Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

$AuTiO_2$ vs. TiO_2 – In-vitro Vergleich von nanostrukturierten goldbeschichteten Titanoberflächen mit klassischem TiO_2 bezüglich Biokompatibilität und Wachstumsverhalten von Osteoblasten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Spyridon Kalantzis
aus Holargos, Griechenland

Kiel (2023)

1. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. dent. Aydin Gülses
2. Berichterstatter/in:	Prof. Dr. med. dent. Sinan Sen
Tag der mündlichen Prüfung:	19.12.2024
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	30.08.2024

gez.: Prof. Dr. med. dent. Aydin Gülses

(Vorsitzende/r der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I. Glossarium ..... **III**

1. Einleitung **1**

2. Grundlagen **3**

2.1 Mechanische Eigenschaften von Titan 3

2.1.1 α-Legierungen 3

2.1.2 (α+β)-Legierungen 4

2.1.3 β-Legierungen 5

2.2 Titanoberfläche 7

2.2.1 Oberflächenmodifikationen 7

2.3 Biologische Eigenschaften von Titan 11

2.3.1 Biokompatibilität 11

2.3.2 Korrosionsbeständigkeit 13

2.3.3 Zell- und Proteininteraktion 15

2.3.4 Osseointegration 16

2.4 Osteoblasten 19

2.5 Nanotechnologie, -topographie und Titanimplantate 20

2.6 Goldnanopartikel 22

2.6.1 Grundeigenschaften und biomedizinische Anwendungsbereiche 22

2.6.2 Herstellungsverfahren 23

3. Fragestellung **25**

4. Material und Methoden **26**

4.1 Titanplatten 26

4.2 Herstellungsprozess der TiO_2-Filme 26

4.3 Beschichtung mit Goldnanostrukturen 28

4.4 Zellkulturen und Versuchsvorbereitung 29

4.5 Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop 31

4.6 MTT-Test 32

4.7 BrdU-Test 32

4.8 FDA/PI-Färbung 33

4.9 Statistische Analyse 34

5. Ergebnisse **35**

5.1 Oberflächenanalyse 35

5.2 Zellanalyse am Rasterelektronenmikroskop 36

5.2.1 Au-TiO_2-Oberfläche 37

5.2.2 TiO_2-Oberfläche 39
5.2.3 Kontrolle 41
5.3 MTT-Test 43
5.4 BrdU-Test 44
5.5 FDA/PI-Färbung 45
5.5.1 Au-TiO_2-Oberfläche 45
5.5.2 TiO_2-Oberfläche 47
5.5.3 Kontrolle 49
6. Diskussion **51**
6.1 Material 51
6.1.1 Ti(O_2) 51
6.1.2 AuNPs 52
6.2 Methoden 54
6.3 Ergebnisse 56
6.3.1 Oberflächenanalyse 56
6.3.2 Ti(O_2) 58
6.3.3 Au-TiO_2 und (Gold-)Nanopartikel 59
6.4 Ausblick 63
7. Zusammenfassung **65**
8. Literaturverzeichnis **67**
9. Danksagung **75**
10. Publikation zur Dissertation **76**
11. Eidesstattliche Versicherung **77**

I. Glossarium

Å – Ångström

Al – Aluminium

Au – Gold

AuNP – Goldnanopartikel

BCECF-AM – (2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein-Acetoxymethylester

BIC – Knochen-Implantat-Kontakt

BMP – Bone Morphogenetic Proteins

BrdU – 5-Brom-2-desoxyuridin

BSP – Bone Sialoprotein

C – Kohlenstoff

CA – Kontaktwinkel

Calcein-AM – Calcein-Acetoxymethylester

Cl – Chlor

Co – Cobald

COL1 – Kollagen Typ I

cp-Ti – Commercially pure titanium / Reintitan

Cr – Chrom

CVD – chemische Gasphasenabscheidung

DCD – diskrete kristalline Deposition

DIN – Deutsches Institut für Normung e.V.

EGF – Epidermal Growth Factor

ELI – extra low interstitial

EphB4 – Ephrin-Typ-B-Rezeptor 4

FDA – Fluoresceindiacetat

Fe – Eisen

GH – Growth Hormone

H – Wasserstoff

HA – Hydroxyapatit

Hf – Hafnium

hOB – humane Osteoblasten

IBAD – ionenstrahlgestützter Deposition

IL-1β – Interleukin-1β

ISO – Internationale Organisation für Normierung

kHz – Kilohertz

M – Mol

Mo – Molybdän

MSC – Mesenchymale Stammzellen

MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

mW – Milliwatt

N – Stickstoff

Ni – Nickel

NRU – Neutral Red Uptake

O – Sauerstoff

OCN - Osteocalcin

OPN – Osteopontin

OPG - Osteoprotegerin

Pa – Pascal

PBS – Phosphatpufferlösung

PI – Propidiumiodid

PVD – physikalische Gasphasenabscheidung

RANK(L) – Receptor Activator of NF-κB (-Ligand)

RES – Resazurin Reduction

Runx2 – Runt-related transcription factor 2

sccm - Standardkubikzentimeter pro Minute

Si – Silicium

SLA – sandgestrahlt und säuregeätzt

Sn – Zinn

SRB – Sulforhodamine B

STABW – Standardabweichung

Ti – Titan

TiO_2 – Titandioxid

TNF-α – Tumornekrosefaktor α

TPS – Titan-Plasma-Spray

UV – ultraviolett

V – Vanadium

Zr – Zirkon

1. Einleitung

Titan ist ein Metall, welches in den Gebieten der Medizin und Zahnmedizin eine breite Verwendung findet. Seit 1965, das Jahr in dem der Mediziner Per-Ingvar Brånemark einem Patienten erstmals Zahnimplantate aus Titan einsetzte, ist der Werkstoff in den allermeisten Fällen Mittel der Wahl, wenn es darum geht etwas in den menschlichen Körper zu implantieren. Heute stößt man in unterschiedlichsten Bereichen auf das Material: Einer der häufigsten Eingriffe in der chirurgischen Orthopädie stellt der künstliche Gelenksersatz mittels Endoprothesen dar; laut dem Endoprothesenregister Deutschland (EPRD) wurden über 300.000 solcher Operationen im Jahr 2018 durchgeführt (1). Und auch die Zahlen der jährlich eingesetzten dentalen Implantate sind beeindruckend, 2018 waren es 1,3 Millionen (2), Tendenz steigend. Sämtliche Materialien, die für die Osteosynthese benötigt werden (Platten, Schrauben, Nägel) bestehen in der Regel aus Titan und auch in den Gehäusen von Herzschrittmachern, dem künstlichen Steigbügel im Ohr, bei künstlichen Herzklappen oder ganzen Kunstherzen und Gefäßclips finden wir das Metall wieder.

Titan ist das in der Erdkruste am neunthäufigsten vorkommende Metall; man findet es meist gebunden in Form von Mineralien und seltener in Reinform. Zum ersten Mal wurde es 1791 von William Gregor entdeckt, doch es vergingen viele Jahre ehe William Justin Kroll 1938 das nach ihm benannte Verfahren entwickelte, mit dem technisch reines Titan großtechnisch hergestellt werden konnte. Erst dann erlangte es industrielle Bedeutung und wird nun neben der Medizintechnik auch in Luft- und Raumfahrt (ursprünglich für diesen Bereich entwickelt), Verkehrstechnik, Fahrzeugtechnik, chemischen Industrie, Schmuckindustrie, Energietechnik, Meerestechnik, Architektur- und Freizeitbereich eingesetzt.

Aus heutiger Sicht ist die Suche nach einem Ersatz für Titan schwierig, vor allem im medizinischen Bereich. Biomaterialien sind eine uneinheitliche Werkstoffgruppe, können aber in vier Hauptkategorien eingeteilt werden: Metalle/Metalllegierungen, Polymere, Keramiken und Verbundwerkstoffe (3). Es gibt eine Reihe von Kriterien, die Biomaterialien erfüllen müssen, darunter Biokompatibilität, Korrosionsbeständigkeit, Bioadhäsion, geeignete mechanische Eigenschaften (Elastizität, Belastbarkeit etc.) und natürlich auch eine breite Verfügbarkeit um die Mengen, die für eine ausreichende Versorgung vonnöten sind, decken zu können (4). Die Auswahl an Werkstoffen ist groß, aber die physikalischen, chemischen und mechanischen Limitationen sind zum Teil erheblich. Synthetische Polymere haben viskoelastische Eigenschaften und niedrige E-Module und sind somit ungeeignet um große Lasten zu tragen, außerdem enthalten sie meistens Zusatzstoffe, die toxisches und allergisches Potential haben können (5). Keramiken wurden in den letzten Jahren bedeutend weiterentwickelt und stellen in manchen Bereichen wie der dentalen Implantologie eine

mittlerweile gute Alternative dar. Einige Probleme bestehen dennoch weiterhin; Keramiken sind von Natur aus spröde und anfällig auf Zugbelastung, sodass es bei Überschreitung der Bruchfestigkeit zu Spontanbrüchen kommt. Durch fehlende Daten kann außerdem noch keine Aussage für die Langzeitbewährung von Keramikimplantaten getroffen werden. Verbundwerkstoffe haben den Vorteil, dass sie durch die Kombination unterschiedlicher Materialien ihre Eigenschaften für die gewünschte Anwendung optimieren können. Calciumphosphat-Keramiken werden zum Beispiel seit Jahren erfolgreich als Knochenersatzmaterial eingesetzt, aber bis heute ist es nicht gelungen einen Werkstoff herzustellen, der im Bereich der Orthopädischen Chirurgie/Implantologie besser funktioniert als Metalle. Diese bleiben als zyklisch belastete Implantate das Mittel der Wahl, da sie einige wichtige Eigenschaften, wie eine hohe mechanische Festigkeit mit einer exzellenten Bruchzähigkeit kombinieren (5). Es kommen drei große Gruppen von Metall(-legierungen) infrage: nichtrostende Stähle (SUS 316L), Cobalt-Legierungen (hauptsächlich CoCrMo und CoNiCr) und technisch reines Titan (cp-Ti)/Titanlegierungen (z.B Ti-6Al-4V) (6). Als jüngste Alternative gelten Magnesiumlegierungen, die als resorbierbares Material allerdings ein wesentlich kleineres Indikationsspektrum haben und weitere Forschung benötigen bis sie konkurrenzfähig werden. Obwohl all diese Materialien heute noch in der Medizintechnik zum Einsatz kommen, hat sich Titan als erste Wahl durchgesetzt und ist nur in seltenen Fällen adäquat zu ersetzen; es weist eine Reihe von Eigenschaften auf, die der Einheilung und Langlebigkeit im menschlichen Körper zugutekommen.

Je nachdem welche der oben genannten Eigenschaften am relevantesten ist, unterscheidet sich die Art von dem verwendeten Titan, abhängig vom Anwendungsgebiet, geringfügig. Während in der Endoprothetik hauptsächlich Legierungen verwendet werden (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb), wird in der Dentaltechnik sowohl unlegiertes Titan als auch seine Legierungen benutzt (7). Dort, wo die Belastung auf die Titanimplantate gering ist, wird unlegiertes Titan, aufgrund seiner geringeren Dichte, verwendet.

2. Grundlagen

2.1 Mechanische Eigenschaften von Titan

Das chemische Element Titan besitzt die Ordnungszahl 22. Es steht in der 4. Nebengruppe des Periodensystems und wird zu den Übergangsmetallen gezählt. Es weist bei Raumtemperatur eine Dichte von 4,51g/cm^3 auf und wird damit gerade noch den Leichtmetallen zugeordnet (Grenze: 5g/cm^3).

Wie auch einige andere Metalle, tritt Titan in verschiedenen Gitterstrukturen auf, genauer gesagt in zwei: Die α-Phase weist eine hexagonal dicht gepackte und die β-Phase eine kubisch-raumzentrierte Modifikation auf, die Transustemperatur, bei der die α-Phase in die β-Phase umgewandelt wird, liegt bei 882±2°C (4). Dieser Prozess nennt sich allotrope Umwandlung. Die räumliche Anordnung der Atome und die vorliegende Modifikation beeinflusst die Eigenschaften des Werkstoffes maßgeblich.

Ebenso großen Einfluss nehmen Fremdatome, die in die Kristallgitterstruktur integriert werden können; es entstehen Legierungen. Titanlegierungen wurden das erste Mal Ende der 1940er Jahre in den USA hergestellt. Obwohl es heute über 100 verschiedene Legierungen gibt, machen das Reintitan und Ti-6Al-4V gemeinsam den Großteil der Gesamtproduktion aus (4). Die grundsätzliche Einteilung erfolgt in drei Hauptgruppen: α-Legierungen, (α+β)-Legierungen und β-Legierungen. Dazwischen wird noch weiter unterteilt in Near-α (geringe Beimischung von β-stabilisierenden Elementen) und ß-metastabile Legierungen (sehr hoher Anteil an β-stabilisierenden Elementen).

2.1.1 α-Legierungen

Zu den α-Legierungen werden Reintitan und alle Legierungen gezählt, die ausschließlich α-stabilisierende (Aluminium, Sauerstoff, Stickstoff, Kohlenstoff) und/oder neutrale (Zinn, Zirkon) Elemente enthalten (8). Die α-stabilisierenden Elemente sorgen dafür, dass die α-Phase auch bei höheren Temperaturen stabil bleibt. Gerade bei Titan muss beachtet werden, dass keine absolute Reinheit erzielt werden kann. Man unterscheidet 4 Reinheitsgrade:

Grade	**Ti** (min.:)	**Fe** (max.:)	**O** (max.:)	**N** (max.:)	**C** (max.:)	**H** (max.:)
Grade 1	99.475	0,2	0,18	0,03	0,1	0,015
Grade 2	99,305	0,3	0,25	0,03	0,1	0,015
Grade 3	99,185	0,3	0,35	0,05	0,1	0,015
Grade 4	98,935	0,5	0,4	0,05	0,1	0,015

Tabelle 1: Zusammensetzung von technisch reinem Titan (in Masse%) (9)

Die Grade 1 (DIN-Werkstoffnummer: 3.7025) und 2 (3.7035) werden in der Zahnmedizin in Form von Implantaten, Implantataufbauten und Stiftaufbauten eingesetzt, die Grade 3 & 4 finden kaum Verwendung in der Medizintechnik. Ebenso wenig Relevanz in diesem Bereich finden auch alle anderen α-Legierungen, wie z.B Ti-5Al-2.5Sn oder Ti-0,2Pd.

α-Titanlegierungen haben zwei wichtige Eigenschaften, sie weisen eine herausragende Korrosionsbeständigkeit (sogar noch besser als die anderen Gruppen) und Verformbarkeit/Duktilität auf (4,10). Einbußen muss man, im Vergleich zu den (α+β)- und β-Legierungen hingegen bei der Festigkeit hinnehmen (s. Tab. 2). Weitere Pluspunkte für den Anwendungsbereich der Zahnmedizin sind die Geschmacksneutralität und die geringe Wärmeleitfähigkeit (Schutz der Zahnpulpa und der Weich- und Hartgewebe der Mundhöhle vor thermischer Schädigung) dieser Werkstoffe (8).

Die Near-α-Titanlegierungen haben durch die Beimischung von β-stabilisierenden Elementen eine höhere Festigkeit in ihrem Einsatzgebiet von 500-550°C, behalten aber die guten Kriecheigenschaften der α-Legierungen (4). Diese Gruppe besitzt keine medizinische Relevanz.

2.1.2 (α+β)-Legierungen

Der größte Teil der verwendeten Titanlegierungen im medizinischen Bereich gehört der Gruppe der (α+β)-Legierungen an. Die Zusammensetzung dieser Legierungen sieht einen Anteil von 10-30% β-Phase vor, der Großteil besteht dementsprechend aus α-Phase (10). Wie bereits erwähnt ist die Transustemperatur zur β-Phase sehr hoch; dass diese aber auch bei niedrigeren Temperaturen stabil sein kann, liegt an den β-stabilisierenden Elementen Vanadium, Niob, Molybdän und Tantal.

Mit den α-Legierungen gibt es in punkto Korrosionsbeständigkeit und Biokompatibilität bereits eine sehr gute Option, der wohl größte Unterschied und Vorteil der (α+β)-Gruppe ist die im Vergleich höhere Dauerfestigkeit (s. Tab. 2). Deshalb werden hoch belastete Endoprothesen in der Regel aus diesen Materialien angefertigt (8).

Die mit Abstand gebräuchlichste und am besten untersuchte Titanlegierung Ti-6Al-4V gehört ebenfalls in diese Gruppe. Die Zusammensetzung geht aus dem Namen hervor; dem Titan sind etwa 6% Aluminium und 4% Vanadium beigemischt. Unterschieden werden muss zwischen dem kommerzielleren Ti-6Al-4V (Grade 5) und dem für medizinische Zwecke standardmäßig verwendetem Ti-6Al-4V ELI (Grade 23). ELI steht für extra low interstitial und bedeutet, dass der Werkstoff möglichst wenig Verunreinigungen in Form von andersartigen Elementen enthält; in diesem Fall ist lediglich etwa 0,12% Sauerstoff zugesetzt (11). Die Überlegenheit der Legierung im Vergleich zu cp-Ti zeigt sich in den Werten der

Festigkeit; Vickers-Härte, 0,2% Dehngrenze und Zugfestigkeit sind um ein Vielfaches höher (s. Tab. 2). Auch die Bruchanfälligkeit ist hier geringer, das E-Modul ist hingegen vergleichbar. Obwohl die Kaltverformung, wie auch bei den α-Legierungen, nicht möglich ist, kann dieser Werkstoff wärmebehandelt werden. Studien haben allerdings gezeigt, dass Vanadium potenziell toxische Eigenschaften hat, karzinogenes Potenzial besitzt (12) und die Ursache für Implantatversagen (13) sein kann. Deshalb wurden neue Legierungen entwickelt, die auf Vanadium verzichten.

Bei Ti-6Al-7Nb stellt das Element Niob mit einem Anteil von 7% den Ersatz da. Diese Legierung wird hauptsächlich beim Hüftgelenkersatz verwendet und weist vergleichbare mechanische Eigenschaften mit Ti-6Al-4V auf (s. Tab. 2) und ist sogar in den Punkten Duktilität und Korrosionsresistenz überlegen (14).

Ti-5Al-2.5Fe mit 2,5% Eisen ist eine weitere Alternative. Hauptvorteil dieser Legierung sind exzellente (Dauer-)Festigkeitseigenschaften (s. Tab. 2).

2.1.3 β-Legierungen

Nachdem in Studien eine Assoziierung mit einigen Krankheiten (15–17) gezeigt werden konnte, ist neben Vanadium auch die Skepsis gegenüber Aluminium, dem wichtigsten Legierungselement des Titans, größer geworden. So wurden, hauptsächlich in den USA, neue β-Titanlegierungen entwickelt. Elemente wie Molybdän, Zirkonium, Niob und Hafnium rückten vermehrt in den Fokus und sollten als Ersatz dienen. Sie weisen eine hervorragende Biokompatibilität auf (18), haben dafür aber ein deutlich höheres spezifisches Gewicht als Aluminium oder Vanadium und machen die Legierungen somit schwerer.
Wang (19) schlägt folgende fünf β-Titanlegierungen zur medizinischen Anwendung vor: TMZF™, Ti-13Nb-13Zr, TIMETAL® 21SRx, Tiadyne 1610 und Ti-15Mo. Die Eigenschaften sind der Tabelle 2 zu entnehmen:

	Vickershärte (HV)	E-Modul [GPa]	0,2%-Dehngrenze [Mpa]	Zugfestigkeit [Mpa]	Bruchdehnung [%]	Bruchzähigkeit [Mpa] $m^{1/2}$]	Dauerfestigkeit [10^7Zykten; Mpa]
α-Titan Grade 1 cp-Ti	120	102.7	170	240	24		430
Grade 2 cp-Ti	160-200	102.7	275	345	20	58-66	
(α+β) Legierungen Ti-6Al-4V	300-400	110-114	825-869	895-930	6-10	65-90	500
Ti-6Al-4V ELI	350	101-110	795-875	860-965	10-15	91-92	
Ti-6Al-7Nb	293-310	114	880-950	900-1050	8,1-15		500-600
Ti-5Al-2.5Fe	~300	112	895	1020	15	39,2-57,1	580
β-Legierungen TMZF™ (Ti-12Mo-6Zr-2Fe)		74-85	1000-1060	1060-1100	18-22	88-92	525
Ti-13Nb-13Zr		79-84	836-908	973-1037	10-16	~65	500
TIMETAL® 21SRx (Ti-15Mo-2.8Nb-0.2Si)		83	945-987	979-999	16-18		
Tiadyne 1610 (Ti-16Nb-10Hf)		81	736	851	10		
Ti-15Mo		78	544	874	21		

Tabelle 2: Mechanische Eigenschaften ausgewählter Titanlegierungen in der Medizintechnik [Werte aus (10,20–23)]

Es fällt auf, dass diese Gruppe deutlich geringere E-Module aufweist als die α- und (α+β)-Legierungen. Das ist ein großer Vorteil, denn damit kommen sie dem E-Modul des menschlichen Knochens näher (s.u).

Die Festigkeitseigenschaften variieren innerhalb der Gruppe stark und sind abhängig von den beigemischten Elementen, können aber wie bei der Legierung TMZF™ Spitzenwerte erreichen.

2.2 Titanoberfläche

Titan weist eine hohe Affinität zu Sauerstoff auf, sodass sich schon bei Raumtemperatur in natürlichen Umgebungsverhältnissen eine sehr dichte, aber dünne Titandioxidschicht (TiO_2) auf der Oberfläche ausbildet (4). Dieser chemische Mechanismus nennt sich spontane Passivierung. Die Passivierungsschicht stellt einen Schutz für das Metall dar und ihre Eigenschaften sind bestimmend für die Interaktion mit der Umgebung.

2.2.1 Oberflächenmodifikationen

Die Titan-Implantatoberfläche kann topographisch, chemisch und physikalisch verändert werden, wobei erstere beiden Punkte hauptsächlich im Forschungsmittelpunkt stehen (24).

Topographische Modifikationen

Aus topograpischer Sicht macht eine Betrachtung in Millimeter-, Mikrometer- und Nanometerebene Sinn.

Potenzielle Modifikationen im Millimeterbereich werden seit Jahrzehnten vor allem in der Zahnmedizin diskutiert und betreffen hauptsächlich das Implantatdesign (Goldstandard: Schraubenform), in der orthopädischen Chirurgie sind vor allem die makroskopischen Oberflächenveränderungen von Interesse (24).

Auf Mikrometerebene wird weiter unterteilt in glatte (<0,5 µm), leicht raue (0,5-1 µm), moderat raue (1-2 µm) und raue (>2 µm) Oberflächen (24). Die moderat rauen Implantate scheinen, gegenüber den glatteren und rauheren, Vorteile in Hinblick auf die Einheilung bzw. Osseointegration (s.u) aufzuweisen (24,25). Die gängigen Verfahren zur Erzeugung der Rauheit sind entweder additiv (Erzeugung von Unebenheiten durch Beschichtung), so wie die Plasma- oder Titanbeschichtungen, oder subtraktiv (Erzeugung von Gruben durch Materialabtrag); hierzu zählen Ätzen, Sandstrahlen, Kombinationen dieser beiden Verfahren und die (anodische) Oxidation (24).

Die jüngsten Ansätze für Veränderungen liegen in einem Bereich von 1-100nm. Nanostrukturen wie Hydroxyapatit (HA), andere Calciumphosphatverbindungen, Titandioxid oder weitere Metallnanopartikel, können mittlerweile, begünstigt durch die Entwicklungen der letzten Jahre in der Nanotechnologie, auflegiert werden (24); es scheint aber auch so zu sein, dass sich bei bestimmten Herstellungsprozessen (Säureätzung in Kombination mit Lagerung in wässrigen Lösungen) spontan Nanostrukturen auf den Oberflächen bilden können (24,26,27).

Chemische Modifikationen

Die bereits erwähnte HA-Beschichtung war nicht nur aufgrund der Erhöhung der Rauigkeit ziemlich früh in der Forschung interessant, sondern hauptsächlich aufgrund ihrer ähnlichen Zusammensetzung zu Knochen, bzw. der Tatsache, dass es Bestandteil dieses Gewebes ist und somit eine chemische Bindung zwischen Implantat und Knochen fördern sollte (24). Aus diversen Gründen (s.u) hat sich dieses Verfahren (noch) nicht durchgesetzt, das Schaffen einer solchen chemischen Bindung wird dennoch, hauptsächlich mit potenziell bioaktiven Ionen (wie Calcium, Fluorid und Magnesium), aber auch Medikamenten (z.B. Bisphosponaten), Wachstumsfaktoren (u.a. BMPs, EGF, GH) oder anderen Molekülen, wie extrazellulären Matrixkomponenten (z.B. kollagenen Eiweißen oder Chondroitinsulfat) weiter angestrebt (24,26).

Physikalische Modifikationen

Ladung, Benetzbarkeit und Energie der Oberfläche werden ebenfalls als mögliche Faktoren für die Interaktion von Implantaten zu ihrer Umgebung angesehen (24). Je größer die Oberflächenenergie, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Bindungen zur Umgebung eingegangen werden. Die Annahme lautet, dass diese Energie positiv mit der Sauberkeit der Oberfläche korreliert; deshalb wurden Techniken wie UV-Licht-Bestrahlung und physikalische Reinigungsmethoden unter Argon- oder Stickstoffschutz entwickelt (24). Auch hier fehlt noch die klinische Evidenz.

Herstellungsverfahren

Im Folgenden werden die Herstellungsverfahren der bedeutendsten Oberflächenmodifikationen erläutert.

Sandstrahlen

Beim Sandstrahlen werden meist harte keramische Partikel durch einen Hochdruckluftstrom auf die Titanoberfläche „geschossen“ (26). Je nach Größe dieser Partikel, variiert auch die Größe der Impressionen, die auf dem Implantat entstehen; entscheidender als der Partikeldurchmesser sind aber andere Eigenschaften wie chemische Stabilität und Biokompatibilität (26). Am häufigsten wird Aluminiumoxid (Al_2O_3) und danach Titanoxid und Calciumphosphat verwendet (26).

Säureätzen

Ähnlich wie beim Sandstrahlen werden subtraktiv Mikroporen auf der Oberfläche geschaffen, hier aber durch die Verwendung von Säuren. Diverse Säuren können für diesen Prozess benutzt werden, Salzsäure, Salpetersäure, Flusssäure, Schwefelsäure (26). Eine Weiterentwicklung stellt die Kombination von Säuren dar, beim „dual-acid-etch"-Verfahren werden die Implantate für einige Minuten mit einem erhitzten Gemisch aus konzentrierter Salz- und Schwefelsäure behandelt (24,26).

Kombiniertes Sandstrahlen und Säureätzen (SLA)

Die heute gängigste Modifikation kombiniert beide bereits erläuterten Verfahren miteinander. Zuerst wird das Sandstrahlen durchgeführt, dann folgt die Ätzung. Ersteres sorgt für eine gute initiale mechanische Verankerungsmöglichkeit, zweiteres verfeinert die Oberflächentopographie und -chemie durch Einfügen weiterer Mikro- und Nanoporositäten und Entfernung/Glättung von unerwünschten lokalen Modifikationen, die durch das Sandstrahlen entstanden sein könnten, mit dem positiven Nebeneffekt der Säuberung der Oberfläche, die von erheblicher Bedeutung sein kann (s.o) (26).

Plasma-Spritz-Verfahren

Beim Titan-Plasma-Spritzverfahren wird Titanpulver durch eine Plasmaflamme angeschmolzen, prallt dann auf die Implantatoberfläche, wo es kondensiert und als dünner Film mit einer Dicke von etwa 40-50 µm und Rauheit von etwa 7 µm zum liegen kommt (26,28).
Der Funktionsmechanismus für HA-Plasmaspritzen ist sehr ähnlich, allerdings muss vorher eine mikroraue Oberfläche durch Sandstrahlen erzeugt werden, um eine ausreichende Retention zu gewährleisten (26).

Anodisieren

Bei hohen Stromdichten (ca. 200 A/m^2) oder Spannungen (ca. 100 V) wird an der Titanoberfläche in einem starken säurehaltigen Medium eine Elektrolyse durchgeführt, die zur Bildung einer zusätzlichen künstlichen Oxidschicht führt, sodass eine Dicke von mehr als 1000 nm, abhängig von der exakten Art des Mediums, der Stromdichte und Temperatur, erreicht wird (26,29). Die Säuren sorgen gleichzeitig für die Bildung von Mikro- und Nanorauhigkeiten, sowie Änderungen in der Kristallstruktur der Oxidschicht (26,29).

Hydrophilisierung

Die Verfahren zur Hydrophilisierung der Oberfläche, und damit der Anpassung an die Haupteigenschaft ihrer Umgebung, beginnen mit kombiniertem Sandstrahlen und Säureätzen. Je nach System findet dann entweder vor der Implantation eine Behandlung mit Natriumhydroxid statt, welche zu einer kurzzeitigen Superhydrophilie führt, oder eine Stickstoffspülung mit anschließender Lagerung in isotoner Kochsalzlösung bis zum Zeitpunkt der Implantation (30). Auch die UV-Bestrahlung führt zu einer Steigerung der Hydrophilität.

Weitere Verfahren seien ebenfalls erwähnt: Laserstrahlverdampfen, Sol-Gel-Beschichtungen, Sputtern, ionenstrahlgestützte Deposition, elektrostatische Spraydeposition, diskrete kristalline Abscheidung, biomimetische Deposition (26).

Sie alle sind additive Verfahren, die sich auf das Beschichten der Titanoberfläche mit HA/Calciumphoshatverbindungen konzentrieren.

2.3 Biologische Eigenschaften von Titan

2.3.1 Biokompatibilität

In einer Konferenz der European Society for Biomaterials 1986 in Chester, England wurde der Begriff Biokompatibilität erstmals einheitlich definiert. Die Übersetzung würde lauten: „Die Fähigkeit eines Materials bei einer speziellen Anwendung eine geeignete Wirtsreaktion hervorzurufen“ (31). Diese Definition ist sehr allgemein gehalten; Wintermantel et al. (32) werden da präziser: „Unter Biokompatibilität wird die Verträglichkeit zwischen einem technischen und einem biologischen System verstanden“ (32). Bei diesem technischen System handelt es sich fast immer um ein Implantat, also „einem Medizinprodukt aus einem oder mehreren Bauteilen, dass absichtlich, entweder teilweise oder komplett, unter einer epithelialen Oberfläche im menschlichen Körper platziert wird“ (31).

Es lassen sich zwei Unterkategorien unterscheiden: statische und dynamische Biokompatibilität. Bei der statischen Biokompatibilität wird wiederum die Strukturbiokompatibilität (Anpassung der Struktureigenschaften des gesamten Implantatmateriales an die des umliegenden Gewebes) von der Oberflächenbiokompatibilität, die sich nur auf die äußersten Schichten des Implantates bezieht, abgegrenzt. Der dynamische Aspekt bezieht sich darüber hinaus auf den Faktor Zeit: Jedes Implantat verweilt eine gewisse Dauer im Organismus und sollte daher keine negativen Eigenschaften in dieser Zeitspanne entwickeln (32).

Obwohl Biomaterialien und Implantate stets optimiert werden, darf nicht vergessen werden, dass es sich um Fremdkörper handelt, die in den menschlichen Organismus eingebracht werden. Diese Tatsache hat immer eine Gewebsreaktion zur Folge. Implantat-Gewebe Interaktionen können in vier Kategorien unterteilt werden (32,33):

1. toxisch: Das umliegende Gewebe wird nekrotisch und stirbt ab.

2. (fast) bioinert: Wenn das Material nicht toxisch und biologisch inaktiv ist, bildet sich eine nicht-adhärente bindegewebige Kapsel um das Implantat.

3. bioaktiv: Wenn das Material nicht toxisch und biologisch aktiv ist, bildet sich eine Bindung an der Grenzfläche zum umliegenden Gewebe aus.

4. biodegradabel: Wenn das Material nicht toxisch ist und sich auflöst bzw. resorbiert wird, wird es durch das umliegende Gewebe ersetzt.

Materialien, die in die erste Kategorie fallen, dürfen unter keinen Umständen eingesetzt werden, bioinerte, bioaktive und biodegradable Implantate hingegen schon. Die genaue Auswahl muss auf das Anwendungsgebiet und dessen Anforderungen abgestimmt sein.

Biokompatibilität von Titan

Die Biokompatibilität von Titan ist breit untersucht. Die Literatur fokussiert sich zur Beurteilung dieser auf vier Hauptthemen: Bioinertität & Korrosion, Zell- und Proteininteraktion, Oberflächenstruktur und Osseointegration (34).

Wie bereits erwähnt verhält sich Titan als Metall bioinert; zu verdanken ist es hauptsächlich seiner dünnen Oberflächenoxidschicht. Durch Beschichtung mit speziellen Gläsern, Keramiken oder Partikeln können allerdings durchaus auch bioaktive Eigenschaften an der Oberfläche erzeugt werden (34).

Das Osteogenesemuster ist ebenfalls ein bewährter Parameter zur Beurteilung der Biokompatibilität (35). Titan induziert bei Knochenkontakt eine Kontaktosteogenese. Dabei kommt es zu einer Knochenbildung in unmittelbarem Kontakt mit dem Implantat mit Wachstum in Richtung der Implantatoberfläche (32). Das bedeutet, dass keine Zytotoxizität, aber auch keine förderlichen Eigenschaften vom Material ausgehen; das Material hat vor diesem Gesichtspunkt eine gute Biokompatibilität.

Das allergische Potenzial sollte möglichst gering sein damit die Biokompatibilität so hoch wie möglich ist. Über viele Jahre großer klinischer Erfahrung ist ein Konsens entstanden, dass durch Titan verursachte, echte Typ-IV-Allergien, nicht oder nur in absoluten Ausnahmefällen bestehen. Dies darf jedoch nicht zur Fehlannahme führen, dass auch Überempfindlichkeitsreaktionen ausgeschlossen sind; ganz im Gegenteil, die Zahl solcher Fallberichte ist in den letzten Jahren gestiegen.

Untersuchungen an der epidermalen Hautbarriere zeigen, dass die Penetration von Titanoxid, Reintitan, Legierungen und entsprechenden Nanopartikeln in tiefere Hautschichten mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht möglich ist (36). In Gegenwart von Flüssigkeiten und anderen Geweben kann der Feststoff Titan aber in Lösung gehen und freigesetzt werden, er korrodiert also, wenn auch nur in sehr geringen Mengen. Bestimmte biologische Umgebungen können diesen Prozess begünstigen, dies scheint in der oralen Mukosa der Fall zu sein (36). Die dauerhafte Präsenz einer großen Menge und Vielfalt von Mikroorganismen und ihren Stoffwechselprodukten, das damit einhergehende Entzündungsgeschehen und niedrige pH-Level, Zähneputzen und die Nutzung fluoridhaltiger Zahnpasten sind neben der Anwesenheit von Speichel und Elektrolyten besondere Faktoren. Außerdem ist die Epithelpermeabilität der Mundschleimhaut von Natur aus höher als die der

Epidermis, dafür verantwortlich ist in erster Linie der geringere Anteil an interzellulären Ceramiden, speziellen Lipiden, die in der Epidermis eine effektive Barriere bilden (im Vergleich zur Epidermis: 50%-75% in der keratinisierten Gingiva, am nicht-keratinisierten Epithel noch niedriger) (37).

Testmethoden für Allergien und Unverträglichkeiten liegen mit dem Patch-Test und dem Lymphozytentransformationstest vor. Derzeit werden diese Methoden für Titan allerdings als unzureichend angesehen, sodass die Bewertung von auftretenden Reaktionen weiterhin primär klinisch erfolgen sollte (36,38).

Stand heute bleibt also unklar ob Metallhypersensitivitäten Leistung und Überleben des Implantates beeinflussen. Fakt ist, dass diese Art von Überempfindlichkeiten existieren kann, aber nur bei wenigen hochempfindlichen Patienten (weniger als 1% der Patienten mit Gelenkersatz) auftritt (38). Die Weiterentwicklung und Optimierung von oben genannten oder neuen immunologischen Tests wird in Zukunft Klarheit bringen; bis dahin kann das Risiko für Patienten als minimal angesehen werden (38).

2.3.2 Korrosionsbeständigkeit

Die Beurteilung der Biokompatibilität eines Metalles wird entscheidend durch dessen Korrosionsverhalten beeinflusst. Jedes Metall, welches mit einem Bioorganismus in Kontakt kommt, unterliegt Korrosionsprozessen. Dieses Phänomen basiert auf chemische Prozesse zwischen Materialoberfläche und Gewebe, wobei körpereigene Flüssigkeiten als elektrolythaltiges Lösungsmedium dienen und somit ein galvanisches Element entstehen lassen (32). An der Anode oxidiert das Metall und es entsteht das entsprechende Ion; die freigesetzten Elektronen werden an der Kathode, durch die Anwesenheit von Wasser bedingt, zur Sauerstoff- und Wasserstoffreduktion herangezogen (32). Die entstandenen Metallionen können entweder am Entstehungsort verbleiben und für erhöhte Konzentrationswerte sorgen, oder durch Diffusion abtransportiert werden. Durch solche korrosiven Prozesse an Metallimplantaten können Zellverhalten, Zellmetabolismus, pH und Sauerstoffpartialdruck beeinflusst werden (32).

Man unterscheidet verschiedene Korrosionsarten, die häufigste ist die Spaltkorrosion. Materialfehler an der Oberflächenstruktur, Verunreinigungen oder Elektrolytunterschiede lokaler Natur können zu einer irreversiblen Störung der Passivierungsschicht (s.o) führen, sodass sich infolgedessen passivierte und nicht-passivierte benachbarte Bereiche wie Anode und Kathode zueinander verhalten (32).

Für die Entstehung einer Spannungsrisskorrosion müssen Zugspannungen und toxische Umgebungsverhältnisse vorherrschen, diese führen erst zu einem Anriss und dann, auch

durch Unterstützung von mechanischen Belastungen, zu einer Rissausbreitung und somit zu einem Defekt an der Materialoberfläche. Dieser Prozess kann interkristallin oder transkristallin erfolgen (32).

Sehr ähnlich verhält es sich bei der Schwingungsrisskorrosion, die bei den meisten Legierungen auftritt. Mechanische Wechselbelastungen sorgen für Mikrobewegungen des Werkstoffes und damit überwiegend für transkristalline Rissausbreitung, die je nach Legierung, Belastungshäufigkeit und -kraft unterschiedlich schnell voranschreitet (32).

In der Realität treten diese Korrosionsarten fast immer zusammen auf. Darüber hinaus gibt es noch mehr Korrosionsarten, die aber bei Metallen eine untergeordnete Rolle spielen.

Korrosionsbeständigkeit von Titan

Oberflächenstruktur und Passivierungsschicht korrelieren eng mit der Korrosionsbeständigkeit von Metallen. Die Dicke und Beständigkeit der Passivierungsschicht der Titanoberfläche ist ihre große Stärke. Untersuchungen haben gezeigt, dass Cp-Titan eine d = 32 ± 8 Å dicke Oxidschicht aufweist, bei der wichtigsten Titanlegierung Ti-6Al-4V sind es sogar d = 83 ± 12 Å (39).

Galvanische Korrosion an Titan durch Anwesenheit anderer Metalle spielt kaum eine Rolle. Nur bei rostfreiem Stahl muss bedacht werden, dass aufgrund seiner geringen Passivierungsschicht eine massive Korrosion zu erwarten ist, aber das Titan selbst wird durch diesen Prozess nicht beeinflusst (32).

Spaltkorrosionsprozesse konnten klinisch bei Titan(legierungen), genauso wie bei Lochfraß, nie konkret nachgewiesen werden. Erklären kann man sich diese Tatsache über die bereits erwähnte Stabilität, Beständigkeit und Dicke der Oberflächenoxidschicht, Verunreinigungen und Fehlstellen an dieser kommen kaum vor bzw. werden schnell repassiviert (s.u). Lediglich Fehler im Herstellungsprozess könnten theoretisch in dieser Hinsicht zu Problemen führen (9,32,40).

Fälle von Spannungsrisskorrosion an Titanimplantaten gibt es bisher nicht, auch von wissenschaftlicher Seite wird diese Widerstandsfähigkeit bestätigt (9). Zur Schwingungsrisskorrosion gibt es einige wenige Untersuchungen, allerdings konnte gezeigt werden, dass die Ausbreitung von Ermüdungsrissen in der Luft und in NaCl-Lösung vergleichbar ist. Titan soll deshalb in dieser Hinsicht weniger anfällig sein als andere Metalle (40).

Titan scheint als Werkstoff korrosionsbeständig zu sein, entscheidend ist aber auch das Verhalten in einer biologischen Umgebung. Der physiologische pH liegt bei etwa 7,4, bei der

Operation zur Einbringung des Implantates wird der pH als Reaktion auf den Eingriff zunächst auf ca. 7,8 ansteigen, später dann auf bis zu 5,5 absinken. In solchen Situationen haben sich cp-Titan und seine Legierungen in der Tat vor Niob, Tantal, den CoCr-Legierungen und Stahl als korrosionsbeständigste Materialien erwiesen (4). Dies konnte in weiteren in-vitro Studien bestätigt werden; in Hanks-Lösung wurden Durchbruchspotentiale (kennzeichnen den Übergang der korrosionsbeständigen passiven Phase zur korrosionsanfälligen transpassiven Phase) von 2,4 – 2,0 V gemessen, etwa zehnfach höhere Werte als bei den anderen Metallen (4). Da kein Werkstoff völlig korrosionsresistent ist, wurde die Korrosionsgeschwindigkeit in physiologischen Verhältnissen gemessen: sie liegt bei verschwindend geringen 30 µg pro cm im Jahr (32).

Für den Fall, dass die Passivierungsschicht doch beschädigt wird, stellt sich die Frage nach der Fähigkeit zur Repassivierung bzw. der Repassivierungszeit. Letzterer Wert liegt bei den gängigen Metalllegierungen generell im sehr schnellen Millisekundenbereich (für cp-Titan/Ti-6Al-4V zwischen 37 - 44,4 ms). Das Wachstum der Passivschicht ist bei Titan(legierungen) sogar schneller als bei den anderen Metallwerkstoffen ($t_{0,05}$: 43,4-49 ms) (4).

2.3.3 Zell- und Proteininteraktion

Wie bereits angedeutet müssen Biomaterialien bei Kontakt mit dem menschlichen Körper andere Anforderungen erfüllen, als wenn sie als einfache Werkstoffe in anderen Bereichen eingesetzt würden. Die Komplexität ebenjenes Bioorganismus macht diese Aufgabe in der Herstellung zu einer großen Herausforderung. Es muss berücksichtigt werden womit dieses Material in Berührung kommt und auf welche Weise es mit seiner Umgebung interagiert; um vorhersagbare Ergebnisse bis in die mikroskopisch kleinsten Ebenen zu erzielen. Über die verschiedenen Körperteile, Organe und Gewebe landet man auf einer zellulären und mikromolekularen Ebene. Leben basiert auf die Funktionen von Proteinen und Zellen, dies müssen Biomaterialien respektieren (können).

Zell- und Proteininteraktion von Titan

Dass Titan sich bioinert und somit nicht zytotoxisch verhält, wurde bereits dargestellt. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Studien zum Verhalten der Titanoberfläche zu Gewebs- und Plasmaproteinen, wie Albumin, Lamininproteinen, Glukosaminoglykanen, Kollagenasen, Fibronektin, Komplementproteinen und Fibrinogen (34). Dabei fällt auf, dass Titan eine große Bereitschaft zur Proteinadsorption aufweist; eine konkrete Schlussfolgerung über die Bedeutung von einzelnen Proteinen oder des sich an der Titanoberfläche bildenden Proteinfilms kann daraus aber nicht gezogen werden (34,41).

Die zellulären Ereignisse ab dem Moment einer Implantation sind ebenfalls gut untersucht. Als erstes werden, wie im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion und wie bei allen anderen Biomaterialien aufgrund der Fremdkörpereinbringung, neutrophile Granulozyten und Makrophagen beobachtet, wobei letztere dann zu Fremdkörperriesenzellen fusionieren (34). Auch die Anlockung von Osteoprogenitorzellen, die über Zwischenstufen zu Osteoblasten differenzieren und den Osseointegrationsprozesses einläuten, ist unbestritten (34).

2.3.4 Osseointegration

Der Begriff Osseointegration wurde über die Jahre immer wieder neu definiert. Das Wort selbst stellt die knöcherne Einheilung (des Implantates) in den Vordergrund. Listgarten et al. bezeichneten es umfassender als die „direkte strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen geordnetem, lebendem Knochen und der Oberfläche eines tragenden Implantates“ (42).

Embryologisch betrachtet gibt es zwei Formen der Knochenbildung. Bei der chondralen Ossifikation entsteht zuerst ein Vorgängergewebe aus Knorpel, welches durch Umbauprozesse in Knochengewebe umgewandelt wird; bei der desmalen Ossifikation entsteht Knochen direkt aus dem Mesenchym. Die Vorgänge bei der Knochenregeneration im Rahmen der Osseointegration ähneln der embryonalen und postnatalen Knochenentwicklung sehr und können eindeutig der direkten desmalen Ossifikation zugeordnet werden, ähnlich wie bei einer primären Frakturheilung, wo sich im Bruchspalt, zwischen den beiden Knochenenden, ohne Knorpel- oder Bindegewebsbeteiligung, neuer Knochen bildet, allerdings mit einem essentiellen Unterschied: Bei der Osseointegration wird keine Knochen-Knochen-Verbindung, sondern eine Knochen-Fremdkörper-Verbindung geschaffen (43). Daher spielt die Materialauswahl und -oberfläche eine entscheidende Rolle für diesen Prozess.

Die initialen zellulären Ereignisse wurden bereits erwähnt, ab dem Zeitpunkt wo die Osteoblasten ausdifferenziert sind, lässt sich der Osseointegrationsprozess in drei Abschnitte unterteilen:

1. Inkorporation durch Geflechtknochenbildung [4-6 Wochen]
2. Adaptation der Knochenmasse an die Belastung (lamellare und parallelfaserige Knochenablagerung) [ab dem 2. Monat]
3. Anpassung der Knochenstruktur an die Belastung (Knochenremodeling) [ab dem 3. Monat] (43)

Geflechtknochen wird häufig als unreifes Knochengewebe angesehen, so auch bei der Osseointegration. Der Kollagenfaserverlauf ist, wie der Name schon andeutet, unregelmäßig

und zufällig angeordnet, die Matrix ist zellreich und der Mineralisierungsgrad gering. Sein Vorteil liegt darin, dass er als eine Art Gerüst bzw. Leitstruktur für die späteren Knochenformen wächst und auch die Einsprossung von Blutgefäßen begünstigt (43). So entsteht bereits eine Art Spongiosa, die vom umgebenden Knochen Richtung Implantatoberfläche wächst (43).

Auf den Geflechtknochen folgt der Umbau in den klassischen Lamellenknochen oder in die seltenere Form des Parallelfaserknochens (43). Der regelmäßige Faserverlauf des Lamellenknochens in parallele Schichten mit abwechselndem Verlauf verleiht ihm höchste Festigkeit (43). Die Apposition beträgt 1-1.5 µm/Tag (43). Beim Parallelfaserknochen verlaufen die Kollagenfibrillen parallel zur Oberfläche, aber ohne bevorzugte Orientierung in dieser Ebene (43). Dadurch ist er nicht so fest wie Lamellenknochen, er wächst aber 3-5 Mal schneller (43). Die knöcherne Apposition kann nur auf einem stabilen Grund stattfinden; diesen bieten der vorher gebildete Geflechtknochen, die vorhandene unberührte Knochenoberfläche und die Implantatoberfläche an (43).

Mit dem Knochenumbau wird die Osseointegration abgeschlossen. In der Kortikalis bilden Osteoklasten basic multicellular units (BMU) mit, die einen zylindrischen Bohrkanal in der Größe eines Osteons (Geschwindigkeit: 50 µm pro Tag) in den Knochen „fressen“, dicht gefolgt (Abstand von etwa 100 µm) von Osteoblasten, die neuen lamellären Knochen bilden (43). In der Spongiosa bilden sich Howship-Lakunen durch die Aktivität der Osteoklasten; nach einigen Tagen sammeln sich Osteoblasten an, die diese Resorptionslakunen mit neuem Knochen auffüllen (43). Das Remodelling bedeutet für die Osseointegration die Fähigkeit zur Anpassung der Knochenstruktur an die Belastung, die auf das Implantat einwirkt. Erstens wird die Knochenqualität durch den Ersatz von anfangs vorhandenem nekrotischem und geflechtartigem Knochen durch lamellären Knochen verbessert und zweitens kann Knochen, dort wo er nicht mehr benötigt wird (z.B bei Druckbelastung) abgebaut und dort, wo er benötigt wird (z.B in Bereichen mit Zugbelastung) neu aufgebaut werden (43). Die lebenslange Fortsetzung dieses Prozesses ermöglicht erst eine Langlebigkeit von Implantaten.

Osseointegration von Titan

Die Osseointegration wird dank der Bioinertität von Titan nicht negativ beeinflusst. Die Oberflächenstruktur des Materials hingegen kann diverse Vorteile für diesen Prozess mitbringen und ist deshalb, wie bereits erwähnt, auch seit Jahren Mittelpunkt der Forschung. Der entscheidend beeinflusste Aspekt ist dabei die Geschwindigkeit bzw. Beschleunigung der Knochenneubildung, der Hauptparameter für die Qualitätsbeurteilung der Osseointegration, ist der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) (29). Das Verkürzen der

Prozessdauer ermöglicht eine schnellere Implantatbelastung, könnte aber auch den „stability dip“, der etwa drei-vier Wochen nach der Implantation, aufgrund des Verlustes der Primärstabilität durch das Remodeling und die damit einhergehende initiale Knochenresorption auftritt, verringern (29).

Ein Vergleich der unterschiedlichen Titanoberflächen in Bezug auf ihr Osseointegrationsverhalten wird ausführlich in Kap. 6.3.2 diskutiert.

2.4 Osteoblasten

Osteoblasten sind neben den Osteoklasten und Osteozyten die wichtigsten Zellen des Knochengewebes. Man findet sie immer an freien Knochenoberflächen, sowohl innen im Knochen, als auch außen unter dem Periost (44). Durch Verbindungen mit Gap Junctions haben sie die Fähigkeit miteinander zu kommunizieren und koordiniert als Zellverband zu arbeiten (44).

Ihre Hauptaufgabe ist die Knochenneubildung (Geschwindigkeit: 1-2 µm pro Tag); realisiert durch die Synthese von Kollagen und dem Osteoid als wesentlichen organischen Bestandteilen des Gewebes und dem Enzym alkalische Phosphatase sowie Matrixvesikeln, mit deren Hilfe die Mineralisierung der Grundsubstanz vorbereitet wird (32,44). Sie entstehen aus mesenchymalen Stammzellen, die dann zu Osteoprogenitorzellen und später über Vorstufen zu reifen Osteoblasten differenzieren (44). Es handelt sich um Zellen, die ein Leben lang neugebildet werden können und auch müssen, damit der Knochenumbau ebenfalls zeitlebens gewährleistet werden kann.

Wenn Osteoblasten aktiv sind, haben sie eine kubische Form und einen Durchmesser von etwa 20 µm mit viel rauem endoplasmatischem Retikulum und großem Golgi-Apparat, bei Inaktivität werden sie durch Schrumpfung/Abbau dieser Zellorganellen sehr flach; sie werden deshalb auch als „lining cells“ bezeichnet (32,44).

Die meisten Osteoblasten werden nach einigen Wochen Lebensdauer durch Apoptose abgebaut, aber einige von ihnen differenzieren auch weiter zu Osteozyten und sorgen dann für die Regulation der Prozesse im Knochengewebe (44).

2.5 Nanotechnologie, -topographie und Titanimplantate

Nanotechnologie ist die Wissenschaft, die sich mit Materie in der Größenordnung von 1-100 nm beschäftigt. Die rasanten Entwicklungen der letzten Jahre in diesem Bereich sind auch in der Medizintechnik angekommen und finden mittlerweile Anwendung bei Biomaterialien, bei denen man sich durch nanoskalige Topographien Verbesserungen verspricht.

Zunächst einmal liegt es auf der Hand, dass Nanorauigkeit die Oberfläche eines Werkstoffes exponentiell vergrößert. Damit einher gehen potenzielle Änderungen in der Ladung der Oberflächen. In einem Vergleich von makro-, mikro- und nanostrukturierter Ti-6Al-4V-Oberfläche konnte genau dies gezeigt werden, wobei letztere die höchste Oberflächenenergie aufwies (41,7 m N/m gegenüber 33,4 für die mikroraue und 29,4 für die makroraue Oberfläche) (24).

Direkt dadurch beeinflusst wird auch die Benetzbarkeit und tatsächlich scheint sie für nanostrukturierte Oberflächen besser zu sein (45). Die vorliegenden Ladungen sind überwiegend negativ (45). Bessere Benetzbarkeit bedeutet auch, dass das Potenzial für bessere Anhaftung/Bindung zum Gewebe, z.B Knochen, im lebenden Organismus vorhanden ist. Außerdem wird darüber spekuliert ob die marginale Weichgewebsadaptation, bedeutend für die dentale Implantologie, ebenfalls positiv beeinflusst wird (24).

Es wurde schon lange angenommen, dass Nanostrukturen auf Implantatoberflächen während der frühen Osseointegrationsphase die Schaffung von Bindungsstellen für wichtige Proteine des Prozesses begünstigt, welche wiederum weitere biologische Vorgänge, Signalkaskaden usw. in den Gang setzen können (24). Mittlerweile gibt es eine Vielzahl an in-vitro- und in-vivo-Studien, die auch die Interaktion mit den wichtigsten Zellen des Osseointegrationsprozesses betrifft. Im Review von Mendonça et al. (46) wurden diese Studienergebnisse zusammengetragen. Die mit Abstand am häufigsten untersuchten Zellen sind Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen. In-vitro konnten positive Einflüsse auf die Zelladhäsion, -adhäsionsspezifität, -proliferation, -differenzierung und -motilität festgestellt werden (46). Speziell bei Osteoblasten konnten auch Änderungen im Zytoskelett, eine verringerte Apoptoserate, vermehrte Ausbildung von Filopodien, erhöhte Calcium-Deposition und Synthese von alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden (46,47). In-vivo wurden darüber hinaus bei Versuchen wiederholt erhöhte BIC-Werte gemessen (46). All diese Erkenntnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass man solche Oberflächen nunmehr per Definition als bioaktiv bezeichnen kann.

Die Methoden, mit denen Nanostrukturen auf (Titan-)Implantatoberflächen hergestellt werden können, sind in Tabelle 3 aufgeführt:

Methoden	Verfahren	Charakteristiken
Selbstorganisierende Monoschicht		Die exponierte funktionelle Endgruppe könnte ein Molekül mit anderen Funktionen sein (ein osteoinduktives oder zelladhäsives Molekül).
Physikalische Ansätze	1. Verdichtung von Nanopartikeln	Bewahrt die Oberflächenchemie zwischen verschiedenen Topographien.
	2. Ionenstrahlgestützte Deposition	Kann je nach verwendetem Material Nanofeatures auf die Oberfläche übertragen
Chemische Methoden	1. Säureätzung	Kann der Oberfläche, kombiniert mit anderen Verfahren (Sandstrahlen und/oder Peroxidation), Nanofeatures verleihen und Verunreinigungen entfernen
	2. Peroxidation	Produziert eine Titan-Gel-Schicht. Es finden sowohl topographische, als auch chemische Veränderungen statt
	3. Behandlung mit alkalischen Lösungen (Natriumhydroxid)	Produziert eine Natrium-Titanat-Gel-Schicht, die eine Hydroxyapatitdeposition erlaubt. Es finden sowohl topographische, als auch chemische Veränderungen statt
	4. Anodisierung	Es entstehen Nanostrukturen auf einer neu entstehenden Oxidschicht (basierend auf das verwendete Material)
Nanopartikel-Deposition	1. Sol-Gel-Verfahren	Kreiert einen dünnen Film mit kontrollierten chemischen Eigenschaften. Wechselwirkungen auf atomarer Skala zeigen starke physikalische Wechselwirkungen.
	2. diskrete kristalline Ablagerung	Überlagert eine nanoskalige topografische Komplexität auf die Oberfläche.

Tabelle 3: Angewandte Methoden zur Herstellung von Nanostrukturen auf cp-Titan-Oberflächen (übersetzt aus (46))

2.6 Goldnanopartikel (AuNPs)

Nanopartikel sind aufgrund einiger ihrer Grundeigenschaften sehr attraktiv für die Anwendung im medizinischen Bereich, dazu zählen das Verhältnis von Oberfläche zu Masse (viel größer als bei anderen Molekülen), Größe, Form, Quanteneigenschaften, ihre Fähigkeit durch Bindungen andere Substanzen zu absorbieren und zu transportieren (48,49). Dies führt zu potenziell hohen Plasmahalbwertszeiten, erhöhter Akkumulation in erkranktem Gewebe und effizientem Drug-Targeting (50). Edelmetall-Nanopartikel wie Gold, Silber, Platin oder Palladium sind aufgrund ihrer einzigartigen elektronischen, mechanischen, chemischen und magnetischen Eigenschaften besonders interessant (49,51).

2.6.1 Grundeigenschaften und biomedizinische Anwendungsgebiete

AuNPs können kontrolliert in unterschiedlichen Größen und Formen (Kugeln, Stäbe, Käfige, Schalen, Sterne, Würfel, Platten) synthetisiert werden und anschließend durch weitere Schritte mit Molekülen (beliebteste: Citrat, Transferrin, Amine, Oligonukleotide, Peptide, Antikörper und Lipide) beschichtet werden, um Eigenschaften wie Hydrophilie und Biokompatibilität zu steigern und die Aufnahme in Zellen zu ermöglichen (50,52). Es ist davon auszugehen, dass der therapeutische Effekt proportional zur von den Zellen des Zielgewebes aufgenommenen Menge an Partikeln ist (50). Eine Untersuchung an Säugetierzellen zeigte, dass der wohl optimale AuNP-Durchmesser für die zelluläre Aufnahme bei 50 nm liegt (53). Dabei muss aber berücksichtigt werden, dass eine Variation von Form, Größe und Beschichtung eine komplette Veränderung der Grundeigenschaften zur Folge haben kann.

Aufgrund der Kombination der oben genannten Eigenschaften werden sie als ideale Transportvektoren für Medikamente (z.B Antibiotika) und Nukleinsäuren angesehen und eingesetzt (50,51). Das enorme Potential zeigt sich vor allem beim Einsatz für Diagnostik und Therapie von Krankheiten wie Krebs, Diabetes und Alzheimer (51). Es konnte nachgewiesen werden, dass der gezielte Transport von Substanzen mit AuNPs zu einer gewünschten Region möglich ist; die Absorption in Krebszellen scheint mehr als 600-mal so hoch wie in gesunden Zellen zu sein (54). Außerdem können die Partikel, aufgrund der größeren Lücken im Tumorgefäßsystem und der ungeordneten extrazellulären Matrix länger in diesem Gewebe verbleiben (51). Molekulares Targeting kann so ermöglicht werden; ein Beispiel dafür sind Indium-111-beschichtete und mit der tumorspezifischen RGD-Sequenz modifizierte AuNPs, die für die Diagnostik bei Melanomen und Glioblastomen eingesetzt werden können (55).

Bei der Alzheimer-Krankheit kann der Einsatz von AuNPs, bedingt durch die Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, die Fibrillogenese und damit die Bildung von Amyloid-Plaques hemmen bzw. verzögern (51).

AuNPs weisen eine starke Lichtabsorption auf mit Absorptionsmaxima im Bereich von sichtbarem Licht bis hin zu Infrarotwellen (50,51). Dies hat zwei große Vorteile: Lebendes Gewebe absorbiert in diesen Wellenlängenbereichen nur wenig Licht und kann dadurch also keinen großen Schaden nehmen, die AuNPs dagegen wandeln das absorbierte Licht in Wärme um und übertragen es in die Umgebung, dieses Prinzip findet Anwendung bei der photothermischen Therapie und photoakustischen Bildgebungverfahren (50). Es wird eine Reduktion der Stahlendosis ermöglicht.

Darüber hinaus besitzen sie die Fähigkeit Photonen abzuschwächen, sodass sich ein Einsatz als Kontrastmittel bei strahlenbasierten Bildgebungsverfahren und als Adjuvantien in der Strahlentherapie (zur Minimierung von Gewebeschädigung) anbietet (50). Besonders beliebt ist die Anwendung bei Diagnostik und Therapie von Brustkrebs (51).

Goldnanokonjugate werden in klinischen Studien bei Kopf- und Halskrebs, fortgeschrittenen und metastasierten Organtumoren, als auch bei koronarer Herzkrankheit getestet (50,51).

2.6.2 Herstellungsverfahren

Die Herstellung von AuNPs lässt sich durch biologische und chemische Methoden erzielen. Während bei den chemischen Prozessen Form und Größe der Partikel vergleichsweise simpel zu kontrollieren ist, ist dies bei den biologischen Methoden durch den Einsatz von Pflanzen, Bakterien, Viren und Hefepilzen deutlich schwieriger, dafür aber umweltfreundlicher (51). Im Folgenden werden die prominentesten Verfahren zusammengefasst:

Art	Verfahren	Kurzbeschreibung
biologisch	1. *Gymnema sylvestre*-Extrakt	G.sylvestre-Blattpulver + destilliertes Wasser → Extrakt → Filterung und Lagerung → Hinzugabe von Tetrachlorogoldsäure → Reduktion von Au^{3+} zu Au^{0}
	2. Chitosan-Oligosaccharide (auch andere Biopolymere wie Alginat oder Stärke geeignet)	Enzymatische Spaltung von Chitosan zu Oligosacchariden → Reduktion und Stabilisierung von AuNPs
	3. *Streptomyces species*	Isolation aus marinen Sedimentproben → Inokulation zu sterilem Stärkebrei und Zentrifugierung → Überstand wird gesammelt und Gold(III)-chlorid hinzugegeben (Lösungsmittel: deionisiertes Wasser) → Bildung von AuNPs
	4. *Acorus Calamus*-Extrakt	Extraktion durch Erwärmung und Filterung von Rhizomen in Wasser → Hinzugabe von Tetrachlorogoldsäure → Reduktion von Au^{3+} zu Au^{0}
chemisch	1. Turkevich-Frens-Methode	Tetrachlorogoldsäure wird erhitzt → Zugabe einer Natriumcitrat-Lösung → Erhalt von AuNPs mit 10 und 30nm Durchmesser
	2. chemische Reduktion	Tetrachlorogoldsäure wird durch L-Ascorbinsäure reduziert → Stabilisierung der entstandenen AuNPs durch Polyvinylalkohol

Tabelle 4: Bekannteste Herstellungsverfahren für Goldnanopartikel (zusammengefasst aus (51))

3. Fragestellung

Titan als Werkstoff und Titandioxid als biokompatible Oberfläche haben sich als Standard-Implantatmaterial durchgesetzt. Auf der Suche nach Verbesserungen hat sich die Forschung in den letzten Jahren auf die Optimierung der Oberfläche fokussiert. Dabei hat die Nanotechnologie durch Beschichtung und Nanostrukturierung völlig neue Möglichkeiten in der Oberflächenmodifizierung eröffnet. Insbesondere sind Nanopartikel aus Gold, aufgrund einer Vielzahl von biomedizinisch förderlichen Eigenschaften von Interesse. Vor diesem Hintergrund stellen sich folgende Fragen für diese Arbeit:

1. Kann eine Beschichtung mit AuNPs die Biokompatibilität der TiO_2-Oberfläche verbessern?
2. Wird die Proliferation der knochenbildenden Zellen (Osteoblasten) in der frühen Phase der Osseointegration beeinflusst?

4. Material und Methoden

Die Versuche wurden in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des UKSH Kiel durchgeführt. Es wurden Osteoblastenkulturen auf entsprechend vorbereiteten Titanplatten, einmal mit TiO_2-Oberfläche und einmal mit zusätzlicher AuNP-Beschichtung (Au-TiO_2), mithilfe von MTT- (Zytotoxizitätstests) und BrdU-Tests (Zellproliferationstests) zu den Kontrollzeitpunkten von 12 bzw. 24 Stunden auf Biokompatibilität und Zellwachstum untersucht. Zusätzlich gab es eine neutrale Kontrolloberfläche. Dafür wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 10 mm verwendet (Hecht-Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland). Zum Schutz vor Kontamination wurden alle Versuche unter einer Laminar-Flow-Kapelle (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) durchgeführt. Außerdem wurden zur Beurteilung der Zellmorphologie und potenzieller (Non-)Toxizität Aufnahmen mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) und dem Laserfluoreszenzmikroskop durchgeführt.

4.1 Titanplatten

Die verwendeten Titanplatten (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) haben einen Durchmesser von 8 mm, eine Dicke von 0,5 mm und bestehen aus einem Reinheitsgrad von 99,99%.

4.2 Herstellungsprozess der TiO_2-Filme

Durch physikalische Gasphasenabscheidung (PVD) ist eine Herstellung von Dünnschichten möglich. Zu dieser Kategorie zählt auch die DC-Magnetron-Sputter-Deposition (MSD), die für die Herstellung der TiO_2-Filme verwendet wurde. Beim Sputtern werden, durch den Beschuss mit Ionen, Atome aus einem Target herausgelöst, die bei Vorhandensein eines Reaktionsgases Moleküle bilden können und anschließend als dünne Schichten auf einem Substrat kondensieren (56).

Die Vorbereitung der Substrate erfolgte durch Reinigung im Ultraschallbad (mit Aceton, Isopropanol und Wasser) und anschließender Trocknung mit Stickstoff (N_2).

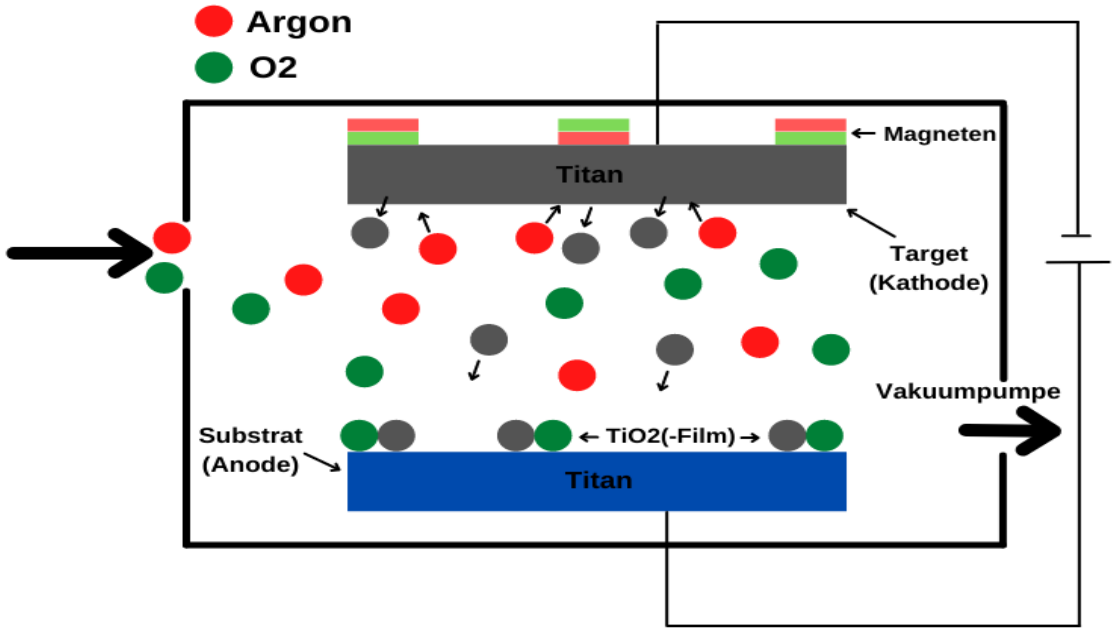


Abbildung 1: DC-Magnetron-Sputter-Deposition zur Herstellung der TiO_2-Filme (in Anlehnung an (56))

Abbildung 1 stellt den Beschichtungsprozess schematisch dar: Der Druck in der Vakuumkammer wurde auf 5 × 10^{-5} Pa eingestellt. Das Edelgas Argon wurde als Prozessgas eingesetzt; durch die angelegte Spannung wurden Kationen gebildet (Ar^+) und Richtung des Titan-Targets (99,99% Reinheitsgrad; 5 cm Durchmesser; Goodfellow GmbH, Hamburg, Deutschland), welches die Kathode darstellt, gelenkt. Durch das zusätzliche Anlegen eines Magnetfeldes (Magneten hinter dem Target positioniert) wurde der Prozess verstärkt, die Ionisierungsrate des Argongases und der Ionenfluss konnten so gesteigert werden (effektiver Ionenfluss: 250 sccm für 10 Minuten) und somit wurden mehr Teilchen aus dem Target herausgeschlagen; diese wanderten dann in Richtung Anode. Anschließend wurde das Reaktionsgas (O_2) (mit 10 sccm) hinzugegeben und die Bildung von TiO_2 ermöglicht, welches die Beschichtung auf dem Substrat bildet. Zur Verhinderung von Oxidationsprozessen an der Targetoberfläche wurde mit einer Gleichstromleistung von 90 W bei einer Frequenz von 50 kHz und einem Tastgrad von 55% gearbeitet (57). Die Prozessdauer betrug drei Stunden, die Substrate wurden dabei permanent mit 30 U/min gedreht um eine gleichmäßige Schichtdicke von 900 nm zu erzielen (57). Zur weiteren Vergrößerung der Oberfläche durch Nanocracks, wurden die Substrate am Ende bei 650 °C für eine Stunde im Laborofen (LE 4/11/R6; Nabertherm GmbH, Lilienthal, Deutschland) wärmebehandelt und anschließend an der Luft abgeschreckt (57).

4.3 Beschichtung mit Goldnanostrukturen

Die Goldnanostrukturen wurden mittels einer modifizierten photokatalytischen Depositionsmethode auf der TiO_2-Oberfläche platziert.

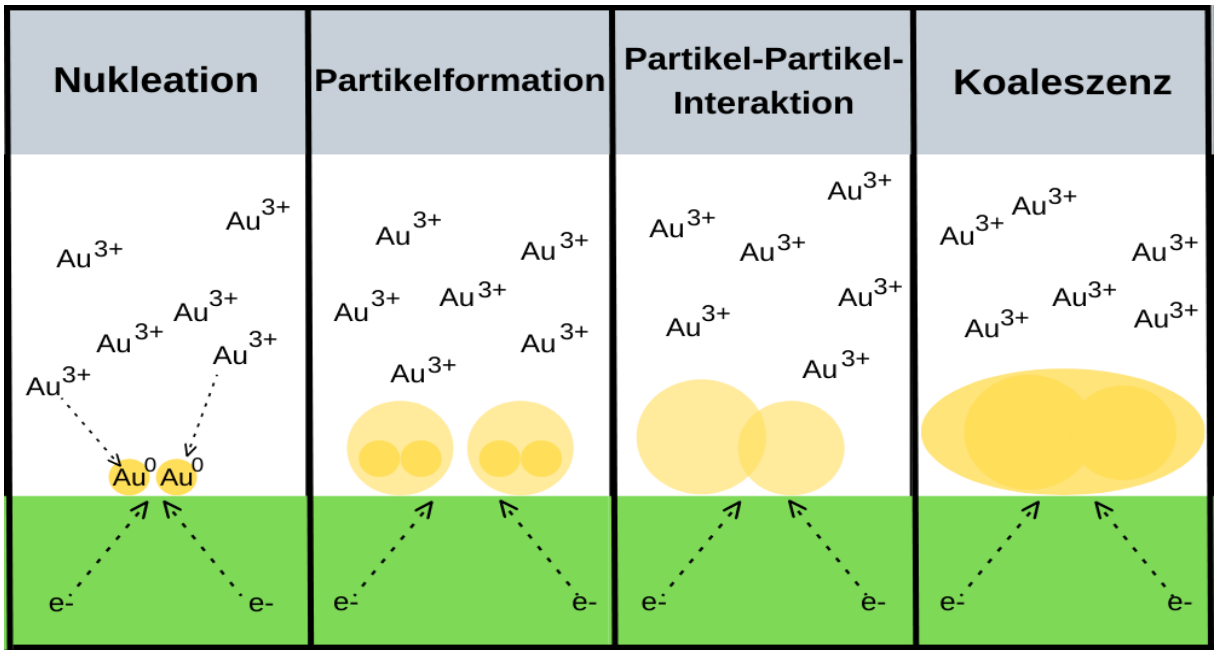


Abbildung 2: Photokatalytische Deposition und Wachstumsschritte der AuNPs unter Einwirkung von UV-Licht (in Anlehnung an (58, 59))

Die vorbereiteten Titanplättchen wurden in eine, mit 6,5 ml wässriger 0,8 x 10^{-3} M $AuCl_3$-Lösung (Alfa Aesar, Ward Hill, USA) gefüllte Quarzküvette getaucht. Es folgte eine zehnminütige Bestrahlung mit einer UV-Lichtlampe niedriger Intensität (Wellenlänge λ=365 nm, Leistung: 4,5 mW/cm^2). Wie aus Abbildung 2 ersichtlich, handelt es sich um einen mehrschrittigen Prozess bis zur Bildung der endgültigen Nanostrukturform. Durch die UV-Licht-Einwirkung entstehen erregte Ladungsträger (Defektelektronen); die generierten Elektronen reduzieren anschließend die in der Lösung vorhandenen Au^{3+}-Ionen zu stabilen AuNPs (A^0) unterschiedlicher Durchmesser (50-250 nm) (59). Dieser Schritt wird als Nukleation bezeichnet. Durch fortwährende Photokatalyse werden weitere Elektronen und damit auch AuNPs gebildet; manche dieser setzen sich auf bereits vorhandene AuNPs ab, sodass es zu einer Partikelformation kommt (59). Benachbarte Partikel beginnen miteinander zu interagieren, transferieren dann Elektronen und ermöglichen somit ein Wachstum und Zusammenschluss (Koaleszenz) zu hierarchischen Strukturen, in diesem Fall mit blütenartigem Aussehen (59). Solche anisotropen AuNP-Strukturen sind hinsichtlich struktureller, optischer, elektronischer und katalytischer Eigenschaften den sphärischen AuNPs überlegen (60).

Am Schluss wurden die Plättchen mit deionisiertem Wasser gespült und mit Luft getrocknet um jegliche Lösungsrückstände zu entfernen.

Zur Oberflächenanalyse wurden Aufnahmen mit dem REM (Supra55VP; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) gemacht und statische sowie dynamische Kontaktwinkelmessungen mit dem Kontaktwinkelmeter (OCA 30, DataPhysics Instruments GmbH, Filderstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die Messungen wurden 10 µl große Wassertröpfchen verwendet, die durch Hinzugabe und Abzug von Wasser im Volumen im Laufe des Versuchs verändert wurden.

4.4 Zellkulturen und Versuchsvorbereitung

Bei den, für alle nachfolgend aufgeführten Versuchen, verwendeten Zellen handelt es sich um humane Osteoblasten (hOB). Diese stammen von Patienten der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirugie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die nach ausführlicher Aufklärung einer Verwendung der entnommenen Gewebe und ihrer Bestandteile für experimentelle Versuche schriftlich zustimmten. Bei entsprechenden oralchirurgischen Eingriffen wurde Kieferknochengewebe gewonnen, welches anschließend in 0,3 - 0,5 cm große Stücke geschnitten wurde um daraus die Zellen in einem mehrwöchigen Prozess zu gewinnen. Das Kulturmedium bestand aus Minimum Essential Medium (MEM) nach Eagle (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), foetalem Kälberserum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 100E Penicillin, 100 mg/L Streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 100 nM Dexamethason (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 1 mM L-Ascorbinsäure 2-Phosphatase (Sigma, Deisenhofen, Deutschland).

Zum Start der Versuche wurden die Zellen zum Auftauen aus dem Stickstoffbehälter geholt und mit Nährmedium versorgt. Am Folgetag fand der erste Nährmediumwechsel statt. Die Kultivierung erfolgte in T75-Zellkulturflaschen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) im Brutschrank (HERAcell 240; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) unter kontrollierten Bedingungen bei 37°C und einer befeuchteten Atmosphäre bestehend aus 95% Luft und 5% CO_2. Alle drei Tage wurde das Medium erneut ausgetauscht, ehe am siebten Tag die Zellversuche gestartet wurden. Auf diese Weise konnte ein ausreichender Zeitraum für Zellwachstum und -proliferation gewährleistet werden. Dazu wurden am vierten Tag die Materialien (Titanplättchen mit und ohne Beschichtung und Kontrollen) zur Reinigung in 70% Ethanol gelegt.

An Tag sieben wurden verschiedene Materialien für das Ansetzen von Eluaten auf je ein 50ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) mit dem jeweiligen Inhalt von 10 ml Medium verteilt. Eluate entstehen durch das Herauslösen adsorbierter Stoffe von einer Oberfläche durch Lösungsmittel. Die Röhrchen wurden bis zu den Zeitpunkten nach 12 und 24 Stunden bei 4°C gelagert. Die Entnahme von jeweils 5 ml

Eluat erfolgte nach 12 bzw. 24 Stunden in ein neues 50 ml-Röhrchen. Vor Gebrauch wurden die zu prüfenden Materialien zur Reinigung jeweils zwei Mal mit Phosphatpufferlösung (PBS; BioWest, Nuaillé, Frankreich) gespült.

Vor Durchführung der Tests wurde die Zellzahl direkt bestimmt. Dazu wurde eine Zählkammer nach Neubauer und ein Durchlichtmikroskop (Leitz Diavert; Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

Für das Rasterelektronenmikroskop wurde eine 24-Well-Mikrotiterplatte (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) vorbereitet; in die Wells wurden 3 x 10^4 Zellen und 300 µl Nährmedium gegeben. Die Materialien wurden mit je 50 µl a 5 x 10^3 Zellen für eine Stunde im Brutschrank inkubiert, dann wurde mit jeweils 1 ml Nährmedium aufgefüllt und bis zu den Untersuchungszeitpunkten nach 12 und 24 Stunden erneut inkubiert. Das Nährmedium wurde nach der Inkubationszeit abgesaugt, mit PBS gespült und mit 1 ml/Well 3% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Die Platten wurden mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, USA) bedeckt und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

TiO_2 12h (1)	**TiO_2 24h (1)**	**Au-TiO_2 12h (1)**	**Au-TiO_2 24h (1)**	**Kontrolle 12h (1)**	**Kontrolle 24h (1)**
TiO_2 12h (2)	**TiO_2 24h (2)**	**Au-TiO_2 12h (2)**	**Au-TiO_2 24h (2)**	**Kontrolle 12h (2)**	**Kontrolle 12h (2)**
TiO_2 12h (3)	**TiO_2 24h (3)**	**Au-TiO_2 12h (3)**	**Au-TiO_2 24h (3)**	**Kontrolle 12h (3)**	**Kontrolle 12h (3)**

Tabelle 5: Schematische Darstellung der 24-Well-Mikrotiterplatte für die Rasterelektronenmikroskopie

Für die BrdU- und MTT-Tests wurden jeweils zwei 96-Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) pro Untersuchungszeitpunkt vorbereitet; in die Wells wurden 5 x 10^3 Zellen passagiert. Pro Material und Zeitpunkt wurde jeweils acht Wiederholungen durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Standard angesetzt, bei dem sich die Zellzahl in den Spalten von oben nach unten pro Zeile halbiert. Nach 24 Stunden wurde ein Wechsel des Nährmediums (Eluat) durchgeführt. In der folgenden Tabelle wird die Verteilung der Zellen dargestellt:

Std. 100%	**Std. 100%**	**TiO_2 12h**	**TiO_2 12h**	**$AuTiO_2$ 12h**	**$AuTiO_2$ 12h**	**TiO_2 24h**	**TiO_2 24h**	**$AuTiO_2$ 24h**	**$AuTiO_2$ 24h**	**Ko. 12h**	**Ko. 24h**
Std. 50%	**Std. 50%**									**Ko. 12h**	**Ko. 24h**
Std. 25%	**Std. 25%**										
Std. 12,5%	**Std. 12,5%**										
Std. 6,25%	**Std. 6,25%**										
Std. 3,12%	**Std. 3,12%**										
Std. 1,56%	**Std. 1,56%**										
Std. 0%	**Std. 0%**										**blank**

Tabelle 6: Schematische Darstellung der 96-Well-Mikrotiterplatten für die BrdU- und MTT-Tests [Std.: Standard, Ko.: Kontrolle]

Für die FDA-Färbung wurden zwei Objektträger (Nunc; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) pro Untersuchungszeitpunkt vorbereitet. Pro Well wurden 1x 10^4 Zellen passagiert.

	$AuTiO_2$	**TiO_2**	**Kontrolle**	
	$AuTiO_2$	**TiO_2**	**Kontrolle**	

Tabelle 7: Objektträger für FDA-Färbung

4.5 Untersuchungen am Rasterelektronenmikroskop

Nach Vorbereitung wurden die Proben zunächst mit unterschiedlichen Lösungen fixiert. Zuerst wurde 4% Glutaraldehyd (Electron Microscopy Sciences, Washington, USA) verwendet; dann wurde mit 0,2 M Natrium-Cacodylat-Puffer bei einem pH von 7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gespült. Als nächstes wurde 1% Osmiumtetroxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zur Nachfixierung und erneut der Natrium-Cacodylat-Puffer zum Spülen verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit einer Lösung aus 1% Tanninsäure (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 0,1 M Natrium-Cacodylat für eine Stunde behandelt und dann

mit 0,2 M Natrium-Cacodylat-Puffer gespült. Danach wurde eine Entwässerung der Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe vorgenommen. Die Proben wurden mithilfe von leitfähigen Haftaufklebern auf Stiftteller (Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland) geklebt und mit Hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bearbeitet. Anschließend wurde für die Rasterelektronenmikroskopie eine Sputter-Beschichtung mit einem 15 nm dicken Gold/Palladium-Film vorgenommen. Die Betrachtung fand mithilfe eines Philips XL30 REM-Mikroskopes (Philips Electron Optics GmbH, Hamburg, Deutschland) statt.

Mit dem REM wurden Übersichts- und Detailaufnahmen mit 100-facher, 250-facher, 500-facher, 1000-facher, 2000-facher und 5000-facher Vergrößerung aufgenommen.

4.6 MTT-Test

MTT ist eine Tetrazoliumverbindung mit gelber Farbe, die intrazellulär enzymatisch zu einem Formazansalz mit violetter Farbe reduziert wird (32). Je intensiver die Färbung ist, desto mehr Zellen befinden sich im Well. Verwendet wurde das Zellproliferationskit I (MTT) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Es wurde eine Blank-Kontrolle (wie beim BrdU-Test) und Positivkontrollen (Zellen in 100 µl Nährmedium + 10 µl MTT-Reagenz) angesetzt.

Ohne vorherigen Mediumwechsel wurde 10 µl MTT-Reagenz in jedes Well pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden im Brutschrank wurde 100 µl Solubilisierungslösung hinzugegeben, da das Formazan von Natur aus unlöslich ist. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden im Brutschrank wurden die Ergebnisse bei Licht einer Wellenlänge von 550 nm im Mikroplatten-Reader abgelesen.

4.7 BrdU-Test

5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) ist ein Pyrimidin, genauer ein Thymidin-Analogon, welches in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut werden kann (61). Durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern kann so eine Zellproliferation immunhistochemisch nachgewiesen werden. Verwendet wurde das Zellproliferationskit ELISA, BrdU (kolorimetrisch) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Es wurde unter anderem eine Blank-Kontrolle (0-Wert), eine Kontrolle mit Zellen in Medium aber ohne Wechsel und eine Hintergrundkontrolle (nur Medium) angesetzt.

Vor Testbeginn wurde noch einmal ein Wechsel des Kulturmediums vorgenommen. Der Testansatz wurde wie folgt vorgenommen: Als erstes wurde das BrdU labeling reagent mit sterilem Nährmedium verdünnt (Verhältnis 1:100). Das Nährmedium wurde von den Platten

abgesaugt und das verdünnte Labeling-Reagenz hinzugegeben (100 µl/Well). Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde das Nährmedium mit dem Labeling-Reagenz abpipettiert. Es fand eine Fixierung mit 200 µl FixDenat für 30 Minuten bei Zimmertemperatur statt. Dieser Schritt ist notwendig, da ohne den Zerfall der doppelsträngigen DNA zu Einzelsträngen eine Bindung des Antikörpers (hier: Anti-BrdU-Peroxidase) an das BrdU nicht möglich ist (61). Das FixDenat wurde abgegossen und der Antikörper (vor dem ersten Gebrauch) in 1,1 ml destilliertem Wasser gelöst. Die dabei entstandene Stammlösung wurde wiederum im Verhältnis 1:100 mit der Antikörper-Verdünnungslösung zur Arbeitslösung verdünnt. Es wurden 100 µl Anti-BrdU-Peroxidase-Arbeitslösung in jedes Well gegeben und bei Zimmertemperatur zwei Stunden inkubiert. In dieser Zeit wurde die Waschlösung durch 1:10-Verdünnung mit destilliertem Wasser vorbereitet. Es wurden drei Waschdurchgänge mit je 200 µl Waschlösung pro Well durchgeführt. Nach Absaugen der Waschlösung wurden 100 µl Substratlösung pro Well zugegeben und bei Zimmertemperatur im Dunkeln bis zu einer türkis-blauen Färbung inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Schwefelsäure gestoppt. Nach Beendigung des Tests wurden die Ergebnisse bei Licht einer Wellenlänge von 450 nm im Mikroplatten-Reader (Specta Max plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) abgelesen.

4.8 FDA/PI-Färbung

Fluoresceindiacetat (FDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Zellmembran passieren und wird dann bei lebendigen Zellen durch Esterasen im Zytoplasma zu Fluorescein (grün fluoreszierende Färbung) gespalten, welches aufgrund seiner polaren Eigenschaften in der Zelle verbleibt; bei toten Zellen passiert das FDA die Zellmembran erneut nach draußen (62). Propidiumiodid (PI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) hingegen bindet an die DNA/RNA nekrotischer Zellen und sorgt für eine rot/orange Färbung (62).

Zunächst wurden die Stammlösungen hergestellt. Dafür wurde 1 mg PI in 1 ml destilliertem Wasser und 1 mg FDA in 1 ml Aceton (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden Gebrauchslösungen gemischt, indem 500 µl PI-Stammlösung in 10 ml PBS und 30 µl FDA in 10 ml PBS gelöst wurden.

Von den Objektträgern wurde zuerst das Medium abgesaugt und eine Waschung mit PBS durchgeführt. Danach wurde die Färbung mit der FDA-Gebrauchslösung für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank und dunkler Umgebung vorgenommen. Nach Absaugen der FDA-Lösung wurde mit der PI-Gebrauchslösung für zwei Minuten bei Raumtemperatur und dunkler Umgebung gefärbt. Es erfolgten zwei Waschungen mit PBS und eine Lagerung im Dunkeln (in PBS) bis zur Mikroskopie. Die Flüssigkeit wurde dann abgesaugt und innerhalb

einer Stunde unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z.1; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Bei Blaulicht einer Wellenlänge von 488 nm wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mittels einer SHORT ARC Lamp HXP (Osram GmbH, München, Deutschland) und einem Lichtleiter (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) angeregt. Die FDA-Färbung wurde bei 530 nm und die PI-Färbung bei 620 nm nachgewiesen. Auf diese Weise konnte die Vitalität der Zellen geprüft werden. Zusätzlich wurden Fotoaufnahmen mit der Digitalkamera (AxioCam MRc5; Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) angefertigt.

4.9 Statistische Analyse

Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt, und jedes Ergebnis wird als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Der Kolmogorov-Smirnov-Test wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Daten eine Normalverteilung zeigten. Da die Daten parametrisch verteilt waren, wurde der Paired-t-Test für die Zeitauswertung verwendet und die Einweg-Varianzanalyse (ANOVA) wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Werte kleiner als 0,05 wurden für die statistische Signifikanz akzeptiert.

5. Ergebnisse

5.1 Oberflächenanalyse

Nach dem Herstellungsprozess wurde zunächst eine Kontrolle der Oberfläche unter dem REM vorgenommen und Aufnahmen in 1000-facher, 5000-facher und 25000-facher Vergrößerung angefertigt.

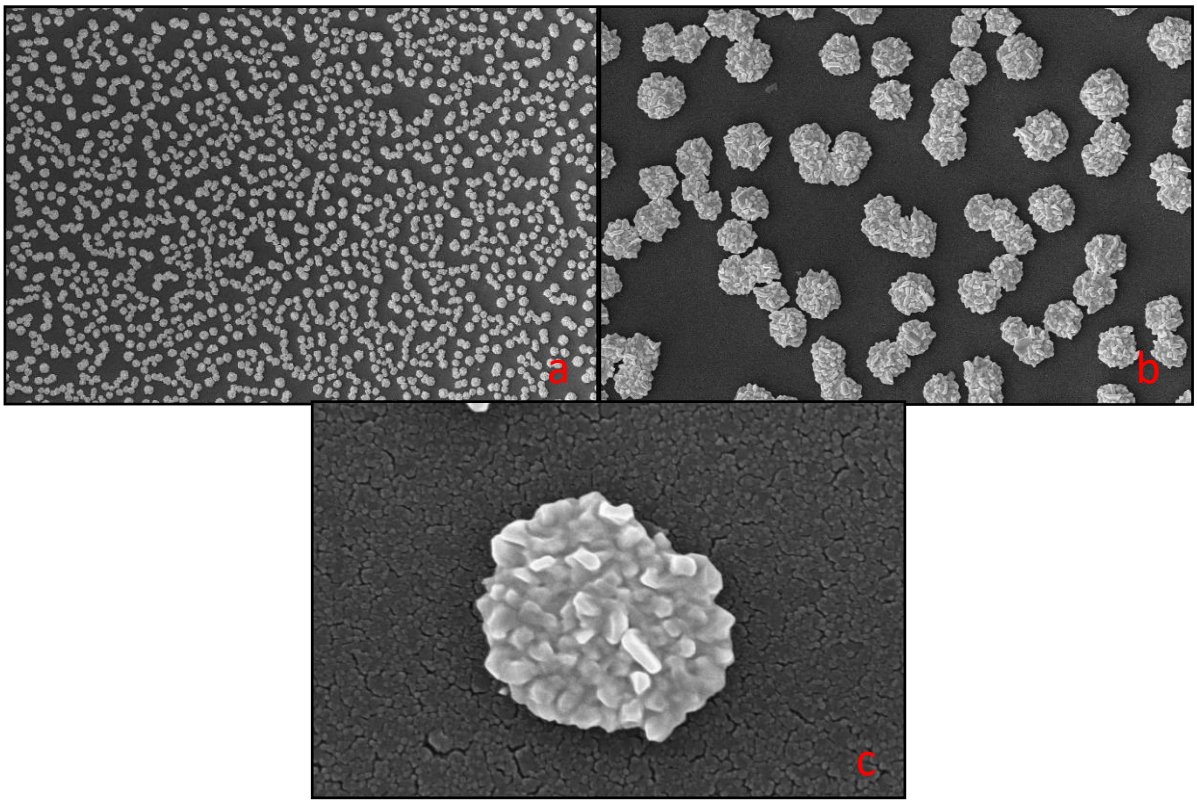


Abbildung 3: REM-Aufnahmen der AuNPs auf der TiO_2-Oberfläche (a: 1000x Vergrößerung, b: 5000x Vergrößerung, c: 25000x Vergrößerung)

Abbildung 3a zeigt die gesputterte Oberfläche mit zahlreichen säulenartig angeordneten Kornstrukturen, die durch die Nanocracks (s.o) begrenzt werden. Nach UV-Licht-Bestrahlung sind in Abbildung 3b Goldnanopartikel zu sehen, ihre reale Form ist hier allerdings nur ansatzweise erkennbar. Ebenso eindeutig erscheint hier die Partikel-Partikel-Interaktion, die für den Prozess der Photokatalyse typisch ist. In Abbildung 3c werden die Partikelstruktur und die Nanocracks genauer sichtbar. In der Gesamtbetrachtung weisen die Partikel eine blütenartige Struktur mit Durchmessern zwischen 2 - 5 µm auf. Die Mikrostrukturen bestehen wiederum eindeutig aus kleineren, hierarchisch geordneten, übereinander gelagerten Unterstrukturen mit Durchmessern im Nanometerbereich. Optisch ähnelt die Formation dieser Strukturen Kiefernzapfen.

Zusätzlich zu den REM-Aufnahmen wurden zur Analyse der Oberflächeneigenschaften statische und dynamische Kontaktwinkelmessungen durchgeführt.

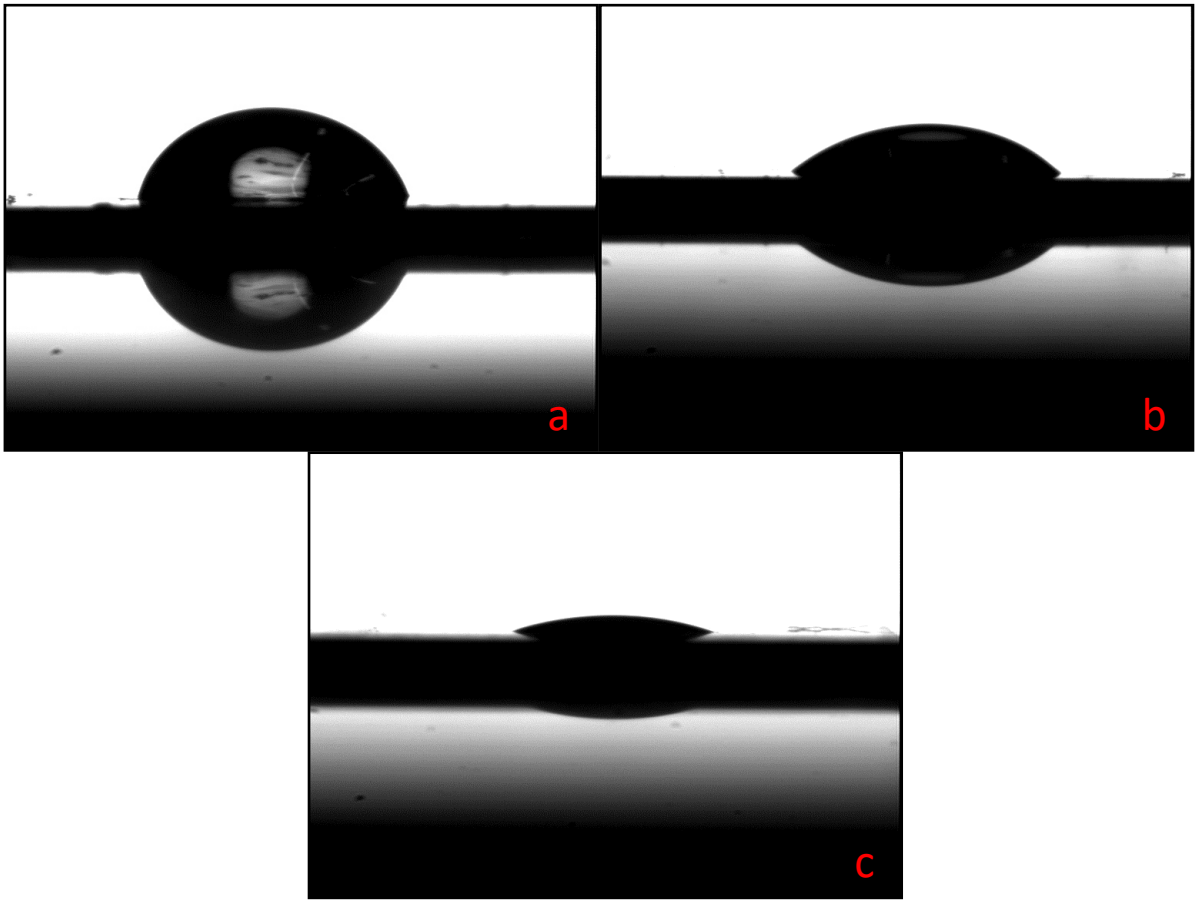


Abbildung 4: Kontaktwinkelaufnahmen der zu testenden Oberflächen (a: Kontrolloberfläche, b: TiO_2-Oberfläche, c: Au-TiO_2-Oberfläche)

Für die Kontrolloberfläche (Abb. 4a) wurde ein Kontaktwinkel von 70 ± 3° gemessen. Das Ergebnis liegt noch im hydrophilen Bereich. Titandioxid (Abb. 4b) lieferte ein Ergebnis von 63 ± 2° und liegt damit in einem vergleichbaren Bereich, auch wenn die Benetzbarkeit durch den geringeren Kontaktwinkel etwas besser ist. Für die AuNP-beschichtete Titandioxid-Oberfläche (Abb. 4c) wurden Kontaktwinkel von unter 5° gemessen. Der Unterschied zu der Kontroll- und Titandioxid-Oberfläche ist somit signifikant. Die Messung liegt im superhydrophilen Bereich; die Oberfläche ist annähernd vollständig benetzbar.

5.2 Zellanalyse am Rasterelektronenmikroskop

Zur Beurteilung der Morphologie der Zellen und ihrer Interaktion zur jeweiligen Oberfläche wurde eine Analyse unter dem REM inklusive entsprechender Aufnahmen in sechs Vergrößerungsstufen (100x, 250x, 500x, 1000x, 2000x und 5000x) vorgenommen.

5.2.1 Au-TiO_2

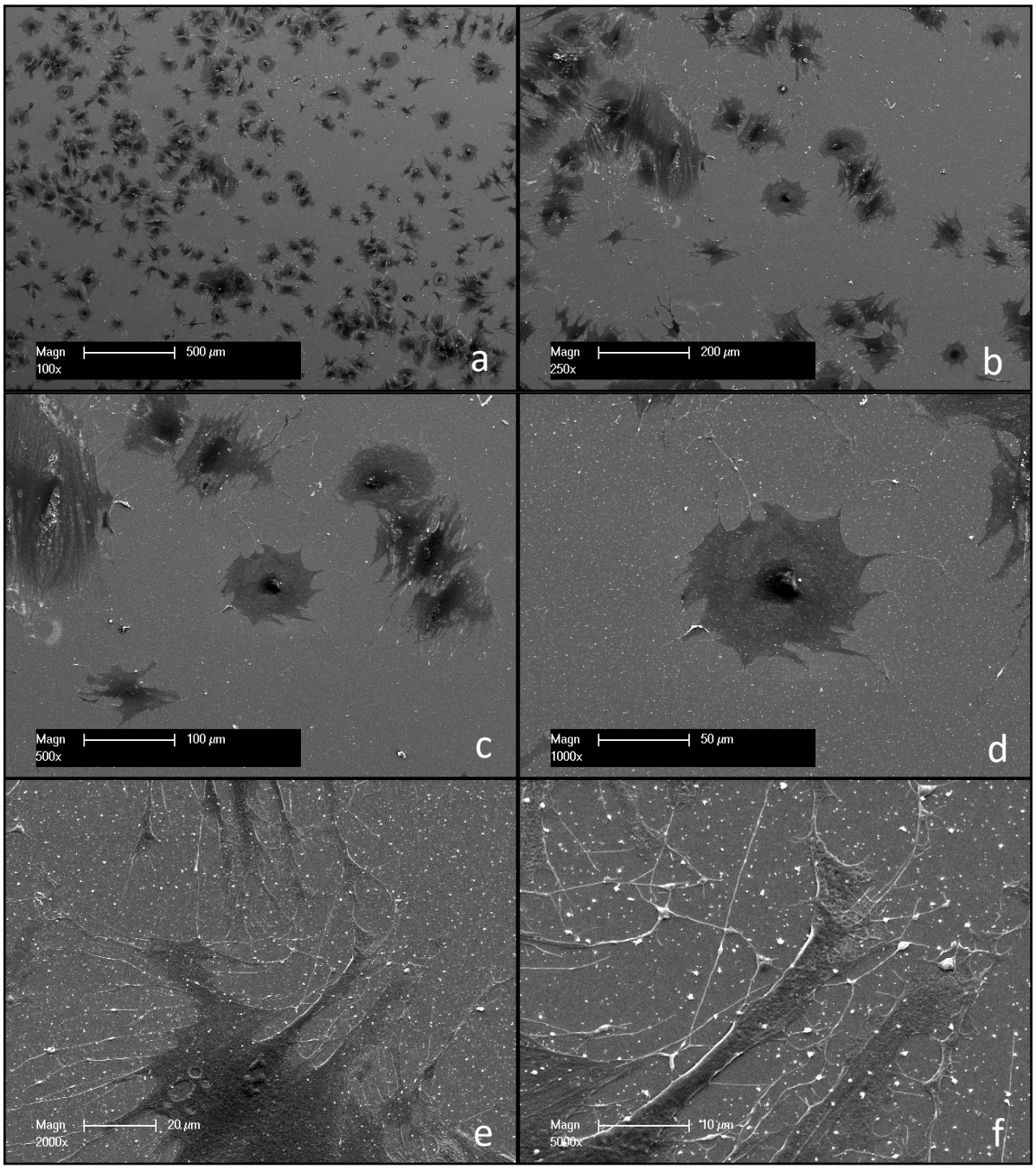


Abbildung 5: REM-Aufnahmen der hOB auf der Au-TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 12 Stunden (a: 100x Vergrößerung, b: 250x Vergrößerung, c: 500x Vergrößerung, d:1000x Vergrößerung, e: 2000x Vergrößerung, f: 5000x Vergrößerung)

In den Übersichtsaufnahmen in 100x (Abb. 5a) und 250x (Abb. 5b) Vergrößerung konnte man bereits nach 12 Stunden einen dichten Zellrasen auf der Au-TiO_2-Oberfläche erkennen. Das Zytoplasma erscheint dunkelgrau und der Zellkern schwarz. Die Zellmorphologie wird in den Abb. 5c und 5d deutlicher; die Zellen weisen überwiegend ein rund-kubische bis oval-prismatische Form auf. Die Zellmembranen besitzen zudem mehrere auffällige Protrusionen, von denen, bei genauerer Betrachtung dünne, fadenförmige Fortsätze, die Filopodien,

entspringen (s. Abb. 5e und 5f). Mithilfe solcher Filopodien sind Osteoblasten in der Lage mit ihrer Umgebung und anderen Zellen zu interagieren (63). Abb. 5e zeigt exemplarisch zwei Osteoblasten, die eindeutig über mehrere Filopodien Zell-zu-Zell-Kontakt hergestellt haben. Ebenso deutlich geht aus Abb. 5f eine Zell-zu-Oberflächen-Interaktion durch auf AuNPs zulaufende Filopodien hervor. Insgesamt sieht man viele und lange Zellfortsätze.

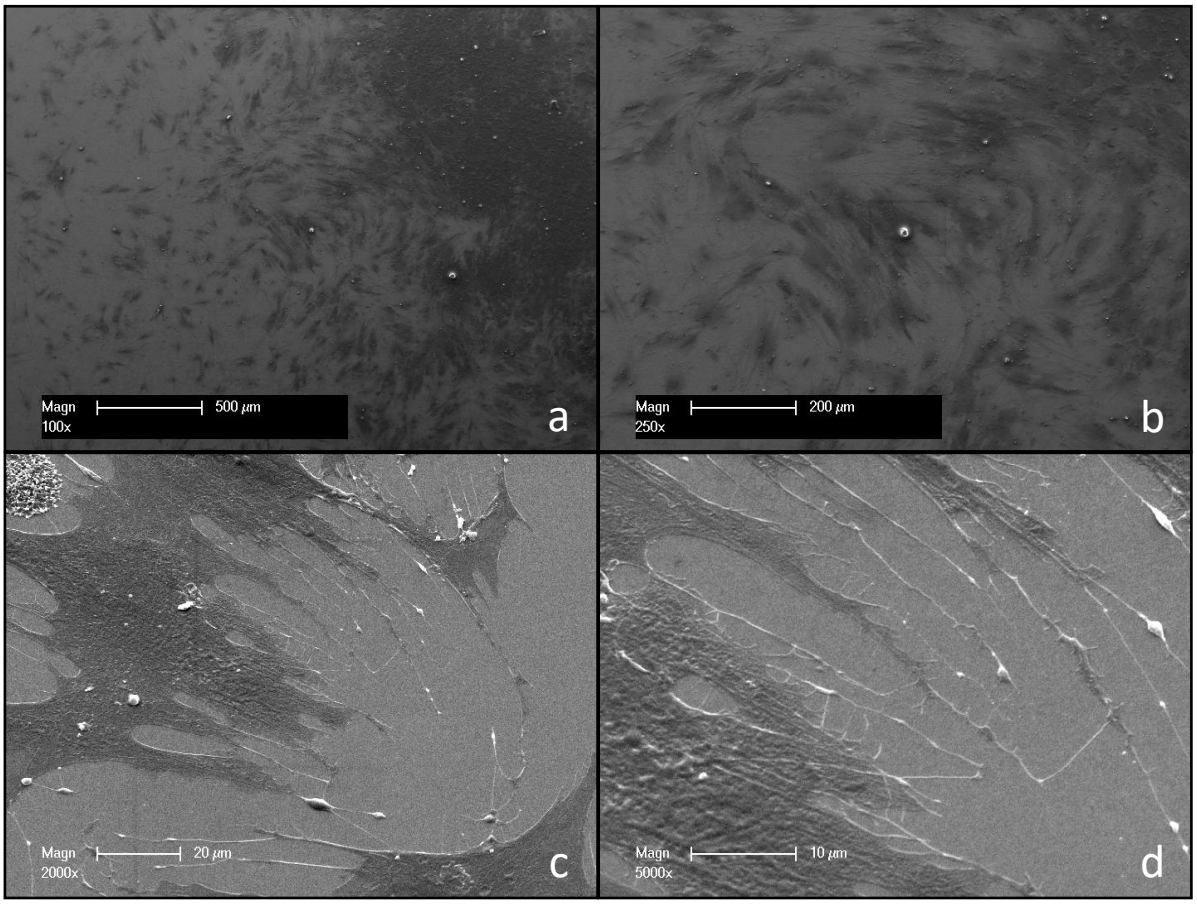


Abbildung 6: REM-Aufnahmen der hOB auf der Au-TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden (a: 100x Vergrößerung, b: 250x Vergrößerung, c: 2000x Vergrößerung, d:5000x Vergrößerung)

Nach 24 Stunden sieht man einen deutlich dichteren Zellrasen als Ausdruck von fortschreitender Zellproliferation (Abb. 6a und 6b). Die Zellmorphologie erscheint etwas unregelmäßiger (s. Abb. 6b), auch weil die Anzahl der Membranprotrusionen, Filopodien und Zell-zu-Zell-Kontakte größer geworden ist. Es ist ein enger und verwobener Zellverbund entstanden. In den größten Vergrößerungen (Abb. 6c und 6d) sieht man, dass die vorher geradlinig verlaufenden Filopodien nun komplizierter verzweigte Verläufe im Vergleich zum letzten Kontrollzeitpunkt aufzeigen, was letztere Entwicklung zusätzlich bestätigt.

5.2.2 TiO_2

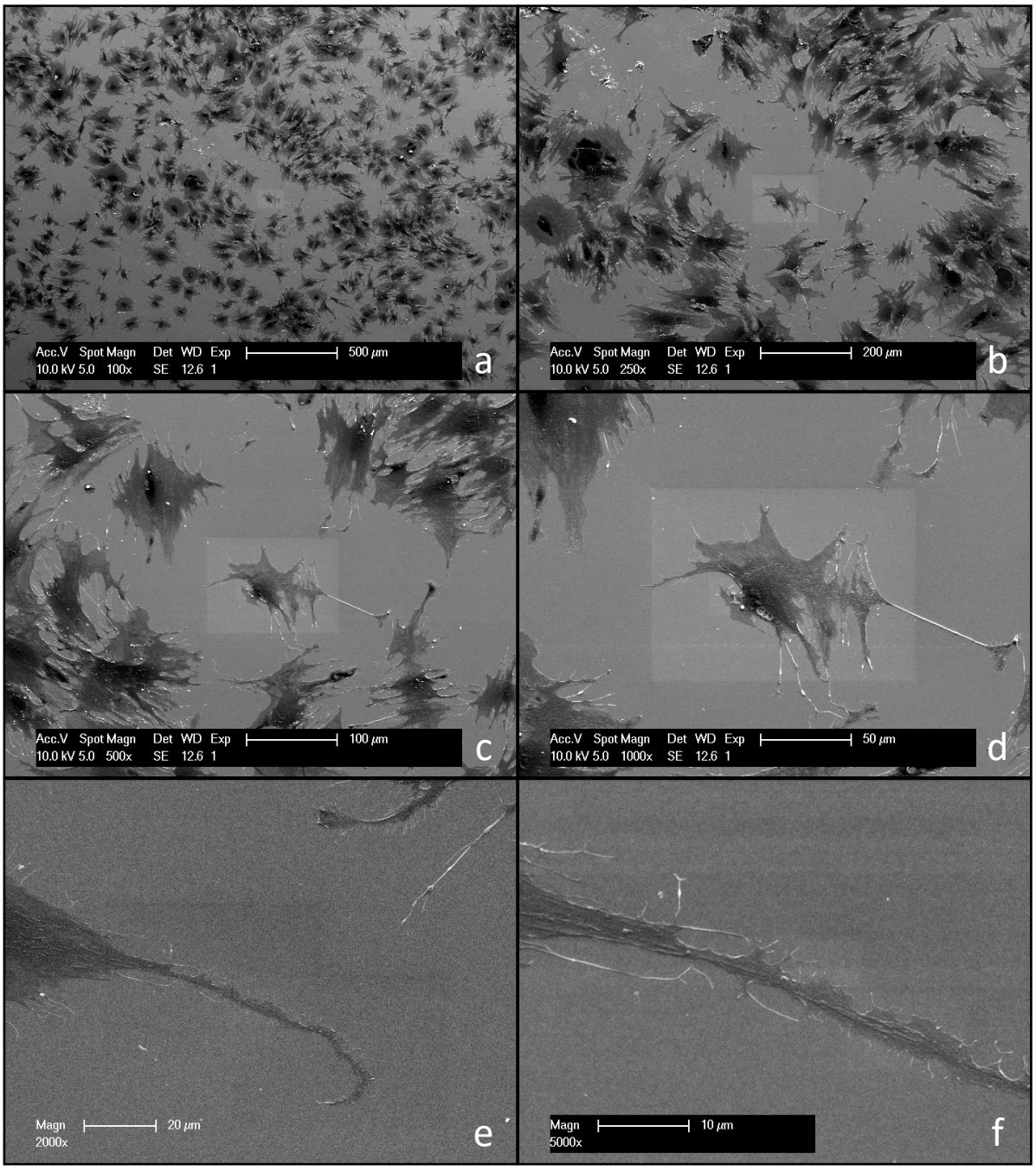


Abbildung 7: REM-Aufnahmen der hOB auf der TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 12 Stunden (a: 100x Vergrößerung, b: 250x Vergrößerung, c: 500x Vergrößerung, d:1000x Vergrößerung, e: 2000x Vergrößerung, f: 5000x Vergrößerung)

Auch auf der TiO_2-Oberfläche konnte man bereits nach 12 Stunden einen dichten Zellrasen als Ergebnis von rascher Zellproliferation sehen (s. Abb. 7a und 7b). Ein auffälliger Unterschied zu den Zellen, die auf der Au-TiO_2-Oberfläche gewachsen sind, liegt in der Beurteilung der Zellmorphologie. Man erkennt hier keine regelmäßige Zellform (s. Abb. 7c und 7d), im Gegensatz zu den kubisch/prismatisch geformten Au-TiO_2-Osteoblasten. Dennoch haben die Zellen auch auf dieser Oberfläche Membranprotrusionen und Filopodien ausgebildet (s. Abb. 7e und 7f). Die Filopodien scheinen hier im Vergleich weniger zahlreich

zu sein, außerdem ist ihre Länge auffällig kürzer (s. Abb. 7e). Es sind auch weniger Zell-zu-Zell-Kontakte zu finden, über die Interaktion zur Oberfläche kann anhand der Bilder keine Aussage getroffen werden.

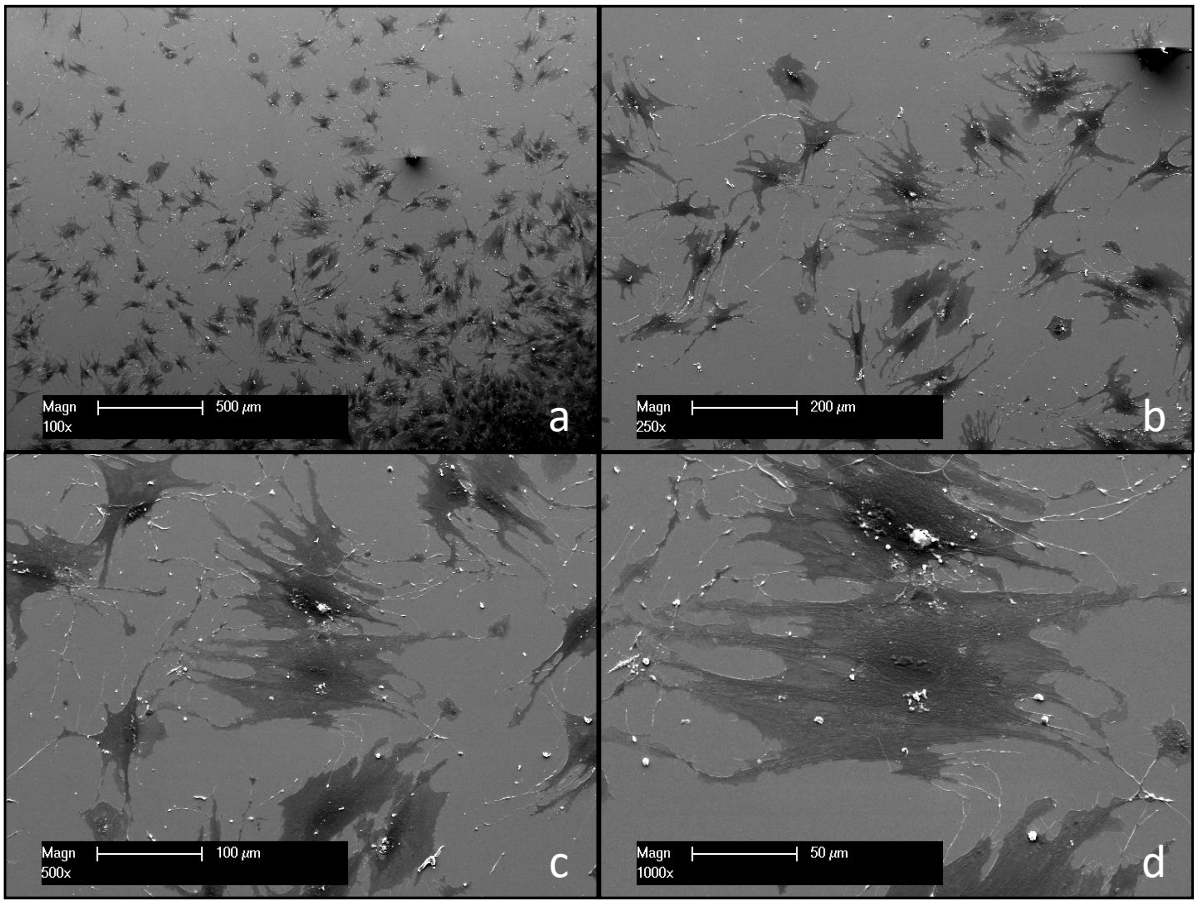


Abbildung 8: REM-Aufnahmen der hOB auf der TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden (a: 100x Vergrößerung, b: 250x Vergrößerung, c: 500x Vergrößerung, d:1000x Vergrößerung)

Zum zweiten Kontrollzeitpunkt nach einem Tag hat sich die Zellzahl augenscheinlich auch auf dieser Oberfläche deutlich vermehrt (s. Abb. 8a). Die Zellmorphologie ist uneinheitlich geblieben (s. Abb. 8b), aber es haben sich mehr Membranausstülpungen, Filopodien und Zell-zu-Zell-Kontakte ausgebildet (s. Abb. 8c). Im Vergleich zur Au-TiO_2-Oberfläche sind diese aber weniger zahlreich; vor allem die Filopodien sind im Durchschnitt deutlich kürzer und besitzen weniger Verzweigungen, sodass keine Interaktion mit Zellen auf größerer Distanz zu sehen ist (s. Abb. 8d).

5.2.3 Kontrolle

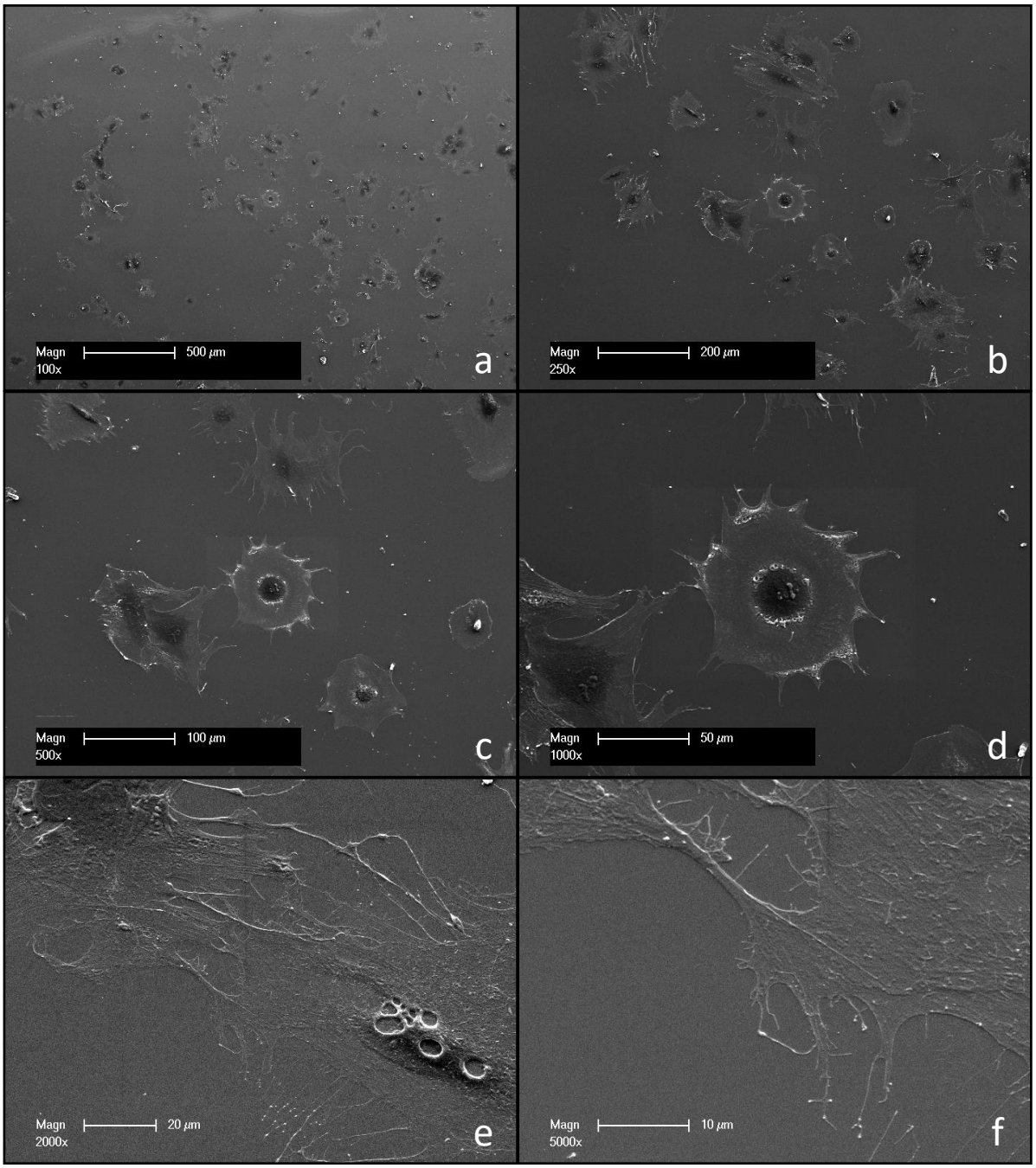


Abbildung 9: REM-Aufnahmen der hOB auf der Ti-Kontroll-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 12 Stunden (a: 100x Vergrößerung, b: 250x Vergrößerung, c: 500x Vergrößerung, d:1000x Vergrößerung, e: 2000x Vergrößerung, f: 5000x Vergrößerung)

Auf der Kontrolloberfläche sind in den Übersichtsaufnahmen (Abb. 9a) nach 12 Stunden deutlich weniger Zellen zu sehen als auf den Vergleichsoberflächen. Dabei scheinen sich die meisten Zellen in ihrer Morphologie zu unterscheiden, man sieht runde, prismatische, ovale und unregelmäßige Formen (s. Abb. 9b) in direkter Nachbarschaft zueinander. Ebenso willkürlich erscheint die Mikromorphologie; manche Zellen besitzen keine

Membranausstülpungen oder Filopodien, die meisten haben einige wenige Fortsätze ausgebildet (s. Abb. 9c). Die Filopodien sind sehr kurz im Vergleich zu den (Au-)TiO_2-Oberflächen (s. Abb. 9d) und weisen wenige Verzweigungen auf (s. Abb 9e und 9f), sodass die Zell-zu-Zell-Interaktionen sehr spärlich sind.

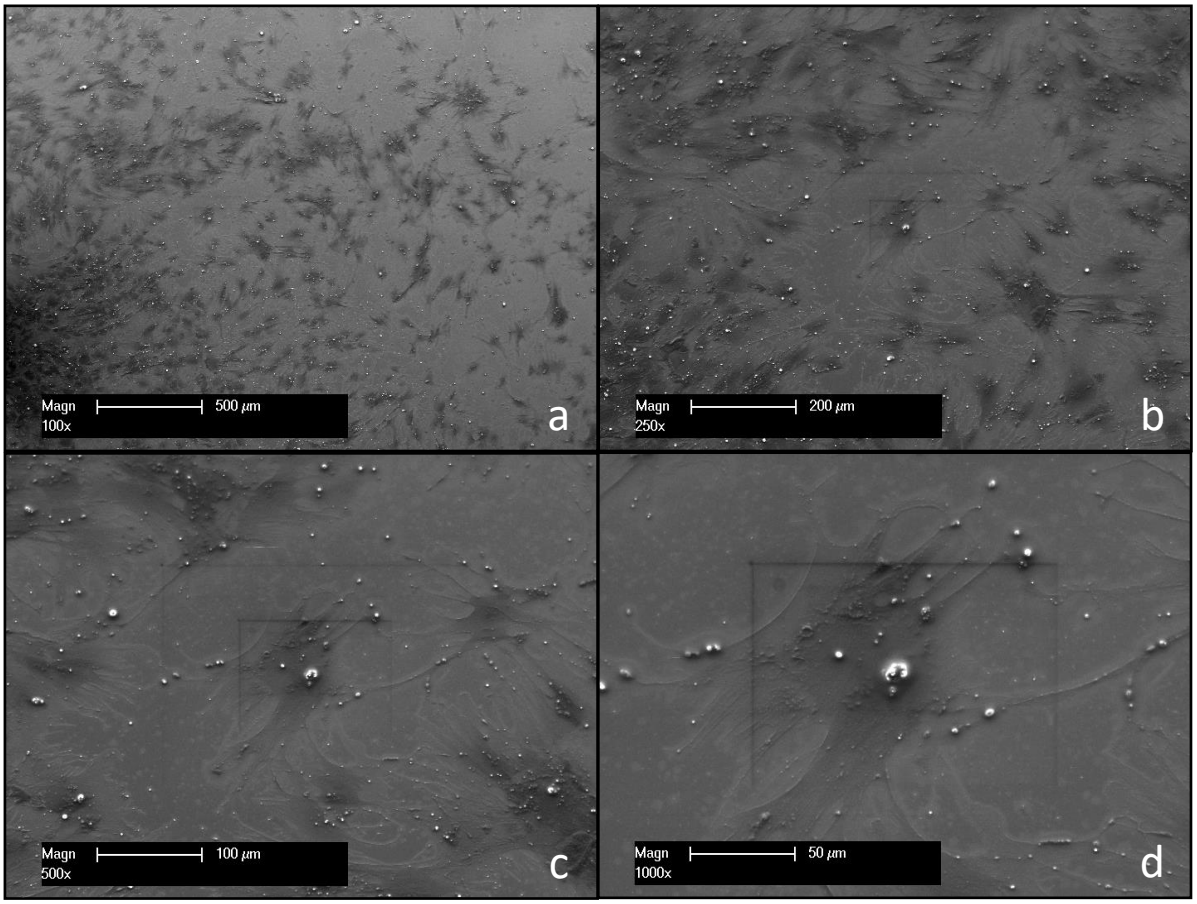
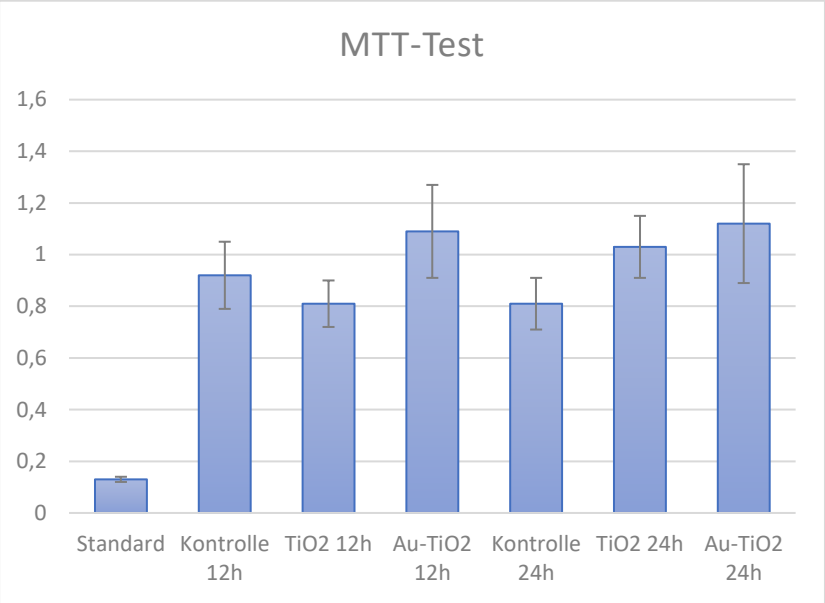


Abbildung 10: REM-Aufnahmen der hOB auf der Ti-Kontroll-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden (a: 100x Vergrößerung, b: 250x Vergrößerung, c: 500x Vergrößerung, d:1000x Vergrößerung)

Die Zellzahl hat sich nach 24 Stunden deutlich vergrößert (s. Abb. 10a). Die Morphologie ist weiterhin unregelmäßig geblieben (s. Abb. 10b), aber die Anzahl der Membranprotrusionen und die Dichte der Filopodien ist größer geworden (s. Abb. 9c). Insgesamt bleibt die Filopodienlänge aber auch nach 24 Stunden deutlich kleiner als bei den Vergleichsoberflächen (s. Abb. 9d), auch wenn die Zell-zu-Zell-Kontakte häufiger geworden sind. Über eine potenzielle Zell-zu-Oberflächen-Interaktion kann anhand der Bilder keine Aussage getroffen werden.

5.3 MTT-Test

Der MTT-Test ist ebenfalls ein quantitatives Verfahren zur Messung der metabolischen Zellaktivität (durch Umsetzung eines Farbstoffes) und wurde eingesetzt, um die Zellviabilität zu beurteilen. Die Ergebnisse wurden bei 550nm-Wellen im photometrischen Verfahren abgelesen und in der optischen Zelldichte angegeben.



	Mittelwert	STABW
Standard	0.13	0.01
Kontrolle 12h	0.92	0.13
TiO_2 12h	0.81	0.09
Au-TiO_2 12h	1.09	0.18
Kontrolle 24h	0.81	0.1
TiO_2 24h	1.03	0.12
Au-TiO_2 24h	1.12	0.23

Abbildung 11: Ergebnisse des MTT-Tests für alle Kontrollgruppen und -zeitpunkte nach Mittelwerten und Standardabweichung (STABW)

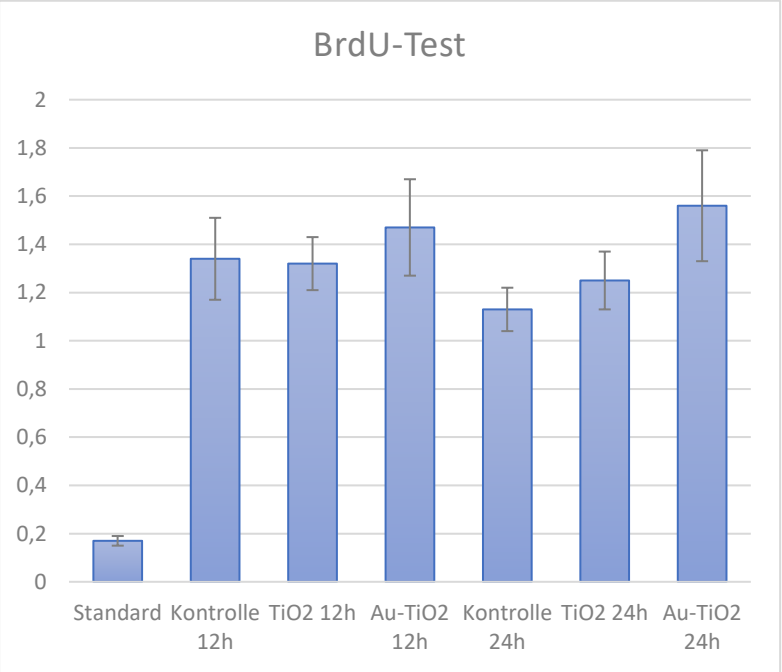
Beim ersten Untersuchungszeitpunkt (12 Stunden) ist die Zelldichte auf der Au-TiO_2-Oberfläche am höchsten (s. Abb 11). Der Unterschied ist sowohl gegenüber der TiO_2-, als auch der Kontrolloberfläche statistisch signifikant.

Bei den 24-Stunden-Ergebnissen zeigt sich eine Vergrößerung der Zelldichte sowohl für Au-TiO_2 als auch TiO_2. Beide Oberflächen zeigen nun eine signifikant höhere Zellzahl als die Kontrolloberfläche, bei welcher die optische Dichte im Vergleich zum 12-Stunden-Ergebnis sogar abgenommen hat. Während der Anstieg des MTT-Wertes von 12 auf 24 Stunden für TiO_2 statistisch signifikant ist (p=0,001), ist der Anstieg für Au-TiO_2 nicht signifikant (p=0,061) Zu beiden Kontrollzeitpunkten ist die Anzahl der hOB auf der Au-TiO_2-Oberfläche am größten.

Im Vergleich zwischen den Gruppen gab es einen statistisch signifikanten Unterschied nach 12 sowie 24 Stunden (p= 0,001). Der Dreifachvergleich der Gruppen ergab statistische Unterschiede (p=0,019 zwischen TiO_2 und Au-TiO_2 nach 12 Stunden).

5.4 BrdU-Test

Mithilfe des BrdU-Tests konnte die Zellteilung anhand der DNA-Replikationsrate dargestellt werden. Durch die Photometrie konnten die Ergebnisse bei einer Wellenlänge von 450nm abgelesen werden. Angegeben ist die optische Zelldichte zu den beiden Kontrollzeitpunkten.



	Mittelwert	STABW
Standard	0.17	0.02
Kontrolle 12h	1.34	0.17
TiO_2 12h	1.32	0.11
Au-TiO_2 12h	1.47	0.2
Kontrolle 24h	1.13	0.09
TiO_2 24h	1.25	0.12
Au-TiO_2 24h	1.56	0.23

Abbildung 12: Ergebnisse des BrdU-Tests für alle Kontrollgruppen und -zeitpunkte nach Mittelwerten und Standardabweichung (STABW)

Die Ergebnisse nach 12 Stunden zeigen für die Au-TiO_2-Oberfläche die höchste Zelldichte (s. Abb. 12). Im Vergleich zwischen den Gruppen gibt es einen statistisch signifikanten Unterschied zu diesem Untersuchungszeitpunkt (p=0,001). Auf der Kontrolloberfläche befinden sich überraschenderweise geringfügig mehr Zellen zu diesem Zeitpunkt als auf der konventionellen TiO_2-Oberfläche, der Unterschied ist nicht signifikant.

Auch zum Zeitpunkt nach 24 Stunden gibt es im Vergleich der Gruppen einen statistisch signifikanten Unterschied (p=0,001). Wie schon beim MTT-Test zu beobachten, ist der Anstieg des BrdU-Wertes für die TiO_2-Gruppe von 12 auf 24 Stunden statistisch signifikant (p=0,001), der Wert für die Au-TiO_2-Gruppe nicht. Im Gegensatz zum ersten Kontrollzeitpunkt, ist die Anzahl der Zellennach 24 Stunden auf dem TiO_2 größer als auf der Kontrolle. Somit ist man davon auszugehen, dass beide Oberflächen non-toxisch sind.

5.5 FDA/PI-Färbung

Mittels der FDA/PI-Färbung konnte die Mikromorphologie der Zellen und ihr Verhalten auf den Kontrolloberflächen auch unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Durch die fluoreszierenden Farbstoffe konnte zusätzlich die Zellvitalität geprüft werden; durch das PI rot leuchtende Zellen sind dabei avital, grün leuchtende Zellen erscheinen dank des FDA vital. Es wurden Bilder in 10x- und 20x-Vergrößerung aufgenommen.

5.5.1 Au-TiO_2

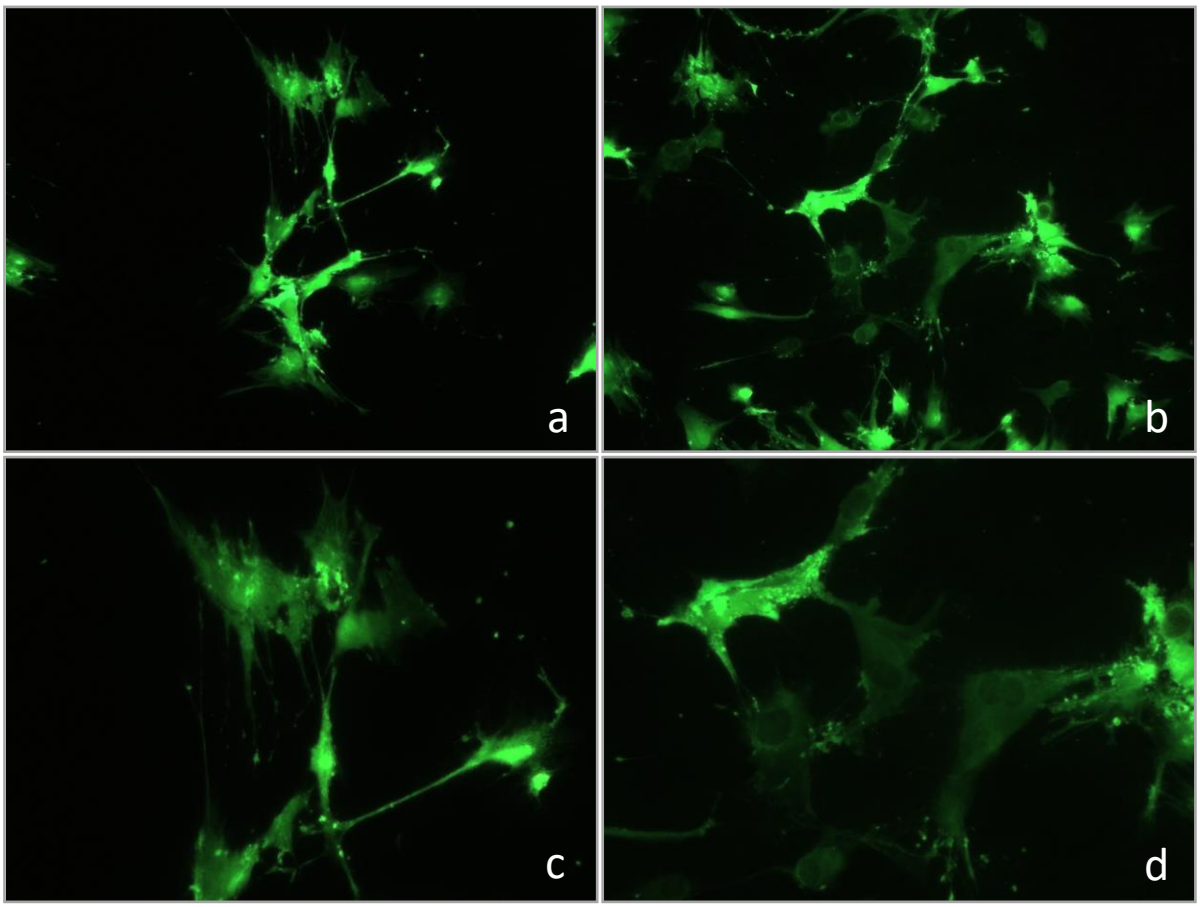


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der hOB auf der Au-TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 12 Stunden (a: 10x Vergrößerung, b: 10x Vergrößerung, c: 20x Vergrößerung, d:20x Vergrößerung)

Die Osteoblasten erscheinen nach 12 Stunden auf der Au-TiO_2-Oberfläche vital; man kann keine devitalen Zellen erkennen (s. Abb. 15). Die Form der Zellen ist überwiegend kubisch bis prismatisch, ähnlich wie unter dem REM beobachtet (s. Abb. 15d). Mikromorphologisch erkennt man auch hier die Membranvorsprünge, aus denen die Filopodien entspringen (Abb. 15a und 15c). Schon zu diesem Zeitpunkt erkennt man Zell-zu-Zell-Kontakte und damit Interaktion zwischen den hOB (Abb. 15b und 15d).

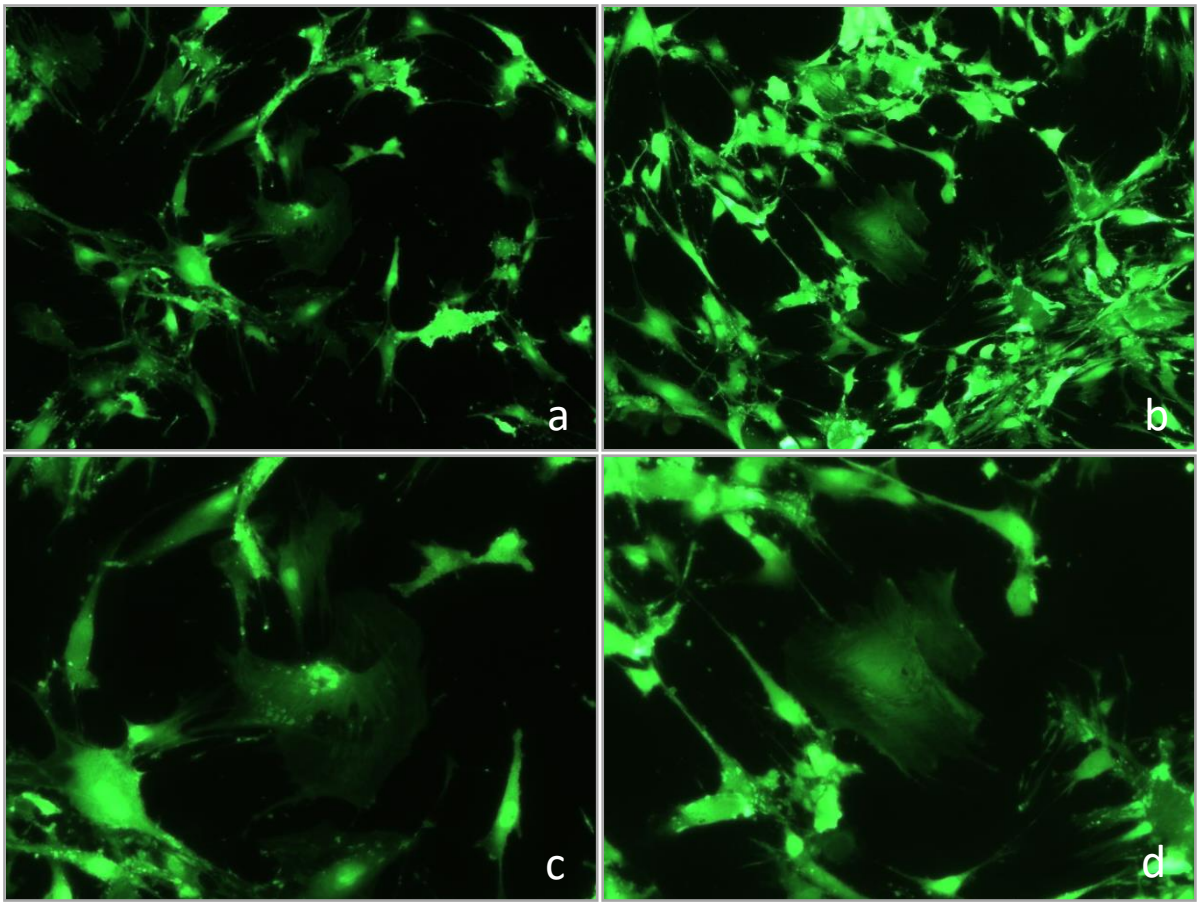


Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der hOB auf der Au-TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden (a: 10x Vergrößerung, b: 10x Vergrößerung, c: 20x Vergrößerung, d:20x Vergrößerung)

Nach 24 Stunden sieht man eine deutliche Zunahme der Zelldichte (s. Abb. 16b). Die äußere Form der Osteoblasten erscheint weiterhin regelmäßig (s. Abb. 16a) und sie sind auch zu diesem Zeitpunkt noch vital. Durch eine größere Zahl an Filopodien (s. Abb. 16d) ist eine bessere Vernetzung erfolgt, sodass eine Zelle in der Regel mit vielen weiteren zu interagieren scheint (s. Abb. 16c). Die Bilder lassen einen hochorgansierten Zellverbund vermuten.

5.5.2 TiO_2

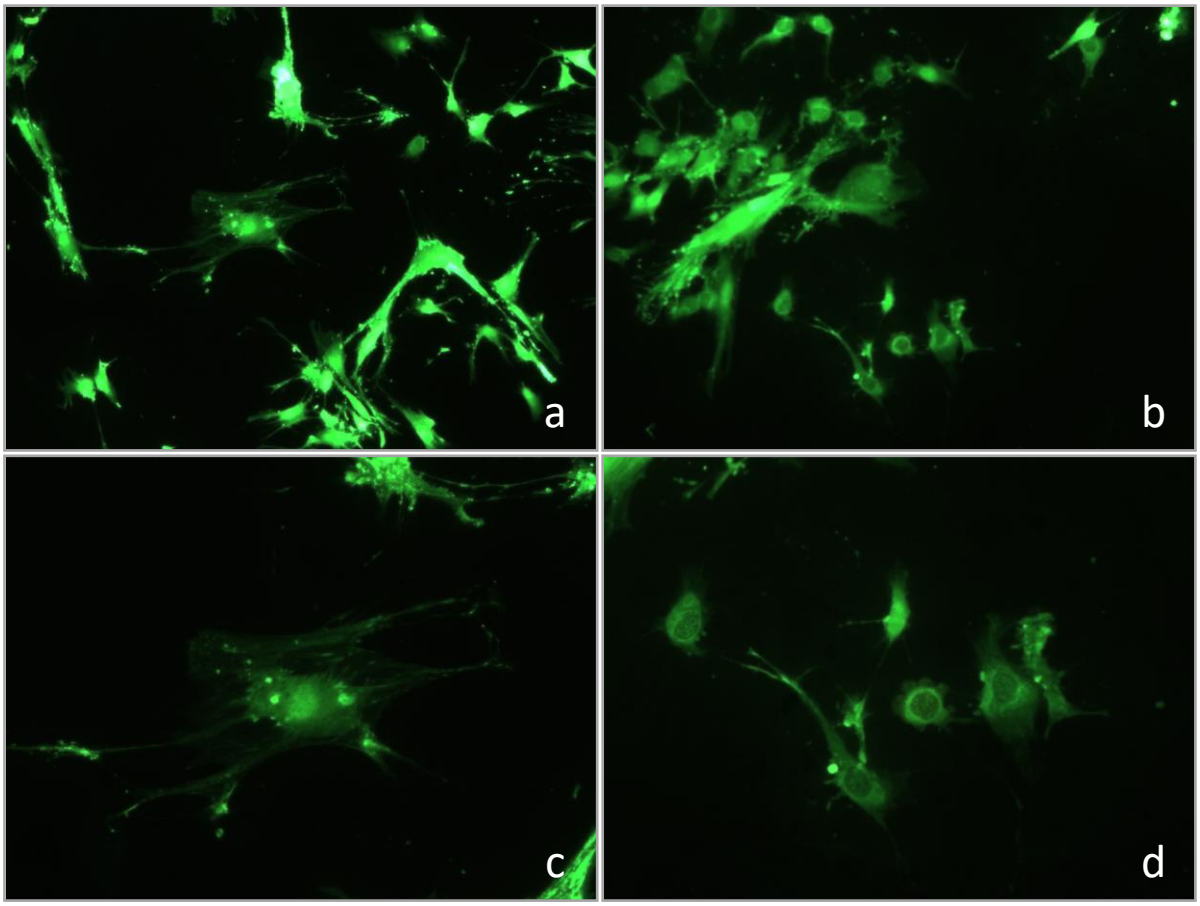


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der hOB auf der TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 12 Stunden (a: 10x Vergrößerung, b: 10x Vergrößerung, c: 20x Vergrößerung, d:20x Vergrößerung)

Auf der TiO_2-Oberfläche befinden sich ebenfalls ausschließlich lebende Zellen (s. Abb. 17a). Die Osteoblasten haben überwiegend eine runde Form (s. Abb. 17b). Die Anzahl der Membranvorsprünge und Filopodien ist im Vergleich zu den Zellen der Au-TiO_2-Oberfläche gering, manche besitzen gar keine (s. Abb. 17d). Die vorhandenen Filopodien sind vergleichsweise kurz (Abb. 17c) und können kaum Zell-zu-Zell-Kontakte bilden, es sei denn die Zellen befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander.

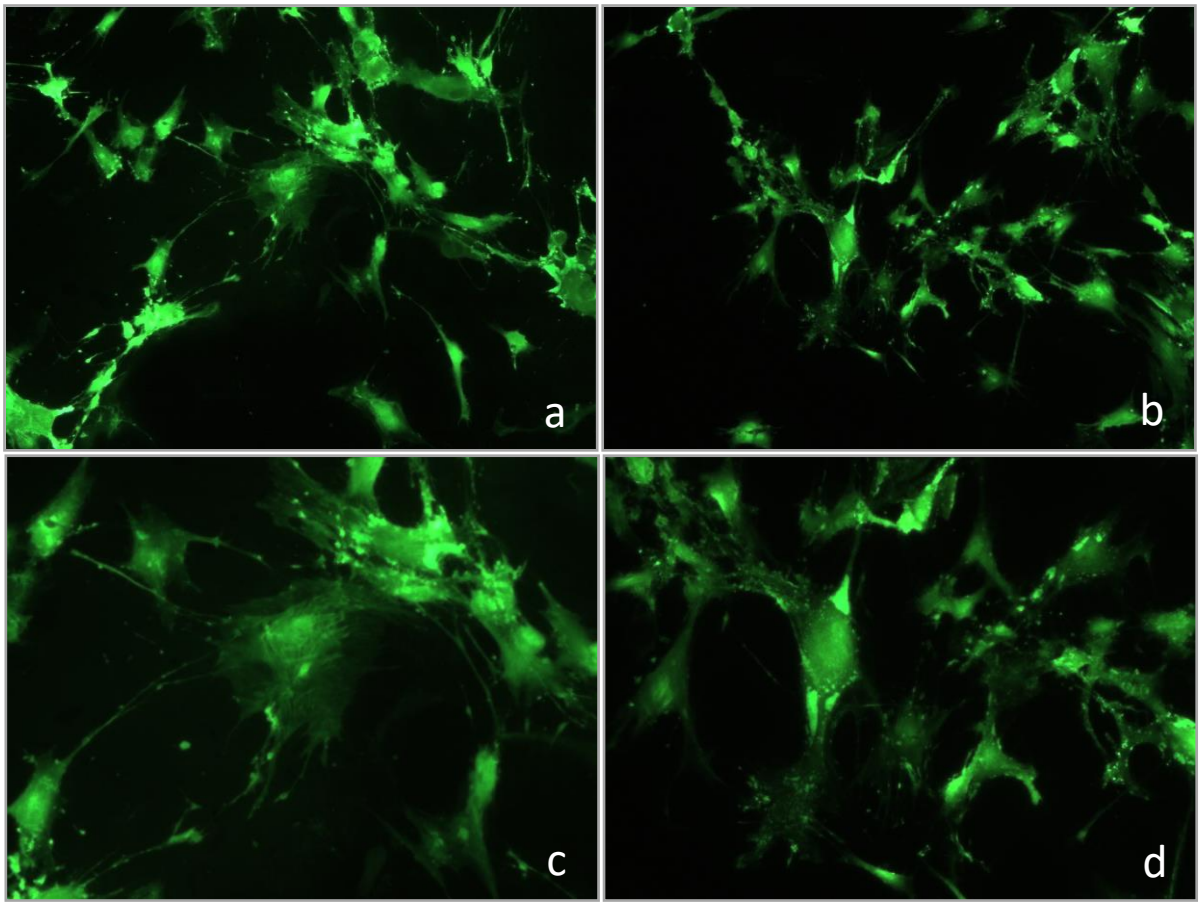


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der hOB auf der TiO_2-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden (a: 10x Vergrößerung, b: 10x Vergrößerung, c: 20x Vergrößerung, d:20x Vergrößerung)

Zum zweiten Kontrollzeitpunkt sind alle Osteoblasten weiterhin vital (s. Abb. 18a und 18b). Insgesamt ist die Zelldichte größer geworden. Die Zellform hat sich im Wesentlichen nicht verändert, allerdings haben sich mehr Membranprotrusionen und auch Filopodien gebildet (s. Abb. 18c), sodass die Anzahl der Zell-zu-Zell-Kontakte ebenso gestiegen ist. In puncto Länge und Anzahl der Filopodien bleiben die TiO_2-Osteoblasten trotzdem deutlich hinter den Au-TiO_2-Osteoblasten (vgl. Abb. 18d mit 16b) zurück; eine Beobachtung, die auch beim Vergleich der REM-Bilder gemacht wurde (s.o).

5.5.3 Kontrolle

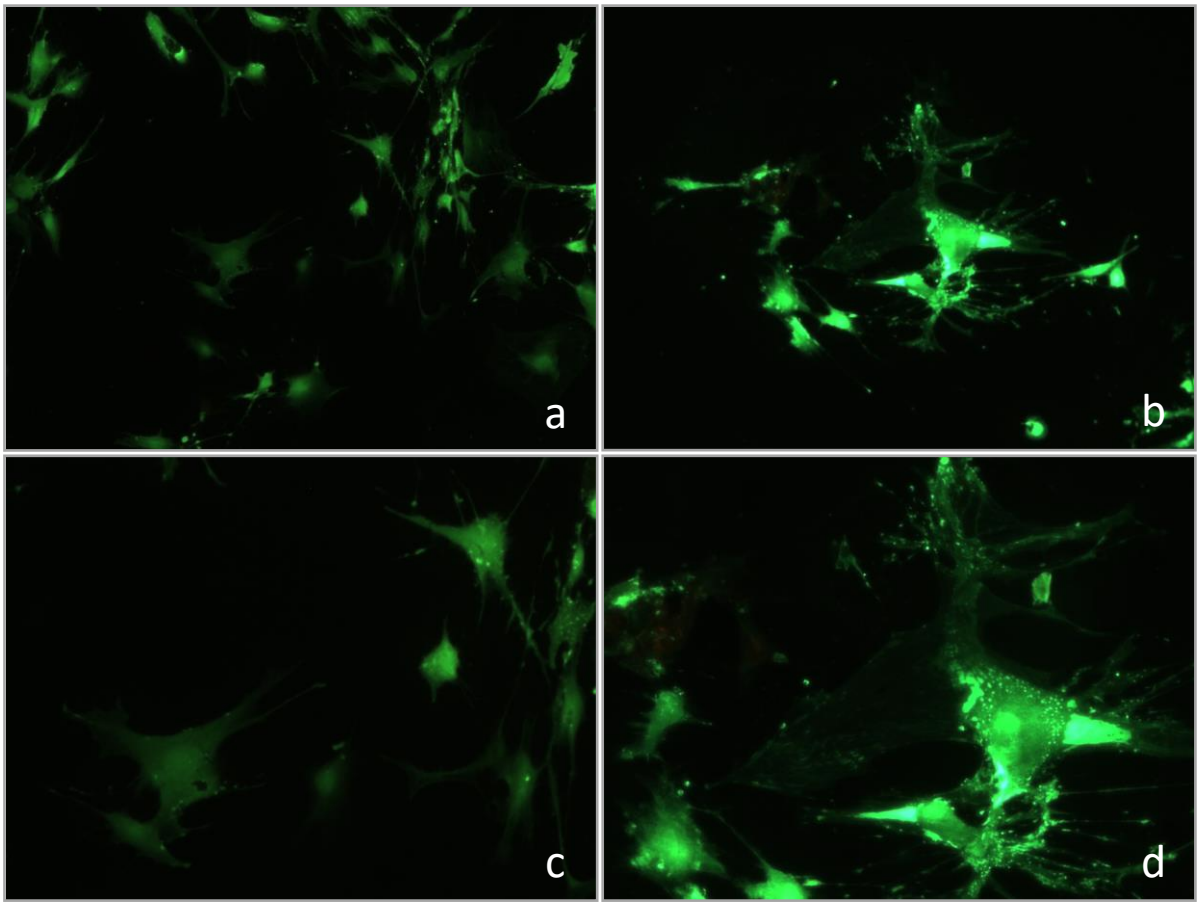


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der hOB auf der Ti-Kontroll-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 12 Stunden (a: 10x Vergrößerung, b: 10x Vergrößerung, c: 20x Vergrößerung, d:20x Vergrößerung)

Auch auf der Kontrolloberfläche sind alle Zellen vital geblieben (s. Abb. 19a). Die Zelldichte scheint auf den ersten Blick geringer zu sein (Abb.19a) und die Form der Osteoblasten zeigt kein einheitliches Muster (s. Abb. 19b). Die Anzahl der Membranprotrusionen und Filopodien ist kleiner, sodass Zell-zu-Zell-Kontakte seltener zu sehen sind (s. Abb. 19c und d) als auf den Vergleichsoberflächen. Auch die Länge der Filopodien erscheint kürzer, Verzweigungen sind nicht zu sehen (s. Abb. 19d).

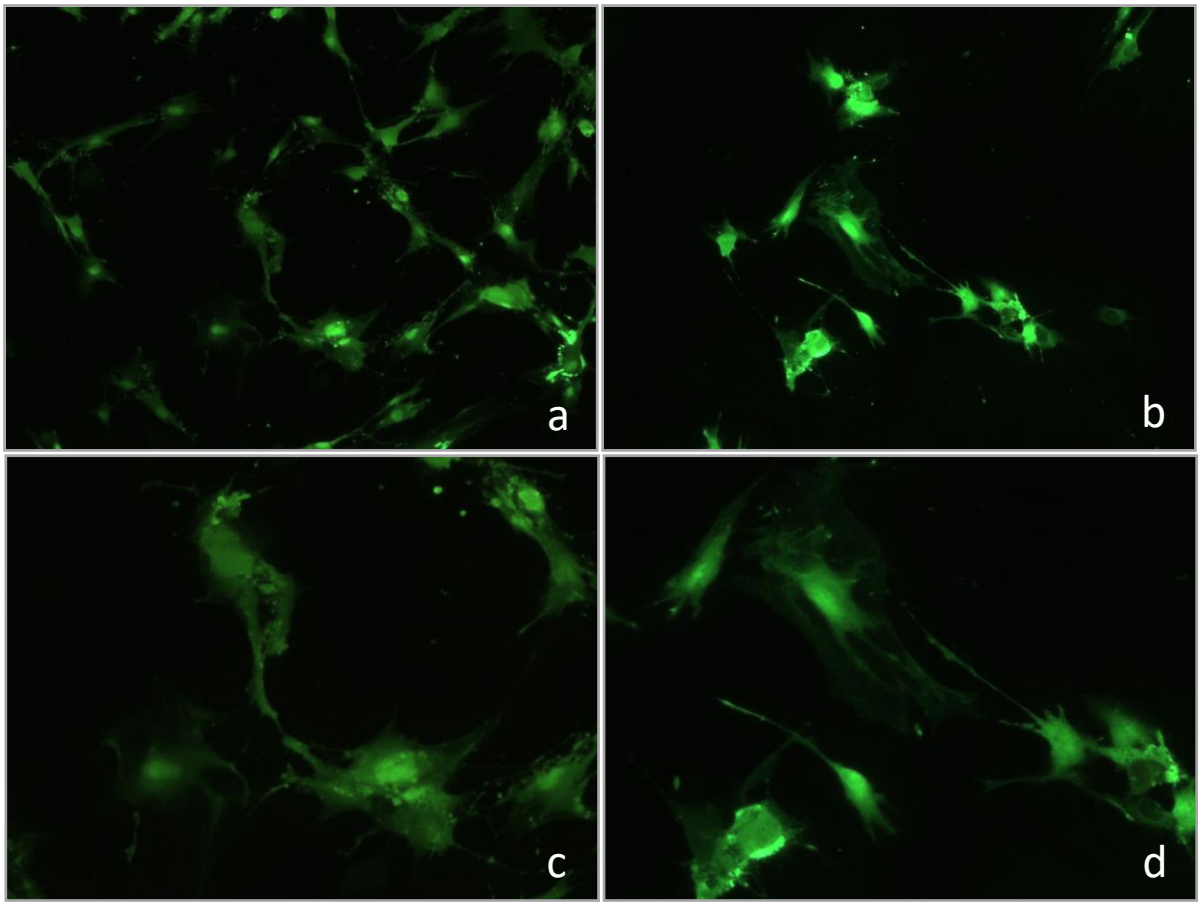


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der hOB auf der Ti-Kontroll-Oberfläche zum Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden (a: 10x Vergrößerung, b: 10x Vergrößerung, c: 20x Vergrößerung, d:20x Vergrößerung)

Zum zweiten Kontrollzeitpunkt nach 24 Stunden kann man eine größere Zelldichte beobachten (s. Abb. 20a). Die Osteoblasten sind weiterhin vital. Die Zellform ist unregelmäßig geblieben (s. Abb. 20c). Auf der Übersichtaufnahme (Abb. 20a) kann man sehen, dass mehr Zell-zu-Zell-Interaktion existiert als im Vergleich zu 12 Stunden zuvor. Die Anzahl der Filopodien ist größer und die Fortsätze sind insgesamt etwas länger geworden (s. Abb. 20b und 20d). Dennoch ist sowohl die Anzahl der Osteoblasten als auch die der Membranprotrusionen, Filopodien und Zell-zu-Zell-Kontakte deutlich geringer als auf den Au-TiO_2- und TiO_2-Oberflächen.

6. Diskussion

6.1 Material

In dieser Studie wurde eine mit Goldnanopartikeln beschichtete TiO_2-Oberfläche, mit einer unbeschichteten TiO_2-Oberfläche und einer Glasoberfläche verglichen. Mit dem bei (zahn-) medizinischen Implantaten konventionell angewandten Werkstoff Titan (und seiner spontan oxidierenden Oberfläche) wurde ein valider Vergleich gewählt. Zudem gab es eine neutrale Kontrolle (Glas) zum Vergleich.

6.1.1 Ti(O_2)

Titan und Titanlegierungen haben sich aufgrund ihrer herausragenden mechanischen und biologischen Eigenschaften als Implantatwerkstoff der ersten Wahl in der Orthopädie und dentalen Implantologie durchgesetzt. Die technischen Hauptvorteile gegenüber anderen Metall(-legierung)en sind ein geringes Molekulargewicht, ein vergleichsweise geringes Elastizitätsmodul, hohe Streckgrenze, Druck- und Dauerfestigkeit; aus biologischer Sicht stechen eine herausragende Biokompatibilität und Korrosionsbeständigkeit heraus (5,19,32). Andere Biomaterialienstoffklassen, mit Ausnahme der hochfesten Keramiken, sind (noch) nicht als gleichwertige Alternativen geeignet.

Es gibt nichtsdestotrotz auch einige Aspekte, die verbesserungswürdig sind. Aus mechanischer Sicht kann man immer noch große Diskrepanzen zwischen den Festigkeits- und Steifigkeitswerten und vor allem beim Elastizitätsmodul im Vergleich zu Knochen feststellen:

Material	**Zugfestigkeit (MPa)**	**Streckgrenze (MPa)**	**E-Modul (GPa)**
Titan(-legierungen)	690-1200	585-1060	55-120
Kortikaler Knochen	50-150	30-70	4-30
Spongiöser Knochen	10-20	-	0,2-0,5

Tabelle 8: Vergleich wichtiger mechanischer Eigenschaften zwischen Titan und Knochen (Werte aus (5,10) (51))

Laut Wolffschem Gesetz, wonach Knochen sich je nach Belastung entsprechend ummodelliert, könnte ein mechanisch überlegenes Implantat eine solchen Prozess, mit möglicherweise fatalen Folgen, auslösen (5).

Auch die Verschleißbeständigkeit und Scherfestigkeit von Titan ist im Vergleich nicht besonders hoch; Zirkonoxidkeramiken beispielsweise weisen hier bessere Werte auf (5,10). Durch einwirkende Kräfte verursachte Mikrobewegungen zwischen Implantat und Knochen, bei Anwesenheit von Körperflüssigkeit, können zu einem Verschleiß bis hin zu vollständigem

Verlust der Passivschicht auf der Oberfläche führen; ein Prozess, der wiederum Korrosion begünstigt (64).

Biologisch betrachtet wäre es außerdem wünschenswert, wenn das Implantat aktiv seinen Einheilungsprozess, die Osseointegration, mit fördern könnte; Titan verhält sich aber wie bereits dargestellt „nur“ bioinert (s.o). Die Fallberichte über Unverträglichkeitsreaktionen (s.o) müssen ebenso ernst genommen und weiter erforscht werden.

Ein weiterer zentraler Aspekt, der vor einer Implantation berücksichtigt werden muss, sind mögliche Limitationen für Implantate, die zu Komplikationen führen können. Hwang et al. fassen die Kontraindikationen für dentale Implantate zusammen (65,66):

Absolute Kontraindikationen	**Relative Kontraindikationen**
kürzlich aufgetretener Myokardinfarkt oder Schlaganfall	Adoleszenz und Altern
neuer Herzklappenersatz	Osteoporose
Immunsuppression	Rauchen
Hämostaseprobleme	Diabetes Mellitus
Aktive Krebsbehandlung	Positiver Interleukin-1 Genotyp
Drogenabusus	HIV-Infektion
Psychiatrische Erkrankungen	Herz-Kreislauf-Erkrankungen
Intravenöse Bisphosphonattherapie	Hypothyreose

Tabelle 9: Absolute und relative Kontraindikationen für (dentale) Implantate (aus (65,66))

6.1.2 AuNPs

Der Fortschritt in der Nanotechnologie, vor allem in den letzten zwei Dekaden, hat in der Biomedizin und damit auch für die Implantologie neue Möglichkeiten eröffnet. Es wird intensiv an nanostrukturierten und mit Nanopartikeln beschichteten Implantatoberflächen geforscht.

Da das Knochengewebe selbst etwa zur Hälfte aus Mineralien der Größe von 25 - 50 nm besteht, ist die Untersuchung von potenziell fördernden Eigenschaften durch Nanopartikel naheliegend (67). Die genauen Mechanismen mit denen AuNPs die Knochenregeneration antreibt sind noch nicht abschließend geklärt, basieren wohl aber auf Förderung der Osteoblastenaktivität und Hemmung der Osteoklasten (67). Nach Interaktion mit der Zellmembran, können AuNPs durch rezeptor-vermittelte Endozytose in die Progenitorzellen

aufgenommen werden, binden an zytoplasmatische Proteine und aktivieren den MAP-Kinase-Weg, der zu einer erhöhten Expression des RUNX2-Genes (Schlüsseltranskriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung) führt (67,68). Das führt in der Folge zur einer vermehrten Produktion weiterer Markerproteine wie Kollagen Typ-1 und BMP-2 und anschließend auch alkalischer Phosphatase und Osteocalcin (67,69,70). Im Gegensatz dazu wird der RANK/RANKL-System von AuNPs inhibiert und damit die Osteoklastenbildung gehemmt (71).

Obwohl Gold sich als Edelmetall grundsätzlich bioinert verhält, können bestimmte physikalische Charakteristiken und Beschichtungen bei AuNPs zytotoxische Eigenschaften auslösen (50). Das Review von Sani et al. (72) fasst die bisherigen Erkenntnisse zusammen:

1. AuNPs können in vitro und in vivo durch oxidativen Stress kontrollierten und unkontrollierten Zelltod auslösen.

2. In vivo reichern sich AuNPs bevorzugt in Milz, Leber und Nieren an, sodass diese Organe am ehesten bei hohen Konzentrationen zu Schaden kommen. In der Regel werden sie aber durch das retikuloendotheliale System rasch entsorgt.

3. AuNPs kleinerer Durchmesser scheinen aufgrund von besseren Zirkulationszeiten und Biodistribution schädlicher zu sein, ultrakleine Partikel können sogar die Blut-Hirn-Schranke passieren.

4. Beschichtung und Oberflächenladung können den Partikeln zytotoxische Eigenschaften verleihen.

5. Die bisherigen Studienergebnisse sind widersprüchlich, es gibt eine große Menge an Versuchen, auch an menschlichen Zelllinien, die keine Zytotoxizität nachweisen konnten.

Außerdem wird durch Chhour et al. (50) berichtet, dass AuNPs die Fähigkeit besitzen Änderungen am Zytoskelett zu vollziehen, ohne dass dies aber zytotoxisch wäre.

Insgesamt kann man, stand heute, davon ausgehen, dass AuNPs bei bedachtem Einsatz eine gute Biokompatibilität bei nur potenziell gering toxischen Eigenschaften besitzen.

6.2 Methoden

Zur Beurteilung der Biokompatibilität der Oberflächen wurden Zellkulturversuche mit Osteoblastenlinien (hOB) durchgeführt.

Die DIN-Norm DIN EN ISO 10993 mit dem Titel „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ dient der Zertifizierung von Medizinprodukten hinsichtlich ihrer Biokompatibilität. Sie beinhaltet 20 Unternormen, darunter zahlreiche Prüfungen und Tests zur Qualitätssicherung. Die klassische Reihenfolge dieser Tests sieht zuerst in-vitro Tests mit Zellkulturen, dann in-vivo Testungen in Tierversuchen und zuletzt klinische Studien am Menschen vor (32). Gemäß der ICH-Guidelines und des 3R-Prinzips, bei dem Tierversuche aus ethischen Gründen auf ein notwendiges Minimum reduziert werden sollten, wurden in dieser Studie Zellkulturversuche potenziellen tierexperimentellen Versuchen vorgezogen.

Bei den angewendeten Testverfahren handelt es sich um immunhistochemische BrdU- und MTT-Tests, mit deren Hilfe Zytotoxizität und Zellproliferation untersucht wurden. Es kamen Test-Kits zum Einsatz.

Sowohl der BrdU-, als auch der MTT-Test sind beides weit verbreitete und anerkannte Testverfahren (73,74). Durch den Einsatz der Test-Kits können auf unkomplizierte und schnelle Weise reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden und durch das Ermöglichen der vollständigen Versuchsdurchführung innerhalb der Mikrotiterplatten werden mögliche Fehlerquellen minimiert (75). Trotz seiner guten Sensitivität und allgemeinen Anerkennung, zeigten van Tonder et al. (76), dass der MTT-Test weniger genaue Ergebnisse in Hinblick auf die Ermittlung der realen Zellzahl im Vergleich zu drei anderen Testverfahren (NRU, RES, SRB) liefert.

Zusätzlich zu den immunologischen Tests wurden mit der Fluoreszenzmikroskopie (Färbung mit FDA und PI) und der Rasterelektronenmikroskopie bildgebende Verfahren angewandt. Dadurch gab es eine zusätzliche Zellvitalitätskontrolle mit besonderem Fokus auf die Zellmorphologie.

FDA wird seit Jahren als Fluoreszenzfarbstoff sowohl für Monolayer-, als auch für Suspensionskulturen eingesetzt (75). Tawakoli (77) stellte beim Vergleich unterschiedlicher Fluoreszenzfärbeverfahren heraus, dass die Kombination aus FDA und PI eine für Untersuchungen ausreichend lange Farbstabilität bei deutlicher Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen gewährleistet. Jones et al. (78) fassen treffend zusammen, dass die Doppelfärbung „eine schnelle, bequeme und zuverlässige Methode, um die Zelllebensfähigkeit zu bestimmen“ ist. Durch Weiterentwicklung wurden FDA-Derivate wie

Calcein-AM und BCECF-AM auf den Markt gebracht, die den Vorteil einer noch besseren Farbstabilität gegenüber des Ausgangsstoffes besitzen (75).

Der zusätzliche Einsatz der Rasterelektronenmikroskopie hat es ermöglicht sowohl die Testoberflächen, als auch die Zellen selbst mit höherer Schärfentiefe und Vergrößerung zu betrachten. Sie diente zudem als Gegenkontrolle zur Bestätigung der Ergebnisse unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Analyse bestimmter Details, wie die Ausbildung von Zell-zu-Oberflächen-Kontakten, wären ohne sie nicht möglich gewesen.

Die Untersuchungszeitpunkte wurden auf 12 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn festgelegt. Somit konnten Erkenntnisse für die anfängliche Phase der Osseointegration, die im lebenden Organismus dem Beginn der Geflechtknochenbildung entsprechen würde (s. Kap. 2.3.4), gewonnen werden. Für einen aussagekräftigen Erkenntnisgewinn aus der Mikroskopie wurde darauf geachtet keine zu späten Zeitpunkte auszuwählen, da die Ausbildung eines ausgeprägten Zellrasens diesen erschweren würde.

Eine Orientierung gaben vergleichbare Studien: Elkhidir et al (79) untersuchten mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten auf unterschiedlich präparierten Titanplatten (unter anderem auch mit AuNP-Beschichtung) ebenfalls mithilfe von Zellviabilitätstests, Immunfluoreszenzfärbung und Rasterelektronenmikroskopie nach 24 Stunden. Fujita et al (80) legten die Zeitpunkte nach 24 und 48 Stunden zur Auswertung potenzieller antiinflammatorischer Wirkung von AuNPs auf unterschiedlichen Metalloxidoberflächen fest. Dieselben Untersuchungszeitpunkte wurden in den Studien von Ko et al (81) und Heo et al (70) zur Bewertung von AuNP-beschichteten Oberflächen in vitro und in vivo (s.u) ausgewählt.

Für den weiteren Verlauf der Zellproliferation, der Biokompatibilität und des Osseointegrationsprozesses nach den 24 Stunden können anhand der Untersuchungen dieser Studie keine festen Erkenntnisse gewonnen werden, sondern lediglich Tendenzen.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Oberflächenanalyse

Die Au-TiO_2-Oberfläche wurde im DC-Magnetron-Sputter-Depositionsverfahren (für die TiO_2-Dünnschichten) und anschließender Photokatalyse (zur AuNP-Bildung) hergestellt.

TiO_2-Dünnschichten können durch nasschemische Abscheidungsverfahren (z.B Dip-Coating oder Spin-Coating), chemische Gasphasenabscheidung (CVD) oder physikalische Gasphasenabscheidung (PVD; die DC-Magnetron-Sputter-Deposition zählt dazu) hergestellt werden (82). Die nasschemischen Verfahren sind zwar kostengünstig und gut skalierbar, allerdings werden für stabile Ergebnisse Folgeverarbeitungsprozesse wie Trocknung und Glühen benötigt (83). Die Vorteile der CVD-Prozesse liegen in gut kontrollierbaren Ergebnissen hinsichtlich Dicke, Homogenität und Haftung (84), allerdings wird im Vergleich zu PVD-Verfahren auf deutlich höhere Temperaturen (400-900°C) erhitzt, was für einige technische Anwendungen und Substrate problematisch sein kann (85). Darüber hinaus gibt es Berichte über Korrosionsprobleme, welche den Umgang und die Lagerung mit den Materialien erschwert (86).

PVD-Verfahren sind immer beliebter geworden, da sie weniger limitiert und günstiger sind (87). Dazu zählen die thermische Verdampfung, Lichtbogenverdampfung, Sputtern, Ionen- oder Elektronenstrahlverdampfung. Die wachsenden Folien werden nach und nach mit energiereichen Partikeln beschossen und erzielen eine hohe Dichte und Homogenität (88). DC-Magnetron-Sputtern eignet sich als Verfahren besonders aus drei Gründen:

1. Sehr hochwertige TiO_2-Folien

2. Arbeiten bei niedrigen Temperaturen

3. Eignung zur großflächigen industriellen Abscheidung (83).

Zur Herstellung von Gold-TiO_2-Hybridstrukturen gibt es einige verschiedene technische Ansätze, wie die kontrollierte Fällung, Imprägnierung, chemische Reduktion oder Elektrodeposition (89). Die Vorteile der Photokatalyse liegen in der Einfachheit des Prozesses, dem Verzicht auf umweltschädliche Tenside oder Stabilisatoren und der vollständigen Kontrolle der Partikelgröße und -morphologie durch Einstellung der photokatalytischen Aktivität des TiO_2-Targets, UV-Licht-Intensität und Bestrahlungszeit (60,90).

Vahl et al. (83) untersuchten in ihrer Studie unter anderem auch eine Au-TiO_2-Oberfläche, die mit dem gleichen Prozess hergestellt wurde und machten folgende Feststellungen:

- Die TiO_2-Dünnschicht bietet eine hohe Stabilität und die oberflächliche Nanopartikelschicht verbessert die photokatalytische Aktivität.

- Edelmetalle (wie Gold) weisen bessere Lichtadsorptionseigenschaften und Stabilität im Vergleich zu Nichtedelmetallen auf.

- Gold-Nanopartikel können große Absorptions- und Streuquerschnitte aufgrund von intensiven elektromagnetischen Feldern an der nanoskaligen Umgebung ihrer Oberfläche erzeugen und steigern somit die Lichtabsorption. Dieser Effekt wird als LSPR bezeichnet (lokalisierte Oberflächenplasmonen).

- Nanocracks (s.o) vergrößern nicht nur die Oberfläche, sondern auch die photokatalytische Aktivität.

Chen et al. (91) zeigten die signifikante Verbesserung der Photokatalyse durch AuNPs auf TiO_2 mithilfe von UV-Vis-Spektroskopie-Messungen und Photostrommessungen. Die Lichtabsorption steigt mit zunehmender Dicke der Nanopartikelschicht an der Oberfläche. Pal et al. (92) untersuchten TiO_2-Nanopartikel mit diversen Beschichtungen. Anhand einer Reihe von Messungen wurde festgestellt, dass AuNPs in Hinblick auf photokatalytische Aktivität eine bessere Performance als reines oder andersartig beschichtetes TiO_2 an den Tag legte. Die AuNPs dieser Studie hatten einen Durchmesser von 4,4 - 6.9 nm und lagen damit in einer ähnlichen Größenordnung mit denen von uns verwendeten Partikeln.

In unserer Studie wurden Kontaktwinkelmessungen durchgeführt. Die Kontroll- und TiO_2-Oberfläche zeigten jeweils Ergebnisse im hydrophilen Bereich (CA: 70 ± 3° respektive 63 ± 2°). Bei der Au-TiO_2-Oberfläche konnte eine Superhydrophilie festgestellt werden (CA < 5°).

Mekayarajjananonth et al. (93) führten umfängliche Kontaktwinkelmessungen auf Reintitan- und Titanlegierungsoberflächen (Ti-6Al-4V) durch. Die durchschnittlichen Ergebnisse der Reintitanoberflächen lagen bei 63,78° und damit im selben Bereich wie unsere Messungen. Pereira-Silva et al. (94) untersuchten Au-TiO_2 als potenzielle Biosensoren und führten unter anderem Kontaktwinkelmessungen an den Dünnschichten durch. Nach O_2-Behandlung wurden annähernd superhydrophile Kontaktwinkel von 7° erreicht, ohne O_2 lagen die Messwerte bei immer noch stark hydrophilen 29 ± 4°.

Breuch et al. (95) stellten Aluminiumplatten her, die mit TiO_2 und AuNPs beschichtet wurden. Kontaktwinkelmessungen zeigten, dass eine Superhydrophilie der Materialoberflächen durch diese Beschichtung erzielt werden konnte (CA: 6 ± 3°); ohne diese lagen die Messwerte für unbehandeltes Aluminium mit 89 ± 6° zum Teil sogar im hydrophoben Bereich.

Abschließend lässt die bisherige Studienlage den Rückschluss zu, dass die Beschichtung von TiO_2 mit AuNPs die photokatalytische Aktivität und die Benetzbarkeit der Oberfläche erhöht. Diese Erkenntnisse stimmen mit dem Wenzel-Modell überein: Durch steigende Rauigkeit einer feinstrukturierten hydrophilen Oberfläche, kann eine noch stärkere Hydrophilität erzielt werden (96).

6.3.2 Ti(O_2)

Die TiO_2-Oberfläche zeigte in den BrdU- und MTT-Tests keine Zytotoxizität. Diese Erkenntnis wurde durch die Laserfluoreszenzmikroskopie bestätigt. Die REM-Aufnahmen zeigten zudem eine reguläre Osteoblastenmorphologie mit Ausbildung von Filopodien und Zell-zu-Zellkontakten.

Die Biokompatibilität von Titan und seiner Oberfläche ist unbestritten. Nach über 55 Jahren Erfahrung in der (dentalen) Implantologie stellt sie den heutigen Goldstandard dar. Dennoch wurde diese Oberfläche in unserer Studie, vor allem als Vergleich für die neuartige Au-TiO_2-Oberfläche und zur besseren Einordnung der Testergebnisse, mituntersucht. Deshalb soll im Folgenden ein Überblick über die aktuelle Studienlage zu Titanimplantaten diskutiert werden:

Die ersten Implantate nach Brånemark hatten eine maschinierte Oberfläche mit geringer Rauigkeit (0,5 - 1µm) und waren lange Zeit der Goldstandard, bis erste Studien mit Titan-Plasma-Spray beschichteten Oberflächen größerer Rauheit gemacht und bessere BIC-Werte festgestellt wurden (97).

Als nächstes kamen sandgestrahlte Implantate auf den Markt; diese waren z.T auch zusätzlich säuregeätzt oder HA-beschichtet. Der Vergleich dieser Oberflächen untereinander durch Buser et al. (98) mit Implantaten, die bei Minischweinen eingesetzt wurden (Auswertung nach 3 und 6 Wochen), zeigte exzellente und in etwa gleichwertig gute Ergebnisse für die SLA (50 - 60%) und HA-beschichteten Oberflächen (60 - 70%), gefolgt von den nur sandgestrahlten mit grober Körnung und TPS-Oberflächen (30 - 40%), gefolgt von den nur sandgestrahlten mittlerer Korngrößen und polierten Implantaten (25 - 30%). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HA-Beschichtung konstante Anzeichen von Resorption bzw. Delamination aufwies, was vermutlich an der Dicke und unzureichenden Haftung dieser Schicht liegt (26,98). Die Erkenntnisse dieser Studie gelten weitestgehend bis heute; die SLA-Oberfläche ist als der moderne Goldstandard anzusehen.

Eine andere vielversprechende Methode, die anodische Oxidation, zeigt ebenfalls eine starke Implantat-Knochen-Verbindung, allerdings fehlen derzeit noch belastbare klinische Langzeitvergleichsstudien zu SLA; gegenüber der maschinierten Oberfläche konnte eine deutliche Überlegenheit in-vitro und in-vivo aufgezeigt werden (29,99).

Die neuesten Entwicklungen gehen in Richtung chemischer Modifizierung der mikrorauen Oberflächen; Hydrophilisierung und biologische Aktivierung stehen dabei im Vordergrund (29). Hydrophile Oberflächen zeigten dabei in-vitro verschiedene positive Effekte (für Hart- und Weichgewebe) auf unterschiedliche Zellen in der initialen Wundheilungsphase und in-vivo eine Beschleunigung der Osseointegration in der frühen Einheilphase, aber ohne dass in der Folge des Gesamtprozesses signifikante Vorteile erkennbar wären (30). Bei den verschiedenen biologischen Modifizierungsansätzen gibt es zum Teil beeindruckende experimentelle Ergebnisse, jedoch fehlt bis dato der Nachweis von klinischer Wirksamkeit (24,29).

Eine Vergleichsstudie in Miniaturschweinen von Saulacic et al (100) verglich cp-Titan mit den Legierungen TiZr und Ti-6Al-4V in Hinblick auf Osseointegrationsdauer und Knochen-Implantat-Kontakt. Die Werte für TiZr und cp-Titan waren vergleichbar gut, eine interessante Erkenntnis war aber, dass die Ti-6Al-4V-Implantate signifikant langsamer osseointegrierten und schlechtere BIC-Werte aufwiesen. Darüber hinaus wurde ein deutlich vermehrtes Vorkommen von Fremdkörperriesenzellen (s.o) auf dieser Oberfläche beobachtet; diese Tatsache alleine lässt aber keine Prognose über die Langzeitüberlebensdauer zu (29).

In Kapitel 6.1.1 wurde bereits über mögliche Limitationen, Komplikationen und Optimierungspotenzial von Ti(O_2) diskutiert.

6.3.3 Au-TiO_2 und (Gold-)Nanopartikel

In den BrdU- und MTT-Tests erzielte die Au-TiO_2-Oberfläche die besten Ergebnisse hinsichtlich Zellproliferation und -viabilität. Dass der Anstieg der Werte von 12 auf 24 Stunden in beiden Versuchen für die Au-TiO_2-Gruppe statistisch nicht signifikant war, wird damit zusammenhängen, dass der Platz in den Platten begrenzt war. Da nach 12 Stunden die Zellpopulation für diese Gruppe jeweils deutlich höher war, war eine adäquate Ernährung und Vermehrung nicht mehr gewährleistet.

Die Mikroskopie zeigte, dass die Anzahl und Länge der Filopodien und Zell-zu-Zell-Kontakte im Vergleich zu TiO_2 wesentlich größer waren. Auch die Zellform erschien deutlich regelmäßiger im Vergleich. Darüber hinaus konnten Zell-zu-Oberflächen-Kontakte ausgebildet werden. Das Ermöglichen einer Interaktion zwischen Osteoblasten und der AuNPs könnte ein entscheidender Hinweis dafür sein, dass durch diese Beschichtung eine Bioaktivität erzielt werden konnte.

Ein Einblick in die bisherigen Erfahrungen mit nanostrukturierten Titanimplantatoberflächen aus dem Bereich der Zahnmedizin, wo die Anwendung bereits seit einigen Jahren erfolgt, hilft bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Studie. Diese Implantate haben alle eine

mikroskalige Grundtextur gemeinsam, in die diese Strukturen hierarchisch hineinplatziert werden (24).

Die NanoTite™-Oberfläche wird von zwei verschiedenen Herstellern (Bicon LLC, Boston, USA und Biomet 3i, Palm Beach Gardens, USA) genutzt und weist eine Calciumphosphat-Beschichtung auf. Obwohl der Name gleich ist, sind die zugrunde liegenden Herstellungsprozesse unterschiedlich. Bicon verwendet eine moderat mikroraue Oberfläche, die durch kombiniertes Sandstrahlen und Säureätzen erzeugt wird, anschließend erfolgt die Platzierung der Calciumphosphat-Partikel mit einem Durchmesser von 20 - 50 nm per ionenstrahlgestützter Deposition (IBAD) (s.o.) (24). Biomet 3i weist eine säuregeätzte Oberfläche auf, die dann durch ein Sol-Gel-Verfahren, die diskrete kristalline Deposition (DCD), behandelt wird (s.o) (24). Die OsseoSpeed™-Implantate (Astra Tech, AB, Mölndal, Sweden) werden zuerst mit TiO_2 bestrahlt und anschließend mit Flusssäure modifiziert, dabei entstehen 50 – 100 nm große Titanoxidpartikel (24,46). Beim Implantatsystem OSSEAN™ der Firma Intra-Lock International (Boca Raton, FL, USA) wird ein Verfahren mit robotischer Mikrobestrahlung angewandt; es bildet sich eine nanoskalige Textur innerhalb der mikrorauhen Oberfläche (24).

Es gibt eine ganze Reihe von Laboruntersuchungen und tierexperimentellen Versuchen für diese Implantate. Die Ergebnisse der Versuche mit Zellkulturen zeigten relativ einheitlich gute Ergebnisse für die nanoskaligen Oberflächen (24). Während für die IBAD-Implantate gemischte Ergebnisse erzielt wurden (101–103) und es für die DCD-Oberfläche keine passende Untersuchung gibt, konnten für OsseoSpeed (104–107) und OSSEAN (101) klare Vorteile in Bezug auf Zellverhalten und den Osseointegrationsprozess gezeigt werden (24). Es muss beachtet werden, dass diese Erkenntnisse überwiegend durch Vergleiche mit den Vorgängerimplantatsystemen gewonnen wurden und die Studien meistens durch die Hersteller selbst durchgeführt worden sind; diese Aspekte könnten ihre Aussagekraft limitieren.

In-vivo wurden die positiven Tendenzen bestätigt. Für die IBAD-Oberfläche konnte eine biologische, mechanische und histologische Überlegenheit gegenüber Implantaten ohne Beschichtung festgestellt werden (24,108,109) und auch die DCD-Beschichtung lieferte gute Ergebnisse in Vergleichsstudien mit Mikrotexturen (24,110–112). Osseospeed und OSSEAN bestätigten ihre positiven Eigenschaften mit verbesserten BIC-Werten, begünstigter Knochenanlagerung, schnellerer Osseointegration und vermehrtem Erhalt von marginalem Knochen (24,113–117).

Klinische 10-Jahres-Überlebensdaten für dentale Implantate mit nanostrukturierten Oberflächen zeigen Erfolge von über 95% (118). Von Wennerberg et al. (24) wird aber

zurecht ausdrücklich darauf hingewiesen, dass man den Erfolg nicht so einfach Nanostrukturen allein zuschreiben kann, denn es liegen immer auch Kombinationen mit weiteren Oberflächencharakteristiken vor. Wie bereits dargestellt, verändern Nanostrukturen nicht nur die Topographie, sondern auch die physikochemischen Eigenschaften.

Da die Au-TiO_2-Oberfläche noch nicht klinisch angewandt wird, können nur in-vitro-Studien und in-vivo-Tierversuche zur Bewertung herangezogen werden.

Paradowska et al. (119) modifizierten TiO_2-Nanoröhren mit AuNPs und verbesserten damit den Elektronentransfer, die Korrosionsresistenz und Proteinadsorption. Die Stabilität und Bindung von Rinderserumalbumin wurde vor allem durch AuNPs kleiner Durchmesser gefördert. Brewer et al. (120) machten in ihrer Studie ähnliche Beobachtungen hinsichtlich der Proteinbindung. Diese Erkenntnisse könnten, bei allgemeiner Gültigkeit für Proteine, besonders interessant für die initiale Osseointegrationsphase sein (s.o).

Die Forschungsgruppe um Ko et al. (81) bewertete die Osseointegration von mit AuNP-Doppellayern beschichteten Titanimplantaten. Wie in unserer Studie wurden in-vitro (hier mit MSCs) Zellviabilitätstests und mikroskopische Untersuchungen inklusive Fluoreszenzfärbung durchgeführt und mit TiO_2 und TiHA verglichen; auch hier zeigten die AuNP-beschichteten Oberflächen zu allen Kontrollzeitpunkten die besten Ergebnisse. Darüber hinaus wurden Gentests (mit COL1, Runx2 und OPN) durchgeführt, mit der Erkenntnis, dass die osseogene Differenzierung der MSCs für Au-TiO_2 im Vergleich verbessert wurde. In-vivo wurden bei Kaninchen Wirbelsäulen-Pedikelschrauben mit den entsprechenden Beschichtungen implantiert, wobei BIC-Messungen signifikant bessere Ergebnisse für die Au-Beschichtung im Vergleich zur HA-Beschichtung zeigten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich bei der Implantation kaum AuNPs von der Oberfläche gelöst haben; ein Phänomen, welches bei HA dagegen häufig beobachtet wurde (s.o).

Heo et al. (70) verwendeten ebenfalls eine Au-TiO_2-Oberfläche und testeten in-vitro das Verhalten von adipösen mesenchymalen Stammzellen (ADSCs) und in-vivo durch Implantation bei Kaninchen. Zellviabilitätstests zeigten zu allen Zeitpunkten die besten Proliferationsraten für Au-TiO_2 (als Vergleich wurden Ti und TiOH verwendet), in der Laserfluoreszenzmikroskopie waren nach 24 und 48 Stunden fast keine toten Zellen sichtbar und bei den PCR-Tests zur Ermittlung der Genexpression (von COL1, Runx2, OCN und BSP) zeigte die Oberfläche die besten Messwerte. In-vivo konnte durch Knochendichtemessungen und Messungen weiterer knochenspezifischer Parameter ein signifikanter Einfluss auf die Bildung der knöchernen Oberfläche festgestellt werden.

Elkhidir et al. (79) kreierten eine neue mit simulierten Körperflüssigkeiten bearbeitete und UV-Licht-bestrahlte Au-TiO_2-Oberfläche. Die Knochenmark-Stammzellen stammten von

Ratten und wurden mittels Zellviabilitätstests, Laserfluoreszenz- und Rasterelektronenmikroskopie nach 24 Stunden untersucht. Die Ergebnisse attestierten ein bemerkenswertes osseogenes Potenzial und eine herausragende Biokompatibilität und Non-Toxizität. Auch bei dieser Studie wurde bei der REM eine deutliche Filopodienmehrbildung auf Au-TiO_2 im Vergleich zu TiO_2 festgestellt.

Als vielversprechende Lösung für Osteoporosepatienten präsentierten Takanche et al. (121) eine Chitosan-Au-TiO_2-Oberfläche, die zusätzlich mit einem Transkriptionsfaktor (c-myb) versehen wurde, der die Knochenbildung unterstützt.

Entsprechende Implantate wurden bei ovarektomierten Ratten mit Osteoporose eingesetzt und mit Erfolg getestet: Die Osseogenese konnte gefördert (erhöhte c-myb-Expression und Hochregulation von BMPs, OPG und EphB4), Knochenabbauprozesse gehemmt (Herabregulation von RANKL) und Knochenvolumen und -dichte ebenfalls erhöht werden. Als eine der wenigen vergleichbaren Studien verwendeten Suarasan et al. (122) Osteoblasten um die Wirkung von AuNPs zu untersuchen. Sie ermittelten unter anderem mithilfe von MTT-Tests, dass die Zellproliferation von Osteoblasten gesteigert werden konnte.

Fujita et al. (80) untersuchten die Wirkung von Au-TiO_2 und anderen Au-Metalloxidoberflächen auf Viabilität, phagozytotische Aktivität und das Entzündungsprofil (TNF-α und IL-1β-Sekretion) muriner Makrophagen und wiesen durch die Messung einer signifikanten Verringerung der Zytokine eine entzündungshemmende Wirkung der Au-TiO_2-Beschichtung nach, ohne Beeinflussung der Vitalität oder phagozytotischen Aktivität der Makrophagen. Die durchgeführten MTT-Tests zeigten beim Vergleich von Au-TiO_2 und TiO_2 keine Zytotoxizität bei nicht-signifikanten Unterschieden, ähnlich wie in unserer Studie bei den Osteoblasten.

Die Ergebnisse unserer Studie stimmen mit denen der Literatur überein. Ein Vorteil, den man für unsere Untersuchung herausstellen sollte, ist, dass wir eine in Hinblick auf biologische, sowie technische Eigenschaften verbesserte Au-TiO_2-Oberfläche inklusive eines kostengünstigen, unkomplizierten, umweltfreundlichen und aus industrieller Sicht interessanten Herstellungsprozesses vorgestellt haben.

In der Literatur gibt es lediglich einen Punkt, der mit Skepsis betrachtet wird. Der hohe Preis von Gold limitiert den breitflächigen Einsatz; Vahl et al. (83) heben zum Beispiel deshalb Nanopartikel aus Silber (AgNPs) als beliebtestes Untersuchungsmaterial für derartige Beschichtungen heraus. Es ist jedoch fraglich ob gleichwertige Ergebnisse mit AgNPs erzielt werden können; es bestehen im Vergleich größere Probleme bei der Kontrolle von Partikelgröße und -geometrie im Herstellungsprozess und bei der Verteilung auf der

Oberfläche (123). Auch aufgrund der Tatsache, dass Silber über einen längeren Zeitraum die Tendenz zur Oxidation zeigt, schlussfolgert Vahl dann doch, dass AuNPs als stabilere Partikel in entsprechenden Anwendungen vorgezogen werden sollen. AuNPs haben ein einzigartiges Eigenschaftsprofil, zu dem es, Stand heute, keine 1:1 gleichwertige Alternative gibt.

6.4 Ausblick

Für Patienten bei denen eine Implantation aufgrund von Risikofaktoren und -erkrankungen wie Osteoporose oder Diabetes heute schwierig ist, ist es besonders wichtig den Prozess der Osseointegration zu beschleunigen und zu optimieren (81,124). Auch gesunde Patienten haben Erwartungen an einer Behandlung, unter anderem die vollständige Wiederherstellung von Funktion und auch Ästhetik, eine kostengünstige, schnelle und schmerzfreie Behandlung mit kurzen Heilungsphasen und eine Langlebigkeit der Implantate.

Die Interessen decken sich mit denen des Operateurs, der vor allem eine effiziente und (langfristig) möglichst komplikationslose Behandlung und zufriedene Patienten wünscht. Eine Einengung des Kreises der o.g Limitationen, die eine Versorgung von mehr Patienten ermöglichen würde, dürfte ebenfalls in beidseitigem Interesse sein. Das Erreichen dieser Ziele sind wesentliche Herausforderungen für die Zukunft.

Es gibt Grund zur Hoffnung, dass Modifikationen und Beschichtungen von Titanoberflächen die bereits erwähnten Schwachstellen beseitigen könnten; diverse Versuche zeigen, dass eine Verringerung des Elastizitätsmoduls und die Erhöhung der Verschleißbeständigkeit möglich ist (10) und auch die Bioaktivierung und Verbesserung der Biokompatibilität des eigentlich bioinerten Metalles kann erzielt werden (s.o).

Dabei sind, aufgrund ihrer zahlreichen förderlichen Eigenschaften, insbesondere für das Knochengewebe und die Osseointegration, AuNPs als Beschichtung für Titanimplantate besonders attraktiv. Obwohl die Studienlage, stand heute, insgesamt noch etwas dünn ist, so konnte bereits, sowohl an verschiedenen reifen Zellen als auch unreifen Stammzellen, gezeigt werden, dass Zellviabilität und -proliferation, Proteinabsorption, antiinflammatorische Effekte und eine Förderung der Knochenbildung, sowie Hemmung des Knochenabbaus zu den Stärken einer solchen Oberfläche zählen. Eine Bioaktivierung kann so ermöglicht werden, in der Literatur wird zum Teil schon davon gesprochen, dass die Beschichtung mit AuNPs die Entwicklung der bestmöglichen Plattform für Biosensing erlaubt (119).

Es gibt erste Tierversuche mit entsprechend beschichteten Implantaten, die ebenfalls vielversprechende Ergebnisse mit guten BIC- und Knochenparameterwerten geliefert haben. Genau dort muss von Forschungsseite angeknüpft werden: Es werden weitere in-vitro und

in-vivo Studien benötigt, um die bisherigen Erkenntnisse zu bestätigen. Die Untersuchung von weiteren relevanten Zelltypen wie Osteoklasten oder Fibroblasten und auch von Mikroorganismen wie Bakterien auf dieser Oberfläche wäre von besonderem Interesse, um umfänglichere Prognosen über die Osseointegration und Biokompatibilität treffen zu können.

Der logische nächste Schritt wären neue Tierversuche und vor allem längere Untersuchungszeiträume. Über die initiale Osseointegration konnten durch Studien wie unsere bereits viele Informationen gewonnen werden, aber die Datenlage für die darauffolgenden Phasen ist noch sehr dünn. Es gilt abzuklären ob eventuelle Spätkomplikationen auftreten können; gerade bei aufwändigen Beschichtungen muss eine Delamination ausgeschlossen werden. Interessant wären auch Messungen von lokalen AuNP-Konzentrationen im Gewebe, um Akkumulationen auszuschließen bzw. potenzielle Gewebstoxizität zu überprüfen.

Zu guter Letzt müssten klinische Studien an Patienten durchgeführt werden. In diesen würde man erst endgültige Aussagen treffen können. Besonders die Fragen um die Anwendbarkeit bei vorerkrankten Patienten, potenzielle Sofort-/Frühbelastung oder verkürzte Einheilzeiten dieser Implantate im Knochen könnten dann genauer untersucht werden. Bis dahin bleiben die Schlussfolgerungen aus den bisherigen Studien schwierig zu bewerten; eine Vorhersage zur klinischen Leistung der AuNP-Oberfläche ebenso.

7. Zusammenfassung

Sowohl in der Medizin, als auch in der Zahnmedizin ist Titan, seit seiner Einführung als Biomaterial vor über 50 Jahren, in den meisten Fällen der Implantatwerkstoff der ersten Wahl. Eine einzigartige Kombination aus vorteilhaften mechanischen Eigenschaften (geringes Molekulargewicht, hohe Streckgrenze, Druck- und Dauerfestigkeit) und aus biologischer Sicht herausragende Biokompatibilität und Korrosionsbeständigkeit sind die Hauptvorteile gegenüber alternativen Materialien. Dennoch gibt es Spielraum für Verbesserungen bei den Festigkeits- und Steifigkeitswerten und vor allem beim Elastizitätsmodul im Vergleich zu Knochen. Es wäre außerdem wünschenswert, wenn eine Bioaktivität der Oberfläche und eine Einengung des Kreises der Kontraindikationen erreicht werden könnte. Deshalb wird intensiv an der Optimierung der Titanoberfläche geforscht.

Die Nanotechnologie eröffnet dabei neue Möglichkeiten der Oberflächenbeschichtung. Goldnanopartikel (AuNPs) werden bereits in unterschiedlichen Feldern der Medizin eingesetzt und haben eine Reihe von Vorteilen, insbesondere eine gute Zellaufnahme, Biokompatibilität und osseogenes Potenzial.

Wir haben deshalb eine Au-TiO_2-Oberfläche hergestellt. Dazu wurden TiO_2-Dünnschichten per DC-Magnetron-Sputter-Deposition auf Titanplatten erzeugt und anschließend AuNPs mithilfe von Photokatalyse auf die Oberfläche platziert. Zum Vergleich wurde eine konventionelle TiO_2-Oberfläche und eine Kontrolle aus Glas verwendet. Die Oberflächen wurde durch REM topographisch und durch statische und dynamische Kontaktwinkelmessungen auf ihre Benetzungseigenschaften getestet.

Osteoblastenkulturen (hOB) wurden auf den Platten kultiviert. Es wurden MTT- (für Zellviabilität) und BrdU- (für Zellproliferation) Tests durchgeführt, sowie Laserfluoreszenzmikroskopie (FDA/PI-Färbung) und REM zur Beurteilung der Biokompatibilität und Zellmorphologie. Untersuchungszeitpunkte wurden auf 12 und 24 Stunden festgelegt.

Die Oberflächenanalyse zeigte eine säulenartige Kornstruktur, die durch Nanocracks begrenzt werden. Die AuNPs zeigen in der Gesamtbetrachtung eine blütenartige Struktur (Durchmesser: 2 - 5 µm). Diese Mikrostrukturen bestehen wiederum eindeutig aus kleineren übereinander gelagerten Unterstrukturen mit Durchmessern im Nanometerbereich. Optisch ähnelt die Formation der von Kiefernzapfen. Kontaktwinkelmessungen attestierten dem TiO_2 eine Hydrophilität und dem Au-TiO_2 sogar eine Superhydrophilität mit CA <5°.

Die TiO_2-Oberfläche wies in den BrdU- und MTT-Tests keine Zytotoxizität auf. Diese Erkenntnis wurde durch die Laserfluoreszenzmikroskopie bestätigt. REM-Aufnahmen zeigten

zudem eine reguläre Osteoblastenmorphologie mit Ausbildung von Filopodien und Zell-zu-Zellkontakten.

Die Au-TiO_2-Oberfläche erzielte die besten Ergebnisse hinsichtlich Zellproliferation und -viabilität. Mikroskopische Bilder zeigten außerdem, dass die Anzahl und Länge der Filopodien, Membranaustülpungen und Zell-zu-Zell-Kontakte im Vergleich zu TiO_2 wesentlich größer waren. Auch die Zellform erschien deutlich regelmäßiger im Vergleich. Darüber hinaus konnten Zell-zu-Oberflächen-Kontakte ausgebildet werden, ein Hinweis auf Bioaktivität.

Die Ergebnisse dieser Studie stimmen mit denen der Literatur weitestgehend überein. Wir haben eine in vielerlei Hinsicht verbesserte, bioaktive Titan-Oberfläche inklusive einer „Anleitung“ für einen einfachen, günstigen und ökologischen Herstellungsprozesses vorgestellt. Die einzige in der Literatur erwähnte und relevante Problematik sind die hohen Kosten für das Material Gold.

Es werden weitere in-vitro Studien, auch mit verschiedenen Zelltypen, zur Bestätigung der Ergebnisse benötigt und vor allem in-vivo Tierversuche und letztendlich klinische Studien am Menschen, um den tatsächlichen Nutzen und Mehrwert gegenüber dem Goldstandard TiO_2 zu ermitteln. Profitieren könnten insbesondere Patienten mit, aufgrund von relevanten Vorerkrankungen wie Osteoporose oder Diabetes, kompromittierter Ausgangssituation. Das Potenzial zur Verkürzung von Osseointegrationszeiten und Möglichkeiten zur schnelleren Implantatbelastung würden allen Patienten und Behandlern zugutekommen.

8.Literaturverzeichnis

1. Endoprothesenregister Deutschland EPRD, Hrsg. Jahresbericht 2019; 10/2019.
2. Deutsche Gesellschaft für Implantologie DGI, Hrsg. Zahnimplantate sind für Patienten zunehmend erste Wahl: 1,3 Millionen werden in Deutschland pro Jahr gesetzt; 11/2018.
3. Marin E, Boschetto F, Pezzotti G. Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. J Biomed Mater Res A 2020; 108(8):1617–33.
4. Peters M, Leyens C., Hrsg. Titan und Titanlegierungen. 3. Aufl. Weinheim: WILEY-VCH; 2002.
5. Planell JA, Hrsg. Bone Repair Biomaterials. Oxford, Cambridge, New Delhi: Woodhead Publishing Limited; 2009.
6. Niinomi M. Metallic biomaterials. J Artif Organs 2008; 11(3):105–10.
7. Shah FA, Trobos M, Thomsen P, Palmquist A. Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants - Is one truly better than the other? Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2016; 62:960–6.
8. Peters M, Clemens H. Titan, Titanlegierungen und Titanaluminide – Basis für innovative Anwendungen. Berg- und Hüttenmännische Monatshefte 2010; (9).
9. Donachie MJ. Titanium a technical guide. 2. Aufl. Materials Park Ohio: ASM International; 2000.
10. Kaur M, Singh K. Review on titanium and titanium based alloys as biomaterials for orthopaedic applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 2019; 102:844–62.
11. Koike M, Greer P, Owen K, Lilly G, Murr LE, Gaytan SM et al. Evaluation of Titanium Alloys Fabricated Using Rapid Prototyping Technologies-Electron Beam Melting and Laser Beam Melting. Materials (Basel) 2011; 4(10):1776–92.
12. Ress NB, Chou BJ, Renne RA, Dill JA, Miller RA, Roycroft JH et al. Carcinogenicity of inhaled vanadium pentoxide in F344/N rats and B6C3F1 mice. Toxicol Sci. 2003; 74(2):287–96.
13. Moretti B, Pesce V, Maccagnano G, Vicenti G, Lovreglio P, Soleo L et al. Peripheral neuropathy after hip replacement failure: Is vanadium the culprit? Lancet 2012; 379(9826):1676.
14. Kobayashi E, Wang TJ, Doi H, Yoneyama T, Hamanaka H. Mechanical properties and corrosion resistance of Ti-6Al-7Nb alloy dental castings. Mater Sci Mater Med 1998; (9):567–74.
15. Shaw CA, Petrik MS. Aluminum hydroxide injections lead to motor deficits and motor neuron degeneration. J Inorg Biochem 2009; 103(11):1555–62.
16. Flaten TP. Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, withemphasis on drinking water. Brain Res. Bull. 2001; 55(2):187–96.
17. Jeffery E, Abreo K, Burgess E, Cannata J, Greger J. Systemic aluminum toxicity: Effects on bone, hematopoietic tissue, and kidney. J Toxicol Environ Health 1996; 48(6):649–65.
18. Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. Biomaterials 2001; 22(11):1253–62.
19. Wang K. The use of titanium for medical applications in the USA. Materials science & engineering A 1996; 213:134–7.

20. Niinomi M. Mechanical properties of biomedical titanium alloys. Materials science & engineering A234 1998:231–6.

21. Shen X, Shukla P, Nath S, Lawrence J. Improvement in mechanical properties of titanium alloy (Ti-6Al-7Nb) subject to multiple laser shock peening. Surface and Coatings Technology 2017; 327:101–9.

22. thyssenkrupp Materials Schweiz AG, Hrsg. Werkstoffdatenblatt Titan 6Al4V "ELI"; 2019.

23. thyssenkrupp Materials Schweiz AG, Hrsg. Werkstoffdatenblatt Titan Grade 2; 2019.

24. Wennerberg A, Albrektsson T, Jimbo R, Hrsg. Implant Surfaces and their Biological and Clinical Impact: Springer; 2015.

25. Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NHJ. Implant Surface Roughness and Bone Healing: a Systematic Review. J Dent Res. 2006; 85(6):496–500.

26. Annunziata M GL. The Effect of Titanium Surface Modifications on Dental Implant Osseointegration. Front Oral Biol. 2015; 17:62–77.

27. Wennerberg A, Svanborg LM, Berner S, Andersson M. Spontaneously formed nanostructures on titanium surfaces. Clin Oral Implants Res 2013; 24(2):203–9.

28. Adam M. Nanostrukturierte Beschichtung auf Implantaten zur Erhöhung der Osseointegration [Wiss. Dissertation]. Rostock; 2013.

29. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. Periodontol 2000 2017; 73(1):22–40.

30. Bosch G, Stübinger S, Rücker M, Stadlinger B. Hydrophile Implantatoberflächen: Ein Update in Klinik und Forschung. Swiss Dent J 2018; 128(1):33–9.

31. Williams DF, Hrsg. Definitions in biomaterials. Amsterdam: Elsevier Science Limited; 1987. (Progress in Biomedical Engineering; Bd. 4).

32. Wintermantel E, Ha SW, Hrsg. Medizintechnik: Life Science Engineering. 5. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2009.

33. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. J Am. Ceram. Soc. 1991; 74(7):1487–510.

34. Brunette DM et al., Hrsg. Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications: Springer Science & Business Media; 2012.

35. Niinomi M. Recent Metallic Materials for Biomedical Applications. Metall and Mat Trans A 2002; 33(3):477–86.

36. Fage SW, Muris J, Jakobsen SS, Thyssen JP. Titanium: A review on exposure, release, penetration, allergy, epidemiology, and clinical reactivity. Contact Dermatitis 2016:323–45.

37. Wertz PW, Cox PS, Squier CA, Downing DT. Lipids of Epidermis and keratinized and non-keratinized oral epithelia. Comp. Biochem. Physiol. 1986; 83(3):529–31.

38. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal Sensitivity in Patients with Orthopaedic Implants. J Bone Joint Surg Am. 2001; 83(3):428–36.

39. Keller JC, Stanford CM, Wightman JP, Draughn RA, Zaharias R. Characterizations of titanium implant surfaces. III. J Biomed Mater Res 1994; 28(8):939–46.

40. Williams DF. Electrochemical aspects of corrosion in the physiological environment. Fundamental aspects of biocompatibility 1981; 1:11–42.

41. Ranjan S, Dasgupta N, Sudandiradoss C, Ramalingam C, Kumar A. Titanium dioxide nanoparticle-protein interaction explained by docking approach. Int J Nanomedicine 2018; 13(T-NANO 2014 Abstracts):47–50. doi: 10.2147/IJN.S125008.

42. Listgarten MA, Lang NP, Schroeder HE, Schroeder A. Periodontal tissues and their counterparts around endosseous implants. Clin Oral Implants Res Jul- Sep 1991; 2(1):1–19.

43. Schenk RK BD. Osseointegration: a reality. Periodontol 2000 1998 Jun; 17:22–35.

44. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 5. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2015.

45. Elias CN ML. Improving osseointegration of dental implants. Expert Rev Med devices 2010; 7(2):241–56.

46. Mendonça G, Mendonça DB, Aragão FJ, Cooper LF. Advancing dental implant surface technology--from micron- to nanotopography. Biomaterials 2008; 29(28):3822–35.

47. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics. Biomaterials 2000; 21(17):1803–10.

48. De Jong WH, Borm PJ. Drug delivery and nanoparticles:applications and hazards. Int J Nanomedicine 2008; 3(2):133–49.

49. Menon S, Rajeshkumar S, Kumar V. A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. Resource-Efficient Technologies 2017; 3(4):516–27.

50. Chhour P, Naha PC, Cheheltani R, Benardo B, Mian S, Cormode DP. Gold Nanoparticles for Biomedical Applications: Synthesis and In Vitro Evaluation. New York: Humana Press; 2016. (Methods in pharmacology and toxicology).

51. Cabuzu D, Cirja A, Puiu R, Grumezescu AM. Biomedical applications of gold nanoparticles. Curr Top Med Chem. 2015; 15(16):1605–13.

52. Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, Massich MD, Patel PC, Mirkin CA. Goldnanopartikel in Biologie und Medizin. Angewandte Chemie 2010; 122(19):3352–66.

53. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. Nano Lett. 2006; 6(4):662–8.

54. Sattler KD. Handbook of Nanophysics: Nanomedicine and Nanorobotics. Boca Raton, London, New York: CRC Press; 2011.

55. Ng QK, Olariu CI, Yaffee M, Taelman VF, Marincek N, Krause T, Meier L, Walter MA. Indium-111 labeled gold nanoparticles for in-vivo molecular targeting. Biomaterials 2014; 35(25):7050–7.

56. Loger K. Entwicklung und in vitro Charakterisierung von NiTi-Dünnschicht Herzklappensegeln [Wiss. Dissertation]. Kiel; 2016.

57. Ghori MZ, Veziroglu S, Henkel B, Vahl A, Polonskyi O, Strunskus T et al. A comparative study of photocatalysis on highly active columnar TiO2 nanostructures in-air and in-solution. Sol Energ Mat Sol C 2018; 178:170–8.

58. Veziroglu S, Ghori MZ, Obermann A-L, Röder K, Polonskyi O, Strunskus T et al. Ag Nanoparticles Decorated TiO 2 Thin Films with Enhanced Photocatalytic Activity. Phys. Status Solidi A 2019; 216(14):1800898.

59. Veziroglu S, Ullrich M, Hussain M, Drewes J, Shondo J, Strunskus T et al. Plasmonic and non-plasmonic contributions on photocatalytic activity of Au-TiO2 thin film under mixed UV–visible light. Surface and Coatings Technology 2020; 389:125613.

60. Veziroglu S, Ghori MZ, Kamp M, Kienle L, Rubahn H-G, Strunskus T et al. Photocatalytic Growth of Hierarchical Au Needle Clusters on Highly Active TiO 2 Thin Film. Adv. Mater. Interfaces 2018; 5(15):1800465.

61. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. Brain Res Rev. 2007; 53(1):198–214.

62. Mulisch M WU, Hrsg. Romeis Mikroskopische Technik. 19. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer; 2015.

63. Mattila P, Lappalainen P. Filopodia: Molecular architecture and cellular functions. Nat Rev Mol Cell Biol 2008; 9(6):446–54.

64. Xue T, Attarilar S, Liu S, Liu J, Song X, Li L, Zhao B, Tang Y. Surface Modification Techniques of Titanium and its Alloys to Functionally Optimize Their Biomedical Properties: Thematic Review. Front Bioeng Biotechnol 2020; 8:603072.

65. Hwang D WHL. Medical contraindications to implant therapy: Part I: absolute contraindications. Implant dent 2006; 15(4):353–60.

66. Hwang D WH. Medical contraindications to implant therapy: Part II: Relative contraindications. Implant dent 2007; 16(1):13–23.

67. Jadhav K, Hr R, Deshpande S, Jagwani S, Dhamecha D, Jalalpure S, Subburayan K, Baheti D. Phytosynthesis of gold nanoparticles: Characterization, biocompatibility, and evaluation of its osteoinductive potential for application in implant dentistry. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018; 93:664–70.

68. Yi C, Liu D, Fong CC, Zhang J, Yang M. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. ACS Nano 2010; 4(11):6439–48.

69. Heo DN, Ko WK, Bae MS, Lee JB, Lee DW, Byun W, Lee CH, Kim EC, Jung BY, Kwon IK. Enhanced bone regeneration with a gold nanoparticle-hydrogel complex. J Mater Chem B 2014; 2(11):1584–93.

70. Heo DN, Ko WK, Lee HR, Lee SJ, Lee D, Um SH et al. Titanium dental implants surface-immobilized with gold nanoparticles as osteoinductive agents for rapid osseointegration. J Colloid Interface Sci 2016; 469:129–37.

71. Sul OJ, Kim JC, Kyung TW, Kim HJ, Kim YY, Kim SH, Kim JS, Choi HS. Gold Nanoparticles Inhibited the Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand (RANKL)-Induced Osteoclast Formation by Acting as an Antioxidant. Biosci Biotechnol Biochem 2010; 74(11):2209–13.

72. Sani A, Cao C, Cui D. Toxicity of gold nanoparticles (AuNPs): A review. Biochem Biophys Rep 2021; 26:100991.

73. Matatall KA, Kadmon CS, King KY. Detecting Hematopoietic Stem Cell Proliferation Using BrdU Incorporation. Methods Mol Biol. 2018; 1686:91–103.

74. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. Cold Spring Harb Protoc. 2018; (6).

75. Gstraunthaler G, Lindl T. Zell- und Gewekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2013.

76. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. BMC Res notes 2015; 8:47.

77. Tawakoli PN. Vergleich verschiedener Vitalfärbeverfahren zur Detektion und Quantifizierung adhärenter Mikroorganismen im initialen oralen Biofilm. Freiburg; 2011.

78. Jones KH, Senft JA. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. J Histochem Cytochem. 1985; 33(1):77–9.

79. Elkhidir Y, Lai R, Feng Z. The impact of photofunctionalized gold nanoparticles on osseointegration. Heliyon 2018; 4(7):e00662.

80. Fujita T, Zysman M, Elgrabli D, Murayama T, Haruta M, Lanone S et al. Anti-inflammatory effect of gold nanoparticles supported on metal oxides. Sci Rep. 2021; 11(1):23129.

81. Ko WK, Kim SJ, Heo DN, Han IB, Kim S, Kwon IK et al. Double layers of gold nanoparticles immobilized titanium implants improve the osseointegration in rabbit models. Nanomedicine 2020; 24:102129.

82. Wang QM, Zhang TF, Kwon SH, Kim KH. Fabrication of TiO_2 Films on Glass Substrates by a Pulsed Dc Reactive Magnetron Sputtering. Appl Mech Mater 2011; 71-78:5050–3.

83. Vahl A, Veziroglu S, Henkel B, Strunskus T, Polonskyi O, Aktas OC, Faupel F. Pathways to Tailor Photocatalytic Performance of TiO2 Thin Films Deposited by Reactive Magnetron Sputtering. Materials 2019; 12(17).

84. Wiatrowski A, Mazur M, Obstarczyk A, Wojcieszak D, Kaczmarek D, Morgiel J, Gibson D. Comparison of the Physicochemical Properties of TiO2 Thin Films Obtained by Magnetron Sputtering with Continuous and Pulsed Gas Flow. Coatings 2018; 8(11):412.

85. Veith M, Lee J, Miró MM, Akkan CK, Dufloux C, Aktas OC. Bi-phasic nanostructures for functional applications. Chem. Soc. Rev. 2012; 41(15):5117–30.

86. Su J, Boichot R, Blanquet E, Mercier F, Pons M. Chemical vapor deposition of titanium nitride thin films: Kinetics and experiments. CrystEngComm 2019; 21(26):3974–81.

87. Henkel B, Neubert T, Zabel S, Lamprecht C, Selhuber-Unkel C, Rätzke K et al. Photocatalytic properties of titania thin films prepared by sputtering versus evaporation and aging of induced oxygen vacancy defects. Appl. Catal. B 2016; 180:362–71.

88. Baptista A, Silva F, Porteiro J, Míguez J, Pinto G. Sputtering Physical Vapour Deposition (PVD) Coatings: A Critical Review on Process Improvement and Market Trend Demands. Coatings 2018; 8(11):402.

89. Ayati A, Ahmadpour A, Bamoharram FF, Tanhaei B, Mänttäri M, Sillanpää M. A review on catalytic applications of Au/TiO2 nanoparticles in the removal of water pollutant. Chemosphere 2014; 107:163–74.

90. Veziroglu S, Obermann A-L, Ullrich M, Hussain M, Kamp M, Kienle L et al. Photodeposition of Au Nanoclusters for Enhanced Photocatalytic Dye Degradation over TiO2 Thin Film. ACS Appl Mater Interfaces 2020; 12(13):14983–92. doi: 10.1021/acsami.9b18817.

91. Chen W, Lu Y, Dong W, Chen Z, Shen M. Plasmon mediated visible light photocurrent and photoelectrochemical hydrogen generation using Au nanoparticles/TiO2 electrode. Mater. Res. Bull. 2014; 50:31–5.

92. Pal NK, Kryschi C. Improved photocatalytic activity of gold decorated differently doped TiO_2 nanoparticles: A comparative study. Chemosphere 2016; 144:1655–64.

93. Mekayarajjananonth T, Winkler S. Contact angle measurement on dental implant biomaterials. J Oral Implantol. 1999; 25(4):230–6.

94. Pereira-Silva P, Meira DI, Costa-Barbosa A, Costa D, Rodrigues MS, Borges J, Machado AV, Cavaleiro A, Sampaio P, Vaz F. Immobilization of Streptavidin on a Plasmonic Au-TiO2 Thin Film towards an LSPR Biosensing Platform. Nanomaterials 2022; 12(9).

95. Breuch R, Klein D, Moers C, Siefke E, Wickleder C, Kaul P. Development of Gold Nanoparticle-Based SERS Substrates on TiO2-Coating to Reduce the Coffee Ring Effect. Nanomaterials 2022; 12(5).

96. Rosario R, Gust D, Garcia AA., Hayes M, Taraci J, Clement T et al. Lotus Effect Amplifies Light-Induced Contact Angle Switching. J. Phys. Chem. B 2004; 108(34):12640–2.

97. Strunz V, Gross U, Nickel SS. Morphometrische Untersuchungen über den Knochenkontakt an titanplasmabeschichteten Implantaten. Fortschr Kiefer Gesichtschir 1983; 28:47–9.

98. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. J Biomed Mater Res. 1991; 25(7):889–902.

99. Mishra SK, Kumar MA, Chowdhary R. Anodized dental implant surface. Indian J Dent Res. 2017; 28(1):76–99.

100. Saulacic N, Bosshardt, DD, Bornstein MM, Berner S, Buser, D. Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants. Eur Cell Mater 2012; 23:273-86.

101. Bucci-Sabattini V, Cassinelli C, Coelho PG, Minnici A, Trani A, Dohan Ehrenfest DM. Effect of titanium implant surface nanoroughness and calcium phosphate low impregnation on bone cell activity in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 109(2):217–24.

102. Moura CC, Machado JR, Silva MV, Rodrigues DB, Zanetta-Barbosa D, Jimbo R, Tovar N, Coelho PG. Evaluation of human polymorphonuclear behavior on textured titanium and calcium-phosphate coated surfaces. Biomed Mater 2013; 8(3):35010.

103. Moura CG, Souza MA, Kohal RJ, Dechichi P, Zanetta-Barbosa D, Jimbo R, Teixeira CC, Teixeira HS, Tovar N, Coelho PG. Evaluation of osteogenic cell culture and osteogenic/peripheral blood mononuclear human cell co-culture on modified titanium surfaces. Biomed Mater 2013; 8(3):35002.

104. Monjo M, Petzold C, Ramis JM, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE. In vitro osteogenic properties of two dental implant surfaces. Int J Biomater 2012; 2012:181024.

105. Guo J, Padilla RJ, Ambrose W, De Kok IJ, Cooper LF. The effect of hydrofluoric acid treatment of TiO2 grit blasted titanium implants on adherent osteoblast gene expression in vitro and in vivo. Biomaterials 2007; 28(36):5418–25.

106. Valencia S, Gretzer C, Cooper LF. Surface Nanofeature Effects on Titanium-Adherent Human Mesenchymal Stem Cells. Int J Oral Maxillofac Implants 2009; 24(1):38–46.

107. Masaki C, Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Stanford C. Effects of implant surface microtopography on osteoblast gene expression. Clin Oral Implants Res 2005; 16(6):650–6.

108. Coelho PG, Cardaropoli G, Suzuki M, Lemons JE. Early healing of nanothickness bioceramic coatings on dental implants. An experimental study in dogs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 2009; 88(2):387–93.

109. Coelho PG LJE. Physico/chemical characterization and in vivo evaluation of nanothickness bioceramic depositions on alumina-blasted/acid-etched Ti-6Al-4V implant surfaces. J Biomed Mater Res A. 2009; 90(2):351–61.

110. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. Discrete calcium phosphate nanocrystalline deposition enhances osteoconduction on titanium-based implant surfaces. J Biomed Mater Res A. 2009; 90(2):577–85.

111. Mendes VC, Moineddin R, Davies JE. The effect of discrete calcium phosphate nanocrystals on bone-bonding to titanium surfaces. Biomaterials 2007; 28(32):4748–55.

112. Orsini G, Piattelli M, Scarano A, Petrone G, Kenealy J, Piattelli A, Caputi S. Randomized, controlled histologic and histomorphometric evaluation of implants with nanometer-scale calcium phosphate added to the dual acid-etched surface in the human posterior maxilla. J Periodontol. 2007; 78(2):209–18.

113. Coelho PG, Takayama T, Yoo D, Jimbo R, Karunagaran S, Tovar N, Janal MN, Yamano S. Nanometer-scale features on micrometer-scale surface texturing: A bone histological, gene expression, and nanomechanical study. Bone 2014; 65:25–32.

114. Coelho PG, Marin C, Granato R, Bonfante EA, Lima CP, Suzuki M. Surface treatment at the cervical region and its effect on bone maintenance after immediate implantation: An experimental study in dogs. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010; 110(2):182–7.

115. Ellingsen JE, Johansson CB, Wennerberg A, Holmén A. Improved retention and bone-to-lmplant contact with fluoride-modified titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 2004; 19(5):659–66.

116. Rocci M, Rocci A, Martignoni M, Albrektsson T, Barlattani A, Gargari M. Comparing the TiOblast and Osseospeed surfaces. Histomorphometric and histological analysis in humans. Oral Implantol (Rome) 2008; 1(1):34–42.

117. Shibli JA, Grassi S, Piattelli A, Pecora GE, Ferrari DS, Onuma T, d'Avila S, Coelho PG, Barros R, Iezzi G. Histomorphometric evaluation of bioceramic molecular impregnated and dual acid-etched implant surfaces in the human posterior maxilla. Clin Implant Dent Relat Res. 2010; 12(4):281–8.

118. Albrektsson T, Buser D, Sennerby L. Crestal bone loss and oral implants. Clin Implant Dent Relat Res. 2012; 14(6):783–91.

119. Paradowska E, Arkusz K, Pijanowska DG. Comparison of Gold Nanoparticles Deposition Methods and Their Influence on Electrochemical and Adsorption Properties of Titanium Dioxide Nanotubes. Materials 2020; 13(19).

120. Brewer SH, Glomm WR, Johnson MC, Knag MK, Franzen S. Probing BSA binding to citrate-coated gold nanoparticles and surfaces. Langmuir 2005; 21(20):9303–7.

121. Takanche JS, Kim JE, Kim JS, Lee MH, Jeon JG, Park IS et al. Chitosan-gold nanoparticles mediated gene delivery of c-myb facilitates osseointegration of dental implants in ovariectomized rat. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018; 46(3):807-817.

122. Suarasan S, Focsan M, Soritau O, Maniu D, Astilean S. One-pot, green synthesis of gold nanoparticles by gelatin and investigation of their biological effects on Osteoblast cells. Colloids Surf B Biointerfaces 2015; 132:122–31.

123. Melvin AA, Illath K, Das T, Raja T, Bhattacharyya S, Gopinath CS. M-Au/TiO2 (M = Ag, Pd, and Pt) nanophotocatalyst for overall solar water splitting: Role of interfaces. Nanoscale 2015; 7(32):13477–88.

124. Park SB, Park SH, Kim NH, Chung CK. BMP-2 induced early bone formation in spine fusion using rat ovariectomy osteoporosis model. Spine J. 2013; 13(10):1273–80.

9. Danksagung

Zuerst gilt mein Dank dem Direktor der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Prof. Dr. Dr. Jörg Wiltfang, der mir das Durchführen und Schreiben dieser Arbeit in seiner Abteilung ermöglicht hat. Ich durfte in diesem Prozess sehr viel über experimentelles und wissenschaftliches Arbeiten lernen, wodurch meine Begeisterung geweckt wurde.

Meinem Doktorvater PD Dr. Aydin Gülses möchte ich für seine Unterstützung während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Dissertation, von dem Tag, an dem wir zum ersten Mal zusammensaßen und alles nur eine grobe Idee war, bis zur Vollendung dieser Schrift, danken. Wo auch immer ich Hilfe brauchte, habe ich sie von ihm bekommen, die Kommunikation und Zusammenarbeit war in allen Phasen phänomenal.

Prof. Dr. Yahya Acil möchte ich für die Motivation und inspirierenden Gespräche, insbesondere zu Beginn dieser Arbeit, danken. Es war mir eine Ehre unter seiner Leitung arbeiten zu dürfen.

Frau Gabriele Neßenius hat mich in die Arbeit im Forschungslabor eingewiesen und bei der Durchführung der Experimente, wo sie nur konnte, unterstützt. Ohne sie hätte ich nie das Verständnis und die Begeisterung für diese hochsensible Arbeit entwickelt. Vielen Dank für alles.

Frau Theresa Kohlhaas möchte ich für die Einweisung bei der Mikroskopie danken.

Der Abteilung von Prof. Dr. rer. nat. Franz Faupel im Institut für Materialwissenschaften der CAU Kiel möchte ich für die Herstellung und das Zurverfügungstellen der Arbeitsmaterialien danken. Insbesondere möchte ich mich für die Kommunikation mit Dr.-Ing. Salih Veziroglu bedanken, der meine Fragen zu den komplizierten technischen Herstellungsverfahren lösen konnte.

Herrn Dr. Fatih Karayürek danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung unserer Versuchsergebnisse.

Allen Korrekturlesern dieser Schrift möchte ich meinen tiefsten Dank für ihre wertvolle Zeit und Hilfe aussprechen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin für ihre bedingungslose Liebe, Motivation und Unterstützung. Ich bin gesegnet eine solche Familie zu haben und habe euch alles zu verdanken.

10. Publikation zur Dissertation

Kalantzis S, Veziroglu S, Kohlhaas T, Flörke C, Mishra YK, Wiltfang J, Açil Y, Faupel F, Aktas OC, Gülses A. Early osteoblastic activity on TiO2 thin films decorated with flower-like hierarchical Au structures. RSC Adv. 5;10(48):28935-28940

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers/meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

31.08.2023, Spyridon Kalantzis

Datum, Unterschrift Doktorand*in