

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. B. Klaiber

Titanoxidnanotubes und ihre Anwendung als Drug-Release-System

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Felix Hage
aus Kemnath

Würzburg, Juli 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. Uwe Gbureck

Koreferent: Prof. Dr. Dr. Alexander C. Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2010

Promovend ist Zahnarzt

gewidmet...

Meinen Eltern

- für alles, was sie mir ermöglicht haben -

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung.....	1
2. Kenntnisstand.....	4
2.1 Titan in der Medizin.....	4
2.1.1 Definition Biokompatibilität.....	4
2.1.2 Definition Osseointegration.....	5
2.1.3 Anwendungsbereiche.....	5
2.2 Modifikationsmöglichkeiten medizinischer Titanoberflächen.....	6
2.3 Nanotubes – ein historischer Rückblick.....	8
2.4 Das Prinzip der Anodisierung.....	9
2.4.1 Physikalisch-chemische Grundlagen.....	9
2.4.2 Anodisierung von Titanoberflächen in fluoridhaltigen Elektrolyten.....	10
2.4.3 Modellvorstellung der Nanotubeentstehung.....	12
2.5 Experimentelle Anwendung von Titanoxidnanotubes.....	16
2.5.1 Wirkung von Titanoxidnanotubes auf die Zellgenese.....	16
2.5.2 Nanotubes als Drug-Release-System.....	18
2.5.3 Weitere Anwendungen der Titanoxidnanotubes im Überblick.....	20
3. Material und Methode.....	22
3.1 Vorbereitung der Titanproben.....	22
3.2 Die Herstellung der Titanoxidnanotubes.....	22
3.2.1 Elektrolyt auf Wasserbasis.....	22
3.2.2 Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis.....	24
3.2.3 Wärmenachbehandlung.....	25
3.3 Oberflächenanalyse.....	26
3.3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM).....	26
3.3.2 Röntgendiffraktometrie (XRD).....	27
3.3.3 Bestimmung der Nanotubeschichtdicke.....	28
3.4 Wirkstoffmodifikation.....	28
3.4.1 Auswahl der Wirkstoffe.....	28
3.4.2 Vakuumimprägnierung.....	30

3.5	Desorption der Wirkstoffe.....	32
3.5.1	Statische Freisetzung in einem Auslagerungssystem aus Teflon®	32
3.5.2	Messung der Antibiotikakonzentrationen durch UV/Vis-Spektroskopie.....	33
3.5.3	Messung der Silberkonzentration durch ICP-Massenspektrometrie.....	35
3.6	Das Korsmeyer-Peppas-Modell.....	36
3.7	Verwendete Chemikalien und Wirkstoffe.....	37
4.	Ergebnisse.....	38
4.1	Strom-Zeit-Diagramm einer Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis.....	38
4.2	Herstellung von vier gleichwertigen Titanproben.....	39
4.3	Definierte Versuchsoberfläche – Abdichtung des Probenzylinders.....	40
4.4	Oberflächenanalyse – Elektrolyt auf Wasserbasis.....	41
4.5	Oberflächenanalyse – Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis.....	44
4.6	Vancomycinauslagerung.....	48
4.6.1	Auslagerungsergebnisse der Oberflächen aus einem Elektrolyten auf Wasserbasis.....	48
4.6.2	Auslagerungsergebnisse der Oberflächen aus einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis.....	50
4.6.3	Vergleich der Oberflächen.....	53
4.7	Ergebnisse der Silberauslagerung.....	54
5.	Diskussion.....	57
5.1	Herstellung der Nanotubeoberflächen.....	59
5.2	Adsorption und Desorption von Vancomycin.....	61
5.3	Adsorption und Desorption von Silber.....	67
6.	Zusammenfassung.....	72
7.	Literaturverzeichnis.....	73

1. Einleitung und Problemstellung

Es ist dem steten Fortschritt der medizinischen Forschung zu verdanken, dass tragende Körperbestandteile durch Implantate ersetzt und schwere Infektionen mit Hilfe antibiotischer Präparate therapiert werden können. Diese Entwicklung ist heute insbesondere im Bereich der Zahnmedizin erkennbar, in der, für jeden Zahnarzt praktikabel, Titanimplantate als künstlicher Wurzelersatz Einzug gehalten haben. Während dieser therapeutische Ansatz vor 10 – 15 Jahren noch die Ausnahmeerscheinung war, wurden in Deutschland 2008 nach einer offiziellen Schätzung des Verbandes der Deutschen Dental-Industrie e. V. Köln 700 000 Titanimplantate diverser Hersteller gesetzt und mit zahnähnlichen Aufbauten funktionell belastet [1]. Ein weiterer wichtiger Bereich, in dem Implantate erfolgreich Verwendung finden, ist die Orthopädie. So ist es heute möglich, degenerierte Gelenke durch entsprechende Eingriffe zu therapieren und sogar komplette Gelenkköpfe funktionell zu ersetzen. Auch hierbei hat sich der Werkstoff Titan als äußerst günstig erwiesen [2].

Grundvoraussetzung für eine funktionelle Belastung medizinischer Implantate ist die Osseointegration. Diverse Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass hierbei nicht nur die chemische Zusammensetzung der Implantatoberfläche wichtig ist, durch die Biokompatibilität bedingt wird, sondern gerade die Oberflächenmorphologie in der Größenordnung von wenigen zehn bis hundert Nanometern eine entscheidende Rolle spielt [3, 4]. Diese Oberflächenstrukturen können größenabhängig zu verstärkter Adhäsion, Proliferation und Matrixbildung körpereigener Osteoblasten führen, aber auch deren Apoptose induzieren [5]. Die exakten Zusammenhänge sind hierbei noch nicht vollständig geklärt. So ist eine genaue in vitro und in vivo Evaluation neuer Oberflächenstrukturen unabdingbar.

Ein entscheidendes Problem der Implantatchirurgie sind postoperativ auftretende Infektionen. Um die Einheilung zu unterstützen, wird deshalb meist präventiv auf standardisierte, antibiotische und entzündungshemmende Begleittherapien zurückgegriffen. Dadurch wird versucht, dieses erhebliche

therapeutische Risiko zu minimieren und den prozentualen Behandlungserfolg zu steigern. Eine systemische Gabe ist allerdings nur bedingt wirksam, da viele Medikamente auf Grund ungünstiger Verteilungskinetik den Implantat-Gewebeübergang, insbesondere im nekrotischen und avaskulären Gewebe, in nur zu geringen und somit unwirksamen Dosen erreichen. Die Reserveantibiotika Gentamycin und Vancomycin gegen multiresistente Problemkeime, wie zum Beispiel den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), werden enteral nicht resorbiert und können ausschließlich intravenös oder lokal appliziert werden. Diese Tatsachen legen eine ortsgebundene Applikation der Wirkstoffe nahe, durch die am therapeutisch interessanten Ort eine erheblich größere Konzentration erreicht werden kann, allerdings ohne das Risiko einer erhöhten systemischen Toxizität [6, 7].

Auch in anderen Fachbereichen der Medizin haben Verletzungen der Oberflächenintegrität durch medizinische Apparaturen regelmäßig schwere Infektionen, bis hin zu Sepsis, und in besonders schweren Fällen den Tod zur Folge. Zu nennen sind hier katheterassoziierte Infektionen, insbesondere in den Fachbereichen der Urologie, Kardiologie sowie der Intensivmedizin [8, 9]. Auch hier ist das Interesse groß, dieses Risiko zu senken und die therapeutische Sicherheit zu steigern. Als Beispiel zeigen hier neue, mit Silber als antibakteriellem Wirkstoff beschichtete, künstliche Herzklappen und Katheter erste Erfolge [10, 11].

In der Literatur der letzten Jahre sind verschiedenste Ansätze zu Oberflächenmodifikationen beschrieben worden, durch die eine kontrollierte Abgabe antimikrobiell wirksamer Substanzen ermöglicht werden soll. Allerdings sind viele Oberflächen, die zur kontrollierten Abgabe wirksamer Substanzen in der Lage sind, mit Mängeln behaftet. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang begrenzte chemische Stabilität, lokale Entzündungsreaktionen und das Fehlen einer kontrollierten Freisetzungskinetik [12]. Insbesondere für Stents, Katheter und Implantate sind neue Oberflächen wünschenswert, die durch eine fraktionierte Abgabe ihrer Wirkstoffe das Infektionsrisiko senken und die Sicherheit für Therapeuten und Patienten entscheidend erhöhen.

1. Einleitung und Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine neuartige Strukturmodifikation medizinischer Titanoberflächen experimentell nachzuvollziehen und ihr Potential hinsichtlich der langfristigen Abgabe ausgewählter Substanzen in vitro abzuschätzen. Zu diesem Zweck wurden Titanplättchen in fluorhaltigen Elektrolyten anodisiert. Es entstanden geordnete, röhrenförmige Strukturen mit Durchmessern von ca. 70 – 160 nm und Längen von bis zu ca. 6,5 μm . Diese Oberflächen wurden unter Vakuum mit Vancomycin und Silber als Beispiele für antimikrobiell wirksame Substanzen beladen und die Abgabemengen in einem Auslagerungssystem aus Teflon[®] zeitbezogen gemessen.

2. Kenntnisstand

2.1 Titan in der Medizin

2.1.1 Definition Biokompatibilität

Unter Biokompatibilität wird die Eigenschaft eines Biomaterials verstanden, seine gewünschte Funktion im Rahmen einer angemessenen Wirtsreaktion zu erfüllen [13]. Diese Definition beinhaltet, dass die Verwendung eines Werkstoffes nicht genotoxischen und karzinogenen Einfluss auf den Wirtsorganismus ausübt oder zu direkten Zellschäden in seiner Umgebung führt. Auch darf es zu keiner sonstigen Irritation oder Sensibilisierung des umliegenden Gewebes kommen [3]. Eine weitere Einteilung erfolgt in die Bereiche biotolerant, bioinert und bioaktiv. Dabei lassen Medizinprodukte, die als biotolerant bezeichnet werden, Anwendungszeiträume von Monaten bis wenigen Jahren zu. Langfristig treten geringfügige Mängel in der Gewebereaktion auf. Bioinerte Werkstoffe verhalten sich in vivo beinahe neutral zu ihrer Umgebung und können durch den Körper, zum Beispiel in Form von Titanoxidoberflächen, zur Anlagerung vitalen Gewebes genutzt werden. Eine chemische Bindung zu diesen Oberflächen erfolgt nicht. Davon werden bioaktive Oberflächen unterschieden, die eine Adhäsion von körpereigenem Gewebe ermöglichen, wie zum Beispiel manche Keramiken [14].

In vielen Bereichen der Medizin wird heute jenseits der Epithelgrenzen des Körpers dem Werkstoff Titan der Vorzug gegeben. Es zeichnet sich durch eine hohe Festigkeit bei einer relativ geringen Dichte aus. Dabei ist es duktil, was die Einheilung und die Funktion in vitalem Knochen begünstigt. Die bedeutendste Eigenschaft ist aber in der Bildung einer oxidischen Schutzschicht zu sehen. Diese Schicht ist chemisch beinahe vollständig inert und macht es in vielen Medien korrosionsbeständig [3], zudem wirkt sie elektrisch isolierend. Verglichen mit den Oberflächen vieler anderer Metalle werden Proteine in direkter Implantatumgebung nicht durch auftretende Mikroströme denaturiert, die dann von der Immunabwehr als fremd erkannt und in einer entzündlichen Reaktion entsprechend bekämpft werden müssen. Diese Tatsache verringert

schädliche Einflüsse auf das Gewebe in der Implantatumgebung und begünstigt dessen direkte Anlagerung an die Implantatoberfläche [15, 16].

2.1.2 Definition Osseointegration

Der Begriff Osseointegration wurde durch P. I. Branemark geprägt. Er bezeichnet damit das Einheilen einer Implantatoberfläche mit direktem Kontakt zu vitalem Knochen, ohne die den Misserfolg einer Implantation kennzeichnende Einscheidung des Implantates durch Bindegewebe. Sie ist abhängig von der Operationstechnik, einer angemessenen Einheilzeit und einer ausreichenden Verteilung der Belastungsspitzen während der Funktionsphase [17]. Zudem sind für einen Implantationserfolg Faktoren wie primäre Stabilität des eingebrachten Implantates [18] und durch seine Oberfläche determinierte Eigenschaften wie Benetzbarkeit [19] und Biokompatibilität von großer Bedeutung, die eine rasche und direkte Anlagerung knochenbildender Zellen ermöglichen. Eine natürliche Entzündungsreaktion nach der Implantation führt zu einem Umbau des vitalen Knochens und zu dessen Anlagerung an die Implantatoberfläche, die ohne direkte chemische Bindung erfolgt. Die daraus entstehende mechanische Verankerung führt zu der sogenannten sekundären und endgültigen Stabilität des Implantates. Viele Teilaspekte des oben beschriebenen Einheilvorganges sind von der dreidimensionalen Struktur und der Zusammensetzung der Implantatoberfläche abhängig. Auf mögliche Modifikationen wird in späteren Kapiteln genauer eingegangen.

2.1.3 Anwendungsbereiche

Titan als Biomaterial wird heute in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt. Insbesondere bei dauerhaftem Kontakt mit Blut und Gewebe kommen seine Vorteile deutlich zum Tragen.

2. Kenntnisstand

Einige Anwendungen sind nachfolgend exemplarisch zusammengefasst:

Herz-/Thoraxchirurgie	<ul style="list-style-type: none">- Gefäßclips [20]- Katheter [21]- künstliche Herzklappen [22]- Herzschrittmacher [23]- implantierte Defibrillatoren [24]- Stents [25]- Vena cava Filter [26]
Hals-/Nasen-/Ohrenheilkunde	<ul style="list-style-type: none">- Cochleaimplantate [27]
Neurochirurgie	<ul style="list-style-type: none">- Aneurysmaclips [28]
Orthopädie	<ul style="list-style-type: none">- Kniegelenksersatz [2]- Hüftgelenksersatz [2]- Fixation von Prothesen [2]
Traumatologie	<ul style="list-style-type: none">- Knochenschrauben [29]- Knochennägel [29]- maxillofaziale Implantate [27]- Plattenosteosynthese [29]- externe Fixatoren [30]- Implantatsysteme für Spinalchirurgie [31]
Urologie	<ul style="list-style-type: none">- Stents bei Prostatahyperplasie [32]
Zahnheilkunde	<ul style="list-style-type: none">- Implantate als Wurzelersatz [33]

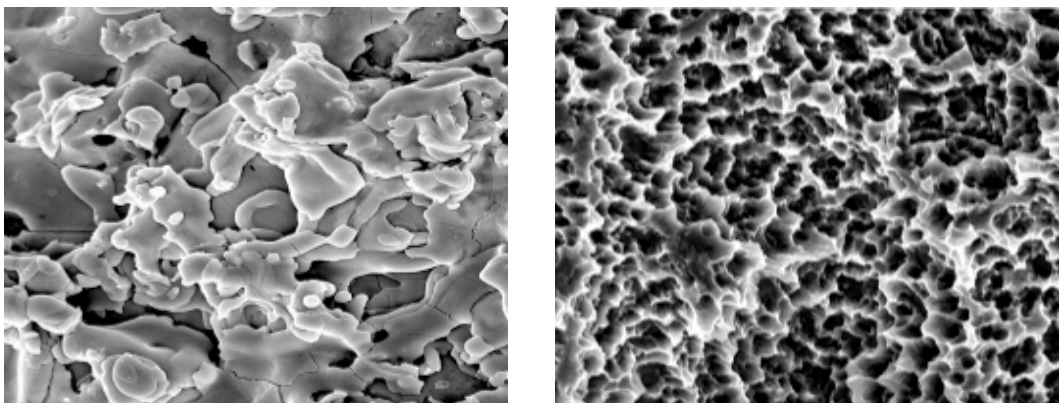
Tabelle 1: Exemplarische Anwendungsmöglichkeiten für Titan in der Medizin

2.2 Modifikationsmöglichkeiten medizinischer Titanoberflächen

Im Bereich der dentalen Implantologie sind heute eine ganze Reihe struktureller Oberflächenmodifikationen bekannt, die zu einer guten Osseointegration und somit zu einer entsprechenden Stabilität nach Einheilung führen. Grundsätzlich werden mechanische, chemische, elektrochemische, thermische sowie biologische Modifikationsverfahren unterschieden. Eine weitere Unterteilung kann in Substanz auftragende Verfahren (additive Verfahren) und Substanz abtragende Verfahren (subtraktive Verfahren) erfolgen [34]. Zu den mechanischen Verfahren sind die maschinelle Bearbeitung und das Sandstrahlen der Titanoberflächen zu zählen. Sie führen zu Rauigkeiten im

Makrobereich und bieten alleine keine ausreichende Grundlage für eine optimale Einheilung dentaler Implantate. Durch biologische Modifikationen zum Beispiel mit Wachstumsfaktoren wird versucht, die Einheilgeschwindigkeit zu steigern [35].

Zwei Beispiele für aktuell käuflich verfügbare dentale Implantatoberflächen namhafter Hersteller mit sehr guten Einheilergenergebnissen sind die Titan-Plasma-Spray-Oberflächen (TPS, Abbildung 1 links) und kombiniert sandgestrahlte/geätzte Implantatoberflächen (SLA, Abbildung 1 rechts).



*Abbildung 1 (links): Bild eines Titanimplantates mit TPS-Oberfläche [36]
(rechts): Bild eines Titanimplantates mit SLA-Oberfläche [36]*

Bei der Herstellung der TPS-Oberflächen handelt es sich um ein additives Verfahren, bei dem Titanpulver in einem Argonplasma verflüssigt und unter Hochdruck auf die Titanoberflächen gespritzt wird [37]. Diese Oberflächen wurden aber weitestgehend durch die erheblich günstigeren SLA-Oberflächen (sand-blasted, large grit, acid-etched) abgelöst. Sie entstehen bei einer Kombination aus sandgestrahlten Titanoberflächen mit chemischen Ätzverfahren. Diese Oberflächenstrukturen bieten den Osteoblasten gute Anlagerungsmöglichkeiten und führen dadurch zu exzellenten Einheilungsergebnissen. Sie gelten heute als Goldstandard [38].

2.3 Nanotubes – ein historischer Rückblick

Die erfolgreiche Synthese von Kohlenstoffnanotubes durch Iijima et al. 1991 [39] führte zu intensiven Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet. Ausgehend von einer Vielzahl an technologischen Anwendungsmöglichkeiten war das Interesse groß, dieses nanostrukturtechnologische Phänomen auch auf andere chemische Elemente zu übertragen. Von Aluminium war schon seit Jahrzehnten bekannt, dass poröse Schichten durch Anodisierung in einem säurehaltigen Elektrolyten synthetisiert werden können, während anodische Oxidation in neutralen Elektrolyten zu kompakten Oxidschichten führt [40]. Aber erst mit der Arbeit von Masuda et al. 1995 [41] wurde deutlich, dass in diesen porösen Strukturen ein hohes Maß an Ordnung erreicht werden kann.

Auch für viele Übergangsmetalle wie z.B. Hafnium, Zirkonium, Niob, Tantal und Titan ist seit über 40 Jahren bekannt, dass sich durch anodische Oxidation in wässrigen Elektrolyten kompakte, spannungsabhängige Oxidschichten von mehreren 100 Nanometer Dicke bilden [42, 43, 44, 45]. Das typische Wachstum dieser Oxidschichten geschieht dabei proportional zu der angelegten Spannung mit einem Faktor von $f_g \approx 1 - 5 \text{ nmV}^{-1}$ bis zu einem Grenzwert, der als dielektrische Durchschlagsspannung bezeichnet wird [46]. Bei aktueller Forschung wurde herausgefunden, dass unter optimalen elektrochemischen Bedingungen selbstorganisierte poröse Strukturen synthetisiert werden können. Die Herstellung von Nanotubebildungen aus Titanoxid wurde erstmals durch Hoyer et al. 1996 [47] beschrieben. Strukturen dieser Arbeit wurden durch elektrochemische Abscheidung von TiCl_3 auf einer vorbestehenden, porösen Aluminiumoberfläche erzeugt. Erst 2001 wurde durch Varghese et al. [48] ein Verfahren beschrieben, mit dem Nanotubes auf einem reinen Titanblech synthetisiert werden können. Grundlage hierfür ist die Anodisierung in einem flusssäurehaltigen Elektrolyten, welche auch in den darauf folgenden Jahren durch Publikationen diverser Forschungseinrichtungen untermauert wurde [49, 50]. Heute sind eine Vielzahl an Methoden bekannt, mit denen sich erfolgreich Nanotubestrukturen auf Titanoberflächen herstellen lassen, so zum Beispiel die Sol-Gel-Methode [51], „template synthesis“ [52],

hydrothermale Prozesse [53] und Anodisierung. Auf Grund der geringen Kosten, der Möglichkeit, große Oberflächen zu modifizieren, und der geordneten Ausrichtung entstehender Nanotubeschichten hat insbesondere die Anodisierung das Interesse der Forscher geweckt. Dabei können die verschiedenen Parameter der Nanotubegeometrie, wie zum Beispiel der innere Durchmesser, die Wanddicke und die Tubelänge durch Änderungen der Anodisierungsspannung, Anodisierungszeit und Elektrolytzusammensetzung leicht beeinflusst werden. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist die gute mechanische Haftung auf der Substratoberfläche. In den letzten acht Jahren wurde eine große Zahl an möglichen Konstellationen veröffentlicht, die repräsentativ für entsprechend intensive Forschung in diesem Bereich stehen (siehe Kapitel 2.4.2).

2.4 Das Prinzip der Anodisierung

2.4.1 Physikalisch-chemische Grundlagen

Der apparative Aufbau für eine Anodisierung besteht aus zwei gut leitenden Elektroden, die in Wasser oder eine Elektrolytlösung eingetaucht werden. Durch eine angelegte Gleichspannung und die damit verbundene Potentialdifferenz entsteht ein gerichtetes elektrisches Feld zwischen beiden Elektroden. Hierbei wird die mit dem Pluspol verbundene Elektrode als Anode, die mit dem Minuspol verbundene Elektrode als Kathode bezeichnet. Elektrolyte sind im festen, flüssigen und gelösten Zustand aus Ionen aufgebaut. Das elektrische Feld führt zu einer Verschiebung der positiv und negativ geladenen Ionen, wobei ein Ladungstransport in Metallen durch Elektronen-, in Elektrolyten durch Ionenverschiebung erfolgt. An der Phasengrenze zwischen Elektronen- und Ionenleitung kommt es zu chemischen Reaktionen. Dabei müssen die an den Elektroden reagierenden Stoffe nicht mit denen identisch sein, die den Ladungstransport in der Lösung bewirken. Zum einen bilden sich Verbindungen, die dem Elektrolyten nicht zugesetzt waren, zum anderen kommt es zu einer Abnahme der Elektrolytkonzentration. Zusätzlich tritt ein

Konzentrationsgefälle der in dem Elektrolyten vorhandenen Ionen auf. Diese, abhängig von dem Fließen eines Gleichstroms durch eine Elektrolytlösung, erzwungene chemische Umsetzung wird Elektrolyse genannt.

$$m = \frac{t \cdot M \cdot I}{z \cdot F} \quad (1)$$

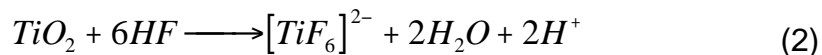
1. Faraday'sches Gesetz: $m = \text{Masse}$, $t = \text{Zeit}$, $M = \text{molare Masse}$, $I = \text{Strommenge}$, $z = \text{Ladungszahl}$, $F = \text{Faradaykonstante}$

Ein quantitativer Zusammenhang zwischen transportierter Ladungsmenge und chemischem Umsatz lässt sich über diesen Grundsatz herstellen. So ist es möglich, über die angelegte Spannung, die Elektrolytkonzentration und die Zeit Einfluss auf den chemischen Umsatz an den Elektrodenoberflächen zu nehmen [54].

2.4.2 Anodisierung von Titanoberflächen in fluoridhaltigen Elektrolyten

Die Elemente der chemischen Gruppe der Halogene sind in der Lage, Oberflächen vieler rostfreier Metalllegierungen anzugreifen, so auch bei Titan. Eine spannungsabhängige Konzentration der negativ geladenen Halogenid-Ionen im Bereich der Anode verstärkt diesen Effekt. In der Literatur werden Lochfraß und Rissbildung als Initiationsprozesse zur Porenbildung in anodisch erzeugten, geordneten Oxidschichten gesehen [48, 55]. Der Zusatz von Bromid- und Chloridionen zu Elektrolyten führt allerdings ausschließlich zu Grübchenbildung [56]. Ebenso sind auch neutrale Fluoridlösungen per se nicht in der Lage, poröse Schichten und Nanotubes zu formen [57].

Die zur Porenbildung notwendige Auflösung von Titanoxid tritt gemäß folgender Reaktionsgleichung auf:



Um Titanoxid aus einer bestehenden Schicht zu lösen ist es notwendig, dass Fluoridionen in ihrer chemisch reaktivsten Form HF hydrolysiert vorliegen. Saure Fluoridlösungen erscheinen daher als eine notwendige Voraussetzung, um poröse Schichten und geordnete Nanostrukturen in Form von Nanotubes auf Titanoberflächen zu erhalten [56].

Aktuell sind diverse Elektrolytzusammensetzungen bekannt, die ein geeignetes chemisches Milieu aufweisen. Die erste Generation durch Anodisierung erzeugter Titanoxidnanotubes wurde mit flusssäurehaltigen Elektrolyten synthetisiert. Ihre Schichtdicke war auf wenige hundert Nanometer limitiert [48, 58]. Unter Verwendung von NaF oder NH_4F anstelle von HF unter Berücksichtigung der Bedeutung des pH-Gradienten innerhalb der Nanotubes konnten Schichtdicken von über 2 μm erreicht werden. Durch den niedrigen pH-Wert der Elektrolytlösungen liegen die Fluoridionen auch hier zum großen Teil in ihrer reaktivsten Form HF vor [59, 60]. Die neuesten Ansätze der dritten Generation basieren auf fast vollständig wasserfreien Elektrolyten. Eine Steigerung der Tubelänge auf 7 μm wurde mit glycerolhaltigen Elektrolyten möglich [61]. Mehrfach benutzte Elektrolyte auf Basis von Ethylenglycol mit einem geringen Anteil an Wasser und Fluoridverbindungen erzielen heute Nanotubelängen von bis zu 1000 μm bei beinahe idealer, hexagonaler Anordnung der freistehenden Tubes [62, 63]. Über die Zusammensetzung der Elektrolytlösung, die Anodisierungsspannung, die Temperatur und die Anodisierungszeit lassen sich hierbei Tubedurchmesser, Wandstärke und Schichtdicke exakt regulieren.

Aber auch in Elektrolyten, die keine Fluoridionen enthalten, lassen sich auf Titanoberflächen Nanotubebildungen erzeugen. Dieses Verfahren beruht auf der Entstehung sogenannter lokaler Durchbruchsspannungen. Dieser Effekt kann durch aggressive Anodisierungsbedingungen erreicht werden. Entscheidende Faktoren sind eine hohe Anodisierungsspannung bei kleiner Fläche, die Elektrolytzusammensetzung und die Temperatur. Als Ersatz für Fluoridionen könnten hierbei zum Beispiel Chloridionen zum Einsatz kommen [57].

2.4.3 Modellvorstellungen der Nanotubeentstehung

Die anodische Oxidation von Titanoberflächen in fluoridfreien Elektrolyten führt zu der Ausbildung einer kompakten Titanoxidschicht (Abbildungen 2, 3a).

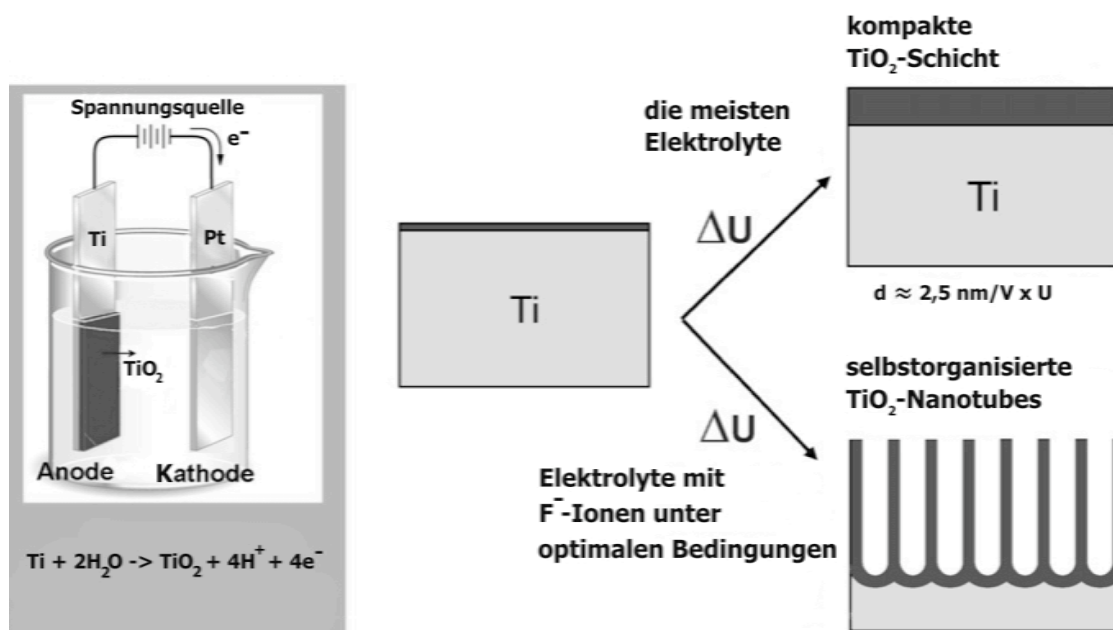


Abbildung 2 links: Versuchsaufbau einer Anodisierung in reinem Wasser unter Ausbildung einer kompakten Oxidschicht

rechts: Anodisierung von Titanoberflächen in fluoridfreien Elektrolyten führt zu kompakten Oxidschichten, in fluoridhaltigen Elektrolyten unter optimalen Bedingungen zu selbstorganisierten Titanoxid-Nanotube-Formationen

ΔU = Spannungsdifferenz, d = Dicke der Oxidschicht [55]

Dabei reagiert das Titan mit Sauerstoffionen O^{2-} , die sich durch die angelegte Spannung aus dem Wasser bilden. Das weitere Wachstum wird durch spannungsunterstützten Transport der Sauerstoffionen O^{2-} und Titanionen Ti^{4+} durch die wachsende Oxidschicht bestimmt. Bei konstanter Spannung nimmt mit zunehmender Schichtdicke die Feldstärke in der Oxidschicht ab, der Prozess ist selbstlimitierend. Unter Bildung einer kompakten Oxidschicht beschreibt die Stromstärke deshalb einen exponentiell abfallenden Verlauf, die erreichbare Schichtdicke ist somit begrenzt. Titanionen, die durch spannungsabhängigen Transport den Oxid/Elektrolytübergang erreichen, gehen

nicht durch Komplexbildung in Lösung, sondern schlagen sich in den fluoridfreien Elektrolyten als Hydroxidschicht auf der Oberfläche nieder und verzögern dadurch die Diffusion weiterer Ionen (Abbildung 3a).

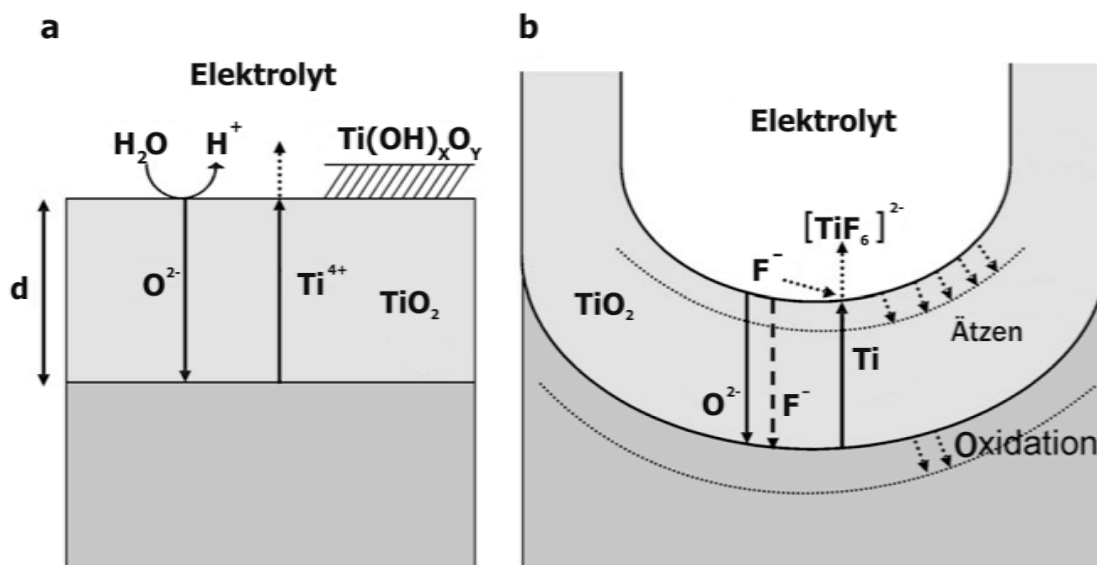
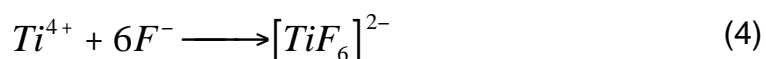
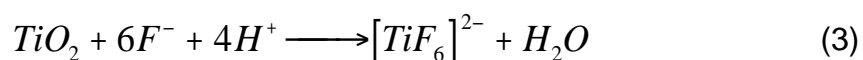
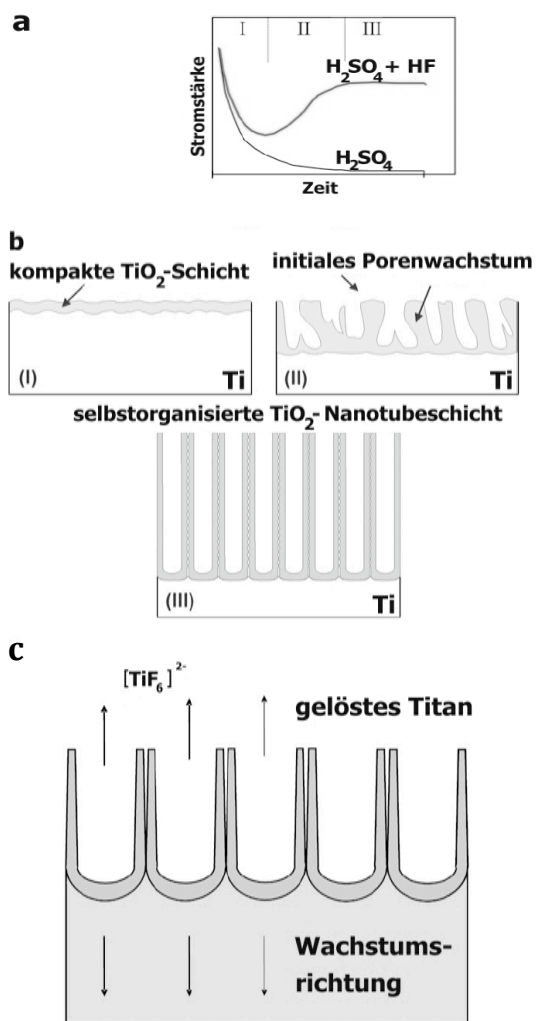


Abbildung 3: Oxidschichtentstehung in fluoridfreien (a) und fluoridhaltigen (b) Elektrolyten [55]

Unter Anwesenheit von Fluoridionen in entsprechenden Elektrolyten bekommt der Ablauf einen weniger auflagernden Charakter. Hierfür sind zwei Effekte der Fluoridionen ausschlaggebend. Zum einen sind sie in der Lage wasserlösliche Komplexe mit Titanionen zu bilden, siehe folgende Reaktionsgleichungen:



Zum anderen können Fluoridionen auf Grund ihres kleinen Radius in das wachsende TiO_2 -Gitterwerk eindringen und mit Hilfe der angelegten Spannung durch die Oxidschicht transportiert werden. Diese Effekte führen dazu, dass ständig Teile des entstehenden TiO_2 in Lösung gehen. Durch Bildung von löslichem $[\text{TiF}_6]^{2-}$ wird eine Ausfällung von Ti^{4+} -Ionen in der Form $\text{Ti}(\text{OH})_x\text{O}_y$ am Oxid/Elektrolytübergang verhindert (Abbildungen 3, 4c).



*Abbildung 4: (a) Strom-Zeit-Diagramm
(b) Phasen der Nanotube-Entstehung
(c) Nanotubewachstum
[55]*

Als Ergebnis unterscheiden sich deshalb Strom-Zeit-Verläufe fluoridhaltiger Elektrolyte von denen klassischer Ansätze. So kommt es nach einem initial exponentiell abfallenden Verlauf (I) zu einem erneuten Anstieg der Strom-Zeit-Kurven (II), gefolgt von einer anhaltenden Plateauphase (III), die das fortschreitende Wachstum der Titanoxidnanotubes kennzeichnet (Abbildung 4a). Die Bildung dieser Nanotubebildungen auf Titanoberflächen kann in verschiedene Etappen untergliedert werden (Abbildung 4b, 5). Im ersten Schritt kommt es zu der Ausbildung einer kompakten Titanoxidschicht, die zu dem initial exponentiell abfallenden Stromfluss führt (I). In der nächsten Phase wird die Oberfläche durch Fluoridionen lokal aktiviert und Poren beginnen, zufällig verteilt, zu wachsen (II). Während dieses Porenwachstums

nimmt die aktivierte Fläche zu und es kommt zu einem Anstieg der Stromstärke. Nach einer gewissen Zeit schließt sich die entscheidende Phase an, in der unterschiedliche Poren beginnen, miteinander zu interferieren und um den Stromfluss zu konkurrieren. Das führt unter optimalen Bedingungen zu einer Situation, in der sich der verfügbare Stromfluss gleichmäßig auf die entstandenen Poren verteilt und in einem stabilen Zustand zu einer Ordnung der entstehenden Strukturen, den Nanotubes, führt (III).

Im Verlauf der Anodisierung findet an der inneren Grenzfläche ein fortwährendes Wachstum der Oxidschicht statt, während gleichzeitig an der äußeren Grenzfläche Titanoxid in Lösung geht. Durch die anliegende Spannung kommt es zu einer erhöhten Konzentration der Fluoridionen am Röhregrund. Allerdings sind Fluoridionen über die gesamte Länge der röhrenförmigen Strukturen vorhanden und führen zu einer Reduktion der Titanoxidschichtdicke, woraus eine leicht v-Form der Nanotubes resultiert. Ein stabiler Zustand ist erreicht, wenn die Wachstumsrate der Poren am Übergang Oxidschicht/Titan mit der dickenreduzierenden Lösung der Oxidschicht an der äußeren Oberfläche identisch ist. Dann „frisst“ sich die Oxidschicht durch das Titan, ohne eine Zunahme ihrer Dicke (Abbildungen 3b, 4b, 4c). Der Grund für die Separierung in freistehende Röhren, im Gegensatz zu sonstigen nanoporösen Strukturen, ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Ursache könnte die Konfluenz verschiedener röhrenförmiger Strukturen zu einzelnen Nanotubes sein (Abbildung 5) [55, 64, 65].

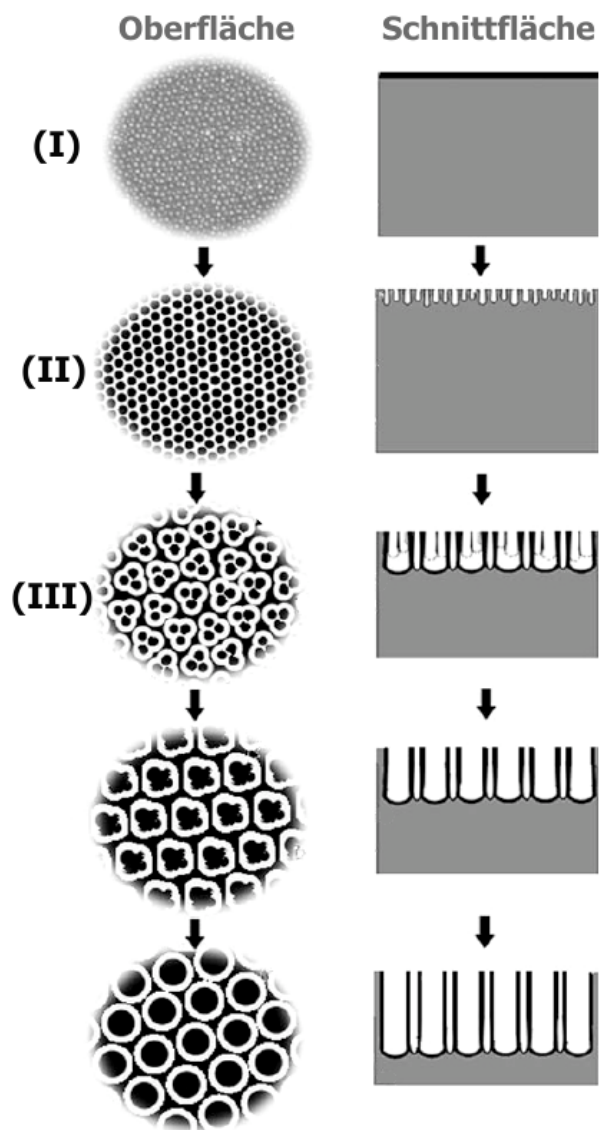


Abbildung 5: Konfluenz der Poren zu röhrenförmigen Strukturen [64]

2.5 Experimentelle Anwendung von Titanoxidnanotubes

2.5.1 Wirkung der Titanoxidnanotubes auf die Zellgenese

Zelladhäsion an Implantatoberflächen ist eine grundlegende Voraussetzung für den Integrationsprozess medizinischer Biomaterialien nach der Implantation [66]. Im Bereich der biomimetischen Materialien und der Implantattechnologie sind in den letzten Jahren zunehmend die Oberflächenrauigkeit und die Topographie neben der chemischen Zusammensetzung als entscheidende Faktoren für Zellüberleben und Gewebeakzeptanz in den Vordergrund gerückt [4, 67, 68]. Eine der ersten Studien zur Zellgenese auf vertikal ausgerichteten, geordneten Nanotubeschichten wurde durch Park et al. 2007 [5] veröffentlicht. Aus den in vitro gewonnenen Daten wurde deutlich, dass Zelladhäsion, Zellverteilung, Zellwachstum und Zelldifferenzierung der verwendeten mesenchymalen Stammzellen von dem Durchmesser einzelner Titananotubes abhängen. Es konnte im Vergleich zu glatten Titanoxidoberflächen gezeigt werden, dass Nanotubedurchmesser zwischen 15 und 50 nm das Zellwachstum deutlich begünstigen, während Durchmesser zwischen 50 und 70 nm zu einem Rückgang der zellulären Aktivität führen. Nanotubedurchmesser von 100 nm hatten sogar die Apoptose der in dieser Versuchsreihe verwendeten mesenchymalen Stammzellen zur Folge. In einer Fortsetzung dieser Studie wurde der Einfluss des Benetzungsverhaltens modifizierter Nanotubeschichten untersucht. Unbehandelte Titananotubeoberflächen besitzen super-hydrophile [69], die in dieser Studie organisch modifizierten Nanotubeschichten dagegen hydrophobe bis super-hydrophobe Eigenschaften. Diese Modifikation erlaubte eine Zelladhäsion unabhängig vom Tubedurchmesser innerhalb der ersten 24 Stunden. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich um einen kurzzeitigen Effekt handelte, der zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr nachweisbar war [70].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurde die erste in vivo Studie an 25 Hausschweinen durchgeführt und im Jahr 2008 veröffentlicht [71]. Verglichen wurden hierbei Implantate mit einer Nanotubeschicht (Einzeldurchmesser 30 nm) und glatte Titanimplantate hinsichtlich der Osteoblastenfunktion und

Osteoblastenproliferation während der Einheilphase. Dabei konnten die in vitro gewonnenen Daten der Studie von Park et al. nicht untermauert werden. Während die modifizierte Titanoberfläche die Osteoblastenfunktion verbesserte, hatte sie keinen messbaren Einfluss auf die Osteoblastenproliferation.

Eine weitere in vitro Studie zu Adhäsion, Differenzierung und Matrixproduktion von mesenchymalen Stammzellen auf Nanotubeschichten (Durchmesser 80 nm) wurde durch Popat et al. 2007 veröffentlicht. In ihr konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass eine geordnete Nanotubeschicht die Zelladhäsion, die Zellproliferation und deren Lebensfähigkeit unterstützt. Weiterhin konnte eine über 50 % höhere Konzentration an Calcium und Phosphor auf der Probenoberfläche nachgewiesen werden, die im Vergleich zu einer Referenzgruppe vermutlich auf eine erhöhte Matrixproduktion und Zellaktivität zurückzuführen ist [72, 73].

Aber auch Anwendungsmöglichkeiten in anderen Bereichen der Medizin sind denkbar, so zum Beispiel in der Gefäßchirurgie. In einer Studie von Peng et al. [74] aus dem Jahr 2009 wurde das Wachstum von Endothelzellen und glatten Muskelzellen auf modifizierten Titanoberflächen untersucht. Das Problem moderner, gefäßerweiternder Endoprothesen, den sogenannten Stents, besteht darin, dass es durch übermäßige Proliferation und mangelnde Differenzierung glatter Muskelzellen zu einem erneuten Verschluss des Gefäßlumens kommen kann. Wichtig ist in diesem Zusammenhang die vollständige Einscheidung des Titanimplantates durch Endothelzellen, da eine unversehrte Endothelschicht zur Ausschüttung wachstumsregulierender Stoffe in der Lage ist und so zu einer Ausdifferenzierung anstelle einer Wachstumsförderung der glatten Muskelzellen führt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Nanotubeoberflächen auf Titanimplantaten die Proliferation von Endothelzellen fördern und gleichzeitig zu einer Wachstumshemmung der glatten Muskelzellen führen, unterstützt durch eine verstärkte Ausschüttung von Prostaglandin I₂. Titananotubes könnten daher die Oberflächen heute bekannter und verwendeter vaskulärer Implantate revolutionieren und die Heilungschancen bei schweren Gefäßleiden verbessern.

Weitere Erkenntnisse in diesem Bereich bleiben abzuwarten, die exaktere Zusammenhänge zwischen Oberflächentopographie der Nanotubeschichten und Zellgenese in vitro und in vivo offenlegen.

2.5.2 Nanotubes als Drug-Release-Systeme

Fortschritte in der Nanostrukturtechnologie haben zu der Entwicklung verschiedenster Oberflächen geführt, bei denen die Größe einzelner Strukturen, die Größenverteilung, die Porosität, die Geometrie und die Oberflächenfunktionalität im Nanobereich modifiziert und dadurch eine kontrollierte Freisetzungskinetik therapeutisch interessanter Substanzen erreicht werden kann.

Carbonnanotubes sind in diesem Zusammenhang länger bekannt und besser erforscht als Titannanotubes. Sie können an endständigen chemischen Gruppen mit bioaktiven Peptiden, Proteinen, Nukleinsäuren und pharmakologischen Wirkstoffen modifiziert werden. Diese Moleküle können dann durch die kleinsten Vertreter, den sogenannten „single-walled“ Carbonnanotubes (SWCNT), über die Blutbahn zu Organen und Zellen transportiert werden. Dabei zeigen sie geringe Toxizität und sind nicht immunogen [75]. Insbesondere in der Tumorthherapie wird in dieses neue Transportsystem große Hoffnung gesetzt, da diese kleinsten Nanotube-Wirkstoff-Verbände von entsprechenden Zellen aufgenommen werden können und vor Ort ihre Wirkung entfalten [76, 77]. Erste in vivo Studien an Mäusen zeigen schon jetzt vielversprechende Ergebnisse [78, 79]. Daneben sind aber auch Carbonnanotubes mit zu Titannanotubes vergleichbaren Größenrelationen bekannt. Diese sogenannten „multi-walled“ Carbonnanotubes (MWCNT) zeigen eine gute Verträglichkeit bei Implantation, erlauben Knochenregeneration und werden unter direktem Kontakt in das Knochengewebe integriert [80]. Zudem weisen sie ebenfalls endständige chemische Gruppen auf, die mit Biomolekülen und pharmakologischen Wirkstoffen modifiziert werden können [81].

2. Kenntnisstand

Im Bereich der Titananotubes beschränkt sich die Forschung bisher auf einige Beispielsubstanzen. Entsprechende Studien sind nachfolgend aufgelistet:

Studie	adsorbierte Substanz	Ergebnis
Popat et al. 2007 [7]	- Rinderserumalbumin - Lysozym	<u>Nanotubes:</u> Ø 80 nm, Länge 400 nm <u>Kinetik:</u> Adsorption 2 Stunden, definierte Substanzmenge 200, 400, 800 µg bei 0,25 cm ² Probenoberfläche, beinahe vollständige Wirkstoffabgabe nach 120 Minuten
Yao et al. 2007 [82]	- Penicillin/Streptomycin - TGF-β - Immunglobulin G	<u>Nanotubes:</u> Ø 40 - 100 Nm, Länge einige hundert nm <u>Kinetik:</u> Adsorption 24 Stunden, deutlich gesteigerte Gesamtbeladungsmenge für kleine Moleküle Penicillin/Streptomycin und TGF-β, reduzierte Gesamtbeladungsmenge für Immunglobulin G, vollständige Abgabe aller Substanzen innerhalb weniger Tage
Popat et al. 2007 [83]	- Gentamycin	<u>Nanotubes:</u> Ø ca. 80 nm, Länge ca. 400 nm <u>Kinetik:</u> Adsorption 2 Stunden, definierte Gentamycinmengen 200/400/ 600 µg bei 0,25 cm ² Probenoberfläche, Gentamycin verhindert initiale Anlagerung und Proliferation von Staph. epidermidis
Aninwene et al. 2008 [84]	- Penicillin/Streptomycin - Dexamethason	<u>Nanotubes:</u> Ø ca. 60 nm, Länge unbekannt (Anodisierungszeit 10 Minuten bei 20 V in 1,5 %-iger HF-Lösung) <u>Kinetik:</u> Adsorption 72 Stunden, gesteigerte Gesamtmenge und vollständige Abgabe innerhalb von 3 Tagen für alle Testsubstanzen

***Tabelle 2:** Studien über Adsorption und Desorption von Wirkstoffen auf Oberflächen mit Titanoxidnanotubes*

Diese Substanzen wurden in mit Nanotubes modifizierte Titanoberflächen eingelagert und ihre Freisetzung gemessen. Die Adsorption erfolgte in allen Studien rein physikalisch und ohne Verwendung eines Vakuums direkt bei der Einlagerung. Allerdings wurden die Probenoberflächen in den Studien von

Popat et al. nach der Wirkstoffbeladung bei Raumtemperatur und angelegtem Vakuum getrocknet.

Bei diesen vier Studien konnte ein großes Potential dieser Oberflächenstrukturen hinsichtlich Wirkstoffbeladung und Wirkstofffreisetzung aufgezeigt werden. Titanoxidnanotubes bieten allerdings keine endständigen chemischen Gruppen, die gezielt modifiziert werden können. Statt dessen wird die Kinetik der Wirkstoffbeladung und Wirkstofffreisetzung zum größten Teil durch physikalische Wechselwirkungen beeinflusst. Diese Wechselwirkungen sind zum großen Teil auf die Ladung endständiger funktioneller Gruppen vieler Wirkstoffe, sowie Gitterlücken und die Bildung einer Hydroxidschicht auf der Titanoxidoberfläche zurückzuführen. Dadurch sind Titanoxidschichten meist schwach negativ geladen, was die Adsorption positiv geladener Moleküle begünstigt und ihre Desorptionsgeschwindigkeit reduziert [7, 84].

Unbehandelte Titanoxidnanotubes weisen super-hydrophile Eigenschaften auf, ihr Kontaktwinkel zu Wasser beträgt annähernd 0° [69]. Auf die unkontrollierte Freisetzung hydrophiler Wirkstoffe aus Titanoxidnanotubes kann durch eine Modifikation mit einer hydrophoben Deckschicht Einfluss genommen werden. Der resultierende amphiphile Charakter führt zu einer verlangsamten Freisetzungskinetik in wässriger Umgebung [85].

2.5.3 Weitere Anwendungen der Titanoxidnanotubes im Überblick

Der spezielle Vorteil gleichmäßiger Nanotubeschichten ist in der erheblich vergrößerten Oberfläche und der klar begrenzten Geometrie zu sehen. Diese Geometrie resultiert in engen Diffusionswegen, nicht nur beim Eintritt in die Tiefe der Röhren, zum Beispiel um Edukte an den Röhrenboden zu transportieren, sondern auch für den Transport von Elektronen und Ionen durch die Röhrenwände. Eine der vielversprechendsten Anwendungen von Titanoxid sind heute mit Färbemitteln sensitivierte Solarzellen, ein Verfahren, das von Grätzel et al. entwickelt wurde [86]. Die klassische Solarzelle dieser Art arbeitet mit gesintertem oder komprimiertem nanopartikulärem Titanoxid als Elektronen

einfangendes Material. Optimierte Nanotubeschichten können die Umsatzeffizienz der durch dieses Verfahren aus Sonne gewonnenen Energie erheblich steigern [87, 88].

Nachdem Fujishima und Honda das erste Mal über lichtinduzierte Spaltung von Wasser auf Titanoxidoberflächen berichtet haben, wurde das Potential dieses Materials bei verschiedenartigen Katalysen untersucht [89]. Seit diesem Zeitpunkt hat sich Titanoxid als exzellenter Photokatalysator erwiesen [90, 91]. Herausragend sind die langfristige Stabilität, geringe Herstellungskosten und die ausreichende Oxidationskraft, um bei dem Abbau unerwünschter organischer Verbindungen erfolgreich eingesetzt zu werden [92, 93]. Die erheblich vergrößerte Oberfläche der Nanotubeschichten führt auch hier bei vergleichbaren Bedingungen zu einer höheren Umsatzeffizienz [94, 95].

Eine weitere besondere Eigenschaft von Titanoxid und einigen anderen Übergangsmetalloxiden besteht in der Fähigkeit, als Träger für Wasserstoffionen oder für Lithiumioneneinlagerung zu dienen [96]. Die Bewegung der Ionen, das Ausmaß ihrer Einlagerung, sowie die elektrochrome Reaktion, also der Kontrast, sind stark von dem Diffusionsweg, der durch die Geometrie der Elektrodenoberfläche bedingt wird, abhängig. Auf Grund der speziellen geometrischen Eigenschaften der Titanoxidnanotubes können auch hier deutlich bessere Ergebnisse erreicht werden [97].

Grimes et al. konnten zeigen, dass die elektrische Leitfähigkeit von Titanoxidnanotubeschichten in einem Umfeld mit erhöhtem Wasserstoffgehalt deutlich zunimmt. Diese Tatsache macht sie als Wasserstoffsensoren einsetzbar [98].

3. Material und Methode

3.1 Vorbereitung der Titanproben

Als Substrat für die Anodisierung wurde Titanblech (Typ Grade 2, Reinheit 99,6 %) der Firma Zapp Materials Engineering, Deutschland, mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Aus diesem Blech wurden kleine viereckige Plättchen herausgestanzt, die gestapelt und so eingespannt zu Scheiben mit einem Durchmesser von 15,5 mm rund gedreht wurden. Zusätzlich wurden die runden Titanplättchen nahe dem Rand mit einer Bohrung von 1 mm Durchmesser versehen, um sie mittels Titanschrauben an dem Probenhalter positionssicher und leitend zu befestigen.

Die unpolierten Titanplättchen wurden dann in einem Ultraschallbad mit Aceton, einer Mischung Ethanol/Wasser und Isopropanol jeweils 15 Minuten gereinigt. Danach wurden die so gereinigten Titanplättchen an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und bis zu ihrer Verwendung in abgedeckten Petrischalen, vor erneuter Verschmutzung geschützt, gelagert.

3.2 Die Herstellung der Titanoxidnanotubes

3.2.1 Elektrolyt auf Wasserbasis

Für dieses Anodisierungsverfahren wurde mit einem Hochleistungspotentiostat Wenking HP 96 der Firma Bank Elektronik Intelligent Controls GmbH, Deutschland, gearbeitet. Dieser war mit einem PC verbunden (Abbildung 6 oben). Dadurch war es möglich, einen exakten Spannungsverlauf vor Anodisierungsbeginn zu programmieren. So wurde die Spannung über eine Rampe mit gleichmäßigen Schritten von 50 mVs^{-1} innerhalb von 400 s auf die Anodisierungsspannung von 20 V angehoben. Diese Spannung wurde dann für 3 bzw. 18 Stunden gehalten.

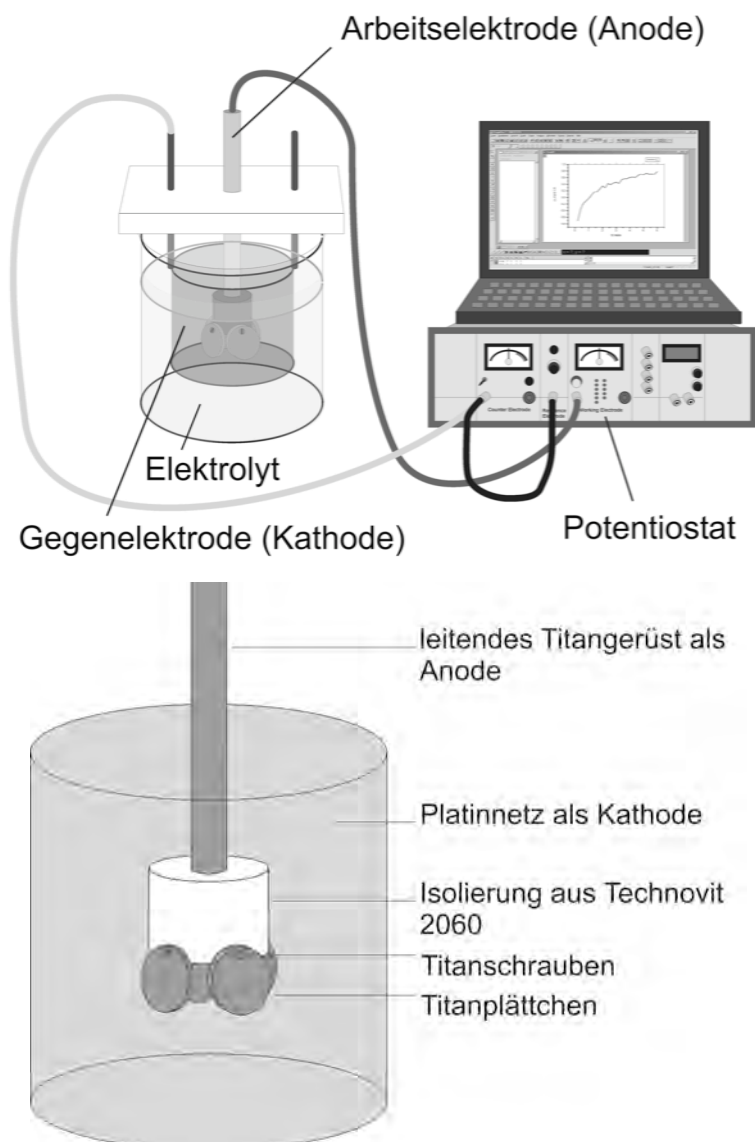


Abbildung 6: Versuchsanordnung zur Anodisierung der Titanproben in flusssäurehaltigen Elektrolyten

Der Probenträger bestand aus einem leitenden Titangerüst, das im Bereich des Elektrolyten mit Technovit 2060 isoliert war. Vier kleine Aussparungen für einen leitenden Verbund zu den Gewinden der Schrauben waren unbedeckt. Für die Anodisierung wurden an diesem Probenträger jeweils vier Titanplättchen mit Titanschrauben befestigt. Der so vorbereitete Probenträger stellte die Anode, ein zylindrisches Platinnetz mit einem Durchmesser von 55 mm und einer Höhe von 42 mm, die Kathode dar (Abbildung 6 unten). Gearbeitet wurde bei diesem Versuchsansatz mit einem

Elektrolyten aus 1M H₂SO₄ + 0,15 Gew. % HF [99]. Für jede Anodisierung wurden 500 ml des frischen Elektrolyten in ein Kunststoffbecherglas gefüllt. Sowohl der Probenträger als Anode, als auch das Platinnetz als Kathode, wurden über Kabel leitend mit dem Hochleistungspotentiostat verbunden. Danach wurde der Probenträger mittels einer Haltevorrichtung so über dem Elektrolyten fixiert, dass lediglich die Titanplättchen bis etwa zu der Mitte der Isolierung und das Platinnetz in den Elektrolyten eintauchten. Der am PC programmierte Verlauf des Anodisierungsvorganges wurde schnellstmöglich gestartet. Nach abgelaufener Anodisierungszeit von 3 bzw. 18 Stunden wurde der Probenträger aus dem Elektrolyten entnommen und für 20 Sekunden vorsichtig in bidestilliertem Wasser geschwenkt. Danach wurden die Titanplättchen abgeschraubt und jeweils für weitere 15 Sekunden mit bidestilliertem Wasser abgespült. Von den so gereinigten Titanproben wurde überschüssiges Wasser abgetropft. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.2 Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis

Für die Anodisierung von Titanproben in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis wurde der in Kapitel 3.2.1 beschriebene Versuchsaufbau modifiziert. Um die Oberfläche der Titanplättchen von der Passivierungsschicht zu befreien, wurden sie vor Befestigung am Probenhalter in einer flusssäurehaltigen Lösung gebeizt. Dazu wurden sie jeweils für zirka 15 Sekunden in ein Gemisch aus 83 % H₂O, 12,5 % H₂O₂ und 4,5 % HF getaucht und anschließend sorgfältig mit bidestilliertem Wasser abgespült. Anstelle eines Hochleistungspotentiostaten wurde ein Spannungsgerät DC Power Supply der Firma Voltcraft, Deutschland, verwendet. Die Anodisierungsspannung lag ab Anodisierungsbeginn in voller Höhe von 70 Volt an. Der Elektrolyt bestand aus 98 Vol. % Ethylenglycol, 2 Vol. % H₂O und 0,25 Gew. % NH₄HF₂ [100]. Für den Anodisierungsvorgang wurden jeweils 250 ml Elektrolyt benötigt, allerdings wurde der Elektrolyt für mehrere aufeinanderfolgende Anodisierungsvorgänge

verwendet. Nach Ablauf der Anodisierungszeiten von 8, 18 und 30 Stunden wurden die Titanplättchen ebenfalls 20 Sekunden in bidestilliertem Wasser geschwenkt und jeweils für weitere 15 Sekunden mit bidestilliertem Wasser abgespült. Durch Abtropfen wurde überschüssige Flüssigkeit entfernt und die Titanproben anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.3 Wärmenachbehandlung

Um die Kristallinität in den Nanotubeschichten der Titanproben zu steigern, wurden die bei der Anodisierung entstandenen offenporigen Titanoxidstrukturen in einem Hochleistungsofen Programm Controller C 19 der Firma Nabertherm, Deutschland, erhitzt. Zu diesem Zweck wurde die Temperatur der Titanplättchen, die gemäß Kapitel 3.2.1 anodisiert wurden, in Schritten von 30 °CMin^{-1} angehoben und an ihrem Zielwert von 550 °C für 3 Stunden gehalten [99]. Bei den gemäß Kapitel 3.2.2 anodisierten Titanplättchen wurde die Temperatur in Schritten von 1 °CMin^{-1} angehoben und an ihrem Zielwert von 580 °C für 4 Stunden gehalten [101]. Auf langsame Abkühlung der Proben wurde geachtet, um zusätzlichen Spannungsaufbau in den empfindlichen Schichten zu vermeiden. Die Atome einer amorphen Titanoxidschicht lagern sich durch dieses Erhitzungsverfahren zu geordneten Kristallstrukturen zusammen [48]. XRD-Untersuchungen konnten zeigen, in welchem Verhältnis die Kristallformen Anatas und Rutil innerhalb der Oxidschicht vorlagen.

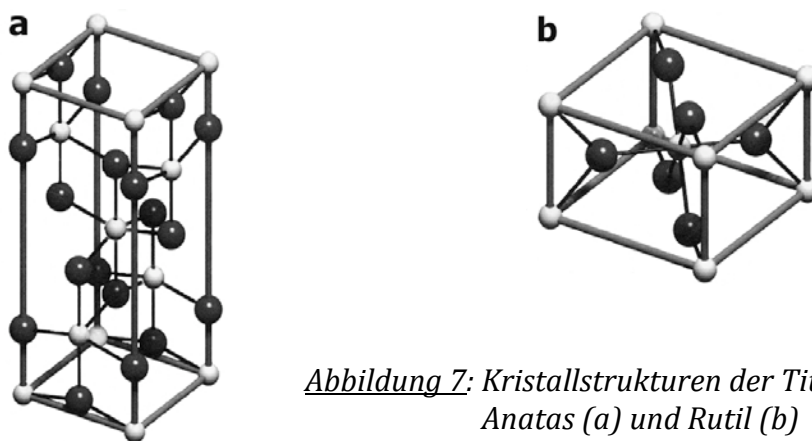


Abbildung 7: Kristallstrukturen der Titanoxide Anatas (a) und Rutil (b) [3]

Diese beiden Kristallformen besitzen eine tetragonale Struktur, bei der jeweils ein Titanatom mit sechs Sauerstoffatomen koordiniert ist. Sie zeichnen sich durch eine höhere Dichte und eine deutlich erhöhte Härte gegenüber der unerhitzten amorphen Titanoxidschicht aus. Zudem weisen sie für die Technik interessante elektrochemische Eigenschaften auf, die zum Beispiel in Solarzellen Anwendung finden [3].

3.3 Oberflächenanalyse

3.3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die REM-Bilder für diese Arbeit wurden mit einem Digital Scanning Microscope 940 (DSM) der Firma Zeiss, Deutschland, aufgenommen. Als Rasterelektronenmikroskopie wird ein Verfahren bezeichnet, bei dem ein Elektronenstrahl unter Hochvakuum in einem bestimmten Muster über das vergrößert abzubildende Objekt geführt (gerastert) wird und die Wechselwirkungen der Elektronen mit dem Objekt zur Erzeugung eines Bildes genutzt werden. Elektronen des Primärstrahls treten hierbei in Wechselwirkung mit den Atomen der Oberfläche und erzeugen Sekundärelektronen. Diese haben eine deutlich geringere Energie als die Elektronen des Primärstrahls und können von einem Everhart-Thornley-Detektor registriert werden. Auf Grund ihrer niedrigen Energie stammen sie aus den obersten Nanometern der Oberfläche. Ihre Gesamtintensität ist dabei charakteristisch für die Topografie der Oberfläche, aus der ein Bild mit Graustufenskalierung berechnet werden kann [102].

Um eine notwendige, gleichmäßige Leitfähigkeit der Oberfläche sicherzustellen und auftretende, lokale Ladungseffekte der isolierenden Oberfläche zu vermeiden, wurden die Titanproben vor den Oberflächenaufnahmen mit einer dünnen Goldschicht bedampft. Als Anodenspannung der Röntgenröhre wurde bei allen Aufnahmen 10 kV gewählt. Durch dieses Verfahren waren bis zu 5000-fache Vergrößerungen möglich.

3.3.2 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Für die Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde mit einem D 5005 X-Ray Diffraktometer der Firma Siemens, Deutschland, gearbeitet. Die Röntgendiffraktometrie (XRD) ist ein Verfahren, das Informationen über die Kristallstruktur, kristalline Defekte und mechanische Spannungen liefert. Dazu wird die zu untersuchende Substanz mit Röntgenstrahlung bestrahlt, deren Wellenlänge in etwa der Größenordnung interatomarer Abstände entspricht. Abhängig von der Kristallstruktur wird die Röntgenstrahlung gebeugt. Beugung tritt auf, wenn der Abstand der Gitterlinien des Beugungsgitters in der Größenordnung der Wellenlänge der auftreffenden Wellen liegt. So lassen sich über die Bragg-Gleichung Korrelationen zwischen Wellenlänge, Abstand der Netzebenen und dem Winkel der Beugung herstellen:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \vartheta \quad (5)$$

n = Grad des untersuchten Maximums, λ = Wellenlänge des monochromatischen Röntgenstrahls, d = Abstand der Netzebenen, ϑ = Winkel zur Netzebene

Die so von den einzelnen Atomen ausgehenden gebeugten Wellen interferieren miteinander. Je nach Abstand der Atome untereinander ergeben sich für die gebeugten Wellen unterschiedliche Gangunterschiede, die strukturspezifisch zu konstruktiver und destruktiver Interferenz führen. Ein Detektor misst den Beugungswinkel und die Röntgenstrahlintensität. Aus diesen Daten können dann die oben genannten Werte errechnet werden [103].

Dieses Verfahren gab Aufschluss über die Kristallstruktur der Titanoxidschicht der anodisierten Titanproben. So war es möglich nachzuweisen, in welchem Verhältnis diese nach der Erhitzung auf 550 °C bzw. 580 °C in der Kristallform Anatas oder Rutil vorlag.

3.3.3 Bestimmung der Nanotubeschichtdicke

Die Schichtdicke der Titannanotubes wurde über elektronenmikroskopische Aufnahmen der Schnittkante bestimmt. Dazu wurden die anodisierten Plättchen in ein etwa 3 mm tiefes Wasserbecken gelegt, um die initiale Hitzeentwicklung während des Sägevorgangs zu reduzieren. Gesägt wurde mit Septi Trennscheiben der Firma Girrbach Dental GmbH, Deutschland, mit einem Durchmesser von 22 mm und einer Dicke von 0,19 mm. Diese bieten den entscheidenden Vorteil, dass sie nur an der Kante schneidend belegt sind, während ihre Fläche absolut glatt ist. Dadurch kommt es zu keiner zusätzlichen Zerstörung der empfindlichen Oxidschicht durch tangentialen Abrieb. Über ein Mandrell HST Zwischenstück wurden die Trennscheiben an einem Intra 15 CN Technikhandstück der Firma Kavo, Deutschland, befestigt, das von einem MF Perfecta Mikromotor Typ 9970 der Firma W&H, Österreich, mit bis zu 35 000 UMin⁻¹ angetrieben wurde. Die so erhaltenen Teilstücke der Titanplättchen wurden mit einer dünnen Goldschicht bedampft und an dem Elektronenmikroskop vermessen.

3.4 Wirkstoffmodifikation

3.4.1 Auswahl der Wirkstoffe

Vancomycin Hydrochlorid

Vancomycin ist ein trizyklisches Glykopeptid mit einem Molekulargewicht von etwa 1500. Es ist sehr gut wasserlöslich (> 100 mg/ml) und in wässriger Lösung bei 37 °C bei pH-Werten von 3 - 7 stabil, denaturiert allerdings bei höheren Temperaturen [104, 105].

Vancomycin hemmt den Aufbau der Bakterienzellwand, indem es mit dem transmembranalen Auswärtstransporter der Zellwandbausteine interferiert. Es wirkt nur auf gram-positive Kokken. Dabei stellt es heute noch ein Reserveantibiotikum dar, das bei schweren Erkrankungen durch Problemkeime wie Staphylokokken und Streptokokken mit Penicillin- und Oxacillin-Resistenz

oder bei Penicillinallergie zum Einsatz kommt. Es wird oral nicht resorbiert, weswegen es nur parenteral oder lokal appliziert werden kann [106]. Schwere Wundinfektionen werden immer wieder von resistenten Problemkeimen wie dem Methicillin-resistenten Staphylokokkus aureus und multiresistenten Enterokokkenspezies verursacht. Hervorzuheben sind hierbei schwer zu therapierende Osteomyelitiden nach ausgeprägten Operationen oder Implantationen, sowie Katheter-assoziierte Infektionen bis hin zur Sepsis. Hier stellt Vancomycin parenteral oder lokal appliziert, vor allem bei resistenten Keimformen, häufig den rettenden Therapieversuch dar. Allerdings wurden 1996 aus einer therapieresistenten Wundinfektion eines japanischen Patienten die ersten MRSA-Keime isoliert, die eine erheblich reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Vancomycin aufwiesen (MIC > 8 µg/ml) [107, 108]. Auch Vancomycin-resistente Enterokokkenarten wurden schon bei therapieresistenten Wundinfektionen nachgewiesen [109]. Die minimale Hemmkonzentration (MIC) für Staphylokokkus aureus Stämme liegt normalerweise zwischen 1 µg/ml [110] und 3,12 µg/ml [111]. Der MIC-Wert variiert abhängig von der Art des Erregers, in vivo sollte allerdings eine minimale toxische Konzentration von 50 µg/ml [110] nicht überschritten werden.

Silbernitrat

Einfach positiv geladene Silberionen als antimikrobieller Wirkstoff sind erneut in den Fokus geraten, als eine Toxizität gegenüber menschlichen Zellen in diversen Studien nicht aufgezeigt werden konnte [112, 113]. Es konnten zudem nur wenige Bakterienspezies nachgewiesen werden, die auf Grund von plasmidabhängigen Resistenzmechanismen an sich gegenüber Silberionen weitestgehend unempfindlich sind [114, 115].

Silberionen sind schon seit der Antike für ihre Wirkung gegen ein großes Spektrum an Mikroorganismen bekannt. Sie haben ihre Wirksamkeit zum Beispiel bei der Therapie von Verbrennungen bewiesen [116]. Auch die antimikrobielle Wirkung von silberbeschichtetem medizinischem Instrumentarium wurde schon in diversen Studien nachgewiesen [117, 118]. So werden heutzutage vielfach Harnwegs- und Zentralvenenkatheter mit

Silberummantelung verwendet, um die Gefahr einer durch sie fortgeleiteten Infektion zu reduzieren. Auch viele künstliche Herzklappen und Dialyseeinheiten profitieren von dem Einsatz silberbeschichteter Oberflächen [11, 119, 120, 121]. Silberionen sind in der Lage, an entscheidende funktionelle Gruppen zu binden und deren Funktion zu beeinflussen. Dabei spielt die Wechselwirkung von Ag^+ -Ionen mit Thiol-Gruppen an Enzymen und Proteinen eine wichtige Rolle. So ist die Zytoplasmamembran, in der sich wichtige Enzyme des Bakterienstoffwechsels befinden, ein Ziel der Silberionen. 1 mol Ag^+ -Ionen sind in der Lage, 2 mol Adenosin zu binden, wodurch das Bakterienwachstum und die Zellteilung signifikant gehemmt werden [122]. Bei Studien mit gelöstem Silbernitrat an Bakterienkulturen von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* haben sich Anhaltspunkte für das bis heute noch nicht vollständig verstandene Wirkprinzip ergeben. So löste sich die Zellmembran von der Zellwand und die DNA lag nur noch in der kondensierten, nicht replikationsfähigen Form vor. Dabei war *Escherichia coli* auf Grund seiner dünneren Zellwand deutlich anfälliger für Silbernitrat als *Staphylococcus aureus* [123, 124].

3.4.2 Vakuumimprägnierung

Um eine Wirkstoffbeladung bis tief in die einzelnen Nanotubes der Titanoxidschicht zu ermöglichen, wurde mit einem Vakuum gearbeitet. Die Adsorption der Wirkstoffe erfolgte dabei in Anlehnung an die Methode nach Byrne [125]. Hierfür wurde jeweils ein Prüfkörper in ein 15 ml Rollrandglas gegeben und durch einen Polyethylendeckel mit Bohrung (3 - 5 mm) verschlossen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die anodisierte Seite der Titanplättchen auf und mit Ausrichtung zur Öffnung zu liegen kam. So wurde sichergestellt, dass die einströmende Vancomycin- bzw. Silbernitratlösung zuerst auf die anodisierte Schicht traf und die Proben optimal mit diesen Wirkstoffen beschickt wurden. Drei dieser präparierten Probengefäße wurden mit der Öffnung nach unten auf ein 8 cm großes, rundes Metallgitter gestellt,

3. Material und Methode

das vorher in einen 250 ml Dreihalsrundkolben aus Duranglas eingebracht worden war. Um die Lage der drei Probengefäße zu sichern, wurden sie noch jeweils mit einem ca. 10 cm langen Draht versehen, der als Widerlager bis in die mittlere Öffnung des Rundkolbens reichte. Zudem wurden diese drei Drähte noch mit einer Drahtschlinge verbunden, um zusätzliche Standsicherheit zu gewährleisten (Abbildung 8 A).

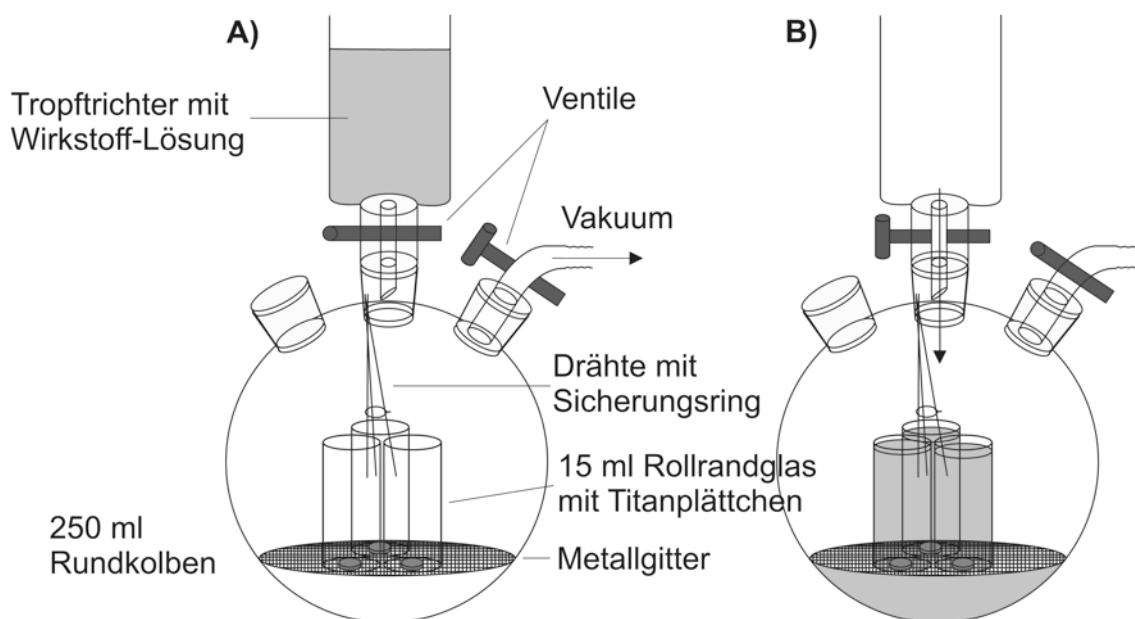


Abbildung 8: Adsorption der Wirkstoffe unter Vakuum in einem 250 ml Rundkolben. Nach erfolgtem Aufbau eines Vakuums (A) wird die Wirkstofflösung durch ein zweites Ventil eingebracht (B). Sobald der Flüssigkeitsspiegel den mit einer Bohrung versehenen Deckel erreicht, schießt die Flüssigkeit in die 15 ml Rollrandgläser ein. Die Wirkstoffe werden hierdurch bis tief in die Nanotubebeformationen gedrückt.

Der so vorbereitete Rundkolben wurde für 45 min mit einer Membranpumpe evakuiert. Dabei konnte der Druck im Dreihalsrundkolben auf unter 100 mPa gesenkt werden. Unter Vakuum wurden 75 ml entweder einer 10 %-igen Vancomycinlösung oder einer 10 %-igen Silbernitratlösung eingelassen, in der die Proben für 24 h verweilten (Abbildung 8 B). Danach wurden sie aus der

entsprechenden Lösung entnommen, Überschüsse abgetropft und weitere 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

3.5 Desorption der Wirkstoffe

3.5.1 Statische Freisetzung in einem Auslagerungssystem aus Teflon®

Teflon® als Handelsname steht für Polytetrafluorethylen (PTFE). Es handelt sich hierbei um ein vollfluoriertes Polymer. PTFE ist extrem reaktionsträge und sehr beständig gegen viele reaktive Reagenzien, wie zum Beispiel Basen, Alkohole, Ketone, Benzine und Öle. Auf Grund seiner extrem niedrigen Oberflächenspannung existieren nahezu keine Substanzen, die an PTFE haften bleiben [126].

Das Problem der Auslagerung bestand darin, dass lediglich eine Seite der Titanplättchen optimal anodisiert war und Nanotubes aufwies. Diesem Problem wurde durch die Verwendung von Zylindern aus Teflon® Rechnung getragen (Abbildung 9).

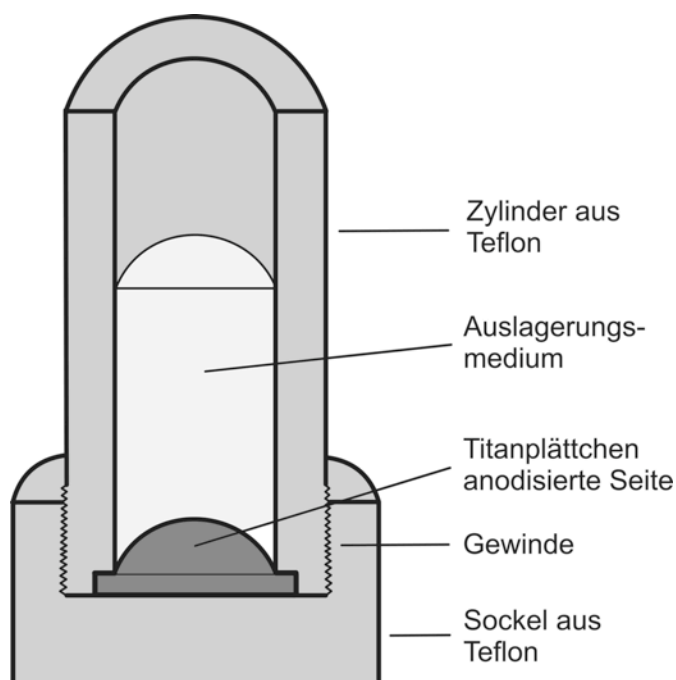


Abbildung 9: Längsschnitt durch ein Teflon®-Auslagerungssystem

Auf diesen Zylindern wurden die Titanplättchen mittels Schraubvorrichtung so befestigt, dass das Lumen des Zylinders eine exakt bekannte, kreisrunde Fläche von $0,64 \text{ cm}^2$ unbedeckt ließ. Durch den aufgebauten Druck des Schraubvorgangs wurde das Zylindervolumen gegenüber dem Restplättchen vollständig abgedichtet. Die Zylinder wurden mit steriler, physiologischer Pufferlösung PBS (8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,11 g Na_2HPO_4 , 0,2 g KH_2PO_4 in einem Liter Reinstwasser) gefüllt und mit einem Deckel gegen Verdunstung geschützt. Das Volumen betrug bei der Vancomycinauslagerung 2 ml, bei der Silberauslagerung 2,5 ml. Zur Auslagerung wurden die präparierten Zylinder in einem Brutschrank (37°C) aufbewahrt. Durch Platzierung der Proben auf einem Kreisschüttler bei mäßiger Rotationsgeschwindigkeit wurde eine permanente Durchmischung der Flüssigkeit und des ausdiffundierten Wirkstoffs gewährleistet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Rotationsgeschwindigkeit des Kreisschüttlers während der gesamten Auslagerungszeit unverändert blieb.

3.5.2 Messung der Antibiotikakonzentration durch UV/Vis-Spektroskopie

Die Wirkstoffkonzentration wurde mit Hilfe eines Zweistrahl-UV/Vis-Spektralphotometers Cary 1 der Firma Varian, Australien, durch Absorptionmessung an flüssiger Phase bei Antibiotika-spezifischer Wellenlänge ermittelt. Die Absorptionswellenlänge für Vancomycin wurde durch Messung der Absorption an 1 %-iger Wirkstofflösung über einen Wellenlängenbereich von 200 – 800 nm ermittelt. Als Absorptionswellenlänge wurde diejenige Wellenlänge gewählt, die eine Absorption proportional zur Wirkstoffkonzentration aufwies. Dabei misst das UV-Spektrometer die Extinktion, d.h. die Abschwächung der Strahlungsintensität beim Durchgang durch eine absorbierende Substanz. Diese korreliert über das Lambert-Beersche Gesetz mit der vorliegenden Vancomycinkonzentration.

$$\Delta E = \varepsilon_{mol} \cdot c \cdot d \quad (6)$$

ΔE = Extinktionsdifferenz, ε_{mol} = molarer Extinktionskoeffizient ($l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$),
 c = Konzentration ($mol \cdot l^{-1}$), d = Durchmesser der Küvette

Für Vancomycin wurde $\lambda = 237$ nm als optimale Absorptionswellenlänge bestimmt. Mit Hilfe von Standardlösungen mit Antibiotikagehalt von 0 – 40 mg/l wurde für Vancomycin eine Eichgerade erstellt. Der Korrelationskoeffizient der Eichgerade betrug 0,99 (Abbildung 10).

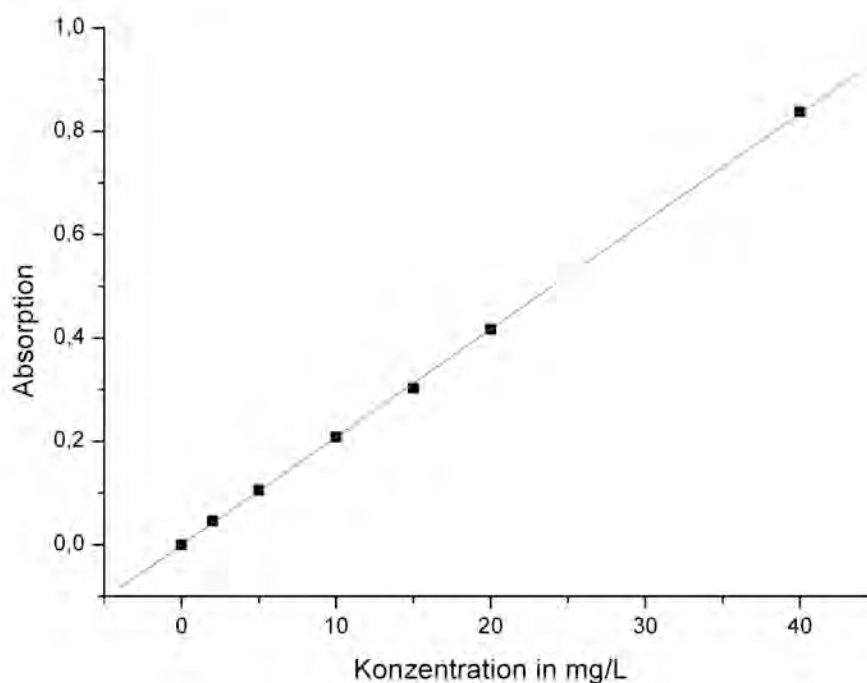


Abbildung 10: Eichgerade zur Messung der Vancomycinkonzentrationen durch Absorption

Anhand der Geradengleichung wurde die Konzentration der Messlösung bestimmt. Die Wirkstoffmenge wurde durch Messung der Wirkstoffkonzentration in den Auslagerungsmedien und dem konstanten Volumen ermittelt. Lag der unbekannte Wert oberhalb des linearen Bereichs, wurden die Lösungen entsprechend verdünnt. Als Referenz diente bei jeder Messung sterile, physiologische Pufferlösung PBS.

Die Wirkstoffmenge wurde durch Messung der Wirkstoffkonzentration in dem Auslagerungsmedium PBS ermittelt. Dazu wurde das Gemisch PBS/Vancomycin aus den Teflonkolben in 1,5 ml UV-Küvetten halbmikro mit den Abmessungen 12,5 x 12,5 x 4,5 mm der Firma Plastibrand, Deutschland, pipettiert und in 30 Minuten Ruhezeit auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch diese standardisierte Abkühlzeit konnte ein auftretender Temperaturfehler vernachlässigt werden. Danach erfolgte die Messung der Vancomyinkonzentration in den Auslagerungsmedien der einzelnen Proben.

3.5.3 Messung der Silberkonzentration durch ICP-Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der Silberkonzentration wurde ein Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry (ICP-MS) Gerät der Firma Varian, Australien, verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren zur Element- und Isotopenanalyse. Die ICP-MS beruht auf der Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Plasma bei etwa 6 000 – 10 000 K. Zur Erzeugung des Plasmas wird ein hochfrequenter Strom in ionisiertem Argongas induziert. Aus diesem Plasma werden die Ionen durch zwei Blenden, die als Sampler und Skimmer bezeichnet werden, in das Vakuumsystem des Massenspektrometers überführt. Nach dem Fokussieren in der sogenannten Ionenoptik wird der Ionenstrahl im eigentlichen Massenspektrometer in Ionen unterschiedlicher Masse getrennt und detektiert. Hierbei wird die Masse zum qualitativen und quantitativen Nachweis genutzt [127].

Gemessen wurden die Konzentration der Silberisotope Ag 107 und Ag 109. Zum Nachweis wurde etwa 1 ml des zu untersuchenden Mediums durch einen dünnen Schlauch angesaugt und in der Plasmakammer verdampft. Die qualitative und quantitative massenspektrometrische Auswertung wurde mittels der Software ICP-MS Expert der Firma Varian durchgeführt. Als Standard wurde „ICP Multi Element Standard Solution VI CertiPUR®“ der Firma Merk, Deutschland, mit einer Silberkonzentration von 20,1 +/- 0,5 mg l⁻¹ in der Verdünnung 1:50, 1:100 und 1:200 verwendet.

3.6 Das Korsmeyer-Peppas-Modell

Ausgehend von dem 2. Fickschen Diffusionsgesetz entwickelten Korsmeyer et al. (1983) und Peppas et al. (1985) ein semiempirisches Modell zur Wirkstofffreisetzung. Das Modell geht von perfekten Sinkbedingungen, einer homogenen initialen Wirkstoffbeladung und einer im Vergleich zu Wirkstoffdiffusion schnellen Wirkstofflösung aus. Als Ursache liegt der Diffusion ein Konzentrationsgradient zu Grunde. Es ergibt sich folgende Korsmeyer-Peppers-Gleichung:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (7)$$

M_t = kumulativ freigesetzte Masse zur Zeit t , M_∞ =kumulativ freigesetzte Masse zur Zeit $t \rightarrow \infty$,
 k = Kinetikkonstante, n = Freisetzungsexponent

Diese Gleichung stellt den verallgemeinerten Fall dar und schließt anomale und nicht-Ficksche Diffusion in der Freisetzungskinetik mit ein. Der Freisetzungsexponent n charakterisiert die verschiedenen Freisetzungsmechanismen, wobei zwischen Fickscher Diffusion (Case I-Transport, diffusions-kontrolliert), nicht-Fickscher Diffusion (Case II-Transport, Quellungs/Degradations-kontrolliert) und anomaler Diffusion (Überlagerung von Case I und Case II) unterschieden werden kann (Tabelle 3).

Freisetzungsexponent n			Freisetzungsmechanismus
Dünner Film	Zylinder	Kugel	
$0,5 \geq n$	$0,45 \geq n$	$0,43 \geq n$	Ficksche Diffusion
$0,5 < n < 1,0$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	Anomaler Transport
$1 \leq n$	$0,89 \leq n$	$0,85 \leq n$	Case-II-Transport

Tabelle 3: Einteilung der Transportmechanismen in Abhängigkeit des Freisetzungsexponenten für verschiedene Geometrien [128]

R^2 (in %) ist dabei ein Maß für die Übereinstimmung der gemessenen Werte mit der aus diesen Daten errechneten Freisetzung nach Peppas.

3.7 Verwendete Chemikalien und Wirkstoffe

Ammoniumhydrogenfluorid	NH_4HF_2 der Firma Merck, Darmstadt, Bstnr.: 1.01164
Ethylenglycol	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ der Firma Merck, Darmstadt, Bstnr.: 1.09621
Flusssäure	HF 40 % der Firma Merck, Darmstadt, Bstnr.: 1.00338
Schwefelsäure	H_2SO_4 95-97 % der Firma Merck, Darmstadt, Bstnr.: 1.00731
Silbernitrat	AgNO_3 der Firma Merck, Darmstadt, Bstnr.: 1.01512
Vancomycin	Vancomycin CP 500 mg in Durchstech- flaschen der Firma Hikma Pharma GmbH, Portugal 512,6 mg Vancomycinhydrochlorid entsprechend 500 mg Vancomycin

4. Ergebnisse

4.1 Strom-Zeit-Diagramm einer Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis

Zu Beginn der jeweiligen Anodisierung wurde die Spannung in gleichmäßigen Schritten von 50 mVs^{-1} auf die Anodisierungsspannung von 20 Volt angehoben. Die anodisch aktive Titanoberfläche hatte eine Gesamtgröße von circa $7,55 \text{ cm}^2$. Dabei stieg die Stromstärke innerhalb der ersten 300 Sekunden sehr langsam auf Werte von 5 – 9 mA an. Nach einem Zeitraum von 300 - 400 Sekunden kam es sehr häufig zu einem sprunghaften Anstieg des Anodisierungstromes um 200 – 300 % (Abbildung 11 oben).

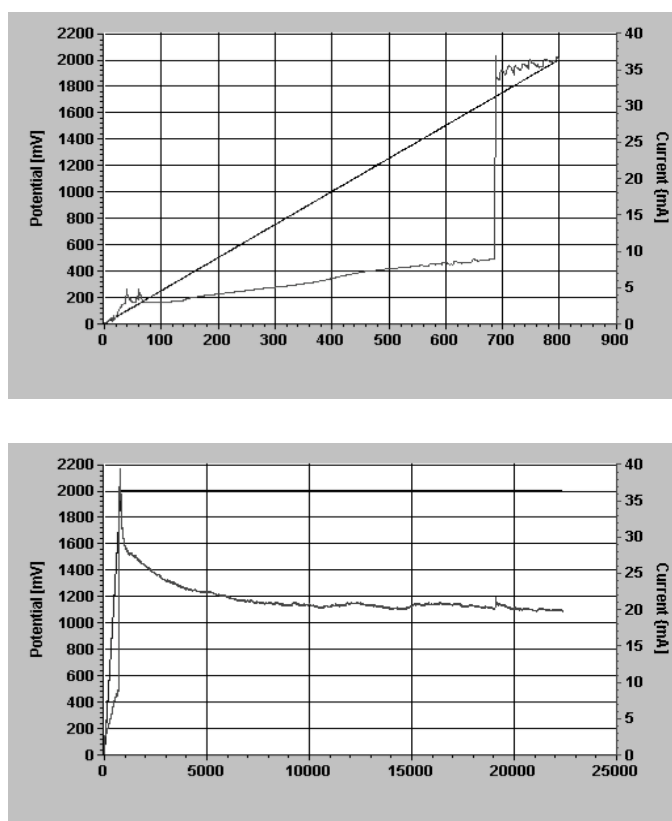


Abbildung 11: Strom-Spannungs-Zeit-Diagramm einer Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis in den ersten 400 Sekunden (oben) und nach einer Anodierungszeit von 3 Stunden (unten). Die Gerade entspricht hierbei der gleichmäßig ansteigenden und nach dem Zeitraum von 400 Sekunden konstant gehaltenen Anodisierungsspannung (Spannung zusätzlich 10:1 verstärkt).

Nach der anfänglichen Phase mit gleichmäßigem Spannungsanstieg wurde die erreichte Anodisierungsspannung in Höhe von 20 Volt über einen Zeitraum von 3 bzw. 18 Stunden gehalten. Die Stromstärke zeigte hierbei einen initial exponentiell abfallenden Verlauf und näherte sich dann asymptotisch Stromwerten an, die zwischen 18 und 28 mA lagen (Abbildung 11 unten).

4.2 Herstellung von vier gleichwertigen Titanproben

Pro Anodisierungszyklus wurden mit dem in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Versuchsaufbau vier Titanplättchen mit Nanotubeoberflächen modifiziert. In den Vorversuchen konnte hierbei gezeigt werden, dass die Anordnung von vier Titanproben im 90° Winkel zueinander, mit umgebender zylindrischer Platinnetzgegenelektrode, zu vier gleichwertigen Titanoxidnanotubeoberflächen führt (Abbildung 12). Jeweils ein Titanplättchen wurde bei der späteren Versuchsdurchführung unter dem Elektronenmikroskop auf seine Oberflächenstruktur hin untersucht und stand exemplarisch für die anderen drei Titanproben dieses Anodisierungsvorganges. Diese drei Titanproben wurden dann ohne weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen für die Auslagerungsversuche verwendet.

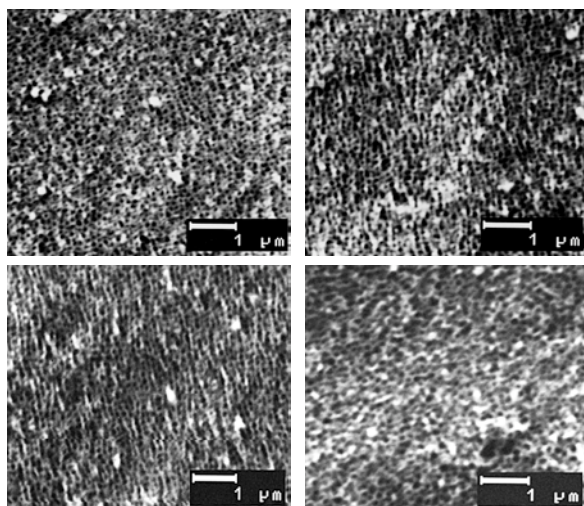


Abbildung 12: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der 4 Titanproben eines Anodisierungsvorganges. Erkennbar ist die weitestgehend einheitliche Oberflächenstruktur der 4 Proben im Vergleich.

4.3 Definierte Versuchsoberfläche – Abdichtung des Probenzylinders

Das entscheidende Problem der Versuchsdurchführung bestand darin, dass die Titanproben nur auf einer Seite mit Nanotubebformationen modifiziert waren. Durch die Verwendung von PTFE-Zylinder musste sichergestellt werden, dass nur eine definierte Fläche zur Auslagerung der Wirkstoffe unbedeckt blieb. Die Schraubverbindung sorgte für einen erheblichen Druck des PTFE-Randes auf die Titanoxidoberfläche, der in diesem Bereich zu einer Deformation und somit zu einer Abdichtung des Probenzylinders gegen die restliche Oberfläche der Titanprobe sorgte (Abbildung 13).

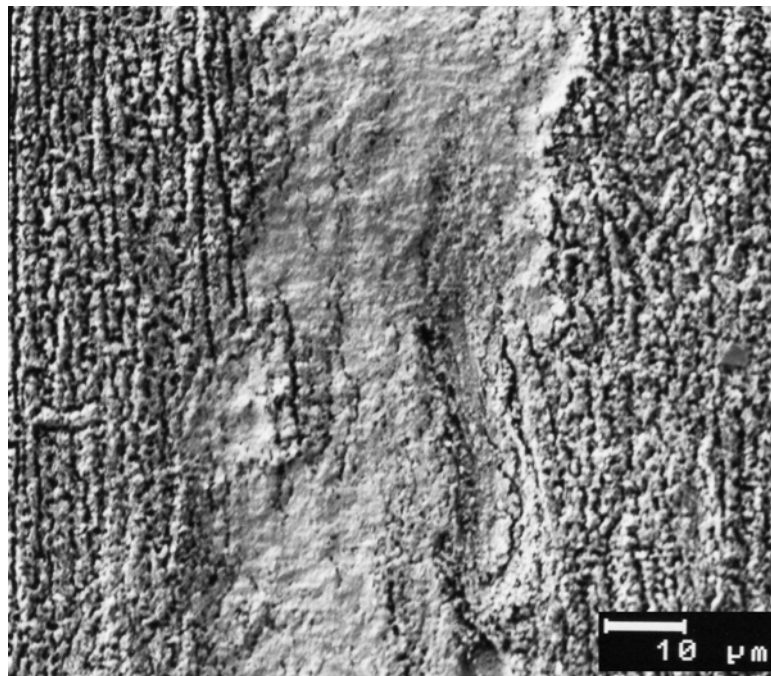


Abbildung 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Impression, die der PTFE-Zylinder nach Versuchsdurchführung auf der Titanoberfläche hinterlassen hat. Dieser Bereich erscheint für die nötige Abdichtung des Probenzylinders gegenüber der übrigen Probenoberfläche ausreichend.

4.4 Oberflächenanalyse – Elektrolyt auf Wasserbasis

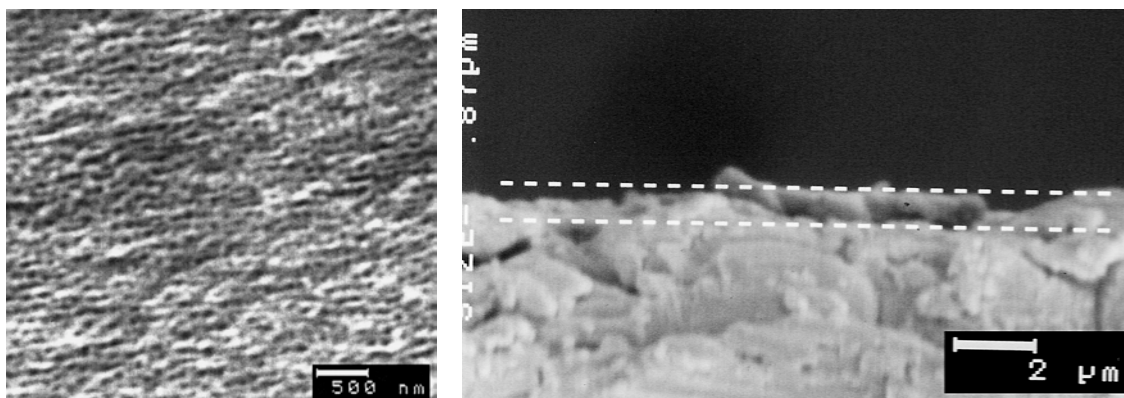


Abbildung 14: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Titanprobe nach 3 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis, die Aufsichtsaufnahme (links) und das Schnittbild durch die Titanoxidschicht (rechts).

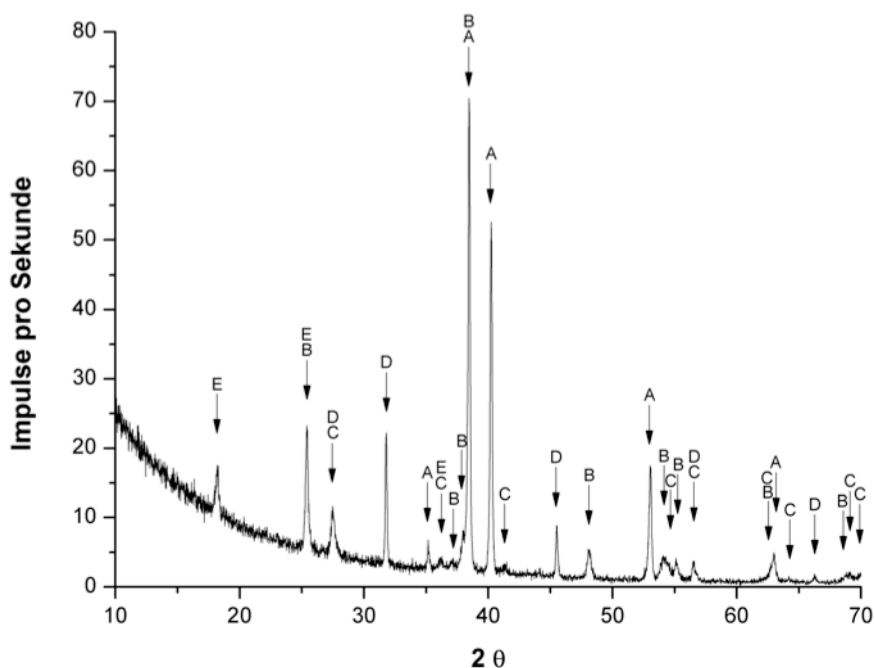


Abbildung 15: XRD-Diagramm einer Titanprobe nach 3 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis. Anteile von NaCl sind auf Reste der PBS-Lösung zurückzuführen. Deutlich erhöhte Impulse bei Titan in Reinform sprechen für die geringe Dicke der Oxidschicht. Diese besteht zu großen Anteilen aus Anatas, zu kleinen Anteilen aus Rutil und Ti_3O_5 .

A → Titan Reinform, B → Anatas, C → Rutil, D → NaCl, E → Ti_3O_5

4. Ergebnisse

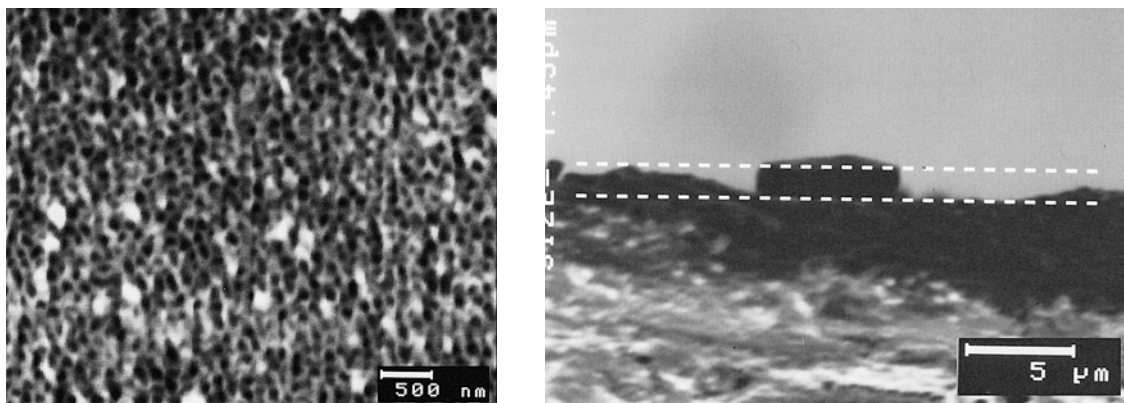


Abbildung 16: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Titanprobe nach 18 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis, die Aufsichtsaufnahme (links) und das Schnittbild durch die Titanoxidschicht (rechts).

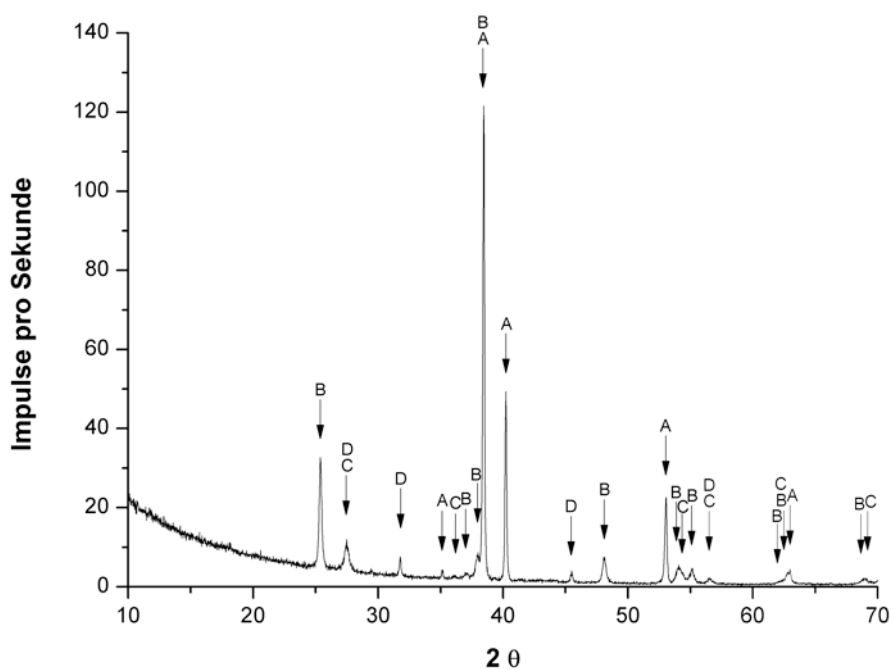


Abbildung 17: XRD-Diagramm einer Titanprobe nach 18 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis. Anteile von NaCl sind auf Reste der PBS-Lösung zurückzuführen. Geringere Impulse bei Titan in Reinform sprechen im Gegensatz zu der 3 Stunden Anodisierungszeit für eine größere Dicke der Oxidschicht. Diese besteht zu großen Anteilen aus Anatas, zu einem kleinen Anteil aus Rutil.

A → Titan Reinform, B → Anatas, C → Rutil, D → NaCl

<u>Tabelle 4: Übersicht über die Oberflächeneigenschaften (wässriger Elektrolyt)</u>		
	3 Stunden Anodisierung	18 Stunden Anodisierung
Form der Nanotubes	keine freistehende Röhrenstruktur, Tubes in kompakter Oberfläche	keine freistehende Röhrenstruktur, Tubes in kompakter Oberfläche
Durchmesser der Nanotubes \emptyset	70 nm	100 nm
Länge der Nanotubes \emptyset	870 nm	1,45 μm
Oberfläche pro Nanotube \emptyset	0,191 μm^2	0,456 μm^2
Volumen pro Nanotube \emptyset	3,384 $\cdot 10^{-3}$ μm^3	11,388 $\cdot 10^{-3}$ μm^3
Anzahl der Nanotubes pro $\text{cm}^2 \emptyset$	4,1 $\cdot 10^9$ Nanotubes	3,8 $\cdot 10^9$ Nanotubes
Zusammensetzung der Nanotubeschicht	Großer Anteil Anatas, kleine Anteile Rutil und Ti_3O_5	Großer Anteil Anatas, kleine Anteile Rutil

4.5 Oberflächenanalyse – Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis

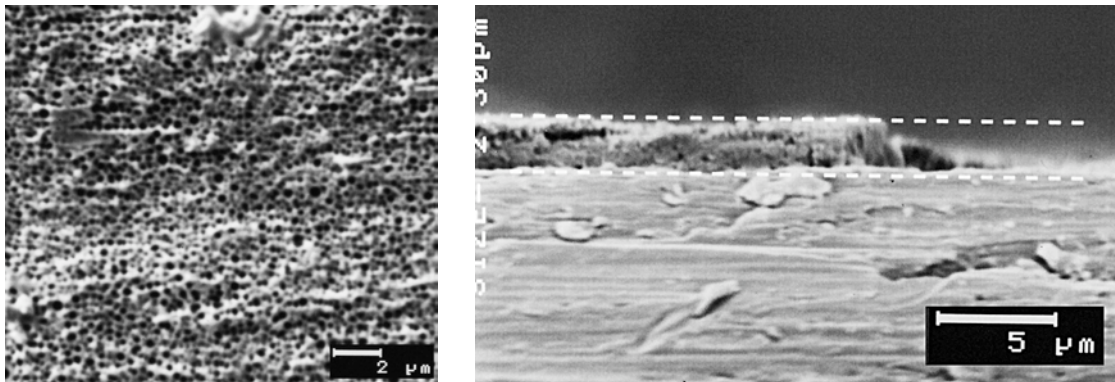


Abbildung 18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Titanprobe nach 8 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis, die Aufsichtsaufnahme (links) und das Schnittbild durch die Titanoxidschicht (rechts).

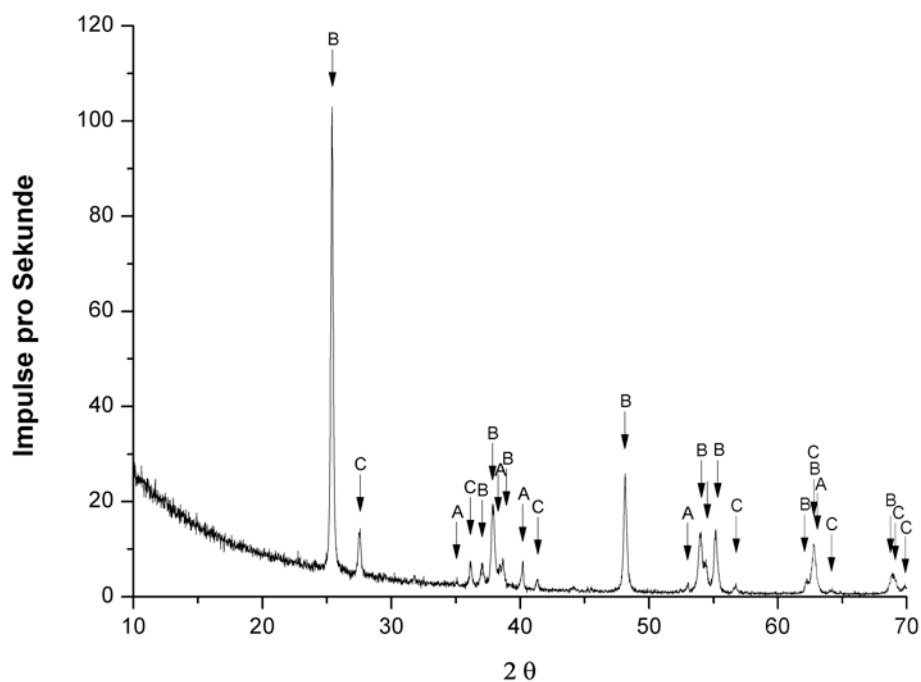


Abbildung 19: XRD-Diagramm einer Titanprobe nach 8 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis. Auf Grund der relativ großen Dicke der Titanoxidschicht ist Titan in Reinform kaum nachweisbar. Die Oxidschicht besteht zu großen Anteilen aus Anatas, zu einem kleinen Anteilen aus Rutil.
A → Titan Reinform, B → Anatas, C → Rutil

4. Ergebnisse

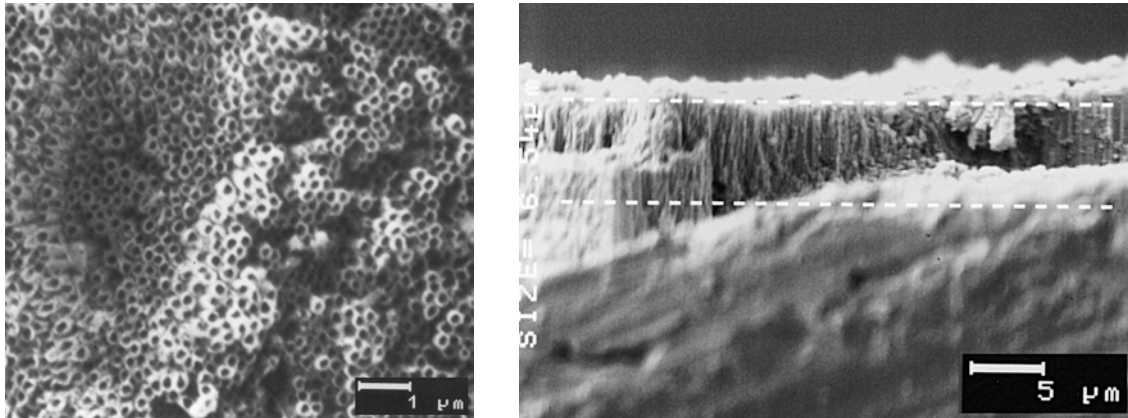
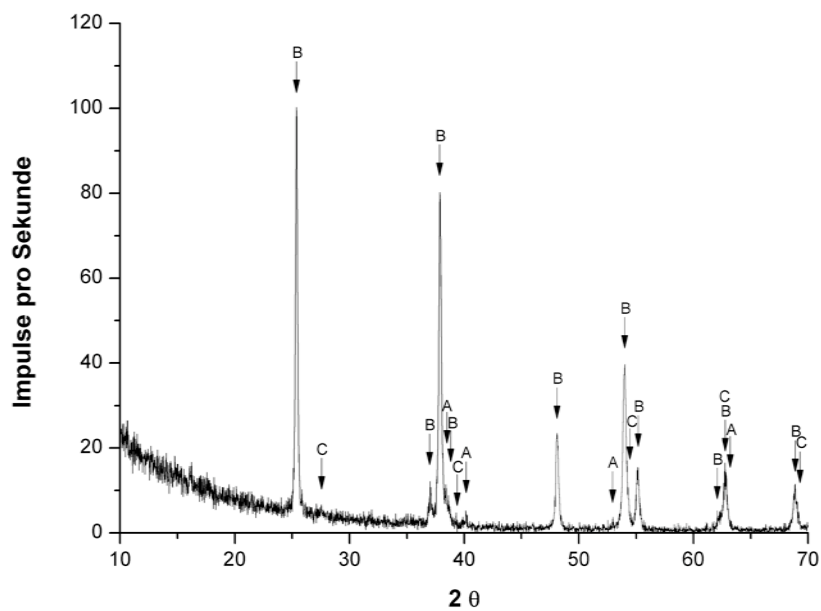


Abbildung 20: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Titanprobe nach 18 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis, die Aufsichtsaufnahme (links) und das Schnittbild durch die Titanoxidschicht (rechts).



*Abbildung 21: XRD-Diagramm einer Titanprobe nach 18 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis. Auf Grund der relativ großen Dicke der Titanoxidschicht ist Titan in Reinform kaum nachweisbar. Die Oxidschicht besteht zu großen Anteilen aus Anatas, zu einem kleinen Anteilen aus Rutil.
A → Titan Reinform, B → Anatas, C → Rutil*

4. Ergebnisse

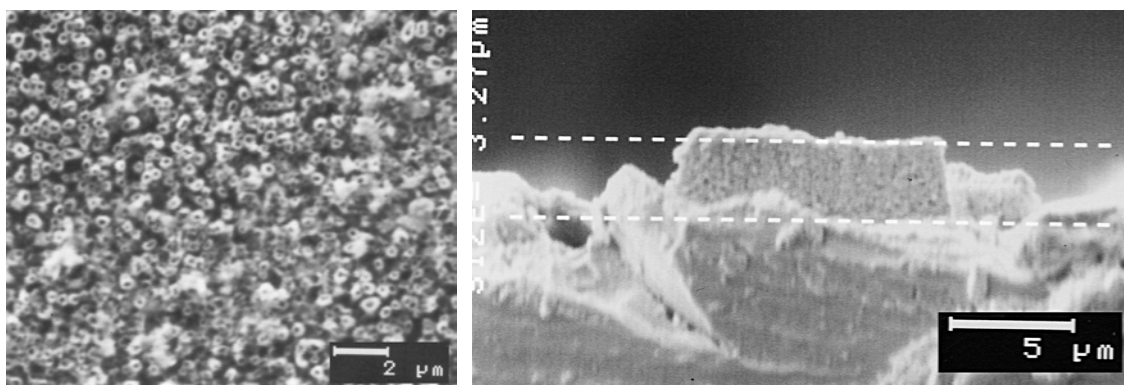


Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer Titanprobe nach 30 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis, die Aufsichtsaufnahme (links) und das Schnittbild durch die Titanoxidschicht (rechts).

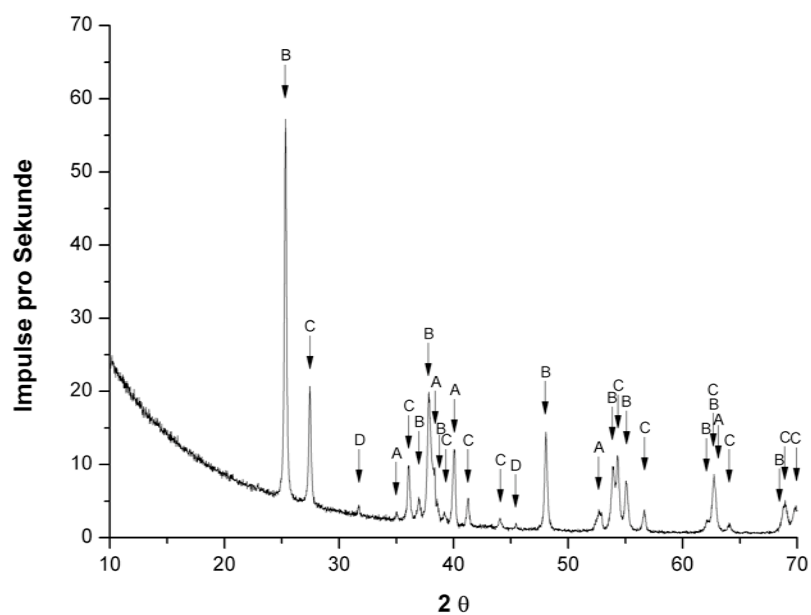


Abbildung 23: XRD-Diagramm einer Titanprobe nach 30 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis. Auf Grund der relativ großen Dicke der Titanoxidschicht, ist Titan in Reinform kaum nachweisbar. Diese besteht zu großen Anteilen aus Anatas, zu einem kleinen Anteil aus Rutil.

A → Titan Reinform, B → Anatas, C → Rutil, D → NaCl

<u>Tabelle 5: Übersicht über die Oberflächeneigenschaften (Ethylenglycolelektrolyt)</u>			
	8 Stunden Anodisierung	18 Stunden Anodisierung	30 Stunden Anodisierung
Form der Nanotubes	Honigwabenstruktur in kompakter Oberfläche	Frei stehende Nanotubes mit einer Wanddicke von circa 15 - 25 nm	Frei stehende Nanotubes mit einer Wanddicke von circa 30 - 45 nm
Durchmesser der Nanotubes Ø	110 nm	160 nm	120 nm
Länge der Nanotubes Ø	2,3 µm	6,54 µm	3,27 µm
Oberfläche pro Nanotube Ø	0,795 µm ²	3,287 µm ²	1,233 µm ²
Volumen pro Nanotube Ø	21,858 • 10 ⁻³ µm ³	131,494 • 10 ⁻³ µm ³	36,983 • 10 ⁻³ µm ³
Zahl der Nanotubes pro cm² Ø	0,85 • 10 ⁹ Nanotubes	1,9 • 10 ⁹ Nanotubes	0,65 • 10 ⁹ Nanotubes
Zusammensetzung der Titanoxidschicht	Großer Anteil Anatas, kleiner Anteil Rutil	Großer Anteil Anatas, kleiner Anteil Rutil	Großer Anteil Anatas, kleiner Anteil Rutil

4. Ergebnisse

Der Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis wurde zur Anodisierung der Probenoberflächen mehrfach verwendet. Bei der Herstellung der 18 Stunden Proben wurde der Elektrolyt vorher schon einmal zur Anodisierung einer 8 Stunden Probe verwendet, vor der Herstellung der 30 Stunden Probe zweimal, zur Anodisierung einer 8 Stunden Probe und zur Anodisierung einer 18 Stunden Probe.

4.6 Vancomycinauslagerung

4.6.1 Auslagerungsergebnisse der Oberflächen aus einem Elektrolyten auf Wasserbasis

Verglichen werden in diesem Kapitel Proben mit 3 und 18 Stunden Anodisierungszeit in einem wässrigen Elektrolyten auf ihre fraktionierte Abgabe von adsorbiertem Vancomycin. Als Referenz dienen wirkstoffbeladene Titanproben, die keinen Anodisierungszyklus durchlaufen haben. Die versuchsrelevante Probenoberfläche beträgt $0,64 \text{ cm}^2$ (Öffnung des Teflonzylinders).

	3 h Anodisierung	18 h Anodisierung	Referenz
Abgabe Stunde 1-6 (initialer burst)	136,16 μg 53,97 % (1) 319,9 % (2)	146,85 μg 45,3 % (1) 352,8 % (2)	32,43 μg 41,31 % (1)
Abgabe bis Tag 14	194,05 μg 76,92 % (1) 290,2 % (2)	217,61 μg 67,13 % (1) 337,6 % (2)	49,73 μg 63,36 % (1)
Gesamte Wirkstoffmenge	252,29 μg 100 % (1) 221,4 % (2)	324,15 μg 100 % (1) 312,9 % (2)	78,5 μg 100 % (1)
Auslagerungszeitraum	145 Tage		80 Tage

Tabelle 6: Vancomycinabgabe der Titanoberflächen nach 3 bzw. 18 Stunden Anodisierung in einem wässrigen Elektrolyten. Eingetragen sind zudem die prozentuale Abgabe hinsichtlich der Gesamtabgabe (1) und die prozentuale Steigerung im Vergleich zu der Referenz (2).

4. Ergebnisse

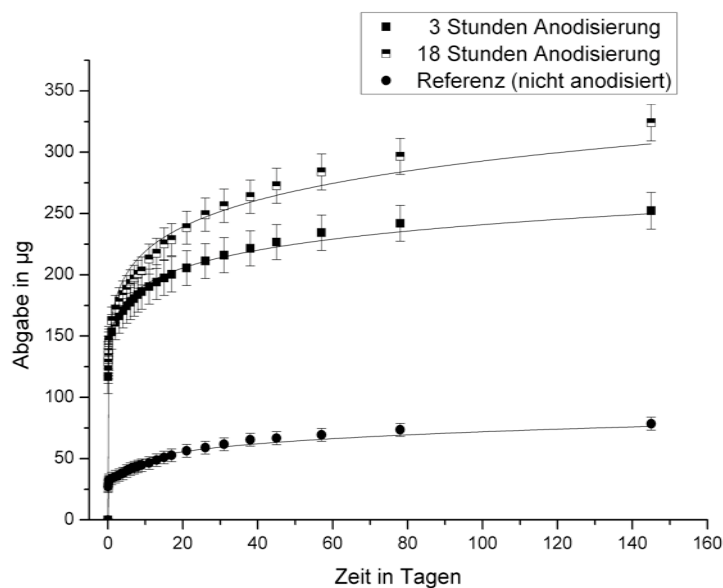


Abbildung 24: Vancomycinauslagerung der Titanproben nach 3 bzw. 18 Stunden Anodisierung im Vergleich zu der Referenz. Graphen gefittet nach Peppas: 3 Stunden Probe: $n = 0,1$; $k = 153,07$; $R^2 = 99,43\%$
 18 Stunden Probe: $n = 0,13$; $k = 164,04$; $R^2 = 97,35\%$
 Referenz: $n = 0,16$; $k = 34,42$; $R^2 = 94,85\%$

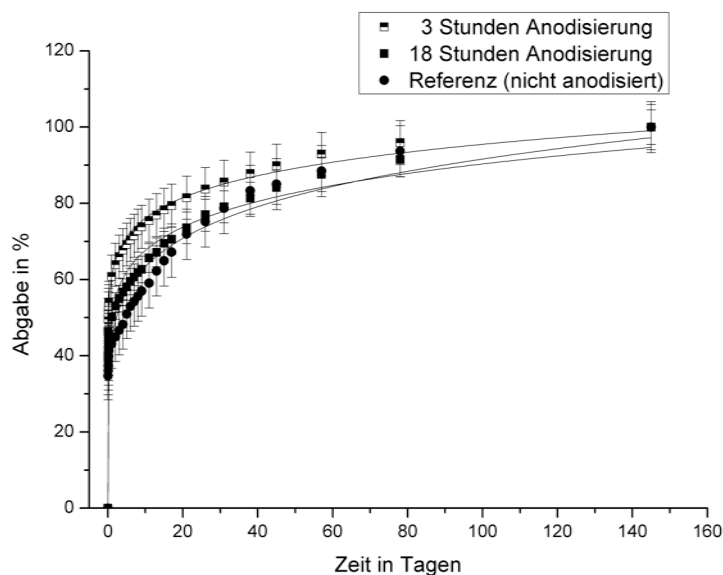


Abbildung 25: Vancomycinauslagerung der Titanproben prozentual nach 3 bzw. 18 Stunden Anodisierung im Vergleich zu der Referenz. Graphen gefittet nach Peppas: 3 Stunden Probe: $n = 0,1$; $k = 60,67$; $R^2 = 99,43\%$
 18 Stunden Probe: $n = 0,13$; $k = 50,61$; $R^2 = 97,35\%$
 Referenz: $n = 0,16$; $k = 43,85$; $R^2 = 94,85\%$

Wie aus Abbildung 24 und Tabelle 6 ersichtlich, konnten in die modifizierten Titanoxidoberflächen deutlich größere Vancomycinmengen eingelagert werden als in die Referenzoberfläche. Verglichen mit der Referenz war sie bei den 3 Stunden Proben um 221,4 % und bei den 18 Stunden Proben um 312,9 % vergrößert. Aus den Auslagerungsdaten lässt sich schließen, dass durch die Vakuumimprägnierung auch eine deutliche Menge Vancomycin in die Nanotubes eingelagert werden konnte.

Bei einer Betrachtung der prozentualen Vancomycinabgabe der Proben mit 3 bzw. 18 Stunden Anodisierungszeit an den therapeutisch interessanten Zeitpunkten nach 6 Stunden bzw. 14 Tagen (Abb. 25 und Tab. 6) wird deutlich, dass die Anodisierung in einem wässrigen Elektrolyten als Oberflächenmodifikation hinsichtlich der Freisetzungskinetik keinen signifikanten Vorteil bietet. Die Auslagerung erfolgte bis Tag 14 schneller als bei der Referenzprobe.

4.6.2 Auslagerungsergebnisse der Oberflächen aus einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis

Verglichen werden in diesem Kapitel Proben mit 8, 18 und 30 Stunden Anodisierungszeit in Ethylenglycol auf ihre fraktionierte Abgabe von adsorbiertem Vancomycin. Als Referenz dienen wirkstoffbeladene Titanproben, die keinen Anodisierungszyklus durchlaufen haben. Die versuchsrelevante Probenoberfläche beträgt $0,64 \text{ cm}^2$ (Öffnung des Teflonzylinders).

4. Ergebnisse

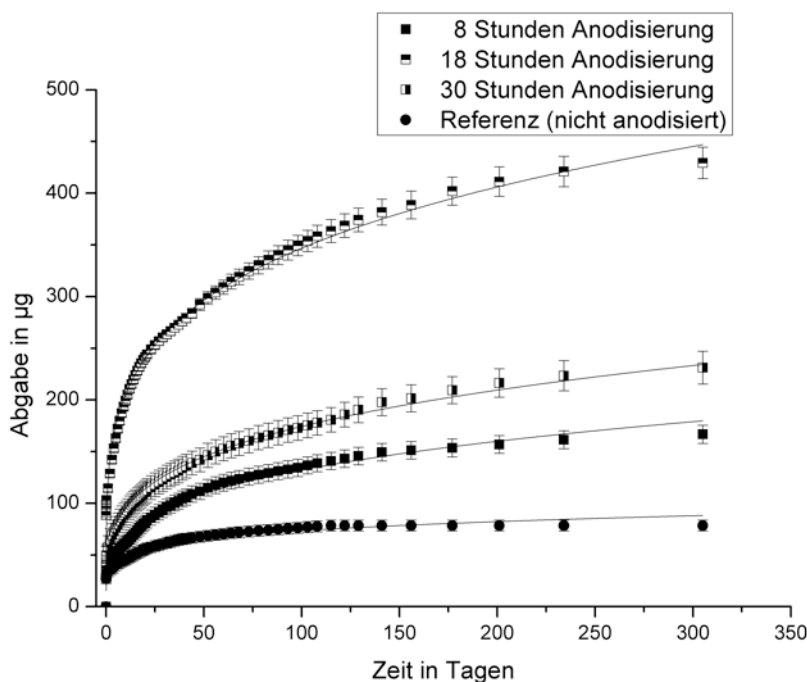


Abbildung 26: Vancomycinauslagerung der Titanproben nach 8, 18 bzw. 30 Stunden Anodisierung im Vergleich zu der Referenz. Graphen gefittet nach Peppas: 3 Stunden Probe: $n = 0,28$; $k = 37,08$; $R^2 = 97,38\%$
 18 Stunden Probe: $n = 0,23$; $k = 121,76$; $R^2 = 99,14\%$
 30 Stunden Probe: $n = 0,27$; $k = 51,52$; $R^2 = 98,85\%$
 Referenz: $n = 0,16$; $k = 34,43$; $R^2 = 95,95\%$

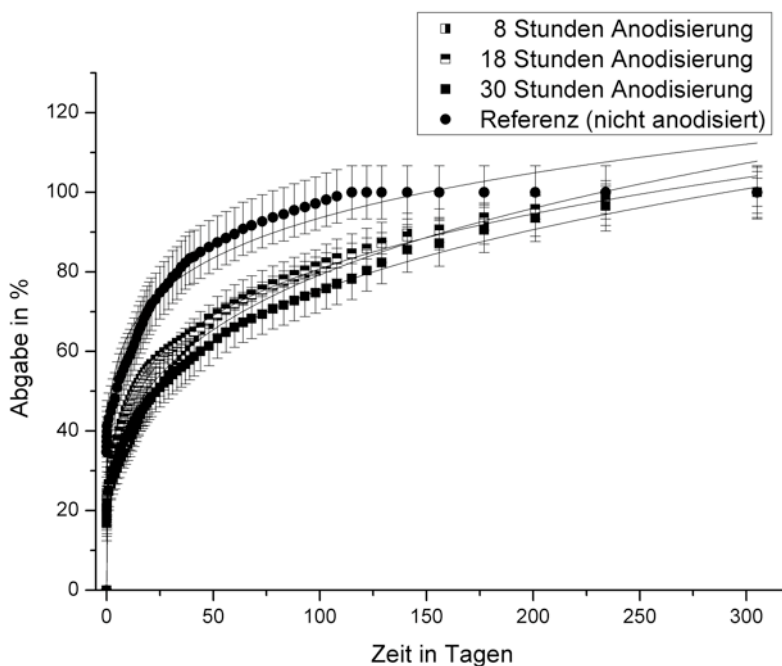


Abbildung 27: Vancomycinauslagerung der Titanproben nach 8, 18 bzw. 30 Stunden Anodisierung prozentual im Vergleich zu der Referenz. Graphen gefittet nach Peppas: 3 Stunden Probe: $n = 0,28$; $k = 22,23$; $R^2 = 97,38\%$
 18 Stunden Probe: $n = 0,23$; $k = 28,36$; $R^2 = 99,14\%$
 30 Stunden Probe: $n = 0,27$; $k = 22,27$; $R^2 = 98,73\%$
 Referenz: $n = 0,16$; $k = 43,86$; $R^2 = 95,95\%$

4. Ergebnisse

	8 Stunden Anodisierung	18 Stunden Anodisierung	30 Stunden Anodisierung	Referenz
Abgabe Stunde 1-6 (initialer burst)	38,3 µg 22,9 % (1) 18,2 % (2)	103,2 µg 24 % (1) 218,5 % (2)	49,4 µg 21,4 % (1) 52,5 % (2)	32,4 µg 41,3%(1)
Abgabe bis Tag 14	69,3 µg 41,6 % (1) 39,4 % (2)	219,7 µg 51,2 % (1) 342,1 % (2)	100,1 µg 43,3 % (1) 101,4 % (2)	49,7 µg 63,4%(1)
Gesamte Abgabemenge	166,8 µg 100 % (1) 112,5 % (2)	429,4 µg 100 % (1) 447 % (2)	231,3 µg 100 % (1) 194,7 % (2)	78,5 µg 100 % (1)
Auslagerungszeitraum	305 Tage			80 Tage

***Tabelle 7:** Vancomycinabgabe der Titanoberflächen nach 8, 18 bzw. 30 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis. Eingetragen sind zudem die prozentuale Abgabe hinsichtlich der Gesamtmenge (1) und die prozentuale Steigerung im Vergleich zu der Referenz (2).*

Zur Herstellung der Probenoberflächen dieses Ansatzes wurde der Elektrolyt mehrfach verwendet. Daher zeigten sich bei den resultierenden Oberflächenstrukturen sehr große Unterschiede. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der Gesamtmenge des eingelagerten Vancomycins (Abb. 26 und Tab. 7) und der Freisetzungskinetik (Abb. 27 und Tab. 7) wider. Verglichen mit der Referenz konnten in alle Oberflächen, die in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis anodisiert worden waren, erheblich größere Vancomycinmengen eingelagert werden. So war bei der 18 Stunden Probe eine Steigerung der Gesamtvancomycinmenge um bis zu 447 % möglich. Ob eine Wirkstoffbeladung bis an den Boden der Nanotubes erfolgt ist, konnte mit den zur Verfügung stehenden Messmethoden nicht geklärt werden. Sicher ist, dass das angelegte Vakuum eine Wirkstoffbeladung bis tief in die Nanotubestrukturen unterstützt hat.

Bei einer Betrachtung der prozentualen Wirkstoffabgabe der Proben dieses Ansatzes zu den therapeutisch interessanten Zeitpunkten nach 6 Stunden bzw. 14 Tagen wird bei allen Proben eine im Vergleich mit der Referenz starke Retardierung der Wirkstoffabgabe deutlich.

4.6.3 Vergleich der Oberflächen

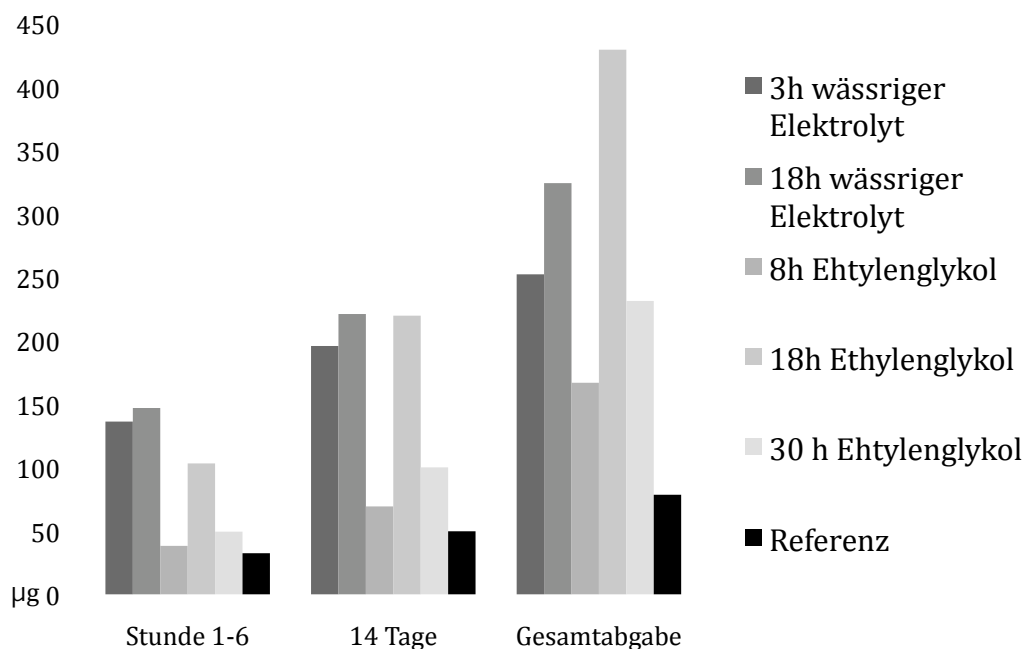


Abbildung 28: Vergleich aller Probenoberflächen. Vancomycinabgabe nach 6 Stunden und nach 14 Tagen, sowie Abgabemenge nach vollständiger Auslagerung.

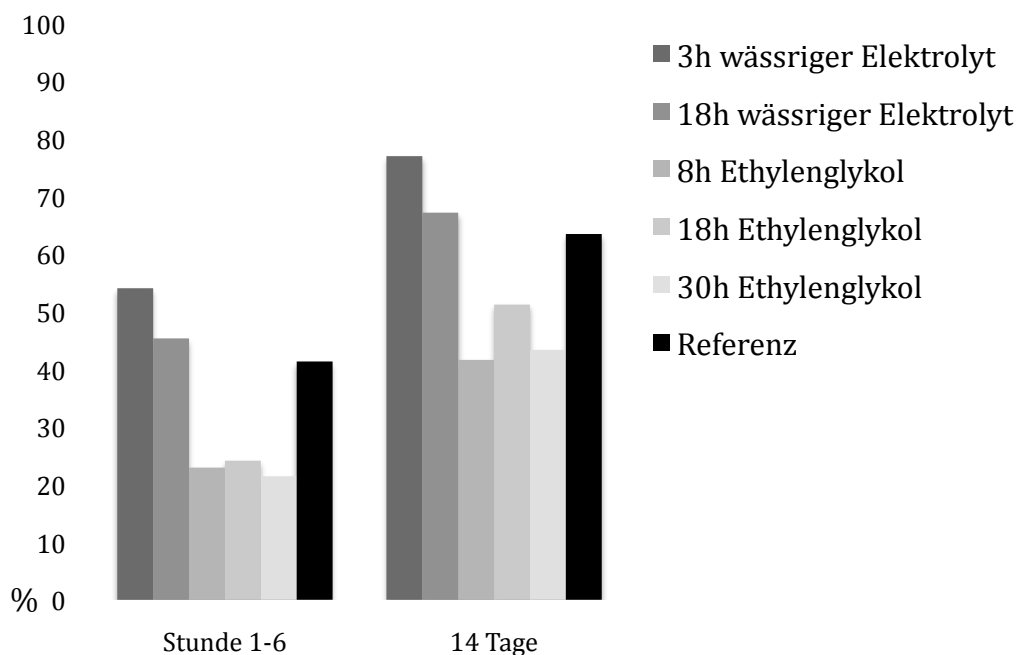


Abbildung 29: Vergleich aller Probenoberflächen. Vancomycinabgabe prozentual nach 6 Stunden und nach 14 Tagen im Vergleich zu der Referenz.

Bei einem prozentualen Vergleich der 18 Stunden Proben hinsichtlich der Vancomycinabgabe zu den therapeutisch interessanten Zeitpunkten nach 6 Stunden bzw. 14 Tagen (Abb. 29) wird eine starke Retardierung der Wirkstoffabgabe bei den Ethylenglycolproben im Vergleich zu den Proben aus wässrigen Elektrolyten deutlich. Verglichen mit der Referenz und den Proben, die in einem wässrigen Elektrolyten anodisiert worden waren, kam es bei den Ethylenglycolproben nach dem 14. Tag bis zum Ende der Messzeit zudem zu der Auslagerung einer weiteren großen Menge Vancomycin aus den Nanotubestrukturen (Abb. 28). Auch bei dem Vergleich der übrigen Proben (Abb. 29) ist eine retardierte Wirkstofffreisetzung der Ethylenglycolproben im Vergleich zu den Proben aus dem wässrigen Elektrolyten und der Referenz erkennbar. Der Grund für die Verlangsamung der Freisetzungskinetik könnte in der geringeren Nanotubeanzahl bei den Proben aus einem Ethylenglycolelektrolyten und den damit verbundenen größeren Tubedurchmessern liegen. Hierdurch erfolgte wahrscheinlich eine tiefere Wirkstoffeinlagerung in die Tubeformationen und damit eine deutliche Verlängerung der Diffusionsstrecke. Die relativ große Gesamtmenge adsorbierten Vancomycins der Oberflächen, die in einem wässrigen Elektrolyten anodisiert worden waren (Abb. 28), lässt sich wahrscheinlich mit der hohen Nanotubeanzahl erklären. Sie führt zu einer erheblichen Vergrößerung der Gesamtoberfläche und ermöglicht eine hohe Adsorptionsmenge trotz geringerer Schichtdicke der Nanotubeformationen.

4.7 Ergebnisse der Silberauslagerung

Verglichen werden in diesem Kapitel Proben mit 3 und 18 Stunden Anodisierungszeit in einem Elektrolyten auf Wasserbasis (Kapitel 3.2.1) auf ihre fraktionierte Abgabe von adsorbiertem Silber (aus Silbernitrat). Als Referenz dienen wirkstoffbeladene Titanproben, die keinen Anodisierungszyklus durchlaufen haben. Die versuchsrelevante Probenoberfläche beträgt $0,64 \text{ cm}^2$ (Öffnung des Teflonzylinders).

4. Ergebnisse

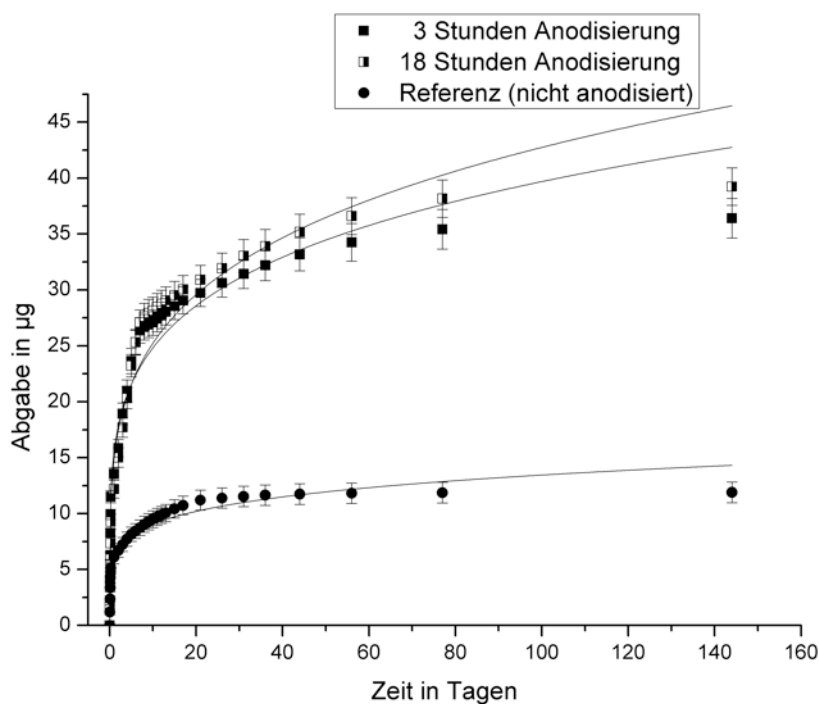


Abbildung 30: Silberauslagerung der Titanproben nach 3 bzw. 18 Stunden Anodisierung im Vergleich zu der Referenz. Graphen gefittet nach Peppas:

3 Stunden Probe: $n = 0,2$; $k = 15,52$; $R^2 = 93,79\%$

18 Stunden Probe: $n = 0,23$; $k = 14,91$; $R^2 = 93,77\%$

Referenz: $n = 0,17$; $k = 6,1$; $R^2 = 93,94\%$

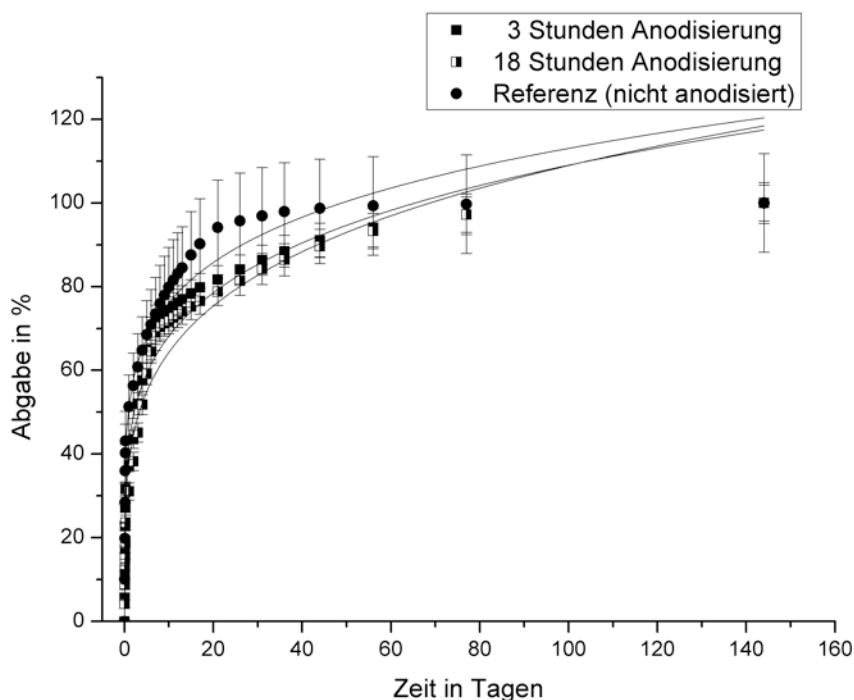


Abbildung 31: Silberauslagerung der Titanproben nach 3 bzw. 18 Stunden Anodisierung prozentual im Vergleich zu der Referenz. Graphen gefittet nach Peppas:

3 Stunden Probe: $n = 0,2$; $k = 42,64$; $R^2 = 93,79\%$

18 Stunden Probe: $n = 0,23$; $k = 37,98$; $R^2 = 93,77\%$

Referenz: $n = 0,01$; $k = 51,3$; $R^2 = 93,94\%$

4. Ergebnisse

	3 h Anodisierung wässriger Elektrolyt	18 h Anodisierung wässriger Elektrolyt	Referenz
Abgabe Stunde 1-6 (initialer burst)	11,51 µg 31,62 % (1) 125,5 % (2)	9,27 µg 23,63 % (1) 82,4 % (2)	5,13 µg 43,13 % (1)
Abgabe bis Tag 14	28,04 µg 77,02 % (1) 177,2 % (2)	29,07 µg 74,09 % (1) 188,1 % (2)	10,05 µg 84,49 % (1)
Gesamte Wirkstoffmenge	36,4 µg 100 % (1) 205,9 % (2)	39,24 µg 100 % (1) 229,4 % (2)	11,9 µg 100 % (1)
Auslagerungszeitraum	144 Tage		44 Tage

***Tabelle 8:** Silberabgabe der Titanoberflächen nach 3 bzw. 18 Stunden Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis. Eingetragen sind zudem die prozentuale Abgabe hinsichtlich der Gesamtabgabe (1) und die prozentuale Steigerung im Vergleich zu der Referenz (2).*

Aus der Abbildung 30 und der Tabelle 8 geht hervor, dass in die modifizierten Titanoxidoberflächen offensichtlich eine erheblich größere Menge Silber eingelagert werden konnte als in die Referenzoberfläche. Der Grund ist auch bei dieser Versuchsreihe in der Oberflächenstruktur und der durch die große Anzahl zylindrischer Poren erheblich vergrößerten Gesamtoberfläche zu sehen. Bei einer Betrachtung der prozentualen Abgabe des adsorbierten Silbers an den therapeutisch interessanten Zeitpunkten nach 6 Stunden bzw. 14 Tagen (Abb. 31, Tab. 8) wird deutlich, dass die Freisetzung dieses Wirkstoffes verglichen mit der Referenz retardiert erfolgt. Das könnte möglicherweise auf eine, verglichen mit der Vancomycinversuchsreihe, tiefere Einlagerung der Silberionen in die Nanotubebildungen zurückzuführen sein. Eine weitere mögliche Ursache könnte auch in der anodischen Oxidation der Titanoberflächen liegen. Durch während der Anodisierung in der Gitterstruktur der Titanoxide auftretenden Fehler entstehen Ladungsphänomene, die für eine zusätzliche Retention des eingelagerten Silbers verantwortlich sein können [7].

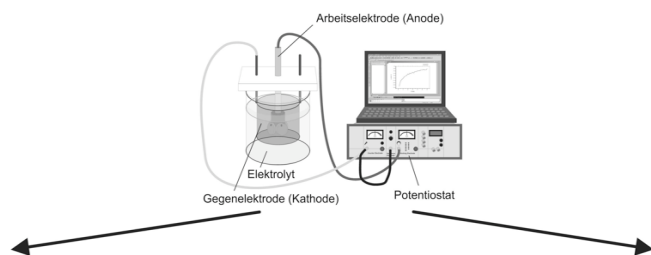
5. Diskussion

Titanimplantate kommen heute in zunehmender Zahl als funktioneller Ersatz degenerierter Gelenke und künstliche Zahnwurzeln zum Einsatz. Nach offiziellen Schätzungen wurden in Deutschland im Jahr 2008 circa 180 000 Hüft-, 125 000 Knieprothesen, sowie 700 000 Zahnimplantate eingesetzt und funktionell belastet [1, 130]. Ein entscheidendes Problem dieser chirurgischen Interventionen sind periimplantäre Infektionen, deren Häufigkeit mit 1,2 % [131] bis 4,3 % [132], bei Revisionsoperationen sogar mit bis zu 17 % [133] angegeben werden. Die Infektionsrate kardiovaskulärer Implantate liegt bei bis zu 7,4 % [132]. Es wird davon ausgegangen, dass in erster Linie der operative Eingriff zu einer Kontamination der Implantatoberfläche führt [134]. Eine hämatogene oder lymphogene Besiedelung des Implantates im Rahmen transitorischer Bakteriämien, die von Infektionsherden alio loco ausgehen, ist vergleichsweise seltener, aber ebenfalls möglich [134, 135, 136]. Standardisiert wird versucht, diesem Problem postoperativ mit hochdosierten, systemischen Antibiosen zu begegnen [137]. Anders als bei nicht mit Fremdkörperoberflächen assoziierten Infektionen gehen die Bakterien in Anwesenheit einer Implantatoberfläche allerdings von der planktonischen in eine sessile Lebensform über. Nach der initialen Adhäsion an der entsprechenden Oberfläche beginnen sie mit der Produktion neuer, extrazellulärer Matrixbestandteile, ein komplex strukturierter Biofilm entsteht. Ab diesem Stadium wird der körpereigene Wirkmechanismus der Bakterienabwehr, die Phagozytose, wirkungslos und auch die Widerstandsfähigkeit der Bakterien im Biofilm gegen Antibiotika steigt um ein Vielfaches [138, 139]. Zudem ist die Funktion der Leukozyten in direkter Fremdkörperumgebung gestört [140, 141]. Das ist die Erklärungsgrundlage dafür, dass schon eine sehr geringe Anzahl an Bakterien in der Lage ist, diese Art der Infektion auszulösen und zu unterhalten [142]. Phasenweise kommt es dann zu einer bakteriellen Ausschwemmung aus dem Biofilm, die zu einer Besiedelung weiterer Areale führen kann, häufig begleitet durch akute klinische Symptome [130]. Dieser Wettlauf zwischen Gewebeanlagerung und bakterieller Besiedelung wird als „race for the surface“

bezeichnet [143]. Je nach Abwehrlage des Wirtsorganismus führt das zu einem sofortigen oder zu einem bis um Jahre verzögerten Implantatverlust. Eine vollständige Keimeradikation ist dann in der Regel nicht mehr durch antibiotische Therapie, sondern nur noch durch den kompletten Austausch der infizierten Implantatbestandteile möglich [135, 143, 144]. Diese Tatsachen erfordern heute neue antimikrobielle Strategien, die präventiv vor einer Infektion der Implantatoberfläche schützen. Es gilt dabei auch, der rasanten Resistenzentwicklung durch unbedachten systemischen Antibiotikaeinsatz entgegenzuwirken. Ein möglicher Weg wird in der lokalen Wirkstofffreisetzung aus Oberflächenmodifikationen gesehen. Sie ermöglicht vor Ort hohe Wirkstoffdosen ohne das erhöhte Risiko systemischer Nebenwirkungen und, bei entsprechender Freisetzungsmenge und -kinetik, mit einem verminderten Risiko der Resistenzentstehung [145].

Medizinische Titanoberflächen wurden in dieser Arbeit durch Anodisierung in fluoridhaltigen Elektrolyten modifiziert. In die dadurch entstandenen nanotubeförmigen Strukturen wurden die antimikrobiell wirksamen Modellsubstanzen Vancomycin und Silber unter Vakuum eingelagert. Ziel war es, ein oberflächennahes Wirkstoffdepot mit kontrollierter Freisetzungskinetik zu schaffen, das es ermöglicht, die initiale Bakterienadhäsion und damit die Infektion der Implantatoberfläche wirksam zu verhindern.

5.1 Herstellung der Nanotubeoberflächen



Ansatz 1:

Elektrolyt auf Wasserbasis

Zusammensetzung:

1 M H₂SO₄
0,15 Gew. % HF

Wärmenachbehandlung:

Temperaturanstieg von 30 °CMin⁻¹
3 Stunden bei 550 °C

Ansatz 2:

Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis

Zusammensetzung:

98 Vol. % Ethylenglycol
2 Vol. % H₂O
0,25 Gew. % NH₄HF₂

Wärmenachbehandlung:

Temperaturanstieg von 1 °CMin⁻¹
4 Stunden bei 580 °C

Abbildung 32: Übersicht über die verwendeten Elektrolytzusammensetzungen sowie die Zeiten der Wärmenachbehandlung

In der vorliegenden Arbeit wurden Titanoxidnanotubeoberflächen in zwei sehr unterschiedlichen Elektrolyten durch Anodisierung erzeugt (Abb. 32). Dieses Verfahren ist kostengünstig und ermöglicht eine relativ einfache Steuerung der Oberflächenmorphologie, wie zum Beispiel dem Tubedurchmesser, der Tubelänge, der Wanddicke und dem Abstand zwischen den einzelnen Nanotubes. Die entstehende Oxidschicht weist eine starke Haftung an der Substratoberfläche auf, die durch die Wärmenachbehandlung noch gesteigert werden kann. Dadurch eignet sie sich auch als Kontaktzone für eine spätere funktionelle Knochenanlagerung. Ihre Röhrenstrukturen sind die ideale Grundlage für eine tiefe Wirkstoffeinlagerung mit gerichtetem Wirkstofftransport bei der Desorption, wobei die Tiefe der Wirkstoffeinlagerung wahrscheinlich von dem Durchmesser der einzelnen Nanotubes abhängt. Die Dicke der Schicht, entsprechend dem maximalen Diffusionsweg, aber auch die Anzahl der Nanotubes pro Zentimeter und der Nanotubedurchmesser, nehmen dabei Einfluß auf die Freisetzungskinetik der Wirkstoffe. Weitere Faktoren sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Oxidschicht, wie zum Beispiel der

isoelektrische Punkt und der pH-Wert, die nach der Anodisierung in verschiedenen Elektrolyten variieren [146]. Ein Maß für die mögliche Gesamtbeladungsmenge scheint die Zahl der Nanotubes pro Quadratzentimeter zu sein, die neben der Tubellänge entscheidenden Einfluß auf den Faktor der Oberflächenvergrößerung hat.

Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis (Ansatz 1)

Bei der Verwendung eines Elektrolyten auf Wasserbasis konnte während des Spannungsanstieges meistens ein sprunghafter Anstieg des Anodisierungsstromes beobachtet werden. Dieser Anstieg resultiert wahrscheinlich aus dem Spannungsdurchbruch durch die natürliche Passivierungsschicht, die bei diesem Ansatz nicht durch vorheriges Beizen entfernt worden war. Die Morphologie der resultierenden Nanotubebeschichtung war geprägt von röhrenförmigen Poren in einer kompakten Oberfläche. Aus Anodisierungszeiten von 3 bzw. 18 Stunden resultierten Dicken der Oxidschicht von 0,87 bzw. 1,45 μm . Eine um 500 % längere Anodisierungszeit führte in der Versuchsreihe also zu einer Steigerung der Nanotubelänge um 66,7 %. Dabei nahm der Nanotubedurchmesser um 42,9 % von 70 auf 100 nm zu. Eine lineare Korrelation ist bei beiden Werten nicht erkennbar. Das Tiefenwachstum der Nanotubes scheint bei diesem Ansatz auch bei einer deutlichen Verlängerung der Anodisierungszeit begrenzt. Diese Erkenntnis deckt sich mit Veröffentlichungen verschiedener Forschungsgruppen, aus denen hervorgeht, dass auch sie die Dicke der resultierenden nanotubeförmigen Oxidschicht bei dieser Art Elektrolyt mit einigen hundert Nanometern als begrenzt ansehen [48, 58, 129].

Anodisierung in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis (Ansatz 2)

Im Gegensatz zu dem Ansatz auf Wasserbasis wurde der Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis, wie durch Prakasam et al. [101] beschrieben, mehrfach verwendet. Erkennbar waren hierbei eine deutliche Verbesserung der Schichtqualität bei der zweiten, sowie eine Verschlechterung der Schichtqualität bei der dritten Anodisierung. Während der erste Anodisierungsdurchgang mit

8 Stunden Dauer lediglich zu porenförmigen Strukturen in einer kompakten Oberfläche führte, konnten im zweiten Durchgang mit 18 Stunden Dauer freistehende Röhrenstrukturen mit gleichmäßiger Verteilung erzeugt werden. Eine um 125 % verlängerte Anodisierungszeit führte hierbei zu einer um 184 % gesteigerten Nanotubelänge ($2,3 \mu\text{m} \Rightarrow 6,54 \mu\text{m}$), sowie zu deutlich einheitlicheren Tubedurchmessern. Bei der dritten Anodisierung kam es trotz Steigerung der Anodisierungszeit um weitere 67 % zu einem Rückgang der Nanotubelänge um 50 %. So konnte bei dem dritten Anodisierungsdurchgang nur eine Schichtdicke von $3,27 \mu\text{m}$ erreicht werden. Es resultierten teilweise freistehende Nanotubestrukturen mit deutlich ungleichmäßigerer Verteilung. Die Verbesserung der Schichtqualität von der ersten zu der zweiten Anodisierung ist wahrscheinlich auf gelöstes Titan im Elektrolyten zurückzuführen, das den initialen Bildungsprozess der Nanotubestrukturen unterstützt. Mit jeder Anodisierung werden allerdings auch Fluoridionen und Wasseranteile aus dem Elektrolyten entfernt, was vermutlich der Grund für die Verschlechterung der Schichtqualität von dem zweiten zu dem dritten Durchgang ist. Bei der vierten Anodisierung mit dem gleichen Elektrolyten konnten keine Nanotubestrukturen mehr generiert werden. Die nötigen Fluorid- und Wasseranteile scheinen unter das erforderliche Maß gesunken zu sein. Der Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis weist also abhängig von seinem Volumen und der Probenoberfläche eine eindeutige Leistungsgrenze auf.

5.2 Adsorption und Desorption von Vancomycin

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde Vancomycin unter Vakuum in die Probenoberflächen aus dem Elektrolyten auf Wasserbasis (Ansatz 1) und dem Ethylenglycolelektrolyten (Ansatz 2) eingelagert und dessen Auslagerung in PBS bei 37°C zeitbezogen gemessen.

Grundsätzlich lassen sich drei Arten von Oberflächenmodifikationen unterscheiden, die zu einer Abgabe von antibakteriellen Wirkstoffen geeignet sind. Biokompatible Polymere, wie zum Beispiel manche Polyurethane,

Silikone, Polyhydroxyalkanoide und Polymethylmethacrylate (PMMA) werden durch den Körper nicht abgebaut [147]. Sie eignen sich für den Einsatz auf Medizinprodukten, die nicht für den funktionellen Ersatz von Hartgewebe gedacht sind. Mögliche Einsatzgebiete sind Katheter und andere temporäre Medizinprodukte [148, 149]. Schierholz et al. [150] fanden heraus, dass die Freisetzungskinetik hierbei von der Hydrophilie der Stoffe abhängt, die bei ähnlichen Eigenschaften zu einer relativ gleichmäßigen Abgabe, bei entgegengesetzten Eigenschaften zu einem initialen „Freisetzungsburst“ führen. Daneben nimmt aber auch die Porosität der Trägerstruktur einen entscheidenden Einfluß. Zu der zweiten Gruppe gehören neben biodegradierbaren Polymeren, wie zum Beispiel Beschichtungen auf der Basis von Polylactiden, auch degradierbare CaP-Schichten aus Brushit [151]. Diese Oberflächenbeschichtungen haben in der Orthopädie schon seit Jahren auf Implantaten für den künstlichen Gelenkersatz an Bedeutung gewonnen. Sie setzen bei ihrer Degradation eingelagerte antimikrobielle Wirkstoffe in großen Mengen frei. Dadurch werden lokal hohe Wirkstoffkonzentrationen ermöglicht, ohne die bekannten Risiken der systemischen Toxizität. Diese kombinierten Oberflächen basieren auf dem Prinzip lokal kontrollierter Wirkstofffreisetzung von einer implantierten Titanprothese, deren primäres Ziel der strukturelle und funktionelle Ersatz von Eigengewebe darstellt. Idealerweise sind beide Abläufe koordiniert und arbeiten Hand in Hand. Beschichtungen auf der Basis von Hydroxylapatiten wirken osteokonduktiv und unterstützen dadurch die Anlagerung des vitalen Knochens. Allerdings sind auch einige Oberflächenmodifikationen dieser Gruppe mit biologischen Mängeln behaftet. So beeinflussen zum Beispiel manche Abbauprodukte der Trägerschichten das umliegende Gewebe nachteilig und auch der Titan-Gewebe-Kontakt, entscheidend für die primäre und die Langzeitstabilität eines Implantates, ist nicht direkt nach der Implantation gegeben, sondern wird erst nach Abbau der aufgetragenen Trägerschicht erreicht. Dieser Tatsache muss Rechenschaft getragen werden, wenn eine möglichst lange Wirkstofffreisetzung angestrebt wird. Durch die Dicke der Schicht und die Konzentration der eingelagerten Wirkstoffe lässt sich allerdings sehr genau Einfluß auf die Freisetzungskinetik

und die insgesamt freigesetzte Wirkstoffmenge nehmen. Nach der initialen Freisetzungsphase, die bei diesen Oberflächen meist einen burstförmigen Verlauf aufweist, ist dadurch auch über längere Zeit hinweg ein ausreichend hoher Wirkspiegel um das Implantat realisierbar [152, 153, 154]. Die dritte Möglichkeit besteht darin, den gewünschten Wirkstoff direkt in die Titanoberfläche einzulagern. So können Implantatoberflächen, zum Beispiel durch Tauchbeschichtung, unmittelbar vor Implantation mit einem Wirkstoff versehen werden. Hierfür wird das Implantat einige Sekunden in eine Wirkstofflösung gelegt. Dies führt unmittelbar nach der Implantation zu einem ausreichenden Wirkspiegel um das Implantat, der allerdings innerhalb weniger Stunden abnimmt und die minimale Hemmkonzentration (MIC) unterschreitet [155]. Der Vorteil dieser Methode liegt in dem unmittelbaren Kontakt des durchbluteten Knochens und der Implantatoberfläche, der den Übergang von der primären zu der sekundären Stabilität begünstigt. In einer einzigen prospektiv randomisierten klinischen Studie konnte mit diesem Verfahren trotz der geringen Wirkdauer eine um 4,1 % reduzierte Rate der Endokarditisfälle nach prothetischem Herzklappenersatz nachgewiesen werden [137, 156].

Die Anforderung hinsichtlich der Freisetzungskinetik antimikrobieller Substanzen an alle diese Oberflächen ist gleich. Eingelagerte Wirkstoffe sollen zu Beginn in einem initialen „burst“ freigesetzt werden, um dem erheblichen Infektionsrisiko direkt nach dem chirurgischen Eingriff, beziehungsweise nach der Implantation, entgegenzuwirken [157]. In den ersten zwei Stunden nach erfolgtem Eingriff beginnen Bakterien über physikalische und chemische Wechselwirkungen unspezifisch an der Implantatoberfläche zu binden. Die darauf folgenden zwei bis drei Stunden sind gekennzeichnet durch festere Adhäsion der Bakterien an der Implantatoberfläche, vermittelt durch spezifische chemische Reaktionen, die irreversible molekulare Brücken schaffen [158]. Schon nach 24 Stunden sind einige Bakterienarten in der Lage, extrazelluläre Matrixproteine und Polysaccharide zu synthetisieren. Diese Strukturbestandteile stellen die Grundlage für einen Biofilm dar, der die Bakterien gegen die körpereigene Immunabwehr schützt und die wirksame

Antibiotikakonzentration bis auf das 1000-fache ihrer ursprünglich wirksamen Konzentration heraufsetzt [159, 160]. Daher wurde der Zeitraum unmittelbar bis sechs Stunden nach der Implantation als entscheidende Phase identifiziert, die für den Langzeiterfolg der Implantation entscheidend zu sein scheint [161]. In dem Zeitraum bis zur vollständigen Gewebeanlagerung sollen die Wirkstoffe deutlich oberhalb der nötigen minimalen Hemmkonzentration (MIC) der pathogenen Keimflora freigesetzt werden, um auch späterer Keimadhäsion an der Implantatoberfläche entgegenzuwirken [157, 162, 163]. Eine langer Abgabezeitraum unterhalb der MIC soll vermieden werden, da dieser Abgabemodus Resistenzentstehungen fördert [141, 152, 164].

Die gram-positiven Keime *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* sind die häufigsten Pathogene, die zu einem Implantatverlust führen. So waren sie für bis zu 60 % aller Infektionen implantierter Hüftgelenke seit dem Jahr 1980 verantwortlich [165]. Sie sollen bei der nachfolgenden Diskussion der Auslagerungsdaten exemplarisch betrachtet werden. Die bekannten Stämme des nicht multiresistenten *Staphylococcus aureus* sind bei minimaler Hemmkonzentration (MIC) von $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [166] – $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [167] gegen Vancomycin empfindlich, die MIC der nicht multiresistenten Stämme des Bakteriums *Staphylococcus epidermidis* bewegen sich in einer vergleichbaren Größenordnung [168]. Eine Steigerung der Vancomycinmenge auf ein Vielfaches der MIC erhöht die bakterizide Wirkung kaum. Allerdings ist ein sogenannter „postantibiotischer sub-MIC Effekt“ (PA SME) nachgewiesen. Lag die ursprüngliche Vancomycindosis oberhalb der MIC, so kann ein daran angeschlossenes Intervall mit Werten unterhalb der MIC ebenfalls eine ausreichend bakterizide Wirkung erzielen [169]. Nach der Ausbildung eines manifesten Biofilmes allerdings sind beide Keimarten beinahe vollständig unempfindlich gegenüber Vancomycin [170, 171].

Die Vancomycinauslagerung der in dieser Arbeit verwendeten Nanotubeoberflächen lässt sich in drei Phasen unterteilen. Die erste Phase ist gekennzeichnet durch einen initialen „burst“ der freigesetzten Vancomycin-

menge. Sie ist wahrscheinlich abhängig von der Oberflächenrauigkeit und dominiert die Auslagerung in den ersten 6 Stunden. In diesem Zeitraum wurden von den Probenoberflächen des Ansatzes 1 zwischen 45,30 % und 53,97 %, von den Probenoberflächen des Ansatzes 2 zwischen 21,36 % und 24,04 %, des adsorbierten Vancomycins freigesetzt. An sie schließt sich eine Übergangsphase an, in der die abnehmende Oberflächenabgabe durch eine Auslagerung aus den Nanotubes überlagert wird. Auch in dieser Phase werden noch deutlich messbare Mengen Vancomycin freigesetzt. In der dritten Phase ist die Auslagerung von der äußeren Titanoberfläche beinahe abgeschlossen, das nun freigesetzte Vancomycin stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit fast vollständig aus den Nanotubes. Allerdings wurde die Freisetzungskinetik durch die Anodisierung der Probenoberflächen sehr unterschiedlich beeinflusst. Die Vancomycinauslagerung nahm bei den Proben des Ansatzes 1 (Elektrolyt auf Wasserbasis) über einen Zeitraum von 145 Tagen, bei den Proben des Ansatzes 2 (Elektrolyt auf Ethylenglycolbasis) über einen Zeitraum von 305 Tagen ab. Alle Probenoberflächen beider Ansätze erfüllen durch den Verlauf der Vancomycinauslagerung grundsätzlich die Charakteristika der erforderlichen Freisetzungskinetik. Nach dem Korsmeyer-Peppas-Modell handelte es sich um einen rein diffusion-gesteuerten Abgabemodus.

In Studien von Popat et al. [83] und Dunn et al. [146] wurde Gentamycin durch einfache Adsorption in Titanoxidoberflächen eingelagert, die zuvor durch Anodisierung modifiziert worden waren. Wie bei Vancomycin handelt es sich auch bei Gentamycin um ein Aminoglykosid, daher sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften vergleichbar. Die Auslagerungszeiträume dieser Studien waren, verglichen mit den gemessenen Daten dieser Arbeit, erheblich kürzer. Sie lagen bei 2,5 Stunden beziehungsweise 18 Tagen. Der entscheidende Unterschied scheint in dem bei der Wirkstoffadsorption verwendeten Vakuum zu liegen. Dadurch war es möglich, das Vancomycin bis tief in die Nanotubeformationen einzulagern und im Vergleich sowohl den Auslagerungszeitraum, als auch die eingelagerte Wirkstoffmenge deutlich zu steigern.

5. Diskussion

Abgabe Vancomycin	Ansatz 1		Ansatz 2		
	3 h Probe	18 h Probe	8 h Probe	18 h Probe	30 h Probe
1. Std.	183,92	202,84	49,66	139,08	61,80
2. Std.	12,84	8,57	2,63	12,91	4,31
3. Std.	6,34	6,82	3,16	2,97	2,34
4. Std.	3,65	5,55	1,39	1,75	5,55
5. Std.	3,63	3,66	1,59	1,98	1,68
6. Std.	3,65	3,41	1,59	3,57	2,00
Summe 1. - 6. Std.	214,04	230,85	60,10	162,25	77,67
6. - 24. Std.	27,12	24,85	5,61	17,70	12,94
24. - 48. Std.	12,31	14,65	4,61	22,43	10,64
48. - 72. Std.	8,28	10,00	3,55	21,10	7,58

Tabelle 9: Vancomycinabgabe der Probenoberflächen in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

Die in der ersten Phase der Auslagerung abgegebenen Vancomycinmengen (Tab. 9) überschreiten die minimale Hemmkonzentration (MIC) der Keime *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* um etwa den Faktor 15 bis Faktor 50. Die Abgabemengen sind also für eine direkte und vollständige Keimeradikation in unmittelbarer Implantatumgebung als ausreichend einzuschätzen. In dem Zeitraum 6. bis 24. Stunde wurden von den Probenoberflächen beider Ansätze stündlich zwischen $0,31 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ und $1,51 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ Vancomycin abgegeben. Bereits diese Werte bewegen sich an der Untergrenze der therapeutisch geforderten Konzentrationen. Allerdings ist durch die initial „burstförmige“ Vancomycinabgabe ein Wirkspiegel im direkten Implantatumfeld erreicht, der auch durch niedrigere Abgabewerte über eine längere Zeit oberhalb der nötigen MIC gehalten werden kann. Ein Faktor, der die Vorhersagbarkeit für den in vivo Einsatz erheblich einschränkt, ist die Knochendurchblutung. Ihr Wert liegt in etwa bei $7,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro 100 g Kompakta und $21,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ pro 100 g Spongiosa, bestimmt bei 20 Wochen alten Schweinen. Sie ist zudem abhängig von der Knochenlokalisation und der Knochenzusammensetzung, so dass die gemessenen Werte ortsabhängig variieren [172]. Es ist davon auszugehen, dass sich nach einer initialen Minderdurchblutung am Implantat-Gewebe-Übergang, bedingt durch das chirurgische Trauma und die Hämostase [145], eine Zone der sterilen Entzündung um das Implantat bildet, die erheblich besser durchblutet wird, als der normale Knochen. In diesem Bereich findet der, für die endgültige Stabilität

des Implantates so wichtige, Umbau des Knochens und die Anlagerung der Knochenstruktur an die Implantatoberfläche statt. Der Abtransport des gelösten Vancomycins wird dadurch in den ersten Stunden bis wenigen Tagen gehemmt, danach allerdings gefördert und seine Konzentration im umliegenden Gewebe herabgesetzt. Bei dieser Betrachtung müssen aber auch die mögliche Prothesenoberfläche, Prothesengeometrie und das umliegende Verteilungsvolumen bedacht werden, so dass eine auf den ersten Blick als insuffizient scheinende Abgabemenge in vivo zu einem ausreichenden Wirkspiegel führen kann. Hinsichtlich der zu Beginn der Auslagerung hohen Vancomycinabgabe, des „postantibiotischen sub-MIC Effektes“ und der initial herabgesetzten Durchblutung im direkten Implantatumfeld kann auch die Vancomycinabgabe bis Tage nach dem Auslagerungsbeginn als therapeutisch sinnvoll bezeichnet werden. Allerdings bewegen sich die Werte schon nach einigen Tagen deutlich in der Größenordnung subtherapeutischer Konzentrationen. Zwar konnte im Vergleich zu einem reinen Tauchverfahren Abgabezeitraum und Abgabemenge erheblich gesteigert werden, allerdings resultierten dadurch im Anschluss an die initiale Phase wochenlange Abgabewerte unterhalb der nötigen minimalen Hemmkonzentration, die für eine effektive Keimreduktion als unzureichend zu bewerten sind. Abgabemengen dieser Größenordnung neigen dazu, Resistenzentwicklungen zu fördern. Der medizinische Nutzen dieser Oberflächen als Träger für eine kontrollierte Vancomycinfreisetzung zur effektiven und insbesondere langfristigen Infektionskontrolle ist daher, trotz des aufgezeigten großen Potentials, mit den für diese Versuchsreihen gewählten Parametern nicht eindeutig zu belegen.

5.3 Adsorption und Desorption von Silber

Für den dritten Teil dieser Arbeit wurden Probenoberflächen nach Anodisierung in einem Elektrolyten auf Wasserbasis (Ansatz 1) ebenfalls unter Vakuum mit einer 10 %-igen Silbernitratlösung imprägniert und die Abgabemenge des Silbers bei 37°C in PBS zeitbezogen gemessen.

Silbernitrat wurde im Jahr 1884 erstmalig zur Prävention vor Ophthalmia neonatorum eingeführt. Nach der Entdeckung des Penicillins gewannen Silbernitratlösungen erst in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts bei der Behandlung von Brandwunden wieder an Bedeutung [173, 174]. Das Besondere an Silberionen ist ihre konzentrationsabhängige Wirksamkeit gegen ein äußerst breites Keimspektrum. Dabei interferieren Silberionen mit dem transmembranalen Energietransfer und dem Elektronentransport des bakteriellen Mikroorganismus [175]. Sie blockieren die Atmungskette durch eine Anlagerung an Cytochrome und verursachen so den Ausfluss wichtiger Ionen und Protonen, der schließlich den Zelltod zur Folge hat [176, 177]. Ein weiterer Effekt ist die Bindung der Silberionen an die DNA-Doppelhelix, deren dreidimensionale Struktur verstärkt und eine für die Replikation vorausgesetzte Teilung der DNA-Doppelstränge unmöglich gemacht wird [114, 123]. Während hohe Silberkonzentrationen diese intrazelluläre Wirkung induzieren, nehmen auch geringe Konzentrationen der Silberionen Einfluss auf das Murein der Bakterienzellwand. Daraus erklärt sich die zum Teil unterschiedliche Sensitivität gram-positiver und gram-negativer Keime [178]. Heute sind nur wenige Bakterienarten bekannt, die auf Grund plasmidabhängiger Resistenzmechanismen gegen Silberionen unempfindlich sind. Daneben besteht auch bei niedrigen Abgabemengen nicht die Gefahr von Resistenzentstehungen [115, 179]. Silber wird heute als Wirkstoff antibakterieller Oberflächenbeschichtungen herangezogen. Dazu werden sowohl metallisches Silber als auch Silberionen in Biomaterialien zum Beispiel auf Basis von Polyurethanen [180], bioaktiven Gläsern [181] und Hydroxylapatiten [182] eingelagert. Aber auch zentrale Venenkatheter und Herzklappen mit Beschichtungen aus silberimprägnierten Polymeren finden heute zur Infektionsprophylaxe erfolgreich Anwendung [11, 119]. Derzeit ist allerdings keine Implantatoberfläche aus Titan verfügbar, die Silber als antimikrobiellen Wirkstoff freisetzt [117].

An die Freisetzungskinetik des Silbers aus Oberflächenbeschichtungen werden die gleichen Anforderungen gestellt, wie an das Reserveantibiotikum

Vancomycin. So ist auch bei diesem Wirkstoff ein initialer „Freisetzungsburst“ zur Keimeradikation wünschenswert. Daran sollte sich ein möglichst langer Auslagerungszeitraum mit hohen Silbermengen anschließen, um bei „the race for the surface“ eine mögliche Keimbesiedelung der Implantatoberfläche zu verhindern. In der aktuellen Literatur finden sich sehr unterschiedliche Angaben zu den erforderlichen Wirkkonzentrationen. Für eine bakterienabweisende Oberfläche wird eine langfristige Silberabgabe über $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gefordert [183]. Wirksam sind dabei nur freie Silberionen [184]. Da diese aber mit Chlorid- und Sulfidionen unlösliche Salze bilden, wird ihre antibakterielle Wirksamkeit in den Gewebe- und Zellflüssigkeiten herabgesetzt. So entspricht die bei der Freisetzung gemessene Silbermenge nicht der tatsächlich antibakteriell in Wirkung tretenden Menge Silberionen [117]. Unterschieden wird auf Grund der konzentrationsabhängigen Wirkungsweise auch zwischen minimaler Hemmkonzentration (MIC) und minimaler bakterizider Konzentration (MBC). Bei *Staphylococcus aureus* liegen die Werte für die MIC im Bereich $0,03 - 0,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ und für die MBC im Bereich $0,26 - 8,25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [113]. Bei *Staphylococcus epidermidis* liegt der Wert für einen antimikrobiellen Effekt (MIC+MBC) bei $0,5 - 2,3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ [117]. Eine Wirkung auf orale parodontale Pathogene wird mit einem MIC von $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ angegeben [185]. Es muss davon ausgegangen werden, dass hohe Silberkonzentrationen neben einer antibakteriellen Wirkung auch Einfluss auf den Zellumsatz und das Wachstum eukaryontischer Zellen ausüben. Gosheger et al. [186] konnten allerdings in einer in vivo Studie an Hasen nachweisen, dass erst ab Konzentrationen von circa $35 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ mit Nebenwirkungen zu rechnen ist.

Auch die Freisetzungskinetik adsorbierten Silbers lässt sich offensichtlich in drei Phasen unterteilen. Die erste Phase, mit einer Dauer von ca. 6 Stunden, ist dominiert durch einen initialen „burst“. Die Silberabgabe erfolgt wahrscheinlich aus oberflächennahen Bereichen der Titanoxidschicht. In diesem Zeitraum wurden bei der 3 Stunden Probe 31,62 % und bei der 18 Stunden Probe 23,63 % der eingelagerten Silbermenge freigesetzt. An sie schließt sich eine Übergangsphase an, in der die Oberflächenabgabe durch die Freisetzung

eingelagerten Silbers aus den Nanotubes überlagert wird. In der dritten Phase ist das oberflächennah adsorbierte Silber beinahe vollständig freigesetzt, das nun abgegebene Silber stammt mit hoher Wahrscheinlichkeit fast vollständig aus den Nanotubebildungen. Der Abgabezeitraum betrug bei der Silberauslagerung 144 Tage. Der entscheidende Faktor für den langen Abgabezeitraum und die relativ hohe Abgabemenge scheint auch hier das bei der Adsorption angelegte Vakuum zu sein. Aber auch eine positive Ladung der Silberionen bei einer in der Regel negativ geladenen Titanoxidschicht beeinflusst die Freisetzungskinetik [7]. Nach dem Korsemeyer-Peppas-Modell handelte es sich auch hier um einen rein Diffusions-gesteuerten Abgabemodus.

Silberabgabe	Oberflächen des Ansatzes 1	
	3 Std. Probe	18 Std. Probe
1. Std.	3,14	2,59
2. Std.	3,36	2,89
3. Std.	3,27	2,86
4. Std.	3,24	1,01
5. Std.	2,58	2,20
6. Std.	2,50	3,02
Summe 1. - 6. Std.	18,09	14,57
6. - 24. Std.	3,24	4,59
24. - 48. Std.	3,58	4,43
48. - 72. Std.	4,84	4,24
72. - 96. Std.	3,22	4,12
96. - 120. Std.	4,20	4,54

Tabelle 10: Silberabgabe der Probenoberflächen in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$

In den ersten 6 Stunden der Auslagerung wurden von den 3 Stunden Proben $18,09 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ und von den 18 Stunden Proben $14,57 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ Silber freigesetzt (Tab. 10). Diese Werte liegen über der minimalen Hemmkonzentration und im Bereich der minimalen bakteriziden Konzentration der exemplarisch betrachteten Bakterienarten. Es ist davon auszugehen, dass diese Werte für eine initiale Keimkontrolle im direkten Implantatumfeld ausreichend sind. Daran schließt sich ein 5 Tage andauerndes Intervall an, in dem stündlich beinahe einheitliche Silbermengen im Bereich zwischen $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ und $0,20 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}$ abgegeben werden. Diese Werte liegen an der Untergrenze der für das Bakterium *Staphylococcus aureus* bestimmten MIC und unterhalb der MIC für *Staphylococcus epidermidis*. Sie liegen aber oberhalb der von Kumar et al.

[182] geforderten $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, die für eine bakterienabweisende Oberfläche erforderlich sind. Die Auslagerung erreicht anschließend nach wenigen Tagen subtherapeutische Konzentrationen und nimmt über einen Zeitraum von etwa 144 Tagen weiter ab. Zwei Faktoren, die bei Abschätzung einer in vivo Wirksamkeit der Silberauslagerung eine Rolle spielen, sind die Komplexbildung der Silberionen mit anderen Ionen und die Durchblutung des Knochens (Kapitel 5.2). Sie reduzieren die tatsächlich wirkende Menge Silberionen, wobei der Faktor Durchblutung erst einige Tage nach Implantatinsertion zum Tragen kommt. Sicherlich ließe sich die Abgabemenge durch eine höher dosierte Silbernitratlösung bei der Imprägnierung steigern. Zwar besteht bei Silber trotz niedrigen Konzentrationen nicht die Gefahr der Resistenzentstehung, allerdings ist eine effektive und langfristige Keimkontrolle bei diesen Abgabewerten nicht gesichert.

6. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Modifikation medizinischer Titanoberflächen mittels Anodisierung in fluoridhaltigen Elektrolyten und die Abschätzung ihres Potentials hinsichtlich der Einlagerung und der Freisetzung ausgewählter antibakteriell wirksamer Substanzen. Durch die Anodisierung der Titanoberflächen konnten Titananotubes aus Titanoxiden mit Röhrenlängen von bis zu 6,54 μm und Röhrendurchmessern von bis zu 160 nm erzeugt werden. Als Modellwirkstoffe wurden das noch heute als Reserveantibiotikum gegen manche Problemkeime geltende Chemotherapeutikum Vancomycin, sowie Silber als Element mit breiter antibakterieller Wirkung, verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Oberflächenvergrößerung, die sich aus der Entstehung von nanotubeförmigem Titanoxid ergab, im Vergleich zu nicht anodisierten Referenzproben um bis zu 447 % mehr Wirkstoff eingelagert werden konnte. In der Freisetzungskinetik von Vancomycin zeigten sich oberflächenabhängig deutliche Unterschiede. Dabei setzten Titanoberflächen, die in einem Elektrolyten auf Wasserbasis anodisiert worden waren, den adsorbierten Wirkstoff schneller frei als die Referenzproben, während das Vancomycin auf Oberflächen, die in einem Elektrolyten auf Ethylenglycolbasis modifiziert worden waren, deutlich retardiert über einen Zeitraum von circa 305 Tagen freigesetzt wurde. Des Weiteren wurde Silber in Proben eingelagert, die in einem Elektrolyten auf Wasserbasis anodisiert worden waren. Auch für Silber resultierte eine deutliche Steigerung der Gesamtmenge des adsorbierten Wirkstoffs um bis zu 229 %. Dabei war seine Freisetzung, verglichen mit der Referenzprobe, deutlich verzögert.

Durch die Anodisierung der Titanproben in fluoridhaltigen Elektrolyten konnten Oberflächen erzeugt werden, die entsprechend ihrer Morphologie verschiedene Wirkstoffbeladungen und Freisetzungskinetiken ermöglichen. Hinsichtlich der unterschiedlichen Anforderungen in der klinischen Medizin nach Abgabemenge und Abgabekinetik antibakteriell wirksamer Substanzen zur postoperativen Infektionsprävention offerieren diese Oberflächenmodifikationen ein hohes Potential für die Erzeugung schnell verfügbarer und kostengünstiger Drug-Release-Systeme.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Presseinformation Verband deutscher Dental-Industrie e.V. Köln 20.01.2009; Implantologie in der Zahnheilkunde: innovativer Wachstumsmarkt mit hohem Qualitätsniveau
- [2] M. Long, H. J. Rack. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. *Biomaterials* 1998; 19:1621-1639
- [3] D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomson. *Titanium in Medicine*. Springer Verlag Berlin 2001 ISBN: 3-540-66936-1
- [4] H. G. Craighead, C. D. James, A. M. P. Turner. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2001; 5:177-184
- [5] J. Park, S. Bauer, K. von der Mark, P. Schmuki. Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate. *Nanoletters* 2007; 7:1686-1691
- [6] J. M. Schierholz, C. Morsczech, N. Brenner, D. P. König, N. Yücel, M. Korenkov, E. Neugebauer, A. F. E. Rump, G. Waalenkamp, J. Beuth, G. Pulverer, S. Arens. Besonderheiten der implantatassoziierten Infektion in der orthopädischen Chirurgie. *Der Orthopäde* 2004; 33:397-404
- [7] K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, T. A. Desai. Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants?. *Small* 2007; 3 No. 11:1878-1881
- [8] A. J. Cox, D. W. L. Hukins, T. M. Sutton. Infection of catheterised patients: bacterial colonisation of encrusted Foley catheters shown by scanning electron microscopy. *Urological Research* 1989; 17:349-352
- [9] K. H. Polderman, A. R. J. Girbes. Central venous catheter: Part 2: Infectious complications. *Intensive care Medicine* 2002; 28:18-28
- [10] T. Carrel, T. Nguyen, B. Kipfer, U. Althaus. Definitive cure of recurrent prosthetic endocarditis using silver-coated St. Jude Medical heart valves: a preliminary case report. *The Journal of heart valve disease* 1998; 7:531-533
- [11] M. Böswald, S. Lugauer, A. Regenfus, G. G. Braun, P. Martus, C. Geis, S. Scharf, T. Bechert, J. Greil, J.-P. Guggenbichler. Reduced rates of catheter-associated infection by use of a new silver-impregnated central venous catheter. *Infection* 1999; 27:56-60
- [12] J. K. Kewal. *Drug delivery systems*. Methods in molecular biology 437. Humana Press Totowa 2008 ISBN 978-1-58829-891-1
- [13] D. F. Williams. *Definitions in Biomaterials*. Progressing Biomedical Engineering. Elsevier Amsterdam. 4. Auflage 1987
- [14] <http://de.wikipedia.org/wiki/Biokompatibilität> Version 21. Dez. 2008
- [15] R. Thull, K. Trautner, E. J. Karle. Modell zur immunologischen Prüfung von Biomaterialien. *Biomedizinische Technik* 1992; 37:162-169
- [16] R. Thull. Biologische Grundlagen der Einheilung von Fremdstoffen. *Nova Acta Leopoldina NF 84* 2001; 322:15-34
- [17] R. Adell, U. Lekholm, B. Rockler, P. I. Branemark. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of oral Surgery* 1981; 10:387-416
- [18] R. Nedir, M. Bischof, S. Szmukler-Moncler, J. P. Bernard, J. Samson. Predicting osseointegration by means of implant primary stability. *Clinical oral Implants Research* 2004; 15:520-528
- [19] D. V. Kilpadi, J. E. Lemons. Surface energy characterization of unalloyed titanium implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994; 28:1419-1425

7. Literaturverzeichnis

- [20] E. Pikoulis, D. Burris, P. Rhee, T. Nishibe, A. Leppäniemi, D. Wherry, N. Rich. Rapid arterial anastomosis with titanium clips. *American Journal of Surgery* 1998; 175:494-496
- [21] D. Franco, M. Labianca, C. Smadja, J. Fragoso, S. Halabi. Titanium catheter tip for peritoneovenous shunts. *Artificial Organs* 2008; 12:81-82
- [22] C. W. Akins. Medtronic-Hall prosthetic aortic valve. *Seminars in thoracic and cardiovascular Surgery* 1996; 8:242-248
- [23] M. S. Peters, A. L. Schroeter, H. M. van Hale, J. C. Broadbent. Pacemaker contact sensitivity. *Contact Dermatitis* 2009; 11:214-218
- [24] G. H. Bardy, G. Johnson, J. E. Poole, G. L. Dolack, P. J. Kudenchuk, D. Kelso, R. Mitchell, R. Mehra, B. Hofer. A simplified, single-lead unipolar transvenous cardioversion-defibrillation system. *Circulation* 1993; 88:543-547
- [25] S. Windecker, R. Simon, M. Lins, V. Klauss, F. R. Eberli, M. Roffi, G. Pedrazzini, T. Moccetti, P. Wenaweser, M. Togni, D. Tüller, R. Zbinden, C. Seiler, J. Mehilli, A. Kastrati, B. Meier, O. M. Hess. Randomized comparison of a titanium-nitride-oxide-coated stent with a stainless steel stent for coronary revascularization. *American Heart Association* 2005; 2617-2622
- [26] M. C. Lim, H. C. Tan, M. H. Choo. The new titanium Greenfield vena cava filter: initial experience and review. *Singapore Medical Journal* 1994; 35:622-625
- [27] P. C. Loizou. Introduction to cochlear implants. *Engineering in Medicine and Biology Magazine* 1999. 18:32-42
- [28] W. Wichmann, K. von Ammon, U. Fink, T. Eik, G. M. Yasargil. Aneurysm clips made of titanium: magnetic characteristics and artifacts in MR. *American Journal of Neuroradiology* 1997; 18:939-944
- [29] M. E. Müller, M. Allgöwer, R. Schneider, H. Willenegger. *Manual of internal Fixation*. Springer, Berlin Heidelberg New York 1991
- [30] K. H. Müller, J. Müller-Färber. Die Osteosynthese mit dem Fixateur Externe am Becken. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 1978; 92:273-283
- [31] Majd, E. Mohammed, Vadhva, Mukta, Holt, R. Richard. Anterior cervical reconstruction using titanium cages with anterior plating. *Spine* 1999; 24:1604
- [32] R. S. Kirby, S. R. Heard, P. Miller, I. Eardley, S. Holmes, J. Vale, J. Bryan, S. Liu. Use of the ASI titanium stent in the management of bladder outflow obstruction due to benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology* 1992. 148:1195-1197
- [33] C. M. Weiss. A comparative analysis of fibro-osteal and osteal integration and other variables that affect long term bone maintenance around dental implants. *Journal of Oral Implantology* 1987; 13:467-487
- [34] X. Liu, P. K. Chu, C. Ding. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering* 2004; R47:49-121
- [35] S. E. Lynch, D. Buser, R. A. Hernandez, H. P. Weber, H. Stich, C. H. Fox, R. C. Williams. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *Journal of Periodontology* 1991; 62:710-716
- [36] Copy Right Firma Straumann, Basel, Schweiz
- [37] C. A. Babbush, J. N. Kent, D. J. Misiek. Titanium plasma-sprayed (TPS) screw implants for the reconstruction of the edentulous mandible. *Journal of the Oral Maxillofacial Surgery* 1986; 44:274-282
- [38] D. L. Cochran, D. Buser, D. M. Bruggenkate, D. Weingart, T. M. Taylor, J.-P. Bernard, F. Peters, J. P. Simpson. The use of reduced healing time in ITI implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface: Early results from clinical trials on ITI SLA implants. *Clinical Oral Implants Research* 2002; 13:144-153

7. Literaturverzeichnis

- [39] S. Iijima. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991; 354:56-58
- [40] F. Keller, M. S. Hunter, D. L. Robinson. *Journal of Electrochemical Society* 1953; 100:411
- [41] H. Masuda, K. Fukuda. Ordered metal nanohole arrays made by two-step replication of honeycomb structures of anodic alumina. *Science* 1995; 268:1466-1468
- [42] H. Tsuchiya, P. Schmuki. Self-organized high aspect ratio porous hafnium oxide prepared by electrochemical anodization. *Electrochemistry Communications* 2005; 7:49-52
- [43] H. Tsuchiya, P. Schmuki. Thick self-organized porous zirconium oxide formed in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{NH}_4\text{F}$ electrolytes. *Electrochemistry Communications* 2004; 6:1131-1134
- [44] I. Sieber, H. Hildebrand, A. Friedrich, P. Schmuki. Formation of self-organized niobium porous oxide on niobium. *Electrochemistry Communications* 2005; 7:97-100
- [45] I. Sieber, B. Kannan, P. Schmuki. Self-assembled porous tantalum oxide prepared in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HF}$ electrolytes. *Electrochemical and Solid-State Letters* 2005; 8:10-12
- [46] L. Young. *Anodic oxide films*. New York; Plenum; 1961
- [47] P. Hoyer, H. Masuda. Electrodeposited nanoporous TiO_2 film by a two-step replication process from anodic porous alumina. *Journal of Materials Science Letters* 1996; 15:1228-1230
- [48] D. Gong, C. A. Grimes, O. K. Varghese, W. Hu, R. S. Singh, Z. Chen, E. C. Dickey. Titanium oxide nanotube arrays prepared by anodic oxidation. *Journal of Material Research* 2001; 16:3331-3334
- [49] J. M. Macak, P. Schmuki. Anodic growth of self-organized anodic TiO_2 nanotubes in viscous electrolytes. *Electrochimica* 2006; 52:1258-1264
- [50] Y. Q. Wang, G. Q. Hu, X. F. Duan, H. L. Sun, Q. K. Xue. Microstructure and formation mechanism of titanium dioxide nanotubes. *Chemical Physics Letters* 2002; 365:427-431
- [51] J. H. Jung, H. Kobayashi, K. J. C. van Bommel, S. Shinkai, T. Shimizu. Creation of novel helical ribbon and double-layered nanotube TiO_2 structures using an organogel template. *Chemical Mater* 2002; 14:1445-1447
- [52] D. G. Shchukin, R. A. Caruso. Inorganic macroporous films from preformed nanoparticles and membrane templates: synthesis and investigation of photocatalytic and photoelectrochemical properties. *Advanced Funktional Merils* 2003; 13:789-794
- [53] M. A. Khan, H.-T. Jung O.-B. Yang. Synthesis and characterization of ultrahigh crystalline TiO_2 nanotubes. *Journal of Physical Chemistry B* 2006; 110:6626-6630
- [54] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Wiley-VCH Verlag Weinheim. 5. Auflage 2004 ISBN: 3-527-31066-5
- [55] J. M. Macak, H. Tsuchiya, A. Ghicov, K. Yasuda, R. Hahn, S. Bauer, P. Schmuki. TiO_2 nanotubes: Self-organized electrochemical formation, properties and applications. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 2007; 11:3-18
- [56] K. S. Raja, M. Misra, K. Paramguru. Formation of self-ordered nano-tubular structure of anodic oxide layer on titanium. *Electrochimica Acta* 2005; 51:154-165
- [57] R. Hahn, J. M. Macak, P. Schmuki. Rapid anodic growth of TiO_2 and WO_3 nanotubes in fluoride free electrolytes. *Electrochemistry Communications* 2007; 9:947-952
- [58] R. Beranek, H. Hildebrand, P. Schmuki. Self-organized porous titanium oxide prepared in $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HF}$ electrolytes. *Electrochemical and Solid-State Letters* 2003; 6:B12-B14
- [59] J. M. Macak, K. Sirotna, P. Schmuki. Self-organized porous titanium oxide prepared in $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{NaF}$ electrolytes. *Electrochimica Acta* 2005; 50:3679-3684
- [60] L. V. Taveira, J. M. Macak, H. Tsuchiya, L. F. P. Dick, P. Schmuki. Initiation and growth of self-organized TiO_2 nanotubes anodically formed in $\text{NH}_4\text{F}/(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ electrolytes. *Journal of the Electrochemical Society* 2005; 152:B405-B410
- [61] J. M. Macak, H. Tsuchiya, L. Taveira, S. Aldabergerova, P. Schmuki. Smooth anodic TiO_2 nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition* 2005; 44:7463-7465

7. Literaturverzeichnis

- [62] S. P. Albu, A. Ghicov, J. M. Macak, P. Schmuki. 250 μm long anodic TiO_2 nanotubes with hexagonal self-ordering. *Physica status solidi (RRL)* 2007; 1:R65
- [63] M. Paulose, H. E. Prakasam, O. K. Varghese, L. Peng, K. C. Papat, G. K. Mor, T. A. Desai, C. A. Grimes. TiO_2 nanotube arrays of 1000 μm length by anodization of titanium foil: Phenol red diffusion. *Journal of Physical Chemistry C* 2007; 111:14992-14997
- [64] J. Bai, B. Zhou, L. Li, Y. Liu, Q. Zheng, J. Shao, X. Zhu, W. Cai, J. Liao, L. Zou. The formation mechanism of titania nanotube arrays in hydrofluoric acid electrolyte. *Journal of Material Science* 2008; 43:1880-1884
- [65] A. Jaroenworarluck, D. Regonini, C. R. Bowen, R. Stevens, D. Allsopp. Macro, micro and nanostructure of TiO_2 anodised films prepared in a fluorine-containing electrolyte. *Journal of Materials Science* 2007; 42:6729-6734
- [66] J. M. Morehead, G. R. Holt. Soft-tissue response to synthetic biomaterials. *Otolaryngologic Clinics of North America* 1994; 27:195-201
- [67] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, Z. Schwartz. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 1996; 17:137-146
- [68] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, A. Zweck. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* 2006; 24:1211-1217
- [69] E. Balaur, J. M. Macak, H. Tsuchiya, P. Schmuki. Wetting behavior of layers of TiO_2 nanotubes with different diameters. *Journal of Materials Chemistry* 2005; 15:4488-4491
- [70] S. Bauer, J. Park, K. von der Mark, P. Schmuki. Improved attachment of mesenchymal stem cells on super-hydrophobic TiO_2 nanotubes. *Acta Biomaterialia* 2008; 4:1576-1582
- [71] C. von Wilmowsky, S. Bauer, R. Lutz, M. Meisel, F. W. Neukam, T. Toyoshima, P. Schmuki, E. Nkenke, K. A. Schlegel. In vivo evaluation of anodic TiO_2 nanotubes: An experimental study in the pig. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 2008; 89B:165-171
- [72] K. C. Papat, L. Leoni, C. A. Grimes, T. A. Desai. Influence of engineered titania nanotubular surfaces on bone cells. *Biomaterials* 2007; 28:3188-3197
- [73] C. Yao, E. B. Slamovich, T. J. Webster. Enhanced osteoblast functions on anodized titanium with nanotube-like structures. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008; 85:157-166
- [74] L. Peng, M. L. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, T. A. Desai. The effect of TiO_2 nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation. *Biomaterials* 2009; 30:1268-1272
- [75] A. Bianco, K. Kostarelos, M. Prato. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology* 2005; 9:674-679
- [76] C. Klumpp, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 2006; 1758:404-412
- [77] Z. Liu, M. Winters, M. Holodniy, H. Dai. siRNA delivery into human T-cells and primary cells with carbon-nanotube transporters. *Angewandte Chemie Internationale Edition* 2007; 46:2023-2027
- [78] S. Hampel, D. Kunze, D. Haase, K. Krämer, M. Rauschenbach, M. Ritschel, A. Leonhardt, J. Thomas, S. Oswald, V. Hoffmann, B. Büchner. Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth. *Nanomedicine* 2008; 3:175-182
- [79] Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Research* 2008; 68:6652-6660

7. Literaturverzeichnis

- [80] Y. Usui, K. Aoki, N. Narita, N. Marukami, I. Nakamura, K. Nakamura, N. Ishigaki, H. Yamazaki, H. Horiuchi, H. Kato, S. Taruta, Y. A. Kim, M. Endo, N. Saito. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Small* 2008; 4:240-246
- [81] G. Pastorin, W. Wu, S. Wleckowski, J.-P. Briand, K. Kostarelos, M. Prato, A. Bianco. Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chemical Communications* 2006; 1182-1184
- [82] C. Yao, G. Balasundaram, T. Webster. Use of anodized titanium in drug delivery applications. *Materials Research Society Symposium Proceedings* 2007; Vol. 951
- [83] K. C. Popat, M. Eltgroth, T. J. LaTempa, C. A. Grimes, T. A. Desai. Decreased *Staphylococcus epidermidis* adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. *Biomaterials* 2007; 28:4880-4888
- [84] G. E. Aninwene, C. Yao, T. J. Webster. Enhanced osteoblast adhesion to drug-coated anodized nanotubular titanium surfaces. *International Journal of Nanomedicine* 2008; 3(2):257-264
- [85] Y.-Y. Song, F. Schmidt-Stein, S. Bauer, P. Schmuki. Amphiphilic TiO₂ nanotube arrays: an actively controllable drug delivery system. *Journal of the American Chemical Society* 2009; 131(12):4230-4232
- [86] B. O'Regan, M. Grätzel. A low-cost, high-efficiency solar cell based on dye-sensitized colloidal TiO₂ films. *Letters to Nature* 1991; 353:737-740
- [87] J. M. Macak, H. Tsuchiya, A. Ghicov, P. Schmuki. Dye-sensitized anodic TiO₂ nanotubes. *Electrochemistry Communications* 2005; 7:1133-1137
- [88] K. Zhu, N. R. Neale, A. Miedaner, A. J. Frank. Enhanced charge-collection efficiencies and light scattering in dye-sensitized solar cells using oriented TiO₂ nanotube arrays. *Nanoletters* 2007; 7:69-74
- [89] A. Fujishima, K. Honda. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Letter to Nature* 1972; 238:37-38
- [90] A. L. Linsebigler, G. Lu, J. T. Yates Jr. Photocatalysis on TiO₂ surfaces: principles, mechanisms, and selected results. *Chemical Review* 1995; 95:735-758
- [91] A. Mills, S. Le Hunte. An overview of semiconductor photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 1997; 108:1-35
- [92] J. Krysa, M. Keppert, G. Waldner, J. Jirkovsky. Immobilized particulate TiO₂ photocatalysts for degeneration of organic pollutants: effect of layer thickness. *Electrochimica Acta* 2005; 50:5255-5260
- [93] F. Zhang, J. Zhao, T. Shen, H. Hidaka, E. Pelizzetti, N. Serpone. TiO₂-assisted photodegradation of dye pollutants II. Adsorption and degradation kinetics of eosin in TiO₂ dispersions under visible light irradiation. *Applied Catalysis B: Environmental* 1998; 15:147-156
- [94] J. M. Macak, M. Zlamal, J. Krysa, P. Schmuki. Self-organized TiO₂ nanotube layers as highly efficient photocatalysts. *Small* 2007; 3:300-304
- [95] S. P. Albu, A. Ghicov, J. M. Macak, R. Hahn, P. Schmuki. Self-organized, free-standing TiO₂ nanotube membrane for flow-through photocatalytic applications. *Nanoletters* 2007; 7:1286-1289
- [96] D. J. Blackwood, L. M. Peter, H. E. Bishop, P. R. Chalker, D. E. Williams. A SIMS investigation of hydrogen penetration of titanium electrodes. *Electrochimica Acta* 1989; 34:1401-1403
- [97] A. Ghicov, H. Tsuchiya, R. Hahn, J. M. Macak, A. G. Munoz, P. Schmuki. TiO₂ nanotubes: H⁺ insertion and strong electrochromic effects. *Electrochemistry Communications* 2006; 8:528-532
- [98] O. K. Varghese, D. Gong, M. Paulose, K. G. Ong, C. A. Grimes. Hydrogen sensing using titania nanotubes. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2003; 93:338-344

7. Literaturverzeichnis

- [99] H. Tsuchiya, J. M. Macak, I. Müller, J. Kunze, F. Müller, P. Greil, S. Virtanen, P. Schmuki. Hydroxyapatite growth on anodic TiO₂ nanotubes. *Journal of Biomedical Materials Research part A* 2006; 77(3):534-541
- [100] C. A. Grimes. Synthesis and application of highly ordered arrays of TiO₂ nanotubes. *Journal of Materials Chemistry* 2007; 17:1451-1457
- [101] H. E. Prakasam, K. Shankar, M. Paulose, O. K. Varghese, C. A. Grimes. A new benchmark for TiO₂ nanotube array growth by anodization. *Journal of Physical Chemistry* 2007; 111:7235-7241
- [102] <http://de.wikipedia.org/wiki/Rasterelektronenmikroskopie> Version 11. Feb. 2009
- [103] <http://de.wikipedia.org/wiki/Röntgenbeugung> Version 11. Feb. 2009
- [104] H. Gauthier, G. Daculsi, C. Merle. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and microbiological activity. *Biomaterials* 2001; 22:2481-2487
- [105] H. Gauthier, J. Caillon, A. M. Le Ray, G. Daculsi, C. Merle. Influence of isostatic compression on the stability of vancomycin loaded with a calcium phosphate-implantable drug delivery device. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 52:308-314
- [106] Lüllman H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York. 16. Auflage 2006
- [107] K. Hiramatsu, H. Hanaki, T. Ino, K. Yabuta, T. Oguri, F. C. Tenover. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40:135-136
- [108] K. Hiramatsu. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *The Lancet Infectious Diseases* 2001; 1 (3):147-155
- [109] M. B. Edmond, J. F. Ober, D. L. Weinbaum, M. A. Pfaller, T. Hwang, M. D. Sanford, R. P. Wenzel. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* bacteremia: Risk factors for infection. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 20:1126-1133
- [110] U. Gbureck, E. Vorndran, F. A. Müller, J. E. Barralet. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *Journal of Controlled Release* 2007; 122:173-180
- [111] S. Radin, J. T. Campbell, P. Ducheyne, J. M. Cuckler. Calcium Phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 1997; 18:777-782
- [112] R. L. Williams, P. J. Doherty, D. G. Vince, G. J. Grashoff, D. F. Williams. The biocompatibility of silver. *Crit. Rev. Biocompat.* 1989; 5:221-223
- [113] T. J. Berger, J. A. Spadaro, S. E. Chapin, R. O. Becker. Electrically Generated Silver Ions: Quantitative Effects on Bacterial and Mammalian Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1976; 9(2):357-358
- [114] A. D. Russell, W. B. Hugo. Antimicrobial activity and action of silver. *Progress in Medical Chemistry* 1994; 31:351-370
- [115] S. Silver. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 2003:341-353
- [116] H. J. Klasen. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 2000; 2:117-130
- [117] A. Ewald, S. K. Glückermann, R. Thull, U. Gbureck. Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *BioMedical Engineering OnLine* 2006; 5:22
- [118] J. M. Schierholz, L. J. Lucas, A. Rump, G. Pulverer. Efficacy of silver-coated medical devices. *Journal of Hospital Infection* 1998; 40:257-262
- [119] G. Cook, J. W. Costerton, R. O. Darouiche. Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of a silver-coated heart valve sewing cuff. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2000; 13:169-173

7. Literaturverzeichnis

- [120] K. Davenport, F. X. Keeley. Evidence for the use of silver-alloy-coated urethral catheters. *Journal of Hospital Infections* 2005. 60(4):298-303
- [121] K. Yorganci, C. Krepel, J. A. Weigelt, C. E. Edmiston. Activity of antibacterial impregnated central venous catheters against *Klebsiella pneumoniae*. *Intensive care Medicine* 2002; 28:438-442
- [122] R. Phillips, P. George. Metal-ATP bindings. I. Thermodynamic data for adenosine-silver binding. *Biochemical Biophysical Acta* 1968; 162:73-78
- [123] Q. L. Feng, J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim, J. O. Kim. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2000; 52:662-668
- [124] W. K. Jung, H.C. Koo, K. W. Kim, S. Shin, S. H. Kim, Y. H. Park. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 2008; 74:2171-2178
- [125] R. S. Byrne, P. B. Deasy. Use of commercial porous ceramic particles for sustained drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 2002; 246:61-73
- [126] <http://de.wikipedia.org/wiki/Polytetrafluorethylen> Version 09. Feb. 2009
- [127] <http://de.wikipedia.org/wiki/ICP-MS> Version 23. Feb. 2009
- [128] W. D. Lindner, B. C. Lippold. Drug release from hydrocolloid embedding with high or low susceptibility to hydrodynamic stress. *Pharmacological Research* 1995; 12:1781-1785
- [129] J. M. Macak, H. Tsuchiya, P. Schmuki. High-aspect-ratio TiO₂ nanotubes by anodization of titanium. *Angewandte Chemie International Edition* 2005; 44:2100-2102
- [130] C. Friesecke, J. Wodtke. Management des Protheseninfektes. *Der Chirurg* 2008; 79:777-794
- [131] M. Otto. Klassifikation bei Protheseninsuffizienz und Partikelbestimmung. *Der Pathologe* 2008; 29(2):232-239
- [132] R. O. Darouiche. Treatment of infections associated with surgical implants. *The New England Journal of Medicine* 2004; 350:1422-1429
- [133] V. Mohr. Leistungen schwanken ganz erheblich. *Spiegel* 2004; 06:137
- [134] B. A. Knobben, Y. Engelsma, D. Neut, H. C. van der Mei, H. J. Busscher, J. R. van Horn. Intraoperative contamination influences wound discharge and periprosthetic infection. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2006; 452:236-241
- [135] J. Wodtke, J. F. Lohr. The infected implant. *Der Orthopäde* 2008; 37:257-267
- [136] S. Ruchholtz, G. Täger, D. Nast-Kolb. Die infizierte Hüftgelenksprothese. *Der Unfallchirurg* 2004; 107(4):307-319
- [137] R. O. Darouiche. Antimicrobial approaches for preventing infections associated with surgical implants. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 36:1284-1289
- [138] B. D. Hoyle, J. W. Costerton. Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Progress in Drug Research* 1991; 37:91-105
- [139] C. A. Fux, J. W. Costerton, P. S. Stewart, P. Stoodley. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology* 2005; 13:34-40
- [140] W. Zimmerli, P. D. Lew, F. A. Waldvogel. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. *The Journal of Clinical Investigation* 1984; 73:1191-1200
- [141] L. G. Harris, R. G. Richards. Staphylococci and implant surfaces: a review. *Injury* 2006; 37(2):S3-S14
- [142] U. Gelpel, M. Hermann. Das infizierte Implantat. Teil 1: Bakteriologie. *Der Orthopäde* 2004; 33:1411-1428
- [143] A. G. Gristina. Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987; 237:1588-1595

7. Literaturverzeichnis

- [144] L. Frommelt. Systemische Antibiotikatherapie bei periprothetischen Infektionen. *Der Orthopäde* 2004; 33:822-826
- [145] P. Wu, D. W. Grainger. Drug/device combinations for local drug therapies and infection prophylaxis. *Biomaterials* 2006; 27(11):2450-2467
- [146] D. S. Dunn, S. Raghavan, R. G. Volz. Gentamicin sulfate attachment and release from anodized Ti-6Al-4V orthopedic materials. *Journal of Biomedical Materials Research* 1993; 27:895-900
- [147] E. M. Hetrick, M. H. Schoenfisch. Reducing implant-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews* 2006; 35:780-789
- [148] S. Rossi, A. O. Azghani, A. Omri. Antimicrobial efficacy of a new antibiotic-loaded poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric acid) controlled release system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54(6):1013-1018
- [149] J. M. Schierholz, A. F. Rump, G. Pulverer, J. Beuth. Anti-infective catheters: novel strategies to prevent nosocomial infections in oncology. *Anticancer Research* 1998; 18(5B):3629-2638
- [150] J. M. Schierholz, H. Steinhauser, A. F. E. Rump, R. Berkels, G. Pulverer. Controlled release of antibiotics from biomedical polyurethanes: morphological and structural features. *Biomaterials* 1997; 18(12):839-844
- [151] A. Ince, N. Schütze, C. Hendrich, R. Thull, J. Eulert, J. F. Löhr. In Vitro Investigation of Orthopedic Titanium-Coated and Brushite-Coated Surfaces Using Human Osteoblasts in the Presence of Gentamycin. *The Journal of Arthroplasty* 2008; 23(5):762-771
- [152] M. Stigter, J. Bezemer, K. de Groot, P. Layrolle. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. *Journal of Controlled Release* 2004; 99:127-137
- [153] H. Gollwitzer, K. Ibrahim, H. Meyer, W. Mittelmeier, R. Busch, A. Stemberger. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51:585-591
- [154] M. Lucke. Local protection for surgical implants. *Chemistry & Biology* 2005; 12(9):958-959
- [155] F. D. Matl, A. Obermeier, S. Repmann, W. Friess, A. Stemberger, K.-D. Kuehn. New anti-infective coatings of medical implants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 1957-1963
- [156] A. Actis Dato, C. Chiusolo, G. C. Cicchitti, G. M. Actis Dato, M. C. Porro, A. Bello. Antibiotic pretreatment of heart valve prostheses. *Minerva Cardioangiologica* 1992; 40(6):225-229
- [157] X. Zhang, U. P. Wyss, D. Pichora, M. F. Goosen. Biodegradable controlled antibiotic release devices for osteomyelitis: optimization of release properties. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1994; 46(9):718-724
- [158] Y. H. An, R. J. Friedman. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; 43A(3):338-348
- [159] K. Vacheethasane and R. E. Marchant. Nonspecific *Staphylococcus epidermidis* adhesion. In *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications* eds. Y. H. An and R. J. Friedman. Humana Press, Totowa, NY, USA 2000 ch. 5, pp. 73-90
- [160] A. W. Smith. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems?. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57(10):1539-1550
- [161] K. A. Poelsta, N. A. Barekzi, A. M. Rediske, A. G. Felts, J. B. Slunt, D. W. Grainger. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *Journal of Biomedical Materials Research* 2002; 60:206-215

7. Literaturverzeichnis

- [162] J. M. Anderson. Biological Responses to Materials. Annual Review of Materials Research 2001; 31:81-110
- [163] S.-J. Liu, S. W.-N. Ueng, S.-S. Lin, E.-C. Chan. In vivo release of vancomycin from biodegradable beads. Journal of Biomedical Materials Research 2002; 63B(6):807-813
- [164] W. R. Gransden. Antibiotic resistance. Nosocomial gram-negative infection. Journal of Medical Microbiology 1997; 46(6):436-439
- [165] Y. H. An, R. J. Friedman. Prevention of sepsis in total joint arthroplasty. Journal of Hospital Infection 1996; 33(2):93-108
- [166] G. Wang, J. F. Hindler, K. W. Ward, D. A. Bruckner. Increasing Vancomycin MICs for Staphylococcus aureus clinical isolates from a university hospital during a 5-year period. Journal of Clinical Microbiology 2006; 44(11):3883-3886
- [167] F. C. Tenover, J. W. Biddle, M. C. Lancaster. Increasing resistance to Vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus. Emerging Infectious Diseases 2001; 7(2): 327-332
- [168] A. Bartoloni, M. G. Colao, A. Orsi, R. Die, E. Giganti, F. Parenti. In-vitro activity of vancomycin, teicoplanin, daptomycin, ramoplanin, MDL 62873 and other agents against staphylococci, enterococci and Clostridium difficile. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1990; 26:627-633
- [169] E. Löwdin, I. Odenholt, O. Cars. In vitro studies of pharmacodynamic properties of Vancomycin against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1998; 42(10):2739-2744
- [170] E. Walencka, B. Sadowska, S. Rozalska, W. Hryniewicz, B. Rozalska. Staphylococcus aureus biofilm as a target for single or repeated doses of Oxacillin, Vancomycin, Linezolid and/or Lysostaphin. Folia Microbiologica 2006; 51(5):381-386
- [171] R. C. Evans, C. J. Holmes. Effect of Vancomycin hydrochlorid on Staphylococcus epidermidis biofilm associated with silicone elastomer. Antimicrobial Agents and Chemistry 1987; 31(6):889-894
- [172] T. Nakano, J. R. Thompson, R. J. Christopherson, F. X. Atherne. Blood flow distribution in hind limb bones and joint cartilage from young growing pigs. Canadian Journal of Veterinary Research 1986; 50(1):96-100
- [173] W. R. Price, M. Wood. Silver nitrate burn dressing. Treatment of seventy burned persons. American Journal of Surgery 1966; 112(5):674-680
- [174] C. A. Moyer, L. Brentano, D. L. Gravens, H. W. Margraf, W. W. Monafu. Treatment of large human burnes with 0,5 % silver nitrate solution. Archives of Surgery 1965; 90(6):812-867
- [175] S. L. Percival, P. G. Bowler, D. Russel. Bacterial resistance to silver in wound care. Journal of Hospital Infection 2005; 60(1):1-7
- [176] W. J. Schreurs, H. Rosenberg. Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by Escherichia coli. Journal of Bacteriology 1982; 152(1):7-13
- [177] P. D. Bragg, D. J. Rainnie. The effect of silver ions on the respiratory chain of Escherichia coli. Canadian Journal of Microbiology 1974; 20(6):883-889
- [178] K. Modak, C. Fox. Binding of silver sulfadiazine in the cellular components of pseudomonas aeruginosa. Biochemical Pharmacology 1973; 22:2392-2404
- [179] D. Lee, R. E. Cohen, M. F. Rubner. Antibacterial properties of Ag nanoparticle loaded multilayers and formation of magnetically directed antibacterial microparticles. Langmuir 2005; 21:9651-9659
- [180] J.-P. Guggenbichler, M. Böswald, S. Lugauer, T. Krall. A new techology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity on central venous catheter. Infection 1999; 27(1):S16-S23

7. Literaturverzeichnis

- [181] M. Bellantone, N. J. Coleman, L. L. Hench. Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *Journal of Biomedical Materials Research* 2000; 51A(3):484-490
- [182] W. Chen, S. Oh, A. P. Ong, N. Oh, Y. Liu, H. S. Courtney, M. Appleford, J. L. Ong. Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *Journal of Biomedical Materials Research* 2007; 82A(4):899-906
- [183] R. Kumar, H. Munstedt. Silver ion release from antimicrobial polyamid/silver composites. *Biomaterials* 2005; 26:2081-2088
- [184] N. Simonetti, G. Simonetti. F. Bognol, M. Scalzo. Electrochemical Ag⁺ for preservative use. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 58(12):3834-3836
- [185] P. Spacciapoli, D. Buxton, D. Rothstein, P. Friden. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *Journal of Periodontal Research* 2001; 36:108-113
- [186] G. Gosheger, J. Harges, H. Ahrens, A. Streitburger, H. Buerger, M. Erren, A. Gonsel, F. H. Kemper, W. Winkelmann, C. von Eiff. Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model – an analysis of infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials* 2004; 25:5547-5556

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Uwe Gbureck, Dr. Claus Moseke und Dipl.-Ing. Elke Vorndran für die Überlassung des Themas und die jederzeit hervorragende fachliche und menschliche Betreuung meiner Arbeit.

Der Physik-Laborantin Judith Friedlein, der Chemie-Laborantin Isabell Biermann, den Feinmechaniker-Meistern Anton Hofmann und Harald Hümpfer, sowie der Technischen Assistentin Felicitas Knorr möchte ich recht herzlich für die stets kompetente technische Unterstützung bei der Durchführung des Experimentalteils meiner Promotion danken.

Neben meinen Eltern Hedwig und Gunter, denen diese Arbeit gewidmet ist, möchte ich auch meiner Freundin Nazin, meinen Geschwistern Stephanie und Florian, sowie allen meinen Freunden für die Unterstützung während meiner Promotion danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Felix Michael Hage
Geburtsdatum	21.02.1983
Geburtsort	Kemnath
Familienstand	ledig

Schulbildung

Sep. 1989 - Aug. 1993	Grundschule Oberndorf (bei Kemnath)
Sep. 1993 - Juni 2002	Humanistisches Gymnasium Christian Ernestinum, Bayreuth
Juni 2002	Abschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Wehrdienst

Juli 2002 - April 2003	Zivildienst im Kreiskrankenhaus, Kemnath
Mai 2003 - Sep. 2003	diverse Praktika zur Berufsfindung

Hochschulausbildung

Okt. 2003 - Nov. 2008	Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
März 2006	Zahnmedizinisches Physikum
Nov. 2008	Staatsexamen Zahnmedizin
Mai 2007 - Sep. 2008	Durchführung des Experimentanteils der Promotion
Dez. 2008 - Juni 2009	Fertigstellung der Promotion

Beruf

seit 01.07.2009	Vorbereitungsassistentenstelle in der Gemeinschaftspraxis Dres. Grubeanu / Grubeanu-Block, Trier
-----------------	---

Trier, 26.10.2010

Felix Hage