

Aus dem Zentrum für Zahn- Mund- und Kiefergesundheit

der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und

der Zahnheilkunde

Vorstand: Prof. Dr. Jürgen Groll

**Elektrochemische Abscheidung von Bruschichten auf Titan
in Gegenwart von Kristallisationsinhibitoren zur Steuerung
von Kristallitgröße und biologischer Reaktion**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lars Wettstein

aus Mülsen

Würzburg, Mai 2020

Referent: Prof. Dr. Uwe Gbureck
Korreferent: Prof. Dr. Torsten Blunk
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.11.2020

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Kenntnisstand.....	4
2.1	Der menschliche Knochen und seine Zusammensetzung	4
2.1.1	Calciumphosphate	5
2.1.2	Osteokonduktion	7
2.1.3	Osteoinduktion	8
2.1.4	Osteointegration	10
2.2	Titan als Implantatmaterial und seine Eigenschaften	11
2.3	Beschichtung von Implantaten	13
2.3.1	Plasmaspritztechnik.....	16
2.3.2	Elektrochemische Abscheidung	18
2.4	Inhibition der Bruschitbildung	20
3.	Material und Methoden	22
3.1	Herstellen definierter gestrahlter Oberflächen	22
3.1.1	Vorbereitung der Titanplättchen.....	22
3.1.2	Der Standardelektrolyt	22
3.1.3	Herstellen des Elektrolyten.....	23
3.2	Aufbau der Beschichtungsapparatur	24
3.3	Durchführung der galvanostatischen Beschichtung	26
3.4	Charakterisierung der Schichten	26
3.5	Optimale Beschichtungsparameter für Desinfektion, Sterilisation und Zelltests.....	28
3.5.1	Desinfektion mit Ethanol	28
3.5.2	Sterilisation im Autoklaven	28
3.6	WST-Zellvitalitätstest und Bestimmung der Zellzahl	28

4.	Ergebnisse	31
4.1	pH-Werte der Elektrolyten	31
4.2	Vergleich der beschichteten Bruschitmassen	32
4.3	Vergleich der Morphologie der Bruschitschichten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie	33
4.4	Bestimmung und Vergleich der Zusammensetzungen und Kristallitgröße der Bruschitschichten mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie.....	37
4.5	Optimale Beschichtungsparameter für Desinfektion, Sterilisation und Zellversuche mit hFOB	40
4.6	Desinfektion der Beschichtungen mit Ethanol.....	44
4.7	Sterilisation der Beschichtungen im Autoklaven im trockenen Zustand	47
4.8	Sterilisation der in PBS-Puffer gelagerten Beschichtungen im Autoklaven....	51
4.9	Zellversuche der Bruschitschichten mit Hilfe von humanen fötalen Osteoblasten	55
5.	Diskussion	58
5.1	Einfluss der Zugabe von Inhibitoren auf die Masse der Bruschitbeschichtung	58
5.2	Charakterisierung der Bruschitschichten.....	59
5.3	Desinfektion und Sterilisation.....	62
5.4	Zellversuch	65
6.	Zusammenfassung und Ausblick	67
7.	Literaturverzeichnis	69

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

- Bru Bruschit aus Standardelektrolyt mit 15 g Calcium-Phosphat Monohydrat monobasisch und 0,5 l Reinstwasser hergestellt.
- BruOpt Bruschit aus Standardelektrolyt mit 15 g Calcium-Phosphat Monohydrat monobasisch und 0,5 l Reinstwasser bei 900 s hergestellt.
- BruZitrOpt Bruschit aus Elektrolyt mit 0,526 g/l ($2,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Zitronensäure bei 900 s hergestellt.
- BruNadiOpt Bruschit aus Elektrolyt mit 0,026 g/l ($5,8 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat bei 900 s hergestellt.
- BruPhytOpt Bruschit aus Elektrolyt mit 2 g/l ($3,03 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Phytinsäure bei 900 s hergestellt.
- BruZitr10,5 Bruschit aus Elektrolyt mit 10,506 g/l ($5,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l) Zitronensäure hergestellt.
- BruZitr1,0 Bruschit aus Elektrolyt mit 1,052 g/l ($5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Zitronensäure hergestellt.
- BruZitr0,5 Bruschit aus Elektrolyt mit 0,526 g/l ($2,4 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Zitronensäure hergestellt.
- BruNadi0,5 Bruschit aus Elektrolyt mit 0,52 g/l ($1,16 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat hergestellt.
- BruNadi0,3 Bruschit aus Elektrolyt mit 0,26 g/l ($5,82 \cdot 10^{-4}$ mol/l) tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat hergestellt.
- BruNadi0,1 Bruschit aus Elektrolyt mit 0,12 g/l ($2,69 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat hergestellt.
- BruNadi0,02 Bruschit aus Elektrolyt mit 0,026 g/l ($5,82 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat hergestellt.

BruPhyt4	Bruskit aus Elektrolyt mit 4 g/l ($6,06 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Phytinsäure hergestellt.
BruPhyt2	Bruskit aus Elektrolyt mit 2 g/l ($3,03 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Phytinsäure hergestellt.
HA	Hydroxylapatit
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
REM	Rasterelektronenmikroskop
WST	wasserlösliches Tetrazoliumsalz (engl. water-soluble tetrazolium salt)
XRD	Röntgendiffraktometrie (engl. X-ray diffraction)
hFOB	humane fötale Osteoblasten
CaP	Calciumphosphat
GPa	Gigapascal
cps	Zählimpulse pro Sekunde (engl. counts per second)
Co-Cr	Cobalt-Chrom-Legierung

Symbole

⊖	Glanzwinkel
---	-------------

1. Einleitung

Die stetigen Fortschritte in der Medizin und eine höhere Lebenserwartung der Menschen, im Sinne des demographischen Wandels, machen eine Weiterentwicklung von biokompatiblen Werkstoffen unumgänglich. Gerade in der Zahnheilkunde kommt es trotz guter Prophylaxe und konservierender Behandlung immer noch zum Verlust von Zähnen [1, 2]. Auch in der Humanmedizin sind altersbedingte Abnutzungserscheinungen der Gelenke an der Tagesordnung [3]. Daher hat die Entwicklung und Verwendung von einem Material, das gute mechanische und biologische Eigenschaften kombiniert und eine hohe Biokompatibilität und Korrosionsresistenz aufweist, einen besonders hohen Stellenwert in der Medizintechnik. Titan besitzt alle diese Eigenschaften und befindet sich im vielseitigen klinischen Einsatz als Implantatwerkstoff. Da das Einbringen von Titan als Fremdkörper in den menschlichen Organismus verschiedenste Reaktionen zwischen Titanoberfläche und umliegenden Knochen und Gewebe verursacht [4, 5], wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Methoden zur Modifikation der Titanoberfläche entwickelt [6]. Eine Veränderung der Rauigkeit und spezielle Beschichtungen steigerten die Knochenformation und erhöhten die Zellanlagerung um die Implantate [7]. Somit wurde eine schnellere und verbesserte Knochen-Implantat-Verbindung (Osteointegration) und langfristige Verankerung im Knochen erreicht [8, 9].

Eine frühe und auch heute noch gebräuchliche Methode zur Beschichtung der Implantate mit Calciumphosphaten (z.B. Hydroxylapatit, Bruschit, Monetit) ist die Plasmaspritztechnik. Die Calciumphosphate, insbesondere Hydroxylapatit (HA , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), besitzen eine hohe chemische Ähnlichkeit zu mineralischem Knochen [10]. Mittels der Plasmaspritztechnik war es möglich, dünne Hydroxylapatitschichten auf Titanimplantate aufzubringen, wodurch sich neuer Knochen um die Implantate bildete und die entstandenen Defekte auffüllte [10, 11]. Die beschichteten Implantate zeigten höhere Belastbarkeit und eine engere Knochen-Implantat-Verbindung als unbeschichtete Implantate [12]. Auf Grund der hohen Temperaturen der Plasmaflamme und der nachfolgenden riesigen Abkühlraten bildeten sich, neben Hydroxylapatit mit stärkerem amorphen Anteil, auch andere Calciumphosphatderivate, wie monoklines α -Tricalciumphosphat und Tetracalciumphosphat [13-15]. Somit kam es durch eine

verringerte Kristallitgröße [16] zu einer Veränderung der Kristallinität der Schichten [17], die nachfolgend die Stabilität und den Knocheneinbau der Implantate beeinflusste [18] und in der Langzeitanwendung zu Delamination führte [19]. Ein weiterer negativer Aspekt zeigte sich in der Scherfestigkeit, welche bei zunehmender Dicke der aufgetragenen Schichten abnahm [12]. Die negativen Aspekte der Plasmaspritztechnik gaben Ausschlag für weitere Forschung und Entwicklung im Gebiet der Beschichtungen.

Um das Jahr 1990 gelangte eine alternative Methode der Beschichtung mit keramischen Werkstoffen in den Fokus der Forschung. Die elektrochemische Abscheidung wurde entwickelt, um eine kontrollierte kristalline Abscheidung auf Oberflächen zu erlangen. Da das Beschichtungsobjekt als Kathode fungiert, minimiert sich die Korrosion der Metalloberfläche und auch stark irreguläre Objekte können schnell und bei geringer Temperatur beschichtet werden [20-22]. Die Modifikation der abgeschiedenen Schichten hinsichtlich Morphologie, Kristallinität und Dicke erfolgt durch die Veränderung der Prozessparameter [23-25]. Die abgeschiedenen Calciumphosphate besitzen auch hier osteokonduktive Eigenschaften und beschleunigen das Knochenwachstum und die Implantatverankerung [26, 27]. Nachteil der elektrochemischen Beschichtungen ist, wie beim Plasmaspritzverfahren, die Brüchigkeit der Schichten und deren Verbindung zur Metalloberfläche. Diese Einschränkungen fungieren bei hohen Scherkräften oder großen Belastungen als limitierende Faktoren [22]. Die Modifikation und Verbesserung der Beschichtungen waren auch Bestandteil der Forschung seitens der FMZ Würzburg. Es wurde gezeigt, dass durch eine Beschichtung mit Calciumhydroxyd eine bakterizide Wirkung erzielt werden kann. Die Keimzahl von *Staphylococcus epidermidis* und *Klebsiella pneumoniae* reduzierte sich stark und das Wachstum von eukaryonten Zellen wurde nicht beeinflusst [19]. Ein wichtiger Punkt bei vielen Untersuchungen war die Verwendung bzw. Herstellung von Hydroxylapatit oder Brushit mit einem ähnlichen oder gleichen Ca/P Verhältnis wie das des natürlichen Knochens [28]. Zusätzlich wiesen die Beschichtungen Übereinstimmungen in der Morphologie gegenüber dem Apatit im natürlichen Knochen auf, da sie beide nadelartige Kristalle ausbildeten [24]. Damit sollte ein noch stabilerer und langfristiger Verbund zwischen Beschichtung und Knochen erreicht werden. Schon frühzeitig wurde deshalb versucht, die abgeschiedenen Schichten noch weiter zu

modifizieren und die Kristallisation mittels der inhibitorischen Effekte bestimmter Substanzen zu beeinflussen. In diversen Studien zeigte sich, dass Pyrophosphat, welches ebenfalls als Ca/P-Phase im menschlichen Körperauftritt, die Keimbildung und das Keimwachstum von Calciumphosphaten hemmen kann [29-33]. Eine vergleichbare inhibierende Wirkung auf Hydroxylapatit oder Brushit erzielten in den Studien auch Phytinsäure [34-36] und Zitronensäure [37, 38].

Das Ziel dieser Arbeit war durch elektrochemische Abscheidung von Brushitschichten auf Titan in Gegenwart von Kristallisationsinhibitoren die Kristallitgröße zu steuern und nachfolgend die biologische Reaktion zu überprüfen. Dabei wurden die Kristallisationsinhibitoren Zitronensäure, treta-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Phytinsäure verwendet und die entstandenen Schichten mit denen ohne Inhibitorzugabe verglichen. Um das Ausmaß der Inhibierung zu verifizieren, wurde die Masse aller Schichten gemessen. Die kristallographische Zusammensetzung der mit und ohne Inhibierung abgeschiedenen Schichten wurde mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie bestimmt. Die daraus entstandenen Werte lieferten zugleich die Informationen über die einzelnen Kristallitgrößen innerhalb der Schichten. Über den Einfluss der Inhibitoren auf die Schichtmorphologie gaben rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen weiteren Aufschluss. Ausgewählte Proben wurden unter verschiedenen Bedingungen desinfiziert bzw. sterilisiert, wie es für die Verwendung als Implantat erfolgen müsste. Nach erfolgter Desinfektion bzw. Sterilisation, wurden die Proben erneut gewogen und mittels Röntgendiffraktogrammetrie und Rasterelektronenmikroskopie analysiert. Des Weiteren war das Verhalten von Zellen gegenüber den Schichten von Interesse. Aus diesem Grund kamen Osteoblasten-Zelllinien zum Überprüfen der Zellverträglichkeit zum Einsatz und die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen aus den materialwissenschaftlichen Analysen in Zusammenhang gebracht.

2. Kenntnisstand

2.1 Der menschliche Knochen und seine Zusammensetzung

Das menschliche Skelett setzt sich in der Regel aus 210 anatomisch abgrenzbaren Knochen zusammen [39]. Sie fungieren als das Stützgerüst des Körpers und wirken als Hebel der daran ansetzenden Skelettmuskulatur. Sie tragen nicht nur zum Schutz sensibler Regionen wie Gehirn, Rückenmark und Organen bei, sondern dienen auch als Speicherorgan für den Stoffwechsel. 99% des Calciums im Körper werden in ihnen abgelagert [40]. Knochen bestehen makroskopisch aus zwei unterschiedlichen Knochengeweben: Substantia Spongiosa und Substantia Compacta. Die Compacta bildet die dichte, stabilere Außenzone, welche die Spongiosa, das schwammartige Gitterwerk aus dünnen Platten und Bälkchen umgibt [41]. Spongiosa und Compacta lassen sich, aufgrund ihrer Relation und Beschaffenheit, radiologisch und klinisch in verschiedene Knochendichten einteilen. Lekholm und Zarb teilten 1985 den Knochen in vier Typen ein: Typ 1: fast ausschließlich kompakte Knochensubstanz, Typ 2: dichte Spongiosa umgeben von breiter Kortikalis, Typ 3: dichte Spongiosa umgeben von dünner Kortikalis, Typ 4: lockere Spongiosa umgeben von dünner Kortikalis. Diese Einteilung wurde 1990 von Misch und letztendlich 2003 von Engels verfeinert, der die Knochenklassen D1 bis D4 anhand von Knochendichtemessungen in Hounsfield-Einheiten (HE) unterteilte [42, 43].

Der feinstoffliche Aufbau des Knochens unterscheidet sich bei Erwachsenen nicht hinsichtlich des Alters oder Geschlechts. Quelch et al. bestimmten die Werte bei einem normalen ausgewachsenen, menschlichen Oberschenkelknochen, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind [44, 45]. Anorganisches Phosphat befindet sich zu ca. 50 % und Calcium zu ca. 35 % im mineralischen Anteil der Knochengrundsubstanz. Die verbleibenden 15 % enthalten Citrat, Karbonat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffe [40]. Mikroskopisch gesehen, ist der Knochen aus kleinen Bauelementen, den mineralisierten Kollagenfasern, aufgebaut. Der mineralisierte Anteil besteht in erster Linie aus Apatitkristallen, bei denen die Calciumphosphate ca. 40 % ausmachen und davon wiederum 60 % aus Hydroxylapatit bestehen [44]. Der organische Anteil besteht zu 90-95 % aus Kollagen [40], speziell Kollagen Typ I [46].

In der mineralisierten Extrazellulärmatrix finden sich neben dem Kollagen noch Osteocalcin, Osteonectin, Bone Sialoproteine (BSP), Phosphoproteine, Proteoglykane und Proteine für die Förderung des Knochenwachstums [46]. Aus chemischer Sicht ist Knochen ein Verbundwerkstoff aus Kollagen und Calciumphosphat, der durch seine physiologischen Flüssigkeiten seine Elastizität erhält. Seine Porosität ist von enormer Wichtigkeit für den Stoffaustausch, die Zugänglichkeit der Zellen, z.B. für die Blutbildung und die mechanische Stabilität [47].

Tabelle 1: Zusammensetzung des menschlichen Knochens nach Quelch [45] (alle Werte gelten für trockenen Knochen)

Bestandteil	normaler, erwachsener, menschlicher Femur
Mineralischer Anteil	66,8 %
Organischer Anteil	27,5 %
Carbonate	5,6 %
Nichtkollagene organische Matrix	2,8 %
Calcium	258,7 mg/g
Phosphor	116,0 mg/g
Ca/P (mg/mg)	2,24
Sialinsäure	1,96 μ mol/g
Hydroxyprolin	32,8 mg/g

2.1.1 Calciumphosphate

Wie im vorherigen Kapitel besprochen, machen die Calciumphosphate (CaP) einen großen Teil im menschlichen Körper aus. Sie kommen nicht nur im Knochen, sondern auch in den Zähnen und zusätzlich als pathologische Verkalkungen in Form von Zahnstein, Blasensteinen und arteriosklerotischen Ablagerungen vor [47]. Da die chemisch hergestellten Calciumphosphate dem biologischen Apatit recht nahe kommen [48], nehmen sie einen großen Stellenwert in Medizin und Zahnmedizin ein. Die Verwendung reicht von dentalen Implantaten und Knochenzementen bzw. -ersatzmaterialien, bis hin zu Endoprothesen [47, 49, 50]. Die herausragende Eigenschaft der Calciumphosphate ist, dass sie sich aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zum Knochen direkt mit diesem verbinden und somit einen sehr starken

Implantat-Knochen-Kontakt herstellen [51]. Dieser Ähnlichkeit ist es auch zu verdanken, dass sie vom Organismus nicht als Fremdkörper eingestuft werden und deshalb keine toxischen oder entzündlichen Reaktionen zeigen [52].

Hydroxylapatit, mit der Summenformel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, ist die wichtigste anorganische Komponente im menschlichen Knochen und deshalb das bevorzugte Material für die Modifikation von Oberflächen [19]. Als Hauptbestandteil des Knochens verfügt Hydroxylapatit nicht nur über eine hohe Biokompatibilität, sondern fördert auch die biologische Aktivität. Es ist als Implantatbeschichtung in der Lage einen starken chemischen Verbund zum Knochen herzustellen, die Einheilzeit des Implantates zu verkürzen, die Freisetzung von Metallionen zu reduzieren und die Osteointegration (siehe Kapitel 2.1.4) zu verbessern [11, 24, 47, 49, 50, 53]. Es besitzt ein Ca/P-Verhältnis von 1,67 und ist das am schlechtesten löslichste und damit stabilste Calciumphosphat. Ein Ersetzen des Hydroxidions durch Fluorid oder Chlorid führt zu einer höheren Stabilität des Kristallgitters [47], indem es die Löslichkeit reduziert [54]. In Zähnen fördert es die Remineralisierung und einen Anstieg der Härte [55]. Hydroxylapatit wird nur langsam resorbiert [49, 50] und die Regulation seiner Bestandteile bzw. des Calcium- und Phosphathaushalts erfolgt im Körper durch die Beteiligung der Hormone Calcitonin, Calciferole (Vitamin D) und Parathormon. Die Resorption der Calcium- und Phosphationen findet im Darm über Absorption statt. In der Niere erfolgt stattdessen nur die Calciumresorption, während die Phosphatresorption gehemmt wird. Im Knochen sezernieren die Osteoklasten Salzsäure, wodurch sich die mineralischen Bestandteile auflösen und die Calcium- und Phosphationen freigesetzt werden. Die organischen Verbindungen des Knochens werden dann mit Hilfe von Enzymen abgebaut [41, 56].

Bruskit besitzt die Summenformel $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und kristallisiert leicht aus wässriger Lösung heraus, die Calcium- und Phosphationen beinhaltet. Biologisch findet sich Bruskit häufig in pathologischen Verkalkungen wie Blasensteinen, Zahnstein und der Chondrocalcinose (Pseudogicht) wieder. Es entsteht in der intermediären Phase der Knochenbildung und bei der Demineralisierung von Zahnschmelz [47, 57]. Chirurgisch wird es in Form von Calciumphosphatzementen als Knochenersatzmaterial

verwendet [58] und spielt als Beschichtungsmaterial eine immer größere Rolle [20, 28]. Oberhalb von 80 °C entwässert es leicht zu Dicalciumphosphat-Anhydrat (Monetit).

Monetit ist die wasserfreie Form von Brushit mit der Summenformel CaHPO_4 . Es kristallisiert wie Brushit aus wässriger Lösung, jedoch erst oberhalb von 100 °C. Monetit findet sich nicht in physiologischen und pathologischen Verkalkungen wieder, wird aber auch als Knochenersatzmaterial in Form von Zement verwendet [47, 59].

2.1.2 Osteokonduktion

Der Knochen ist das Gerüst des Menschen und gibt dem Körper als knöchernes Skelett seine Form. Die Knochen gehören wie Knorpel, Gelenke, Bandscheiben und Bänder zum passiven Teil des Bewegungsapparates. Zum aktiven Teil des Bewegungsapparates zählt die Skelettmuskulatur mitsamt der Faszien, Sehnen, Sehnenscheiden und Schleimbeutel. Alles zusammen kann unter dem Begriff muskuloskelettales System zusammengefasst werden und sichert sowohl die Haltung des Menschen, als auch die Bewegung und Fortbewegung. Eine Schädigung des Knochens kann durch Unfälle und Verletzungen oder Erkrankungen, wie zum Beispiel entzündliche Prozesse oder Tumoren hervorgerufen werden [60, 61]. Die Größe bzw. das Ausmaß der Knochenschädigung spielt für die spätere Heilung eine entscheidende Rolle. Diesem Umstand beschreibt der Begriff der kritischen Defektgröße. Der „critical size defect“ wird definiert als die kleinste Größe eines knöchernen Defektes, bei der die Heilung nicht spontan während der Lebenszeit des Lebewesens erfolgt [62, 63]. Die Regeneration dieses Defektes endet in der Formation von fibrösem Bindegewebe und nicht in der von Knochen. Die Größe des „critical size defect“ ist abhängig von der Rasse und Spezies, sowie vom Alter des Lebewesens und von der Lokalisation des Defekts im Skelett [64]. Der Erforschung und Entwicklung von Knochenersatzmaterialien kommt deshalb eine wichtige Rolle zu, damit es durch die oben genannten Verletzungen des Knochens nicht zur Bildung von fibrösem Bindegewebe oder gar zum Knochenverlust kommt. Die Knochenersatzmaterialien dienen zur Auffüllung der vorhandenen ossären Defekte und sollen die Heilung begünstigen. Aus diesem Grund sollten die Materialien osteokonduktive Eigenschaften besitzen. Die Osteokonduktion ist die Eigenschaft eines Materials, eine Leitstruktur für die Neuanlagerung von Knochen zu liefern und das Einwachsen des umgebenden

Knochengewebes zu ermöglichen [65]. Die Oberflächenbeschaffenheit der Materialien erlaubt ein Wachstum auf sich selbst oder hinein in Poren und Kanäle [66]. Die vorhandenen porösen Strukturen begünstigen das Einsprossen von Gefäßen, sowie durch die Wirkung bestimmter Zellmediatoren, die Ansammlung, Bildung und Differenzierung von Zellen zur Knochenreparatur und -neubildung [67]. Albrektsson et al. fanden heraus, dass dazu eine volle Vaskularisation notwendig ist und es sowohl von dem verwendeten Biomaterial als auch von seinen Reaktionen abhängt [66].

2.1.3 Osteoinduktion

Im Gegensatz zur Osteokonduktion beschreibt die Osteoinduktion den Vorgang, bei dem das Implantat die Differenzierung der knochenbildenden Zellen im perivaskulären Bindegewebe und Knochen stimuliert.

Der Knochen ist ein netzwerkartiges Gewebe, das sich aus lebenden Knochenzellen und einer extrazellulären Matrix zusammensetzt. Die Bestandteile der extrazellulären Matrix sind im Kapitel 2.1 beschrieben. Die Knochenzellen lassen sich in vier Zellgruppen, die Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Saumzellen oder Bone-Liningzellen, unterteilen. Die Osteoblasten sind für die Knochenbildung verantwortlich und sie entwickeln sich durch die Umwandlung von undifferenzierten mesenchymalen Vorläuferzellen über Preosteoblasten, von denen die osteogene Induktion ausgeht, bis zu Osteoblasten und am Ende zu Osteozyten [65, 66]. Die bereits existierenden Osteoblasten wären ohne Neubildung und -differenzierung nicht in der Lage, bestehende Defekte oder den Knochenumbau adäquat zu reparieren bzw. zu gewährleisten. Die Fähigkeit der Knochenneubildung (Osteoneogenese) durch die genannte Umwandlung, wird von diversen Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, Mitogenen und Differenzierungsproteinen gesteuert [67, 68]. Die Osteozyten entwickeln sich, wie oben beschrieben, aus Osteoblasten und sind von der mineralisierten Knochenmatrix umschlossen. Sie modulieren die Signale, die von der mechanischen Belastung entstehen und steuern so den Auf- und Abbau des Knochengewebes [69]. Die Osteoklasten sind aus einkernigen Vorläuferzellen fusionierte mehrkernige Zellen, die die Knochensubstanz abbauen. Die Saumzellen

bedecken die inaktive Knochenoberfläche, sind am Knochenumbau mitbeteiligt und haben eine wichtige Rolle bei der Skelettreparatur nach einer Verletzung [70, 71].

Die Neubildung von Knochen kann auf zwei verschiedenen Wegen stattfinden. Der neue Knochen kann sich direkt aus Bindegewebe (desmale Ossifikation) oder indirekt über Knorpel als Zwischenstufe bilden (chondrale Ossifikation). Bei der desmalen Ossifikation differenziert sich gut vaskularisiertes Mesenchym (embryonales Bindegewebe) zu Osteoblasten, die die Knochengrundsubstanz (Osteoid) produzieren, die anschließend mineralisiert. So bilden sich kleine Knochentrabekel, die zu größeren Strukturen fusionieren und die primäre Spongiosa bilden. Das weitere Wachstum geschieht durch die äußere Anlagerung von neuer Knochensubstanz (appositionelles Wachstum) und aus der primären Spongiosa wird die Kompakta. Beispiele für die desmale Ossifikation sind die Knochen des Schädeldachs und des Gesichtsschädels sowie das Schlüsselbein.

Bei der chondralen Ossifikation differenziert sich das mesenchymale Bindegewebe zu Chondroblasten, die ein knorpeliges Modell des zukünftigen Knochens bilden. Der Knorpel wird vom Perichondrium umgeben. Dieses Modell wird kontinuierlich durch Chondroklasten abgebaut und mit Hilfe von Osteoblasten durch Knochen ersetzt. Die Verknöcherung findet sowohl von außen her (perichondrale Ossifikation) als auch von innen (enchondrale Ossifikation) statt. Bei der Verknöcherung von außen differenzieren sich Osteoblasten auf halber Höhe der zukünftigen Diaphyse (Knochenschaft). Die Osteoblasten bilden eine Knochenmanschette, die sich im weiteren Verlauf nach proximal und distal verlängert. Das anfängliche Perichondrium wird zum Periost, von dem das Dickenwachstum der Manschette ausgeht. Die enchondrale Ossifikation beginnt im Inneren der Knochenmanschette mit der Vergrößerung von Chondrozyten und deren Mineralisation der interterritorialen Knorpelmatrix. In die Knorpelmatrix wachsen Blutgefäße und Mesenchymzellen ein. Aus den Mesenchymzellen differenzieren sich Chondroklasten und Osteoblasten. Die Chondroklasten bauen einen Teil der mineralisierten Knorpelmatrix ab und die noch vorhandene Matrix wird von den Osteoblasten als Gerüst zur Ablagerung von Knochengewebe genutzt.

2.1.4 Osteointegration

Der Begriff Osteointegration bzw. Osseointegration geht zurück auf Per-Ingvar Brånemark, der ihn erstmals beschrieb. Er bezeichnet die direkte, im lichtmikroskopischen Bereich sichtbare, strukturelle und funktionelle Verbindung zwischen lebendem Knochengewebe und der Oberfläche eines belasteten Implantates [66, 72, 73]. Bei diesem Phänomen wächst der Knochen direkt an die Implantatoberfläche heran, ohne dass sich dazwischen noch Kollagen oder eine Fibroblasten-Matrix befinden. Die Osteointegration ist zudem ein Maß für die Stabilität eines Implantates, welche in zwei Kategorien eingeteilt wird. Die Primärstabilität entsteht durch die Presspassung direkt nach dem Einbringen in das Implantatbett. Die Stabilisierung in der Knochenwunde erfolgt passiv durch die Friktion mit dem umgebenden Knochen. Je dichter der Knochen ist, umso höher wird die Primärstabilität des Implantates sein. Die Sekundärstabilität oder biologische Stabilität beschreibt das Einwachsen des Implantats durch Knochenregeneration und Remodeling und ist für den Langzeiterfolg entscheidend [74, 75]. Die Einheilung des Implantats kann in drei Stadien unterteilt werden. Das Stadium 1 beschreibt die Wundheilung und Geflechtknochenkallusbildung. Nach der Implantation kommt es im periimplantären Gewebe zur Blutstillung und Organisation des Koagulums durch Granulationsgewebe. Der Kontakt des Blutes mit dem Implantat führt zur Sezernierung von Wachstumsfaktoren, welche eine Migration von endothelialen und osteogenen Zellen zur Folge haben [76]. Die Geflechtknochenbildung beginnt ca. in der zweiten Woche nach der Implantation und geht von intakten endostalen und periostalen Oberflächen aus. Wie bei der Spalthheilung kann auch hier der Geflechtknochen lebende oder avitale Knochenoberflächen nutzen, um Distanzen bis zu 1 mm zu überbrücken [77]. Das avitale Knochenmaterial wird aber im weiteren Verlauf durch vitales Knochenmaterial ersetzt. Das Stadium 2 beschreibt die lamelläre Verdichtung und Umbauvorgänge. Die Osteoblastensäume bilden primäre Osteone an den endostal, periostal und periimplantär neugebildeten Geflechtknochenstrukturen. Durch dieses Modelling kommt es aufgrund von höher mineralisierten und lamellären Knochen zur Stabilisierung des Implantates und ebenso zur Sklerosierung der Implantatumgebung [78]. Des Weiteren erfolgen bereits Umbauprozesse (Remodelling) von Geflechtknochen hin zu Lamellenknochen [79]. Das Stadium 3 ist von Reifung und Anpassung geprägt. Der gebildete Knochen

kann sich in Gegenden höherer Belastung verstärken (periimplantäre Sklerosierung) oder es werden überschüssige periostale und endostale Kallusbildungen resorbiert [79, 80]. Diese funktionelle Adaptation des Knochens an die verschiedenen Belastungen und Kräfte, die auf das Implantat einwirken, erfolgt zeitlebens [77].

2.2 Titan als Implantatmaterial und seine Eigenschaften

Zahlreiche Ergebnisse aus Forschung und Entwicklung haben gezeigt, dass Materialien, die in den Körper eingebracht werden sollen, spezielle Anforderungen erfüllen müssen. Am Anfang des 19. Jahrhunderts wurden viele Metalle und Legierungen, wie Kupfer, Zink, Eisen, Silber und Nickel als Implantatmaterial getestet [81, 82] und riefen reaktive Prozesse, wie Toxizität, Allergie, Fremdkörperreaktion oder Kanzerogenität im Körper hervor [83]. Mit diesen Reaktionen sind sie für diese Verwendung ungeeignet [82]. Die heute am häufigsten in der Chirurgie verwendeten Implantatmetalle sind Edelstahl, Cobalt-Chrom (Co-Cr) und Titan bzw. Titanlegierungen. Edelstahl und Co-Cr gelten als biotolerant und werden von einer Bindegewebsschicht umgeben, die sich zwischen Knochen und Implantat befindet [84]. Die Bindegewebsschicht führt sowohl zu einer schlechteren Kraftübertragung zwischen Implantat und Knochen, als auch zu einer minderwertigeren Fixierung des Implantates im Knochen [82]. Im Edelstahl ist Nickel ein Hauptbestandteil und es kommt unter physiologischen Bedingungen zu korrosiven Prozessen. Im Blutserum beträgt die Nickelkonzentration ca. 10 nM und im Skelettmuskel ca. 3 nM und ist damit geringer als die Löslichkeitsgrenze für physiologische pH-Werte. Im Kontaktgewebe um Implantate liegt die Metallkonzentration weit über dem Wert für normalen Muskelgewebe und reicht an die Toxizitätsschwelle für Nickel heran, was eine Sequesterbildung bei Edelstahlimplantaten zur Folge haben kann [72].

Bioinerte Materialien sind dagegen durch eine fehlende Freisetzung toxischer Substanzen charakterisiert und besitzen eine stabile Oxidschicht auf ihrer Oberfläche [52, 85]. Titan ist solch ein Material und wird als Titanlegierung oder als Reintitan verwendet. Die benutzten Legierungen sind z.B. Titanium-6 Aluminium-4 Vanadium (Ti-6Al-4V) oder Titanium-6 Aluminium-7 Niob (Ti-6AL-7Nb). Beide besitzen eine höhere Dehngrenze als Reintitan und verfügen über eine hohe Zugfestigkeit [72]. Da sich Aluminium und Vanadium aus der Legierung herauslösen können, besteht die

Gefahr einer toxischen Reaktion im Gewebe [86, 87]. Titan ist ein hochreaktives Material mit einer hohen Affinität zu Sauerstoff und Wasserstoff. Unter Luft oder in wässrigen Medien ist Titan mit einer dünnen, passiven Oxidschicht überzogen, die das Metall gegen Korrosion schützt. Die Oxidschicht kann sich bei einer Beschädigung durch Reoxidation selbst reparieren. Dieser gute Korrosionsschutz und die fehlende Toxizität auf Makrophagen oder Fibroblasten, sowie das Ausbleiben einer entzündlichen Reaktion im periimplantären Gewebe führen zu einer sehr guten Biokompatibilität [52, 74, 88, 89]. Das hat den positiven Effekt, dass keine Metallionen frei werden und in das umliegende Gewebe gelangen können [72].

Das Reintitan hat sich als dentales Implantat durchgesetzt und seine Festigkeit wird durch die Reaktion mit Sauerstoff und Stickstoff erhöht [42]. Die Reinheit des Titans unterteilt sich in die Grade 1 - 4. Zwischen den einzelnen Graden ändert sich der prozentuale Anteil von Sauerstoff, Eisen, Wasserstoff, Kohlenstoff und Stickstoff. Ahmad et al. zeigten, dass selbst die geringen Unterschiede in der stofflichen Zusammensetzung zwischen Grad 1 und 4 ausreichen, um eine veränderte Zellantwort hervorzurufen [90]. Ebenso wie die biologischen Eigenschaften veranschaulichen auch die mechanischen Eigenschaften von Titan gegenüber anderen Metallen oder Legierungen seine Attraktivität als bevorzugter Implantatwerkstoff [88, 91]. Die Höhe des Elastizitätsmoduls ist ausschlaggebend für die mechanische Kompatibilität zwischen Knochen und Implantat und dem dort stattfindenden Heilungsprozess. Ti-6Al-4V besitzt im Gegensatz zu Edelstahl (200 GPa) und einer Co-Cr-Mo Legierung (210 GPa) nur einen E-Modul von 110 GPa, welcher immer noch ca. 5x höher als der von Knochen (25 GPa) ist. Ist der Unterschied zwischen den E-Moduln von Knochen und Implantat zu groß, verändert sich die Kraftübertragung in den umgebenden Knochen und verursacht eine Remodelierung des Gewebes. Dieses Phänomen nennt sich Stress Shielding und die daraus entstehende Knochenatrophie kann zu Implantatverlust führen. Ein dem Knochen ähnliches Elastizitätsmodul fördert die Osteointegration und vermeidet Stress Shielding [52, 92, 93]. Mit Hilfe der außergewöhnlichen Eigenschaften hat sich Titan als Material der Wahl für Implantate etabliert. Neuere Studien zeigen, dass Titan auch als Allergen wirken kann. Aus diesem Grund verweisen die Forscher auf diagnostische Untersuchungen, um eine mögliche Allergie auszuschließen [94-96].

2.3 Beschichtung von Implantaten

Wie bereits in Kapitel 2.2 erwähnt wurde, besitzen bestimmte Metalle als Implantatmaterial selbst hervorragende Eigenschaften, wie z.B. die Stabilität und Flexibilität. Der Metallkörper ist damit für die lasttragenden Eigenschaften des Implantates verantwortlich. Gerade bei Titanimplantaten ist jedoch die passivierende Oxidschicht die biologisch aktive Komponente, die mit dem umliegenden Gewebe interagiert. Für ein stabiles, reizloses und osteointegriertes Implantat ist diese Gewebeinteraktion und das damit verbundene Interface von großer Bedeutung. Somit war es naheliegend, dass die Verbesserung der Implantatoberflächen ein Grund für weitere Forschungen war. Das Ziel war die Kombination von den oben genannten werkstofflichen Eigenschaften des Metallkörpers und den osteophilen Oberflächeneigenschaften der Beschichtung. Es zeigte sich, dass sich raue und poröse Oberflächen positiv auf die Anlagerung von Knochen und die initiale Stabilität auswirken [9, 97]. Die Osteoblasten zeigten bei rauen oder porös beschichteten Oberflächen eine höhere Synthese von Extrazellulärmatrix mit anschließender Mineralisation. Die Porositäten bewirken eine Oberflächenvergrößerung, in welche zunächst Fibrin einwächst und sich vernetzt. Der entstandene bindegewebige Kallus mineralisiert anschließend und erhöht aufgrund der Mikroretention die Primärstabilität. Hench et al. beschrieben bei einer Porengröße $< 150 \mu\text{m}$ nur das Einwachsen einer knorpeligen Substanz ohne die nachfolgende Mineralisation [98]. Dabei fällt auf, dass der mittlere Porendurchmesser der intertrabekulären Spongiosa bei etwa $150 \mu\text{m}$ liegt. Bei eben dieser Porengröße wiesen Clemow et al. die größte Verbundfestigkeit (Scherfestigkeit) zwischen Knochen und Titanimplantaten nach [99]. Neben der Widerstandsfähigkeit gegenüber höheren Scherkräften, muss bei der Entfernung von Implantaten auch ein größeres Drehmoment aufgebracht werden [7, 100-102]. Die Fixation und schnellere Osteointegration führen letztendlich auch zum Anstieg der Langzeitstabilität. Die verschiedenen Oberflächenbehandlungen von Implantaten können in additive und subtraktive Methoden eingeteilt werden und reichen von Sandstrahlen, Schleifen und Polieren, über Ätzen bis hin zu Anodisieren, Beschichten und die Verwendung eines Lasers. Auch Kombinationen der Methoden sind im Einsatz [8, 103, 104].

Das Sandstrahlen ist eine der ersten und ältesten Methoden um eine raue Implantatoberfläche zu erzeugen und die Osteointegration zu verbessern. Dabei werden keramische Partikel, wie Titanoxid, Aluminiumoxid oder Calciumphosphate mit hoher Geschwindigkeit mittels Pressluft auf die Implantatoberfläche geschossen. Die Geschwindigkeit und die Größe der Partikel beim Auftreffen auf die Oberfläche der Implantate sind die wichtigsten Parameter, die die Oberflächenrauigkeit beeinflussen. Die Partikelgröße variiert normalerweise zwischen 25 bis 250 μm und erzeugt damit eine Oberflächenrauigkeit bestehend aus Vertiefungen und Gruben von 1,2 bis 2,2 μm [105-107]. Das Bestrahlen von Implantaten mit Aluminiumdioxid kann durch die hohe Aufprallgeschwindigkeit dazu führen, dass trotz anschließender Reinigung Partikel auf der Implantatoberfläche verbleiben. Verschiedene Untersuchungen legten nahe, dass das Aluminium als ein potenzielles Risiko für die Langzeit-Osteointegration der Implantate angesehen werden könnte [106-109].

Im Gegensatz zum Sandstrahlen entsteht durch das Schleifen eine maschinell gefertigte Oberfläche, die glatter als die sandgestrahlte ist und nur flache Rillen besitzt. Die Rauigkeit der Oberfläche liegt zwischen 0,5 bis 1 μm .

Die chemische Oberflächenbehandlung zur Steigerung der Oberflächenrauigkeit erfolgt mittels Säureätzung. Dabei sollte die Implantatoberfläche so modifiziert werden, dass keine Rückstände wie nach dem Sandstrahlen zu finden sind. Des Weiteren sollte damit die ungleichmäßige Behandlung der Oberfläche vermieden und der Verlust von Metallsubstanz aus dem Implantatkörper kontrolliert werden. Das homogene Aufrauen der Implantatoberfläche, unabhängig von Form und Größe, wird im Säurebad mit verschieden starken Säuren, wie Salzsäure (HCl), Schwefelsäure (H_2SO_4), Phosphorsäure (H_3PO_4), Flußsäure (HF) und Salpetersäure (HNO_3) durchgeführt. Das Aussehen der erodierten Oberfläche kann über die Säurekonzentration, die Zeit und die Temperatur gesteuert werden. Iwaya et al. zeigten in ihrer Studie, dass das Ätzen in konzentrierter Schwefelsäure zu einer raueren Titanoberfläche führte, als das Ätzen mit Salzsäure, Phosphorsäure, Flußsäure oder Salpetersäure [107, 110, 111]. Mehrere experimentelle und klinische Berichte zeigten, dass eine geätzte Implantatoberfläche, im Gegensatz zu einer nicht geätzten, maschinell gefertigten Oberfläche, eine viermal größere Festigkeit im Knochen aufwies [104, 107].

Die Kombination aus dem Sandstrahlen und der Säureätzung (SLA: Sand-blasted, Large-grit, Acid-etched) zeigte in den 1990er Jahren in Studien vielversprechende Ergebnisse. Die Implantatoberfläche wurde zuerst mit einer Körnung von 250 bis 500 μm sandgestrahlt, was eine Makrorauheit von ca. 20 bis 40 μm erzeugte. Anschließend erfolgte das Säurebad mit einer Mischung aus Salzsäure und Schwefelsäure, wodurch eine Mikrorauheit von ca. 2 bis 4 μm erreicht wurde [106, 107, 111]. Die SLA Oberfläche führte im Vergleich zu einer Titan-Plasma gespritzten Oberfläche zu einem besseren Knochenkontakt [110] und die Mischung von Salz- und Schwefelsäure hat einen zusätzlichen stimulierenden Einfluss auf die Knochenanlagerung [97]. Im Gegensatz zu einer maschinell gefertigten Oberfläche wies die SLA Oberfläche der Implantate eine größere Scherfestigkeit der Knochen-Implantat-Kontaktfläche auf und die mittleren Ausdrehmomentwerte waren etwa 30% höher [104]. Diese positiven Osteointegrationseigenschaften machten unter bestimmten Bedingungen eine verringerte Einheilzeit der Implantate und eine vorhersagbare frühere Belastung möglich [107, 112-114].

Eine weitere Möglichkeit die Oxidschicht bzw. die Oberfläche von Titanimplantaten zu modifizieren, ist das Anodisieren. Das Anodisieren ist ein elektrochemisches Verfahren, bei dem die Titanimplantate in einen Elektrolyten, wie Schwefelsäure (H_2SO_4), Essigsäure (CH_3COOH) oder Phosphorsäure (H_3PO_4), getaucht werden und eine Spannung angelegt wird. Die Dicke bzw. das Wachstum der entstehenden Oxidschicht kann durch die angelegte Stromdichte, die Elektrolytkonzentration, die Elektrolyttemperatur, die Rührgeschwindigkeit und das Verhältnis der Oberfläche von Kathode zu Anode variiert werden [111, 115]. Sul et al. zeigten in ihren Untersuchungen, dass die Oxidschichtdicke unter Verwendung von Essigsäure als Elektrolyt auf bis zu 1000 nm ansteigen kann. Das Verändern der elektrochemischen Parameter führte weiterhin zu verschiedenen Eigenschaften der Oxidschicht, wie die Porengröße, die Porosität und die Oberflächenrauigkeit [116]. Im Vergleich zu maschinell gefertigten Implantatoberflächen wiesen die anodisierten Implantatoberflächen eine verstärkte Zelladhäsion und Zellproliferation, sowie eine fehlende Zytotoxizität auf [111]. Die Verdickung der Oxidschicht verbessert zudem deutlich die Knochenantwort zwischen der Titanoberfläche und dem umliegenden Knochen bei der Osteointegration [117, 118].

Der Einsatz eines Lasers zur Veränderung der Implantatoberfläche ist in der heutigen Zeit ebenso in den Fokus von Forschung und Entwicklung gerückt. Der Laser ist in der Lage die Oberfläche kontaktfrei, mit hoher Genauigkeit und Effizienz zu bearbeiten. Es kommen CO₂-Laser und Nd:YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) zum Einsatz, die entweder Material von der Oberfläche abtragen oder auch bioaktive Materialien (z.B. Calciumphosphate) als Substrat auftragen. Die biomechanischen Eigenschaften der endgültigen Oberfläche werden dabei durch Energiedichte, Wellenlängenbreite, Scangeschwindigkeit und Pulsfrequenz des Lasers beeinflusst [111, 119]. Die mittels Laser veränderte Implantatoberfläche unterstützt die Osteointegration, indem sie die Härte, die Korrosionsbeständigkeit und die Reinheit der Oxidschicht erhöht [120]. Im Tierversuch an Hasen musste bei den mittels Laser bearbeiteten Implantaten ein größeres Drehmoment bei der Entfernung aufgebracht werden, als bei den Implantaten mit maschinell gefertigter Oberfläche [121, 122]. Gagli et al. verglichen Implantate mit einer Oberflächenbehandlung mittels Sandstrahlen, Schleifen und Laser. Dabei kamen Sie zu dem Schluss, dass die optimale Oberfläche mit der geringsten Verunreinigung bei den laserbehandelten Implantaten zu finden war [123].

2.3.1 Plasmaspritztechnik

Seit die hervorragenden Eigenschaften der Calciumphosphate erforscht und zunehmend bekannt wurden, gab es stetige Versuche diese als Beschichtung auf Metallimplantaten einzusetzen. Die meist genutzte Methode, um Implantate mit keramischen Beschichtungen zu versehen, ist die Plasmaspritztechnik [14]. Schon in den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde erkannt, dass die Implantatbeschichtung eine attraktive Alternative ist, um die positiven Eigenschaften von Metall und Calciumphosphaten zu kombinieren [10]. Die verwendeten Calciumphosphate sind z.B. Hydroxylapatit, Brushit und Monetit. Mit der Plasmaspritztechnik werden keramische Partikel bei sehr hohen Temperaturen (15.000 °C) in einen Plasmabrenner gespritzt und stark beschleunigt. Das durch den Plasmabrenner strömende Gas ist Argon oder Wasserstoff. Dabei schmelzen die Partikel in der Plasmaflamme, verfestigen sich durch den Aufprall auf das Metallsubstrat und bilden eine dünne Schicht. Das Plasmaspritzverfahren kann unter Umgebungs- oder Niederdruckbedingungen durchgeführt werden. Um die Haftfestigkeit der Beschichtung auf den Implantaten zu

erhöhen und dichtere Schichten zu erhalten, kann das Plasmasprayen auch unter Vakuum durchgeführt werden. Eine zusätzliche Erhöhung der Retention auf der Implantatoberfläche wird durch Sandstrahlen oder ähnliche Methoden erreicht [52, 124].

Aufgrund der hervorragenden Biokompatibilität von z.B. Hydroxylapatit kommt es bei den beschichteten Implantaten zu einer rascheren Neubildung von Knochen direkt auf dem Implantat ohne eine dazwischenliegende Bindegewebsschicht. Der Knochen wächst schnell in die vorhandenen Poren der Beschichtung ein, was die primäre Fixation verbessert und zu einer höheren Langzeitstabilität führt. Die Beschichtung verhindert zudem ein Freiwerden von Metallionen und schützt damit das umliegende Gewebe [11, 12, 74, 125-127].

Die hohen Temperaturen, die während des Plasmaspritzens auftreten, liegen weit über dem Schmelzpunkt von Hydroxylapatit und verändern dessen Kristallinität, was zu einem starken Anstieg des amorphen Anteils führt [13, 18]. Durch den Prozess kann es zur Transformation zwischen den Phasen kommen, sodass sich Tricalciumphosphate oder Tetracalciumphosphate bilden können [128]. Sie besitzen unterschiedliche Ca/P-Verhältnisse und beeinflussen damit nicht nur die Stabilität der Beschichtung, sondern auch ihre Löslichkeit und die Reaktion des Knochens [16]. Somit ist es schwer, Beschichtungen mit präzisen physikalischen und chemischen Eigenschaften herzustellen [128]. Treten während des Plasmaspritzens Temperaturschwankungen auf, ist eine Schwächung der Beschichtung nicht auszuschließen. Brüche, Lufteinschlüsse, oxidierte überhitze Partikel und nicht geschmolzene Partikel sind Faktoren, die die mechanische Festigkeit und die Haftung zwischen Beschichtung und Implantat signifikant reduzieren können [52]. Ein weiteres Problem liegt in der schlecht zu regulierenden Dicke der Beschichtung. Es zeigte sich schnell, dass dünnere Beschichtungen mit 50 µm höheren Scherkräfte widerstanden, als dickere mit 200 µm. Kam es zur Fraktur zwischen Implantat und Knochen, brach die Verbindung bei 50 µm zwischen Beschichtung und Knochen, bei 200 µm jedoch zwischen Beschichtung und Implantat [10, 12]. Die dünneren Schichten wiesen eine bessere Stabilität nach der Implantation auf, während eine dickere Beschichtung zu einer höheren Brüchigkeit der Calciumphosphate führte [129]. Eine große Schwierigkeit besteht zudem in der

Herstellung von gleichmäßigen, dünnen Beschichtungen bei kompliziert gestalteten Oberflächen der Implantate (z.B. Riefen bei Schrauben) [26, 130].

2.3.2 Elektrochemische Abscheidung

Die unterschiedlichen Methoden der elektrochemischen Abscheidung sind Verfahren mit vergleichsweise geringem technischen Aufwand, die entweder anodisch (anodische Oxidation) oder kathodisch (elektrophoretische oder kathodische Abscheidung) ablaufen können. Die elektrophoretische Abscheidung (EPD) ist ein kolloidales Verfahren, bei dem geladene Partikel, die in einem flüssigen Medium dispergiert oder suspendiert sind, aufgrund eines elektrischen Feldes angezogen werden und sich auf einen entgegengesetzt geladenen Substrat abscheiden [131, 132]. Sie kann in zwei Teilschritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wandern die geladenen Teilchen in einer Suspension, unter Einfluss eines angelegten elektrischen Feldes, zur entgegengesetzt geladenen Elektrode. Im zweiten Schritt sammeln sich die Teilchen an einer der Elektroden und scheiden sich auf ihr ab [131, 133]. Wie von Van der Biest et al. beschrieben wurden, kann die elektrophoretische Abscheidung auf jeden Feststoff angewendet werden, der in Form eines feinen Pulvers ($< 30 \mu\text{m}$) oder einer kolloidalen Suspension vorliegt. Dafür eignen sich zum Beispiel Metalle, Polymere, Carbide, Oxide, Nitride und Gläser [133, 134]. Als Lösungsmittel werden in der Literatur zum Beispiel Ethanol, Aceton, Acetylaceton, Isopropanol, Essigsäure, Wasser oder Mischungen aus diesen Stoffen beschrieben [132, 135]. Die Verwendung von wasserbasierten Suspensionen kann aufgrund der Elektrolyse des Wassers zu Problemen führen. Die dabei entstehenden Gasblasen können die Qualität der abgeschiedenen Schichten negativ beeinflussen [131-133].

Die anodische Oxidation ist ein elektrolytisches Verfahren zur Erzeugung von Oxidschichten auf Metallen. Das zu anodisierende Metall wird als Anode verwendet und der Vorgang findet in einer Elektrolysezelle bei konstantem Strom (Galvanostatischer Prozess) oder konstanter Spannung (Potentiostatischer Prozess) statt. Aufgrund der chemischen Reaktion zwischen dem Metall und dem Elektrolyt bildet sich auf der Metalloberfläche die Oxidschicht. Titan kann beispielsweise in sauren oder nicht-sauren Elektrolyten anodisch oxidiert werden. Wird als Elektrolyt eine Lösung verwendet, die Calciumacetat und Glycerophosphat enthält, so wurden Calcium und

Phosphat auf Titanoxid abgeschieden und waren für die Bildung von Hydroxylapatit wichtig [136]. Die Zugabe wiederum von Flusssäure zum Elektrolyten führt bei Titan zur Nanostrukturierung [137, 138]. Dabei wird durch die Oxidation die Titanpassivschicht verstärkt und die Fluoridionen ätzen Kanäle hinein [139].

Die kathodische oder elektrochemisch gestützte Abscheidung (ECAD) ist die in dieser Arbeit verwendete Methode. Sie wurde in den 1990er Jahren das erste Mal von Redepenning et al. [20] und Shirkhanzadeh et al. [25] eingesetzt. Mit ihr war es möglich, mit einem Calcium- und Phosphationen enthaltenden Elektrolyten bei relativ niedrigen Temperaturen Calciumphosphatbeschichtungen auf Titanlegierungen abzuscheiden. Durch Veränderung von Temperatur, pH-Wert und Elektrolytzusammensetzung gelang es, Einfluss auf die chemische Zusammensetzung (Hydroxylapatit, Bruschit, Monetit) und die mechanischen Eigenschaften der Beschichtung zu nehmen [25, 28]. Ein Ändern der Beschichtungszeit oder der angelegten Stromstärke bzw. Spannung ließ Schichtdicken von unter 1 μm entstehen und führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Delamination [140]. Durch die Kontrolle der Kristallinität und Modulierbarkeit des Ca/P-Verhältnisses verbesserte sich die Biodegradation und Resorbierbarkeit der Schichten [52, 141]. Mit all diesen Einstellungen lassen sich dem Knochenmineral sehr ähnliche, dünne Calciumphosphatschichten auf porösen Oberflächen und irregulär geformten Strukturen abscheiden. Eine Kombination der Elektrolyte mit organischen Komponenten (Proteinen) und Kristallisationsinhibitoren ist zudem ohne weiteres möglich [142-144]. Die ablaufenden Prozesse bei der Beschichtung wurden von Redepenning et al. beschrieben [21]. Nach dem Anlegen einer Spannung läuft in der elektrochemischen Zelle eine Kombination aus elektrochemischen Halbreaktionen, Säure-Base- und Ausfällungsreaktionen ab. Zuerst erfolgt die Reduktion von Wasser an der Kathodenoberfläche, um Hydroxidionen und Wasserstoff Gas zu gewinnen:



Die an der Oberfläche entstandenen Hydroxidionen reagieren weiter mit Dihydrogenphosphat und es stellt sich folgendes Gleichgewicht ein:



Die Abscheidung von Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in Anwesenheit von Calciumionen wird von der nachfolgenden Reaktion beschrieben:



2.4 Inhibition der Brushitbildung

Wie bereits in Kapitel 2.3.2 aufgezeigt, ist eine Veränderung der Elektrolytzusammensetzung bzw. die Zugabe von bestimmten Stoffen ohne größeren Aufwand möglich, um die entstehenden Schichten zu modifizieren. Schon in den 1960er Jahren zeigten Forschungen, dass der menschliche Körper Kristallisationsinhibitoren bei der Entstehung von Brushit und anderen Calciumphosphaten zum Beispiel im Urin nutzt [30, 36, 38]. Die inhibierende Wirkung von Zitronensäure, Phytinsäure und Natriumdiphosphat (Pyrophosphat) wurde vom Körper auf die Knochenzemente übertragen [58] und sollte deshalb bei der elektrochemischen Abscheidung genauer untersucht werden.

Die Anwesenheit von Zitronensäure verlangsamt das Kristallitwachstum von Calciumphosphaten und inhibiert es in bestimmten Richtungen [37]. Im Knochenmineral lagern sich die Citrationen auf der Oberfläche an und spielen dabei eine wichtige Rolle für die Löslichkeit und das Remodeling [145]. Der inhibitorische Effekt auf Brushit wird mittlerweile zur Vorbeugung von Nierensteinen genutzt und verlängert die Abbindezeit und Haltbarkeit von Calciumphosphatzementen [146]. Böhner et al. zeigten, dass mit der Inhibition eine Veränderung der Kristallitgröße und -form einher geht [147]. Die Wirkung der Zitronensäure wird über die Bildung eines Dicalciumphosphat-Citrat-Komplexes erreicht. Die Calciumionen an der Oberfläche eines Brushitkristalles werden von der negativ geladenen Carboxylgruppe der Zitronensäure gebunden, wodurch sich die Präzipitation des Brushit verzögert [148]. Ein Einbau der Säure in die Kristallstruktur findet jedoch nicht direkt statt [149].

Die Phytinsäure ist ein natürlicher Inhibitor und kommt, wie die Zitronensäure, im menschlichen Körper vor [34, 150, 151]. Sie findet sich im Blut, im Urin, sowie in interstitiellen und intrazellulären Flüssigkeiten wieder. Phytinsäure besitzt, wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), starke chelatbildende Eigenschaften gegenüber

Calciumionen [152, 153]. Sie beugt damit pathologischen Calcifizierungen in der Niere vor und blockiert die Brushitabscheidung [35].

Der erste entdeckte und untersuchte biologische Inhibitor war das anorganische Pyrophosphat (Diphosphat). Im Blut, im Urin und in der Gelenkflüssigkeit inhibiert es bei sehr geringen Konzentrationen die Abscheidung und blockiert bei effektiven Konzentrationen das Wachstum von Hydroxylapatit [36]. *In vitro* inhibieren Pyrophosphate die Transformation von amorphen Calciumphosphaten in ihre kristalline Form, indem sie die Auflösungsrate des amorphen Materials reduzieren [154] und die Umwandlung der amorphen Vorstufe von Hydroxylapatit stabilisieren [54]. Das Senken der Löslichkeit geschieht durch Adsorption von Pyrophosphat an der Oberfläche der frühen, kleinen Kristalle. Damit wird nicht nur das Kristallitwachstum gehemmt, sondern auch der Austausch von Calcium- und Phosphationen inhibiert [54, 147]. In Brushitzementen bindet Pyrophosphat an die Kristallisationskeime der Calciumsalze, verhindert den Einbau von Ionen in das Kristallgitter und hindert die Kristalle am Erreichen einer kritischen Größe, die das Wachstum und die Aggregation ermöglicht. Daraus resultieren kleine, dicht zusammengelagerte Kristalle, die die Zementeigenschaften verbessern [155].

3. Material und Methoden

3.1 Herstellen definierter gestrahlter Oberflächen

3.1.1 Vorbereitung der Titanplättchen

Die runden Titanplättchen (Titan cp 2) besaßen im Durchschnitt einen Durchmesser von 15,4 mm, eine Dicke von 1,1 mm und eine Bohrung von 1,6 mm. Für die nachfolgende elektrochemische Beschichtung erfolgte die Reinigung im Becherglas mittels Ultraschall. Für 10 min wurden die Plättchen in 5%iger Extran-Lösung (Merck KGaA, Darmstadt) gereinigt. Die Lösung wurde anschließend zweimal durch ausreichend Reinstwasser ersetzt und mit den Plättchen jeweils 10 min im Ultraschallbad Sonorex (Fa. Bandelin electronic, Berlin) gereinigt. Nachdem die Titanplättchen getrocknet waren, wurden sie einzeln in 24-Wellplatten (Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden; Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg) aufbewahrt, um ein nachfolgendes gegenseitiges Zerkratzen zu verhindern.

Nach erfolgter Reinigung wurden die Proben im Sandstrahlgerät Basic Quatro (Fa. Renfert GmbH, Hilzingen) mit Korox 50 (Fa. BEGO, Bremen) für jeweils 10 s bei 3 bar Luftdruck und aus 2 cm Abstand unter kreisenden Bewegungen abgestrahlt. Diese Prozedur diente der Oberflächenvergrößerung und -aufrauung, um bessere und gleichmäßigere Schichten zu erzielen.

Um Verunreinigungen der Plättchen durch Strahlsand und Abrieb von Sand und Titan, sowie durch manuelle Verschmutzung (Handschuhpuder, Hautfett) zu entfernen, wurden die Proben erneut, wie oben beschrieben, gereinigt.

3.1.2 Der Standardelektrolyt

In dieser Arbeit wurden die Titanplättchen, mit dem von Redepenning [21] entwickelten Elektrolyten, zur Ermittlung der optimalen Stromstärke im Einfach-Schraubprobenhalter mit unterschiedlichen Stromstärken beschichtet. Dies diente dazu, eine makroskopisch dünne und gleichmäßige Schicht ohne Aufwerfungen oder Blasen herzustellen, sowie die passenden Konzentrationen für die Inhibitoren zu finden. Die im Schraubprobenhalter befestigten Plättchen besaßen eine Oberfläche von ca. 4,26 cm².

Die verwendeten Stromstärken im Einfach-Probenhalter waren: -5 mA, -10 mA, -20 mA, -30 mA, -40 mA, -45 mA, -50 mA, -60 mA, -70 mA, -80 mA und -90 mA. Die Beschichtungsdauer variierte zwischen 600 s und 900 s. Die bei allen weiteren Proben, mit und ohne Inhibitorzugabe, verwendete Stromstärke für die Abscheidung betrug -60 mA (Stromdichte 14,1 mA/cm²).

Um für die Untersuchungen im XRD, dem Rasterelektronenmikroskop und den Zelltests mehr vergleichbare Proben herzustellen, wurde nach den Vorversuchen mit dem Einfach-Probenhalter auf einen Vierfach-Probenhalter gewechselt. Um gleiche Schichten wie bei den Vorversuchen zu erhalten, wurde im Vierfach-Probenhalter eine Stromstärke von -320 mA (Stromdichte: 18,8 mA/cm²) verwendet.

3.1.3 Herstellen des Elektrolyten

Die Herstellung des Standardelektrolyten für die Abscheidung von Brushit erfolgte nach den Angaben von Redepenning et al. [21]. Mit der Feinstwaage Ohaus Explorer T2914 (OHAUS Corp., Parsippany, USA) wurden 15 g Calcium-Phosphat Monohydrat monobasisch mit Reinstwasser aus einer Reinstwasseranlage aurium pro VF TOC (Fa. Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen) gemischt und auf 500 ml aufgefüllt, bis eine klare Lösung entstand [21]. Die Lösung wurde anschließend mit dem Magnetrührer IKA RCT Basic (IKA Werke GmbH & CO. KG) für 30 min bei 1000 rpm durchgerührt.

Zum Elektrolyt wurde in den verschiedenen Versuchen jeweils einer der Inhibitoren gegeben. Brečević et al. verwendeten für die Inhibierung mit Zitronensäure $0 - 2 \cdot 10^{-3}$ mol/l [37]. Aufgrund dieser Angaben wurden in dieser Arbeit 0,526 g/l ($2,4 \cdot 10^{-3}$ mol/l), 1,052 g/l ($5,0 \cdot 10^{-3}$ mol/l) und 10,506 g/l ($5,0 \cdot 10^{-2}$ mol/l) Zitronensäure zum Elektrolyt hinzu gegeben.

Bei der Inhibierung der Abscheidung von Brushit mit Pyrophosphat nutzten Grases et al. $5,75 \cdot 10^{-6}$ mol/l als geringste Konzentration mit inhibierendem Effekt und $46,0 \cdot 10^{-6}$ mol/l als extrapolierte Konzentration für eine totale Brushitinhibition für mindestens 1 h [34]. In der Versuchsreihe wurden 0,026 g/l ($5,82 \cdot 10^{-5}$ mol/l); 0,12 g/l ($2,69 \cdot 10^{-5}$ mol/l); 0,26 g/l ($5,82 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und 0,52 g/l ($1,16 \cdot 10^{-5}$ mol/l) tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat verwendet.

Zur weiteren Inhibierung mit Phytinsäure dienten $3,03 \cdot 10^{-6}$ mol/l als geringste Konzentration mit inhibierendem Effekt und $12,12 \cdot 10^{-6}$ mol/l, als extrapolierte Konzentration für eine totale Bruschitinhibition für mindesten 1 h von Grases et al. als Orientierungswerte [34]. In der Versuchsanordnung kamen 2 g/l ($3,03 \cdot 10^{-3}$ mol/l) und 4 g/l ($6,06 \cdot 10^{-3}$ mol/l) Phytinsäure zur Verwendung.

Der pH-Wert der Elektrolytlösungen wurde nach dem Rühren mit Hilfe des pH-Wert-Messgeräts inolab pH Level 1 (WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim) bei 20 °C gemessen.

3.2 Aufbau der Beschichtungsapparatur

Der für die galvanostatische Beschichtung notwendige Strom wurde mit dem Wenking LPG03-S Laboratory Potentiostat-Galvanostat (Bank Elektronik GmbH, Clausthal-Zellerfeld) und der dazugehörigen CPC Software angelegt. Die Kontrolle der Stromstärke erfolgte durch den Integra Series 2700 Multimeter (Keithley Instruments GmbH, Germering), welcher zwischen den Arbeitselektrodenausgang des Spannungsteilers und den Probenhalter geschaltet war. Als elektrochemische Zelle wurde ein doppelwandiges Glasgefäß (Schott AG, Mainz) verwendet, in dem sich der Elektrolyt bei 24 °C Raumtemperatur befand. Als Gegenelektrode kam ein zylinderförmiges Platindrahtnetz mit 7 cm Durchmesser und 8 cm Höhe zum Einsatz. Der Versuchsaufbau ist im Original in Abbildung 1 und als schematische Darstellung in Abbildung 2 zu sehen.

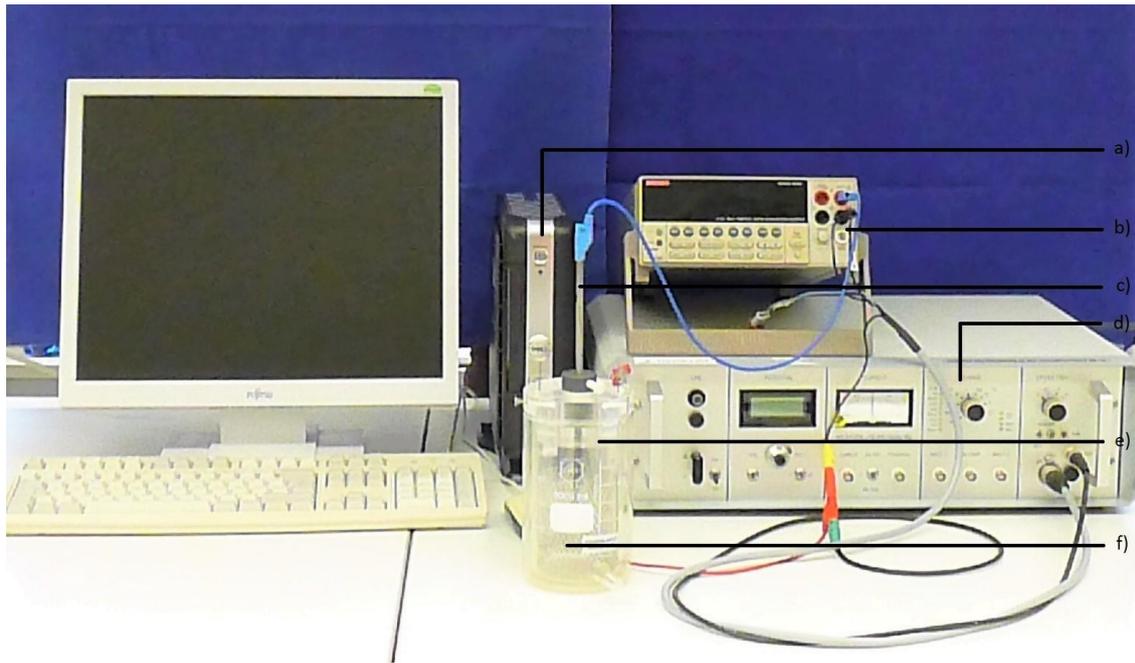


Abbildung 1: Versuchsaufbau im Original. a) Computer mit CPC Software, b) Integra Series 2700 Multimeter, c) Probenhalter, d) Wenking LPG03-S Laboratory Potentiostat-Galvanostat, e) doppelwandige elektrochemische Zelle, f) Platindrahtnetz

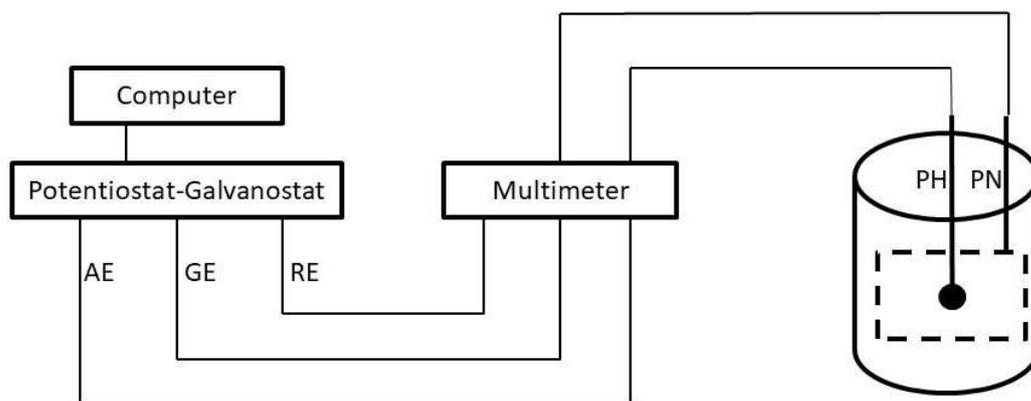


Abbildung 2: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Computer, Potentiostat-Galvanostat mit Arbeitselektrode (AE), Gegenelektrode (GE) und Referenzelektrode (RE), Multimeter, elektrochemische Zelle mit Probenhalter (PH) und Platindrahtnetz (PN) im doppelwandigen Glasgefäß

3.3 Durchführung der galvanostatischen Beschichtung

Die am Probenhalter fixierten Plättchen (s. Abbildung 3) wurden in den hergestellten Elektrolyten getaucht. Die Beschichtungsdauer bei angelegtem Strom betrug 600 s oder 900 s. Nach der Abscheidung wurden die Proben sofort aus dem Elektrolyten genommen und vom Probenhalter entfernt. Die Trocknung an der Luft und die anschließende Aufbewahrung erfolgte in 12-Wellplatten (Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden; Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg).

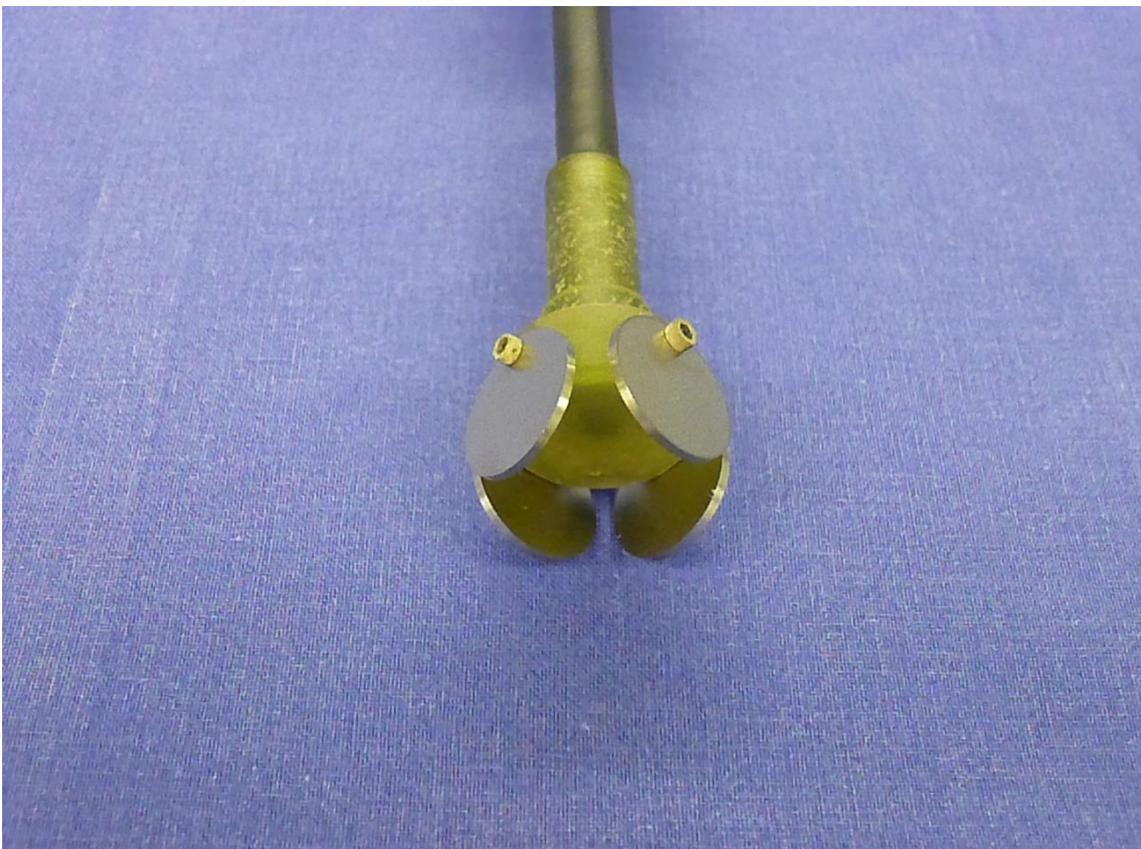


Abbildung 3: Originalaufnahme des Vierfach-Probenhalters mit befestigten Titanplättchen vor der Beschichtung

3.4 Charakterisierung der Schichten

Die Titanplättchen wurden vor der Beschichtung und nach der Trocknung der Beschichtung mit Hilfe der Feinstwaage Ohaus Explorer T2914 (OHAUS Corp., Parsippany, USA) gewogen.

Alle diffraktometrischen Messungen wurden mit einem Siemens D5005 Röntgendiffraktometer (Brukers AXS, Karlsruhe) durchgeführt. Die Kathodenspannung der Röntgenröhre betrug 40 kV bei einem angelegten Strom von 40 mA und erzeugte eine Kupfer-K_α-Strahlung, die die Proben in Bragg-Brentano-Geometrie in einem Winkelbereich von 20° bis 40° bei einer Schrittgeschwindigkeit von 3 s pro Step und einer Schrittweite von 0,02° maß. Die Beschleunigungsspannung der Elektronen betrug 10 keV.

Die aufgetragenen Bruschitschichten wurden unter Verwendung des Rasterelektronenmikroskops DSM 940 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) auf ihre Morphologie und Oberflächenbeschaffenheit hin untersucht. Zur Erhaltung einer im Rasterelektronenmikroskop sichtbaren und leitfähigen Oberfläche wurden die mit Bruschi beschichteten Titanplättchen mit Reinstgold bei einer Stromstärke von 20 mA über 4 min bedampft, welches mit Hilfe des Sputter Coater K550 (Emitech Ltd, Kent, England) erfolgte.

Die Halbwertsbreite, welche die Breite bestimmter Peaks im Diffraktogramm ist, wurde mittels der Eva Software (Bruker Corp. Billerica, MA, USA) aus den Rohdaten der Röntgendiffraktogramme bestimmt. Die gemessene Halbwertsbreite und der entsprechende Winkel aus dem Röntgendiffraktogramm wurde genutzt, um mittels der Scherrer-Gleichung [156] die Ausdehnung der Kristalle senkrecht zu den Netzebenen des Reflexes zu berechnen.

$$\Delta(2\theta) = \frac{K\lambda}{L \cos \theta} \quad (4)$$

In der Gleichung ist $\Delta(2\theta)$ die volle Halbwertsbreite des Reflexes gemessen in Bogenmaß, $K = 0,9$ der Scherrer-Formfaktor, $\lambda = 0,154$ nm die Wellenlänge der Röntgenstrahlung, L die Ausdehnung des Kristalls und $\cos \theta$ der Kosinus des Beugungswinkels.

3.5 Optimale Beschichtungsparameter für Desinfektion, Sterilisation und Zelltests

Um die Proben und Beschichtungen zukünftig auch klinisch untersuchen zu können, wurde jeweils eine definierte Konzentration pro Inhibitor bei 900 s Beschichtungsdauer ausgewählt und die resultierende Beschichtung nach verschiedenen Methoden desinfiziert und sterilisiert. Die Stromstärke für Beschichtungen betrug wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben -320 mA (Stromdichte: 18,8 mA/cm²). Für die Abscheidung wurden die Bruschitschichten mit 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat oder 2 g/l Phytinsäure inhibiert.

3.5.1 Desinfektion mit Ethanol

Die hergestellten Bruschitplättchen wurden für 30 min pro Seite in einer Petrischale mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Danach wurden sie aus den Schalen entnommen und an der Luft getrocknet, sodass das verbliebene Ethanol verdampfen konnte.

3.5.2 Sterilisation im Autoklaven

Die Sterilisation wurde in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Parametern im Autoklav Tuttnauer 3870 ELV (Fa. Systec GmbH, Wetzlar) durchgeführt. Eine Charge an bruschitbeschichteten Plättchen wurde trocken, in einer Petrischale ohne Pufferlösung, für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Der andere Teil der ausgewählten Bruschitplättchen wurde in eine Petrischale mit 70 %igem PBS-Puffer gelegt und anschließend autoklaviert. Nach dem erfolgten Autoklavieren wurde der verbliebene PBS-Puffer abgesaugt und die Plättchen an der Luft getrocknet. Nach der Sterilisation wurden die Plättchen erneut gewogen und mittels Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie bezüglich Schichtzusammensetzung und Morphologie charakterisiert.

3.6 WST-Zellvitalitätstest und Bestimmung der Zellzahl

Beide Verfahren dienen der Untersuchung der Vitalität von Zellen auf den unterschiedlich beschichteten Titanplättchen, sowie deren möglicher Zytotoxizität. Für diese Zellversuche wurden humane fötale Osteoblasten hFOB 1.19 (LGC Standards, Manassas, USA) verwendet. Die sterilisierten Prüfkörper wurden in die Inserts von 24-Wellplatten überführt. Jede Wellplatte enthielt vier leere Wells als

Polystyrol-Referenz und jeweils vier Wells mit Bruschitplättchen, deren Bruschitabscheidung durch 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat oder 2 g/l Phytinsäure inhibiert wurde. Alle verwendeten Plättchen wurden mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Die Zellen wurden sowohl in die PS Inserts als auch in die Inserts mit den Prüfkörpern ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte statisch bei 34 °C und 5 % CO₂ im Inkubator (Fa. Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold). An den Tagen 3, 5, 7, und 9 wurde das Kulturmedium gewechselt. Die Analyse der Zellaktivität (WST-Test) und die Bestimmung der Zellzahl erfolgten an den Tagen 4, 6, 10 und 12.

Der WST-1 Test wird zur Bestimmung der Zellproliferation, Zellviabilität und Zytotoxizität über die Aktivität der Succinatdehydrogenase genutzt. WST-1 ist ein schwach rotes, stabiles Tetrazoliumsalz, welches von der Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase in der mitochondrialen Atmungskette der Zellen, zum gelborangen Formazan umgewandelt wird [157]. In einem Spektralphotometer wird die Absorption, die von der Konzentration des umgesetzten Formazans abhängt, gemessen.

Vor dem Start der Untersuchungen wurden Reagenzien wie PBS-Puffer und Zellkulturmedium im Wasserbad (Fa. Memmert GmbH & Co KG, Schwabach) auf 37 °C, bzw. WST-1 und Accutase auf Raumtemperatur erwärmt. Das Medium der 24-Wellplatte wurde abgezogen und dann 500 µl 1:10 WST-1 Mischlösung zugegeben. Die Wellplatte blieb für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator. Anschließend wurde die Mischlösung in eine neue 24-Wellplatte pipettiert und somit jede Weiterreaktion der WST-1 Lösung unterbunden. In die PS und Prüfkörper-Inserts wurde danach PBS-Puffer gegeben. Jeweils 200 µl des WST-1-Gemisches (Doppelbestimmung) wurden in zwei Inserts einer 96-Wellplatte übertragen. Als Leerwert fungierten 200 µl der reinen WST-1 Verdünnung. Die Extinktion des Formazans der Proben wurde im ELISA-Reader Spectrafluor plus (Fa. Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) ermittelt. Der Messfilter betrug 450 nm und der Referenzfilter 690 nm. Mit Hilfe der Magellan 3 Software erfolgte das Subtrahieren der Absorptionen vom Leerwert. Die sich ergebende Differenz veranschaulicht die Zellaktivität. Der PBS-Puffer der Inserts wurde noch ein zweites Mal gewechselt und danach abgesaugt. Um die Zellen von der Oberfläche abzulösen, wurden sie mit 500 µl

Accutase versetzt und wieder 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von 500 µl Zellkulturmedium wurde die Reaktion gestoppt. Die Mischung wurde erst 20 mal und danach erneut 10 mal durchgemischt und letztendlich 100 µl in ein mit 1 ml isotonischer Lösung gefülltes Zählgefäß (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) pipettiert. Die Zellen im Zählgefäß wurden im Zellzähler Typ Casy (Roche GmbH, Mannheim) gezählt.

4. Ergebnisse

4.1 pH-Werte der Elektrolyten

Die Ergebnisse der pH-Wertmessung sind in Tabelle 2 gezeigt. Der Standardelektrolyt besaß einen pH-Wert von 2,74. Im Vergleich dazu führte die Zugabe von Zitronen- und Phytinsäure zu einer Absenkung der pH-Werte. Mit der Inhibierung durch Natriumdiphosphat glichen die pH-Werte nahezu dem des Standardelektrolyten. Mit steigender Zitronensäurekonzentration verringerten sich die pH-Werte. Innerhalb der Beschichtungsreihe mit Zitronensäureinhibition wurden der höchste pH-Wert mit 2,70 bei 0,526 g/l und der niedrigste mit 2,43 bei 10,506 g/l gemessen. Bei tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat wurden, bis auf 2,78 bei 0,52 g/l, gleiche pH-Werte gemessen. Die unterschiedlichen Phytinsäurekonzentrationen mit 2 g/l und 4 g/l ergaben einen gleichen pH-Wert von 2,68. So ließ sich erkennen, dass die Zugabe von Natriumdiphosphat bzw. Phytinsäure keine nennenswerten pH-Wert-Unterschiede im Vergleich zum Standardelektrolyt ergab. Lediglich die Zitronensäurezugabe führte zu einem geringen Absinken der pH-Werte.

Tabelle 2: Gemessene pH-Werte der Elektrolyten

Elektrolyt	Konzentration [g/l]	pH-Wert
Standardelektrolyt		2,74
+ Zitronensäure	10,506	2,43
$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	1,052	2,57
	0,526	2,70
+ Natriumdiphosphat	0,52	2,78
$Na_4P_2O_7 \cdot 10 H_2O$	0,26	2,72
	0,12	2,72
	0,026	2,72
+ Phytinsäure	4	2,68
$C_6H_{18}P_6O_{24}$	2	2,68

4.2 Vergleich der beschichteten Bruschitmassen

In Abbildung 4 sind die Schichtmassen nach 600 s und 900 s Beschichtungszeit aufgetragen. Die dargestellten Werte zeigen Mittelwerte mit dazugehöriger Standardabweichung.

Bei einer Zugabe von Zitronensäure war ein deutlicher Verlust der Bruschitmasse zu erkennen. Während bei 10,506 g/l Zitronensäure keine Bruschitschicht entstand und nur die Masse des Titanplättchens abnahm, verringerte sich bei 1,052 g/l und 0,526 g/l Zitronensäure die Bruschitmasse. Bei einer Beschichtungsdauer von 600 s und mit einer InhibitorKonzentration von 0,526 g/l schied sich dieselbe Masse an Bruschit auf dem Titanplättchen ab, wie beim Standardelektrolyten. Dagegen nahm die abgeschiedene Masse an Bruschit bei 900 s Beschichtungszeit ab.

Die Zugabe von tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat erbrachte eine Massenzunahme, sowohl bei 600 s, als auch bei 900 s Beschichtung im Vergleich zum Standardelektrolyt. Die Bruschitmasse nach der Abscheidung war während 600 s Beschichtungszeit bei der Zugabe von 0,026 g/l und 0,12 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat gleich der Bruschitmasse vom Standardelektrolyten. Mit Inhibierung der Abscheidung durch 0,26 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat entstand bei 600 s Beschichtungszeit eine größere Masse als bei 900 s.

Die Abscheidung von Bruschit unter Inhibition von 2 g/l und 4 g/l Phytinsäure nahm bei 600 s und 900 s Beschichtungszeit im Vergleich zum Standardelektrolyt ab. Bei beiden Konzentrationen schied sich über 900 s Beschichtungszeit eine größere Masse als bei 600 s ab.

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei 900 s Beschichtungszeit in der Regel eine höhere Masse, als bei 600 s, gemessen werden könnte. Ausnahmen stellten hierbei die Beschichtung dar, die mit 0,526 g/l Zitronensäure und 0,26 g/l Natriumdiphosphat inhibiert wurden.

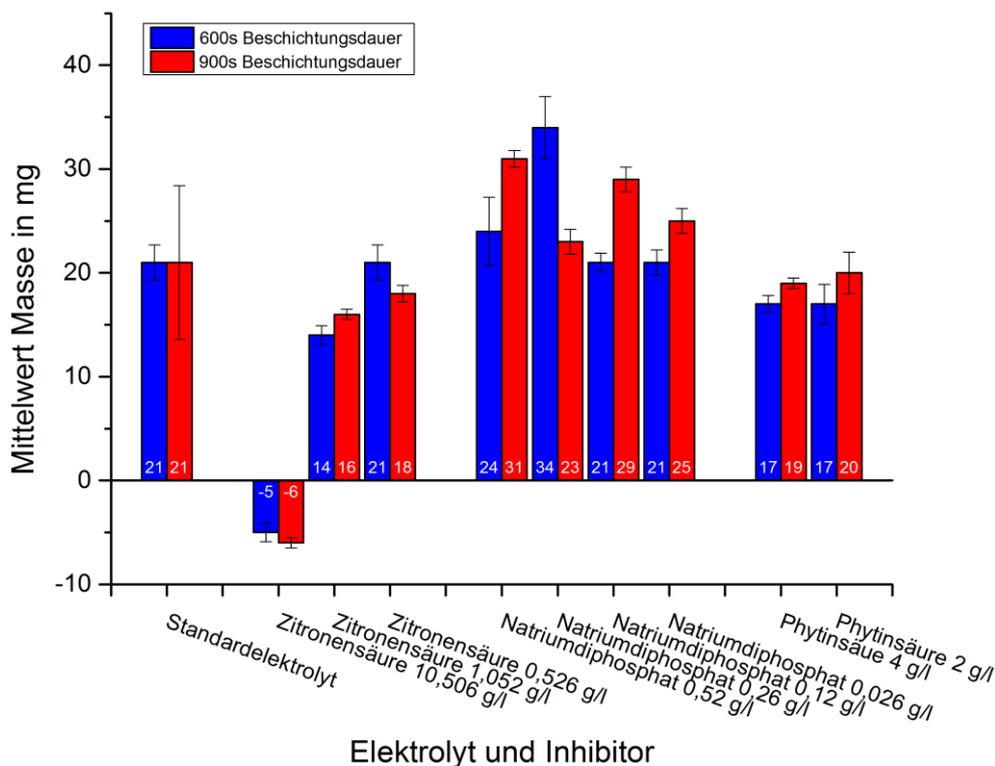
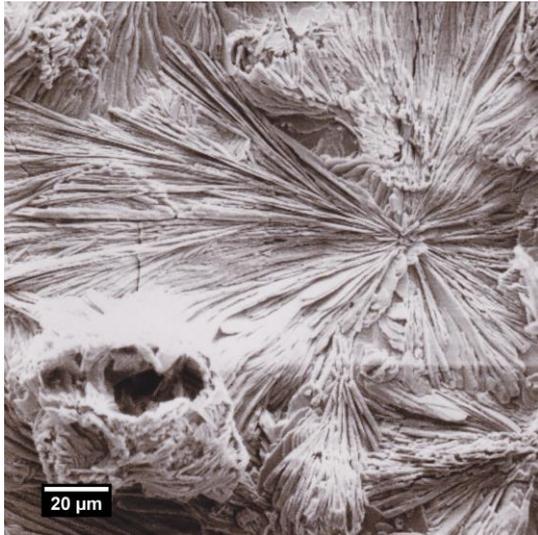


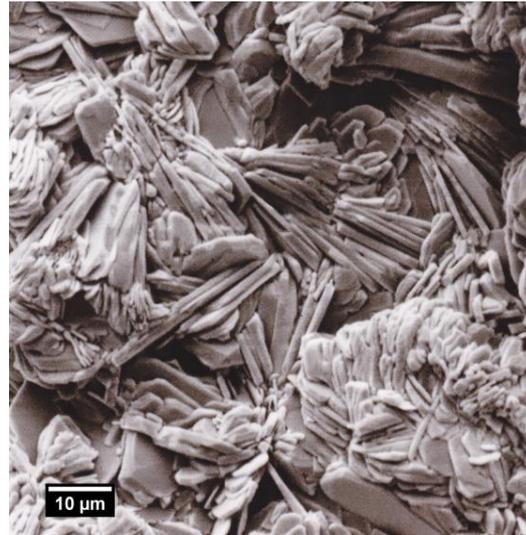
Abbildung 4: Vergleich der Mittelwerte der Masse der Bruschschichten auf Titanplättchen mit Standardabweichung beschichtet mit dem Standardelektrolyt sowie der Inhibition durch Zitronensäure, tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Phytinsäure. Die Anzahl der Messungen betrug beim Standardelektrolyt mit 900 s Beschichtungszeit 12 und bei allen anderen Elektrolyten 4.

4.3 Vergleich der Morphologie der Bruschschichten mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie

Die aus dem Standardelektrolyt und der Zugabe von 10,506 g/l; 1,052 g/l und 0,526 g/l Zitronensäure; 0,52 g/l; 0,26 g/l; 0,12 g/l und 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat; 4 g/l und 2 g/l Phytinsäure entstandenen Bruschschichten wurden mittels Rasterelektronenmikroskopie bezüglich ihrer Morphologie verglichen. Die Beschichtungszeit betrug jeweils 600 s und 900 s. Der Standardelektrolyt fungierte hier bei beiden Beschichtungszeiten als Referenz, zur Beurteilung und zum Vergleich der restlichen Schichten. Es stellten sich bei 600 s und 900 s die üblichen sternförmigen Anordnungen dar, welche kubische, plättchen- bzw. lamellenförmige Kristalle bildeten (s. Abbildung 5 A und B).



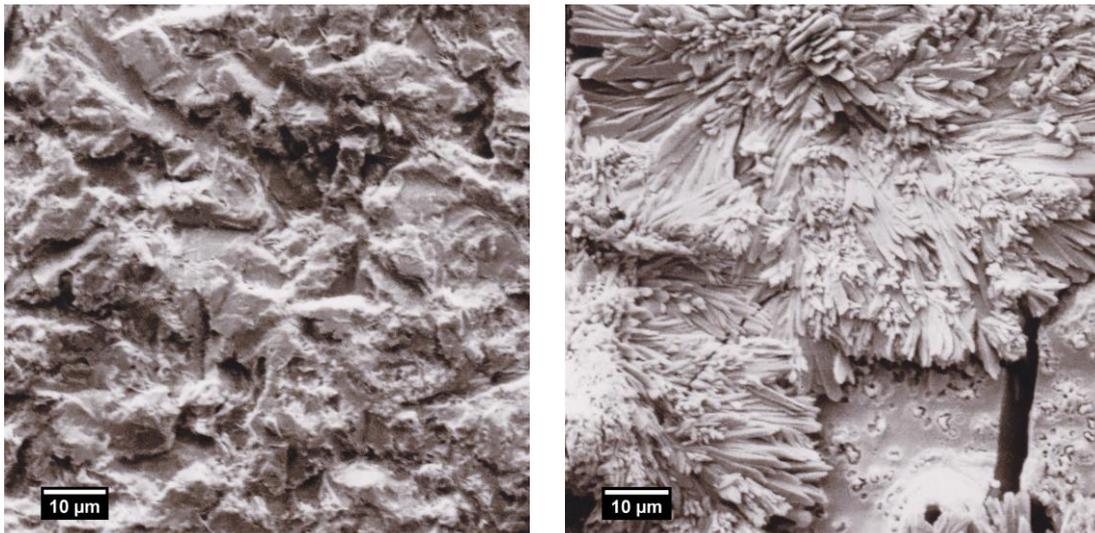
A: Standardelektrolyt



B: Standardelektrolyt

Abbildung 5: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen aus dem Standardelektrolyt für 600 s (A) und für 900 s (B) Beschichtungszeit.

Es zeigte sich, dass bei hoher Zitronensäurekonzentration die typischen Kristallformationen nicht mehr gebildet wurden. Die Inhibierung der Beschichtung mit 10,506 g/l Zitronensäure war so ausgeprägt, dass sich nur vereinzelt kleine Kristalle abschieden und die restliche Oberfläche rau und diffus erschien (s. Abbildung 6 A). Die Inhibierung der Brushitabscheidung mit 1,052 g/l Zitronensäure ließ kraterartige Strukturen und büschelförmige, spitz zulaufende Kristalle entstehen. Der Großteil der Schicht wurde jedoch von glatten oder auch blasigen Oberflächen abgegrenzt bzw. unterbrochen (s. Abbildung 6 B). Für die Beschichtungszeit von 900 s mit einer Inhibitorkonzentration von 1,052 g/l Zitronensäure bildete sich wieder die bekannte Oberfläche bestehend aus vorwiegend spitzen Brushitkristallen mit kraterartigen Strukturen. Im Unterschied zur Beschichtungsdauer von 600 s war die Schicht von weniger Rissen durchzogen und die glatte Oberfläche machte nur noch einen geringen Teil der Schicht aus. Mit sinkender Konzentration des Inhibitors und längerer Beschichtungszeit näherte sich die Kristallmorphologie wieder der Kristallmorphologie der Beschichtung durch den Standardelektrolyten an.

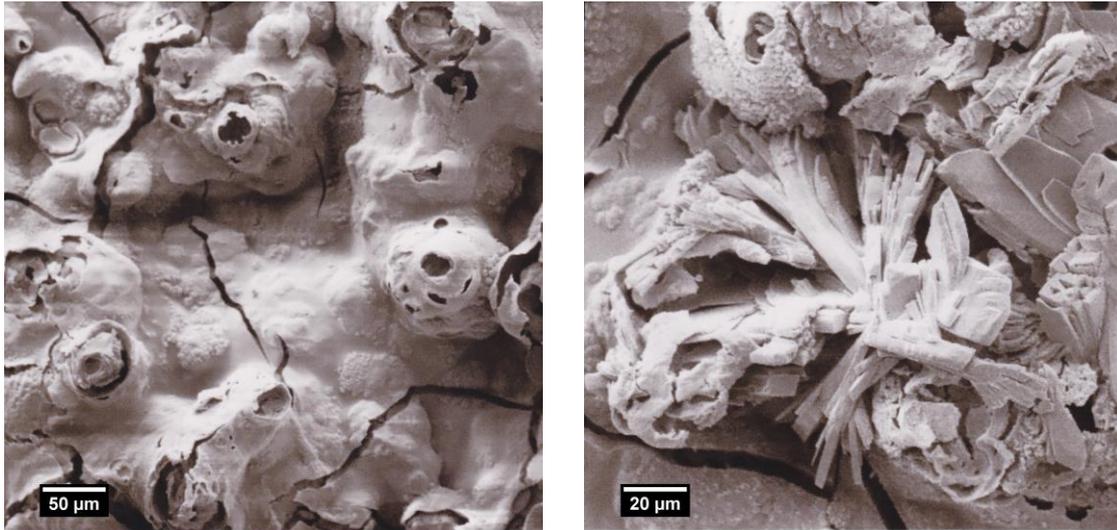


A: Zitronensäure 10,506 g/l

B: Zitronensäure 1,052 g/l

Abbildung 6: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen inhibiert durch 10,506 g/l Zitronensäure (A) und 1,052 g/l Zitronensäure (B) bei jeweils 600 s Beschichtungszeit.

Eine durch 0,52 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierte Abscheidung ließ eine teils glatte, teils blasige Oberfläche aus kraterförmigen Aufwerfungen entstehen. Die Schicht war mit vielen Rissen durchzogen und die typischen Kristallformationen fehlten (s. Abbildung 7 A). Durch die Zugabe von 0,26 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat zum Elektrolyten nahmen die zuvor fehlenden Kristallanordnungen wieder zu und es entstand eine, von Rissen unterbrochene, Schicht aus dicken kubischen Kristallen und daran anschließenden diffus-blasigen Anordnungen. Der überwiegende Teil der Beschichtung bestand jedoch aus zerklüfteten Bereichen. Die durch 0,12 g/l Natriumdiphosphat inhibierte, elektrochemische Abscheidung von Brushit glich weitestgehend der durch 0,26 g/l Natriumdiphosphat inhibierten. Der Unterschied zwischen den entstandenen Beschichtungen war, dass die sternförmigen Formationen wieder vermehrt auftraten und die zerklüfteten Bereiche abnahmen (s. Abbildung 7 B). Eine mit Hilfe von 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierte Brushitbeschichtung zeigte typische Kristallformationen, die von Rissen durchzogen waren. Auch bei einer Inhibition durch hohe tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat Konzentrationen schieden sich Brushitschichten ab, die stark von den durch den Standardelektrolyt entstandenen Schichten abwichen. Die reguläre Bildung der kubischen Kristalle wurde stark inhibiert, sodass sich nur die glatten und aufgeworfenen Schichten bilden konnten.

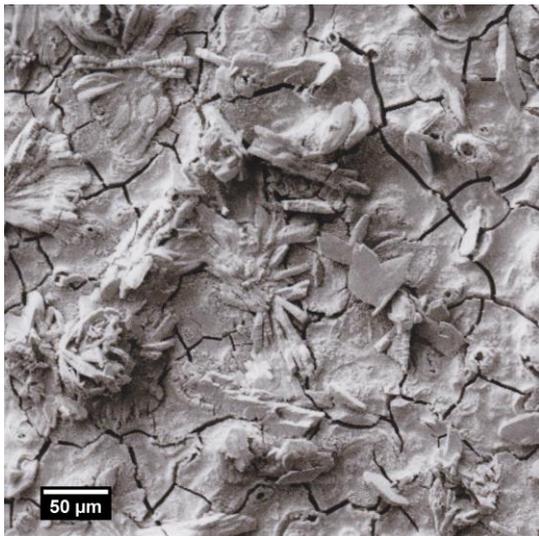


A: tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat 0,52 g/l

B: tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat 0,12 g/l

Abbildung 7: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen inhibiert durch 0,52 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (A) und 0,12 g/l tetra-Natrium-diphosphat-Decahydrat (B) bei jeweils 600 s Beschichtungszeit.

Bei der Inhibition mit Phytinsäure entstanden, verglichen mit den Schichten aus dem Standardelektrolyt, auch bei der höchsten Konzentration die stärksten Abweichungen der Brushitschichten. Mit zunehmender Beschichtungszeit oder abnehmender Konzentration bildeten sich Brushitschichten, die denen hergestellt durch den Standardelektrolyten immer ähnlicher wurden. Die durch 4 g/l Phytinsäure inhibierte Abscheidung wies bei 600 s Beschichtungszeit sowohl glatte und blasige Oberflächen, als auch kubische Sternformationen und Krater auf, die mit Rissen durchzogen waren (s. Abbildung 8 A). Während der 900 sekundigen Beschichtungszeit nahmen die Risse ab und die glatten bzw. blasigen Oberflächen verschwanden. Bei den durch 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schichten waren die Risse bei 600 s und 900 s Beschichtungszeit fast komplett verschwunden und es zeigten sich Brushitschichten mit typischen Sternformationen und Kratern. Die einzelnen Brushitkristalle waren breit und schmal und ordneten sich lamellenförmig an und die glatte bzw. blasige Oberfläche wie bei der Inhibition durch 4 g/l Phytinsäure fehlte vollständig (s. Abbildung 8 B).



A: Phytinsäure 4 g/l



B: Phytinsäure 2 g/l

Abbildung 8: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen inhiert durch 4 g/l Phytinsäure (A) und 2 g/l Phytinsäure (B) bei jeweils 600 s Beschichtungszeit.

4.4 Bestimmung und Vergleich der Zusammensetzungen und Kristallitgröße der Brushitschichten mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie

In Abbildung 9 ist die Zusammensetzung und die Kristallitgröße der Schichten aus den Elektrolyten mit und ohne Inhibitor in den entsprechenden Konzentrationen aufgeführt, die jeweils für 600 s und 900 s beschichtet wurden. Die Peaks der Halbwertsbreiten der Brushitschichten lagen bei den beobachteten Maxima von ca. $20,9^\circ$ und $29,2^\circ$. Auf allen Proben, bei denen es zu einer Abscheidung kam, zeigten die Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie, dass sich kristalline Brushitschichten bildeten. Die zusätzlichen Peaks ließen sich eindeutig auf die Anwesenheit von in die Titanoberfläche eingebrachtem Korund zurückführen. Die Schichten des Standardelektrolytes fungierten hier in beiden Beschichtungszeiten als Referenz zur Beurteilung und zum Vergleich der restlichen Schichten.

Bei den mit dem Standardelektrolyten hergestellten Schichten verringerte sich durch die längere Beschichtungszeit von 900 s die Kristallitgröße. Die Reinheit von Brushit war davon jedoch nicht betroffen, da sich nur Brushit ohne amorphen Anteil abschied. Mit einer Inhibition der Schichten durch 10,506 g/l Zitronensäure kam es, wie in Kapitel 4.3 beschrieben, zu einer massiven Inhibition der Brushitbildung, sodass vorwiegend

Titan- und Korund-Peaks im entsprechenden Röntgendiffraktogramm erkennbar waren. Bei den mit 1,052 g/l und 0,526 g/l Zitronensäure inhibierten Elektrolyten traten in den Schichten mittlere Kristallitgrößen auf. Die Schichten verhielten sich, was den Unterschied zwischen den Beschichtungszeiten anging, aber gleich. Lediglich bei der Inhibierung durch 0,526 g/l Zitronensäure bei 600 s Beschichtungszeit nahm die Kristallitgröße bei der Peakposition von $20,962^\circ$, verglichen mit der Kristallitgröße der durch den Standardelektrolyten hergestellten Schichten, zu. Ein amorpher Anteil war in allen Bruschtschichten, deren Abscheidung von 1,052 g/l und 0,526 g/l Zitronensäure inhibiert wurde, erkennbar. Unter Zitronensäureinhibition nahm die Kristallitgröße ab, jedoch stieg sie bei sinkender InhibitorKonzentration wieder leicht an. Im Vergleich zu den Schichten des Standardelektrolytes reduzierte sich die Kristallitgröße bei den Schichten der beiden Zitronensäureelektrolyten für 900 s stärker als bei 600 s. Die Bruschtschichten aus den durch 0,52 g/l; 0,26 g/l; 0,12 g/l und 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierten Elektrolyten zeigten im Röntgendiffraktogramm alle reines Bruschit, mit auftretenden hohen amorphen Anteilen, unabhängig von Konzentration, Beschichtungszeit oder Beschichtungsdauer. Die Kristallitgröße der durch 0,52 g/l Natriumdiphosphat inhibierten Bruschtschicht nahm im Vergleich von 600 s zu 900 s Beschichtungszeit ab. Bei den Schichten aus der 600 sekundigen Beschichtung trat bei einem Winkel von $29,309^\circ$ die größte Kristallitgröße mit 157 nm unter allen hergestellten Schichten auf. Die Größe der Kristallite nahm bei den mit 0,26 g/l; 0,12 g/l und 0,026 g/l Natriumdiphosphat inhibierten Schichten beim Wechsel von 600 s auf 900 s Beschichtungsdauer zu. Die Bruschtschichten mit einer InhibitorKonzentration von 0,12 g/l Natriumdiphosphat zeigten im Vergleich der Beschichtungsdauer eine Abnahme des amorphen Anteils und ein Anstieg der Kristallitgröße. Verglichen mit den anderen Natriumdiphosphatkonzentrationen bildeten sich bei 0,026 g/l bei beiden Beschichtungszeiten reine Bruschtschichten, die einen sehr geringen amorphen Anteil im Röntgendiffraktogramm aufwiesen. Es zeigte sich, dass die Inhibition der Bruschtschichten mit Natriumdiphosphat fast immer zu einer geringeren Kristallitgröße als die aus dem Standardelektrolyten hergestellten Schichten führte. Im Vergleich der Konzentrationen von Natriumdiphosphat, ihrer Beschichtungszeit und ihrer jeweiligen Kristallitgröße lässt sich jedoch kein Zusammenhang der Parameter erkennen.

Die Inhibition der Bruschitabscheidung mit Phytinsäure zeigte im Diffraktogramm sowohl die für kristallinen Bruschit charakteristischen Peaks als auch einen Halo, der auf amorphe Phasenanteile hinwies. Im Unterschied zu den anderen Inhibitoren war der amorphe Anteil bei allen Phytinsäurekonzentrationen aber gering. Die Schichten wiesen alle eindeutige, durchweg hohe und spitze Peaks im Röntgendiffraktogramm auf und die Peakintensitäten waren bei den länger beschichteten Proben kleiner. Wie schon die Peaks, nahm auch die Halbwertsbreite mit höherer Beschichtungsdauer bei der Inhibition mit 2 g/l und 4 g/l Phytinsäure ab, was auf eine geringere Kristallitgröße hinwies.

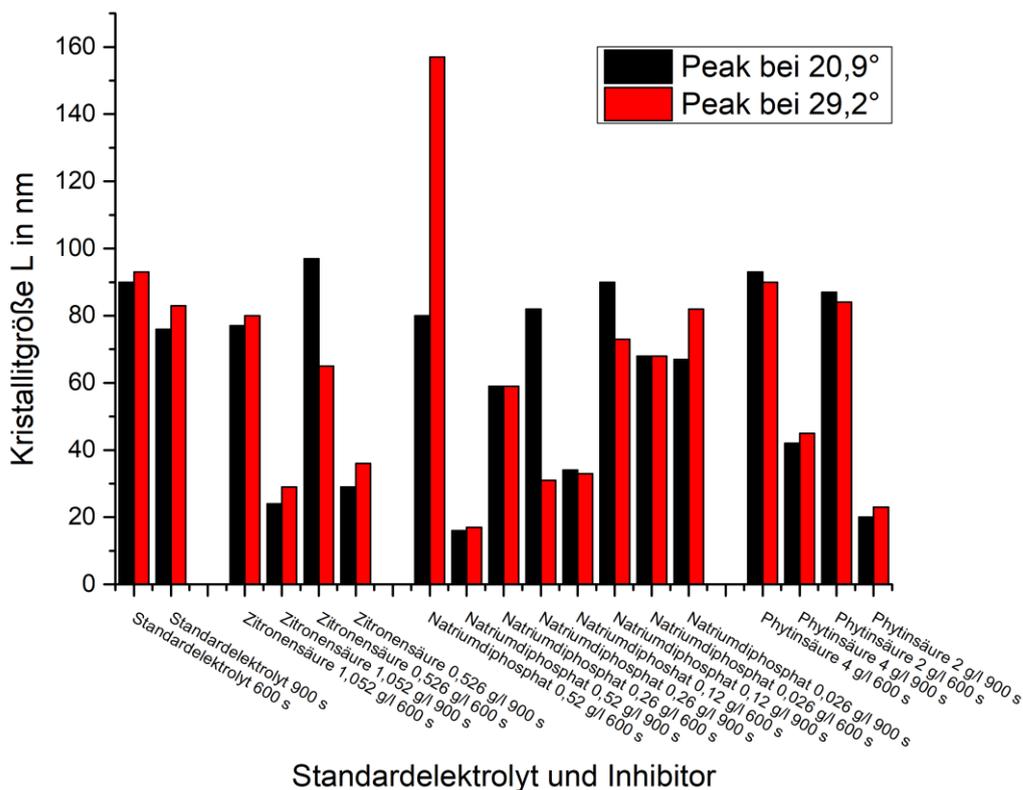


Abbildung 9: Vergleich der Kristallitgröße von Bruschitbeschichtungen hergestellt aus dem Standarddelektrolyt, sowie die Inhibition der Abscheidung durch Zitronensäure, tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Phytinsäure für 600 s bzw. 900 s Beschichtungsdauer.

4.5 Optimale Beschichtungsparameter für Desinfektion, Sterilisation und Zellversuche mit hFOB

In diesem Kapitel sollen die Schichten der für die Desinfektion, Sterilisation und Zellversuche mit hFOB ausgewählten Proben miteinander verglichen werden. Wie in Kapitel 3.5 beschrieben, handelt es sich um Schichten deren Abscheidung mit 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat oder 2 g/l Phytinsäure inhibiert wurden. Diese Konzentrationen wurden ausgewählt, da die hergestellten Schichten die größten Unterschiede zu denen des Standardelektrolytes besaßen und sie trotzdem eine gleichmäßige Schichtmorphologie ohne besonders große Abnormitäten zeigten. Alle dargestellten Proben wurden für 900 s beschichtet. Die hergestellten Schichten sollten, durch die Bestimmung mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie, nur reines Bruschit und keine anderen Calciumphosphate enthalten.

Die Schichtmassen waren nach der Inhibition der Abscheidung mit 0,526 g/l Zitronensäure und 2 g/l Phytinsäure geringer als die Schichtmassen der mit dem Standardelektrolyt hergestellten Proben. Im Gegensatz dazu erhöhte sich die Masse der Bruschitbeschichtung aus dem Elektrolyten mit Inhibition durch 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat im Vergleich zu der des Standardelektrolyten (vgl. Kapitel 4.2). Unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet stellte sich ohne Inhibitor eine rissfreie Schicht kubischer stumpfer Kristalle, die sich sternförmig anordneten und Krater bildeten, dar (s. Abbildung 11 A). Bei allen abgeschiedenen Schichten der drei Inhibitoren traten Risse auf, welche bis an die Kristallformationen heran reichten bzw. diese durchtrennten. Die kubischen Einzelkristalle mit spitzen Enden traten nur bei den mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibierten Schichten mit 900 s Beschichtungsdauer auf (s. Abbildung 11 B), wohingegen sich bei der Inhibition mit 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat dünne lamellare Bruschitplatten abschieden (s. Abbildung 11 C). Der Großteil der Oberfläche der mit 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schicht bestand aus schmalen lamellaren Bruschitplatten, doch bildeten sich in den aufgeplatzten Kratern eher kleine, flache Bruschitkristallplättchen (s. Abbildung 11 D). Die Anordnung in Sternformationen, sowie die Bildung von Kratern wurde bei allen drei Inhibitoren beobachtet, jedoch waren die Krater bei den Schichten, die mit 0,026 g/l Natriumdiphosphat und 2 g/l Phytinsäure inhibiert wurden,

häufiger zu beobachten. Durch die Inhibition mit 0,526 g/l Zitronensäure kam es zusätzlich zu einer büschelförmigen Zusammenlagerung der spitzen Einzelkristalle (s. Abbildung 11 B).

Die Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie zeigten, dass die Schichten der Inhibitoren deutlich geringere Peaks als die Schichten des Standardelektrolytes aufwiesen. Die höchsten Peaks der von 0,526 g/l Zitronensäure inhibierten Bruschitschicht waren um das ca. 4,5-fache, der von 0,026 g/l Natriumdiphosphat inhibierten Schicht um das ca. 12-fache und der von 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schicht um das ca. 3-fache niedriger. Alle Schichten bestanden aus reinem Bruschit mit unterschiedlich hohen amorphen Anteilen (s. Abbildung 10). Die Halbwertsbreiten der Kristallite der inhibierten Bruschitschichten lagen alle über den Schichten, die aus dem Standardelektrolyten hergestellt wurden. Die daraus errechneten Kristallitgrößen waren für alle drei Inhibitoren geringer, als die des Elektrolyten unter Standardbedingungen (s. Tabelle 3). Alle Kristallitgrößen der inhibierten Bruschitschichten wiesen kleinere Werte als die Schichten des Standardelektrolytes auf. Im Vergleich der Inhibitoren untereinander, nahmen die Kristallitgrößen von Natriumdiphosphat, über Zitronensäure, hin zu Phytinsäure ab. Die Kristallitgröße der mit 0,026 g/l Natriumdiphosphat inhibierten Bruschitschichten besaßen nur minimal kleinere Werte als die Schichten des Standardelektrolytes.

Tabelle 3: Halbwertsbreite und Kristallitgröße von Bruschitbeschichtungen hergestellt aus dem Standardelektrolyt, sowie die Inhibition der Abscheidung durch 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure für 900 s Beschichtungsdauer.

Probe	Winkel [°]	FWHM [°]	Kristallitgröße L [nm]
Standardelektrolyt	20,956	0,112	76
	29,298	0,110	83
0,526 g/l Zitronensäure	21,081	0,293	29
	29,362	0,256	36
0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat	20,926	0,365	67
	29,294	0,511	82
2 g/l Phytinsäure	21,109	0,419	20
	29,400	0,390	23

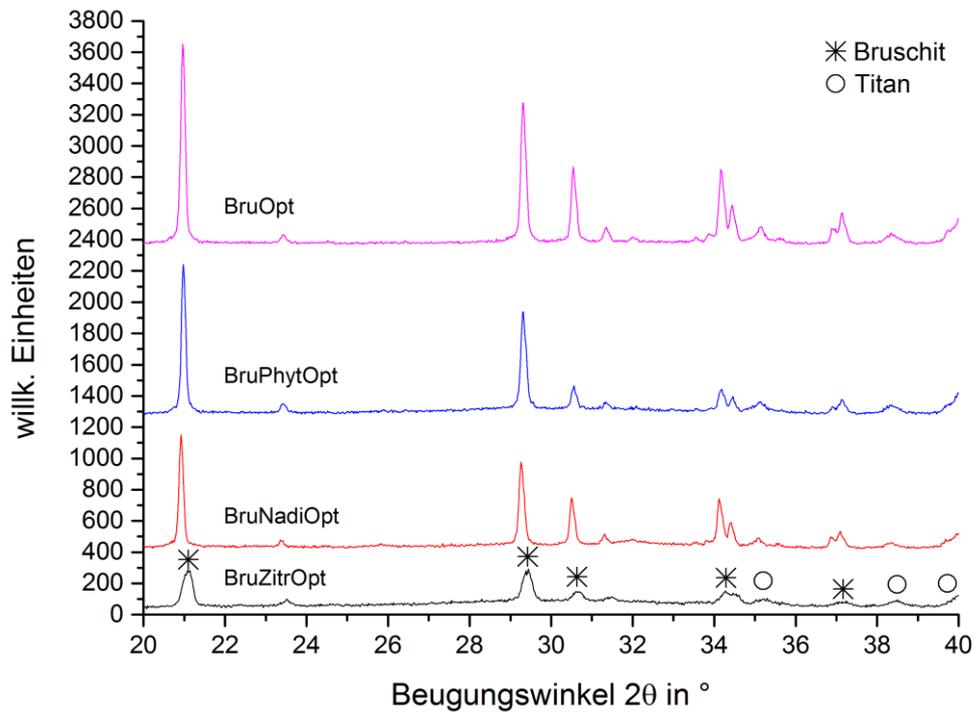
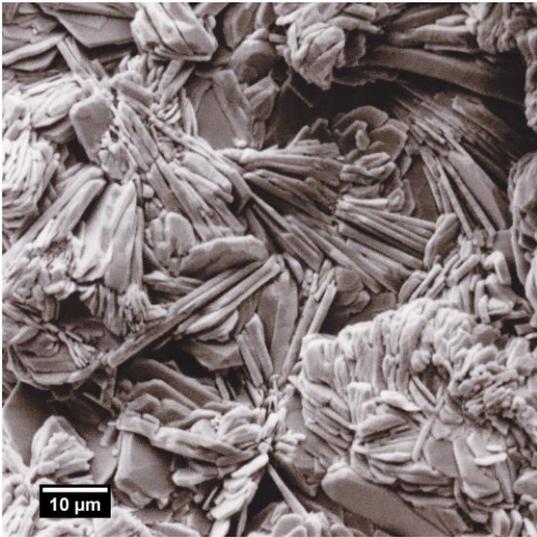
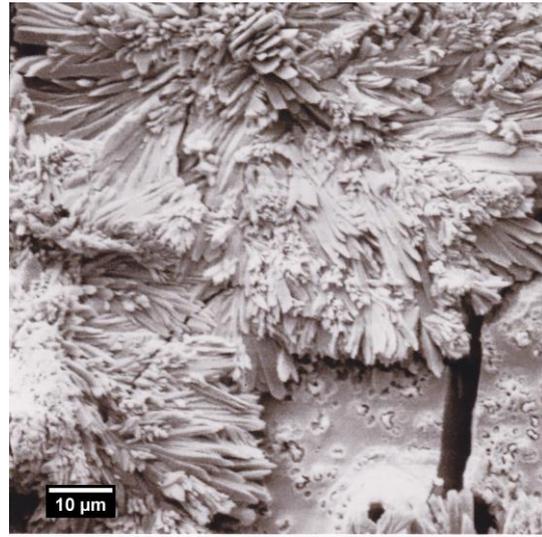


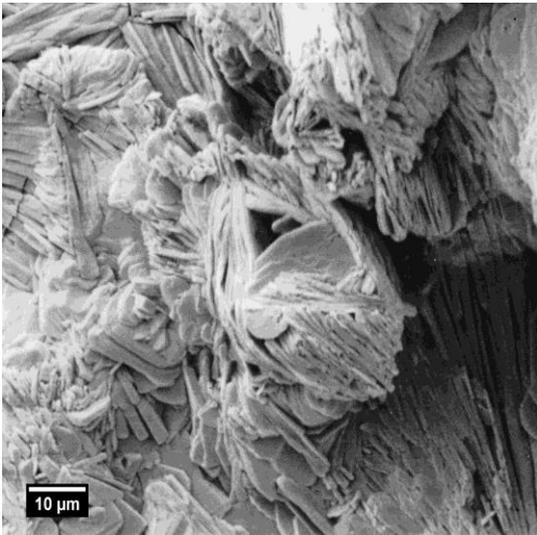
Abbildung 10: Röntgendiffraktogramme von Brushitbeschichtungen hergestellt aus dem Standardelektrolyt, sowie die Inhibition der Abscheidung durch 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure für 900 s Beschichtungsdauer



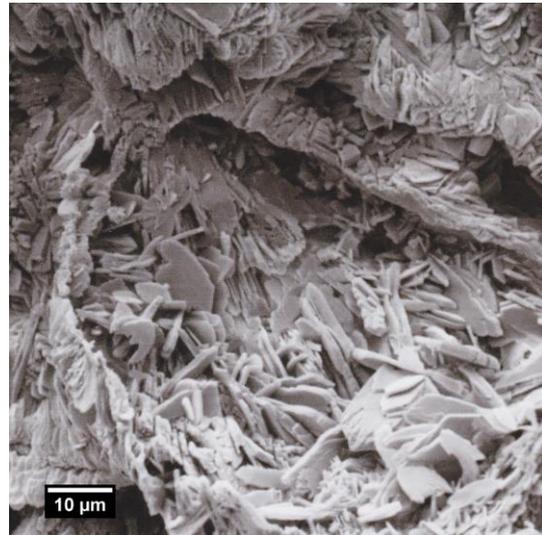
A: BruOpt



B: BruZitrOpt



C: BruNadiOpt



D: BruPhytOpt

Abbildung 11: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen hergestellt aus dem Standardelektrolyt (A), sowie die Inhibition der Abscheidung durch 0,526 g/l Zitronensäure (B), 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (C) und 2 g/l Phytinsäure (D) für 900 s Beschichtungsdauer.

4.6 Desinfektion der Beschichtungen mit Ethanol

Die Desinfektion der Bruschtplättchen mit 70 %igem Ethanol führte bei allen Beschichtungen zum Massenverlust. Die Proben, deren Abscheidung mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibiert wurden, verloren nach der Desinfektion im Mittel $(1 \pm 0,7)$ mg. Die mit Hilfe von 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat bzw. 2 g/l Phytinsäure inhibierten Beschichtungen verloren nach der Desinfektion im Mittel (1 ± 0) mg bzw. (7 ± 0) mg.

Aus dem Röntgendiffraktogramm war ersichtlich, dass bei allen drei Inhibitoren reine Bruschtschichten entstanden und auch der amorphe Anteil gering war. Die Halbwertsbreiten und Peakintensitäten der mit Zitronensäure und Natriumdiphosphat inhibierten und mit Ethanol desinfizierten Proben waren etwa gleich. Die desinfizierten Proben aus der Phytinsäureinhibition wiesen etwa doppelt so hohe Peakintensitäten auf, wie die desinfizierten und mit Zitronensäure und Natriumdiphosphat inhibierten Proben.

Die Kristallitgrößen und Halbwertsbreiten des Röntgendiffraktogrammes sind in Tabelle 4 ersichtlich.

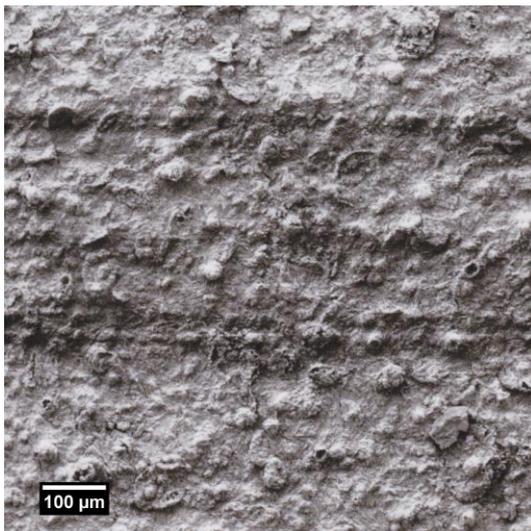
Tabelle 4: Halbwertsbreite und Kristallitgröße von Bruschtbeschichtungen inhibiert durch 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure für 900 s Beschichtungsdauer nach der Desinfektion mit 70 %igem Ethanol.

Probe	Winkel [°]	FWHM [°]	Kristallitgröße L [nm]
0,526 g/l Zitronensäure	20,963	0,104	82
	29,299	0,101	90
0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat	21,104	0,210	41
	29,430	0,200	46
2 g/l Phytinsäure	20,950	0,090	95
	29,287	0,099	92

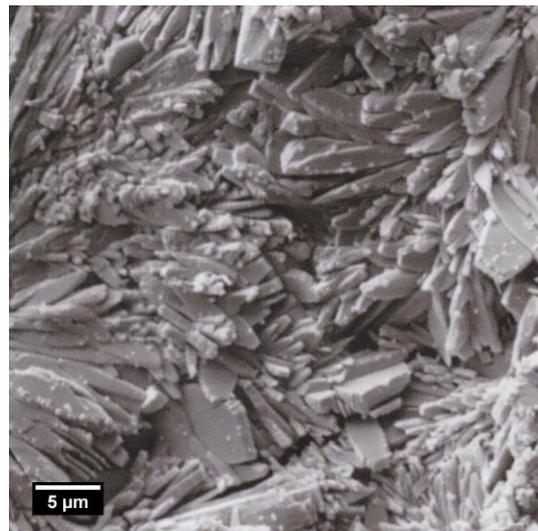
Unter dem Rasterelektronenmikroskop zeigten sich nach Inhibition mit 0,526 g/l Zitronensäure und Desinfektion mit Ethanol kraterförmige Kristalle und die typischen Bruschi Sternformationen (s. Abbildung 12 A). Die Schicht war vereinzelt mit Rissen durchzogen und die Kristalle hatten eine flache, kubische, stumpfe Form. In der 2000-fachen Vergrößerung waren kleine, runde Kügelchen auf den Kristallen in Abbildung 12 B zu sehen.

Durch die Inhibition der Bruschi Schichten mit 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Desinfektion mit Ethanol waren viele Krater und Blasen in Abbildung 12 C erkennbar. Die Bruschi Schicht war rissfrei und die Kristalle bildeten kubische, stumpfe Sternformationen aus (s. Abbildung 12 D), welche erst ab einer 5000-fachen Vergrößerung mit den oben genannten Kügelchen bedeckt waren.

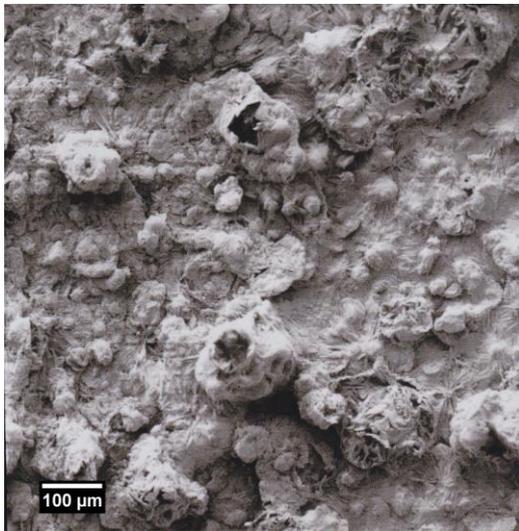
Die Desinfektion der mit 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schichten zeigte rasterelektronenmikroskopisch eine noch große und eng zusammenliegende Anzahl an Kratern und Blasen (s. Abbildung 12 E), sowie einige Risse, die die teils sternförmig teils linear angeordneten Kristalle durchzogen. Die einzelnen Kristalle waren vorwiegend plattenförmig, jedoch fanden sich auch diffus-rundliche Strukturen (s. Abbildung 12 F). Die Struktur der Kristalloberflächen erschien in höheren Vergrößerungen rauer.



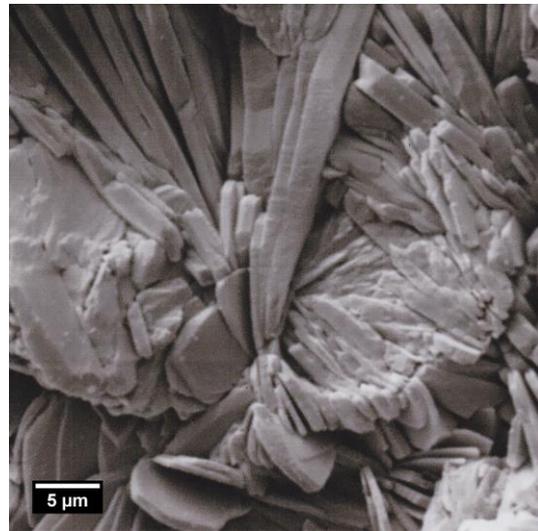
A) BruZitrOpt



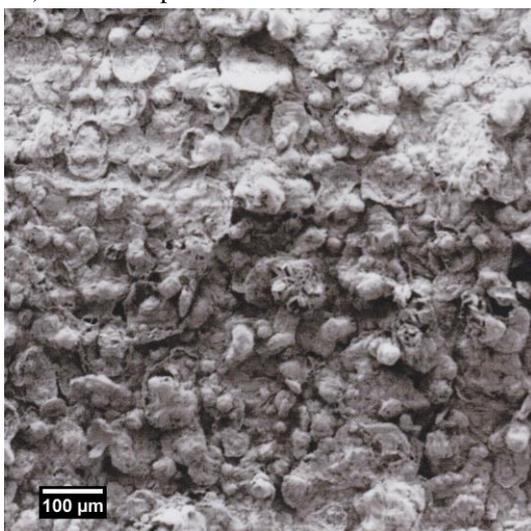
B) BruZitrOpt



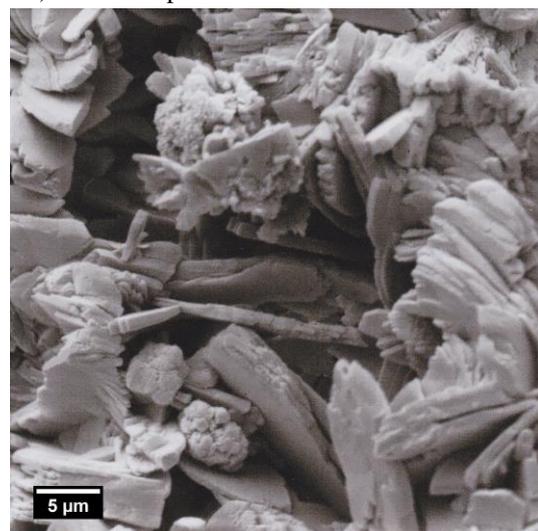
C) BruNadiOpt



D) BruNadiOpt



E) BruPhytOpt



F) BruPhytOpt

Abbildung 12: Rasterelektronen mikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen inhibiert durch 0,526 g/l Zitronensäure (A, B), 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (C, D) und 2 g/l Phytinsäure (E, F) für 900 s Beschichtungsdauer nach der Desinfektion mit 70 %igem Ethanol.

4.7 Sterilisation der Beschichtungen im Autoklaven im trockenen Zustand

Die Sterilisation der Bruschitplättchen im Autoklav im trockenen Zustand führte bei allen Beschichtungen zum Gewichtsverlust. Die Proben aus der mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibierten Abscheidung verloren im Mittel (5 ± 1) mg an Schichtmasse. Die Masse der mit 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierten und sterilisierten Schichten sank um (10 ± 6) mg. Die Sterilisation der mit 2 g/l Phytinsäure inhibierten Bruschitbeschichtung hatte einen Verlust von (11 ± 1) mg Schichtmasse zur Folge.

Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie war zu erkennen, dass sich bei der Inhibition der Schichten mit Zitronensäure, Natriumdiphosphat und Phytinsäure und anschließenden Sterilisation im Autoklaven im trockenen Zustand Bruschit in reines Monetit umwandelte. Bei allen Proben war im Röntgendiffraktogramm ein amorpher Anteil zu erkennen, der bei den mit Natriumdiphosphat inhibierten Proben am größten und bei den mit Phytinsäure inhibierten Proben am geringsten war. Bei den sterilisierten Proben aus der Zitronensäureinhibition hatten die Peaks mit der höchsten Intensität eine Peakhöhe von ca. 130 cps. Die sterilisierten und mit Natriumdiphosphat inhibierten Proben zeigten einen Wert von ca. 44 cps als höchste Peakintensität. Die Phytinsäure inhibierten Proben hatten von allen drei Inhibitoren die höchste Peakintensität mit einer Peakhöhe von ca. 340 cps (s. Abbildung 13).

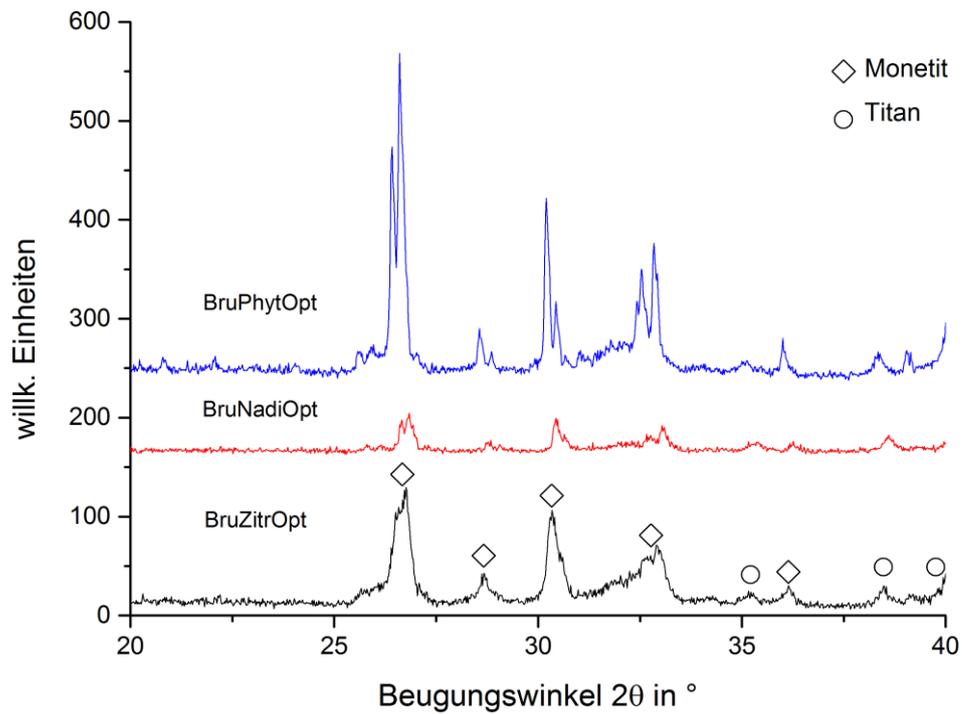
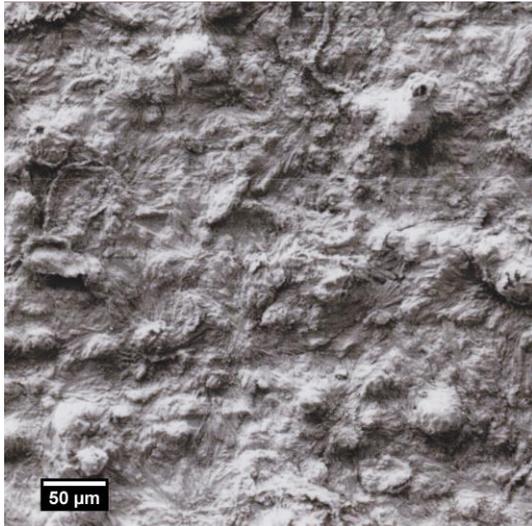


Abbildung 13: Röntgendiffraktogramme von Bruschiitbeschichtungen inhibiert durch 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure für 900 s Beschichtungsdauer nach der Sterilisation im Autoklaven im trockenen Zustand. Während der Sterilisation wandelte sich Bruschiit in Monetit um.

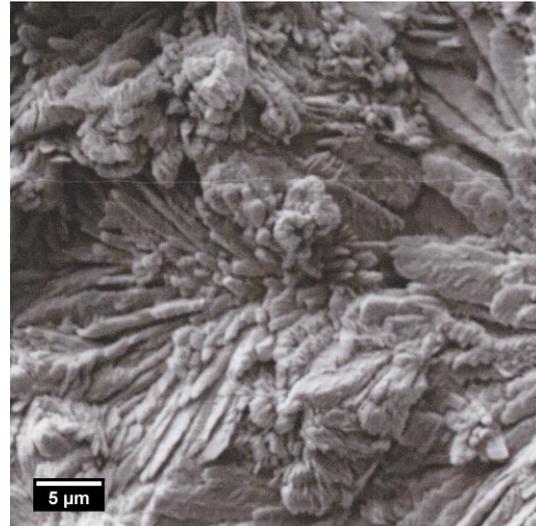
Die Betrachtung mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskopes zeigte, dass die mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibierte und in Monetit umgewandelte Schicht aus Blasen und kraterförmigen Strukturen bestand (s. Abbildung 14 A). Die sternförmige Anordnung der Kristalle war teilweise mit Rissen durchzogen. In der 2000-fachen Vergrößerung in Abbildung 14 B zeigte sich, dass die größeren Strukturen aus eher kleineren rechteckigen Kristallen zusammengesetzt waren.

Bei den mit 0,026 g/l Natriumdiphosphat inhibierten und autoklavierten Schichten bestand die Monetitoberfläche aus vielen geschlossenen und zerklüfteten Blasen (s. Abbildung 14 C). Die dünnen und flachen Kristalle bildeten mit Rissen durchzogene, lamellare Sternformationen, wobei die größeren Kristalle sich aus kleineren zusammensetzten (s. Abbildung 14 D).

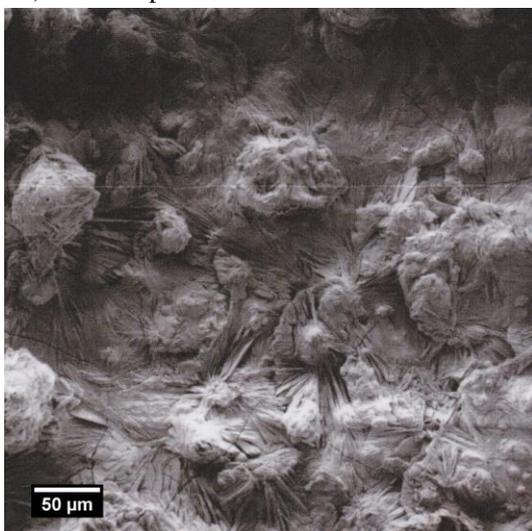
Die mittels 2 g/l Phytinsäure inhibierten und durch das Autoklavieren in Monetit umgewandelten Beschichtungen waren durch viele zerklüftete und offene Blasen und Krater charakterisiert (s. Abbildung 14 E). Die Kristalle waren eher klein, lamellen- oder plattenförmig und ordneten sich diffus zu größeren Strukturen an (s. Abbildung 14 F).



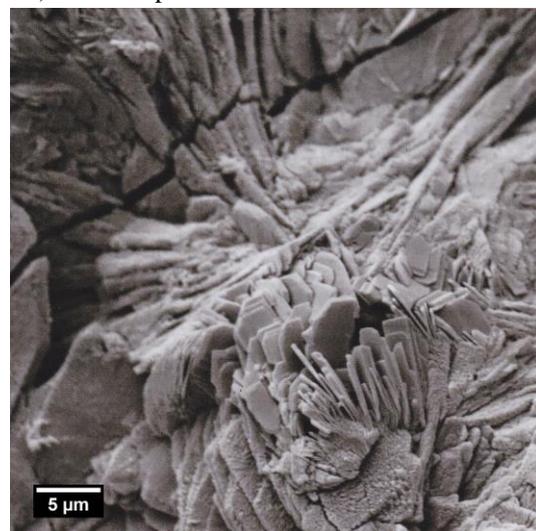
A) BruZitrOpt



B) BruZitrOpt



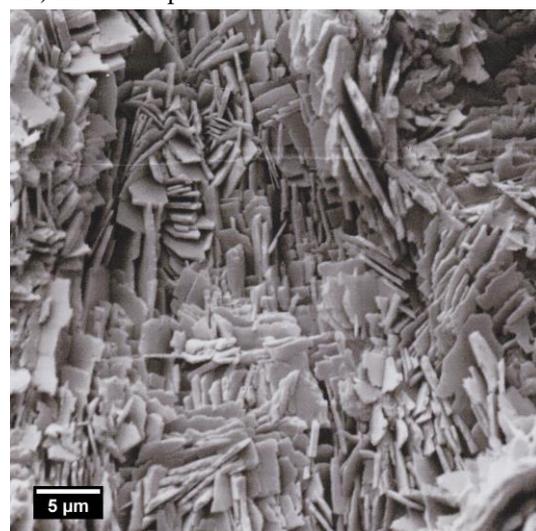
C) BruNadiOpt



D) BruNadiOpt



E) BruPhytOpt



F) BruPhytOpt

Abbildung 14: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Bruschnitbeschichtungen inhibiert durch 0,526 g/l Zitronensäure (A, B), 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (C, D) und 2 g/l Phytinsäure (E, F) für 900 s Beschichtungsdauer nach der Sterilisation im Autoklaven im trockenen Zustand. Während der Sterilisation wandelte sich Bruschnit in Monetit um.

4.8 Sterilisation der in PBS-Puffer gelagerten Beschichtungen im Autoklaven

Die Sterilisation der in PBS-Puffer gelagerten beschichteten Plättchen im Autoklaven führte bei allen Beschichtungen zu einem Massenverlust. Die mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibierten Bruschitschichten verloren im Mittel (5 ± 3) mg, die mit tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierten Schichten (BruNadiOpt) (11 ± 3) mg und die mit Phytinsäure inhibierten Schichten (BruPhytOpt) (8 ± 3) mg an Masse.

Mittels Röntgendiffraktometrie war zu erkennen, dass sich bei allen inhibierten Abscheidungen und der nachfolgenden Sterilisation Bruschit in reines Hydroxylapatit umwandelte. Die mit Zitronensäure inhibierten Schichten wiesen die höchste Peakintensität bei Werten von ca. 110 cps auf. Die mit Hilfe von tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierten Schichten hatten ihre höchste Intensität bei einer Peakhöhe von ca. 80 cps. Die durch Phytinsäureinhibition entstandenen Schichten zeigten bei einer Peakhöhe von ca. 105 cps ihre höchste Intensität. Der amorphe Anteil der Schichten nach der Sterilisation war bei allen drei zugegebenen Inhibitoren ungefähr gleich ausgeprägt (s. Abbildung 15).

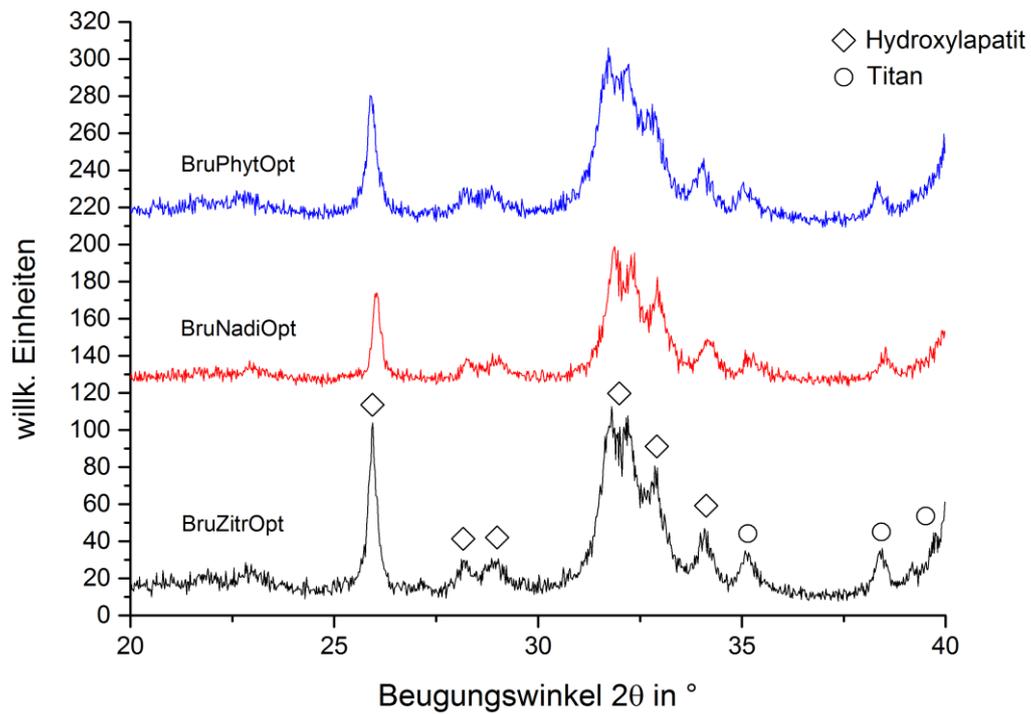
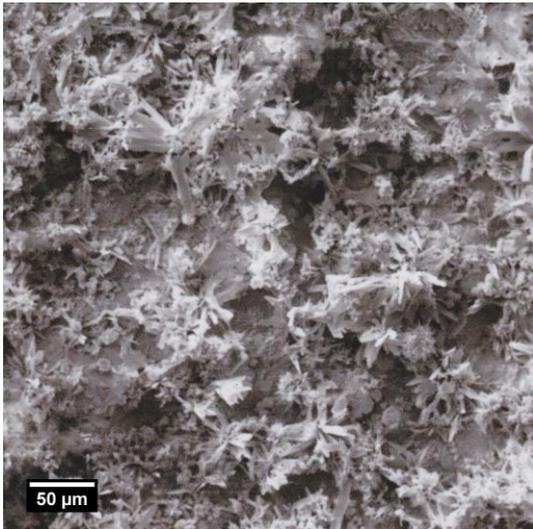


Abbildung 15: Röntgendiffraktogramm von Brushitbeschichtungen inhibiert durch 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure für 900 s Beschichtungsdauer nach der in PBS-Puffer gelagerten Sterilisation im Autoklaven. Während der Sterilisation wandelte sich Brushit im Hydroxylapatit um.

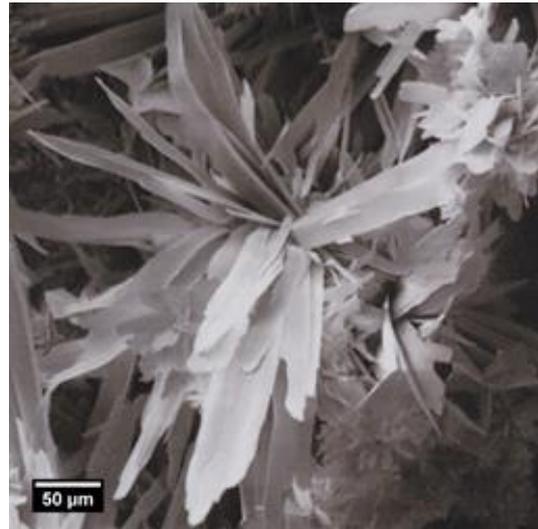
Im Rasterelektronenmikroskop bestand die mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibierte und in Hydroxylapatit umgewandelte Beschichtung aus flach verteilten, spitzen Kristallanordnungen ohne Risse oder Blasen (s. Abbildung 16 A). Die Kristalle bildeten büschelförmige, feinblättrige Formationen (s. Abbildung 16 B).

Die Inhibition der Schichten mit 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und anschließende Sterilisation ließ diffus blasige Kristallformationen ohne Risse entstehen (s. Abbildung 16 C). Die einzelnen Blasen wurden von büschelförmig angeordneten Kristallen gebildet und die Kristalle hatten eine feinblättrige Struktur (s. Abbildung 16 D).

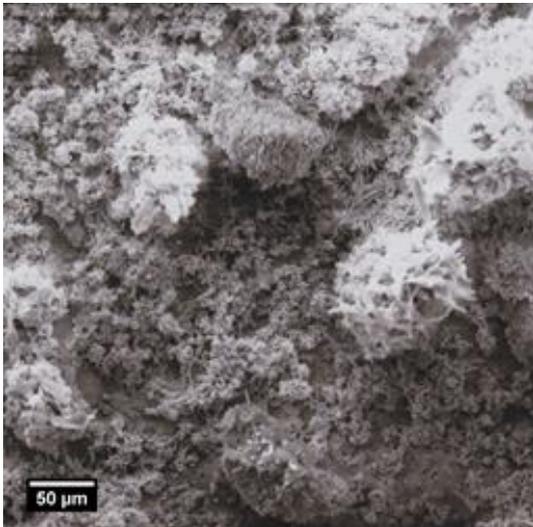
Die durch 2 g/l Phytinsäure inhibierte und sterilisierte Schicht wies wieder Blasen auf, wobei der Schichtboden eher flache glatte Kristallformationen zeigte und sich darüber eher diffus zusammengesetzte Strukturen bildeten (s. Abbildung 16 E). Bei näherer Betrachtung schien der Untergrund aus flachen lamellenförmigen Kristallen zu bestehen, auf denen büschelartige und feinblättrige Kristalle entstanden. Die Einzelkristalle hatten wieder die Form von feinblättrigen Kristallen (s. Abbildung 16 F).



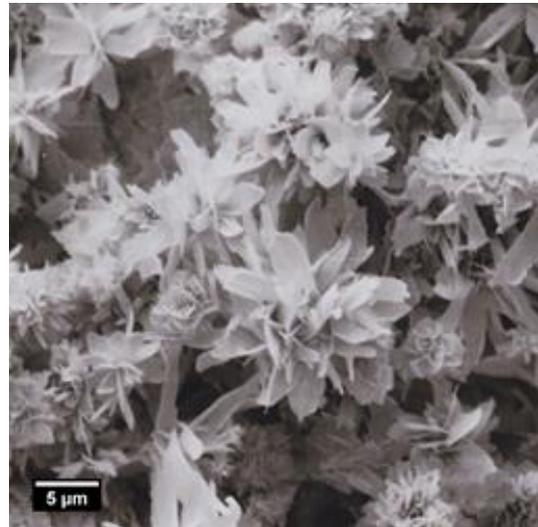
A) BruZitrOpt



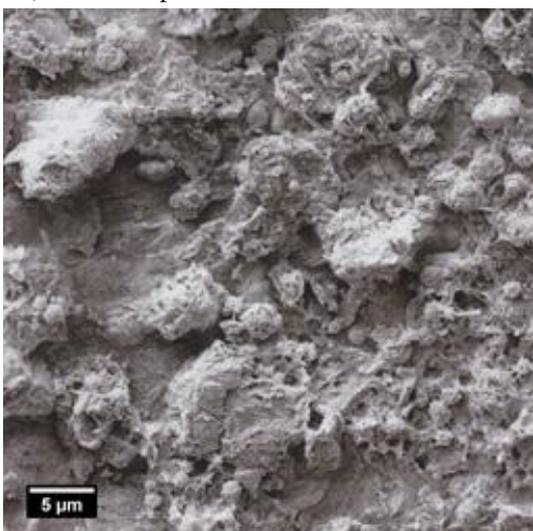
B) BruZitrOpt



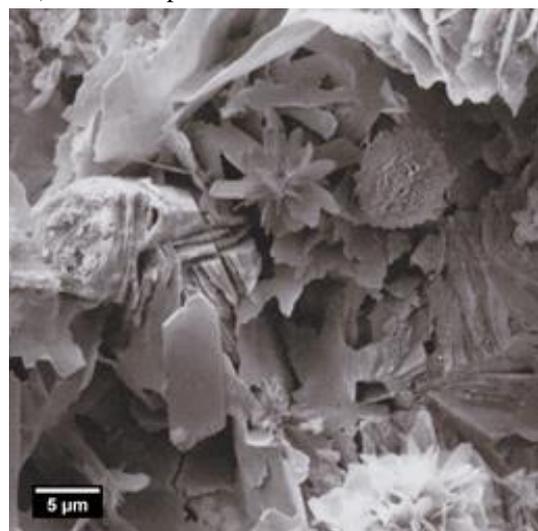
C) BruNadiOpt



D) BruNadiOpt



E) BruPhytOpt



F) BruPhytOpt

Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Brushitbeschichtungen inhibiert durch 0,526 g/l Zitronensäure (A, B), 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat (C, D) und 2 g/l Phytinsäure (E, F) für 900 s Beschichtungsdauer nach der in PBS-Puffer gelagerten Sterilisation im Autoklaven. Während der Sterilisation wandelte sich Brushit in Hydroxylapatit um.

4.9 Zellversuche der Bruschitschichten mit Hilfe von humanen fötalen Osteoblasten

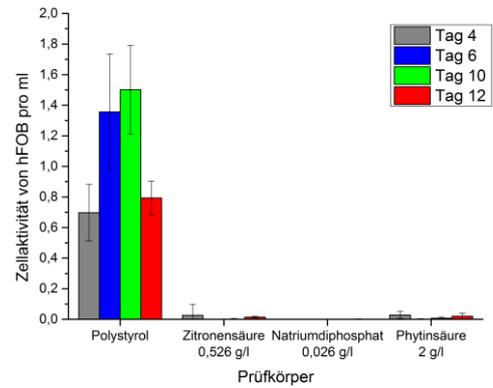
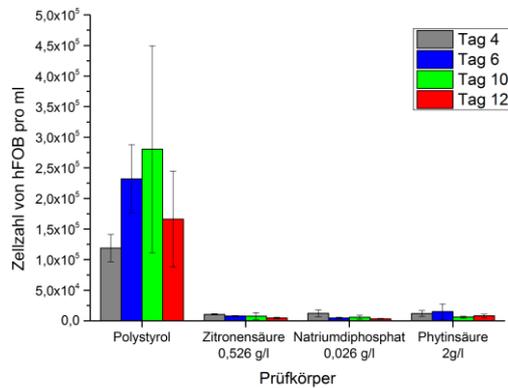
Für die Zelltests in dieser Arbeit wurden humane fötale Osteoblasten (hFOB) über 12 Tage auf mit Bruschi beschichteten Titanplättchen kultiviert und anschließend bezüglich ihrer Zellzahl, Zellaktivität und Aktivität pro Zelle untersucht. Als Referenzmaterial diente Polystyrol (s. Kapitel 3.6).

Aus Abbildung 17 A ist ersichtlich, dass die Zellzahl auf Polystyrol an allen vier Messtagen am höchsten war. Die Zellzahl stieg bis zum Tag 10 auf ihr Maximum von $2,8 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^5$ an, blieb an Tag 12 mit $1,6 \cdot 10^5 \pm 7,8 \cdot 10^4$ jedoch noch über dem Anfangswert von $1,1 \cdot 10^5 \pm 2,2 \cdot 10^4$. Tag 10 war im Mittel zwar der Höchstwert, doch hier darf die recht hohe Standardabweichung nicht vernachlässigt werden. Auf den Plättchen, deren Schichten mit 0,526 g/l Zitronensäure inhibiert wurden, betrug die Zellzahl ca. $1 \cdot 10^{+1}$ weniger als auf Polystyrol. Hier nahm im Verlauf der Messtage die Anzahl der Zellen weiter ab und erreichte am 12. Tag $4,8 \cdot 10^3 \pm 1,1 \cdot 10^3$ Zellen. Die Zellzahl auf den Plättchen der mit 0,026 g/l Natriumdiphosphat inhibierten Schichten zeigte im Vergleich dazu ein sehr ähnliches Bild. An Tag 4 lag der Mittelwert der Zellzahl von den Schichten mit Natriumdiphosphatinhibition mit $1,2 \cdot 10^4$ etwas über dem Mittelwert der mit Zitronensäure inhibierten Bruschitschichten, wobei die Standardabweichung um ca. das 5-fache höher war. Im weiteren Verlauf der Messungen sank die Zellzahl weiter bis zum 12. Tag und stieg am Tag 10 nochmal kurz auf $5,8 \cdot 10^4 \pm 3,1 \cdot 10^3$ an. Auf den Plättchen, deren Schichten mit 2 g/l Phytinsäure inhibiert wurden, verhielt sich die Zellzahl unterschiedlich im Gegensatz zu den restlichen Inhibitoren und Polystyrol. Sie stieg von Tag 4 mit $1,21 \cdot 10^4 \pm 4,7 \cdot 10^3$ zu Tag 6 auf $1,5 \cdot 10^4 \pm 1,2 \cdot 10^4$ Zellen an. Am 10. Messtag betrug die Zellzahl nur noch $6,0 \cdot 10^3 \pm 1,5 \cdot 10^3$ und erhöhte sich an Tag 12 auf $8,0 \cdot 10^3 \pm 2,7 \cdot 10^3$. Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Zellzahl auf den Plättchen der mit Zitronensäure, Natriumdiphosphat und Phytinsäure inhibierten Bruschitschichten etwa auf demselben Niveau war.

Die Ergebnisse der mit Hilfe des WST-Tests durchgeführten Zellaktivitätsbestimmung sind in Abbildung 17 B dargestellt. Wie schon in den oben besprochenen Versuchen zur Zellzahlbestimmung zeigte auch hier Polystyrol den höchsten Wert und wies einen annähernd gleichen Verlauf auf. Es gab wieder einen Anstieg von Tag 4 mit $0,6974 \pm 0,1849$ zu Tag 10 auf $1,5015 \pm 0,2909$. Am letzten Tag der Messung nahm die Zellaktivität auf $0,7936 \pm 0,1102$ ab. Die Zellaktivität auf den Plättchen der mit Zitronensäure inhibierten Bruschtschichten ergab nur geringe Messwerte. An Tag 4 betrug sie $0,0257 \pm 0,0722$, fiel am 6. Messtag sogar auf 0 ab, um dann bei den letzten beiden Messungen mit $0,0018 \pm 0,004$ und $0,0144 \pm 0,0061$ nur knapp über 0 zu liegen. Auf den Plättchen, deren Bruschtschichtabscheidung mit Natriumdiphosphat inhibiert wurde, fielen die Ergebnisse der Zellaktivität noch geringer aus, da ihre Messwerte an den Tagen 4, 6 und 10 bei 0 lag. Am Messtag 12 wurde ein leichter Anstieg auf $0,0012 \pm 0,0028$ verzeichnet. Die Zellaktivität auf den mit Phytinsäure inhibierten Bruschtschichten war mit der Aktivität auf den mit Zitronensäure inhibierten Bruschtschichten vergleichbar. Am ersten Tag der Messung waren die Werte im Mittel mit $0,0285 \pm 0,0223$ am höchsten. An Tag 6 sank die Aktivität auf das Minimum von $0,0011 \pm 0,0032$ ab, um bis Tag 12 wieder auf $0,02 \pm 0,02$ anzusteigen.

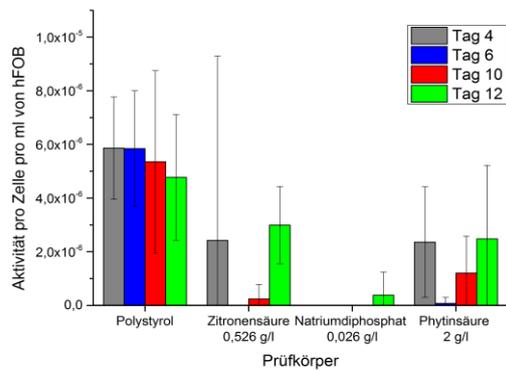
Die Ergebnisse der Bestimmung der Aktivität pro Zelle von hFOB sind in Abbildung 17 C dargestellt. Auf Polystyrol hatte die Aktivität pro Zelle an Tag 4 ihren Höchstwert mit $5,8 \cdot 10^{-6} \pm 1,9 \cdot 10^{-6}$, welche im weiteren Verlauf bis zum Tag 12 auf $4,7 \cdot 10^{-6} \pm 2,3 \cdot 10^{-6}$ abfiel. Für die Plättchen mit Zitronensäure inhibierter Bruschtbeschichtung ergab die Messung der Aktivität pro Zelle an Tag 4 $2,4 \cdot 10^{-6} \pm 6,8 \cdot 10^{-6}$. An Tag 6 war keine Aktivität messbar, jedoch stieg sie im weiteren Verlauf von $2,4 \cdot 10^{-7} \pm 5,3 \cdot 10^{-7}$ auf $2,9 \cdot 10^{-6} \pm 1,4 \cdot 10^{-6}$ am letzten Tag an. Während die Aktivität pro Zelle auf den Proben mit Natriumdiphosphatinhibition für die Tage 4, 6 und 10 null zeigte, war am Tag 12 ein geringer Anstieg auf $3,8 \cdot 10^{-7} \pm 8,5 \cdot 10^{-7}$ zu verzeichnen. Die Aktivität pro Zelle für die Proben mit Phytinsäure inhibierter Bruschtbeschichtung hatte einen ähnlichen Verlauf wie die Proben mit Zitronensäure inhibierter Bruschtbeschichtung auf. Der erste Wert für Tag 4 lag bei $2,3 \cdot 10^{-6} \pm 2,0 \cdot 10^{-6}$, sank dann an Tag 6 auf $7,5 \cdot 10^{-8} \pm 2,2 \cdot 10^{-7}$, um letztendlich über $1,2 \cdot 10^{-6} \pm 1,3 \cdot 10^{-6}$ auf $2,4 \cdot 10^{-6} \pm 2,7 \cdot 10^{-6}$ anzusteigen. Bei allen Proben, besonders denen mit inhibierten Bruschtschichten, fiel die Standardabweichung sehr groß aus, sodass vergleichende Aussagen nicht möglich sind.

4. Ergebnisse



A) Zellzahl von hFOB pro ml

B) Zellaktivität von hFOB pro ml



C) Mittelwert der Aktivität pro Zelle pro ml von hFOB

Abbildung 17: Zellzahl (A), Zellaktivität (B) und Mittelwert der Aktivität pro Zelle (C) von hFOB an Tag 4, 6, 10 und 12. Inhibition der Bruschschichten mit Hilfe von 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure. Polystyrol diente als Referenz.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es Bruschitschichten mit Hilfe der elektrochemisch gestützten Abscheidung auf die sandgestrahlte Oberfläche von Titanproben aufzubringen und durch Zugabe von Kristallisationsinhibitoren die Kristallitgrößen und die Schichtmorphologie zu beeinflussen. Die Veränderungen konnten mittels Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskop untersucht und nachgewiesen werden. Ausgewählte Schichten deren Abscheidung für 900 s Beschichtungszeit mit Hilfe von 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat oder 2 g/l Phytinsäure inhibiert wurde, wurden auf Morphologieveränderung nach Ethanoldeinfektion und Sterilisation im Autoklaven untersucht. Die ethanoldeinfizierten Proben waren Grundlage für die anschließenden Zellversuche mit Hilfe von humanen fötalen Osteoblasten (hFOB).

5.1 Einfluss der Zugabe von Inhibitoren auf die Masse der Bruschitbeschichtung

In den vorliegenden Versuchen wurden die Auswirkungen von drei verschiedenen Kristallisationsinhibitoren auf die Bruschitabscheidung auf Titanplättchen untersucht. Bei der Zugabe der Inhibitoren Zitronensäure und Phytinsäure kam es in den Versuchen zu einer verringerten Abscheidung der Bruschitschichten. Je höher die zugegebene Inhibitorkonzentration war, desto mehr wurde das Kristallitwachstum inhibiert und die abgeschiedene Bruschitmasse nahm ab. Auffällig war, dass es bei der Zugabe der höchsten Zitronensäurekonzentration zu keiner Abscheidung kam. Offenbar wurde in diesem Fall die Grenzkonzentration für die Totalinhibierung der Bruschitabscheidung erreicht. Wie schon in Kapitel 2.4 beschrieben, band die negativ geladene Carboxylgruppe der Zitronensäure die Calciumionen aus dem Elektrolyt unter Bildung des Dicalciumphosphat-Citrat-Komplexes. Somit wurde der Reaktionsgleichung ein Edukt entzogen und es konnte kein Bruschit abgeschieden werden [148]. Die verringerte Bruschitabscheidung bei einer Inhibition mit Hilfe von Zitronensäure konnte auch bei Untersuchungen von Alkhraisat et al. anhand Bruschitzementen gezeigt werden [149]. In dem oben genannten Fall der Totalinhibierung mit Hilfe von Zitronensäure war auffällig, dass nach dem Versuch sich nicht nur kein Bruschit

abgeschieden hatte, sondern sich vielmehr die Titanmasse verringerte. Die Ursache der verringerten Titanmasse wurde aufgrund der fehlenden Bruschitabscheidung nicht weiter verfolgt.

Die Ergebnisse bezüglich der Wirkungsweise von Phytinsäure bestätigen vorherige Veröffentlichungen anderer Autoren. Grases et al. und March et al. wiesen in mehreren Studien das natürliche Vorkommen von Phytinsäure als Kristallisationshemmer für Calciumphosphate im Urin [158, 159] und Nierengewebe von Ratten nach [35]. In einer anderen Untersuchung zeigte Grases et al. die inhibierende Wirkung speziell auf Bruschit [34].

Bei Verwendung des dritten Inhibitors tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat konnte in den Versuchen keine Inhibition festgestellt werden. Die abgeschiedene Bruschitmasse war entweder gleich oder höher als beim Standardelektrolyten. Es gibt keine vergleichbaren Untersuchungen mit einem identischen Versuchsaufbau, es finden sich lediglich leicht abgewandelte Studien, die jedoch alle Natriumdiphosphat (Pyrophosphat) als Kristallisationsinhibitor beschreiben. So zeigten Alkhraisat et al und Bohner et al. die Wirkung von Natriumdiphosphat als Abbindeverzögerer in Bruschitzementen [147, 155]. Fleisch et al. und Grases et al. beschrieben in ihren Untersuchungen die Rolle von Pyrophosphat als natürlicher Kristallisationsinhibitor für Calciumphosphate im speziellen Bruschit und Hydroxylapatit im Urin [29-32, 34]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese abweichenden Ergebnisse wäre der unterschiedliche pH-Wert im Urin von 6,1 im Gegensatz zu einem pH-Wert von 2,7 in der vorliegenden Arbeit. Die mögliche Abhängigkeit der Wirkungsweise von Natriumdiphosphat von unterschiedlichen pH-Werten wäre Gegenstand zukünftiger Studien.

5.2 Charakterisierung der Bruschitschichten

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, erfolgte die Bestimmung der Morphologie der Schichten mittels Rasterelektronenmikroskopie. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie wurden die Phasenzusammensetzung bzw. die kristallographischen Eigenschaften untersucht. Aus den Rohdaten der Röntgendiffraktogramme wurde die Kristallitgröße unter Zuhilfenahme der Scherrer-Gleichung errechnet. Alle hergestellten Schichten bestanden aus reinem Bruschit und wiesen keine anderen Phasen oder

Verunreinigungen auf. Auch bei der Verwendung von Zitronensäure, tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Phytinsäure wurde reines Brushit abgeschieden, aber die Kristallisationsinhibitoren beeinflussten die kristallographischen Eigenschaften der Brushitschichten. Die amorphen Phasenanteile der Brushitschichten nahmen zu und die Peakhöhen im Röntgendiffraktogramm verringerten sich. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Inhibitorkonzentrationen und den amorphen Anteilen konnte in dieser Arbeit jedoch nicht nachgewiesen werden, aber in Abhängigkeit der Beschichtungszeit zeigte sich eine Änderung der Kristallitgröße. Bei der Erhöhung der Beschichtungszeit von 600 s auf 900 s nahm die Kristallitgröße unter Zitronen- und Phytinsäureinhibition ab (s. Kapitel 4.4).

Eine Erklärung zum vergrößerten amorphen Phasenanteil für den Inhibitor Zitronensäure bieten Brečević et al. und Hofmann et al.. Sie zeigten, dass die Zitronensäure auf der Oberfläche von Brushit oder Hydroxylapatit unter Bildung des intermediären Dicalciumphosphat-Citrat-Komplexes (s. Kapitel 2.4) Calcium bindet und damit die Kristallnukleation und das Wachstum der kristallinen Phasen inhibiert [37, 148], was eine Stabilisierung der amorphen Calciumphosphate zur Folge hat [160]. Pak et al. wiesen in ihren Versuchen nach, dass bei steigender Citratkonzentration das Kristallitwachstum von Brushit im Urin abnahm [38].

Die Ergebnisse für den Inhibitor Natriumdiphosphat decken sich mit den Ergebnissen anderer Forscher. Fleisch et al. stellten fest, dass Pyrophosphat die Umwandlung der amorphen Form in ihre kristalline Form verhindert [154]. Posner et al. beschrieben Natriumdiphosphat als Stoff, der durch die Adsorption auf frühen kleinen Kristallen die Proliferation und das Wachstum von Calciumsalzen in Wasser verhindert [54].

Unter Phytinsäureinhibition konnte im Diffraktogramm, wie in Kapitel 4.4 beschrieben, ein Auftreten von amorphen Phasenanteilen beobachtet werden. Jedoch war der Anteil geringer als bei der Zitronensäure- und Natriumdiphosphatinhibition. Deshalb wäre eine Vermutung, dass die chelatbildende Wirkungsweise der Phytinsäure, ähnlich wie bei den anderen Inhibitoren, die amorphe Phase beeinflusst. Doch für diese Wirkungsweise von Phytinsäure fanden sich in der Literatur keine vergleichbaren Studien. Für eine Bestätigung oder Widerlegung der Vermutung wären somit weitere Forschungen notwendig.

Die mit Hilfe der Scherrer-Gleichung bestimmten Kristallitgrößen lagen für alle Messungen zwischen 16 nm und 157 nm. Vergleicht man diese mit den Abbildungen des Rasterelektronenmikroskops ergibt sich eine Abweichung der Größen. Die Kristalle aus den Rasterelektronenmikroskopaufnahmen zeigten Werte im Mikrometerbereich.

Letzte Ergebnisse werden durch Untersuchungen anderer Forscher bestätigt. So fanden Mariño et al. Kristalle mit einer Größe von 2,5 μm innerhalb von mit Zitronensäure abbindeverzögerten Bruschitzementen [161].

Demnach liefert die Scherrer-Gleichung in diesem Anwendungsfall nicht die richtigen Ergebnisse. Scherrer et al. setzt bei der Anwendung der Gleichung würfelförmige Kristalle voraus und berechnet die Größe von einzelnen Kristalliten, die in der gleichen, parallelen Netzebene liegen und zeigt damit Kristallite nur innerhalb ihrer Korngrenzen [156]. Yanovska et al. zeigten, dass die Kristallitgrößen von monoklinem Bruschit in verschiedenen Netzebenen kaum voneinander zu unterscheiden sind [162]. Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurden dagegen große Kristalle betrachtet, die sich aus einzelnen Kristalliten zusammensetzten.

Die Morphologie der Bruschitschichten wurde in Kapitel 4.3 beschrieben. So waren in allen Beschichtungen mit und ohne Inhibitor sternförmige Kristallanordnung, sowie das Auftreten von Kratern zu finden. Dieses Aussehen ist für Bruschit typisch und wurde mehrfach in der Literatur bestätigt [28, 128]. Das Auftreten der stern- und kraterförmigen Kristallanordnungen nimmt mit abnehmender Konzentration der unterschiedlichen Inhibitoren und damit nachlassender Inhibitorwirkung zu. Beim Vergleich der Rasterelektronenmikroskopaufnahmen der Studie von Redepenning et al., die der hier vorliegenden Arbeit als Vorlage diente, fallen Gemeinsamkeiten mit den hier hergestellten Aufnahmen auf (s. Abbildung 5 B) [21].

Während die Bilder der aus dem Standardelektrolyten hergestellten Schichten durchgängig waren, zeigten sich nach Zugabe der Inhibitoren von Rissen unterbrochene Schichten, wie sie auch Redepenning et al. und Shih et al. in ihren Untersuchungen beschrieben [22, 163]. Die Größe und Menge der Risse in den Schichten sank mit der verringerten Zugabe von Inhibitoren. Eine Korrelation zwischen Rissausprägung und Konzentration des Inhibitors konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich durch die Zugabe der Inhibitoren die Schichtdicke änderte, was beim Trocknen eventuell zu Verspannungen führte.

Für die aus dem Standardelektrolyten hergestellten Schichten besaßen die Kristalle, wie bei Redepenning bzw. Kumar et al., neben ihrer typischen Anordnung zusätzlich ein kubisches Aussehen mit stumpfen Enden und ordneten sich in Platten oder Lamellen an (s. Abbildung 5 B) [21, 128]. Die Zugabe des Inhibitors Zitronensäure veränderte die Erscheinung hin zu büschelförmigen Anordnungen, die auch Barralet et al. bei seinen Untersuchungen vom Bruschtzementen mit Natriumcitrat fand [164], und verlieh den einzelnen Kristallen spitze Enden. Daran angrenzend trat teilweise eine diffus-glatte Oberfläche ohne erkennbare Kristalle auf (s. Abbildung 6 B). Brečvić et al. stellten ebenso eine Veränderung zu nadelförmigen Kristallen unter Einfluss von Citrationen fest [37], wohingegen im Zement von Bohner et al. die Kristalle kleiner und runder wurden [147]. Unter der Inhibition durch Natriumdiphosphat nahmen die Kristalle, im Vergleich zur Inhibition mit Hilfe von Zitronensäure, wieder kubische Platten- oder Lamellenform an und wiesen stumpfe Enden auf (s. Abbildung 8 A). Die Kristalle nahmen, im Unterschied zu den anderen Inhibitoren, an Dicke zu. Ein vergleichbares Aussehen zeigten β -Tricalcium-Phosphat Zemente, die mit Natriumpyrophosphat modifiziert wurden [147]. Unter den hohen Natriumdiphosphatkonzentrationen bildeten sich nur blasige bzw. kraterartige Strukturen und ein Auftreten von erkennbaren Kristallen fehlte teilweise bis komplett (s. Abbildung 7 A). Die Schichten mit Phytinsäure wiesen trotz ihrer inhibierenden Wirkung Vulkane und sternförmige Anordnungen auf, die sich von den typischen Bruschitkristallen jedoch unterschieden. Vergleichbare Beispiele für die Inhibition mit Phytinsäure konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

5.3 Desinfektion und Sterilisation

Ein großes Risiko in der Medizin ist die Keimverschleppung und Infektion bei chirurgischen Eingriffen [165]. Um dieses Risiko zu vermeiden, befinden sich unterschiedliche Verfahren zur Inaktivierung von Bakterien, Pilzsporen und Viren in der Anwendung [166]. In den vorliegenden Versuchen wurden die Auswirkungen von Desinfektion und Sterilisation auf die mit Hilfe von drei verschiedenen Kristallisationsinhibitoren abgeschiedenen Bruschitbeschichtungen auf Titanplättchen

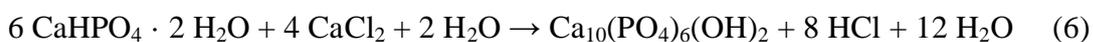
untersucht. Das Desinfizieren der mit 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l Natriumdiphosphat und 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schichten mit 70 %igem Ethanol führte zu keiner Umwandlung des Bruschits. Im Ethanol sollte ein geringer Teil der Calcium- und Phosphationen wieder in Lösung gehen, wodurch der Masseverlust zu erklären wäre. Aufgrund der gelösten Ionen könnten die Bruschitkristalle weiter auskristallisieren, was einen Teil der Risse verschwinden ließe. Die Desinfektion in Ethanol führte zu einer vermindert starken Ausprägung der anfänglich aufgeführten Unterschiede und speziellen Merkmale zwischen den mit Zitronensäure, tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Phytinsäure inhibierten Schichten. Die Morphologie der verschiedenen inhibierten und desinfizierten Bruschitschichten war, wie in Abbildung 12 ersichtlich, sehr ähnlich. Eine chemische Untersuchung des Ethanols könnte Rückschlüsse darauf geben, ob ein Teil der Inhibitoren ausgewaschen wurde und sich aufgrund dessen die Schichten in ihrer Morphologie aneinander anglichen. Die Entstehung der kleinen Kügelchen auf den Kristallen ist bislang nicht erklärbar und könnte durch andere Faktoren oder äußere Einflüsse hervorgerufen worden sein. Es wurden ebenso keine Hinweise in der Literatur gefunden. Die weitere Kristallisation hatte auch Einfluss auf die Kristallitgrößen, da diese sich umgekehrt zu den Ausgangswerten darstellten. Die Kristallitgröße der mit Zitronensäure und Phytinsäure inhibierten und desinfizierten Schichten nahm zu und erreichte höhere Werte als die Kristallitgröße der Schichten des Standardelektrolytes ohne Desinfektion. Im Gegensatz dazu verringerten sich die Werte der mit 0,026 g/l Natriumdiphosphat inhibierten Bruschitschichten nach der Desinfektion mit Ethanol. Die Desinfektion von Schichten des Standardelektrolytes wäre bei zukünftigen Untersuchungen als Vergleichswert sinnvoll. In der Literatur wurden keine vergleichbaren Ergebnisse oder Erklärungen gefunden.

Die Behandlung der mit 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l Natriumdiphosphat und 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schichten im Autoklav bei Trockenheit führte zur Umwandlung von Bruschit in seine Anhydratform Monetit [167]. Durch den Verlust des Wassers in der Transformation ließe sich auch der Masseverlust der Schichten erklären [168].



Im Röntgendiffraktogramm waren die Peaks einer reinen Monetitschicht ohne andere Phasen oder Verunreinigungen (s. Abbildung 13) erkennbar. Die Morphologie der Schichten aus den Rasterelektronenmikroskopaufnahmen von Abbildung 14 glichen der Morphologie der Schichten mit Desinfektion durch Ethanol in Abbildung 12. Es konnte das Fehlen der kleinen Kügelchen in großen Vergrößerungen beobachtet werden, sowie eine Änderung im Aufbau und Größe der Kristalle. Die großen Kristalle bestanden bei Monetit teilweise aus einer Zusammenlagerung von kleineren Kristallen und erschienen etwas kleiner (s. Abbildung 14 B), als die vergleichbaren von Bruschit (s. Abbildung 12 B). Die hier gewonnenen Ergebnisse korrelieren mit denen von Tamimi et al. in ihrer Arbeit, die sich jedoch auf Zemente bezieht [169]. Weitere Untersuchungen zur elektrochemischen Abscheidung von Monetit könnten in dieser Hinsicht mehr verwertbare und vergleichbare Ergebnisse bringen. Boroujeni et al. fanden 2012 heraus, dass Monetitzemente eine potentielle Alternative, aufgrund von chemischer Zusammensetzung, Löslichkeit, Knochenregeneration und -wachstum, sein könnten [59].

Die Einlagerung der inhibierten Bruschitschichten in PBS-Puffer und anschließende Sterilisation im Autoklav hatte eine Umwandlung zu Hydroxylapatit zur Folge.



Diese Transformation beobachteten auch Tas et al. in ihren Untersuchungen mit Bruschitpulver [170]. Die hohe Temperatur und die Bestandteile des PBS-Puffers ließen, wie im XRD erkennbar, reinen Hydroxylapatit entstehen (s. Abbildung 15). Wie schon bei dem entstandenen Monetit konnte keine Aussage über einen Zusammenhang zwischen Inhibitor und Peakhöhe in XRD getroffen werden. Die Morphologie der gebildeten Kristalle in den REM-Aufnahmen stimmte mit denen in vorangegangenen Arbeiten überein [170-172]. Die entstandenen Schichten der drei Inhibitoren hatten untereinander wieder sehr große Ähnlichkeit und bildeten büschelförmige, flache und teilweise spitz zulaufende Kristalle aus (s. Abbildung 16). Weitere Ergebnisse, in Hinblick auf die gewollte Umwandlung von Bruschit in Hydroxylapatit und der Einfluss von Kristallisationsinhibitoren, könnten in zukünftigen Untersuchungen gewonnen werden. Ebenso wäre die Erforschung alternativer Sterilisationsverfahren in Folge

dieser Arbeit denkbar, um die Transformation in Hydroxylapatit erst *in vivo* stattfinden zu lassen [170].

5.4 Zellversuch

Für die Untersuchung der Zellverträglichkeit der Schichten wurden die Zellzahl (s. Abbildung 17A) und die Zellaktivität (s. Abbildung 17 B) anhand eines Zellkulturmodells mit hFOB-Zellen bestimmt. Als Referenz wurde Polystyrol verwendet und bei der Bestimmung war ein deutlicher Anstieg von Zellzahl und Zellaktivität bis zum 10. Tag erkennbar. Jedoch sollten dabei die hohen Standardabweichungen nicht vernachlässigt werden. Die Zellzahl war bei allen mit Hilfe von 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l Natriumdiphosphat und 2 g/l Phytinsäure inhibierten Schichten um mindestens eine Größenordnung geringer als bei Polystyrol. Ein Absinken war für die mit Zitronensäure, Natriumdiphosphat und Phytinsäure inhibierten Schichten von Tag 4 auf Tag 12 erkennbar. Die Zellaktivität auf Polystyrol hatte einen zur Zellzahl vergleichbaren Verlauf. Es konnte keine Aktivität auf den mit Zitronensäure inhibierten Schichten an Tag 6 und dem mit Natriumdiphosphat inhibierten Schichten an Tag 4, 6 und 10 beobachtet werden. An Tag 10 und 12 konnte für die mit Zitronen- und Phytinsäure inhibierten Schichten ein minimaler Anstieg der Zellaktivität verzeichnet werden. Die Aktivität pro Zelle aus Abbildung 17 C bestätigt diese Beobachtung. Die Ergebnisse finden kaum Übereinstimmung in der Literatur. Für Zitronensäure konnte durch Jamshidi et al. bestätigt werden, dass sowohl die Zellhaftung auf Bruschitzementen behindert wurde, als auch, dass Zellzahl und Zellaktivität geringer ausfielen [173]. Da Phytinsäure und Natriumdiphosphat beide im menschlichen Körper vorkommen und dort die Ausfällung von Calciumphosphaten regulieren [30, 34], wäre eine negative Auswirkung bei entsprechender Dosis auf die Zellen nicht zu erwarten. *In vivo* und *in vitro* wurde die gute Zellverträglichkeit und Zellhaftung von Pyrophosphatbeschichtungen bereits bestätigt [174]. Roy et al. konnten 2012 zeigen, dass Bruschit, wenn auch in Zementform, eine gute Biokompatibilität gegenüber humanen fötalen Osteoblasten besitzt [175]. Die in dieser Arbeit auftretenden hohen Standardabweichungen, die teilweise sogar höher als die Mittelwerte waren, stellen eine mögliche Fehlerquelle in den Ergebnissen der Zellversuche dar. Damit konnten die Ergebnisse nicht für genauere Aussagen bzw. Zusammenhänge herangezogen werden. Der mögliche Einfluss des niedrigen

pH-Wertes der Elektrolyte, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, könnte auch hier zum Tragen kommen. Um die Fehler zu minimieren und konkrete Aussagen über die jeweilige Wirkung der Inhibitoren treffen zu können, müsste die zukünftige Probenanzahl erhöht, eine Bruchitbeschichtung ohne Inhibitor als Referenz oder das Verwenden einer alternativen Zelllinie in Betracht gezogen werden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen Bruschitschichten auf Titan in Gegenwart von Kristallisationsinhibitoren elektrochemisch gestützt abzuscheiden. Zur Steuerung von Kristallitgröße und Untersuchung der biologischen Reaktion kamen Zitronensäure, tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und Phytinsäure zum Einsatz. Die elektrochemische Abscheidung erfolgte bei Raumtemperatur von 24 °C mit einer Stromstärke von -320 mA (Stromdichte: 18,8 mA/cm²) und ließ reproduzierbare, geschlossene Schichten von ausreichender Dicke entstehen. Die Inhibition des Ausgangselektrolytes mit Hilfe von Zitronen- und Phytinsäure verringerte die abgeschiedene Masse an Bruschi, wohingegen die Inhibition mit tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat sie erhöhte. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde der Einfluss der Kristallisationsinhibitoren auf die Morphologie der Schichten untersucht. Die für Bruschi typische Bildung von kubischen, sternförmigen Kristallen, sowie kraterförmigen Anordnungen ließ mit zunehmender Inhibitorkonzentration nach. Die mit Hilfe von Zitronensäure inhibierten Schichten bildeten spitze, büschelförmige Kristalle und Krater neben teils glatt-diffusen Oberflächen aus. Die Kristalle aus den mit Hilfe von tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat inhibierten Schichten wiesen wieder kubische, platten- oder lamellenartige Formen mit stumpfen Enden auf, wobei auch glatt-diffuse Bereiche in den Kristallschichten vorhanden waren. Die Phytinsäureinhibition der abgeschiedenen Schichten ließ vom normalen Bruschi abweichende Krater und sternförmige Anordnungen mit glatt-blasigen Oberflächen entstehen. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie konnte nachgewiesen werden, dass alle entstandenen Schichten aus reinem Bruschi bestanden. Bei den inhibierten Schichten nahm, im Unterschied zu den mit Hilfe des Standardelektrolytes abgeschiedenen Schichten, lediglich der amorphe Anteil zu. Als optimale Beschichtungsparameter für die weiteren Versuche wurden 0,526 g/l Zitronensäure, 0,026 g/l tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat und 2 g/l Phytinsäure gewählt. Damit ein späterer klinischer Einsatz der Schichten möglich wäre, erfolgte die Desinfektion mit 70 %igem Ethanol oder die Sterilisation im Autoklav im trockenen Zustand oder in PBS-Puffer gelagert. Wie schon zuvor, wurden die desinfizierten bzw. sterilisierten Proben mittels Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie charakterisiert.

Die Desinfektion in Ethanol veränderte die Phasenreinheit der Schichten im Röntgendiffraktogramm nicht und glich die mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskopes festgestellten vorausgegangenen Unterschiede mehr aneinander an. In allen Schichten waren kraterförmige Kristalle und Sternformationen erkennbar und die zuvor aufgetretenen Risse wurden weniger. Die Sterilisation im trockenen Zustand im Autoklav führte zu Umwandlung von Brushit in Monetit, dessen Reinheit durch die Untersuchung mittels Röntgendiffraktometrie bestätigt wurde. Die Morphologie von Monetit ähnelte der von Brushit, da auch lamellenartige Sternformationen zu beobachten waren. Lediglich die Kristallitgröße erschien kleiner bzw. es setzten sich große Kristalle sichtbar aus kleineren zusammen. Die Sterilisation der in PBS-Puffer gelagerten Schichten im Autoklav transformierte das Brushit in Hydroxylapatit. Mit Hilfe der Röntgendiffraktometrie konnte die Reinheit des Hydroxylapatites nachgewiesen werden. Die Rasterelektronenmikroskopaufnahmen machten deutlich, dass sich die Hydroxylapatitkristalle büschelförmig, schmal mit spitzen Enden anordnen und nur geringe Unterschiede erkennbar waren.

Die anhand eines Zellkulturmodells mit hFOB-Zellen durchgeführten Zellversuche zeigten im Vergleich zur Referenz eine mindestens $1 \cdot 10^{+1}$ verringerte Zellaktivität an allen Untersuchungstagen. Sowohl für die Zitronensäureinhibition, als auch für die Natriumdiphosphatinhibition sank die Zellaktivität bzw. Aktivität pro Zelle teilweise auf null. Die Ergebnisse der Zellversuche wurden aus den in Kapitel 5.4 genannten Gründen und Schlussfolgerungen nicht für weitere Vergleiche bzw. Zusammenhänge herangezogen.

Für zukünftige Untersuchungen wäre eine Veränderung der Prozessparameter (pH-Wert, Temperatur, InhibitorKonzentration) denkbar. Zusätzlich sollten weitere Inhibitoren, wie Magnesium zur Verwendung kommen und untersucht werden. Im Urin wurden von Forschern synergistische Effekte zwischen Pyrophosphat und Phytinsäure oder Citrat und Pyrophosphat nachgewiesen. Die entdeckten Synergien zwischen unterschiedlichen Inhibitoren bei Brushitzementen könnten auf elektrochemische Beschichtungen übertragen werden und sich positiv auf die Veränderung der Schichten auswirken.

7. Literaturverzeichnis

- [1] R. Kern, J. Krämer, W. Micheelis, Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) Kurzfassung, (2006) 1-33.
- [2] R.A. Jordan, C. Bodechtel, K. Hertrampf, T. Hoffmann, T. Kocher, I. Nitschke, U. Schiffner, H. Stark, S. Zimmer, W. Micheelis, The fifth german oral health study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V)–rationale, design, and methods, *BMC Oral Health* 14(1) (2014) 1-617.
- [3] W.C. Head, D.J. Bauk, R.H. Emerson, Jr., Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (311) (1995) 85-90.
- [4] Y. Ding, C.Q. Qin, Y.R. Fu, J. Xu, D.S. Huang, In vitro comparison of the biological activity of alumina ceramic and titanium particles associated with aseptic loosening, *Biomedical Materials* 7(4) (2012) 1-8.
- [5] G.A. Obando-Pereda, L. Fischer, D.R. Stach-Machado, Titanium and zirconia particle-induced pro-inflammatory gene expression in cultured macrophages and osteolysis, inflammatory hyperalgesia and edema in vivo, *Life Sciences* 97(2) (2014) 96-106.
- [6] M.L. Schwarz, M. Kowarsch, S. Rose, K. Becker, T. Lenz, L. Jani, Effect of surface roughness, porosity, and a resorbable calcium phosphate coating on osseointegration of titanium in a minipig model, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 89(3) (2009) 667-678.
- [7] B.D. Boyan, T.W. Hummert, D.D. Dean, Z. Schwartz, Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response, *Biomaterials* 17(2) (1996) 137-146.
- [8] C.H. Hartwig, L. Rehak, S. Milz, K.U. Benner, W. Kusswetter, G. Willmann, Das Einwachsverhalten von Titan-Prüfkörpern unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit im metaphysären Knochenlager des Hundes--eine biomechanische und histologische Analyse [Osseointegration of titanium test bodies of different surface properties in metaphyseal bone sites of the dog--a biomechanical and histological analysis], *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering* 40(4) (1995) 99-105.
- [9] K. Gotfredsen, A. Wennerberg, C. Johansson, L.T. Skovgaard, E. Hjørtning-Hansen, Anchorage of TiO₂-blasted, HA-coated, and machined implants: an experimental study with rabbits, *Journal of Biomedical Materials Research* 29(10) (1995) 1223-1231.
- [10] C.P. Klein, P. Patka, H.B. van der Lubbe, J.G. Wolke, K. de Groot, Plasma-sprayed coatings of tetracalciumphosphate, hydroxyl-apatite, and alpha-TCP on titanium alloy: an interface study, *Journal of Biomedical Materials Research* 25(1) (1991) 53-65.
- [11] K. de Groot, R. Geesink, C.P. Klein, P. Serekian, Plasma sprayed coatings of hydroxylapatite, *Journal of Biomedical Materials Research* 21(12) (1987) 1375-1381.
- [12] B.C. Wang, T.M. Lee, E. Chang, C.Y. Yang, The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone: the effect of coating thickness, *Journal of Biomedical Materials Research* 27(10) (1993) 1315-1327.
- [13] B. Koch, J.G. Wolke, K. de Groot, X-ray diffraction studies on plasma-sprayed calcium phosphate-coated implants, *Journal of Biomedical Materials Research* 24(6) (1990) 655-667.
- [14] R.Y. Whitehead, W.R. Lacefield, L.C. Lucas, Structure and integrity of a plasma sprayed hydroxylapatite coating on titanium, *Journal of Biomedical Materials Research* 27(12) (1993) 1501-1507.
- [15] J. Wen, Y. Leng, J. Chen, C. Zhang, Chemical gradient in plasma-sprayed HA coatings, *Biomaterials* 21(13) (2000) 1339-1343.

- [16] C.P. Klein, J.G. Wolke, J.M. de Blicke-Hogervorst, K. de Groot, Features of calcium phosphate plasma-sprayed coatings: an in vitro study, *Journal of Biomedical Materials Research* 28(8) (1994) 961-967.
- [17] L.G. Ellies, D.G. Nelson, J.D. Featherstone, Crystallographic changes in calcium phosphates during plasma-spraying, *Biomaterials* 13(5) (1992) 313-316.
- [18] W. Tong, J. Chen, X. Zhang, Amorphization and recrystallization during plasma spraying of hydroxyapatite, *Biomaterials* 16(11) (1995) 829-832.
- [19] C. Moseke, W. Braun, A. Ewald, Electrochemically deposited Ca(OH)₂ coatings as a bactericidal and osteointegrative modification of Ti implants, *Advanced Engineering Materials* 2009, 11, No. 3 (2009) B1-B6.
- [20] J. Redepenning, J.P. Mclsaac, Electrocrystallization of brushite coatings on prosthetic alloys, *Chemistry of Materials* 2(6) (1990) 625-627.
- [21] J. Redepenning, T. Schlessinger, S. Burnham, L. Lippiello, J. Miyano, Characterization of electrolytically prepared brushite and hydroxyapatite coatings on orthopedic alloys, *Journal of Biomedical Materials Research* 30(3) (1996) 287-294.
- [22] J. Redepenning, G. Venkataraman, J. Chen, N. Stafford, Electrochemical preparation of chitosan/hydroxyapatite composite coatings on titanium substrates, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66(2) (2003) 411-416.
- [23] S. Ban, S. Maruno, Hydrothermal-electrochemical deposition of hydroxyapatite, *Journal of Biomedical Materials Research* 42(3) (1998) 387-395.
- [24] Y. Han, K. Xu, J. Lu, Morphology and composition of hydroxyapatite coatings prepared by hydrothermal treatment on electrodeposited brushite coatings, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10(4) (1999) 243-248.
- [25] M. Shirkhazadeh, Bioactive calcium-phosphate coatings prepared by electrodeposition, *Journal of Materials Science Letters* 10(23) (1991) 1415-1417.
- [26] M.C. Kuo, S.K. Yen, The process of electrochemical deposited hydroxyapatite coatings on biomedical titanium at room temperature, *Materials Science and Engineering C* 20(1-2) (2002) 153-160.
- [27] H. Oonishi, M. Yamamoto, H. Ishimaru, E. Tsuji, S. Kushitani, M. Aono, Y. Ukon, The effect of hydroxyapatite coating on bone-growth into porous titanium-alloy implants, *Journal of Bone and Joint Surgery British Volume* 71(2) (1989) 213-216.
- [28] M. Kumar, H. Dasarathy, C. Riley, Electrodeposition of brushite coatings and their transformation to hydroxyapatite in aqueous solutions, *Journal of Biomedical Materials Research* 45(4) (1999) 302-310.
- [29] H. Fleisch, Role of nucleation and inhibition in calcification, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 32 (1964) 170-180.
- [30] H. Fleisch, S. Bisaz, Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor, *The American Journal of Physiology* 203 (1962) 671-675.
- [31] H. Fleisch, S. Bisaz, Mechanism of calcification - inhibitory role of pyrophosphate, *Nature* 195(4844) (1962) 911.
- [32] H. Fleisch, S. Bisaz, Inhibitory effect of pyrophosphate on calcium oxalate precipitation and its relation to urolithiasis, *Experientia* 20(5) (1964) 276-277.
- [33] A. Jung, S. Bisaz, H. Fleisch, The binding of pyrophosphate and two diphosphonates by hydroxyapatite crystals, *Calcified Tissue Research* 11(4) (1973) 269-280.
- [34] F. Grases, M. Ramis, A. Costa-Bauzá, Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates, *Urological Research* 28(2) (2000) 136-140.
- [35] F. Grases, R.M. Prieto, B.M. Simonet, J.G. March, Phytate prevents tissue calcifications in female rats, *BioFactors* 11(3) (2000) 171-177.

- [36] F. Grases, A. Costa-Bauzá, Phytate (IP6) is a powerful agent for preventing calcifications in biological fluids: usefulness in renal lithiasis treatment, *Anticancer Research* 19(5A) (1999) 3717-3722.
- [37] L. Brečević, H. Füredi-Milhofer, Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions V. The influence of citrate ions, *Calcified Tissue International* 28(2) (1979) 131-136.
- [38] C.Y. Pak, K. Rodgers, J.R. Poindexter, K. Sakhaee, New methods of assessing crystal growth and saturation of brushite in whole urine: effect of pH, calcium and citrate, *The Journal of Urology* 180(4) (2008) 1532-1537.
- [39] D. Drenckhahn, J. Waschke, Taschenbuch Anatomie 1. Auflage, Elsevier GmbH, München, Urban und Fischer Verlag, 2008.
- [40] C. Moseke, Biomineralisation von Knochengewebe unter dem Einfluss von Metallionen - Modellsysteme und Kristallanalyse - Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Fachbereich Physik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster, 2003, p. 217.
- [41] R. Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2006.
- [42] N. Schwenzer, M. Eherenfeld, Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Zahnärztliche Chirurgie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2009.
- [43] S. Sterling, Numerische und experimentelle Untersuchung des biomechanischen Verhaltens sofortbelasteter Dentalimplantate bei verschiedenen Insertionstiefen - Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades, Medizinische Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2013, p. 73.
- [44] F. Wenniger, Modifikation von Titanoberflächen mittels elektrochemischer Abscheidung von Magnesiumphosphaten - Inaugural - Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten der Universität Würzburg, 2013, p. 126.
- [45] K.J. Quelch, R.A. Melick, P.J. Bingham, S.M. Mercuri, Chemical composition of human bone, *Archives of Oral Biology* 28(8) (1983) 665-674.
- [46] J.M. Mbuyi-Muamba, J. Dequeker, G. Gevers, Biochemistry of bone, *Baillière's Clinical Rheumatology* 2(1) (1988) 63-101.
- [47] S.V. Dorozhkin, M. Epple, Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten, *Angewandte Chemie* 114(7) (2002) 3260-3277.
- [48] S. Marković, L. Veselinović, M.J. Lukić, L. Karanović, I. Bračko, N. Ignjatović, D. Uskoković, Synthetic bone-like and biological hydroxyapatites: a comparative study of crystal structure and morphology, *Biomedical Materials* 6(4) (2011) 1-13.
- [49] J.M. Rueger, W. Linhart, D. Sommerfeldt, Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik-Implantationen. Tierexperimentelle Ergebnisse [Biologic reactions to calcium phosphate ceramic implantations. Results of animal experiments], *Der Orthopäde* 27(2) (1998) 89-95.
- [50] J.M. Rueger, Knochenersatzmittel. Heutiger Stand und Ausblick [Bone substitution materials. Current status and prospects], *Der Orthopäde* 27(2) (1998) 72-79.
- [51] M. Jarcho, Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (157) (1981) 259-278.
- [52] K. Søballe, Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs, *Acta Orthopaedica Scandinavica. Supplementum* 255 (1993) 1-58.
- [53] A. Sabokbar, R. Pandey, J. Diaz, J.M. Quinn, D.W. Murray, N.A. Athanasou, Hydroxyapatite particles are capable of inducing osteoclast formation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12(8) (2001) 659-664.
- [54] A.S. Posner, The structure of bone apatite surfaces, *Journal of Biomedical Materials Research* 19(3) (1985) 241-250.

- [55] J.M. ten Cate, J.D. Featherstone, Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2(3) (1991) 283-296.
- [56] J. Rassow, K. Hauser, R. Netzker, R. Deutzmann, *Biochemie* 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart 2008.
- [57] R.Z. LeGeros, Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification, *Zeitschrift für Kardiologie* Band 90 Supplement 3 (2001) 116-124.
- [58] U. Gbureck, S. Dembski, E. Barralet Jake, R. Thull, Brushit-Knochenzemente aus biphasigen β -Tricalciumphosphat/ Calciumpyrophosphat Keramiken [Brushite bone cements from biphasic β -tricalcium phosphate/ calcium pyrophosphate ceramics], *BIOmaterialien* (2004) 255-260.
- [59] N.M. Boroujeni, H. Zhou, T.J. Luchini, S.B. Bhaduri, Development of monetite/phosphorylated chitosan composite bone cement, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 102(2) (2014) 260-266.
- [60] F. Tamimi, B. Kumarasami, C. Doillon, U. Gbureck, D. Le Nihouannen, E. López-Cabarcos, J.E. Barralet, Brushite-collagen composites for bone regeneration, *Acta Biomaterialia* 4(5) (2008) 1315-1321.
- [61] A. Ewald, K. Helmschrott, G. Knebl, N. Mehrban, L.M. Grover, U. Gbureck, Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein expression in osteoblastic cells, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 96(2) (2011) 326-332.
- [62] J.O. Hollinger, J.C. Kleinschmidt, The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials, *The Journal of Craniofacial Surgery* 1(1) (1990) 60-68.
- [63] J.P. Schmitz, J.O. Hollinger, The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (205) (1986) 299-308.
- [64] C. Bosch, B. Melsen, K. Vargervik, Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials, *The Journal of Craniofacial Surgery* 9(4) (1998) 310-316.
- [65] N.R. Kübler, Osteoinduktion und -reparation [Osteoinduction and -reparation], *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG* 1(1) (1997) 2-25.
- [66] T. Albrektsson, C. Johansson, Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 10 Supplement 2 (2001) 96-101.
- [67] H.M. Frost, The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (248) (1989) 283-293.
- [68] H.M. Frost, The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (248) (1989) 294-309.
- [69] B.S. Noble, J. Reeve, Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance, *Molecular and Cellular Endocrinology* 159(1-2) (2000) 7-13.
- [70] S.C. Miller, L. de Saint-Georges, B.M. Bowman, W.S. Jee, Bone lining cells: structure and function, *Scanning Microscopy* 3(3) (1989) 953-961.
- [71] M.N. Wein, Bone lining cells: normal physiology and role in response to anabolic osteoporosis treatments, *Current Molecular Biology Reports* 3(2) (2017) 79-84.
- [72] S.G. Steinemann, Titanium--the material of choice?, *Periodontology* 2000 17 (1998) 7-21.
- [73] T. Albrektsson, P.I. Brånemark, H.A. Hansson, J. Lindström, Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man, *Acta Orthopaedica Scandinavica* 52(2) (1981) 155-170.
- [74] S. Parithimarkalaignan, T.V. Padmanabhan, Osseointegration: an update, *Journal of Indian Prosthodontic Society* 13(1) (2013) 2-6.

- [75] H. Terheyden, N.P. Lang, S. Bierbaum, B. Stadlinger, Osseointegration--communication of cells, *Clinical Oral Implants Research* 23(10) (2012) 1127-1135.
- [76] P.W. Kammerer, M. Gabriel, B. Al-Nawas, T. Scholz, C.M. Kirchmaier, M.O. Klein, Early implant healing: promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetical titanium surface modifications in vitro, *Clinical Oral Implants Research* 23(4) (2012) 504-510.
- [77] R.K. Schenk, D. Buser, Osseointegration: a reality, *Periodontology* 2000 17(1) (1998) 22-35.
- [78] W.E. Roberts, Bone tissue interface, *Journal of Dental Education* 52(12) (1988) 804-809.
- [79] J.E. Davies, Understanding peri-implant endosseous healing, *Journal of Dental Education* 67(8) (2003) 932-949.
- [80] G. Watzek, *Enossale Implantate in der oralen Chirurgie*, Quintessenz Verlags, Berlin ; Chicago, 1993.
- [81] L.C. Lucas, J.E. Lemons, Biodegradation of restorative metallic systems, *Advances in Dental Research* 6 (1992) 32-37.
- [82] I. Gotman, Characteristics of metals used in implants, *Journal of Endourology* 11(6) (1997) 383-389.
- [83] M. Ungethum, W. Winkler-Gniewek, *Toxikologie der Metalle und Biokompatibilität metallischer Implantatwerkstoffe [Toxicology of metals and biocompatibility of metallic implant materials]*, *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 122(1) (1984) 99-105.
- [84] Y. Sun, The effects of early stage load-bearing on bone ingrowth of porous coated implant in rabbits, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 72(5) (1992) 265-268, 318.
- [85] M. Baldauf, *Biokeramische Werkstoffe*, TU Bergakademie Freiberg Institut für Mineralogie (2008) 1-12.
- [86] T. Rae, The toxicity of metals used in orthopaedic prostheses. An experimental study using cultured human synovial fibroblasts, *The Journal of Bone and Joint Surgery British Volume* 63-B(3) (1981) 435-440.
- [87] S.J. Lugowski, D.C. Smith, A.D. McHugh, J.C. Van Loon, Release of metal ions from dental implant materials in vivo: determination of Al, Co, Cr, Mo, Ni, V, and Ti in organ tissue, *Journal of Biomedical Materials Research* 25(12) (1991) 1443-1458.
- [88] D.F. Williams, Titanium as a metal for implantation. Part 1: physical properties, *Journal of Medical Engineering and Technology* 1(4) (1977) 195-198.
- [89] D.F. Williams, Titanium as a metal for implantation. Part 2: biological properties and clinical applications, *Journal of Medical Engineering and Technology* 1(5) (1977) 266-270.
- [90] M. Ahmad, D. Gawronski, J. Blum, J. Goldberg, G. Gronowicz, Differential response of human osteoblast-like cells to commercially pure (cp) titanium grades 1 and 4, *Journal of Biomedical Materials Research* 46(1) (1999) 121-131.
- [91] C.E. Wen, Y. Yamada, K. Shimojima, Y. Chino, T. Asahina, M. Mabuchi, Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 13(4) (2002) 397-401.
- [92] F.B. Christensen, M. Dalstra, F. Sejlting, S. Overgaard, C. Bünger, Titanium-alloy enhances bone-pedicle screw fixation: mechanical and histomorphometrical results of titanium-alloy versus stainless steel, *European Spine Journal* 9(2) (2000) 97-103.
- [93] Y. Zhang, J. Wang, P. Wang, X. Fan, X. Li, J. Fu, S. Li, H. Fan, Z. Guo, Low elastic modulus contributes to the osteointegration of titanium alloy plug, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 101(4) (2013) 584-590.
- [94] A. Sicilia, S. Cuesta, G. Coma, I. Arregui, C. Guisasola, E. Ruiz, A. Maestro, Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients, *Clinical Oral Implants Research* 19(8) (2008) 823-835.
- [95] A. Siddiqi, A.G. Payne, R.K. De Silva, W.J. Duncan, Titanium allergy: could it affect dental implant integration?, *Clinical Oral Implants Research* 22(7) (2011) 673-680.

- [96] M. Goutam, C. Giriya pura, S.K. Mishra, S. Gupta, Titanium allergy: a literature review, *Indian Journal of Dermatology* 59(6) (2014) 1-6.
- [97] D. Buser, R.K. Schenk, S. Steinemann, J.P. Fiorellini, C.H. Fox, H. Stich, Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs, *Journal of Biomedical Materials Research* 25(7) (1991) 889-902.
- [98] L.L. Hench, R.J. Splinter, W. Allen, T. Greenlee, Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, *Journal of Biomedical Materials Research* 5(6) (1971) 117-141.
- [99] A.J. Clemow, A.M. Weinstein, J.J. Klawitter, J. Koeneman, J. Anderson, Interface mechanics of porous titanium implants, *Journal of Biomedical Materials Research* 15(1) (1981) 73-82.
- [100] J.D. Bobyn, R.M. Pilliar, H.U. Cameron, G.C. Weatherly, G.M. Kent, The effect of porous surface configuration on the tensile strength of fixation of implants by bone ingrowth, *Clinical Orthopaedics and Related Research* (149) (1980) 291-298.
- [101] K.A. Thomas, S.D. Cook, An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition, *Journal of Biomedical Materials Research* 19(8) (1985) 875-901.
- [102] D.L. Cochran, P. Nummikoski, F. Higginbottom, J. Hermann, S. Makins, D. Buser, Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results, *Clinical Oral Implants Research* 7(3) (1996) 240-252.
- [103] W. Becker, B.E. Becker, A. Ricci, O. Bahat, E. Rosenberg, L.F. Rose, M. Handelsman, H. Israelson, A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures, *Clinical Implant Dentistry and Related Research* 2(3) (2000) 159-165.
- [104] D. Li, S.J. Ferguson, T. Beutler, D.L. Cochran, C. Sittig, H.P. Hirt, D. Buser, Biomechanical comparison of the sandblasted and acid-etched and the machined and acid-etched titanium surface for dental implants, *Journal of Biomedical Materials Research* 60(2) (2002) 325-332.
- [105] L.M. Czumbel, B. Kerémi, N. Gede, A. Mikó, B. Tóth, D. Csupor, A. Szabó, S. Farkasdi, G. Gerber, M. Balaskó, E. Pétervári, R. Sepp, P. Hegyi, G. Varga, Sandblasting reduces dental implant failure rate but not marginal bone level loss: A systematic review and meta-analysis, *PLOS ONE* 14(5) (2019) 1-19.
- [106] S.A. Gehrke, S. Taschieri, M. Del Fabbro, P.G. Coelho, Positive biomechanical effects of titanium oxide for sandblasting implant surface as an alternative to aluminium oxide, *The Journal of Oral Implantology* 41(5) (2015) 515-522.
- [107] N. Sykaras, A.M. Iacopino, V.A. Marker, R.G. Triplett, R.D. Woody, Implant materials, designs, and surface topographies: their effect on osseointegration. A literature review, *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 15(5) (2000) 675-690.
- [108] A. Canabarro, M.G. Diniz, S. Paciornik, L. Carvalho, E.M. Sampaio, M.M. Beloti, A.L. Rosa, R.G. Fischer, High concentration of residual aluminum oxide on titanium surface inhibits extracellular matrix mineralization, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 87(3) (2008) 588-597.
- [109] A. Piattelli, M. Degidi, M. Paolantonio, C. Mangano, A. Scarano, Residual aluminum oxide on the surface of titanium implants has no effect on osseointegration, *Biomaterials* 24(22) (2003) 4081-4089.
- [110] Y. Iwaya, M. Machigashira, K. Kanbara, M. Miyamoto, K. Noguchi, Y. Izumi, S. Ban, Surface properties and biocompatibility of acid-etched titanium, *Dental Materials Journal* 27(3) (2008) 415-421.
- [111] D. Naveen Reddy Vootla, D. K. Varun Reddy, Osseointegration- key factors affecting its success-an overview, *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 16 (2017) 62-68.
- [112] D. Cochran, T. Oates, D. Morton, A. Jones, D. Buser, F. Peters, Clinical field trial examining an implant with a sand-blasted, acid-etched surface, *Journal of Periodontology* 78(6) (2007) 974-982.

- [113] T. Nordin, R. Nilsson, A. Frykholm, M. Hallman, A 3-arm study of early loading of rough-surfaced implants in the completely edentulous maxilla and in the edentulous posterior maxilla and mandible: results after 1 year of loading, *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 19(6) (2004) 880-886.
- [114] R. Cornelini, F. Cangini, U. Covani, A. Barone, D. Buser, Immediate loading of implants with 3-unit fixed partial dentures: a 12-month clinical study, *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 21(6) (2006) 914-918.
- [115] Y.T. Sul, C.B. Johansson, Y. Jeong, K. Röser, A. Wennerberg, T. Albrektsson, Oxidized implants and their influence on the bone response, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 12(10-12) (2001) 1025-1031.
- [116] Y.T. Sul, C.B. Johansson, S. Petronis, A. Krozer, Y. Jeong, A. Wennerberg, T. Albrektsson, Characteristics of the surface oxides on turned and electrochemically oxidized pure titanium implants up to dielectric breakdown: the oxide thickness, micropore configurations, surface roughness, crystal structure and chemical composition, *Biomaterials* 23(2) (2002) 491-501.
- [117] R.A. Abdelrahim, N.A. Badr, K. Baroudi, Effect of anodization and alkali-heat treatment on the bioactivity of titanium implant material (an in vitro study), *Journal of International Society of Prevention and Community Dentistry* 6(3) (2016) 189-195.
- [118] T. Traini, G. Murmura, B. Sinjari, G. Perfetti, A. Scarano, C. D'Arcangelo, S. Caputi, The surface anodization of titanium dental implants improves blood clot formation followed by osseointegration, *Coatings* 8(7) (2018) 252.
- [119] W. Liu, S. Liu, L. Wang, Surface modification of biomedical titanium alloy: micromorphology, microstructure evolution and biomedical applications, *Coatings* 9 (2019) 249.
- [120] B. Fouziya, M. A. Uthappa, D. Amara, N. Tom, S. Byrappa, K. Sunny, Surface modifications of titanium implants - the new, the old, and the never heard of options, *Journal of Advanced Clinical and Research Insights* 3 (2016) 215-219.
- [121] R.S. Faeda, H.S. Tavares, R. Sartori, A.C. Guastaldi, E. Marcantonio, Jr., Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias, *Brazilian Oral Research* 23(2) (2009) 137-143.
- [122] A. Jemat, M.J. Ghazali, M. Razali, Y. Otsuka, Surface modifications and their effects on titanium dental implants, *BioMed Research International* 2015 (2015) 1-11.
- [123] A. Gaggi, G. Schultes, W.D. Müller, H. Kärcher, Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces--a comparative study, *Biomaterials* 21(10) (2000) 1067-1073.
- [124] C. Berndt, G. Haddad, A. Farmer, K.A. Gross, Thermal spraying for bioceramic applications, *Materials Forum* 14 (1990) 161-173.
- [125] P. Ducheyne, K.E. Healy, The effect of plasma-sprayed calcium phosphate ceramic coatings on the metal ion release from porous titanium and cobalt-chromium alloys, *Journal of Biomedical Materials Research* 22(12) (1988) 1137-1163.
- [126] W.J. Dhert, C.P. Klein, J.G. Wolke, E.A. van der Velde, K. de Groot, P.M. Rozing, A mechanical investigation of fluorapatite, magnesiumwhitlockite, and hydroxylapatite plasma-sprayed coatings in goats, *Journal of Biomedical Materials Research* 25(10) (1991) 1183-1200.
- [127] D.P. Rivero, J. Fox, A.K. Skipor, R.M. Urban, J.O. Galante, Calcium phosphate-coated porous titanium implants for enhanced skeletal fixation, *Journal of Biomedical Materials Research* 22(3) (1988) 191-201.
- [128] M. Kumar, J. Xie, K. Chittur, C. Riley, Transformation of modified brushite to hydroxyapatite in aqueous solution: effects of potassium substitution, *Biomaterials* 20(15) (1999) 1389-1399.
- [129] P.L. Tranquilli, A. Merolli, O. Palmacci, C. Gabbi, A. Cacchioli, G. Gonizzi, Evaluation of different preparations of plasma-spray hydroxyapatite coating on titanium alloy and duplex

stainless steel in the rabbit, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(6-7) (1994) 345-349.

[130] G. Giavaresi, M. Fini, A. Cigada, R. Chiesa, G. Rondelli, L. Rimondini, P. Torricelli, N.N. Aldini, R. Giardino, Mechanical and histomorphometric evaluations of titanium implants with different surface treatments inserted in sheep cortical bone, *Biomaterials* 24(9) (2003) 1583-1594.

[131] P. Amrollahi, J. Krasinski, R. Vaidyanathan, L. Tayebi, D. Vashaee, Electrophoretic deposition (EPD): fundamentals and applications from nano-to micro-scale structures, *Handbook of Nanoelectrochemistry* (2015) 1-27.

[132] L. Besra, M. Liu, A review on fundamentals and applications of electrophoretic deposition (EPD), *Progress in Materials Science* 52(1) (2007) 1-61.

[133] O.O. Van der Biest, L.J. Vandeperre, Electrophoretic deposition of materials, *Annual Review of Materials Science* 29(1) (1999) 327-352.

[134] A.R. Boccaccini, S. Keim, R. Ma, Y. Li, I. Zhitomirsky, Electrophoretic deposition of biomaterials, *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 7 Supplement 5 (2010) 581-613.

[135] I. Zhitomirsky, L. Gal-Or, Electrophoretic deposition of hydroxyapatite, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 8(4) (1997) 213-219.

[136] K.H. Kim, N. Ramaswamy, Electrochemical surface modification of titanium in dentistry, *Dental Materials Journal* 28(1) (2009) 20-36.

[137] C. Moseke, F. Hage, E. Vorndran, U. Gbureck, TiO₂ nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents, *Applied Surface Science* 258(14) (2012) 5399-5404.

[138] C. Moseke, C. Lehmann, T. Schmitz, F. Reinert, J. Groll, U. Gbureck, Nanostructuring of refractory metal surfaces by electrochemical oxidation: Nb and the binary systems Ti-Ta and Nb-Ta, *Current Nanoscience* 9 (2013) 132-138.

[139] A. Elsanousi, J. Zhang, H.M.H. Fadlalla, F. Zhang, H. Wang, X. Ding, Z. Huang, C. Tang, Self-organized TiO₂ nanotubes with controlled dimensions by anodic oxidation, *Journal of Materials Science* 43(22) (2008) 7219-7224.

[140] D.Y. Kim, M. Kim, H.E. Kim, Y.H. Koh, H.W. Kim, J.H. Jang, Formation of hydroxyapatite within porous TiO₂ layer by micro-arc oxidation coupled with electrophoretic deposition, *Acta Biomaterialia* 5(6) (2009) 2196-2205.

[141] P. Ducheyne, W. Van Raemdonck, J.C. Heughebaert, M. Heughebaert, Structural analysis of hydroxyapatite coatings on titanium, *Biomaterials* 7(2) (1986) 97-103.

[142] D. Scharnweber, S. Bierbaum, Electrochemically assisted deposition of thin CaP coatings, in: B. León, J. Jansen (Eds.), *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer New York (2009) 215-261.

[143] S. Rößler, A. Sewing, M. Stölzel, R. Born, D. Scharnweber, M. Dard, H. Worch, Electrochemically assisted deposition of thin calcium phosphate coatings at near-physiological pH and temperature, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 64(4) (2003) 655-663.

[144] D. Scharnweber, M. Flössel, R. Born, H. Worch, Adjusting the chlorhexidine content of calcium phosphate coatings by electrochemically assisted co-deposition from aqueous solutions, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18(2) (2007) 391-397.

[145] L. Brečević, H. Füredi-Milhofer, Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solutions II. The formation and transformation of precipitates, *Calcified Tissue Research* 10(1) (1972) 82-90.

[146] J.L. Giocondi, B.S. El-Dasher, G.H. Nancollas, C.A. Orme, Molecular mechanisms of crystallization impacting calcium phosphate cements, *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 368(1917) (2010) 1937-1961.

- [147] M. Bohner, J. Lemaitre, T.A. Ring, Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of β -tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures, *Journal of the American Ceramic Society* 79(6) (1996) 1427-1434.
- [148] M.P. Hofmann, A.M. Young, U. Gbureck, S.N. Nazhat, J.E. Barralet, FTIR-monitoring of a fast setting brushite bone cement: effect of intermediate phases, *Journal of Materials Chemistry* 16(31) (2006) 3199-3206.
- [149] M.H. Alkhraisat, F.T. Mariño, J.R. Retama, L.B. Jerez, E. López-Cabarcos, Beta-tricalcium phosphate release from brushite cement surface, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 84(3) (2008) 710-717.
- [150] A. Costa-Bauzá, C. Barceló, J. Perelló, F. Grases, Synergism between the brushite and hydroxyapatite urinary crystallization inhibitors, *International Urology and Nephrology* 34(4) (2002) 447-451.
- [151] Z. Amjad, Constant composition study of crystal growth of dicalcium phosphate dihydrate. The influence of polyphosphates, phosphonates, and phytate, *Canadian Journal of Chemistry* 66(9) (1988) 2181-2187.
- [152] T. Konishi, S. Takahashi, K. Nishiyama, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, M. Aizawa, Fabrication of novel bioresorbable β -tricalcium phosphate cement on the basis of chelate-setting mechanism of inositol phosphate and its evaluation, *Journal of the Ceramic Society of Japan* 119(1385) (2011) 35-42.
- [153] T. Konishi, M. Mizumoto, M. Honda, Y. Horiguchi, K. Oribe, H. Morisue, K. Ishii, Y. Toyama, M. Matsumoto, M. Aizawa, Fabrication of novel biodegradable α -tricalcium phosphate cement set by chelating capability of inositol phosphate and its biocompatibility, *Journal of Nanomaterials* 2013 (2013) 1-11.
- [154] H. Fleisch, S. Bisaz, R.G. Russell, Influence of pyrophosphate on the crystallisation of uric acid and magnesium ammonium phosphate and its implications in phosphate therapy for urolithiasis, *Urologia Internationalis* 22(6) (1967) 483-491.
- [155] M.H. Alkhraisat, F.T. Mariño, C.R. Rodríguez, L.B. Jerez, E. López-Cabarcos, Combined effect of strontium and pyrophosphate on the properties of brushite cements, *Acta Biomaterialia* 4(3) (2008) 664-670.
- [156] P. Scherrer, Bestimmung der Grösse und der inneren Struktur von Kolloidteilchen mittels Röntgenstrahlen, *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen* 26 (1918) 98-100.
- [157] Roche Diagnostics, Cell Proliferation Reagent WST-1. <<http://lifescience.roche.com/shop/products/cell-proliferation-reagent-wst-1#tab-0>>, 2013).
- [158] J. March, B. Simonet, F. Grases, A. Salvador, Indirect determination of phytic acid in urine, *Analytica Chimica Acta* 367(1) (1998) 63-68.
- [159] F. Grases, L. Garcia-Ferragut, A. Costa-Bauzá, J.G. March, Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation, *Nephron* 73(4) (1996) 561-568.
- [160] K.S. Tenhuisen, P.W. Brown, The effects of citric and acetic acids on the formation of calcium-deficient hydroxyapatite at 38 °C, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(5) (1994) 291-298.
- [161] F.T. Mariño, J. Torres, M. Hamdan, C.R. Rodríguez, E. López-Cabarcos, Advantages of using glycolic acid as a retardant in a brushite forming cement, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 83(2) (2007) 571-579.
- [162] A. Yanovska, V. Kuznetsov, A. Stanislavov, S. Danilchenko, L. Sukhodub, A study of brushite crystallization from calcium-phosphate solution in the presence of magnesium under the action of a low magnetic field, *Materials Science and Engineering C* 32(7) (2012) 1883-1887.

- [163] W.-J. Shih, S.-H. Wang, W.-L. Li, M.-H. Hon, M.-C. Wang, The phase transition of calcium phosphate coatings deposited on a Ti-6Al-4V substrate by an electrolytic method, *Journal of Alloys and Compounds* 434-435 (2007) 693-696.
- [164] J.E. Barralet, L.M. Grover, U. Gbureck, Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement, *Biomaterials* 25(11) (2004) 2197-2203.
- [165] W.A. Rutala, D.J. Weber, Disinfection, sterilization, and antisepsis: an overview, *American Journal of Infection Control* 44 Supplement 5 (2016) e1-6.
- [166] S. Endres, M. Kratz, M. Heinz, C. Herzberger, S. Reichel, T. von Garrel, L. Gotzen, A. Wilke, Biokompatibilitätstestung unterschiedlich sterilisierter bzw. desinfizierter allogener Knochentransplantate im Vergleich zum Goldstandard der autologen Knochenspende--Eine "In-vitro"-Analyse der Immunmodulation [Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in comparison to the gold standard of autologous bone grafts--an "in vitro" analysis of immunomodulation], *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* 143(6) (2005) 660-668.
- [167] E. Duff, Orthophosphates. XIII. Thermal decomposition of secondary calcium orthophosphate (CaHPO₄) and secondary calcium orthophosphate dihydrate (CaHPO₄ · 2H₂O), *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology* 21(8) (1971) 233-235.
- [168] M. Bohner, U. Gbureck, Thermal reactions of brushite cements, *Journal of Biomedical Materials Research Part B, Applied Biomaterials* 84(2) (2008) 375-385.
- [169] F. Tamimi, D. Le Nihouannen, H. Eimar, Z. Sheikh, S. Komarova, J. Barralet, The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: brushite vs. monetite, *Acta Biomaterialia* 8(8) (2012) 3161-3169.
- [170] A.C. Tas, S.B. Bhaduri, Chemical processing of CaHPO₄·2H₂O: its conversion to hydroxyapatite, *Journal of American Ceramic Society* 87(12) (2004) 2195-2200.
- [171] M.H. Prado Da Silva, J.H.C. Lima, G.A. Soares, C.N. Elias, M.C. de Andrade, S.M. Best, I.R. Gibson, Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium, *Surface and Coatings Technology* 137(2-3) (2001) 270-276.
- [172] H. Wang, N. Eliaz, Z. Xiang, H.-P. Hsu, M. Spector, L.W. Hobbs, Early bone apposition in vivo on plasma-sprayed and electrochemically deposited hydroxyapatite coatings on titanium alloy, *Biomaterials* 27(23) (2006) 4192-4203.
- [173] P. Jamshidi, R.H. Bridson, A.J. Wright, L.M. Grover, Brushite cement additives inhibit attachment to cell culture beads, *Biotechnology and Bioengineering* 110(5) (2013) 1487-1494.
- [174] Y. Yonggang, J.G.C. Wolke, L. Yubao, J.A. Jansen, Preparation and characterization of RF magnetron sputtered calcium pyrophosphate coatings, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 76(4) (2006) 744-752.
- [175] M. Roy, K. Devoe, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Mechanical and in vitro biocompatibility of brushite cement modified by polyethylene glycol, *Materials Science and Engineering C, Materials for Biological Applications* 32(8) (2012) 2145-2152.

Chemikalienliste:

Chemikalie	Summenformel	Hersteller	Chargennummer
Calcium Phosphat Monohydrat monobasisch	$\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	Chemie 1412781 20309120
Calcium Phosphat Monohydrat monobasisch	$\text{CaH}_4\text{P}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	Chemie BCBJ7664V
Zitronensäure Monohydrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	Chemie SZBB2010V
Tetra-Natriumdiphosphat-Decahydrat	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt	F1061091 139
Phytinsäure 40 %	$\text{C}_6\text{H}_{18}\text{P}_6\text{O}_{24}$	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim	Chemie BCBH8997V
Korox 50	Al_2O_3	BEGO GmbH & Co. KG, Bremen	1225262
Extran® MA 03 phosphatfrei	-	Merck KGaA, Darmstadt	L58143450
Ethanol 70 %	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	FMZ Würzburg	
PBS Puffer 70 %		Nach VA-BioLab 042901	
CellProliferationsReagent WST-1		Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim	Art. Nr. 1644807
DNEM Medium		Nach VA-Biolab 042901	
Accutase		Fa. PAA GmbH, Cölbe	Art. Nr. L11-007
Isotonlösung		Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld	Art. Nr. 8448044

Geräteliste 1:

Gerät	Hersteller
Ohaus Explorer T2914	OHAUS Corp., Parsippany, USA
Magnetrührer IKA RCT Basic	IKA Werke GmbH & CO. KG
Reinstwasseranlage aurium pro VF TOC	Fa. Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen
Ultraschallbad SONOREX Typ RK 102 H	Bandelin electronic, Berlin
Sandstrahlgerät Basic Quattro	Renfert GmbH, Hilzingen
Wenking LPG03-S Laboratory Potentiostat-Galvanostat	Bank Elektronik GmbH, Clausthal-Zellerfeld
Software CPCDT98h b Test Point for Windows(v5.0)	Capital Equipment Inc., Puyallup, WA, USA
Integra Series 2700 Multimeter / Data Acquisition System	Keithley Instruments GmbH, Germering
doppelwandige elektrochemische Zelle	Schott AG, Mainz
Siemens D5005 Röntgendiffraktometer	Bruker AXS, Karlsruhe
Sputter Coating Emitech K550	Emitech Ltd, Kent, England
Rasterelektronenmikroskop DSM 940	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Videoprinter Mitsubishi P66E	Mitsubishi Electronic Corp., Tokyo, Japan
Software Eva v10.0.1.0	Bruker Corp. Billerica, MA, USA
Inolab pH Level 1	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV	Fa. Systec GmbH, Wetztenberg
Inkubator Hera cell 150i	Fa. Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold

Geräteliste 2:

Gerät	Hersteller
Inkubator Hera cell 150i	Fa. Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
ELISA Reader Spectrafluor plus	Fa. Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Zählgefäß	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Zellzähler Typ Casy 1 Schärfe System	Roche GmbH, Mannheim

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Uwe Gbureck** für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und der Möglichkeit die Räumlichkeiten, Geräte und Materialien des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (FMZ) der Universität Würzburg jederzeit nutzen zu dürfen.

Meinen besonderen Dank möchte ich an meinen Betreuer Herrn **Markus Meininger** aussprechen, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Des Weiteren Bedanke ich mich bei **Dr. Claus Moseke** für die stets humorvolle und umfangreiche Hilfe vor Ort und per Mail.

Herrn **Prof. Dr. Torsten Blunk** danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Vielen Dank auch an alle **Mitarbeitenden der FMZ**, die mir mit ihrer Hilfe den Aufbau, die Durchführung und die Auswertung der Versuchsreihen ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter **Elke-Kerstin Hohmuth**, die mir das Studium der Zahnmedizin erst ermöglicht hat und mich auf meinem ganzen Bildungs- und Berufsweg sowie auch privat immer unterstützte, ermutigte und mich zu dem gemacht hat, der ich heute bin. Mögest du in Frieden ruhen. Ich wünsche du könntest jetzt noch bei mir sein.

Zu guter Letzt danke ich meiner Freundin **Sabrina Götz** für ihren liebevollen Beistand und ihre permanente Unterstützung. Ohne dich und deine Deadlines hätte ich diese Arbeit vermutlich nicht abgeschlossen.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Lars Wettstein

Ausbildungsdaten

Abitur

Berufliche Erfahrungen und Tätigkeiten

14.11.2012	Zahnmedizinisches Staatsexamen
1/2013 – 1/2014	Experimentelle Versuche der Dr. Arbeit
01/2014 - 12/2015	Assistenzzeit
01/2016 - 05/2016	Angestellter Zahnarzt
05/2016 -	Angestellter Zahnarzt