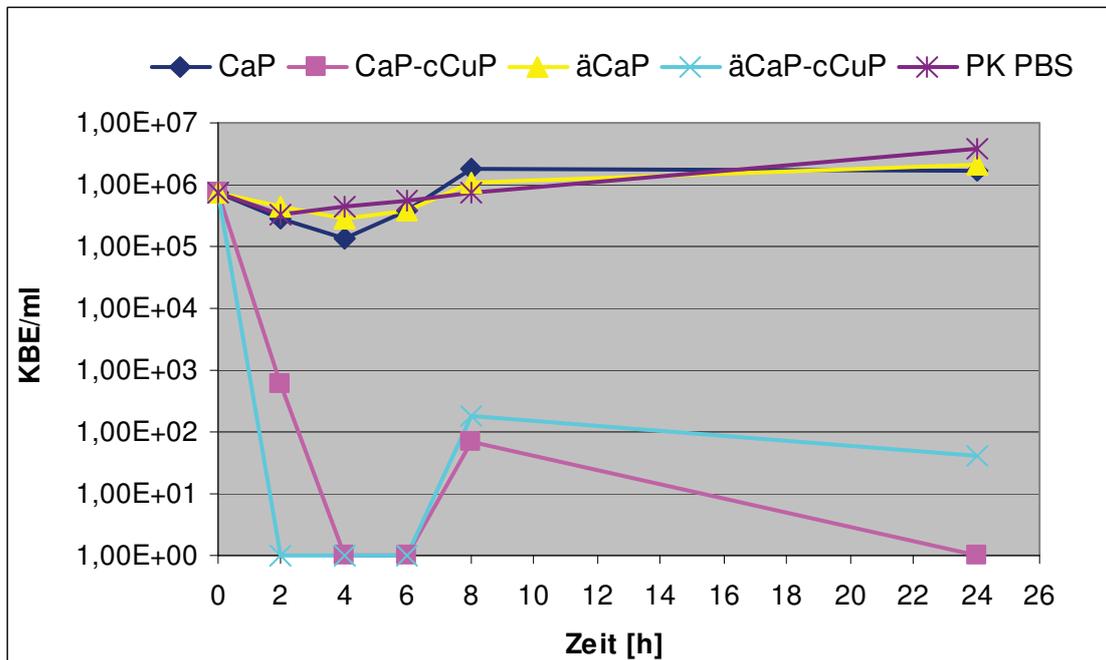


Abb. 40 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über (CaP)-, (CaP-cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben sowie als Positivkontrolle in PBS-Puffer (PK PBS)

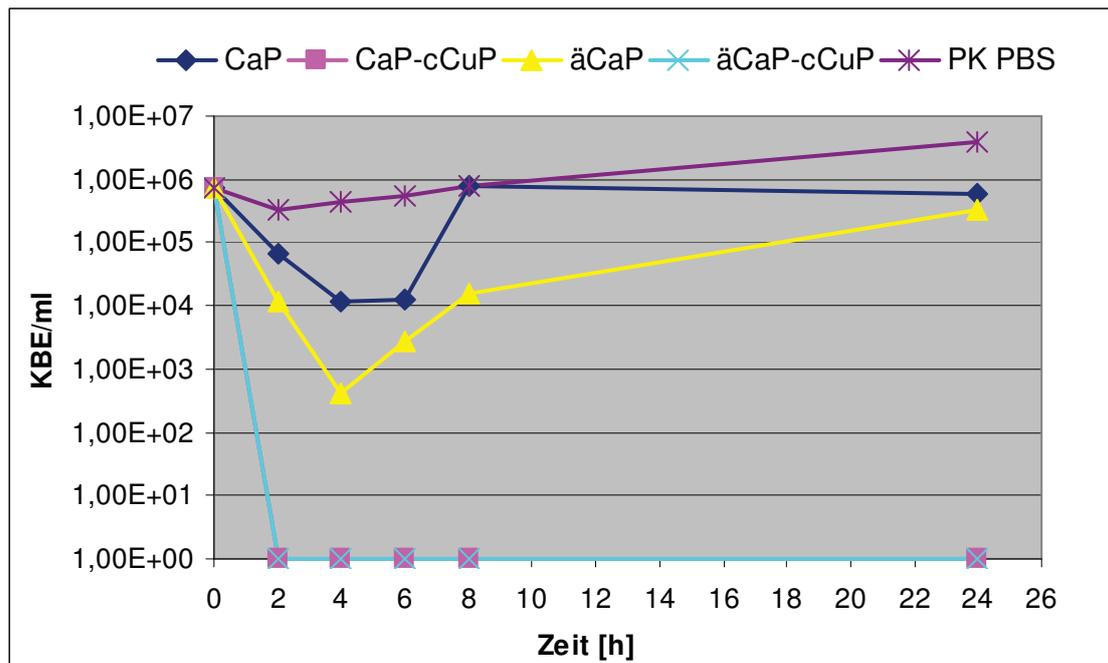


Abb. 41 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf (CaP)-, (CaP/cCuP)- und (äCaP-cCuP)-Proben

Nach der 8. Stunde werden bei beiden Proben wieder vermehrungsfähige planktonische Bakterien gefunden, die nach 24 Stunden bei der nicht geätzten Probe auf Null, bei der geätzten Probe jedoch nur auf ca. 10^2 KBE/ml reduziert werden (Abb. 40). Biofilmbildende Bakterien werden für beide Proben bereits nach 2 Stunden nicht mehr nachgewiesen (Abb. 41).

Eine erneute Vermehrung biofilmbildender Bakterien nach längerer Auslagerung konnte nicht beobachtet werden. Dies wird auch durch LFM-Aufnahmen bestätigt. Auf der lediglich mit Calciumphosphat beschichteten Probenoberfläche sind deutlich lebende Bakterien nachzuweisen, auf der zusätzlich mit Kupfer beschichteten Oberfläche (CaP-cCuP) dagegen nicht (Abb. 42a und b).

Die Kupferelution der (CaP-cCuP)-Schicht wurde zusätzlich in verschiedenen Inkubationsmedien untersucht (Abb. 43). Der Mediumwechsel erfolgte nach 2, 4, 6, 8 und 24 Stunden. Im Zellkulturmedium wie auch in der LB-Bouillon wurde bereits nach 8 Stunden die Gesamtmenge an Kupfer eluiert, während im PBS-Puffer auch nach 24 h lediglich ca. 40 % des eingebrachten Kupfers freigesetzt wurde.

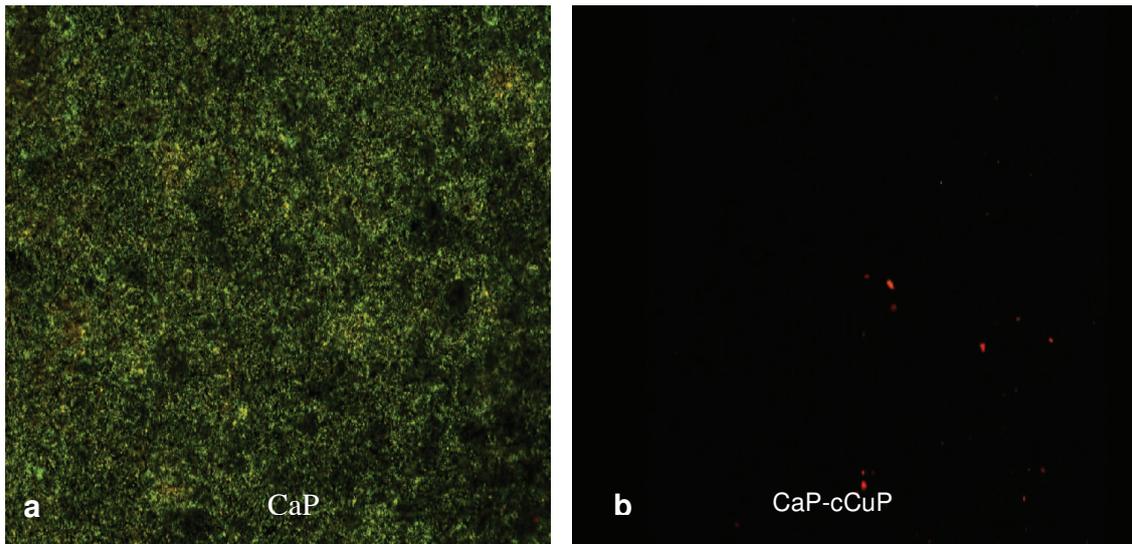


Abb. 42 *Staphylococcus aureus* -Biofilm a) auf einer Calciumphosphat-Oberfläche (CaP), b) auf einer Calciumphosphat/Kupfer-Oberfläche (CaP-cCuP)

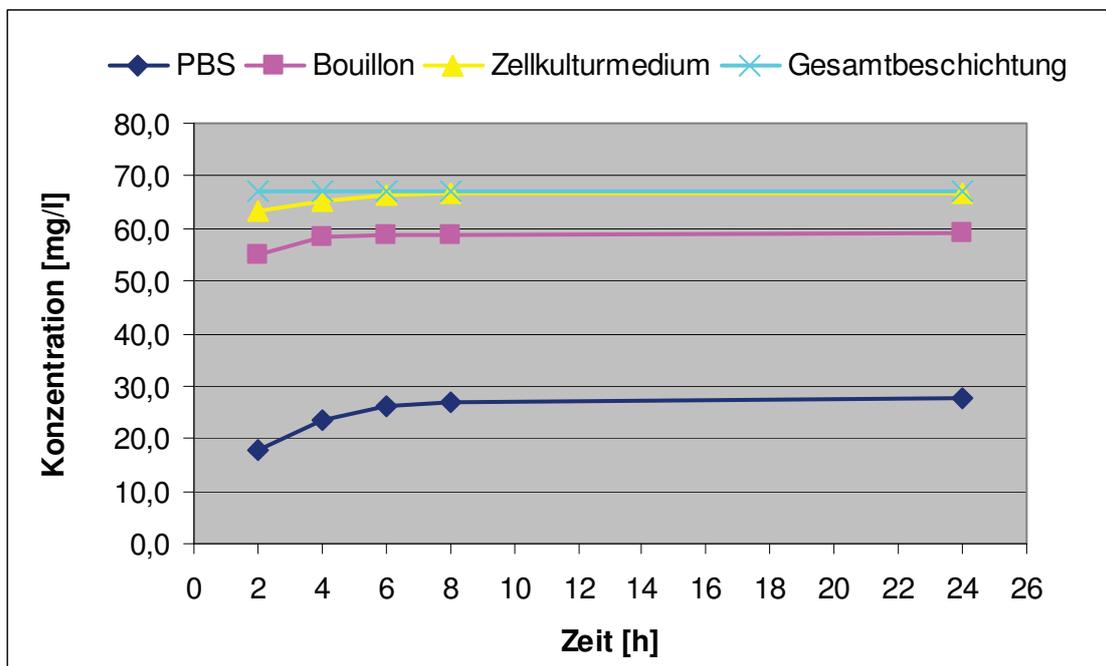


Abb. 43 Kupferrelease aus (CaP-cCuP)-Proben in Zellkulturmedium, PBS-Puffer und LB-Bouillon, kumuliert dargestellt

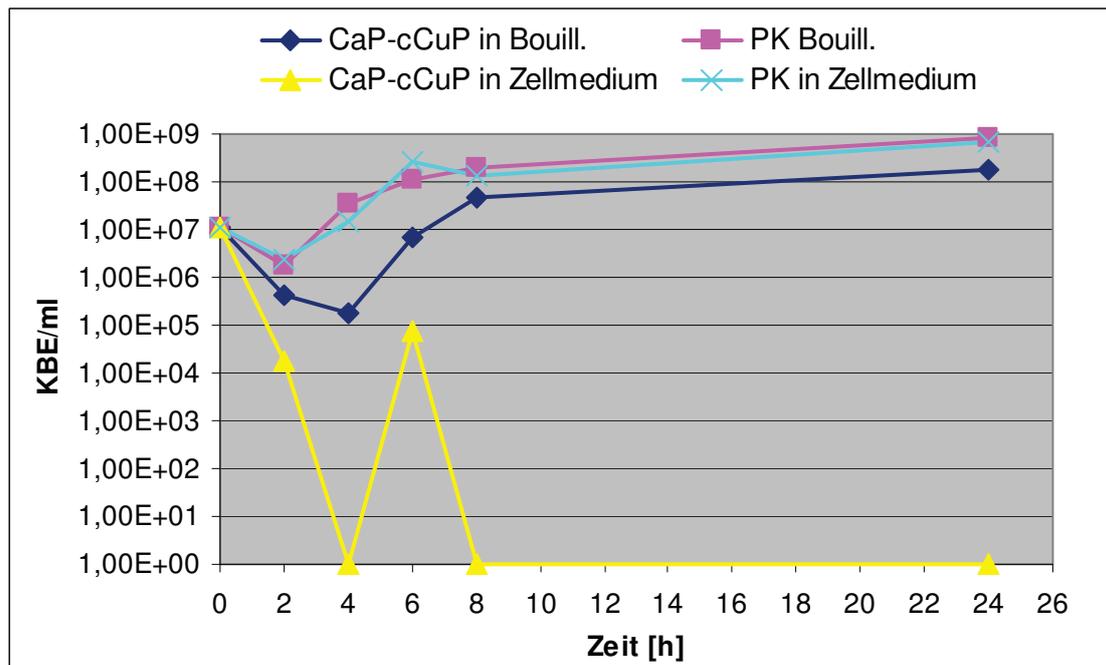


Abb. 44 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium über (CaP-cCuP)-Proben sowie in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium als Positivkontrolle (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium)

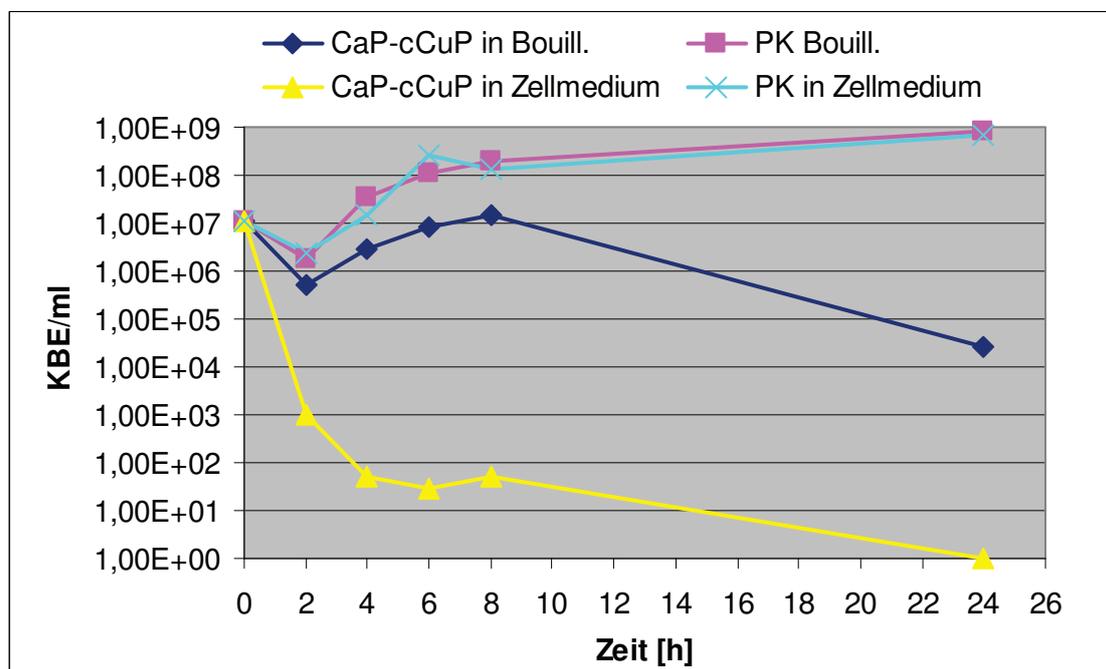


Abb. 45 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK PBS) sowie auf (CaP-cCuP)-Proben

Die Untersuchung der antibakteriellen Wirkung der Eluate lieferte die in den Abbildungen 44 und 45 dargestellten Ergebnisse. Anders als bei den (PeO-gCu)-Proben konnte bei der Verwendung von Zellkulturmedium bei den planktonischen Bakterien nach 8 Stunden und bei den biofilmbildenden Bakterien nach 24 Stunden eine vollständige bakterizide Wirkung erreicht werden. In der LB-Bouillon wurde bei den biofilmbildenden Bakterien eine Absenkung um knapp 3 Zehnerpotenzen erreicht, planktonische Bakterien konnten dagegen nicht an ihrer Vermehrung gehindert werden.

4.1.2.2.4 PVD- Kupfer beschichtete Proben (TiN-sCu)

Bei den nachfolgend dargestellten Proben handelt es sich um eine durch kombinierte Arc-/Sputter-Beschichtung hergestellte (TiN-Cu)-Sandwich-Schicht. Bei dieser Beschichtung wurde das Kupfer, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, in mehreren Beschichtungsschritten in die Oberfläche eingebracht. Die Kupferionen werden daher recht unterschiedlich: Beginnend mit einer Anfangskonzentration von knapp 15 mg/l fallen die freigesetzten Kupfer-Konzentrationen am Tag 2 und 3 auf Werte um 1 mg/l ab und steigen am 4. Tag wieder auf ca. 10 mg/l an (Abb. 46).

Das geringe Releasevermögen der Kupferionen aus der (TiN-Cu)-Sandwich-Schicht wirkt sich hinsichtlich ihrer bakteriziden Wirkung auf planktonische Bakterien aus. Die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter steigt, wie in Abb. 47 dargestellt, nach der Anpassungsphase wieder an und wird, ausgehend von 10^7 KBE/ml, innerhalb von 24 Stunden auf 10^2 KBE/ml reduziert. Die kupferfreie (TiN)-Schicht zeigt keine die Bakterien hemmenden Eigenschaften.

Der direkte Einfluss der mit Kupfer beschichteten (TiN-sCu)-Probe lässt bereits nach 2 Stunden keine Biofilmbildung mehr zu (Abb. 48). Mikroskopisch ist dieser Befund in Abb. 49 dargestellt. Während auf der reinen (TiN)-Oberfläche (Abb. 49a) eine dichte Schicht lebender Bakterien erkennbar ist, zeigt die (TiN-sCu)-beschichtete Probe lediglich wenige tote Bakterien (rot) (Abb. 49b).

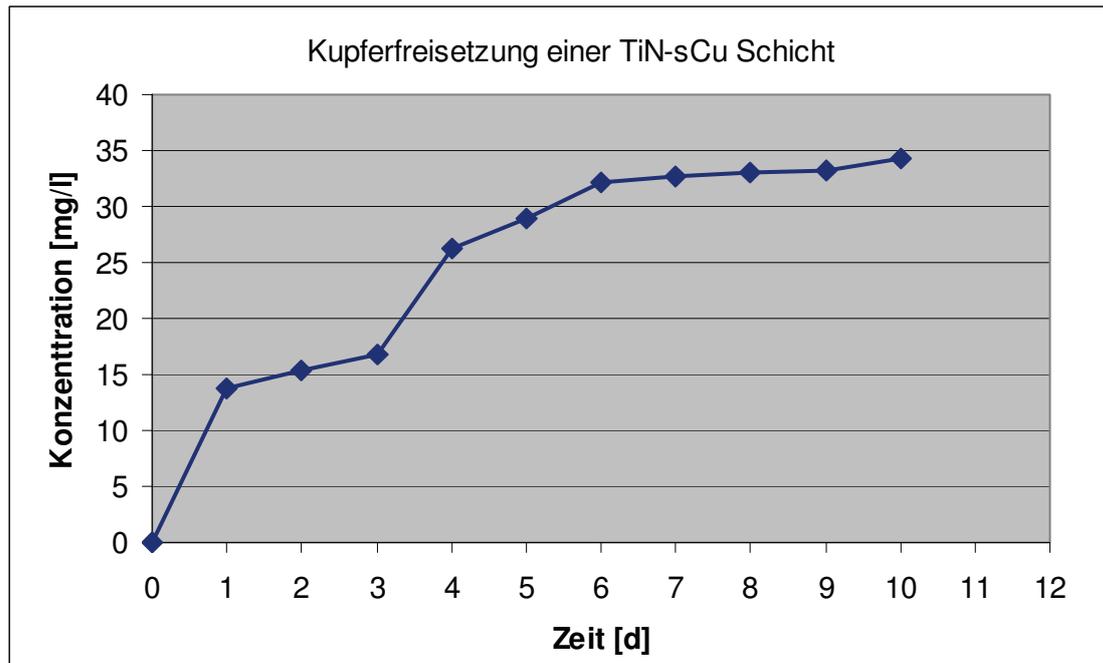


Abb. 46 Kupferrelease aus (TiN-sCu)-Proben in PBS-Puffer, täglicher Medi-
umwechsel (5 ml), kumuliert dargestellt

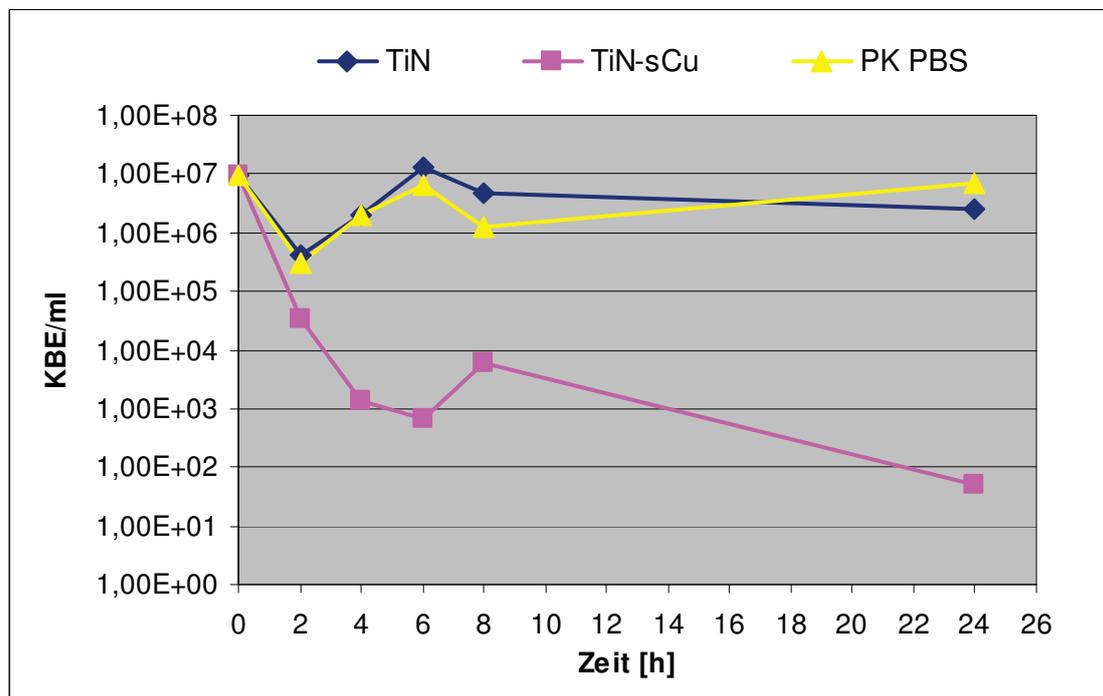


Abb. 47 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in PBS-Puffer über
(TiN)- und (TiN-sCu)-Proben sowie als Positivkontrolle in PBS-Puffer (PK
PBS)

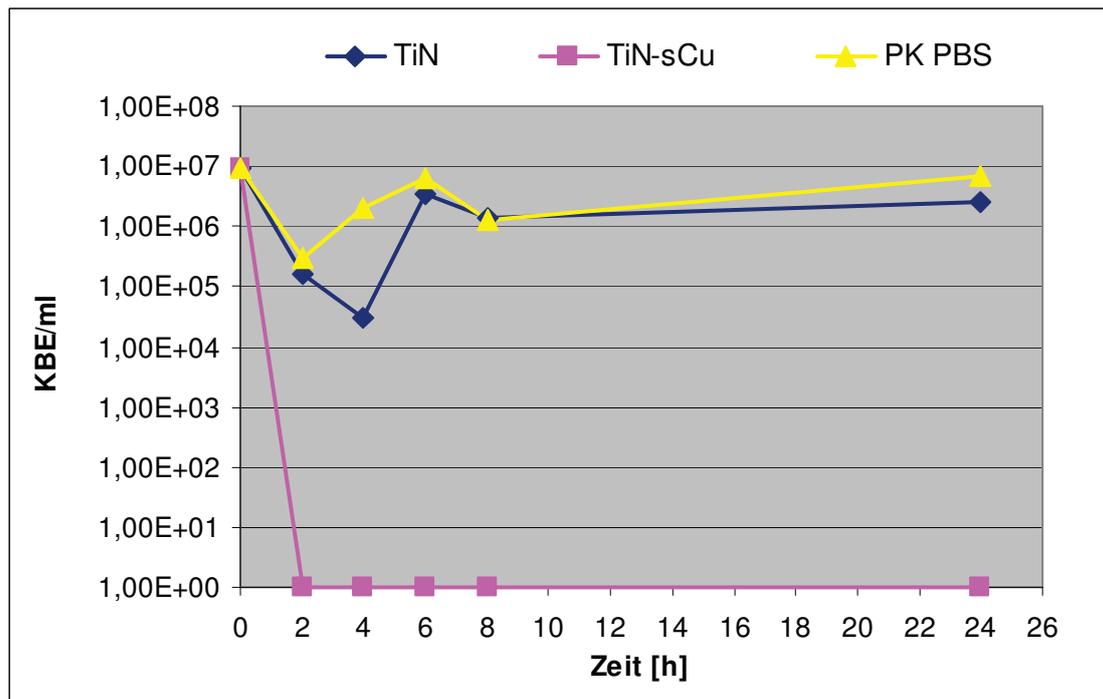


Abb. 48 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK PBS) sowie auf (TiN)- und (TiN-sCu)-Proben

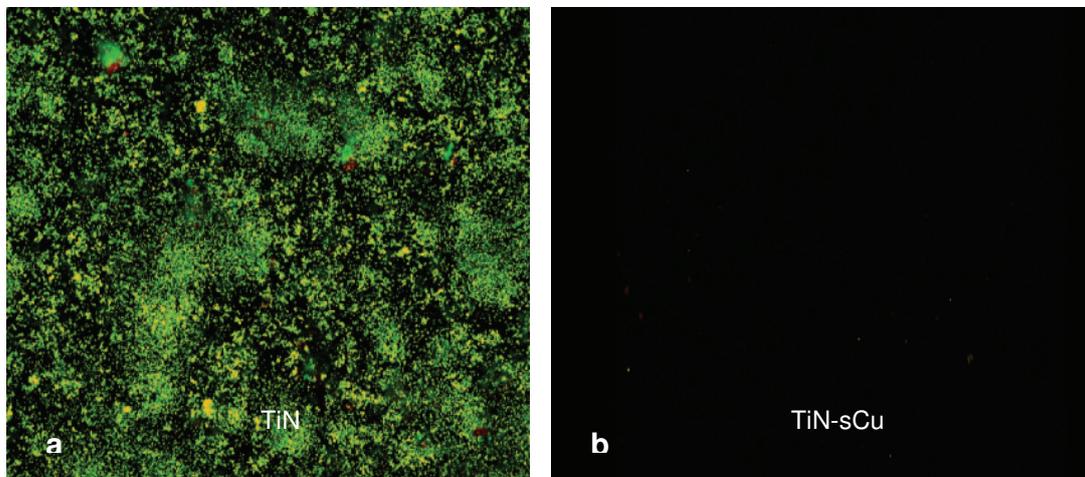


Abb. 49 *Staphylococcus aureus* a) auf einer mit Titannitrid beschichteten Probe (TiN), b) auf einer mit Titannitrid und Kupfer beschichteten Probe (TiN-sCu)

Bei der Verwendung von Zellkulturmedium und LB-Bouillon wurden auch hier unterschiedliche Releaseergebnisse erzielt (Abb. 50). Im PBS-Puffer werden nach 24 h mit 165 µg bzw. 33 mg/l lediglich 22 % der eingebrachten Kupfermenge (750 µg) freigesetzt. Hingegen wird in der LB-Bouillon sowie im Zellkul-

turmedium bereits nach 6 Stunden etwa die Hälfte der Gesamtmenge an Kupfer herausgelöst.

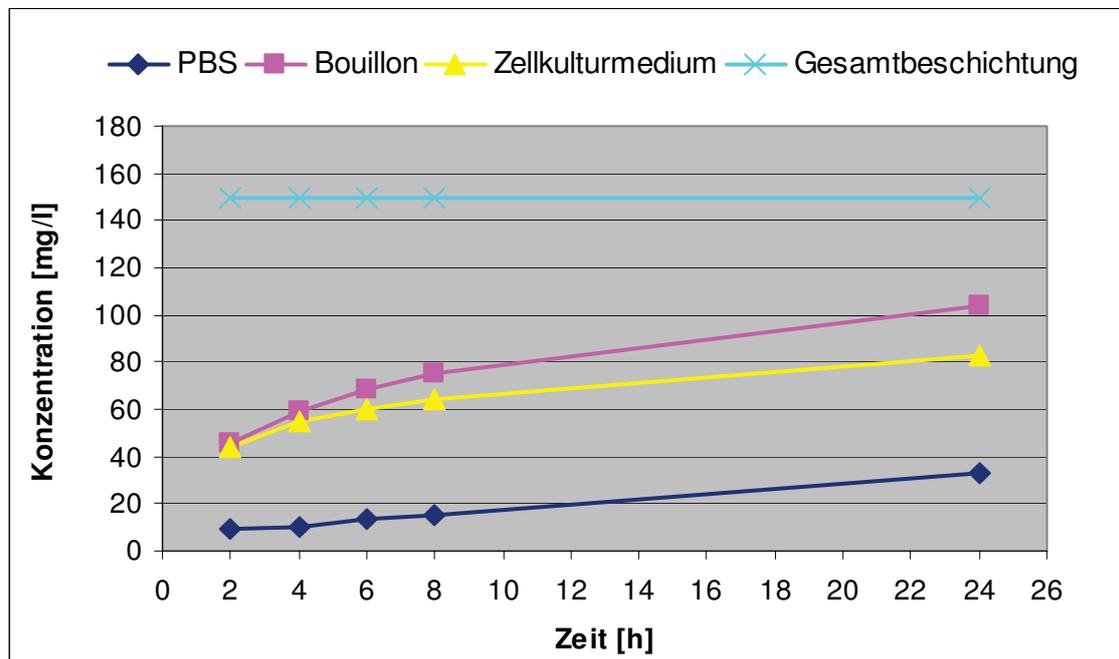


Abb. 50 Kumulatives Kupferrelease einer (TiN-sCu)-Probe in Zellkulturmedium, in LB-Bouillon und in PBS-Puffer

Die folgenden Abbildungen zeigen die antibakteriellen Effekte dieser Eluate. Das Wachstum der planktonischen Bakterien (Abb. 51) kann in der LB Bouillon nicht verhindert werden, ihre Konzentration steigt ähnlich dem Wachstum in der Positivkontrolle um eine Zehnerpotenz gegenüber der Ausgangskonzentration an. Bei der Verwendung von Zellkulturmedium kann nach 24 Stunden eine Reduktion der Bakterienzahl auf 10^2 KBE/ml erreicht werden. Wie in Abb. 52 sichtbar, konnte die Bildung eines Biofilms weder in der LB-Bouillon noch im Zellkulturmedium vollständig verhindert werden. Es wurde aber zumindest eine Reduktion der biofilmbildenden Bakterien um 3 Zehnerpotenzen in der LB-Bouillon und um 6 Zehnerpotenzen im Zellkulturmedium erreicht.

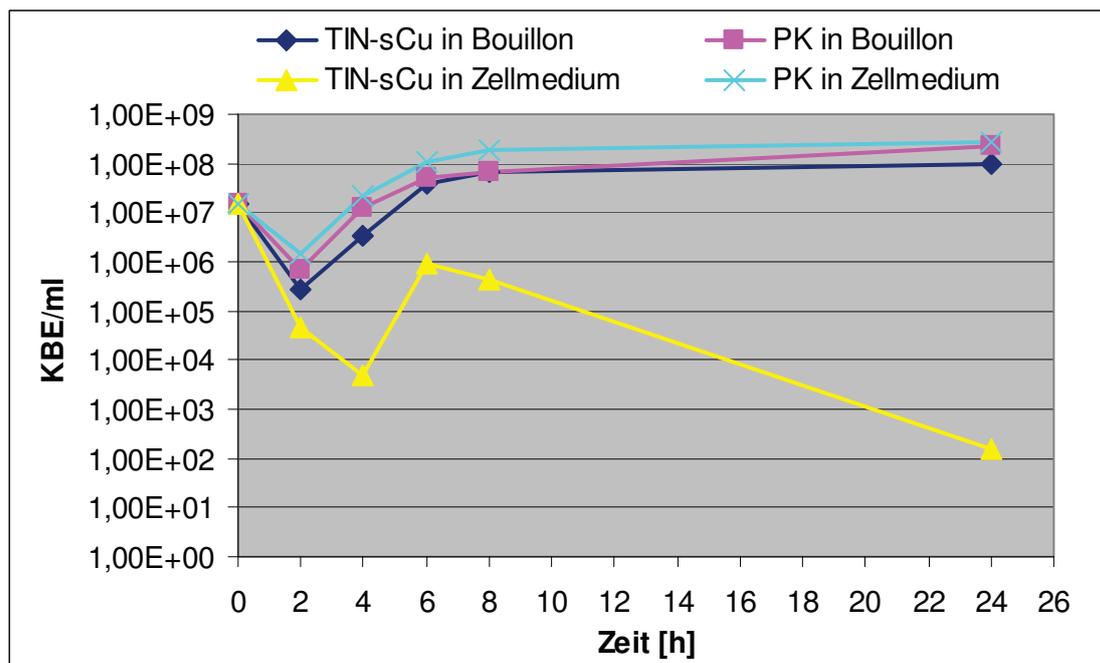


Abb. 51 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium über (TiN-sCu)-Proben sowie als Positivkontrolle in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium (PK Bouillon; PK Zellkulturmedium)

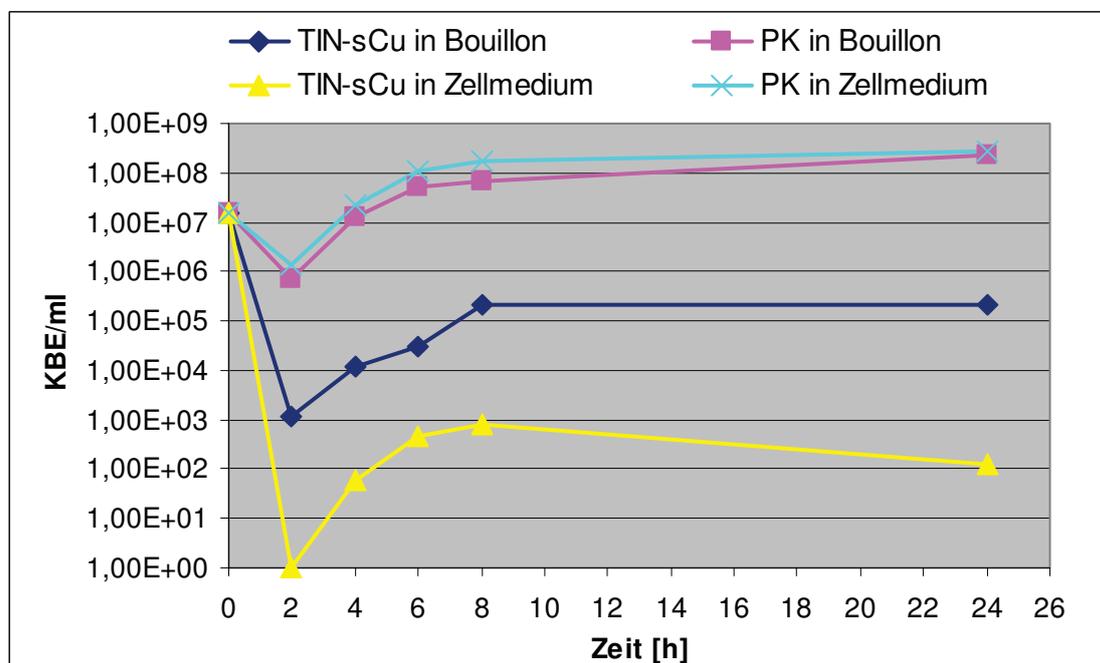


Abb. 52 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in LB-Bouillon bzw. Zellkulturmedium auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatte (PK PBS) sowie auf (TiN-sCu)-Proben

4.1.3 Einfluss verschiedener Elutionsmedien

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, ist die Menge der in Lösung gehenden Kupferionen von den verwendeten Elutionsmedien abhängig. Die Abb. 53 zeigt das Releaseverhalten aller für diese Arbeit verwendeten Kupferproben sowie deren Abhängigkeit vom Elutionsmedium. Es wurden Proben mit den in Tabelle 3 aufgeführten Kupferkonzentrationen verwendet.

Tabelle 3: Kupferbeladene Proben

Probekörper	Beschichtungsmasse (abs.) µg	Flächenkonzentration	
		µmol/mm ²	µg/mm ²
(PeO-gCu)	520	0,026	1,7
(TiN-sCu)	750	0,037	2,4
(CaP-cCuP)	333	0,018	1,0

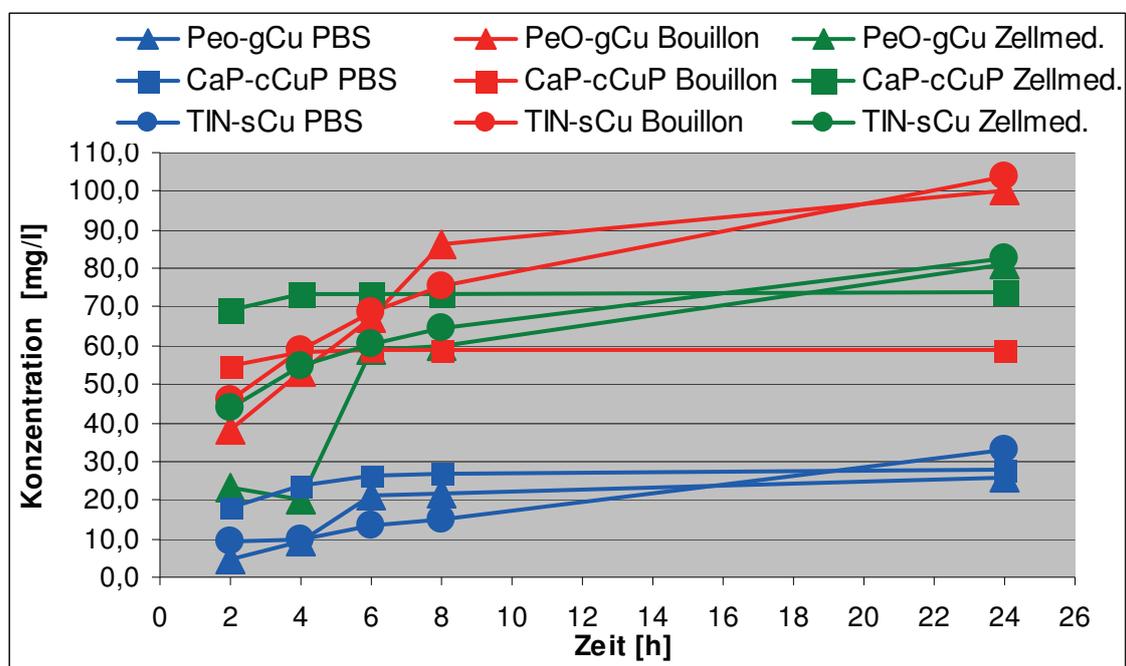


Abb. 53 Kumulative Freisetzung von Kupfer aus unterschiedlich hergestellten Proben (Tab. 3) in PBS Puffer, Zellkulturmedium und LB Nährbouillon

In Abbildung 53 wird deutlich, dass im Zellkulturmedium PC Komplet (grün) und in der LB-Nährbouillon (rot) 3- bis 5-fach mehr Kupfer als im PBS-Puffer (blau) eluiert wird.

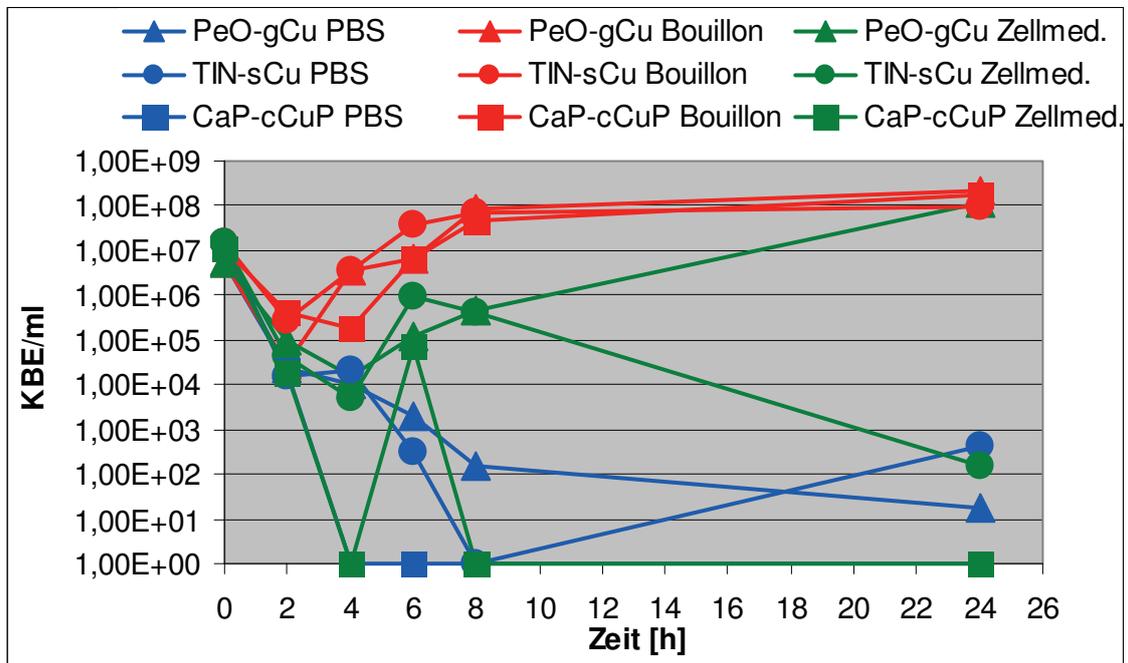


Abb. 54 Einfluss der Elutionsmedien auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* (planktonisch) über kupferbeschichteten Proben

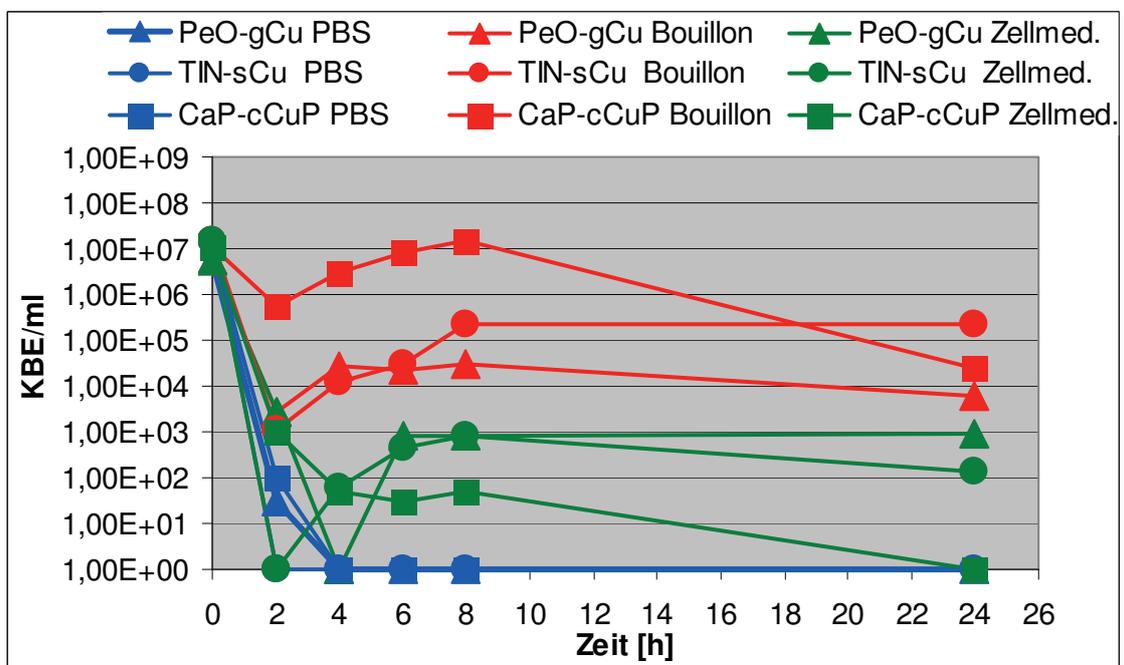


Abb. 55 Einfluss der Elutionsmedien auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) auf kupferbeschichteten Proben

Die antibakterielle Wirkung dieser Medien zeigen die Abbildungen 54 und 55. Es wird deutlich, dass diese Wirkung im PBS-Puffer (blau) am größten ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Absolutkonzentration an Kupfer im verwendeten Elutionsmedium und der Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* ist somit nicht erkennbar.

Insbesondere die Bouillon und das Zellkulturmedium sind in ihrer Zusammensetzung der Körperflüssigkeit des Menschen nicht ähnlich. Deshalb wurde entschieden, Humanplasma als Inkubations- und Releasemedium zu verwenden. Der Kupfergehalt im Releasemedium Humanplasma wurde sowohl photometrisch als auch über die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ermittelt, um sowohl den Anteil an freiem, d.h. ionischem Kupfer, als auch den von gebundenem Kupfer festzustellen. Bei einem Vergleich der Abbildungen 56 und 57 fällt auf, dass die photometrisch und die mit AAS ermittelten Konzentrationen kaum Unterschiede zeigen, was bedeutet, dass nahezu das gesamte in der Lösung enthaltene Kupfer als zweiwertiges Ion vorliegt.

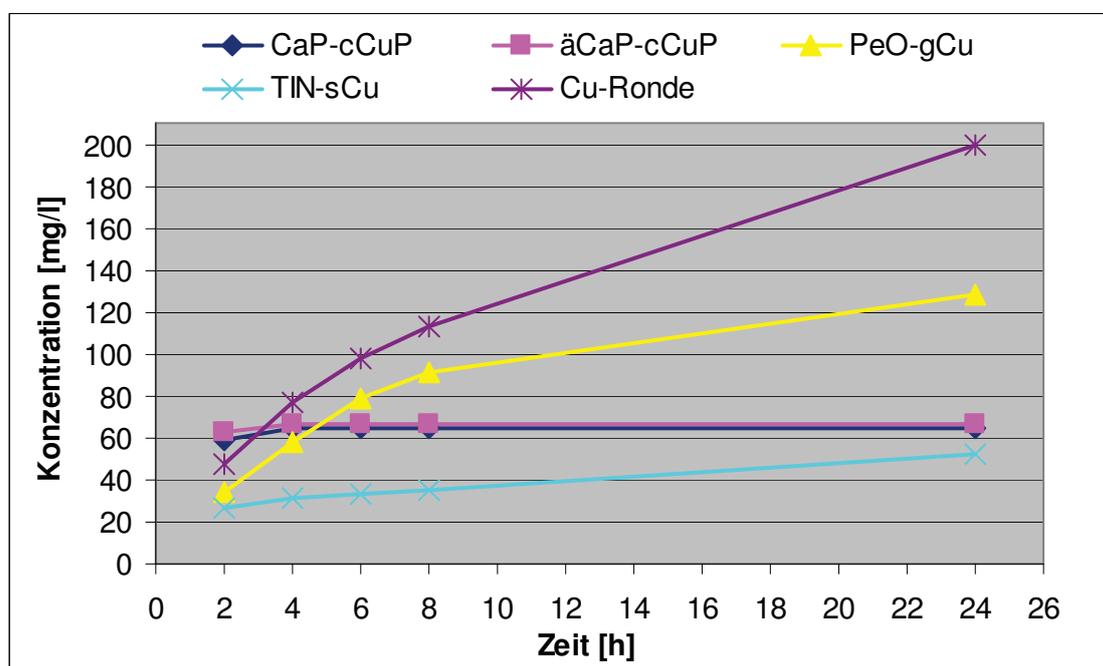


Abb. 56 Kumulatives Cu-Release in Humanplasma (AAS)

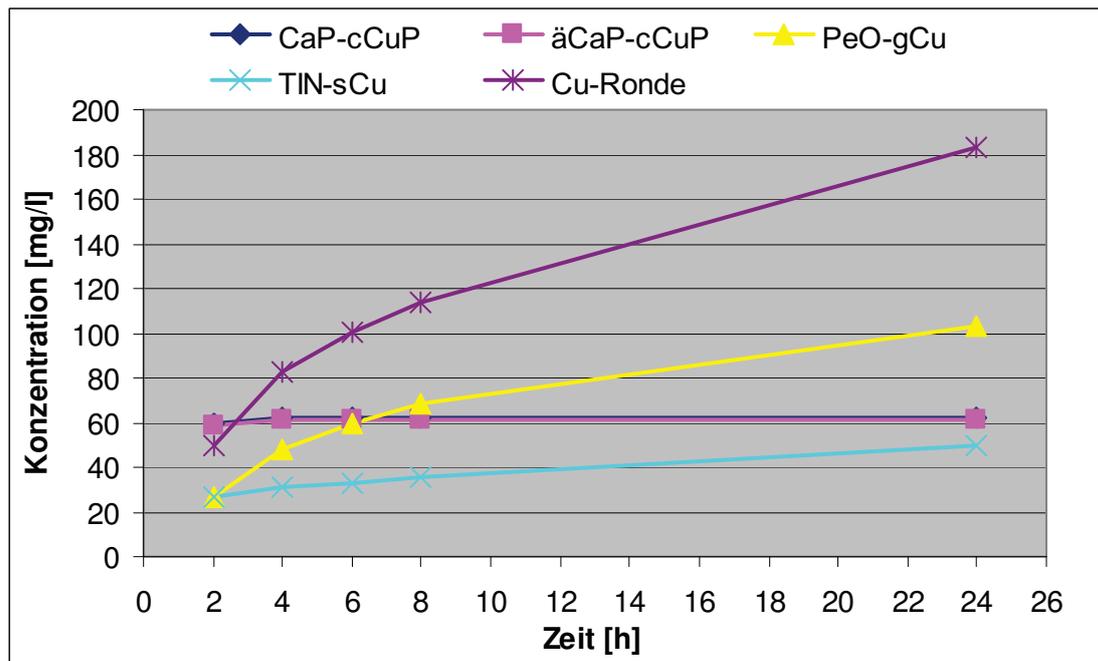


Abb. 57 Kumulatives Cu-Release in Humanplasma (photometrische Messung)

Bei der Verwendung von reinem Humanplasma bildeten sich nach der Inkubation der beimpften Proben Plasma-Koagulate, d.h. das Humanplasma konnte nicht wie erforderlich gleichmäßig auf dem Agar ausplattiert werden. Bei der Verwendung eines Gemisches aus Humanplasma und PBS-Puffer im Verhältnis 1:3 als Inkubationsmedium war das möglich. Die Zahl der koloniebildenden Einheiten planktonischer Bakterien konnte innerhalb der ersten 24 Stunden von 10^7 KBE/ml auf 10^5 KBE/ml bis 10^2 KBE/ml reduziert werden (Abb. 58). Zudem war eine erneute Vermehrung in keinem Fall zu beobachten. Der in der Abb. 59 dargestellte Einfluss der einzelnen kupferhaltigen Schichten auf biofilmbildende Bakterien zeigt, dass bei der Verwendung einer reinen Kupferprobe bereits nach 4 Stunden keine lebensfähigen Bakterien mehr nachzuweisen waren. Die (TiN-sCu)-Probe zeigte nach 8 Stunden eine Reduktion der Konzentration dieser Bakterien um 3 Zehnerpotenzen. Nach 24 Stunden sind keine lebensfähigen Bakterien mehr nachzuweisen. Die (PeO-gCu)-Probe reduzierte nach 24 Stunden die Zahl der biofilmbildenden Bakterien um 4 Zehnerpotenzen. Bei den Calciumphosphat/Kupfer-Schichten konnte lediglich eine Reduktion der Bakterienzahl um 2 Zehnerpotenzen erzielt werden.

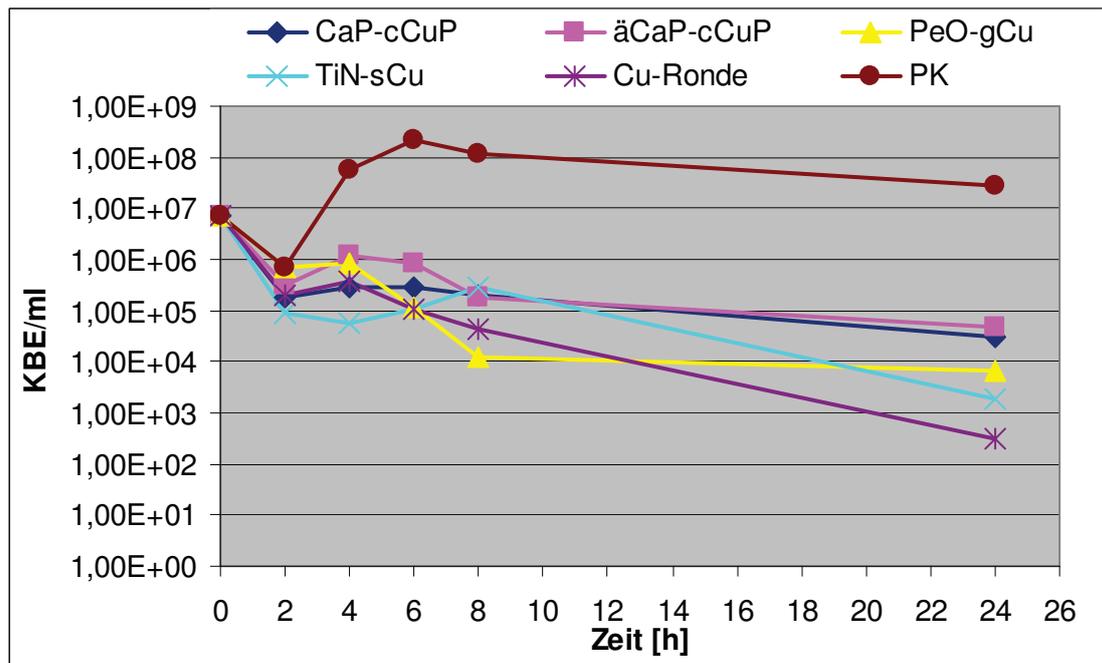


Abb. 58 *Staphylococcus aureus* (planktonisch) bei 37 °C in einem Humanplasma-PBS-Puffer-Gemisch über verschiedenen mit Kupfer beschichteten Oberflächen sowie in Plasma-PBS-Puffer-Gemisch als Positivkontrolle (PK)

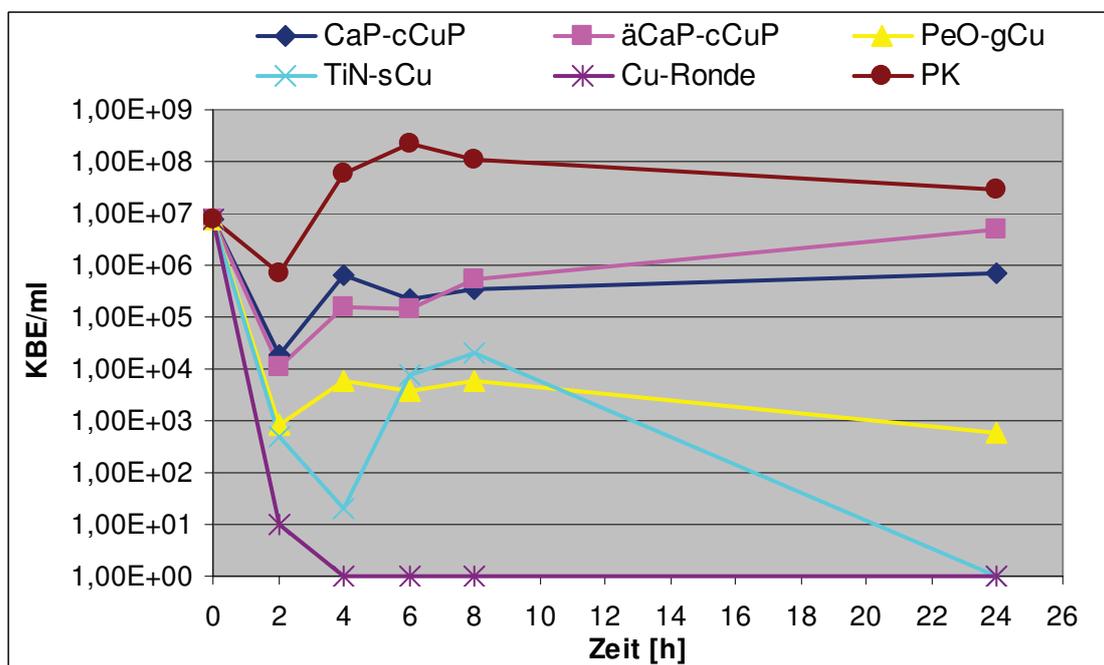


Abb. 59 *Staphylococcus aureus* (biofilmbildend) bei 37 °C in Plasma/PBS-Puffer-Gemisch auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten (PK PBS) sowie auf verschiedenen mit Kupfer beschichteten Oberflächen

4.1.4 Einfluss von Bakterien auf die Kupferfreisetzung

Nach der Inkubation mit Bakterien wurde in dem die mit Kupfer beschichteten Proben umgebenden PBS-Puffer eine höhere Kupfermenge gemessen. Diese Freisetzung ist jedoch wesentlich von der Art der Beschichtung abhängig. Während bei den Calciumphosphatschichten nur geringere Releaseunterschiede festgestellt wurden, setzten sowohl die galvanisch mit Kupfer beschichteten Proben (PeO-gCu) als auch die mittels PVD beschichteten Proben (TiN-sCu) unter dem Einfluss der Bakterien eine erhöhte Kupfermenge frei (Abbn. 60 und 61). Bei der (PeO-gCu)-Probe erreichte die Gesamtelution nach 24 h etwa 30 mg/l (Abb. 62). Wurde die Elutionslösung ein 2. Mal mit 50 μ l Bakteriensuspension der Konzentration 10^7 KBE/ml beladen, stieg ihre Kupferkonzentration im Verlaufe der Zeit erneut an und erreichte nach 24 h den Wert 50 mg/l (Abb. 62).

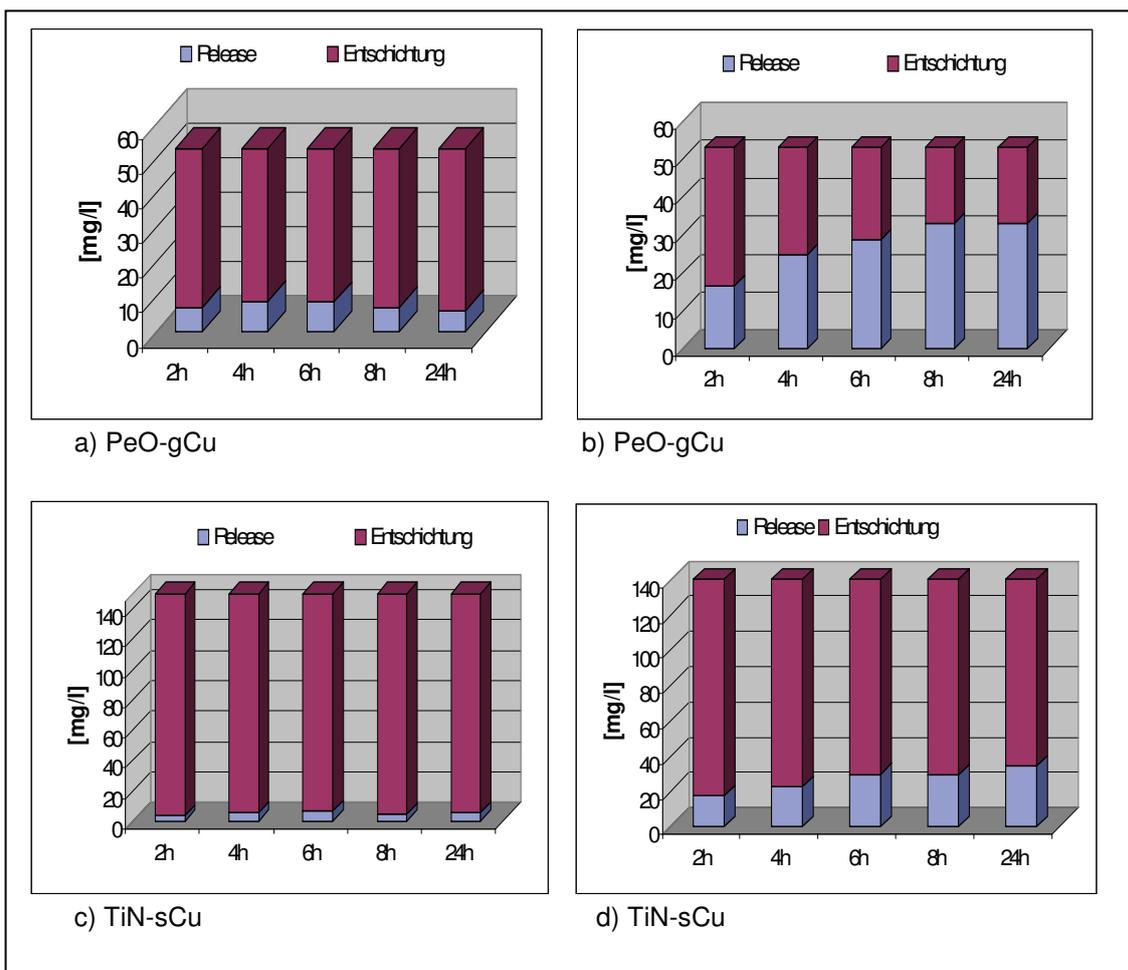


Abb. 60 Kupferelution aus galvanisch bzw. mittels PVD beschichteten Titanoberflächen in PBS-Puffer ohne (a und c) und mit (b und d) Bakterien

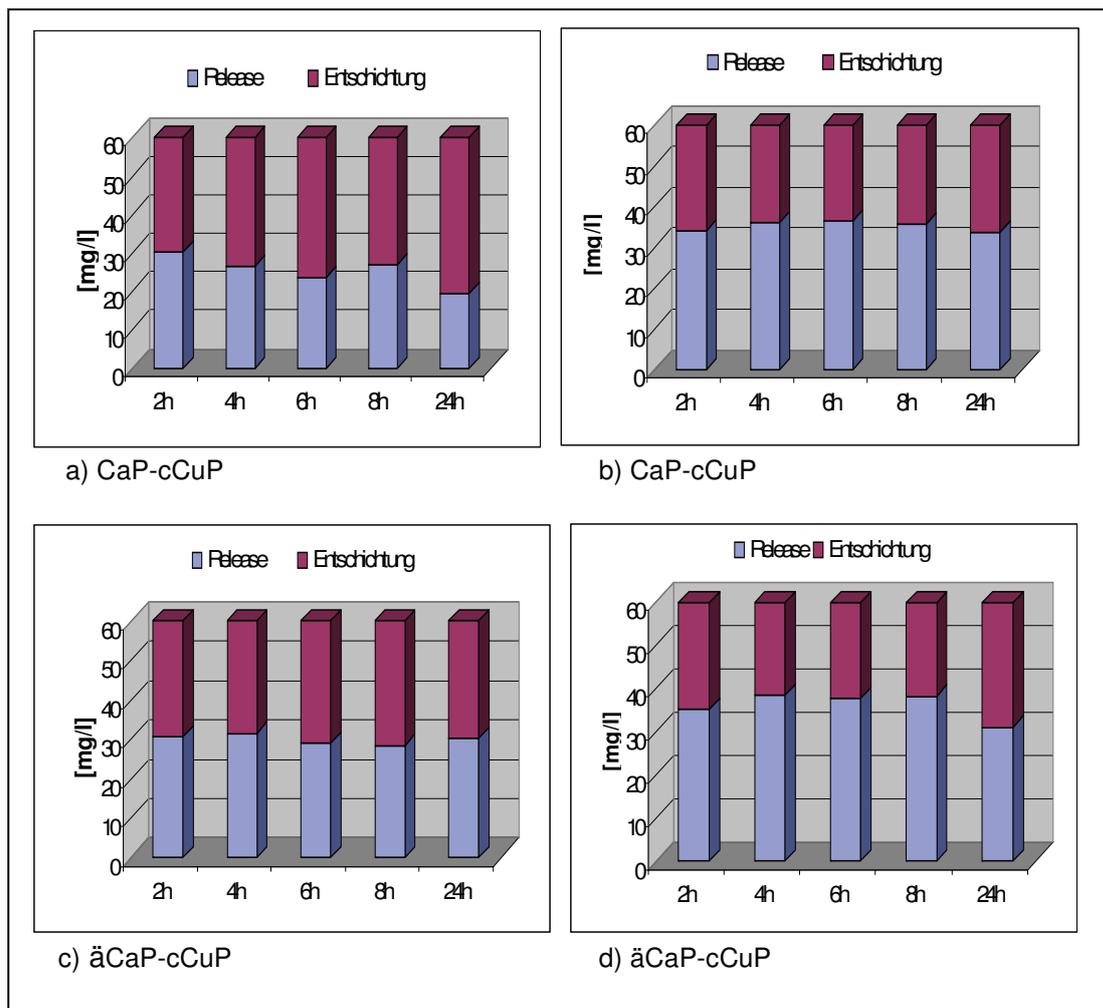


Abb. 61 Kupferelution aus kupferbeschichteten Calciumphosphatschichten, in PBS-Puffer ohne (a und c) und mit (b und d) Bakterien

Diese sich einstellenden Konzentrationen zeigten sich auch in den bakteriziden Eigenschaften. Nach 24 h waren nach der 1. Beladung keine lebensfähigen planktonischen Bakterien mehr nachzuweisen, ähnlich wie in einer 20 mg/l konzentrierten Cu-Lösung (Abb. 63). Auch die Analyse nach der 2. Bakterieninjektion auf die (PeO-gCu)-Probe ergab nach 24 h, ähnlich wie nach der 1. Gabe, keine lebensfähigen Bakterienkolonien. Dagegen war die bakterizide Wirkung der Cu-Lösung bei der 2. Bakteriengabe weitgehend erschöpft. Die Anwesenheit von biofilmbildenden Bakterien auf den (PeO-gCu)-Proben konnte nur nach der 2. Bakteriengabe untersucht werden. Eine Biofilmbildung konnte auch hier nicht beobachtet werden.

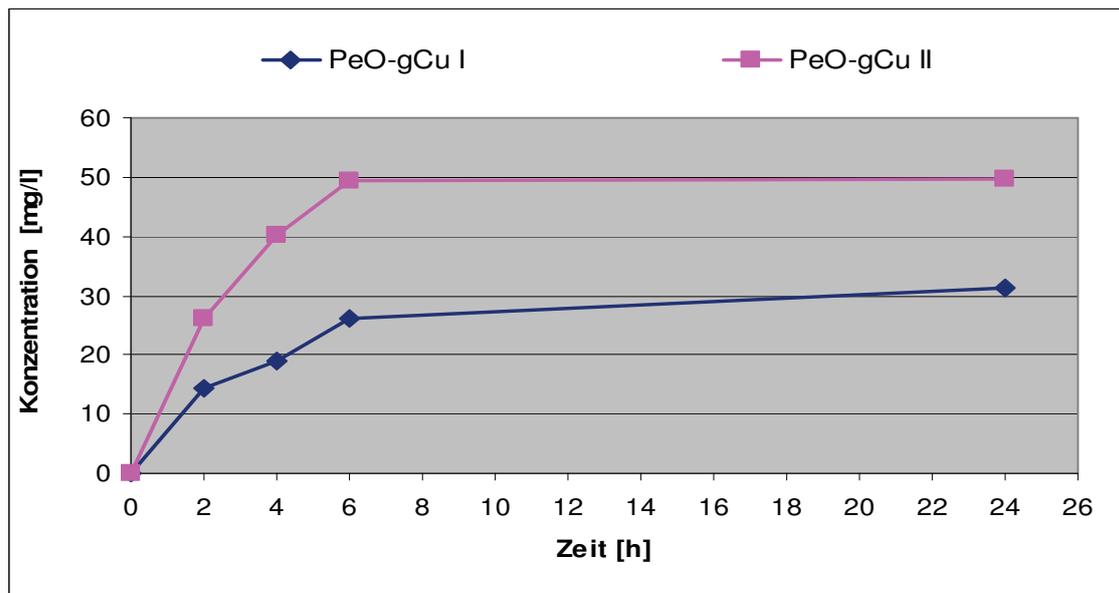


Abb. 62 Kupferelution aus: (PeO-gCu I) Elution nach Erstinkubation mit 100 μ l Bakteriensuspension (10^7 KBE/ml); (PeO-gCu II) Elution nach erneuter Inkubation mit 50 μ l Bakteriensuspension (10^7 KBE/ml)

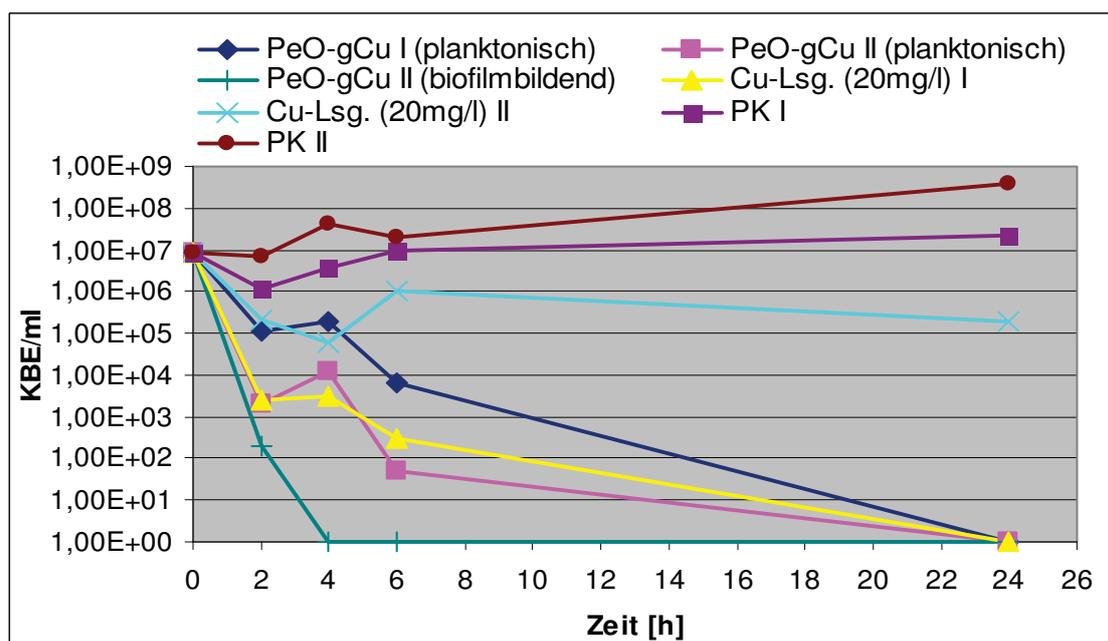


Abb. 63 *Staphylococcus aureus* (planktonisch bzw. biofilmbildend) bei 37 °C in PBS-Puffer nach einmaliger Zugabe (PeO-gCu I) und Cu-Lösung (20 mg/l) I; nach erneuter Zugabe (PeO-gCu II) und Cu-Lösung (20 mg/l) II; (PK I-PBS, einmalig) und (PK II-PBS erneut) auf der Wand von Greiner CELLSTAR Mehrfachkulturplatten

4.2 Zytotoxizitätsuntersuchungen

Zusätzlich zur Charakterisierung ihrer antiinfektiösen Eigenschaften wurden Kupfer- und Silberionen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Wirkung geprüft. Diese Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Abteilung Zellbiologie der Universität Rostock durchgeführt.

4.2.1 Zytotoxizität von Kupfer- bzw. Silberionen

Analog zu den Bakterienversuchen (Kap. 4.1.1) wurde zunächst der Einfluss von unterschiedlich konzentrierten Kupfer- bzw. Silbersalzlösungen auf MG-63-Zellen untersucht. Anhand eines Vergleiches der 48 h -Tests in den Abbildungen 64 und 65 wird deutlich, dass Kupfer und Silberionen die MG 63-Zellen unterschiedlich stark beeinflussen. Während bei einer Kupferionen-Konzentration von 0,05 mmol/l (3,18 mg/l) noch 90 % und selbst bei 0,5 mmol/l (31,8 mg/l) noch ein Anteil von über 50 % vitaler Zellen vorliegen, werden durch Silberionen-Konzentrationen von bereits 0,01 mmol/l (1,08 mg/l) 40 % aller Zellen getötet. Bei einer Silberionen-Konzentration von 0,5 mmol/l (53,9 mg/l) konnten lediglich 30 % vitale Zellen ermittelt werden.

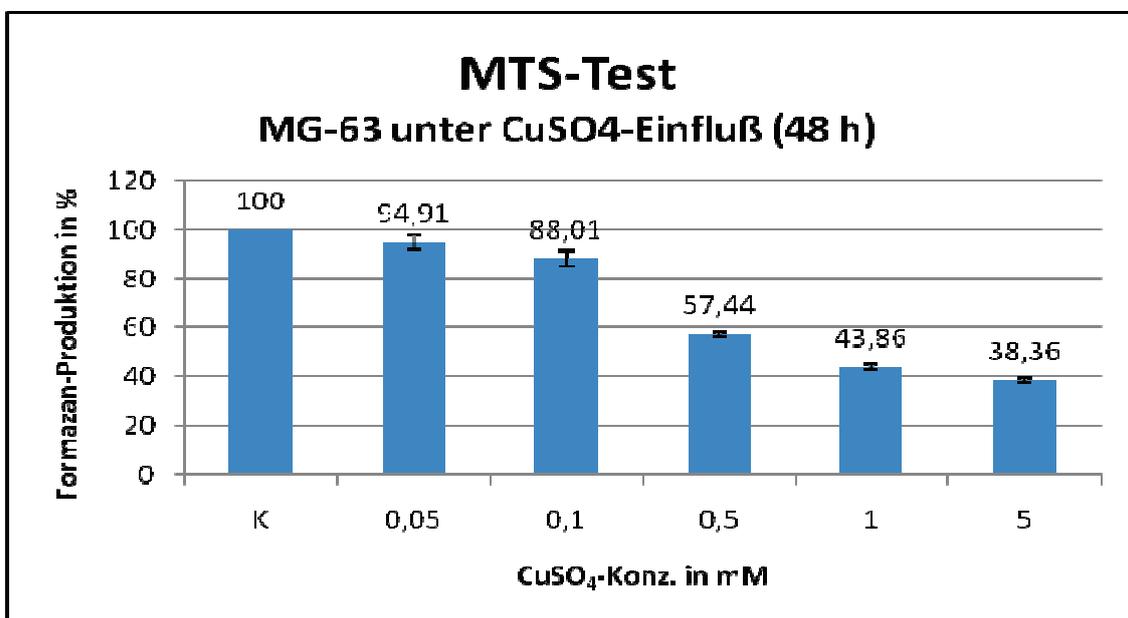


Abb. 64 MTS-Test: Einfluss von CuSO₄-Lösungen verschiedener Konzentration auf MG-63/19. Passage-Zellen, 10⁵ Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte)

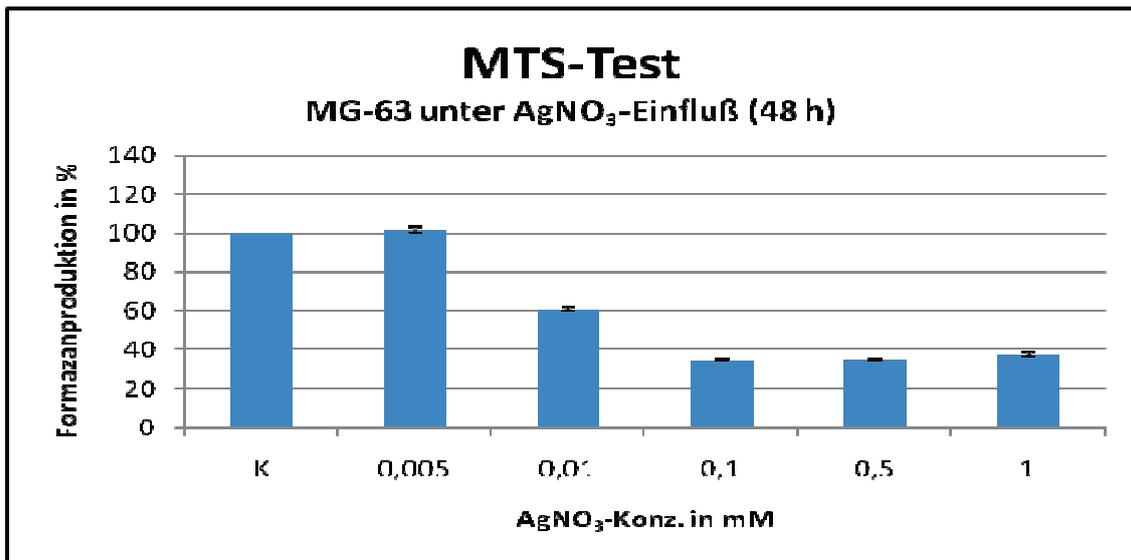


Abb. 65 MTS-Test: Einfluss von AgNO₃-Lösungen verschiedener Konzentration auf MG-63/27.Passage, 10⁵ Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte)

Bei den Untersuchungen der Zellzyklusphasen (Abbn. 66 und 67) ergaben sich, verglichen mit der Kontrolle (K), bei Kupferkonzentrationen von 0,05 mmol/l und 0,1 mmol/l keine wesentlichen Unterschiede. Erst bei Konzentrationen von > 0,5 mmol/l ist bei beiden Versuchen eine Verschiebung der Zellzyklusphasen zu beobachten. So gehen sowohl bei direkter als auch bei indirekter Einsaat bei einer Konzentration von 0,5 mmol/l die S-Phase (Zellwachstum, Protein-/RNA-Synthese) und die G1-Phase (Zellwachstum und Replikation) fast vollständig verloren. Bei Kupferkonzentrationen von 1 und 5 mmol/l zeigt sich bei direkter Einsaat (Abb. 66) eine Verlängerung der G1-Phase, die S- und G2/M-Phasen (G2 = Verdoppelung von Zellorganellen, M = Mitose) dagegen sind kaum mehr vorhanden. Lässt man die Zellen jedoch zunächst 24 Stunden adhären, bevor sie für weitere 24 Stunden mit der Kupfersulfatlösung inkubiert werden (indirekte Einsaat) zeigt sich bei Konzentrationen von 0,5 und 1 mmol/l eine stark verlängerte G2/M-Phase, die zu einer Verkürzung der G1-Phase führt. Bei 5 mol/l ist eine Verlängerung der S-Phase zu Ungunsten der G1 und G2/M-Phasen zu beobachten (Abb. 67).

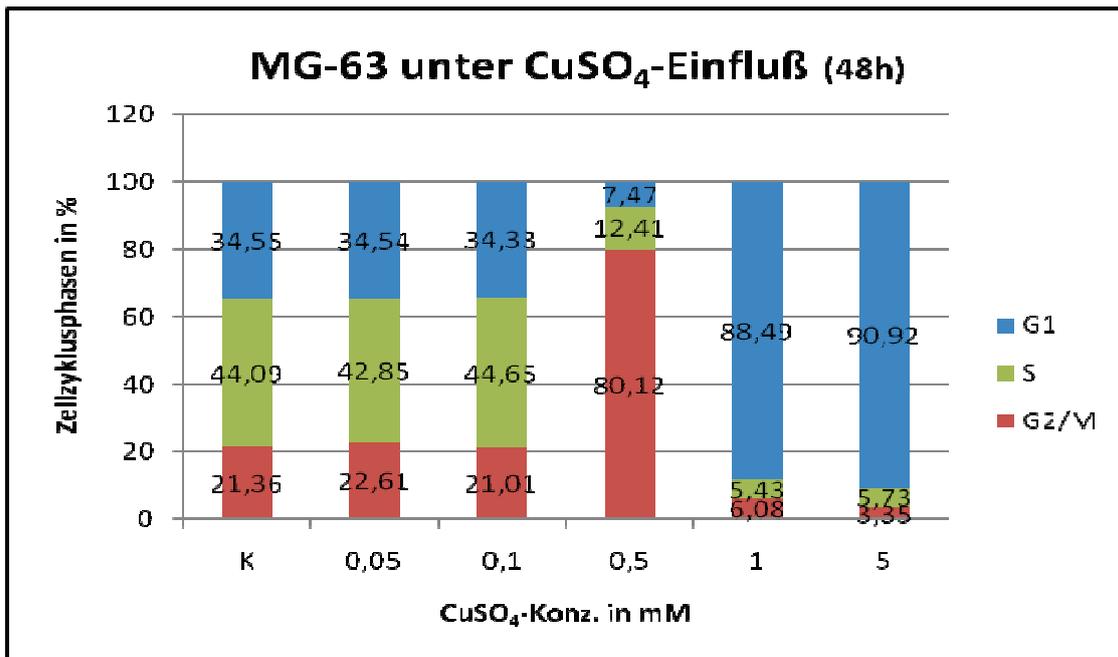


Abb. 66 FACS-Analyse: Einfluss von CuSO₄-Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 5. u. 7. Passage, 10⁵ Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte), direkte Einsaat

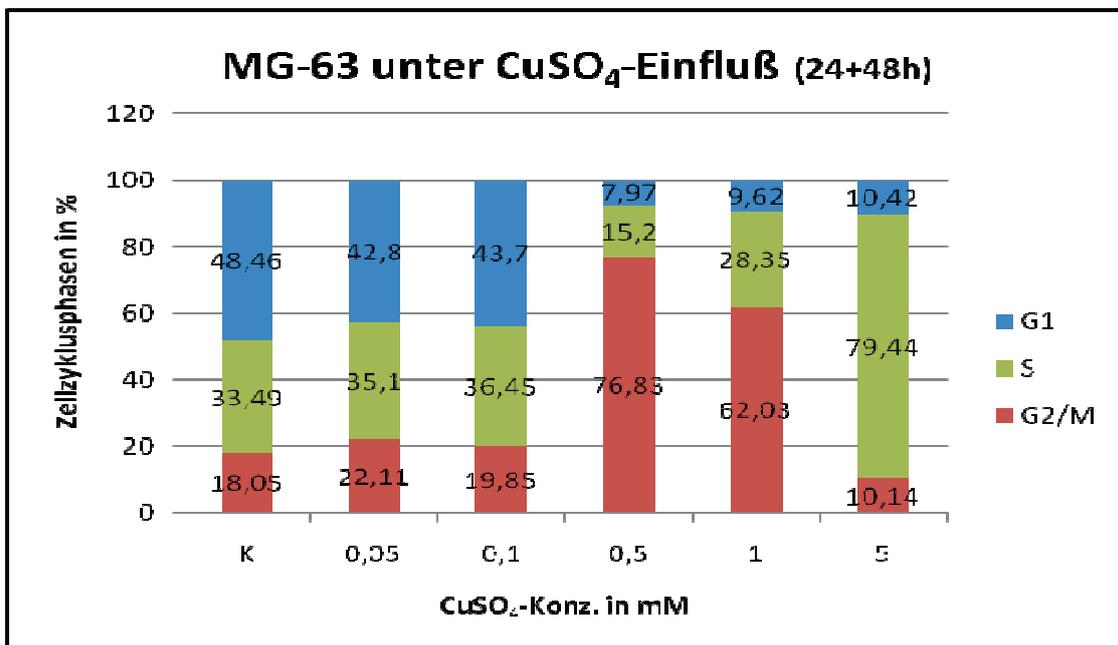


Abb. 67 FACS-Analyse: Einfluss von CuSO₄-Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 5. u. 8. Passage, 10⁵ Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte), indirekte Einsaat

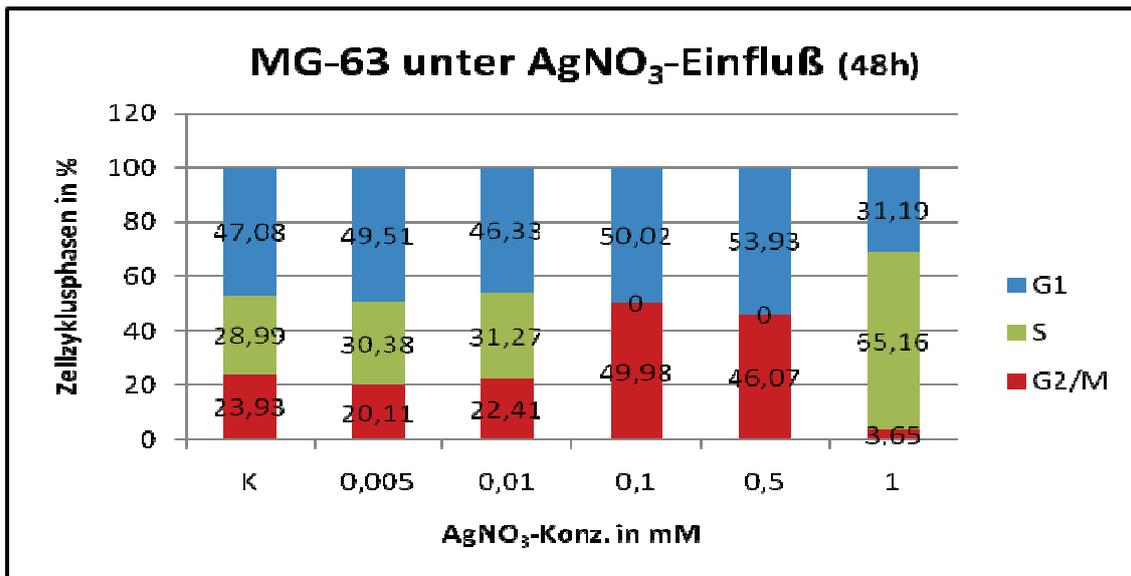


Abb. 68 FACS-Analyse: Einfluss von AgNO₃-Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 25. Passage, 10⁵ Zellen / 3ml / Well (6 Well-Platte), direkte Ein-saat

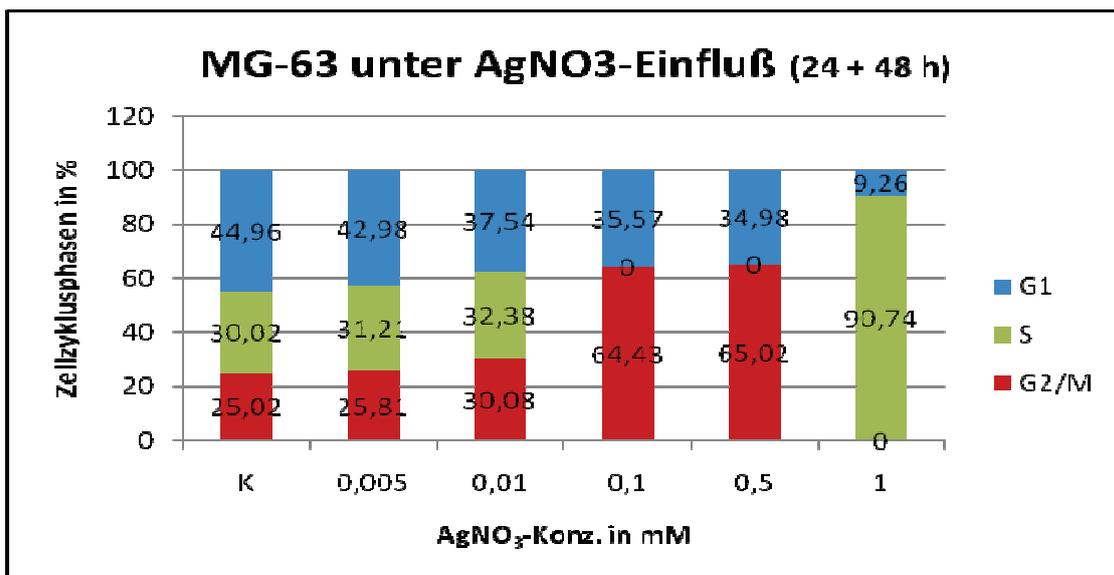


Abb. 69 FACS-Analyse: Einfluss von AgNO₃-Lösungen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 25. Passage (10⁵ Zellen / 3ml /Well (6 Well-Platte), indirekte Ein-saat

Die in den Abbildungen 68 und 69 dargestellten Ergebnisse für Silbernitratlösungen weisen bei Silberionen-Konzentrationen von > 0,1 mmol/l deutliche Veränderungen in den Zellzyklusphasen nach. Konzentrationen von 0,1 mmol/l sowie 0,5 mmol/l lassen keine Replikation, das heißt keine Verdopplung der Chromosomen (S-Phase) mehr zu. Diese Wirkung zeigt sich sowohl bei direkter

als auch bei indirekter Aussaat. Werden dem Zellkulturmedium Silberionen in einer Konzentration von 1 mmol/l zugesetzt, ist eine kurze Zellwachstumsphase mit Protein- und RNA-Synthese (G1-Phase), eine verlängerte Replikationsphase (S-Phase) aber keine G2/M Phase, also keine Verdopplung von Zellorganellen bzw. eine Mitosephase zu erkennen. Durch eine 24stündige Vorinkubation konnte somit keine Verbesserung der Ergebnisse erreicht werden.

4.2.2 Zytotoxizität von kupferbeschichteten Oberflächen

Auf Grund der in den Abbildungen 68 und 69 dargestellten Ergebnisse zur Zytotoxizität von Silbernitratlösungen wurden keine Zytotoxizitätsuntersuchungen an silberbeschichteten Proben durchgeführt, es wurde lediglich mit den in Tabelle 3, Kapitel 4.1.3, aufgeführten mit Kupfer beschichteten Probekörpern gearbeitet.

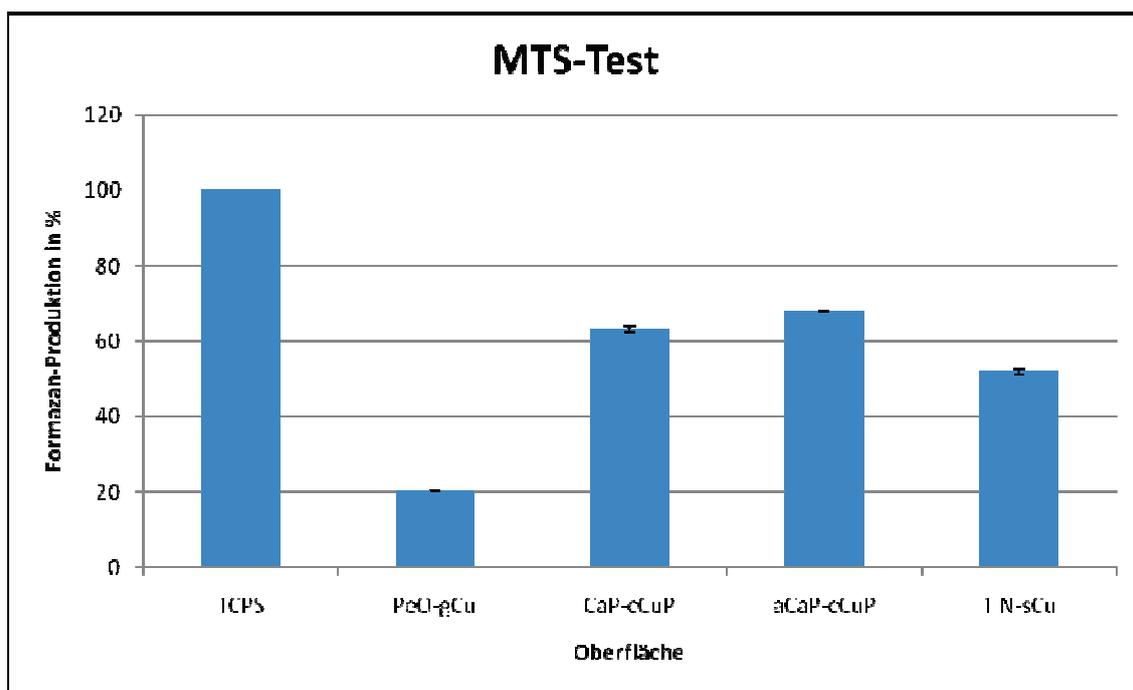


Abb. 70 MTS-Test: Einfluss von kupferbeschichteten Probekörpern auf MG-63/27.Passage, 10^5 Zellen / 2ml / Well (12-Well-Platte)

Der MTS -Test (Abb. 70) lässt erkennen, dass bei den (CaP-cCuP)- sowie bei den (äCaP-cCuP)-Proben eine, verglichen mit der Kontrolle (TCPS), knapp 70 %ige Formazanproduktion stattgefunden hat, das heißt, es liegen hier 70 % vitale Zellen vor. Durch den Einfluss der Kupferionen in den (TiN-sCu)-Proben wurden ca. 50 % und durch die Kupferionen in den (PeO-gCu)-Proben sogar

80 % der aufgebrauchten Zellen getötet. Verglichen mit der Kontrolle (TCPS) scheinen sowohl die (PEO-gCu)- und (CaP-cCuP)- als auch die (äCaP-cCuP)-

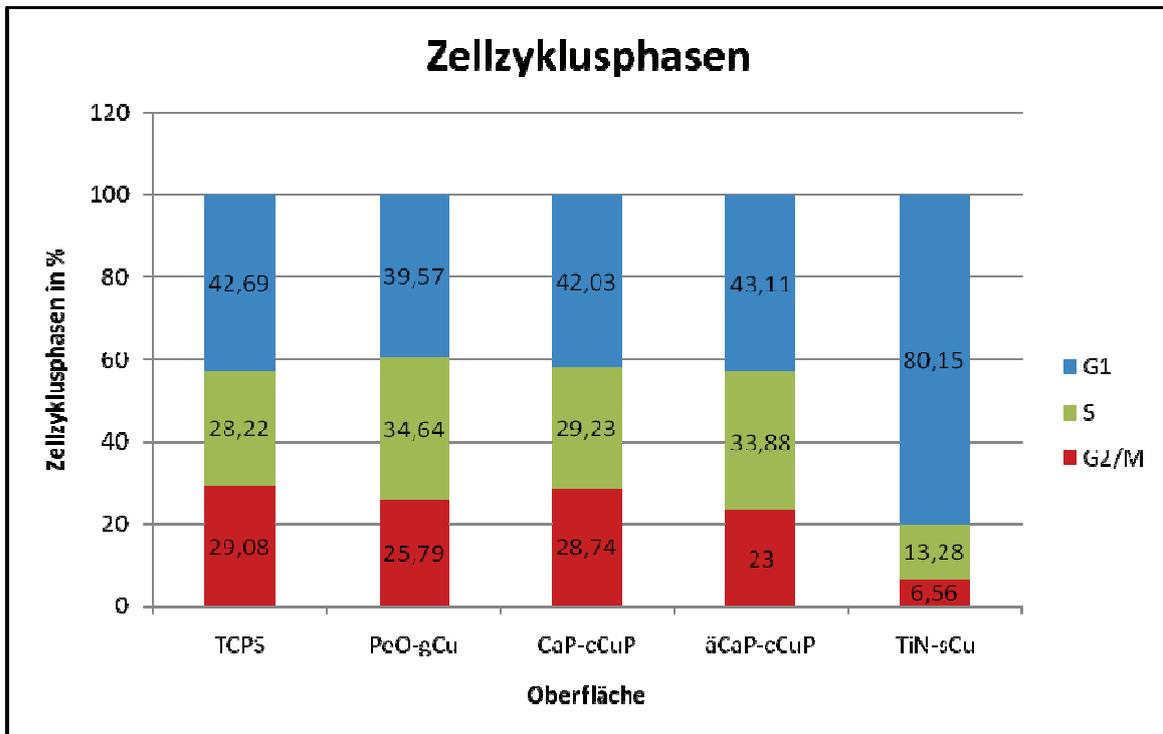


Abb. 71 FACS-Analyse: Einfluss von kupferbeschichteten Oberflächen auf die Zellzyklusphasen, MG-63/ 25. Passage, 10^5 Zellen / 2 ml / Well (12-Well-Platte)

Proben jedoch nur einen geringen Einfluss auf die Zellzyklusphasen der Zelle auszuüben (Abb. 71). Die (TiN-sCu)-Probe hingegen bewirkt eine Phasenverschiebung zu Gunsten der G1-Phase, während die S- und G2/M-Phasen kaum vorhanden sind.

4.3 *in vitro*-Untersuchungen zum Einfluss von Kupfer auf die Angiogenese

Neben der Testung auf Zytotoxizität wurden auch die Effekte von Kupfer auf die Signaltransduktion der Gefäßneubildung und der Entzündung untersucht. Für diese Versuche wurden, wie in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben, humane mikrovaskuläre Endothelzellen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass der direkte Kontakt zu (PeO-gCu)-beschichteten Titanprobekörpern keine zytotoxischen Effekte auf humane Endothelzellen bewirkte (Abb. 72). Wie auch im Kontakt zu Kontrolloberflächen beobachtet (Zellkultur-geeignete Glasoberflächen,

Abb. 72a), kam es auf den (PEO-gCu)-beschichteten Titanprobekörpern zur Ausbildung eines nahezu geschlossenen Monolayers (Abb. 72b-d).

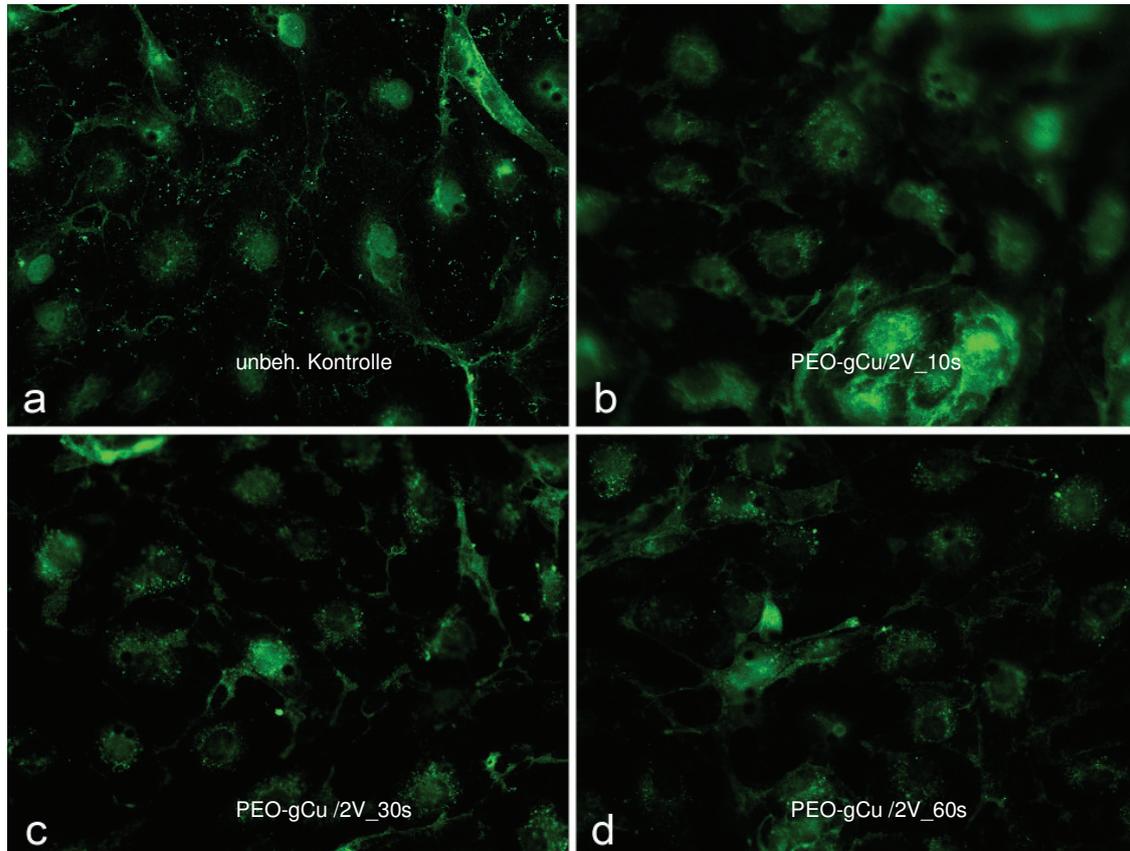


Abb. 72 Humane Endothelzellen im Kontakt zu a) Zellkultur-geeigneter Glasoberfläche, b) (PEO-gCu)-Beschichtung/2V_10s, c) (PEO-gCu)-Beschichtung/2V_30s und d) (PEO-gCu)-Beschichtung/2V_60s (Immunfluoreszenzmikroskopie, CD31-Färbung, 24 h Kontakt zur Oberfläche)

Es gab keinen Hinweis auf das Auftreten von Zelltod. Unterschiede der Zellreaktionen auf die unterschiedliche lange (10 s, 30 s, 60 s) beschichteten (PEO-gCu)-Titanprobekörper waren nicht zu erkennen. Jedoch deutete die Immunfärbung des CD31 (ein Protein des Interzellulärkontaktes) eine Aktivierung der Zellen im Kontakt zu (PEO-gCu)-beschichteten Titanprobekörpern an. Welcher Art diese Aktivierung ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Eine derartige Aktivierung kann sowohl in Bezug auf Gefäßneubildungsprozesse als auch in Bezug auf ein Entzündungsgeschehen eintreten. Die Gefäßneubildung lässt sich *in vitro* nachahmen. Dazu werden Endothelzellen in eine Matrix aus Typ I-Kollagen und Fibrin eingebettet. Diese Komponenten der extrazellulären Matrix kommen auch in einem Wundheilungsgewebe vor. Als wichtige

lösliche Faktoren bei Gefäßneubildungsprozessen (Vaskulogenese und Angiogenese) sind u.a. der Fibroblastenwachstumsfaktor bFGF (basic fibroblast growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor) und sein Rezeptor VEGFR2 sowie TGF β -1 (transforming growth factor) beteiligt (Cameliet, 2000) (Abb. 73).

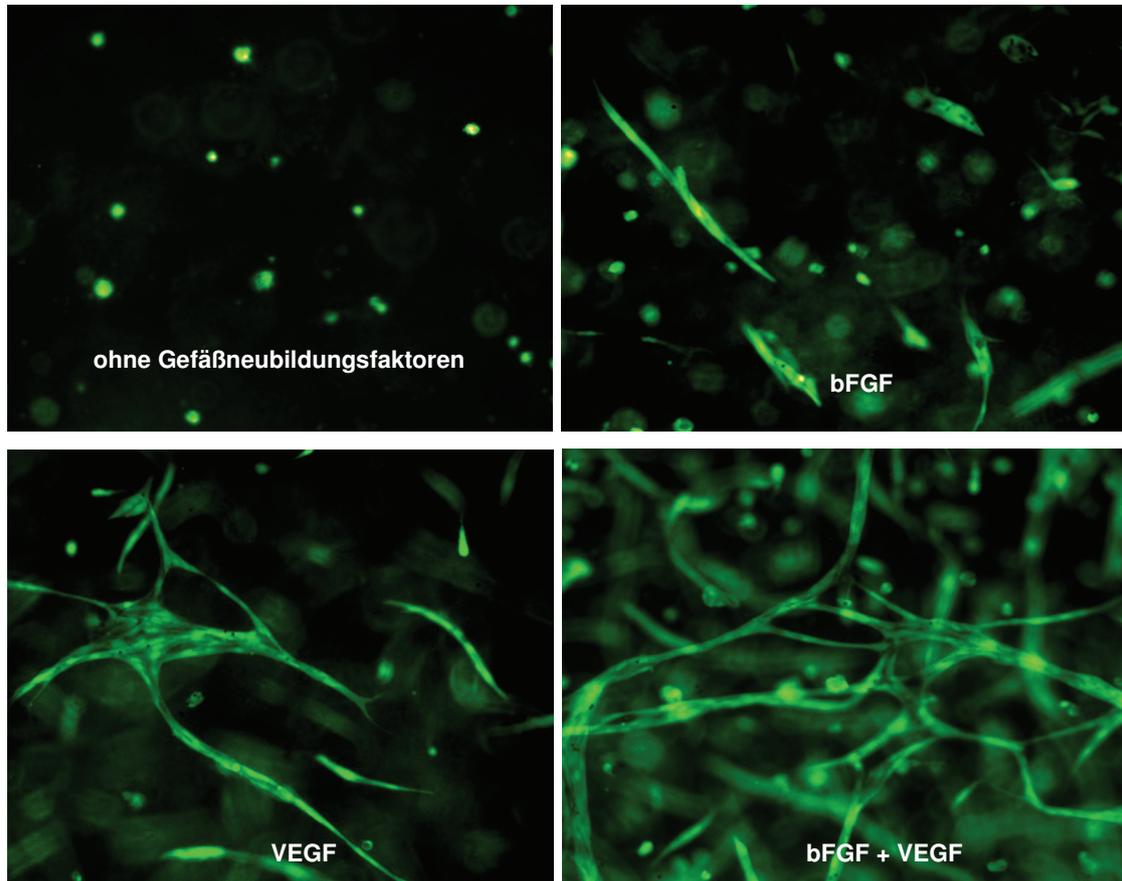


Abb. 73 *in vitro*-Modell zur Gefäßneubildung: Humane Endothelzellen eingebettet in ein Gel aus Typ I-Kollagen und Fibrin, Effekt verschiedener Gefäßneubildungsfaktoren (a: ohne Faktoren, b: mit bFGF (5 ng/ml Zellkulturmedium), c: mit VEGF (50 ng/ml Zellkulturmedium), d: bFGF+VEGF (Konzentrationen siehe b und c))

Die Gefäßneubildung kann im menschlichen Organismus durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) ausgelöst werden (Abb. 74). Entscheidend für die durch Hypoxie ausgelöste Signaltransduktion ist der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer-Faktor-1). Der Effekt von Kupfer auf die Gefäßneubildung wurde auf (PeO-gCu)-Proben untersucht. Für diesen Versuch wurden die Proben zum einen mit einer Kupfermenge von 1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ und zum anderen mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ beschichtet. Die Proben zu den Abbildungen 75c und f wurden über 4 Tage bei

täglichem Mediumwechsel mit Zellkulturmedium vorinkubiert. Eine Gefäßneubildung ist, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle, auf keiner der mit Kupfer beschichteten Proben erkennbar.

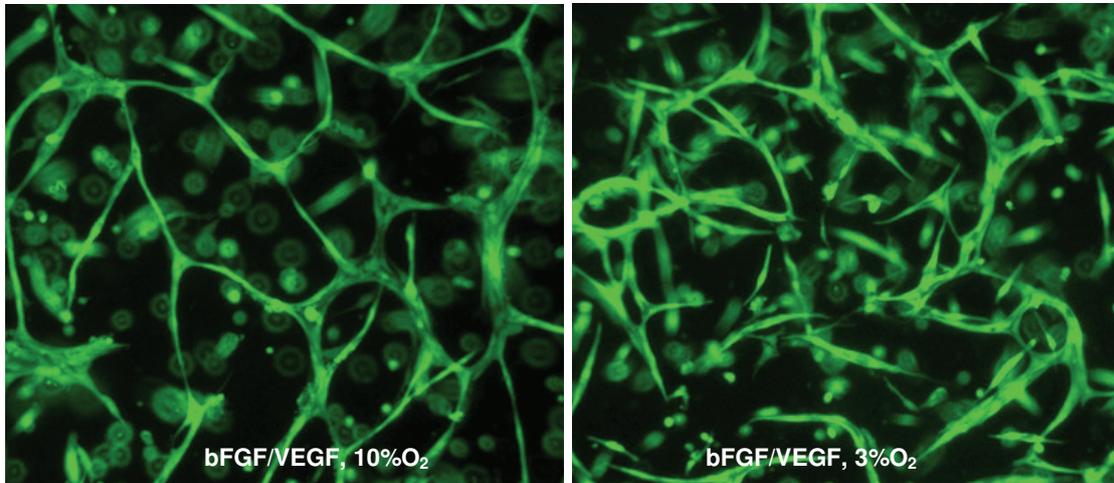


Abb. 74 Einfluss des Sauerstoffmangels (Hypoxie)

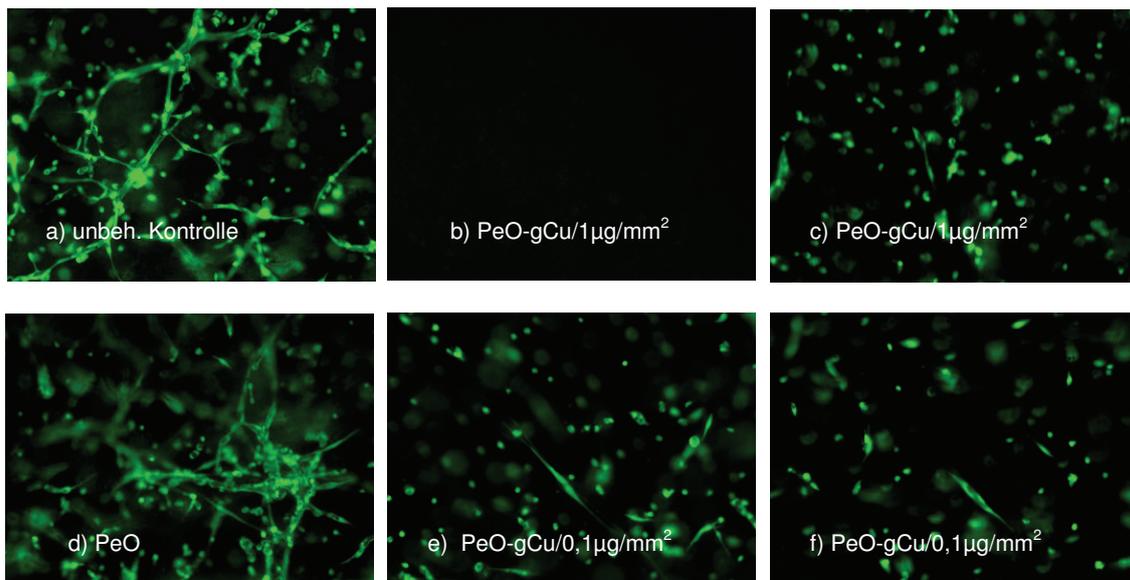


Abb. 75 *in vitro* Effekt von (PeO-gCu)-Proben auf die Gefäßneubildung nach 5tägiger Stimulation mit Gefäßneubildungsfaktoren: a) unbehandelte Kontrolle, b und e) (PeO-gCu)-Proben ohne Vorinkubation, c und f) (PeO-gCu)-Proben mit Vorinkubation, d) (PeO)-Probe, ohne Kupfer

Die Abbildungen lassen damit, im Vergleich zur kupferfreien (PeO)-Probe, eine Inhibierung der Gefäßneubildung durch Kupfer vermuten. Die Verwendung von vorinkubierten bzw. geringer konzentrierten Kupferproben lässt jedoch zumindest einige vitale Zellen erkennen (Abb. 75a-f).

5 Diskussion

5.1 Einfluss von Kupfer- und Silberlösungen auf Bakterien und Zellen

Die zunehmende Resistenz von Bakterien gegen Antibiotika hat auch in der Tier- und Humanmedizin zu einer Renaissance klassischer antibakterieller Varianten mittels Kupfer- bzw. Silberionen geführt. Wichtig für die Verwendung von Kupfer und Silber als Schutz gegen eine bakterielle Besiedelung von Implantaten ist aber auch deren Wirkung auf die das Implantat umgebenden und damit im direkten Kontakt stehenden Körperzellen.

Die in der Literatur vielfach beschriebene antibakterielle Wirksamkeit von Silber- und Kupferionen wurde zunächst an Silber- und Kupfersalzlösungen geprüft. Bei der Verwendung einer 20 mg/l konzentrierten Silbernitratlösung konnte festgestellt werden (Kap. 4.1.1), dass bereits nach 2 Stunden Einwirkzeit die Bakterienvermehrung komplett inhibiert wird. In Kupfersulfat- und Kupferchloridlösungen wird diese Wirkung unter sonst gleichen Bedingungen erst nach 8 Stunden erzielt. Entscheidend für die Beurteilung dieser Resultate ist die Positivkontrolle. Aus der Abb. 16 ist zu erkennen, dass die Lebensfähigkeit der verwendeten Bakterien bereits eingeschränkt war. Von den eingesetzten 10^6 KBE/ml konnten nur 10^4 KBE/ml in die quantitative Betrachtung einbezogen werden. Ist die Bakterienkultur, wie in Abb. 17 dargestellt, wesentlich lebensfähiger, so kann die hohe Ausgangskonzentration von 5×10^7 KBE/ml bis auf die Anpassungsphase als Referenzwert angenommen werden, d.h. eine Silberkonzentration von 20 mg/l führt bei dieser hohen Bakterienkonzentration erst nach 6 Stunden zur völligen Einstellung der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien. Die quantitativ unterschiedlichen antibakteriellen Effekte von Silber und Kupfer werden auch aus einem Vergleich der Abbildungen 17 und 18 deutlich. Während für Silber eine Konzentration von 10 mg/l ausreicht, um nach 24 h keine lebensfähigen Bakterien mehr nachweisen zu können, ist für die gleiche Konzentration bei Kupfer nur eine vergleichsweise geringfügige Abnahme der Bakterienvermehrung um 2 Größenordnungen zu verzeichnen.

Neben der im Vergleich zu Kupfer höheren antibakteriellen Wirksamkeit von Silberionen wurde jedoch festgestellt (Kap. 4.2.1), dass Silberkonzentrationen

von nur 10 $\mu\text{mol/l}$ (1,08 mg/l) bereits zelltoxische Wirkungen auslösen (Abb. 65). Die Anzahl vitaler Zellen reduzierte sich in einer Silbernitratlösung dieser Konzentration um 40 %. Steigen die Silberkonzentrationen auf 100 $\mu\text{mol/l}$ (10,8 mg/l) an, werden zusätzlich alle Zellteilungsprozesse erheblich gestört (Abb. 68). Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben aus der Literatur. Hier werden Konzentrationen von größer als 380 $\mu\text{g/l}$ Silberionen bereits als zytotoxisch bezeichnet (HEIDENAU et al. 2005).

Die bereits bei derart geringen Konzentrationen beobachtete Zelltoxizität von Silberionen korrespondiert damit, dass Silber im Stoffwechsel der Zelle keine Rolle spielt, es gehört nicht zu den so genannten essentiellen Spurenelementen im menschlichen Organismus. Die Einnahme von niedrigen Dosen Silber wie auch ein über längere Zeit stattfindendes Release aus Silberoberflächen kann zu dauerhaften Zellschädigungen führen. Die WHO empfiehlt, pro Tag nicht mehr als 180 μg Silber zu konsumieren (GIBBIS & WARNER 2005). Auf Grund dessen und auch auf Grund der Ergebnisse der durchgeführten Zellversuche mit Silbernitrat-Lösungen wurde im Weiteren auf Versuche mit silberbeschichteten Oberflächen weitgehend verzichtet.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Verwendung von Kupfersulfatlösung gezeigt werden, dass bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ (3,18 mg/l) bis 100 $\mu\text{mol/l}$ (6,36 mg/l) kaum Zellschäden oder Verschiebungen der Zellzyklusphasen eintreten. Erst Kupferkonzentrationen von 500 $\mu\text{mol/l}$ (31,8 mg/l) stören den Zellzyklus und reduzieren die Anzahl vitaler Zellen auf die Hälfte der eingesetzten Menge (Abbn. 64 und 66). Demgegenüber reicht eine Konzentration von 315 $\mu\text{mol/l}$ (20 mg/l) aus, um eine vollständige antibakterielle Wirkung gegenüber *Staphylococcus aureus* auch bei sehr hohen Bakterienkonzentrationen in kurzer Zeit zu erreichen (Abb. 16). Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungsergebnissen aus der Literatur (HEIDENAU et al. 2005).

Obwohl die bakterizide Wirkung beider Ionensorten auf dem gleichen Mechanismus beruht, zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass bei der Verwendung von Kupferionen höhere Konzentrationen sowie längere Einwirkzeiten als bei Silberionen notwendig sind. Sowohl Silber- als auch Kupferionen binden an SH-Gruppen (Thiolgruppen) von Proteinen und peroxidieren die Lipide der Zell-

membran, dies führt zur Bildung von DNA-schädigenden freien Radikalen (DAN et al. 2009). Für die geringere Schädigung durch Kupferionen spielt möglicherweise die Einbindung des Kupfers in oxidations- und reduktionsaktive Enzyme eine Rolle. Das Redoxverhalten von Kupfer ist eng mit dem Transport- und Homöostase-Gleichgewicht verknüpft (VILCHEZ et al. 2007): In aeroben Umgebungen wie im Extrazellulärraum von Bakterien liegt es als zweiwertiges Kupfer vor. Im Intrazellulärraum wurde Kupfer nur in der Form von Cu^+ , das heißt also einwertig gefunden. Es ist nicht bekannt, wann die Reduktion zum Cu^+ stattfindet, ob an der Zellwand, während des Transportes zur Zellmembran oder während des Eindringens in Zelle (SILVER & PHUNG 2005). Es gilt jedoch als erwiesen, dass das Kupfer im Intrazellulärraum ausschließlich als einwertiges Ion vorliegt. Das bei dem Übergang in die Zelle zu Cu^+ reduzierte Kupfer wirkt dabei toxisch, Makromoleküle werden zerstört und die Bakterienzelle stirbt ab (VILCHEZ et al. 2007). Die Zeitkonstante für die Reduktion des Kupfers von Cu^{2+} zu Cu^+ könnte ein Hinweis sowohl auf die benötigte höhere Konzentration als auch für die Verlängerung der Wirkphase gegenüber Silber sein (SILVER & PHUNG 2005).

Dass Kupfer auf Gewebezellen weniger toxisch wirkt als auf Bakterienzellen, liegt vermutlich daran, dass Kupfer für Gewebezellen essentiell ist. Diese Zellen nehmen Kupfer über Kupferrezeptoren wie den Kupfertransporter Ctr 1 (copper transporter 1) auf. Kupfer wird an so genannte Metallochaperone gebunden und so an spezifische Biosynthesewege weitergeleitet (SIEGENTHALER & BLUM 2006). Es liegt intrazellulär deshalb nicht in freier Form vor. Etwa 80 bis 95 % des Kupfers liegen in Form von Cu-Coeruloplasmin vor. Coeruloplasmin bindet dabei acht Kupferatome pro Molekül (RAPOPORT 1987). Die Kupferdetoxifikation bzw. Regulierung der intrazellulären Kupferkonzentration erfolgt dabei durch P-Typ-ATPasen. Sie transportieren das Kupfer in das Trans-Golgi-Netzwerk und somit in den sekretorischen Apparat der Zelle und sorgen so für ein Gleichgewicht zwischen Kupferaufnahme und Kupferabgabe (SIEGENTHALER & BLUM 2006).

Kupfer ist deshalb im Vergleich zu vielen anderen Schwermetallen für höhere Organismen nur relativ schwach giftig. So kann der Mensch täglich 40 mg Kupfer zu sich nehmen, ohne Schaden an seiner Gesundheit zu erleiden. Kupfer ist

als Bestandteil vieler Enzyme ein lebensnotwendiges Spurenelement und mit einem Gesamtbestand an gebundenem Kupfer von ca. 100 mg das zweithäufigste im menschlichen Körper (SUSKA 2004). Kupfer trägt in unserem Körper entscheidend zum Wachstum und zur Knochenneubildung bei und ist außerdem an der Freisetzung bestimmter Hormone der Hirnanhangsdrüse beteiligt. Aber nicht nur das Wachstum, die Abwehrfunktion, die Entwicklung des Gehirns sowie die Synthese von neuroaktiven Peptidhormonen (Kathecholaminen und Enkephalinen) brauchen die Mitwirkung von Kupfer. Bekannt ist auch, dass die adäquate Kupferversorgung für den normalen Eisenstoffwechsel und die Bildung von Erythrozyten nötig ist. Das Plasmaprotein Coeruloplasmin ist auch hier von besonderer Bedeutung, es weist sowohl eine Enzymfunktion als auch eine spezifische Bindungs- und Transportfunktion für Kupfer auf. Sehr wahrscheinlich übernimmt Kupfer in Form von Cu-Coeruloplasmin die wichtigste Transportfunktion für Eisen im Knochenmark. Das im Plasma an Coeruloplasmin gebundene Kupfer wird bedarfsgerecht im Organismus an verschiedene Organe und an das Gewebe verteilt. (RAPOPORT 1987; <http://www.vitalstofflexikon.de> 2009).

Kupfer ist zudem an zahlreichen körpereigenen Redox-Reaktionen sowie an der Hämoglobinsynthese beteiligt. Die Kupferaufnahme- und -ausscheidung halten sich, wie bereits erwähnt, normalerweise die Balance. Die Leber spielt dabei eine zentrale Rolle, hier wird Kupfer gespeichert und die Kupferausscheidung reguliert. Diese für die Zelle physiologischen Vorgänge tragen somit zur Verträglichkeit gegenüber Kupfer bei (SIEGENTHALER & BLUM 2006). Kommt es aber, wie es bei *in vitro* Versuchen der Fall ist, zur Überlastung der physiologischen Regelmechanismen und somit zur Störung der Balance, kann Kupfer, wie gezeigt, oberhalb bestimmter Konzentrationen toxisch wirken (Kap. 4.2.1, Abb. 66).

5.2 Antibakterielle Optimierung von Implantatoberflächen

Die Untersuchungen zur Entwicklung bakterizid wirkender Beschichtungen für Implantate orientierten sich an der in Lösungen ermittelten antibakteriell wirkenden Kupferkonzentration (Kap. 5.1). Das Ziel bestand darin, diese Konzentration in verschiedenen Medien *in vitro* zu erreichen, wobei die strukturellen Ein-

flüsse unterschiedlicher Beschichtungsarten und Methoden des Kupfereinbaus sowie die Abhängigkeit vom verwendeten Medium untersucht wurden.

5.2.1 Ionenfreisetzung

Bei diesen Untersuchungen wurde die Ionenfreisetzung in Bezug auf die Art des verwendeten Mediums, die Häufigkeit des Mediumwechsels sowie hinsichtlich der Beschichtungsart studiert.

5.2.1.1 Art des verwendeten Mediums

5.2.1.1.1 PBS-Pufferlösung

Zunächst wurde die Ionenfreisetzung aus einer reinen Kupferronde in Tris- und PBS-Puffer untersucht. Während unter den gewählten konstanten Versuchsbedingungen die Elution der reinen Kupferronde in Tris-Puffer durchschnittlich Kupferkonzentrationen von 2,55 g/l bzw. 40 mmol/l pro Tag lieferte, wurden aus

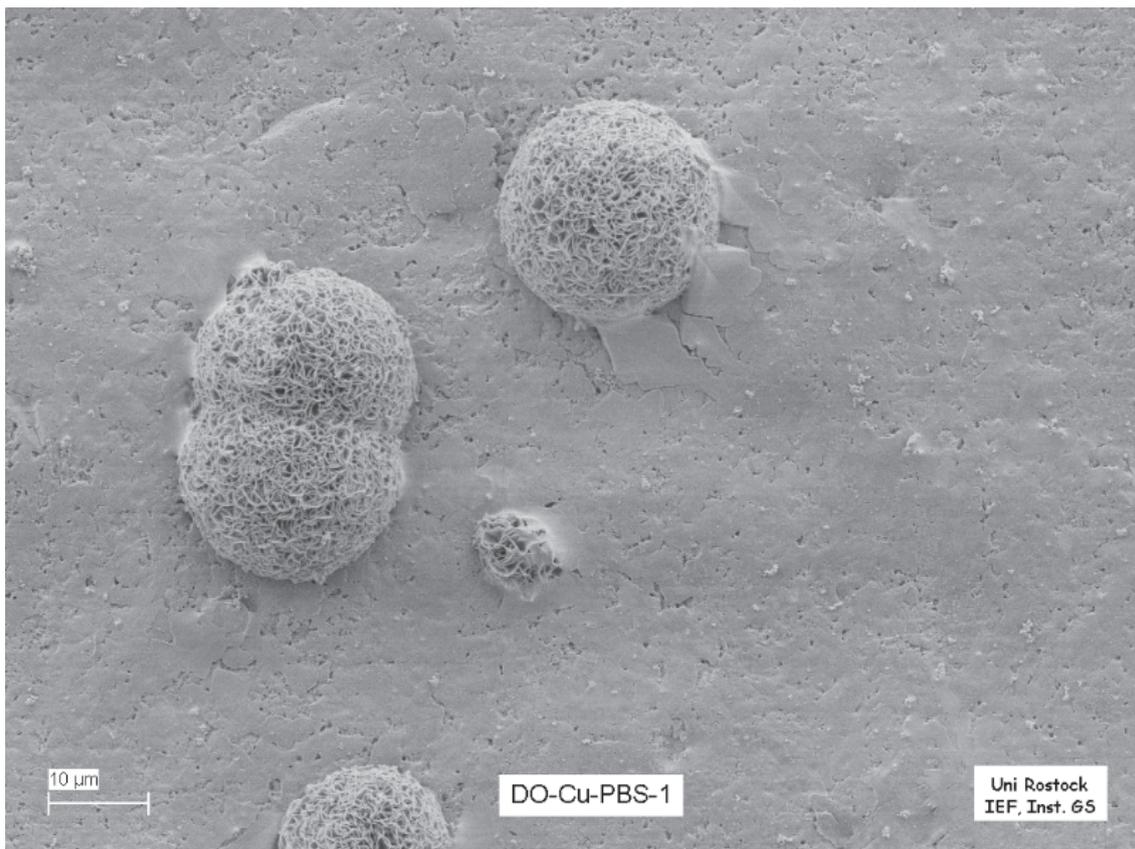


Abb. 76 Mit Kupfer beschichtete Titanoberfläche, in PBS-Puffer eluiert

der gleichen Probe in PBS-Puffer lediglich $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{100}$ dieser Konzentration freigesetzt (Abbn. 19 und 20). Die Ursache für diese geringe Kupferelution in PBS-

Puffer ist die eintretende Passivierung der Kupferoberfläche durch Ausfällung von schwerer löslichen Kupferphosphaten aus der PBS-Pufferlösung. Im PBS-Puffer sind, anders als im Tris-Puffer, durch Dissoziationsprozesse freie bindungsfähige Phosphationen vorhanden. Eluieren in einem mit Phosphaten angereicherten Medium geringe Mengen Kupfer aus einer Kupfer- bzw. mit Kupfer beschichteten Oberfläche, so können sich auf dieser in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen 2- oder 3-dimensional strukturierte, schwer lösliche Kupferphosphat-Dihydrat-Komplexe bilden (WU et al. 2005), die u.a. als pustelblumenähnliche Gebilde auf der Oberfläche sichtbar werden (Abb. 76). Dieser Effekt führte bei allen kupferbeschichteten Proben zur Passivierung der Oberfläche. Die in PBS-Puffer freigesetzte Kupfermenge war demzufolge gering.

5.2.1.1.2 LB-Nährbouillon, Zellkulturmedium und Humanplasma

Bei der Verwendung von LB-Nährbouillon, Zellkulturmedium und auch Humanplasma wurde, verglichen mit der Freisetzung in PBS-Puffer-Lösung, etwa die 3 bis 5fache Kupferkonzentration freigesetzt (Kap. 4.1.4, Abb. 52). Bei diesen 3 Medien handelt es sich um eiweißhaltige Lösungen. Diese enthalten zusätzlich zu den komplexbildenden Ionen zahlreiche Proteine, die Kupferionen in Form schwer löslicher Kupfer-Proteinkomplexe binden. Das führt dazu, dass ständig weitere Ionen aus der Oberfläche nachgelöst werden. Eine Übersättigung des Mediums mit Kupferionen und das daraus resultierende Ausfällen von Komplexsalzen sowie eine Passivierung der Oberfläche, wie es im PBS-Puffer beobachtet werden konnte, bleiben aus. Auf Grund dessen wurde bei der Verwendung dieser Medien innerhalb eines Tages fast die gesamte eingebrachte Kupfermenge freigesetzt. Ähnliche Erfahrungen wurden von WATAHA et al (2000) mitgeteilt: Bei der Untersuchung des Releasevermögens von Kupferoberflächen in NaCl-Lösung, in NaCl-Lösung mit 3 % Rinderserumalbumin sowie in Zellkulturmedium wurde die größte Kupferfreisetzung in der NaCl-Lösung mit 3 % Rinderserumalbumin festgestellt.

5.2.1.1.3 Häufigkeit des Mediumwechsels

Für die im PBS-Puffer eintretende Passivierung der Oberflächen wurde der zeitliche Ablauf dieses Prozesses untersucht. Dazu wurde ein stündlicher Mediumwechsel vorgenommen. Es konnte festgestellt werden, dass die Passivierung

kontinuierlich verläuft und von der Häufigkeit des Mediumwechsels abhängt. Erfolgt der Wechsel des PBS-Puffers stündlich, können in der Summe nach 24 h mehr Kupferionen freigesetzt werden als bei einer Inkubation von insgesamt 24 h ohne Mediumwechsel (Abbn. 77 und 78). Es wird deutlich, dass durch häufigen Mediumwechsel eine Übersättigung der Lösung mit Kupferphosphat hinausgezögert bzw. verhindert werden kann.

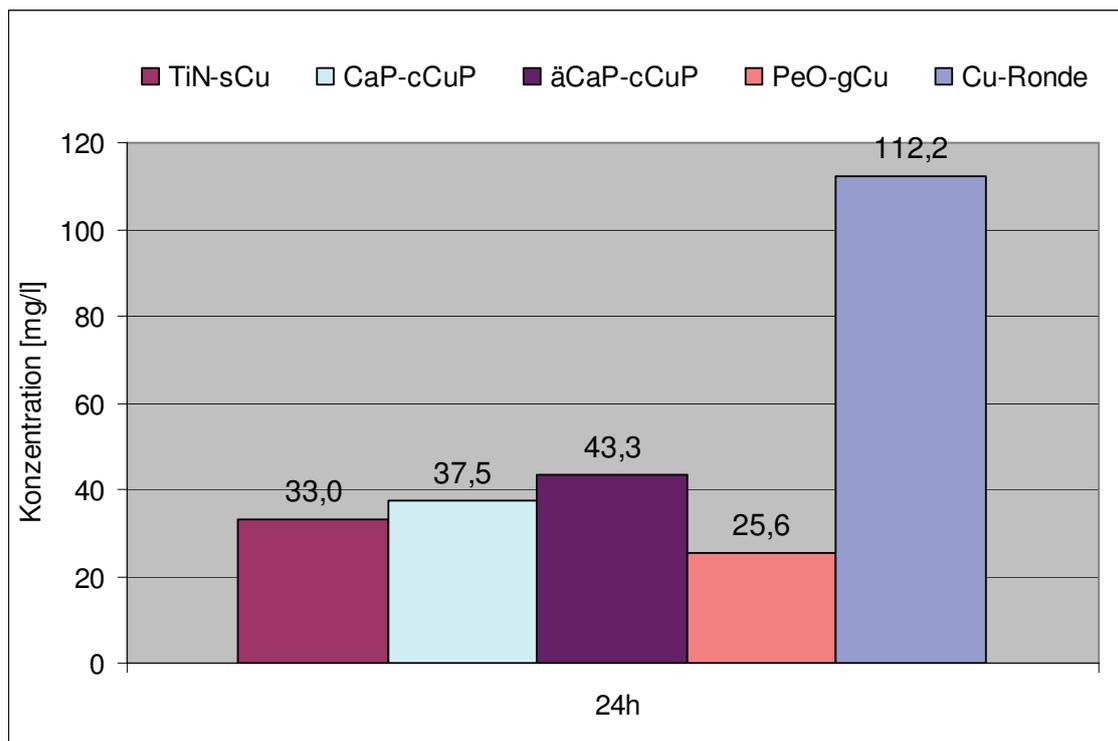


Abb. 77 Kumulierte Kupferfreisetzung aus verschiedenen Beschichtungen in PBS-Puffer bei stündlichem Mediumwechsel nach 24 Stunden

Am deutlichsten ist die durch Übersättigung verursachte Ausfällung von Kupferphosphaten bei den (PeO-gCu)-Proben zu erkennen. Während im Elutionsmedium PBS-Puffer nach 24 Stunden nur eine sehr geringe Menge Kupfer von 1,8 mg/l nachzuweisen ist, wird bei stündlichem Mediumwechsel nach 24 Stunden kumulativ eine Cu-Konzentration von 25,6 mg/l erreicht (Abbn. 27 und 31). Diese Konzentration ist ausreichend, die Bakterienvermehrung wie beobachtet völlig zu unterbinden. Somit ist der stündliche Wechsel des Elutionsmediums gut als Modellfall für die Anwesenheit von Bakterien geeignet, weil die Bakterien stetig Kupfer aufnehmen, womit die Cu-Konzentration im Elutionsmedium gering gehalten und ein Ausfällen von Kupferphosphaten verzögert wird, bis die

Kupferaufnahme der Bakterien durch Erreichen der toxischen Konzentration beendet ist.

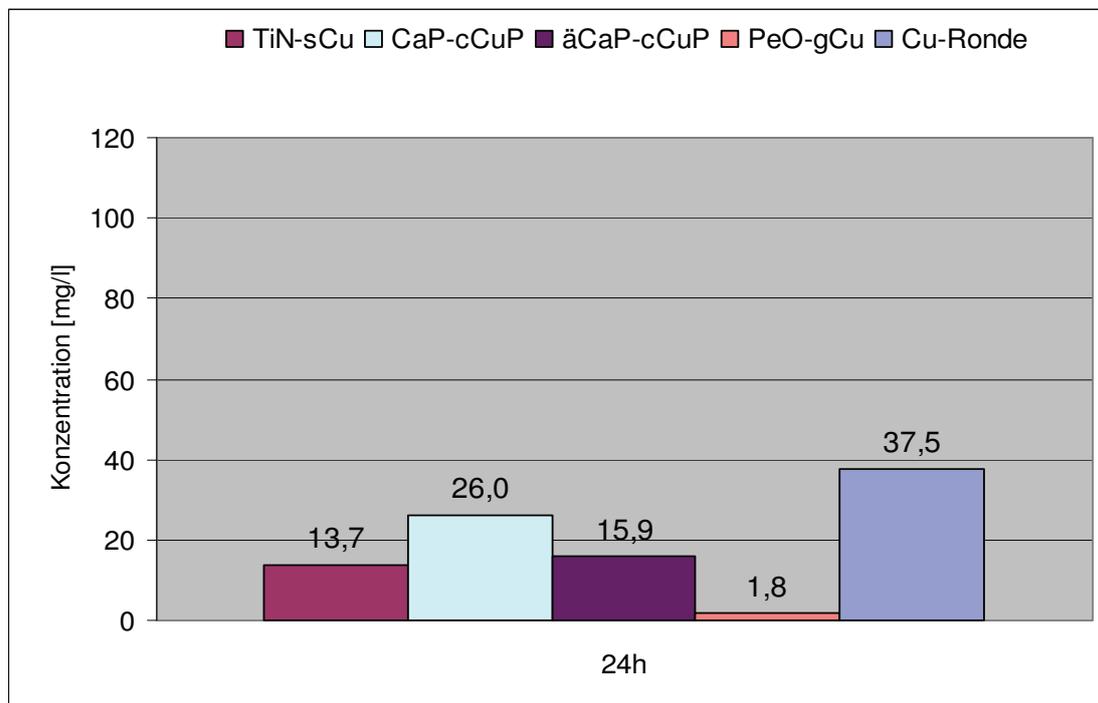


Abb. 78 Kupferfreisetzung aus verschiedenen Beschichtungen in PBS-Puffer nach 24 Stunden ohne Mediumwechsel

5.2.1.2 Art der Beschichtung

Die galvanisch abgeschiedenen inselartigen Kupferschichten (PeO-gCu) können durch die Modifizierung des Herstellungsprozesses, wie z.B. das abschließende Glaskugelstrahlen, leicht auf die antibakteriell erforderliche Menge eingestellt werden. Wie beispielhaft in Abb. 77 dargestellt, kann durch die Insel-schicht, verglichen mit der massiven Ronde, die Kupferelution auf $\frac{1}{4}$ reduziert werden, weil offenbar die eluierende Oberfläche in gleichem Maße reduziert wurde.

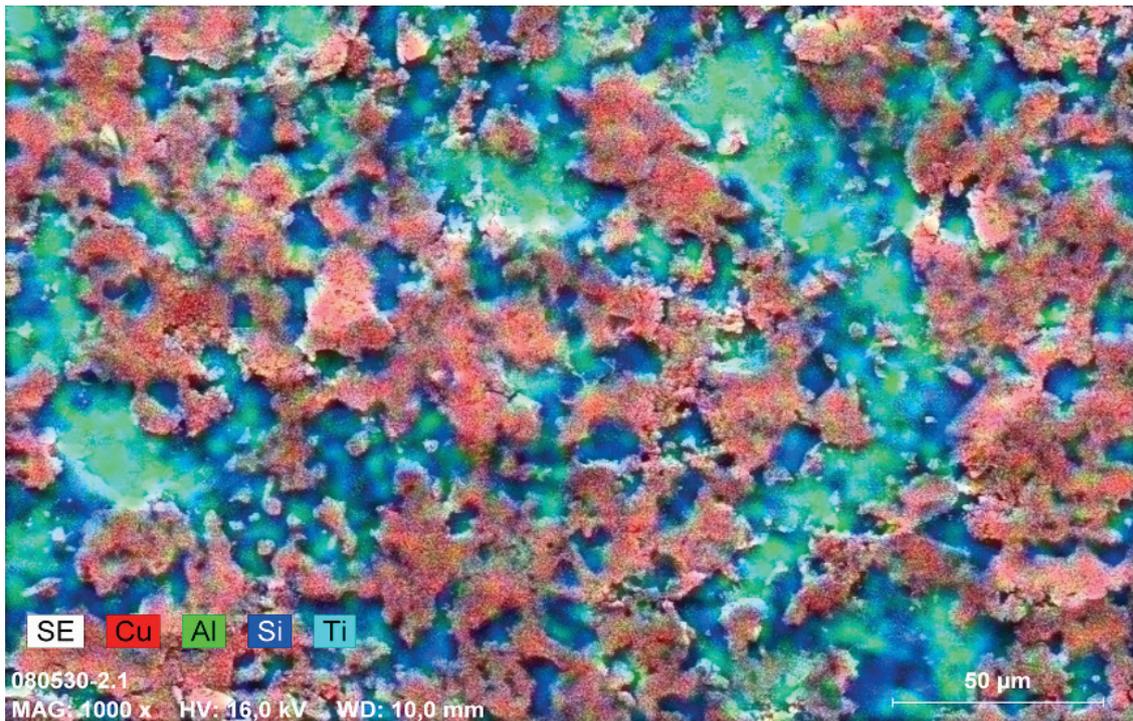


Abb. 79 EDX-Mapping einer (PeO-gCu)-Schicht nach kurzem Glaskugelstrahlen

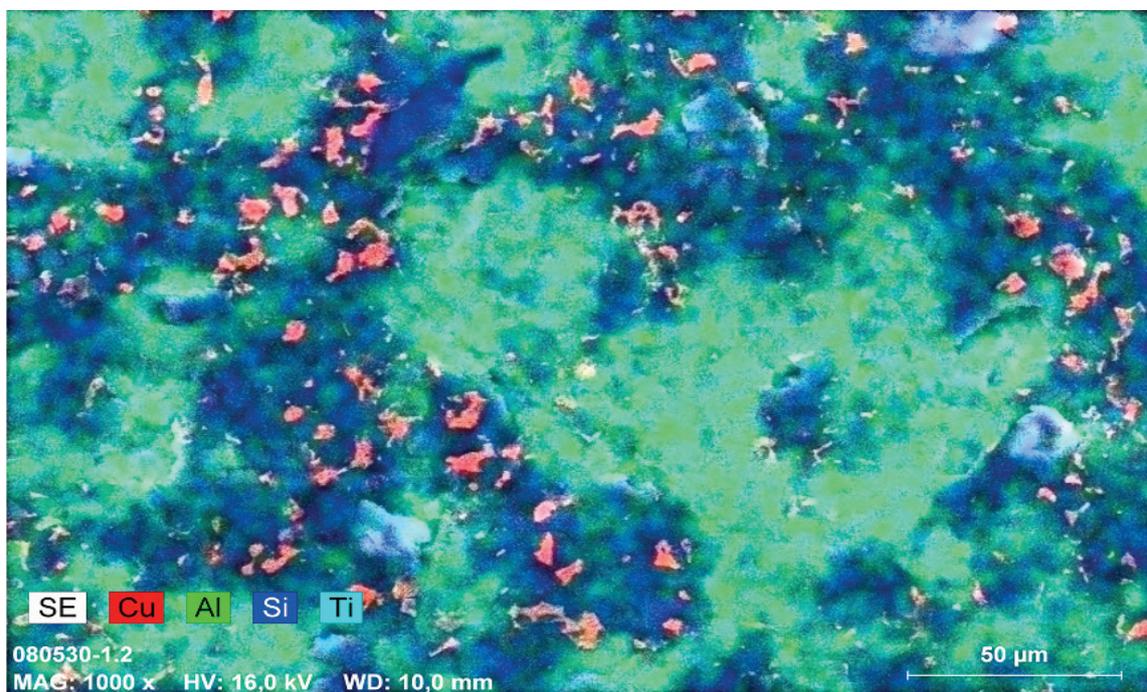


Abb. 80 EDX-Mapping einer (PeO-gCu)-Schicht nach längerem Glaskugelstrahlen

Bei den (CaP-cCuP)-Schichten ist bereits nach 2 Stunden, abhängig vom Elutionsmedium, nahezu die gesamte Kupfermenge eluiert (Abb. 43, Kap. 4.1.2.2.3).

Bei den (TiN-sCu)-Schichten war das Kupfer sandwichartig in die TiN-Schicht eingebaut und daher mit dem Elutionsmedium nur über Poren in der abdeckenden TiN-Schicht verbunden. Auf diese Weise ließen sich größere Kupfermengen mit eingeschränkter Elution auf der Probenoberfläche deponieren.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Struktur der Schicht und damit die Art des Kupfereinbaus für die Freisetzung des Kupfers wesentlich ist. Hinzu kommt, dass sowohl die Releasedauer als auch die Releasekonzentration stark von dem verwendeten Medium sowie von der Häufigkeit des Mediumwechsels abhängen. Die konkreten Kenntnisse der in dieser Arbeit untersuchten Zusammenhänge sind entscheidende Kriterien bei der Auswahl sowohl der jeweiligen Beschichtungsart als auch der Analytik für die Charakterisierung des Elutionsverhaltens.

5.2.2 Bakterienhemmung und Zellstimulation

Trotz des unterschiedlichen Releaseverhaltens der verschiedenen Proben konnte für die Kupferfreisetzung im PBS-Puffer eine sehr gute antibakterielle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten WAN et al. (2007). Bei verschiedenen Oberflächenmodifikationen, die mit annähernd gleichen Kupfermengen beschichtet worden waren, wurden trotz unterschiedlicher Freisetzungskinetik gleichermaßen die Bakterien inhibierende Effekte festgestellt (Kap.4.1.2). Während WAN et al. davon ausgehen, dass die kritischen antibakteriell wirkenden Konzentrationen lediglich auf die Materialzusammensetzung zurückzuführen sind, konnte mit der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass nicht nur die Art der Beschichtung, sondern vielmehr die Anwesenheit von Bakterien selbst dafür verantwortlich ist. Durch die Messung der Kupferkonzentration in dem mit Bakterien angereicherten PBS-Puffer über den mit Kupfer beschichteten Proben konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass alle strukturell verschiedenen Oberflächen bei Anwesenheit von Bakterien eine Kupfermenge von ca. 20 mg/l freisetzen (Abbn. 60 und 61, Kap.

4.1.3). Diese Konzentration deckt sich mit der ermittelten bakteriziden Kupferkonzentration (Abb. 18, Kap. 4.1.1).

Am Beispiel der (PeO-gCu)-Proben konnte sogar nachgewiesen werden, dass dieser Effekt bei erneuter Zugabe einer frischen Bakteriensuspension wiederholt auftritt: Es wurde abermals eine Kupferkonzentration von ca. 20 mg/l freigesetzt, welche wiederum zum Absterben der eingesetzten Bakterien führte (Abb. 62 und 63, Kap. 4.1.3). Dabei nehmen die Bakterien genau so viel Kupfer auf, bis eine für sie toxische Dosis erreicht ist. VILCHEZ et al. (2007) beschreiben, dass dieses Phänomen zur Entfernung von Kupfer aus Grundwasser verwendet werden kann. Die Autoren bezeichnen diesen Prozess als Bioakkumulation, bei dem es sowohl auf das Metallion als auch auf die Mikroorganismen ankommt. Dieser Mechanismus wird allein dadurch begrenzt, dass jeweils neue Kupferionen zur Verfügung stehen müssen. Wird nämlich an Stelle einer mit Kupfer beschichteten Probe eine Kupferionenlösung mit fester Konzentration von 20 mg/l verwendet, kann der beschriebene, sich wiederholende bakterizide Effekt nicht beobachtet werden. Die zunächst eingebrachten Bakterien wurden wie erwartet nach 24 h an ihrer Vermehrung gehindert. Die erneute Beimpfung dieser Kupferlösung mit Bakterien zeigte keine wesentlichen, die Bakterien inhibierenden Eigenschaften (Abb. 62 und 63, Kap. 4.1.3). Die Bestimmung der Kupferkonzentration ergab zu jedem Analysezeitpunkt die eingebrachte Kupferkonzentration von 20 mg/l.

Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine Neuinfektion mit Bakterien verhindert wird, solange Kupfer aus einer Oberfläche mit Konzentrationen von ca. 20 mg/l an das Medium abgegeben werden kann. Sinken diese Konzentrationen unter 20 mg/l, ist zumindest eine Bakterienhemmung möglich. Diese Ergebnisse wurden in Versuchen mit reinem PBS-Puffer als Elutionsmedium erzielt, jedoch lassen die in Abbildung 58 dargestellten Ergebnisse darauf schließen, dass dieses Phänomen auch bei zusätzlicher Verwendung von Humanplasma auftritt. Unabhängig von der Art der Beschichtung wurden ähnliche bakterizide Wirkungen gegenüber planktonischen Bakterien erzielt. Für Zellkulturmedium und LB-Nährbouillon scheint das hingegen nicht in dem Maße zuzutreffen (Abb. 54).

Die durchgeführten Release-Untersuchungen in der LB-Bouillon und im Zellkulturmedium ergaben, im Gegensatz zum PBS-Puffer, nach 24 Stunden ein Vielfaches der Kupferkonzentration. Resultierend aus diesen Ergebnissen wurde erwartet, dass der durch das Zellkulturmedium bzw. durch die LB-Nährbouillon freigesetzte hohe Kupferanteil eine deutliche antibakterielle Wirkung zeigt. Die dazu durchgeführten Versuche ergaben jedoch, verglichen mit den Untersuchungen in PBS-Puffer-Lösung, keine bzw. nur eine sehr geringe antibakterielle Wirksamkeit (Kap. 4.1.3). Diese überraschenden Resultate lassen sich dahingehend diskutieren, dass auf Grund der bereits beschriebenen für Kupfer bindungsfähigen Proteine in diesen Lösungen vermutlich der Anteil freier bakterienwirksamer Kupferionen in der Lösung abnimmt. Die an Proteine gebundenen Kupferionen zeigen eine nur geringe antibakterielle Wirkung. Lediglich die in hochporöse Calciumphosphat-Schichten eingelagerten, leicht freisetzbaren Kupferionen (CaP-cCuP) zeigten im Zellkulturmedium gute bis sehr gute antibakterielle Eigenschaften.

Eine deutlich bessere Wirksamkeit gegenüber Bakterien war für alle Schichten bei der Verwendung von Humanplasma als Medium zu beobachten. Obwohl das Releaseverhalten in Humanplasma demjenigen in Zellkulturmedium und in LB-Nährbouillon ähnlich ist, ergab die vergleichende Messung von einerseits der Kupferionen-Konzentration über die Photometrie und andererseits der Gesamtkupferkonzentration mit Hilfe der AAS, dass im Humanplasma der größte Kupferanteil in ionischer Form vorlag. Es ist davon auszugehen, dass dies der Grund für die deutlich bessere antibakterielle Wirksamkeit ist (vgl. Abbn. 57, 58 und 59). Die in den Abbildungen 57 bis 59 dargestellten Untersuchungen ergaben außerdem, dass die Kupferelution aus einer reinen Kupferprobe nach gleicher Elutionsdauer zwar deutlich höhere Konzentrationen liefert als alle beschichteten Proben, sich jedoch die antibakterielle Wirkung gegenüber planktonischen Bakterien nicht deutlich unterscheidet. Die (TiN-sCu)-Probe z.B. eluierte gegenüber der reinen Kupferprobe lediglich 30 % der Kupfermenge, zeigte aber nach 24 Stunden - ähnlich der Kupferprobe - ebenfalls eine Reduktion der Anzahl planktonischer Bakterien um knapp 4 Zehnerpotenzen. Die Abbildung 58 macht demzufolge deutlich, dass trotz der unterschiedlichen Kupferfreisetzung aus verschiedenen Oberflächen die inhibierende Wirkung auf plankto-

nische Bakterien ähnlich ist. Offenbar „verbrauchen“ die anwesenden Bakterien sofort alle eluierten Kupferionen und harmonisieren damit in der Inhibitionsphase das Elutionsverhalten der unterschiedlichen Oberflächen.

Im Vergleich zu Bakterien zeigen MG-63-Zellen (Kap. 4.2.2) eine gute bis sehr gute Verträglichkeit gegenüber den jeweils aus den verschiedenen beschichteten Kupferoberflächen freigesetzten Kupfermengen. In Zellkulturmedium über (CaP-cCuP)-, (TiN-sCu)- und (PeO-gCu)-Proben (vgl. Tab. 3) konnten 70, 50 und 20 % vitale Zellen nachgewiesen werden, d.h. im Zellkulturmedium sind antibakterielle Wirkung der Kupferionen und Zellverträglichkeit verknüpft. Dieses Ergebnis ist so sicher nicht allgemeingültig, sondern ergibt sich aus der Beschaffenheit der verwendeten Proben. Offenbar werden, wie bereits erwähnt, neben den aus den (CaP-cCuP)-beschichteten Proben stark eluierenden Kupferionen auch die das Wachstum der MG-63-Zellen stimulierenden Calcium- und Phosphationen an das Zellkulturmedium abgegeben und durch die hochporöse Calciumphosphat-Oberfläche das Anhaften dieser Zellen begünstigt. Die Ausbildung eines bakteriellen Biofilms wird dadurch erschwert.

Zell- und Bakterienadhäsionsprozesse sind stark von der Oberflächenbeschaffenheit abhängig. Vor allem die chemische Zusammensetzung, die hygroskopischen Eigenschaften wie auch die Rauigkeit der Oberfläche spielen dabei eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Bei der Adhäsion von Bakterien besteht ein Zusammenhang zwischen ihrer Größe und Form und der Oberflächentopographie. Carolin Diaz et al. (2007) beschreiben, dass ein Anwachsen der Bakterien begünstigt wird, wenn die topologischen Eigenschaften der Oberfläche der Bakterienform und -größe entsprechen. Sie untersuchten glatte und raue Kupfer- und Goldschichten und fanden heraus, dass die Biofilmbildung auf den rauen Kupferoberflächen kaum oder gar nicht möglich war (DIAZ et al. 2007). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass die Ausbildung von Biofilmen auf rauen Oberflächen im Vergleich zu glatten Oberflächen entweder verspätet oder gar nicht stattfindet. So beschreiben KENNETH et al. (2007) in einer Studie mit Haihaut, dass auf dieser, durch eine spezielle Mikrotopographie gekennzeichneten Oberfläche, die Biofilmbildung vollständig ausblieb, während sie im Vergleich dazu auf einem glatten Polyelastomer leicht erfolgen konnte. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen von HARRIS und RICHARDS (2004).

Allerdings schränkten sie ihre Ergebnisse dahingehend ein, dass nicht vorwiegend die Rauigkeit, sondern vielmehr die chemische und energetische Beschaffenheit der Oberfläche für die Adhäsion der Bakterien ausschlaggebend sei.

Werden die durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss von Kupfer auf die Zellzahl (Abb. 70) mit den Untersuchungen zur Zellviabilität verglichen (Abb. 71), so fällt auf, dass die Anzahl der Zellen durch das freigesetzte Kupfer zwar reduziert, die Zellviabilität jedoch nicht entscheidend gestört wurde. Ähnliche Ergebnisse hat SUSKA (2003) berichtet. Sie verglich Kupfer mit Titan und stellte fest, dass Kupfer zwar bereits nach 12 h zytotoxische Wirkungen zeigte, die Ergebnisse zur Zellviabilität jedoch keine signifikanten Unterschiede ergaben. Bei der Verwendung von Kupfer konnte sie zudem eine schnelle Vermehrung von inflammatorischen Zellen nachweisen. Für die Toxizität bzw. die biologische Rückantwort sind also die chemischen Eigenschaften der Metallionen, ihre Zusammensetzung sowie die Konzentration im Gewebe bzw. im Zellkulturmedium als Funktion der Zeit von großer Bedeutung (SUSKA 2004).

Neben der antibakteriellen Wirksamkeit und der Zytotoxizität von kupferbeladenen Oberflächen wurde auch deren Einfluss auf die Signaltransduktion bei der Gefäßneubildung und bei der Entzündung untersucht (Kap. 4.3). Wie in Kap. 4.3 bereits beschrieben, gab es keine Hinweise auf das Auftreten von Zelltod. Das Anfärben des CD31-Proteins ließ sogar eine Aktivierung der Zellen durch Kupfer vermuten (Abb. 72). Mit den durchgeführten Versuchen konnte zwar keine Gefäßneubildung nachgewiesen werden, es waren aber zumindest einige vitale Zellen zu erkennen (Abb. 75).

Inwieweit Kupfer einen Einfluss auf die HIF-1-Aktivierung und somit auf die Gefäßneubildung besitzt, ist bisher wenig untersucht. Bekannt ist aber ein die Angiogenese fördernder Effekt und eine VEGF-Induktion durch Kupfer (PARKE et al. 2000; SEN et al. 2002). HIF ist ein heterodimeres Protein, welches aus einer α - und einer β -Untereinheit besteht. Bei der Adaption an reduzierte Sauerstoffverfügbarkeit spielt HIF eine große Rolle. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass Kupfer positiv bei Wundheilungsprozessen wirkt. BORKOW (2004) stellte in diesem Zusammenhang fest, dass GHK-Cu^{2+} antiinflammatorisch wirkt und die Geweberegeneration fördert. GHK (Glycyl-L-histidyl-L-lysine) ist eine

Aminosäure, die eine hohe Affinität gegenüber Kupfer aufweist. Er beobachtete weiterhin, dass durch Cu^{2+} -Ionen die Angiogenese sowie die Endothelzellproliferation stimuliert werden. Eine hinreichende Kupferversorgung scheint für die Funktion von Zytokinen, die bei der Angiogenese, der Fibrinfaserbildung bei Entzündungen sowie bei der Wundheilung eine Rolle spielen, notwendig zu sein (PARKE et al. 1988; SEN et al. 2002).

6 Zusammenfassung

Implantatinfektionen werden typischerweise durch biofilmbildende Bakterien wie *Staphylococcus aureus* hervorgerufen. Biofilme können sich innerhalb von 24 h bilden und sind nach 48 h vollständig ausgereift. Innerhalb des Biofilms teilen sich Bakterien in geringerem Ausmaß als unter planktonischen Bedingung (RITSCHHEL et al. 2008). Die Ausbildung eines Biofilms und die damit verbundene Protheseninfektion hat häufig die Entfernung des Implantates als einziges Mittel zur Infektionsbekämpfung zur Folge.

Mit dieser Arbeit wurde nach einer Möglichkeit gesucht, Implantatoberflächen durch Beschichtung mit Kupfer dahingehend zu optimieren, dass einerseits ein antibakterieller Schutz gegeben ist und andererseits die Besiedlung mit Körperzellen nicht nennenswert gestört wird. Ausgehend von Untersuchungen mit Kupferlösungen wurden Titan-Probekörper mit Hilfe verschiedener Verfahren mit Kupfer beschichtet und auf ihre Wirksamkeit gegenüber Bakterien und Zellen getestet.

Die Untersuchungen ergaben zusammenfassend folgende Ergebnisse:

1. Kupferlösungen wirken bei Konzentrationen ab 20 mg/l auf *Stapylococcus aureus* mit Bakterienkonzentrationen von 10^7 KBE/ml bakterizid und zeigen ab 30 mg/l bei MG-63-Zellen erste zytotoxische Wirkungen.
2. Es wurden 3 Varianten für die Kupferbeschichtung von Implantaten entwickelt und erfolgreich getestet:
 - a) Die galvanische Abscheidung auf Titan durch eine poröse Titanoxidschicht (PeO-gCu)

Es wird eine diskontinuierliche inselartige Oberflächenbelegung mit Kupfer erreicht, die in ihrer Struktur durch nachfolgendes Glaskugelstrahlen verändert werden kann.

b) Die chemische Abscheidung aus einer Lösung (CaP-cCuP)

In Tris-Puffer gelöstes Kupfer wird in PBS-Puffer weiter verdünnt und auf hochporöse Calciumphosphat-Schichten aufgetragen.

c) Die Abscheidung aus der Dampfphase (TiN-sCu)

Titannitrid und Kupfer werden im Vakuum alternierend schichtweise mittels reaktiver Arc- (TiN) und Sputter-Technik (Cu) abgeschieden.

3. Die chemisch beschichteten (CaP-cCuP)-Proben zeigten die schnellste Freisetzung von Kupfer, gefolgt von den (PeO-gCu)- und den (TiN-sCu)-Proben. Die spezifischen Kupferbeladungen der Oberflächen lagen zwischen 1 und 4 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$.
4. Die PBS-Pufferlösung ist gut, das Zellkulturmedium bedingt und die LB-Bouillon wenig als Elutionsmedium für eine zielgerichtete Entwicklung von antibakteriell wirkenden kupferbeladenen Implantatoberflächen geeignet.
5. Bei Zugabe von Bakterien zum PBS-Elutionsmedium wird mehr Kupfer aus der Oberfläche herausgelöst, da die Bakterien Kupfer bis zum Erreichen der letalen Dosis aufnehmen. Ist die Kupferbeladung ausreichend, kann dieser Vorgang durch eine neue Bakterieninjektion wiederholt werden.
6. Wird dem PBS-Puffer Humanplasma zugegeben, erscheint für die planktonischen Bakterien die antibakterielle Wirkung der einzelnen Oberflächen harmonisiert. Selbst in dem Elutionsmedium über der massiven Kupferronde verhalten sich die planktonischen Bakterien ähnlich wie in den Medien über den anderen Proben. Allerdings zeigen die (CaP-cCuP)-Proben, welche die geringste Kupferbeladung besitzen, auch die geringste antibakterielle Wirkung. Deutlich unterschiedlicher sind die Wirkungen der kupferbeladenen Oberflächen auf die biofilmbildenden Bakterien. Gegen sie geht von der massiven Kupferronde eindeutig die größte Wirkung aus, der geringste Effekt wird mit den schnell eluierenden (CaP-cCuP)-Proben erzielt.
7. Während für alle verwendeten Beschichtungsvarianten gute bis sehr gute antibakterielle Wirkungen bescheinigt werden können, ist der Einfluss ge-

genüber Gewebezellen unterschiedlich. Durch die (PeO-gCu)-Proben wurde die eingesetzte Zellmenge zwar leicht reduziert, die Zellzyklusphasen jedoch kaum gestört. Für die (TiN-sCu)-Proben hingegen, trat eine erhebliche Störung im Zellzyklus auf. Die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Zellverträglichkeit lieferten die Calciumphosphatschichten (CaP-cCuP, äCaP-cCuP).

8. Es ist möglich, mit den 3 getesteten Varianten zur antibakteriellen Optimierung von Implantatoberflächen unterschiedliche Anforderungen der jeweiligen Applikation zu erfüllen. Durch Variation der Kupferbeladung und der Releasekinetik kann der Einfluss sowohl auf Bakterien als auch auf Zellen gesteuert werden. Die vorliegenden Ergebnisse weisen nach, dass Oberflächen so modifiziert werden können, dass eine dauerhafte bakterizide Wirkung bei gleichzeitig sehr geringer Zellschädigung erreicht wird.

7 Literaturverzeichnis

Abou Neel, E.A., Ahmed, I., Pratten, J., Nazhat, S.N., Knowles, J.C., 2005: „Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres“; *Biomaterials* 26, 2247-2254

Bechert, T., Böswald, M., Lugauer, S., Regenfus, A., Greil, J., Guggenbichler, J-P., 1999: “The Erlanger Silver Catheter: *In Vitro* Results for Antimicrobial Activity”, *Infection* 271, 24-29

Becker, C., 2009 „Einzelmolekülmikroskopie“, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie, http://www.thch.uni-bonn.de/wandelt/pcf_praktikum/ver-suchsanleitungen/EMM.pdf 25.05.09

Becker, K., von Eiff, C., 2003: Universität Münster, http://www.p-e-g.org/archivtmp/bad_honnef_symposium_2003, 10.08.08

Borkow, G., 2004: “Copper`s Role in Wound Healing”, Review of Literature, Property of Cupron Inc (CUPRON Better Health Through Technology™) <http://www.pedorthicnewswire.com/.../Copper%20Role%20in%20Wound%20Healing.pdf> 12.04.2008

Cameliet, P., 2000: “Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis”, *Nat Med* 6, 389-395

Chung, K. K., Schumacher, J. F., Sampsen, E. M., Burne, R.,A., Antonelli, P. J., Brennan, A. B., 2007: „Impact of engineered surface microtopography on biofilm formation of *s. aureus*; *Biointerphases* 2(2), 89-94

Costerton, J.W., Steward, P. S., Greenberg, E.P., 1999: „Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections“; *Science*, Vol. 284, 1320-1322

Dan Z.G., Ni H.W. Xu, B.F. Xiong J., Xiong P.Y., 2005: “Microstructure and antibacterial properties of ASI 420 stainless steel implant by copper ions”, *Science direct. Thin solid films* 492, 93-100

Diaz, C., Cortizo, M.C., Schilardi, P. L. , de Saravia, S.G.G., Fernandez, M.A., de Mele, L., 2007: „Influence of the Nano-micro Structure of the Surface on Bacterial Adhesion“; *Materials Research*, Vol.10, No. 1,11-14

Egler, M., 2005: „Rolle von RpoE-homologen Sigmafaktoren in der Schwermetall-Homöostase von *Escherichia coli* und *Cupriavidus metallidurans*“, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Gallardo-Morena, A.M., van der Mei, H.C., Busser, H.J., Gonzalez-Martin, M.L., Bruque, J.M., Perez-Giraldo. C., 2001: “Adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131 grown under subinhibition concentrations of ampicillin and vancomycin at hydrophilic and hydrophobic substratum”, *FEMS Microbiol Lett* 203: 75-79

Gibbins, B., Warner, L., 2005: “The Role of Antimicrobial Silver Nanotechnology”, MDDI, <http://www.devicelink.com/mddi/archive/05/08/005.html>, 05.02.08

Gristina, A. G., 1987: “Biomaterial-Centered Infection: Microbial Adhesion versus Tissue Integration”, *Science*, 237:1588-1595

- Harris**, L-G., Richards, R.G., 2004: „Staphylococcus aureus adhesion to different treated titanium surfaces“, J. Mat. Science in Medicine 15, 311-314
- Heidenau**, F., Mittelmeier W., Detsch R., Haenle M., Stenzel F., Zeigler G., Gollwitzer H., 2005: “A novel antibacterial titania coating: Metall ion toxicity and in vitro surface colonization”, J. Materials Science, Materials in Medicine 16, 1-6
- Hubacher**, D., Lara-Ricalde, R., Taylor, D.J., Guera-Infante, F., Guzman-Rodriguez, R., 2001: “Use of copper intrauterine devices and the risk of tubal infertility among nulligravid women”, N Engl J Med 345, 561-567
- Lausmaa**, J., 2001: „Mechanical, Thermal, Chemical and Electrochemical Surface Treatment of Titanium“, in „Titanium in Medicine“, Ed. D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor and P. Thomson, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, S. 232-266
- Miller**, D.C., Haberstroh, K.M., Webster, Th.J., 2006: „PLGA nanometer surface features manipulate fibronectin interactions for improved vascular cell adhesion” J. Biomed. Mat. Res. Part A, Vol. 81A, Issue 3, 678-684
- Niedner**, R., Vanscheidt, W., 1994: „Die Wundinfektion - folgenschwerste Komplikation der Wundheilung“, HARTMANN WundForum 2/94, 8-15
- Parke**, A., Bhattacherjee, P., Palmer, R.M., Lazarus, N.R., 1988: “Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea”, Am J Pathol 130, 173-178
- Rapoport**, S.M., 1987: „Medizinische Biochemie“, Verlag Volk und Gesundheit Berlin
- Ritschl**, R., Böhler, N., Bröll, H., 2008: „ Protheseninfektionen in der Orthopädie“ Experten Statement, Österreichisches Ärzteblatt Juni
- Rühle**, Th., Gruber, A., 2006: „Mit Nanosilber beschichtete Kunststoffe gegen Bakterien, Pilze und Biofilme“; Plastverarbeiter September
- Sen**, C.K., Khanna, S., Venojarvi, M., Trikha, P., Ellison, E.C., Hunt, T.K., Roy, S., 2002: “Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and woundhealing”, Am J Physiol Heart Circ Physiol 282, H1821-1827
- Siegenthaler**, W., Blum, H.E., 2006: „Klinische Pathophysiologie“, Thiemeverlag, Stuttgart
- Silver**, S., Phung, Le T., 2005: “A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions”, J. of Industrial Microbiology and Biotechnology 32, 587-605
- Stöcker**, H.; 1994: „Taschenbuch der Physik“, 2.Aufl., Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, Thun
- Stüber**, M., 1997: „Magnetron-gesputterte superharte, amorphe Kohlenstoffschichten mit gradiertem Schichtaufbau“, Dissertation, Universität Karlsruhe
- Suska**, F., 2004: “On the inflammatory response to variations in biomaterial surface chemistry”; ISBN 91-628-6302-9

Thomas, K.A., Cook, S.D., 1985: "An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition", J. of Biomaterials Research Vol. 19, Issue 8, 875-901

van Osten, U., Salito, A., Breme, F., Aits, M., Hufnagel, K., 2008: http://www.gf-e-online.de/opencms2/export/sites/default/PDF/Veroeffentlichungen/Max-schneidern_porxserx4FEE2.pdf, 15.11.2008

Veenstra, D.L., Saint, S., Saha, S., Lumley, T., Sullivan, S.D., 1999: "Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheter-related bloodstream infection: a meta analysis", Jma (?), 281, 261-267

Vilchez, R., Pozo, C., Gómez, M.A., Rodelas´, B., González, J., 2007: "Dominance of sphingomonas in a copper exposed biofilm community for groundwater treatment" , Microbiology 153(Pt 2):325-37, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17259604>

Wataha, J. C., Nelson, S. K., Lockwood, P. E., 2001: "Element release from dental casting alloys into biological media with and without proteins", Dental Materials 17, 409-414

Welz, C., 2008: "Osseointegrative Eigenschaften einer Silberbeschichtung von Hüftendoprothesen bei Hunden" , Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Wu, X., Shi, G., Wang, S., Wu, P., 2005: "Formation of 3D Danderlions and 2D Nanowalls of Copper Phosphate Dihydrate on a Copper Surface and Their Conversion into a Nanoporous CuO Film"; Eur. J. Inorg. Chem., 4775-4779

Ziegler, G., 2004: „Technik im menschlichen Körper - Moderner Dreikampf: Medizin, Naturwissenschaften, Technik“, Spektrum 2/04, 24-27

Ziegler, K. B. G., 2006: „Die Bedeutung der Biofilmbildung von S. aureus für die bakterielle Persistenz im Respirationstrakt von Patienten mit der Erbkrankheit Mukoviszidose“ , Dissertation, Universität Tübingen

Anonymus a, 2005: Katalog des Inst. f. Labordiagnostik Klinikum Süd, Rostock

Anonymus b, 2008: Handbuch 60-2-0015/d, Axio Observer, Fa. Zeiss: <http://www.zeiss.de.axioobserver>, 12.05.09

<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/13/bs13-7.htm>, 02.02.08

<http://encarta.msn./Antibiotika>., 10.02.08

<http://wikipedia.org/wiki/ätzen>, 01.03.08

<http://wikipedia.org/wiki/Rasterelektronenmikroskop>, 12.05.08

<http://www.vitalstoff-lexikon.de/Spurenelemente/Kupfer> , 02.04.08

<http://www2.biologie.uni-halle.de/genet/plant/staff/boch/lectures/ma-bi2005/VL06-Quorum&Antibiotika.pdf>, 10.01.08

www.uni-tuebingen.de/Teilchenoptik/html/fprakt/pdf/AnleitungREM.pdf, 06.07.08

Erklärung

Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst wurde.

Rostock, 09.09.2009

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H.-G. Neumann für die jederzeit gewährte Hilfe und Diskussionsbereitschaft. Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Lembke für die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Bei meinen Mitarbeiterinnen Frau Wollmerstädt, Frau Schuster, Frau Ike und Frau Aderkas bedanke ich mich für die stets hilfreiche Unterstützung bei den Laboranalysen. Der DOT GmbH danke ich ebenfalls für die Unterstützung.

Bei Frau Dr. Peters und Herrn Dr. Lüthen bedanke ich mich im Besonderen für die Durchführung der Zelluntersuchungen.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Mann und meinen Kindern für die stets aufmunternden Worte und ihr Verständnis während aller Phasen dieser Arbeit.

Ich danke meinen Eltern, die mir in allen Lebenslagen unterstützend mit Rat und Tat zur Seite standen.