

Aus der Klinik für Kieferorthopädie
(Direktor: Prof. Dr. H. Fischer-Brandies)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**ÜBER DIE HERSTELLUNG EINER OBERFLÄCHENBESCHICHTUNG
AUS HYDROXYLAPATIT MITTELS SOL-GEL-SYNTHESE UND
UNTERSUCHUNGEN HINSICHTLICH IHRER
IN-VITRO-BIOKOMPATIBILITÄT**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
FRIEDERIKE KRAAS
aus Lübeck

Kiel 2014

| | |
|--------------------------------|---|
| 1. Berichterstatter: | <i>Prof. Dr. Helge Fischer-Brandies</i> |
| 2. Berichterstatter: | <i>Prof. Dr. Matthias Kern</i> |
| Tag der mündlichen Prüfung: | <i>16.12.2015</i> |
| Zum Druck genehmigt, Kiel, den | <i>27.07.2015</i> |
| | <i>gez.: Prof. Dr. Yahya Açil</i> |
| | (Vorsitzender der Prüfungskommission) |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | IV |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Oberflächenoptimierung von Biomaterialien | 1 |
| 1.2 Hydroxylapatit | 2 |
| 1.3 Oberflächenbeschichtungen aus Hydroxylapatit | 4 |
| 1.4 Osteoblasten in Zellkultur und <i>In-vitro</i> -Mineralisation | 8 |
| 1.5 Ziele dieser Arbeit | 10 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 11 |
| 2.1 Material..... | 11 |
| 2.1.1 Geräte, Chemikalien, Gebrauchswaren | 11 |
| 2.1.2 Stammlösungen für Färbungen..... | 11 |
| 2.1.3 Stammlösungen für Zytotoxizitätsassay (XTT)..... | 12 |
| 2.1.4 Verwendete Zellen..... | 13 |
| 2.2 Methode zur Herstellung von Hydroxylapatit-Beschichtungen..... | 14 |
| 2.2.1 Herstellung von Hydroxylapatit-Sol..... | 14 |
| 2.2.2 Beschichtung durch Tauchzieh-Verfahren | 14 |
| 2.2.3 Beschichtung durch Aufschleuder-Verfahren | 16 |
| 2.3 Die Charakterisierung der Hydroxylapatit-Beschichtungen | 17 |
| 2.3.1 Untersuchungen mittels REM, Raman-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie | 17 |
| 2.3.2 Untersuchungen zur Benetzbarkeit..... | 18 |
| 2.4 Herstellung von Eluat (<i>Extraktion</i>)..... | 18 |
| 2.5 Nachweis von Ionen in Eluaten der Hydroxylapatit-Beschichtungen | 19 |
| 2.5.1 Bestimmung der Phosphat-Ionen-Konzentration mittels Molybdänblau-Methode | 19 |
| 2.5.2 Bestimmung der Calcium-Ionen-Konzentration nach der Calmagit-Methode | 20 |
| 2.6 Zellkulturversuche | 21 |
| 2.6.1 Generelles zum Zellkulturablauf | 21 |
| 2.6.2 Vorversuche zur <i>In-vitro</i> -Mineralisation von Osteoblasten..... | 22 |
| 2.6.2.1 Calcium-Nachweis mittels Alizarin Rot-Färbung | 22 |
| 2.6.2.2 Nachweis von Alkalischer Phosphatase | 23 |
| 2.6.3 Untersuchung der Hydroxylapatit-Eluate mittels Zytotoxizitätstest (XTT-Test) | 23 |
| 2.6.4 Direkttests mit Osteoblasten auf der hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtung..... | 24 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.6.4.1 | Giemsa-Färbung | 25 |
| 2.6.4.2 | Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie | 25 |
| 2.7 | Datenerfassung und statistische Analyse | 26 |
| 3 | ERGEBNISSE | 27 |
| 3.1 | Analyse der Hydroxylapatit-Beschichtungen | 27 |
| 3.1.1 | Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen | 27 |
| 3.1.2 | Ergebnisse der Raman-Analysen | 27 |
| 3.1.3 | Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie | 29 |
| 3.1.4 | Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen | 31 |
| 3.2 | Ergebnisse der Untersuchungen mit Hydroxylapatit-Eluaten..... | 32 |
| 3.2.1 | Nachweis von Phosphat-Ionen in den Eluaten der HAP-Beschichtung..... | 33 |
| 3.2.2 | Nachweis von Calcium-Ionen in den Eluaten der HAP-Beschichtung..... | 34 |
| 3.3 | Zellkulturversuche | 38 |
| 3.3.1 | Voruntersuchungen zur Zellcharakterisierung | 38 |
| 3.3.1.1 | Nachweis von <i>In-vitro</i> -Mineralisation mit Alizarin Rot-Färbung | 40 |
| 3.3.1.2 | Nachweis von <i>Alkalischer Phosphatase</i> | 42 |
| 3.3.2 | Untersuchungen zur Zytoverträglichkeit der Hydroxylapatit-Beschichtungen | 43 |
| 3.3.2.1 | Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels XTT-Assay | 44 |
| 3.3.2.2 | <i>In-vitro</i> -Direkttests der Hydroxylapatit-Beschichtungen | 47 |
| 3.4 | Zusammenfassung der Ergebnisse | 51 |
| 4 | DISKUSSION..... | 52 |
| 4.1 | Die Synthese von Hydroxylapatit mittels Sol-Gel-Methode | 53 |
| 4.2 | Phasenreinheit und Oberflächeneigenschaften der Hydroxylapatit-Beschichtungen | 55 |
| 4.3 | Die Probenbeschichtungen und Auswahl der Substrate..... | 58 |
| 4.4 | Bioverträglichkeit von Hydroxylapatit-Beschichtungen | 60 |
| 4.5 | Schlussfolgerungen | 64 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 65 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 67 |
| 7 | ANHANG | 74 |
| 7.1 | Tabellen..... | 74 |
| 7.2 | Verwendete Geräte | 75 |

| | | |
|-----|--|-----------|
| 7.3 | Gebrauchsmaterial /Laborbedarf..... | 76 |
| 7.4 | Verwendete Chemikalien | 77 |
| 7.5 | Zellkulturmedien und Puffer-Ansätze | 78 |
| 7.6 | Zutaten zur Komplettierung der Zellkulturmedien..... | 78 |
| 7.7 | Komplettierung der Gebrauchsmedien..... | 79 |
| 7.8 | Positivkontrolle für Zytotoxizitätsassay..... | 80 |
| 7.9 | Ethik-Kommissions-Antrag | 81 |
| | DANKSAGUNG | 82 |
| | AKADEMISCHER LEBENS LAUF | 83 |
| | PUBLIKATION | 83 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|---|
| α -MEM | Minimum Essential Medium Eagle, alpha modification |
| β -TCP | β -Tricalciumphosphat |
| λ | Wellenlänge [in nm] |
| μ | Mikro- (10^{-6}) |
| Å | Ångström, (10^{-10} m) |
| A.dest. | Aqua destillatum/ destilliertes Wasser |
| A.bidest. | doppelt destilliertes Wasser |
| ALP | alkalische Phosphatase |
| Asc/ Asc-2P | Ascorbinsäure bzw. L-Ascorbinsäure-2-Phosphat |
| bar | Bar (SI- Einheit, s. Pa) <i>1bar = 100 000 Pa</i> |
| Ca | Calcium-Ionen (Ca^{2+}) |
| CaP | Calciumphosphat |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Cu | Kupfer(II)-Ionen (Cu^{2+}) |
| CuSO ₄ | Kupfersulfat |
| Dex | Dexamethason |
| DMEM | <i>Dulbecco 's Modified Eagle Medium</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenbis(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure |
| EL | Eluat/ Extrakt |
| FA | Fluorapatit |
| FDA | <i>Food and Drug Administration (USA)</i> |
| FBS | Fetales Rinder-/Kälberserum; auch: FCS |
| g | Gramm bzw. Erdbeschleunigung |
| h | Stunden |
| HAp | Hydroxylapatit [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] |
| HCl (aq) | Chlorwasserstoff, bildet in Wasser gelöst Salzsäure |
| ISO | <i>International Standard Organisation</i> |
| K | Kelvin (Thermodynamische Temperatur) |
| KPT | Kritisch-Punkt-Trocknung |

| | |
|------------|--|
| LW | Leerwert |
| M | molar |
| Med/MED | Medium |
| Mg | Magnesium |
| n | Nano- (10^{-9}) |
| NaOH (aq) | Natriumhydroxid in wässriger Lösung, Natronlauge |
| NK | Negativkontrolle |
| OD | optische Dichte |
| OT | Objektträger aus Kalk-Natron-Glas |
| P | Phosphor bzw. Phosphat-Ionen (PO_4) ³⁻ |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung; engl.: phosphate buffered saline |
| pH | potentia Hydrogenii |
| PK | Positivkontrolle |
| <i>Pa</i> | Druck in <i>Pascal</i> |
| PMS | Phenazinmethosulfat |
| REM | Rasterelektronenmikroskop/ -mikroskopie |
| RT | Raumtemperatur (ca. 20 °C) |
| <i>s</i> | Sekunde |
| SD | Standardabweichung; engl.: standard deviation |
| SEM | <i>engl. scanning electron microscope</i> (s. auch REM) |
| T | Temperatur in °C |
| t | Zeit |
| TEP | Triethylphosphat |
| <i>UpM</i> | Umdrehungen pro Minute |
| WAK | Wärmeausdehnungskoeffizient α in [$10^{-6}/\text{K}$] |
| XRD | Röntgendiffraktometrie, engl.: <i>X-ray diffraction</i> |
| XTT | 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)- carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid |

1 EINLEITUNG

1.1 Oberflächenoptimierung von Biomaterialien

Biomaterialien sind körperfremde Materialien, welche in der Medizin und Zahnmedizin auf vielfältige Weise zum Einsatz kommen. Ihre Hauptfunktion liegt darin, fehlendes oder erkranktes Gewebe möglichst dauerhaft strukturell und funktionell zu ersetzen (Thull 1994). Der wohl am häufigsten genannte Begriff im Zusammenhang mit Biomaterialien ist die *Biokompatibilität*. Dieser Begriff wurde 1987 von der *European Society for Biomaterials* auf der Consensus Conference I definiert als *“the ability of a material to perform with an appropriate host response in a specific application”* (Williams 2008). Vereinfacht gesagt ist ein Biomaterial biokompatibel, wenn es lokal und systemisch mit dem Empfänger(-gewebe) harmonisiert und dabei keine inakzeptablen Reaktionen auslöst; es sollte also unter anderem weder zytotoxisch noch allergen wirken (Patel und Gohil 2012). In der Zahnmedizin und ihrer Nachbardisziplin Kieferorthopädie versteht man unter Biomaterialien im engeren Sinne vor allem dentale Implantate, kieferorthopädische Minischrauben oder auch Knochenersatzmaterialien. Dabei müssen diese vielen, zum Teil konträren Anforderungen gerecht werden. Bei dentalen Implantaten sind z.B. neben einer hohen mechanischen Stabilität und einer einfachen Verarbeitbarkeit auch die Sterilisierbarkeit und die Widerstandsfähigkeit des Materials gegenüber Korrosion, Verschleiß und Materialermüdung von Bedeutung (Thull 1994; Epple 2003).

Um eine Kontaktosteogenese zu erreichen, haben sich bei den enossalen Implantaten die Verwendung von Titan und Titanlegierungen durchgesetzt, da diese eine hohe mechanische Stabilität bei gleichzeitig guter Korrosionsresistenz durch spontane Ausbildung einer passiven Oxidationsschicht auf der Metalloberfläche aufweisen (Textor et al. 2001; Thull 1994). Trotz der bekannten Vorteile von Titanimplantaten sind sie praktisch *bioinert*, das heißt, sie induzieren weder positive noch negative Wechselwirkungen im Empfängergewebe.

Die biologische Kompatibilität eines Biomaterials wird wesentlich von seiner Oberfläche bestimmt (Thull 1994). Daher war und ist es Gegenstand intensiver Forschung, die Oberflächen von Implantaten so zu verändern, dass die Einheilungsprozesse im Empfängergewebe noch weiter optimiert werden können (Sammons 2011). Dadurch soll eine stabilere Einheilung von Implantaten erreicht und die klinischen Überlebensraten verbessert werden.

Eine Art der Oberflächenoptimierung sind die sogenannten *Verbundwerkstoffe*, in denen man die positiven Eigenschaften von verschiedenen Werkstoffen verknüpfen kann. Üblicherweise kombiniert man dafür einen bioinerten, aber mechanisch stabilen Volumen-Werkstoff (i.d.R. metallischen Ursprungs), welcher die Hauptmasse des Implantates ausmacht, mit einem *bioaktiven* Oberflächen-Werkstoff (Thull 1994). Auf der Oberfläche von bioaktiven Werkstoffen kommt es in Folge der Einheilung zu einem stabilen, chemischen Verbund zwischen dem Implantat und Knochengewebe. Dieser ruft idealerweise eine *Verbundosteogenese* hervor, welche durch eine Bildung von neuem Knochengewebe auf der Implantat-Oberfläche gekennzeichnet ist (Wintermantel und Ha 2002). Eine vielversprechende Möglichkeit der Oberflächenoptimierung von Implantat-Werkstoffen ist daher nachwievor die Beschichtung mit bioaktiven Calciumphosphaten. Dabei ist insbesondere synthetisch hergestellter *Hydroxylapatit (HAp)* zu nennen, welcher dem mineralischen Bestandteil von biologischen Hartgeweben, wie Knochen, Dentin und Zahnschmelz, ähnelt.

1.2 Hydroxylapatit

Reiner Hydroxylapatit hat die chemische Formel $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ und bildet hexagonal aufgebaute Kristalle, deren Größe zwischen $100 - 200 \times 50 \times 50 \text{ \AA}$ variieren kann (Neuman und Neuman 1953 zitiert nach Osborn 1985). HAp wird mineralogisch der Gruppe der Apatite zugeordnet. Die chemische Formel $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ beschreibt die stöchiometrische Zusammensetzung von monophasischem Hydroxylapatit mit einem Calcium/Phosphat-Verhältnis von $10:6 = 1,67$. Ein HAp-Kristall besteht wiederum aus vielen Elementareinheiten. Abb. 1 zeigt den schematischen Aufbau von drei Elementarzellen, welche zusammen das hexagonale Kristallgitter von Hydroxylapatit bilden. Die vier Eckpunkte der parallelogrammförmigen Grundfläche einer Ele-

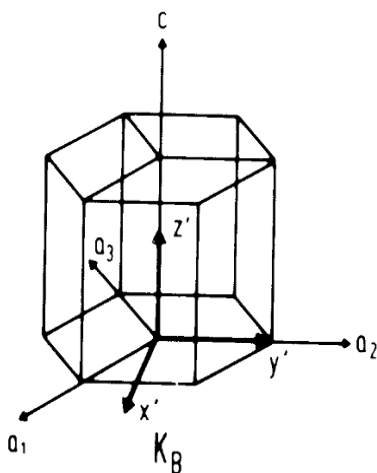


Abb. 1 Schemata des hexagonalen Raumgitters von Hydroxylapatit

Dreidimensionaler Aufbau eines Hydroxylapatit-Kristalls mit drei Elementarzellen mit x', y', z' als Raumachsen und a_1, a_2, a_3, c als Kristallachsen. Aus Scintag (1999).

mentarzelle (a_1 , a_2 - Ebene) sind von Hydroxyd-Ionen (OH^-) besetzt. Diese sind wiederum von je sechs Calcium-Ionen umgeben. Zwei weitere Calcium-Ionen und fünf Gruppen, bestehend aus je zwei PO_4 -Tetraedern, füllen den übrigen Raum einer Elementarzelle (s. auch Abb. 2). Es gibt auch eine monokline Kristallstruktur von Hydroxylapatit, welche aber in der Biomaterialforschung keine Bedeutung hat. HAp wird chemisch den schwerlöslichen *Calciumphosphaten* zugeordnet und ist das am schwersten lösliche dieser Gruppe. Weitere bekannte und für die Biomaterialforschung interessante Calciumphosphate sind β -Tricalciumphosphat (β -TCP), Fluorapatit (FA), Calcium-defizitärer Hydroxylapatit und amorphes Calciumphosphat (Epple 2003; Lacey 1998). Hydroxylapatit ist dem mineralischen Bestandteil von Knochen, Zahnschmelz und Dentin sehr ähnlich. Dieser mineralische Anteil macht mit ca. 65 bzw. 97 Gew.-% die Hauptmasse im Knochen bzw. Zahnschmelz des menschlichen Körpers aus (Daculsi et al. 1997). Allerdings ist dieser „biologische Apatit“ im Vergleich zum reinen HAp stets nicht-stöchiometrisch aufgebaut, da ein Teil der Ionen durch Carbonate und Spuren von Natrium, Magnesium und anderen Ionen ersetzt ist (Dorozhkin und Epple 2002). Hydroxylapatit als Biomaterial kann aus biologischem Ursprung, also aus humanen oder tierischen Quellen gewonnen werden oder auf

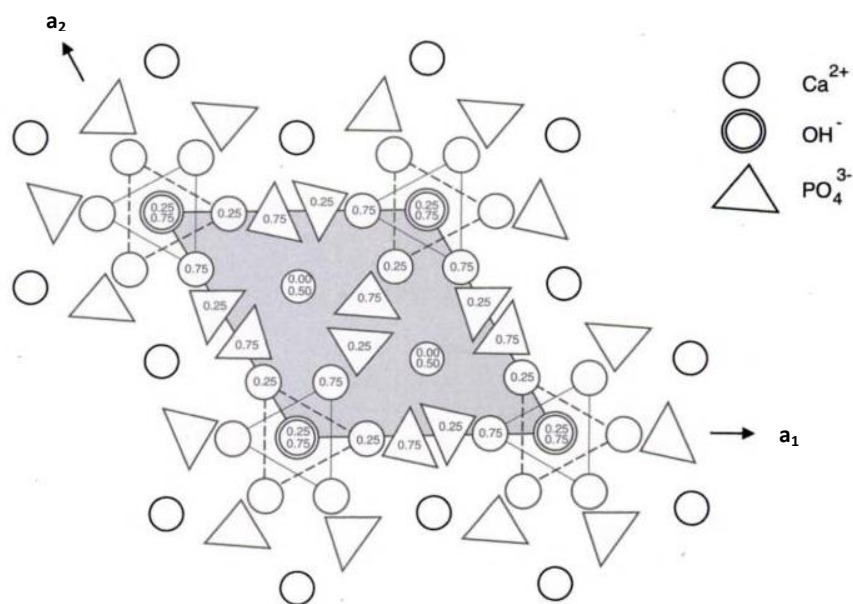


Abb. 2 Hexagonaler Struktur von Hydroxylapatit dargestellt in der a_1, a_2 -Ebene

Die einfachen Kreise entsprechen den Ca^{2+} -Ionen, die doppelten Kreise den OH^- -Ionen und die Dreiecke den PO_4^{3-} -Tetraedern. Die Zahlen in den Symbolen geben die Höhendifferenz der Ionen zur a_1, a_2 -Ebene in Bruchteilen der Ausdehnung der Elementarzelle in c -Richtung ($c=6,89 \text{ \AA}$, weist senkrecht aus der Seitenebene heraus). Die Kantenlänge einer Einheitszelle ($a_1=a_2$) wird in der Literatur mit $9,43 \text{ \AA}$ angegeben. Aus Wintermantel und Ha (2002).

synthetischem Wege hergestellt werden. Dabei ist synthetisch hergestellter Hydroxylapatit auf Grund seiner praktisch unbegrenzten Verfügbarkeit und des ethisch unproblematischen Hintergrunds eindeutig bevorteilt gegenüber Fremdmaterialien biologischer Herkunft, die nicht zuletzt wegen ihres Infektionsrisikos kritisch gesehen werden (Dorozhkin und Epple 2002). Eine Übersicht weiterer Eigenschaften von Hydroxylapatit ist in Tabelle 9 (Anhang, s. S.74) zusammengestellt.

1.3 Oberflächenbeschichtungen aus Hydroxylapatit

Die ersten Versuche, Implantate und Endoprothesen mit Calciumphosphaten zu beschichten, sind in den 1980er Jahren durchgeführt worden. *J. F. Osborn* war einer der Pioniere auf dem Gebiet und entwickelte eine gesinterte Hydroxylapatitkeramik, welche er erfolgreich zunächst in Form von reinen HAp-Blöcken in Femurdiaphysen von Ratten implantierte (Osborn 1985). Später wurde sein weiterentwickeltes *Osprovit-HAp* mittels *Plasmaspritzens* als Beschichtung auf orthopädische Hüftprothesen aus einer neuartigen Titanlegierung (Ti_6Al_4V) aufgebracht. Dabei konnte man an einigen wenigen postmortal explantierten Implantaten einen histologischen Knochenverbund nachweisen (Furlong und Osborn 1991).

Weitere experimentelle Entwicklungsverfahren der vielversprechenden Calciumphosphat- bzw. HAp-Beschichtungen folgten in den Jahrzehnten danach. Es ist bekannt, dass diese Beschichtungen in der periimplantären Region zu einer Übersättigung mit gelösten Calcium- und Phosphationen führen. Diese bewirkt wiederum eine Abscheidung von biologischem Apatit auf den Implantatoberflächen und damit eine nachgewiesenermaßen schnellere Adhäsion von Knochengewebe zu Calciumphosphat-Beschichtungen im Vergleich zu unbeschichteten Titan-Implantaten (Junker et al. 2009). Es wurden auch Kriterien für standardisierte Calciumphosphat-Beschichtungen auf medizinischen Substraten festgelegt, u.a. von der amerikanischen FDA. Eine kommerziell produzierte Beschichtung musste demnach eine Reinheit von 95% und einen minimalen Kristallgehalt von 62% aufweisen (Juhasz und Best 2011).

Das thermische Plasmaspritzen (engl. *thermal spray deposition* oder *plasma spraying*) ist die gängigste Technik zur industriellen Herstellung von Calciumphosphat-Beschichtungen. Dabei wird HAp-Pulver mittels einer Plasmaflamme auf Temperaturen von über 1000 °C erhitzt und mit hohem Druck auf eine Substratoberfläche beschleunigt. Wenn die HAp-Partikel auf die Oberfläche treffen, kühlen sie ab und werden zu einer festen, kristallinen Schicht. Man unterscheidet verschiedene Techniken des thermischen Spritzens je nach vorherrschenden Druckver-

hältnissen: normaler Luftdruck (APS), Unterdruck (LPPS) und Vakuum (VPS). Die beiden Letzteren ermöglichen zwar eine bessere Qualität der Beschichtungen, sind allerdings auch mit höheren Produktionskosten verbunden (Juhász und Best 2011). HAp zersetzt sich bei Temperaturen oberhalb von etwa 1350 °C in leichter lösliche Calciumphosphate, wie amorphes Calciumphosphat und Calciumoxid (Willmann 1992). Diese Phaseninstabilität von HAp ist der Grund für die geringere Reinheit von mittels Plasmaspray-Verfahren hergestellten Beschichtungen.

In einem systematischen Review über die Effekte von verschiedenen Oberflächenbeschichtungen auf die Osseointegration von Implantaten beschreiben *Junker et al.*, dass der überwiegend schlechte Ruf von Calciumphosphat-Beschichtungen in der Zahnmedizin primär auf die partiellen Delaminierungen der Beschichtungen im klinischen Einsatz zurückzuführen sind. Das klinische Versagen der CaP-Beschichtungen wurde erklärt mit der Diskrepanz der Löslichkeiten von kristallinen und amorphen Phasen (Junker 2009). Des Weiteren waren Plasma-Spray-Beschichtungen deutlich dicker (durchschnittlich 40-60 µm; Lacefield 1998), wodurch es ebenfalls zu unerwünschten Abplatzungen kommen kann (Breme et al. 1995). Ebenso sind HAp-Beschichtungen im Vergleich zu unbeschichteten Titanimplantaten im höheren Maße anfällig für bakterielle Besiedlung, wenn diese Oberflächen im Rahmen klinischen Attachmentverlusts mit dem Milieu der Mundhöhle in Kontakt kommen (Ong und Chan 2000). Die negativen Publikationen über Plasmaspray-beschichtete Implantate haben zu der Entwicklung von dünneren CaP-Beschichtungen geführt (Junker 2009). Ebenso bestand der Bedarf, Alternativen zu dem apparativ aufwendigen und kostenintensiven thermischen Spritzen zu entwickeln. Solche Alternativen zur Beschichtung von Oberflächen, die industriell oder experimentell eingesetzt werden, sind beispielsweise Kathodenzerstäubung („Sputtern“), biomimetische Beschichtungsmethoden, elektrochemische, elektrolytische und elektrophoretische Beschichtungen oder auch Sol-Gel-Verfahren kombiniert mit Beschichtungsmethoden wie Rotations- und Tauchziehverfahren (Lacefield 1998; Junker 2009; Juhász und Best 2011).

Eine besonders kostengünstige Alternative bietet das Sol-Gel-Verfahren, welches in dieser Arbeit Anwendung fand. Dieses Verfahren ist eine von Industrie und Forschung genutzte Methode zur Herstellung von unterschiedlichsten Produkten. Sie wird u.a. häufig für die Herstellung von funktionellen Oberflächen-Beschichtungen wie Schutzschichten, optischen Filtern und Antihafbeschichtungen genutzt. Die synthetische Herstellung von anorganischen Calciumphosphat-Beschichtungen erfolgt dabei nasschemisch über in Alkohol oder Wasser gelöste Prekursoren. Diese Ausgangsstoffe sind in der Regel metallorganischer Herkunft, wie

Alkoxyde, Metallalkoholate oder Salze organischer Säuren, welche in entsprechenden Lösungsmitteln hydrolysiert und dann gemischt werden. Dabei entsteht unter Wasserabspaltung und Polykondensation der Ausgangsstoffe ein kolloidales Gemisch, das sogenannte Sol. Die Alterung des Sols führt dann zum weiteren Wachstum der Partikel. Dabei entsteht letztlich durch maximale Vernetzung der Solpartikel das sogenannte Gel, ein dreidimensional vernetztes Gerüst mit zunehmender Viskosität. Durch restloses Verdampfen der Lösungsmittel und anschließendes Sintern können keramische Pulver hergestellt werden. Alternativ kann man das Sol durch einfache Beschichtungsverfahren, wie Tauchzieh- und Rotationsverfahren, auf temperaturstabile Substrate wie Metalle, Glas oder Keramik aufbringen und anschließend die Lösungsmittel verdampfen. Die dünnen Gelschichten können dann bei relativ niedrigen Temperaturen erhitzt werden. Dabei entstehen die gewünschten keramischen Verbindungen.

Als eine der ältesten Studien über die Herstellung synthetischer Hydroxylapatit-Beschichtungen via Sol-Gel-Methode wird oft die von *Masuda et al.* 1990 veröffentlichte Arbeit (Masuda et al. 1990, zitiert nach Cooper, Masuda et al. 1998) genannt. Das Verfahren wurde in den folgenden Jahren von verschiedenen Forschungsgruppen experimentell untersucht und weiterentwickelt (Breme et al. 1995; Gross et al. 1998; Weng et al. 1998a,b; Liu et al. 2001a,b und 2002a,b,c,d; Kim HW et al. 2004a,b,c und 2005; Balamurugan et al. 2006; Wang Y. et al. 2008; Wang D. et al. 2008). Die Arbeiten unterscheiden sich dabei u.a. in der Auswahl der Prekursoren und Lösungsmittel, die einen Einfluss ausüben auf die spätere chemische Aktivität und die benötigten Temperaturen zur Herstellung der kristallinen Struktur von HAp (Nayak 2010).

In Abb.3 ist ein Fließschema dargestellt über den generellen Ablauf der Sol-Gel-Synthese und die Herstellung von Hydroxylapatit-Beschichtungen in dieser Arbeit.

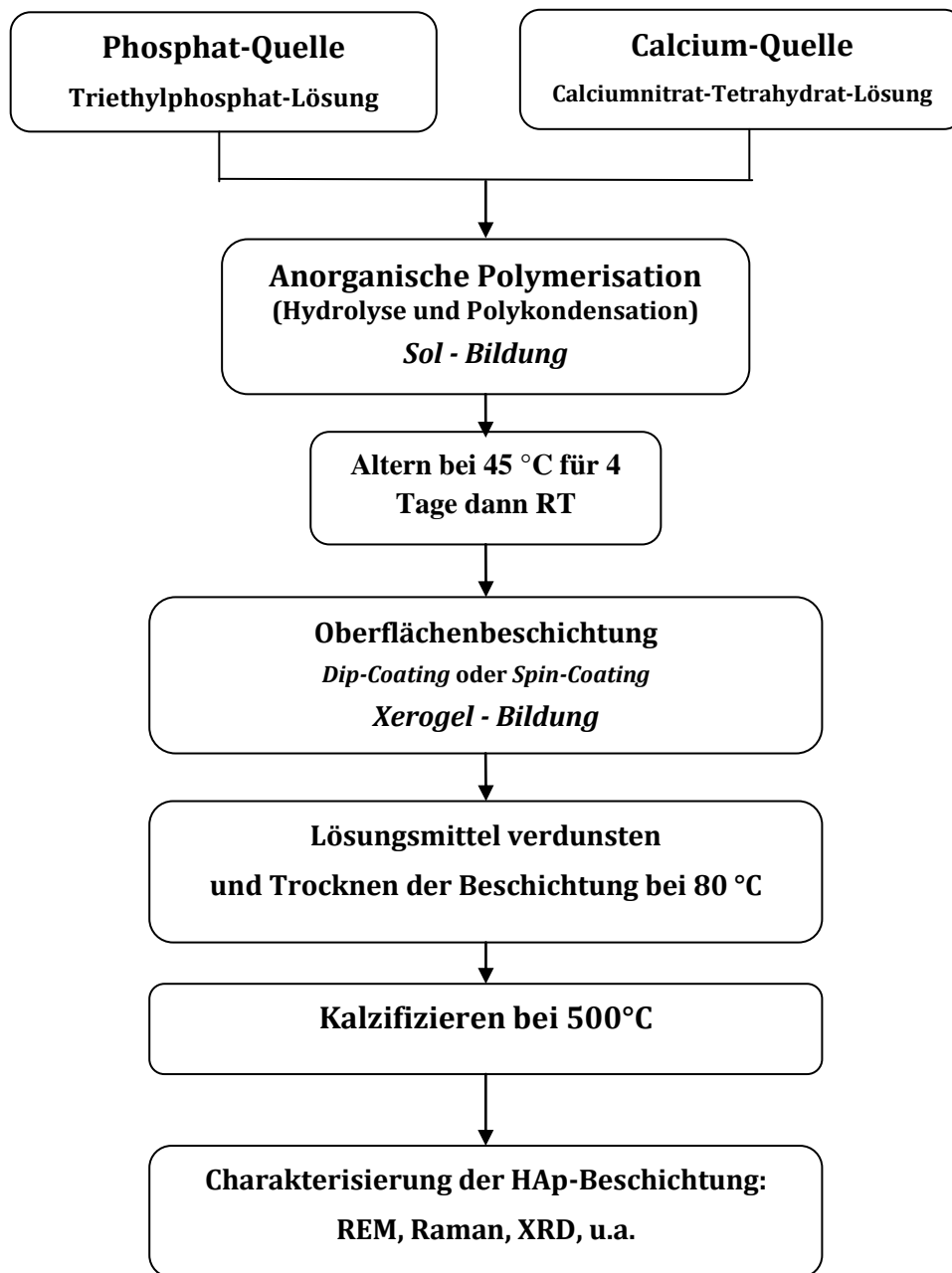


Abb.3 Fließschema über die Sol-Gel-Methode zur Herstellung von synthetischen Hydroxylapatit-Beschichtungen

Der hier dargestellte Ablauf entspricht dem der vorliegenden Arbeit. RT = Raumtemperatur, REM = Rasterelektronenmikroskopie, XRD = Röntgendiffraktometrie. Fließschema modifiziert nach Liu et al. (2002a).

1.4 Osteoblasten in Zellkultur und *In-vitro*-Mineralisation

Um die biologische Verträglichkeit von neuen Biomaterialien einschätzen zu können, werden sie vor ihrem klinischen Einsatz zunächst an Zellkulturen *in vitro* getestet. Da bei dentalen Implantaten primär der Verbund mit Knochengewebe von Interesse ist, werden diese üblicherweise an Osteoblasten-Kulturen untersucht (Cooper et al. 1998). Osteoblasten sind spezialisierte Fibroblasten, deren Hauptfunktion in der Produktion und Mineralisation von extrazellulärer Knochenmatrix besteht. Die Bildung von Osteoid und die Steuerung der Mineralisation durch Osteoblasten in Zellkultur war und ist Gegenstand intensiver Forschung und die Grundlage für das Verständnis der komplexen Vorgänge bei der *In-vivo*-Knochenbildung. Ebenso ist die *In-vitro*-Mineralisation von Interesse bei Untersuchungen von Aspekten der Osseointegration verschiedener Implantat-Oberflächen (Ahmad et al. 1999). Dabei unterscheiden sich einschlägige Studien zunächst in der Art der verwendeten Osteoblasten: Man findet Untersuchungen mit humanen Osteoblasten und mit von diversen Tieren abstammenden Zellen. Darüberhinaus unterscheidet man Versuche mit jungen Vorläuferzellen (mesenchymale Stammzellen, Progenitorzellen) von differenzierten Osteoblasten sowie die Verwendung *primärer Zellen* (direkt aus Spendermaterial gewonnene Zellen mit einer begrenzter Zellzykluszahl) von *Zelllinien* (immortalisierte oder transformierte Zellen mit praktisch unbegrenzter Anzahl von möglichen Zellzyklen ähnlich der von Tumorzellen) (Cooper et al. 1998).

Die Bedingungen für Osteoblasten *in vitro* unterscheiden sich naturgemäß von denen im menschlichen Körper. Man versucht durch geeignete Wachstumsbedingungen den osteoblastischen Zellkulturen ein optimales Umfeld zu schaffen, um sie zur Produktion und Mineralisation von Extrazellulärmatrix - das wesentliche Merkmal dieses Zelltyps - zu stimulieren. Ein gebräuchliches Nährmedium für Osteoblasten in Zellkultur ist *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (kurz *DMEM*), eine wässrige Lösung aus diversen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und D-Glucose. Diese Grundlösung wird i.d.R. vor Gebrauch in Zellkultur mit fötalem Kälberserum, Antibiotika und -mykotika komplettiert (Siggelkow et al. 1999). Um humane Osteoblasten zu ausgeprägter *In-vitro*-Mineralisation zu stimulieren, reicht „einfaches“ Zellmedium nicht aus; es bedarf hierfür weiterer Zusätze (Beresford et al. 1993). Dabei findet man in der Literatur zum Teil stark variierende Angaben über Zugaben wie Ascorbinsäure (Ahmad et al. 1999; Siggelkow et al. 1999), L-Ascorbinsäure-2-phosphat (Takamizawa et al. 2004), $1\alpha,25(\text{OH})_2$ Vitamin D₃ (auch Calcitriol; Kveiborg et al. 2001;

Yamaguchi und Weitzmann 2012), Vitamin K (Kasperk et al. 1995), Dexamethason (Souter et al. 2011), β -Glycerolphosphat (Chung et al. 1992; Ahmad et al. 1999; Sell et al. 1998) oder auch unterschiedlich hohe Konzentrationen von fötalem Kälberserum (Pautke et al. 2004; Sell et al. 1998).

Ungeachtet der Unterschiede bezüglich der Zusammensetzung von Anzuchtmedien gibt es allgemein hin akzeptierte Merkmale, die eine mineralisierende Zellkultur ausmachen. So sind nur osteogen differenzierte Zellen in einem fortgeschrittenen Stadium oder ausdifferenzierte Osteoblasten in der Lage, Knochenmatrix zu produzieren (Ilmer 2009). Als charakteristische Marker für den differenzierten Osteoblasten und Knochenmineralisation werden bei *In-vitro*-Versuchen häufig Kollagen Typ I sowie charakteristische Oberflächenproteine wie Osteocalcin oder alkalische Phosphatase (ALP) nachgewiesen (Kasperk et al. 1995). Allgemeiner Konsens zahlreicher Studien besteht ebenfalls über den zeitlichen Ablauf der Mineralisation in Zellkulturen. Owen et al. zeigten 1990 in ihren Untersuchungen zur *In-vitro*-Mineralisation an aus Ratten gewonnenen Osteoblasten, dass bestimmte Knochenmarker zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Zellkultur in verschieden hohen Konzentrationen auftraten (Owen et al. 1990). Aus ihren Beobachtungen entwickelten sie ein dreiphasiges Differenzierungsmodell (oft zitiert als *Owen-Modell*) bestehend aus den Phasen *Proliferation*, *Matrixmaturation* und *Mineralisation*; dieses Modell lässt sich allerdings nur teilweise auf humane Osteoblasten-Kulturen übertragen (Siggelkow et al. 1999):

- (1) Proliferation: In dieser Phase vermehren sich die Osteoblasten stark bis zur Konfluenz und produzieren v.a. Matrixproteine wie Prokollagen I.
- (2) Matrixmaturation: Es kommt zur Reifung der jungen Knochenmatrix. Der Nachweis von skelettaler alkalischer Phosphatase erreicht ein Maximum.
- (3) Mineralisation: In dieser Phase mineralisiert die Knochenmatrix. Man findet eine hohe Genexpression von Osteocalcin.

Ein ebenfalls oft erwähntes Phänomen in den stimulierten Osteoblasten-Zellkulturen ist das Auftreten von sogenannten „*nodules*“ (engl. für Zellhaufen); dies sind variabel geformte Verdichtungen im Zellrasen von unterschiedlicher Größe (Beresford et al. 1993; Sell et al. 1998). In diesen Zellhaufen kommt es im Verlaufe der *In-vitro*-Mineralisation zur Entstehung von amorphen und später kristallinen Hydroxylapatit in der Extrazellulärmatrix (Ghita et al. 2014).

Die Zahl an Forschungsarbeiten in diesem Bereich bezeugt die anhaltende Aktualität dieses Themas und deutet darauf hin, wie anspruchsvoll die Entwicklung zuverlässiger

Versuchsanordnungen ist, welche verschiedene Osteoblasten-Kulturen zur Mineralisation von Extrazellulärmatrix stimulieren.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Studien über Oberflächenbeschichtungen von Biomaterialien, insbesondere von endossalen Implantaten, mit Hydroxylapatit gehen in ihren Anfängen in die 1980 Jahre zurück. In den zahlreich publizierten Arbeiten wurden unterschiedliche Herstellungsprozesse und Beschichtungsverfahren beschrieben. Die dabei hergestellten Oberflächenbeschichtungen unterscheiden sich hinsichtlich Kriterien wie Oberflächenstruktur, chemische Zusammensetzung, Schichtdicke, Kristallisationsgrad, Löslichkeit, Porosität und Fremdionen-Gehalt. Diese Kriterien haben entscheidenden Einfluss auf die Verwendbarkeit der HAp-Beschichtungen in experimentellen und klinischen Studien; an ihrer weiteren Optimierung besteht daher nach wie vor Bedarf.

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung einer selbst hergestellten Oberflächenbeschichtung aus synthetischem Hydroxylapatit nach der Sol-Gel-Methode mit dem Hauptaugenmerk auf deren *In-vitro*-Zytoverträglichkeit. Es wurden zwei Testmaterialien (Aluminium und Kalk-Natron-Glas) als Substrate verwendet und mit dem synthetisch hergestellten HAp-Sol mittels Spin- bzw. Dip-Coating-Verfahren beschichtet. Die qualitative und quantitative Charakterisierung der angefertigten Hydroxylapatit-Beschichtungen erfolgte anschließend mittels Rasterelektronmikroskopie (REM), Röntgenbeugung (XRD) und Raman-Spektroskopie. Ein Extraktions-Test sollte Aufschluss geben über die Löslichkeit von Ionen aus der HAp-Beschichtung. Die Erfassung der *In-vitro*-Zytoverträglichkeit dieser HAp-Beschichtungen sollte mittels indirekten Zytotoxizitätstests (XTT) und im Direktkontakt mit primären und immortalisierten Osteoblasten-Zellkulturen untersucht werden.

In einer charakterisierenden Vorstudie sollte außerdem eine primäre Osteoblasten-Kultur vorab in Hinblick auf ihre Morphologie und dem *In-vitro*-Mineralisationsverhalten in Anwesenheit verschiedenener Zellkulturmedien mittels REM, Alizarin-Rot-Färbung und dem Nachweis von alkalischer Phosphatase untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Chemikalien, Gebrauchswaren

Eine detaillierte Auflistung sämtlicher verwendeter Geräte, Chemikalien und Gebrauchswaren findet sich im Anhang (Abschnitt 7, Seiten 74 ff.).

2.1.2 Stammlösungen für Färbungen

Für die in dieser Arbeit im Rahmen der Zellkulturversuche verwendeten Färbungen wurden Fixier- und Färbelösungen angesetzt, deren Herstellung nachfolgend aufgelistet ist. Der genaue Ablauf der entsprechenden Färbungen wird im Abschnitt Methoden beschrieben.

Vitalfärbung für Zellzählung

| | | |
|----------------------------|--------------------|--------|
| <i>(0,4 %)-Färbelösung</i> | Trypanblau | 0,04 g |
| | NaCl-Lösung (0,9%) | 10 ml |

Der Ansatz wurde gelöst und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

Giensa-Färbung

| | | |
|---------------------|---------------------|-------|
| <i>Fixierlösung</i> | Glutaraldehyd (25%) | 5 ml |
| | PBS | 45 ml |

| | | |
|--------------------|-----------------------------|-------|
| <i>Färbelösung</i> | A. dest. | 500µl |
| | Giensa Stain Solution (PAA) | 500µl |

Alizarin Rot-Färbung

| | |
|---------------------|----------------------------|
| <i>Fixierlösung</i> | eisgekühlter Ethanol (70%) |
|---------------------|----------------------------|

| | | |
|--------------------------|----------------|----------|
| <i>Färbelösung 40 mM</i> | Alizarin Red-S | 0,685 g |
| | A. dest. | ad 50 ml |

Alizarin Red-S-Pulver wurde in destilliertem Wasser unter Rühren erhitzt und dabei gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1M HCl (aq) auf 4,1 eingestellt. Der abgekühlte Ansatz wurde filtriert und

MATERIAL UND METHODEN

lichtgeschützt bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die Haltbarkeit betrug etwa drei bis vier Wochen.

Alkalische-Phosphatase-Färbung

| | | |
|-----------------------|---|---------|
| <i>Fixierlösung</i> | Citratlösung | 1,25 ml |
| | Aceton | 3,25 ml |
| | Formalin (37%) | 400 µl |
| <i>Substratlösung</i> | Natriumnitrit-Lösung | 40 µl |
| | FRV(Fast-Red-Violet)-Alkali-Lösung | 40 µl |
| | mischen und nach zwei Minuten Inkubationszeit zugeben in: | |
| | A. dest. | 1,8 ml |
| | Naphtol AS-BI-Alkalilösung | 40 µl |

Die Citrat-, Natriumnitrit- und Alkali-Lösungen waren Bestandteil des *Leukocyte Alkaline Phosphatase-Kit* (86R-1Kt) der Fa. Sigma Aldrich® (D-Steinheim).

2.1.3 Stammlösungen für Zytotoxizitätsassay (XTT)

XTT-Stammlösung 1,4 mM

| | |
|-----|----------|
| XTT | 0,0188 g |
| PBS | 20 ml |

Das XTT-Pulver wurde durch Erwärmen im Wasserbad in PBS gelöst und portioniert bei -20° C gelagert.

Phenazinmethosulfat (PMS) – Stammlösung 12 mM

| | |
|-----|-----------|
| PMS | 0,03675 g |
| PBS | 10 ml |

Das PMS-Pulver wurde in PBS gelöst und portioniert bei -20° C gelagert. Für die 1,2 mM-Gebrauchslösung wurde die PMS-Stammlösung 1:10 mit PBS verdünnt und sofort verbraucht.

2.1.4 Verwendete Zellen

Als Osteoblasten für die *In-vitro*-Versuche wurden eine etablierte Osteosarkom-Zelllinie (SAOS-2) und kommerziell erworbene primäre Osteoblasten (hOb-C) der Fa. Promocell (D-Heidelberg) verwendet. Des Weiteren kamen primäre Osteoblasten und Fibroblasten zur Anwendung, welche im eigenen Labor etabliert wurden. Die Gewinnung dieser Zellen erfolgte nach einem von Es-Souni et al. (2001) beschriebenen Verfahren aus Gewebeexplantaten von gesunden, 25-jährigen Spendern. Eine Übersicht aller Zellkulturen, die in dieser Studie verwendet wurden, kann Tabelle 1 entnommen werden. Genaue Auflistungen der verwendeten Zellkulturmedien inklusive der Komplettierungszusätze finden sich im Anhang (Abschnitt 7.6 und 7.7.). Generelles zum Zellkulturablauf ist unter Abschnitt 2.6.1 beschrieben.

Tabelle 1 Auflistung der in dieser Arbeit verwendete Zelllinie und Primärzellkulturen

| | Name | Zelltyp | Lieferant/ Bestellnr./ Lot Nr. | Donor (Alter, Geschlecht) |
|------------------------------|---------------|--|--|---------------------------------|
| <i>Zelllinie:</i> | SAOS-2 | Humanes, primäres Osteosarkom | DSMZ, D-Braunschweig/ ACC 243 /Lot. 10 | 11 Jahre, weiblich |
| <i>Primär- Kulturen:</i> | hOb-C | Humane Osteoblasten (Femurkopf) | Promocell, D-Heidelberg/ C-12720/ 0102201.1 und 0091001 | 62 und 56 Jahre, weiblich |
| | O-139 | Humane Osteoblasten (Alveolarknochen) | im eigenen Labor etabliert, 2013 | 25 Jahre, männlich |
| | F-128 | Humane Gingiva- Fibroblasten | im eigenen Labor etabliert, 2011 | 25 Jahre, männlich |
| | F-133 | Humane Gingiva- Fibroblasten | im eigenen Labor etabliert, 2012 | 25 Jahre, weiblich |

2.2 Methode zur Herstellung von Hydroxylapatit-Beschichtungen

2.2.1 Herstellung von Hydroxylapatit-Sol

Die Herstellung von synthetischem Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ erfolgte nach der Sol-Gel-Methode. Als Calcium- und Phosphatquellen dienten *Calciumnitrat-Tetrahydrat* $[\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$ und *Triethylphosphat* (TEP) im Verhältnis 1,67 ($\text{Ca}/\text{PO}_4 = 10:6$) als Prekursoren des Sols. Calciumnitrat-Tetrahydrat wurde in Ethanol (absolut) unter Rühren vollständig gelöst und anschließend tropfenweise der vorbereiteten TEP-Lösung zugegeben. Das Sol wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur weitergerührt, bevor es für drei bis vier Tage bei 45 °C altern konnte. Die weitere Lagerung bis zur Probenbeschichtung erfolgte luftdicht verschlossen bei Raumtemperatur. Der Prozessablauf ist schematisch in Abb.3 dargestellt.

2.2.2 Beschichtung durch Tauchzieh-Verfahren

Die Probenbeschichtung erfolgte mittels Tauchziehverfahren, auch *Dip-Coating* genannt. Bei diesem Beschichtungsverfahren wird das zu beschichtende Substrat in das Sol getaucht und nach einer kurzen Verweilzeit langsam wieder herausgezogen, wobei eine dünne Sol-Schicht auf dem Substrat verbleibt. Dabei verdampft bereits ein Teil des Lösungsmittels und es kommt durch die weitere Annäherung der kolloidalen Sol-Partikel zu Bildung eines dreidimensionalen Netzwerkes, des Xerogels. Eine schematische Darstellung des Tauchziehverfahrens zeigt Abb. 4.

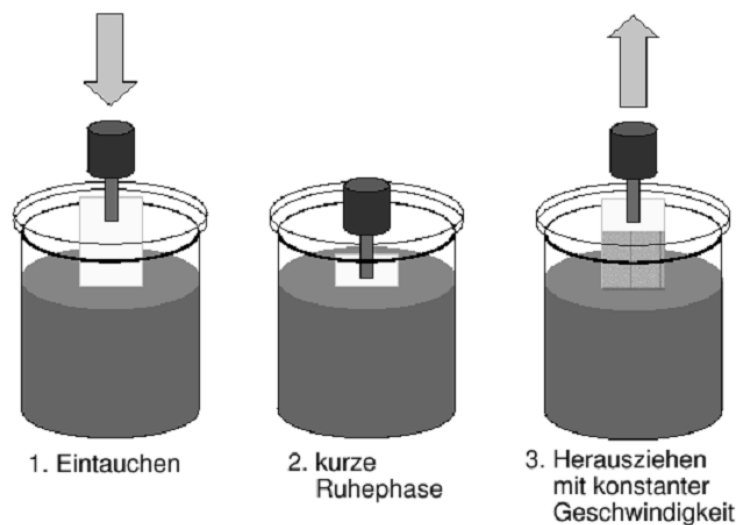


Abb. 4 Prinzip der Tauchzieh-Beschichtung (Dip-Coating)
(Worsch 2010).

Das für diese Studie verwendete Tauchziehgerät mit angeschlossener Steuerungssoftware war eine Eigenproduktion des Instituts für Werkstoff- und Oberflächentechnologie der Fachhochschule Kiel mit Bauteilen von Bosch Rexroth AG (D-Lohr). Abb. 5 zeigt den Vorgang der Beschichtung mittels Tauchziehverfahren. Es wurden Glasobjektträger der Fa. Walter CMP (Nachfolger: Fa. Menzel, D-Kiel) als Substrate beim Tauchziehverfahren verwendet. Die Objektträger wiesen eine Kantenlänge von 26 mm x 76 mm bei einer Dicke von 1 mm auf. Zur Entfernung von Verschmutzungen wurden diese zunächst mechanisch vorgereinigt (Schwamm, Spülmittel, Leitungswasser) und anschließend mit reichlich destilliertem Wasser klargespült. Danach wurden die Objektträger in 99% -igem Ethanol für zehn Minuten im Ultraschallbad belassen, bevor die Proben mittels Heißluft getrocknet wurden. Nach Erwärmung auf einer Heizplatte (ca. 375 °C) für mind. 20 bis 30 Minuten konnte die Proben beschichtet werden. Dafür wurden diese in der Halterung des Querhauptes des Tauchziehgerätes lotrecht positioniert, bevor der computergestützte Tauchvorgang gestartet wurde. Die Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 200 mm/min in die untere Position bewegt wobei die finale Eintauchtiefe in die mit dem HAp-Sol gefüllte Glasküvette mindestens 56 mm betrug. Nach einer Verweildauer von zwei Minuten in der unteren Position wurde die Probe mit einer Aufwärtsgeschwindigkeit von 200 mm/min, 20 mm/min oder 10 mm/min aus dem Sol gezogen, aus der Halterung entnommen und bei 80 °C im Ofen für mindestens 30 Minuten vorgetrocknet.

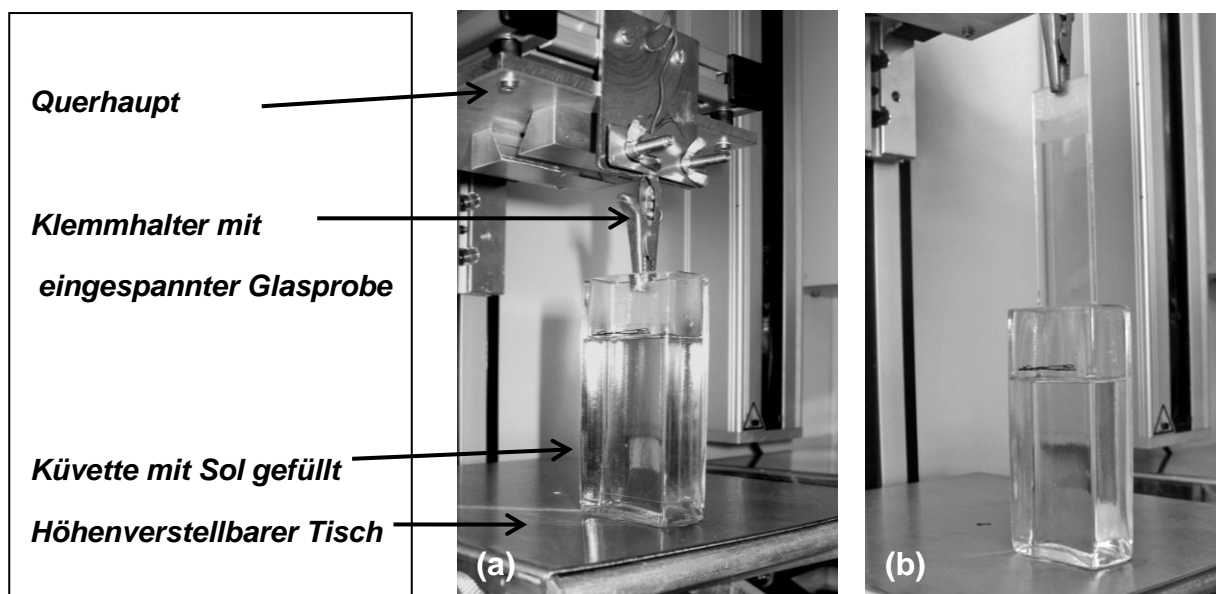


Abb. 5 Küvette mit Hydroxylapatit-Sol und eingespannter Glas-Probe

In unterer Tauchposition (a) und unmittelbar nach dem Tauchziehvorgang (b).

Anschließend wurden die Proben auf einem hitzestabilen Halter gesammelt und bei 500 °C für mind. 6 Stunden thermobehandelt. Einen Überblick der unterschiedlichen Dip-Coating-Chargen zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2 Übersicht der durch Tauchziehverfahren hergestellten HAp-Beschichtungen

| Chargen-Nr. | Tauchgeschwindigkeit in das HAp-Sol [in mm/min] | Ziehgeschwindigkeit aus dem HAp-Sol [in mm/min] |
|-------------|---|---|
| 1 | 200 | 200 |
| 2 | 200 | 20 |
| 3 | 200 | 10 |

2.2.3 Beschichtung durch Aufschleuder-Verfahren

Eine weitere Beschichtungsmethode, die in dieser Arbeit verwendete wurde, war das Aufschleuder-Verfahren, auch Rotationsbeschichtung oder *Spin-Coating* genannt. Bei dieser Methode fixiert man zunächst die zu beschichtende Probe auf einem Drehteller und tropft das Sol dann mittig auf die rotierende Oberfläche. Dabei wird in einem ersten Schritt, dem sogenannten „*Spin-Up*“, das Sol zentrifugal auf der gesamten Probenoberfläche verteilt. Im zweiten Schritt, dem „*Thinning*“, wird durch hohe Drehzahlen der Sol-Film weiter ausgedünnt und überschüssiges Sol vom Rand der Probe fortgeschleudert. Es bildet sich so ein dünner und gleichmäßiger Beschichtungsfilm. Eine schematische Darstellung des Spin-Coating-Verfahrens zeigt Abb. 6. Für die Herstellung von Beschichtungen durch Aufschleudern, wurde ein

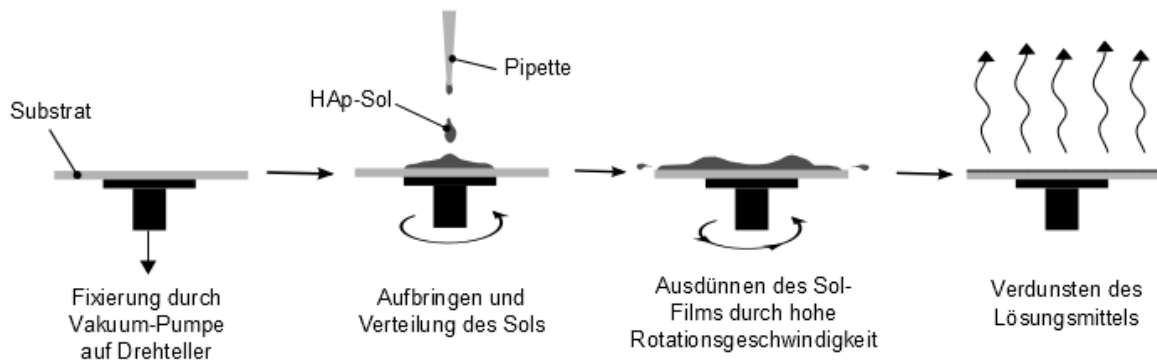


Abb. 6 Prinzip der Rotationsbeschichtung (*Spin-Coating*)

Spincoater der Fa. APT GmbH (D-Bienenbüttel) benutzt. Als Substrate für die Rotationsbeschichtung wurden Proben aus einseitig hochglanzgewalzten Aluminiumblech mit einem Reinheitsgehalt von 99,5 % der Fa. Gemmel Metalle (D-Döbeln; Al 99,5; EN AW-1050 a; hart; Stärke: 0,5 mm) verwendet. Das Blech wurde vor der Beschichtung in quadratische Proben mit einer Kantenlänge von 14 mm geschnitten (rechnerische Oberfläche = 1,96 cm²). Vor der Beschichtung erfolgten eine mechanische Reinigung der Aluminiumsubstrate mit Wattestäbchen und Ethanol, gefolgt von einer Ultraschallbehandlung in einem mit Ethanol gefüllten Becherglas für mindestens zehn Minuten. Anschließend wurden die Substrate mit Heißluft getrocknet und für mindestens fünf Minuten auf einer Heizplatte (Temperatur ca. 365 ± 10 °C) belassen. Die Proben konnten nun einzeln beschichtet werden. Dafür wurde je ein Aluminiumplättchen auf dem Drehteller der Zentrifuge platziert und per Vakuumpumpe von unten fixiert. Die Rotation des Probentellers wurde per voreingestelltem Programm gestartet. Es wurden jeweils 40 µl des HAp-Sols per Pipette auf die mit 800 UpM rotierende Probe gegeben. Nach Ablauf von acht Sekunden erfolgte das *Thinning* (s.o.) bei Drehgeschwindigkeiten von 6000 UpM für 20 Sekunden. Nach Beendigung des Beschichtungsvorgangs wurde die Probe zur Verdunstung des Lösungsmittels für mind. 30 Minuten in einen Thermoschrank bei etwa 80 °C gegeben. Eine weitere Thermobehandlung erfolgte analog zum *Dip-Coating* im Ofen bei 500 °C für ca. acht Stunden.

2.3 Die Charakterisierung der Hydroxylapatit-Beschichtungen

2.3.1 Untersuchungen mittels REM, Raman-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie

Zufällig ausgewählte Hydroxylapatit-Beschichtungen wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) bezüglich ihrer Oberflächenmorphologie untersucht. Für die Charakterisierung der Phasenreinheit und Kristallstruktur der hergestellten HAp-Beschichtung kamen Raman-Spektroskopie und Röntgendiffraktometrie (engl. XRD) zur Anwendung. Die Untersuchungen wurden an einer zufällig ausgewählten, mittels *Spin-Coating* beschichteten Aluminiumprobe durchgeführt.

Die Analysen mit dem Raman-Spektroskop (Senterra, Fa. Bruker-Optik, D-Ettlingen) erfolgten bei Raumtemperatur mithilfe eines senkrecht zur Probe ausgerichteten Laserlichts der Wellenlänge 532 nm mit einer Energie von 2 mW und einer Blende der Größe 25 x 10³ µm². Es

wurden jeweils zehn Zyklen á 10-15 Sekunden gemessen. Die erfasste Weite des Spektrums betrug ca. 1500 bis 100 cm^{-1} .

Die Kristallstrukturanalyse der HAp-Beschichtung mittels Röntgenbeugung erfolgte mit einem Röntgendiffraktometer (Modell: X'PERT Pro MPD; Fa. PANalytical; NL-Almelo). Dabei wurde die Probe mit einem monochromatischen Röntgenstrahl aus einer Kupferquelle ($K\text{-}\alpha = 1,5418\text{ \AA}$) in einem Einstrahlwinkel von $10 - 60^\circ 2\theta$ bestrahlt. Anschließend wurde das erhaltene Spektrum mittels softwaregestützter Mustererkennung („*Patternmatching*“) analysiert.

2.3.2 Untersuchungen zur Benetzbarkeit

Für die Untersuchung zum Benetzungsverhalten der Hydroxylapatit-Beschichtungen wurde ein videogestütztes Kontaktwinkelmessgerät der Fa. Dataphysics (D-Filderstadt) verwendet. Es kam die Testmethode nach dem Prinzip des liegenden Tropfens (engl. *sessile drop*) zur Anwendung (siehe Abb. 7). Hierbei wurde die zu untersuchende Oberfläche waagrecht an einen von einer Kanüle hängenden Wassertropfen (Volumen: $5,0\text{ }\mu\text{l}$) zugeführt, bis dieser sich löste und auf der Test-Oberfläche zu liegen kam. Es erfolgte jeweils eine PC-gestützte Messung der seitlichen Winkel zum Zeitpunkt 60 Sekunden nach der Benetzung. Es wurden auf zwei zufällig ausgewählten HAp-beschichteten Objektträgern mehrere Messungen an verschiedenen Stellen durchgeführt. Jede Stichprobe ergab je einen Wert für den linken und rechten Kontaktwinkel, die zu einem Messergebnis gemittelt wurden. Als Kontroll-Oberfläche dienten temperaturbehandelte, aber unbeschichtete Glas-Objektträger.

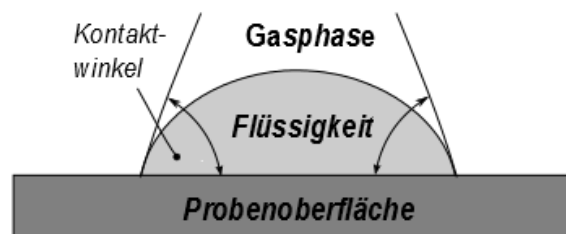


Abb. 7 Prinzip der Kontaktwinkelmessung

2.4 Herstellung von Eluat (*Extraktion*)

Für die indirekte Zytotoxizitätsprüfung der hergestellten HAp-Beschichtungen in Anlehnung an ISO-Norm 10993-5 (2009) wurden diese zunächst extrahiert. Als Proben dienen die zuvor mit Hydroxylapatit beschichteten Glas-Objektträger. Die Objektträger wiesen eine Kantenlänge von $26\text{ mm} \times 76\text{ mm}$ bei einer Dicke von 1 mm auf. Da diese bis zu einer Tiefe von etwa 56 mm

getaucht wurden, ergab sich rein rechnerisch eine beschichtete Gesamt-Oberfläche von ca. 30,5 cm² pro beschichteter Probe. Als Extraktionsgefäß kamen saubere und sterilisierte Objektträger-Transportkassetten mit Deckel (Th. Geyer, D-Renningen) aus Polypropylen (PP) zur Anwendung, welche zusätzlich mehrfach mit Verschlussfolie versiegelt wurden. Auf drei beschichtete Objektträger pro Kassette wurde 17 ml sterilfiltriertes A. bidest. als Extraktionsmedium gegeben. Das ergab ein Verhältnis von Oberfläche zu Extraktionsvolumen von etwa 5,4 cm²/ml. Die Eluierung erfolgte für 72 oder 96 h ± 2h bei 37±1 °C im Schüttelwasserbad mit einer Frequenz von ca. 100 min⁻¹. Anschließend wurden die Proben entnommen und der pH-Wert mit Indikatorstäbchen bestimmt. Die Lagerung der Eluate bis zu den Testungen erfolgte bei 4 °C. Es wurden insgesamt drei Extraktions-Chargen von der hergestellten HAp-Proben hergestellt. Diese entsprechen den jeweils unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeiten bei der Tauchbeschichtung (vergl. Tabelle 2). Die Herstellung von Kontrollproben erfolgte simultan ohne Proben (*Kontrolle a*) und mit thermobehandelten, aber unbeschichteten Objektträgern (*Kontrolle b*). Tabelle 3 enthält eine Übersicht der hergestellten Eluate.

2.5 Nachweis von Ionen in Eluaten der Hydroxylapatit-Beschichtungen

Der Nachweis von gelösten Phosphat- und Calcium-Ionen in den Eluatproben der drei HAp-Chargen erfolgte mittels zweier Test-Kits zur Wasseranalytik der Fa. Hach Lange (D-Düsseldorf).

2.5.1 Bestimmung der Phosphat-Ionen-Konzentration mittels Molybdänblau-Methode

Für die Bestimmung der Konzentration von *ortho*-Phosphat-Ionen (PO₄³⁻) in den Eluaten kam ein photometrischer Test der Fa. Hach Lange (PhosVer®-Methode) zur Anwendung. Dieser basiert auf der Reaktion von Phosphat- und Molybdationen zu Phosphormolybdatkomplexen, welche in Anwesenheit von Ascorbinsäure eine molybdänblaue Farbe aufweisen. Diese Methode ist laut Herstellerangaben geeignet für einen Phosphat-Konzentrationsbereich von 0,0 bis 2,5 mg/l. In dieser Studie wurde die Methode für die Untersuchung von deutlich kleineren Probenvolumina im Mikrotiterplattenphotometer angepasst, da der Originaltest der Fa. Hach Lange für ein Wasserprobenvolumen von 25 ml ausgelegt ist. Dafür wurden zunächst je 1 ml der zu untersuchenden Probe bzw. Standards in 2 ml-Reagiergefäße (*Cap*) vorgelegt. Es wurde ein PhosVer®-Pulverkissen in 12,5 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst und zügig je 1 ml

Tabelle 3 Übersicht der hergestellten Eluate der HAp-Beschichtung und Kontrollen

| Eluat-probe | Eluations-Zeit bei 37° C | Anzahl der OT | HAp-Beschichtung [j/n] | Vorbehandlung der Objektträger | Tauchzieh-Beschichtung (Ziehgeschwindigkeit) |
|-------------|--------------------------|---------------|------------------------|---|--|
| Charge 1 | 96 h | 3 | j | ca. 375° C, min. 20 -30 min | 200 mm/min, |
| Charge 2 | 96 h | 3 | j | ca. 375° C, min. 20 -30 min | 20 mm/min |
| Charge 3 | 72 h | 3 | j | ca. 375° C, min. 20 -30 min | 10 mm/min |
| Kontrolle a | 96 h | 0 | n | Keine Probe nur A. bidest | Keine Beschichtung |
| Kontrolle b | 72 h | 3 | n | Thermobehandlung bei ca. 140° C, mind. 20 min | Keine Beschichtung |

OT= Objektträger; j/n= ja/nein

dieser doppeltkonzentrierten PhosVer®-Lösung zu den vorbereiteten Proben bzw. Standards gegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Testansätze 2 min inkubiert. Anschließend wurden aus einem Cap je acht Vertiefungen einer 96-Loch Platte mit je 200 µl Volumen befüllt. Die photometrische Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei 890 nm (ohne Referenzfilter). Zur Aufstellung einer Kalibrationskurve wurde Phosphat-Standardlösung (50 mg/l PO₄³⁻; Fa. Hach Lange) mit doppelt destilliertem Wasser entsprechend verdünnt und wie oben beschrieben photometrisch untersucht. Die ermittelte Kalibrationskurve verlief bis zu einer Phosphat-Konzentration von 5 mg/l linear; höher konzentrierte Proben wurden vor dem Test mit A. bidest. so verdünnt, dass die Ergebnisse im linearen Bereich der Kalibrationskurve lagen. Die Ergebnisse wurden mit dem Verdünnungsfaktor korrigiert.

2.5.2 Bestimmung der Calcium-Ionen-Konzentration nach der Calmagit-Methode

Zur Bestimmung der Konzentration an freiem Calcium (Ca²⁺) kam ein Reagenzien-Kit zur Bestimmung der Wasserhärte (auch: Karbonathärte) zur Anwendung. Da der Originaltest der Fa. Hach Lange zur Bestimmung der Ca²⁺ - und Mg²⁺ - Konzentration für ein Wasserprobenvolumen von 100 ml ausgelegt ist, wurde auch diese Methode für die Untersuchung von kleineren Probenvolumina und die photometrische Bestimmung in Mikrotiterplatten adaptiert. Für die Erstellung einer Kalibrationskurve wurde ein Calcium-Standard (10 mg/l Ca²⁺ als CaCO₃; Fa. Hach

Lange) verwendet und mit A. bidest verdünnt. Die erhaltene Kalibrationskurve verlief bis zu einer Ca-Konzentration von 1,25 mg/l linear (siehe Ergebnisse, Abschnitt 3.2.2). Die Auswertung höher konzentrierter Eluat-Proben erfolgte analog zu dem Vorgehen bei der Bestimmung des Phosphatgehalts.

Der Testablauf für die Untersuchung der Calcium-Ionen-Konzentration war wie folgt: Es wurden 2 ml der zu bestimmenden Eluat-Probe in einer Reagiergefäß (*Cap*) vorgegeben, 20 µl *Calmagit-Indikatorlösung* zugeben und auf dem Schüttler (Vortex-Gerät) durchmischt. Nach Zugabe von 20 µl *Alkalilösung* und nochmaliger Durchmischung wurde von diesem Ansatz zweimal 650 µl entnommen und in neue Caps (*Cap a und b*) überführt. *Cap a* erhielt keinen weiteren Zusatz; zu *Cap b* wurden 2µl einer 1M EGTA –Lösung zur Komplexbindung der Calcium-Ionen gegeben. Nach erneuter Durchmischung wurden aus jedem Cap je drei Vertiefungen einer 96-Loch-Platte à 200µl befüllt. Die Bestimmung der Extinktionen erfolgte bei 522nm (ohne Referenzfilter). Über die Differenz der Extinktionswerte von *Cap a* und *b* („*Cap ohne Zusatz*“ minus „*Cap mit EGTA-Zusatz*“) wurde der Gehalt an Calcium-Ionen in der jeweiligen Probe anhand der Kalibrationskurve bestimmt.

2.6 Zellkulturversuche

2.6.1 Generelles zum Zellkulturablauf

Sämtliche Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (Scanlaf, Mars 1200; Fa. LaboGene ApS, DK-Lyngø) durchgeführt. Die Inkubation der verwendeten Zellkulturen erfolgte im Brutschrank bei 37° C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer CO₂-Sättigung von 5 %. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit ventilierter Verschlusskappe und 75 cm² Wachstumsfläche mit einer durchschnittlichen Zelldichte von 4 x10³ Zellen pro cm² (3 x10⁵/ T-75 Flasche) ausgesät. Die primären Osteoblasten (hOb-C) wurden laut Empfehlung der Fa. Promocell mit 1 x10⁴ Zellen/ cm² dichter ausgesät (7,5 x10⁵/ T-75 Flasche). Die Ernährung der Zellen erfolgte mit je 10 ml komplettiertem Medium, welches alle zwei bis drei Tage gewechselt wurde (Details zur Herstellung der Zellkulturmedien s. Anhang, Kapitel 7.5 bis 7.7). Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 90-100 % bzw. bei hOb-C von 70-80 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium abgezogen und pro Flasche 10 ml PBS zugegeben, um Serumrückstände zu eliminieren. Anschließend wurde der Phosphatpuffer vorsichtig über den Rand der Flasche abgesaugt und drei Milliliter einer 1:10 mit PBS verdünnten Trypsin/EDTA–Lösung zugegeben. Die Flaschen wurden dann für 5 min im Brut-

schränk inkubiert, bevor die Trypsinwirkung mit serumhaltigem Medium im Verhältnis von mind. 1:2 abgestoppt und der Zellrasen durch mehrmaliges Spülen des Flaschenbodens gelöst wurde. Es folgte eine Zentrifugation der gesamten Suspension bei 1800 *U/min* (ca. 500 *xg*) und 12° C für neun Minuten. Das gewonnene Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und zur Vermeidung von Zellklumpen durch ein steriles Zellsieb (70 µm Maschenweite) in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellzählung erfolgte mittels *Neubauerzählkammer* (Neubauer improved; Fa. Marienfeld, D-Lauda-Königshofen), indem 14 µl der homogenen Zellsuspension mit 14 µl einer 0.4 % -igen Trypanblaulösung (siehe Kap.2.1.2) gemischt und auf die Zählkammer eingebracht wurden. Die Auszählung erfolgte nach Herstelleranleitung mittels Lichtmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung. Anschließend wurde durch Verdünnung mit Medium eine Zellsuspension mit der benötigten Zellzahl pro Volumen hergestellt. Die Zellen wurden für die Tests in entsprechende Multititerplatten bzw. zur weiteren Kultivierung wieder in neue Flaschen ausgesät. Für sämtliche Versuche mit primären Zellen wurden nur Zellkulturen bis maximal zur zehnten Passage verwendet. Für Details zu Ansatz und Komplettierung der Zellkulturmedien inkl. Zusätze siehe Kapitel 7.6 und 7.7.

2.6.2 Vorversuche zur *In-vitro*-Mineralisation von Osteoblasten

Es wurden primäre Osteoblasten (hOb-C) in 24-Well Platten auf Thermanox-Deckgläsern mit einer Zelldichte von $1-2 \times 10^4 / \text{cm}^2$ in DMEM-Medium ausgesät. Sobald die Zellen nach ca. drei bis fünf Tagen konfluent waren, wurde die Hälfte der Zellen mit einem kommerziellen Mineralisationsmedium der Fa. Promocell (D-Heidelberg) inkubiert. Die andere Hälfte der Zellen erhielt weiterhin komplettiertes DMEM als Nährmedium mit einem Zusatz von 50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (Asc-2P) und 0,1 µm Dexamethason (Dex). Als Kontrolle dienten zeitgleich ausgesäte, primäre Fibroblasten. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach 21 Tagen Zellkultur erfolgten die morphologische Begutachtung mittels REM, eine Untersuchung auf Calcium-Ablagerungen mit *Alizarin-Red-S-Färbung* sowie ein Nachweis von *alkalischer Phosphatase* (vergl. Absatz 2.6.2.1 und 2.6.2.2).

2.6.2.1 Calcium-Nachweis mittels Alizarin Rot-Färbung

Zum Nachweis von zweiwertigem Calcium in der Zellkultur diente die Alizarin-Rot-Färbung. Der Ablauf der Färbung erfolgte modifiziert nach DiGirolamo et al. (1999). Die Färbung der auf Thermanox-Deckgläsern (Thermanox, Ø 13mm; Thermo scientific, D-Braunschweig) ausgesäten Zellkulturen erfolgte in 24-Well-Platten. Dafür wurde die Zellen nach Entfernung des

Nährmediums dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem 70%igen Ethanol für eine Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte ein Waschgang mit A. dest., bevor in die Wells je 1 ml der Alizarin-Rot-Stammlösung (zur Herstellung s. Absatz 2.1.2) zugegeben wurde. Die Färbelösung wurde lichtgeschützt, bei Raumtemperatur und langsamer Rotationsbewegung für 15 min auf den Zellen belassen. Anschließend wurde die Färbelösung entsorgt und die Zellen dreimal vorsichtig mit A. dest. gewaschen. Nach einem letzten Differenzierungsschritt von 10 min in PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+}) wurden die Zellen mit PBS bedeckt und bei 4 °C bis zur lichtmikroskopischen Untersuchung gelagert.

2.6.2.2 Nachweis von Alkalischer Phosphatase

Für den enzymatischen Nachweis von alkalischer Phosphatase (ALP) wurde ein Kit der Fa. Sigma-Aldrich® (D-Steinheim) verwendet. Die Herstellung der *Fixier-* und *Substrat-Lösungen* erfolgte entsprechend der Herstellerangaben unmittelbar vorher (vergl. Abschnitt 2.1.2). Die auf Thermanox-Deckgläschen kultivierten Zellen wurden zunächst je einmal mit PBS und A. dest. gespült. Es folgten ein kurzer Fixierschritt für 30 Sekunden mit der *Fixierlösung* und ein zweiminütiger Waschschrift mit A. dest. bevor die *Substratlösung* auf die Zellen gegeben und lichtgeschützt für 15 Minuten belassen wurde. Es folgten ein weiterer, zweiminütiger Waschschrift mit A. dest., eine Gegenfärbung für 60 Sekunden mit je 500 µl Hämatoxylinlösung (Gill No. 3, Fa. Sigma-Aldrich; D-Steinheim) und mehrmaliges Spülen mit A. dest.. Eine Spülung mit Leitungswasser und A. dest. im Verhältnis 1:2 für etwa 60 Sekunden bewirkte einen Farbumschlag (Bläuen), wobei die gewünschte Farbtintensität mittels Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Ein erneuter Waschschrift und die Lagerung erfolgten in A. dest.. Falls die Zellen nicht sofort mikroskopisch untersucht werden konnten, erfolgte analog zur Giemsa-Färbung eine Konservierung mit Euparalharz (siehe Abschnitt 2.6.4.1).

2.6.3 Untersuchung der Hydroxylapatit-Eluate mittels Zytotoxizitätstest (XTT-Test)

Es wurden quantitative Untersuchungen zur Zytotoxizität der HAp-Eluate (siehe Kap. 2.4) in Anlehnung an ISO-Norm 10993-5 (2009) durchgeführt. Dabei kam ein dreitägiger Biotoxizitätsassay mit dem Tetrazoliumsals *2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5((phenylamino)-carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid* (kurz: XTT) zur Anwendung. Am ersten Tag dieses Versuchs fanden Passage, Zellzählung und Aussaat der Osteoblasten (SAOS-2 bzw. hOb-C) statt. Die Aussaat erfolgte in 96-Well-Platten à 1×10^4 Zellen pro Vertiefung in je 100 µl DMEM (mit Phenolrot). Für die Bestimmung der Leerwerte (LW) wurden auf den gleichen

Platten auch Vertiefungen ohne Zellen mit 100 µl DMEM befüllt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle auf gleichmäßige Zelladhärenz sowie ein Mediumwechsel. Dafür wurde jedes Well einmal vorsichtig mit 100 µl PBS gespült und je 50 µl doppelt konzentriertes DMEM ohne Phenolrot und 50 µl der jeweiligen Testlösung (*Eluate der HAp-Chargen 1-3, Kontrolle b*) zugegeben. Für die Herstellung von Negativkontrollen (NK) wurde die Testlösung durch 50 µl A.bidest. ersetzt; als Positivkontrollen (PK) zur Überprüfung des Assays wurde anstelle der Testlösung 50 µl Kupfer(II)-Lösung zugegeben (s. Abschnitt 7.8). Nach weiteren 24 h Inkubationszeit im Brutschrank wurde am dritten Tag eine XTT/PMS-Lösung zugegeben. Der Ansatz dieser Lösung erfolgte unmittelbar vor Gebrauch aus den portionierten, bei -20 °C gelagerten Stammlösungen (vgl. Abschnitt 2.1.3). Für eine Mikrotiter-Platte wurden 60 µl einer 1,2 mM PMS-Lösung mit 3 ml einer 1,4 mM XTT-Lösung gemischt (Verhältnis 1: 50). Pro Vertiefung wurden 25 µl dieser XTT/PMS-Lösung zugegeben. Die so vorbereiteten Platten wurden für weitere drei Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit erfolgte der Umsatz des Tetrazoliumsals XTT in orangefarbenes Formazan durch die metabolisch aktiven Zellen. Anschließend wurden aus jedem Well 100 µl entnommen und in eine neue 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte bei 470 nm und einem Referenzfilter von 750 nm. Es wurden die drei verschiedenen Eluate der HAp-Chargen, die Kontrolle b (*vergl.* Tabelle 3) im Vergleich zur Negativkontrolle jeweils mit beiden Osteoblastenkulturen (SAOS-2 und hOb-C) getestet. Dabei wurde jede Kombination in mindestens zwei zeitlich unabhängigen Versuchen mit je 8 bis 16 Wells (d.h. 1-2 Reihen einer 96-Well-Platte) durchgeführt.

2.6.4 Direkttests mit Osteoblasten auf der hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtung

Für die qualitative Untersuchungen der HAp-Beschichtungen im Direktkontakt mit Osteoblasten wurden diese in 12-Well-Platten auf den HAp-beschichteten Aluminiumsubstraten (14 mm Kantenlänge, ca. 2 cm²) ausgesät. Als Kontrolle dienten auf sterile Kunststoff-Deckgläschen (Thermanox) und auf unbeschichteten Aluminiumplättchen ausgesäte Zellen. Eine Positivkontrolle erfolgte mit auf Kupferblech ausgesäten Zellen. Es wurden pro Probe bzw. Kontrolle 2×10^4 Zellen pro cm² ausgesät. Dafür wurde die entsprechende Zellzahl in 250 µl im Tropfen auf Probe pipettiert. Nach einer Adhärenz-Zeit von 60 - 120 Minuten bei 37 °C wurde jedes Well mit 1,25 ml frischem DMEM- Medium vervollständigt. Ein Mediumwechsel erfolgte

regelmäßig alle zwei bis drei Tage. Die Auswertungen der HAp-Beschichtungen und Kontrollen fanden nach 24 h, 72 h und 120 h (mit SAOS-2 und O-139) statt. Die Proben wurden wie nachfolgend beschrieben mittels Giemsa-Färbung und mittels REM auf morphometrische Unterschiede untersucht. Pro Zellart wurden mindestens zwei bis vier HAp-Proben untersucht. Ursprünglich war für die Direkttests ebenfalls die Zellkultur hOb-C vorgesehen; da diese aber zahlenmäßig nicht ausreichend kultiviert werden konnte, wurde auf eine im eigenen Labor etablierte, primäre Osteoblastenkultur zurückgegriffen (O-139, vergl. auch Tabelle 1).

2.6.4.1 Giemsa-Färbung

Für die lichtmikroskopische Beurteilung von Zelldichte- und -morphologie, wurden die Zellen mit einer industriell gefertigten Giemsa-Stammlösung (*Giemsa Stain Solution*; PAA Laboratories, A-Pasching) gefärbt. Die Zellen wurden dafür vor der eigentlichen Färbung einmal mit PBS gewaschen und für mind. 30 Minuten bei 4° C mit 2,5%-iger Glutaraldehydlösung fixiert. Es folgten zwei Waschschrte mit PBS und einer mit destilliertem Wasser für je fünf Minuten. Für die Färbung wurde stets eine frisch zubereitete Giemsa-Lösung verwendet. Es wurde hierfür die Giemsa-Stammlösung mit A. dest. 1 : 2 verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Lösung wurde für 20 Minuten auf den Zellen belassen. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die Zellen für ca. drei Sekunden mit 99 %-igem Ethanol differenziert und sofort zweimal mit A. dest gespült. Wenn die Zellen auf Deckgläsern nicht gleich fotografiert werden konnten, erfolgte nach zwei weiteren dreiminütigen Waschschrten mit Isopropanol eine Eindeckung mit Euparalharz auf einem Objektträger.

2.6.4.2 Probenvorbereitung für die Rasterelektronenmikroskopie

Die Vorbereitung der Zellproben für die Untersuchung mit dem Rasterelektronenmikroskop erfolgte mittels *Kritisch-Punkt-Trocknung* (KPT). Zuvor wurden die kultivierten Zellen (auf Thermanox bzw. HAp-beschichteten Aluminiumplättchen) mit PBS gespült und mit einer 2,5%-igen Glutaraldehydlösung für mindestens 30 Minuten fixiert. Es folgte eine Entwässerungsreihe in Ethanol mit zunehmender Konzentration für je 10 min (30%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% und 3x mit *Ethanol absolut*). Die Proben wurden bis zur Überführung in die Probenkammer des KPT-Gerätes in eisgekühltem *Ethanol absolut* aufbewahrt. Die Probentrocknungen mit den KPT-Geräten der Fa. Emitech (UK-Ashford, Kent) bzw. Fa. Balzers (*Nachfolger*: Fa. Leica, D-Wetzlar) wurde nach der jeweiligen Herstelleranleitung durchgeführt. In beiden Geräten wurde absoluter Ethanol gegen Kohlenstoffdioxid (kritischer Punkt von CO₂ liegt bei 34° C und 73,8

bar) als Intermedium ausgetauscht. Um die getrockneten Proben leitfähig zu machen, wurden sie anschließend mittels Kathodenzertäubung in einem Argonplasma bei 5×10^{-2} bar und einer Stromstärke von ca. 32 mA mit einer dünnen Goldschicht versehen. Erwünscht war eine Schichtdicke von ca. 8 nm, die durch ein angeschlossenes Schichtdickenmessgerät gesteuert wurde. Die Probenlagerung erfolgte feuchtigkeitsgeschützt bis zur Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen mittels SE-Detektors.

2.7 Datenerfassung und statistische Analyse

Sämtliche photometrischen Messungen erfolgten mit dem Mikrotiterplatten-Photometer „µ-Quant“ der Fa. Bio-Tek Instruments (Kansas, USA) und dem Software-Programm Mikrowin (Version 3.33; Fa. Mikrotek Laborsysteme, D-Overath). Für die Auswertungen der Ergebnisse mittels deskriptiver Statistik wurden die PC-Programme MicroCal Origin (Vers.7.5G; Fa. OriginLab Co., USA) und Microsoft Office Excel 2007 verwendet. Für die Erstellung von Kalibrationsgeraden (Standardkurven) und deren Errechnung sowie für sämtliche grafischen Darstellungen kam ebenfalls das Programm Origin (s.o) zur Anwendung. Die statistischen Tests mittels zweiseitigem *Student-t-Test*, einfaktorieller Varianzanalyse bzw. der verteilungsfreien Kruskal-Wallis-ANOVA auf einem festgelegten Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (α -Fehler-Wahrscheinlichkeit $< 5\%$) erfolgten mit dem PC-Programm SigmaStat (Vers. 3.11; Fa. Systat, D-Erkrath). Für die morphologischen Untersuchungen und Darstellungen von Zellen wurden diese mit einem Lichtmikroskop Optishot-2 (Fa. Nikon) untersucht und mit einer Mikroskopkamera (Typ CF11/1; Fa. Kappa optronics GmbH, D-Gleichen) sowie dem Software-Programm WinTV (Version 4.11.24011; Fa. Hauppauge; NY-USA) erfasst. Eine Skalierung der Fotos erfolgte gegen eine Objektträgermesskala (0,1mm; Fa. Nikon).

3 ERGEBNISSE

3.1 Analyse der Hydroxylapatit-Beschichtungen

Im Anschluss an die im Abschnitt 2.2 beschriebene Herstellung von Hydroxylapatit-Beschichtungen mittels Sol-Gel-Verfahren erfolgten die qualitativen und quantitativen Analysen von zufällig ausgewählten Proben.

3.1.1 Ergebnisse der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen

Mit den ausgewählten Proben erfolgten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen. Die Darstellungen mit Vergrößerungen im Mikrometerbereich zeigten eine glatt wirkende Oberfläche der Hydroxylapatitbeschichtung, welche von zahlreichen runden Poren mit einem Durchmesser von ca. 4 μm durchsetzt war (s. Abb. 8a-d). Die Tiefe dieser kraterförmigen Strukturen variierte innerhalb der HAp-Beschichtung und legte hier eine kristalloide Innenstruktur frei. Zusätzlich konnte man in den Beschichtungen „C“- förmige bzw. halbmondförmige Unterbrechungen erkennen, welche vermutlich die Vorläufer der Poren darstellten, sowie einige deckelförmige Pendants der Poren, die lose der Oberfläche auflagen (siehe Abb. 8 c). Bei noch höherer Vergrößerung (im Nanometerbereich) zeigte sich, dass die zuvor glatt wirkende Fläche eine gleichmäßige Nanorauigkeit aufwies (siehe Abb. 8 e-f).

3.1.2 Ergebnisse der Raman-Analysen

Der *Raman-Effekt* entsteht durch inelastische Streuung von monochromatischem Licht an einem Streuer; dies kann ein Atom oder Molekül sein. Die Frequenzverschiebung zwischen dem einfallenden Laserlicht und den gestreuten Raman-Emissionen entsprechen den Energieübertragungen von den Photonen des Laserlichts auf die bestrahlten Moleküle bzw. Atome (Stokes-Strahlung) bzw. umgekehrt von den Molekülen/Atomen auf die Photonen (Anti-Stokes-Strahlung) (Tsuda und Arends 1997). Die sogenannten Raman-Banden des gestreuten Lichts sind charakteristisch für bestimmte chemische Gruppen und ergeben zusammen ein Spektrum, aus welchem sich qualitative und quantitative Rückschlüsse auf die untersuchte Probe ziehen lassen. Raman-Analysen erfolgten routinemäßig nach jeder Herstellungscharge von Hydroxylapatit-Sol als Screening-Verfahren. Dafür wurde exemplarisch von jeder Charge eine beschichtete Probe mit dem Raman-Mikroskop an verschiedenen Stellen untersucht.

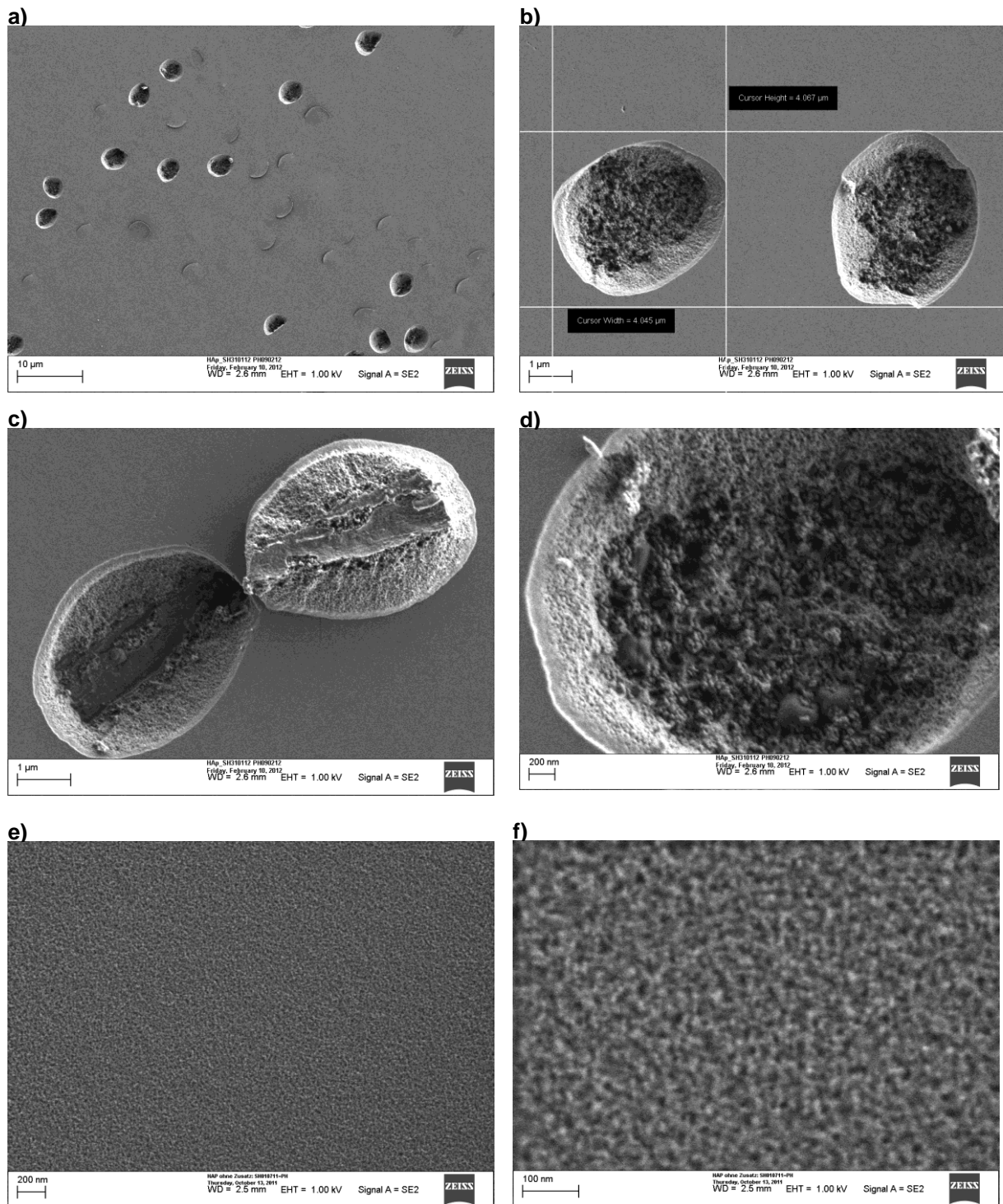


Abb. 8 a) – f) Hydroxylapatit-Beschichtungen auf Aluminiumsubstrat

REM-Aufnahmen in verschiedenen Vergrößerungen. Auffällig sind die zahlreichen Poren von ca. 4 μm Durchmesser, bei Vergrößerungen im Nanometerbereich wirkt die HAp-Beschichtung zunehmend rauer. *Spin-Coating*-Beschichtung.

Ein typisches Ramanspektrum einer hergestellten HAp-Beschichtung auf einer Aluminiumprobe ist in Abb. 9 dargestellt. Es zeigte sich neben einem deutlicher Peak bei 963 cm^{-1} weitere, wesentlich kleinere Banden in den Bereichen 1073 - 1046 cm^{-1} , 606 - 588 cm^{-1} und 446 - 432 cm^{-1} . Ab ca. 1000 cm^{-1} nahm der Verlauf der Raman-Intensität schulterartig ab. Die gemessenen Raman-Banden waren charakteristisch für die chemischen Gruppen von Hydroxylapatit und in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten und konnten wiederholt bei allen HAp-Chargen gemessen werden. Eine zweifache Beschichtung der Probe führte zu keiner Änderung der Peakverteilung, sondern nur zu einer Zunahme der Intensität.

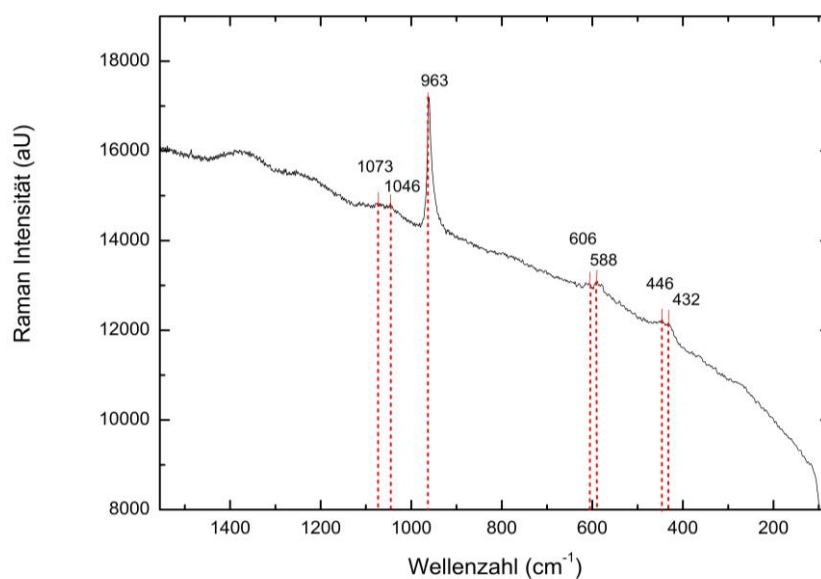


Abb. 9 Raman-Spektrum einer Hydroxylapatitbeschichtung auf Aluminium - Substrat

Das gemessene Spektrum der analysierten Beschichtung ist im Bereich von 1600 -100 cm^{-1} dargestellt. Am auffälligsten ist der typische Phosphat- Peak (ν_1) bei 963 cm^{-1} . *Spin-Coating*-Beschichtung.

3.1.3 Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie

Die Röntgendiffraktometrie (XRD) ist eine häufig verwendete Analysemethode in der Kristallografie. Sie dient der Bestimmung von Kristalltextur und Gitterparameter einer unbekannt (kristallinen) Probe. Diese wird mit einem monochromatischen Röntgenstrahl in flachen Einstrahlwinkeln (Einstrahlwinkel „theta“ = θ) bestrahlt. Dabei kommt es an den Atomen der untersuchten Kristallprobe unter bestimmten Winkeln zur Beugung, also Reflektion der Röntgenstrahlung, aufgrund von konstruktiven Interferenzen, analog der Beugung von sichtbarem Licht am Spalt und Doppelspalt (Epple 2003). Die gemessenen

Winkel der Streustrahlung sind abhängig von dem Abstand der Atome im Kristallgitter und der verwendeten Röntgenquelle bzw. deren Wellenlänge λ . Man kann das erhaltene Spektrum softwaregestützt mit den theoretischen Werten aus Datenbank-Bibliotheken vergleichen („*Pattern-Matching*“). Da die XRD-Analyse zeitlich sehr aufwendig ist, wurde sie in dieser Studie exemplarisch anhand einer zufällig ausgewählten, doppelbeschichteten Hydroxylapatit-Probe durchgeführt. Das Substrat der Probe war wiederum hochglanzgewalztes Aluminium und war mittels *Spincoating*-Verfahren beschichtet worden. Das Diffraktogramm der HAp-Probe wurde mittels computergestützter Mustererkennung (*Pattern Matching*) analysiert, wobei die experimentell gemessenen mit den theoretischen Werten von Hydroxylapatit verglichen wurden. Es wurde eine starke Streuung beobachtet mit Reflexen bei $2\theta = 26^\circ, 28,5^\circ, 31^\circ - 34^\circ, 40^\circ, 42^\circ, 44$ sowie bei $46^\circ - 56^\circ$.

Die *Bragg'schen Indizes* der Kristallflächen-Schar wurden im Diffraktogramm in der (hkl)-Schreibweise angegeben (siehe Abb. 10). Neben diesen für Hydroxylapatit typischen Reflexen wurden auch die Reflexe des Aluminium-Substrats gemessen (Bragg-Index = 111 bzw. 200 bei $2\theta = 36^\circ$ bzw. 45°). Andere Fremd-Phasen konnten nicht beobachtet werden.

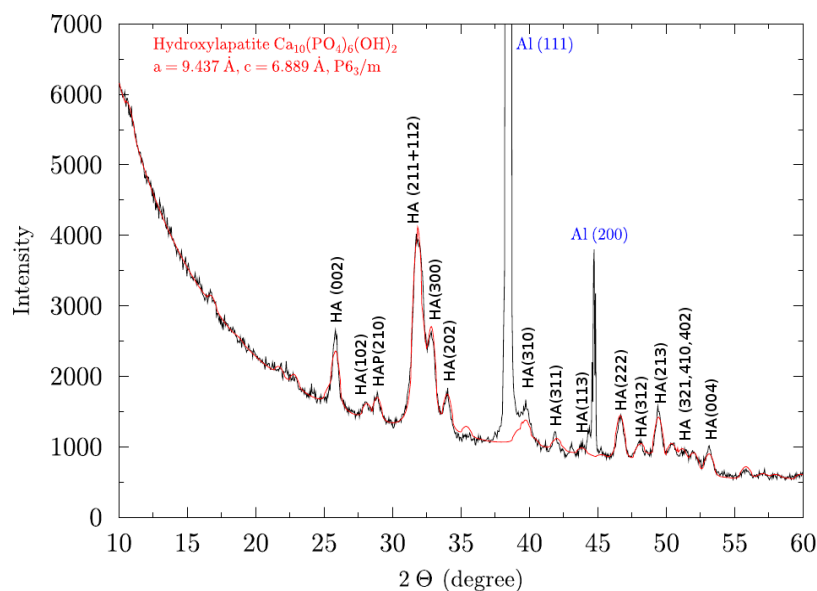


Abb. 10 XRD- Beugungsdiagramm einer Hydroxylapatitbeschichtung auf Aluminium-Substrat als Signalintensität über dem doppelten Einstrahlwinkel (2θ)

Das gemessene Spektrum der HAp-Probe ist schwarz dargestellt. Die theoretischen Werte von Hydroxylapatit, hier rot dargestellt, entstammen einer Software-Datenbank. Die *Bragg'schen Indizes* der Netzebenen-Schar sind über den jeweiligen Peaks angegeben. Die verfeinerten Gitterparameter sind oben links im Spektrum angegeben. Neben den für Hydroxylapatit typischen Reflexen sind auch zwei Reflexe des Aluminium-Substrats zu erkennen. *Spin-Coating*-Beschichtung.

Die Kristallanalyse der texturfreien Beschichtung ergab eine hexagonale Gitterstruktur $P6_3/m$ mit $a = 9,437 \text{ \AA}$ und $c = 6,889 \text{ \AA}$ als Gitterkonstanten.

3.1.4 Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen

Für die Untersuchung des Benetzungsverhaltens der hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen wurden Kontaktwinkelmessungen nach dem Prinzip des liegenden Tropfens durchgeführt (vergl. Abschnitt 2.3.2). Die seitlichen Winkel wurden dabei mittels video- und softwaregestütztem Kontaktwinkelmessgerät erfasst (siehe Abb. 11). Die Messungen wurden 60 Sekunden nach Tropfenkontakt durchgeführt. Die untersuchten Oberflächen waren tauchbeschichtete Objektträger (OT_HAp) sowie temperaturbehandelte, aber unbeschichtete Objektträger als Referenzoberfläche (OT_Glas).

An den mit Hydroxylapatit-beschichteten Glasobjektträgern ergaben die Messungen einen durchschnittlichen Kontaktwinkel von $14,0^\circ \pm 3,22^\circ$. Bei den entsprechenden Untersuchungen mit der unbeschichteten Referenzoberfläche lag der durchschnittliche Kontaktwinkel bei etwa 40° und war damit signifikant höher (s. auch Tabelle 4).

Abb.11 a)-b) zeigen typische Momentaufnahmen von Kontaktwinkelmessungen auf den verschiedenen Oberflächen. Die Ergebnisse der Kontaktwinkelmessung auf den HAp-Beschichtungen im Vergleich zu der unbeschichteten Referenzoberfläche ist in Abb. 12 anschaulich als Säulendiagramm dargestellt.

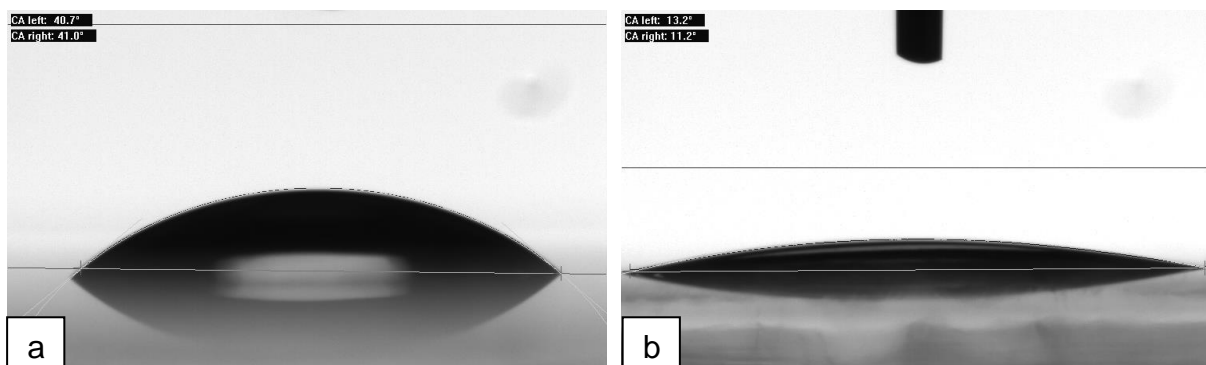


Abb. 11 a)-b) Momentaufnahmen einzelner Kontaktwinkelmessungen

Die Aufnahmen wurden jeweils 60 Sekunden nach Tropfenkontakt angefertigt. Sie zeigen die typische Form von Kontakttropfen auf (a) unbeschichteten Glasobjektträgern und (b) Hydroxylapatit-beschichteten Glasobjektträgern (*Dip-Coating*).

Tabelle 4 Ergebnisse der Kontaktwinkelmessungen

| Oberfläche | MW [in °] | SD [in °] | n |
|------------|-----------|-----------|----|
| OT_Glas | 40,5 | 1,39 | 8 |
| OT_HAp | 14,0 | 3,22 | 10 |

MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl der Messungen, OT_Glas = thermobehandelte Glas-Objekträger als Kontrolle, OT_HAp= mit Hydroxylapatit beschichteter Objekträger.

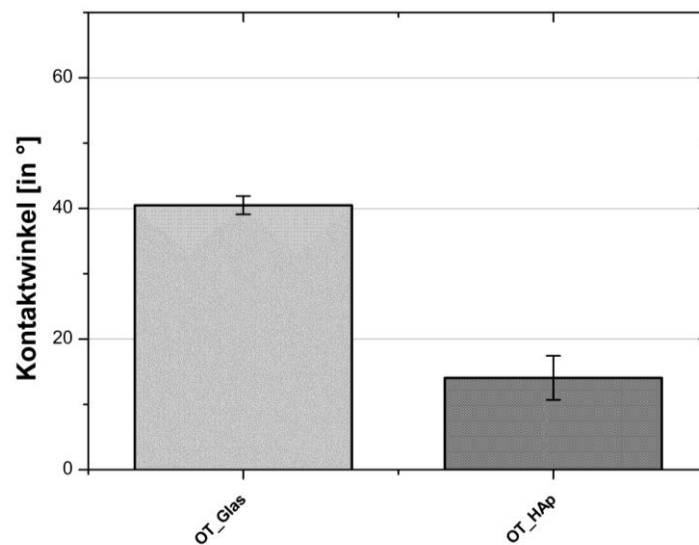


Abb. 12 Diagramm der Kontaktwinkelmessungen auf der HAp-Beschichtung im Vergleich zur unbeschichteten Referenzoberfläche

OT_Glas = Referenzoberfläche, unbeschichtete Glasobjekträger, OT_HAp = mit Hydroxylapatit beschichtete Objekträger (*Dip-Coating*).

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen mit Hydroxylapatit-Eluaten

Für die indirekten Untersuchungen der Hydroxylapatit-Beschichtungen wurden drei Chargen von beschichteten Glasobjekträgern, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, in bidestilliertem Wasser bei 37 °C in einem Schüttelbad extrahiert. Die so gewonnenen Eluate wurden zunächst auf ihren Gehalt an Calcium- und Phosphat-Ionen untersucht und anschließend mittels XTT-Test auf Zytotoxizität getestet. Die Bestimmung des pH-Wertes der Extraktionsproben wurde vor und nach Beendigung der Eluierung mit Indikatorreststreifen durchgeführt. Dies ergab bei allen Messungen einen neutralen pH-Wert (pH = 7,0).

In allen drei hergestellten Eluaten-Chargen ließen sich winzige Partikel der HAp-Beschichtungen beobachten. Diese waren beim Schütteln der Probenröhrchen bereits mit bloßem Auge als „Flimmern“ in den ansonsten durchsichtigen Lösungen zu erkennen. In den Probenansätzen (Wells) des XTT-Tests konnte diese HAp-Stückchen auch mikroskopisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 13).

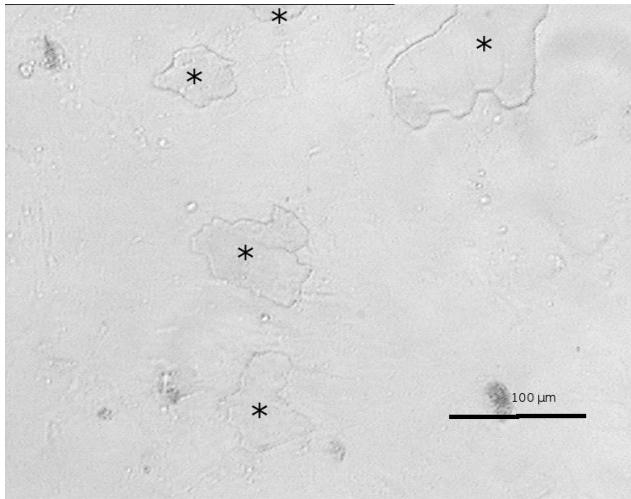


Abb. 13

Gelöste Teilchen der Hydroxylapatit-Beschichtung im XTT-Test

Primäre Osteoblasten (hOb-C, Passage 7, Tag 3 nach Aussaat) wurden in einer Mikrotiterplatte mit dem Eluat einer HAp-Beschichtung inkubiert.

Es sind kleinste Stückchen der Beschichtung erkennbar (Sternchen-Markierung). Die ungefärbte Lebendkultur ist hier weniger gut erkennbar.

Fotografiert mit Phasenkontrast, die Messkala entspricht 100µm.

3.2.1 Nachweis von Phosphat-Ionen in den Eluaten der HAp-Beschichtung

Zur Bestimmung der Phosphat-Ionen-Konzentration (PO_4^{3-}) in den drei Eluaten der Hydroxylapatitbeschichtung wurde ein photometrischer Nachweis (*Ascorbinsäure-Methode mit PhosVer®*), wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurde eine Kalibrationskurve mithilfe eines Phosphatstandards bestimmt, die bei Phosphat-Ionen-Konzentrationen von 0 - 5 mg/l einen linearen Verlauf aufwies. Bei Konzentrationen von mehr als 5 mg/l verlief die Kurve nicht-linear und zunehmend flacher (siehe Abb. 14).

Die Bestimmung der Steigung des linearen Bereiches unterhalb von 5 mg/l erfolgte mittels der Funktion *linear fit* der verwendeten Statistik-Software. Für den Bereich von 0 - 5 mg/l ergab sich daraus folgende Geradengleichung:

$$f(x): y = 0,049 + 0,074 \cdot x \quad (1)$$

Nach Festlegung des sensiblen Bereiches diente die Funktion (1) zur Ermittlung der Konzentration von Phosphat-Ionen in den hergestellten Eluatproben der unterschiedlichen HAp-Chargen und Kontrollen.

Es zeigte sich, dass der Phosphat-Gehalt in den drei verschiedenen Chargen der Hydroxylapatit-Beschichtungen deutlich über denen der Kontrollen lag. Erwartungsgemäß ergaben die Messungen der *Kontrolle a* (= Eluat ohne Proben) und *Kontrolle b* (= Eluat mit unbeschichteten Glasobjektträgern) Phosphat-Ionen-Konzentrationen an der unteren Nachweisgrenze.

Die drei eluierten HAp-Chargen unterschieden sich voneinander durch die beim Beschichtungsvorgang (*Dip-Coating*) vorgenommenen Ziehgeschwindigkeiten aus dem HAp-Sol (vergl. auch Tabelle 2 und Abschnitt 2.2.2). Diese hatten offensichtlich Einfluss auf die Höhe der gemessenen Phosphat-Ionen-Konzentration: Die Messungen von *HAp-Charge 3*, der dünnsten der drei Hydroxylapatit-Beschichtungen, ergaben mit durchschnittlich 7,30 mg/l nur ungefähr die Hälfte der Phosphat-Ionen-Konzentration im Vergleich zu den Messungen der beiden Eluate der dickeren Beschichtungen (*HAp-Chargen 1 und 2*). Wider Erwarten wurde im Eluat der *HAp-Charge 1* mit 12,54 mg/l weniger Phosphat-Ionen als in *HAp-Charge 2* (15,14 mg/l) nachgewiesen, obwohl Letztere die dünnere Hydroxylapatit-Beschichtung aufwies. Eine Gesamtübersicht der Ergebnisse der Untersuchungen zum Phosphat-Ionen-Gehalt aller Eluatproben ist Tabelle 5 zu entnehmen.

3.2.2 Nachweis von Calcium-Ionen in den Eluaten der HAP-Beschichtung

Für die Bestimmung der Konzentration an Calcium-Ionen in den Eluaten wurde, wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben, ein photometrischer Nachweistest der Fa. Hach Lange für die Anwendung im Mikrotiterplattenphotometer abgewandelt. Zunächst wurde wiederum eine Kalibrationskurve mittels eines Calcium-Standards aufgestellt. Diese wies bei einer Calcium-Ionen-Konzentration von 0 mg/l bis 1,0 mg/l einen linearen Verlauf auf. Bei Konzentrationen von über 1,0 mg/l verlief die Kurve nicht-linear und zunehmend flacher, ähnlich einer Sättigungskurve (siehe Abb. 15). Die Bestimmung der Steigungsgeraden im linearen Bereich erfolgte analog zum Vorgehen beim Phosphat-Nachweis (s.o.):

$$f(x): y = 0,12883 \cdot x \quad (2)$$

Die Funktion (2) diente nun zur Ermittlung des Gehalts an Calcium-Ionen in den hergestellten HAp-Chargen und Kontrollen. Eluatproben mit höheren Ca-Konzentrationen wurden durch Verdünnen in den linearen Bereich der Kalibrationskurve (0 – 1 mg/l) gebracht; der Verdünnungsfaktor wurde bei der Berechnung der Ergebnisse entsprechend berücksichtigt.

Die mittleren Calcium-Konzentrationen der HAp –Eluate (*HAp-Chargen 2 und 3*) lagen um ein Vielfaches höher als die der Kontrollen (*Kontrolle a und b*). Zusätzlich konnte hier, im Gegensatz zu den Ergebnissen beim Phosphat-Ionen-Nachweis, ein deutlicher Konzentrationsunterschied zwischen den beiden Kontrollen festgestellt werden: Die Messungen der Calcium-Ionen-Konzentration ergaben für *Kontrolle a* (= Eluat ohne Proben) einen durchschnittlichen Calcium-Gehalt von 0,19 mg/l. Dagegen konnten bei *Kontrolle b* (= Eluat mit unbeschichteten Glasobjektträgern) eine etwa dreifach höhere Calcium-Ionen-Konzentration (0,42 mg/l) gemessen werden. Die zwei untersuchten HAp-Chargen unterschieden sich kaum voneinander: *HAp-Charge 2* wies mit durchschnittlich 6,16 mg/l eine nur wenig höhere Calcium-Ionen-Konzentration auf als *HAp-Charge 3* mit 6,00 mg/l. Das Eluat der *HAp-Charge 1* konnte wegen des hohen Probenverbrauchs bei zahlreichen Vorversuchen nicht mehr zuverlässig bestimmt werden. Die Ergebnisse des Calcium-Ionen-Nachweises sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

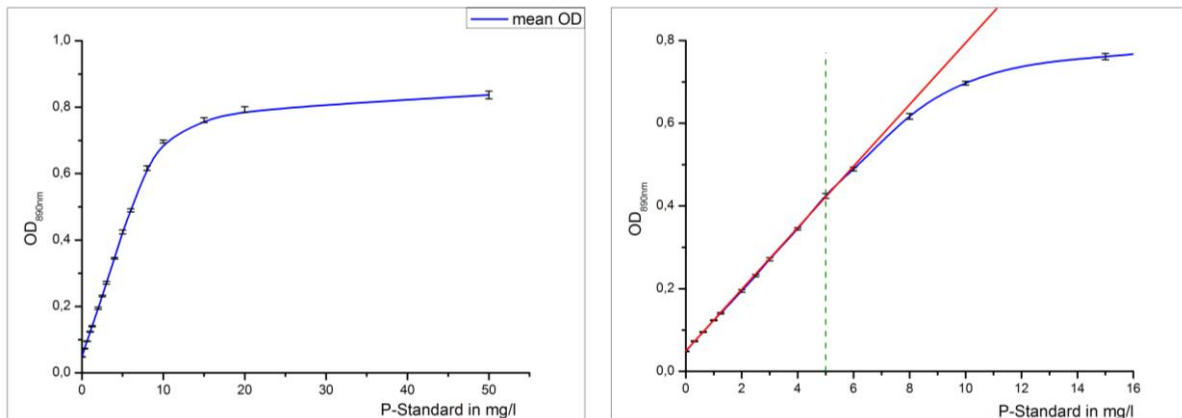


Abb. 14 Kalibrationskurve der Phosphat-Ionen-Konzentration in mg/l

Photometrischer Nachweis von Phosphat-Ionen bei 890 nm. Dargestellter Bereich: 0 - 50 mg/l (links) und 0 - 16 mg/l (rechts). Im rechten Kurvendiagramm entsprechen die helle gestrichelte Linie der ermittelten, linearen Steigungsgerade und die senkrechte, rot gestrichelte Linie dem Grenzwert (5 mg/l), oberhalb dessen die Kurve nicht-linear verläuft. OD = optische Dichte.

Tabelle 5

Ergebnisse des Nachweises von Phosphat-Ionen in den Eluaten mittels der Ascorbinsäure - Methode

Gelistet sind die mittlere Phosphat-Ionen-Konzentration in mg/l und die errechnete Stoffmengenkonzentration in μM ($\mu\text{mol/l}$) der untersuchten HAp-Chargen bzw. Kontrollen, \pm SD = Standardabweichung. Die HAp-Chargen unterschieden sich in den Ziehgeschwindigkeiten aus dem HAp-Sol (*up-velocity*).

| Eluat-probe | Extraktions-Zeit [in h] | Anzahl OT/ up-velocity | Phosphat-Ionen-Konzentration [in mg/l \pm SD] | Phosphat-Ionen-Konzentration [in μM \pm SD] | Anzahl der Messungen [n] |
|--------------|-------------------------|---------------------------|---|--|--------------------------|
| HAp-Charge 1 | 96 | 3 HAp-OT/ 200mm/min | 12,54 \pm 0,342 | 132,05 \pm 3,600 | 8 |
| HAp-Charge 2 | 96 | 3 HAp-OT/ 20mm/min | 15,14 \pm 0,187 | 159,37 \pm 1,972 | 8 |
| HAp-Charge 3 | 72 | 3 HAp-OT/ 10mm/min | 7,30 \pm 0,108 | 76,84 \pm 1,138 | 8 |
| Kontrolle a | 96 | keine OT nur A. bidest | 0,04 \pm 0,022 | 0,38 \pm 0,232 | 15 |
| Kontrolle b | 72 | 3 OT, unbeschichtet | 0,03 \pm 0,019 | 0,28 \pm 0,201 | 8 |

HAp = Hydroxylapatit; OT = Glas-Objektträger; up-velocity = Ziehgeschwindigkeit aus dem HAp-Sol beim Dip-Coating

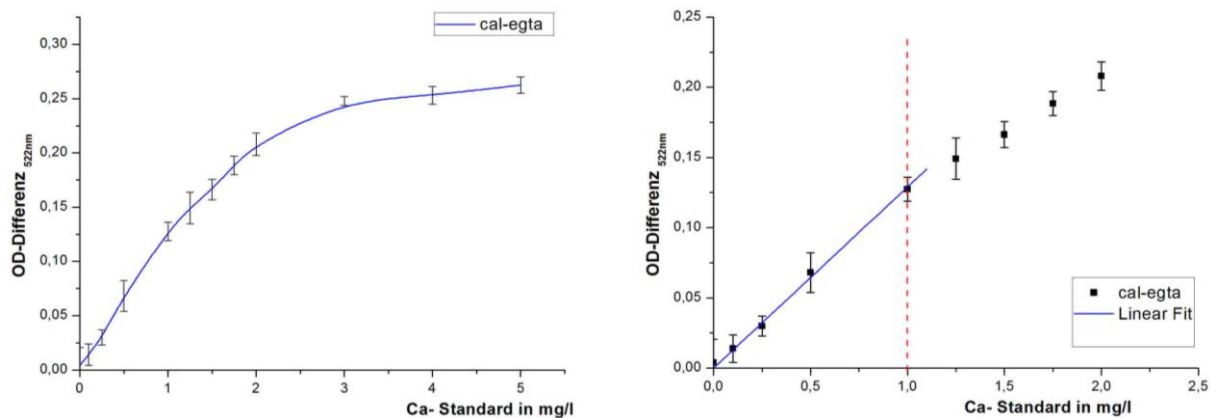


Abb. 15 Kalibrationskurve der Calcium-Ionen-Konzentration in mg/l

Photometrischer Nachweis von Calcium-Ionen bei 522 nm. Dargestellt im Bereich 0 - 5,5 mg/l (links) und 0 - 2,5 mg/l (rechts). Die blaue Gerade im rechten Diagramm entspricht dem linearen Bereich des Calcium-Nachweises und die rot gestrichelte Linie dem Grenzwert (1,0 mg/l), bis zu welchem die Standardkurve linear verläuft. OD =optische Dichte.

Tabelle 6

Ergebnisse des Calcium-Ionen-Nachweises in den Eluaten mittels der Calmagit-Methode

Mittlere Konzentration von Calcium-Ionen in den Eluaten der HAp-Chargen bzw. Kontrollen in mg/l und der Stoffmengenkonzentration in μM ($\mu\text{mol/l}$) \pm SD = Standardfehler. Die HAp-Chargen unterschieden sich in den Ziehgeschwindigkeiten aus dem HAp-Sol (*up-velocity*). Der Nachweis von Calcium-Ionen von HAp-Charge konnte nicht erhoben werden.

| Eluatproben | Extraktions-Zeit [in h] | Anzahl OT/ up-velocity | Calcium-Ionen-Konzentration [in mg/l \pm SD] | Calcium-Ionen-Konzentration [in μM \pm SD] | Anzahl der Messungen [n] |
|--------------|-------------------------|---------------------------|--|---|--------------------------|
| HAp-Charge 2 | 96 | 3 OT/ 20mm/min | 6,16 \pm 0,505 | 153,64 \pm 12,60 | 3 |
| HAp-Charge 3 | 72 | 3 OT/ 10mm/min | 6,00 \pm 1,316 | 149,58 \pm 32,826 | 5 |
| Kontrolle a | 96 | keine OT nur A. bidest | 0,19 \pm 0,166 | 4,84 \pm 4,140 | 5 |
| Kontrolle b | 72 | 3 OT, unbeschichtet | 0,42 \pm 0,043 | 10,46 \pm 1,067 | 3 |

HAp = Hydroxylapatit; OT = Glas-Objektträger; up-velocity = Ziehgeschwindigkeit aus dem HAp-Sol beim Dip-Coating

3.3 Zellkulturversuche

Um die mittels Sol-Gel-Methode hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen auf eine potentielle Zytotoxizität hin beurteilen zu können, wurden die zellulären Reaktionen von primären Osteoblasten und einer Osteoblasten-Zelllinie auf die hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen mit direkten und indirekten Zellkulturversuchen untersucht. Für die Charakterisierung der verwendeten primären Osteoblasten (hOb-C) wurde vorab ihre Fähigkeit zur *In-vitro*-Mineralisation überprüft.

3.3.1 Voruntersuchungen zur Zellcharakterisierung

Für die Versuche zur *In-vitro*-Mineralisation durch humane Osteoblasten (hOb-C) wurden diese auf Deckgläser ausgesät und für ca. drei bis fünf Tage bis zur 100%-igen Konfluenz wachsen gelassen. Dann wurde das Vitamin-C-haltige (50 μ M) Kulturmedium gegen ein kommerzielles Mineralisationsmedium (Fa. Promocell) ausgetauscht und alle 2-3 Tage erneuert. Nach 21 Tagen erfolgte die morphologische Auswertung mit *Alizarin Rot-Färbung*, *alkalischer Phosphatase-Nachweis* und/oder rasterelektronmikroskopischer Untersuchung. Die Beurteilung erfolgte im Vergleich zu zeitgleich ausgesäten humanen Osteoblasten, die mit dem Asc-2P- und Dexamethason-haltigem DMEM kultiviert wurden, sowie im Vergleich zu humanen Fibroblasten mit α -MEM als Kontrollkultur.

Bereits wenige Tage nach Austausch des Mediums ließen sich auch ohne Zellfärbungen lichtmikroskopische Unterschiede bei den Osteoblasten mit und ohne Mineralisationsmedium erkennen: Man konnte bei den zur Mineralisation stimulierten Zellen zunächst unregelmäßig große Verdichtungen bzw. Anhäufungen der Zellen beobachten, allerdings konnte man die einzelnen Zellen aufgrund der hohen Zelldichte nicht klar voneinander differenzieren. Außerdem zeigte sich eine im Laufe der Zeit zunehmende, schwarze „Körnung“, welche, wenn auch in deutlich geringeren Ausmaß, auch bei den in Kontrollmedium kultivierten hOb-C auftrat. Teilweise bildeten sich regelrechte Löcher im Zellrasen der zu Mineralisation stimulierten Zellen. Diese wurden mit der Zeit zunehmend größer, waren allerdings nicht bei allen Mineralisationsversuchen zu beobachten. Die in Kontrollmedium gewachsenen humanen Osteoblasten zeigten keine der genannten Phänomene. Sie schienen proliferationsfreudiger zu sein, da der Zellrasen dichter und regelmäßig erschien. Auch hier ließen sich einzelne Zellen nicht sicher voneinander unterscheiden, da diese sehr dicht und verzweigt wuchsen. Löcher im Zellrasen traten hier nicht auf. Mit zunehmenden Passagenalter der hOb-

C traten vereinzelt lipidartig aussehende Vakuolen auf. Abb. 16 a und b zeigen typische mikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast der gleichen vitalen Osteoblastenkultur mit und ohne Mineralisationsmedium.

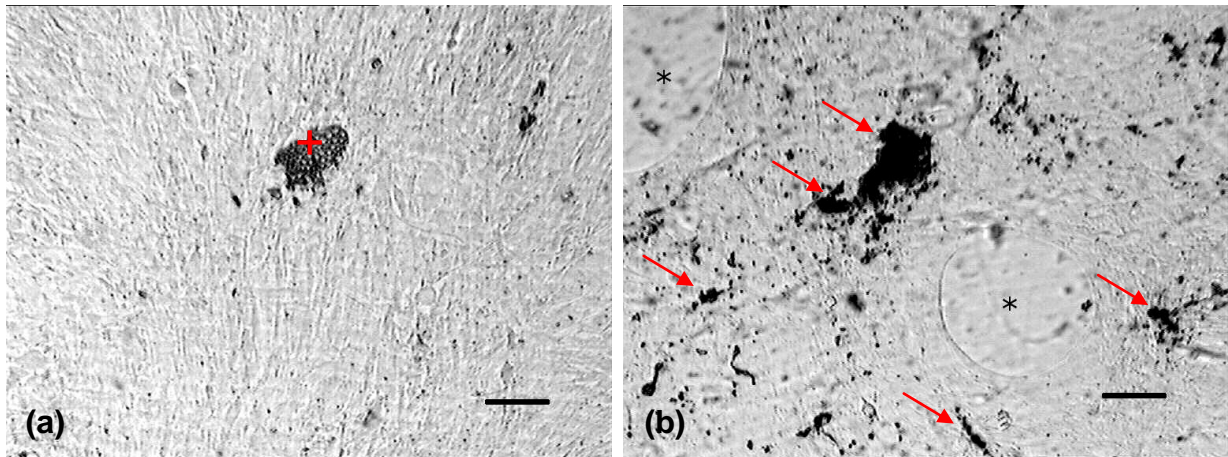


Abb. 16 Unterschiede von humanen Osteoblasten bei den Mineralisationsversuchen

Zellkultur: hOb-C, 6. Passage, Tag 24 nach Zellaussaat; Fotos zeigen Zellkultur nach 20 Tagen mit verschiedenen Nährmedien kultiviert, a) mit 50 μ M VC-2P und 0,10 μ M Dexamethason, b) mit Mineralisationsmedium. Es sind deutliche Unterschiede erkennbar: bei (a) homogener Zellrasen, vereinzelt Lipidvakuolen (+), bei (b) Löcher im Zellrasen (Sternchen) und schwarze Körnung (Pfeile).

Lebendkulturen, 4x-Vergrößerung mit Phasenkontrast, Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m.

3.3.1.1 Nachweis von *In-vitro*-Mineralisation mit Alizarin Rot-Färbung

Für den besseren Vergleich wurden die Zellen eines Versuches nach bestimmten Zeitpunkten (i.d.R. nach 21 Tagen mit Mineralisationsmedium) auf ihren Deckgläsern fixiert und anschließend gefärbt (Calcium-Nachweis mit *Alizarin Rot*-Färbung bzw. enzymatischer Nachweis der *alkalischen Phosphatase*) oder für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop getrocknet und mit einer dünnen Goldbeschichtung elektrisch leitfähig gemacht (vergl. Abschnitt 2.6.2 und 2.6.4.2).

Nach einer Gesamtdauer von ca. 20 Tagen unterschieden sich die Osteoblasten, welche mit Mineralisationsmedium inkubiert wurden, deutlich von den Referenzkulturen, also hOb-C mit Asc-2P/Dex-Medium und Fibroblasten. Besonders eindrucksvoll war dies bei dem Calciumnachweis mit der *Alizarin Rot-Färbung*, wie man Abb. 17 und entnehmen kann. Während sich bei den Referenzkulturen ohne Mineralisationsmedium sowie bei den Kontrollfibroblasten nach dem Färben lediglich eine unspezifische und minimale Färbung des Untergrundes zeigte, erschienen die zur Mineralisation stimulierten Osteoblastenkulturen kräftig rot angefärbt. Dabei bestanden diese intensiven Färbungen mikroskopisch aus einer Ansammlung verschieden großer, rotfarbener, punktförmiger Strukturen, die im gesamten Bereich der Deckgläschen verteilt zu finden waren und welche lokal mit den vor der Färbung beobachteten schwarzen Körnungen übereinstimmten. Die Untersuchungen mittels *REM* an Tag 20 (vergl. Abb. 18) zeigten wieder die bereits ohne Färbung beobachteten „Löcher“ im Zellrasen bei den zur Mineralisation stimulierten hOb-C. Bei den nicht stimulierten Osteoblasten konnte man die bei höheren Passagen auftretenden lipidartigen Vakuolen finden. Ansonsten ergab die REM-Untersuchung keine großen Unterschiede zwischen den Zellkulturen, da diese sehr dicht erschienen und keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Oberflächenstruktur zeigten. Die zahlreichen im Lichtmikroskop beobachteten körnigen Strukturen konnten so in den REM-Aufnahmen nicht wiedergefunden werden, da der Zellrasen sehr dicht gewachsen und sich die gesuchten, körnigen Strukturen vermutlich in den tieferen Schichten des Zellrasens befunden haben mussten.

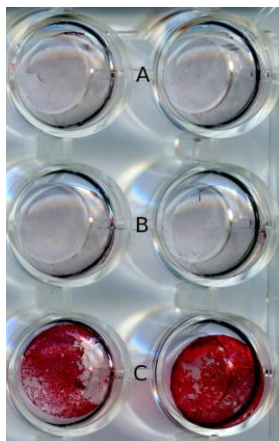


Abb. 17 Mineralisationsnachweis mit Alizarin-Rot

An Tag 20 nach Zellaussaat in 24-Well-Platte durchgeführte Alizarin-Rot-Färbung. Doppelbestimmung. Kontrollfibroblasten F128/2, Passage 6 kultiviert in α -MEM (A); primäre Osteoblastenkultur hOb-C, Passage 6 kultiviert in DMEM mit Asc-2P und Dex (B) und hOb-C, Passage 6 kultiviert in Mineralisationsmedium von Promocell (C). Ein 24-Well hat einen Durchmesser von 16 mm.

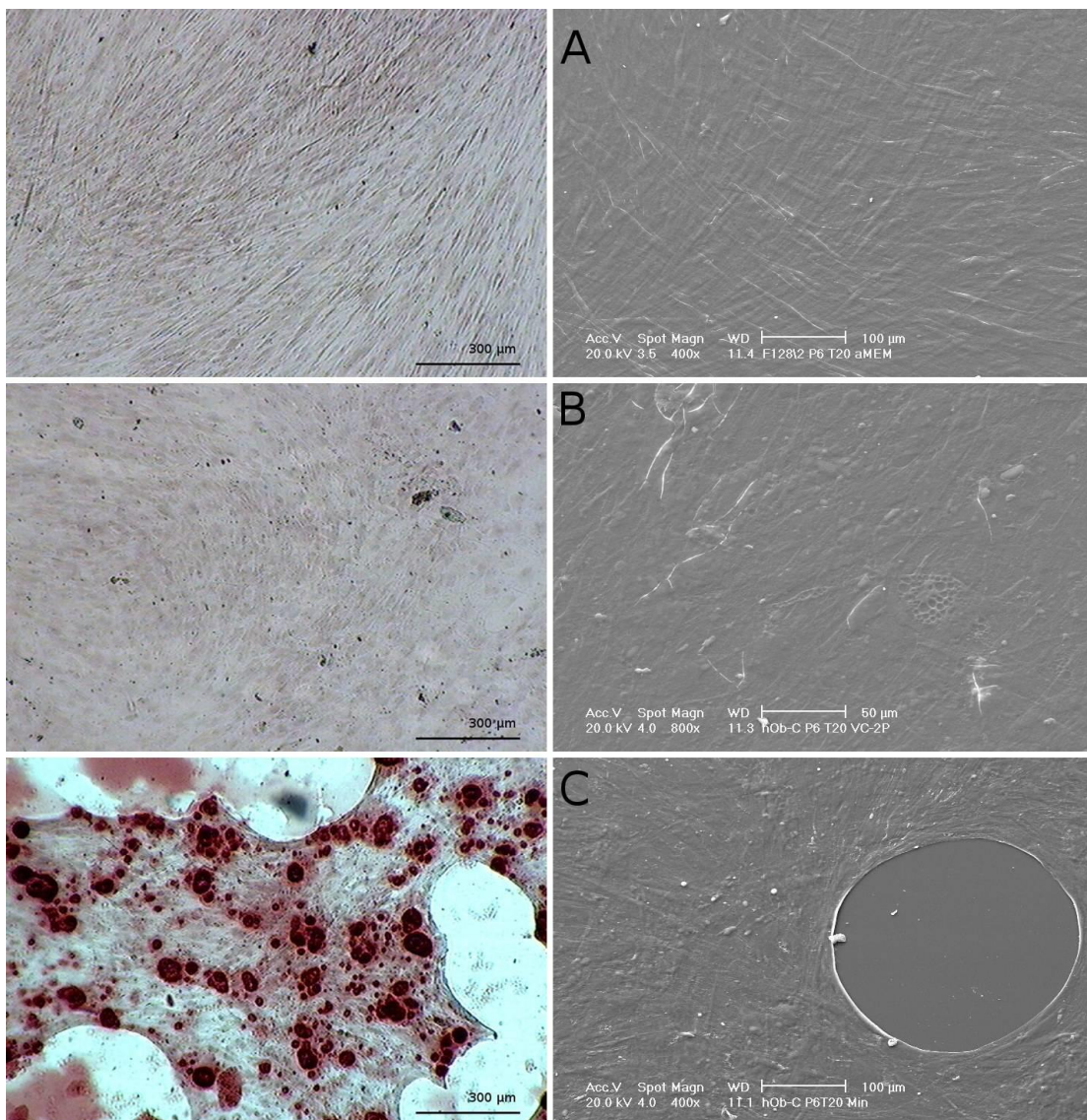


Abb. 18 Alizarin Rot Färbungen und REM-Aufnahmen

Tag 20 nach Zellaussaat: Fibroblasten F128/2, Passage 6 kultiviert in α -MEM (A); hOb-C, Passage 6 kultiviert in DMEM mit Zusatz von $50\mu\text{M}$ Asc-2P und $0,1\mu\text{M}$ Dex (B); hOb-C, Passage 6 kultiviert in Mineralisationsmedium von Promocell (C).

Der Maßstabsbalken bei den Aufnahmen der Alizarin-Färbung entspricht $300\mu\text{m}$.

3.3.1.2 Nachweis von *Alkalischer Phosphatase*

Bei den Untersuchungen zur Mineralisation war auch der Nachweis von *alkalischer Phosphatase* (ALP) vorgesehen, wie unter Abschnitt 2.6.2.2 beschrieben. Es sollte hierfür, wie zuvor bei der Alizarin-Rot-Färbung, untersucht werden in wieweit sich ALP qualitativ nachweisen lässt bei der zur Mineralisation stimulierten, primären Osteoblastenkultur (hOb-C). Zum Vergleich kamen wiederum humanen Osteoblasten, die mit Vitamin-C-haltigem DMEM kultiviert wurden, sowie humanen Fibroblasten mit α -MEM als Kontrollkultur zum Einsatz. Erwartet wurde, dass sich bei der Färbung der Fibroblasten (F128/2), also der Negativkontrolle, kein violette Reaktionsprodukt bilden würde, welches als positiver Nachweis von ALP galt. Die Fibroblasten waren nach 21 Tagen in Kultur allerdings ebenfalls wie die Osteoblasten positiv angefärbt. Zum Ausschluss eines falsch-positiven Ergebnisses wurde der Versuch wiederholt; dabei wurden diesmal aber weitere Färbungen zum Nachweis von ALP an früheren Zeitpunkten (an den Tagen 2, 5, 9, 12, 19 und 26 nach Aussaat) durchgeführt. Zusätzlich wurde eine weitere, im eigenen Labor etablierte Fibroblasten-Kulturen (F133) verwendet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen dieser Färbungen sind in Abb. 19 zusammengestellt. Es konnte eine „positive“ violette Färbung des Zytoplasmas bei den Osteoblasten mit und ohne Mineralisationsstimulation beobachtet werden, die bei den Zeitpunkten T2 und T5 nur bei einigen Osteoblasten nachweisbar (etwa 20-40 %) war; bei zunehmender Zellkonfluenz nahm die Anzahl der ALP-positiven Zellen zu (Tag 5 vs. 26). Dabei konnten zwischen den beiden Osteoblasten (mit bzw. ohne Stimulation mit Mineralisationsmedium) keine Unterschiede hinsichtlich der Anzahl ALP-positiver Zellen und der Farbtintensität festgestellt werden.

Die beiden Fibroblasten-Kulturen hingegen unterschieden sich deutlicher. Zwei Tage nach Aussaat waren beide noch eindeutig blau gefärbt, also ALP-negativ. Von Tag 12 bis 26 gab es bei den F128/2 eine stetige Zunahme einzelner violett gefärbter Zellen. Diese erreichten zwar auch am T26 nicht die Intensität der hOb-C, konnten aber wiederum eindeutig als „ALP-positiv“ eingestuft werden (vergl. Abb. 19). Die jüngere Fibroblastenkultur F133 war bei allen untersuchten Zeitpunkten prinzipiell ALP-negativ. Hier waren lediglich einzelne, violett angefärbte Zellen auf der Unterseite der Deckgläser zu beobachten, wohin sie im Laufe der Anzucht eingewandert waren; sie sind als Artefakte des Färbevorgangs einzuordnen (vergl. Abb. 19; F133 an Tag 19).

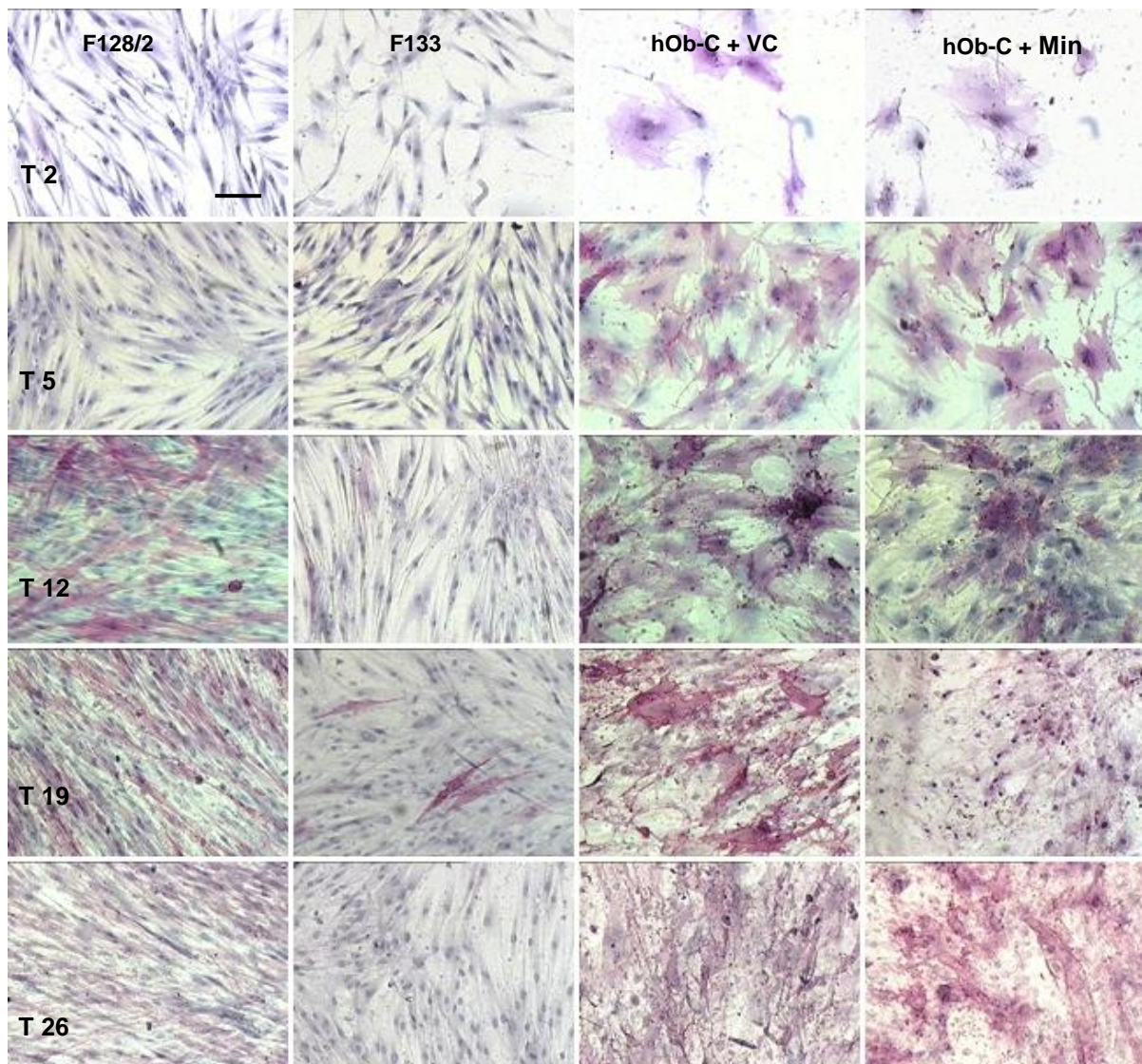


Abb. 19 Mineralisationsnachweis mit Alkalische Phosphatase Färbungen

Gefärbt und fotografiert an Tag 2, 5, 12, 19 und 26 nach Zellaussaat. F128/2 bzw. F133 = Kontroll-Fibroblasten, kultiviert in α - MEM; hOb-C + VC= kultiviert in DMEM plus Vitamin-C und Dexamethason; hOb-C + Min = ab 100% Konfluenz kultiviert in Mineralisationsmedium der Fa. Promocell.

Der Maßstabsbalken im ersten Bild entspricht 100 μ m und gilt für alle Ausschnitte.

3.3.2 Untersuchungen zur Zytoverträglichkeit der Hydroxylapatit-Beschichtungen

Es war zunächst vorgesehen, die in Abschnitt 3.3.1 charakterisierten, primären Osteoblasten (hOb-C) für sämtliche *In-vitro*-Untersuchungen der HAp-Beschichtungen zu verwenden, allerdings war diese Zellen lediglich für den indirekten Zytoverträglichkeitstest (XTT-Assay) zahlenmäßig ausreichend. Die Untersuchungen zur Proliferation (Direkttest) wurden daher

neben den SAOS-2 (Osteoblasten-Zelllinie) mit den im eigenen Labor etablierten, primären Osteoblasten (O-139) durchgeführt.

3.3.2.1 Zytotoxizitätsuntersuchungen mittels XTT-Assay

Um die in dieser Studie hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen auf eine potentielle Zytotoxizität hin beurteilen zu können, wurde deren Zellverträglichkeit indirekt anhand ihrer Eluate untersucht. Dafür kam ein dreitägiger Biotoxizitätsassay mit dem *Tetrazoliumsalz XTT* (vergl. Abschnitt 2.6.3) zur Anwendung. Es wurden damit die zellulären Reaktionen von primären Osteoblasten (*hOb-C*) und einer Osteoblasten-Zelllinie (*SAOS-2*) in Anwesenheit der hergestellten Eluate der Hydroxylapatit-Beschichtungen (*Chargen 1-3*) untersucht. Vergleiche erfolgten mit einer Kontrolle der HAp-Eluate (*Kontrolle b*), einer Negativkontrolle mit Medium *DMEM (NK)* sowie einer Positivkontrolle mit Kupfersulfat. Die HAp-Eluate wurden auf den Osteoblasten-Kulturen über eine 24-stündige Einwirkzeit getestet. Danach wurde den Platten die XTT/PMS-Lösung zugegeben und der XTT-Umsatz in das orangefarbene Formazan nach drei Stunden photometrisch ausgewertet. Abb. 20 zeigt das typische Aussehen einer Mikrotiterplatte nach der Umsetzung von XTT in XTT-Formazan. Die Ergebnisse eines Zytotoxizitätsassays wurden zunächst einer Leerwertkorrektur unterzogen (d.h. Extinktion von Testansatz in Anwesenheit von Zellen minus Extinktion des jeweiligen Testansatz ohne Zellen) und dann in Relation zur plattenspezifischen



Abb. 20 Belegung einer Mikrotiterplatte im XTT-Test

Die vier linken Spalten wurden nicht mit Osteoblasten bestückt, daher wurde hier auch kein XTT in orangefarbenes Formazan umgesetzt. Diese Spalten dienen der Ermittlung des jeweiligen Leerwertes. NK = Negativkontrolle mit A. bidest., EL1 bzw. EL2 = Eluate der HAp-Charge 1 bzw. 2, BL (Blank) = Eluat von Kontrolle b.

Negativkontrolle ($NK = 100\%$) gesetzt. Die Werte der relativen optischen Dichten wurden anschließend gemittelt. Die Überprüfung der Testgruppen auf Mittelwertsunterschiede erfolgten gegen NK mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) bzw. Kruskal-Wallis-Rangsummentest und post-hoc-Gruppenvergleich nach Dunn.

Die Auswertung des Zytotoxizitätsassays ergab für *Kontrolle b* (Eluat von nicht-beschichteten Objektträgern) mit beiden verwendeten Osteoblasten-Kulturen einen jeweils nicht-signifikant Unterschied zur Mediumkontrolle NK ($p < 0,05$). Die Mittelwerte betragen $104,7\% \pm 9,04$ für SAOS-2 und $100,2\% \pm 6,43$ für hOb-C.

Die getesteten Eluat-Chargen von Hydroxylapatit-Beschichtungen (*HAp-Chargen 1-3*) auf Glasobjektträgern ergaben sowohl in Anwesenheit der Zelllinie SAOS-2 als auch bei den primären Osteoblastenzellkultur hOb-C annähernd ähnliche optische Dichten (rel. OD) wie die unbeeinflussten Zellen der Mediumkontrolle (=100%). Dabei lag der niedrigste Wert der HAp-Beschichtungen bei $92,1 \pm 2,96$ (HAp-Charge 1 mit SAOS-2) und der höchste Wert bei $107,8 \pm 7,93$ (HAp-Charge 3 mit SAOS-2); diese beiden Grenzwerte waren gleichzeitig die beiden einzigen Mittelwerte, bei welchen sich signifikante Unterschiede zu NK feststellen ließen. Die Ergebnisse der XTT-Tests mit der hOb-C-Zellkultur wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Eluaten der HAp-Beschichtung (*HAp-Chargen 2-3*) und der Mediumkontrolle auf. Das Eluat der HAp-Charge 1 konnte mit diesen Zellen aufgrund zahlreicher Vorversuche allerdings nicht mehr zuverlässig bestimmt werden.

Die als Positivkontrolle gewählte Testlösung wirkte wie erwartet wachstumshemmend auf die Zellen (SAOS-2), was sich durch eine stark verminderte Formazan-Bildung aus XTT und damit in einer ausgeprägten Abnahme der Absorption zeigt. Die relative optische Dichte lag für diese Kupfer(II)-Sulfat-Lösung bei $42,3\% \pm 7,54$ und wirkte damit mäßig zytotoxisch auf die Osteoblastenzelllinie. Sie wurde lediglich zur Kontrolle des allgemeinen Testverfahrens bestimmt und dementsprechend nicht bei den statistischen Tests einbezogen. Die Ergebnisse dieses *In-vitro*-Zytotoxizitätstests mittels XTT sind getrennt nach den untersuchten Osteoblastenkulturen SAOS-2 und hOb-C in Tabelle 7 zusammengefasst und in Abb. 21 als Diagramme dargestellt.

Tabelle 7 Übersicht der Ergebnisse der XTT-Zytotoxizitätsassays

SAOS-2 und hOb-c = verwendetet Osteoblasten-Kulturen, Rel. OD = Relative optische Dichte SD = Standardabweichung, NK= Negativkontrolle mit Medium (rel OD=100%), OT = Glas-Objektträger, HAp-Charge1-3 = Eluate der Hydroxylapatit-Beschichtungs-Chargen auf OT, Kontrolle b = Eluat mit unbeschichteten OT, n= Anzahl der Stichproben (=Vertiefungen mit Zellen), PK= Positivkontrolle bzw. Kitkontrolle mit CuSO₄-Lösung in PBS; PK wurde nicht auf Signifikanz geprüft (Konzentration in Zellkultur 10 mg/l). k.A. = keine Angabe, das Eluat der HAp-Charge 1 konnte mit hOb-C aufgrund zahlreicher Vorversuche nicht zuverlässig bestimmt werden. Signifikanz zu NK: * = p<0,05; *** = p<0,001.

| Testsubstanz | SAOS- 2 | | hOb-C | |
|-----------------------|----------------------|----|----------------------|------|
| | rel. OD ± SD [in %] | n | rel. OD ± SD [in %] | n |
| Mediumkontrolle (NK) | 100 ± 5,54 | 41 | 100 ± 5,27 | 27 |
| Kontrolle b | 104,7 ± 9,04 | 26 | 100,2 ± 6,43 | 28 |
| HAp-Charge 1 | 92,1 ± 2,96 * | 8 | k.A. | k.A. |
| HAp-Charge 2 | 93,6 ± 7,10 | 6 | 100,8 ± 6,11 | 10 |
| HAp-Charge 3 | 107,8 ± 7,93 *** | 22 | 97,7 ± 4,81 | 27 |
| Positivkontrolle (PK) | 42,3 ± 7,54 | 22 | --- | --- |

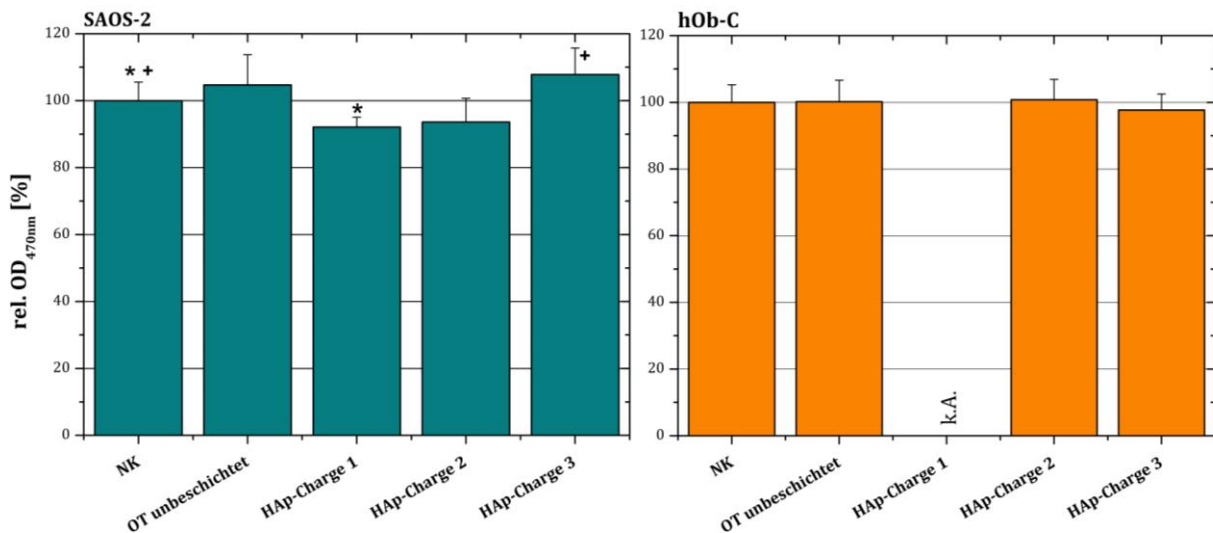


Abb. 21 Diagramm der Ergebnisse des XTT-Assay mit SAOS-2 Zellen und hOb-C

rel. OD = optischen Dichte in Relation zur Negativkontrolle in %, gemessen bei 470 nm; OT unbeschichtet = Kontrolle b (Eluat von unbeschichteten Glas-Objektträgern); HAp-Charge 1-3 = Eluate von Hydroxylapatit-beschichteten Glas-Objektträgern; +, * = signifikant zu NK; k.A. = keine Angabe, vergl. Tabelle 7.

3.3.2.2 *In-vitro*-Direkttests der Hydroxylapatit-Beschichtungen

Weitere *In-vitro*-Versuche mit der hergestellten HAp-Beschichtung waren die Untersuchungen von direkt auf HAp-Proben ausgesäten Zellen. Dafür wurden die Osteosarkom-Zelllinie (SAOS-2) und primären Osteoblasten (O139) verwendet. Es sollte hierbei auf eventuelle Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen auf den HAp-Beschichtungen im Vergleich zu anderen Kontroll-Oberflächen untersucht werden.

Für die **Versuche mit der Zelllinie SAOS-2** im Direktkontakt mit den hergestellten HAp-Beschichtungen wurden diese wie in Abschnitt 2.6.4 beschrieben auf den HAp-Beschichtungen und Kontrolloberflächen ausgesät und in den üblichen Bedingungen der Zellkultur gezüchtet (vergl. Abschnitt 2.6.1). Nach je 24, 72 oder 120 h wurden die Zellen fixiert und licht- sowie rasterelektronenmikroskopisch auf morphologische Unterschiede hin untersucht. Als Kontrollen dienten auf unbeschichtetem Aluminiumblech, sowie auf Thermanox-Deckgläsern ausgesäte Zellen. Als Positivkontrolle wurden Kupferbleche verwendet. Mittels Giemsa-Färbung wurden die Zellen auf den Proben gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht.

Nach Aussaat und Adhäsion proliferierten die Zellen sehr schnell auf allen Substraten mit Ausnahme der Kupferbleche. Wie in Abb. 22 und Abb. 23 zu sehen ist, konnte man dabei keine deutlichen Unterschiede zwischen den HAp-, NK- und Alu-Substraten finden. Alle drei zeigten eine zunehmende Konfluenz im Zeitverlauf. Bei allen drei Proben zeigten die Zellrasen nach 24 Stunden eine ca. 50-60 % und nach 72 Stunden bereits nahezu vollständige Konfluenz.

Bei den entsprechend zeitgleich durchgeführten morphologischen Untersuchungen mittels REM (siehe Abb. 24) konnte man ebenfalls erkennen, dass sich die SAOS-2 im Zeitverlauf stark vermehrten. Insbesondere bei der Negativkontrolle zeigte sich, dass die Zellen nach 72 Stunden bereits sehr gedrängt und nach 120 Stunden bereits mehrlagig wuchsen; zudem waren diese Zellkörper auch zunehmend kleiner und schmaler im Vergleich zu denen nach 24 Stunden. Nach 120 h konnte man bei den HAp-Oberflächen noch stellenweise die Beschichtung erkennen. Die Morphologie der SAOS-2 Zellen war typisch für diese Zellart und gab keinen Hinweis auf Zytotoxizität. Die Zellen schienen regelrecht mit der HAp-Beschichtung zu verwachsen, wie der Ausschnitt eines Zellkörpers auf einer HAp-Beschichtung 120h nach Aussaat zeigt (s. Abb. 25); die Zellen bildeten feinste Zellausläufer, die sich an die hergestellte HAp-Oberfläche angelagert hatten.

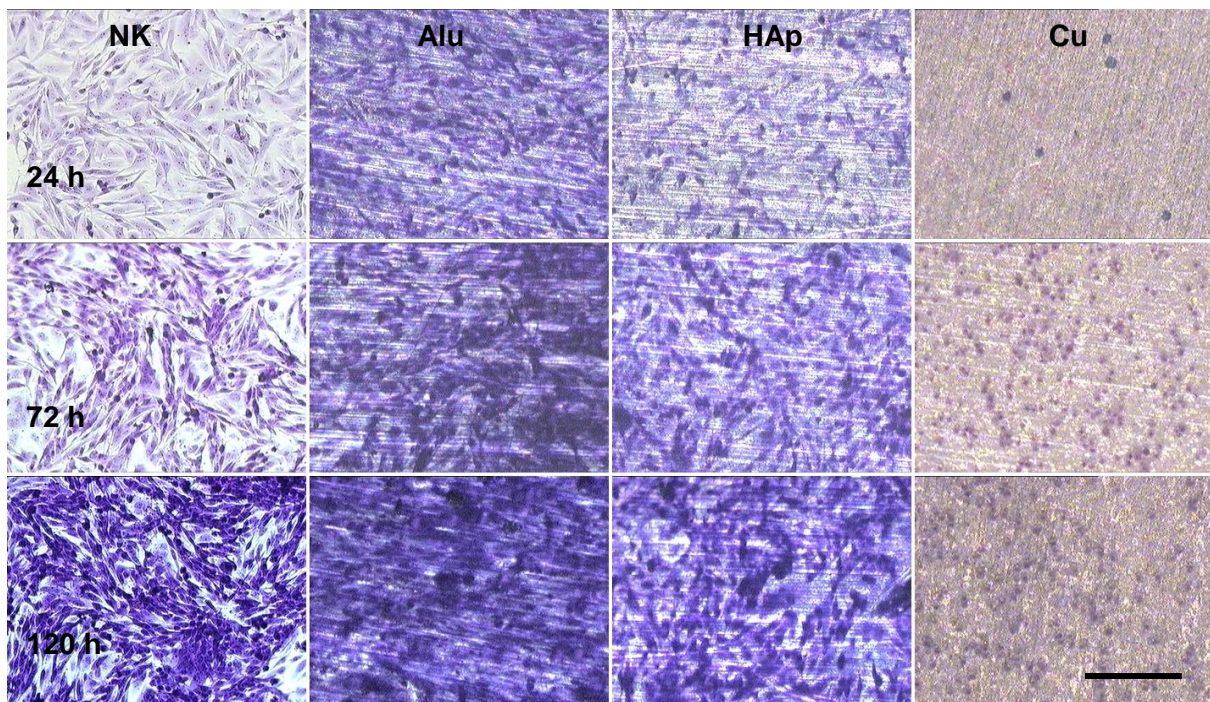


Abb. 22 *In vitro*-Direkttest mit SAOS-2 Zellen auf Hydroxylapatit-Beschichtung

Die Zellen wurden direkt ausgesät auf Thermanox-Deckgläschen (NK), Aluminium-Plättchen (Alu), HAp-beschichteten Aluminiumplättchen (HAp) und Kupferplättchen (Cu). Giemsa Färbung nach 24, 72 und 120 h.

Der Maßstabsbalken entspricht 200µm und gilt für alle Ausschnitte.

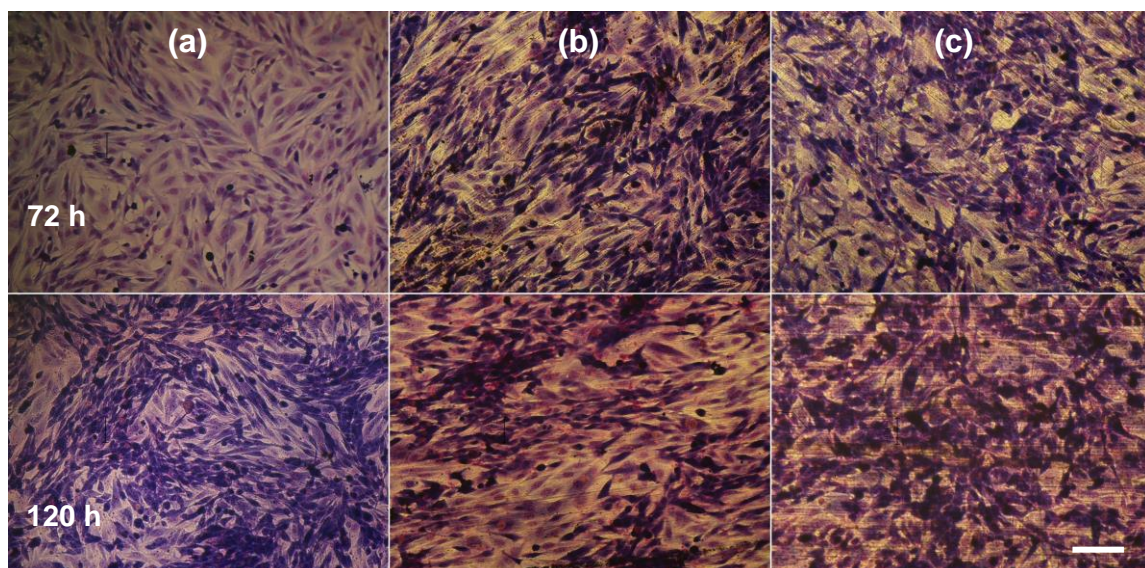


Abb. 23 *In vitro*-Direkttest mit SAOS-2 Zellen auf Hydroxylapatit-Beschichtung

Giemsa Färbungen 72h und 120 h nach Aussaat auf Thermanox-Deckgläschen (a), Aluminium-Plättchen (b), HAp-beschichteten Aluminiumplättchen (c). Dieselben Proben, wie in Abb. 22 gezeigt, hier in höherer Auflösung.

Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm und gilt für alle Ausschnitte.

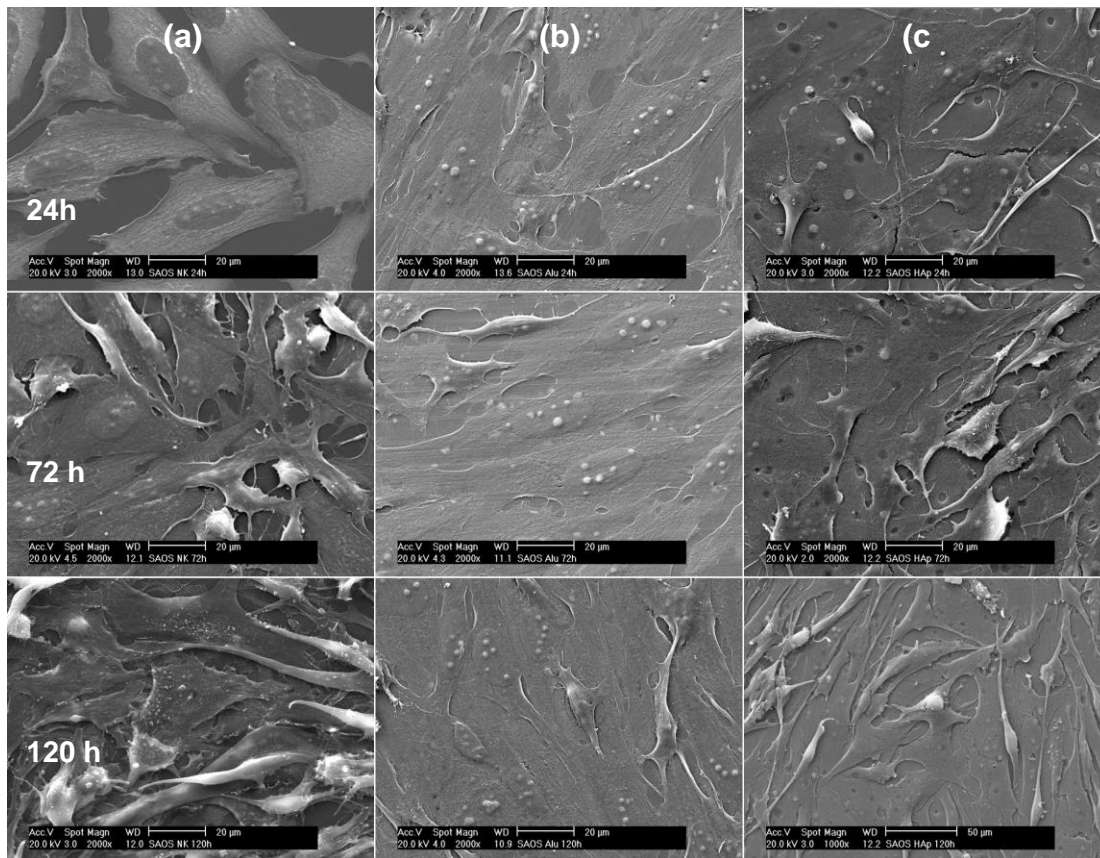


Abb. 24 REM-Aufnahmen vom Direkttest der HAp-Beschichtungen mit SAOS-2-Zellen

Zellen nach 24h, 72h und 120h auf Thermanox-Deckgläschen (a), Aluminium-Plättchen (b), HAp-beschichteten Aluminiumplättchen (c). Die Maßstabsbalken entsprechen 20µm bzw. 50µm.

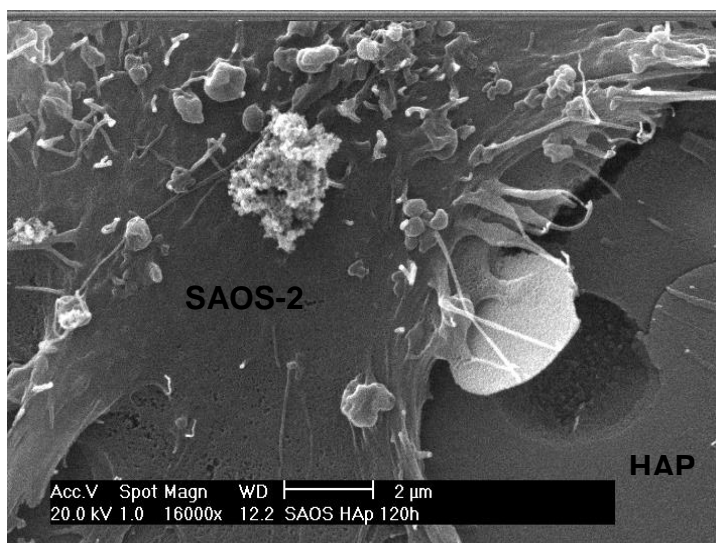


Abb. 25

REM-Aufnahme Direkttest

Ausschnitt eines Osteoblasten (SAOS-2) auf der Oberfläche einer HAp- Beschichtung 120h nach Aussaat. Man erkennt feinste Zellausläufer, die sich hier an einem HAp-„Deckel“ angelagert haben.

ERGEBNISSE

Der zuvor beschriebene Direkttest zur *In-vitro*-Untersuchung der Zytoverträglichkeit der HAp-Beschichtungen wurde mit **primären Osteoblasten (0-139)** wiederholt (s. Abb. 26). Man konnte, wie schon beim entsprechenden Versuch mit der Osteosarkom-Zelllinie, erkennen, dass sich die primären Osteoblasten im Zeitverlauf stark vermehrten. Nach 24h konnte man bereits bei allen Proben eine sehr gute Zell-Adhärenz erkennen. Es bestand eine etwa 50-60 %-ige Konfluenz bei deutlich freiliegender Proben-Oberfläche. Bei der HAp-Oberfläche erschienen die Osteoblasten im Vergleich zu den anderen Proben etwas größer bzw. flächiger ausgebreitet; die von Poren durchsetzte Oberfläche ließ sich einwandfrei beobachten. Nach 72h konnte man nur noch stellenweise die Oberflächen erkennen. Bei allen Proben, insbesondere aber bei den HAp-Proben, lag die Zell-Konfluenz nun bei über 90 %. Zum Zeitpunkt 120 h nach Aussaat konnte man bei allen drei getesteten Oberflächen die einzelnen Zellen nicht mehr sicher voneinander unterscheiden, da sie einen dicht gedrängten, homogenen Zellrasen bildeten.

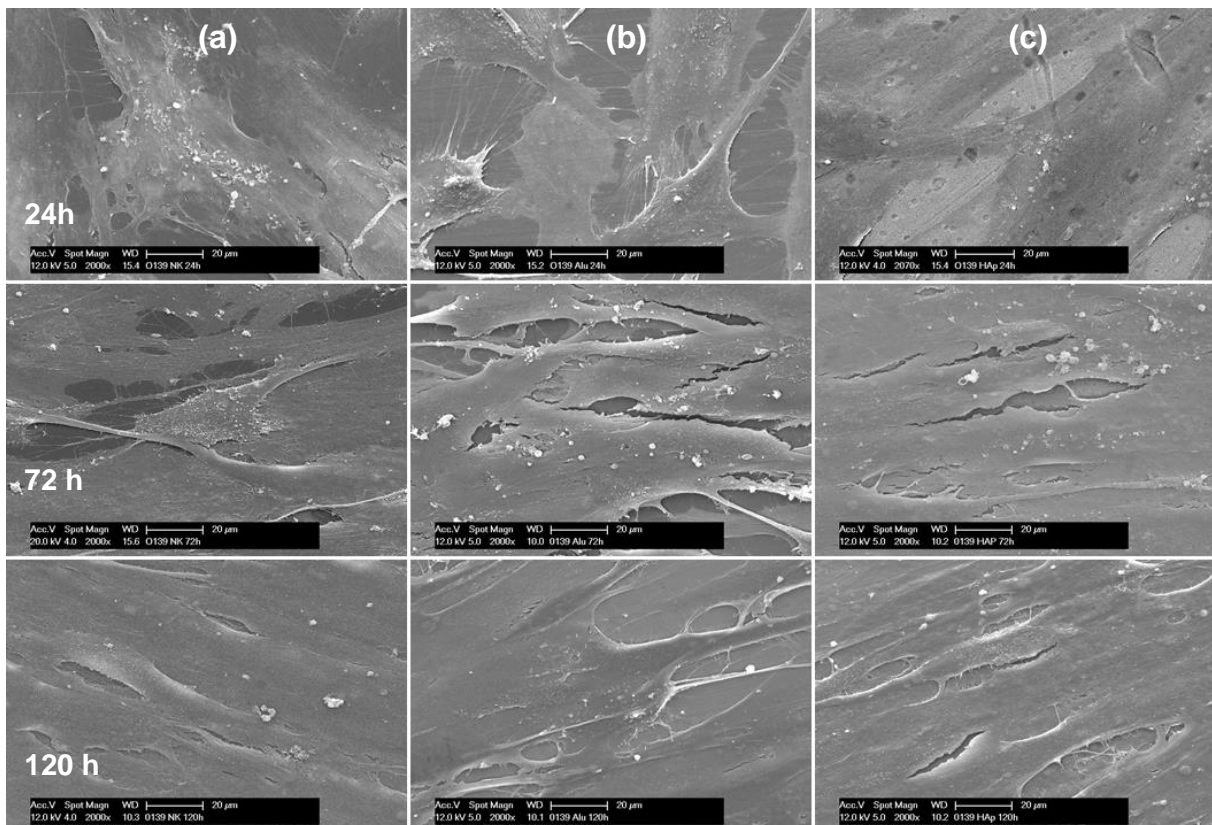


Abb. 26 REM-Aufnahmen von primären Osteoblasten 0-139 im Direktkontakt mit HAp

Zellen nach 24h, 72h und 120h auf Thermanox-Deckgläschen (a), Aluminium-Plättchen (b), HAp-beschichteten Aluminiumplättchen (c); die Maßstabsbalken entsprechen 20µm.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Beschichtungen aus Hydroxylapatit wurden mittels *Sol-Gel-Methode* hergestellt und konnten zuverlässig mittels Tauchzieh- und Aufschleuder-Verfahren auf verschiedene Substrate (Aluminium und Glasobjektträger) aufgebracht werden. REM-Untersuchungen der HAp-Beschichtungen konnten gleichmäßige, mit Poren durchsetzte nanorauhe Oberflächen zeigen. Kristallografische Untersuchungen mittels Raman- und XRD-Analysen wiesen eine hohe qualitative und quantitative Reinheit dieser HAp-Beschichtung nach. Kontaktwinkelmessungen charakterisierten eine ausgeprägt hydrophile Eigenschaft (seitlicher Winkel $< 15^\circ$) der HAp-Oberflächen im Vergleich zur unbeschichteten Kontrolloberfläche. Eluate von HAp-beschichteten Gläsern (Extraktion in Aqua dest. bei 37°C für mind. 72 h) wurden auf ihre Konzentration von Calcium- und Phosphat-Ionen getestet. Es konnten dabei eine deutlich erhöhte Phosphat- und Calcium-Ionen-Konzentration gegenüber Kontrollen festgestellt werden.

Charakterisierende Vorversuche zur *In-vitro*-Mineralisation von primären Osteoblasten (hOb-C) kultiviert mit einem kommerziellen Mineralisationsmedium konnten zeigen, dass diese Zellen dazu in der Lage sind, Calcium-haltige Extrazellulärmatrix zu produzieren (*Alizarin-Rot-Färbung*); indes gelang dies nicht durch Kultivierung dieser Zellart in DMEM-Medium und Zusatz von L-Ascorbinsäure-2-Phosphat und Dexamethason. Ein qualitativer Nachweis von alkalischer Phosphatase konnte in der hOb-C-Kultur erbracht werden; dabei konnten keine Unterschiede festgestellt werden zwischen den Kulturen mit Mineralisationsmedium und DMEM mit Asc2P/Dex. Die hOb-C waren somit als Osteoblasten charakterisiert und für die folgenden Versuche zur Zytoverträglichkeit der hergestellten HAp-Beschichtungen geeignet. Dafür wurde das zytotoxische Potential der HAp-Eluate quantitativ mittels XTT-Test untersucht. In Anlehnung an ISO-Norm 10993-5 wurde dieser Test an einer Osteoblasten-Zelllinie (SAOS-2) sowie an primären Osteoblasten (hOb-C) durchgeführt; die Umsatzrate von XTT-Formazan entsprach $> 90\%$ im Vergleich zu Negativkontrollen und wies damit auf eine hohe *In-vitro*-Bioverträglichkeit der HAp-Beschichtungen hin. Qualitative, morphometrische Analysen erfolgten mit zwei Osteoblasten-Kulturen (SAOS-2 und O-139) in Direktkontakt auf HAp-beschichteten Substraten im Vergleich zu Kontrolloberflächen. Die dünnen und hydrophilen HAp-Beschichtungen wiesen auch hier eine gute *In-vitro*-Bioverträglichkeit auf. Die Zellen zeigten ein ungestörtes Wachstumsverhalten bei normaler Morphologie.

4 DISKUSSION

Um die Einheilung von nicht resorbierbaren Biomaterialien, wie beispielsweise enossalen Implantaten, im Knochen zu optimieren, kann man deren Oberfläche entweder morphologisch-physikalisch oder chemisch verändern (Williams 2011; Le Guéhenec et al. 2007). Bereits seit mehr als 20 Jahren wird extensiv mit diversen Oberflächenbeschichtungen aus bioaktiven Calciumphosphaten, wie Hydroxylapatit, geforscht (Junker et al. 2009; Nayak 2010). Sie gelten als vielversprechende Möglichkeit der Oberflächenoptimierung von Implantatwerkstoffen, da auf diesen Oberflächen eine schnellere und anfänglich verlässlichere biologische Integration im Vergleich zu unbeschichteten Titanoberflächen nachgewiesen werden konnte (Barrere et al. 2003; Tinsley 2001). Ebenfalls zeigten sich in klinischen Studien über 36 Monate HAp-beschichtete Implantate in Fällen von ungenügender Knochenqualität am Implantationsort unbeschichteten Titanimplantaten überlegen (Morris und Ochi 1998; Truhlar et al. 2000). Der Einsatz von HAp-beschichteten Implantaten werden in der Zahnmedizin allerdings kontrovers diskutiert und haben sich im klinischen Gebrauch bislang nicht in dem Maße durchsetzen können, wie konventionelle Titan-Implantate und deren zahlreich erhältlichen Oberflächenmodifikationen (z.B. durch Sandstrahlen oder Säureätzung). Der teilweise schlechte Ruf von Hydroxylapatit-beschichteten Implantaten rührt von diversen klinischen Studien her, welche verminderte Überlebensraten dieser Implantate *in situ* über eine Dauer von etwa 6- 8 Jahren zeigten (Tinsley 2001; Wheeler 1996). Der Hauptgrund für die erhöhten Implantatverluste wurde dabei im klinischen Versagen der mittels Plasmaspraying hergestellten Beschichtungen gesehen; dies lag zum einen an zu hohen Schichtstärken und zum anderen an der Diskrepanz der Löslichkeit zwischen amorphen und kristallinen Phasen von Hydroxylapatit in den Beschichtungen, welche zur Delamination von kleinsten Teilchen der Beschichtungen geführt haben sollen (Junker et al. 2009; Whitehead et al. 1993). Diese Gründe führten zur Entwicklung zahlreicher, teilweise noch experimenteller Verfahren zur Herstellung von deutlich dünneren und höher kristallinen Hydroxylapatit- bzw. Calciumphosphat-Beschichtungen (Juhász und Best 2011; Junker et al. 2009; Lacefield 1998).

Eine dieser experimentellen Methoden ist die Sol-Gel-Methode, welche in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kam. Dabei wurde aus den Ausgangsstoffen Triethylphosphat und Calciumnitrat-Tetrahydrat ein Hydroxylapatit-Sol synthetisiert. Dieses wurde mittels Tauchzieh- und Aufschleuder-Verfahren auf Oberflächen von Testsubstraten aufgebracht und kalzi-

fiziert. Mittels diverser qualitativer und quantitativer Analyseverfahren erfolgte der Nachweis von Hydroxylapatit in den dünnen Oberflächenbeschichtungen. Kontaktwinkelmessungen wurden zur Bewertung des Benetzungsverhaltens der HAp-Beschichtungen durchgeführt. Ein Extraktions-Test gab Aufschluss über die Löslichkeit von Ionen aus den Beschichtungen. Die hergestellten HAp-Beschichtungen wurden anschließend auf ihre *In-vitro*-Bioverträglichkeit mittels indirekter Zytotoxizitätstests (XTT) und im Direktkontakt mit unterschiedlichen Osteoblasten-Zellkulturen untersucht. In einer charakterisierenden Vorstudie wurden primäre Osteoblasten mit Hilfe eines speziellen Mineralisationsmediums zur *In-vitro*-Mineralisation stimuliert, und die Zellkulturen anschließend im Vergleich zu nicht stimulierten Osteoblasten und Kontroll-Fibroblasten untersucht.

4.1 Die Synthese von Hydroxylapatit mittels Sol-Gel-Methode

Die Synthese von Hydroxylapatit-Beschichtungen mittels *Sol-Gel-Methode* wurde von verschiedenen Forschungsgruppen experimentell untersucht. Dabei unterscheiden sich die Arbeiten in zahlreichen Prozessparametern, wie u.a. in der Auswahl der Prekursoren, der Alterungszeiten und Sintertemperaturen. Breme et al. verwendeten beispielsweise für die Herstellung ihres HAp-Sols gelöstes Calciumoxid (CaO) und Trimethylphosphat bzw. Triethylphosphat und stellten etwa 1 μm dünne HAp-Beschichtungen mittels *Dip-Coating* her. Sie fanden eine höhere Kristallinität der HAp-Schichten bei Temperaturbehandlung mit 800 °C im Vergleich zu 600 °C (Breme et al. 1995). Weng und Baptista beschrieben 1998 ein HAp-Sol, hergestellt mit Calciumnitrat-Tetrahydrat und Diphosphorpentoxid (P_2O_5) als Prekursoren. Die auf Aluminiumoxid-Substrate mittels *Dip-Coating* aufgebracht und bei 750 °C gesinterten Beschichtungen waren etwa 2 μm dünn und wiesen eine gute Kristallinität sowie Adhäsionsfestigkeit auf. Allerdings wurden auch Spuren von β -Tricalciumphosphat nachgewiesen (Weng und Baptista 1998a,b). In zahlreichen von Liu et al. veröffentlichten Studien wurde über die Entwicklung eines HAp-Sols aus Triethylphosphat und Calciumnitrat-Tetrahydrat mit destilliertem Wasser als Lösungsmittel berichtet. Dabei wurde sich intensiv mit verschiedenen Prozessparametern, wie z.B. unterschiedlichen Alterungszeiten und Sintertemperaturen, befasst. Allerdings wiesen die verschiedenen HAp-Beschichtungen immer wieder auch Spuren von amorphem Calciumoxid und/oder β -Tricalciumphosphat auf. Nach Temperaturbehandlungen um 400 - 500 °C traten auch deutliche Mini-Risse auf; trotzdem lag die Adhäsionsfestigkeit dieser Beschichtungen mit etwa 44 MPa deutlich über

der von Plasmaspray-Beschichtungen (etwa 30 MPa) (Liu et al. 2001 und 2002a-e). Die Hauptvorteile der Sol-Gel-Methode fanden Liu et al. dabei vor allem in dem chemisch fein justierbaren Herstellungsprozess, dessen abschließende Sinterungsphase bei etwa 500 °C keine allzu hohen Temperaturen benötigt. Als weitere Vorteile führt er die mikrostrukturelle und chemische Phasenstabilität der dünnen HAp-Schichten auf sowie die Möglichkeit, selbst komplexe geometrische Strukturen beschichten zu können (Liu et al 2002a). Balamurugan et al. verwendeten ebenfalls Triethylphosphat und Calciumnitrat-Tetrahydrat als Ausgangsstoffe für ein hochreines HAp-Sol, welches bei 60 °C zur Gel-Form getrocknet, zu Pulver zerstoßen und dann bei verschiedenen Temperaturen (300 - 900 °C) gesintert wurde. Wegen der relativ niedrigen Temperaturen, die für die Herstellung von hochreinen, stöchiometrischen HAp-Beschichtungen nötig waren, sahen auch diese Autoren in der Sol-Gel-Methode eine günstige Möglichkeit für die Beschichtungen von metallischen Substraten in der Verwendung als Biomaterialien (Balamurugan 2006). Ein weiterer wichtiger Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, besonders dünne Beschichtungen herzustellen; typische Schichtstärken der Sol-Gel-Methode kombiniert mit dem Tauchziehverfahren liegen bei lediglich 1 - 20 µm (Lacefield 1998; Weng & Baptista 1998b; Breme et al.1995). Es können aber noch deutlich dünnere Schichten erzeugt werden, etwa durch *Spin-Coating* oder auch im Tauchziehverfahren, wenn beispielsweise die Soleigenschaften wie Viskosität, Dichte etc. durch Verwendung anderer Lösungsmittel oder veränderter Konzentrationen der Prekursoren entsprechend verändert werden.

In dieser Studie erfolgte die Synthese von Hydroxylapatit-Sol aus den in Ethanol gelösten Ausgangsstoffen Triethylphosphat (TEP) und Calciumnitrat-Tetrahydrat ($\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) bei einem Ca/P-Verhältnis von 1,67; eine anschließende Alterungszeit erfolgte bei 45 °C für mind. 72 Stunden. Nach den Beschichtungsvorgängen mittels *Dip-* bzw. *Spin-Coating* wurden die HAp-Beschichtungen bei 500 °C gesintert. Diese geringe Sintertemperatur, welche für die mittels Sol-Gel-Methode hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen benötigt werden, hat mehrere Vorteile; zum einen aufgrund der Phaseninstabilität von HAp bei Temperaturen oberhalb von etwa 1350 °C (Willmann 1992) und zum anderen weil dadurch der Phasenübergang bei etwa 883 °C von Titaniumlegierungen, welche üblicherweise für dentale Implantate verwendet werden, vermieden werden kann (Gross et al.1998). Die Vorteile der Sol-Gel-Methode sind daher offensichtlich: Sie ist im Gegensatz zu dem industriell viel genutzten Plasmaspritzen (*plasma spraying*) ein simples und vor allem kostengünstiges

Verfahren. Es lassen sich damit hochreine, keramische Beschichtungen mit relativ kleinem apparativen Aufwand herstellen. Man kann diese auch auf verschiedene Implantatwerkstoffe aufbringen; neben den bekannteren Titanlegierungen können z.B. auch Yttrium-stabilisierte Zirkonoxid-Keramiken beschichtet werden (Kim, H.W. et al. 2004c). Auch besteht durch Integration von Fremd-Ionen, wie z.B. Fluorid, die Möglichkeit, die Eigenschaften der HAp-Beschichtungen zu modifizieren (Tredwin et al. 2013; Wang, Y. et al. 2008; Kim et al. 2004a-c). In einer jüngsten experimentellen Studie beschrieben Rojaee et al. eine Methode, durch HAp-Beschichtungen via Sol-Gel-Synthese und Tauchbeschichtung das Korrosionsverhalten einer neuen Generation von degradierbaren Biomaterialien für Hartgewebe (Magnesium-Legierung) zu verbessern (Rojaee et al. 2013). Die Grenzen der Sol-Gel-Methode in der Biomaterialforschung sind dabei nicht nur auf die Beschichtung mit Hydroxylapatit beschränkt, sondern es können damit u.a. auch Beschichtungen aus silikathaltigen Biogläsern hergestellt werden (Fan et al. 2014).

4.2 Phasenreinheit und Oberflächeneigenschaften der Hydroxylapatit-Beschichtungen

Es gibt diverse Analyseverfahren, welche üblicherweise für die Charakterisierung von Biomaterialien eingesetzt werden und daher auch in dieser Studie Anwendung fanden. Um Aussagen über die Phasenreinheit und Oberflächenmorphologie der in dieser Arbeit hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen treffen zu können, wurden die HAp-Beschichtungen neben der rasterelektronenmikroskopischen Betrachtung der Oberflächenmorphologie auch mittels Raman-Analyse und Röntgendiffraktometrie (XRD) analysiert. Zur Bestimmung der Benetzbarkeit der HAp-Proben wurden außerdem Kontaktwinkelmessungen durchgeführt.

Im **Raman-Spektrum** der von uns untersuchten HAp-Probe fanden wir einen deutlichen Peak bei 963 cm^{-1} sowie drei weitere, kleinere Banden (vergl. Abb. 9). Im Prinzip lassen sich im Raman-Spektrum von Hydroxylapatit vier Hauptgruppen ($\nu_1 - \nu_4$) erkennen, welche den vier charakteristischen Raman-Vibrationen von *ortho*-Phosphat-Ionen zugeordnet werden können. Gegenüber freien Phosphat-Ionen ($[\text{PO}_4]^{3-}$) sind die im Apatitgitter eingebundenen allerdings in ihrer Frequenz verschoben (O'Shea et al. 1974). Bei der starken Bande bei ca. 963 cm^{-1} handelt es sich um die symmetrische P-O-Streckschwingung der Phosphat-Tetraeder (bezeichnet als ν_1), die das Raman-Spektrum von HAp dominiert. Weitere, deutlich kleinere

Peaks lassen sich bei etwa $432 - 446 \text{ cm}^{-1}$ (ν_2 -Biegungsschwingung des Phosphat-Tetraeders) sowie in den Bereichen von $1025 - 1087 \text{ cm}^{-1}$ (ν_3) und $606 - 588 \text{ cm}^{-1}$ (ν_4) beobachten. Diese entsprechen den asymmetrischen Streckschwingungen der P-O-Bindungen. Die wiederholt bei allen HAp-Chargen dieser Studie gemessenen Raman-Banden sind charakteristisch für reinen Hydroxylapatit und in guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten. In diversen Studien wurden synthetischer und biologischer Hydroxylapatit mittels Raman-Analyse untersucht (Balamurugan et al. 2006; Walters et al. 1990; Tsuda und Arends 1994, 1997; Sauer et al. 1994). Vergleicht man speziell die in dieser Arbeit gemessenen Phosphat-Peaks ($\nu_1 - \nu_4$) mit den Ergebnissen aus Studien, in denen ebenfalls synthetischer HAp untersucht wurde, so findet man eine hohe Übereinstimmung der Raman-Banden (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8 Raman-Banden von synthetischen HAp-Beschichtungen verschiedener Studien

| Studie | Synthetischer HAp-Ursprung | Position der Raman-Banden [in cm^{-1}] | | | |
|-------------------------------|---|--|-------------------|------------|----------------------|
| | | ν_2 | ν_4 | ν_1 | ν_3 |
| eigene Versuche | Sol-Gel-Synthese | 432, 446 | 588, 606, | 963 | 1046, 1073 |
| Balamurugan et al. (2006) | Sol-Gel-Synthese | 432,442 | 579, 592, 608 | 962 | 1025, 1047, 1087 |
| Sauer et al. (1994) | Präzipitation (bulk-precipitation) | Ca. 435 | Ca. 590 | Ca. 960 | Ca. 1075 |
| Tsuda und Arends (1994, 1997) | Nass-chemische Synthese einzelner HAp-Kristalle | 432, 449,454 | 581, 593 | 962 | 1028, 1034, 1043 |
| O'Shea et al. (1974) | Präzipitation | 436, 451 | 585, 597, 613,621 | 968 | 1033,1046, 1052,1081 |

Je höher die Wellenzahl des dominanten Phosphatpeaks (ν_1), desto kristalliner ist die HAp-Phase (Balamurugan et al. 2006). Demnach weist die in dieser Studie mittels Sol-Gel Verfahren hergestellte HAp-Beschichtung eine hohe Kristallinität auf. Es gibt weitere

typische Banden im Raman-Spektrum von HAp wie z.B. die OH-Streckschwingung („OH-stretch“) bei etwa 3570 cm^{-1} , die aber mit der Weite des Spektrums dieser Studie nicht erfasst wurde. Die Intensität der Raman-Banden ist direkt proportional zur Konzentration der untersuchten Substanz und kann in interferenzfreien Spektren gegen ein Referenzmaterial bestimmt werden (Murthy 2011).

Das aus der **XRD-Messung** erhaltene Diffraktogramm der Hydroxylapatitbeschichtung wurde mittels *Pattern-Matching* analysiert. Die experimentell gemessenen Intensitäten der Reflexe waren dabei in sehr guter Übereinstimmung mit den theoretischen Werten der Datenbank (vergl. Abb. 10); dies zeigte, dass es sich bei der hergestellten Sol-Gel-Beschichtung um reinen und hochkristallinen Hydroxylapatit handelt. Die ermittelten Gitterparameter der texturfreien Probe (Raumgruppe $P6_3/m$, mit $a = 9,437\text{ \AA}$ und $c = 6,889\text{ \AA}$) entsprechen den allgemein bekannten Werten von HAp (vergl. auch Abb. 1 und 2) und stimmen mit denen von anderen Untersuchungen überein (Balamurugan et al. 2006; O'Shea et al. 1974). Es zeigten sich neben der reinen HAp-Phase keine Verunreinigungen mit amorphen Tricalciumphosphaten (α - oder β -TCP), Calciumcarbonaten (CaCO_3) oder Calciumoxiden (CaO), wie sie oft in anderen Studien zu finden waren (Sun et al. 2003; Wang, D. et al. 2008; Weng und Baptista 1998a, b). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ergebnisse der XRD- und Raman Analysen auf eine hohe Reinheit und Kristallinität der für diese Studie hergestellten HAp-Beschichtungen hinweisen.

Eine weitere durchgeführte Charakterisierungsmethode war die Bestimmung des Benetzungsverhaltens der Oberfläche mittels der **Kontaktwinkel-Messungen** nach der Methode des liegenden Tropfens (vergl. Abschnitt 2.3.2 und 3.1.4). Der dabei gemessene Kontaktwinkel (auch: Randwinkel) ist kennzeichnend für die Benetzbarkeit einer Oberfläche und ergibt sich aus dem Gleichgewicht der Kraft-Vektoren der drei Grenzflächenspannungen zwischen Festkörper- Flüssigkeit, Festkörper- Gas und Flüssigkeit- Gas (Murthy 2011). Die in dieser Studie hergestellten HAp-Beschichtungen bewirkten eine signifikante Verbesserung in der Benetzbarkeit der Substratoberfläche und sind mit einem Randwinkel von ca. 14° deutlich als hydrophil charakterisierbar. Damit zeigten die HAp-Beschichtungen dieser Studie ein auffällig hydrophileres Benetzungsverhalten als solche aus anderen Studien, in denen Kontaktwinkel über 50° beobachtet wurden (Tredwin et al. 2013; Wang, Y. et al. 2008). Klinische Studien zeigten, dass hydrophile Oberflächen vorteilhaft für die initiale Einheilung von Implantaten sind (Lang et al. 2011). Es gibt außerdem Hinweise aus In-vivo-Studien, dass Oberflächenrauig-

keiten im Nanometerbereich die Neubildung von Knochen beschleunigen (Sammons 2011). Die chemische Zusammensetzung, die Benetzbarkeit und die Oberflächenrauigkeit von Implantatoberflächen haben demnach einen entscheidenden Einfluss auf die frühen Vorgänge der Osseointegration, wie beispielsweise die Absorption von bestimmten Proteinen, welche die Adhäsion von jungen Osteoblasten-Zellen stimulieren (Le Guéhennec et al. 2007).

4.3 Die Probenbeschichtungen und Auswahl der Substrate

In der vorliegenden Studie kamen zwei Beschichtungsmethoden zur Anwendung: die Rotations- und die Tauchzieh-Beschichtung (vergl. Abschnitt 2.2.2 und 2.2.3).

Die Rotationsbeschichtung (engl. *Spin-Coating*) ist ein simples Verfahren zur Oberflächenbeschichtung flächiger Proben. Es lassen sich damit hochdünne und gleichmäßige Beschichtungen herstellen. Das Aufschleuder-Verfahren wurde auch in anderen Studien im Rahmen von HAp-Beschichtungen angewendet (Gross et al. 1998, Kim et al. 2004b) und eignet sich sehr gut für das experimentelle Beschichten von flächigen Materialproben, ist allerdings ungeeignet für die Beschichtung von komplex geformten Substraten.

Für die Beschichtung von dreidimensionalen Strukturen, wie beispielsweise Implantaten, ist die Tauchbeschichtung (engl. *Dip-Coating*) besser geeignet. Diese ist eine in der Industrie vielverwendete Methode und ist ebenso einfach wie kostengünstig, da sie mit geringem apparativen Aufwand verbunden ist. Die Tauchbeschichtung kam ebenfalls in anderen Studien für die Herstellung von HAp-Beschichtungen zur Anwendung (Rojae et al. 2013; Weng und Baptista 1998a; Breme et al. 1995). Die Ziehgeschwindigkeit der Proben aus dem Sol hat dabei Einfluss auf die Dicke der HAp-Schicht: Je langsamer eine Probe aus dem Sol gezogen wird, desto dünner wird die jeweilige Beschichtung, da das Sol mehr Zeit hat, um in die Küvette zurückzufließen. Dieser Zusammenhang von Schichtdicke h und Ziehgeschwindigkeit u wird in der *Landau-Levich-Gleichung* beschrieben:

$$\text{Schichtdicke } h = 0,94 \frac{(\eta \cdot u)^{2/3}}{\gamma^{1/6} \cdot (\rho \cdot g)^{1/6}}$$

Mit h = Schichtdicke der Beschichtung, η = Viskosität des Sols, u = konstante Ziehgeschwindigkeit des Substrates aus dem Sol, γ = Oberflächenspannung des Sols, ρ = Dichte des Sols, g = Gravitationskonstante.

Dieser Zusammenhang lässt sich auch vereinfacht darstellen (Worsch 2010):

$$h \sim \sqrt{u}$$

Es besteht demnach eine nicht-lineare Proportionalität zwischen den beiden Variablen: Je kleiner die Ziehgeschwindigkeit des Substrates aus dem Sol, desto geringer die Schichtdicke. In dieser Arbeit wurden verschiedene HAp-Proben (HAp-Chargen 1-3) hergestellt, welche sich durch die Ziehgeschwindigkeit aus dem Sol unterschieden und daher folglich auch verschieden dünne Beschichtungen aufwiesen (HAp-Charge 3 < Charge 2 < Charge 1; vergl. Tabelle 2). Das Probenende, also der jeweils am längsten im Sol verbleibende Bereich, wies dabei stets etwas dickere Beschichtungsstärken auf, was ein typisches Phänomen bei der Tauchbeschichtung ist. Eine vergleichbare Erscheinung gab es auch bei der Rotationsbeschichtung: Auf den flächigen Aluminium-Substraten waren im Allgemeinen sehr homogene und dünne HAp-Beschichtungen zu beobachten (vergl. auch Abb. 8 a-f); lediglich in Randbereichen (insbesondere in den Ecken) der quadratischen Proben waren die Oberflächenbeschichtungen aufgrund des zentrifugalen Beschichtungsverfahrens etwas dicker; in diesen Bereichen waren bei den REM-Untersuchungen gelegentlich Risse in der Beschichtung zu beobachten.

Als Substrate für die Hydroxylapatit-Beschichtungen wurden hochreines, gewalztes Aluminiumblech und einfache Glasobjektträger verwendet. Diese Materialien sind zwar ungeeignet für den klinischen Einsatz bzw. die Verwendung als Biomaterialien, wurden aber in dieser experimentellen *In-vitro*-Studie aus diversen Gründen als Substrate für die HAp-Beschichtungen gewählt:

- Das *Aluminiumblech* kam als Substrat beim Spin-Coating zum Einsatz; dies lag zuallererst an der Eigenschaft von Aluminium zur sehr schnellen Ausbildung einer Oxidschicht der Oberfläche (schneller als reines Titan), was die Haftung von Beschichtungen verbessert. Als vorteilhaft sind außerdem die einfache Bearbeitbarkeit der Aluminiumproben sowie die geringen Materialkosten zu nennen.
- Für das Tauchziehbeschichtungsverfahren wurden einfache Objektträger aus *Kalk-Natron-Glas* benutzt, da diese praktisch bioinert sind. Außerdem konnte, im Gegensatz zu metallischen Substraten, bei der Extraktion in wässriger Lösung (Eluatversuche) die Bildung von lokalen Elementen bzw. Korrosionsprodukten praktisch ausgeschlossen werden konnte. Dies war wichtig für einen unbeeinflussten

Zytotoxizitätstest und die störungsfreien Nachweise von Calcium- und Phosphat-Ionen in den Eluaten.

Von Nachteil erwiesen sich in dieser Studie allerdings die geringeren Adhäsionseigenschaften der HAp-Beschichtung auf den Glasobjektträgern. So konnte nach dem Eluieren beobachtet werden, dass sich kleinste Stückchen der HAp-Beschichtungen gelöst hatten und in den entsprechenden Eluaten lichtmikroskopisch zu beobachten waren (vergl. Abb. 13). Eine Erklärung für die geringe Haftung der Hydroxylapatit-Beschichtung auf den Glasobjektträgern liegt in dem unterschiedlich hohen *Wärmeausdehnungskoeffizient* α (WAK) der beiden Materialien. Der WAK von Hydroxylapatit beträgt etwa $14 \times 10^{-6}/K$ (Breme et al. 1995), während für die Objektträger vom Hersteller (Fa. Menzel, D-Kiel) ein WAK von etwa $9 \times 10^{-6}/K$ im Bereich 20-300 °C angegeben wird. Wenn angenommen wird, dass der WAK von Kalk-Natron-Glas sich nicht deutlich anders verhält im Temperaturbereich um etwa 500°C, kam es im Rahmen des Sinterprozesses zu einer etwa 50% höheren Expansion der HAp-Beschichtung im Vergleich zum Glas-Substrat. Folglich wären nach dem Abkühlen der Proben ein Abplatzen der HAp-Beschichtungen auf einfachem Kalk-Natron-Glas eher die Regel als die Ausnahme. Trotz der hier beobachteten, ungenügenden Haftung der HAp-Beschichtungen auf Glas haben die Ergebnisse des Zytokompatibilitätstests offenbar nicht negativ beeinflusst (vergl. Ergebnisse der XTT-Tests).

4.4 Bioverträglichkeit von Hydroxylapatit-Beschichtungen

In den Vorversuchen dieser Studie sollten die verwendeten Osteoblasten-Kulturen zunächst charakterisiert werden. Dabei wurde ihre Morphologie sowie die Fähigkeit zur *In-vitro*-Mineralisation in Anwesenheit verschiedener Zellkulturmedien mittels REM, Alizarin-Rot-Färbung und dem Nachweis von alkalischer Phosphatase untersucht (vergl. Abschnitt 3.3.1). Da es bereits zahlreiche charakterisierende Studien über die Osteosarkom-Zelllinie SAOS-2 gibt (Ahmad et al. 1999; Rao et al. 2003; Pautke et al. 2004), wurden die Vorversuche lediglich mit primären Osteoblasten (hOb-C) durchgeführt. Eine zuverlässige Stimulation zur *In-vitro*-Mineralisation gelang dabei in dieser Studie nur mittels des kommerziell erhältlichen Mineralisationsmediums der Fa. Promocell (vergl. *Alizarin Rot*-Nachweis). Dieses Medium, dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist, wurde speziell für die Stimulation von primären Osteoblasten entwickelt; bei korrekter Verwendung wird die *In-vitro*-Mineralisation vom Hersteller garantiert. Im Gegensatz dazu gelang in dieser Studie keine *In-vitro*-

Mineralisation von Extrazellulärmatrix durch diese humanen Osteoblasten in Anwesenheit von komplettiertem DMEM-Zellmedium und Zusatz von *L-Ascorbinsäure-2 Phosphat* (Asc-2P) und *Dexamethason* (Dex). Eine entsprechende Beobachtung wurde auch in einer anderen Studien beschrieben (Ilmer 2009). Die humanen Osteoblasten wurden dabei ebenfalls von der Fa. Promocell bezogen und eine Stimulation mit vergleichbaren Konzentrationen von Asc-2P und Dex führte nicht zur *In-vitro*-Mineralisation. Nur die Zugabe von Dexamethason und β -*Glycerolphosphat* (mit und ohne Asc-2P) bewirkten eine ausreichend starke Stimulation für einen positiven *Alizarin-Rot*-Nachweis. Ilmer schloss daraus, dass es sich bei den hOb-Zellen der Fa. Promocell daher vermutlich um Osteoblasten früherer Differenzierungsphasen handelt, welche ohne entsprechende Stimuli nicht zur Einlagerung von Calciumphosphaten in die Extrazellulärmatrix fähig sind (Ilmer 2009).

In den nachfolgenden Zytotoxizitätsuntersuchungen dieser Studie wurden daher Zellkultur-Bedingungen geschaffen, unter denen die hOb-C und SAOS-2 lediglich proliferierten, da mittels dieser Tests (XTT-Test und Direkttest) die ungestörte Proliferation von Osteoblasten auf den HAp-Beschichtungen gezeigt werden sollte. Um Aussagen treffen zu können über die Bioverträglichkeit der hergestellten synthetischen HAp-Beschichtungen, wurden diese in diversen Zellkulturversuchen auf ihre *In-vitro*-Zytotoxizität hin überprüft. Zum einen gab ein indirekter Zytotoxizitätsassay (XTT-Test) Aufschluss über das zytotoxische Potential der hergestellten Eluate (HAp-Charge 1-3), zum anderen wurde die Zellmorphologie von direkt auf HAp-Proben ausgesäten Zellen untersucht (vergl. Abschnitt 2.6.3 und 2.6.4 sowie 3.3.1 und 3.3.2.2).

Der in dieser Studie verwendete XTT-Test ist ein bekannter Zytotoxizitätsassay für die *In-vitro*-Untersuchung von ganz unterschiedlichen Biomaterialien (Jang 2014 et al., Tavares et al. 2013; Atay et al. 2012). XTT ist ein wasserlösliches, gelbliches Tetrazoliumsalz, welches in Anwesenheit von lebenden Zellen bzw. deren mitochondrialen Enzymen, wie beispielsweise Dehydrogenasen, in ein orangefarbenes Produkt reduziert wird, dem Formazan (Gerlier und Thomasset 1986). Dabei findet die Reduktion an den Zelloberflächen oder Plasmamembranen anderer Zellkompartimente durch transmembranen Elektronentransport statt (Berridge et al. 2005). Die Intensität dieser orangenen Farbe verhält sich in nicht-linearer Art proportional zur Stoffwechselaktivität von vitalen Zellen und lässt sich spektrophotometrisch erfassen (Gerlier und Thomasset 1986). Der Ablauf des dreitägigen Tests erfolgte in Anlehnung an ISO-Norm 10993-5 (2009) in einem indirekten Testverfahren

(Untersuchung von Eluaten). Dabei wird ein Verhältnis von Probenoberfläche zu Extraktionsvolumen von 1,25 cm²/ml gefordert (ISO-Norm 10993-12 (2007)). In dieser Studie wurde diese Forderung um mehr als das Vierfache übertroffen (3 OT à 30,5 cm² auf 17,0 ml ergeben ca. 5,4 cm²/ml); ein mögliches zytotoxisches Potential der HAp-Beschichtung wäre daher in dieser Studie leichter nachzuweisen gewesen.

Die gewonnenen Eluate wurden zunächst auf ihren Gehalt an Calcium- und Phosphat-Ionen mittels zweier photometrischer Nachweistests der Fa. Hach Lange untersucht, welche für diese Studie angepasst wurden (vergl. Abschnitt 2.4 ff.). Es kam allerdings, wie bereits beschrieben, beim Extraktionsvorgang zu Delaminierungen winziger Partikel der HAp-Beschichtungen vom Glassubstrat und damit zu entsprechend erhöhten Messwerten von Calcium- und Phosphat-Ionen in allen Eluaten der HAp-Beschichtungen (*HAP-Chargen 1-3*) gegenüber den Kontroll-Eluaten (*Kontrolle a und b*). Die Erklärung für den höheren Phosphat-Gehalt in den Chargen 1 und 2 gegenüber den der Charge 3 (vergl. Tabelle 5) liegt dabei vermutlich nicht ausschließlich an der Eluierungs-Zeit (96h versus 72h), sondern auch an den unterschiedlichen Ziehgeschwindigkeit aus dem HAp-Sol beim Beschichtungsprozess (vergl. Tabelle 2). Die Charge 1 und 2 wiesen demnach dickere HAp-Beschichtungen als Charge 3 auf (vergl. auch Abschnitt 4.3). Da Rissbildungen und Delaminationen im Fall von dicken Beschichtungen wahrscheinlicher sind (Breme et al. 1995) und so Leachingprozesse begünstigen können, ist es denkbar, dass es dadurch zum Nachweis von höheren Phosphat-Mengen in den Eluat-Chargen 1 und 2 kam. Weshalb aber die HAp-Chargen 1 und 2 trotz deutlich unterschiedlicher Ziehgeschwindigkeiten bzw. Schichtstärken ein sehr ähnliches Eluierungsverhalten aufweisen, ist nicht einfach zu beantworten. Eine mögliche Erklärung könnte in der unbeabsichtigten Variation von Prozessparametern liegen, wie z.B. der Temperatur des Objektträgers beim Probentransport von der Trocknervorrichtung zum Ofen.

Im Gegensatz zu dem Ergebnis des Phosphat-Nachweises, konnte bei dem Nachweis von Calcium ein Unterschied zwischen den beiden Kontrollen festgestellt werden: Die Messungen der mittleren Calcium-Ionen-Konzentration ergab für die Eluat-*Kontrolle a* (reinem A. bidest. ohne Proben) etwa 0,19 mg/l. Dagegen konnte bei der *Kontrolle b* (Eluat von unbeschichteten Glasobjektträger in A. bidest.) eine um etwa dreimal höhere Calcium-Ionenkonzentration (0,42 mg/l) gemessen werden (vergl. Tabelle 6). Als Erklärung dafür muss angenommen werden, dass sich Ionen aus den Glas-Objektträgern zu einem geringen Anteil im Eluat wiederfinden lassen. Diese Ionen könnten sich z.B. über die geätzten Enden der Objektträger

(sog. *frosted ends*) oder aus den geschnittenen Kanten gelöst haben. Die Herstellerfirma Menzel gibt an, dass Calcium-Oxide 6,4 % der Objektträger aus Kalk-Natron-Glas ausmachen (s. Tabelle 10, Anhang). Offenbar hat also das Glas-Substrat zu einer Erhöhung der Calcium-Ionen-Konzentration in den HAp-Chargen und der *Kontrolle b* geführt. Neben der bereits diskutierten thermischen Eigenschaft ist dies ein zweiter Grund, weshalb in experimentellen Studien dieser Art die Benutzung von einfachen Objektträgern aus Kalk-Natron-Glas als Substrat für HAp-Beschichtungen weniger geeignet sind.

Der Überprüfung der Zytotoxizität von den in dieser Studie hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen erfolgte mittels XTT-Test und wurde mit zwei verschiedenen Osteoblastenkulturen (SAOS-2 und hOb-C) durchgeführt. In Anwesenheit aller untersuchten Eluate der HAp-Beschichtungen (*HAp-Chargen 1 bis 3*) wies die Viabilität der Zellen Werte von über 92,1 % bis 100,8 % in Relation zu den Negativkontrollen mit Medium (NK = 100%) auf. Bei der untersuchten Primärkultur (hOb-C) ließ sich mittels Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen den Eluaten der drei HAp-Chargen und der Negativkontrolle nachweisen. Bei den Versuchen mit der Osteoblasten-ähnlichen Zelllinie (SAOS-2) wurden statistisch signifikante Unterschiede von HAp-Charge 1 und 3 gegenüber der NK festgestellt. Diese statistischen Unterschiede sind allerdings gering ausgeprägt und vermutlich eher auf zufällige Messfehler zurückzuführen sowie auf die geringe Anzahl durchgeführter Assays und eine möglicherweise niedrigere Interassay-Präzision. Zusammenfassend lässt sich allerdings sagen, dass von den Eluaten und gelösten Partikeln der hergestellten Hydroxylapatit-Beschichtungen über eine Einwirkzeit von 28 Stunden keine nachweisbaren, zytotoxischen Wachstumshemmungen ausgingen. Sie ergaben eine Viabilität, die deutlich über der Marke von 70 % lag, welche als Nachweisgrenze einer (geringen) Zytotoxizität angenommen wird (ISO 10993-5). Somit lässt sich in dieser *In-vitro*-Studie das Vorhandensein eines zytotoxischen Potentials der Eluate der HAp-Beschichtungen ausschließen.

Die Osteoblasten wurden zusätzlich im Direktkontakt auf HAp-Beschichtungen untersucht. Zusammengefasst betrachtet konnte bei beiden morphologischen Untersuchungen (*Giemsa*-Färbung und REM) über die Zeit von 5 Tagen mit zwei Osteoblastenkulturen (SAOS-2 und O-139) keine Unterschiede bezüglich des Zellwachstums, der Zellkonfluenz und des allgemeinen morphologischen Aussehens auf den verschiebenen Substraten festgestellt

werden. Auf den hergestellten HAp-Oberflächen zeigten beide Osteoblastenkulturen ein ungestörtes Proliferationsverhalten und das jeweils typische morphologische Aussehen.

Da Calciumphosphate und insbesondere Hydroxylapatit bereits viel erforschte und anerkannte Biomaterialien sind, war die gute *In-vitro*-Bioverträglichkeit der in dieser Studie hergestellten HAp-Beschichtung zu erwarten und steht im Einklang mit zahlreichen anderen Studien (Zhou und Lee 2011; Juhasz und Best 2011; Dorozhkin et al. 2002). Bei Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen von *In-vitro*-Untersuchungen ist zu beachten, dass deren Resultate nur in Hinblick auf ihre kurzfristigen und lokalen Wirkungen beurteilt werden können. Die Aussagen aus *In-vitro*-Versuchen mit standardisierten Zellkulturen bzw. primären Zellen beschränken sich dabei auf die zelluläre Ebene und lassen sich nicht einfach auf die Verhältnisse im menschlichen Körper übertragen (Groth et al. 1995). Der erfolgreiche Einsatz von Biomaterialien im menschlichen Knochen ist von zahlreichen Faktoren abhängig: Neben Morphologie und chemischer Zusammensetzung der Oberflächen spielen biomechanische Überlegungen, das chirurgische Vorgehen des Operateurs und der Ablauf der Knochenheilung eine Rolle (Lemons 2004). *In-vitro*-Untersuchungen sind dabei ein unverzichtbares Screening-Verfahren für das Erforschen neuer Biomaterialien und werden sinnvollerweise vor den zeit- und kostenintensiveren *In-vivo*-Studien bzw. klinischen Versuchen durchgeführt (Groth et al. 1995).

4.5 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Sol-Gel-Methode eine vielversprechende Möglichkeit zur Synthese von hochstöchiometrischem Hydroxylapatit ist. Mit einfachen Beschichtungsmethoden wie *Spin-* und *Dip-Coating* lassen sich aus dem Sol qualitativ hochwertige, keramische HAp-Beschichtungen bei relativ niedrigen Sintertemperaturen (500 °C) herstellen. Die Ergebnisse dieser Studie konnten eine sehr hohe *In-vitro*-Bioverträglichkeit der HAp-Beschichtungen in Anwesenheit von proliferierenden, humanen Osteoblasten-Zellkulturen zeigen. In einer nachfolgenden Studie wäre die Beschichtung von anderen Substraten, wie z.B. Titanlegierungen, und komplexeren Strukturen, wie beispielsweise Schraubenimplantaten, denkbar. Darüber hinausgehend müssten auch verschiedene mechanische Belastungsprüfungen, wie z.B. Adhäsionstests, erfolgreich durchgeführt werden, bevor Tierstudien oder gar ein klinischer Einsatz der hier vorgestellten HAp-Beschichtung in Erwägung gezogen werden könnten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Integration von Biomaterialien, die mit Knochengewebe in Berührung kommen, wie beispielweise endossalen Implantaten und kieferorthopädischen Minischrauben, ist deren Oberflächenoptimierung. Dies kann u.a. durch Beschichtungen mit synthetisch hergestelltem *Hydroxylapatit* (HAp) erfolgen. Das Ziel dieser Arbeit war die Herstellung sowie die qualitative und strukturelle Analyse einer Oberflächenbeschichtungen aus synthetischen Hydroxylapatit mittels Sol-Gel-Methode und die anschließende Untersuchung hinsichtlich ihrer *In-vitro*-Zellverträglichkeit.

Material und Methode: Es wurde synthetischer Hydroxylapatit mittels Sol-Gel-Methode aus den Ausgangsstoffen Calciumnitrat-Tetrahydrat und Triethylphosphat hergestellt. Die Beschichtungen von Objektträgern und Aluminiumsubstraten erfolgten über Aufschleuder- bzw. Tauchziehprozesse mit anschließender Temperaturbehandlung bei 500 °C. Zur Charakterisierung der Oberflächenbeschaffenheit dienten Rasterelektronenmikroskopie (REM) sowie Kontaktwinkelmessung. Die Nanostruktur wurde mittels Röntgenbeugung (XRD) und *Raman*-Analysen ermittelt. Untersuchungen zur *In-vitro*-Bioverträglichkeit wurde in Anlehnung an ISO-Norm 10993-5 (2009) an der Osteosarkomzelllinie SAOS-2 sowie an primären Osteoblastenkulturen (hOb-C, Fa. PromoCell) durchgeführt. Das zytotoxische Potential von Eluaten (72 h bzw. 96 h \pm 2h, 37 °C) der beschichteten HAp-Proben wurde quantitativ mittels XTT-Test erfasst. Mithilfe photometrischer Nachweis-Kits wurden die HAp-Eluate auf den Gehalt von Calcium- und Phosphat-Ionen untersucht. Eine qualitative, morphometrische Analyse der HAp-Beschichtungen mittels *Giemsa*-Färbung und REM erfolgte mit Osteoblastenkulturen in Direktkontakt auf den HAp-beschichteten Substraten. Eine Charakterisierung der primären Osteoblasten sollten mittels Nachweis von knochenspezifischer alkalischer Phosphatase (ALP) und *Alizarin-Rot*-Färbung erfolgen. Dabei wurde sie auf ihr Mineralisations- und Proliferations-Verhalten im Gegenwart verschiedener Zellkulturmedien untersucht.

Ergebnisse: Die mittels Sol-Gel-Methode hergestellten Oberflächenbeschichtungen aus Hydroxylapatit konnten zuverlässig auf die Testsubstrate mittels Tauchzieh- und Aufschleuderverfahren aufgebracht werden. Kristallografische Untersuchungen mittels

Raman-Analyse und XRD wiesen eine sehr hohe Reinheit und Kristallinität dieser HAp-Beschichtung nach. Kontaktwinkelmessungen im Vergleich zu Kontrolloberflächen charakterisierten die ausgeprägt hydrophile Eigenschaft der HAp-Oberflächen (Randwinkel $< 15^\circ$). REM-Untersuchungen der HAp-Beschichtungen zeigten eine im Nanometerbereich raue, mit einzelnen Poren durchsetzte Oberflächenstruktur. In den Eluaten der HAp-Beschichtungen wurden erhöhte Konzentrationen von Calcium- und Phosphat-Ionen nachgewiesen, die vornehmlich auf delaminierte Partikel der HAp-Beschichtung zurückzuführen waren. Untersuchungen der HAp-Eluate mittels XTT-Test an proliferierenden Osteoblasten ergaben Umsatzraten von XTT-Formazan von jeweils deutlich über 90 % im Vergleich zu Negativkontrollen und wiesen damit auf eine hohe *In-vitro*-Bioverträglichkeit der HAp-Beschichtungen in Anwesenheit der untersuchten Zellkulturen hin. Die qualitativen Analysen der Osteoblastenkulturen zeigten im Direktkontakt auf HAp-beschichteten Substraten über den Zeitraum von 120 Stunden ein ungestörtes Wachstumsverhalten bei normaler Morphologie.

Vorversuche zur *In-vitro*-Mineralisation durch hOb-C in Anwesenheit von kommerziellen Mineralisationsmedium konnten zeigen, dass diese Zellen dazu in der Lage sind, Calcium-haltige Extrazellulärmatrix zu produzieren (*Alizarin-Rot*-Färbung). Wurden diese primären Osteoblasten allerdings in DMEM und Zugabe von Ascorbinsäure-2-Phosphat sowie Dexamethason kultiviert, proliferierten die Zellen ohne Mineralisations-Aktivität. Auch der qualitative Nachweis von ALP mittels enzymatischer Färbung konnte bei den primären Osteoblasten erbracht werden; dabei wurden in dieser Studie keine Unterschiede festgestellt zwischen den beiden verwendeten Zellkulturmedien.

Schlussfolgerung: Synthetisches Hydroxylapatit, hergestellt nach einem schnellen und kostengünstigen Verfahren (Sol-Gel-Methode), kann sowohl im Tauchzieh- als auch im Aufschleuderverfahren auf verschiedene Substrate aufgebracht werden; dabei hat die Auswahl der Substrate Einfluss auf die Integrität der Beschichtung. Die dünnen und hydrophilen Beschichtungen weisen eine gute *In-vitro*-Bioverträglichkeit auf.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmad, M., McCarthy, M. B. & Gronowicz, G. (1999): An in vitro model for mineralization of human osteoblast-like cells on implant materials. *Biomaterials*, 20. 211–220.
- Atay, A., Bozok Cetintas, V., Cal, E., Kosova, B., Kesercioglu, A. & Guneri, P. (2012): Cytotoxicity of hard and soft denture lining materials. *Dent Mater J*, 31. 1082–1086.
- Balamurugan, A., Michel, J., Fauré, J., Benhayoune, H., Wortham, L., Sockalingum, G., Banchet, V., Bouthors, S., Laurent-Maquin, D. & Balossier, G. (2006): Synthesis and structural analysis of sol gel derived stoichiometric monophasic hydroxyapatite. *Ceramis - Silikáty*, 11. 27–31.
- Barrere, F., van der Valk, C. M., Meijer, G., Dalmeijer, R. A. J., Groot, K. de & Layrolle, P. (2003): Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 67. 655–665.
- Beresford, J. N., Graves, S. E. & Smoothy, C. A. (1993): Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: A model of bone formation? *Am. J. Med. Genet.*, 45. 163–178.
- Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005): Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11. 127–152.
- Breme, J., Zhou, Y. & Groh, L. (1995): Development of a titanium alloy suitable for an optimized coating with hydroxyapatite. *Biomaterials*, 16. 239–244.
- Chung, C.-H., Golub, E. E., Forbes, E., Tokuoka, T. & Shapiro, I. M. (1992): Mechanism of action of *beta*-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int*, 51. 305–311.
- Cooper, L. F., Masuda, T., Yliheikkilä, P. K. & Felton, D. A. (1998): Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 13. 163–174.
- Daculsi, G., Bouler, J. M. & LeGeros, R. Z. (1997): Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int Rev Cytol*, 172. 129–191.
- Deutsches Institut für Normung e. V. (2009): DIN EN ISO 10993-5 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität. Beuth Verlag, Berlin

- Deutsches Institut für Normung e. V. (2007): DIN EN ISO 10993-12 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien. Beuth Verlag, Berlin.
- DiGirolamo, C. M., Stokes, D., Colter, D., Phinney, D. G., Class, R. & Prockop, D. J. (1999): Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol*, 107. 275–281.
- Dorozhkin, S. V., Epple, M., Laws, D. D., Bitter, H. M. L. & Jerschow, A. (2002): Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Ang. Chem.*, 114. 3260–3277.
- Eggert, F. (Hrsg.) (2005): Standardfreie Elektronenstrahl-Mikroanalyse (mit dem EDX im Rasterelektronenmikroskop): Ein Handbuch für die Praxis, Books on Demand GmbH.
- Epple, M. (Hrsg.) (2003): Biomaterialien und Biomineralisation : Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. (1), Teubner. Stuttgart.
- Es-Souni, M., Es-Souni, M. & Fischer-Brandies, H. (2001): On the transformation behaviour, mechanical properties and biocompatibility of two niti-based shape memory alloys: NiTi42 and NiTi42Cu7. *Biomaterials*, 22. 2153–2161.
- Fan, J. P., Kalia, P., Di Silvio, L. & Huang, J. (2014): In vitro response of human osteoblasts to multi-step sol-gel derived bioactive glass nanoparticles for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 36. 206–214.
- Fogh, J., Fogh, J. M. & Orfeo, T. (1977): One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst*, 59. 221–226.
- Furlong, R. J. & Osborn, J. F. (1991): Fixation of hip prostheses by hydroxyapatite ceramic coatings. *J Bone Joint Surg Br*, 73. 741–745.
- Gerlier, D. & Thomasset, N. (1986): Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods*, 94. 57–63.
- Ghita, A., Pascut, F. C., Sottile, V. & Notingher, I. (2014): Monitoring the mineralisation of bone nodules in vitro by space- and time-resolved Raman micro-spectroscopy. *Analyt*, 139. 55–58.
- Gross, K. A., Chai, C. S., Kannangara, G. S., Ben-Nissan, B. & Hanley, L. (1998): Thin hydroxyapatite coatings via sol-gel synthesis. *J Mater Sci Mater Med*, 9. 839–843.

- Groth, T., Falck, P. & Miethke, R. R. (1995): Cytotoxicity of biomaterials—basic mechanisms and in vitro test methods: a review. *ATLA (Alternatives to laboratory animals)*, 790–799.
- Ilmer, M. (Hrsg.) (2009): Osteoblasten-induzierte frühe Osteogenese in humanen mesenchymalen Stammzellen durch Aktivierung des Wnt-Signalweges. München.
- Jang, Y.-E., Lee, B.-N., Koh, J.-T., Park, Y.-J., Joo, N.-E., Chang, H.-S., Hwang, I.-N., Oh, W.-M. & Hwang, Y.-C. (2014): Cytotoxicity and physical properties of tricalcium silicate-based endodontic materials. *Restor Dent Endod*, 39. 89–94.
- Juhasz, J. A. & Best, S. M. (2011): Surface modification of biomaterials by calcium phosphate deposition. Chapter 6. In: Williams, R. (Hrsg.) *Surface modification of biomaterials : Methods, analysis and applications*. 143–168, Oxford, WP Woodhead Publ.
- Junker, R., Dimakis, A., Thoneick, M. & Jansen, J. A. (2009): Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*, 20 Suppl 4. 185–206.
- Kasperk, C., Wergedal, J., Strong, D., Farley, J., Wangerin, K., Gropp, H., Ziegler, R. & Baylink, D. J. (1995): Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin. *J Clin Endocrinol Metab*, 80. 2511–2517.
- Kim, H.-W., Kim, H.-E. & Knowles, J. C. (2004a): Fluor-hydroxyapatite sol-gel coating on titanium substrate for hard tissue implants. *Biomaterials*, 25. 3351–3358.
- Kim, H.-W., Knowles, J., Salih, V. & Kim, H.-E. (2004b): Hydroxyapatite and fluor-hydroxyapatite layered film on titanium processed by a sol-gel route for hard-tissue implants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 71. 66–76.
- Kim, H.-W., Kong, Y.-M., Bae, C.-J., Noh, Y.-J. & Kim, H.-E. (2004c): Sol-gel derived fluor-hydroxyapatite biocoatings on zirconia substrate. *Biomaterials*, 25. 2919–2926.
- Kim, H.-W., Lee, E.-J., Jun, I.-K. & Kim, H.-E. (2005): On the feasibility of phosphate glass and hydroxyapatite engineered coating on titanium. *J Biomed Mater Res*, 75. 656–667.
- Kveiborg, M., Rattan, S. I., Clark, B. F., Eriksen, E. F. & Kassem, M. (2001): Treatment with 1,25-dihydroxyvitamin D3 reduces impairment of human osteoblast functions during cellular aging in culture. *J Cell Physiol*, 186. 298–306.
- Lacefield, W. R. (1998): Current status of ceramic coatings for dental implants. *Implant Dent*, 7. 315–322.
- Lang, N. P., Salvi, G. E., Huynh-Ba, G., Ivanovski, S., Donos, N. & Bosshardt, D. D. (2011): Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Implants Res*, 22. 349–356.

- Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P. & Amouriq, Y. (2007): Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23. 844–854.
- Lemons, J. E. (2004): Biomaterials, biomechanics, tissue healing, and immediate-function dental implants. *J Oral Implantol*, 30. 318–324.
- Liu, D.-M., Troczynski, T. & Tseng, W. J. (2001): Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*, 22. 1721–1730.
- Liu, D.-M., Troczynski, T. & Hakimi, D. (2002a): Effect of hydrolysis on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite and its application to bioactive coatings. *J Mater Sci Mater Med*, 13. 657–665.
- Liu, D.-M., Troczynski, T. & Tseng, W. J. (2002b): Aging effect on the phase evolution of water-based sol-gel hydroxyapatite. *Biomaterials*, 23. 1227–1236.
- Liu, D.-M., Yang, Q. & Troczynski, T. (2002c): In-vitro forming of calcium phosphate layer on sol-gel hydroxyapatite-coated metal substrates. *J Mater Sci Mater Med*, 13. 965–971.
- Liu, D.-M., Yang, Q. & Troczynski, T. (2002d): Sol-gel hydroxyapatite coatings on stainless steel substrates. *Biomaterials*, 23. 691–698.
- Liu, D.-M., Yang, Q., Troczynski, T. & Tseng, W. J. (2002e): Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite. *Biomaterials*, 23. 1679–1687.
- Morris, H. F. & Ochi, S. (1998): Hydroxyapatite-coated implants: a case for their use. *J Oral Maxillofac Surg*, 56. 1303–1311.
- Murthy, N. S. (2011): Techniques for analyzing biomaterial surface structure, morphology and topography. In: Williams, R. (Hrsg.) *Surface modification of biomaterials : Methods, analysis and applications*. 232–254, Oxford, WP Woodhead Publ.
- Nayak, A. K. (2010): Hydroxyapatite synthesis methodologies: An overview. *Int. J. ChemTechRes*, 2. 903–907.
- Ong, J. L. & Chan, D. C. (2000): Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. *Crit Rev Biomed Eng*, 28. 667–707.
- Osborn, J. F. (Hrsg.) (1985): *Implantatwerkstoff Hydroxylapatitkeramik*, Quintessenz-Verl. Berlin [u.a.].
- O'Shea, D. C., Bartlett, M. L. & Young, R. A. (1974): Compositional analysis of apatites with laser-Raman spectroscopy:(oh,f,cl)apatites. *Arch Oral Biol*, 19. 995-06.

-
- Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., Kennedy, M. B., Pockwinse, S., Lian, J. B. & Stein, G. S. (1990): Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 143. 420–430.
- Patel, N. R. & Gohil, P. P. (2012): A Review on Biomaterials: Scope, Applications & Human Anatomy Significance. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 2. 91–101.
- Pautke, C., Schieker, M., Tischer, T., Kolk, A., Neth, P., Mutschler, W. & Milz, S. (2004): Characterization of osteosarcoma cell lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in comparison to human osteoblasts. *Anticancer Res*, 24. 3743–3748.
- Rao, L. G., Liu, L. J.-F., McCleod Murray, T., McDermott, E. & Zhang, X. (2003): Estrogen added intermittently, but not continuously, stimulates differentiation and bone formation in SaOS-2 cells. *Biol Pharm Bull*, 26. 936–945.
- Rojaee, R., Fathi, M. & Raeissi, K. (2013): Controlling the degradation rate of AZ91 magnesium alloy via sol-gel derived nanostructured hydroxyapatite coating. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 33. 3817–3825.
- Sammons, R. L. (2011): Modifying biomaterial surfaces to optimise interactions with bone. Chapter 15. In: Williams, R. (Hrsg.) *Surface modification of biomaterials : Methods, analysis and applications*. 365–400, Oxford, WP Woodhead Publ.
- Sauer, G. R., Zunic, W. B., Durig, J. R. & Wuthier, R. E. (1994): Fourier transform Raman spectroscopy of synthetic and biological calcium phosphates. *Calcif Tissue Int*, 54. 414–420.
- Scintag (Hrsg.) (1999): *Basics of X-ray Diffraction : Chapter 7*, Scintag Inc. New York, NY.
- Sell, S., Gaissmaier, C., Fritz, J., Herr, G., Esenwein, S., Küsswetter, W., Volkmann, R., Wittkowski, K. M. & Rodemann, H. P. (1998): Different Behavior of Human Osteoblast-Like Cells Isolated from Normal and Heterotopic Bone In Vitro. *Calcified Tissue International*, 62. 51–59.
- Siggelkow, H., Rebenstorff, K., Kurre, W., Niedhart, C., Engel, I., Schulz, H., Atkinson, M. J. & Hufner, M. (1999): Development of the osteoblast phenotype in primary human osteoblasts in culture: comparison with rat calvarial cells in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, 75. 22–35.
- Souter, P., Horner, A. & Cunningham, J. C. (2011): Quantification of in vitro mineralisation using ion chromatography. *Anal Biochem*, 410. 244–247.

- Sun, L., Berndt, C. C. & Grey, C. P. (2003): Phase, structural and microstructural investigations of plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Materials Science and Engineering: A*, 360. 70–84.
- Takamizawa, S., Maehata, Y., Imai, K., Senoo, H., Sato, S. & Hata, R.-I. (2004): Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int*, 28. 255–265.
- Tavares, D. d. S., Castro, L. d. O., Soares, G. D. d. A., Alves, G. G. & Granjeiro, J. M. (2013): Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted beta-tricalcium phosphate. *J Appl Oral Sci*, 21. 37–42.
- Textor, M., Sittig C., Frauchiger V. & Tosatti S. (2001): Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys. In: Brunette, D. M., Tengvall, P., Textor, M. u. Thomsen, P. (Hrsg.) *Titanium in Medicine*. 171–230, Berlin, Springer.
- Thull, R. (1994): *Naturwissenschaftliche Aspekte von Werkstoffen in der Medizin*. *Naturwissenschaften*, 81. 481–488.
- Tinsley, D., Watson, C. J. & Russell, J. L. (2001): A comparison of hydroxylapatite coated implant retained fixed and removable mandibular prostheses over 4 to 6 years. *Clin Oral Implants Res*, 12. 159–166.
- Tredwin, C. J., Young, A. M., Georgiou, G., Shin, S.-H., Kim, H.-W. & Knowles, J. C. (2013): Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method. Optimisation, characterisation and rheology. *Dent Mater*, 29. 166–173.
- Truhlar, R. S., Morris, H. F. & Ochi, S. (2000): Implant surface coating and bone quality-related survival outcomes through 36 months post-placement of root-form endosseous dental implants. *Ann Periodontol*, 5. 109-8.
- Tsuda, H. & Arends, J. (1994): Orientational micro-Raman spectroscopy on hydroxyapatite single crystals and human enamel crystallites. *J Dent Res*, 73. 1703–1710.
- Tsuda, H. & Arends, J. (1997): Raman spectroscopy in dental research: a short review of recent studies. *Adv Dent Res*, 11. 539–547.
- Walters, M. A., Leung, Y. C., Blumenthal, N. C., LeGeros, R. Z. & Konsker, K. A. (1990): A Raman and infrared spectroscopic investigation of biological hydroxyapatite. *J Inorg Biochem*, 39. 193–200.
- Wang, D., Chen, C., He, T. & Lei, T. (2008): Hydroxyapatite coating on Ti6Al4V alloy by a sol-gel method. *J Mater Sci Mater Med*, 19. 2281–2286.

-
- Wang, Y., Zhang, S., Zeng, X., Ma, L. L., Khor, K. A. & Qian, M. (2008): Initial attachment of osteoblastic cells onto sol-gel derived fluoridated hydroxyapatite coatings. *J Biomed Mater Res A*, 84. 769–776.
- Weng, W. & Baptista, J. L. (1998a): Alkoxide route for preparing hydroxyapatite and its coatings. *Biomaterials*, 19. 125–131.
- Weng, W. & Baptista, J. L. (1998b): Sol-gel derived porous hydroxyapatite coatings. *J Mater Sci Mater Med*, 9. 159–163.
- Wheeler, S. L. (1996): Eight-year clinical retrospective study of titanium plasma-sprayed and hydroxyapatite-coated cylinder implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11. 340–350.
- Whitehead, R. Y., Lucas, L. C. & Lacefield, W. R. (1993): The effect of dissolution on plasma sprayed hydroxylapatite coatings on titanium. *Clin Mater*, 12. 31–39.
- Williams, D. F. (2008): On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29. 2941–2953.
- Williams, R. (Hrsg.) (2011): *Surface modification of biomaterials : Methods, analysis and applications*. Oxford, WP Woodhead Publ.
- Willmann, G. (1992): Materialeigenschaften von Hydroxylapatit-Keramik. *Mat.-wiss. u. Werkstofftech*, 23. 107–110.
- Wintermantel, E. & Ha, S. W. (2002): *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. (3), Springer. Berlin.
- Worsch, C. (2010): *Untersuchung beschichteter Gläser für die Heißformgebung*. Dissertation, Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Yamaguchi, M. & Weitzmann, M. N. (2012): High dose 1,25(OH)₂D₃ inhibits osteoblast mineralization in vitro. *Int J Mol Med*.
- Zhou, H. & Lee, J. (2011): Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomater*, 7. 2769–2781.

7 ANHANG

7.1 Tabellen

Tabelle 9 Eigenschaften von stöchiometrischem Hydroxylapatit

| | |
|---|---|
| Chemische Formel | $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ |
| Mineral Gruppe | Apatit, Calciumphosphat |
| Dichte ^(a) | 3,16 (g cm ⁻³) |
| Kristallstruktur | hexagonal (P6 ₃ /m); monoklin (P2 ₁ /b) |
| Molares Ca/P- Verhältnis | 1,67 |
| Schmelzpunkt ^(c) | 1650° C |
| Elastizitätsmodul ^(b) | 80-120 GPa |
| Druckfestigkeit ^(b) | 300-960 MPa |
| Zugfestigkeit ^(b) | 40-200 MPa |
| Biegefestigkeit ^(b) | 100-120 MPa |
| Wärmeausdehnungskoeffizient α ^(d) | 14,1 (10 ⁻⁶ /K) |

^(a) Epple, 2003; ^(b) Wintermantel und Ha 1998; ^(c) Willmann, 1992; ^(d) Breme et al., 1995

Tabelle 10 Zusammensetzung von Glasobjekträgern der Fa. Menzel-Gläser

| | | |
|-----------------|--------------------------------|--------|
| Siliziumdioxid | SiO ₂ | 72.20% |
| Natriumoxid | Na ₂ O | 14.30% |
| Kaliumoxid | K ₂ O | 1.20% |
| Calciumoxid | CaO | 6.40% |
| Magnesiumoxid | MgO | 4.30% |
| Aluminiumoxid | Al ₂ O ₃ | 1.20% |
| Eisenoxid | Fe ₂ O ₃ | 0.03% |
| Schwefeltrioxid | SO ₃ | 0.30% |

aus <http://www.menzel.de/Objekttraeger.687.0.html?L=0>

7.2 Verwendete Geräte

| | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|--|
| Absauganlage | <i>Vacusafe und Vacuboy</i> | Integra Bioscience AG, Switzerland |
| Begasungsbrutschrank | <i>Inc 153</i> | Memmert GmbH, D-Scwabach |
| Bunsenbrenner | <i>gasprofi 2 (SCS)</i> | WLD-TEC GmbH, D-Göttingen |
| Heiz-/Magnetrührer | <i>C-MAG HS4</i> | IKA® Works, Inc. Wilmington, NC |
| Inverses Mikroskop | <i>Bio Star</i> | Reichert-Jung (<i>heute Leica</i>) |
| Kleinst Tiefkälteschrank | <i>Profi-Master PMV</i> | National-Lab GmbH, D-Mölln |
| Kontaktwinkel- messgerät | <i>Typ: OCA 15EC</i> | Dataphysics, D-Filderstadt |
| Kritisch Punkt Trockner | <i>K850</i> | Emitech Ltd., UK-Ashford, Kent |
| Kritisch Punkt Trockner | <i>CPD030</i> | Balzers (<i>heute Leica</i>) |
| Lichtmikroskop | <i>Optishot-2</i> | Nikon GmbH, Japan |
| Mikroskopkamera | <i>Typ CF11/1</i> | Kappa optronics GmbH, D-Gleichen |
| Muffelofen | <i>HT400</i> | Linn High Therm, D-Eschenfelden |
| pH-Messelektrode | <i>Blueline 16 und 22 pH 0-14</i> | Schott Instruments, D-Mainz |
| pH-Meter | <i>pH 537</i> | WTW, D-Weilheim |
| Pipette | <i>Research pro, 500-5000µl</i> | Eppendorf AG, D- Hamburg |
| Pipette | <i>Research pro, 50-1000µl</i> | Eppendorf AG, D- Hamburg |
| Pipette | <i>Reference, 100-1000µl</i> | Eppendorf AG, D- Hamburg |
| Pipette | <i>Reference, 10-100µl</i> | Eppendorf AG, D- Hamburg |
| Pipette | <i>Research, 0,5-10µl</i> | Eppendorf AG, D- Hamburg |
| Pipette (8-Kanal) | <i>Transferpette®-8, 20-200µl</i> | BRAND GmbH, D-Wertheim |
| Pipettierhelfer | <i>accu-jet® pro</i> | BRAND GmbH, D-Wertheim |
| Plattenphotometer | <i>µQuant</i> | Bio-Tek Instruments Inc. |
| Präzisionswaage | <i>ABJ 120-4M</i> | Kern®GmbH, D-Balingen-Frommern |
| Raman Spektroskop | <i>Senterra</i> | Bruker |
| Röntgendiffraktometer | <i>X'PERT Pro MPD</i> | PANalytical B.V., NL-Almelo |
| Scanner | <i>V700 Photo</i> | EPSON GmbH, D-Meerbusch |
| Schichtdickenmessgerät | <i>QSG100</i> | Bal-Tec (<i>heute Leica</i>) |
| Schüttelwasserbad | <i>GFL®-1083</i> | Gesellschaft für Labortechnik, D-Burgwedel |
| SEM (REM) | <i>XL20 D654</i> | Philips Electronics V.V., NL- Eindhoven |
| SEM (REM) | <i>ULTRA plus GEMINI</i> | Carl ZEISS AG, D-Oberkochen |
| SEM (REM) | <i>XL30CP</i> | Philips Electronics V.V., NL- Eindhoven |

ANHANG

| | | |
|-----------------------|-----------------------------------|---|
| Spincoater Zentrifuge | <i>spin 150</i> | APT GmbH, D-Bienenbüttel |
| Sputter-Coater | <i>SCD 500</i> | Bal-Tec (<i>heute Leica</i>) |
| Stereomikroskop | <i>DMW 143 FBGG-B</i> | Motic® Deutschland GmbH, D-Wetzlar |
| Steril-Filter | <i>Bottle Top Filter Unit</i> | Nalgene®, Nalge Company, Sybron Corp., NY |
| Sterilwerkbank | <i>Scanlaf Mars SafetyClass 2</i> | LaboGene ApS, DK-Lyngø |
| Tischzentrifuge | <i>Biofuge stratos</i> | Heraeus instruments, Kendro Lab. Products |
| Trockenschrank | <i>Typ:B5060 EC-CO2</i> | Heraeus instruments, Kendro Lab. Products |
| Vortex-Gerät | <i>MS1 Minishaker</i> | IKA® Works, Inc. Wilmington, NC |

7.3 Gebrauchsmaterial /Laborbedarf

| | |
|-------------------------|---|
| Einmal-Pipettenspitzen: | 1-10 µl, 100-100 µl (Sarstedt, D-Nümbrecht) 2-200 µl (BRAND GmbH, D-Wertheim) 50-5000 µl (Eppendorf AG, D-Hamburg) |
| Serologische Pipetten | 5 ml, 10 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht) |
| Gewebekulturplatten | 6-, 24-, 96-Well-Platten mit Deckel (Sarstedt, D-Nümbrecht) 12- Well Platten mit Deckel (orange Scientific, B-Braine-l'Alleud) |
| Deckgläser | Ø13 mm, Thermanox™ (Thermo scientific, D-Braunschweig) |
| Zellkulturflaschen: | T-75 und T-25 (Sarstedt, D-Nümbrecht) |
| Zentrifugenröhrchen | 15, 50 ml PP, konischer Boden (Sarstedt, D-Nümbrecht) |
| CryoPure Gefäße | 1,8 ml (Sarstedt, D-Nümbrecht) |
| Microtubes (Cap) | 1,5 ml und 2 ml Reagiergefäß mit Deckel (Sarstedt, D-Nümbrecht) |
| Einmal-Spritzen | Discardit™ II, 10 ml und 20 ml, (BD Bioscience, NJ-USA) |
| Steril-Filter | 0,2 µm, Cellulose-Acetat-Filter (Satorius S. Biotech, D-Göttingen) 0,2 µm, Spritzenaufsatz, Filtropur (Sarstedt, D-Nümbrecht) |
| Zellsiebe | 70 µm, Aufsatz für 50ml Röhrchen, Falcon™ (BD Bioscience) |
| pH Indikatorstäbchen | pH-Fix 0-14 (Carl Roth® GmbH und CoKG, D-Karlsruhe) |
| Verschlussfolie | Parafilm® M (über Sarstedt, D-Nümbrecht) |

7.4 Verwendete Chemikalien

| | |
|---|--|
| 2-Propanol (Isopropanol, 99,5%) | Carl Roth® GmbH und CoKG, D-Karlsruhe |
| Aceton z.A. | Th. Geyer GmbH&CoKG, D-Renningen |
| Alizarin-Red-S | Sigma Aldrich® Chemie GmbH, D-Steinheim |
| Aqua ad injectabilia (Ampuwa®-Spüllösung) | Plastipur®, Fresenius Kabi, D-Homburg |
| Ca Standard Solution 1000 mg/l as CaCO ₃ | HACH LANGE GmbH, D-Düsseldorf |
| Ca Standard Solution 10mg/l as Ca | HACH LANGE GmbH, D-Düsseldorf |
| Calciumnitrat-Tetrahydrat | Carl Roth® GmbH und CoKG, D-Karlsruhe |
| Dexamethason, research grade | SERVA Electrophoresis GmbH, D-Heidelberg |
| EDTA solution, 1M | HACH LANGE GmbH, D-Düsseldorf |
| EGTA solution | HACH LANGE GmbH, D-Düsseldorf |
| Etanol, vergällt, ca 99%, Typ 642 | BÜFA Chemikalien GmbH & Co Ag, D-Hude |
| Ethanol, absolut (Purity ≥99,9%) | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Euparal, für die Mikroskopie | Carl Roth® GmbH und CoKG, D-Karlsruhe |
| Formaldehyd (Formalin) 37%, wässr. Lösung | Sigma Aldrich® Chemie GmbH, D-Steinheim |
| Giemsa Stain Solution (S11-019) | PAA Laboratories GmbH, A-Pasching |
| Glutardialdehydlösung (25%) | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Hämatoxylin nach Gill, No.3 | Sigma Aldrich® Chemie GmbH, D-Steinheim |
| L-Ascorbinsäure-2-Phosphat (-trisodiumsalt) | Sigma Aldrich® Chemie GmbH, D-Steinheim |
| Leukocyte Alkaline Phosphatase-Kit (86R-1Kt) | Sigma Aldrich® Chemie GmbH, D-Steinheim |
| L-Glutamin, 200mM (M11-004) | PAA Laboratories GmbH, A-Pasching |
| Natriumchlorid-Spüllösung (0.9%) | Plastipur®, Fresenius Kabi, D-Homburg |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck KGaA, Darmstadt, Germany |
| Natriumpyruvat (Brenztraubensäure Na-Salz) | Carl Roth® GmbH und CoKG, D-Karlsruhe |
| Natronlauge (NaOH(aq)), 1mol/l (1N) | Th. Geyer GmbH&CoKG, D-Renningen |
| Phosphatstandard, 50 mg/l as PO ₄ | HACH LANGE GmbH, D-Düsseldorf |
| PhosVer®-3 Reagent Powder Pillows | HACH LANGE GmbH, D-Düsseldorf |
| PMS (Phenazine methosulfate), pure | SERVA Electrophoresis GmbH, D-Heidelberg |
| Salzsäure (HCl(aq)) 1mol/l (1N) | Th. Geyer GmbH&CoKG, D-Renningen |
| Triethylphosphat (TEP) (purity 98%) | Sigma Aldrich® Chemie GmbH, D-Steinheim |
| Trypanblau | SERVA Electrophoresis GmbH, D-Heidelberg |
| Trypsin EDTA (1:250) 10 x conc. | PAA Laboratories GmbH, A-Pasching |
| Wasser, doppelt destilliert (Aqua bidest.) | Carl Roth® GmbH und CoKG, D-Karlsruhe |
| XTT | SERVA Electrophoresis GmbH, D-Heidelberg |

7.5 Zellkulturmedien und Puffer-Ansätze

DMEM, high Glucose (4,5g/l) -Flüssigmedien

- mit Phenolrotindikator, mit Natriumpyruvat und L-Glutamin(E15-843, PAA)
- ohne Phenolrot, mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat (E15-877, PAA)

DMEM, high Glucose (4,5g/l) Pulvermedium

- ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin, ohne Na-pyruvat (G0005,3010, PAA) wurde doppelt konzentriert (2X) angesetzt:

| | |
|---------|-------------------------------|
| 12,79 g | DMEM-Pulver (G0005,3010, PAA) |
| 3,7 g | NaHCO ₃ |
| 2 ml | Natriumpyruvatlösung (s.u.) |

ad **500 ml A. dest.** lösen, pH auf 7,2 einstellen mit 1 N HCl(aq) / NaOH(aq),
Der Ansatz wird mittels Vakuumpumpe durch eine sterile Filtereinheit mit eingelegtem Cellulose-Acetat-Filter (0,2µm) in eine sterile Glasflasche filtriert, wodurch sich der pH Wert auf 7,4 erhöht.

α – MEM Pulvermedium

| | |
|------------|---|
| 1x | Portioniertes M0644-Trockenmedium(M0644, Sigma-Aldrich) |
| 2,2 g | NaHCO ₃ |
| ad 1000 ml | A. dest |

lösen und pH auf 7,2 mit NaOH(aq) bzw. HCl(aq) einstellen und steril filtrieren (s.o.)

Phosphatpuffer (PBS)

Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca & Mg (H15-002, PAA)

Trypsin/EDTA-Lösung

1ml Trypsin/EDTA (10x) aufgetaut und mit 9 ml sterilem PBS verdünnt.
(beides PAA, Pasching, Austria)

7.6 Zutaten zur Komplettierung der Zellkulturmedien

Fetales Bovines Serum (FBS)

FBS, Standard Quality, EU approved (PAA, A15-101, Lot: A10106-1183)

FBS, Origin Brazil, Biochrom AG (S0115, Lot. 0214x)

Kontaminationsprophylaxe

Penicillin/Streptomycin (100x Concentrate), 10000 U/ml und 10 mg/ml P11-010, PAA

Amphotericin B; 0,25 mg/ml P11-001, PAA

L-Glutamin 200mM M11-004, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria

Natriumpyruvat (für 110 mg/l Medium)

1,1 g Natriumpyruvat (Brenztraubensäure, Roth)

ad 20 ml A. dest. lösen

sterilfiltrieren und in Aliquots à 1 ml bis zum Gebrauch bei -20° C lagern.

1 ml auf 500 ml 1x konzentriertem Medium geben.

7.7 Komplettierung der Gebrauchsmedien

Alle komplettierten Ansätze sind bei 4 °C ca. 6 Wochen haltbar. Eine Mediumkontrolle bei 37 °C und 5% CO₂-Sättigung im Brutschrank erfolgte zum Ausschluss von Kontaminationen.

Zellart:**Medium:**

SAOS-2, hOb-C, 0-139

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), PAA

mit 4,5 mg/l Glucose, 4 mM L-Glutamin und 110 mg/l Natriumpyruvat

10% fetales Kälberserum (FBS)

1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml und 100 µg/ml)

1% Amphotericin B (2,5 µg/ml)

0,2% Dexamethason (0,1 µM).

DMEM (2x)-Konz. Ansatz, ohne Phenolrot (siehe Seite 78)

wurde doppelt komplettiert in 50 ml Portionen mit

35,8 ml Med (2x, sf)

10 ml FBS

1 ml Penicillin/Streptomycin

1 ml Amphotericin B

200 µl Dexamethason

2 ml L-Glutamin (4mM Endkonzentration)

F128/2, F133

Minimum Essential Medium Eagle, Alpha Modification (α -MEM)

10% fetales Kälberserum (FBS)

1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml und 100 μ g/ml)

1% Amphotericin B (2,5 μ g/ml)

Spezielle Medienzusätze für Osteoblastenkulturen:

Dexamethason- Stammlösung, 20 μ g/ml (51 μ M):

| | |
|---------|---------------------------|
| 0,001 g | Dexamethason (MW 392,0) |
| in 1 ml | Ethanol absolut lösen und |
| ad 49ml | PBS |

zu je 1ml portionieren und bei -20 °C lagern. *Anwendung:* 1 Portion (1 ml) auf 500ml DMEM (s.o.) ergibt eine Endkonzentration von 40 ng/ml (0,10 μ M).

Ascorbinsäure - 2-Phosphat- Stammlösung 20mM:

| | |
|---------|---|
| 64,4 mg | L-Ascorbis Acid 2 Phosphate (trisodiumsalt) |
| 10 ml | PBS |

Portioniert à 125 μ l in -20 °C gelagert.

Ascorbinsäure-haltiges Medium wurde nach Bedarf stets frisch zubereitet.

Für Mediumansatz (50 μ M= 16,1 μ g/ml Endkonzentration):

| | |
|-------------|---------------------|
| 125 μ l | Stammlösung |
| ad 50ml | komplettiertem DMEM |

7.8 Positivkontrolle für Zytotoxizitätsassay

1 g/l Kupfer(II)-Sulfat-Stammlösung:

| | |
|------------|---|
| 0,251156 g | CuSO ₄ , wasserfrei (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) |
| 100 ml | A. bidest. |

20 mg/l Cu(II)-Gebrauchslösung:

| | |
|--------------|--------------------------------------|
| 50 μ l | Kupfer(II)-Sulfat-Stammlösung (1g/l) |
| 2450 μ l | PBS-Puffer gelöst |

7.9 Ethik-Kommissions-Antrag

Diese Studie gehört zum Studienplan „*Optimierung der Bioverträglichkeit medizinischer/ zahnmedizinischer Produkte durch geeignete Oberflächen-behandlung.*“

Es bestehen keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken durch die Ethik-Kommission zur Durchführung des Studienplans.

Der Antrag läuft unter der Nummer AZ: D 457/11.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. H. Fischer-Brandies danke ich für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit im Zellkultur-Labor der Klinik für Kieferorthopädie wissenschaftlich arbeiten zu können.

Herrn Prof. M. Es-Souni danke ich für die Möglichkeit im Rahmen dieser Studie die Räumlichkeiten und technischen Geräte im Institut für Werkstoffkunde und Oberflächentechnologie der FH Kiel für die Herstellung und Charakterisierung der Hydroxylapatit-Beschichtungen benutzen zu dürfen.

Mein größter Dank gilt *Frau Dr. M. Es-Souni* für ihre ausgesprochen engagierte und fachliche Unterstützung während der gesamten Promotion. Ohne Sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Dem *Kompetenzzentrum Funktionale Oberflächen TraFo* (Projektträger FuE-Zentrum FH Kiel GmbH) danke ich für die Finanzierung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Bei *Frau Martina Schneeberg* und *Herrn Robert Csiesilski* möchte ich mich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre stete Hilfsbereitschaft im Zusammenhang mit dieser Arbeit bedanken.

Allen Mitarbeitern und Kollegen der Klinik für Kieferorthopädie sowie den anderen Doktoranden danke ich an dieser Stelle für ihre Hilfsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Frank Lehmann gilt mein Dank für die Einweisungen und Unterstützung bei der Benutzung des Rasterelektronenmikroskops der Zahnklinik.

Herrn Prof. R. Lucius und *Herrn Frank Lichte* danke ich sehr herzlich für die Möglichkeit während länger dauernder Umbaumaßnahmen in der Zahnklinik die REM-Aufnahmen am Anatomischen Institut der CAU Kiel fortsetzen zu können. Die Räumlichkeiten und technischen Geräte standen mir jederzeit frei zur Verfügung. Vielen Dank für das von Ihnen entgegengebrachte Vertrauen.

Bei den *Koreferenten* möchte ich mich für die Begutachtung und das Interesse an meiner Arbeit bedanken.

Meinem Vater, *Dr. Ekkehard Kraas*, danke ich sehr für seine Hilfe bei den statistischen Auswertungen sowie dem wiederholten Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Dr. Claudia Ehlert danke ich besonders für die geduldigen Korrekturen des schriftlichen Teils dieser Promotion, ihr offenes Ohr sowie für die zahllosen Tassen Kaffee während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei meinen Freunden möchte ich mich ebenfalls bedanken für ihr offenes Ohr, ihr Verständnis sowie die notwendige moralische Unterstützung.

Last, but not least gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, meinen Geschwistern sowie meinem Freund Jan Ueberall für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung während des gesamten Studiums, der Promotion und darüber hinaus.

AKADEMISCHER LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Friederike Kraas
Geboren: 26.09.1984 in Lübeck

Schulbildung:

1995 - 2004 Gymnasium Domschule, Schleswig
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

2005 - 2011 Studium der Zahnmedizin an der Christan-Albrechts-Universität zu Kiel
Abschluss: Staatsexamen und Approbation im Juni 2011

Promotion:

09/2011 - 06/2012 Planung und Durchführung des experimentellen Teils der Dissertation

Berufliche Tätigkeit:

08/2011 - 06/2012 Wissenschaftliche Angestellte an der Klinik für Kieferorthopädie im UKSH, Campus Kiel
08/2012 – 12/2013 Assistenz Zahnärztin in freier Praxis, Lübeck
seit 2014 Weiterbildungsassistentin in kieferorthopädischer Praxis, Lübeck

PUBLIKATION

F. Kraas, H. Fischer-Brandies, M. Es-Souni

„In-vitro-Bioverträglichkeit synthetischer Hydroxylapatit-Beschichtungen auf verschiedenen Substratoberflächen.“

Poster auf der 85. Wissenschaftlichen Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kieferorthopädie; ICS Stuttgart, 26. - 29. September 2012.