

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg

Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde

Direktor: Professor Dr. rer. nat. J. Groll

**Untersuchung topographischer Strukturen verschiedener
Stahlätzverfahren zur Optimierung von Implantatoberflächen**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Franka Sichel
aus Bad Kreuznach

Würzburg, November 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. Uwe Gbureck

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

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung : 28.03.2011

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Kenntnisstand	5
2.1 Biokompatibilität.....	5
2.2 Oberflächenmodifikation	6
2.3 Materialabrieb	7
2.4 Metallische Biomaterialien	8
2.4.1 Gold und Silber	9
2.4.2 Reintitan und Titanlegierungen	10
2.4.3 Co-Cr-Legierungen.....	12
2.4.4 Stahl und Stahllegierungen	13
3 Material und Methode	18
3.1 Material.....	18
3.2 Methode.....	21
3.2.1 Herstellung der Stahlproben.....	21
3.2.2 Oberflächenvorbehandlung der Stahlproben.....	22
3.2.3 Normierung des Schleif- und Polierverfahren.....	22
3.3 Oberflächenätzen.....	23
3.3.1 Messung.....	24
3.3.2 Oberflächenrauigkeit	25
3.4 Biologischer Versuch.....	26
3.4.1 Zellkultivierung	26
3.4.2 WST-1 Test	27
3.4.3 Bestimmung der Zellzahl.....	27
3.4.4 Immunhistochemische Untersuchung	28
3.5 Testalgorithmus und Plattenbelegung.....	29
3.6 Statistik	29
4 Ergebnisse	30
4.1 Säurebehandelte Oberflächen	31

4.2 Messreihen zur Beobachtung der Oberflächenentwicklung mittels Rasterkraftmikroskopie	32
4.3 Oberflächencharakterisierung mit IP Auto Probe	39
4.4 Messung Oberflächenrauigkeit mit dem Profilometer	42
4.5 Ergebnisse des biologischen Versuchs	43
5 Diskussion	50
6 Zusammenfassung	57
7 Literaturverzeichnis	59

1 Einleitung

In vielen Bereichen der Medizin dienen Implantate zur Wiederherstellung anatomischer Strukturen und physiologischer Situationen im menschlichen Körper. Ziel ist es, Organe oder Gewebe allgemein zu unterstützen, verloren gegangenes Gewebe zu rekonstruieren und es so zu gestalten, dass es möglichst zu einer „restitutio ad integrum“, einer narbenfreien Heilung kommen kann. Aufgrund der unterschiedlichen Indikationen liegen Implantate in verschiedensten Materialien und Systemen vor. Unterschieden werden beispielsweise körpereigene, resorbierbare, polymere, keramische und metallische Implantate. Letztere dienen meist der Verankerung (Zahnimplantate), beziehungsweise der interfragmentären Fixierung [1, 2], dem Offenhalten von Gefäßen (Stents) oder dem Ersatz verloren gegangener Knochensubstanz. Maßgeblichen Faktoren bei der Implantatentwicklung sind die mechanischen und chemischen Eigenschaften, bei primär sichtbaren Versorgungen aber auch die ästhetischen Aspekte [3, 4]. Viele Materialien erwiesen sich als unvorteilhaft und sind heute obsolet. Zum Teil sind auch etablierte Werkstoffe und Systeme kompromissbehaftet und veranlassen zu neuen Optimierungsversuchen. Die positiven Eigenschaften der Werkstoffe, wie z.B. die Korrosionsbeständigkeit von hochgoldhaltigen Legierungen, Kobalt-Chrom-Legierungen und Titan und die mechanische Festigkeit von Eisen oder Nickel [5], sind nicht uneingeschränkt kombinierbar. Stahl wird mit steigendem Kohlenstoffanteil fester, aber auch spröder. Als wegweisende Neuerungen sind die Einführung der Co-Cr-Legierungen und die medizinische Nutzung von Titan im 20. Jahrhundert zu betrachten [6, 7]. Steigende Anforderungen an Implantatsysteme, wie Sofortversorgung und Sofortbelastung stellen maximale Anforderungen an Makro- und Mikrodesign der Implantate [8]. Zu Untersuchungen können alle bedeutsamen Implantatwerkstoffe herangezogen und verschiedene Verfahren der Oberflächengestaltung genutzt werden. Proben können mechanisch (Sandstrahlung) oder chemisch (Ätzen) angeraut, durch PVD-Beschichtung (physical vapour deposition) mit anderen Materialien bedeckt, mit funktionellen Liganden (Kollagen, BMP) oder chemischen

Substanzen (Fluorid, Calciumphosphat) beschichtet werden [9, 10, 11, 12, 13, 14]. Junker et al. konnten durch Beschichtung mit Calciumphosphat jedoch keine grundsätzliche Verbesserung der Osseointegration gegenüber lediglich angerauten dentalen Implantaten feststellen. Der Einsatz von BMP-2 kann durch Aktivierung der Osteoklasten einer Integration sogar entgegenwirken [15]. Der Einfluss der Rauigkeit von Implantatoberflächen wird in vielen Studien untersucht. Eine gewisse Rauigkeit scheint förderlich für den Prozess der Osseokonduktivität zu sein. Durch jene vergrößert sich die Oberfläche und die Adsorptionskapazität für das Adhäsionsprotein Fibrinogen [16]. Unabhängig davon, sind die geometrischen Aspekte eines Proteins ein wichtiger Faktor bei der Adsorption. Je nach verfügbarer Fläche kann es zu unterschiedlicher Anlagerung von Proteinen kommen. Bei eingeschränktem Platzangebot, wird ein Protein lediglich eine platzsparende Anlagerung erreichen. Ist eine Oberfläche unbeladen, hat ein Protein prinzipiell die Möglichkeit sich flächig anzulagern, es kann zu strukturellen Veränderungen kommen. Wie zuvor erwähnt spielt auch die Gestaltung der Bindungsstellen eine Rolle, es kann beispielsweise zu einer Selektion (Kanal-Proteine) oder zu einer verstärkten Affinität durch Liganden kommen.

Proteinadsorption ist einer der ersten Vorgänge der stattfindet wenn ein Implantat mit Blutserum oder Gewebsflüssigkeit in Kontakt kommt und ist maßgeblich für die Biokompatibilität eines Werkstoffs verantwortlich [17]. Untersuchungen zeigten, dass Oberflächenmodifikationen die Fibrinadsorption und Thrombozytenaktivierung verändern [18, 19, 20, 21]. So ist es denkbar, hierdurch die Sekundärstabilität (bzw. Osseointegration) eines Implantats zu beeinflussen. Durch die Attraktivierung von Glykoproteinen (z.B. Zytokinen) und Zellen (Thrombozyten, Granulozyten) könnte die erste Phase der Implantateinheilung, die sterile Entzündung, gefördert werden. Die Adsorption von Blutkomponenten (z.B. Fibrinogen) und Zellproteinen wie Selektin und Integrin vermittelt erst die Adhäsion von Thrombozyten [22, 23, 24, 25]. Durch, von den Thrombozyten sezernierte, Wachstumsfaktoren wandern später osteogene Zellen an die Implantatoberfläche.

Das gezielte Aufbringen von topographischen Nanostrukturen modifiziert die elektrischen Feldstärken in der elektrolytischen Körperflüssigkeit nahe der Implantatoberfläche und beeinflusst somit die Proteinadsorption. Medizinischer Stahl eignet sich für diese Untersuchung besonders, da er an der Oberfläche eine höhere Ladungsträgerdichte, als z.B. Titanwerkstoffe besitzt. An letzteren bildet sich rasch eine TiO_2 -Halbleiterpassivierungsschicht, eine derartige Schicht wird im Stahl durch Fe_2O_3 viel langsamer ausgebildet. Die Anzahl der ladungstragenden Teilchen pro Volumen hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Oberflächenpotenzial, somit ist unter Anwendung stählerner Proben ein größerer Effekt zu erwarten.

In dieser Untersuchung sollen die Wirkungen verschiedener Ätztechniken [9] für medizinischen Implantatstahl 316 LVM (1.4441) im Hinblick auf die Oberflächentopographie und deren biologisches Verhalten *in vitro* verglichen werden. Folgende vereinfachte Beschreibung möge als Gedankenmodell dienen. Elektronen sind die Ladungsträger im Metall, sie befinden sich in einem „quasifreien“ Zustand, was bedeutet, dass ein Elektron einen metallischen Gegenstand zwar nicht ohne weiteres verlassen, sich aber innerhalb seiner Gitterstruktur bewegen kann. Dadurch kann elektrische Ladung transportiert werden [26]. Die meisten Metallatome sind starke Elektronendonatoren, doch im Durchschnitt gleichen sich alle elektrischen Ladungen aus, wenn kein elektrisches Feld existiert, diese Metalle werden dann als passiv bezeichnet. Ob ein Metall sich aktiv oder passiv verhält, hängt von verschiedenen Faktoren, wie dem Potential des Metalls, der Zusammensetzung und Konzentration des wirkenden Elektrolyten, der Temperatur und der (anodischen) Stromdichte ab [27]. Die Auswertung der Experimente erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskop, Rasterkraftmikroskop, einem biologischen Versuchsteil und Fluoreszenzmikroskopie. Zur Visualisierung von Zellproteinen wurden Antikörper gegen Vinkulin und Tubulin verwendet. Vinkulin ist an der Ausbildung von Adhäsionskontakten beteiligt. Der Kontakt findet zwischen Zellen und Extrazellulärmatrix statt. Vinkulin gehört zu den Plaque-Proteinen, welche die Verankerung des Zytoskeletts an der Innenseite der

Plasmamembran vermitteln. Tubulin ist an der Ausbildung des Zytoskeletts beteiligt. Konkret liegt Tubulin in Mikrotubuli, Zentrosomen und Kinozilien vor.

2 Kenntnisstand

2.1 Biokompatibilität

Neben den mechanischen Eigenschaften spielen mögliche Wechselwirkungen der Implantate mit dem umgebenden Gewebe eine außerordentlich wichtige Rolle, welche man mit dem Begriff Biokompatibilität bezeichnet (griechisch: bios = Leben; Kompatibilität = Vereinbarkeit). Metalle und Metallverbindungen können in gelöster Form chemisch-toxische Wirkungen haben und z.B. Allergien hervorrufen. Die Freisetzung von Metallpartikeln kann Bindegewebsproliferation und Fremdkörperreaktionen hervorrufen [28]. Auf elementarer Ebene bezeichnet man diese Partikelfreisetzung als Korrosion. Sie ist abhängig vom pH-Wert des umgebenden Milieus, dem Sauerstoffangebot und natürlich von der Beschaffenheit des Metalls. In anaerober, mikrobieller Entzündungssituation verliert beispielsweise der bewährte Implantatwerkstoff Titan seine Fähigkeit zur Selbstpassivierung und neigt zur verstärkten Ionenabgabe unter gleichzeitiger Bildung schwarzer suboxidischer Verbindungen. Bei diesem Vorgang geht Titan als Ti_2O_3 oder TiO^+ in Lösung und zeichnet sich durch eine Schwarzfärbung der Oberfläche aus [29].

Als biokompatibel bezeichnet man Materialien, die entsprechend ihrer Anwendung keinen negativen, eventuell sogar einen förderlichen Einfluss auf das sie umgebende Gewebe ausüben. Eine hohe Biokompatibilität spricht für eine gute Verträglichkeit. Diese wird stark von dem Korrosionsverhalten des jeweiligen Materials, Stabilität und Integration des Implantats beeinflusst. Durch eine hohe Korrosionsrate kann es unter Umständen leichter zur Ausbildung von Allergien kommen. Jene ist in der initialen Kontaktphase zum Gewebe relativ hoch und kann durch chemische Vorbehandlung im Labor, zum Beispiel durch spezielles Abbeizen (pH 0-1) reduziert werden [5,30].

Die Reaktion des Gewebes auf das Implantat lässt sich unter anderem histologisch untersuchen. Man unterscheidet biotolerante und biopassive Werkstoffe. Zu Ersteren zählen Co-Cr-Mo-Verbindungen, bei denen sich eine starke Bindegewebsschicht zwischen Implantat und Knochen bildet. Bei Implantation biologisch-passiver Stoffe wie Tantal, Titan oder Aluminiumoxid kommt es in der Regel zur Ausbildung einer lediglich 30-40 µm breiten Bindegewebsschicht [5] und damit zu einer größeren Sekundärstabilität. Nur durch eine physiologische Belastung von Implantat und Knochen kann ein physiologischer Knochenumbau (remodelling) stattfinden. Ohne, beziehungsweise bei Vorhandensein einer filigranen Bindegewebsschicht ist eine direkte Lastübertragung möglich [31]. Die Entstehung jener ist multifaktoriell. Bei einer verminderten Primärstabilität, beispielsweise durch Belastung während der Einheilphase, ist die Entstehung einer breiteren Bindegewebsschicht zu beobachten [32, 33]. In vitro sind Vitalität, Differenzierung und Proliferation der Zelltestreihen wichtige Parameter, die zur Beurteilung der Biokompatibilität herangezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise neben der Entwicklung der Zellzahl und Zellaktivität, die Ausbildung und Lokalisation zweier Zellproteine beobachtet.

2.2 Oberflächenmodifikation

Da die Implantatoberfläche in direktem Kontakt zu dem umgebenden Gewebe, bzw. Blut-/Serumbestandteilen (Fibrin, Albumin, Thrombozyten) steht, liegt es nahe, dass auch ihre topographische Modifikation von Bedeutung ist [34, 8]. Abhängig von der Indikation eines Implantats kann eine schnelle Protein- und Zellbesiedlung oder eine absolute Isolation zu umgebenden Geweben und Blutbestandteilen gewünscht sein. Ferner wurden urethrale Katheter, um vor aufsteigenden Infektionen zu schützen, in zahlreichen Experimenten mit Silber beschichtet [35]. Die Silberbeschichtung verhindert die Adhäsion und das Wachstum sowohl gram-negativer, als auch gram-positiver Bakterien [36]. Cormio et al. stellten fest, dass zum Zwecke einer Infektionsprophylaxe Oberflächen mit pharmazeutisch wirksamen Bestandteilen, wie Antibiotika

beschickt werden können [37]. Um die Implantatintegration im Gewebe zu fördern, gilt es die Proteinadsorption und die Besiedlung mit Zellen zu fördern. Sowohl die Beschickung mit bestimmten wachstumsfördernden Proteinen, wie BMP [38, 9], als auch die gezielte Topographieänderung können dies beschleunigen. Bauer zeigte in seiner Untersuchung, dass die Biokompatibilität von TiO₂-Nanoröhrenschichten mit bestimmten Durchmessern im sub-100 nm-Bereich auf titanbasierten Implantatoberflächen deutlich erhöht ist [39]. Der positive Einfluss auf Adhäsion, Proliferation, Differenzierung und Migration der relevanten Zellen (mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, Osteoblasten, Endothelzellen und Osteoklasten) ist bei einem Röhrendurchmesser von 100 nm nicht mehr zu beobachten. Vielmehr zeigt sich in diesem Bereich die Apoptose der untersuchten Zellen. Baier konnte zeigen, dass bei gleichem Metall eine unterschiedliche Oberflächenenergie zu einer unterschiedlichen Gewebeintegration führt [40]. Krüger beschäftigte sich mit der Erhöhung der Benetzbarkeit von Metalloberflächen mittels Plasmabeschichtung um die Implantateinheilung zu verbessern [41]. Der Einfluss der Rauigkeit von Titan- und Stahlproben wird kontrovers diskutiert.

2.3 Materialabrieb

Die Primärstabilität ist vor allem in beanspruchten Regionen von besonderer Bedeutung. Durch die mechanische Befestigung eines Osteosyntheseimplantats und die Ruhigstellung der beteiligten Knochenfragmente kann eine möglichst narbenfreie Ausheilung erreicht werden. Auch die Einheilungsphase wird durch Ruhigstellung des versorgten Gebietes günstig beeinflusst. Durch ungenügende Fixierung kann es zu Fehlstellungen und Ausbildungen von Pseudoarthrosen kommen. Um eine Winkelstabilität (bei Wechselbelastungen mit langem Hebelarm) bei Systemen für Tibia und Femur beispielsweise zu erlangen wurden Plattensysteme mit verschiedenen Winkeln untersucht. Hierbei sind auch anfallende Implantatspäne beim Einbringen der Schraube in das Gewinde zu beachten [42]. Durch sogenanntes Reibschweißen kommt es zu einem starken Verbund

bei Titansystemen dieser Art. Nach Implantation von Hüft- und Knieendoprothese stellten Müller-Karow et al. einen Zusammenhang zwischen Lockerung des Implantats und Abrieb im Prothesen-Knochen Interface fest [28]. Abhängig von dem verwendeten Material entstehen Metall-, Polyethylen- und Knochenpartikel welche einen weiteren Abrieb im Gelenkspalt unterhalten. Es kann zur Entstehung von Granulationsgewebe und Fremdkörperreaktionen, infolge dieser zu Knochendefekten, kommen [43]. Bei der Untersuchung von künstlichen Hüftgelenken zeigten Manley und Serekian, dass bei Belastung Biege- oder Torsionskräfte entstehen und es zu einem erhöhten Abrieb zwischen Hüftkopf und Konus kommt [44]. Durch die hohen punkt- oder linienförmigen Belastungsspitzen, die bei einem Impingement oder einer Luxation der Hüftprothese auftreten, können je nach Prothesen-Material ein erhöhter Polyethylen-Abrieb am Insertrand oder Randbrüche und Abplatzungen bei keramischen Pfannen auftreten [45].

2.4 Metallische Biomaterialien

In der medizinischen Industrie werden verschiedene Metalle und Metallegierungen zur Implantatherstellung genutzt. Sie finden in mannigfaltigen Indikationen Anwendung, etwa als Osteosyntheseplatten aus Titan oder Stahl, Stents, Hüftgelenksprothesen, Tibiakopfprothesen oder als Cochlea-Implantate. Je nach Metall und Legierung haben die Werkstoffe stark unterschiedliche Eigenschaften und Anwendungen. Man unterscheidet grundsätzlich Edelmetalle, deren Normalpotential positiv gegenüber der Wasserstoffelektrode ist, sie sind sehr korrosionsbeständig, und in Nicht-Edel-Metalle. Für die elektronische, atomische Struktur und den größten Teil der physikalischen Eigenschaften fester Stoffe sind maßgeblich die starken interatomaren Kräfte verantwortlich. Zu den stärkeren interatomaren Bindungen zählen ionische, kovalente oder metallische [46]. Da bei metallischen Bindungen die Valenzelektronen delokalisiert sind, weisen sie besondere elektrische Eigenschaften auf. Die Modellvorstellung beschreibt eine kristallähnliche Anordnung der Atomkerne [47]. Dies entspricht einem dreidimensionalen, sich

wiederholenden Muster. Man geht von der Vorstellung aus, dass die Valenzelektronen vergleichbar mit einem gasförmigen Medium, dazwischen zirkulieren [47]. Je dichter das Kern-Elektronen-Konstrukt, desto stärker sind die Bindungen, dies entspricht dem Zustand der niedrigsten Energie [46]. Des Weiteren ist es für Metalle charakteristisch, dass es beim Erstarren einer Schmelze zur Ausbildung von Kristalliten, sogenannten Körnern kommt. Aufgrund eingeschränkter Ausbreitung, durch zuvor erstarrte Bereiche nehmen Kristalle eine andere Ausrichtung vor, man bezeichnet sie dann auch als Polykristalle. Diese Bereiche unterscheiden sich lediglich in ihrer dreidimensionalen Anordnung, bei sonst gleicher Gitterstruktur und werden durch sogenannte Korngrenzen getrennt. Man unterscheidet weiter in Groß- und Kleinwinkelkorngrenzen. Sie differieren in der Größe ihrer Orientierungsunterschiede. Großwinkelkorngrenzen weisen einen Winkel von über 15° auf, Kleinwinkelkorngrenzen entsprechend einen kleineren. Letztere entstehen auch durch Stufenversetzungen bei der Kristallerholung.

Im Folgenden sollen die bedeutsamen Vertreter der medizinisch genutzten Metalle kurz vorgestellt werden.

2.4.1 Gold und Silber

Gold zählt zu den Edelmetallen. Unlegiert ist es weich und Säuren gegenüber sehr beständig (Ausnahme: Salpetersäure-Salzsäure-Gemisch). Erhitzte Säuren und Cyanid-Lösungen beispielsweise sind aber durchaus in der Lage Gold zu lösen. Früher wurde die Reinheit von Gold in Karat angegeben, inzwischen verwendet man Promille-Angaben. Goldlegierungen mit Anteilen von Zink, Indium, Zinn, Cadmium oder Gallium senken die Schmelztemperaturen und die Oberflächenspannung der Schmelze. Platin, Kupfer und Nickel erhöhen die Härte der Legierung. Silizium verhindert die Oberflächenoxidation. Das Edelmetall findet Anwendung in der Optik (Wärmereflektor, Sputtern), Elektrotechnik, Medizin (Zahnmedizin, Rheumatherapie, Gehörknöchelchenerersatz), als Katalysator in der Chemie, und natürlich in der Schmuckherstellung. Durch seine Korrosionsbeständigkeit und Duktilität ist es ein häufig verwendeter

Werkstoff in der Zahnheilkunde, in der Medizin oft als Titan-Gold-Legierungen mit einer hohen Festigkeit.

Auch Silber zählt zu den Edelmetallen. In seiner Reinform besitzt es eine hohe elektrische und thermische Leitfähigkeit. Es ist weich, dehnbar und relativ reaktionsträge. In legierter Form kann die Härte gesteigert werden. Allerdings reagiert Silber an der Luft mit Schwefelwasserstoff zu Silberoxid. Das Edelmetall löst sich in Cyanid-Lösungen und oxidierenden Lösungen. Ähnlich wie Gold findet Silber Anwendung in der Elektrik, Industrie (Katalysator bei Partialoxidationen), Medizin und Zahnmedizin, Fototechnik und der Schmuckherstellung. Silber hat eine bakterizide Wirkung, welche beispielsweise durch Beschichtung medizinischer Instrumente (endotracheale Tuben) und in Form kolloidalen Silbers genutzt wird. Silber wird häufig mit Gold, Kupfer, Palladium Chrom, Mangan oder Nickel legiert.

Gold und Silber werden aufgrund ihrer geringen mechanischen Beanspruchbarkeit nur in bestimmten Indikationen, etwa zur Beschichtung, aber auch in der Knochenchirurgie verwendet [48]. In zahlreichen Versuchen zeigte Silber eine starke antibakterielle Wirkung [49, 50, 36]. Silber gibt kontinuierlich positiv geladene Ionen ab, welche bakterielle Enzyme und damit den Zellstoffwechsel zerstören [51,52]. Scheinbar führen die Silberionen zu einer Verbindung der SH-Gruppen von bakteriellen Enzymen und damit zu ihrer Inaktivierung [53, 54]. Feng QL et al. untersuchten den antibakteriellen Effekt von Silber auf E. coli und S. aureus. Die DNA scheint durch Behandlung mit Ag(+) ihre Replikationsfähigkeit zu verlieren. Sie beobachteten die Ablösung der Zytoplasmamembran von der Zellwand und elektronendichte Akkumulationen von Silberionen und Schwefel in den Zellen.

2.4.2 Reintitan und Titanlegierungen

Der Forscher Leventhal schlug nach guter Knochenreaktion in Tierversuchen Titan zur Fixierung von Frakturenden vor. Maßgeblich dadurch begann 1940 Titan eine zunehmend wichtige Rolle als Implantatwerkstoff einzunehmen [55].

Das Metall wird inzwischen mannigfaltig eingesetzt, beispielsweise in der maritimen Industrie, Pyrotechnik, Luftfahrt, Elektronik und natürlich in der Medizin. Die häufigsten Titanmineralien sind Oxide des Titans (Anatas, Brookit, Rutil) und Titanate (Ilmenit, Perowskit, Titanit). Reintitan (commercially pure titanium, ASTM F67) zeichnet sich durch eine hohe mechanische Festigkeit bei gleichzeitig geringer Dichte, einen geringen Elastizitätsmodul und eine besondere Korrosionsresistenz aus. Durch Zulegieren verschiedener Elemente, beispielsweise Tantal, Niob, Molybdän oder Eisen, versucht man mechanische Mängel, wie geringe Zugfestigkeit und Biegsamkeit zu minimieren und die Belastbarkeit zu erhöhen [56]. Für medizinische Indikationen wird meist Niob, Vanadium und Aluminium zulegiert. Die Dichte von Titan beträgt $4,5 \text{ g/cm}^3$, der E-Modul 105 GPa. Die Zugfestigkeit variiert, je nach Legierung zwischen 400 und 1100 N/mm^2 . Die elektrische und thermische Leitfähigkeit ist geringer als die von Stahl. Reines Titan ist duktil. Des Weiteren werden α - und β -Titanlegierungen unterschieden. Die unterschiedlichen Phasen lassen sich durch bestimmte Legierungskomponenten stabilisieren. Sauerstoff, Palladium und Aluminium tragen zur Bildung der α -Phase, Zirkonium und Niob zum Beispiel zur Stabilisierung der β -Phase bei. Letztere sind aus medizinischer Sicht besonders erfolgsversprechend, da sie durch ihre Mikrostruktur im Vergleich zu Edelstählen einen viel geringeren Elastizitätsmodul (reduziertes Stress-Shielding Potential), bei erhaltener Festigkeit und geringem Gewicht aufweisen [57]. Durch ihr starkes Passivierungsverhalten sind sie sehr korrosionsbeständig. Die Festigkeit des Titans wird von den prozentualen Anteilen an Sauerstoff (O), Stickstoff (N) und Kohlenstoff (C) bestimmt, wobei N mit einer zweifachen Effektstärke den größten Einfluss hat [47]. Das Übergangsmetall ist in vielen auch organischen Säuren beständig, nicht jedoch in konzentrierter Schwefelsäure. Die geringe Korrosionsneigung des Titans ist auf die Ausbildung einer passivierenden Oxidschicht zurückzuführen, welche sich spontan bei Sauerstoffexposition oder Kontakt mit Gewebsflüssigkeiten bildet [58]. Sie besteht vorwiegend aus Titandioxid, kann auf Legierungen jedoch auch V, Nb und Al enthalten [58, 59]. Ihre Dicke beträgt etwa 2-5 nm. Ein wesentlicher Nachteil ist ihre geringe Verschleißfestigkeit, welche zu einem

erhöhten Abrieb unter Belastung führt [60, 61]. Dieses Phänomen und die darauf mögliche three-body-abrasion sind sehr kritisch zu betrachten, da neben Titan zelltoxische Bestandteile wie Aluminium und Vanadium freigesetzt werden können [62, 63, 64, 58]. Als third-body Partikel treten oxidiertes Titan (verursacht Schwarzfärbung), Legierungsbestandteile wie Ti-6Al-4V oder gelöster Knochenzement (PMMA) auf. Letzterer findet sich auch durch Lockerung der Implantate bei Belastungsspitzen im interartikulären Raum. Bei Belastung schädigen die interartikulären Teilchen die Gelenkflächen enorm [65]. Titan verliert seine Fähigkeit zur Selbstpassivierung in entzündetem Gewebe mit niedrigem pH-Wert und neigt zur verstärkten Ionenabgabe unter gleichzeitiger Bildung schwarzer suboxidischer Verbindungen. Titan geht als Ti_2O_3 oder TiO_2 in Lösung und kann zu einer Schwarzfärbung im Gewebe führen [29]. Wie erwähnt treten bei einem Impingement oder einer Luxation von Endoprothesen Belastungsspitzen auf, abhängig vom Material kann dies zu erhöhtem Polyethylen-Abrieb oder Abplatzungen bei keramischen Gelenkpfannen führen [45]. Biege- und Torsionsbelastungen im Bereich zwischen Hüftkopf und Konus führen zu einem Anstieg von Abriebpartikeln [44]. Nachteilig ist auch die hohe Steifigkeit der medizinischen Titanlegierungen, welche nach jahrelanger Belastung eines Hüftimplantats beispielsweise zum sogenannten Stress-Shielding und damit zum periimplantären Knochenabbau führt. Dieses Phänomen geht mit einer Implantatlockerung einher. Mit zunehmender Lockerung erhöht sich der Verschleiß im Prothesen-Knochen Interface und setzt je nach verwendetem Material abrasive Stoffe frei [66]. Titan wird häufig in geringer Konzentration (0,01-0,1% Massenanteil) Stahl zulegiert um eine hohe Festigkeit, Duktilität und Zähigkeit zu erreichen. Außerdem unterdrückt es die interkristalline Korrosion in rostfreien Stählen.

2.4.3 Co-Cr-Legierungen

1936 wurde beobachtet, dass eine molybdänhaltige Gusslegierung auf Kobalt-Chrom-Basis sich korrosionsbeständig zeigt. Zunächst fand diese Legierung unter dem Handelsnamen Vitallium in der Zahnmedizin, ab 1943 in Form von Nägeln, Schrauben, Osteosyntheseplatten und Endoprothesen in der Medizin

Anwendung. Die Dichte dieser Legierungen bewegt sich um $8,4 \text{ g/cm}^3$, der E-Modul beträgt 211 GPa und die Zugfestigkeit 880 N/mm^2 . Diese Legierungen haben eine weit zurückreichende Geschichte in der maritimen Industrie, der Biomedizin und in verschiedenen Bereichen der Luftfahrttechnik. Sie zeichnen sich durch eine hohe Festigkeit, Korrosionsbeständigkeit und durch das Fehlen von Magnetisierbarkeit aus und wurden daher in der U-Boot Industrie genutzt. In der Luftfahrtindustrie finden sie aufgrund hoher Ermüdungsfestigkeit in Form von WC-Co-Cr-Legierungen Anwendung als Verschleißschicht auf Gleitflächen von Hydraulikzylindern, Flugturbinen und Flügelverstellrichtungen [67]. Aktuell finden Co-Cr-Legierungen gehäuft Anwendung in der Orthopädie [62] und der prothetischen Zahnmedizin.

Sie bestehen zu 58-70% aus Co, zu 26-30% aus Cr und einem variablen Anteil an Stickstoff. In einigen Legierungen finden sich auch Nickel, Molybdän und Wolfram [47]. Mangan und Molybdän stabilisieren die Ausbildung eines austenitischen Gefüges und erhöhen die Korrosionsbeständigkeit. Der hohe Chromgehalt ist für die Ausbildung einer passivierenden Chromoxidschicht verantwortlich; diese schützt das Implantat vor Lochfraß und Korrosion [68]. Allerdings kann die Oxidschicht das Lösen von Ionen nicht ausschließen und so kommt es wie beim Titan, unter Umständen zur Freisetzung zytotoxischer Legierungskomponenten, wie beispielsweise Kobalt [62, 69, 70]. Die mikrostrukturellen Eigenschaften sind stark vom Herstellungsprozess abhängig. So kann es aufgrund von Konglomeraten zu ungünstiger Kraftverteilung, aber auch zu gesteigerten Ermüdungserscheinungen kommen [47]. Untersuchungen von Azetabulum-Pfannen aus UHMWPE (ultra-high molecular weight polyethylene) in Kontakt mit Gelenkflächen aus Metall und Keramik und mit PMMA (Polymethyl-Metacrylat) als third-body zeigten belastungsabhängig starke Schädigung durch die Partikel zwischen den Gelenkflächen [71].

2.4.4 Stahl und Stahllegierungen

Stahl zeichnet sich durch eine von Dichte $7,85 \text{ g/cm}^3$ und einen E-Modul von circa 210 GPa , je nach Vorbehandlung, aus. Die Zugfestigkeit beträgt 255 bis

2180 N/mm². Definitionsgemäß ist Stahl eine Legierung aus Eisen (Hauptbestandteil) und Eisenkarbid (Kohlenstoff: 0,002%- 2,06%). Die mechanischen Eigenschaften des Stahls sind stark vom Kohlenstoffgehalt der Legierung abhängig. Es gibt unlegierte, niedrig legierte und hoch legierte Stähle. Diese Einteilung richtet sich nach dem prozentualen Anteil der Legierungselemente, beträgt dieser zwischen 1 und 5%, gilt der Stahl als niedrig legiert. Daraus ist ersichtlich, dass bei überschreiten der 5%-Marke ein Stahl als hoch legiert eingestuft wird, unlegierte Stähle enthalten lediglich Kohlenstoff als zusätzliches Element. Wenn die Legierungselementmarke steigt, erhöht sich die Festigkeit, aber das Material wird auch spröder. Abhängig vom Kohlenstoffanteil, der Umgebungstemperatur und Abkühlgeschwindigkeit bilden sich verschiedene Phasen aus, die im Eisen-Kohlenstoffdiagramm dargestellt werden. Folgende Phasen können beschrieben werden:

Austenit: Benannt nach Sir William Chandler Roberts-Austen (1843-1902) stellt diese Phase die γ -Mischkristalle des Eisens dar. In der Modellvorstellung entspricht der Aufbau einer kubisch-flächenzentrierten Struktur. Kohlenstoff ist hier mit einem maximalen Prozentsatz von 2,06 gelöst.

Ferrit: Ferrit bildet ein kubisch-raumzentriertes Kristallgitter aus. Hier sind maximal 0,001- 0,1% C löslich. Es ist weicher und korrosionsanfälliger als Austenit. Durch Beeinflussung der Abkühlung kann sich eine höher nickelhaltige Martensitphase statt des Ferrits bilden. Diese ist wiederum härter und zeigt eine Gitterstruktur, welche durch Umklappung aus dem Gitter des Austenits in eine tetragonal verzerrte Anordnung entsteht.

Zementit: Ist ein sehr hartes Eisenkarbid, dessen Kristallstruktur aus 12 Fe-Atomen und 4 C-Atomen besteht, angeordnet in einem orthorhombischen Gitter. Man unterscheidet des weiteren Primär-, Sekundär- und Tertiärzementit.

Perlit: Bezeichnet ein Eutektikum, zu dessen Ausbildung es bei einem C- Gehalt zwischen 0,02 % und 6,67 % kommt. Das Phasengemisch selbst enthält maximal 4,29 % C. Auffallend ist seine Lamellenstruktur, die aufgrund der lokalen C-Konzentrationsunterschiede entsteht. In der kohlenstoffarmen

Region liegt Ferrit vor, in der kohlenstoffreichen Zementit. Die Lamellenbreite nimmt mit zunehmender Abkühlgeschwindigkeit ab.

Ledeburit: Ist ein Eutektikum aus Austenit und Zementit mit einem hohen Kohlenstoffgehalt (4,3 %). Es kann eine Unterteilung in Ledeburit I (Austenit + Zementit) und Ledeburit II (Perlit + Zementit) vorgenommen werden.

Bainit: Es besteht wie Perlit aus Ferrit und Zementit, jedoch unterscheidet es sich charakteristisch von diesem. Bei seiner Entstehung kommt es zu Umklappungen im Kristallgitter und Diffusionsvorgängen.

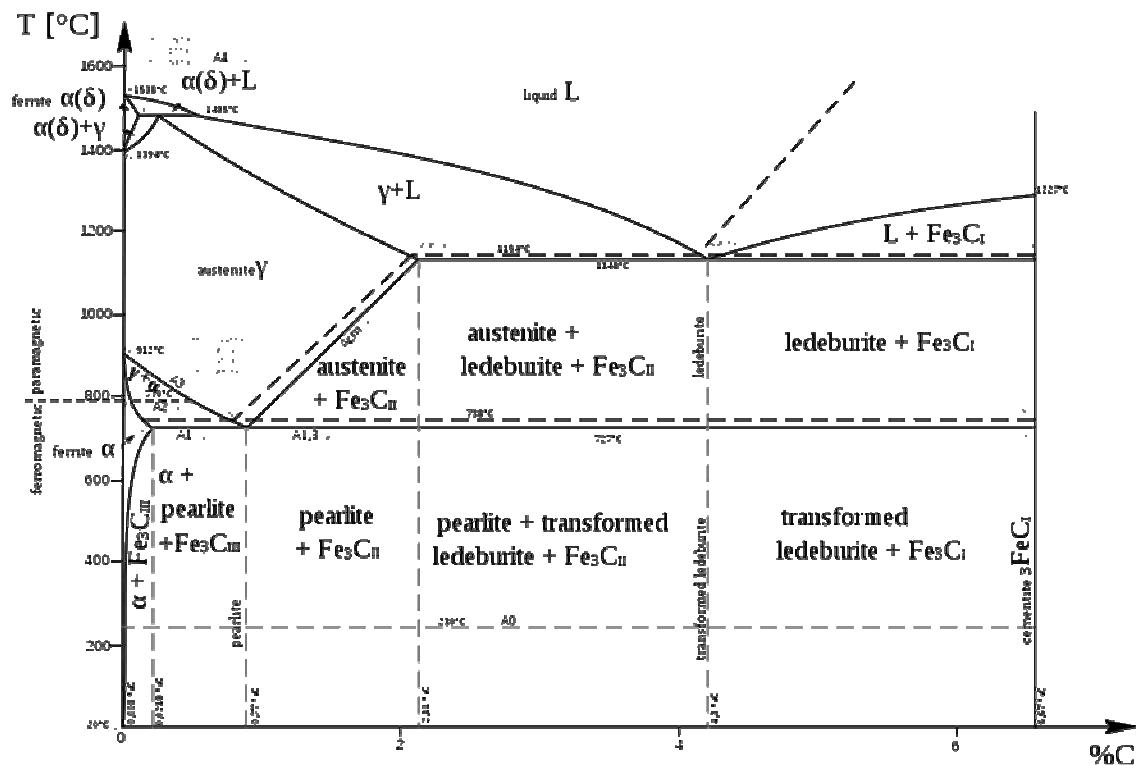


Abbildung 1 Eisen-Kohlenstoff-Diagramm; entnommen aus [94]

Abbildung 1 zeigt die Einteilung der zuvor beschriebenen Phasen des Stahls. Die Eigenschaften des Stahls können durch Legieren, Wärmebehandlung oder Kaltverformung verändert werden. Beim Erstarren der Schmelze entstehen sogenannte Körner, mit dazugehörigen Korngrenzen, welche Trennlinien unter ihnen darstellen. An den Korngrenzen kann es während der Herstellung zu

Entmischungsprozessen kommen, welche einen Einfluss auf die Werkstoffeigenschaften haben.

Man unterscheidet unter anderem Baustahl (zerspanbar, verformbar), nichtrostende Stähle (durch Zulegieren von Cr und Ni), säurebeständige Stähle (hoher Chromgehalt). Außerdem gibt es die Bezeichnung Edelstahl. Sie beschreibt legierte und unlegierte Stähle mit einem hohen Reinheitsgrad. Sogenannte Eisenbegleiter (z.B. S, P) sind hier nur in einem geringen prozentualen Anteil vorhanden. Chromstahl, Chromnickelstahl und Titanstahl gehören zu den legierten Edelstählen, die namensgebenden Komponenten verstärken Eigenschaften wie Korrosionsbeständigkeit, Verformbarkeit und etwa reduzierte thermische Leitfähigkeit. Edelstahl findet aufgrund seiner besseren mechanischen Eigenschaften, wie Festigkeit, Dehnbarkeit usw. im Vergleich zum biokompatibleren Titan als Material für kardiale Stents beispielsweise bevorzugt Anwendung. Kontrovers diskutiert werden Kontaktreaktionen auf Legierungselemente wie Nickel, Chrom und Molybdän, welche unter Umständen auch als Triggerfaktor für die Restenose bei kardialen Stents verantwortlich gemacht werden [72]. Ein Lösungsansatz in diesem Anwendungsgebiet ist die Beschichtung mit biokompatiblen, stabilen Stoffen wie Tantal/Tantaloxid [73].

Der im Experiment verwendete Stahl mit der Werkstoffnummer 1.4441 gehört zu den austenitischen säure- und rostbeständigen Stählen. Synonym wird er vom American Iron and Steel Institute (AISI) als 316L bezeichnet. Die nachfolgende Tabelle zeigt prozentual die Bestandteile.

Tabelle 1 Prozentuale Zusammensetzung des Implantatstahls 1.4441

C	Si	Mn	P	S	Cr	Mo	Ni
max. 0,03	max. 1,00	max. 2,00	max. 0,0025	max. 0,01	17- 18,50	2,50- 3,20	13,00- 15,50
V	W	Ti	Cu	Al	Nb	B	N
			max. 0,10				max. 0,10

Dieser Stahl ist nicht ferromagnetisch, des Weiteren zeichnet er sich durch leichte Verarbeitung, gute mechanische Eigenschaften und eine hohe

Korrosionsbeständigkeit aus. Um eine maximale Ausbildung des Austenits und eine Supression der anderen Phasen zu erreichen, wird Nickel, Kohlenstoff, Kobalt, Niob oder Mangan zulegiert. Kohlenstoff fördert allerdings die interkristalline Spannungsrisskorrosion durch Cr_{23}C_6 -Präzipitate (Chromkarbid) im Bereich der Korngrenzen und wird daher möglichst gering zulegiert. Ein höherer Chromgehalt fördert die Entstehung einer Schutzschicht durch Cr_2O_3 (Chromoxid). Molybdän verschafft dem Stahl eine erhöhte Korrosionsbeständigkeit durch die Ausbildung einer dünnen Passivschicht (1-5 nm). Diese ist jedoch nicht inert und nach beispielsweise mechanischer Zerstörung nur unter bestimmten Vorraussetzungen (Sauerstoffangebot, geringe Passivierungsstromstärke) regenerationsfähig [74]. Durch den relativ hohen Elastizitätsmodul im Vergleich zur Kortikalis kann es gerade bei Stahlimplantaten zur Knochenresorption aufgrund von Stress-Shielding kommen [68].

3 Material und Methode

3.1 Material

Nachstehend sind die zur Versuchsdurchführung verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt.

Benötigte Geräte

- Zentrifuge (Fa. Kendro GmbH, Langenselbold)
- Magnetrührer (Fa. IKA Werke GmbH & CoKG, Staufen)
- pH-Meter (Fa. WTW GmbH, Weilheim)
- Reinstwasseranlage Purelab Ultra (Fa. USF Deutschland, Ransbach)
- Analysenwaage (Fa. Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt)
- Kühl-Gefrierkombination (Fa. Bosch GmbH, München)
- Fluoreszenzmikroskop (Lehrstuhl für Molekulare Infektionsbiologie)
- Mitutoyo SJ-201 Profilometer (Mitutoyo, Japan)
- Wasseraufbereitungsanlage (USF PURELAB PLUS)
- Exsikkator (Glaswerk Wertheim, Wertheim)
- Vakuum- Membranpumpe (Fa. KNF Neuberger, Freiburg)
- Lichtmikroskop (Ernst Leitz GmbH, Wetzlar)
- Rasterelektronenmikroskops, REM (Zeiss DSM 940, Zeiss, Oberkochen)
- DC- Magnetron (Fa. Emitec, Lohmar)
- Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope, Autoprobe CP, Veeco Instruments)
- Schleifmaschine AUTOMATA PRESS AIR TF 250 (Fa. Wirtz, Aldenhoven)
- Ultraschallbad (Fa. Bandelin, Berlin)

Weitere Materialien

- Objektträger mit Mattrand (Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg)
- Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner, Frickenhausen)
- Filterpapier (Schleicher & Schüll GmbH, Dassel)

- Präparateständer (Eigenbau FMZ Würzburg)
- Reaktionsgefäße mit Deckel (Fa. Sarstedt AG & Co, Nürnberg)
- Deckgläschen für Mikroskopie (Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg)
- Probenplättchen mit Loch, 15 mm (Eigenbau FMZ Würzburg)
- Feuchtkammer, Glasschale rund (Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg)
- Magnetrührstäbchen (Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg)
- 1.4441 Stahl/AISI 316LVM (Fa. Ergste Westig GmbH, Schwerte, Germany)
- Siliziumkarbid-Naßschleifpapier (Fa. Struers GmbH, Willich)
- Filzplatte (Fa. Struers, Willich)
- OP-S Suspension (Fa. Struers, Willich)
- V2A- Beize (Buehler GmbH, Düsseldorf)
- Stahlbeize:
 - 50% H₂O (USF PURELAB PLUS), 40% HF (Fa. Merck), 10% HNO₃ (Fa. Merck)
- Reinstwasser
- PBS-Puffer
- Farbstoff Hoechst 33258
 - Bisbenzimid, Hoechst 33258 Trihydrochloride (Fa. Sigma GmbH, Traufkirchen),
 - Stammlösung: 5 µg/ ml PBS
 - Arbeitslösung: 20 µl Stammlösung/ 1000 µl PBS
- Mowiol (Hoechst AG, Frankfurt)
- Primäre und sekundäre Antikörper (Verdünnung nach Datenblatt)
 - Vinkulin: 1:100 in PBS (Sigma, Traufkirchen)
 - Tubulin: 1:200 in PBS (Sigma, Traufkirchen)
 - Sekundärer Antikörper gekoppelt an Fluoreszenzfarbstoff Cy2, 1:75 in PBS (Dianova, Hamburg)
- Aceton (Fa. Merck, Darmstadt)
- Methanol (Fa. Merck, Darmstadt)
- Ethanol 96 % (Fa. Brückemann GmbH & Co KG, Heilbronn)
- Pufferlösung, pH 7 und pH 10 (Fa. AppliChem GmbH, Darmstadt)

- Natronlauge 5 M, zur Einstellung des pH-Wertes (Fa. Merck, Darmstadt)
- Salzsäure 37 %, zur Einstellung des pH- Wertes (Fa. Merck, Darmstadt)

Falls nicht gesondert vermerkt, wurden die Chemikalien von der Firma Merck AG, Darmstadt verwendet.

Fibroblastenzelllinie Maus L-929

- ATCC-Bezeichnung CCL-1 (American Type Culture Collection), auch als NCTC Klon 929 (National Collections of Type Cultures) bezeichnet

Polystyrol

- Sterile 24-Well-Kulturschalen (Fa. Nunc A/S, Denmark)
- Zellkulturflaschen (Fa. Falcon, Heidelberg)
- ELISA-Reader (Fa. Tecan, Crailsheim)
- CASY-1, Modell TTC Cell Counter und Analyser (Schärfesystem GmbH, Reutlingen)

PBS- Puffer

- 1000 ml Reinstwasser
- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KH_2PO_4
- 2,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$
- 0,2g KCl

Autoklavieren erfolgte bei 121 °C (20 min.)

DMEM- Kulturmedium für Fibroblasten (Ingredienzien der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

- 440 ml Dulbecco´s Mod Eagle Medium mit 0,11 g/l Na Pyr, mit Pyridoxin
- 50,0 ml Foetal Calf Serum (FCS), EU approved origin (South America), Mycoplasma and virus screened, performance tested (inaktiviert durch 30 min Inkubation bei 56 °C, um Komplementfaktoren zu zerstören)

- 5,0 ml Penicillin-Streptomycin 10000 µg/ml
- 5,0 ml Hepes Buffer (Solution 1M)

Accutase (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

Proliferations- Reagent WST- 1 (Fa. Boehringer, Mannheim)

- Farbstoff (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3 Benzendisulfonat)

WST (water soluble tetrazolium salt) dient zur colorimetrischen Messung von Enzymaktivitäten der Succinatdehydrogenase, einem Enzym der Mitochondrien. In oxidiertem Zustand ist das Salz (Tetrazolium) farblos. Durch die Aufnahme von zwei Elektronen und einem Wasserstoffatom wird es zu dem roten Formazan reduziert.

Isoton-Pufferlösung

- Natriumsulfat 9,7 g/l
- Natriumchlorid 4,0 g/l
- Dimethylolharnstoff 1,0 g/l
- Procainhydrochlorid 0,1 g/l

3.2 Methode

3.2.1 Herstellung der Stahlproben

Die Probenkörper werden aus einem Blech gewalztem 1.4441 Stahl/AISI 316LVM hergestellt. Die Scheiben haben einen Durchmesser von 15,5 mm und eine Höhe von 1mm. Peripher sind die Plättchen mit einer kleinen Bohrung zur Aufhängung, bzw. Befestigung versehen.

3.2.2 Oberflächenvorbehandlung der Stahlproben

Von den hier verwendeten Stahlproben, wurden jeweils 6 Stück in einer Schleifapparatur befestigt und wie folgt (s. 3.2.3) behandelt um eine einheitliche Ausgangssituation zu sichern und lediglich die Auswirkung der weiterführenden Behandlung untersuchen zu können. Ziel dabei war es eine möglichst ebene Oberfläche zu erzeugen, optimalerweise mit einer Rauigkeit von $3\text{nm}/\mu\text{m}^2$. Dadurch wird es möglich, viele Unebenheiten durch zuvor bestandene Strukturen zu vermeiden und allein den Effekt der Nachbehandlung auf die Topographie der Stahloberfläche zu beobachten. Durch die Behandlung ist es gelungen, Oberflächen mit einer Rauigkeit von $0,08\text{ nm}$ zu schaffen. Ein Atom hat einen ungefähren Durchmesser von $0,1\text{-}0,5\text{ nm}$, in der alten Bezeichnung mit 1 \AA ($1\text{ Angström}=0,1\text{ nm}$) angegeben.

3.2.3 Normierung des Schleif- und Polierverfahren

Zur Herstellung der normierten Proben wurde die Schleifmaschine AUTOMATA PRESS AIR TF 250 verwendet. Die Beschickung der Drehscheibe, der Anlagedruck (stufenlos) und die Drehzahl (zweistufig) sind variierbar. Ein Wasserzulauf vermeidet die schädliche Staubbildung und schwemmt abradierte Partikel ab. Die Probenkörper wurden mit Siliziumkarbid-Naßschleifpapier absteigender Körnung (s. Tabelle 2) bearbeitet. Der Anpressdruck bei diesem Arbeitsschritt betrug $1,75\text{ bar}$. Es wurde die höhere Umdrehungszahl, Stufe II gewählt.

Tabelle 2 Schleifen der Stahlproben

Körnung	Zeit (min.)
1200	5
2400	10
4000	40

Anschließend wurden die Probenkörper auf einer Filzplatte unter Zugabe von OP-S Suspension und einfach destilliertem Wasser poliert. Hierbei wurde eine

Anpresskraft von lediglich 1 bar gewählt und die Umdrehungsstufe I. Die Politur dauerte 45 Minuten. Die Reinigung der Plättchen von Poliermittel und Abrieb erfolgte in einem Ethanol-H₂O-bidestilliert-Gemisch (1:1) für 15 min im Ultraschallbad. Mögliche Rückstände wurden mit einem ethanolgetränkten Zellstofftuch vorsichtig entfernt.

3.3 Oberflächenätzen

Die polierten Proben aus medizinischem Implantatstahl wurden verschiedenen Säureätzverfahren unterzogen um eine Oberflächenmodifikation zu erreichen. Alle Experimente wurden aus Sicherheitsgründen unter einem Luftabzug im Labor durchgeführt:

(B1) Die gereinigten Proben wurden in einem Becherglas unterschiedlich lange mit V2A-Beize geätzt. Die Beizdauer betrug: 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 10 min.

(B2) In der zweiten Versuchsreihe wurden polierte Probenkörper im Becherglas mit V2a-Beize im Ultraschallbad geätzt [75]; in Intervallen von: 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min.

Zum Ausschluss einer ultraschallabhängigen Strukturausbildung wurde ein Probenkörper im Ultraschallbad in seiner Lage markiert und fixiert. Zur Befestigung der Probe an einem Teflonstäbchen diente eine Schraube. Jenes wiederum wurde durch eine Laborklemme außerhalb des Ultraschallbades gehalten.

(F) Zuletzt fand eine modifizierte Stahlbeize Anwendung.

Diese bestand aus:

- 50% H₂O
- 40% HF
- 10% HNO₃

Die Behandlungsdauer der Proben mit der Beize betrug 45 min, 90 min und 135 min.

Nach dem jeweiligen Ätzvorgang wurden die Plättchen in bidestilliertem H₂O neutralisiert und anschließend 15 min in einem 1:1 Ethanol-bidestilliertem-H₂O-Gemisch im Ultraschallbad gereinigt. Die Herstellung des Reinstwasser erfolgte durch die Wasseraufbereitungsanlage. Zur Aufbewahrung aller Proben zwischen den Arbeitsschritten und nach der Versuchsdurchführung diente ein Exsikkator. Der Behälter wurde mit Hilfe einer Vakuumpumpe unter Vakuum gesetzt.

3.3.1 Messung

Um die modifizierten Oberflächen zu charakterisieren fanden verschiedene Mikroskope Verwendung. Zur Vergrößerung und Untersuchung der Korngrenzen diente ein Lichtmikroskop. Außerdem wurde unter Anwendung eines Rasterelektronenmikroskops, die Oberflächenstruktur in Feldern von 50x50 µm, 100x100 µm und 200x200 µm Größe erfasst. Dieses Verfahren eignet sich hervorragend um kleinste Risse, Absenkungen oder Erhebungen zu untersuchen. Die Auflösung der Lichtmikroskope ist durch die Wellenlänge des sichtbaren Lichts beschränkt und für unsere Zwecke nicht ausreichend. Aufgrund des Dualismus von Welle und Korpuskel ist es möglich Objekte unter Hochvakuum mit einem fokussierten Elektronenstrahl abzutasten. Sekundärelektronen werden von der unter Umständen zuvor elektronendicht beschichteten Oberfläche emittiert und bilden einen elektrischen Strom. Detektoren werten diesen aus und wandeln die Ergebnisse in ein zweidimensionales Bild um. Die Bündelung des genutzten Elektronenstrahls durch die Magnetspulen definiert unter anderem das Auflösungsvermögen [26, 76]. Vor der Betrachtung unter dem Rasterelektronenmikroskop mussten die Stahlproben vergoldet werden um elektrische Aufladungen zu vermeiden [77]. Die Probe wurde in einem DC-Magnetron unter Vakuum plasmabeschichtet [75].

Um Strukturunterschiede im Nanometerbereich zu untersuchen diente ein Rasterkraftmikroskop. Die Messungen erfolgten im Kontaktmodus. An dem Cantilever ist eine mikroskopisch kleine Nadel befestigt, diese fährt die Probe nach einem Raster ab (Scannen). Je nach Topographie der Probe biegt sich der Cantilever entsprechend stark. Auf diesen ist ein Laserstrahl gerichtet, durch die unterschiedlich starke Ablenkung des Strahls ist eine Signalauswertung möglich, die auf die Oberflächenstruktur rückschließen lässt.

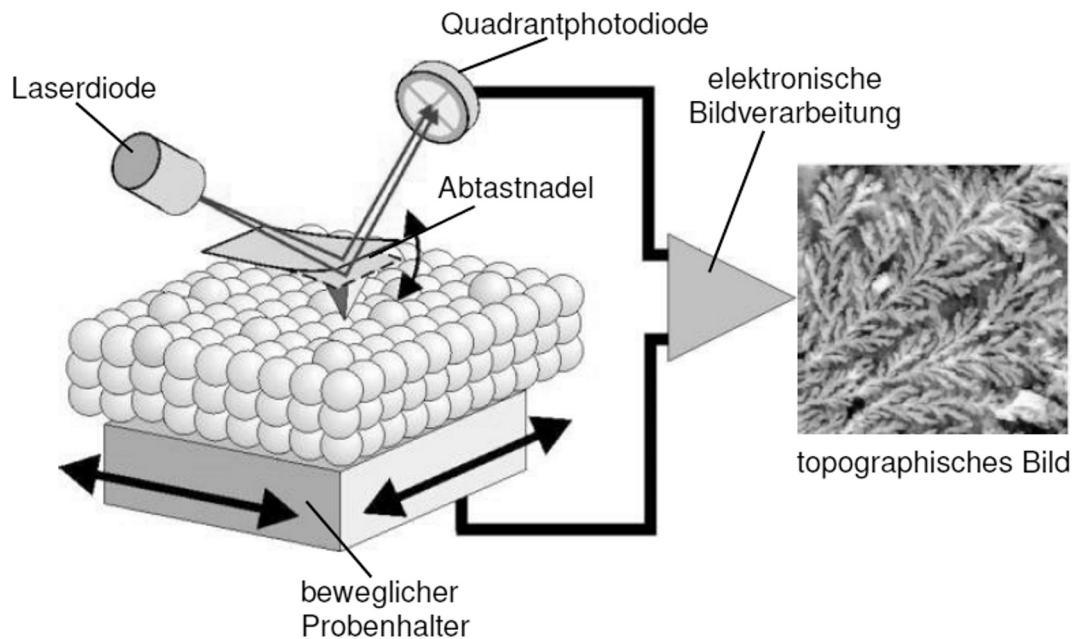


Abbildung 2 Funktionsweise eines Rasterkraftmikroskops (AFM); zur Verfügung gestellt von Moseke C, Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde, Universität Würzburg

Hierbei wurden standardmäßig Ausschnitte von $1 \times 1 \mu\text{m}$ und $10 \times 10 \mu\text{m}$, zur Übersicht und Entwicklungsbeobachtung auch $5 \times 5 \mu\text{m}$, $25 \times 25 \mu\text{m}$ und $40 \times 40 \mu\text{m}$ gescannt.

3.3.2 Oberflächenrauigkeit

Zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit unbearbeiteter, polierter und geätzter Proben diente ein Profilometer. Außerdem konnte mittels der

AFM-Software IP Auto Probe die, durch die verschiedenen Ätzverfahren erzeugte Rauigkeit ermittelt werden.

3.4 Biologischer Versuch

Um die Auswirkungen der Oberflächenmodifikation zu untersuchen bietet sich die Kultur von Fibroblastenzelllinien an [78]. Ihr biologisches Verhalten lässt auf die Biokompatibilität der Oberfläche schließen. Für die nachfolgenden Experimente wurden unbearbeitete Stahlproben, polierte Stahlproben und B2-Stahlproben verwendet. Diese wurden wie folgt gereinigt und sterilisiert:

- 10 min in 2%-ige SDS- Lösung bei 40 °C im Ultraschallbad
- 10 min in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad
- 10 min in 5%-iger Extranlösung bei 40 °C im Ultraschallbad
- 2x10 min in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad
- 10 min in Isopropanol bei 40 °C im Ultraschallbad
- 1x10 min in Reinstwasser bei 40 °C im Ultraschallbad
- 20 min Autoklavieren bei 121 °C

3.4.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen mit dem DMEM-Medium für Fibroblasten bei 37 °C unter wasserdampfgesättigter 5%-iger CO₂-Atmosphäre. Um eine Suspension mit 50.000 Zellen/ml zu erhalten, wurde das Medium aus einer Zellkulturflasche mit einer sterilen Pipette abgezogen und die verbliebenen Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gespült. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit 2 ml Accutase. Die Einwirkzeit betrug 7 min, zum Abbruch der Reaktion wurden wieder 10 ml Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden durch auf- und abpipettieren vereinzelt und im Zellzähler gezählt. Es konnte die entsprechende Verdünnung vorgenommen werden um eine Zellzahl von 50.000/ml zu erreichen, welche abermals im Zellzähler kontrolliert wurde. Je 1 ml der Suspension wurde in die Vertiefungen der Mehrfachkulturplatten, beziehungsweise auf die darin befindlichen Proben aufgebracht. In einer Platte befanden sich je vier unbearbeitete, polierte und nach dem Verfahren B2

hergestellte Proben. Vier weitere Vertiefungen wurden lediglich mit der Suspension beschickt und dienten als Referenzoberfläche. Für den WST-1 Zellaktivitätstest und die Bestimmung der Zellzahl dienten separat angesetzte Kulturplatten. Für jeden der beiden Tests in dreifacher Ausführung, da die Untersuchungen an Tag 3, Tag 5 und Tag 7 nach Aussaat durchgeführt wurden.

3.4.2 WST-1 Test

An den 3 verwendeten Probenarten wurde ein Wachstumsstimulationstest durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten leere Kavitäten der Kulturplatte. Dabei wird über die Bestimmung der Succinatdehydrogenase der Mitochondrien die Zellaktivität bestimmt. Die zuvor beschriebene Umwandlung von Tetrazolium zu farbigem Formazan findet durch die Succinatdehydrogenase statt. Zur colorimetrischen Auswertung diente der ELISA-Reader. Die Messung der Absorption erfolgte durch ein Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Der Farbumschlag ist direkt proportional zur Stoffwechselaktivität der Fibroblasten. Zur Versuchsdurchführung wurde zunächst mit einer sterilen Pipette das Medium von den Zellen abgesaugt. Dreimaliges Spülen jeder Kavität mit je 1 ml PBS beseitigte geringe, verbliebene Mediumreste. Anschließend wurden 500 µl neues Medium und 50 µl WST-Reagenz zupipettiert und für 30 min bei 37 °C und 5%-iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Danach wurden aus jeder genutzten Vertiefung der Kulturplatte 2x separat 200 µl der Lösung auf eine 96-Well-Platte überführt. Als Leerwert dienten nur mit Medium und WST-Reagenz beschickte probenkörperlose Vertiefungen [75].

3.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit dem CASY-1, Modell TTC Cell Counter und Analyser [75]. Das Funktionsprinzip dieses vollautomatischen Analysesystems beruht auf einer elektrischen Widerstandsmessung. Die Zellsuspension wird in eine Kapillare gesaugt, aufgrund der Zellvolumina wird

eine bestimmte Menge des Isotons verdrängt, dadurch verändert sich der Widerstand und lässt so eine Berechnung der Zellzahl zu.

An Tag 3, 5 und 7 nach Aussaat fand eine Zellzählung statt. Hierzu wurde das Medium aus den Wells abgezogen und die adhärennten Zellen zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden 500 µl Accutase hinzupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 7 min wurde der Vorgang mit 500 µl Medium gestoppt. Die Vereinzelnung der Zellen erfolgte durch 20-maliges Auf- und Abpipettieren der Suspension in jeder Vertiefung des Wells. Zur Zählung wurden 100 µl in 10 ml isotoner Lösung in das Messgefäß des CASY-1 überführt.

3.4.4 Immunhistochemische Untersuchung

In diesem Teil der Arbeit wurden einzelne Zellproteine mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Hierzu mussten die Zellen mit Ethanol und Aceton fixiert werden. Anschließend wurden separat Antikörper gegen Vinkulin und Tubulin aufgebracht. Die nicht gebundenen Überschüsse dieser Antikörper wurden durch Waschen entfernt und die Proben mit dem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper versehen.

Versuchsdurchführung indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Auf den Proben (unbearbeitet, poliert, geätzt) und zur Referenz auf Deckgläschen wurden die schon zuvor verwendeten Fibroblasten über 5 Tage kultiviert. Die Probenplättchen wurden in PBS in einem Präparatständer gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 10 min bei -20 °C in Methanol und anschließend in Aceton bei -20 °C. Abschließend wurden die Proben mit der Zellseite nach oben 30 min lang auf einem Filterpapier luftgetrocknet. Die fixierten Präparate wurden in einer Feuchtkammer mit dem primären Antikörper, welcher zuvor nach Angaben des Datenblattes mit PBS verdünnt wurde, 30 min bis 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf jede Probe kamen 50 µl bis 100 µl des Antikörpers. Zum Waschen wurde der Präparatständer in eine mit

PBS befüllte Glasschale gestellt und dann mit den Proben gefüllt (dreimal für je 5 min). Darauf folgte die Inkubation mit dem fluoreszenzfarbstoffgekoppelten, zweiten Antikörper gegen die entsprechenden Spezies. In der Feuchtkammer wurde jede Probe mit 50 µl Antikörperlösung beschickt und 20 min in der geschlossenen Kammer inkubiert. Zur Markierung der DNA wurden nach 15 min 2 Tropfen des Farbstoffes Hoechst 33258 auf die Präparate gegeben und die Proben erneut für 7 min inkubiert. Der Waschvorgang in PBS wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, anschließend wurden die Proben 1 min in Ethanol entwässert und dann 30 min auf Filterpapier getrocknet. Die so präparierten Proben wurden mit Mowiol auf einem Objektträger zur Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop eingebettet.

3.5 Testalgorithmus und Plattenbelegung

Für die Messung der Zellaktivität und der Zellzahl wurden Tag 3, Tag 5 und Tag 7 nach der Aussaat der Zellen gewählt. Dafür wurden für jeden der beiden Tests jeweils 3 Kulturplatten (24-Well-Zellkulturplatten) angelegt, für jeden Testtag eine. In jeder Kulturplatte dienten die ersten 4 Vertiefungen als Referenz (Polystyrol), die nächsten 4 waren mit unbearbeiteten Stahlproben die darauf folgenden mit 4 polierten und die letzten genutzten Kavitäten mit 4 gebeizten Probenkörpern versehen. Während der Kultivierung wurde an jedem Tag ein Wechsel des Mediums durchgeführt.

3.6 Statistik

Zur graphischen Darstellung der Entwicklung von Zellzahl und Zellaktivität auf den verschiedenen Proben wurden jeweils die Mittelwerte und der Standardfehler errechnet. Die Werte wurden in Bezug zur Polystyrol-Referenz gesetzt, der höchste hier (Polystyrol) gemessene Wert, wird als 100% angesetzt.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit medizinischem Implantatstahl (1.4441) gearbeitet. Verschiedene Säuren dienten zur gezielten Modifikation der zuvor polierten Oberflächen. Die Auswertung fand mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) statt.

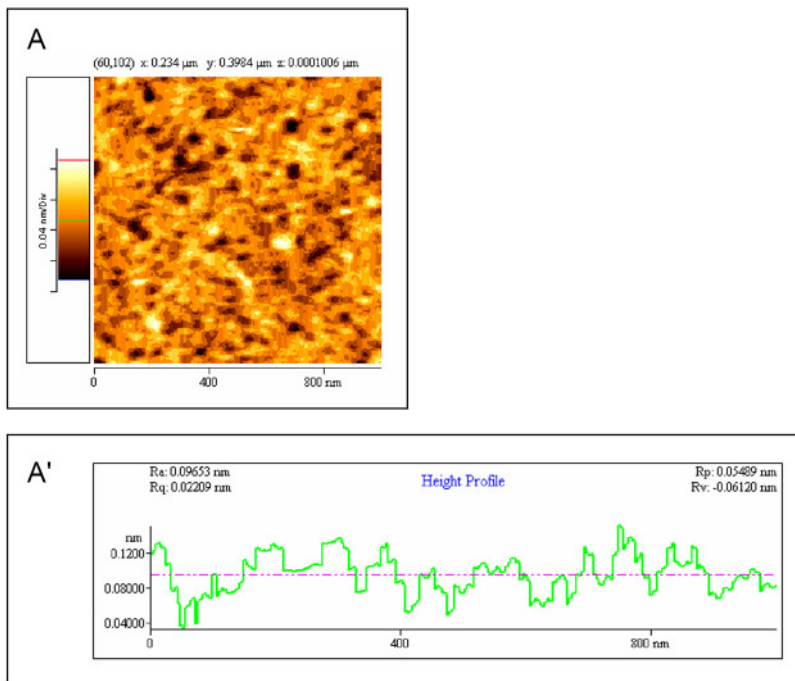


Abbildung 3 AFM-Aufnahme; polierte Probe $1 \times 1 \mu\text{m}$

Abbildung 3 zeigt in **A** eine $1 \times 1 \mu\text{m}$ Aufnahme einer polierten Probe mit dem Rasterkraftmikroskop. **A'** zeigt das dazugehörige Höhendiagramm. Die Politur ermöglichte Niveauunterschieden von der Größe eines Atomdurchmessers.

4.1 Säurebehandelte Oberflächen

Die polierten Probenkörper wurden 3 verschiedenen Beizlösungen ausgesetzt und die Oberflächenbeeinflussung verschieden langer Einwirkzeiten beobachtet. Diese ergaben sich aus der jeweiligen Aggressivität der Beizlösungen.

Es wurden folgende Beizlösungen verwendet:

(B1) V₂A-Beize

(B2) V₂A-Beize im Ultraschallbad

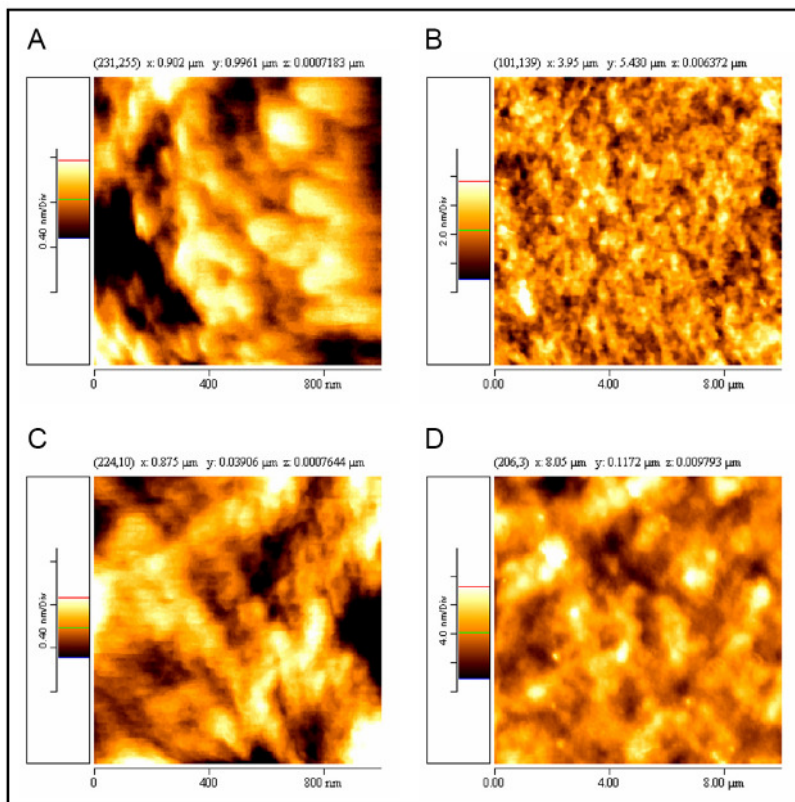
(F) Modifizierte Stahlbeize

4.2 Messreihen zur Beobachtung der Oberflächenentwicklung mittels Rasterkraftmikroskopie

B1: V₂A-Beize

Diese Ätzlösung zählt zu den gebräuchlichen Beizen zur Behandlung nichtrostender Stähle. Unter ihrer Anwendung lassen sich verschiedene Gefüge und Phasen entwickeln. Austenit und Delta-Ferrit sind genau so anätzbar wie Karbidausscheidungen und Glühgefüge bei hochlegierten Ferriten. Das Ergebnis der Ätzung ist temperaturabhängig. Bei niedrigen Temperaturen weisen die Proben eine ausgeprägte Nanostruktur auf, die Korngrenzen sind nur schwach zu erkennen. Gegenteiliges lässt sich bei Ätzungen mit hohen Temperaturen feststellen, die Korngrenzen sind stark ausgeprägt, dafür ist weniger bis keine Nanostruktur erkennbar.

Die polierten Probenkörper wurden bei Raumtemperatur der Beize ausgesetzt. Bei austenitischem Gefüge zeigt diese Ätzung deutlich die Korngrenzen [79].



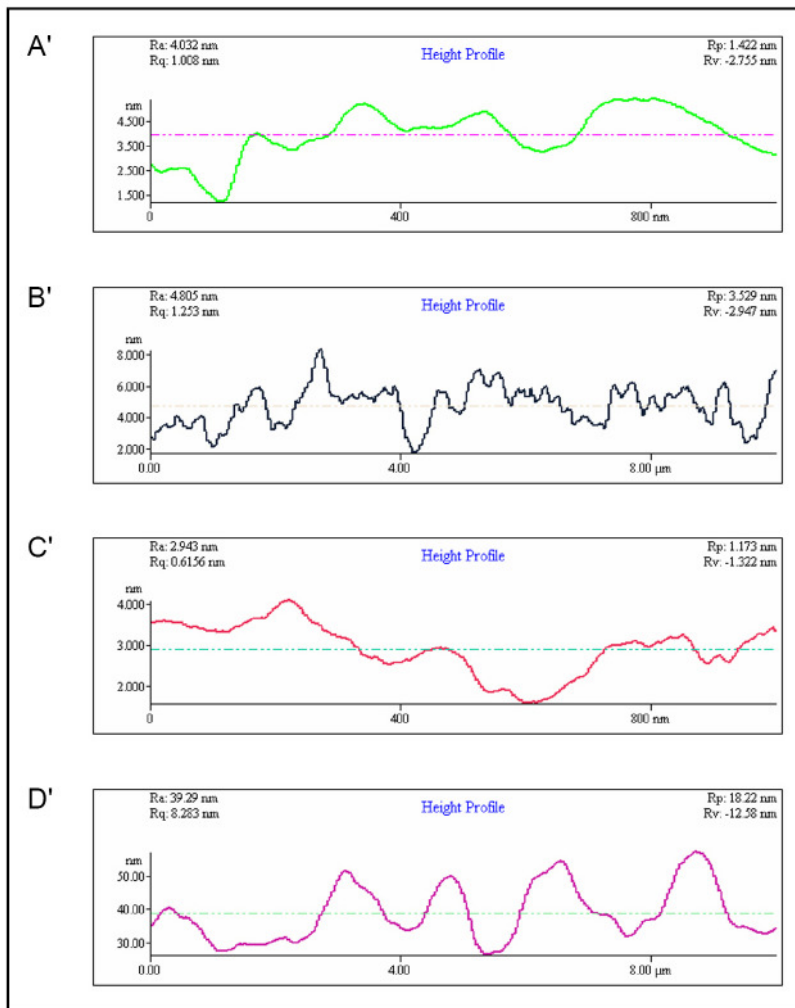


Abbildung 4 Oberflächenstruktur und Höhendigramme nach Inkubation in B1

Abbildung 4 zeigt in **A** die Oberflächenstruktur nach einer Ätzzeit von 1 min. In **A** und **A'** ist ein Ausschnitt von $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$ dargestellt, in **B** und **D** $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$.

Schon nach einer Ätzdauer von 1 Minute zeigte sich eine deutlicher akzentuierte Topographie (**A**, **A'**). Die Höhenunterschiede betragen 3 nm, anstatt 0,8 nm, wie aus den Höhenprofilen in **A'** und **B'** ersichtlich ist.

Um kurz die Entwicklung der Oberflächenstruktur bei Verlängerung der Beizzeit zu beschreiben lässt sich zusammenfassen, dass sich nach einer Ätzzeit von 2 min auffallende Höhenunterschiede von bis zu 60 nm zeigen. Nach einer Ätzzeit von 4 min die Höhenunterschiede ca. 12 nm betragen. Bei einer Ätzzeit

von 6 min wurde die Oberfläche deutlich glatter, Spitzen und Täler erreichten eine maximale Differenz von 4 nm. Damit handelt es sich um eine Reduktion der Höhenunterschiede um 2/3 zur 4 Minutenprobe.

C und **D** zeigen die Oberflächenstruktur nach einer Ätzzeit von 10 min. In **C** und **C'** ist ein Ausschnitt von 1 μm x 1 μm dargestellt, in **D** und **D'** ein Ausschnitt von 10 μm x 10 μm . Bei dem letzten 1 μm x 1 μm Scan dieser Ätzreihe zeigte sich eine Rauigkeit von 2 nm. Die Rauigkeit bei dieser Scangröße variierte unabhängig von der Ätzdauer kaum. Bei dem 10x10 μm Ausschnitt einer Probe mit 10-minütiger Ätzdauer zeigte sich wiederum eine stark variierende Topographie mit Höhendifferenzen von 20 nm (Vgl.: bei der 6 min Ätzung betrug die Differenz 4 nm).

B2: V₂A-Beize im Ultraschallbad

Die Säure in diesem Versuchsteil unterschied sich nicht von der zuvor verwendeten (B1), allerdings wurden die Proben der Säure in einem Becherglas im Ultraschallbad ausgesetzt.

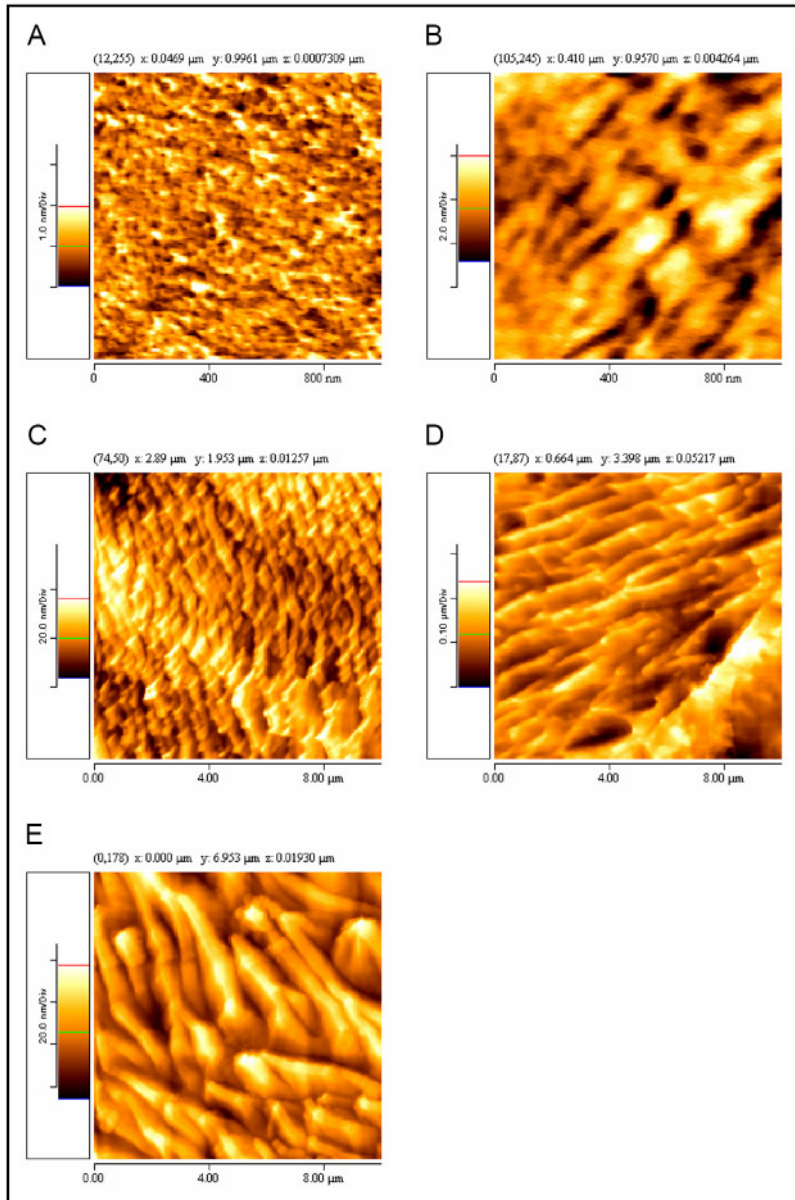


Abbildung 5 Oberflächenstruktur nach Inkubation in B2

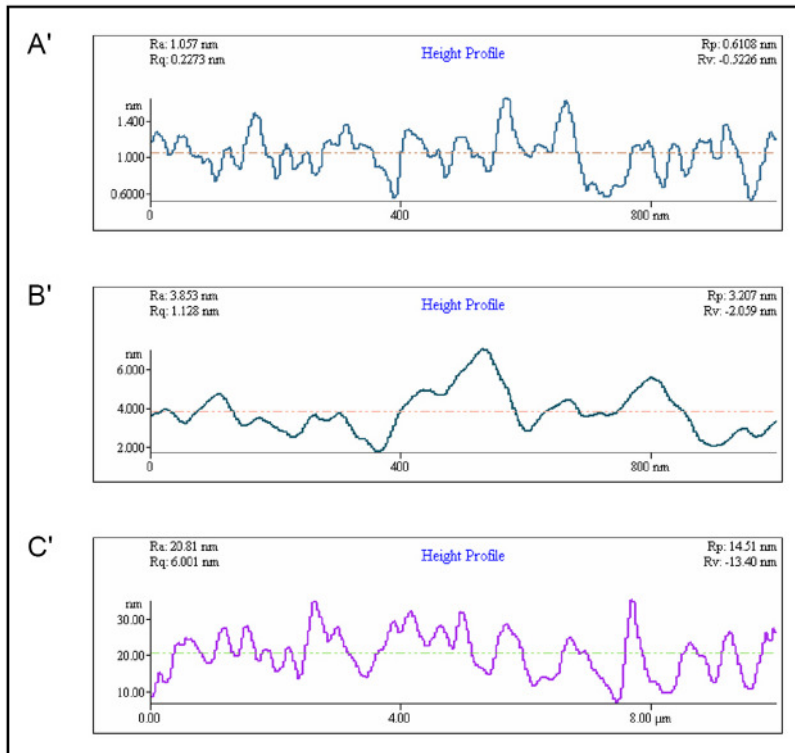


Abbildung 6 Höhendiagramme nach Inkubation in B2

Abbildung 5 zeigt in **A** die Oberflächenstruktur nach einer Ätzzeit von 1 min. **A'** zeigt das entsprechende Höhenprofil in Abbildung 6. Nach einer Ätzdauer von 2 Minuten zeigte sich eine deutliche Topographieänderung. Diese stellte sich auch im $10 \times 10 \mu\text{m}$ Ausschnitt deutlich dar. **B** und **C** zeigen die Oberflächenstruktur nach einer Ätzzeit von 6 min. In **B** ist ein Ausschnitt von $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ dargestellt, in **C** ein $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ Scan. Ergänzend zeigen **B'** und **C'** die Höhenprofile zu diesen Messungen. Die Höhenverhältnisse änderten sich zwischen den 2, 4 und 6-minütigen Ätzungen nicht sonderlich. Dafür trat ab der 6-Minuten-Ätzung eine interessante lamellenartige Struktur (**C**) auf, deren Vorstufe sich nach 4 Minuten ätzen schon andeutete. **D** zeigt die Oberflächenstruktur nach einer Ätzzeit von 8 min in einem Ausschnitt von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. **E** zeigt die Oberflächenstruktur nach einer Ätzzeit von 10 min in einem Ausschnitt von $10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Nach 8 und 10 Minuten Säureexposition kam es zu einer deutlichen Vertiefung der Lamellenstruktur. Die Hügel-Tal-

Differenz der Lamellen beträgt etwa 70-150 nm im Gegensatz zu der 6-minütigen Ätzung mit Höhendifferenzen von etwa 20-30 nm.

F: Modifizierte Stahlbeize

Die Auswertung der Ätzreihe mit modifizierter Stahlbeize fand nach 45, 90 und 135 min statt. Die Höhendifferenz nach 45 min beträgt lediglich circa 12 nm, eine definierte Struktur ist nicht erkennbar.

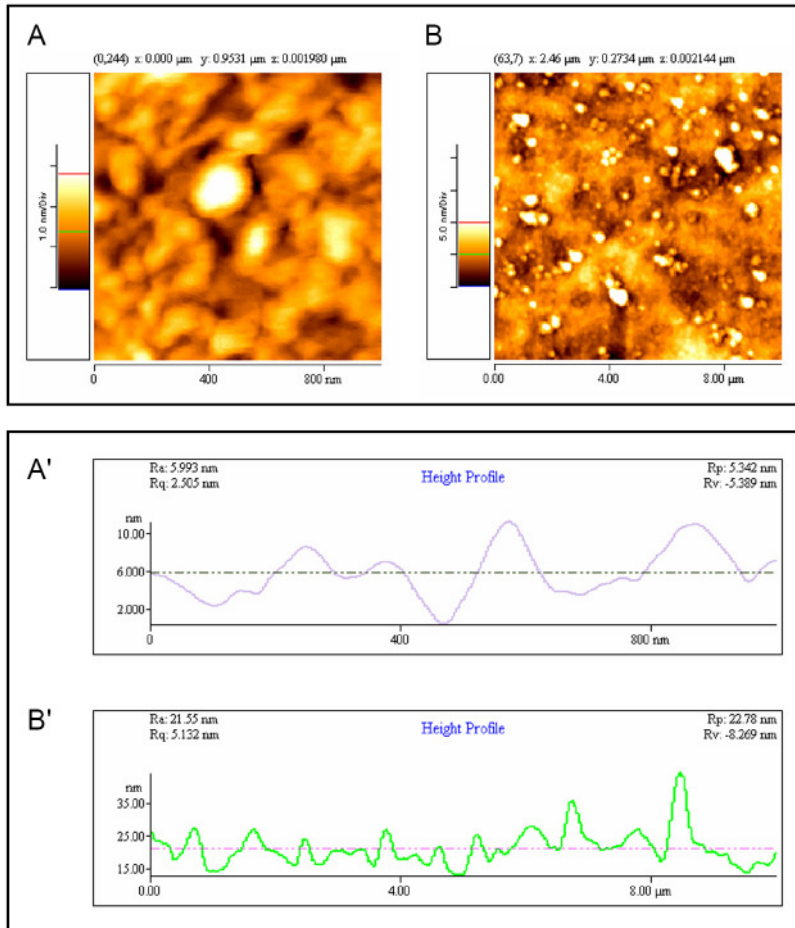


Abbildung 7 Oberflächenstruktur und Höhendiagramm nach 90 min Inkubation in F

Exemplarisch zeigt Abbildung 7 die Oberflächenstruktur und Höhendiagramme nach einer Ätzzeit von 90 min. In **A** und **A'** ist ein Ausschnitt von 1 $\mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ dargestellt, in **B** und **B'** von 10 $\mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$. Die Hügel-Tal-Differenzen haben sich kaum verändert, jedoch ist die Oberfläche zerklüfteter. Nach 135 min zeigt die Oberflächenstruktur wenig markante Hügel-Tal-Beziehungen mit Höhendifferenzen von etwa 5 nm.

Zur Erklärung: Die Auflösung des AFM ist indirekt proportional zu der Rauigkeit der Oberfläche, daher erscheinen die $1 \times 1 \mu\text{m}$ Ausschnitte oftmals unscharf.

4.3 Oberflächencharakterisierung mit IP Auto Probe

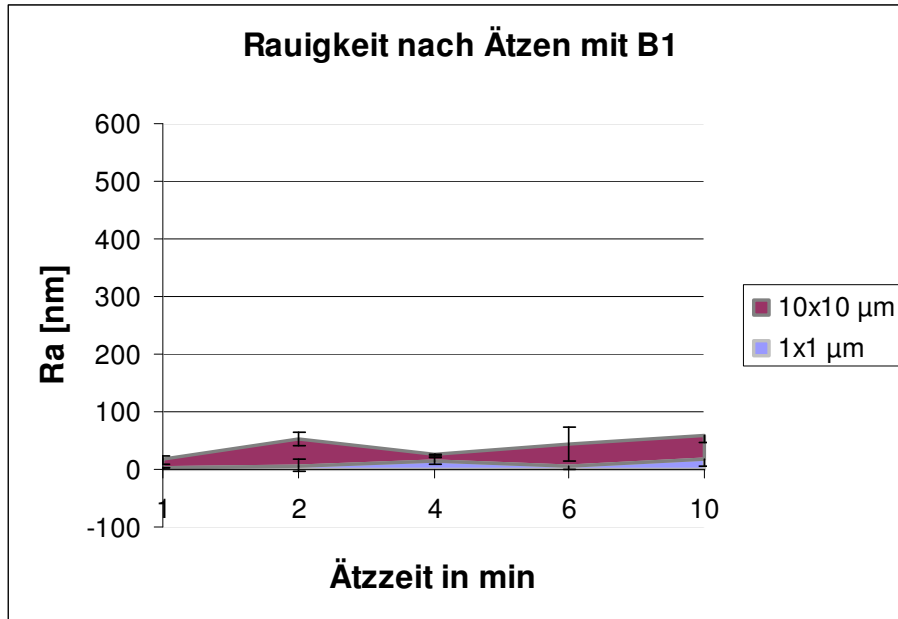


Abbildung 8 Rauigkeit nach Ätzen mit B1 über einen Zeitraum von 10 min

Abbildung 8 zeigt die Rauigkeit in nm über eine Ätzdauer von 10 min mit V_2A -Beize auf $1 \times 1 \mu\text{m}$ und $10 \times 10 \mu\text{m}$ Ausschnitten der Probe. Auf dem $1 \times 1 \mu\text{m}$ -Ausschnitt erreicht die Rauigkeit nach 4 min und nach 10 min ihr Maximum von etwa 12 nm, wohingegen dieses bei dem größeren Ausschnitt nach einer Ätzzeit von 2 min und 10 min mit einem Wert von etwa 50 nm auftritt.

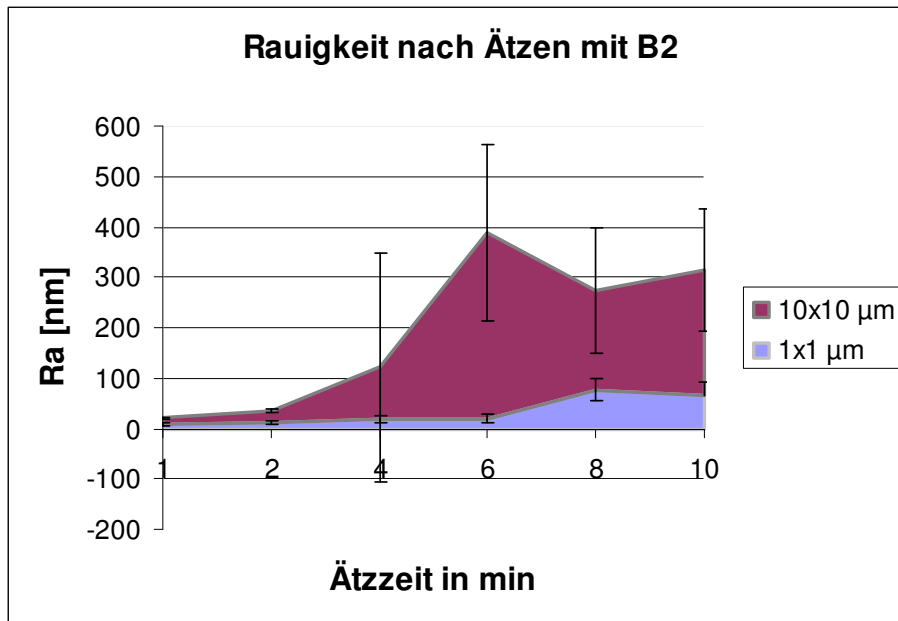


Abbildung 9 Rauigkeit nach Ätzen mit B2 über einen Zeitraum von 10 min

Abbildung 9 zeigt die Rauigkeit in nm über eine Ätzdauer von 10 min mit V₂A-Beize im Ultraschallbad auf 1x1 µm und 10x10 µm Ausschnitten der Probe. Die zu dem 10x10 µm Scan gehörenden hohen Fehlerbalken bei einer Ätzdauer von 4, 6, 8 und 10 min zeigen eine große Standardabweichung. Der 1x1 µm-Ausschnitt weist ab einer Ätzzeit von 6 min eine Steigerung der Rauigkeit auf, welche ausgehend von ungefähr 20 nm, nach 8 min bei etwa 70 nm liegt und anschließend wieder leicht abfällt. Bei dem 10x10 µm Ausschnitt findet sich die größte Rauigkeit von knapp 400 nm nach 6-minütiger Ätzzeit, fällt nach 8 min auf 280 nm ab und steigt nach 10 min erneut auf etwa 310 nm an.

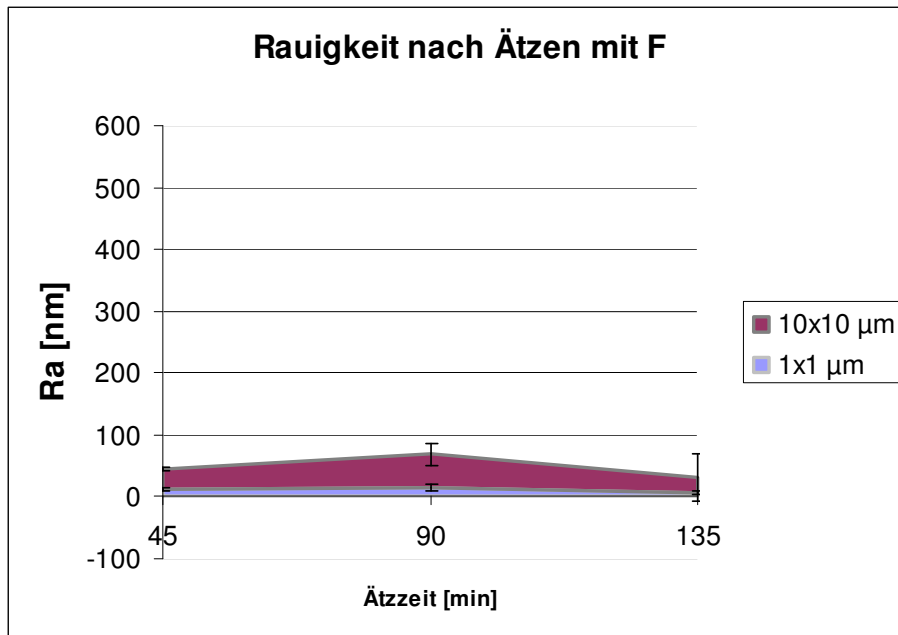


Abbildung 10 Rauigkeit nach Ätzen mit F über einen Zeitraum von 135 min

Abbildung 10 zeigt die Rauigkeitsentwicklung bei der 45-, 90- und 135-minütigen Ätzung mit Stahlbeize. Sowohl bei dem 1x1 µm-, als auch bei dem 10x10 µm-Ausschnitt tritt das Rauigkeitsmaximum nach 90-minütigen Ätzdauer auf. In dem kleineren Ausschnitt zeigt sich kaum eine Veränderung der Rauigkeit, sie bewegt sich um 10 nm. Der Graph des größeren Probenausschnitts verläuft von etwa 45 nm (45 min) über ungefähr 68 nm (90 min) und fällt bei 135 min Ätzdauer auf 34 nm ab.

4.4 Messung Oberflächenrauigkeit mit dem Profilometer

Die Messung wurde an unbearbeiteten, polierten und geätzten Referenzproben (Ätzverfahren B2 für 6min) durchgeführt, die Werte lassen sich der folgenden Tabelle entnehmen.

Tabelle 3 Messung der Oberflächenrauigkeit

Methoden	Rauigkeit in μm
unbearbeitet	$0,25 \pm 0,1$
poliert	$0,06 \pm 0,04$
geätzt	$0,17 \pm 0,04$

Es wurden zu dieser Untersuchung lediglich geätzte Proben nach dem Verfahren B2 nach 6-minütiger Inkubation verwendet. Nach dieser Behandlung erreicht man eine hohe Rauigkeit, deren Einfluss auf die Biokompatibilität in dieser Arbeit untersucht wurde. Die Oberflächenstruktur ist reproduzierbar und eignet sich daher für weitere Untersuchungen. Wie die Tabelle zeigt, weist die geätzte Probe zwar eine höhere Rauigkeit als die polierte Referenz auf, liegt aber deutlich unter der Rauigkeit einer unbearbeiteten Probe.

4.5 Ergebnisse des biologischen Versuchs

Bei allen nun folgenden Beschreibungen wurden von den geätzten Proben ausschließlich jene verwendet, welche nach dem Verfahren B2 bei einer Verweildauer von 6 min hergestellt wurden.

Die Ergebnisse des biologischen Versuchsteils wurden mittels CASY-1, Modell TTC Cell Counter und Analyser (Zellzahlbestimmung) und mit dem ELISA-Reader (Zellaktivität) bestimmt. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden zu Polystyrol in Referenz gesetzt. Zur graphischen Darstellung wurde Harvard Graphics AP 3.0 genutzt.

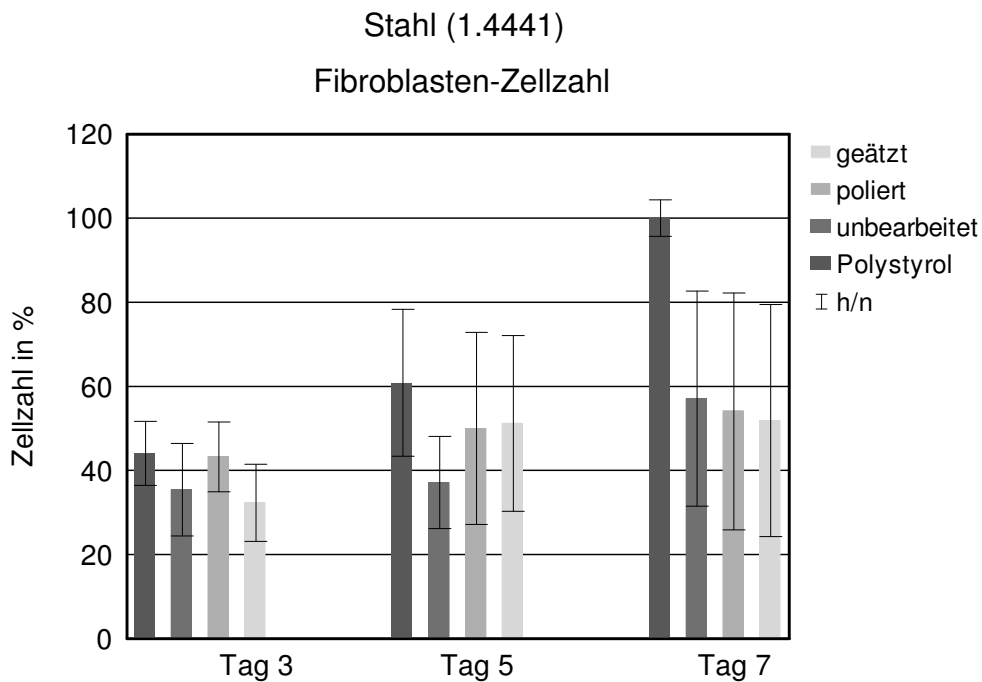


Abbildung 11 Grafik zur Entwicklung der Fibroblasten-Zellzahl

Die Abbildung 11 zeigt die Entwicklung der Zellzahl in Prozent. Abgesehen von der Polystyrolreferenz, zeigt sich an jedem Tag bei einer anderen Probe das Zellzahlmaximum. Die höchsten Zellzahlen treten an Tag 3 auf den polierten, an Tag 5 auf den geätzten Proben auf. An Tag 7 weisen schließlich die

unbehandelten Stahlplättchen die höchste Zellzahl auf. Beachtenswert sind die Fehlerbalken, welche die mögliche Abweichung der Messwerte vom tatsächlichen Wert darstellen. Innerhalb der Schwankungsbreite sind die Werte auf Stahl gleich.

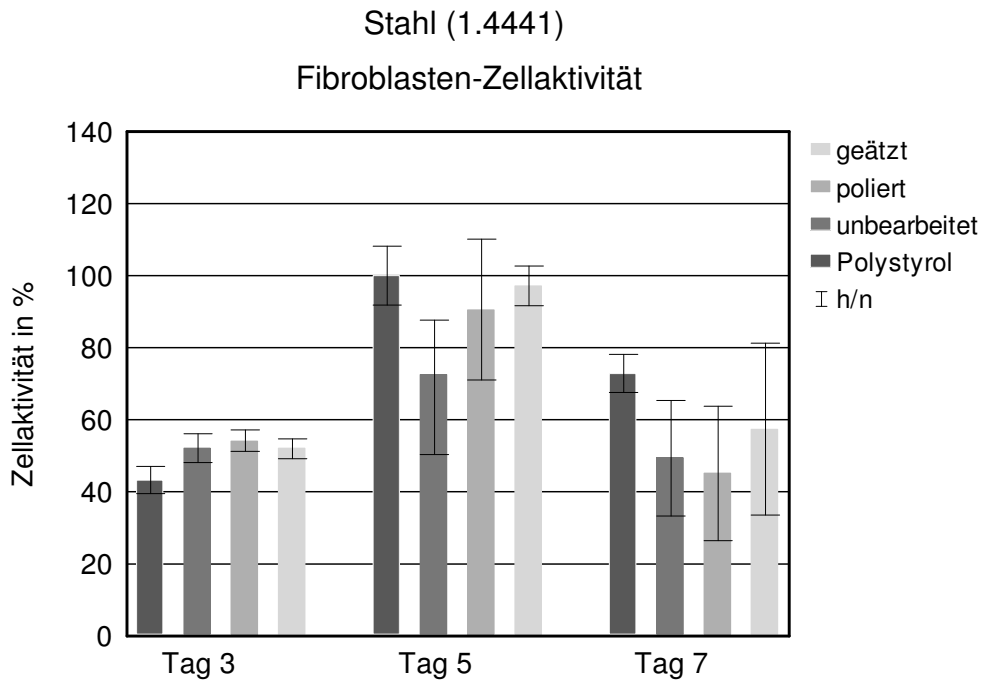


Abbildung 12 Grafik zur Entwicklung der Fibroblasten-Zellaktivität

Die Messergebnisse der Zellaktivität zeigen eindeutigeren Werte (Abb. 12). Nur an Tag 3 ist auf den geätzten Proben nicht die höchste Aktivität zu beobachten, die Polystyrolreferenz wird bei der endgültigen Beurteilung ausgeklammert. Die höchsten Werte auf den verschiedenen Oberflächen waren an Tag 5 zu finden. Der allgemeine Rückgang der zuvor progredienten Zellaktivität an Tag 7, könnte möglicherweise seine Ursache in der zu dichten Bewachsung der Oberflächen haben, welche ein Ablösen der Zellen zur Folge hat. Der Trend weist auf eine leicht erhöhte Zellvitalität auf den mit Säure behandelten Proben hin, auch wenn eine endgültige Aussage auf Grund der Fehler schwierig ist.

Des Weiteren wurden mit Fibroblasten bewachsene Probenkörper, nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen unter dem Rasterelektronenmikroskop zur

visuellen Auswertung untersucht. Hierbei wurden Proben aller drei Qualitäten (unbearbeitet, poliert, geätzt) und eine Deckglasreferenz verwendet. Bei genauer Betrachtung lassen sich feine Unterschiede anhand der Aufnahmen bemerken.

Tabelle 4 Visueller Vergleich von Fibroblasten auf verschiedenen Proben mittels eines Rasterelektronenmikroskops

	P poliert	G Glas	R unbehandelt	B geätzt
Morphologie der Fortsätze		Weit gespreizte Fortsätze		Die Fortsätze scheinen gezielter, an bestimmten Strukturen anzusetzen
Ausprägung der Fortsätze		Schwächere Fortsätze als B, stärkere als P	Stark ausgeprägte Fortsätze	Sehr kräftige Fortsätze
Morphologie des Zellkörpers	Wirkt flach	Wirkt eher kugelig und auf der Oberfläche stärker strukturiert	Wirkt flach	Wirkt eher kugelig und auf der Oberfläche stärker strukturiert
Weitere Auffälligkeiten	Hohe Anzahl filigraner Fortsätze	Hohe Anzahl filigraner Fortsätze		

Tabelle 4 fasst morphologische Eigenschaften zusammen, welche anhand der REM-Aufnahmen beobachtet werden konnten.

Zur Veranschaulichung wurden einzelne REM-Aufnahmen ausgewählt (Abb. 13).

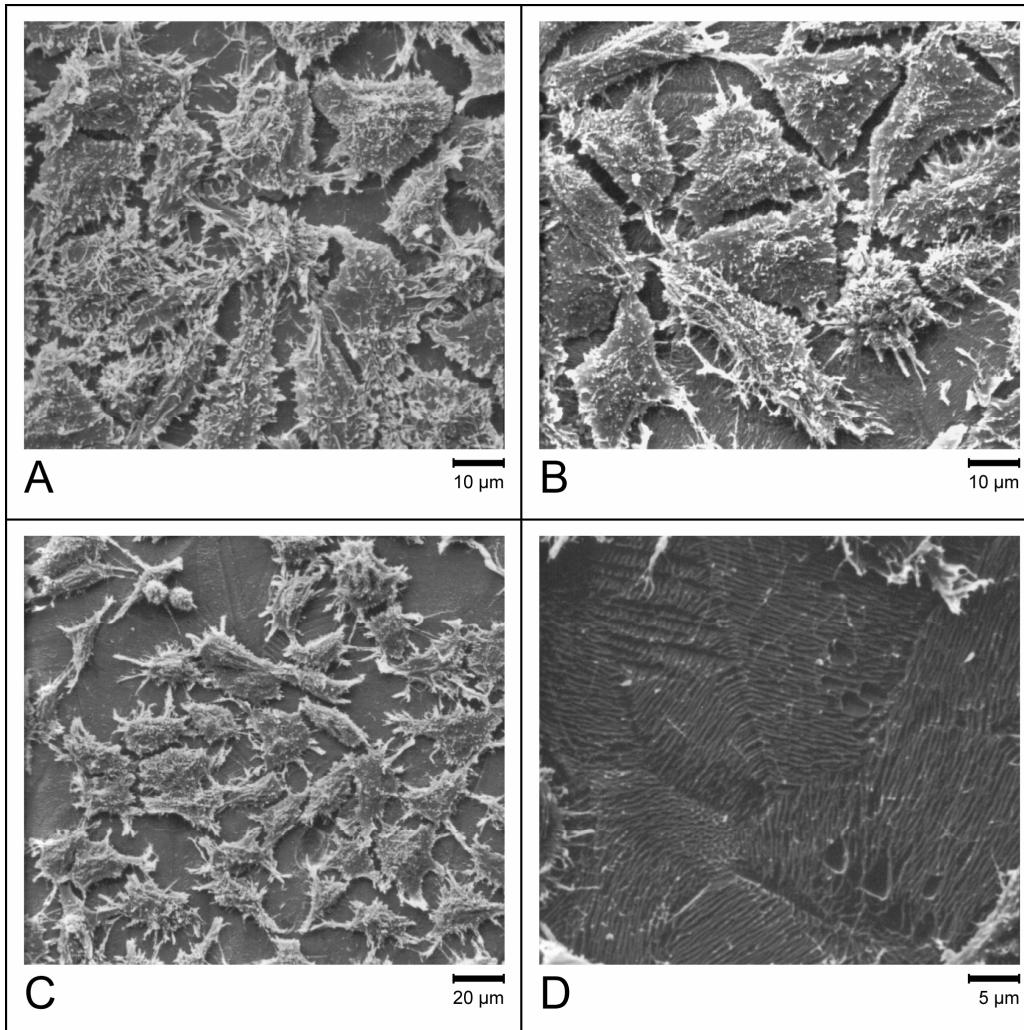


Abbildung 13 REM-Aufnahme; Fibroblasten auf Stahl

A zeigt Fibroblasten auf poliertem Stahl. Viele feine Fortsätze verankern die Zellen an der polierten Stahloberfläche. In **B-D** sind Fibroblasten auf geätzttem Stahl aufgenommen. Auffällig in **B** sind die weniger zahlreichen, dafür umso kräftigeren Zellausläufer, im Gegensatz zu der Aufnahme des polierten Stahls. Die Korngrenzen und die lamellenartige Struktur der Felder sind deutlich erkennbar. Die reduzierte Zellzahl in **C** ist lokalisationsbedingt. An anderen Stellen der Probe zeigt sich eine stärkere Kolonisierung, dieses Bild wurde aufgrund der deutlichen Adhäsionskontakte gewählt. Bei 2000-facher

Vergrößerung in **D** sieht man deutlich die Lamellenstruktur der Stahloberfläche und die Korngrenzen. Die Abstände der Lamellenspitzen zueinander betragen etwa 0,2 bis 0,7 μm . Die Fortsätze der Zellen an den Rändern des Ausschnitts scheinen eine Kontaktausbildung zu prominenten Regionen der Probenoberfläche zu präferieren. Feine Ausläufer setzen hier an Lamellenpeaks und Korngrenzen an [75]. Die Lamellenstruktur ist wesentlich kleiner als die Zellkörper der Fibroblasten, jedoch liegt sie in etwa im Größenbereich der Zellausläufer. Diese zeigen eine Orientierung zur dargebotenen Oberfläche. Sie setzen bevorzugt an prominenten Strukturen, wie Korngrenzen oder Lamellenpeaks an. Konsequenterweise realisieren Fortsätze, welche parallel zu einer Lamelle verlaufen keine signifikanten Höhenunterschiede. Filopodien, die quer über die Lamellen und damit über eine Hügel-Tal-Landschaft verlaufen, weisen eine signifikant hohe Ausbildung von Adhäsionskontakten zu den Lamellenpeaks auf [75].

Zuletzt wurde eine immunhistochemische Behandlung an den unbearbeiteten, polierten, geätzten Proben und der Glasreferenz durchgeführt. Diese ermöglicht eine Betrachtung der Zellteilungsfiguren und der Ausbildung bestimmter Bestandteile des Zytoskeletts. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale der Proteine Vinkulin und Tubulin, welche charakteristisch für die Architektur der Zelle sind erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie. Zur graphischen Darstellung wurden Aufnahmen der polierten Proben und der V_2A -Beize im Ultraschallbad ausgesetzten Proben gewählt. Grund hierfür war unter anderem die Relevanz der Oberflächen. Im Gegensatz zu der Glasreferenz bestehen die gewählten Proben aus demselben Material, daher ist zwischen ihnen ein direkterer Vergleich bezüglich der Biokompatibilität möglich.

Vinkulin ist maßgeblich an der Ausbildung von Adhäsionskontakten oder zwischen Zelle und Umgebung beteiligt. Dieses Protein gehört zu den Plaque-Proteinen, es unterstützt die Verankerung des Zytoskeletts an der Zellmembran und ist daher dicht unter dieser lokalisiert. Tubulin ist direkt an der Ausbildung

des Zytoskeletts beteiligt. Es dient zum Aufbau von Mikrotubuli, Zentrosomen und Kinozilien [80].

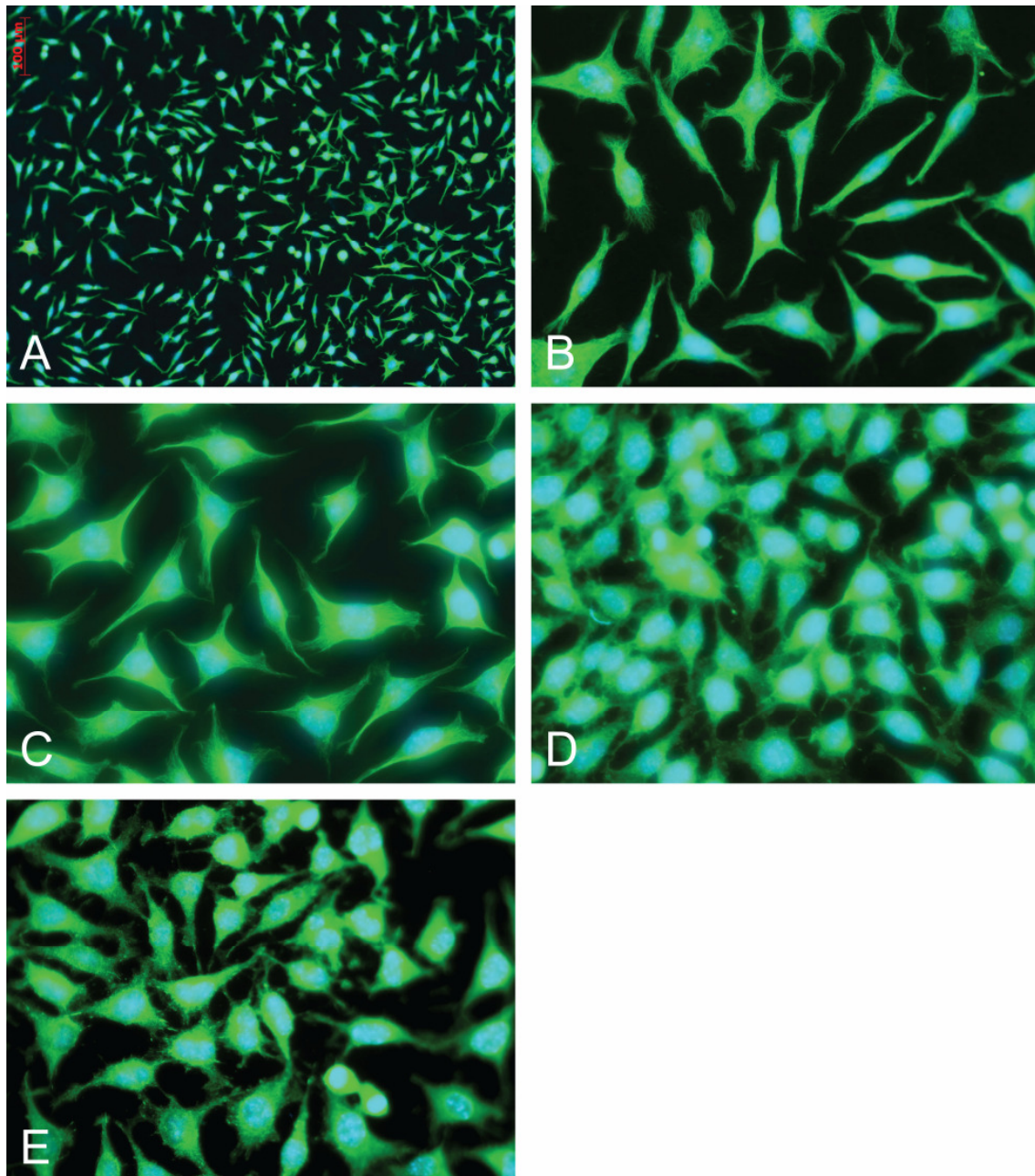


Abbildung 14 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten mit gezielter Markierung von Tubulin- und Vinkulin-Proteinen

Abbildung 14 zeigt in **A** die markierten Tubulin-Proteine auf geätzter Oberfläche in 40-facher Vergrößerung.

In **B** ist ein Ausschnitt mit 100-facher Vergrößerung derselben Probe gewählt.

In **C** ist das Tubulin der Fibroblasten bei 100-facher Vergrößerung auf poliertem Stahl markiert. Bei der Betrachtung der Markierung zeigt sich die Proteinverteilung im Zytoplasma auf den Proben **B** und **C** ähnlich. Die Zellausläufer scheinen jedoch auf dem säurebehandelten Untergrund geringer in ihrer Zahl und akzentuierter befestigt, was sich auch in den Aufnahmen des Rasterelektronenmikroskops zeigte.

D und **E** stellen Ausschnitte bei 100-facher Vergrößerung dar. Bei der Markierung des Proteins Vinkulin lassen sich die gespreizten Fortsätze und ihre Verankerung an der Oberfläche deutlich darstellen. Quantitativ zeigte sich kein deutlicher Unterschied zwischen der Zahl der Ausläufer von Fibroblasten auf poliertem Stahl (**E**) zu geätztem (**D**). Allerdings ist feststellbar, dass die Fortsätze auf dem geätzten Stahl distal häufiger aufgefächert erscheinen, was durch Ausbildung filigraner Verankerungsstrukturen erklärbar ist.

5 Diskussion

In zahlreichen Experimenten wurde versucht den Einfluss der Oberflächengestaltung auf Implantatwerkstoffen zu untersuchen und diese derart zu modifizieren, dass es zu einem rascheren Erreichen und Andauern der Sekundärstabilität (Osseointegration) kommt [8]. Zur Beurteilung der Biokompatibilität werden hier beispielsweise Proliferations- und Differenzierungsparameter herangezogen [81, 82]. Unterschiedliche Ergebnisse werden in der Literatur diskutiert. Einige Autoren beobachteten einen positiven Effekt rauer Oberflächen [83,84], andere wiederum räumten glatten Oberflächen einen Vorzug ein [85]. Dies kann eine Ursache in den gewählten Implantatmaterialien und den möglichen Untersuchungsmethoden haben. Es ist vorstellbar, dass die Messung der alleinigen Proteinadsorption an Probenoberflächen sich differierend zu den zellulären Parametern (Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion) verhalten kann. Auch das Verhalten der Zelltestreihen kann abhängig von Herkunft (Spezies), Entnahmelokalisation und Reifegrad variieren und muss bei der Ergebnisinterpretation bedacht werden.

Rauhigkeiten auf Implantatoberflächen wurden durch verschiedene Methoden erzeugt und untersucht. Hier finden additive Verfahren wie etwa 3D-Pulverdruck mit Hydroxylapatit oder Tricalciumphosphat Anwendung [86, 87]. Oberflächen können dadurch mit osseoinduktiven Proteinen (BMP), aber auch mit Medikamenten versehen werden, welche beispielsweise eine Periimplantitis verhindern sollen [9]. Primäres Ziel ist eine beschleunigte Implantateinheilung und eine durch die Beschichtung minimale Freisetzung von Ionen aus dem metallischen Implantat. Weitere strukturelle Differenzierungen wurden durch Nanotubes auf Titanoberflächen realisiert. Bauer zeigte eine erhöhte Biokompatibilität von TiO₂-Nanoröhrenschichten mit Durchmessern im sub-100 nm-Bereich auf titanbasierten Implantatoberflächen [39]. Bei einem Tube-Durchmesser von 100 nm war die Apoptose der untersuchten Zellen (mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, Osteoblasten,

Endothelzellen und Osteoklasten) zu beobachten. Abhängig von Legierungszusammensetzung und Anodisationsspannung konnte Berger verschiedene Röhrenmorphologien herstellen [88] Durch Abstrahlen und Ätzen beispielsweise finden subtraktive Verfahren Realisierung. Ein wesentlicher Angriffspunkt um die Implantatintegration zu verbessern ist die Beeinflussung der Chemotaxis beteiligter Zellen, bzw. die Beschleunigung der initialen biologischen Kaskaden (wie Blutgerinnung, Phase der Proliferation und Regeneration). Für Titan scheint tendenziell zu gelten, dass eine mittlere Rauigkeit die Interaktion zwischen Oberfläche und Osteoblast am günstigsten beeinflusst [8, 89].

Außer topographisch-mechanischen Reizen sind chemische Oberflächenkomponenten und elektrische Potentialgradienten maßgebliche Einflussgrößen auf Proteine und Zellen im periimplantären Raum [90].

Das resultierende elektrische Feld im Elektrolyt könnte Proteinstrukturen durch Lösen schwacher Verbindungen verändern. Dies könnte zu Antigen-Antikörperreaktionen führen oder aber die Protein- und Zelladsorption auf der Oberfläche fördern. [87, 91] Tauböck beobachtete einen positiven Einfluss von polarisierten Stahloberflächen auf die Entwicklung der Zellzahl osteoblasten-ähnlicher Zellen (MG-63), bei Titanoberflächen verhielt es sich umgekehrt, jedoch korrelierte die signifikant geringere Zellzahl mit einer tendenziell höheren Atmungsaktivität der Zellen [92].

Ziel dieser Arbeit war es, reproduzierbare topographische Strukturen im Nanometerbereich auf 1.4441 Implantatstahl zu erzeugen und ihren Einfluss auf Zellwachstum und –verhalten zu untersuchen. Dazu wurden die metallischen Proben mit verschiedenen Beizlösungen behandelt und strukturelle Veränderungen unter anderem mittels Rasterkraftmikroskopie visualisiert und ausgewertet. Als Testzellreihe diente die murine Zellreihe L-929. In dieser Arbeit wurde 1.4441 Implantatstahl verwendet, mit der Absicht, einen Effekt seiner hohen Ladungsträgerdichte auf die Proteinadsorption zu beobachten. Um die Ausbildung von Feldstärken in elektrolytischer Gewebsflüssigkeit, bzw.

Blutserum zu fördern, bestand das Ziel des Experiments in der Entwicklung einer reproduzierbaren Oberflächentopographie im Nanometerbereich. Nicht modifizierte Implantatoberflächen haben je nach Herstellungsprozedur eine gewisse Makrorauigkeit, um allein die Auswirkungen der reproduzierbaren Nanostrukturen erkennen zu können, wurde die Oberfläche möglichst glatt gestaltet. Durch die Vorbehandlung wurde die Stahloberfläche derart egalisiert, dass die Unterscheidung von einer Atomebene möglich war. Verschiedene Säureätzverfahren zur Entwicklung einer Nanostruktur auf Implantatstahl fanden in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Die Säurekompositionen greifen unterschiedliche Phasen des Stahls an. Die Entwicklung einer Oberflächenstruktur wurde nach unterschiedlichen Ätzzeiten untersucht.

Unter Anwendung des ersten Beizverfahrens mit V_2A -Beize (**B1**) kam es bei dem $10 \times 10 \mu\text{m}$ Scan zu einer Ausbildung sehr unterschiedlicher Höhendifferenzen in Abhängigkeit von der Zeit, die sich von 6nm bis 60nm bewegten. Bei den $1 \times 1 \mu\text{m}$ Scans waren durchweg Höhenunterschiede von ungefähr 2-3 nm feststellbar. Es entstand eine Topographie mit zahlreichen Peaks auf einer kleinen Grundfläche. Bei der längsten Ätzung zeigten sich auf einer $10 \mu\text{m}$ -Strecke durchschnittlich etwa 6 definierte Erhebungen.

Auch bei der zweiten Ätzreihe mit derselben Lösung (V_2A -Beize) im Ultraschallbad (**B2**) kam es zu einer Ausbildung morphologisch vergleichbarer Peaks, allerdings mit einer Höhendifferenz von ca. 150 nm. Die deutliche Strukturausprägung unter Anwendung der V_2A -Beize im Ultraschallbad (B2) könnte mit der Entfernung gelöster Partikel von der Oberfläche durch das Schallbad zusammenhängen und so eine weitere Tiefenentwicklung der Struktur ermöglicht haben. Die Ausbildung der Spitzen und Täler nahm mit der Beizdauer wie folgt zu:

Bei dem $10 \times 10 \mu\text{m}$ -Scan ergaben sich nach 1 min Differenzen von 2 nm, nach 2 min von 30 nm, nach sowohl 4 min, als auch nach 6 min von 20 nm. Nach 8 min ergaben sich Täler-Spitzen-Differenzen von 80 nm und nach 10 min schließlich von 150 nm. Bei denselben Ätzzeiten waren im $1 \times 1 \mu\text{m}$ -Scan

Höhendifferenzen von 1 nm über 6 nm, 12 nm, 4 nm, 20 nm und 80 nm zu beobachten. Die Höhenunterschiede zwischen Tälern und Spitzen bei den 1x1 µm-Scans waren bei diesem zweiten Verfahren sehr viel größer als bei dem zuvor genannten und bewegten sich in einem Rahmen von ca. 1 bis 80 nm. Die undeutliche Auflösung dieser Aufnahmen erklärt sich durch die großen Höhendifferenzen, welche umgekehrt proportional zur Auflösung des Raster-Kraft-Mikroskops sind.

Bei dem dritten Ätzverfahren mit modifizierter Stahlbeize (**F**) gab es keine Signifikanzen bezüglich einer Höhenänderung. Die Täler-Spitzen-Differenz befand sich bei ungefähr 15 nm im 10x10 µm-Scan und um 8 nm im 1x1µm-Scan. Bei der mittleren Ätzdauer von 90 Minuten zeigten sich viele punktförmige Erhebungen, deren Anzahl nach 135 min leicht abnahm.

Unter Anwendung der Methode B2 ließ sich eine definierte Lamellenstruktur entwickeln. Die Struktur scheint vom Prozess der Stahlherstellung abhängig zu sein. Nicht nur Korngrenzen, sondern auch Strukturen innerhalb der Körner werden sichtbar. Diese lamellären Strukturen sind auf Entmischungsprozesse im Stahl zurückzuführen. Die Abkühlungsdauer des Stahls hat einen maßgeblichen Einfluss auf Entmischungsprozesse und damit auf die Phasenentwicklung des Materials. Je schneller der Stahl abgekühlt wird, desto kürzer ist die Zeit, in der sich Gefügebestandteile entmischen können. Wie sich in Experimenten zeigte, weisen die rasch abgekühlten Proben eine verwaschene oder gar keine Lamellenstruktur auf. Aufgrund der unterschiedlichen Größe der Körner im Metall und deren Verkipfung im Gefüge unterscheiden sich die Lamellenabstände und Ausrichtungen [75]. Durch ihre Reproduzierbarkeit und die gute Abschätzbarkeit der Tiefenentwicklung in Abhängigkeit von der Zeit wurde die zweite Ätzmethode zur Weiterführung der Experimente selektiert.

Um die behandelten Proben auf ihre Biokompatibilität zu untersuchen gibt es viele Möglichkeiten. Die Zellreihe L-929 diente zur Beurteilung der

Zellproliferation und der Zellaktivität. Sie wird beispielsweise zur Testung der Biokompatibilität vom Deutschen Institut für Normung verwendet. Zur Untersuchung der zuvor genannten Parameter eignen sich die vielfach angewandten Testmethoden, wie etwa die Konzentration der alkalischen Phosphatase oder der Succinat-Dehydrogenase um die Vitalität der Zellen einschätzen zu können. Markierung bestimmter Proteine um ihre Biomasse oder ihre Lokalisation zu ermitteln und die Bestimmung der Zellzahl sind standardisierte Analyseverfahren um die Gewebeverträglichkeit eines Werkstoffs zu beurteilen. Allerdings ist die mögliche Multikausalität bei der Entstehung eines Ergebnisses zu berücksichtigen und sollte zur Hinterfragung eiliger Schlussfolgerungen anregen.

Die Beobachtung der Zellzahl über einen Zeitraum von 7 Tagen auf Polystyrol, unbehandelten, polierten und geätzten Proben (Lamellenstruktur) erbrachte keine eindeutigen Ergebnisse. An jedem Messtag scheint eine andere Probe die höchste Zellzahl aufzuweisen. Zudem machte die Größe der Fehlerbalken eine eindeutige Interpretation der geringen Unterschiede unmöglich. Allerdings war die Zellaktivität auf den geätzten Proben an Tag 5 und 7 am höchsten. Die Zellaktivität war an Tag 7 bei allen Proben geringer als am 5. Tag. Dies könnte an einer zu dichten Bewachsung der Oberfläche nach dem 5. Tag liegen, welche zum Ablösen der Zellen führt. Bei den REM-Aufnahmen zeigt sich als merklicher Unterschied eine qualitativ verstärkte Kontaktausbildung der Fibroblasten zur Oberfläche der geätzten Proben. Eine mögliche Erklärung wäre die Konzentration der Fortsätze auf dargebotene prominente Bereiche. Dies kann taktile, aber auch physikalische oder chemische Ursachen haben. Denkbar ist tatsächlich die Attraktivität der Lamellenpeaks oder Korngrenzen durch eine elektrochemische Beeinflussung des umgebenden Milieus. Allerdings wäre dann eine deutlich höhere Ansiedlung von Fortsätzen in bestimmten Arealen zu erwarten, welche nicht beobachtet werden konnte. Die Fibroblastenzellen sind sehr viel größer, als die ihnen dargebotenen Lamellenstrukturen, sie liegen im Größenbereich ihrer Zellfortsätze. Die Zellzahl auf den geätzten Proben schien eher reduziert und ihre Anordnung zufällig,

doch bei genauem Betrachten fiel auf, dass sich die Zellen häufig an Korngrenzen platzierten. Dort existiert meist ein signifikanter Höhenunterschied, welcher denkbarer Weise einen Einfluss auf die Kontaktausbildung hat. Diese Feststellung findet durch zahlreiche Hinweise in der Literatur Bestätigung [27, 93]. Die dünnen Ausläufer zeigen eine Orientierung in Abhängigkeit von der Lamellenstruktur. Fortsätze, welche parallel zu einer Lamelle verlaufen, scheinen die umgebenden Höhenunterschiede nicht registrieren zu können, läuft ein Fortsatz jedoch quer, bzw. senkrecht über die Hügel-Tal-Landschaft der Lamellen, ist eine signifikant hohe Bevorzugung und Ausbildung von Adhäsionskontakten zu den Peaks der Oberfläche zu beobachten. Ob die Ursache in einer erschwerten Überwindung des Peakanstiegs oder einer höheren Attraktivität des Peaks zur Verankerung der Zelle zu suchen ist, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Die immunhistochemische Untersuchung unterstützt die Beobachtungen auf den Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Markierung von Vinkulin und Tubulin ermöglichte die Beobachtung von Zellteilungsfiguren und der Zellarchitektur allgemein. Auch hier zeigte sich die quantitativ geringere, jedoch deutlich akzentuiertere Ausbildung der Adhäsionskontakte zur geätzten Oberfläche. Die Filopodien der Fibroblasten sind distal häufig aufgefächert, dies entspricht den filigranen Verankerungsstrukturen an den Lamellenpeaks.

Die Ergebnisse des biologischen Versuchs deuten auf eine erhöhte Zellaktivität bei nicht signifikanter Unterscheidung der Zellzahl auf geätzten Stahlproben hin. Die Ausbildung der Filopodienkontakte konzentrierte sich auf die markanten Lamellenpeaks innerhalb der Körner und auf die Korngrenzen. Dies zeigt einen Erfolg in der gezielten Beeinflussung der Kontaktausbildung. Diese Arbeit zeigt, dass das gezielte Aufbringen einer lamellären Nanostruktur zu Filopodienkontakten an prominenten Strukturen führt. Osteoblasten verhielten sich in anderen Untersuchungen ähnlich [75]. Eine Untersuchung der elektrischen Felder, wie sie an nanostrukturierten Oberflächen auftreten wurde nicht vorgenommen. Es ist jedoch denkbar, weitere relevante Zellarten

(mesenchymale Stammzellen, hämatopoetische Stammzellen, Endothelzellen, Osteoklasten) im Kontakt mit derart modifizierten Oberflächen im simulierten periimplantären Raum zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine definierte Nanostruktur mithilfe eines Säureätzverfahrens zu erzeugen. Verschiedene Säureexpositionen fanden hierzu Anwendung. Neben einer Stahlbeize und einer V2A-Beize wurde eine dritte Ätzreihe mit letztgenannter Beize im Ultraschallbad durchgeführt. Es gelang mit der V2A-Beize im Ultraschallbad eine definierte, reproduzierbare Nanostruktur zu erzeugen. Diese wurde mittels AFM und REM charakterisiert. Der etablierte Implantatstahl 1.4441 eignet sich besonders für diese Untersuchung, da es während des Stahlherstellungsprozesses zu Entmischungen kommt, welche sich gegen Säureeinwirkung unterschiedlich resistent zeigen. Es bildete sich ab einer gewissen Ätzdauer eine periodische Nanostruktur aus. Abhängig von der Ätzdauer konnten verschiedene Rauigkeiten erzeugt werden. Die Hügel-Tal-Höhendifferenz betrug nach 2-6 min 20-30 nm, nach 8-10 min 70-150 nm. Durch den Lamellencharakter der Struktur ist eine Richtung uneben, die andere Richtung, zwischen den Lamellen, relativ glatt. Weitere Beachtung galt möglichen Einflüssen der Nanostruktur auf Fibroblasten.

In einer anschließenden biologischen Untersuchung galt es die Zellaktivität und die Veränderung der Zellzahl auf den säurebehandelten, polierten, unbehandelten und Glasreferenz-Proben zu untersuchen. Hierzu wurde die Fibroblastenzelllinie L-929 verwendet. Tendenziell fanden sich weniger Zellen auf dem geätzten Stahl mit einer jedoch erhöhten mitochondrialen Zellaktivität. An Tag 5 der Untersuchung war die Zellvitalität auf den geätzten Proben etwa 8% höher als auf den polierten und circa 25% höher als auf den unbearbeiteten Probenkörpern. An Tag 7 waren die höchsten Werte erneut bei den säurebehandelten Proben zu finden und lagen um ungefähr 10% über denen der polierten und etwa 8% über den unbearbeiteten Proben. Auch die Morphologie der Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie und REM beurteilt. Interessant war die Bevorzugung der Korngrenzen und der Lamellenspitzen als Ansatzpunkt der Zellausläufer [75].

Die in dieser Studie erbrachten Ergebnisse, belegen eine Methode, die zu reproduzierbaren Oberflächenmodifikationen im Nanometerbereich führt. Für weitere Studien wäre eine Untersuchung des Verhaltens anderer Zellarten und Bakterien auf derart modifizierten Proben von Interesse, um Auswirkungen auf Einheilung, Abstoßung oder Isolation einschätzen zu können.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kebernik M; Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften der Schrauben–Knochen–Verbindung im kortikalen Knochen; Dissertation Universität Ulm, 2005
- [2] Implant for interconnecting two bone fragments; World Intellectual Property Organization; (WO/2000/006036); sighted April 2008 (<http://www.wipo.int/portal/index.html.en>)
- [3] Toellner R; Illustrierte Geschichte der Medizin; Bechtermünz Verlag 2000, Augsburg
- [4] Charité Berlin; Geschichte der Epithetik; sighted May 2008 (<http://www.gesichtsepithetik.de/ger/history.html>)
- [5] Rau, Ströbel; Die Metalle in der Zahntechnik; Neuer Verlag Merkur 1995, München; 17. Auflage
- [6] Ring M E; Geschichte der Zahnmedizin; Könenmann, Köln; 2000
- [7] Römpf Chemielexikon 1998: 4154-4158, Thieme
- [8] Klein MO; Osteoblastenkulturen zur Charakterisierung der Biokompatibilität moderner Zahnimplantatoberflächen; Biomaterialien 2006 (7/4): 291-297
- [9] Chatzinikolaidou M; Untersuchung zur Immobilisierung und Freisetzung von rekombinantem humanem bone morphogenetic protein (BMP-2) in biologisch aktiver Form auf metallischen Implantatoberflächen; Dissertation an der Universität Duisburg- Essen, 2004
- [10] Cooper LF Zhou Y, Takebe J, Guo J, Abron A, Holmen A, et al.; Fluoride modification effects on osteoblast behaviour and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants; Biomaterials 2006, 27: 926-36
- [11] Liu Y, de Groot K, Hunziker EB; BMP-2 liberated from biomimetic implant coatings induces and sustains direct ossification in an ectopic rat model; Bone 36: 745-57, 2005
- [12] Schliephake H, Scharnweber D et al.; Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules; J. Biomed. Mater. Res. Part B. Appl.

- Biomater. 73B: 88-96, 2005
- [13] Zhou GS , Su ZY, Cai YR, Liu YK, Dai LC, Tang RK, Zhang M; Different effects of nanophase and conventional hydroxyapatite thin films on attachment, proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells; Bio-Med. Mat. And Engineering Vol.17; Number 6 2007: 387-395
- [14] Esposito M, Murray-Curtis L, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV: Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. Cochrane Database Syst Rev. Oct 17(4):CD003815, 2007
- [15] Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA: Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res 20 Suppl 4: 185-206, 2009
- [16] Park JY, Gemmell CH, Davies JE: Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. Biomaterials 22, 2671-2682 2001
- [17] Yang Y, Cavin R, Ong JL; Protein adsorption on titanium surface and their effect on osteoblast attachment; J. Biomed. Mater. Res. 67A: 344 2003
- [18] Hong J, Andersson J, Ekdahl KN, Elgue G, Axen N, Larsson R, Nilsson B; Titanium is highly thrombogenic biomaterial: Possible implications for osteogenesis; Thromb Haemost 1999, 82: 58-64
- [19] Kikuchi L, Park JY, Victor C, Davies J E; Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces; Biomaterials 2005, 26: 5285-95
- [20] Nygren H, Tengvall P, Lundstrom I; The initial reactions of TiO₂ with blood; J. Biomed. Mater. Res. 1997, 34: 487- 92
- [21] Park JY, Davies JE; Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces; Clin. Oral Implants Res. 2000, 11: 530-9
- [22] Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P; Titanium in medicine; Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, Germany, 2001
- [23] Davies JE; Understanding peri-implant endosseous healing; J. Dent. Educ. 2003, 67: 932-49
- [24] Keselowsky BG, Collard DM, Garcia AJ; Surface chemistry modu-

- lates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion; *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 66A: 247-59
- [25] Broberg M, Eriksson C, Nygren H: GpIIb/IIIa is the main receptor for initial platelet adhesion to glass and titanium surfaces in contact with whole blood; *J Lab Clin Med* 2002, 139: 163-172
- [26] Harten; *Physik für Mediziner*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 10. Auflage, 2002
- [27] Clark P, Connolly P, Curtis A, Dow J, Wilkinson C; Topographical control of cell behavior: II multiple grooved substrata; *Development* 1990, 108: 635-644
- [28] Müller-Karow A; Perioperative Chrom- und Kobaltserumkonzentrationen bei Implantation einer Hüft- oder Knieendoprothese; Dissertation der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; 2003
- [29] Repenning D; Bewertung von Materialien für den implantologischen Einsatz; *Implantologie-Zeitung* 07/2006: 14-19
- [30] Risch K, Althen W; Gezieltes Beizen von Apparaten aus chemisch beständigen Stählen; *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* Volume 12, Issue 1 , Pages 23 – 31, 15. Sep. 2004
- [31] Gross U, Müller-Mai C, Fritz T, Voigt C, Schmitz H; Implant surface roughness and mode of load transmission influence periimplant bone structure; In: Heimke G, Soltesz U, Lee A, eds. *Advances in Biomaterials*; Amsterdam: Elsevier (1990)
- [32] Pilliar RM, Lee JM, Maniopoulos C; Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants; *Clin Orthop* 1986, 208:108–113
- [33] Burke DW, Bragdon CR, O'Connor DO, et al.; Dynamic measurement of interface mechanics in vivo and the effect of micromotion on bone ingrowth into a porous surface device under controlled loads in vivo; *Transactions of the Orthopaedic Research Society* 1991, 16:103-104
- [34] Fillies T, Wiesmann HP, Sommer D, Joos U, Meyer U; Primäre Osteoblastenreaktionen auf SLA- und mikrostrukturierten Implantatoberflächen; *Zeitschrift Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*; Verlag

- Springer Berlin / Heidelberg ISSN1432-9417 (Print) 1434-3940 (Online)
Heft Volume 9, Number 1 / Januar 2005: 24-28
- [35] Multanen M; Effect of Silver Nitrate and Ofloxacin Blended Caprolactone-L-lactide Coatings on the Properties of Bioabsorbable Self-reinforced Polylactide Urospirals; Dissertation, University of Tampere, 2002
- [36] Liedberg H, Lundberg T; Silver coating of urinary catheters prevents adherence and growth of *Pseudomonas aeruginosa*; *Urolog. Res.* 1998, 17 (6): 357-358
- [37] Cormio L, La Forgia P, Siitonen A, Ruutu M, Törmälä P, Talja M; Immersion in antibiotic solution prevents bacterial adhesion onto biodegradable prostatic stents; *Br J Urol* 1997, 79: 409-413
- [38] Esenwein SA, Esenwein S, Herr G, Muhr G, Küsswetter W, Hartwig CH; Osteogene Aktivität BMP-3-beschichteter Titanprüfkörper unterschiedlicher Oberflächenbeschaffenheit im orthotopen Lager des Riesenkaninchens; *Der Chirurg* Volume 72, Number 11: 1360-1368, SpringerLink, Heidelberg, 2001
- [39] Bauer S; Selbstorganisierte Titandioxid-Nanoröhren als biorelevante Schichten auf titanbasierten Implantatwerkstoffen; Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg, 2009
- [40] Baier RE, Meyer AE, Natiella JR, Natiella RR, Carter JM; Surface Properties determine bioadhesive outcomes: Methods and results; *J. Biomed. Mater. Res.* 1984, 18 (4) 337-355
- [41] Krüger CD; Experimentelle Untersuchungen zur Oberflächenveränderung metallischer Implantatmaterialien durch Plasmabehandlung; Dissertation Universität Bochum; 2009
- [42] Wolter D, Jürgens C; Trauma und Berufskrankheit; Volume 8, Number 4, p: 206-211, November 2006
- [43] Jäger M, Wirth C; Erworbene Erkrankungen des Hüftgelenks; *J. Praxis der Orthopädie* 1992, Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York
- [44] Manley MT and Serekian P; Wear debris; An environmental issue in total joint replacement.; *Clin.Orthop.* 1994, p. 137-146.
- [45] Datzmann TP; Experimentelle Untersuchung von neuartigen Implantat-

- designkonzepten für die Luxationsvermeidung von künstlichen Hüftgelenken; Dissertation an der Universität München, 2009
- [46] Zeeck Fischer S, Grond S; Chemie für Mediziner; Urban & Fischer Verlag München-Jena; 4. Auflage (2000)
- [47] Carew EO, Cooke FW, Lemons JE, Ratner BD, Vesely I, Vogler E; Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine; Elsevier Inc.; 2. Auflage (2004)
- [48] Kraft CN, Hansis M, Arens S, Menger MD, Vollmar B; Striated muscle microvascular response to silver implants: A comparative in vivo study with titanium and stainless steel; J. Biomed. Mater. Res. 2000, 49 (2): 192-199
- [49] Oloffs A, Grosse-Siestrupp C, Bisson S, Rinck M, Rudolph R, Gross U; Biocompatibility of silver-coated polyurethane catheters and silver coated Dacron materials; Biomaterials 1994, 15 (10): 753-758
- [50] Olson-Merle E, Harmon BG, Kollef MH; Silver-coated endotracheal tubes associated with reduced bacterial burden in the lungs of mechanically ventilated dogs; Pulmol. 2002, 121 (3): 863-870
- [51] Kang HY, Jung MJ, Jeong YK; Antibacterial activity and the stability of an Ag⁺ solution made using metallic silver; Korean J Biotechnol Bioeng 15, 2000, pp. 521–524
- [52] Kawashita M, Tsuneyama S, Miyaji F, Kokubo T, Kozuka H, Yamamoto K; Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel Method; Biomaterials 21, 2000, pp. 393–398.
- [53] Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO; A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*; J Biomed Mater Res 52, 2000, pp. 662–668
- [54] Zhang F, Wolf GK, Wang X, Liu X; Surface properties of silver doped titanium oxide films; Surface and Coatings Technology 2001, Issue 1: 65-70 (6)
- [55] Leventhal J; Titanium a metal for surgery; Bone Jt. Surg 1951, 33A; 473.34
- [56] Banovetz JM, Sharp R, Probe RA, Anglen JO: Titanium plate fixation: A

- review of implant failures; J.Orthop. Trauma 1996, 10: 389-394
- [57] Heisterkamp B; Korrosion biokompatibler Titan-Legierungen; Dissertation Universität Dortmund, 2007
- [58] Long M, Rack; HJ: Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective; Biomaterials 1998, 19: 1621-1639
- [59] Textor M, Sittig C, Wieland M, Xiao SJ, Kurrat R; Oberflächen von Titanimplantaten: Chemische und topographische Eigenschaften und deren Einfluss auf das biologische Verhalten; Osteologie 1999, 8 Suppl. 1: 9-10
- [60] Williams D F; Elektrochemical aspects to corrosion in the physiological environment. Fundamental aspects of biocompatibility; CRC press,1981; Boca Raton :11-42
- [61] Williams R L, Williams D F; The spatial resolution of protein adsorption on surfaces of heterogenous metallic biomaterials; J Biomed Mat Res 1989, 23: 339-350
- [62] Galante JO, Lemons J, Spector M, Wilson PD, Jr., Wright TM; The biologic effects of implant materials; J Orthop Res 1991, 9: 760-775
- [63] Liao H, Wurtz T, Li J; Influence of titanium ion on mineral formation and properties of osteoid nodules in rat calvaria cultures; J Biomed Mater Res 1999, 47: 220-227
- [64] Steinemann SG; Metal implants and surface reactions; Injury 1996, 27 Suppl 3: SC16-22
- [65] Poggie RA, Mishra AK, Davidson JA; Three-body abrasive wear behaviour of orthopaedic implant bearing surfaces from titanium debris; J. of Materials Science: Materials in medicine; Vol. 5, Numbers 6-7; 387-392; 1994
- [66] Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH; Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. Analysis with immunohistochemical techniques and in situ hybridization; J. Bone Joint Surg. Am. 1993, 75; pp. 863-879
- [67] Bach FW, Möhwald K, Laarmann A, Wenz T; Moderne Beschichtungsverfahren; Wiley-VCH Verlag, Weinheim; 2005
- [68] Wintermantel E, Ha SW; Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen;

- Springer, Berlin (1996)
- [69] Howie DW, Rogers SD, McGee MA, Haynes DR, Percy MJ; Biologic effects of cobalt chrome in cell and animal models: The response to particulate debris; *Clin Orthop* 1996, 24: S217-232
- [70] Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Fureder W, Sperr WR, Sperr W, Ellinger A, Slavicek R, Boltz-Nitulescu G, Valent P; Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations; *J Dent Res* 1995, 74: 1513-1520
- [71] Wan A, Esner A; Three-body wear of UHMWPE acetabular cups by PMMA particles against CoCr, alumina and zirconia heads in a hip joint simulator; *Wear*, Vol. 250, Issue 1-12; October 2001; Pages 212-216
- [72] Hillen U, Haude M, Erbel R, Goos M; Evaluation of metal allergies in patients with coronary stents; *Contact Dermatitis* 2002 (47); S. 353-356
- [73] Bonfig J; Tantalmodifikationen auf Implantatstahl für kardiale Stents, Herstellung und Charakterisierung; Dissertation an der Universität Würzburg, 2004
- [74] Gellings PJ; Korrosion und Korrosionsschutz von Metallen: Eine Einführung, 1981; Carl Hanser Verlag, München, Wien
- [75] Elter P, Sickel F, Ewald A; Nanoscaled periodic surface structures of medical stainless steel and their effect on osteoblast cells; *Acta Biomaterialia* 5, 2009, 1468–1473; Elsevier
- [76] Ferner M; Praktikumsbericht; Universität Ulm, Abt. Chem. Physik, 02.05.2001
- [77] Gnehr WM; Untersuchung zum reaktiven Puls-magnetronspattern von ITO von metallischen Targets; Dissertation an der Technischen Universität Ilmenau, 2005
- [78] Trentz OA, Zellweger R, Amgwerd MG, Uhlschmid GK; Testung von Knochenimplantaten auf Zelllinien und humanen Osteoblasten; *Der Unfall-Chirurg* 1997; Jan, Volume 100, Number 1
- [79] Schumann U, Del Genovese D, Rösler J; Auswahl der Ätzmedien für Ein- und Polykristalline Hochtemperaturwerkstoffe; Institut für Werkstoffe; Technische Universität Braunschweig, 2004

- [80] Lüllmann-Rauch R; Histologie; Thieme 2003
- [81] Kunzler TP, Drobek T, Schuler M, Spencer ND; Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 2007, 28: 2175 – 2182
- [82] Martin JY, Schwartz Z, Hummert TW, Schraub DM, Simpson J, Lankford J, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD; Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63); *J Biomed Mater Res* 1995, 29: 389 – 401
- [83] Kuroda S, Viridi AS, Li P, Healy KE, Sumner DR; A low temperature biomimetic calcium phosphate surface enhances early implant fixation in a rat model; *J. Biomed. Mater. Res.* 2004, A 70: 66-73
- [84] Davies JE; Mechanisms of endosseous integration; *Int. J. Prosthodont.* 1998, 11: 391- 401
- [85] Barber TA, Ho JE, De Ranieri A, Viridi AS, Sumner DR, Healy KE; Peri-implant bone formation and implant integration strength of peptide-modified p(AAm-co-EG/AAc) interpenetrating polymer network-coated titanium implants; *J Biomed Mater Res A.* 2007 Feb; 80(2): 306-320
- [86] Gebhardt A; Rapid Prototyping - Werkzeuge für die schnelle Produktentstehung; Carl Hanser, Verlag München - Wien, 2000
- [87] Thull R, Surface modifications to improve biocompatibility and mechanical properties of orthopedic implant, *Orthopäde* 2003; 32 (1): 51-59
- [88] Berger S; Selbstorganisierte nanostrukturierte anodische Oxidschichten auf Titan und TiAl-Legierungen: Morphologie, Wachstum und Dünnschichtanodisation; Dissertation Universität Erlangen-Nürnberg, 2009
- [89] Peters M, Leyens C; Titan und Titanlegierungen; Wiley- VCH; S. 438 f., 2002
- [90] Monsees TK, Barth K, Tippelt S, Heidel K, Gorbunov A, Pompe W, Funk RH; Effects of different titanium alloys and nanosize surface patterning on adhesion, differentiation, and orientation of osteoblast-like cells. *Cells Tissues Organs* 2005, 180: 81 – 95
- [91] Scharnweber D; Bio surface-engineering of titanium materials. *Biomaterialien* 2007, 8 (1): 8-15

- [92] Tauböck T; Analyse des Zellverhaltens auf metallischen Proben in Abhängigkeit von der Oberflächenpolarisation; Dissertation Universität Würzburg, 2008
- [93] Zhu X, Chen J, Scheideler L, Altebaeumer T, Geis-Gerstorfer J, Kern D; Cellular Reactions of Osteoblasts to Micron- and Submicron-Scale Porous Structures of Titanium Surfaces; Cells Tissues Organs 2004, 178:13-22
- [94] <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:IJzerkoolstofdiagram.png>, 2010