

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

Nanostrukturierte Beschichtung auf Implantaten zur Erhöhung der Osseointegration

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Adam, Martin

geb. am 26.10.1982 in Schwedt/O.

Rostock, Juni 2013

Erster Gutachter

Prof. Dr. Thomas Gerber
Institut für Physik
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock

Zweiter Gutachter

Prof. Dr. Katrin Sternberg
Institut für Biomedizinische Technik
Medizinische Fakultät
Universität Rostock

Datum der Einreichung: 01.07.2013

Datum der Verteidigung: 27.09.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Knochengewebe	3
2.1.1. Zelluläre Bestandteile	3
2.1.2. Extrazelluläre Bestandteile	4
2.2. Osseointegration von Implantaten	6
2.3. Implantatoberflächen - Stand der Technik	8
2.3.1. Calciumphosphat-Beschichtungen	8
2.3.2. Rauheit auf Implantaten	9
2.3.3. Hydrophile Implantate	11
2.3.4. Wachstumsfaktoren	12
2.4. Sol-Gel-System SiO_2	13
2.4.1. Hydrolyse	13
2.4.2. Kondensation	13
2.4.3. Sol-Gel-Übergang	14
2.4.4. Vergleich SiO_2 -Gele, -Gläser, -Kristalle	15
2.5. NanoBone [®] -Technologie	17
2.5.1. SiO_2 -Matrix	18
2.5.2. Wirkungsweise und Matrixwechsel	19
2.6. Synthetischer Hydroxylapatit	20
3. Untersuchungsmethoden	23
3.1. Stereo-Rasterelektronenmikroskopie (3D-REM)	23
3.2. Bestimmung der Rauheit	24
3.3. Gasadsorption	25
3.4. Ultramikrotomie	25
3.5. Elektronenmikroskopie	26
3.6. Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)	27
3.7. Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)	27
4. Charakterisierung unbeschichteter Implantate	31
4.1. Experimentelle Vorgehensweise	31
4.2. Semados [®] -S	32
4.2.1. Topografie der Oberfläche	32
4.2.2. Zusammensetzung der Oberfläche	32

4.3.	ixx2 [®]	33
4.3.1.	Topografie der Oberfläche	33
4.3.2.	Zusammensetzung der Oberfläche	33
4.4.	tiologic [®] sandgestrahlt	34
4.4.1.	Topografie der Oberfläche	34
4.4.2.	Zusammensetzung der Oberfläche	34
4.5.	tiologic [®] maschiniert	35
4.5.1.	Topografie der Oberfläche	35
4.5.2.	Zusammensetzung der Oberfläche	35
5.	Beschichtungsprozess NanoBone[®]	37
5.1.	Beschichtungsanlage	37
5.2.	Vorbehandlung durch O ₂ -Plasma	38
5.2.1.	Reinigung der Implantatoberfläche	38
5.2.2.	Temperatur der Implantatoberfläche	39
5.2.3.	Titandioxid-Passivschicht	40
5.2.4.	Benetzbarkeit	40
5.3.	Herstellung der Beschichtungsdispersion	42
5.3.1.	SiO ₂ -Sol	42
5.3.2.	Hydroxylapatit	42
5.3.3.	Dispersion	42
5.4.	Auftragen der Beschichtungsdispersion	43
5.5.	Nachbehandlung durch O ₂ -Plasma	43
5.6.	Festlegung der Beschichtungsparameter	44
6.	Charakterisierung der Schichtmikrostruktur	47
6.1.	Schichtdicke	47
6.2.	Schichtrauheit	49
6.2.1.	Parameter Schichtdicke	49
6.2.2.	Parameter Temperatur	50
6.3.	Schichthaftung	51
6.3.1.	Haftzugfestigkeit	51
6.3.2.	Implantationsversuch	53
6.4.	Beschichtete Implantate in den Tierstudien	54
6.5.	Zusammenfassung Schichtmikrostruktur	55
7.	Charakterisierung der Schichtnanostruktur	57
7.1.	Porosität	57
7.2.	Layer-By-Layer	59
7.3.	Hydroxylapatit in der SiO ₂ -Matrix	60
7.4.	Struktur der SiO ₂ -Gelmatrix	61
7.5.	Zusammenfassung Schichtnanostruktur	64

8. Tierexperimentelle Studien	65
8.1. Voruntersuchungen <i>in vitro</i>	65
8.1.1. Live/Dead [®] -Test	65
8.1.2. Zytotoxizitätstest, XTT	67
8.2. Minipig-Modell	68
8.2.1. Implantatgruppen	68
8.2.2. Chirurgischer und histologischer Ablauf	68
8.2.3. Histomorphometrie	69
8.3. Kaninchen-Modell	70
8.3.1. Implantatgruppen	71
8.3.2. Chirurgischer und histologischer Ablauf	72
8.3.3. Histomorphometrie	72
8.3.4. Histologie	74
8.4. Zusammenfassung und Diskussion	78
9. Matrixwechsel	81
9.1. <i>In vivo</i> - Wistar Ratten	81
9.1.1. Chirurgischer und experimenteller Ablauf	81
9.1.2. Ergebnisse	82
9.2. <i>Ex vivo</i> - Kaninchen	84
9.2.1. Experimenteller Ablauf	84
9.2.2. Ergebnisse	85
9.3. <i>In vitro</i> - Blut	85
9.3.1. Experimenteller Ablauf	86
9.3.2. Ergebnisse SiO ₂ -Schicht (Kontrolle)	87
9.3.3. Ergebnisse NB-Schicht	88
9.4. Zusammenfassung und Diskussion	90
10. TiO₂-Rauheit über Sol-Gel	93
10.1. Beschichtung	93
10.1.1. Beschichtungsdispersion	93
10.1.2. Beschichtungsprozess	93
10.2. Ergebnisse	94
10.3. Zusammenfassung TiO ₂ -Schicht	96
11. Zusammenfassung	97
A. Anhang	113
A.1. zusätzliche Abbildungen	113

1. Einleitung

Seit mehreren Jahrzehnten werden metallische und auch keramische Implantate in den menschlichen Knochen eingebracht, um dort bestimmte Aufgaben und Funktionen dauerhaft zu erfüllen. Sie verbleiben also über mehrere Jahre bzw. Jahrzehnte im menschlichen Organismus. Sie müssen deshalb vom Körper angenommen werden, um ihre Funktion zu gewährleisten. Bei Implantaten, die im Kontakt mit Knochen stehen, spricht man von *Osseointegration*. Das bedeutet, dass sich zwischen dem Knochen und der Implantatoberfläche ein fester Verbund ausbildet. Demzufolge sind bestimmte Voraussetzungen an das jeweilige Implantat wie Biokompatibilität und mechanische Festigkeit gestellt.

Weltweit gibt es auf dem Dentalmarkt mehr als 100 Implantatsysteme, wobei der größte Teil der Implantate aus Titan oder einer Titanlegierung gefertigt wird. Eine zweite Gruppe bilden die keramischen Implantate aus z.B. Zirkoniumdioxid. In Abb. 1.1 ist ein Foto zweier Titan-Implantate gezeigt. Diese schraubenähnlichen Stifte sind der Teil des Zahnersatzes, der in den Knochen eingebracht wird. Auf das obere Ende des Implantates schließt sich dann der sog. Aufbau und der künstliche Zahn an. Wenige Wochen nach der Implantation weisen alle Implantate ein Stabilitätsminimum auf, weil bei dem Implantationsprozess (alter) vorhandener Knochen teilweise zerstört und dadurch abgebaut wird und neuer Knochen erst nach 5-8 Wochen in ausreichendem Maße gebildet wird. Aus diesem Grund ist das Standardprotokoll zum Zahnersatz in zwei Phasen geteilt. In der ersten Phase wird das Implantat gesetzt und nach erfolgreicher Osseointegration wird ein paar Monate später durch einen zweiten operativen Eingriff der Zahnaufsatz installiert.

Dieses Vorgehen soll auf einen Eingriff begrenzt werden, d.h. das Implantat soll sofort oder kurz nach Implantation belastbar sein. Dazu muss die Stabilität in den ersten Wochen hoch genug sein, das bedeutet die Osseointegration muss in den ersten Wochen verbessert werden. Die Standard-Oberfläche von Dentalimplantaten besteht aus einer Titandioxidschicht, die durch Sandstrahl- und/oder Ätzprozesse mit einer Rauheit im Mikrometerbereich versehen wird. Zusätzlich gab es in der Vergangenheit Beschichtungen aus Calciumphosphaten, die sich wegen ihrer mechanischen Stabilität nicht bewährt haben, da sie sich von der Oberfläche ablösten und so zu schlechten Einheilvorgängen bis hin zu Implantatversagen führen konnten. Zur Zeit geht der Trend in Richtung Beschichtung oder Inkorporation von Wachstumsfaktoren in/auf die Implantatoberfläche, die am Knochenaufbauprozess beteiligt sind.



Abbildung 1.1.: Titanimplantat, Dentaurum tiologic®

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Osseointegration von Implantaten durch eine neue, bioaktive

Beschichtung zu beschleunigen bzw. zu verbessern. Um Implantate sofort belasten zu können, muss das Stabilitätsminimum eliminiert werden. Durch das Beschichtungsmaterial soll eine autologe Proteinbeschichtung *in vivo* erzielt werden, d.h. Adsorptionsmechanismen und Austauschprozesse sollen Proteine in die Schicht einbauen, die am Knochenmetabolismus beteiligt sind.

Die technologische Grundlage dafür bildet das an der Universität Rostock entwickelte und von der Firma Artoss GmbH produzierte Knochenaufbaumaterial NanoBone[®] |granulate. Das ist ein nanoporöses Granulat, was aus synthetischem Hydroxylapatit und einer Silicagelmatrix besteht. Es zeichnet sich durch eine schnelle Knochenbildung *in vivo* aus. Die Wirkungsweise des Biomaterials wird dabei maßgeblich durch einen Austausch der SiO₂-Matrix nach wenigen Tagen durch körpereigene Moleküle bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit sollen durch ein Beschichtungsverfahren die gleichen strukturellen Eigenschaften in Form einer Schicht auf Implantatoberflächen übertragen werden. Durch den Matrixwechsel soll eine organische, autologe Proteinbeschichtung erfolgen. Dazu wurde ein Beschichtungsverfahren unter der Verwendung des Sol-Gel-Prozesses entwickelt. Die Prozessparameter wurden definiert und Korrelationen zu den Eigenschaften der Schicht wurden aufgezeigt. Anhand von Röntgenbeugung, Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie sowie mechanischen Tests wurden die strukturellen Eigenschaften untersucht und bestimmt. Die Biokompatibilität wurde durch verschiedene *in vitro*-Tests nachgewiesen. Die Osseointegration beschichteter Implantate wurde in zwei verschiedenen Tiermodellen *in vivo* getestet. Es konnte durch Knochen-Implantat-Kontakt-Messungen (BIC:Bone-to-Implant-Contact) nachgewiesen werden, dass durch die Schicht die Osseointegration in den ersten Wochen signifikant erhöht wurde. Die Wirkungsweise der Schicht wurde in weiteren *in vitro* und *ex vivo* Versuchen beschrieben. Es zeigte sich, dass das Beschichtungsmaterial nach wenigen Minuten den Austausch der SiO₂-Matrix vollzieht und so eine Beschichtung mit autologen Proteinen *in vivo* durchführt.

2. Grundlagen

Jedes Implantat tritt über die Implantatoberfläche mit dem umliegenden Gewebe in Kontakt. Um diese Wechselwirkung zwischen Implantatoberfläche und Gewebe nachvollziehen zu können, wird im folgenden Kapitel die Anatomie des Knochengewebes beschrieben. Weiterhin wird das Einwachsen von Implantaten (Osseointegration) erläutert und die bedeutendsten Oberflächenmodifikationen zur Erhöhung der Osseointegration erklärt. Die strukturellen Eigenschaften und die daraus resultierende Wirkungsweise der NanoBone[®]-Technologie, die der beschriebenen Schicht zu Grunde liegt, wird am Ende dieses Kapitels erläutert.

2.1. Knochengewebe

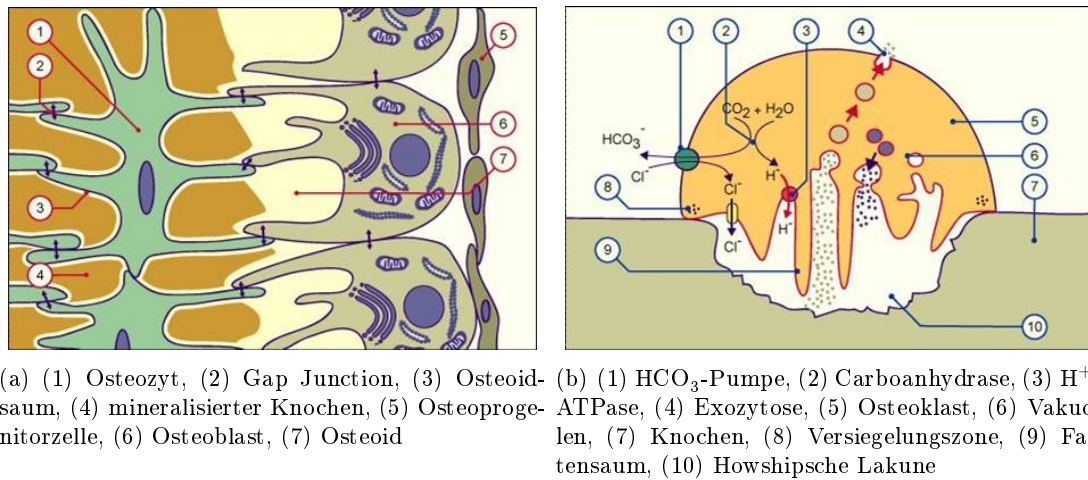
Der Knochen übernimmt im Körper strukturelle und metabolische Funktionen. Er bildet zum einen den Stützapparat gegen einwirkende Kräfte und zum anderen ein Hebelsystem für Muskelaktionen, [1]. Darüberhinaus reguliert er den Calcium- und Phosphathaushalt im Körper. Knochen ist keine ruhende und tote Masse, sondern mit Blutgefäßen durchsetzt und einem ständigen Umbau unterlegen, dem sog. Knochenregenerationsprozess (*Bone Remodeling*). 10% des Skeletts eines ausgewachsenen Menschen werden jährlich umgebaut und somit erneuert. Dieser Erneuerungsprozess dient der funktionellen Anpassung an herrschende Belastungen, raschen Mobilisierung von Calcium und Phosphaten und beugt der Materialermüdung vor.

Das Knochengewebe lässt sich in folgende zwei Bestandteile eingrenzen - zelluläre und extrazelluläre Bestandteile. Letzteres und die drei wichtigsten Zelltypen sind von grundlegender Bedeutung für die Wechselwirkung zwischen Biomaterial und Gewebe und werden nachfolgend beschrieben.

2.1.1. Zelluläre Bestandteile

Osteoblasten

Osteoblasten sind für den Aufbau des Knochens verantwortlich. Sie differenzieren aus Osteo-Progenitorzellen (Knochenvorläuferzellen) und haben einen Durchmesser von ca. 20 μm , [1]. In Abb. 2.1(a) ist die Differenzierung und Knochenbildung von Osteoblasten schematisch gezeigt. Sie produzieren die nicht-mineralisierte Knochenmatrix, das *Osteoid* (Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine), Kollagen Typ-I und setzen die Alkalische Phosphatase frei. Dieses Enzym ist bei der anschließenden Mineralisierung des Osteoids beteiligt. Die Geschwindigkeit der Knochenbildung kann mit ca. 1 – 2 μm pro Tag abgeschätzt werden, [1,2].



(a) (1) Osteozyt, (2) Gap Junction, (3) Osteoidsaum, (4) mineralisierter Knochen, (5) Osteoprogenitorzelle, (6) Osteoblast, (7) Osteoid
 (b) (1) HCO_3^- -Pumpe, (2) Carboanhydrase, (3) H^+ -ATPase, (4) Exozytose, (5) Osteoklast, (6) Vakuolen, (7) Knochen, (8) Versiegelungszone, (9) Faltsaum, (10) Howshipsche Lakune

Abbildung 2.1.: Osteoklasten und Osteoblasten, aus [3].

Osteozyten

Diese Zellen entstehen aus den Osteoblasten. Genau dann, wenn Osteoblasten sich selbst eingebaut und die Knochenmatrix mineralisiert haben. Ausgereift besitzen sie eine Länge von 20 – 60 μm , [1]. Über Fortsätze, sog. *Canaliculi* mit *Gap Junctions*, stehen die Osteozyten weiterhin in Kontakt. Das gewährleistet den Fluss von Ionen und kleinen Molekülen und sie sind somit in der Lage untereinander zu kommunizieren, siehe Abb. 2.1(a), [2]. Die Osteozyten haben die Aufgabe, die Aktivität der Osteoklasten sowie die Mineralisation zu regulieren.

Osteoklasten

Die Osteoklasten sind verantwortlich für die Resorption von Knochengewebe. Sie werden durch Fusion mononukleärer Vorläuferzellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet werden und sind mehrkernige Zellen mit einer Größe von bis zu 100 μm . Der aktive Osteoklast bildet eine resorptive Vorderseite (Resorptionslakune), die dem Knochen aufliegt, wo auch die H^+ -ATPase sitzt. Durch Carboanhydrase entstehender Wasserstoff H^+ und durch Cl^- -Ionen wird der pH-Wert lokal bis auf 4.5 herabgesetzt, was eine Auflösung der Calcium-Verbindungen bewirkt. Diese werden dann durch die Zelle hindurch abtransportiert (Exozytose). Aufgrund des pH-Werts ist die Umgebung von dieser sog. Howshipschen Lakune zirkulär durch die Versiegelungszone abgeschirmt, siehe Abb. 2.1(b).

2.1.2. Extrazelluläre Bestandteile

Die Knochenmatrix (Extrazelluläre Matrix) besteht zu 35 wt % aus organischen und 65 wt % aus anorganischen Anteilen, [2]. Der anorganische Anteil besteht zu 90 wt % aus Calciumphosphat (Hydroxylapatit, HA) und zu 10 wt % aus Calciumcarbonat, der organische Teil hauptsächlich aus Kollagen-I, [1]. Die Struktur der Knochenmatrix ist in Abb. 2.2 schematisch

dargestellt. Sie besteht aus Fibrillen mit einem Durchmesser von ca. 80-100 nm und einer Länge von ca. 10 μm .

Extrazelluläre Matrix

Diese Fibrillen haben eine Unterstruktur bestehend aus Kollagen-I-Molekülen, die sich zu Tripelhelices zusammenschließen und die Kollagenmoleküle bilden, und dem dazwischen gelagerten Hydroxylapatit. Dieser hat eine plättchenartige Form und ist parallel zu den Kollagenmolekülen angeordnet, [4, 5]. Die HA-Plättchen selbst sind ca. 2-4 nm dick, 25 nm breit und 50 nm lang, [4]. In Abb. 2.3(a) ist die Fibrillenstruktur (ohne HA) und in Abb. 2.3(b) die HA-Plättchen im TEM-Bild gezeigt. Die gerichtete Struktur der Extrazellulären Matrix ist in beiden Abbildungen ersichtlich. Die nadelförmigen Strukturen in (b) sind die HA-Plättchen, wenn sie parallel zum Elektronenstrahl orientiert sind.

Im Körper treten je nach Ort und Funktion zusätzliche Modifikationen des Hydroxylapatits auf, indem die OH- oder die PO_4 -Gruppe durch andere Elemente substituiert werden (Mg, Na, Pb, S, Karbonat, Fluorid), [5, 6]. Die Struktur und Morphologie des verwendeten Hydroxylapatits werden später im Abschnitt 2.6 genauer beschrieben.

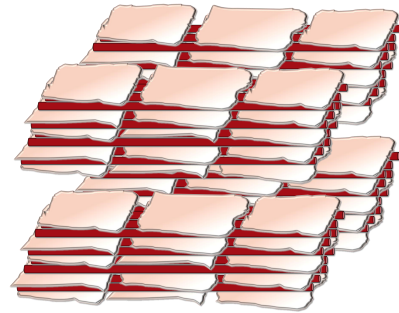


Abbildung 2.2.: Aufbau der Knochenmatrix schematisch

Biomineralisation

Die Osteoblasten produzieren in einem ersten Schritt faserartiges Kollagen-Typ-I, welches sich zu einem Netzwerk anordnet (Osteoid). An diesen Prozess schließt sich die Mineralisation an. Dabei wachsen nach ca. 10 Tagen epitaktisch die HA-Kristallite in das Kollagen-Netzwerk, [4, 5, 7].

Wachstumsfaktoren

Obwohl die Wachstumsfaktoren nur einen kleinen Teil des Knochens ($< 1\%$) bilden, spielen sie bei der Osteogenese eine entscheidende Rolle, [7]. Sie sind Polypeptide und fungieren als lokale Faktoren bei der Zellregulation. Sie beeinflussen die Proliferation und Stoffwechselfunktionen von Zellen (Mesenchymzellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten) und regulieren den Phänotyp durch Differenzierungsvorgänge. Z.B. übernehmen Wachstumsfaktoren wie BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) und TGF- β 1 (Transforming Growth Factors) die Steuerung im Metabolismus von Osteoblasten und Osteoklasten beim Bone Remodelling, d.h. sie stimulieren die Proliferation und Differenzierung von Osteo-Progenitorzellen in Osteoblasten, [2].

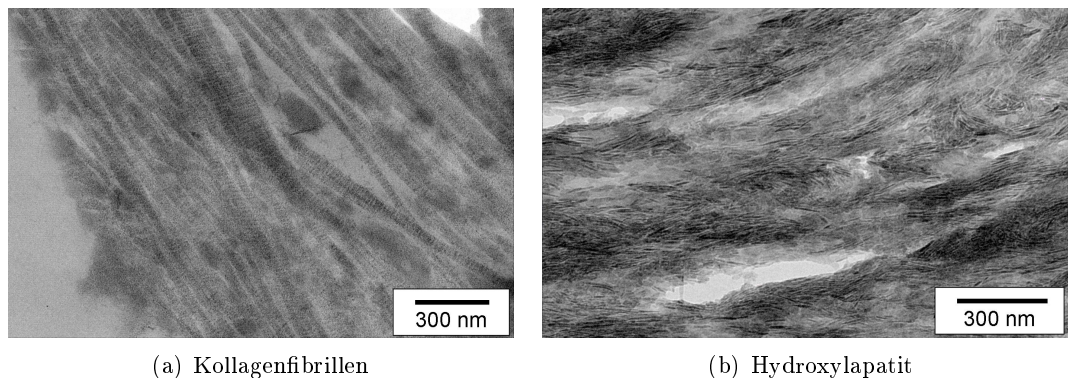


Abbildung 2.3.: TEM-Aufnahme der Knochenmatrix

2.2. Osseointegration von Implantaten

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich dentale Implantate verwendet. Dennoch sind die Prinzipien der Wechselwirkung zwischen Biomaterial und Gewebe auf orthopädische Implantate übertragbar. Durch den Implantationsprozess bei Dentalimplantaten, der in diesem Abschnitt näher erläutert wird, sind die Oberflächen sehr hohen Belastungen, wie z.B. Scherkräften beim Eindrehen, ausgesetzt. Weiterhin werden durch die Einwirkung der Kaukräfte hohe mechanische Anforderungen an Dentalimplantate gestellt.

Die meisten dentalen Implantatsysteme bestehen aus Titan (cpTi: commercially pure) oder aus einer Titanlegierung wie z.B. TiAl6V4, [8]. Einige Hersteller verwenden keramische Implantate aus Zirkoniumdioxid o.ä., [9–12]. Nicht nur ästhetische Gründe, wegen der weißen Farbe, sondern wegen seiner höheren Festigkeit gegenüber Titan sprechen für die Verwendung von keramischen Implantaten. Aber die Osseointegration keramischer Implantate ist im Vergleich zu Titanimplantaten schlechter, [9, 11]. Dentalimplantate werden in den meisten Fällen in den Kieferknochen eingeschraubt. Dazu wird durch eine Bohrung eine entsprechende Kavität erzeugt, in der anschließend (ggf. nach Gewindeschneiden) das Implantat eingeschraubt wird. Nach erfolgreicher Osseointegration wird dann der künstliche Zahn auf das Implantat montiert.

Die konventionelle Vorgehensweise beim Implantatsetzen ist unterteilt in zwei Phasen, [13–15]. In der ersten sog. *surgical phase* wird das Implantat eingesetzt und biomechanisch im Knochen verankert. Es entsteht die sog. Primärstabilität. Durch den Implantationsprozess (Bohren, Eindrehen) kommt es zu Gewebeerstörung und damit verbunden zu Hämatombildungen. Die an der Blutstillung beteiligten Thrombozyten setzen Faktoren frei, die mesenchymale Stammzellen und Vorläuferzellen anlocken. Gleichzeitig adsorbiert die Implantatoberfläche Proteine aus dem Plasma des Patienten und die Stamm- bzw. Vorläuferzellen differenzieren zu Osteoblasten, die dann Knochen periimplantär aufbauen. Ab ca. zwei Wochen nach Implantatsetzung lagert sich kalzifizierter Geflechtknochen ab und reift ab der dritten Woche zu Lamellenknochen, [16, 17]. Diese Implantateinheilung durch Osteogenese führt zu einem Anstieg der sog. Sekundärstabilität. Die Primärstabilität nimmt in den ersten Wochen ab und die Sekundärstabilität (periimplantäre Osteogenese) setzt zeitverzögert ein. Dadurch

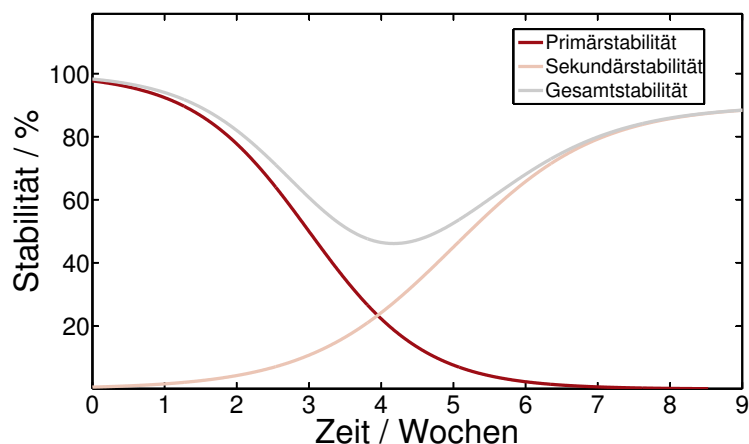


Abbildung 2.4.: Stabilität eines Dentalimplantats im Knochen nach der Implantation, in Anlehnung an [18]

bildet sich ein Minimum in der Gesamtstabilität der Knochen-Implantat-Verankerung bei ca. 3-5 Wochen aus, siehe Abb. 2.4. Während dieser Zeit tritt das häufigste Implantatversagen auf, [18].

Nach 3-6 Monaten kommt es zu einer zweiten Operation, *prosthesis phase*. Dabei wird der eigentliche Zahnersatz auf das osseointegrierte Implantat gesetzt. Um diese zweifache physiologische und psychologische Belastung zu vermeiden und um die gesamte Behandlungsdauer zu verkürzen, liegt ein Schwerpunkt auf der Verkürzung der Einheilphase bis hin zur Sofortbelastung des Implantates. Das reduziert den gesamten Operationsaufwand auf einen chirurgischen Eingriff. Das bedeutet, dass die Osseointegration des Implantates erhöht bzw. beschleunigt werden muss.

Die initiale Knochenbildung und die direkte Knochenablagerung auf der Implantatoberfläche sind entscheidend für eine frühzeitliche Implantatbelastung, [19]. Da der Organismus mit der Implantatoberfläche in Wechselwirkung steht, wird die Osseointegration durch die chemische Zusammensetzung und Topografie der Oberfläche beeinflusst. Aus biomechanischen Gesichtspunkten (Implantatsetzen, Primärstabilität) spielt die Geometrie des Implantates ebenso eine Rolle, [20]. Folglich ergeben sich dadurch verschiedene Ansätze, um die Osseointegration zu erhöhen, die im folgenden Abschnitt näher diskutiert werden.

Tabelle 2.1.: Verschiedene Methoden zur Herstellung von Calciumphosphat-Beschichtungen, in Anlehnung an [28]

Methoden	Schichtdicke	Vorteile	Nachteile
Thermisches Sprühen	30 – 200 μm	Hohe Depositionsraten, niedrige Kosten	Hohe Temperaturen \rightarrow Mischphasen; hohe Kühlraten \rightarrow amorphe Phasen
Sputter Coating	0.5 – 3 μm	Homogene Schichtdicke auf flachen Oberflächen	Hohe Kosten, zeitintensiv
Dip Coating	0.05 – 0.5 μm	Schneller Beschichtungsvorgang, auf komplexen Geometrien anwendbar	Hohe Sintertemperaturen, die thermische Ausdehnung ist ungleich zum Substrat
Sol-Gel	< 1 μm	Auf komplexen Geometrien anwendbar, niedrige Prozesstemperaturen	Teilweise kontrollierte Atmosphäre, hohe Kosten für Ausgangsmaterialien
Elektrochemische Beschichtung	0.1 – 0.2 mm	Homogene Schichtdicke, hohe Depositionsraten, auf komplexen Geometrien anwendbar	Anfällig für Risse, hohe Sintertemperaturen

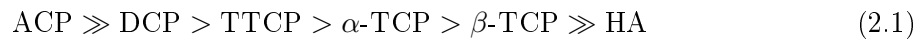
2.3. Implantatoberflächen - Stand der Technik

In der Vergangenheit sind viele Untersuchungen zu Calciumphosphat-Beschichtungen unternommen worden. Zur Zeit verwenden die meisten Hersteller Titandioxidoberflächen, die über verschiedene Verfahren mit einer (dreidimensionalen) Rauheit versehen sind, [8]. Einen weiteren Ansatzpunkt bilden chemisch modifizierte Titandioxidoberflächen, d.h. die Implantatoberflächen werden hinsichtlich freier Oberflächenenergie bzw. Benetzbarkeit modifiziert. In letzter Zeit sind Untersuchungen unternommen worden, Implantatoberflächen mit Proteinen und Wachstumsfaktoren (z.B. BMPs) zu versehen. Die vier Möglichkeiten und deren Korrelation zur Osseointegration werden im folgenden dargestellt und erläutert.

2.3.1. Calciumphosphat-Beschichtungen

Seit den 1970er Jahren werden Beschichtungen mit Calciumphosphaten (CaP) für klinische Anwendungen untersucht, [21]. Es wurde gezeigt, dass durch die CaP-Beschichtungen eine erhöhte Osseokonduktion und dadurch eine verbesserte Osseointegration erzielt wird, [22–27]. Darüber hinaus besitzen Calciumphosphate eine hohe Affinität, Proteine und Wachstumsfaktoren zu adsorbieren, die dann die Differenzierung von Osteoblasten-Vorläuferzellen und osteoklastenähnliche Zellen hervorrufen, [20,23,25,28,29]. Um CaP-Beschichtungen zu erzeugen, wurden verschiedene Methoden verwendet, die an dieser Stelle kurz mit ihren Vor- und Nachteilen in Tab. 2.1 zusammengefasst sind. Die Schwierigkeit bei CaP-Beschichtungen besteht darin, phasenreine Schichten herzustellen. Denn bestehen die Materialien aus verschiedenen Phasen gleichzeitig, z.B. β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und Hydroxylapatit (HA), dann hat

das starke Auswirkungen auf die Löslichkeit des Beschichtungsmaterials. Sie unterscheidet sich je nach Phase und chemischer Zusammensetzung bei physiologischem pH-Wert von 7.4 um Größenordnungen, [5, 6, 30, 31]. Die Löslichkeiten der verschiedenen Calciumphosphate sind nachfolgend in Relation gesetzt, [28]:



ACP steht für amorphes Calciumphosphat, DCP für Monetit (CaHPO_4), TTCP für Tetracalciumphosphat ($\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$), TCP für Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) und HA für Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Eine weit verbreitete Methode zur Erzeugung von HA-Schichten ist das HA-Plasmaspray. Dabei werden CaP- bzw. HA-Partikel durch ein Plasma gesprüht. Durch das Plasma geht die Oberfläche der Partikel in Schmelze und beim Auftreffen auf der Implantatoberfläche bildet sich eine dicke spröde Schicht. Die Temperatur während dieses Prozesses hat zur Folge, dass in einer CaP-Beschichtung unterschiedliche Phasen CaP auftreten, die dann unterschiedlich stark dissoziieren. Deshalb kann es bei diesen Schichten zu Ablösungen einzelner Partikel kommen. Im schlechtesten Fall können abgelöste Partikel zum Implantatversagen führen, [32–35].

2.3.2. Rauheit auf Implantaten

In der Literatur wurde die Rolle der Oberflächenrauheit in Bezug auf die Osseointegration vielfältig beschrieben und diskutiert, [36, 37]. Die Rauheit spielt eine wesentliche Rolle bei der Adsorption von Proteinen und damit verbunden bei der Adhäsion von Osteoblasten. Auch hat sie einen Einfluss auf die Expression von osteogenen Regulatoren, [38, 39]. Es wurde gezeigt, dass raue Implantatoberflächen die Adhäsion, Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten erhöhen, [16, 40, 41]. Darüberhinaus wurden höhere Knochen-Implantat-Kontakte (BIC) und höhere Ausdrehmomente bei Implantaten mit rauen Oberflächen nachgewiesen, [20, 22, 37, 42–44].

Dennoch steigt mit höherer Rauheit das Risiko, dass sich der Bereich zwischen Implantatoberfläche und umliegendem Knochengewebe entzündet (Periimplantitis), induziert durch ionischen Abrieb. Dieser Faktor limitiert die Rauheit der Implantatoberflächen und die meisten Implantatsysteme besitzen daher eine mittlere Rauheit im Bereich von $1 - 2 \mu\text{m}$, [36, 45–49].

Es gibt verschiedene Verfahren, um die Rauheit der Implantatoberfläche zu modifizieren. Die häufigsten Methoden werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

Sandstrahlen (sand/grit-blasting, SLA)

Keramische Partikel werden bei diesem Verfahren mit hohem Druck durch eine Düse geleitet und dadurch mit hoher Geschwindigkeit auf die zu bearbeitende Fläche geschossen. Dabei kommt es zu einer mechanischen Verformung der Oberfläche. In Abhängigkeit von der Partikelgröße sind so unterschiedliche Rauheiten erreichbar und die so generierten Oberflächen verbessern die Osseointegration gegenüber maschinieren Oberflächen, [50, 51]. Jedoch bleiben viele Partikel als Reste auf der Oberfläche fest haften, auch nach anschließender Reinigung durch Ultraschall und Sterilisation, [20, 42]. Häufig werden Aluminiumoxid-Partikel (Korund

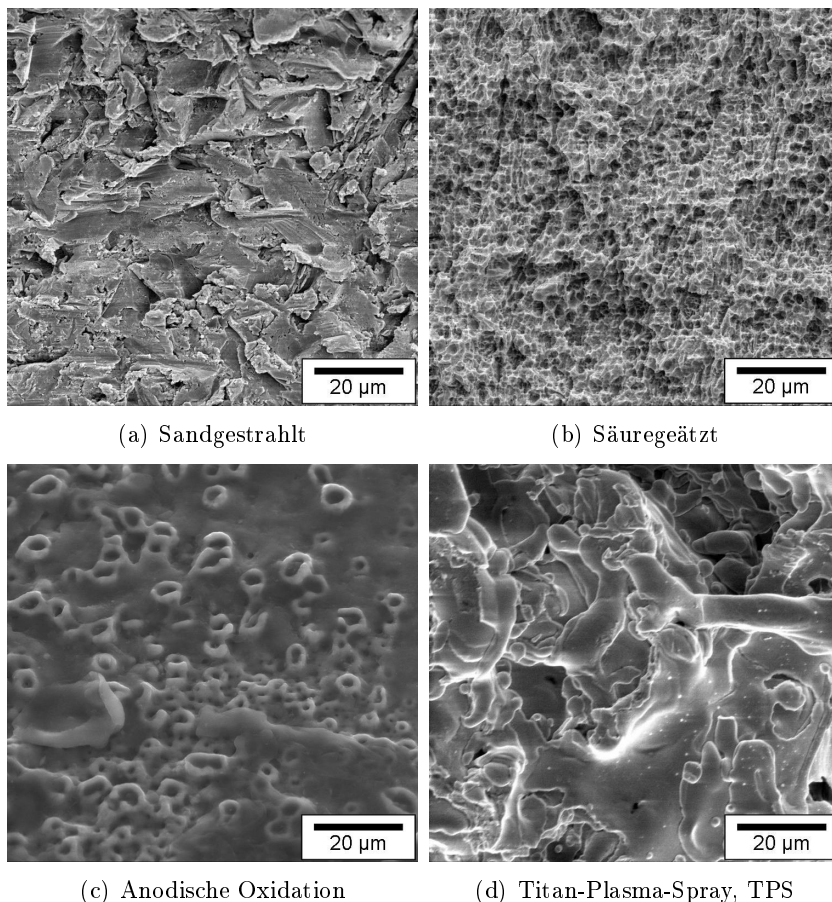


Abbildung 2.5.: REM-Aufnahmen der unterschiedlichen Implantatoberflächen

Al_2O_3 , [20]) verwendet. Al_2O_3 ist biotolerant, kaum in sauren Bedingungen lösbar und daher schlecht von der Oberfläche zu entfernen. Der Einfluss dieser Partikel auf die Langzeitstabilität wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Einerseits wird von Implantatversagen durch Aluminiumoxidrückstände berichtet, [52–54], andererseits gibt es Untersuchungen, die keine Korrelation zwischen Osseointegration und Al_2O_3 -Partikel feststellen können [55,56]. In Abb. 2.5(a) ist eine mit Al_2O_3 gestrahlte Titanoxidoberfläche dargestellt. Darüberhinaus werden auch TiO_2 - oder CaP-Partikel verwendet, [20,47], die von sich aus eine gute Biokompatibilität aufweisen und so zu hohen klinischen Erfolgsraten führen können, [57–59].

Säureätzen (acid-etching)

Bei diesem Verfahren werden die zu behandelnden Oberflächen in ein Säurebad aus HCl , H_2SO_4 , HNO_3 oder HF getaucht, wodurch auf der Titanoberfläche sogenannte *micro pits* in der Größenordnung von $0.5 - 2 \mu\text{m}$ entstehen, siehe Abb. 2.5(b), [20]. Eine weitere Möglichkeit ist, eine Mischung aus HCl und H_2SO_4 zu verwenden und dabei die Temperatur auf über

100 °C zu heizen (dual acid-etching), [44]. Die säuregeätzten Titanoberflächen bewirken ebenfalls eine Erhöhung der Osseointegration, [36,60]. Es hat sich gezeigt, dass der osteokonduktive Prozess durch Anlagerung von Fibrin und osteogener Zellen verbessert werden kann [61].

Einige Hersteller verwenden eine Kombination aus Sandstrahlen und Säureätzen. Durch die Partikel entstehen Strukturen in der Größenordnung der Strahlpartikel, die dann durch die Micro-Pits nach dem Säureätzen überlagert werden, siehe Abb. 2.5(b), [62,63].

Anodische Oxidation

Die Anodische Oxidation ist ein elektrochemisches Verfahren. Durch potentiostatisches oder galvanostatisches Anodisieren der Titanoberfläche in einer starken Säure (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HNO_3 , HF) wird Sauerstoff an der Anode (Implantat) angelagert. Beim galvanostatischen Anodisieren liegt die Stromdichte in der Größenordnung von 200 A/m^2 , beim potenziostatischen liegt die Spannung in der Größenordnung von 100 V, [20]. Die erzeugten Strukturen und die Dicke der Oxidschicht sind dabei abhängig von der Konzentration und Art der Säure, der Prozesstemperatur, der Spannung und ob Funkenüberschlag stattfindet. In Abb. 2.5(c) ist eine Titandioxidoberfläche des Implantatsystems TiUnite® (Fa. Nobel Biocare) dargestellt. Charakteristisch sind die Mikro- und Nanoporen, die durch Funkenüberschlag entstehen. [43,64,65]. Weiterhin gibt es die Möglichkeit, die chemische Zusammensetzung der Titandioxidoberfläche durch Magnesium-, Calcium-, Schwefel- oder Phosphorinkorporationen zu verändern, [66,67].

Titan-Plasma-Spray

Bei dem Plasma-Spray-Verfahren wird hauptsächlich Pulver aus reinem Titan durch ein (Argon-) Plasma gesprüht (Titan-Plasma-Spray, TPS). Durch die hohe Temperatur des Plasmas wird das Pulver an der Oberfläche angeschmolzen und trifft danach auf die zu beschichtende Oberfläche, kühlt schnell ab und ist dauerhaft fixiert. Die Schichtdicken derartiger Beschichtungen betragen $40 - 50 \mu\text{m}$ und besitzen Rauheiten im Bereich von $7 \mu\text{m}$ [20,68]. Wie im Abschnitt 2.3.1 beschrieben, wird dieses Verfahren aber auch für andere Beschichtungsmaterialien verwendet wie z.B. Hydroxylapatit [25,26] und findet große Anwendung bei orthopädischen Implantaten. Jedoch wird teilweise von abgelösten Titanpartikeln berichtet, die an anderen Stellen im Körper auftreten können [69,70].

2.3.3. Hydrophile Implantate

In Abschnitt 2.2 wurde beschrieben, dass in den ersten Tagen Proteine auf der Implantatoberfläche adsorbieren. Dieser Prozess ist natürlich abhängig von der chemischen Zusammensetzung und der Ladung der Oberfläche bzw. der Oberflächenenergie. Die reine TiO_2 -Oberfläche ist hydrophil. Aber nach der Herstellung ist die Oberfläche der normalen Atmosphäre ausgesetzt. So kommt es, dass die meisten Implantatoberflächen eine hydrophobe Oberfläche aufweisen, die durch Adsorption organischer Ketten aus der Atmosphäre hervorgerufen werden, [62,71–75]. Dieser Effekt läuft auch unter Sterilverpackung ab. Demzufolge wurden Untersuchungen unternommen, durch hydrophile Implantate die Osseointegration zu steigern.

Die dabei verwendeten Implantate besitzen ebenfalls eine durch die beschriebenen Verfahren hergestellte Rauheit, nur werden sie anschließend unter Schutzgas oder in steriler Kochsalzlösung verpackt, um Kontaminationen aus der Luft zu vermeiden, [74, 76]. In verschiedenen *in vivo* Studien wurde eine bessere Osseointegration gerade in den ersten Tagen beschrieben und nachgewiesen, [77–84]. Auch wird über einen höheren Anteil BMP-2-positiver Zellen nach 8 Tagen berichtet, [85]. Trotzdem gibt es auch Untersuchungen, die keine Auswirkung auf die Osseointegration hydrophiler Oberflächen feststellen können, [86].

2.3.4. Wachstumsfaktoren

In den letzten Jahren wurde versucht, Implantatoberflächen mit osteogenen Wirkstoffen (TGF, Transforming Growth Factors) zu versehen. Das ist eine Gruppe von Signalmolekülen, welche die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) als Untergruppe beinhalten. Durch die Verwendung von BMPs besteht die Möglichkeit, Implantaten eine osteoinduktive Eigenschaft zu verleihen, [87–89]. BMPs stimulieren die Proliferation und Differentiation von Osteoprogenitorzellen, aber auch von Osteoklasten, [90]. Allerdings wurde gezeigt, dass die Menge der applizierten Faktoren entscheidend ist, zumal eine Überdosis die Produktion von BMP-Inhibitoren nach sich zieht, [91, 92]. Darüberhinaus kann eine Überdosis auch zu unkontrollierter Knochenbildung führen, [93, 94].

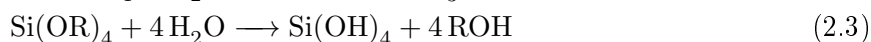
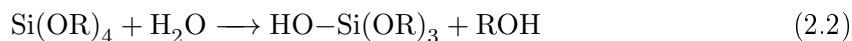
2.4. Sol-Gel-System SiO_2

Eine Komponente der in dieser Arbeit beschriebenen Schicht ist die SiO_2 -Matrix. Zur Herstellung dieser Matrix wird das Sol-Gel-Verfahren verwendet. Das Verfahren wird an dieser Stelle allgemein am System SiO_2 über Alkoxide als Precursor beschrieben.

Ein Sol ist eine kolloidale Suspension fester Partikel in einer Flüssigkeit. Unter einer kolloidalen Suspension versteht man allgemein ein System, das dispergierte Partikel in der Größenordnung von 1-1000 nm enthält. Aufgrund dieser Größe und der damit verbundenen kleinen Masse spielt die Gravitation keine wesentliche Rolle und die Teilchen unterliegen der Brownschen Bewegung. Die Wechselwirkung der Partikel geschieht durch kurzreichweitige Wechselwirkungen wie van der Waals- oder Coulombwechselwirkung aufgrund von Oberflächenladungen, [95]. Durch eine Kondensationsreaktion können die dispergierten Partikel vernetzen und bilden somit ein Gel. Je nach Herstellung (Lösungsmittel, Trocknungsprozedur usw.) bilden sich Alkogelee oder Hydrogele bzw. Xerogelee oder Aerogelee. In diesem Abschnitt wird der Sol-Gel-Prozess am System SiO_2 erläutert, wobei der Fokus nur auf einen Teil dieses Themengebietes im Hinblick auf die beschriebenen Strukturen in Kap. 7 gelegt wird.

2.4.1. Hydrolyse

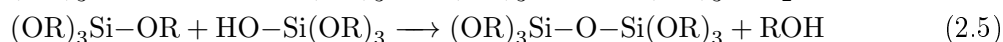
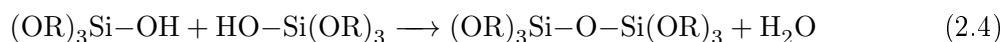
SiO_2 -Sole mit Alkoxiden als Precursor werden über eine Hydrolysereaktion hergestellt. In wässriger Lösung wird dabei ein Ligand R vom Silizium-Alkoxid abgetrennt und durch ein Hydroxyl-Ion ersetzt, Gl. 2.2. Es entsteht der entsprechende Alkohol. In Abhängigkeit von der Wassermenge (r_W), Lösungsmittel (r_L) und der Art des Katalysators kann dieser Prozess viermal ablaufen, sodass alle OR-Gruppen durch OH-Gruppen ersetzt sind, Gl. 2.3. Der Grad der Hydrolyse gibt somit an, wieviele OH-Gruppen sich am Si-Atom befinden (teilweise oder vollständige Hydrolyse), [95,96].



In der vorliegenden Arbeit wurde als Ausgangsmaterial (Precursor) Tetraethylorthosilikat (TEOS) verwendet. Das TEOS-Molekül ist in Abb. 2.6(a) dargestellt und besteht aus einem Siliziumatom mit vier Sauerstoffatomen bzw. vier Ethylgruppen als Liganden. Per Hydrolyse werden die Ethylgruppen vom TEOS-Molekül unter Entstehung von Ethanol abgetrennt und es bilden sich OH-Gruppen am Si-Atom aus.

2.4.2. Kondensation

Die während der Hydrolyse entstandenen $\text{Si}(\text{OH})_4$ -Tetraeder können sich vernetzen, indem sie eine (Si-O-Si)-Bindung ausbilden. Dabei entsteht Wasser, Gl. 2.4 oder Ethanol, Gl. 2.5.



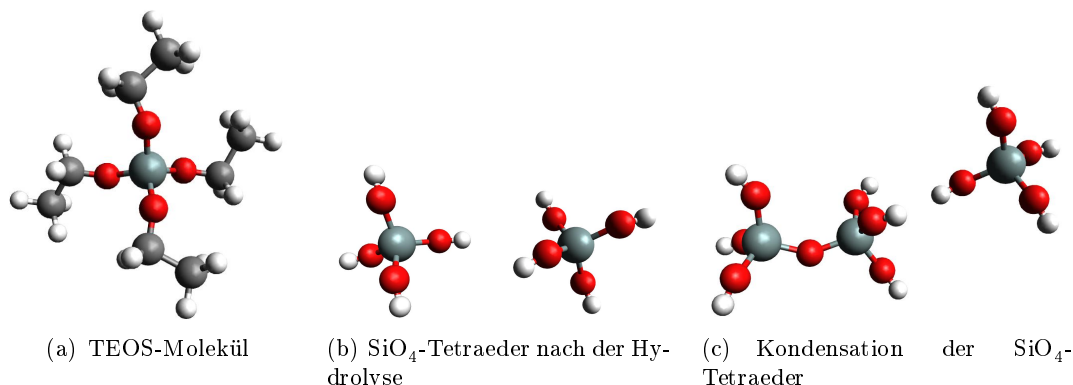


Abbildung 2.6.: Hydrolyse und Kondensation des SiO_2 mit einem Alkoxid als Precursor, schematisch

Weitere hydrolysierte Moleküle können mit den bereits kondensierten Molekülen über eine Si-O-Si-Bindung anbinden und je nach Grad der Hydrolyse, teilweise oder vollständig, können sich so die verschiedensten Strukturen ausbilden. Die Anzahl der Bindungen, die ein SiO_4 -Tetraeder bilden kann, wird als *Funktionalität* f bezeichnet. Je nach Höhe der Funktionalität sind Dimere, lineare Ketten oder Ringstrukturen realisierbar, [95, 96]. Durch Quervernetzung (*crosslink*) kann man so dreidimensionale Netzwerke aufbauen.

2.4.3. Sol-Gel-Übergang

Generell laufen die beiden Reaktionen Hydrolyse und Kondensation gleichzeitig ab. D.h. bereits kurz nach der Hydrolyse entstehen Monomere, Dimere bzw. ringartige Strukturen. Diese Strukturen werden kurz nach Reaktionsbeginn erzeugt und sind dann über längere Zeit stabil, [97, 98]. Gerber et al. untersuchten die Strukturbildung in TEOS-Lösungen für $r_w > 2$ mit Röntgenbeugungsmethoden (SAXS, WAXS). Es wurde gezeigt, dass bereits nach wenigen Minuten konkrete Ring- oder Polyederstrukturen entstehen, [99]. Die Größe dieser sog. *Primärteilchen* änderte sich im weiteren zeitlichen Verlauf (Gelbildung, Trocknung) nicht mehr, Tab. 2.2. Generell läuft die Gelbildung nach Iler [96] in drei Stufen ab:

1. Polymerisation von Monomeren, Dimeren bis zu Partikeln.
2. Partikelwachstum.
3. Vernetzung der Partikel zu Ketten bzw. Netzwerken.

Dabei unterteilt Iler die Polymerisation in drei unterschiedliche pH-Bereiche: $\text{pH} < 2$, $\text{pH} 2-7$ und $\text{pH} > 7$. Bei $\text{pH} 2$ besitzt SiO_2 den *isoelektrischen Punkt* (IEP) d.h. die Oberflächenladung ist in der Summe Null. Dadurch wird die Gelbildung minimiert. Zwischen $\text{pH} 2$ und $\text{pH} 7$ befinden sich negative Ladungen auf der Oberfläche. Dadurch wird die Kondensation beschleunigt. Die Gelbildungszeit durchläuft bei ca. $\text{pH} 4-6$ ein Minimum. Ab $\text{pH} 7$ befinden sich so große Ladungen, dass es zu Coulombabstoßung zwischen den Teilchen kommt. Der

gesamte Prozess der Strukturbildung von wässrigem Silica ist in Abb. 2.7 schematisch dargestellt. In basischer Lösung tritt ein Partikelwachstum bei gleichzeitiger Abnahme der Anzahl der Partikel auf (Ostwald-Reifung). In saurer Lösung hingegen aggregieren sie zu dreidimensionalen Netzwerken und bilden Gele, [95]. Über diese Aggregationsprozesse ist es möglich, die verschiedensten Netzwerkstrukturen aufzubauen. Z.B. ist es möglich, hochporöse Strukturen zu erzeugen. Ein Primärteilchennetzwerk bildet Cluster, Abb. 2.8(c), die wiederum zu einem Cluster-Cluster-Netzwerk kondensieren. Dadurch entstehen selbstähnliche Strukturen - Fraktale, [96, 100, 101]. Der Trocknungsprozess spielt dabei eine entscheidene Rolle. Aufgrund des Phasenübergangs beim Trocknungsprozess kommt es zu Kapillarkräften unter denen das Netzwerk kollabiert. Dann spricht man von einem Xerogel. Durch überkritische Trocknung kann dieser Prozess umgangen werden und das Netzwerk bleibt bestehen, [102]. Diese Gele werden als Aergele bezeichnet.

2.4.4. Vergleich SiO_2 -Gele, -Gläser, -Kristalle

Die Grundstruktur der verschiedenen SiO_2 -Formen bildet immer der SiO_4 -Tetraeder, bei dem ein Siliziumatom von vier Sauerstoffatomen umgeben ist. Über Si-O-Si-Bindungen sind diese Tetraeder miteinander verknüpft und bilden dreidimensionale Strukturen aus. Je nach Anordnung und Ordnung dieser Tetraeder lässt sich Siliziumdioxid folgendermaßen (mit zunehmender Unordnung) einteilen:

- kristallines SiO_2
- SiO_2 -Glas (amorph)
- SiO_2 -Gel (amorph)

Die Tetraeder in kristallinem Siliziumdioxid sind zu einer periodischen Gitterstruktur angeordnet, siehe Abb. 2.8(a). Dabei ist jedes Si-Atom von vier O-Atomen umgeben und somit vierfach koordiniert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Struktur in zwei Dimensionen dargestellt. Die kristalline Struktur stellt sich im thermodynamischen Gleichgewicht ein.

Tabelle 2.2.: Primärpartikelgröße in wässriger TEOS-Lösung (molare Verhältnisse, TEOS : H_2O : $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$: HCl = 1 : 10 : 6 : 0.02). Bereits kurz nach Reaktionsbeginn sind Polyederstrukturen in der Lösung, die sich im weiteren Verlauf (Gelbildung, Trocknung) nicht mehr stark verändern. Mit R_g -Guinierradius und t_g -Gelbildungszeit, aus [99].

t	t/t_g	R_g in nm	t	t/t_g	R_g in nm
30 min	0.0003	0.26	30 d	0.429	0.58
60 min	0.0006	0.32	50 d	0.714	0.55
90 min	0.0009	0.38	65 d	0.929	0.56
120 min	0.0012	0.39	90 d	1.286	0.56
150 min	0.0015	0.42			
180 min	0.0018	0.45			

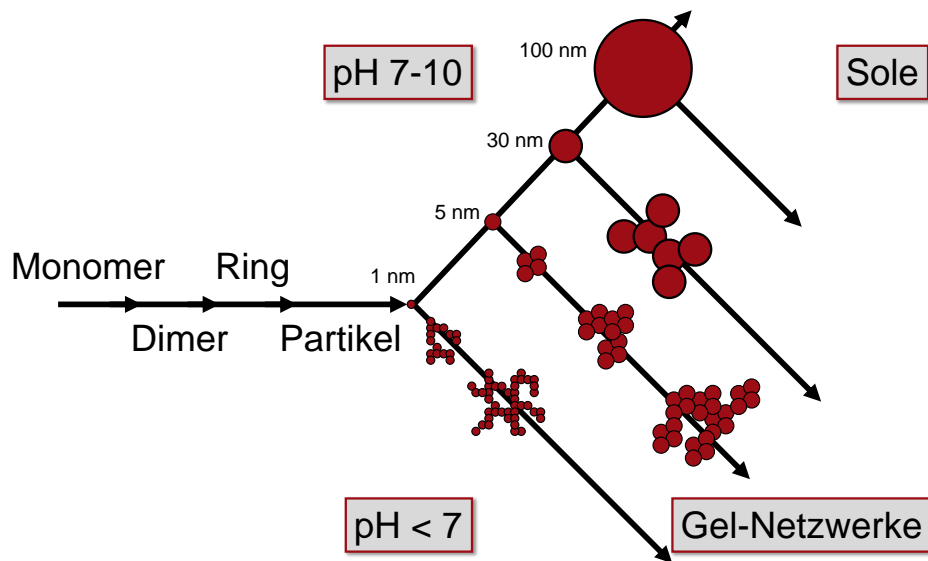


Abbildung 2.7.: Strukturbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert, nach Iler [96]

Im Gegensatz zu den SiO_2 -Kristallen besitzen SiO_2 -Gläser keine weitreichende Periodizität. Sie werden aus der Schmelze durch Abkühlen nach Durchlaufen des Glasübergangs hergestellt. Strukturell entspricht Glas einer unterkühlten Flüssigkeit. Im reinen SiO_2 -Glas (Kieselglas) bilden die Tetraeder auch über Si-O-Si-Bindungen Netzwerke aus, bei denen das Si-Atom vierfach koordiniert ist, siehe Abb. 2.8(b). Auch hier sind 6er-Ringe die maßgebende Einheit, mit dem Unterschied, dass die Anordnung dieser Ringstrukturen zu keiner langreichweitigen Ordnung führt. Durch Verdrehungen der einzelnen Tetraeder zueinander, geht die Gitterstruktur verloren.

Die SiO_2 -Gele sind weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt. Sie bestehen ebenfalls aus Tetraedern, die sich zu einem Netzwerk verbinden. Der entscheidende Unterschied zu den Gläsern ist das Vorhandensein von offenen Bindungen. D.h. teilweise befinden sich an einigen Sauerstoffatomen offene Bindungen, Wasserstoffatome (OH-Gruppen) oder aber auch Alkyl-Gruppen - je nach Herstellung und pH-Wert. In Abb. 2.8(c) ist ein SiO_2 -Gel beispielhaft dargestellt. Durch Temperaturbehandlung kann ein Gel in ein Glas und weiter in einen Kristall überführt werden.

SiO_2 -Gele haben in wässrigen Lösungen bei pH 2 den isoelektrischen Punkt, d.h. es ist nach außen elektrisch neutral, weil die offenen Bindungen mit Protonen abgesättigt sind. Bei pH 7, wie in lebenden Organismen, befindet sich hauptsächlich O^- -Ionen an der Oberfläche.

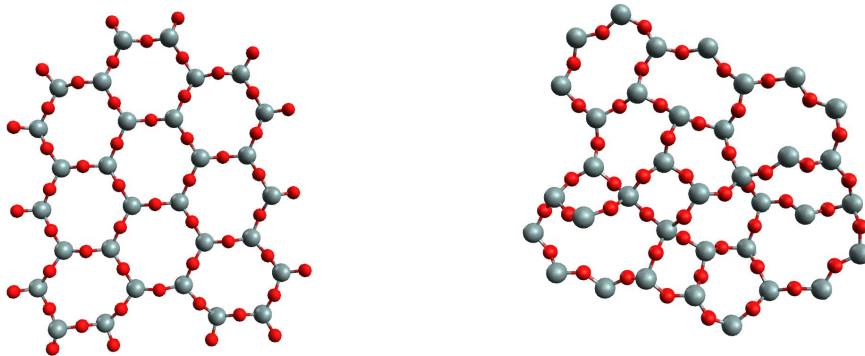
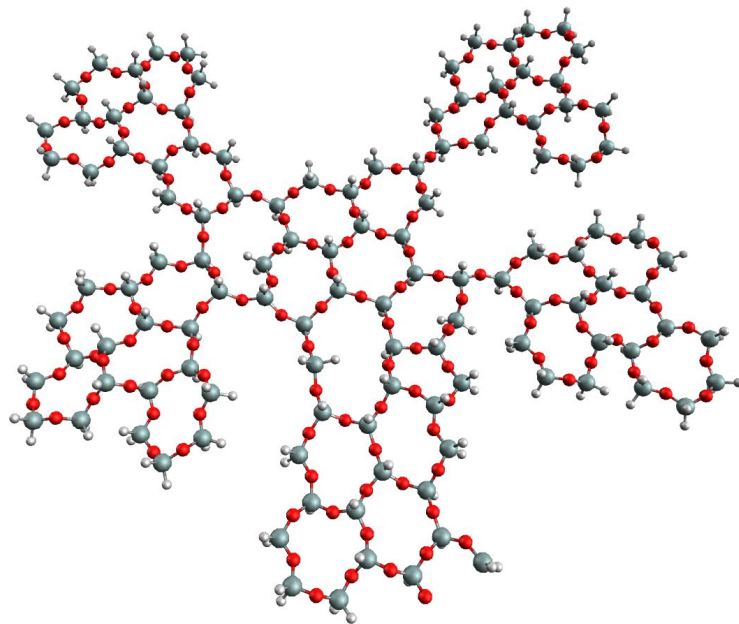
(a) kristallines SiO_2 , 6er Ringe(b) SiO_2 -Glas(c) SiO_2 -Gel

Abbildung 2.8.: Die verschiedenen SiO_2 -Strukturen schematisch. Von (a) nach (c) mit zunehmender Unordnung.

2.5. NanoBone[®] - Technologie

Die NanoBone[®] -Technologie (NB) bildet die Basis für mehrere Anwendungsformen im Bereich Knochenaufbaumaterialien. Es gibt drei verschiedene Anwendungsformen, die sich seit längerer Zeit im klinischen Einsatz befinden. Ein Granulat (NanoBone[®] | granulate), das in Verbindung mit körpereigenem Blut eine pastöse Konsistenz erlangt, ein Formkörper (NanoBone[®] | block), der im Vergleich zum Granulat formstabil ist und eine Paste (NanoBone[®] |

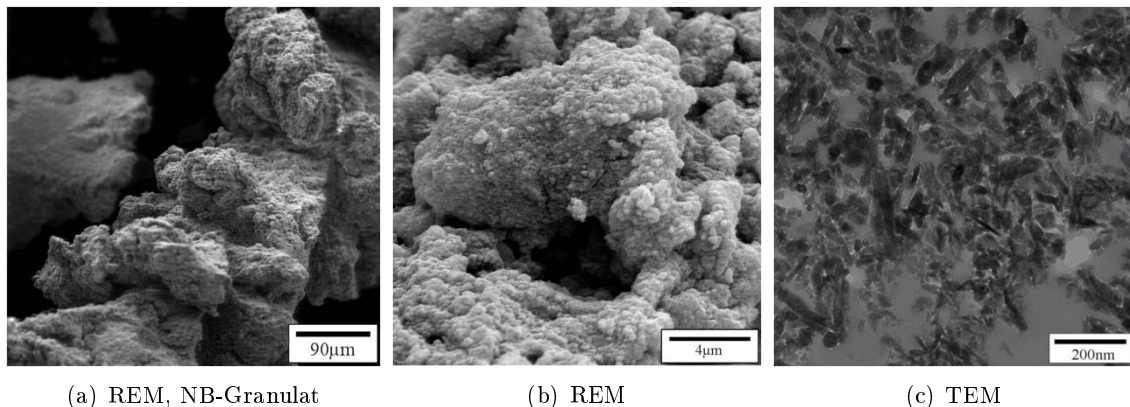


Abbildung 2.9.: Die Struktur des NanoBone[®]-Granulats

putty), die „ready to use“ appliziert werden kann. Grundlegend bestehen diese Materialien aus einer hochporösen SiO_2 -Gelmatrix (Silicamatrix), in die nanokristalliner Hydroxylapatit eingebettet ist. In den folgenden Abschnitten werden die Struktur und die daraus resultierende Wirkungsweise erläutert. Ein wichtiger Effekt dabei ist der sog. Matrixwechsel des Materials.

2.5.1. SiO_2 -Matrix

Die SiO_2 -Matrix wird über den Sol-Gel-Prozess gewonnen, wobei ein SiO_2 -Sol unter sauren Bedingungen hergestellt wird. Nach Zugabe von nanokristallinem Hydroxylapatit (HA) findet der Sol-Gel-Übergang statt und das SiO_2 -Sol kondensiert in ein Silica-Xerogel. In Abb. 2.9 sind die Makro- (a) und Mikrostruktur (b) anhand von REM-Aufnahmen des Granulats dargestellt. Die Makrostruktur ist gekennzeichnet durch tannenzapfenförmige Granulatkörner, die dadurch eine hohe Oberfläche besitzen und eine lockere Packung aufweisen. Der Mikrometerbereich ist ebenfalls durch eine Porosität gekennzeichnet. Die Nanostruktur (c) ist durch eine TEM-Aufnahme erkennbar. Die dunklen plättchenförmigen Strukturen sind der Hydroxylapatit, vgl. Abs. 2.6. Die SiO_2 -Matrix besteht aus SiO_2 -Polyedern, Abs. 2.4, die ein Xerogel-Netzwerk ausbilden, was bei einem pH-Wert von 7 eine negative Oberfläche (OH^- -Gruppen) besitzt, [103–105]. Zusätzlich ist das Gelnetzwerk hochporös. Die Porosität des Granulats beträgt je nach SiO_2 -Anteil 152 g/m^2 (NB S24, 24 wt%) bzw. 207 g/m^2 (NB S39, 39 wt%), wobei die meisten Poren eine Größe von $10 - 50 \mu\text{m}$ besitzen, [106, 107].

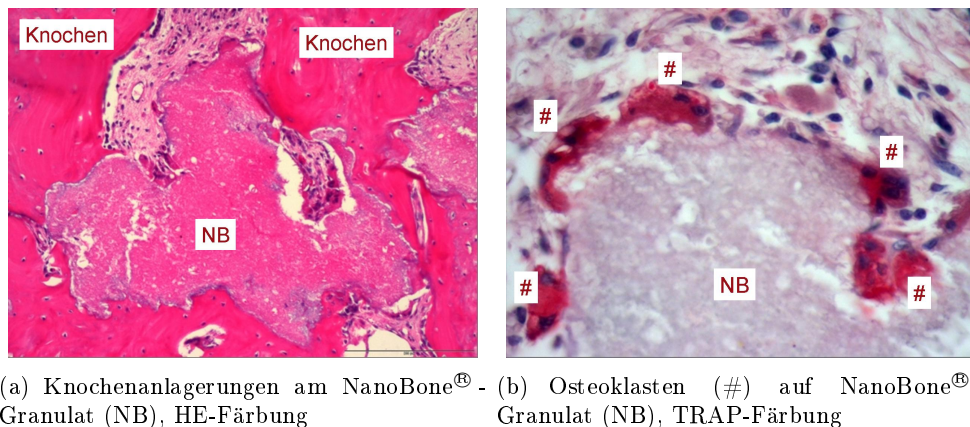


Abbildung 2.10.: Knochenumbau des NB-Granulats

2.5.2. Wirkungsweise und Matrixwechsel

NB wird (bis auf NB putty) mit körpereigenem Blut angemischt und in den Knochendefekt eingebracht, [108]. Durch die negative Oberfläche kommt es zur Proteinadsorption in die Nanoporen, [109,110]. Götz et al. [109] fanden in einer Tierstudie am Minipig-Modell heraus, dass die SiO_2 -Matrix innerhalb von 5 Wochen durch eine organische Matrix ersetzt wurde. Diese bestand aus einzelnen Kollagenfibrillen und enthielt die Knochenproteine Osteopontin, Osteocalcin und BMP-2. Anschließend wird das Granulat durch Osteoklasten abgebaut und neuer Knochen durch Osteoblasten aufgebaut. Das Material nimmt am Knochenremodelling teil.

In Abb. 2.10(a) ist ein histologischer Schnitt (HE-Färbung) von einem Granulat-Stück dargestellt. Zu erkennen sind Osteoblasten, die neuen Knochen auf der Oberfläche des Biomaterials ablagern. In Abb. 2.10(b) ist ebenfalls ein histologischer Schnitt dargestellt. Anhand einer TRAP-Färbung (osteoklastenspezifische Färbung) sind die Osteoklasten auf dem Granulat-Korn nachweisbar. Eine weitere Studie von Xu et al. [106] hat den Matrixwechsel bei früheren Zeitpunkten in Ratten untersucht. Es wurde festgestellt, dass der Austausch der Silicamatrix innerhalb weniger Tage abläuft (je nach Defektgröße), siehe Abb. 2.11. Dabei ging der Austausch des SiO_2 einher mit der Vaskularisierung des Defektes, die von außen nach innen fortschritt. Darüberhinaus wurde ein osteoinduktives Verhalten im Minipig nachgewiesen, [111,112]. Im subkutanen Gewebe konnten Vorzeichen von Osteogenese und daraus entwickelte knochenähnliche Strukturen nachgewiesen werden. Der Matrixwechsel wurde als Erklärung für die schnelle Degradierung durch Osteoklasten und die Knochenproduktion durch Osteoblasten herangezogen. Die Wirkungsweise des Materials wird durch den Austausch der SiO_2 -Matrix durch körpereigene Proteine, die an der Knochenbildung beteiligt sind (Osteocalcin, BMP-2, Osteopontin usw. [109]), hervorgerufen.

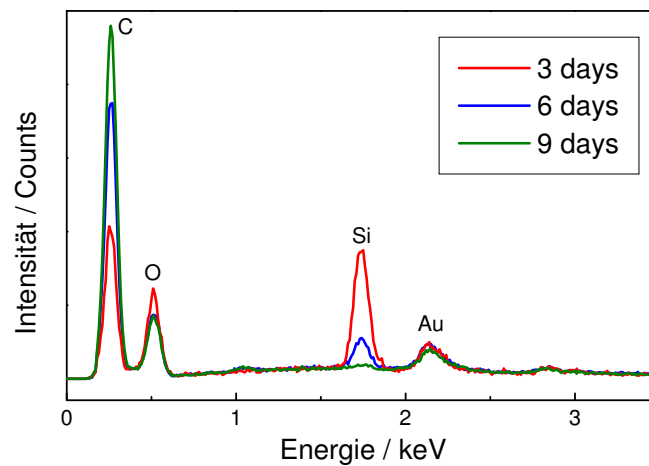


Abbildung 2.11.: EDX-Spektren des Granulats nach 3, 6 und 9 Tagen in der Ratte. Der Austausch der SiO_2 -Matrix durch eine organische Matrix (Matrixwechsel) läuft je nach Größe des Defekts innerhalb von ca. 10 Tagen ab, entnommen aus [106].

2.6. Synthetischer Hydroxylapatit

Die zweite Komponente der hier beschriebenen Schicht ist nanokristalliner, synthetischer Hydroxylapatit (ncHA $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Dieser wurde über eine Fällungsreaktion bei einem pH-Wert von 7.8 hergestellt. Die Zusammensetzung nach Herstellung bei diesem FällungspH-Wert ist nichtstöchiometrisch, d.h. einige Phosphatgruppen sind durch Hydrogenphosphat substituiert. Infolgedessen kommt es zu einem verringerten Ca/P-Verhältnis und man bezeichnet das als calciumdefizitär. Das Verfahren zur Herstellung des synthetischen HAs wurde im Rahmen der Arbeit von Ulf Weber entwickelt und beschrieben, [113]. Im Abs. 5.3 wird auf die Herstellung etwas genauer eingegangen.

In Abb. 2.13 sind zwei Diffraktogramme von dem ncHA und dem HA im menschlichen Knochen (bone) dargestellt. Beim Knochen sind alle Peaks stark verbreitert, was aus der geringen Kristallitgröße resultiert. Damit verbunden ist die Größe der HA-Plättchen, da die Plättchen nicht polykristallin sind. Im Vergleich der beiden Kurven hinsichtlich Peakbreiten, Peakhöhen und Intensitätsverhältnisse wird deutlich, dass der synthetische HA *morphologisch* identisch zum Hydroxylapatit im Knochen ist. Weiterhin sind alle Peaks in beiden Kurven zur Phase Hydroxylapatit zuzuordnen, d.h. der synthetische Hydroxylapatit ist phasenrein und es befinden sich keine anderen Phasen wie z.B. β -TCP im Material.

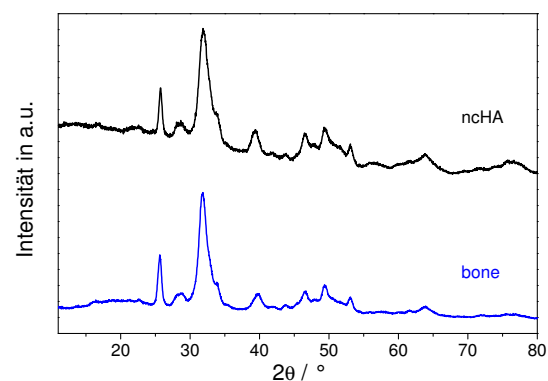
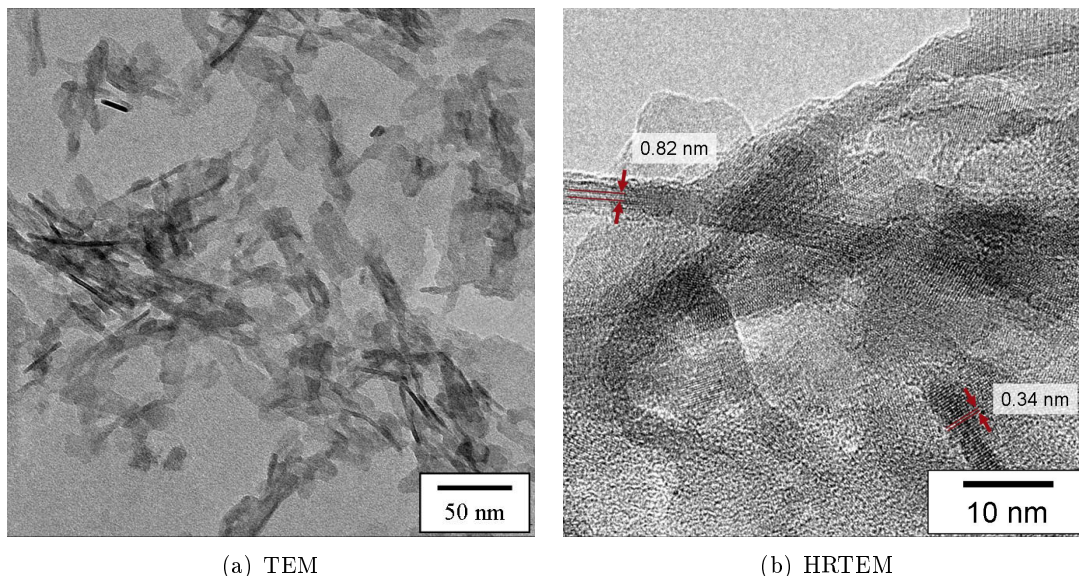


Abbildung 2.13.: XRD HA und Knochen



(a) TEM

(b) HRTEM

Abbildung 2.12.: In der TEM-Aufnahme (a) wird die plättchenartige Morphologie des HAs deutlich. In der HRTEM-Aufnahme (b) sind die Orientierungen der Netzebenen erkennbar $d_{100} = 0.82$ nm $d_{002} = 0.34$ nm.

In Abb. 2.12(a) ist eine TEM-Aufnahme des synthetischen HAs dargestellt. Die Morphologie des synthetischen Hydroxylapatits ist gekennzeichnet durch plättchenförmige Partikel im Nanometerbereich. Die Plättchen weisen 50 nm in der Länge, 20 nm in der Breite und 3 – 4 nm in der Dicke auf. Die Dicke der Plättchen ist in der Abbildung als dunkle, nadelförmige Struktur zu erkennen. Das ist dann der Fall, wenn die HA-Plättchen parallel zum einfallenden Elektronenstrahl orientiert sind. Im Vergleich zu humanem Hydroxylapatit wird eine hohe morphologische Ähnlichkeit deutlich, vgl. Abb. 2.3. Denn humanes HA besitzt ebenfalls eine plättchenförmige Morphologie. Die Größe der Plättchen ist mit der Größe des synthetischen HAs identisch, [113].

In Abb. 2.12(b) (HRTEM) ist die Kristallstruktur des HAs dargestellt. Die Länge des Plättchens ist entlang der c-Achse der Einheitszelle ausgerichtet ($d_{002} = 0.34$ nm) und die Dicke in Richtung der a-Achse ($d_{100} = 0.82$ nm), [5, 6, 113]. Die HA-Plättchen sind monokristallin und weisen auf ihrer Oberfläche eine dünne amorphe Schicht von 0.25 nm auf, [113]. Die Einheitszelle vom HA ist in Abb. 2.14 gezeigt. Sie besitzt eine hexagonale Symmetrie (Raumgruppe $P6_3/m$). Die c-Achse ist senkrecht zur Bildebene.

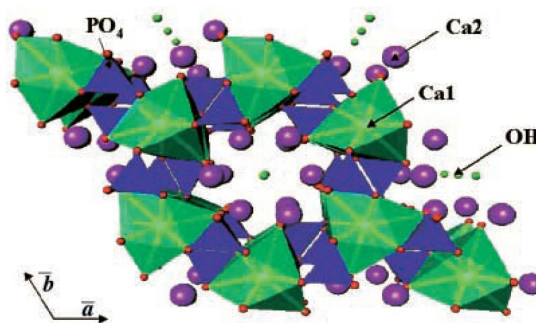


Abbildung 2.14.: Kristallstruktur des Hydroxylapatits entlang der c-Achse, aus [114]

3. Untersuchungsmethoden

Im vorliegenden Kapitel werden die verwendeten Methoden, Geräte und die damit verbundenen Parameter angeführt. Es soll einen kurzen Überblick geben, um die daraus resultierenden Ergebnisse einordnen zu können.

3.1. Stereo-Rasterelektronenmikroskopie (3D-REM)

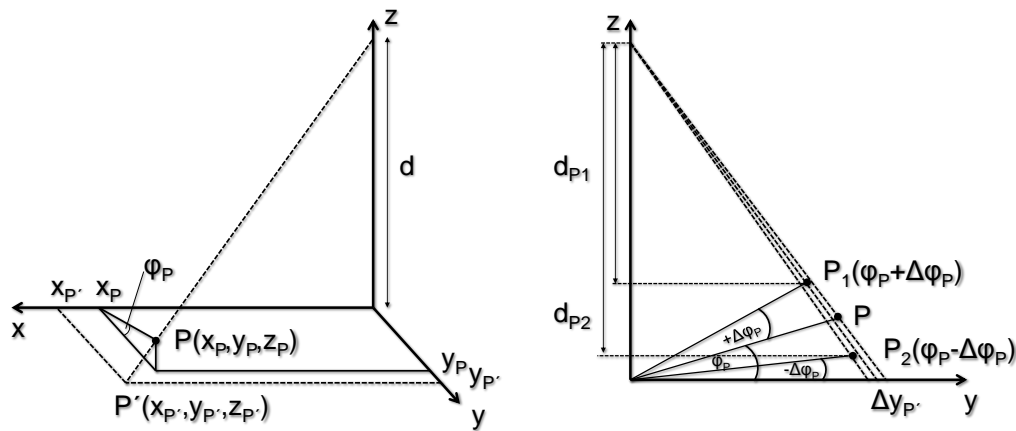
Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen besitzen eine dreidimensionale Erscheinung, die z.B. durch den sog. Kanteneffekt bewirkt wird. Dennoch gibt es innerhalb eines REM-Bildes keine Tiefeninformationen über die gemessene Oberfläche. Vielmehr ist es eine Intensitätsverteilung von Sekundärelektronen (SE) oder Rückstreuelektronen (BSE), [115,116]. Es besteht aber die Möglichkeit durch zwei gegeneinander verkippte Bilder ein und derselben Fläche, die dritte Dimension zu errechnen. Dazu werden zwei Bilder der Probe aufgenommen, die gegen eine Achse, im vorliegenden Fall die x-Achse, um den Winkel $\Delta\varphi$ euzentrisch verkippt sind. $P(x_P, y_P, z_P)$ sei ein Punkt der Oberfläche, den es zu bestimmen gilt. $P'(x_{P'}, y_{P'}, z_{P'})$ ist die Projektion in die Referenzebene, Abb. 3.1(a). Die Länge d ist der Arbeitsabstand des Mikroskops. φ_P ist der Winkel zwischen kürzester Entfernung von der Kippachse (x-Achse) zu P und der Projektion in die Referenzebene der kürzesten Entfernung zu P. Bei euzentrischer Kippung um $\pm\Delta\varphi_P$, Abb. 3.1(b), unterliegt die Projektion P' einer Paralaxe $\Delta y_{P'}$. Es ergibt sich daher für die Koordinaten eines jeden Bildpunktes, mit den Indizes 1 und 2 für das erste bzw. das zweite Bild, [116]:

$$x_P = \frac{d_{P1} + d_{P2} - z \cos \Delta\varphi_P}{d_{P1}/x_1 + d_{P2}/x_2} \quad (3.1)$$

$$y_P = \frac{z (\cos \Delta\varphi_P (y_{P'1} + y_{P'2}) + \sin \Delta\varphi_P (d_{P1} - d_{P2})) - (y_{P'1}/d_{P1} + y_{P'2}/d_{P2})}{\Delta y_{P'} \sin \Delta\varphi_P - (d_{P1} + d_{P2}) \cos \Delta\varphi_P} \quad (3.2)$$

$$z_P = \frac{\Delta y_{P'} \cos \Delta\varphi_P + y_1 y_2 (1/d_{P1} + 1/d_{P2}) \sin \Delta\varphi_P}{(1 + y_{P'1} y_{P'2} / d_{P1} / d_{P2}) \sin(2\Delta\varphi_P) + (y_{P'1}/d_{P1} - y_{P'2}/d_{P2}) \cos(2\Delta\varphi_P)} \quad (3.3)$$

Die Bestimmung der Koordinaten wird in der Regel von einer Software übernommen. In dieser Arbeit wurden dreidimensionale Rekonstruktionen (dreidimensionales Oberflächenmodell, DOM) aus Stereo-Triplets mit Winkeln $\varphi = -5^\circ, 0^\circ, +5^\circ$ mit der Software MeX 5.1 der Fa. Alicona angefertigt. Bei der Rechnung mit drei Bildern (Stereo-Triplets) wird eine Mittelung über die drei möglichen Stereo-Paare durchgeführt, [116]. Anhand der berechneten Koordinaten ist es möglich, Parameter wie z.B. die Rauheit der Oberfläche zu bestimmen, Abschnitt 3.2.



(a) Projektion eines Punktes P der Oberfläche in die Bild-Ebene
 (b) Kippung um den Winkel $\Delta\varphi$ und die daraus resultierende Verschiebung des Punktes P in der Projektion $\Delta y_{P'}$

Abbildung 3.1.: Die fehlende z -Komponente in REM-Aufnahmen kann mit Hilfe von Kippbildern errechnet werden. Die Projektion P' eines Punktes P der Oberfläche in die Bildebene (a) verschiebt sich bei euzentrischer Kippung um eine Achse (hier: x -Achse) um $\Delta y_{P'}$, (b). Aus diesen Informationen ist Höhen- oder Tiefeninformation berechenbar. In Anlehnung an [116].

3.2. Bestimmung der Rauheit

Die Gestalt einer Oberfläche ist allgemein charakterisiert durch die Form, Rauheit und Welligkeit (nach DIN 4760:1982). Bei Implantaten wird die Form durch die Gewindegeometrie und durch die makroskopischen Abmessungen ansich bestimmt. Die Welligkeit wird ebenfalls durch die Gewindegeometrie aber auch durch die meist runde Form dentaler Implantate bestimmt. Zur Messung der Rauheit von Implantatoberflächen werden häufig Laser Scanning Profilometry (LSP) [37,47,117], Tastschnittverfahren [42] oder Rasterkraftmikroskopie [71], verwendet. Eine Alternative ist mit Stereo-REM gegeben. Dazu werden drei REM-Bilder (SE-Detektion) mit verschiedenen Kippwinkeln aufgenommen und das dreidimensionale Oberflächenmodell (DOM) wird dann nach 3.1 berechnet.

Um die Rauheit aus einem gemessenen Oberflächenmodell zu bestimmen, muss die Welligkeit eliminiert werden, Abb. 3.2. Dazu wird das Profil fouriertransformiert und die langwelligen Anteile werden rausgefiltert (Hochpassfilter). Die maximale Wellenlänge wird als Cut-Off-Wellenlänge λ_c bezeichnet. In dieser Arbeit wurde mit $\lambda_c = 500 \mu\text{m}$ gearbeitet, [9,118]. Zusätzlich wurde die Vergrößerung (Geräteparameter 1000x) so eingestellt, dass die Anteile der Gewindegeometrie eliminiert worden sind. Es ergab sich dann eine Messfläche von $160 \times 160 \mu\text{m}^2$.

In der Literatur wird zur Bestimmung der Rauheit der Implantatoberflächen (Abschnitt 2.3.2) häufig der Wert der *mittleren Rauheit* verwendet. Das ist die mittlere Abweichung von einer mittleren Höhe \bar{z} , Abb.3.2. Findet die Mittelung in einer Dimension statt, wird der Wert als r_a bezeichnet; über zwei Dimensionen gemittelt, s_a (*area analysis*). Damit ergibt sich für

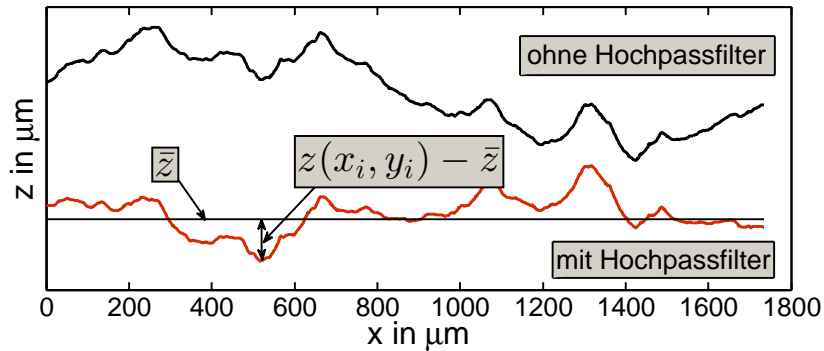


Abbildung 3.2.: Beispiel eines Profils aus einem dreidimensionalen Oberflächenmodell. Um den Parameter Rauheit zu bestimmen, muss die Welligkeit (oben) eines Profils über Hochpassfilterung eliminiert werden (unten). Die mittlere Rauheit r_A bzw. s_a ist die mittlere Abweichung von einer mittleren Höhe \bar{z} .

eine Fläche bestehend aus N mal M Punkten die mittlere Rauheit zu:

$$s_a = \frac{1}{NM} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M |z(x_i, y_j) - \bar{z}| \quad (3.4)$$

$$\text{wobei } \bar{z} = \frac{1}{NM} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^M z(x_i, y_j) \quad (3.5)$$

In Gl. 3.4 sind keine Informationen über die Frequenzen im Profil enthalten. Daher können zwei unterschiedliche Profile zu ein und derselben mittleren Rauheit führen. Dennoch wird gerade die mittlere Rauheit in der Literatur häufig verwendet.

3.3. Gasadsorption

Die Bestimmung der BET-Oberfläche (Brunauer-Emmett-Teller) von Proben wurde mittels N_2 -Adsorption durchgeführt (ASAP 2010, Micromeritics®). Zur Messung der Schichten wurde ein Metallstab unter Einhaltung der in Kap. 5 beschriebenen Parameter beschichtet. Anschließend wurde die Schicht mechanisch entfernt. Von dem entstandenen Pulver wurde dann die BET-Oberfläche bestimmt.

3.4. Ultramikrotomie

Für Transmissionselektronenmikroskopische Messungen wurden Ultradünnschnitte der Schicht auf Titan-, oder Alufolie angefertigt. Dazu wurde die beschichtete Folie in Epoxidharz eingebettet. Epoxid (Araldit® M, Fluka) und Härter (Araldit® M Härter 964, Fluka) wurden im Verhältnis 1 : 1 zusammengegeben und nach Zugabe von 8 Tropfen Beschleuniger

(Araldit[®] M accelerator, Fluka) 4 h gerührt ($U = 100 \text{ min}^{-1}$). Nach Einbettung der Proben wurden diese bei ca. $60 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 Tage ausgehärtet. Die Ultradünnschnitte wurden dann mit dem Ultramikrotom Leica UC6 mit einem Diamantmesser (Messerwinkel 45° , Diatome) angefertigt und auf Cu-Grids mit Kohle-Loch-Film gebracht. Die Dicke der Schnitte betrug etwa 40 nm.

3.5. Elektronenmikroskopie

Zur Materialcharakterisierung wurde die Elektronenmikroskopie verwendet. Es wurden Strukturaufklärung und Elementzusammensetzungen durchgeführt bzw. bestimmt.

(Scanning) Transmission Electron Microscopy (S)TEM

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurden mit einem energiegefiltertem Mikroskop (Omegafilter) angefertigt (EM 912, Fa. Zeiss, Germany). Zum einen wurden dazu Kupfer-Netze (Cu-Grids) mit Kohle-Loch-Film nach Kap. 5 so besprüht, dass sich keine komplett das Grid bedeckende Schicht ausbildete. Zum anderen wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Alle Bilder wurden mit einer Beschleunigungsspannung von $U = 100 \text{ kV}$ aufgenommen.

Zusätzlich wurden im Raster-Modus Dunkelfeldaufnahmen (STEM-ADF: annular dark field) angefertigt. Bei dieser Methode wird die Probe punktförmig abgerastert und die Intensität der gestreuten Elektronen gemessen. Dadurch wird der Kontrast durch den Beugungskontrast bestimmt. Außerdem wurden Bilder mit Hilfe der Sekundärelektronen, wie im REM aufgenommen (STEM-SE).

Electron Energy Loss Spectroscopy (EELS)

Elementspezifische Abbildungen wurden am TEM (EM 912, Zeiss, Germany) mittels Image-EELS (EELS: Electron Energy Loss Spectroscopy) durchgeführt. Zur Extrapolation und zum Abzug des Untergrunds wurde die Drei-Fenster-Methode mit einer Fensterbreite von $\Delta E = 15 \text{ eV}$ verwendet. Dazu wurden jeweils zwei Abbildungen vor der gemessenen Absorptionskante aufgenommen und ein Bild an der Kante. Der Untergrund wurde in diesem Bereich mit einem exponentiellem Abfall ($A \cdot \exp(-B \cdot E)$) gefittet, auf den weiteren Verlauf nach der Kante extrapoliert und von der Abbildung bei der spezifischen Kante $E_{\text{Si}} = 110 \text{ eV}$ bzw. $E_{\text{Ca}} = 346 \text{ eV}$ abgezogen, Abb. 3.3.

High Resolution Electron Microscopy (HRTEM)

Hochauflösende TEM-Aufnahmen (HRTEM) wurden am Leibniz-Institut für Katalyse e.V. (LIKAT) angefertigt (JEM-ARM 200F, JEOL, Japan). Es wurden ebenfalls Cu-Grids mit Kohle-Loch-Film verwendet. Die Schicht wurde ebenfalls auf das Cu-Grid gesprüht. Die Beschleunigungsspannung betrug 200 kV.

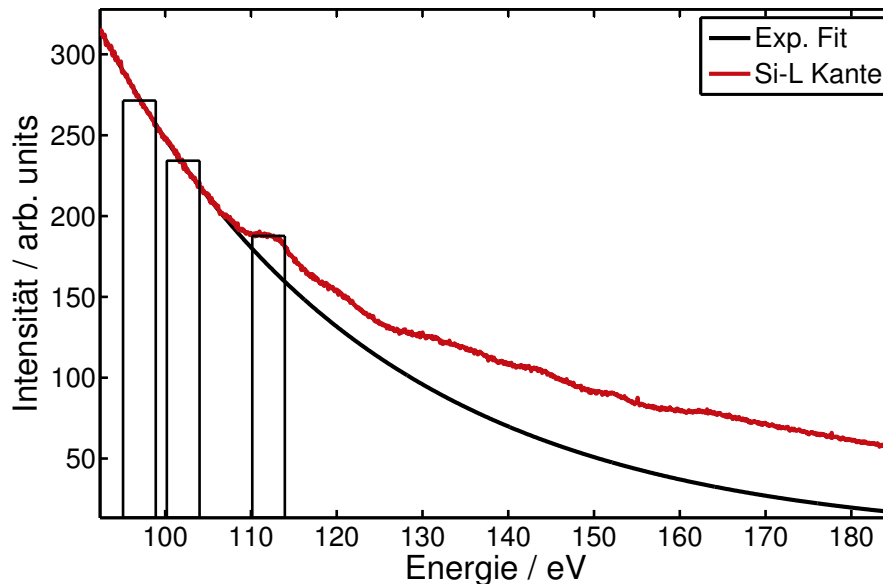


Abbildung 3.3.: Die Drei-Fenster-Methode beim EELS. Der Untergrund wurde mit $A \cdot \exp(-B \cdot E)$ gefittet.

3.6. Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS: X-Ray Photoelectron Spectroscopy) ist ein zerstörungsfreies Verfahren zur Elementanalyse von Oberflächen. Die Informationstiefe bei dieser Messung ist auf wenige Nanometer begrenzt (max. 10 nm). Darüberhinaus können die Bindungszustände auf der gemessenen Oberfläche bestimmt werden, [119].

In dieser Arbeit wurden Titanfolien mit dem ESCALAB 220 iXL am Leibniz-Institut für Katalyse e.V. (LIKAT) gemessen, bei einer Anregungsenergie von $E = 1486.6$ eV ($\text{AlK}\alpha$). Es wurde der Kohlenstoffgehalt (C 1s) auf der Titandioxidoberfläche vor und nach einer Sauerstoffplasmabehandlung bestimmt, siehe Kap. 5. Die Messgenauigkeit wurde mit 10 % abgeschätzt.

3.7. Knochen-Implantat-Kontakt (BIC)

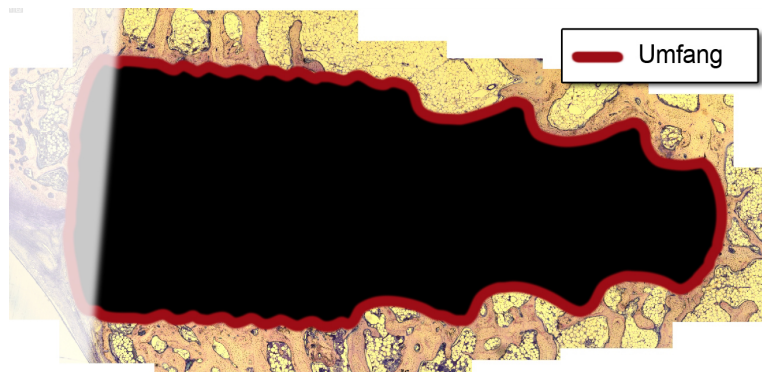
Der Wert des Knochen-Implantat-Kontaktes (BIC) ist ein Maß für die Knochenapposition an der Oberfläche eines Implantates. Er ist ein in der Literatur häufig verwendeter Wert zur Bewertung der Osseointegration. Darüber hinaus gibt es weitere Werte, die als Maß herangezogen werden können. Das ist zum einen das Ausdrehmoment (Removal Torque Test), das aufgewendet werden muss, um ein Implantat herauszudrehen [43, 44, 65–67]. Zum anderen gibt es den Pull- oder Push-Out-Test. Bei dieser Methode wird die Kraft gemessen, um das Implantat aus dem Knochen-Implantatverbund zu lösen, [27, 42, 46, 120–122]. Der Nachteil

beider Messverfahren ist, dass die Präparate nicht zerstörungsfrei gemessen werden können und eine histologische Bewertung deshalb nicht möglich ist.

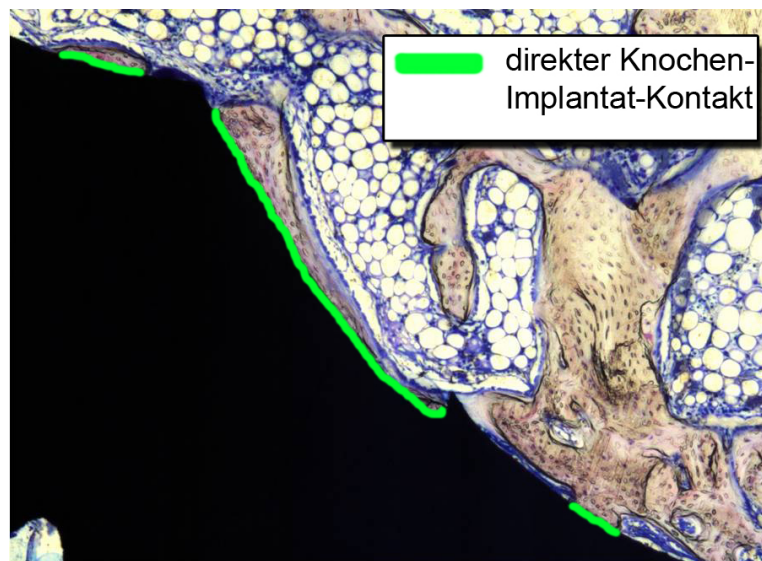
Der BIC wurde anhand histologischer, lichtmikroskopischer Bilder gemessen. Histologische Dünnschliffpräparate wurden nach der Methode von Donath angefertigt, [123]. Von der Implantatgrenze wurden Bilder angefertigt und zusammengesetzt. Die Vergrößerung der einzelnen Bilder wurde so gewählt (Originalvergrößerung 50fach), dass eine Unterscheidung zwischen direktem Knochenkontakt zur Implantatoberfläche und bindegewebigen Zwischenschichten erfolgen konnte. Aus dieser Vergrößerung resultierte eine Pixelgröße von $1.3 \mu\text{m}$, siehe Abb. 3.4(a). Der obere Bereich des Implantats (Abdeckschraube, ausgeblendeter Bereich in (a)) trug nicht zur Messung bei. Der BIC ergab sich dann aus dem Verhältnis aus Länge direkter Knochenanlagerung, siehe Abb. 3.4(b), und Umfang des Implantats im histologischen Schliff (a):

$$\text{BIC} = \frac{\text{direkter Knochen-Implantat-Kontakt}}{\text{Umfang Implantat im Bild}} \quad (3.6)$$

Die in Abs. 8.3 angegebenen Werte sind Mittelwerte aus $n=6$ BIC-Werten einzelner Implantate. Eine Varianzanalyse wurde mittels One-way-ANOVA (Origin 5.0, Microcal Software Inc.) durchgeführt.



(a) Umfang Implantat



(b) Direkter Kontakt zwischen Knochen und Implantat

Abbildung 3.4.: Der Knochen Implantat-Kontakt (bone to implant contact, BIC) ist das Verhältnis aus der Strecke des direkten Knochen-Implant-Kontakt und dem Umfangs des Implantates im histologischen Schliff.

4. Charakterisierung unbeschichteter Implantate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Implantatsysteme verwendet, die sich in Geometrie, Rauheit und in der chemischen Zusammensetzung der Oberfläche unterscheiden. Unbeschichtet und beschichtet wurden diese Implantate *in vivo* getestet. Der Parameter Rauheit wurde durch die Wahl des Systems tiologic[®] mit unterschiedlicher Oberfläche (sandgestrahlt und maschinert) untersucht. Die weiteren zwei Systeme repräsentieren zwei typische Implantatoberflächen mit unterschiedlicher Geometrie. Im folgenden Kapitel werden die Implantatsysteme hinsichtlich Rauheit, chemischer Zusammensetzung und Oberflächenenergie charakterisiert.

- BEGO Semados[®]-S (Bego Implant Systems GmbH & Co. KG)
- ixx2[®] (m&k GmbH)
- tiologic[®] sandgestrahlt (Dentaurum Implants GmbH)
- tiologic[®] maschinert (Dentaurum Implants GmbH)

4.1. Experimentelle Vorgehensweise

Zur Charakterisierung der Implantatoberflächen wurden die zu untersuchenden Implantate direkt nach Entnahme aus der Verpackung auf ein Kohle-Tab präpariert. Mittels REM und Stereo-REM wurden Topografie und Rauheit nach Gl. 3.4 bestimmt. Die chemische Zusammensetzung der Implantatoberflächen wurde mittels EDX durchgeführt. Dazu wurden an drei verschiedenen Stellen Spektren aufgenommen mit jeweils einer Messfläche der Größe von ca. 0.9 mm². Die Beschleunigungsspannung betrug $E_0 = 10$ keV. Mit der Dichte von TiO₂ mit $\rho = 4.3$ g/cm³ und der Anregungsenergie für Ti von $E_c = 4.5$ keV kann die Eindringtiefe des Elektronenstrahls abgeschätzt werden, [124]:

$$R = 33 \frac{A}{\rho \cdot Z} \cdot (E_0^{1.7} - E_c^{1.7}) \approx 500 \text{ nm} \quad (4.1)$$

Somit gibt diese Messung Informationen aus einem Bereich bis 500 nm innerhalb der Probe. Dieser Bereich wird nachfolgend als Oberfläche bezeichnet. Da die Partikelgröße beim Sandstrahlen einige Mikrometer beträgt, ist der Begriff Oberfläche in diesem Zusammenhang gerechtfertigt. Die chemische Zusammensetzung wurde anschließend im Wechselwirkungsgebiet quantitativ bestimmt. Folglich sind die quantitativen Angaben immer bezogen auf das Wechselwirkungsvolumen.

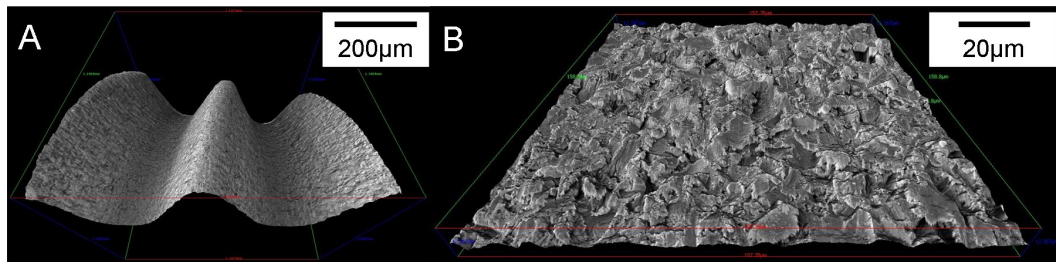


Abbildung 4.1.: Die Gewindegeometrie des Implantats Bego Semados[®] im Stereo-REM (A) und die Rauheit der Oberfläche in (B)

4.2. Semados[®] -S

Dieses Implantatsystem besteht aus Rein-Titan (Grad 4). Die raue Oberfläche wurde durch Sandstrahlen produziert (Angaben laut Hersteller).

4.2.1. Topografie der Oberfläche

Die Gewindegeometrie ist in Abb. 4.1 A im DOM dargestellt. Sie ist hauptsächlich durch ein Feingewinde gekennzeichnet. Die Oberfläche bei höherer Vergrößerung ist in (B) gezeigt. Charakteristisch ist die hügelartige Topografie bei sandgestrahlten Oberflächen. Damit ergibt sich eine mittlere Rauheit von $s_a = 1.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$, Tab. 4.1.

4.2.2. Zusammensetzung der Oberfläche

Wie im Abs. 2.3.2 beschrieben, bleiben beim Sandstrahlen mit Al_2O_3 Partikel als inkorporierter Rückstand auf der Oberfläche zurück. In Abb. 4.2 ist die Elementverteilung auf der Oberfläche anhand eines EDX-Mappings gezeigt. Die Partikel-Verteilung wird anhand des Al-K α -Signals (C) sichtbar. Zur Kontrolle ist das Ti-K α -Signal in (B) dargestellt. Deutlich sind Partikel in der Größenordnung mehrerer Mikrometer erkennbar. Dies führt zu einer Al-Konzentration von 16 at % auf der Implantatoberfläche, Tab. 4.1.

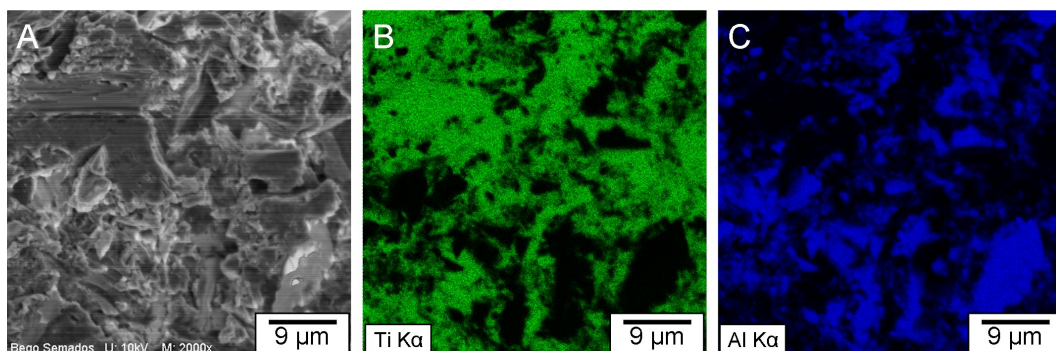


Abbildung 4.2.: Elementverteilung einer sandgestrahlten Implantatoberfläche. Bego Semados[®]

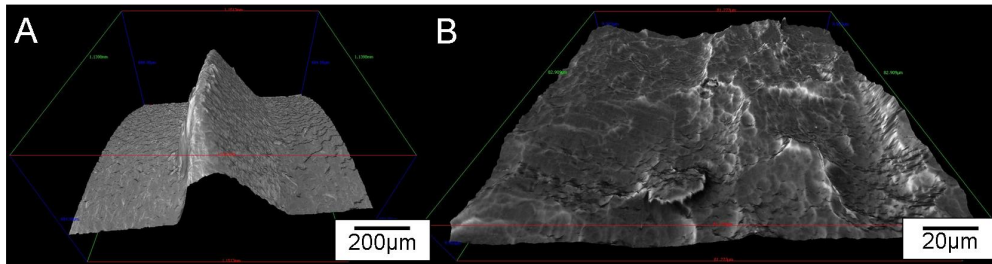


Abbildung 4.3.: Die Gewindegeometrie des Implantats ixx2[®] im Stereo-REM (A) und die Rauheit der Oberfläche in (B)

4.3. ixx2[®]

Das Implantatsystem ixx2[®] besteht aus Rein-Titan (Grad 4). Die Oberfläche ist sandgestrahlt und anschließend geätzt (Angaben laut Hersteller).

4.3.1. Topografie der Oberfläche

Das Gewinde besteht aus drei Teilen, einem Extensionsgewinde zur Kompensation von Abweichungen der Kavität, einem Kompensationsgewinde zur Verdichtung der Spongiosa und einem Schneidgewinde zur Präparation des Gewindes in der Kavität (Angaben laut Hersteller). Das Schneidgewinde ist in Abb. 4.3 (A) durch Stereo-REM abgebildet. Die Implantatoberfläche im Mikrometerbereich ist in (B) dargestellt. Charakteristisch sind die langwelligeren Vertiefungen (im Vergleich zum vorherigen Implantat) durch den Ätzprozess. Dadurch ergibt sich eine Rauheit von $s_a = 1.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$, Tab. 4.1.

4.3.2. Zusammensetzung der Oberfläche

Die lokale Al-Verteilung auf der Oberfläche ist in Abb. 4.4 (C) dargestellt. Es sind wenige Partikelreste vom Sandstrahlen vorhanden. Sie führen zu einer Al-Konzentration von 1 %, Tab. 4.1. Dieser Wert wird durch den Ätzprozess im Anschluss an das Sandstrahlen erreicht.

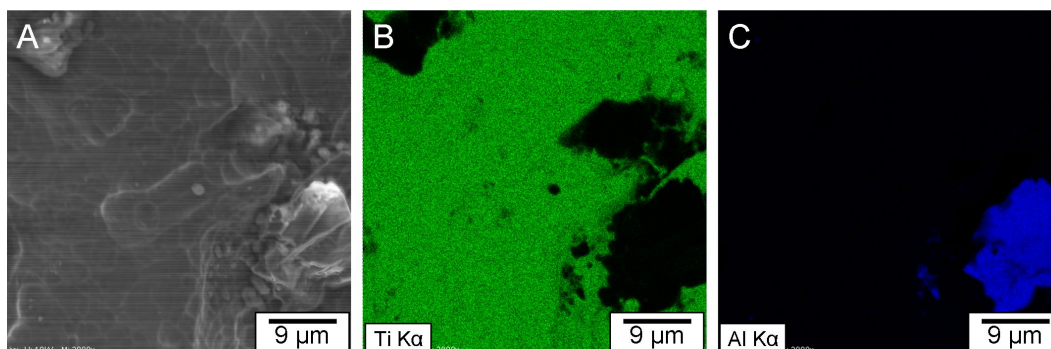


Abbildung 4.4.: Elementverteilung einer sandgestrahlten und geätzten Implantatoberfläche, ixx[®]

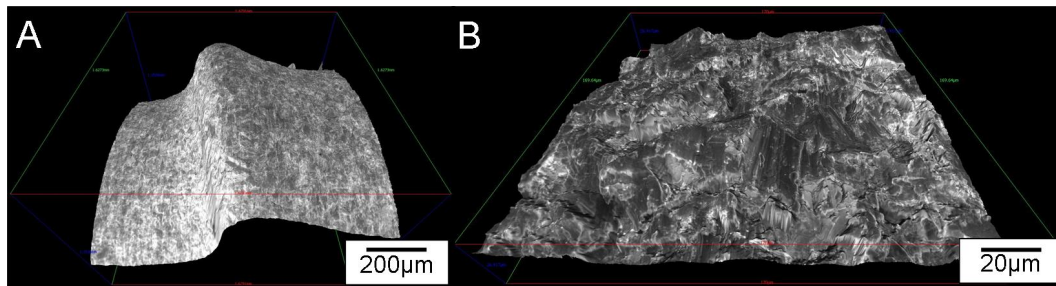


Abbildung 4.5.: Topographie im Stereo-REM tiologic[®] sandgestrahlt

4.4. tiologic[®] sandgestrahlt

Das Implantatsystem tiologic[®] besitzt eine zweiteilige Gewindegeometrie. Ein kreistales Feingewinde, das auf die Knochendichte der Kortikalis abgestimmt ist und das progressive Grob-
gewinde, das auf die Knochendichte der Spongiosa abgestimmt ist.

4.4.1. Topografie der Oberfläche

Es wurden zwei verschiedene Oberflächen dieses Implantattyps im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet, sandgestrahlt und maschinert. Die Gewindegeometrie war bei beiden gleich. In Abb. 4.5 (A) ist das DOM des Grobgewindes gezeigt. In (B) ist die sandgestrahlte Oberfläche dargestellt. Auch hier besitzt sie eine ähnliche Struktur wie zuvor das Semados[®] Implantat, hügelartig und mit Partikelrückständen. Nur die Rauheit ist mit $s_a = 3.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ höher als die vom Semados[®]-Implantat.

4.4.2. Zusammensetzung der Oberfläche

Durch die Sandstrahlprozedur bleiben auch auf der tiologic[®]-Oberfläche Aluminiumpartikel als Rückstand, Abb. 4.6. Die Partikel sind über die gesamte Oberfläche verteilt. Im Vergleich zur Semados[®]-Oberfläche sind die Partikelreste ähnlich. Insgesamt ergibt die EDX-Analyse

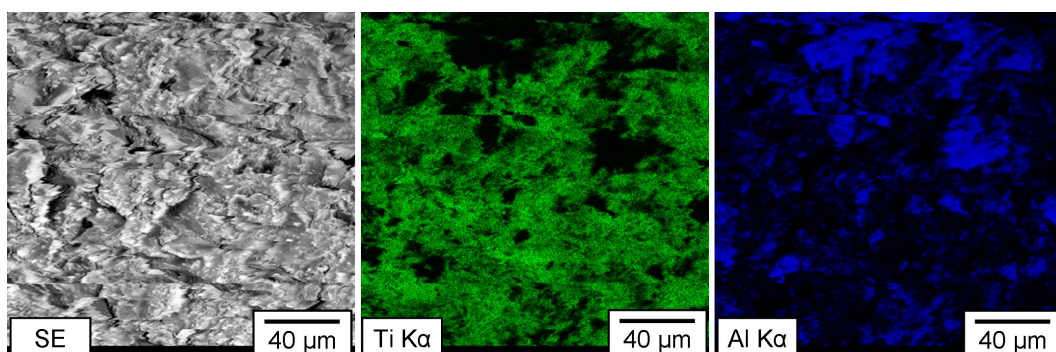


Abbildung 4.6.: Elementverteilung der sandgestrahlten Implantatoberfläche tiologic[®]

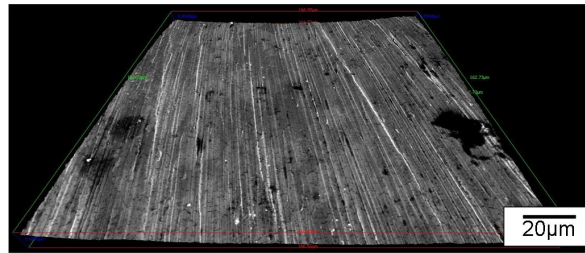


Abbildung 4.7.: Rauheit Stereo-REM tiologic[®] maschinert

eine Al-Konzentration von ca. 14 %, siehe Tab. 4.1.

4.5. tiologic[®] maschinert

Das maschinerte Implantat tiologic[®] ist geometrisch das gleiche wie das sandgestrahlte Implantat. Die Gewindeform des Implantats wird durch einen Drehprozess realisiert. Der anschließende Sandstrahlprozess wurde bei diesem Implantatsystem weggelassen.

4.5.1. Topografie der Oberfläche

Die maschinerte Oberfläche ist in Abb. 4.7 gezeigt. Durch den Herstellungsprozess des Drehens ist die typische Rillenstruktur vorhanden. Das ergibt eine Rauheit von $s_a = 0.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$.

4.5.2. Zusammensetzung der Oberfläche

Die chemische Zusammensetzung der Oberfläche ist Titandioxid, siehe Tab. 4.1. Wenngleich die Werte für TiO_2 nichtstöchiometrisch sind. Das liegt an der geringen Schichtdicke der TiO_2 -Passivschicht.

Tabelle 4.1.: Zusammensetzung und Rauheit der Implantatoberflächen

Implantat	C / at.%	O / at.%	Al / at.%	Ti / at.%	$s_a / \mu\text{m}$
Semados [®]	6 ± 1	42 ± 4	16 ± 2	36 ± 6	1.3 ± 0.1
ixx2 [®]	12 ± 3	30 ± 2	1 ± 1	58 ± 4	1.5 ± 0.1
tiologic [®] sandgestrahlt	13 ± 2	31 ± 2	14 ± 2	43 ± 1	3.8 ± 0.5
tiologic [®] maschinert	6 ± 1	24 ± 2	-	65 ± 2	0.7 ± 0.2

5. Beschichtungsprozess NanoBone[®]

In diesem Kapitel wird der Beschichtungsprozess beschrieben und die damit verbundenen Parameter definiert. Aus Voruntersuchungen ergaben sich bestimmte Wertebereiche einzelner Parameter. Eine Korrelation der Parameter zu Eigenschaften der Schicht wird in Kap. 6 hergestellt. Die gesamte Prozedur besteht aus mehreren Teilprozessen, die im Folgenden einzeln erläutert werden, siehe Abb. 5.1. Vor der eigentlichen Beschichtung erfolgte eine Vorbehandlung der Implantatoberfläche mit Sauerstoffplasma. Dadurch werden die Oberflächen von kohlenstoffhaltigen Kontaminationen befreit. Danach erfolgt der eigentliche Beschichtungsprozess via Spin-Spray-Coating. Dies ist der strukturgebende Teil des Prozesses. Im Anschluss daran wird eine Nachbehandlung mit Sauerstoffplasma durchgeführt.

5.1. Beschichtungsanlage

Die Beschichtungsanlage besteht grundlegend aus einer Plasmaeinheit, Beschichtungseinheit und Steuereinheit. Die Plasma- und Beschichtungseinheiten befinden sich in einer Laminar-Flow-Box (HERAsafe[®] HSP12, Klasse 2, Heraeus[®]) um kontrollierte Reinraumbedingungen zu realisieren. Kurz hinter der Frontscheibe wird kontaminierte Luft angesaugt, gefiltert (H 14, DIN 24 184) und von oben als laminare Strömung in den Versuchsraum gegeben. Die Plasmaeinheit besteht aus einem atmosphärischen Plasmajet (Plasma Beam, Diener electronic GmbH + Co. KG). Dadurch ist unter Normaldruck eine Oberflächenbehandlung möglich. Als Prozessgas wird reiner Sauerstoff verwendet und als Kühlgas ölfreie und trockene Druckluft eines Dentalkompressors (FIAC Carat 106/E). Die Beschichtungseinheit besteht aus einer Zweistoffdüse (Fa. Düsen Schlick), die die Beschichtungsdispersion, pneumatisch gesteuert, auf das Implantat sprüht. Das Implantat selbst wird in einem Implantathalter aus Edelstahl eingespannt, der per Linearachse die einzelnen Orte anfahren kann, siehe Anhang Abb. A.1. Die Steuerung wird durch ein Programmablauf am Rechner realisiert.

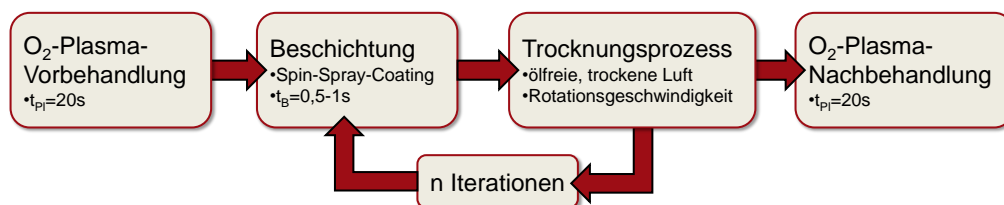
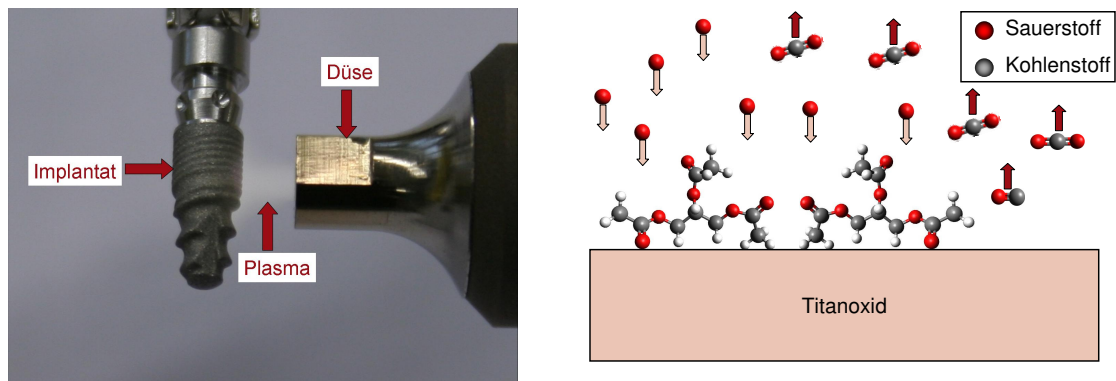


Abbildung 5.1.: Flussschema des Beschichtungsprozesses



(a) Das O₂-Plasma wird als sog. Plasmajet auf die Implantatoberfläche (hier: tiologic[®], Dentaurum) bei einem Abstand $d = 3 - 10$ mm geleitet.

(b) Die Sauerstoffionen im O₂-Plasma reagieren mit den Kohlenstoffverbindungen (Öle, Fette) auf der Oberfläche zu Kohlenstoffdioxid bzw. Kohlenstoffmonoxid.

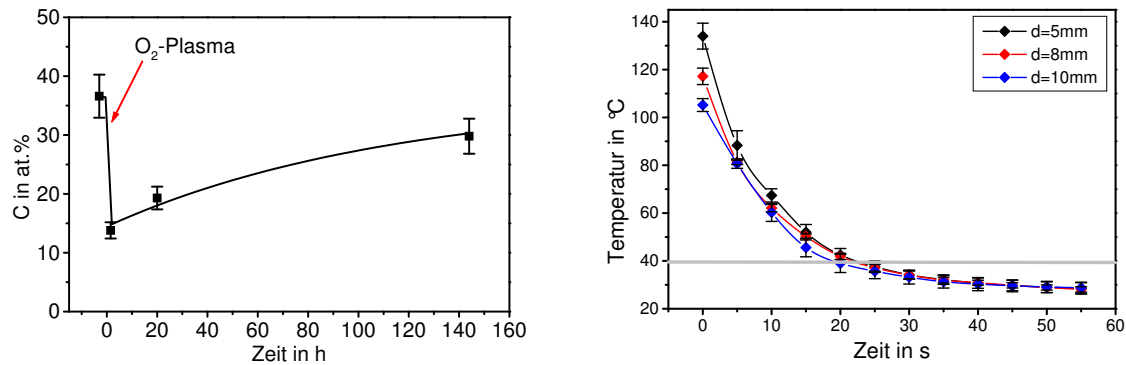
Abbildung 5.2.: Reinigungsprozess der Implantatoberfläche durch Sauerstoffplasma

5.2. Vorbehandlung durch O₂-Plasma

Alle Implantatoberflächen weisen, sofern sie sich an Luft befinden, eine Kontamination mit organischen Verbindungen (z.B. Fett-, Ölmoleküle) auf. Dieser Prozess erfolgt auch in der Sterilverpackung. Dadurch haben fast alle Implantatoberflächen hydrophobe Eigenschaften, siehe Abschnitt 2.3.3. Die Benetzbarkeit der Implantatoberflächen muss, hinsichtlich einer homogenen Schichtdicke, hoch sein. Deshalb wurde vor dem eigentlichen Beschichtungsprozess eine Plasmabehandlung mittels atmosphärischen Sauerstoffplasmas (PlasmaBeam, Diener electronic GmbH + Co. KG) durchgeführt. Ein Hochspannungsgenerator erzeugt eine Spannung von $U = 10$ kV. Innerhalb des sog. Plasmaerzeugers wird zwischen zwei Elektroden eine Entladungszone aufgebaut. Durch einen ölfreien und trockenen Luftstrom (FIAC Carat 106/E, gleichzeitig Kühlgas) wird das Plasma aus dem Plasmaerzeuger heraustransportiert. Eine Düse fokussiert den Gasstrom (Plasmajet) auf die zu behandelnde Oberfläche. Der Plasmajet hat eine Breite von etwa 5 mm. Die verwendeten Implantate besitzen aber eine Länge von mehr als 5 mm. Deshalb werden alle Implantate rotierend durch das O₂-Plasma gefahren. Sinnvolle Gesamtbehandlungszeiten sind $t_{Pl} = 10 - 30$ s. Der Abstand zur Plasmadüse beträgt 3 – 10 mm. In Abb. 5.2(a) ist der Prozess der Plasmaaktivierung an einem Titanimplantat dargestellt. Links im Bild ist das Implantat, rechts im Bild ist die Plasmadüse zu erkennen, die den Gasstrom auf die Implantatoberfläche fokussiert. Alle verwendeten Implantatoberflächen wurden nach folgender Prozedur mit O₂-Plasma gereinigt, wenn es nicht anders angegeben ist.

5.2.1. Reinigung der Implantatoberfläche

In Abb. 5.2(b) sind die ablaufenden Prozesse bei der Plasmabehandlung der Oberfläche schematisch dargestellt. Das Plasma beinhaltet reaktive Sauerstoffionen, die die organischen Mo-



(a) XPS-Messung des Kohlenstoffgehalts der TiO₂-Oberfläche vor und nach der Plasmabehandlung (b) Temperatur der Implantatoberfläche nach der Plasmabehandlung

Abbildung 5.3.: Durch das Plasma wird der Kohlenstoffgehalt auf der Oberfläche reduziert und steigt innerhalb weniger Tage bis auf 30 % an (a). Die O₂-Plasmabehandlung führt zu einer Temperatur von 100-140 °C, je nach Abstand Implantat-Düse (b). Parameter: Plasma $t_{Pl} = 20$ s

leküle auftrennen. Die kohlenstoffhaltigen Verbindungen oxidieren zu CO₂ oder CO. Der Kohlenstoffgehalt der Oberfläche wurde per XPS bestimmt, siehe Abs. 3.6. Die Plasmabehandlung erfolgte an einer Titanfolie (Titan Grade 4), die um ein Implantat präpariert war. Die Bestimmung des Kohlenstoffgehalts erfolgte vor und 1.5 h, 20 h, 144 h nach der Plasmabehandlung, siehe Abb. 5.3(a). Nach 1.5 h beträgt der C-Gehalt ca. 14 % (Eindringtiefe etwa 10 nm). Dieser C-Gehalt ist eine obere Abschätzung, da zum einen die XPS-Messung nicht *in situ* erfolgte und die Probe deshalb transportiert werden musste. Und zum anderen kann unter den vorliegenden Bedingungen der C-Gehalt nicht weiter verringert werden, da durch die Luftatmosphäre eine sofortige Kontamination eintritt. Der Wert steigt demzufolge mit der Zeit wieder an und erreicht nach 6 Tagen fast 30 %.

5.2.2. Temperatur der Implantatoberfläche

Der Gasstrom vom Plasmajet hat eine Temperatur von ca. 300 °C. Demzufolge gibt es einen Wärmeübertrag auf die Implantatoberfläche. Dieser Effekt wurde mit einer Infrarot-Kamera dargestellt und gemessen. Dazu wurde im Abstand von $t = 5$ s die Temperatur gemessen, Abb. 5.4 Cursor. Man erkennt deutlich anhand der gelblichen Verfärbung die lokale Temperaturerhöhung. Je nach Abstand der Plasmadüse zum Implantat erreicht die Implantatoberfläche 105 °C ($d=10$ mm) bis 140 °C ($d=5$ mm), Abb. 5.3(b). Aufgrund des Luftstromes aus dem

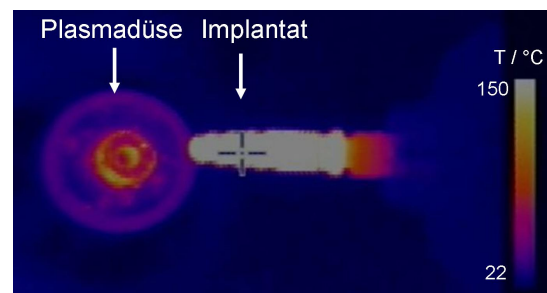


Abbildung 5.4.: Infrarotbild des Implantats kurz nach O₂-Plasma.

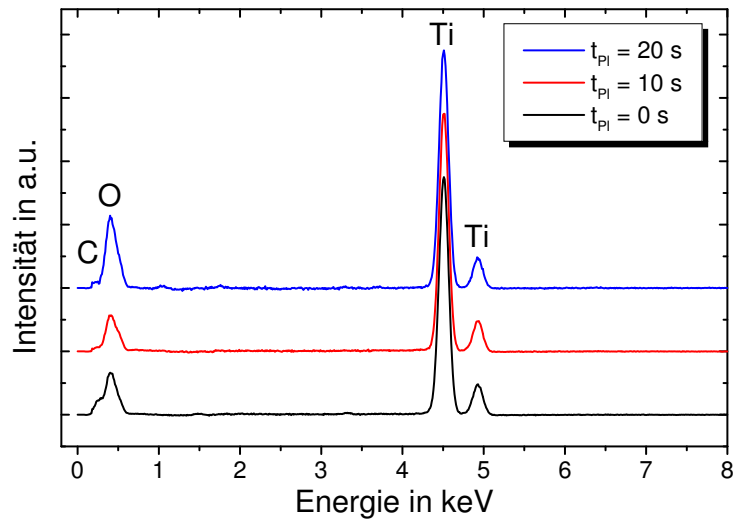


Abbildung 5.5.: EDX-Spektren der TiO_2 -Implantatoberfläche nach unterschiedlichen Zeiten O_2 -Plasma. Es ist ein leichter Anstieg des O-Peaks zu verzeichnen, die TiO_2 -Passivschicht erhöht sich infolge des O_2 -Plasmas.

Plasmajet (Kühlgas) und durch die laminare Strömung der LAF-Box kühlt die Implantatoberfläche innerhalb einer Minute auf nahezu Zimmertemperatur ab. Ein weiterer Grund für die schnelle Abkühlung ist, dass das Implantat nicht bis zur Mitte hin erhitzt worden ist. Die graue Linie markiert die Temperatur unter welcher die Beschichtungsdispersion aufgetragen wird (ab $t \approx 20$ s). Die Temperatur hat einen Einfluss auf die Strukturbildung während des Sol-Gel-Übergangs. Der Einfluss wird später untersucht, Abs. 6.2.

5.2.3. Titandioxid-Passivschicht

Es wurde in Abb. 5.3(a) gezeigt, dass der Kohlenstoffgehalt durch die Verwendung von O_2 -Plasma reduziert wird. Die radikalen O_2 -Ionen im O_2 -Plasma bewirken allerdings, dass sich die Schichtdicke der TiO_2 -Passivschicht erhöht. Es wurden maschinerte Titanimplantate wie oben beschrieben behandelt und anschließend die Zusammensetzung der Oberfläche mittels EDX-Analyse bestimmt. In Abb. 5.5 sind die EDX-Spektren vor und nach $t_{PI}=10$ s bzw. 20 s. Man erkennt, dass sich das C-Signal als Schulter vom O-Signal mit der Zeit verringerte. Gleichzeitig ist ein Anstieg des O-Signals zu verzeichnen, was auf die steigende Dicke der TiO_2 -Passivschicht zurückzuführen ist. Die Topologie (z.B. Rauheit) dieser Schicht änderte sich allerdings nicht oder nur sehr wenig. Die dazugehörigen REM-Aufnahmen sind aus Platzgründen im Anhang, Abb. A.2.

5.2.4. Benetzbarkeit

Die Benetzbarkeit von Oberflächen wird durch den Kontaktwinkel beschrieben. Der Kontaktwinkel ist der Winkel, der sich zwischen dem Tropfen und der zu benetzenden Oberfläche

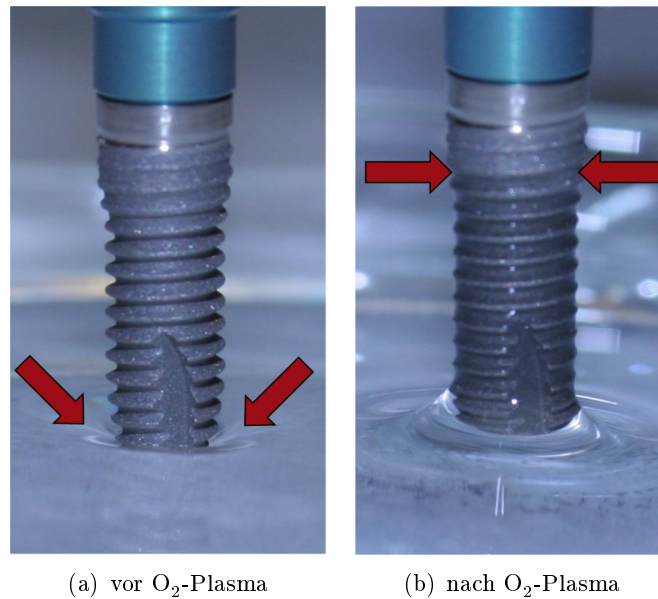


Abbildung 5.6.: Veränderung der Benetzbarkeit der Implantatoberfläche am Beispiel Semados[®]

ausbildet. Er ist abhängig von der Oberflächenenergie des Substrats σ_S , der Grenzflächenenergie zwischen der Flüssigkeit und der Oberfläche σ_{FS} sowie der Oberflächenspannung der Flüssigkeit σ_F , Youngsche Gleichung:

$$\cos \theta = \frac{\sigma_S - \sigma_{FS}}{\sigma_F} \quad (5.1)$$

Diese Gleichung ist nur für plane, ebene Flächen definiert. Eine derartige Bestimmung wäre im vorliegenden Fall nur bedingt sinnvoll, da die Implantate raue Oberflächen besitzen. Deshalb wurde an dieser Stelle auf eine Kontaktwinkelmessung verzichtet und eine qualitative Beschreibung vorgenommen. Die Benetzbarkeit der Titandioxidoberflächen wurde mit entionisiertem Wasser durchgeführt. Die Implantatoberfläche wurde langsam, senkrecht von oben an die Wasseroberfläche herangeführt. In Abb. 5.6(a) ist die Benetzung direkt nach Entnahme aus der Sterilverpackung beispielhaft für das Semados[®]-Implantat demonstriert. Deutlich ist die Wölbung der Wasseroberfläche nach unten zu erkennen und es findet keine Benetzung der Implantatoberfläche statt. Die Benetzung der Implantatoberfläche mit Wasser reicht nach der Plasmabehandlung bis zur Markierung, (b). Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass das Implantat zuvor nicht tiefer in die Flüssigkeit eintauchte als es auf dem Bild zu erkennen ist. Die Oberfläche ist demzufolge stark hydrophil.

5.3. Herstellung der Beschichtungsdispersion

Die Beschichtungsdispersion besteht aus einem SiO_2 -Sol, nanokristallinem Hydroxylapatit und Ethanol mit einem Feststoffgehalt $FS = 0.5 - 2 \text{ wt\%}$ ($\text{HA}/\text{SiO}_2 = 76/24$).

5.3.1. SiO_2 -Sol

Die Ausgangssubstanz für das SiO_2 -Sol bildet Tetraethylorthosilikat (TEOS, Sigma Aldrich). Die Hydrolyse erfolgt bei einem pH-Wert von 3.5 – 3.8 (Katalysator: CH_3COOH) und einem molaren Verhältnis von $\text{TEOS} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH} = 1 : 6.7 : 0.2$. Dieser Prozess ist exotherm, deshalb erreicht die Temperatur bei der Hydrolyse nach ca. 120 min ein Maximum von ca. 40 °C. Danach sinkt die Temperatur wieder, weil die Hydrolyse abgeschlossen ist, [125]. Nach einer Zeit von $t = 140 \text{ min}$ wird das Sol auf ca. 8-10 °C heruntergekühlt. Da die Gelbildung temperaturabhängig ist, d.h. die Gelbildungszeit nimmt mit zunehmender Temperatur zu, wird so die Gelbildung minimiert. Dadurch ergibt sich ein definiertes Zeitfenster zur weiteren Verarbeitung von ca. 40 min, [125]. Zu diesem Zeitpunkt haben die SiO_2 -Polyeder eine Größe von etwa 0.45 nm, siehe Tab. 2.2.

5.3.2. Hydroxylapatit

Der Hydroxylapatit als eine Komponente der Beschichtungsdispersion (siehe 5.3) wurde über eine nasschemische Fällungsreaktion aus Calciumchlorid (CaCl_2), Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) hergestellt. Beide Ausgangsmaterialien wurden in deionisiertem Wasser aufgelöst und mit einem molarem Verhältnis von $\text{Ca}/\text{P} = 1.67$ zur Fällung gebracht. Der pH-Wert der Fällung bei Raumtemperatur wurde mit Ammoniumhydroxid auf 7.8 eingestellt. Das Fällungsprodukt, der HA-Schlicker, wurde anschließend dreimal mit deionisiertem Wasser gespült, um die restlichen Ionen Na^+ , Cl^- und NH_4^+ zu entfernen. Durch weitere drei Spülungen mit Ethanol wurde das Wasser gegen Ethanol ausgetauscht. Das Verfahren zur Herstellung des HAs wurde im Rahmen der Promotion von Ulf Weber entwickelt und ist in [113] beschrieben.

5.3.3. Dispersion

Die einzelnen Komponenten der Beschichtungsdispersion werden wie folgt zusammengeführt. Der ethanolhaltige HA-Schlicker wird sukzessiv unter Einwirkung von Ultraschall mit Ethanol auf ein Masseverhältnis $\text{HA}/\text{Ethanol} = 0.5 - 1.5 \%$ eingestellt. Die Verwendung von Ultraschall bewirkt eine Homogenisierung des entstandenen Schlickers. Ein Masseverhältnis von mehr als 2% führt zu sehr hohen Einzelschichtdicken und dadurch zu Trocknungsrissen, siehe [125]. Das hydrolysierte TEOS (SiO_2 -Sol) wird anschließend dem verdünnten HA-Schlicker zugeführt. Der Feststoffgehalt FS dieser Dispersion ist die Summe aus Masse Siliziumdioxid m_{SiO_2} und Hydroxylapatit m_{HA} :

$$FS = \frac{m_{\text{SiO}_2} + m_{\text{HA}}}{m_E + m_{\text{Kat}} + (m_{\text{SiO}_2} + m_{\text{HA}})}, \quad (5.2)$$

mit m_E als Masse des Ethanol und m_{Kat} als Masse des Katalysators. Der Feststoffgehalt liegt dabei im Bereich $FS = 0.5 - 2\%$. Da die Gelbildung des SiO_2 -Sols temperaturabhängig ist und die Homogenisierung per Ultraschall einen Wärmeeintrag generiert, wird dieser Prozess gekühlt.

5.4. Auftragen der Beschichtungsdispersion

Nach der Plasmabehandlung wird in einer Kombination aus Spin- und Spray-Coating die Beschichtungsdispersion mit der Zweistoffdüse auf die Implantatoberfläche aufgetragen. Das Ziel ist, eine homogene Schichtdicke auf der Implantatoberfläche zu erreichen. Das zu beschichtende Implantat wird in den Implantathalter so eingespannt, dass eine Rotation um die Längsachse stattfindet. Die Rotationsgeschwindigkeit beträgt während des Sprühprozesses $U = 300 \text{ min}^{-1}$. Dieser Wert hat sich als sinnvoll erwiesen, da bei höheren Rotationsgeschwindigkeiten die aufgetragene Dispersion durch die erhöhten Fliehkräfte vom Implantat entfernt wird. Die Beschichtungszeit beträgt $t_B = 0.5 \text{ s}$ und hängt von der Größe und Form der zu beschichtenden Fläche ab, s. Kap. 6. Aus Vorversuchen wurde deutlich, dass durch die geringe Beschichtungszeit Trocknungsrisse vermieden werden können. Hier wird auch deutlich, warum kleinere Rotationsgeschwindigkeiten nicht sinnvoll sind. Während des Sprühvorgangs ($t_B = 0.5 \text{ s}$) vollführt das Implantat bei $U = 300 \text{ min}^{-1}$ 2.5 Umdrehungen. Um eine gleichmäßige Schichtdicke zu erzielen, sollte dieser Wert nicht unterschritten werden.

Direkt nach dem Sprühvorgang findet der Trocknungsprozess statt. Dabei verdunstet das Ethanol unter einem ölfreien und trockenem Luftstrom. Die SiO_2 -Primärteilchen im Sol treffen im zeitlichen Mittel häufiger aufeinander und vernetzen sich. Es bildet sich ein nanoporöses Netzwerk (SiO_2 -Matrix), in dem die HA-Kristallite eingebettet sind, siehe Kap. 7. Der Sol-Gel-Übergang findet daher auf der Implantatoberfläche statt. Die Abfolge aus Beschichtung und Trocknung läuft mehrmals hintereinander ab (Iteration $n=6$). So werden dünne Schichten realisiert und Trocknungsrisse werden vermieden, [125]. Einen wesentlichen Einfluss auf die Struktur der Schicht haben demzufolge die Parameter Beschichtungszeit t_B und Iteration n .

5.5. Nachbehandlung durch O_2 -Plasma

Im Anschluss an den letzten Iterationsschritt beim Spin-Spray-Coating erfolgt eine Nachbehandlung mit O_2 -Plasma. Dazu wird das beschichtete Implantat wieder durch den Plasmajet gefahren wie oben beschrieben. Die Behandlungszeit ist dabei $t_{Pl} = 20 \text{ s}$. Das Ziel dieses

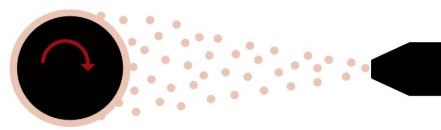


Abbildung 5.7.: Per Spin-Spray-Coating, hier schematisch, wird die Dispersion auf die Implantatoberfläche aufgetragen. Das Implantat rotiert dabei um seine Längsachse, hier senkrecht zur Paperebene.

Schrittes ist die Entfernung restlicher Ethylgruppen in der SiO_2 -Matrix, die in geringer Anzahl vorkommen könnten. Der Kohlenstoffgehalt der Schicht wurde mittels Elementaranalyse (CHNS-Analyse) bestimmt. Da die Schichtdicke im Mikrometerbereich ist, wäre eine Messung mit XPS nicht sinnvoll.

In Tab. 5.1 sind die Kohlenstoffgehalte vor und nach O_2 -Plasma. Die Unterschiede sind kaum messbar. Dass der Wert ohne O_2 -Plasma so gering war, könnte daran liegen, dass nicht viele Ethylgruppen nach der Trocknung in der Schicht vorhanden sind. Aber falls doch, könnten sie durch Hydrolyse wegen der Luftfeuchtigkeit und CO_2 als Katalysator wieder entfernt worden sein. Dennoch wird dieser Schritt am Ende des Beschichtungsvorganges eingeführt. Zum einen aus Sicherheitsgründen, um die restliche Kohlenstoffverbindungen zu entfernen, die trotzdem (wegen wechselnder Umgebungsbedingungen wie Luftfeuchtigkeit, Temperatur usw.) noch im Material verblieben sind, [126]. Zum anderen wird durch das Plasma die Oberfläche sterilisiert. Wenngleich dieser Prozess eine Sterilisation nach Medizinproduktegesetz (MPG) nicht ersetzt.

Tabelle 5.1.: C-Gehalt der Schicht vor und nach abschließender O_2 -Plasmabehandlung, bestimmt mit Elementaranalyse (CHNS)

	C in at%
ohne O_2 -Plasma	1,1
mit O_2 -Plasma	0,9

5.6. Festlegung der Beschichtungsparameter

In den vorangegangenen Abschnitten wurden die Teilprozesse mit ihren Parametern beschrieben und untersucht. An dieser Stelle werden die Parameter zusammengefasst und es erfolgt vorab eine Festlegung so wie sie im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet wurden. Warum und welche Korrelationen zwischen einzelnen Parametern und den Schichteigenschaften bestehen, wird im folgenden Kapitel beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Einstellungen verwendet. Die Werte sind in Tab. 5.2 zusammengefasst. Im Teilprozess O_2 -Plasma-Vorbehandlung sind die Parameter Behandlungszeit t_{PI} und Abstand Implantat-Plasma d beschrieben worden. Sinnvolle Werte t_{PI} sind 10 – 30 s. Größere Zeiten sind hinsichtlich Benetzung nicht notwendig und bei kleineren Zeiten ist die Zeit pro Fläche zu gering, um eine vollständige Aktivierung zu erzielen. Die Zeit wurde auf $t_{PI} = 20$ s festgelegt. Der Abstand zwischen Plasmadüse und Implantatoberfläche wurde auf $d = 8$ mm gesetzt. Bei diesen Einstellungen wächst die TiO_2 -Schichtdicke noch nicht so, dass sich die Rauheit der Implantatoberfläche verändert.

Die Zusammensetzung der Beschichtungsdispersion wird durch die Parameter Feststoffgehalt FS und durch das Masseverhältnis des Feststoffes charakterisiert. Im Verlauf der Arbeit wurde der Feststoffgehalt im Bereich von 0.5 – 2 wt % untersucht. Bei Feststoffgehalten über 2 wt % war der Materialauftrag pro Iterationsschritt zu hoch, so dass Trocknungsrisse in der Schicht entstanden. Unterhalb von 0.5 wt % ist die Schichtdicke sehr gering, siehe Kap. 6. Wenn nicht anders gekennzeichnet, wurde ein Feststoffgehalt von $FS = 1.3$ wt % verwendet. Die Zusammensetzung des Feststoffs betrug dabei 24 : 76 (Masseverhältnis SiO_2 zu HA). Das Auftragen der Beschichtungsdispersion selbst wird durch die Parameter Beschichtungszeit t_B ,

Tabelle 5.2.: Die Parameter während des Beschichtungsprozesses. Es hat sich gezeigt, dass nur gewisse Einstellungen sinnvolle Ergebnisse erzielen. Die Zusammenhänge der Parameter auf die Schichteigenschaften und die Begründungen für die Festlegungen werden im Kap. 6 beschrieben.

Teilprozess	Parameter	sinnvolle Werte	Festlegung
O ₂ -Plasmavorbehandlung	Zeit t_{Pl}	10 – 30 s	20 s
	Abstand O ₂ -Plasma d	3 – 10 mm	8 mm
Beschichtungsdispersion	Feststoffgehalt FS	0.5 – 2 wt %	1.3 wt %
	SiO ₂ /HA-Masseverhältnis	20 : 80 – 40 : 60	24 : 76
Beschichtung	Beschichtungszeit t_B	0.5 – 2 s	0.5 s
	Iterationen n	1 – 20	6
	Trocknungszeit t_{Tr}	5 – 20 s	20 s
	Rotationsgeschwindigkeit U	60 – 3000 min ⁻¹	300 min ⁻¹
O ₂ -Plasmanachbehandlung	O ₂ -Plasma t_{Pl}	10 – 30 s	20 s
	Abstand O ₂ -Plasma d	3 – 10 mm	8 mm

Iteration n , Trocknungszeit t_{Tr} und Rotationsgeschwindigkeit des Implantats U beschrieben. Die Beschichtungszeit bestimmt genauso wie FS die Menge des Materials und demzufolge hat sie einen Einfluss auf die Schichtdicke und Morphologie (Rauheit), Kap. 6. Bei $t_B > 2$ s kam es ebenfalls zur Ausbildung von Trocknungsrissen in der Schicht, [125]. Die Beschichtungszeit und die Anzahl der Iterationen wurde auf $t_B = 0.5$ s und $n = 6$ festgelegt. Höhere Werte führten zu größeren Schichtdicken bzw. Trocknungsrissen. Eine Korrelation zur Schichtstruktur wird im folgenden Kapitel untersucht. Die Rotationsgeschwindigkeit U wurde auf $U = 300$ min⁻¹ gesetzt. Bei dieser Rotationsgeschwindigkeit vollführt das Implantat 2.5 Umdrehungen im Sprühnebel bei $t_B = 0.5$ s. Es ist ein Kompromiss aus vollständiger Benetzung der Implantatoberfläche durch die Beschichtungsdispersion und Materialverlust durch Fliehkräfte bei hoher Rotationsgeschwindigkeit. Die Trocknungszeit t_{Tr} wurde aus prozesstechnischen Gründen auf $t_{Tr} = 20$ s gesetzt.

Der letzte Teilschritt im Beschichtungsprozess, die O₂-Plasmanachbehandlung, wurde wie die O₂-Plasmavorbehandlung mit $t_{Pl} = 20$ s und $d = 8$ mm durchgeführt.

6. Charakterisierung der Schichtmikrostruktur

Der Beschichtungsprozess wurde im vorangegangenen Kapitel beschrieben. Im folgenden Kapitel werden die Eigenschaften der Schicht innerhalb der Größenordnung Mikrometer untersucht. Gleichzeitig werden Zusammenhänge zu den im Kap. 5 definierten bzw. festgelegten Parametern hergestellt. Der Weg zur Festlegung der Parameter soll hier demonstriert werden. Zwei wichtige Eigenschaften sind die Schichtdicke und deren Homogenität in Abhängigkeit von der Implantatgeometrie sowie die Rauheit der Schichtoberfläche. Weiterhin spielt die Schichthafung eine wesentliche Rolle. Denn während des Implantationsprozesses ist die Schicht hohen Belastungen ausgesetzt. Aufgrund der Wirkungsweise des Beschichtungsmaterials muss die Stabilität in erster Linie so hoch sein, dass der Implantationsprozess überstanden wird. Es ist nicht primär notwendig, dass das Beschichtungsmaterial eine Langzeitstabilität über Monate aufweist, denn das Beschichtungsmaterial verändert seine Zusammensetzung kurz nach Implantation und wird in Knochen umgebaut, siehe Kap. 8.

6.1. Schichtdicke

Die Schichtdicke wurde in Abhängigkeit von den Parametern Beschichtungszeit t_B und Feststoffgehalt FS untersucht. Das Ziel ist, eine homogene Beschichtung auf der Implantatoberfläche zu erreichen. Gleichzeitig muss die Schichtdicke aber so gering sein, dass keine Trocknungsrisse entstehen. Die Zusammenhänge sollen hier an einem bestimmten Implantatsystem (tiologic[®], Dentaurem) aufgezeigt werden. Dieses Implantatsystem wurde auch in der tierexperimentellen Studie am Kaninchenmodell verwendet. Wie in Kap. 4 beschrieben, unterscheiden sich die Implantatsysteme verschiedener Hersteller durch Gewindedesign

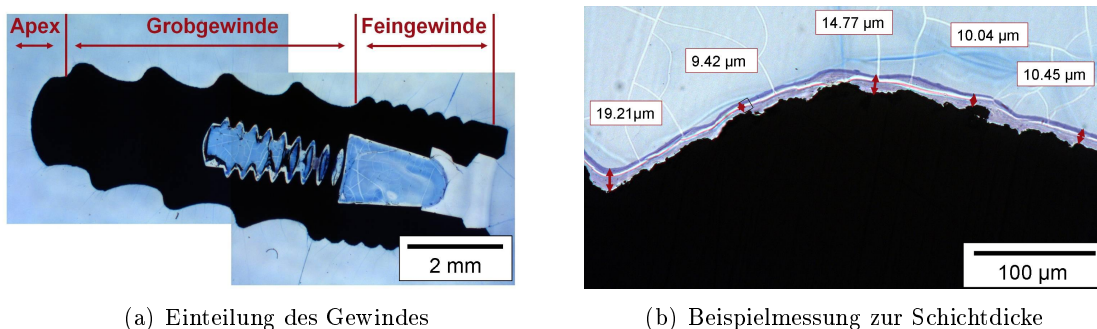


Abbildung 6.1.: Einteilung des Gewindes und Beispielmessung zur Schichtdicke

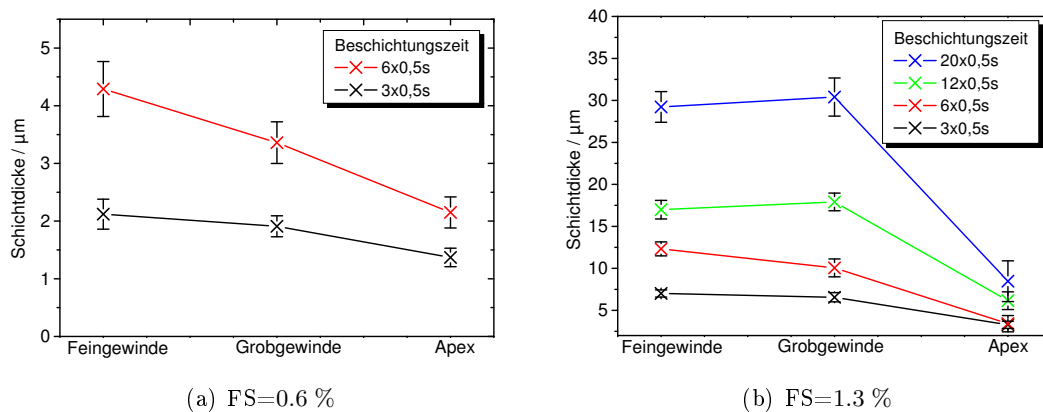


Abbildung 6.2.: Schichtdicke in Abhängigkeit der Beschichtungszeit für (a) $FS = 0.6\%$ und (b) $FS = 1.3\%$, jeweils $SiO_2:HA = 24 : 76$

und Oberflächenrauheit. Somit sind die hier dargestellten Ergebnisse nicht absolut auf andere Implantatsysteme übertragbar - die Zusammenhänge hingegen schon. Die Geometrie des verwendeten Implantatsystems beinhaltet zwei verschiedene Gewindetypen. Deshalb wurde zur Messung der Schichtdicke das Implantat in diese Bereiche eingeteilt. Einen zusätzlichen Bereich bildet der abgerundete Apex (Implantatspitze). Die verschiedenen Bereiche sind in Abb. 6.1(a) definiert. Es wurden histologische Schliffe von den beschichteten Titanimplantaten und lichtmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Schliffe wurden mit Toluidinblau gefärbt, um die Schicht im Lichtmikroskop leichter identifizieren zu können. An den beiden Gewindetypen wurden jeweils acht repräsentative Bilder pro Implantat aufgenommen. Am Apex wurden vier repräsentative Bilder pro Implantat aufgenommen. Da der Apex nur einen kleinen Teil der Implantatoberfläche ausmacht, wurde dies mit der damit verbundenen kleineren Anzahl der Messwerte gewichtet. Die Schichtdicke wurde mit der Software AxioVision (Zeiss) an fünf Stellen pro Bild gemessen. Es ergaben sich so 100 Messwerte pro Schliff.

Die Beschichtung erfolgte nach beschriebener Prozedur mit der Zusammensetzung $SiO_2:HA = 24 : 76$ und $FS=0.6\text{ wt}\%$, $FS=1.3\text{ wt}\%$. Die Beschichtungszeiten wurden durch Variation der Iteration eingestellt ($n = 3; 6; 12; 20$), wobei $t_B = 0.5\text{ s}$ konstant blieb.

In der Abb. 6.2 sind die Mittelwerte der Schichtdicke in den jeweiligen Bereichen in Abhängigkeit der Beschichtungszeit für die beiden Feststoffgehalte (a): $FS=0.6\text{ wt}\%$ und (b): $FS=1.3\text{ wt}\%$ dargestellt. Erwartungsgemäß nimmt die Schichtdicke bei ansteigender Beschichtungszeit zu, da mehr Material aufgetragen wird. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen Apex und den beiden Gewinden zu erkennen. Das liegt zum einen daran, dass das Implantat senkrecht zur Sprühhichtung orientiert ist. Dadurch ist die Fläche der Implantatspitze, die senkrecht zur Sprühhichtung steht, kleiner. Zum anderen, dass bei der Rotation die Beschichtungsdispersion durch die Zentrifugalkraft nach außen transportiert wird und sich ggf. ablöst. Die Schichtdicke zwischen Fein- und Grobgewinde hingegen ist bei gleicher Beschichtungszeit konstant. Die beiden schwarz und rot dargestellten Messergebnisse in (a) und (b) sind miteinander vergleichbar und unterscheiden sich nur durch den Feststoffgehalt. Erwartungs-

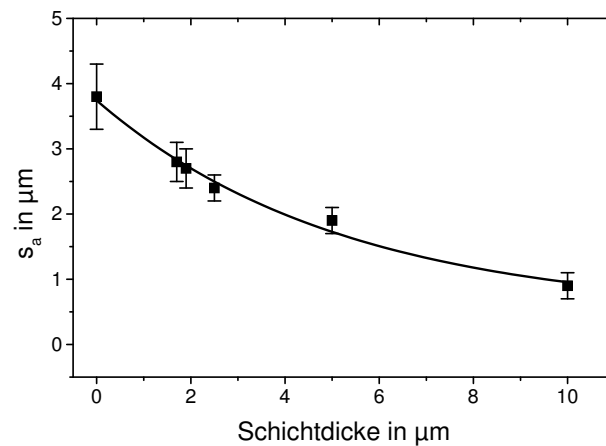


Abbildung 6.3.: Die Rauheit der Schicht nimmt mit zunehmender Schichtdicke ab.

gemäß sind die Werte der Schichtdicken bei FS=1.3 wt% in etwa 2x bzw. 3x höher als bei FS=0.6 wt%, da der Materialauftrag etwa doppelt so groß ist.

6.2. Schichtrauheit

Wie im Abs. 5.4 beschrieben, findet die Strukturbildung durch Verdunstung des Dispersionsmediums auf der Implantatoberfläche statt. Demzufolge spielt die Temperatur der Oberfläche eine Rolle. Außerdem ist zu vermuten, dass die Rauheit der beschichteten Implantatoberfläche von ihrer Schichtdicke abhängt. Nachfolgend wird die Korrelation zwischen Rauheit und Schichtdicke bzw. Oberflächentemperatur beschrieben.

6.2.1. Parameter Schichtdicke

Um den Einfluss der Schichtdicke auf die Rauheit der Schicht zu untersuchen, wurden sandgestrahlte tiologic[®] Implantate mit verschiedenen Beschichtungszeiten und demzufolge unterschiedliche Schichtdicken beschichtet. Die Zeit zwischen Plasmavorbehandlung und Beschichtungsvorgang betrug 30 s, so dass die Temperatur der Oberfläche zum Zeitpunkt des Spin-Spray-Coatings $T = 35\text{ °C}$ betrug. Die mittlere Rauheit der beschichteten und unbeschichteten Implantate wurde durch Area Analysis (3D-REM) an drei unterschiedlichen Stellen bestimmt. In Abb. 6.3 ist der Zusammenhang dargestellt. Die Rauheit des unbeschichteten tiologic[®]-Implantates betrug $3.8\ \mu\text{m}$. Bei einer geringen Schichtdicke von $1.7\ \mu\text{m}$ verringert sich die Rauheit zu $s_a = 2.8\ \mu\text{m}$. Die Topografie der unbeschichteten Oberfläche bleibt dabei nahezu erhalten. Der Wert wird demzufolge maßgeblich durch die Rauheit des Implantats bestimmt. Mit steigender Schichtdicke wird die Topografie weniger durch die Implantatoberfläche als durch die Schichtoberfläche bestimmt und die Rauheit sinkt entsprechend auf $s_a = 0.9\ \mu\text{m}$ bei $d = 9.6\ \mu\text{m}$. In Abb. 6.4 ist die Oberfläche der unbeschichteten und beschichteten Implantate in REM-Aufnahmen dargestellt. Die hügelartige Struktur mit

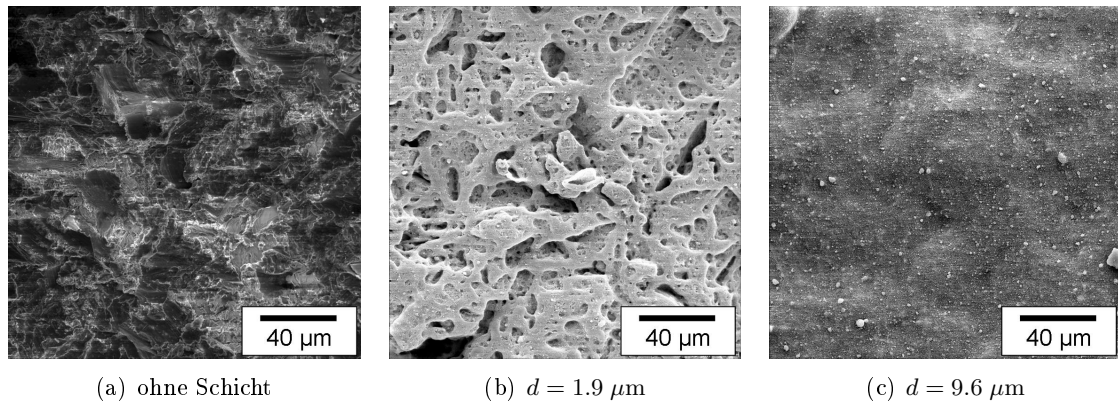


Abbildung 6.4.: Die Topografie der unbeschichteten Titanoberfläche bleibt bei geringer Schichtdicke erhalten. Die Rauheit der beschichteten Oberfläche nimmt mit der Schichtdicke erwartungsgemäß ab.

den Partikelrückständen des Implantats (a) wurde bei einer Schichtdicke von $d \approx 2 \mu\text{m}$ (b) noch abgebildet. Wohingegen bei dickerer Schicht (c) die Topografie nahezu verloren geht.

6.2.2. Parameter Temperatur

Die Verdunstung des Ethanolts ist temperaturabhängig. Deshalb wurde die Rauheit in Abhängigkeit von der Temperatur der Implantatoberfläche untersucht. Dazu wurden maschinerte Titanschrauben (M5-Gewinde, $L = 10 \text{ mm}$) bei unterschiedlichen Oberflächentemperaturen beschichtet. Anhand von Stereo-REM an jeweils drei unterschiedlichen Stellen wurde die mittlere Rauheit s_a über die Flächenanalyse bestimmt. Es wurden maschinerte Oberflächen verwendet, um allein die Rauheit der Schicht zu messen und die Rauheit der Implantatoberfläche auszuschließen. Außerdem wurde nur ein Sprühvorgang mit $t_B = 1 \text{ s}$ und $FS = 1.6 \text{ wt}\%$ durchgeführt, um den direkten Einfluss auf den Trocknungsprozess zu beobachten. In den Abb. 6.5 sind drei REM-Aufnahmen der Schicht auf maschinerten Oberflächen dargestellt, anhand derer die Rauheit bestimmt wurde.

In Abb. 6.5(a) ist die Strukturbildung bei ca. $60 \text{ }^\circ\text{C}$ erfolgt. Man erkennt deutlich ringartige Strukturen, die dadurch entstehen, dass der Ethanol bei dieser Temperatur sehr schnell verdunstet. Die Rauheit beträgt durch diese Ringstrukturen $1.1 \mu\text{m}$. Ab $T \approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ bilden sich kaum bis keine Ringstrukturen mehr aus, (b) und (c). Die Rauheit der Schichtoberfläche wird bei geringerer Oberflächentemperatur kleiner, siehe Tab. 6.1. Findet der Gelübergang bei $T = 34 \text{ }^\circ\text{C}$, also fast Raumtemperatur, beträgt die Rauheit $0.69 \mu\text{m}$.

Tabelle 6.1.: Die Rauheit der Schicht ist abhängig von der Temperatur der Implantatoberfläche.

t_{PS} in s	T in $^\circ\text{C}$	Rauheit in μm
10	62	1.1 ± 0.5
20	42	0.87 ± 0.21
30	34	0.69 ± 0.24

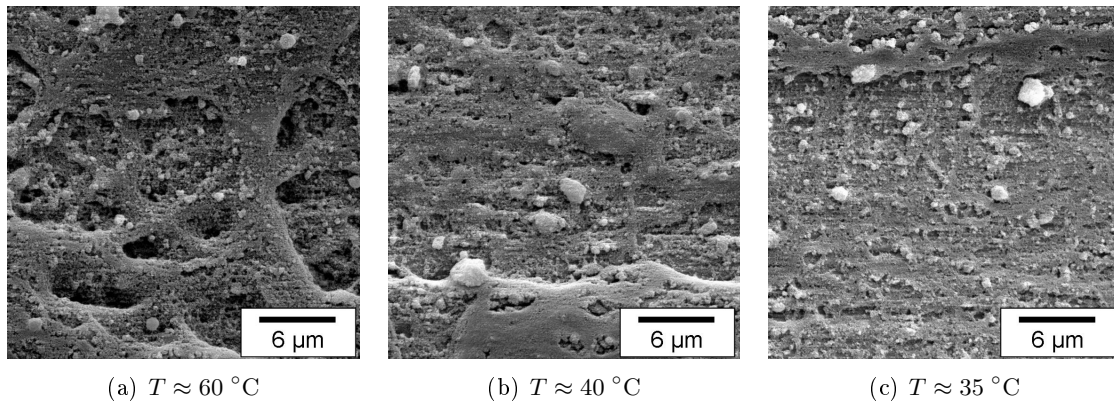


Abbildung 6.5.: REM-Aufnahmen der Schicht in Abhängigkeit der Oberflächentemperatur. Bei Temperaturen über $T = 40\text{ °C}$ treten Trocknungsringe auf. Darunter verschwinden diese Strukturen und die Rauheit der Schicht nimmt ab. $t_B = 1\text{ s}$ und $FS = 1.6\text{ wt\%}$. Größere Darstellung siehe Anhang Abb. A.3

6.3. Schichthaftung

Eine wichtige Anforderung an die Schicht ist, dass sie eine ausreichende Haftung zur Implantatoberfläche besitzt. Bezogen auf die Anwendung bedeutet das, dass die Beschichtung durch den Implantationsprozess nicht abgelöst wird.

Zur Untersuchung der Schichthaftung wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurde die Haftzugfestigkeit der Schicht auf der Titanoberfläche in Anlehnung an DIN EN 582 bzw. nach ASTM C633 bestimmt. Das ist ein Standardverfahren um die Haftzugfestigkeit von Schichten auf metallischen Implantaten zu bestimmen. Zum anderen wurde die Schicht mittels Implantation getestet. Dadurch wird die Schicht der gleichen Scherbelastung ausgesetzt wie sie später zur Anwendung kommen wird. D.h. beschichtete Implantate wurden anhand von Implantationsversuchen in *ex vivo* Knochen untersucht.

6.3.1. Haftzugfestigkeit

Bei diesem Prüfverfahren wurde die Schicht auf einen zylindrischen Prüfkörper mit einer unterseitigen M16 Aufnahmebohrung ($d = 25\text{mm}$, TiAl4V6) aufgebracht. Der Prüfkörper wies auf der zu messenden Seite eine raue Oberfläche durch Sandstrahlen auf. Ein zweiter im Durchmesser identischer Prüfkörper wurde mittels Einkomponentenklebstoff auf die zu untersuchende Schicht geklebt. Nach dem Aushärten des Klebers bei $T = 160\text{ °C}$ für $t = 4\text{ h}$ wurden beide Prüfkörper auseinander gezogen und die Kraft gemessen, bei der sich der

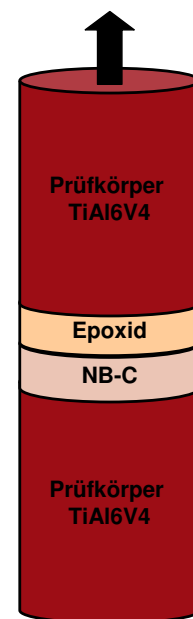


Abbildung 6.6.: Bestimmung der Haftzugfestigkeit nach ASTM C633

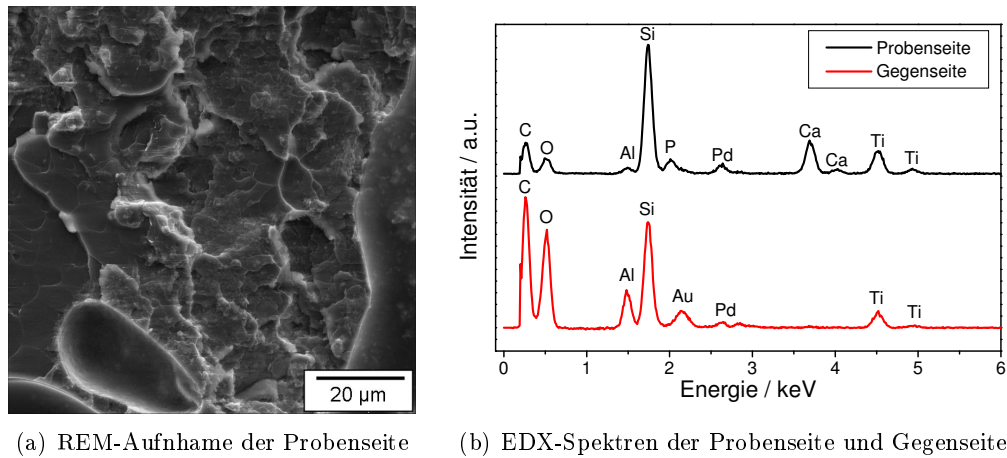


Abbildung 6.7.: Aus der REM- und EDX-Untersuchung der Prüfkörper zur Messung der Haftzugfestigkeit ergibt sich, dass bei den gemessenen Werten der Verbund Kleber-Schicht bricht. Das REM-Bild (a) zeigt die Bruchfläche. Die glatten Bereiche sind Bruchstellen im Kleber, die rauen Stellen sind die Grenzfläche Kleber-Schicht.

Verbund ablöste. Da die Fläche bekannt war, war somit die maximale (mechanische) Spannung ermittelbar. Jeweils drei Prüfkörper wurden so beschichtet, dass die Schichtdicke mit der im Tierexperiment verwendeten Schichtdicke vergleichbar ist. D.h. die Beschichtungszeit wurde dementsprechend auf $t_B = 1$ s angepasst bei $n = 6$ Iterationen. In Tab. 6.2 sind die Messungen der Schicht in Abhängigkeit der Schichtdicke dargestellt. Alle Messwerte lagen oberhalb von 22 MPa. Dieser Wert ist durch die *U.S. Food and Drug Administration, FDA* als Mindestanforderung für Schichten auf metallischen Implantaten festgelegt, [127]. Eine Korrelation zwischen Haftzugfestigkeit und Schichtdicke konnte im Rahmen dieser Messung nicht festgestellt werden. Dennoch ergeben diese Messungen eine weitere wichtige Information.

Bei allen Messungen hat sich das Epoxidharz von der Schicht abgelöst, d.h. die Schicht blieb unverseht auf der Titanoberfläche. In der Abb. 6.7(a) ist eine REM-Aufnahme der Probenseite nach dem Versuch dargestellt. Die glatten Bereiche sind der Kleber, der raue Bereich in der Mitte ist die Grenzfläche Kleber-Schicht. Auf keiner Probe wurde die Titanoxid-Oberfläche vom Prüfkörper selbst gefunden, d.h. die Schicht hat sich nicht abgelöst. In Abb. 6.7(b) sind beispielhaft zwei EDX-Spektren von der Probenseite und der Gegenseite dargestellt. Beide Spektren wurden integral über eine Fläche von ca. $1.5 \text{ mm} \times 1.5 \text{ mm}$ aufgenommen. Die schwarze Kurve ist die Probenseite. Die Schicht ist durch den Ca-Peak nachweisbar. Das hohe

Tabelle 6.2.: Die Messwerte zur Haftzugfestigkeit der Schicht in Abhängigkeit der Schichtdicke. Die Messwerte in Klammern sind nicht auswertbar, siehe Text. Eine Abhängigkeit zwischen Schichtdicke und Haftzugfestigkeit ist nicht nachweisbar. Die Mindestanforderung von 22 MPa wurde überschritten.

Schichtdicke	5 μm	10 μm	15 μm
Haftzugfestigkeit in N/mm^2	33 ± 10	44 ± 2	35 ± 4

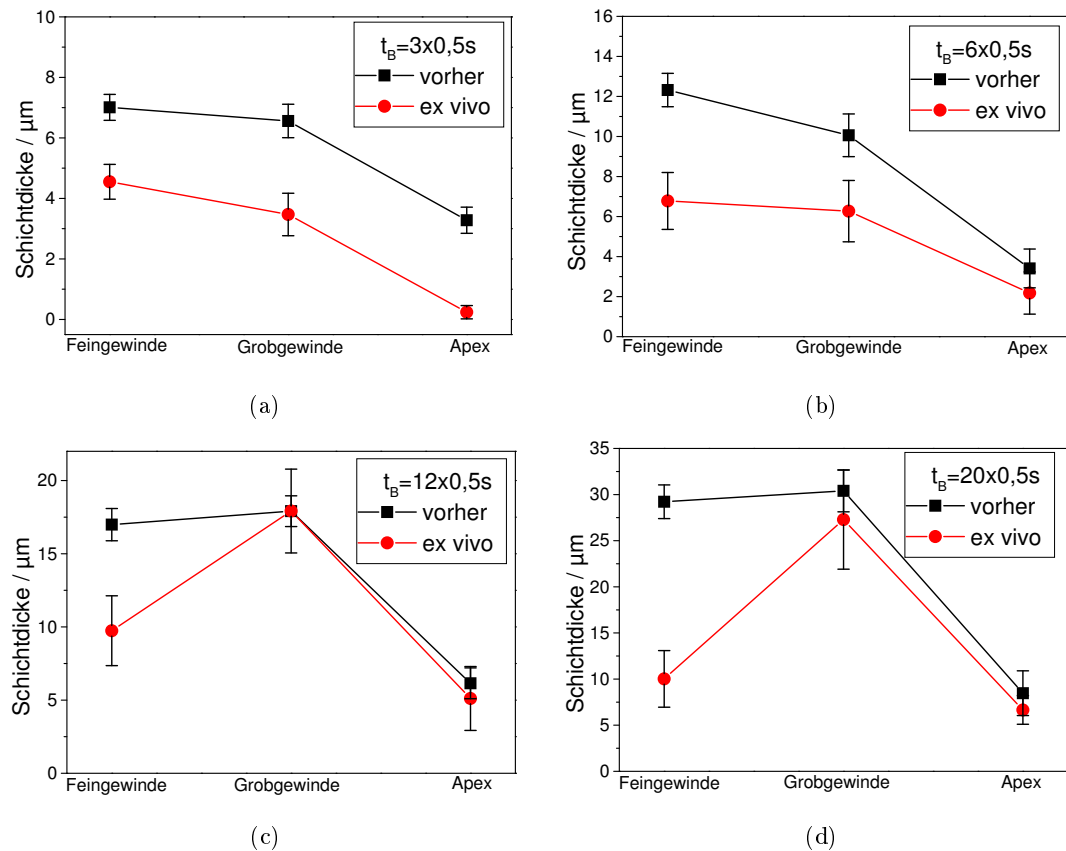


Abbildung 6.8.: Schichtdicken nach dem Einsetzen in Femur vom Kaninchen.

Si-Signal kommt vom Kleber. Dass die elektronische Anregung durch die gesamte Proben- bzw. Schichtdicke ging, ist am Ti-Peak zu erkennen. Im Vergleich dazu ist auf der dazugehörigen Gegenseite, schwarze Kurve, kein Ca-Peak zu erkennen. Auch hier kamen die Signale des Spektrums aus der gesamten Probendicke. Es wurde kein Beschichtungsmaterial auf den Gegenseiten der Prüfkörper nachgewiesen. Demzufolge ergeben diese Messwerte eine quantitative Aussage über den Epoxid-Schicht-Verbund und gleichzeitig die Information, dass die Haftzugfestigkeit der Schicht auf Titanoxid über den gemessenen Werten liegen muss.

6.3.2. Implantationsversuch

Bei dem Implantationsprozess ist die Schicht großen Scherkräften ausgesetzt. Es gibt standardisierte Verfahren, die Implantatoberflächen gegenüber Scherkräften testen. Dabei wird das zu testende Implantat in einen Kunststoff gespannt, der ähnliche mechanische Eigenschaften wie Knochen aufweist. Durch zyklische Auf- und Abbewegungen in diesem Kunststoff wird die Scherbelastung generiert. Über die Anzahl der Zyklen kann der Belastungszeitraum angepasst werden. Aufgrund der besonderen Wirkungsweise der Schicht, was in Kapitel 8 erläutert wird, besteht keine Forderung nach einer langzeitlichen Stabilität der Schicht. Sie muss nur

den Belastungen durch den Implantationsprozess standhalten.

Um eine Aussage über die Belastbarkeit der Schicht gegenüber den Scherkräften treffen zu können, wurden beschichtete Implantate mit unterschiedlichen Schichtdicken, vgl. Abschnitt 6.1, in *ex vivo* Knochen von Kaninchen (Femur) eingebracht. Anschließend wurden die Implantate mit dem umliegenden Gewebe entnommen und nach Entwässerung durch aufsteigende Acetonreihe in Epoxidharz eingebettet. Danach wurden histologische Schliffe nach Donath angefertigt, [123]. Die Schichtdicken wurden wie im Abschnitt 6.1 an mehreren Stellen des histologischen Schliffs bestimmt. In Abb. 6.8 sind die Messungen der Schichtdicken vor und nach Implantation dargestellt. Die jeweils schwarze Kurve ist die Schichtdicke ohne Belastung, die jeweils rote mit Belastung. Bei allen Proben hat sich teilweise Beschichtungsmaterial abgelöst. In den Abb. 6.8(c) und 6.8(d) zeigt sich, dass die Scherkräfte am Grobgewinde geringer sind als am Feingewinde, denn dort wurde vergleichsweise mehr Schicht abgelöst. Das liegt an der geringeren Knochendichte der Spongiosa, in der das Grobgewinde eingeschraubt wird. Das Feingewinde wird hingegen in der dichteren Kompakta verankert. Generell aber bleiben ca. 60% des Ausgangsmaterials auf der Implantatoberfläche nach Implantation. Dieser Wert ist das arithmetische Mittel über alle Messwerte und somit eine grobe Abschätzung. Eine genauere Angabe ist an dieser Stelle nicht sinnvoll, da die Scherkräfte stark von der Knochendichte abhängig sind, die für jeden Organismus und an jeder Stelle im Körper unterschiedlich ist. Da die Zellen in erster Linie nur mit der Oberfläche des Materials in Kontakt treten, Abs. 2.2, ist die Schichtdicke für Zellreaktionen nicht entscheidend. Ein weiterer Punkt, der im weiteren Verlauf dieser Arbeit geklärt wird, sind die abgelösten Partikel. Dass das abgelöste Material keine Entzündungsreaktionen hervorruft, zeigt sich im Tierexperiment und liegt daran, dass das Beschichtungsmaterial chemisch und strukturell identisch dem NanoBone[®]-Granulat ist. Zusätzlich wurden bei Mikropartikeln, die der Schicht strukturell identisch sind, im Tierversuch keine toxischen Reaktionen nachgewiesen. Abgelöste Schichtfragmente könnten daher osteokunduktiv oder -induktiv wirken, [107].

6.4. Beschichtete Implantate in den Tierstudien

An dieser Stelle wird die Schicht auf den in Kap. 4 charakterisierten Implantaten beschrieben. Alle Implantate wurden nach beschriebener Beschichtungsprozedur und den festgelegten Parametern beschichtet. Diese Implantate wurden so bei den tierexperimentellen Untersuchungen verwendet. In Abb. 6.9 sind 3D-REM-Aufnahmen der Implantoberflächen gezeigt. Es waren keine Unterschiede in der Topografie bei diesen Parametern feststellbar. Die Messung der Rauheit der Schicht auf den Implantaten zeigte ebenfalls keine messbaren Unterschiede. Alle Implantate wiesen eine homogene Bedeckung der Oberfläche auf. Das Beschichtungsverfahren ist demzufolge unabhängig vom verwendeten Implantattyp bzw. der Implantatgeometrie. Das ist hinsichtlich einer Anwendung auf marktüblichen Implantaten eine wichtige Voraussetzung.

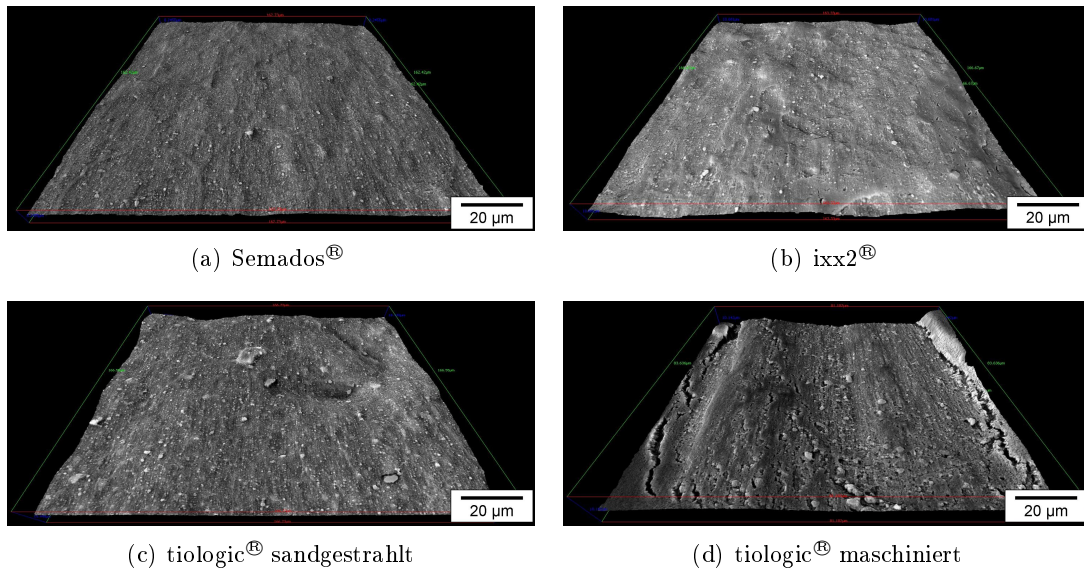


Abbildung 6.9.: Stereo-REM der verschiedenen Implantattypen. Sie weisen nach der Beschichtung nahezu die gleiche Topografie und Rauheit auf.

6.5. Zusammenfassung Schichtmikrostruktur

Das Ziel dieses Beschichtungsprozesses ist, eine dünne Schicht aus SiO_2 und Hydroxylapatit auf Implantaten aufzutragen, wobei eine vollständige Bedeckung bzw. eine homogene Schichtdicke erreicht werden soll. Die NB-Schicht wurde hinsichtlich Schichtdicke, Schichthaftung und Rauheit untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Schichtdicke über die Parameter Beschichtungszeit und Feststoffgehalt der Beschichtungsdispersion kontrollierbar ist. Es sind mittlere Schichtdicken von $6 \mu\text{m}$ bis $25 \mu\text{m}$ realisiert worden. Dabei hat es sich als notwendig erwiesen mehrere dünne Einzelschichten hintereinander aufzutragen, um Risse infolge der Schrumpfung des Schichtmaterials beim Trocknungsprozess zu vermeiden.

Die Schichthaftung wurde anhand zweier verschiedener Tests untersucht. Zum einen wurde die Haftzugfestigkeit der Schicht nach dem Standard ASTM C633 bestimmt. Die Messungen haben ergeben, dass die Schicht eine Haftzugfestigkeit über dem geforderten Mindestwert von 22 MPa (FDA) besaß. Eine genaue Angabe der Haftzugfestigkeit war nicht möglich, da der Verbund Kleber-Schicht eine geringere Haftung besaß als der Verbund Schicht-Titandioxid. Daher lieferten die Messungen eine untere Einschränkung des realen Wertes. Zum anderen wurde die Scherbelastung des Beschichtungsmaterials durch Implantationsversuche untersucht. Dazu wurden beschichtete Implantate *ex vivo* in Knochen gesetzt. Die Schichtdicke wurde nach dem Prozess bestimmt, um Aussagen zu Ablösungen treffen zu können. Die mittlere Schichtdicke betrug ca. 60 % der Ausgangsschichtdicke, wenngleich es lokal zu Ablösungen kam. Andererseits gab es Bereiche ohne Veränderung der Schicht. Es ist aber davon auszugehen, dass mögliche abgelöste Schichtpartikel keine toxische Reaktionen hervorrufen, siehe [107].

Die Bestimmung der Rauheit ergab folgende Ergebnisse. Die Rauheit der Schicht wird maßgeblich durch die Schichtdicke und die Oberflächentemperatur beim Sol-Gel-Übergang bestimmt. Bei Schichtdicken unter ca. $4 \mu\text{m}$ wird die Rauheit eines beschichteten Implantats durch die TiO_2 -Rauheit bestimmt; über $4 \mu\text{m}$ durch die Rauheit der Schicht selbst. Die Temperatur der Implantatoberfläche hat durch die O_2 -Plasmavorbehandlung eine Temperatur von bis zu $140 \text{ }^\circ\text{C}$. Beim anschließenden Spin-Spray-Coating ist die Temperatur der Oberfläche, je nach Zeit zwischen Plasma und Coating, im Bereich von $T = 20 - 60 \text{ }^\circ\text{C}$. Die Verdunstung des Dispersionsmediums Ethanol ist temperaturabhängig. Demzufolge bilden sich ringartige Strukturen infolge der schnellen Trocknung in der Schicht aus. Dieser Effekt bildet sich ab $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ aus und es wurden dadurch Rauheiten von $1.1 \mu\text{m}$ erzielt. Dieser Werte gibt die Rauheit der Schicht selbst an, d.h. exklusive TiO_2 -Rauheit der Implantate. Unterhalb dieser Temperatur werden die Ringstrukturen minimiert und die Rauheit der Schicht ist etwa $s_a = 0.9 \mu\text{m}$.

Die für die tierexperimentellen Untersuchungen beschichteten Implantate unterscheiden sich durch ihre Form, ihr Gewindedesign und durch ihre Oberflächentopografie, siehe Kap. 4. Es zeigte sich, dass das Beschichtungsverfahren invariant gegenüber diesen Eigenschaften der verschiedenen Implantattypen ist.

7. Charakterisierung der Schichtnanostruktur

Im vorangegangenen Kapitel wurden die Mikrostruktur der Schicht und die Korrelationen zu Prozessparametern untersucht und erläutert. Im nun folgenden Kapitel geht es um Strukturen auf der Nanometerskala. Das Ziel ist es, Hydroxylapatit-Kristallite in eine SiO_2 -Matrix einzubetten. Gleichzeitig soll diese entstandene Struktur eine hohe Porosität bzw. eine hohe spezifische Oberfläche aufweisen, um eine hohe Proteinadsorption zu gewährleisten. Diese Punkte wurden mittels Elektronenmikroskopie und Gasadsorption untersucht. Die Struktur der Silicagelmatrix, die in einer Art „erzwungener“ Gelbildung erzielt wird, wurde in Abhängigkeit von den Prozessparametern untersucht. Die Charakterisierung der SiO_2 -Matrix erfolgte durch XRD-Messungen im Vergleich zu anderen SiO_2 -Netzwerken.

7.1. Porosität

Zur Charakterisierung der Porosität wurden zum einen elektronenmikroskopische Aufnahmen der Schicht angefertigt und zum anderen wurde die Oberfläche nach BET bestimmt. Hierzu wurden die einzelnen Komponenten HA und SiO_2 -Gel sowie die Schicht selbst untersucht, um die einzelnen Beiträge zur Porosität beurteilen zu können. Das SiO_2 -Gel wurde gesprüht, so dass die gleichen Prozessparameter bei der Struktur realisiert wurden.

Die Messergebnisse der BET-Oberflächen sind in Tab. 7.1 zusammengestellt. Die spezifischen Oberflächen der Komponenten und SiO_2 -Gel unterscheiden sich nicht. Beide sind knapp über $220 \text{ m}^2/\text{g}$. Die Schicht liegt mit $169 \text{ m}^2/\text{g}$ unter den beiden Werten. In Abb. 7.1 sind die Porenvolumina gegen die Porengrößen aufgetragen. Aus dieser Darstellung kann man auf die volumengewichtete Größenverteilung der Poren schließen.

Beim HA (a) waren große Porenvolumina vorzufinden. Das liegt daran, dass die HA-Kristallite zu einer offenporigen, lockeren Packung mehrerer Kristallite agglomerieren, siehe Abb. 2.12(a). Im SiO_2 -Gel hingegen bildeten sich sehr kleine Poren aus. Das wird aus dem Anstieg des Porenvolumens zu kleinen Porengrößen hin deutlich. Die Theorie ist zwar auf Porengrößen $> 1 \text{ nm}$ beschränkt, aber aus dem Verlauf der Verteilung wird deutlich, dass die meisten Poren im SiO_2 -Gel kleiner als 2 nm sind. In Abb. 7.1(c) ist die Porenvolumenverteilung der Schicht dargestellt. Sie besitzt ein breites Maximum zwischen 20 nm und 50 nm , d.h. diese Poren tragen hauptsächlich zum Volumen bei. Dies wird

Tabelle 7.1.: BET-Oberflächen der einzelnen Schicht-Komponenten und der Schicht selbst.

Material	Oberfläche in m^2/g
HA	225
SiO_2 -Gel	222
Schicht	169

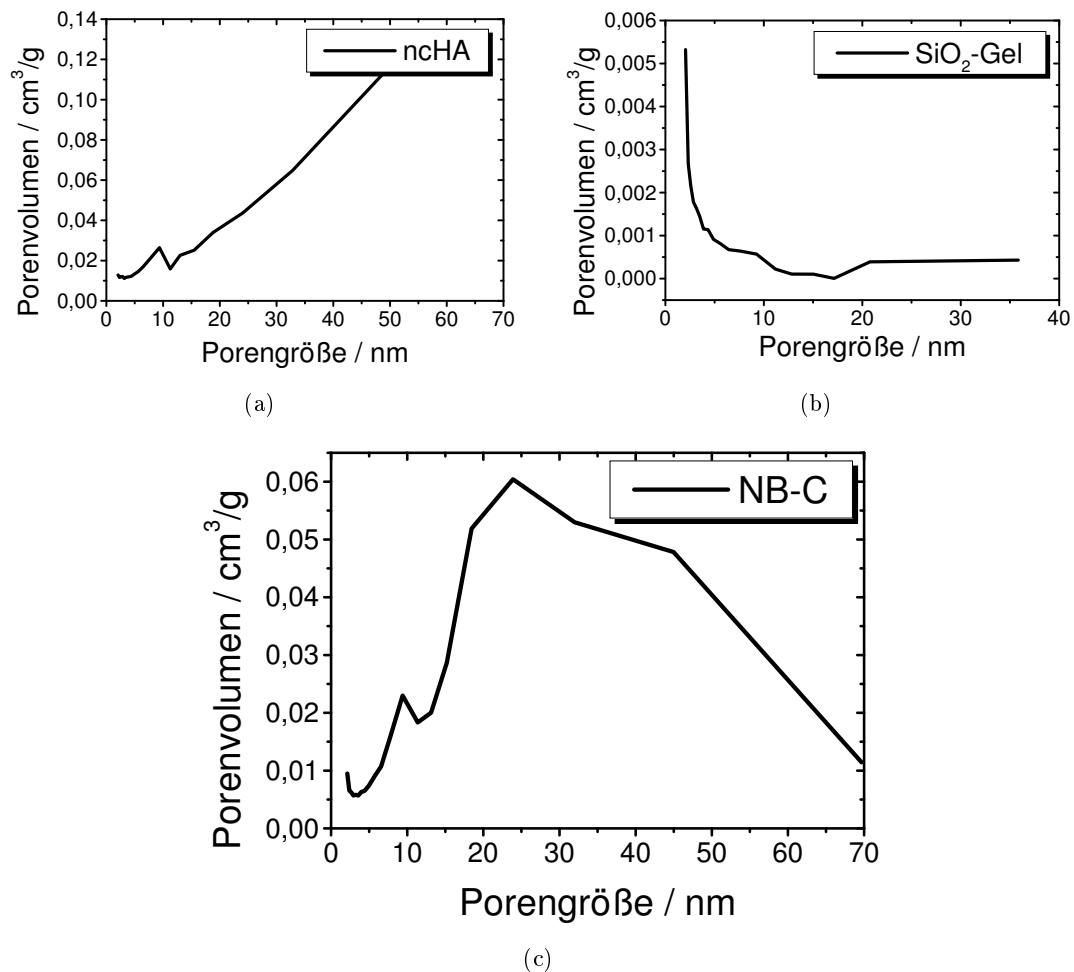


Abbildung 7.1.: Porenvolumina nach BET

durch die folgenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt.

In Abb. 7.2 (a) und (b) sind zwei unterschiedliche Vergrößerungen der Schichtoberfläche dargestellt. In (a) ist ein normales REM-Bild, in (b) mit höherer Vergrößerung ein SE-Bild im STEM-Modus. In (a) sind sphärische Partikel in der Größenordnung von etwa 300 – 800 nm auf der Oberfläche zu erkennen. Das sind Agglomerate aus SiO₂ und HA, die in der Dispersion entstanden sind, denn Messungen der Partikelgröße in der Dispersion mittels dynamischer Lichtstreuung, [125], ergaben Partikelgrößen im Bereich von 300 – 1000 nm. Bei höherer Vergrößerung (b) sieht man Poren im Bereich von wenigen Nanometern bis einigen hundert Nanometern. Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der BET-Oberflächenbestimmung. Außerdem sind die HA-Kristallite als Plättchen sichtbar. Allerdings deutet sich an dieser Stelle schon an, dass die Kristallite von der SiO₂-Matrix eingehüllt sind, denn in Abb. 7.2(b) fällt auf, dass die Kristalloberfläche des HAs rau erscheint. Das ist auf das SiO₂-Gel zurückzuführen, das das HA umgibt.

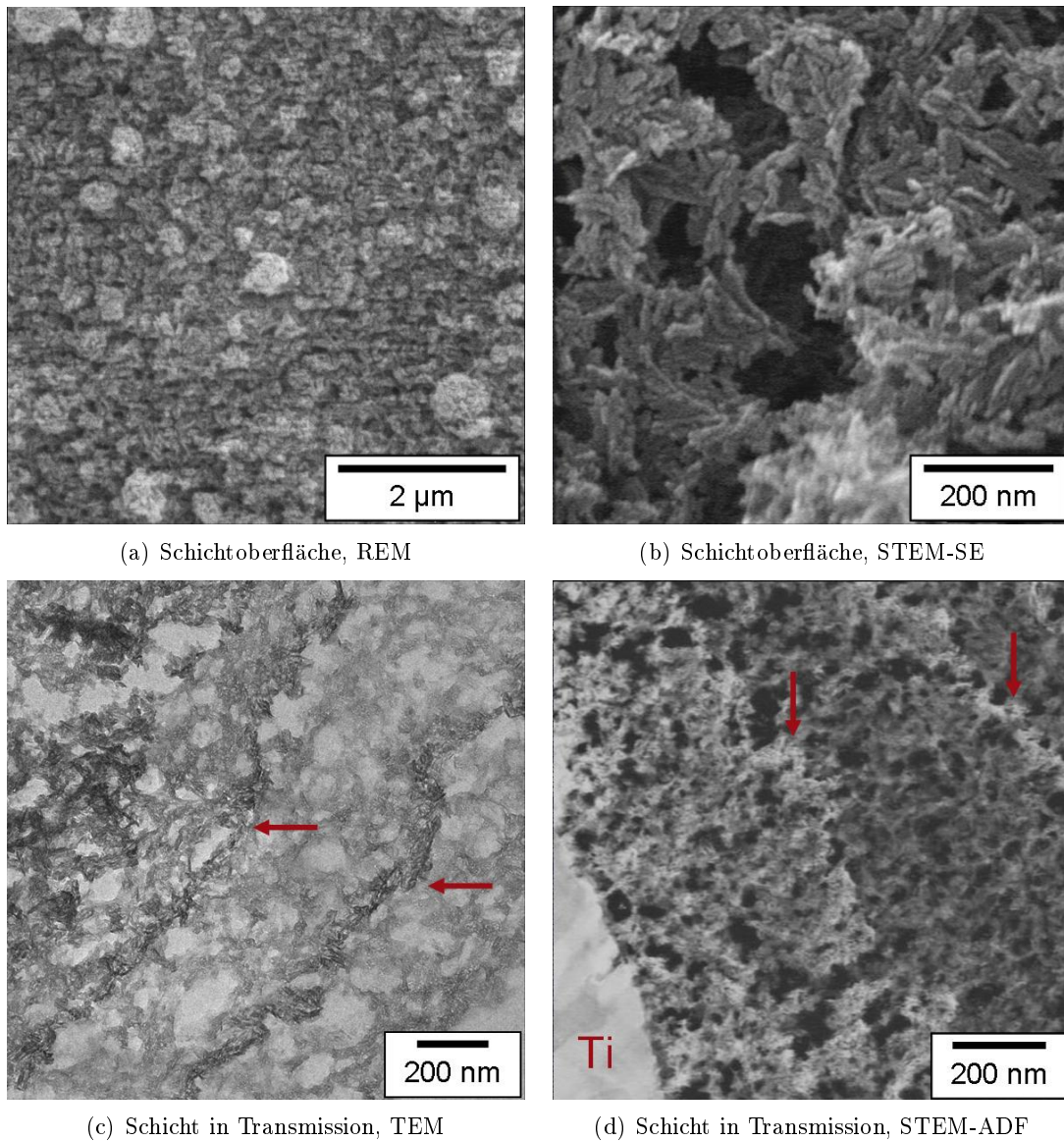
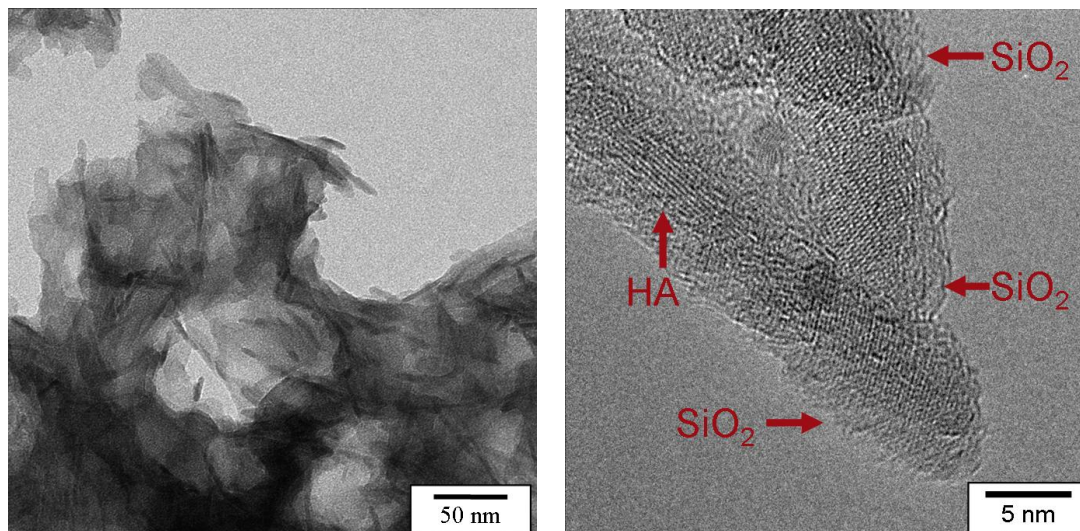


Abbildung 7.2.: Nanostruktur der Schichtoberfläche und der Schicht in Transmission

7.2. Layer-By-Layer

Um das Schichtinnere zu untersuchen, wurde eine Titanfolie nach Abs. 5.6 beschichtet und davon Ultradünnschnitte (etwa 40 nm dick) angefertigt. Die Schnittrichtung war senkrecht zur Folie bzw. Schicht. Dadurch ist es möglich die Schichtstruktur entlang der Schichtdicke zu beobachten. Von diesen Schnitten wurden STEM-ADF (Annular Dark Field) und TEM-Bilder aufgenommen. In Abb. 7.2(c) ist eine TEM-Aufnahme der Schicht gezeigt. Auffällig sind dunkle Streifen in der Schicht. Das bedeutet, in diesen Streifen fand mehr Absorption



(a) TEM-Aufnahme der Schicht. Das SiO₂ bildet eine Matrix um die HA-Kristallite mit einer Porenstruktur im Nanometerbereich. (b) HRTEM-Aufnahme der SiO₂-Matrix auf den HA-Kristalliten. Größere Darstellung siehe Anhang Abb. A.4

Abbildung 7.3.: Die SiO₂-Matrix mit dem eingebetteten Hydroxylapatit

statt, was durch dichteres Material erklärt werden könnte. Durch das iterative Verfahren trocknet das Material nach jedem Sprühvorgang und es bildet sich eine Art Hülle mit mehr SiO₂ und höherer Dichte. Ein vergleichbarer Effekt wurde in [113] beschrieben. Es bildete sich bei sprühgetrockneten Mikropartikeln, die die gleiche Struktur und Zusammensetzung wie die hier beschriebene Schicht aufweisen, eine Hülle mit anteilig mehr SiO₂.

Der Kontrast im STEM-ADF, siehe Abb. (d) wird vorrangig durch den Beugungskontrast des HAs bestimmt. Die layer-by-layer Strukturen sind in dieser Abbildung weniger deutlich als im TEM. Der Unterschied in den beiden Abbildungen TEM und STEM-ADF spricht für eine SiO₂-Anreicherung als äußere Hülle einer jeden Einzelschicht. Denn wie im Kap. 5 beschrieben, erfolgt die Beschichtung iterativ mit jeweils einem Spin-Spray-Vorgang mit jeweils anschließender Trocknung. Dennoch sind die einzelnen Schichten nicht separiert, sondern bilden eine zusammenhängende Schicht. In beiden Abbildungen, (c) und (d), wird die Porosität zusätzlich deutlich. Die Schicht besitzt über ihre ganze Dicke ein durchgängiges Porensystem.

7.3. Hydroxylapatit in der SiO₂-Matrix

Eine wesentliche Eigenschaft des NanoBone[®]-Granulats ist der nanokristalline Hydroxylapatit in der Silicamatrix. Dabei ist der HA vom SiO₂ umgeben. In diesem Abschnitt wurde die Elementverteilung innerhalb der Schicht untersucht bzw. ob die Einbettung des HAs in die SiO₂-Matrix auch für die NB-Schicht gilt. Dazu wurden Kupfer-Grids mit Kohle-Lochfilm mit NB beschichtet und TEM- und HRTEM-Aufnahmen bzw. elementspezifische Abbildungen (EELS ESI) angefertigt. In Abb. 7.3(a) ist ein TEM-Bild der Schicht gezeigt. Die dunklen

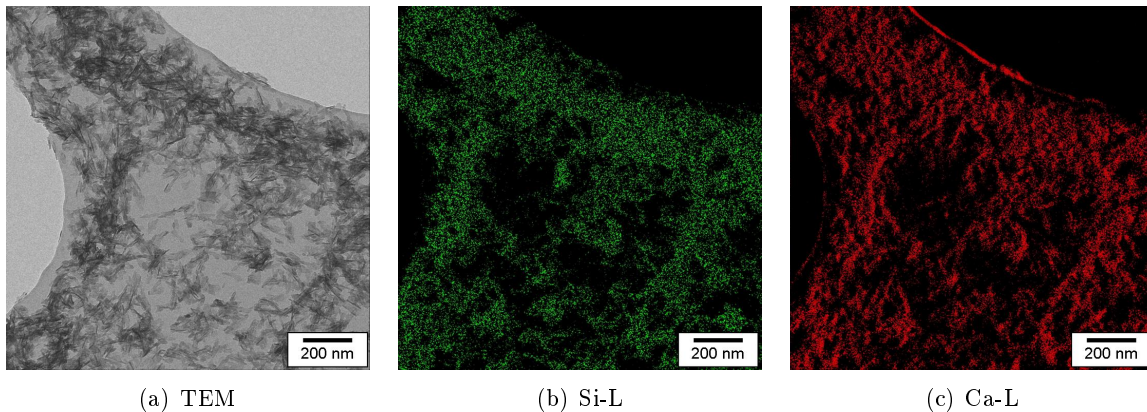


Abbildung 7.4.: Elementenspezifische Abbildungen mit EELS. Die Schicht im TEM-Bild (a) wurde auch in der Si- (b) und Ca-Verteilung (c) abgebildet. Si ist an denselben Stellen wie Ca. Das SiO_2 bildet eine Matrix in der der Hydroxylapatit eingebettet ist.

nadelförmigen Strukturen sind die HA-Plättchen, wenn sie parallel zum Elektronenstrahl orientiert sind. Die SiO_2 -Matrix ist als amorphe Struktur um die HA-Plättchen zu erkennen. In (b) ist ein HRTEM-Bild dargestellt. Die Netzebenen des HA-Kristalls sind zu erkennen. Die Pfeile zeigen auf die SiO_2 -Matrix auf der Oberfläche dieses HA-Plättchens. Da das SiO_2 kein periodisches Gitter ausbildet, ist es schwierig zu identifizieren, aber die unregelmäßigen Ränder und die granuläre Struktur deuten darauf hin. Weiterhin deuten die granulären Strukturen auf die Primärteilchen im Gelnetzwerk hin.

Zur weiteren Verifizierung dieser Aussagen sind in Abb. 7.4 elementenspezifische Aufnahmen mit EELS gezeigt. In (a) ist das dazugehörige TEM-Bild des gemessenen Bereichs (Zero-loss). In (b) ist das Signal der Si-L-Kante und in (c) das der Ca-L-Kante. Bei beiden Messungen wurde der Untergrund mit der Drei-Fenster-Methode abgezogen. Beide Elementverteilungen bilden die Strukturen im Zero-loss-Bild ab, d.h. an den Stellen wo Ca ist, befindet sich auch Si. Damit ist die Einbettung des Hydroxylapatits in die SiO_2 -Matrix nachgewiesen.

7.4. Struktur der SiO_2 -Gelmatrix

Wie bereits mehrfach erwähnt, besteht die SiO_2 -Matrix aus einer Gel-Struktur. Im Abschnitt 2.4 wurde allgemein das SiO_2 -Netzwerk beschrieben. Es besteht immer aus SiO_4 -Tetraedern, die sich zu Polyedern vernetzen. Diese Gebilde werden als Primärteilchen bezeichnet, die sich wiederum je nach Trocknungs- und Alterungsprozess mehr oder weniger vernetzen können. Im folgenden Abschnitt wurde die Vernetzung der Gelmatrix mit Röntgenbeugung untersucht und mit anderen SiO_2 -Netzwerken verglichen.

Experiment

Eine Messung der Schicht auf der Implantatoberfläche ist aus geometrischen Gründen nicht möglich. Außerdem ist die Menge des Schichtmaterials zu gering, um aussagekräftige Messun-

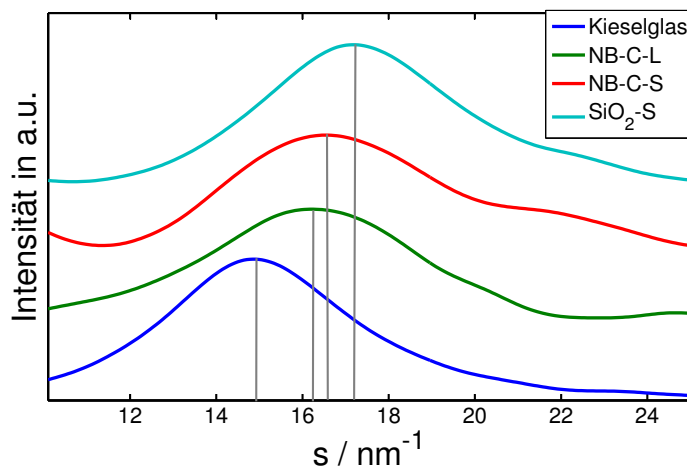


Abbildung 7.5.: Erstes Beugungsmaximum des SiO₂ in der Schicht, im Xerogel, im gesprühten Xerogel, im Kieselglas. Vernetzungsgrad wird mit kleinerem q größer. Durch schnelle Trocknung bzw. Gelbildung können sich weniger Bindungen ausbilden.

gen durchführen zu können. Deswegen wurde in mehreren Iterationsschritten ($n \approx 200$) ein metallischer Stab beschichtet und das Beschichtungsmaterial wurde jeweils nach etwa 20 bis 30 Iterationsschritten mechanisch entfernt. Das so gewonnene Pulver wurde dann mit XRD in Reflexion gemessen. Da Hydroxylapatit bei $s = 18.3 \text{ nm}^{-1}$ den (002)-Reflex besitzt, wurde die HA-Streukurve abgezogen (NB-C-S). Um den Einfluss der Gelbildungszeit zu untersuchen, wurde die Beschichtungsdispersion zusätzlich offen in einer Petrischale im Luftstrom der LAF-Box platziert (NB-C-L) bis der Ethanol verdunstet war. Dieser Vorgang dauerte etwa 24 Stunden. Zur Übersicht sind die Bezeichnungen in Tab. 7.2 zusammengefasst.

Um den Einfluss des HAs zu untersuchen, wurde eine SiO₂-Schicht hergestellt, indem eine Beschichtungsdispersion mit gleichem SiO₂/Ethanol-Verhältnis wie in der NB-Beschichtungsdispersion nur ohne HA gesprüht wurde (SiO₂-S). Als Referenz wurde Kieselglas gemessen. Alle Messungen wurden zur besseren Darstellung geglättet. Der Streuvektorbetrag des ersten Hauptmaximums (FSDP) wurde bestimmt, indem die Streukurve in diesem Bereich mit einer Gaußfunktion gefittet wurde.

Der Streuvektorbetrag des Maximums liefert ein Maß für den Vernetzungsgrad in der SiO₂-Struktur. Im Kieselglas sind die Tetraeder komplett vernetzt, siehe Abb. 2.8. Wohingegen sich im Gel Primärteilchen ausbilden, die offene Bindungen bzw. OH-Gruppen an der Oberfläche aufweisen. Dadurch können sich die Tetraederwinkel zueinander verdrehen und die Ringstrukturen in den Primärteilchen relaxieren. Sie sind dadurch kleiner als im Kieselglas. Die Lage des ersten Hauptmaximums verschiebt sich mit der Größe der Ringstrukturen und demzufolge verschiebt sich das Maximum in Abhängigkeit vom Vernetzungsgrad, [99, 128–130].

Tabelle 7.2.: Übersicht zu den Probenbezeichnungen und Streuvektorbeträgen s_{max} der ersten Hauptmaxima (FSDP) der jeweiligen SiO_2 -Strukturen

Probe	Kurzbeschreibung	s_{max} in nm^{-1}
Kieselglas	gemörsertes Kieselglas	15.0
Xerogel	vergleichbares Xerogel (gleicher pH-Wert) aus [99]	15.9
NB-C-L	NB-Schicht mit langsamen Gelübergang unter LAF-Luftstrom	16.3
NB-C-S	NB-Schicht gesprüht	16.7
SiO_2 -S	Beschichtungsdispersion ohne HA, aber gleiches SiO_2 /Ethanol-Verhältnis wie in „normaler“ Dispersion	17.3

Ergebnisse

Die Streukurven sind in Abb. 7.5 im Bereich des ersten Hauptmaximums (FSDP) vom SiO_2 dargestellt. Die schwachen Peaks in den Streukurven der Schicht (NB-C) bei 20 bzw. 22 nm^{-1} sind Artefakte. Das sind Reflexe des HAs, die nicht komplett eliminiert wurden. Der Peak vom Kieselglas liegt bei $s = 15.0 \text{ nm}^{-1}$. Die Maxima der weiteren Proben sind zu höheren Streuvektorbeträgen s verschoben. Das bedeutet, dass die Vernetzung in diesen Proben abnimmt. Die Streuvektorbeträge der Maxima sind in Tab. 7.2 zusammengefasst. Der Unterschied zwischen den Messungen NB-C-L und NB-C-S besteht in der Gelbildungszeit. Bei NB-C-L wurde das Dispersionsmedium langsam im Luftstrom verdunstet, d.h. der Feststoffgehalt der Dispersion nimmt dabei allmählich zu und die SiO_2 -Primärteilchen treffen statistisch häufiger aufeinander. Dadurch sind sie in der Lage mehr Si–O–Si-Bindungen auszubilden als in NB-C-S. Denn hierbei wird das Dispersionsmedium innerhalb weniger Sekunden entfernt und es können sich nicht so viele Si–O–Si-Bindungen ausbilden. Das System wird in die Gelbildung „gezwungen“. Die Ringstrukturen sind dadurch kleiner und das Maximum verschiebt sich zu größeren s . Im Vergleich zu den Werten der Schicht (NB-C-S bzw. NB-C-L) ist ein vergleichbares (gleicher pH-Wert) Xerogel aus [99] angeführt. Demnach besitzt das Xerogel einen höheren Vernetzungsgrad als das SiO_2 in der Schicht. Das ist durch den Trocknungsprozess bei der Herstellung zu erklären. Die Entfernung des Lösungsmittels lässt die Primärteilchen teilweise weiter kondensieren und die Primärteilchennetzwerke werden „auseinander gezogen“. Das Maximum von SiO_2 -S ist zu noch höheren Streuvektorbeträgen verschoben. Der Unterschied dieser Probe zur Schicht ist das fehlende HA. Offensichtlich hat das Vorhandensein von HA einen Einfluss auf die Strukturbildung im SiO_2 . Wie in Abs. 7.1 beschrieben, bildet sich in der Schicht eine Porenstruktur im Nanometerbereich aus. Das hat zur Folge, dass das Ethanol im Trocknungsprozess aufgrund von Kapillarkräften nicht so schnell verdunsten kann wie in SiO_2 -S. Deshalb läuft die Entfernung des Dispersionsmediums in SiO_2 -S schneller ab als in der Schicht und die SiO_2 -Primärteilchen können sich nicht so stark vernetzen wie in NB-C. Die Porenstruktur in der Schicht, die durch das HA mitbestimmt wird, hemmt die Entfernung des Ethanols.

7.5. Zusammenfassung Schichtnanostruktur

Durch das Beschichtungsverfahren sollte eine poröse SiO_2 -Matrix mit eingebetteten Hydroxylapatitkristalliten auf Implantaten aufgetragen werden. In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass die Schicht eine Porenstruktur im Bereich weniger Nanometer bis hundert Nanometer aufweist. Das resultiert in einer BET-Oberfläche von $169 \text{ m}^2/\text{g}$. Die meisten Poren besitzen dabei eine Größe von $20 - 50 \text{ nm}$. Für Proteinadsorption ist das eine wichtige Voraussetzung.

Weiterhin wurde festgestellt, dass das iterative Beschichten sich in der Struktur der Schicht abzeichnet. D.h. es bildeten sich an der jeweiligen Grenzfläche dichtere Bereiche aus. Dennoch sind die einzelnen Schichten im Verbund miteinander. Anhand von (HR)TEM-Aufnahmen und elementspezifischen Abbildungen (Image-EELS) konnte gezeigt werden, dass die HA-Kristallite in die SiO_2 -Matrix eingebettet sind und nicht voneinander separiert vorliegen.

Die Struktur der Silicamatrix wurde durch die Untersuchung des Vernetzungsgrades der SiO_2 -Primärteilchen charakterisiert. Dazu wurde die Lage des ersten amorphen Hauptmaximum ausgewertet. Verglichen wurde die SiO_2 -Matrix in Abhängigkeit der Trocknungsgeschwindigkeit mit verschiedenen, bekannten Gelstrukturen (Kieselglas und Xerogel). Es zeigte sich, dass infolge der „erzwungenen“ Gelbildung durch die rasche Lösungsmittelentfernung das SiO_2 -Netzwerk zu einem Xerogel kollabiert. Dennoch hemmt das Vorhandensein der HA-Kristallite die Verdunstung des Ethanol und die SiO_2 -Primärteilchen können sich stärker vernetzen als im SiO_2 -Gel ohne HA.

8. Tierexperimentelle Studien

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist, die Osseointegration von Implantaten zu erhöhen. Diese Frage ist nur durch den Einsatz von Tierstudien beantwortbar. Sämtliche *in vitro* Untersuchungen bilden stets nur einen Ausschnitt der Prozesse und Mechanismen im lebenden Organismus ab. Dennoch muss die Biokompatibilität nachgewiesen sein, bevor ein Biomaterial in einem Tierversuch getestet werden kann. Dies wurde durch zwei Testverfahren, direkt (Live/Dead[®]-Test) und indirekt (Zytotoxizitätstest), nachgewiesen.

Anschließend wurde die Schicht in zwei unterschiedlichen Tiermodellen getestet - Minipig- und Kaninchenmodell. Generell sind *in vivo*-Studien stets mit großem finanziellen und zeitlichen Aufwand verbunden. Demzufolge muss der Umfang auf das Notwendigste reduziert werden. In den hier beschriebenen Tierexperimenten wurde ein großer Wert auf die Wechselwirkung der Implantatoberfläche mit dem Organismus in der Frühphase gelegt. Außerdem wurden keine Aufbauten (künstlicher Zahn) wie beim realen Zahnersatz eingesetzt. Es kamen die vier in Kap. 4 beschriebenen Implantatsysteme unbeschichtet bzw. beschichtet zum Einsatz. Zusätzlich, um eine Einordnung in den Stand der Technik gewährleisten zu können, wurden hydrophile und raue Implantatoberflächen (jeweils unbeschichtet) verwendet. Durch Histomorphometrie und durch histologische Betrachtungen wurde die Osseointegration dieser Implantatoberflächen beschrieben und bewertet.

8.1. Voruntersuchungen *in vitro*

Die Biokompatibilität eines Materials muss gewährleistet sein, bevor Tierstudien an dem Material vorgenommen werden dürfen. Die Biokompatibilität kann u.a. mit einem Live/Dead[®]-Test oder dem Zytotoxizitätstest (XTT-Test) nachgewiesen werden. Für beide Testverfahren, die nachfolgend erläutert werden, wurden maschinierete Titan-Plättchen (Durchmesser 20 mm, Ti-Grade 2) beschichtet. Die Schichtdicke betrug ca. 5 μm . Nach der Plasmabehandlung wurden die Ti-Plättchen steril verpackt (160 °C für 4 h). Als Kontrollgruppe diente jeweils die unbeschichteten Titanplättchen.

8.1.1. Live/Dead[®]-Test

Dieser Test bestimmt die Viabilität von Zellen auf einer zu testenden Oberfläche bzw. die Zytotoxizität der interessierenden Oberfläche.

Experimentelle Vorgehensweise

Der Test wurde mit dem LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, Molecular Probes, USA) an zwei verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Dazu wurde eine Testlösung be-

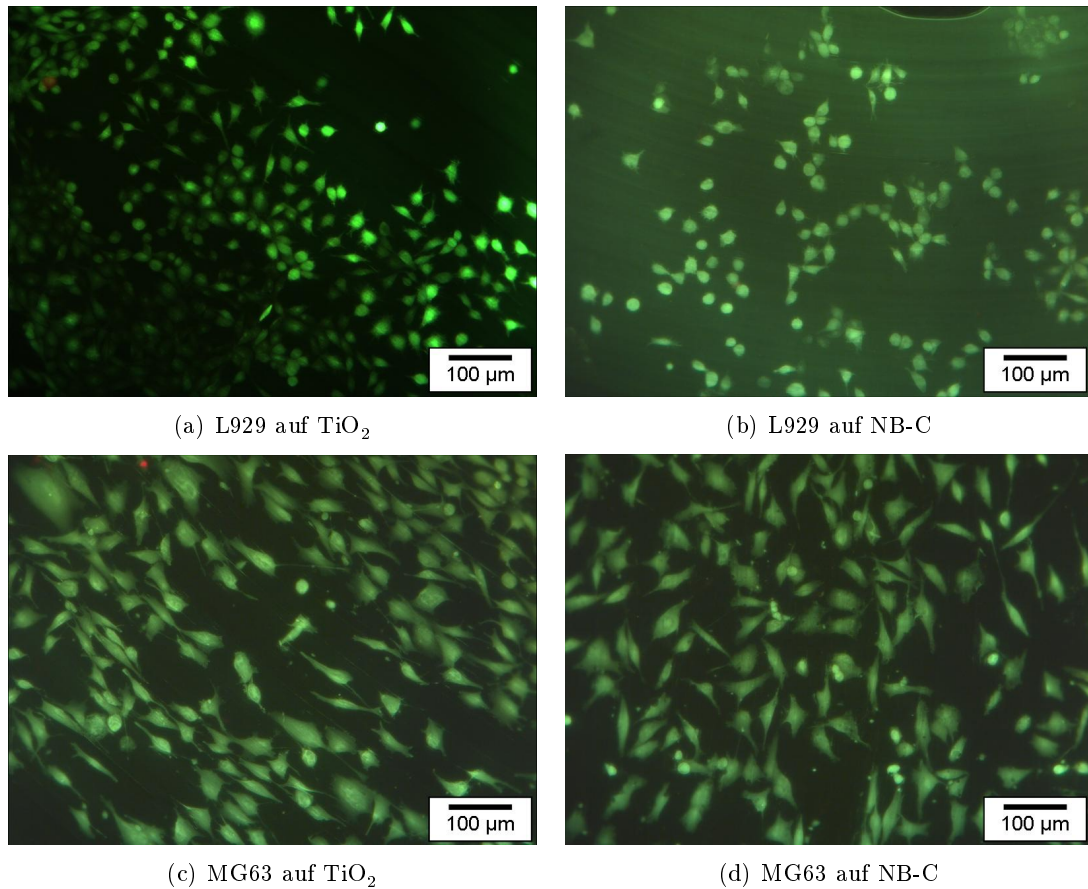


Abbildung 8.1.: Live/Dead-Test der NB-C Oberfläche mit L929 und MG63 im Vergleich zur unbeschichteten Titanoberfläche

stehend aus Ethidium homodimer-1 und Calcein AM direkt auf Fibroblasten (L929, Mausfibroblasten) und humanen osteoblastenähnlichen Zellen (MG63) gegeben. Anschließend wurde der Ansatz im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 – 40 min inkubiert.

Ergebnisse

In Abb. 8.1 sind die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der beiden Zelllinien dargestellt; (a), (b): L929 bzw. (c), (d): MG63. Beide Oberflächen zeigten einen deutlichen Überschuss an grün fluoreszierenden Zellen. Nur vereinzelt wurden rote (nekrotische) Zellen nachgewiesen. Darüberhinaus zeigten die MG63-Zellen sog. *Cell-spreading*. Dieses Spreizen ist bei beiden Oberflächen, Kontrolle und Schicht, zu erkennen. Daraus lässt sich eine hohe Biokompatibilität für die NB-Schicht ableiten. Es war kein Unterschied zu der als bioaktiv anerkannten TiO₂-Oberfläche nachweisbar.

8.1.2. Zytotoxizitätstest, XTT

Der Zytotoxizitätstest ist ein Zellproliferationstest. Es ist ein indirektes Testverfahren zur Bestimmung der Biokompatibilität und wurde nach Cell Proliferation Kit II, Fa. Roche durchgeführt.

Experimentelle Vorgehensweise

Die Schicht wurde für 48 h bei $T = 37\text{ °C}$ und 5 % CO_2 mit dem Zellmedium inkubiert (RPMI1640+NKS/FCS). Anschließend wurde das Zellmedium von der Schicht entfernt und L929-Zellen wurden für 24 h bei $T = 37\text{ °C}$ und 5 % CO_2 mit diesem Zellmedium inkubiert. Danach wurden die L929-Zellen mit XTT (sodium 3'-[1-phenyl-aminocarbonyl]-3,4-tetrazolium]bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulphonic acid) behandelt. In lebenden Zellen wird das Tetrazolium-Salz XTT in ein orangefarbenes, lösliches Formazan umgewandelt. Tote Zellen können kein Formazan aus XTT bilden. Die Formazanbildung wird photometrisch quantifiziert und der Grad der Zytotoxizität der Testsubstanzen kann angegeben werden, [131]. Dabei gilt eine Zellaktivität von über 80 % als biokompatibel.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der photometrischen Messung sind in Abb. 8.2 dargestellt. Die Zellaktivität der TiO_2 -Oberfläche wurde als Vergleich angeführt, da sie eine vielfach erprobte Oberfläche und als bioaktiv bekannt ist (Ctrl). Der Wert der Kontrollgruppe lag bei etwa 90 % und somit über der definierten Grenze von 80 %. Der Wert der beschichteten Gruppe lag ebenfalls über dieser Marke. Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden. Die Differenzen lagen innerhalb des Messfehlers.

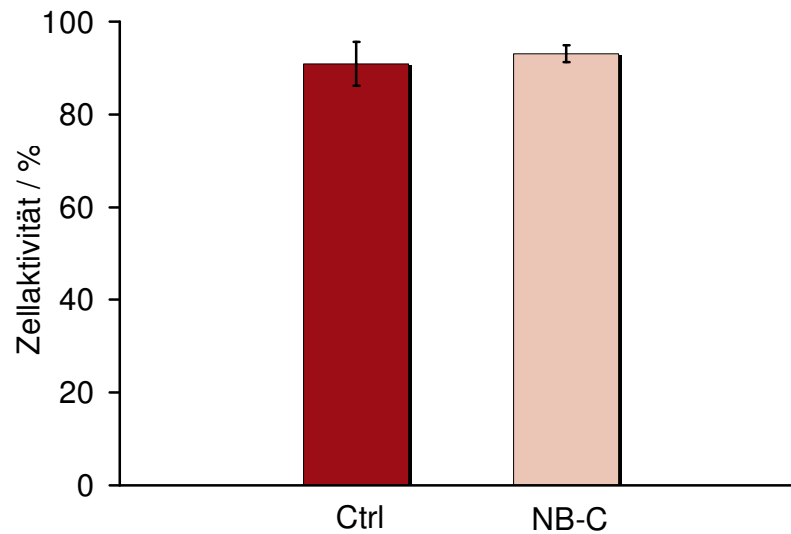


Abbildung 8.2.: Zellviabilität der NB-Schicht und der TiO₂-Kontrolle

8.2. Minipig-Modell

Die Frühphase der Osseointegration von beschichteten Implantaten wurde im Minipig-Modell untersucht. Das ist ein Standardverfahren in der Implantologie zur Testung von Knochenerersatz bzw. -aufbaumaterialien und Implantaten, [9, 42, 108, 132]. Bei diesen Tieren ist der Knochenmetabolismus vergleichbar mit dem des Menschen. D.h. die Zeitskala der Untersuchung ist vergleichbar mit der in Abb. 2.4, [133]. Die Implantation erfolgte in spongiöse Bereiche. Dadurch und durch fehlende Kaukräfte wurde keine mechanische Belastung in den Implantat-Knochenverbund eingeleitet. Die daraus resultierenden Bewegungen sollten den Einheilprozess nicht beeinflussen.

8.2.1. Implantatgruppen

Es wurden zwei verschiedene Implantatsysteme mit unterschiedlichen Oberflächen verwendet, Semados[®] und ix2[®]. Die Oberflächen dieser beiden Implantate sind in Kap. 4 beschrieben. Beide Oberflächen unterscheiden sich geringfügig durch Rauheit und chemischer Zusammensetzung. Beide Implantatsysteme wurden nach der beschriebenen Methode beschichtet (NB-C). Die Schichtdicke betrug ca. 10 μm . Als Kontrollgruppe wurden jeweils die unbeschichteten Implantate verwendet (Ctrl).

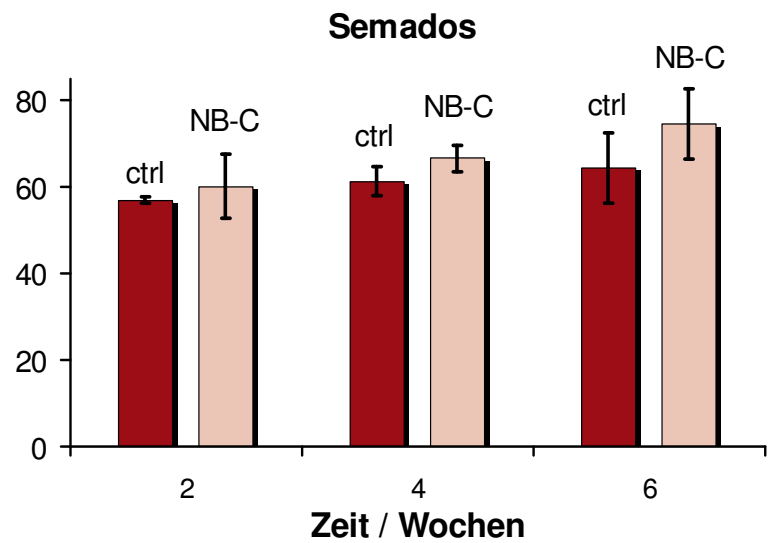
8.2.2. Chirurgischer und histologischer Ablauf

Die Tierhaltung und alle chirurgischen Eingriffe wurden nach den Richtlinien der Europäischen Union durchgeführt (Antragsnr.: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-034/06). Die Anästhesie erfolgte für alle Göttinger Minipigs durch 4 mg/kg Azaperon (Stresnil[®]) und nach 15 min

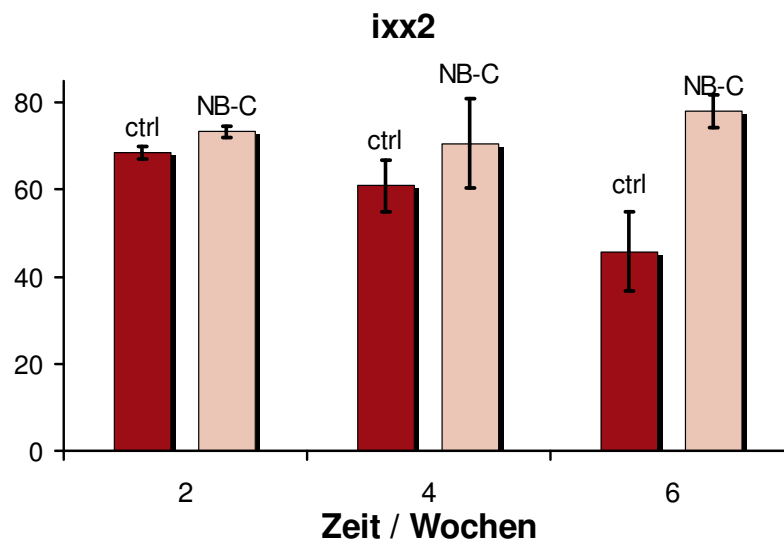
20 mg/kg Ketamin (bela-pharm GmbH und Co. KG) und 0.02 mg Midazolam (Dormicum[®], Mischspritze). Lokalanästhesie erfolgte durch 6 ml Xylocitin-Ioc und Epinephrin (Adrenalin 0.001 %). Zur Antibiose wurden 6 ml Strepdipen i.m. und zur Thromboseprophylaxe 0.4 ml Clexane 40 mg Duo gegeben. Zusätzlich wurde Vitamin B-Komplex und URSOVIT[®] gegeben. Unbeschichtete (ctrl) und beschichtete (NB-C) Implantate wurden in das Stirnbein der Minipigs implantiert. Nach 2, 4 und 6 Wochen wurden die Implantate mit umliegendem Knochengewebe explantiert. Die Euthanasie erfolgte durch Prämedikation von 7.0 ml Stresnil[®], 8.0 ml Ketamin[®] und 1.0 ml Dormincum[®] und Herzpunktion 8 ml Pentobarbital. Histologische Dünnschliffe wurden nach Donath angefertigt und der Knochen-Implantat-Kontakt wurde gemessen.

8.2.3. Histomorphometrie

Die Ergebnisse der Messung des Knochen-Implantat-Kontakts (BIC) sind in Abb. 8.3 dargestellt. Im Fall von Gruppe Semados[®] (a) war ein ansteigender BIC für die unbeschichteten Implantate (Ctrl) zu verzeichnen. Ein ähnlicher Verlauf wurde für die beschichteten Implantate (NB-C) gemessen. Die Werte von NB-C waren zwar höher als die der Kontrolle, aber die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant. Bei dem Implantatsystem ixx2[®] (b) fiel die Kontrollgruppe (Ctrl) mit der Zeit ab, wohingegen die BIC-Werte der beschichteten Gruppe anstiegen.



(a) BIC von Bego Semados



(b) BIC von ixx2 von MuK

Abbildung 8.3.: Knochen-Implantat-Kontakt der beiden Implantatgruppen im Minipig

8.3. Kaninchen-Modell

Mit der Ausweitung des Projekts und dem Fortgang der Entwicklung des Beschichtungsprozesses war es notwendig, die Schicht mit den anderen Oberflächenmodifikationen, siehe Abs. 2.3, zu vergleichen. Die Ergebnisse der Schicht sollten im Vergleich mit den Parametern Rauheit

und Hydrophilie dargestellt werden. Gleichzeitig wurde dadurch eine Korrelation des Prozessschrittes Plasmavorbehandlung auf die Osseointegration untersucht. Mit anderen Worten: Was bewirkt allein eine Oberflächenaktivierung durch Sauerstoffplasma? Die zeitabhängige Untersuchung von drei Oberflächen (Rauheit, Hydrophilie, Beschichtung) bedeutet eine Vervielfachung der Implantatanzahl, was durch den Einsatz von Minipigs nicht mehr realisierbar ist. Ein weiteres Standardtiermodell bildet die Implantation in den Femur von Kaninchen (New Zealand White Rabbits), [12, 40, 50, 65, 66, 83, 134–136]. Der Nachteil dabei ist, dass der Knochenstoffwechsel von Kaninchen nicht mehr direkt mit dem von Menschen vergleichbar ist. Er ist in etwa 2-3 mal schneller, [133]. Gleichzeitig sind die wirkenden Kräfte ebenfalls nicht realisiert.

Dennoch kann man durch den Vergleich der Gruppen untereinander Aussagen bzgl. der Osseointegration treffen. Durch den schnelleren Knochenstoffwechsel von Kaninchen kann man die frühen Einheilphasen gut auflösen. Anhand von histomorphometrischen und histologischen Untersuchungen wurde die Wechselwirkung des Materials mit dem Knochengewebe *in vivo* beschrieben.

8.3.1. Implantatgruppen

In diesem Fall wurde die Implantatgeometrie konstant gehalten, tiologic[®] (Fa. Dentaureum). Zur Untersuchung des Parameters Rauheit wurden die unbeschichteten, sandgestrahlten Oberflächen als Kontrollgruppe mit hoher Rauheit verwendet (rCtrl, $s_a = 3.8 \mu\text{m}$) und die unbeschichteten, maschinieren Implantate bildeten die Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche (smCtrl, $s_a = 0.7 \mu\text{m}$), siehe Kap. 4.

Hydrophile Implantate wurden durch die O_2 -Plasmavorbehandlung hergestellt, Abschnitt 5.2. Dazu wurden sandgestrahlte (rPlas) und maschinieren (smPlas) Implantate bei $d = 8 \text{ mm}$ für $t_{PI} = 20 \text{ s}$ vorbehandelt.

Sandgestrahlte (rNB-C) und maschinieren (smNB-C) Implantate wurden mit NB nach der in Kap. 5 beschriebenen Prozedur beschichtet.

Die Zusammensetzung der Schicht betrug $\text{SiO}_2:\text{HA}=24:76$. Die Schichtdicke betrug $10 \mu\text{m}$.

Alle Implantatgruppen wurden für 4 h bei $160 \text{ }^\circ\text{C}$ zusätzlich sterilisiert und in Glasvials unter einer LAF-Box verpackt.

Für eine bessere Übersicht sind die Implantatgruppen mit ihren Bezeichnungen und Implantationszeiten in Tab. 8.1 zusammengefasst. Ein Schwerpunkt wurde auf die Verwendung von der rauen Oberfläche gelegt, da derartige Oberflächen zur Zeit der Stand der Technik sind, siehe Abs. 2.3. Hier wurde der Versuchszeitraum auf 6 Wochen ausgeweitet.

Tabelle 8.1.: Übersicht zu den Implantatgruppen

Implantatgruppe	Abkürzung	Zeit/Wochen
rau, unbeschichtet	rCtrl	2,4,6
glatt, unbeschichtet	smCtrl	2,4
rau, hydrophil	rPlas	2,4,6
glatt, hydrophil	smPlas	2,4
rau, beschichtet	rNB-C	2,4,6
glatt, beschichtet	smNB-C	2,4

8.3.2. Chirurgischer und histologischer Ablauf

Die Tierhaltung und alle chirurgischen Eingriffe wurden nach den Richtlinien der Europäischen Union durchgeführt (Antragsnr.: LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-027/09). Alle Implantate ($n=6$, pro Zeitpunkt, pro Implantatgruppe) wurden unter Vollnarkose in den Femur (Os femoris, Lateral Condyle) von New Zealand White Rabbits (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) eingebracht. Die Anästhesie erfolgte durch Injektion von 10% Ketamin (bela-pharm GmbH und Co. KG) und 2% Xylazin (Rompun[®], Bayer AG) und nach 10 min 0.3 ml Atropin (0.5 mg/ml, ratiopharm GmbH). Zusätzlich wurden als Analgetikum und Antibiotikum Metamizol Natrium (500 mg/ml, Novaminsulfon, ratiopharm GmbH) und Penicillin G (i.M. 150.000 i.E.) injiziert. Lokalanästhesie wurde mit 2 ml Xylocitin-loc (2 %/ml) durchgeführt. Die Wunde wurde nach der Implantation mit Gentamicin (80 mg/2ml, 1:5 Verdünnung mit NaCl) gespült. Novaminsulfon wurde für drei Tage dem Trinkwasser beigemischt.

Nach zwei, vier und sechs Wochen wurden die Implantate mit dem umliegenden Gewebe entnommen. Die Euthanasie wurde mit Pentobarbital (Release[®], Richter Pharma) vorgenommen. Die Proben wurden anschließend nach der Dünnschlifftechnik nach Donath aufbereitet, [123].

8.3.3. Histomorphometrie

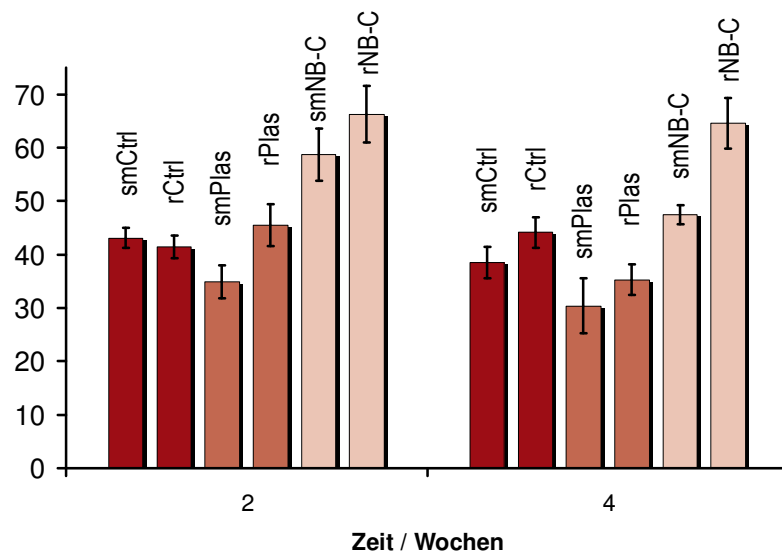
In der Abb. 8.4 sind die Werte der Knochen-Implantat-Kontaktmessung (BIC) aller Gruppen in Abhängigkeit der Zeit nach Gl.3.6 dargestellt. In (a) sind alle Gruppen nach 2 und 4 Wochen gezeigt. Die BIC-Werte der sandgestrahlten Oberfläche sind in (b) gesondert dargestellt. Im Folgenden wurden die Ergebnisse bezüglich der Parameter Rauheit, Hydrophilie und Beschichtung unterteilt.

Rauheit

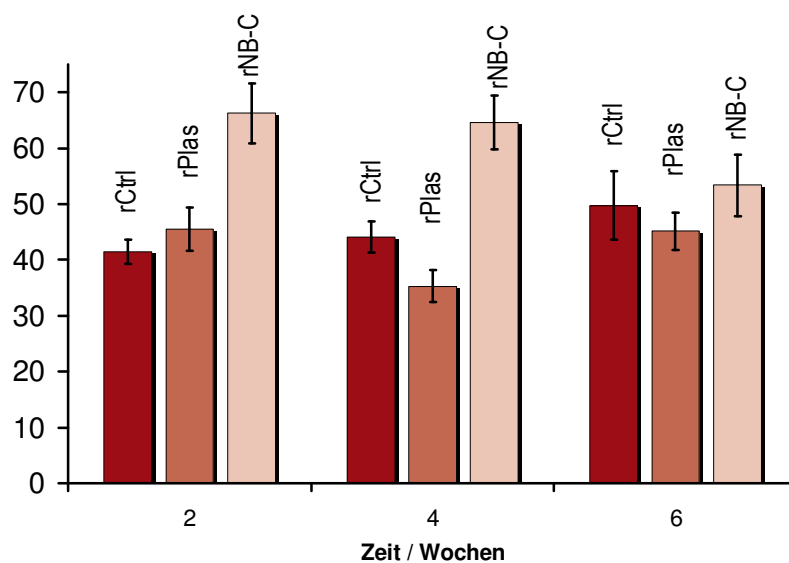
Zwischen den unbeschichteten, maschinerten und unbeschichteten, sandgestrahlten Implantatoberflächen (smCtrl und rCtrl) war kein Unterschied nach zwei Wochen festzustellen, Abb. 8.4(a). Beide Werte waren bei knapp über 40 % ($p = 0.59$). Nach vier Wochen lag der Mittelwert von rCtrl zwar höher als bei smCtrl, die Abweichung war jedoch nicht signifikant ($p = 0.19$). Die beiden hydrophilen Implantatgruppen zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied bezüglich Rauheit. Nach 2 Wochen war rPlas zwar höher als smPlas, jedoch die Diskrepanz war statistisch nicht gesichert ($p = 0.06$). Anhand der beiden Gruppen smNB-C und rNB-C konnte man keinen Unterschied zwischen rauher und glatter Oberfläche im beobachteten Zeitraum feststellen.

Hydrophilie

Die BIC-Werte der hydrophilen Implantatoberflächen (smPlas und rPlas) zeigten im Vergleich zu den Kontrollgruppen (smCtrl und rCtrl) nur leichte Veränderungen. Der Wert der maschinerten, hydrophilen Oberfläche (smPlas) war im Vergleich zur glatten Kontrolle (smCtrl) niedriger, wobei der Unterschied nach 2 Wochen nicht signifikant ($p > 0.05$) war - nach 4 Wochen $p < 0.05$.



(a) alle Gruppen BIC nach 2 und 4 Wochen



(b) raue Implantate BIC nach 2,4 und 6 Wochen

Abbildung 8.4.: Knochen-Implantat-Kontakt

Beschichtung

Beide beschichteten Implantatgruppen zeigten nach 2 Wochen einen deutlich erhöhten Knochen-Implantat-Kontakt (smNB-C: 59 %, rNB-C: 66 %) in Bezug zu den jeweiligen Kontrollen ($p < 0.05$). Der BIC der maschinieren, beschichteten Implantate (smNB-C) sank nach 4 Wo-

chen auf 47 % ab, trotzdem war der Wert noch höher als bei der zugehörigen Kontrollgruppe.

Die BIC-Werte der sandgestrahlten Gruppen sind in Abb. 8.4(b) über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Es war ein leichter Anstieg innerhalb der Kontrollgruppe (rCtrl) von 2 Wochen bis 6 Wochen von 41 % bis 50 % zu erkennen. Die hydrophilen Oberflächen (rPlas) zeigten, wie oben erwähnt, keinen Unterschied zur Kontrolle - auch nicht nach 6 Wochen. Auffällig waren die Unterschiede der NB-Schicht gegenüber den anderen beiden Implantatgruppen innerhalb von 2 und 4 Wochen. Es hatte sich innerhalb der ersten 4 Wochen deutlich mehr Knochen an der beschichteten Implantatoberfläche gebildet. Dieser Wert sank allerdings nach 6 Wochen auf das Niveau der Kontrolle bzw. der hydrophilen Gruppe.

8.3.4. Histologie

Um die quantitativen Ergebnisse aus dem Abschnitt zuvor näher zu beschreiben, wurden die Daten aus der Histomorphometrie anhand von repräsentativen histologischen Bildern qualitativ belegt. Die Messungen aus der Histomorphometrie ergaben, dass sich anfangs viel neuer Knochen auf der beschichteten Implantatoberfläche bildete. Es müsste folglich einen Unterschied in der Knochenbildung auf der Implantatoberfläche feststellbar sein. Laut Histomorphometrie ist dieser nach 6 Wochen wieder abgebaut. Demzufolge müssten Osteoblasten und Osteoklasten an der Implantatoberfläche zu finden sein.

2 Wochen

In den Abb. 8.5 sind lichtmikroskopische Aufnahmen der beiden Gruppen rCtrl und rNB-C nach 2 Wochen zusammengestellt. Auf der linken Seite sind die Kontrollgruppen, rechts die beschichteten dargestellt. Die Abb. (a) und (b) zeigen Übersichtsaufnahmen mit geringer Vergrößerung. Bei beiden Gruppen war eine gute Distanzosteogenese zu erkennen, d.h. es bildete sich Knochen (B) in weiterer Implantatnähe. Generell waren viele Blutgefäße und Knochenmark (+) nachweisbar. Auffällig war die erhöhte Knochenbildung an der Implantatoberfläche bei den beschichteten Implantaten, Abb. 8.5(b). Es war viel appositioneller Knochen entlang der Implantatgeometrie zu erkennen. Das war deutlich als basophiler Streifen am Implantat erkennbar. In der Kontrollgruppe war ebenfalls viel neu gebildeter Knochen, nur war hier keine so ausgeprägte Oberflächenaffinität erkennbar. Die Knochenneubildung fand statistisch verteilt statt. In den Abb. (c) und (d) sind höhere Vergrößerungen dieser beiden Gruppen gezeigt. Bei beiden Gruppen waren Blutgefäße (&) und Knochenmark (+) anzutreffen. In der Kontrollgruppe fand man häufig Stellen, an denen kein direkter Knochen-Implantat-Kontakt zu erkennen war, was durch die Histomorphometrie dokumentiert ist. Oft war eine gerichtete Knochenbildung zum Implantat hin erkennbar. In Abb. (c) ist ein typischer Bereich von neu gebildetem Knochen dargestellt. Es ist zwischen Implantatoberfläche und Knochen ein kleiner Spalt erkennbar. Hier ist der Knochen in Richtung Implantatoberfläche gewachsen. Darüberhinaus befanden sich auffällig viele mehrkernige Riesenzellen direkt auf der Implantatoberfläche. Im Gegensatz zur Kontrolle waren bei der beschichteten Gruppe viele Bereiche direkter Knochenapposition auffällig, Abb. 8.5(d). Dabei bildeten Osteoblastensäume viel Osteoid (#) auf dem Beschichtungsmaterial. Die Schicht wird in der Abbildung als stark lila

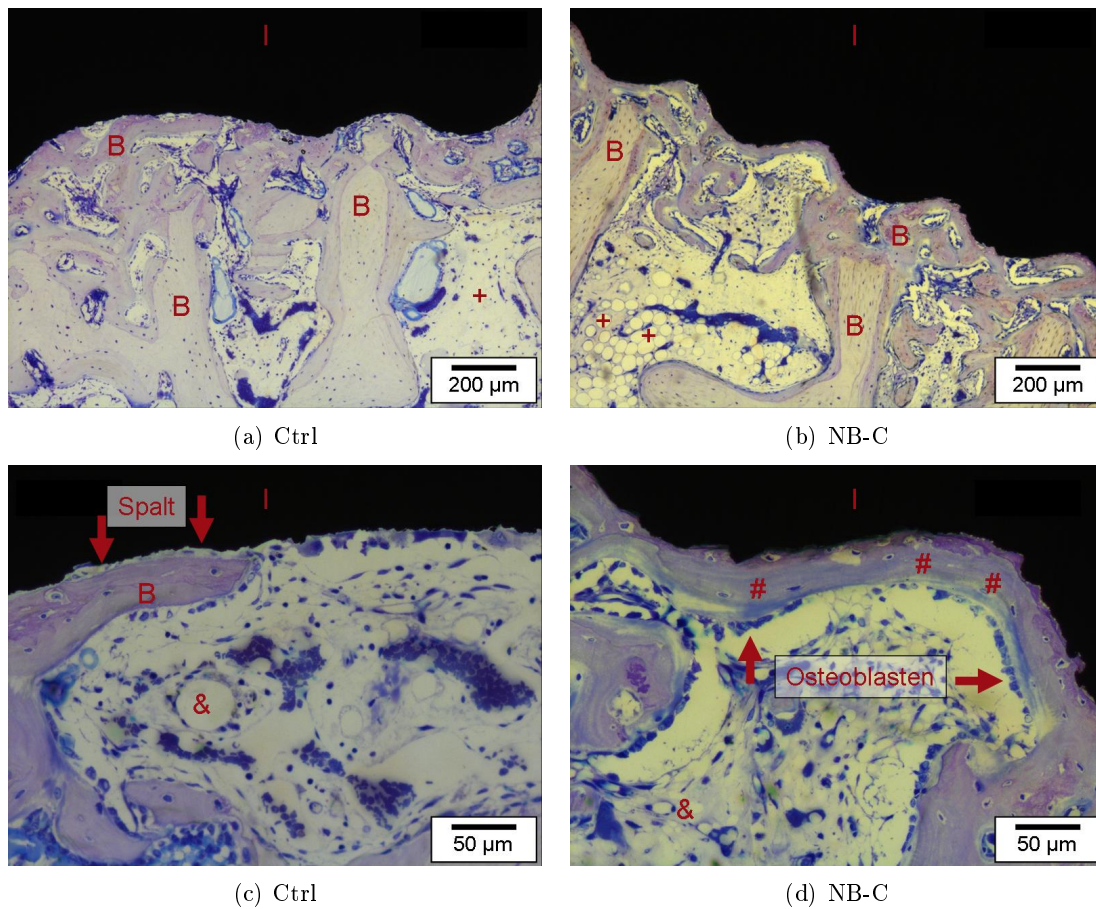


Abbildung 8.5.: Histologische Bilder nach 2 Wochen, Toluidinblau-Färbung, B: Knochen, I: Implantat, #: Osteoid, +: Knochenmark, &: Blutgefäß

gefärbter Streifen sichtbar. Teilweise befanden sich Osteozyten in dem neuen Knochen an der Schicht - ein direkter Verbund aus Schicht und Knochen.

4 Wochen

Die Abb. 8.6 zeigt die Gruppen unbeschichtet (rCtrl) und beschichtet (rNB-C) nach 4 Wochen in zwei verschiedenen Vergrößerungen. Links Kontrollgruppe, rechts beschichtete Gruppe. In den Übersichtsaufnahmen ist kein nomineller Unterschied zu 2 Wochen erkennbar. Bei beiden Gruppen ist eine gute Distanzosteogenese nachweisbar. Periimplantär hat sich viel mineralisierter Knochen gebildet. Wiederum ist eine hohe Osteoblastenaktivität sichtbar. Bei der Kontrollgruppe gibt es ebenfalls längere Bereiche ohne direkte Knochenanlagerung. Ein typischer Bereich ist in Abb. 8.6(a) mit höherer Vergrößerung gezeigt. Der Knochen scheint reifer zu sein, mehr durchmineralisiert. Im gebildeten Knochen ist kein gerichtetes Wachstum feststellbar.

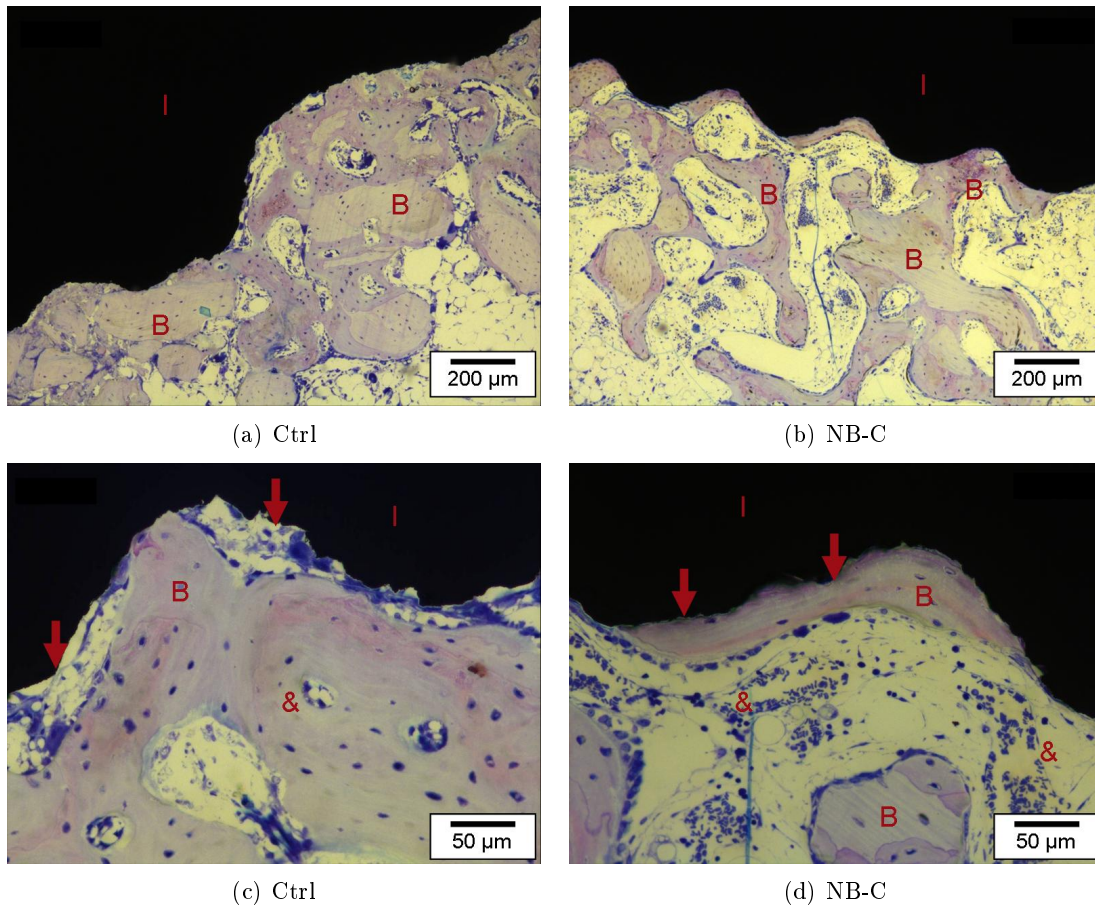


Abbildung 8.6.: Histologische Bilder nach 4 Wochen, Toluidinblau-Färbung, B: Knochen, I: Implantat, &: Blutgefäß

In Abb. 8.5(d) ist ein Stück des appositionellen Knochens auf der NB-Schicht zu erkennen. Auch hier wird eine hohe Osteoblastenaktivität auf dem Schichtmaterial deutlich. Aber im Vergleich zu 2 Wochen weist der Knochen eine reifere Struktur auf. Es haben sich mehr Osteozyten im appositionellen Knochen gebildet, teilweise in der ehemaligen Schicht. Darüberhinaus ist eine lamellenartige Struktur vorhanden. Der gezeigte Bereich ist mit Blutgefäßen durchsetzt und Knochenmark ist vorhanden.

6 Wochen

Die histologischen Bilder der beiden Gruppen rCtrl und rNB-C sind in den Abb. 8.7 dargestellt. In der Übersicht der Kontrollgruppe in Abb. 8.7(a) ist viel Knochenmark und eine gute Durchblutung sichtbar. Im Vergleich zu 2 und 4 Wochen ist weniger Osteoblastenaktivität zu verzeichnen. Der Knochen ist deutlich reifer als gegenüber 2 Wochen. Deutlich wird das in der höheren Vergrößerung in Abb. 8.7(c). Lamellenartige Strukturen bilden sich aus und

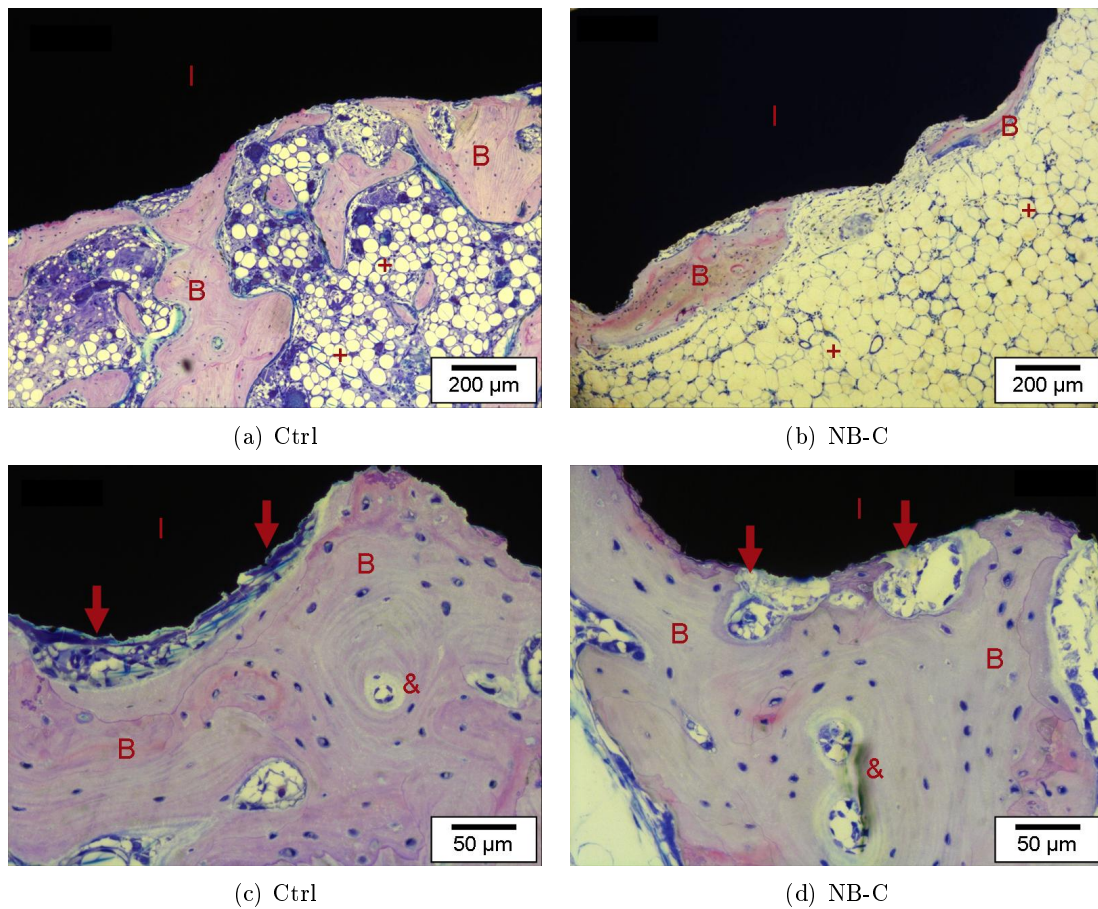


Abbildung 8.7.: Histologische Bilder nach 6 Wochen, Toluidinblau-Färbung, B: Knochen, I: Implantat, +: Knochenmark, &: Blutgefäß

Osteonen mit Havers-Kanälen sind erkennbar.

In der beschichteten Gruppe, Abb. 8.7(b) waren im Vergleich zu den 2 und 4 Wochen größere Bereiche ohne direktem Knochen-Implantat-Kontakt auffällig. Generell ist auch hier der Knochen deutlich reifer als zuvor. Osteonen mit Havers-Kanälen sind auffindbar, Abb. 8.7(d). Bei höherer Vergrößerung fällt auf, dass Knochen an der Implantatoberfläche durch Osteoklasten abgebaut wird. Es sind zwei Resorptionslakunen innerhalb des Knochens, der im direkten Kontakt zur Implantatoberfläche steht, zu erkennen. Es sind vermehrt Osteoklasten periimplantär nachweisbar (Pfeile). In Abb. 8.8 sind zwei Bilder von Osteoklasten gezeigt, die die Schicht bzw. den neugebildeten Knochen auf der Implantatoberfläche abbauen (Pfeil). Die Schicht ist in beiden Bildern als basophiler Bereich noch erkennbar. In (b) ist ein Osteoklast mit Resorptionslakune zu erkennen, der gerade Knochen von der Implantatoberfläche abbaut.

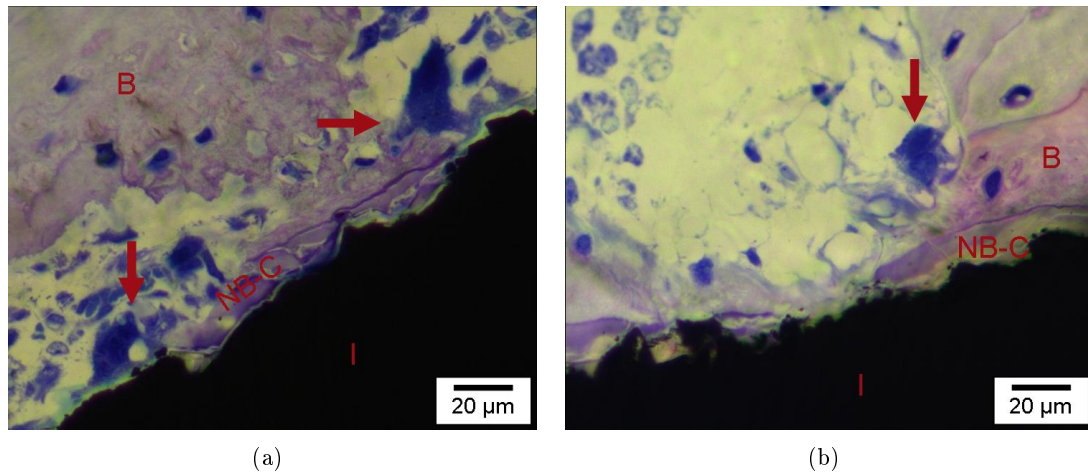


Abbildung 8.8.: Histologische Bilder der NB-Schicht nach 6 Wochen. Osteoklasten (Pfeil) bauen neu gebildeten Knochen auf der Implantatoberfläche ab.

8.4. Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurden Untersuchungen zur Biokompatibilität und Osseointegration von unbeschichteten und beschichteten Implantaten gezeigt. Das Ziel war, eine Korrelation zwischen Beschichtung und erhöhter Osseointegration nachzuweisen. Gleichzeitig sollten diese Ergebnisse mit Standardoberflächen verglichen werden.

Bevor überhaupt Tierstudien durchführbar sind, muss die Biokompatibilität nachgewiesen sein. Dazu wurden die Zelltests Live/Dead[®] und Zytotoxizitätstest durchgeführt. Sie wiesen der NB-Schicht gute biokompatible Eigenschaften nach. Im Live/Dead[®]-Test wurden nur wenige nekrotische Zellen gefunden. Im Vergleich zur unbeschichteten Kontrollgruppe wurde kein Unterschied festgestellt. Auch im XTT-Test lag der Wert der Schicht ebenfalls im Bereich der Kontrollgruppe. Die Schicht besitzt eine vergleichbare Biokompatibilität wie die Titandioxidoberfläche, die für ihre hohe Biokompatibilität bekannt ist und dadurch vielfach angewendet wird.

Es wurden zwei verschiedene Tiermodelle zur Bestimmung der Osseointegration verwendet - Minipigmodell und Kaninchenmodell. Im Minipigmodell konnte anhand zwei verschiedener Implantatsysteme gezeigt werden, dass die Schicht den BIC signifikant erhöhte. Beide beschichteten Implantatgruppen wiesen einen steigenden bzw. konstant hohen BIC von über 60 % bis fast 80 % nach 6 Wochen auf.

Um die Schicht mit anderen Standardoberflächen vergleichen zu können, d.h. einen Vergleich zu den Parametern Rauheit und Hydrophilie ziehen zu können, wurde das Kaninchenmodell verwendet. Einhergehend mit diesen Untersuchungen war eine Erhöhung der Implantatanzahl, was durch das Minipigmodell nicht mehr zu vertreten war. Kaninchen besitzen einen etwa 3-fach schnelleren Knochenstoffwechsel als Menschen. Dadurch entsprach der beobachtete Zeitraum von 2-6 Wochen im Kaninchen eher 6-18 Wochen im Menschen. Anhand von histomorphometrischen Untersuchungen wurde der Einfluss der Parameter Rauheit, Hydro-

philie und Beschichtung auf die Osseointegration bestimmt. Im betrachteten Zeitraum konnte durch BIC-Bestimmung kein wesentlicher Einfluss der Rauheit nachgewiesen werden. Die BIC-Werte beider Kontrollgruppen lagen im Bereich um 40 %. Vermutlich ist der Zeitraum zu lang gewesen um Unterschiede zwischen den einzelnen TiO₂-Oberflächen festzustellen. Im Rahmen dieser Tierstudie konnte durch (super-) hydrophile Implantatoberflächen ebenfalls keine Erhöhung der Knochenapposition nachgewiesen werden. Auch hier waren die Unterschiede zwischen Implantatgruppen innerhalb der Fehlergrenzen, sowohl bei maschinieren als auch bei sandgestrahlten Oberflächen. Der in der Literatur (kontrovers) diskutierte Effekt wurde nicht bestätigt.

Einen deutlichen Unterschied zu den Parametern Rauheit und Hydrophilie zeigten hingegen die beschichteten Implantatoberflächen. Der Knochen-Implantat-Kontakt wurde in den ersten 4 Wochen auf einen Wert über 60 % gesteigert. Nach 6 Wochen wurde die Erhöhung des BIC allerdings wieder ausgeglichen. Diese Resultate wurden durch histologische Betrachtungen bestätigt. In den ersten 4 Wochen bildete sich auffallend viel Knochen direkt auf der beschichteten Oberfläche. Es wurde eine hohe Osteoblastenaktivität periimplantär festgestellt. Die Knochenbildung ging von der Implantatoberfläche aus. Die Knochenneubildung bei der Kontrollgruppe war ebenfalls hoch, trat aber eher zufällig verteilt und nicht gerichtet auf. Weiterhin wurde eine Verringerung des BIC bei der beschichteten Gruppe nach 6 Wochen festgestellt. Dieses Absinken des BICs konnte durch Knochenabbau über Osteoklasten erklärt werden. Der Knochenabbau resultierte zum einen daraus, dass Kaninchen einen deutlich schnelleren Knochenstoffwechsel aufweisen als Menschen. Daher ist die Zeitskala dieser Messungen nicht direkt zur Abb. 2.4 vergleichbar. Zum anderen fand keine mechanische Belastung statt wie sie im Kiefer durch Kaukräfte stattfindet. Deshalb wurde der neu gebildete Knochen im Zuge des Remodelling-Prozesses wieder abgebaut. Denn nach 6 Wochen wurden vermehrt Osteoklasten auf den beschichteten Oberflächen gefunden.

Das wesentliche Ziel der Beschichtung ist, die Osseointegration in der Frühphase der Einheilung so zu erhöhen, dass eine Sofortbelastung erreicht werden kann. Um diesen Punkt beurteilen zu können müssten Stabilitätstest osseointegrierter Implantate durchgeführt werden. Dennoch wurde anhand von Histomorphometrie und Histologie deutlich, dass die Osseointegration durch das Schichtmaterial gesteigert werden konnte. Im nächsten Kapitel wurde die Frage untersucht, warum ein so hoher BIC und eine so hohe Osteoblastenaktivität gerade nach 2 Wochen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen wurde.

9. Matrixwechsel

In Kap. 8 wurde die Osseointegration des Beschichtungsmaterials untersucht. Dabei wurde eine Verbesserung der Osseointegration durch die beschichteten Implantate gegenüber unbeschichteten erzielt. Es zeigte sich, dass durch die Schicht frühzeitig viel Knochen von der Implantatoberfläche ausgehend gebildet wird. Nach 2 Wochen ist eine hohe Osteoblastenaktivität im Kaninchen erkennbar. Im Vergleich zu anderen, eingangs beschriebenen Beschichtungsmaterialien ist diese initiale Knochenbildung auffallend hoch. In diesem Kapitel werden die Ursachen für die beschriebenen Resultate untersucht. Der Schlüsselmechanismus für die Wirkungsweise des NanoBone[®]-Granulats ist ein schneller Austausch der Silica-Matrix durch eine organische, autologe Matrix, vgl. Abs. 2.5.2. Da die Struktur der Schicht nahezu identisch zur Struktur des Granulats ist, liegt es somit nahe, dass ein Matrixwechsel auch innerhalb der Schicht stattfinden könnte.

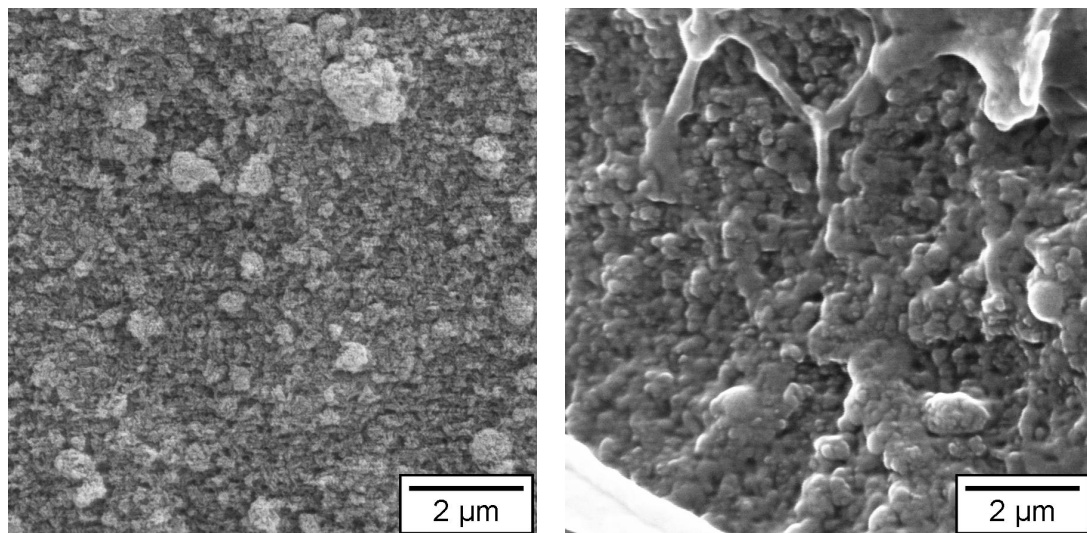
Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurden *in vivo* Untersuchungen an Wistar Ratten im Zeitraum von 6 und 12 Tagen und *ex vivo*-Versuche im Femur von Kaninchen innerhalb weniger Stunden durchgeführt. Zusätzlich wurden Versuche mit humanem Blut innerhalb weniger Minuten absolviert, um den Matrixwechsel ansich genauer zu charakterisieren und um den Zeitraum einzuschränken.

9.1. *In vivo* - Wistar Ratten

In Anlehnung an [106] wurde die Wechselwirkung der NB-Schicht mit dem Organismus subkutan nach 6 und 12 Tagen *in vivo* untersucht. Dazu wurden beschichtete Implantate in das Fettgewebe von Wistar Ratten eingebracht. Die Schicht wurde anschließend mittels REM- und EDX-Analyse hinsichtlich Morphologie und Zusammensetzung untersucht.

9.1.1. Chirurgischer und experimenteller Ablauf

Das Protokoll für den tierexperimentellen und chirurgischen Ablauf erfolgte nach den Richtlinien für den Umgang mit Labortieren. Es wurden männliche Wistar Ratten mit einer Körpermasse von 300-400 g (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) verwendet - Standard-Laborfutter und Wasser ad libitum. Die Ratten wurden mit einer intraperitonealen Injektion mit 60 mg/kg von Natriumpentobarbital (Sigma, Deisenhofen) anästhesiert. Sie wurden in Bauchlage auf einer Heizmatte positioniert, um die Körpertemperatur aufrecht zu erhalten. Durch einen 2 cm langen Schnitt am Nacken wurde ein beschichtetes Implantat (l=5 mm, d=3.7 mm) pro Tier in das Fettgewebe eingesetzt. Die Wunde wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Marlin, Markneukirchen) verschlossen. Nach 6 und 12 Wochen wurden die Tiere euthanasiert und die Proben mit umliegendem Gewebe entnommen. Die Proben wurden in



(a) REM-Aufnahme der Schicht

(b) REM-Aufnahme nach 6 Tagen in der Ratte subkutan

Abbildung 9.1.: REM-Aufnahmen der Schicht vorher (a) und nach (b) 6 Tagen subkutan in der Ratte. Nach der Implantation ist die Struktur der Schicht ähnlich zu vorher. Die gleichen sphärischen Agglomerate sind erkennbar, aber auch die Porosität ist nahezu erhalten geblieben. Der organische Film über der Schicht ist präparationsbedingt.

4 % Formaldehyd (Formalin[®]) fixiert und nach Entwässerung und Lösungsmittelaustausch über eine Acetonreihe überkritisch getrocknet. Das Implantat wurde vorsichtig per Hand vom umliegenden Gewebe frei gelegt und mit Gold und Palladium besputtert.

9.1.2. Ergebnisse

Alle Tiere zeigten keine Auffälligkeiten innerhalb des gesamten Implantationszeitraumes. In Abb. 9.1 sind zwei REM-Aufnahmen der Schicht vor Implantation und nach 6 Tagen gezeigt. Das Material hat sich in dieser Zeit nicht abgebaut und ist mit ähnlicher Struktur noch auf der Implantatoberfläche vorhanden. Die Struktur der Schicht ist, wie in Kap. 6 beschrieben, gekennzeichnet durch eine hohe Nanoporosität, Abb. 9.1(a). In Abb. 9.1(b) ist die Schicht nach 6 Tagen subkutan zu sehen. Auf der Oberfläche ist ein organischer Film zu erkennen. Die Struktur der Schicht ist im Vergleich zu vorher (a) nahezu erhalten geblieben. Die sphärischen Agglomerate (300 – 800 nm) und auch die Porosität sind im Wesentlichen erhalten. Die gleichen Ergebnisse wurden auch nach 12 Tagen erzielt, deshalb wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen.

Die Zusammensetzung der Schicht nach Implantation wurde mittels EDX-Analyse bestimmt. An jedem Präparat wurde an mehreren Stellen ein EDX-Spektrum aufgenommen. Die jeweiligen Spektren nach sechs Tagen sind in Abb. 9.2 gezeigt. Die obere Kurve ist das Spektrum der Schicht vor der Implantation. Alle anderen Kurven sind von den verschiedenen Proben aus den verschiedenen Tieren. Die für die Schicht repräsentativen Elemente sind Calci-

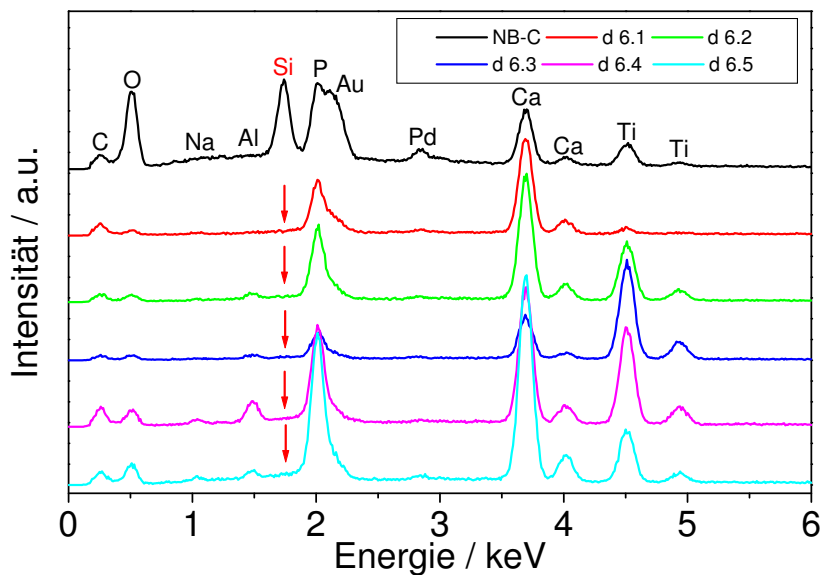


Abbildung 9.2.: EDX-Spektren weisen kein Silizium nach.

um, Phosphor und Silizium. Die Signale Gold und Palladium kommen von der Sputter-Schicht sowie Titan und Aluminium von der Implantatoberfläche. Anhand der Ti- und Al-Signale wird deutlich, dass die Spektren die Zusammensetzung des gesamten Schichtvolumens wiedergeben. Bei allen Messungen konnte nach 6 Tagen kein Silizium mehr nachgewiesen werden (s. rote Pfeile). Weiterhin ist die Intensität des O-Signals im Vergleich zu vorher deutlich reduziert. Die Intensitätsverhältnisse von O- und C-Signal $\frac{I_O}{I_C}$ sind in allen Fällen kleiner als vorher. Die SiO_2 -Matrix wurde demzufolge in dieser Zeit abgebaut. Die Spektren nach 12 Tagen sind identisch zu den nach 6 Tagen und befinden sich deshalb im Anhang, siehe Abb. A.5. Anhand beider Untersuchungen (REM und EDX) zeigte sich, dass innerhalb von 6 Tagen die SiO_2 -Matrix abgebaut wurde, wobei sich Form und Struktur des Beschichtungsmaterials nicht wesentlich änderten. Da das Beschichtungsmaterial identisch zu der Struktur des Granulats ist, kann davon ausgegangen werden, dass die SiO_2 -Matrix hier ebenfalls durch eine organische Matrix ersetzt wurde, siehe Abs. 2.5.2.

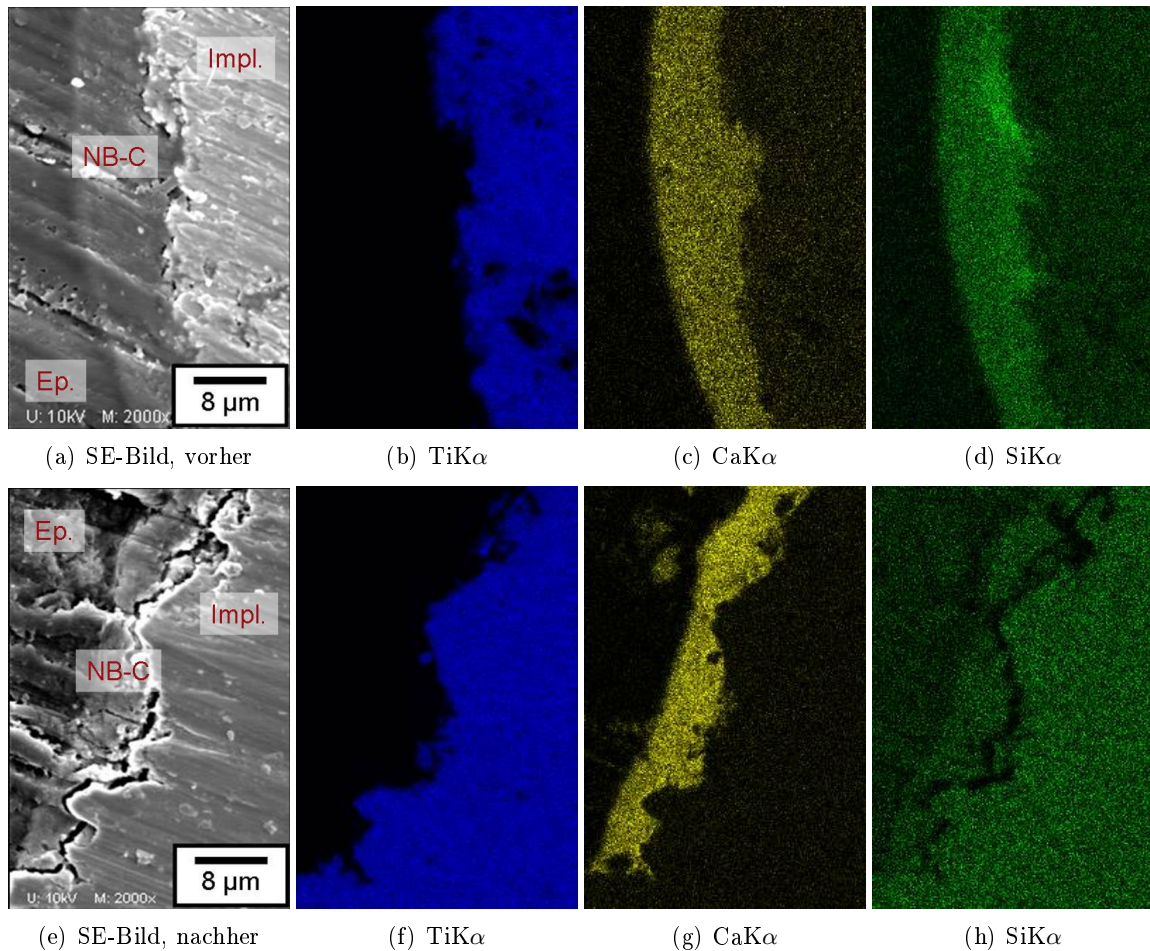


Abbildung 9.3.: EDX-Mapping vor (obere Reihe) und nach (untere Reihe) Implantation *ex vivo*, Impl.: Implantat, NB-C: Schicht, Ep.: Epoxid. Nach Implantation ist kein Si mehr nachweisbar. Die Signale im Bild (h) sind Untergrund (Bremsstrahlung).

9.2. *Ex vivo* - Kaninchen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die SiO₂-Matrix durch eine organische Matrix ersetzt wurde. Dieser Prozess war nach 6 Tagen bereits abgeschlossen. Um diesen Effekt zeitlich genauer aufzulösen, wurden beschichtete Implantate in den Femur von euthanasierten New Zealand White Rabbits eingebracht (*ex vivo*) und die Zusammensetzung der Schicht bestimmt. Dadurch konnte der Untersuchungszeitraum auf max. 5 h eingegrenzt werden.

9.2.1. Experimenteller Ablauf

New Zealand White Rabbits wurden im Rahmen eines anderen Tierversuchs euthanasiert. Im Anschluss der dazugehörigen Probenentnahme wurde jeweils ein beschichtetes Implantat

in jeden Femur eingebracht, vgl. Abs. 8.3.2. Der Zeitraum von Euthanasie bis Implantation betrug ca. 1-2 h. Man kann folglich davon ausgehen, dass die lokalen Prozesse auf zellulärer Ebene noch intakt waren. Die Implantate wurden nach dem Einsetzen sofort mit dem umliegenden Knochengewebe entfernt und mit 4 %-iger Formaldehydlösung fixiert. Die Fixierung des Gewebes hängt dabei von der Diffusion des Formaldehyds in das Knochengewebe ab. Als Faustregel gilt in der Histologie eine Eindringtiefe von 1 mm pro Stunde. Damit kann man also den Matrixwechsel im *ex vivo*-Knochen auf ca. 3 – 5 h eingrenzen. Histologische Schliffe wurden nach Donath [123] angefertigt, dabei wurden die Implantate in Epoxidharz eingebettet und entlang ihrer Längsachse geschnitten. Zur Auswertung wurden hier aber die Anschnitte, die bei der Präparation entstehen, verwendet.

9.2.2. Ergebnisse

In Abb. 9.3 sind die REM-Bilder und die dazugehörigen Elementverteilungen von Titan, Calcium und Silizium im Vergleich zu vor der Implantation dargestellt. Im jeweiligen SE-Bild ist die Schicht auf der Titanoberfläche als schmaler Streifen zu erkennen. Links davon ist das Einbettmedium Epoxid, rechts das Titanimplantat. In Abb. (c) und (g) sind die zur Schicht zugehörigen Calcium-Verteilung vor und nach Implantation dargestellt. Beide Abbildungen zeigen, dass sich die Schicht nicht aufgelöst hat und sich auf der Implantatoberfläche befindet. Vergleicht man nun die Silizium-Verteilungen, (d) und (h), fällt auf, dass nach der Implantation kein Silizium in der Schicht nachweisbar ist. Die Verteilung (h) müsste zum einen deckungsgleich zur Calcium-Verteilung (g) sein, zum anderen müsste die Intensität am Ort der Schicht höher sein. Die Signale, die sich in der Si-Verteilung (h) dennoch zeigen, kommen vom Untergrund der Messung. Der Untergrund (Bremsstrahlung) ist materialabhängig. Bei Titan beispielsweise ist der Untergrund höher als beim Epoxid, der hauptsächlich aus Kohlenstoff besteht.

Der in den Ratten beobachtete Austausch der Silicamatrix wurde in diesem Versuch auf 2 h nach Implantation eingegrenzt. Anhand von EDX-Messungen konnte kein Silizium innerhalb der Schicht detektiert werden, wenngleich die Schicht auf der Implantatoberfläche vorhanden war.

9.3. *In vitro* - Blut

Der vorangegangene Abschnitt hat gezeigt, dass der Matrixwechsel in den ersten Stunden nach Implantation abgeschlossen sein muss. Mit den folgenden Untersuchungen wurde dieser Zeitraum weiter eingeschränkt und gleichzeitig wurde dieser Effekt als solches genauer untersucht. Wie im Abs. 2.5.2 beschrieben, geht der Matrixwechsel des Granulats einher mit der Vaskularisierung des Biomaterials. Aus diesem Grund wurde die Wechselwirkung der Schicht mit Blut untersucht. Dazu wurden beschichtete Implantate in humanes Blut getränkt und nach 30 min bis 5 h wieder entnommen. So war es möglich, eine Zeitauflösung im Bereich von Minuten bis Stunden zu realisieren.

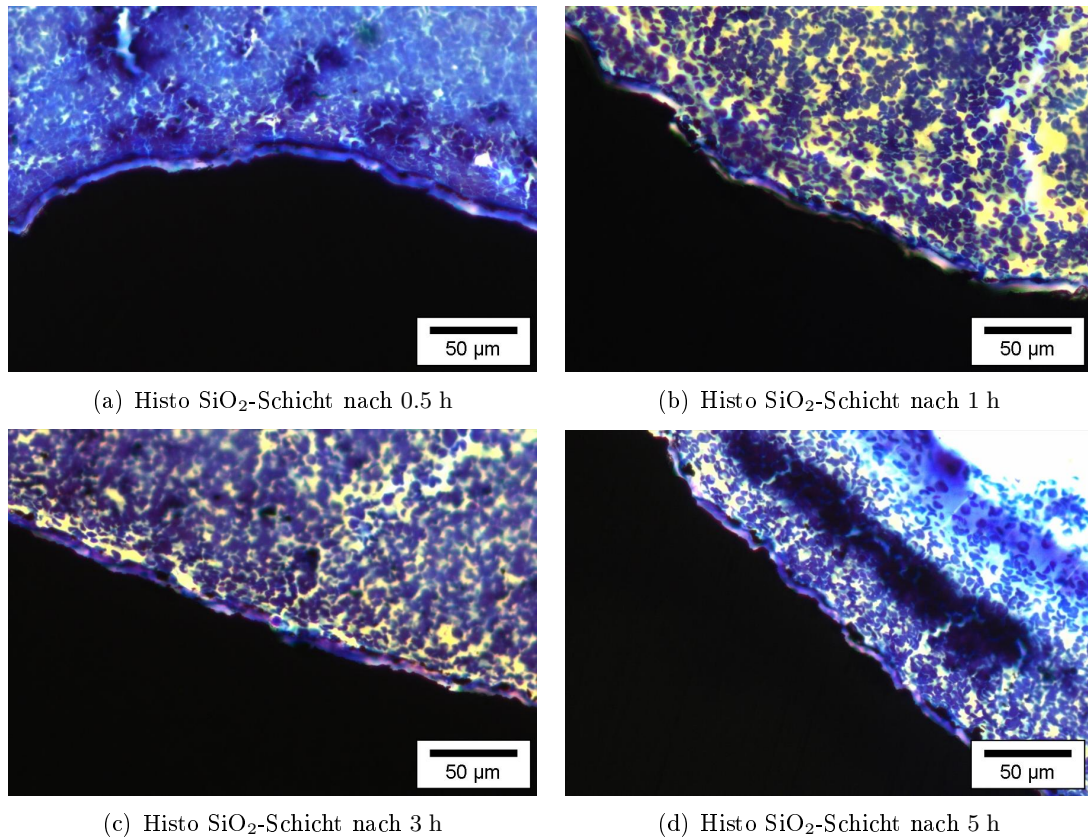
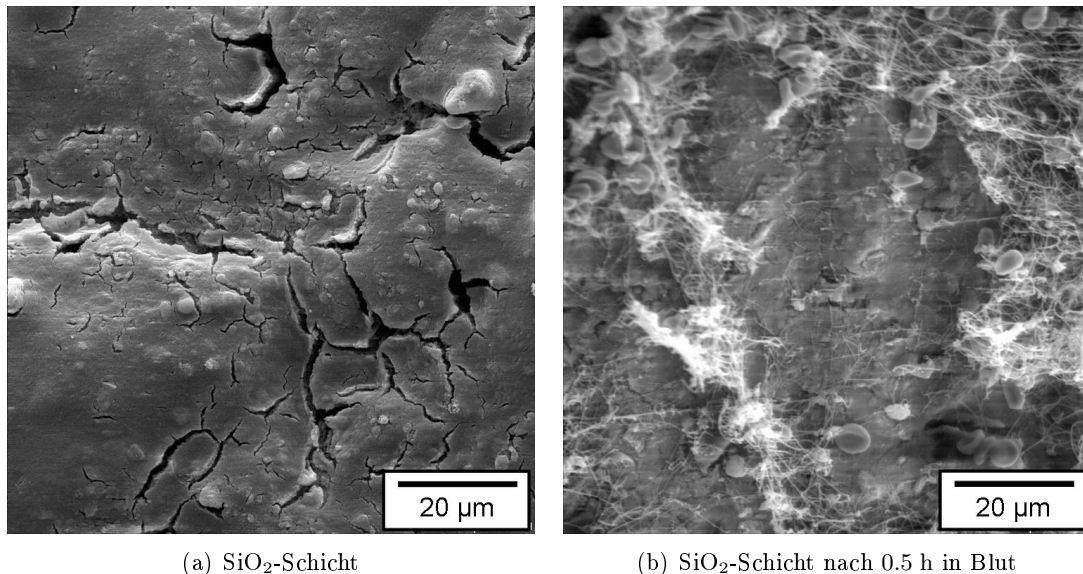


Abbildung 9.4.: Histologische Schliffe der SiO₂-Schicht (Kontrolle) nach der Wechselwirkung mit humanem Blut

9.3.1. Experimenteller Ablauf

Es wurden insgesamt 16 Titanimplantate mit NB beschichtet, acht mit einer Schichtdicke von 5 μm und weitere acht mit 10 μm . Alle Implantate wurden in jeweils 3 ml humanes Blut gegeben. Dabei wurde auf Gerinnungshemmer wie z.B. Heparin oder EDTA verzichtet, da sie durch Bindung der Ca-Ionen im Blut, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, die Anzahl der freien Ca-Ionen verändern, was nicht den Bedingungen des Implantationsprozesses entspricht. Die Temperatur des Blutes wurde während des gesamten Versuchszeitraumes auf 36 – 37 °C eingestellt. Die Proben wurden nach 0.5 h, 1 h, 3 h und 5 h entnommen und in 4%-iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Eine Hälfte der Proben wurde anschließend überkritisch getrocknet und für REM- und EDX-Analysen präpariert. Von der anderen Hälfte wurden histologische Dünnschliffe angefertigt. So konnten zu jedem Zeitpunkt histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Die Elementzusammensetzung wurde an fünf verschiedenen Stellen per EDX bestimmt und daraus die Siliziumkonzentration in der NB-Schicht errechnet.

Zur Kontrolle wurden acht Implantate nur mit der SiO₂-Matrix beschichtet. Dazu wurden

(a) SiO₂-Schicht(b) SiO₂-Schicht nach 0.5 h in Blut**Abbildung 9.5.:** REM-Aufnahmen der SiO₂-Schicht vor und nach 0.5 h im Blut

die Implantate wie zuvor mit NB-Schicht beschichtet, Schichtdicke ca. 10 µm, und anschließend wurde der Hydroxylapatit mittels EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) herausgelöst. EDTA ist ein Komplexbildner und bindet die Ca-Ionen vom Hydroxylapatit der Schicht. Dazu wurden die beschichteten Implantate für 24 h in ein EDTA-Bad gelagert, anschließend mit Wasser und Aceton gespült und an Luft getrocknet. Somit wurde der HA aus der Schicht herausgelöst und die SiO₂-Matrix blieb als Schicht auf der Implantatoberfläche. Die SiO₂-beschichteten Implantate wurden ebenfalls für 0.5 h, 1 h, 3 h und 5 h in 3 ml humanes Blut gegeben und anschließend in 4%-iger Formaldehyd-Lösung fixiert und überkritisch getrocknet. Es wurden histologische Dünnschliffe sowie REM und EDX-Analysen angefertigt.

9.3.2. Ergebnisse SiO₂-Schicht (Kontrolle)

Erwartungsgemäß war das Blut nach kurzer Zeit aufgrund des fehlenden Gerinnungshemmers koaguliert. Dadurch bildete sich bei allen Implantaten eine partielle Einkapselung aus koaguliertem Blut. In den Abb. 9.4 sind Bilder von den histologischen Schliffen der SiO₂-Schicht nach der Blutbehandlung gezeigt. Direkt auf der Implantatoberfläche (schwarz) ist die SiO₂-Schicht als heller Streifen zu erkennen. Die blau bis lila-farbenen Strukturen sind die Blutzellen, die durch die Koagulation des Blutes auf der Oberfläche anlagern. Die SiO₂-Schicht war nach allen Zeitpunkten unverändert auf der Implantatoberfläche, d.h. eine Verringerung der Schichtdicke oder Ablösungen wurden nicht beobachtet.

Abb. 9.5 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der SiO₂-Schicht vor (a) und nach 0.5 h (b) Behandlung mit Blut. Nach 0.5 h sind durch die Blutgerinnung Fibrin (Fäden) und Blutzellen auf der Oberfläche. Im Vergleich vorher zu nachher sind in der Mikrostruktur aber keine Unterschiede feststellbar.

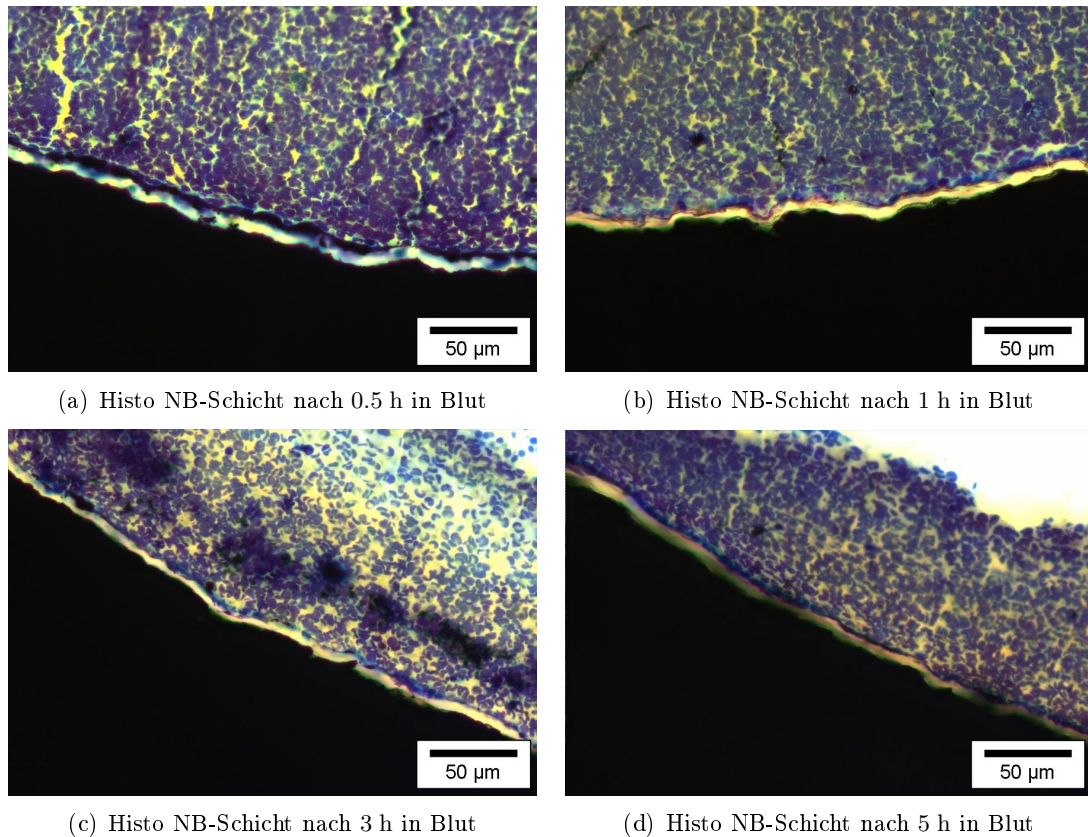
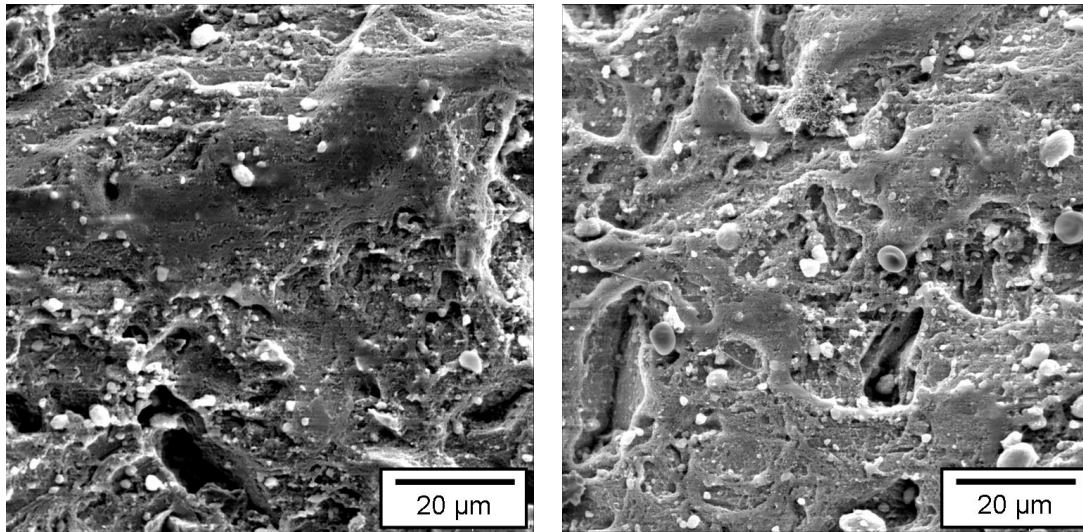


Abbildung 9.6.: Histologische Schliffe der NB-Schicht

9.3.3. Ergebnisse NB-Schicht

Wie bei der SiO_2 -Schicht bildete sich um die NB-beschichteten Implantate eine Einkapselung aus geronnenem Blut. In den Abb. 9.7 sind Bilder von den histologischen Dünnschliffen der Schicht nach Blutbehandlung gezeigt. Die NB-Schicht ist als heller Streifen parallel zur Implantatoberfläche zu erkennen. Die Schichtdicke der NB-Schicht über den betrachteten Zeitraum war konstant. Es fand also kein Auf- oder Ablösen der NB-Schicht als solches statt.

In Abb. 9.7 sind zwei REM-Aufnahmen der NB-Schicht (a) vor und (b) nach 0.5 h dargestellt. Im Vergleich beider Bilder sind keine Unterschiede hinsichtlich der Struktur im Mikrometerbereich festzustellen. Die raue Oberfläche ist auch nach der Blutbehandlung vorhanden. Das Verhältnis der Siliziumkonzentration in der NB-Schicht vor der Blutbehandlung zu nachher ist in Abb. 9.8 zeitabhängig für die zwei Schichtdicken $d = 5 \mu\text{m}$ und $d = 10 \mu\text{m}$ dargestellt (Ausgangswert ist auf 100 % gesetzt). Bereits nach einer halben Stunde sanken beide Si-Konzentrationen auf 20 % des Ausgangswertes und blieben bis 5 h auf diesem Niveau. Beide Si-Konzentrationen erreichten eine Art Sättigung bei ca. 20 %. Das lokale Minimum bei $t = 1 \text{ h}$ der dickeren Schicht ist im Bereich des Fehlers der Messung und nicht signifikant. In beiden Fällen wurde die SiO_2 -Matrix innerhalb von 30 min abgebaut. Die Sättigung ist fol-



(a) NB-Schicht

(b) NB-Schicht nach 0.5 h in Blut

Abbildung 9.7.: REM-Aufnahmen der NB-Schicht vor und nach 0.5 h im Blut

gendermaßen zu erklären. Zum einen kann eventuell nur eine bestimmte Menge SiO_2 im Blut aufgenommen werden. Zum anderen könnte es sein, dass die Menge der Proteine im Blut, die am Matrixwechsel beteiligt sind, nicht ausgereichend war und es deshalb zu dieser Sättigung kam. Für den ersten Fall soll abgeschätzt werden, wieviel SiO_2 sich in 3 ml Blut gelöst hat. Dazu werden folgende Überlegungen herangezogen.

Die Schicht (24 wt % SiO_2) mit der Dicke $d = 10 \mu\text{m}$ besitzt die Masse m_{SiO_2} . Mit der Annahme eines zylindrischen Implantats ergibt sich:

$$m_{\text{SiO}_2} = 0.24 \cdot \rho_s \cdot \frac{\pi}{4} (d_s^2 - d_i^2) \cdot l \quad (9.1)$$

mit der Dichte ρ_s , Implantatdurchmesser $d_i = 3 \text{ mm}$ bzw. Implantatdurchmesser mit Schicht $d_s = 3.01 \text{ mm}$ und Implantatlänge $l = 9 \text{ mm}$. Die Dichte der Schicht wird hier grob als 1 g/cm^3 angenommen. Der Wert ist durch die Porosität real niedriger, er bildet somit eine obere Grenze für diese Überlegung. Das ergibt für die Masse von m_{SiO_2} :

$$m_{\text{SiO}_2} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ mg}. \quad (9.2)$$

Angenommen es wäre das ganze SiO_2 der Schicht gelöst, wäre das ein Wert von

$$\frac{10^{-4} \text{ mg}}{3 \text{ mg}} = 70 \text{ ppm}, \quad (9.3)$$

mit der Dichte von Blut von 1 g/ml . Der Wert liegt also in der Größenordnung von $10 - 100 \text{ ppm}$. Der Wert für Wasser ist in etwa 150 ppm , [95]. Unter der Annahme, dass der Wert für Blut in der gleichen Größenordnung liegt, könnte der Effekt der Sättigung dadurch erklärt werden,

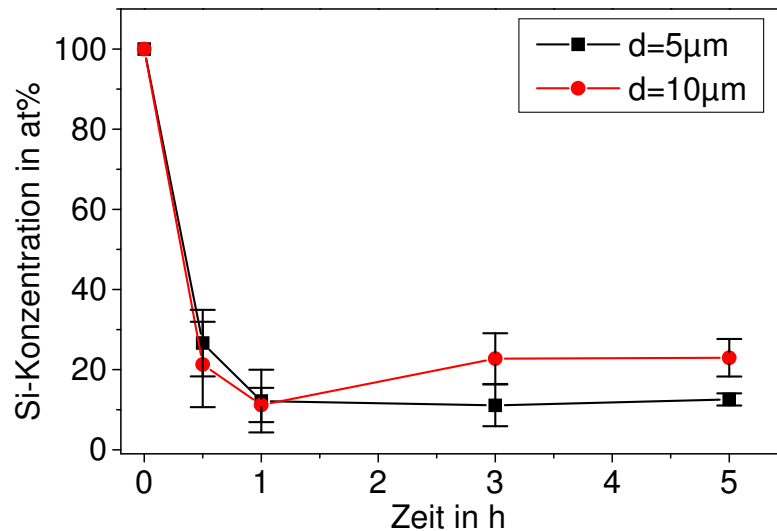


Abbildung 9.8.: Siliziumkonzentration in Bezug zur Ausgangskonzentration in der NB-Schicht nach Tränkung mit Blut.

dass die maximale Aufnahme von SiO_2 für Blut erreicht wäre. Die zweite Erklärung wäre, dass alle Proteine, die bei dem Matrixwechsel beteiligt sind, „aufgebraucht“ worden sind.

Festzuhalten ist allerdings, dass der Matrixwechsel nur in Verbindung mit dem Hydroxylapatit abläuft. Denn in der Kontrollgruppe (SiO_2 -Schicht) wurde deutlich weniger oder kein SiO_2 abgebaut, siehe Abb. 9.4.

9.4. Zusammenfassung und Diskussion

In diesem Kapitel wurde die Wechselwirkung des Biomaterials mit dem lebenden Organismus untersucht. In Wistar Ratten wurden beschichtete Implantate subkutan eingesetzt. Anhand von EDX-Analysen und REM-Aufnahmen wurde gezeigt, dass ein Austausch der SiO_2 -Matrix durch eine organische Matrix stattfand, ohne dabei die Struktur der Schicht signifikant zu verändern. Dieser Prozess war nach 6 Tagen bereits abgeschlossen. Um den Ablauf zeitlich weiter einzugrenzen, wurden beschichtete Implantate *ex vivo* in den Femur von New Zealand White Rabbits eingesetzt. Auch hier wurde durch REM- und EDX-Messungen nachgewiesen, dass die SiO_2 -Gelmatrix innerhalb weniger Stunden umgebaut wurde. Daraufhin wurde der Beobachtungszeitraum weiter eingeschränkt, indem die Wechselwirkung der Schicht mit humanem Blut untersucht wurde. Es wurde ein Abbau der SiO_2 -Matrix nach ca. 30 min aufgezeigt. Die Ausgangskonzentration des SiO_2 hatte sich nach 30 min auf ca. ein Fünftel reduziert. Dieser Wert blieb über die gesamte Messzeit konstant, es trat eine Sättigung auf. Die gleiche Untersuchung wurde an der SiO_2 -Schicht (ohne HA) durchgeführt. Das SiO_2 der Schicht wurde auch nach 5 h auf den Implantaten nachgewiesen.

Der Matrixwechsel in der NB-Schicht ist demzufolge nicht durch einen Lösungsprozess er-

klärbar, ansonsten hätte sich die reine SiO_2 -Schicht ablösen müssen. Der Gewichtsverlust des SiO_2 war hier 80 % innerhalb von 30 min. In anderen Untersuchungen, bei denen SiO_2 -Xerogel als Material für *drug delivery* eingesetzt wird, zeigen Gewichtsverluste von etwa 30 % innerhalb mehrerer Tage, [137–139].

Der Hydroxylapatit muss folglich eine wesentliche Rolle beim Austausch der Matrix spielen. Es ist bekannt, dass HA eine hohe Proteinaffinität besitzt und er deshalb auch für Proteinisolierung eingesetzt wird, [140]. Darüberhinaus gibt es mehrere Publikationen zur Proteinadsorption an Hydroxylapatit. Folgender Ablauf wäre als Erklärung für den SiO_2 -Austausch denkbar: Als erstes werden Proteine, da sie polare Makromoleküle sind, durch die bei pH 7.4 negative Oberfläche von SiO_2 adsorbiert. Weiterhin ist bekannt, dass die stärksten Wechselwirkungen zwischen HA und Proteinen durch die NH_3^+ und COO^- Gruppen hervorgerufen werden, [10, 141–144]. Dadurch wird das SiO_2 von der HA-Oberfläche gelöst. Was genau bei diesem Vorgang abläuft, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und benötigt weitere Untersuchungen. Eine wichtige Frage dabei ist, welche Proteine durch den Matrixwechsel von der Schicht adsorbiert werden. Im Vergleich zu immunohistochemischen Untersuchungen am Granulat, [109], liegt die Vermutung nahe, dass auch hier knochenspezifische Proteine wie BMP-2, Osteocalcin, Osteopontin usw. eine ganz wesentliche Rolle spielen.

10. TiO₂-Rauheit über Sol-Gel

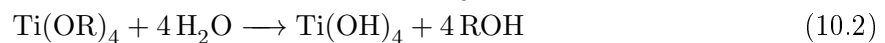
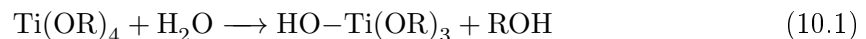
In diesem Kapitel soll geprüft werden, ob die Beschichtung mit NB direkt mit einer TiO₂-Beschichtung gekoppelt werden kann. Daraus ergibt sich die Option, eine Kombination aus einer rauheitsgebenden TiO₂-Schicht und der bioaktiven NB-Schicht zu verwenden. Das bedeutet vor der in Kap. 5 beschriebenen NB-Beschichtung einen zusätzlichen Beschichtungsschritt einzufügen, der auf einem Implantat-Rohling die raue TiO₂-Oberfläche erzeugt. Dadurch entfielen Ätzprozesse im Anschluss an das Sandstrahlen, vgl. Abs. 2.3.2 und es könnten Prozessabläufe in der Implantatherstellung mit geringem Finanz- und Zeitaufwand betrieben werden. Im vorliegenden Kapitel sind erste geleistete Vorarbeiten dazu beschrieben.

10.1. Beschichtung

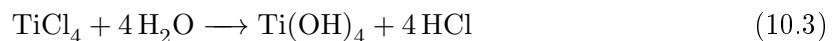
Der TiO₂-Beschichtungsprozess ist als Teilprozess im NB-Beschichtungsverfahren integriert. Das bedeutet, dass die Beschichtung ebenfalls per Spin-Spray-Coating mit derselben Anlage erfolgt. Der Unterschied ist, dass eine andere Beschichtungsdispersion verwendet wird. Das Ziel ist, TiO₂-Kristallite mit definierter Partikelgröße in ein TiO₂-Gel einzubauen.

10.1.1. Beschichtungsdispersion

Das Beschichtungsmaterial wird ebenfalls über den Sol-Gel-Prozess gewonnen. Als Ausgangsmaterial wurden zwei verschiedene Materialien verwendet. Tetraethylorthotitanat (TEOT) und Titan-tetrachlorid (TiCl₄). Beide Verbindungen reagieren in Kontakt mit Wasser sehr schnell zu TiO₂. Im ersten Fall werden die Ethylgruppen sukzessiv abgespalten und durch die entstandenen OH-Gruppen tritt Kondensation auf.



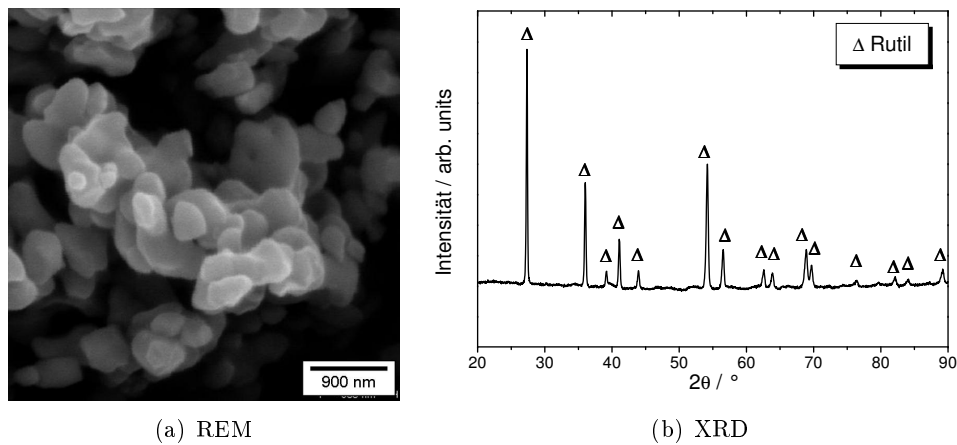
Im zweiten Fall entsteht bei Wasserkontakt HCl:



In beide Sol-Ansätze wurden TiO₂-Kristallite mit einer mittleren Größe von etwa 1.3 μm gegeben (STREM Chemicals).

10.1.2. Beschichtungsprozess

Der eigentliche Beschichtungsprozess erfolgt ebenfalls über Spin-Spray-Coating. Dabei werden nahezu die gleichen Parameter wie bei der NB-Beschichtung vorgenommen, siehe Kap. 5.



(a) REM

(b) XRD

Abbildung 10.1.: REM und XRD der TiO₂-Kristallite

Ebenfalls findet der Sol-Gel-Übergang auf der Implantatoberfläche statt. Durch den Sprühprozess kommen die TEOT-Moleküle in Kontakt mit dem Wasser und dem CO₂ der Luft, welches als Katalysator bei der Reaktion agiert.

10.2. Ergebnisse

Struktur

In Abb. 10.1(a) ist eine REM-Aufnahme der TiO₂-Kristallite dargestellt. Es zeigt sich, dass Partikel ab einer Größe von etwa 0,5 μm vorhanden sind. Der Großteil jedoch liegt im Bereich von 1,0 – 1,3 μm (Herstellerangabe). In Abb. 10.1(b) ist ein Diffraktogramm der TiO₂-Partikel gezeigt. Alle identifizierten Reflexe gehören zur Titandioxidphase Rutil. Es waren keine weiteren Reflexe sichtbar, somit ist das Material phasenrein.

Die TiO₂-Schicht ist in Abb. 10.2 in zwei unterschiedlichen Vergrößerungen gezeigt. In (a) erkennt man eine teilweise offenporige Struktur, die durch die Kristallite erzeugt wird. Weiter-

Tabelle 10.1.: Parameter zur TiO₂-Beschichtung

Parameter	Wert
O ₂ -Plasmavorbehandlung t_{Pl}	20 s
Abstand O ₂ -Plasma d	8 mm
Feststoffgehalt FS	1.3 wt %
Beschichtungszeit t_B	0.5 – 1 s
Iterationen n	1-10
Trocknungszeit t_{Tr}	15 s
Rotationsgeschwindigkeit U	300 min ⁻¹

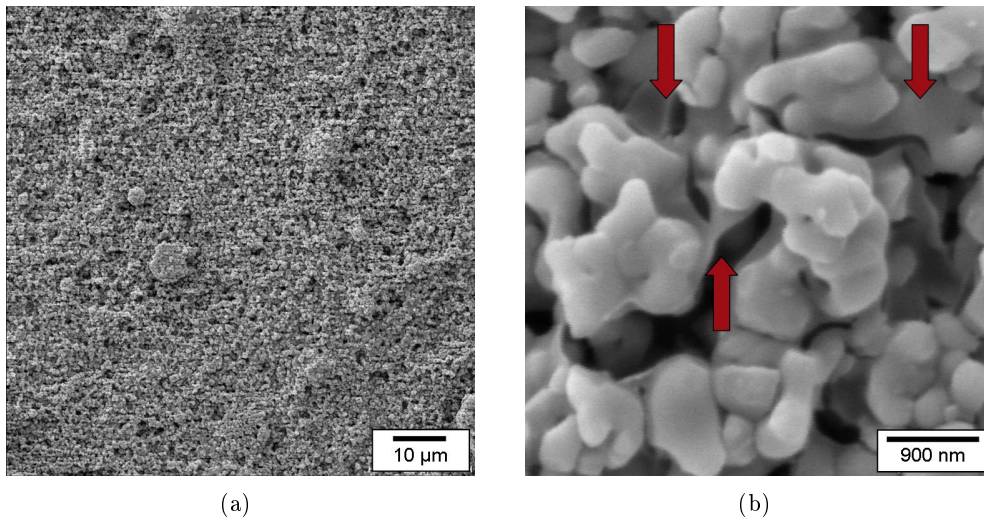


Abbildung 10.2.: Rauheit durch Titandioxidbeschichtung. a) Übersichtsaufnahme b) Einbettung der TiO₂-Kristallite in das TiO₂-Gel (Pfeile)

hin besitzt die Schicht eine raue Oberfläche. In (b) sind das TiO₂-Gel und die TiO₂-Kristallite zu erkennen. Im Vergleich zum Ausgangsmaterial (Abb. 10.1(a)) sind die Kristallite hier ummantelt von dem TiO₂-Gel. Das ist deutlich an den Rändern der Partikel zu erkennen. Vorher besitzen sie klar abgegrenzte Kanten, wohingegen sie durch das Gel runde Abgrenzungen aufweisen.

Rauheit

Die Rauheit wurde nach Abs. 3.2 bestimmt. Dazu wurden maschinerte Titanschrauben nach oben stehender Prozedur beschichtet. Anhand von 3D-Stereo-REM wurde die mittlere Rauheit ermittelt:

$$s_a = 0.3 \mu\text{m}$$

Dieser Wert ist im Vergleich zu kommerziellen Implantatoberflächen noch eine Größenordnung zu niedrig. Man könnte mit einer anderen TiO₂-Kristallitegröße evtl. auch mit einer bimodalen Größenverteilung die mittlere Rauheit erhöhen. Durch zwei verschiedene Partikelgrößen, die sich mindestens um eine Größenordnung voneinander unterscheiden, könnte man ein komplexes Porensystem erreichen und gleichzeitig diese hier beschriebene Submikrometer-Rauheit beibehalten.

Kombination

In Abb. 10.3 ist eine REM-Aufnahme einer Titanschraube gezeigt, auf der beide Beschichtungsprozeduren nacheinander angewendet worden sind. Diese Oberfläche ist eher mit den zuvor diskutierten maschinerten Oberflächen vergleichbar.

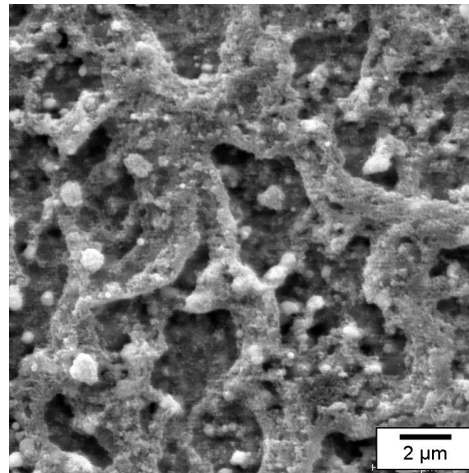


Abbildung 10.3.: REM-Aufnahme Kombination aus TiO₂-Schicht und NB-Schicht

10.3. Zusammenfassung TiO₂-Schicht

Das Ziel dieses Abschnittes war es, den Beschichtungsprozess mit der bioaktiven Schicht zu erweitern. Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung wäre es so möglich die Oberfläche eines Implantat-Rohlings direkt nacheinander in zwei ähnlichen Prozessschritten zu modifizieren. Die nächsten Schritte wären dabei, die Rauheit entsprechend zu erhöhen, durch eine andere Wahl der Partikel oder ggf. durch Verwendung eines Platzhalters. Darüberhinaus müssen dann mechanische Messungen wie Haftzugtest, Scherkraftmessungen o.ä. aufklären, ob ein Ablösen der Schicht auftreten würde. Es wurde aber gezeigt, dass eine Kombination aus TiO₂-Schicht und NB-Schicht in einem Beschichtungsprozess realisiert werden kann.

11. Zusammenfassung

Der Kurz- und Langzeiterfolg von Implantaten ist abhängig von der Stabilität der Implantatverankerung im Knochengewebe. Die Stabilität hängt davon ab, wie gut das Implantat in den Knochen integriert ist (Osseointegration). Da die Oberfläche eines Implantates im Kontakt mit dem umliegenden Gewebe ist, spielen Oberflächeneigenschaften wie chemische Zusammensetzung, Rauheit, Oberflächenenergie usw. eine entscheidende Rolle. Demzufolge wird auf diesen Gebieten viel Aufwand betrieben, die Osseointegration von Implantaten zu steigern und zu beschleunigen. Die „Standard“-Oberfläche ist eine raue TiO_2 -Oberfläche, die durch Sandstrahlen und anschließendem Säureätzen oder durch anodische Oxidation hergestellt wird. Der Trend geht aber zu bioaktiven Schichten, Proteine wie z.B. BMPs, die auf die Implantatoberfläche aufgebracht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine bioaktive Beschichtung auf Implantaten aufzubringen. Dazu bildete die NanoBone[®]-Technologie die Grundlage. Die Eigenschaften des im Menschen angewandten Knochenaufbaumaterials NanoBone[®]-Granulat sollten in eine Beschichtung überführt werden. Das Granulat besteht aus einer Silicagelmatrix mit eingebetteten Hydroxylapatit-Kristalliten. Durch den Matrixwechsel des Biomaterials nach wenigen Tagen *in vivo* erfolgt ein Austausch der SiO_2 -Matrix durch autologe Proteine wie BMP-2, Osteocalcin usw. direkt *in vivo*. Dadurch wird das Material in kurzer Zeit durch Knochen ersetzt. Die strukturellen Eigenschaften und die daraus resultierende Wirkungsweise dieses Granulats sollten auf eine Beschichtung auf Implantaten übertragen werden.

Der gesamte Beschichtungsprozess ist in vier Teilprozesse unterteilt: Plasmavorbereitung, Beschichtung, Trocknung und Plasmanachbehandlung. Vor dem eigentlichen Beschichtungsprozess wird die Implantatoberfläche mittels atmosphärischen Sauerstoffplasmas gereinigt. Dabei wird das Implantat für $t_{PI} = 20\text{s}$ rotierend durch das Plasma gefahren, so dass die kohlenstoffhaltigen Moleküle (Fette o.ä.), die sich auf jeder Oberfläche unter Normalbedingungen anlagern, entfernt werden. Die Oxidschicht der Implantatoberfläche wurde durch das Sauerstoffplasma erhöht. Dies hatte aber keine Auswirkungen auf die Rauheiten der Titan-dioxidoberflächen. Die Temperatur der Implantatoberfläche wurde aber durch das Plasma erhöht. Es wurden nach der Plasmabehandlung Temperaturen von bis zu $T = 140\text{ °C}$ gemessen. Die Temperatur hatte Auswirkungen auf die Struktur der Schicht.

Die Beschichtung erfolgt durch Spin-Spray-Coating unter der Verwendung des Sol-Gel-Prozesses. Die Beschichtungsdispersion besteht aus einem SiO_2 -Sol und synthetischem, nanokristallinem Hydroxylapatit (ncHA), der morphologisch identisch zu humanem Hydroxylapatit ist. Das Dispersionsmedium ist Ethanol. Die Schicht soll die Implantatoberfläche möglichst homogen bedecken, d.h. die Schicht soll an allen Stellen der Implantatoberfläche die gleiche Schichtdicke aufweisen. Deshalb wird die Dispersion während der Rotation des Implantates aufgesprüht, wobei die Implantatoberfläche komplett benetzt wird. Nach einem Trocknungs-

schritt wird der Ethanol entfernt. Die SiO_2 -Polyeder im Sol können sich dadurch untereinander vernetzen und das Sol geht in ein Gel über. Dabei wird der nCHA in eine SiO_2 -Matrix eingebaut. Die Teilprozesse Beschichtung und Trocknungsprozess werden mehrfach nacheinander durchgeführt. Dadurch werden dünne Einzelschichten aufgetragen und Trocknungsrisse vermieden, die durch die Schrumpfung des SiO_2 -Gels entstehen.

Die Charakterisierung der Eigenschaften der Schicht wurde im Mikrometer- und Nanometerbereich vorgenommen. Gleichzeitig wurden Korrelationen zu den Prozessparametern untersucht. Es zeigte sich, dass die Parameter Beschichtungszeit, Feststoffgehalt der Dispersion und Iteration (Anzahl der Teilprozesse Beschichtung und Trocknung) mit der Schichtdicke des Materials korrelieren. Denn je länger gesprüht, je mehr Material pro Sprühvorgang aufgetragen und je mehr Beschichtungsiterationen durchgeführt wurden, desto dicker war erwartungsgemäß die Schichtdicke. Die Schichtdicke ist an den unterschiedlichen Gewindegeometrien eines Implantates gleich groß, bis auf die Implantatspitze. Dort wiesen alle Implantate eine deutlich geringere Schichtdicke auf, was durch den Rotationsprozess bedingt ist. Da die Implantatspitze kaum mechanische, lasttragende Aufgaben erfüllen muss, ist dieser Effekt nicht von großer Bedeutung.

Die Rauheit der Schicht selbst beträgt $s_a = 0.69 \mu\text{m}$. Das ist der Wert ohne die Rauheit der ursprünglichen Implantatoberfläche, die durch Sandstrahlen o.ä. erzeugt wurde. Betrachtet man die gesamte Rauheit, also Schicht und TiO_2 , dann hängt dieser Wert von der Schichtdicke des Beschichtungsmaterials ab. Bei Schichtdicken von etwa $2 \mu\text{m}$ wurde die Topografie der Implantatoberfläche nahezu erhalten bzw. die Rauheit wurde nur leicht verringert, bspw. von $3.8 \mu\text{m}$ auf etwa $3 \mu\text{m}$. Bei höheren Schichtdicken nimmt die Rauheit des Implantat-Schicht-Systems ab und nähert sich ab $10 \mu\text{m}$ der Rauheit der Schicht selbst an ($0.69 \mu\text{m}$). Weiterhin sind die Rauheit und die Topografie der Schicht abhängig von der Oberflächentemperatur des Implantats. Oberhalb von $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ bilden sich durch das schnelle Verdunsten des Ethanol ringartige Strukturen in der Schicht aus, die gleichzeitig die Rauheit erhöhen.

Ein wesentlicher Punkt bei Schichten ist die Festigkeit gegenüber ihren Substraten. Konkret für den vorliegenden Fall ist es aufgrund der Wirkungsweise des Materials notwendig, dass die Schicht den Implantationsprozess übersteht. Trotzdem wurde die Haftzugfestigkeit nach ASTM C633 geprüft, um die Schicht in Zulassungsnormen einzuordnen. Der Wert lag oberhalb von 22 MPa , was als untere Grenze für HA-Beschichtungen auf metallischen Implantaten gilt. Der Implantationsprozess wurde *ex vivo* nachgestellt, um die gleichen Scherbelastungen wie bei einer realen Anwendung zu realisieren. Es zeigte sich, dass die Schicht im Mittel zu 60% auf der Implantatoberfläche verblieb. Die Ablösungen, die dabei im Knochen entstehen, sind nicht als nachteilig zu betrachten, da sie die gleiche Struktur und Zusammensetzung aufweisen wie das zu Grunde liegende Aufbaumaterial.

Die Struktur der Schicht im Nanometerbereich ist gekennzeichnet durch eine SiO_2 -Matrix mit eingebetteten HA-Kristalliten. Anhand von elementspezifischen Abbildungen (EELS) und hochauflösenden TEM-Abbildungen konnte nachgewiesen werden, dass die HA-Kristallite von der SiO_2 -Matrix ummantelt sind und so in die Silicamatrix eingebettet sind. Durch den iterativen Beschichtungsvorgang bildet sich eine layer-by-layer-Struktur in der Schicht aus. Die SiO_2 -Matrix selbst ist ein poröses Xerogel. Während des Trocknungsprozesses bildet sich das SiO_2 -Gel indem die SiO_2 -Primärteilchen untereinander vernetzen. Der Vernetzungsgrad

wurde anhand des ersten amorphen Hauptmaximums (FSDP) im Röntgendiffraktogramm beschrieben. Der FSDP vom vollständig vernetzten Kieselglas liegt bei $s_{max} = 15.0 \text{ nm}^{-1}$. Im Vergleich dazu ist der Vernetzungsgrad der SiO_2 -Matrix mit $s_{max} = 16.7 \text{ nm}^{-1}$ auch geringer als beim vergleichbaren Xerogel mit $s_{max} = 15.9 \text{ nm}^{-1}$. Die Gelbildungszeit spielt dabei eine Rolle. Durch die schnelle Gelbildung (Ethanolverdunstung) können sich die Primärteilchen nicht so stark vernetzen. Je schneller das Dispersionmedium entfernt wurde, desto weniger konnten sich die Primärteilchen vernetzen.

Die Porosität der Schicht wurde mittels Elektronenmikroskopie und Gasadsorption (BET) untersucht. Es zeigte sich, dass die Schicht eine BET-Oberfläche von $169 \text{ cm}^3/\text{g}$ besitzt und die dominierende Porenstruktur eine Größe von $20 - 50 \text{ nm}$ aufweist.

Zur Untersuchung der Wirkungsweise der Beschichtung wurden Tierstudien an Göttinger Minipigs und New Zealand White Rabbits durchgeführt. Zuvor wurde die Biokompatibilität mit den zwei verschiedenen Zelltests Live/Dead[®] und XTT nachgewiesen. Die Schicht zeigte in beiden Tests eine vergleichbare Biokompatibilität wie die jeweiligen Kontrollgruppen. In den beiden Tierstudien wurde die Osseointegration histomorphometrisch anhand der Messung des Knochen-Implantat-Kontakts beschrieben. Im Minipig-Modell wurde gezeigt, dass die Schicht auf Implantaten zu einem deutlich erhöhten BIC führte. Das Kaninchen-Modell wurde verwendet, um die Ergebnisse des Minipig-Versuchs in Vergleich zu den Parametern Rauheit und Oberflächenenergie zu setzen. Hier wurden zusätzlich histologische Untersuchungen durchgeführt. Die wesentlichen Erkenntnisse aus Histomorphometrie und Histologie sind, dass nach 2 Wochen viel neuer Knochen auf der Implantatoberfläche gebildet wurde, der auch nach 4 Wochen in gleicher Menge vorhanden ist. Auffällig war im Vergleich zu den unbeschichteten Gruppen, dass sich neuer Knochen direkt auf der beschichteten Implantatoberfläche abgelagert hatte. Das Knochenwachstum ging dabei von der Implantatoberfläche aus. Nach 6 Wochen war zu beobachten, dass der neu gebildete Knochen wieder durch Osteoklasten abgebaut wurde. Dies war auf die mangelnde Belastung durch Kaukräfte zurückzuführen. Zwischen den Parameter Rauheit und Hydrophilie konnte kein signifikanter Unterschied im BIC gemessen werden.

Eine wichtige zu klärende Frage war, warum sich die beschichteten Implantate so von den anderen Implantatgruppen unterschieden. Bei dem zu Grunde liegenden Knochenaufbaumaterial NanoBone[®] spielt der Matrixwechsel die entscheidende Rolle. Um die Schicht bzgl. Matrixwechsel zu analysieren, wurden verschiedene *in vitro* und *ex vivo* durchgeführt. Beschichtete Implantate wurden in Wistar Ratten subkutan implantiert. Nach 6 Tagen konnte kein Silizium in der Schicht nachgewiesen werden, obwohl die Morphologie des Materials nahezu erhalten geblieben war. Zur weiteren Einschränkung dieses Zeitintervalls wurde die Schicht *ex vivo* in den Femur von Kaninchen eingebracht. Auch hier wurde die SiO_2 -Matrix innerhalb weniger Stunden umgebaut. Da der Matrixwechsel mit der Vaskularisierung des Knochendefekts zusammenhängt, wurde der Matrixwechsel der Schicht *in vitro* mit Blut analysiert. Bereits nach 30 min wurde die SiO_2 -Matrix ersetzt. Die NB-Schicht ist identisch zum NanoBone[®]-Granulat, daher liegt die Vermutung nahe, dass die gleichen autologen Proteine wie BMP-2, Osteocalcin, kollagene Moleküle usw. die neue Matrix bilden. Das bedeutet, dass nach kurzer Zeit die Silicamatrix durch eine autologe Matrix ersetzt wurde. Die Implantatoberfläche wurde *in vivo* mit körpereigenen Proteinen „beschichtet“, die dann knochenspezifische Zellen „anlockten“.

Wie beim Granulat, ist auch bei der Schicht der Matrixwechsel der Schlüsselmechanismus zur Wirkungsweise.

In einem weiteren „Proof-of-principle“-Kapitel wurde eine mögliche Kombination der bioaktiven NB-Beschichtung mit einer TiO_2 -Schicht geprüft. Durch einen Zwischenschritt im Beschichtungsprozess wurde eine TiO_2 -Schicht bestehend aus TiO_2 -Kristallite und TiO_2 -Gel aufgetragen. So besteht die Möglichkeit, im Produktionsprozess von Implantaten die gewünschte Rauheit mit bioaktiver Beschichtung zu kombinieren. Die erzielte Rauheit von $s_a = 0.3 \mu\text{m}$ lag allerdings nicht auf dem Niveau kommerzieller Implantatrauheiten. Durch die Verwendung geeigneter Kristallitegrößen kann die Rauheit sicherlich weiter erhöht werden. Dennoch wurde gezeigt, dass eine raue TiO_2 -Schicht in Kombination mit einer bioaktiven Schicht in einem Beschichtungsprozess durchgeführt werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] E. Wintermantel and S.-W. Ha, editors. *Medizintechnik - Life Science Engineering*. Springer, 2008.
- [2] R. Gradinger and H. Gollwitzer, editors. *Ossäre Integration*. Springer Medizin Verlag, 2006.
- [3] Département de médecine Unité d'Anatomie Université de Fribourg, Faculté des sciences. <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/>.
- [4] S. Weiner and H. D. Wagner. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annual Review of Materials Science*, 28(1):271–298, 1998.
- [5] S. V. Dorozhkin and M. Epple. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*, 41(17):3130–3146, 2002.
- [6] L.L. Hench and J. Wilson. *An introduction to bioceramics*, volume 1. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 1993.
- [7] M. M. Sandberg. Matrix in cartilage and bone development: Current views on the function and regulation of major organic components. *Annals of Medicine*, 23(3):207–217, 1991.
- [8] J. Isbaner. Implantatoberflächen und osseointegration - marktübersicht systeme und oberflächen. *Oralchirurgie Journal*, 3:34–37, 2012.
- [9] H. Schliephake, T. Hefti, F. Schlottig, P. Gédet, and H. Staedt. Mechanical anchorage and peri-implant bone formation of surface-modified zirconia in minipigs. *J Clin Periodontol*, 37:818–828, 2010.
- [10] A. Rosengren, E. Pavlovic, S. Oscarsson, A. Krajewski, A. Ravaglioli, and A. Piancastelli. Plasma protein adsorption pattern on characterized ceramic biomaterials. *Biomaterials*, 23(4):1237 – 1247, 2002.
- [11] M. Gahlert, T. Gudehus, S. Eichhorn, E. Steinhauser, H. Kniha, and W. Erhardt. Biomechanical and histomorphometric comparison between zirconia implants with varying surface textures and a titanium implant in the maxilla of miniature pigs. *Clin. Oral Impl. Res.*, 18:662–668, 2007.
- [12] A. Scarano, F. Di Carlo, M. Quaranta, and A. Piattelli. Bone response to zirconia ceramic implants: An experimental study in rabbits. *Journal of Oral Implantology*, 24:8–12, 2003.

- [13] T. Albrektsson, P.-I. Bränemark, H.-A. Hansson, and J. Lindström. Osseointegrated titanium implants: Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica*, 52(2):155–170, 1981.
 - [14] C.N. Elias and L. Meirelles. Improving osseointegration of dental implants. *Expert Rev. Med. Devices*, 7:241–256, 2010.
 - [15] W.R. Laney, D.E. Tolma, E.E. Keller, R.P. Desjardins, N.B. Van Roekel, and P.I. Bränemark. Dental implants: tissue-integrated prosthesis utilizing the osseointegration concept. *Mayo Clin Proc*, 61:91–97, 1986.
 - [16] W. Götz. Osseointegration - biologische und klinische grundlagen. *ZWR - Das Deutsche Zahnärzteblatt*, 119(11):550–561, 2010.
 - [17] M.-E. Marquis, E. Lord, E. Bergeron, O. Drevelle, H. Park, F. Cabana, H. Senta, and N. Faucheux. Bone cells-biomaterials interactions. *Front Biosci*, 14:1023–1067, 2009.
 - [18] S. Raghavendra, M.C. Wood, and T.D. Taylor. Early wound healing adjacent to endosseous dental implants: A review of the literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 20(3):425–31, 2005.
 - [19] R. Gapski, H.-L. Wang, P. Mascarenhas, and N. P. Lang. Critical review of immediate implant loading. *Clinical Oral Implants Research*, 14(5):515–527, 2003.
 - [20] L. LeGuehennec, A. Soueidan, P. Layrolle, and Y. Amouriq. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23:844–854, 2007.
 - [21] R.Z. Legeros. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Advances in Dental Research*, 2(1):164–180, 1988.
 - [22] D. Buser, R. K. Schenk, S. Steinemann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, and H. Stich. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. a histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res*, 25(7):889–902, 1991.
 - [23] G. L. Darimont, R. Cloots, E. Heinen, L. Seidel, and R. Legrand. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit. *Biomaterials*, 23:2569–2575, 2002.
 - [24] R. Junker, P. J. D. Manders, J. Wolke, Y. Borisov, and J. A. Jansen. Bone-supportive behavior of microplasma-sprayed cap-coated implants: mechanical and histological outcome in the goat. *Clinical Oral Implants Research*, 21:189–200, 2009.
 - [25] L. Sun, Ch. C. Berndt, K. A. Gross, and A. Kucuk. Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review. *J Biomed. Mater. Res.*, 58:570–592, 2001.
-

-
- [26] N. Aebli, J. Krebs, H. Stich, P. Schawalder, M. Walton, D. Schwenke, H. Gruner, B. Gasser, and J.-C. Theis. In vivo comparison of the osseointegration of vacuum plasma sprayed titanium- and hydroxyapatite-coated implants. *J Biomed Mater Res A*, 66:356–363, 2003.
- [27] S. H. Maxian, J. P. Zawadsky, and M. G. Dunn. Mechanical and histological evaluation of amorphous calcium phosphate and poorly crystallized hydroxyapatite coatings on titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(6):717–728, 1993.
- [28] Y Yang, KH Kim, and JL Ong. A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process—an alternative to plasma spraying. *Biomaterials*, 26(3):327–337, January 2005.
- [29] S. V. Dorozhkin. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31(7):1465–1485, 2010.
- [30] P. Ducheyne, S. Radin, and L. King. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. i. dissolution. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(1):25–34, 1993.
- [31] C. P. A. T. Klein, J. M. A de Blicq-Hogervorst, J. G. C. Wolke, and K. de Groot. Studies of the solubility of different calcium phosphate ceramic particles in vitro. *Biomaterials*, 11(7):509 – 512, 1990.
- [32] St. L. Wheeler. Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated cylinder implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11:340–350, 1996.
- [33] E.W. Morscher, A. Hefti, and U. Aebi. Severe osteolysis after third-body wear due to hydroxyapatite particles from acetabular cup coating. *J Bone Joint Surg*, 80-B:267–272, 1998.
- [34] D. Tinsley, C. J. Watson, and J. L. Russell. A comparison of hydroxylapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clin Oral Impl Res*, 12(2):159–166, 2001.
- [35] M. J. Coathup, G. W. Blunn, N. Flynn, C. Williams, and N. P. Thomas. A comparison of bone remodelling around hydroxyapatite-coated, porous-coated and grit-blasted hip replacements retrieved at post-mortem. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume*, 83-B(1):118–123, 2001.
- [36] D. L. Cochran, R. K. Schenk, A. Lussi, F. L. Higginbottom, and D. Buser. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A histometric study in the canine mandible. *Journal of Biomedical Materials Research*, 40(1):1–11, 1998.
-

-
- [37] A. Wennerberg, C. Hallgren, C. Johansson, and S. Danelli. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical Oral Implants Research*, 9(1):11–19, 1998.
- [38] G.B. Schneider, H. Perinpanayagam, M. Clegg, R. Zaharias, D. Seabold, J. Keller, and C. Stanford. Implant surface roughness affects osteoblast gene expression. *Journal of Dental Research*, 82(5):372–376, 2003.
- [39] P.M Brett, J Harle, V Salih, R Mihoc, I Olsen, F.H Jones, and M Tonetti. Roughness response genes in osteoblasts. *Bone*, 35(1):124 – 133, 2004.
- [40] L. Le Guehenne, E. Goyenvalle, M.-A. Lopez-Heredia, P. Weiss, Y. Amouriq, and P. Layrolle. Histomorphometric analysis of the osseointegration of four different implant surfaces in the femoral epiphyses of rabbits. *Clin. Oral Impl. Res.*, 19:1103–1110, 2008.
- [41] D.D. Deligianni, N.D. Katsala, P.G. Koutsoukos, and Y.F. Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22:87–96, 2001.
- [42] M. L. R. Schwarz, M. Kowarsch, St. Rose, K. Becker, T. Lenz, and L. Jani. Effect of surface roughness, porosity, and a resorbable calcium phosphate coating on osseointegration of titanium in a minipig model. *J Biomed Mater Res*, 89A:667–678, 2009.
- [43] Y.-T. Sul, C. B. Johansson, Y. Jeong, A. Wennerberg, and T. Albrektsson. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clinical Oral Implants Research*, 13(3):252–259, 2002.
- [44] S.-A. Cho and K.-T. Park. The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*, 24(20):3611–3617, 2003.
- [45] T. Albrektsson and A. Wennerberg. The impact of oral implants - past and future 1966-2042. *J Can Dent Assoc*, 71:327–327d, 2005.
- [46] M.M. Shalabi, A. Gortemaker, M.A. Van't Hof, J.A. Jansen, and N.H.J. Creugers. Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. *Journal of Dental Research*, 85(6):496–500, 2006.
- [47] H. J. Ronold, St. P. Lyngstadaas, and J. E. Ellingsen. A study on the effect of dual blasting with tio2 on titanium implant surfaces on functional attachment in bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 67A:524–530, 2003.
- [48] A. Wennerberg, A. Ektessabi, T. Albrektsson, C. Johansson, and B. Andersson. A 1-year follow-up of implants of differing surface roughness placed in rabbit bone. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 12:486–494, 1997.
- [49] W. Becker, B. E. Becker, A. Ricci, O. Bahat, E. Rosenberg, L. F. Rose, M. Handelsman, and H. Isrealson. A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 2:159–165, 2000.
-

-
- [50] A. Wennerberg, T. Albrektsson, C. Johansson, and B. Andersson. Experimental study of turned and grit-blasted screw-shaped implants with special emphasis on effects of blasting material and surface topography. *Biomaterials*, 17(1):15–22, 1996.
- [51] DH Li, BL Liu, JC Zou, and KW Xu. Improvement of osseointegration of titanium dental implants by a modified sandblasting surface treatment: an in vivo interfacial biomechanics study. *Implant Dent*, 8(3):289–294, 1999.
- [52] A. Schuh, U. Holzwarth, W. Kachler, J. Göske, and G. Zeller. Oberflächenuntersuchungen an al₂o₃-raugestrahkten titanimplantaten in der hüftendoprothetik. *Orthopäde*, 33(8):905–910, 2004.
- [53] J. L. Ricci, F. J. Kummer, H. Alexander, and R. S. Casar. Technical note: Embedded particulate contaminants in textured metal implant surfaces. *Journal of Applied Biomaterials*, 3:225–230, 1992.
- [54] M. Böhler, F. Kanz, B. Schwarz, I. Steffan, A. Walter, H. Plenck Jr., and K. Knahr. Adverse tissue reactions to wear particles from co-alloy articulations, increased by alumina-blasting particle contamination from cementless ti-based total hip implants. *J Bone Joint Surg*, 84-B:128–136, 2002.
- [55] M. Rüger, T.J. Gensior, Ch. Herren, M. von Walter, Ch. Ocklenburg, R. Marx, and H.-J. Erli. The removal of al₂o₃ particles from grit-blasted titanium implant surfaces: Effects on biocompatibility, osseointegration and interface strength in vivo. *Acta Biomaterialia*, 6:2852–2861, 2010.
- [56] A. Piattelli, M. Degidi, M. Paolantonio, C. Mangano, and A. Scarano. Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration. *Biomaterials*, 24:4081–4089, 2003.
- [57] K. Gotfredsen and U. Karlsson. A prospective 5-year study of fixed partial prostheses supported by implants with machined and tio₂-blasted surface. *Journal of Prosthodontics*, 10(1):2–7, 2001.
- [58] L. Rasmusson, K.-E. Kahnberg, and A. Tan. Effects of implant design and surface on bone regeneration and implant stability: An experimental study in the dog mandible. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 3(1):2–8, 2001.
- [59] L. Rasmusson, J. Roos, and H. Bystedt. A 10-year follow-up study of titanium dioxide-blasted implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 7(1):36–42, 2005.
- [60] D. Li, St. J. Ferguson, Th. Beutler, D. L. Cochran, C. Sittig, H. P. Hirt, and D. Buser. Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants. *J Biomed Mater Res*, 60(2):325–332, 2002.
- [61] J. Y. Park and J. E. Davies. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 11(6):530–539, 2000.
-

-
- [62] C. Massaro, P. Rotolo, F. De Riccardis, E. Milella, A. Napoli, M. Wieland, M. Textor, N.D. Spencer, and D.M. Brunette. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. part i: chemical composition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13:535–548, 2002.
- [63] M. Wong, J. Eulenberger, R. Schenk, and E. Hunziker. Effect of surface topology on the osseointegration of implant materials in trabecular bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29:1567–1575, 1995.
- [64] Y.-T. Sul, C. B. Johansson, Y. Jeong, and T. Albrektsson. The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes. *Medical Engineering & Physics*, 23(5):329–346, 2001.
- [65] P. R. Klokkevold, R. D. Nishimura, M. Adachi, and A. Caputo. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface. a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research*, 8(6):442–447, 1997.
- [66] Y.-T. Sul, C. B. Johansson, and T. Albrektsson. Oxidized titanium screws coated with calcium ions and their performance in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17(5):625–634, 2002.
- [67] Y.-T. Sul, E.-S. E.-S. Byon, and Y. Y. Jeong. Biomechanical measurements of calcium-incorporated oxidized implants in rabbit bone: Effect of calcium surface chemistry of a novel implant. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 6(2):101–110, 2004.
- [68] A. Bagno and C. Di Bello. Surface treatments and roughness properties of ti-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15:935–949, 2004.
- [69] R. M. Urban, J. J. Jacobs, M. J. Tomlinson, J. Gavrilovic, J. Black, and M. Peoc'h. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Jt Surg American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 82:457–477, 2000.
- [70] P. Ducheyne and K. E. Healy. The effect of plasma-sprayed calcium phosphate ceramic coatings on the metal ion release from porous titanium and cobalt-chromium alloys. *Journal of Biomedical Materials Research*, 22(12):1137–1163, 1988.
- [71] M. Taborelli, M. Jobin, P. Francois, P. Vaudaux, M. Tonetti, S. Szmukler-Moncler, J. P. Simpson, and P. Descouts. Influence of surface treatments developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. (i) surface characterization. *Clinical Oral Implants Research*, 8(3):208–216, 1997.
- [72] J. Lausmaa, L. Mattsson, U. Rolander, and B. Kasemo. Chemical composition and morphology of titanium surface oxides. *MRS Online Proceedings Library*, 55, 1985.
- [73] B. Kasemo and J. Lausmaa. Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res: Applied Biomaterials*, 22:145–158, 1988.
-

-
- [74] F. Schwarz, M. Herten, M. Wieland, M. Dard, and J. Becker. Chemisch modifizierte, ultra-hydrophile titanimplantatoberflächen. *Mund Kiefer GesichtsChir*, 11:11–17, 2007.
- [75] B.-S. Kang, Y.-T. Sul, S.-J. Oh, H.-J. Lee, and T. Albrektsson. XPS, AES and SEM analysis of recent dental implants. *Acta Biomaterialia*, 5:2222–2229, 2009.
- [76] G. Zhao, Z. Schwartz, M. Wieland, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, D. L. Cochran, and B. D. Boyan. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A*, 74A(1):49–58, 2005.
- [77] J. Ganeles, A. Zöllner, J. Jackowski, C. ten Bruggenkate, J. Beagle, and F. Guerra. Immediate and early loading of straumann implants with a chemically modified surface (slactive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clinical Oral Implants Research*, 19(11):1119–1128, 2008.
- [78] F. Schwarz, M. Herten, M. Sager, M. Wieland, M. Dard, and J. Becker. Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(1):78–86, 2007.
- [79] J.-W. Park, J.-H. Jang, Ch.-S. Lee, and T. Hanawa. Osteoconductivity of hydrophilic microstructured titanium implants with phosphate ion chemistry. *Acta Biomaterialia*, 5:2311–2321, 2009.
- [80] F. Rupp, L. Scheideler, N. Olshanska, M. de Wild, M. Wieland, and J. Geis-Gerstorfer. Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *J Biomed. Mater. Res.*, 76A:323–334, 2006.
- [81] N. P. Lang, G. E. Salvi, G. Huynh-Ba, S. Ivanovski, N. Donos, and D. D. Bosshardt. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 22(4):349–356, 2011.
- [82] F. Schwarz, M. Wieland, Z. Schwartz, G. Zhao, F. Rupp, J. Geis-Gerstorfer, A. Schedle, N. Brogini, M. M. Bornstein, D. Buser, S. J. Ferguson, J. Becker, B. D. Boyan, and D. L. Cochran. Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 88B(2):544–557, 2009.
- [83] T. Sawase, R. Jimbo, K. Baba, Y. Shibata, T. Ikeda, and M. Atsuta. Photo-induced hydrophilicity enhances initial cell behavior and early bone apposition. *Clin. Oral Impl. Res.*, 19:491–496, 2008.
- [84] M. Schätzle, R. Männchen, U. Balbach, Ch. H. F. Hämmerle, H. Toutenburg, and R. E. Jung. Stability change of chemically modified sandblasted/acid-etched titanium palatal implants. a randomizedcontrolled clinical trial. *Clin. Oral Impl. Res.*, 20:489–495, 2009.
-

-
- [85] C. Eriksson, H. Nygren, and K. Ohlson. Implantation of hydrophilic and hydrophobic titanium discs in rat tibia: cellular reactions on the surfaces during the first 3 weeks in bone. *Biomaterials*, 25(19):4759–4766, 2004.
- [86] L. Carlsson, T. Albrektsson, and C. Berman. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 4:1999–204, 1989.
- [87] Y. Liu, L. Enggist, A. F. Kuffer, D. Buser, and E. B. Hunziker. The influence of bmp-2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osseointegration. *Biomaterials*, 28:2677–2686, 2007.
- [88] Y. Liu, R. O. Huse, K. de Groot, D. Buser, and E. B. Hunziker. Delivery mode and efficacy of bmp-2 in association with implants. *J Dent Res*, 86:84–89, 2007.
- [89] E.B. Hunziker, L. Enggist, A. Küffer, D. Buser, and Y. Liu. Osseointegration: The slow delivery of bmp-2 enhances osteoinductivity. *Bone*, 51(1):98–106, 2012.
- [90] Di Chen, Ming Zhao, and Gregory R. Mundy. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4):233–241, 2004.
- [91] V. Rosen. Bmp and bmp inhibitors in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068:19–25, 2006.
- [92] N. Aebli, H. Stich, P. Schawalder, J.-C. Theis, and J. Krebs. Effects of bone morphogenetic protein-2 and hyaluronic acid on the osseointegration of hydroxyapatite-coated implants: An experimental study in sheep. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 73A(3):295–302, 2005.
- [93] A. R. Poynton and J. M. Lane. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine*, 27(16S):S40–S48, 2002.
- [94] B. Perri, M. Cooper, C. Laurysen, and N. Anand. Adverse swelling associated with use of rh-BMP-2 in anterior cervical discectomy and fusion: a case study. *Spine J*, 7(2):235–239, 2007.
- [95] C. Jeffrey Brinker and George W. Scherer. *Sol-Gel-Science*. Academic Press, Inc., 1990.
- [96] R.K. Iler. *The Chemistry of Silica*. John Wiley & Sons, Inc, New York, 1979.
- [97] M.-A. Einarsrud, M. B. Kirkedelen, E. Nilsen, K. Mortensen, and J. Samseth. Structural development of silica gels aged in teos. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 231(1-2):10–16, 1998.
- [98] B. Himmel, Th. Gerber, and H. Bürger. X-ray diffraction investigations of silica gel structures. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 91(1):122–136, 1987.
- [99] Th. Gerber and B. Himmel. *Dissertation B und A, Rostock*. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock, 1987.
-

-
- [100] D. W. Schaefer, J. E. Martin, P. Wiltzius, and D. S. Cannell. Fractal geometry of colloidal aggregates. *Phys. Rev. Lett.*, 52:2371–2374, Jun 1984.
- [101] C.J. Brinker and G.W. Scherer. Sol-gel-glass: I. gelation and gel structure. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 70(3):301–322, 1985.
- [102] Th. Gerber. The subcritical preparation of aerogels based on sodium water glass. *Sol-Gel Science and Technology*, 13:323–328, 1998.
- [103] B. Knoblich. *Aggregationsprozesse von SiO₂ in wässriger Lösung - Strukturbildung beim Sol-Gel-Übergang*. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock, 1999.
- [104] B. Knoblich and Th. Gerber. Aggregation in SiO₂ sols from sodium silicate solutions. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 283:109–113, 2001.
- [105] B. Knoblich and Th. Gerber. The arrangement of fractal clusters dependent on the pH value in silica gels from sodium silicate solutions. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 296:81–87, 2001.
- [106] W. Xu, G. Holzhüter, H. Sorg, D. Wolter, S. Lenz, Th. Gerber, and B. Vollmar. Early matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 91(2):692–699, 2009.
- [107] W. Xu, C. Ganz, U. Weber, M. Adam, D. Wolter, B. Frerich, B. Vollmar, and Th. Gerber. Evaluation of injectable silica-embedded nanohydroxylapatite bone substitute in rat tibia defect model. *Int J Nanomed*, 6:1543–1552, 2011.
- [108] K.-O. Henkel, V. Bienengräber, S. Lenz, and Th. Gerber. Comparison of a new kind of calcium phosphate formula versus conventional calciumphosphate matrices in treating bone defects - a long-term investigation in pigs. *Key Engineering Materials*, 284-286:885–888, 2005.
- [109] W. Götz, Th. Gerber, B. Michel, S. Lossdörfer, K.-O. Henkel, and F. Heinemann. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel nanobone osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin. Oral Impl. Res.*, 19:1016–1026, 2008.
- [110] C. Ganz, W. Xu, G. Holzhüter, W. Götz, B. Vollmar, and Th. Gerber. Comparison of bone substitutes in a tibia defect model in wistar-rats. *Key Engineering Materials*, 493-494:732–738, 2012.
- [111] W. Götz, S. Lenz, C. Reichert, K.-O. Henkel, V. Bienengräber, L. Pernicka, K. Gundlach, T. Gredes, Th. Gerber, T. Gedrange, and F. Heinemann. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochem Cytobiol*, 48(4):589–596, December 2010.
-

-
- [112] Th. Gerber, S. Lenz, G. Holzhüter, W. Götz, K. Helms, C. Harms, and Th. Mittelmeier. Nanostructured bone grafting substitute - a pathway to osteoinductivity. *Key Engineering Materials*, 493-494:147–152, 2012.
- [113] U. Weber. *Calciumorthophosphate mit kontrollierter Kristallmorphologie und ein injizierbares, poröses Biomaterial: Materialentwicklung und Charakterisierung*. PhD thesis, Universität Rostock, 2013.
- [114] M. Vallet-Regi. Ceramics for medical applications. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2:97–108, 2001.
- [115] J.-L. Pouchou, D. Boivin, P. Beauchêne, G. L. Besnerais, and F. Vignon. 3D Reconstruction of Rough Surfaces by SEM Stereo Imaging. *Microchimica Acta*, 139:135–144, 2002.
- [116] F. Marinello, P. Bariani, E. Savio, A. Horsewell, and L. De Chiffre. Critical factors in sem 3d stereo microscopy. *Measurement Science and Technology*, 19(6):065705, 2008.
- [117] B. Al-Nawas and H. Götz. Three-dimensional topographic and metrologic evaluation of dental implants by confocal laser scanning microscopy. *Cl*, 5:176–183, 2003.
- [118] M. Wieland, M. Textor, N.D. Spencer, and D.M. Brunette. Wavelength-dependent roughness: A quantitative approach to characterizing the topography of rough titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 16:163–181, 2001.
- [119] Paul Van der Heide, editor. *X-Ray Photoelectron Spectroscopy: An Introduction to Principles and Practices*. John Wiley & Sons, 2012.
- [120] G. Giavaresi, M. Fini, A. Cigada, R. Chiesa, G. Rondelli, L. Rimondini, P. Torricelli, N. N. Aldini, and R. Giardino. Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone. *Biomaterials*, 24(9):1583–1594, 2003.
- [121] M. Diefenbeck, T. Mückley, C. Schrader, J. Schmidt, S. Zankovych, J. Bossert, K. D. Jandt, M. Faucon, and U. Finger. The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials*, 32(32):8041–8047, 2011.
- [122] C. Yu-Liang, D. Lew, J. B. Park, and J. C. Keller. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 57(9):1096–1108, 1999.
- [123] K. Donath and G. Breuner. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 11:318–326, 1982.
- [124] J.-L. Pouchou. x-ray microanalysis of thin surface films and coatings. In *7th european workshop on modern developments and applications in microbeam analysis*, 2001.
-

-
- [125] M. Adam. Entwicklung eines Verfahrens zur Beschichtung von Zahnimplantaten auf der Basis der NanoBone[®]-Technologie. Master's thesis, Universität Rostock, 2009.
- [126] H.-R. Kim, H.-H. Park, S.-H. Hyun, and G.-Y. Yeom. Effect of O₂ plasma treatment on the properties of SiO₂ aerogel film. *Thin Solid Films*, 332:444–448, 1998.
- [127] Orthopedic Devices Branch, Division of General and Restorative Devices, Office of Device Evaluation, Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration. *Guidance Document for Testing Orthopedic Implants With Modified Metallic Surfaces Apposing Bone Or Bone Cement*, 1994.
- [128] P. H. Gaskell and D. J. Wallis. Medium-range order in silica, the canonical network glass. *Phys. Rev. Lett.*, 76(1):66–69, January 1996.
- [129] S. R. Elliott. The origin of the first sharp diffraction peak in the structure factor of covalent glasses and liquids. *J. Phys.: Condens. Matter*, 4:7661–7682, 1992.
- [130] J. Du and L. R. Corrales. First sharp diffraction peak in silicate glasses: Structure and scattering length dependence. *Phys. Rev. B*, 72:092201, Sep 2005.
- [131] D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, and M. R. Boyd. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17):4827–4833, 1988.
- [132] M Kirchhoff, S Lenz, KO Henkel, B Frerich, G Holzhüter, S Radefeldt, and Th Gerber. Lateral augmentation of the mandible in minipigs with a synthetic nanostructured hydroxyapatite block. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater*, 96B:342–350, 2011.
- [133] W. E. Robert, P. K. Turly, N. Brezniak, and P. J. Fielder. Implant: bone physiology and metabolism. *J Calif Dent Assoc*, 15:54–61, 1987.
- [134] N. G. Stoker and B. N. Epker. Age changes in endosteal bone remodeling and balance in the rabbit. *Journal of Dental Research*, 50(6):1570–1574, 1971.
- [135] M. Adam, C. Ganz, W. Xu, H.R. Sarajian, B. Frerich, and Th. Gerber. How to enhance osseointegration - roughness, hydrophilicity or bioactive coating? *Key Engineering Materials*, 493-494:467–472, 2012.
- [136] M. Adam, C. Ganz, W. Xu, B. Frerich, and Th. Gerber. Controlled self-coating of implant surfaces with autologous molecules. *Key Engineering Materials*, 529-530:207–212, 2013.
- [137] P. Kortesus, M. Ahola, M. Kangas, T. Leino, S. Laakso, L. Vuorilehto, A. Yli-Urpo, J Kiesvaara, and M. Marvola. Alkyl-substituted silica gel as a carrier in the controlled release of dexmedetomidine. *Journal of Controlled Release*, 76(3):227–238, 2001.
-

- [138] P. Korteso, M. Ahola, M. Kangas, A. Yli-Urpo, J. Kiesvaara, and M. Marvola. In vitro release of dexmedetomidine from silica xerogel monoliths: effect of sol-gel synthesis parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 221(1-2):107–114, 2001.
- [139] P. Korteso, M. Ahola, S. Karlsson, I. Kangasniemi, A. Yli-Urpo, and J. Kiesvaara. Silica xerogel as an implantable carrier for controlled drug delivery - evaluation of drug distribution and tissue effects after implantation. *Biomaterials*, 21(2):193–198, 2000.
- [140] D. Roelcke. Isolierung von β_1 a/c-globulin aus menschlichem serum mittels hydroxylapatit- und deae-cellulose-säulenchromatographie. *Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.*, 6:310–313, 1967.
- [141] J.-W. Shen, T. Wu, Q. Wang, and H.-H. Pan. Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*, 29(5):513–532, 2008.
- [142] J.R. Sharpe, R.L. Sammons, and P.M. Marquis. Effect of ph on protein adsorption to hydroxyapatite and tricalcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 18(6):471 – 476, 1997.
- [143] R. Fujisawa and Y. Kuboki. Preferential adsorption of dentin and bone acidic proteins on the (100) face of hydroxyapatite crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1075(1):56–60, 1991.
- [144] Q. Luo and J. D. Andrade. Cooperative adsorption of proteins onto hydroxyapatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 200(1):104–113, 1998.
-

A. Anhang

A.1. zusätzliche Abbildungen

Beschichtungsanlage

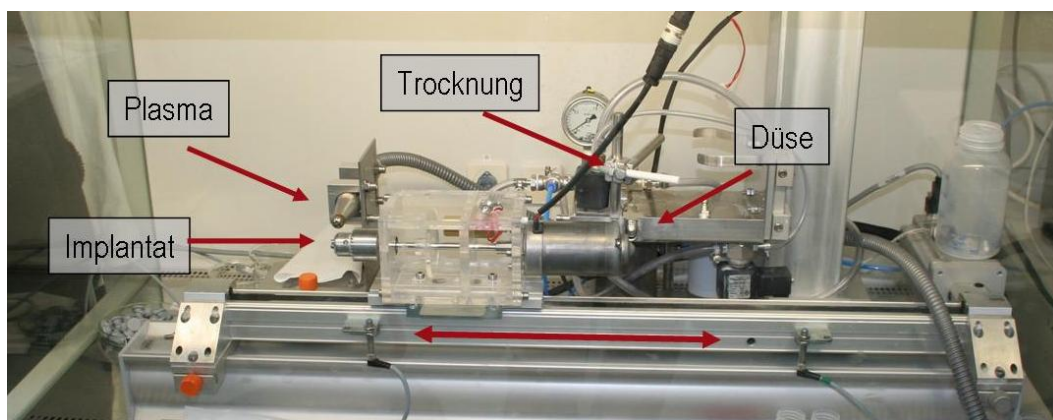


Abbildung A.1.: Foto der Beschichtungsanlage

Beschichtungsprozess

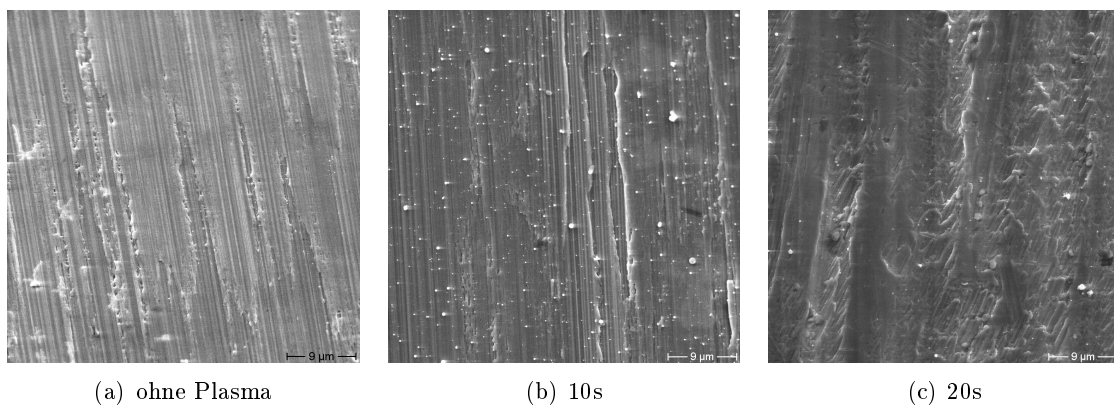


Abbildung A.2.: Die Dicke der TiO₂-Passivschicht wird durch das O₂-Plasma erhöht. Die Topologie der Oberfläche wird dadurch allerdings nur sehr wenig verändert.

Mikrostruktur

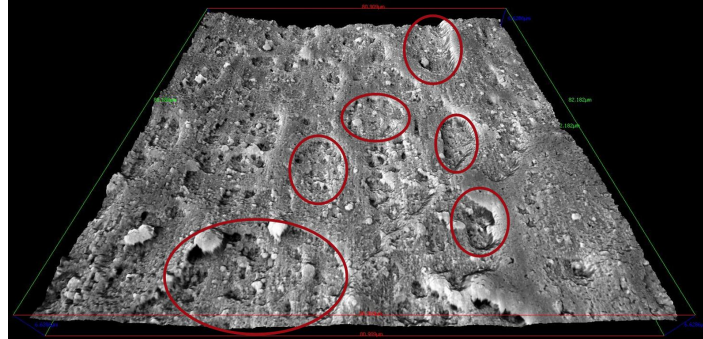
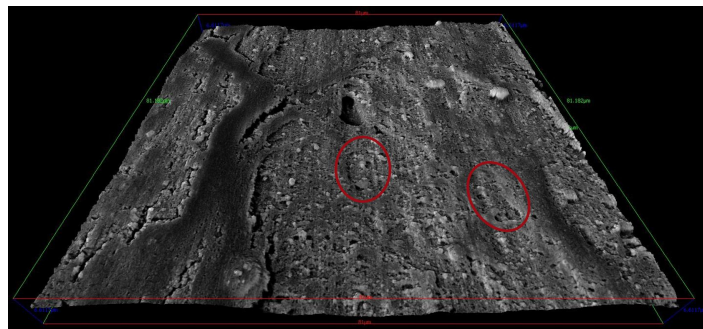
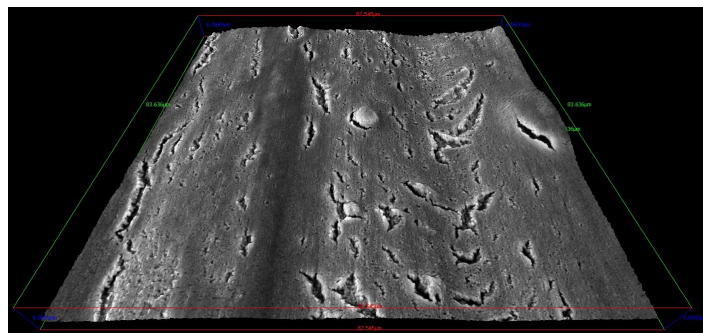
(a) $T \approx 60 \text{ }^\circ\text{C}$ (b) $T \approx 40 \text{ }^\circ\text{C}$ (c) $T \approx 35 \text{ }^\circ\text{C}$

Abbildung A.3.: 3D-Modelle aus Stereo-REM-Aufnahmen. Durch die schnelle Verdunstung des Ethanol in der Beschichtungsdispersion bei $T = 60 \text{ }^\circ\text{C}$ entstehen Trocknungsringe. Ab $T < 40 \text{ }^\circ\text{C}$ verschwinden diese Strukturen und die Rauheit der Schicht nimmt ab.

Nanostruktur

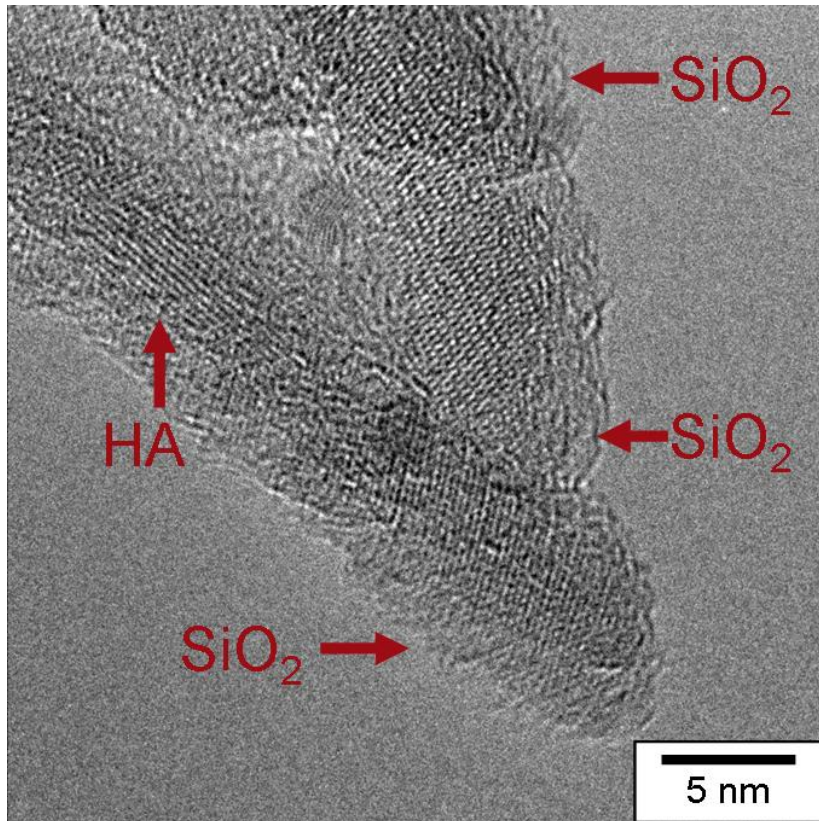


Abbildung A.4.: Einbettung des HAs in die SiO₂-Matrix

Matrixwechsel in Wistar Ratte

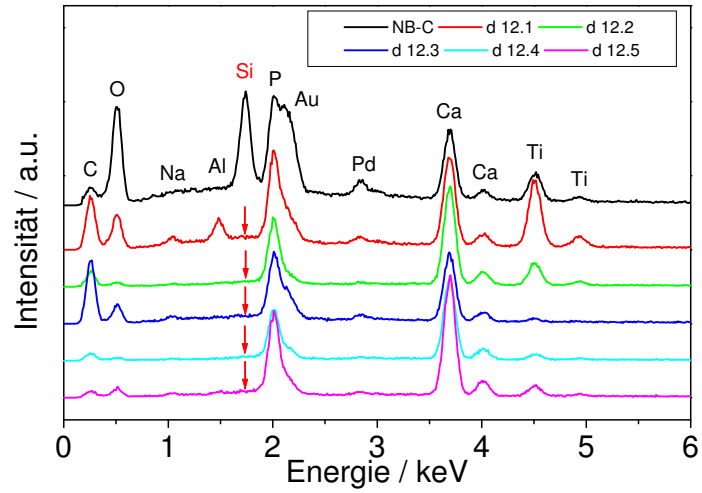


Abbildung A.5.: EDX-Spektren der Schicht nach 12 Tagen in Wistar Ratten.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank an:

- Prof. Dr. Thomas Gerber für die Überlassung des Themas, die Begleitung und Diskussionsbereitschaft auf dem Weg zur Vollendung der Arbeit,
- Dr. Gerd Holzhüter für die Einarbeitung in die Elektronenmikroskopie und den fachlichen Austausch darüber,
- Dr. Cornelia Ganz für die Unterstützung bei allen biologischen Fragen und Problemen sowie die Planung und Durchführung der Tierexperimente,
- Alle Mitglieder und ehemalige Mitglieder der AG Nano- und Biomaterialien, Holger Keuer, Ulf Weber, Richard Dietrich, Anja Clasen und Petra Wilhelm,
- Die Firma ARTOSS GmbH für die Möglichkeit zur Nutzung der Technologie und der finanziellen Unterstützung und speziell Dr. Walter Gerike, den Mitarbeitern der Produktion und Kristin Boeck,
- Prof. Dr. Werner Götz für die freundliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei histologischen Fragestellungen,
- Dr. Dr. Hamit-Reza Sarajian, Dr. Weiguo Xu und Sigrid Reincke für die Tier-OPs und Unterstützung bei der Durchführung der Tierexperimente,
- Dorothea Gütschow, Daniel Wolter für die histologischen Schliffpräparate und die Durchführung der Zelltests,
- Dr. Jörg Radnik und Dr. Marga-Martina Pohl vom Leibniz-Institut für Katalyse e.V. für die XPS-Messungen und hochauflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen,
- Reinhard Eckelt vom Leibniz-Institut für Katalyse e.V. für die Messung der BET-Oberfläche,
- Lars Middelborg, Orthopädische Klinik und Poliklinik der Universität Rostock, Forschungslabor für Biomechanik und Implantattechnologie für die Messung der Haftzugfestigkeit,
- Die mechanische Werkstatt des Instituts für Physik,
- Dr. Uwe Hoppe und Ulrike Schröder für lustige Gespräche und Zusammensein im Alltag in der Villa,

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und Kareen, die durch die finanzielle und moralische Unterstützung erst das Studium und dann die Promotion ermöglichten.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form an keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Rostock, 01.07.2013

Martin Adam