

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

Verbesserung der Osseointegration orthopädischer Implantate

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Holger Keuer

Rostock, 24. Januar 2014

1. Gutachter:
Prof. Dr. Thomas Gerber
Universität Rostock
Deutschland

2. Gutachter:
Prof. Dr. Hans Schmotzer
Sigma RC GmbH
Schweiz

Verteidigungsdatum:
08. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1. Medizinische Grundlagen	3
2.1.1. Osteogenese	3
2.1.2. Osseointegration	5
2.2. Physikalische Grundlagen	6
2.2.1. Elastizitätsmodul - Strukturmodul	6
2.2.2. Oberflächenspannung	6
2.3. NanoBone [®] -Technologie	9
2.3.1. Sol-Gel-Prozess	10
2.3.2. Synthetisches Hydroxylapatit	13
2.3.3. Herstellung von NanoBone [®]	14
2.3.4. Anwendung von NanoBone [®]	14
2.3.5. Löslichkeit von NanoBone [®]	14
2.3.6. Wirkungsweise von NanoBone [®]	15
3. Untersuchungsmethoden	17
3.1. Mikroskopie	17
3.2. Tierexperimentelle Studie	17
3.2.1. Sterilisation und steriles Arbeiten	17
3.2.2. Zytotoxizitätstest	18
3.2.3. Tiermodell - New Zealand White Rabbit	18
4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)	21
4.1. Struktur und Eigenschaften von Titan	21
4.2. Stand der Forschung	25
4.3. Entwicklung des Modellimplantates (TS)	27
4.3.1. Design des Modellimplantates	27
4.3.2. Porosität des Modellimplantates	31
4.3.3. Beschichtung des Modellimplantates	32
4.3.4. Eigenschaften der Beschichtung im μm -Bereich	37
4.3.5. Eigenschaften der Beschichtung im nm -Bereich	39
4.4. Tierexperimentelle Studie (TS)	40
4.4.1. Zytotoxizitätstest des Implantatmodells	41
4.4.2. Theoretisches Modell zur histomorphometrischen Evaluation	42
4.4.3. Histomorphometrische Auswertung	46
4.4.4. Histologische Auswertung	50

4.5. Diskussion (TS)	57
4.5.1. Fehlerdiskussion der histomorphometrischen Evaluation	57
4.5.2. Makrophagenaufkommen in der Kontrollgruppe	58
4.5.3. Einfluss der Schicht auf die Knochenbildung	59
4.5.4. Adipozyten im Kernbereich	61
5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)	63
5.1. Polyaryl	63
5.2. Struktur und Eigenschaften von PEEK	64
5.3. Verwendung von Kunststoffen in der Medizin	66
5.4. Stand der Forschung	68
5.5. Entwicklung des Modellimplantates (PEEK)	68
5.5.1. Vorüberlegungen zur Beschichtung	68
5.5.2. Erarbeitung der Pulverbeschichtung	69
5.5.3. Design der Implantatform	72
5.5.4. Beschichtungsprozess	73
5.5.5. Charakterisierung der Beschichtung	74
5.6. Tierexperimentelle Studie (PEEK)	78
5.6.1. Zytotoxizitätstest der Modellimplantate	78
5.6.2. Design der tierexperimentellen Studie	81
5.6.3. Histologische Auswertung	81
5.6.4. Histomorphometrische Auswertung	89
5.7. Diskussion (PEEK)	90
5.7.1. Reproduzierbarkeit der Pulverbeschichtung	90
5.7.2. Nanostrukturierte Polymeroberfläche	92
5.7.3. Verbesserung der Osseointegration	92
6. Zusammenfassung und Ausblick	97
A. Anhang	99
A.1. Abkürzungen	99
A.2. Fachbegriffe	99
A.3. Ergänzende Abbildungen	100
A.4. Verwendete Geräte, Materialien & Software	104
Abbildungsverzeichnis	107
Tabellenverzeichnis	111
Literaturverzeichnis	113

1. Einleitung

Die Menschen werden immer älter. In der Politik ist dieses Phänomen unter dem Begriff „Generationenwandel“ bekannt. Eine Folge dessen ist, dass der Körper im hohen Alter immer häufiger nach medizinischen „Wartungsarbeiten“ verlangt. Im Jahre 1989 wurden etwa 65.000 Hüftprothesen implantiert. Zwanzig Jahre später sind es bereits 150.000 bis 180.000 künstliche Hüftimplantate pro Jahr [1, 2]. Hinzu kommen etwa 10.000 Revisionsoperationen, bei denen die alten Hüftprothesen ausgewechselt werden müssen [2] – Tendenz steigend. Die Auswechselloperationen werden unter anderem notwendig, wenn sich das Implantat lockert oder beginnt Materialermüdungserscheinungen zu zeigen. Bei Hüftprothesen kann man heutzutage mit einer Standzeit von 10 bis 15 Jahren rechnen, in Einzelfällen bis zu 20 Jahren [3]. Bei den Wechseloperationen von einzementierten Implantaten wird der einfassende Knochen stark in Mitleidenschaft gezogen. Aus diesem Grund wird versucht bei Patienten, die jünger als etwa 70 Jahre sind, in Hinblick auf einen möglichen späteren Wechsel der Prothese, auf eine Zementierung verzichtet [3].

Um dem Punkt des Prothesenwechsels entgegen zu arbeiten, unterliegt die Herstellung von Implantaten einem ständigen Wandel. So wurden zum Beispiel mit immer neuen Erkenntnissen über Biokompatibilität und mechanischer Belastbarkeit die Ausgangsmaterialien für Implantate im Laufe der Zeit von Edelstahl und Chrom-, Kobalt- und Nickellegierungen durch vorwiegend Titan und Titanlegierungen ersetzt. Auch die Polymere erhalten immer mehr Einzug in die Sparte der Ausgangsmaterialien [4] und haben in manchen Bereichen, wie der Wirbelfusionierung, die Metallimplantate fast vollständig verdrängt. Aber nicht nur die Materialien haben sich verändert, sondern auch die Herstellungsmechanismen. So können heutzutage durch FEM (Finite-Elemente-Methode) ganze Belastungszyklen für komplexe Implantatstrukturen simuliert und angepasst werden. So ist aus heutiger Sicht, durch neuartige dreidimensionale Druckverfahren, sowohl für Metalle als auch für Kunststoffe, der Komplexität in der Implantatstruktur während der Herstellung, kaum noch eine Grenze gesetzt.

Die vorliegende, interdisziplinäre Arbeit wird den Osteogeneseprozess von zwei verschiedenen Modellen für orthopädische Implantate untersuchen. Dazu werden beide Modelle mit einer osteoinduktiven Beschichtung auf Basis der NanoBone[®]-Technologie versehen. Die Klärung des Einflusses dieser Schicht auf den Einheilprozess stellt für diese Arbeit einen fundamentalen Aspekt dar. Die Charakterisierung der Modellimplantate kann in zwei Teilprozesse unterteilt werden. Der erste Teilprozess umfasst die Herstellung und die Beschichtung der Modelle mittels experimentalphysikalischer Untersuchungsmethoden. Im zweiten Prozess wird dann jeweils eine medizinische *in vivo* Studie durchgeführt, die Aufschluss über die Osseointegration liefern soll.

Die Arbeit ist in die beiden Modellimplantate gegliedert. Das erste Modell basiert auf einer interkonnektierenden Porenstruktur, die besonders im Hinblick auf eine zementfreie Implantatverankerung an Bedeutung gewinnt. Die medizinischen Untersuchungen sollen zeigen, wie weit der Knochen in diese offenporigen Strukturen wächst. Weiterhin wird eine Methode ent-

1. Einleitung

wickelt, die eine objektive Beschreibung der Einwachstiefe ermöglicht. Dazu wird der Einfluss der osseointegrativen Beschichtung auf diesen Prozess mit erfasst.

Das zweite Modell wird aus dem Polymer Polyetheretherketone (PEEK) hergestellt. PEEK zeichnet sich besonders durch seine mechanischen Eigenschaften als Implantatmaterial aus und hat, wie eingangs erwähnt, metallische Implantatmaterialien im Bereich der Wirbelsäulenfusionierung stark zurückgedrängt. Problematisch für den Kunststoff ist jedoch die schlechte Gewebe-Implantat-Interface. Die Untersuchungen an diesem Modell sollen zeigen, ob die osseointegrative Beschichtung das Problem der unzureichenden Zelladhäsion lösen kann.

2. Theoretische Grundlagen

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Herstellung und Beschichtung von Implantaten. Um ein Material für den Implantateinsatz als geeignet zu verifizieren, ist es erforderlich, dieses einer Vielzahl von Tests zu unterziehen. In Tabelle 2.1 sind die dazu notwendigen Untersuchungen, gegliedert in physikalische, chemische und biologische Eigenschaften, dargestellt. Da sowohl das verwendete Titan zur Herstellung medizinischer Produkte geeignet ist und auch das Herstellungsverfahren von hochporösen Formkörpern [5] eine patentierte Anwendung zur Herstellung von Implantaten hervorgebracht hat [6], werden die Untersuchungen auf die Beschichtung, die *in vitro* und die *in vivo* Tests beschränkt. Das Gleiche gilt für das verwendete Polymer, welches auch eine Zulassung für klinische Untersuchungen hat. Auch hierbei werden die Untersuchungen auf die Beschichtung, die *in vitro* und die *in vivo* Tests fokussiert. In beiden Fällen ist davon auszugehen, dass die Materialien die notwendigen Bedingungen und Eigenschaften zur Implantatherstellung erfüllen.

Tab. 2.1.: Übersicht der zu überprüfenden Materialeigenschaften vor einem Einsatz als Implantat [7].

Eigenschaften	notwendige Untersuchungen zur ...
physikalische und mechanische	Dichte, Gaspermeabilität, Härte, Biegefestigkeit, Schermodul, elektrische Leitfähigkeit, Wärmeleitfähigkeit, thermischer Ausdehnungskoeffizient, spezifische Wärme, Oberflächenrauigkeit
chemische und elektrochemische	Korrosionsbeständigkeit, chemische Stabilität, Lösungsmittelbeständigkeit, Sterilisierbarkeit, Wasseraufnahme, Oberflächenspannung
biologische und physiologische	Toxizität, Karzinogenität, Thrombogenität, Immunreaktionen, allergische und entzündliche Reaktionen

2.1. Medizinische Grundlagen

2.1.1. Osteogenese

Unter dem Begriff Osteogenese ist allgemein der Prozess der Knochenbildung zu verstehen. Der Knochen hat viele Funktionen: die Stütz- und Schutzfunktion, das Knochen-Knochenmark-System und den Mineralienstoffwechsel [8]. Er besteht aus einer Kollagen-Protein-Matrix, in

2. Theoretische Grundlagen

der Mineralien eingelagert sind. Die Matrix besteht aus Kollagenfasern, den Fibrillen, zwischen denen die Mineralien hauptsächlich in Form von Hydroxylapatitplättchen eingelagert sind. Diese bestehen zu etwa 85 % aus Kalziumphosphat [8].

Der Knochen ist ein lebendes Gewebe und unterliegt einem ständigem Umbauprozess. Etwa 0,7 % des gesamten Knochens werden bei einem gesunden menschlichen Organismus täglich neugestaltet und an die äußere Belastung angepasst [9]. Dies geschieht durch Knochenapposition und -resorption, an denen hauptsächlich drei verschiedene Zelltypen beteiligt sind: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten [10]. Die Abbildung 2.1 stellt diesen Prozess des Knochenumbaus schematisch dar.

Die Osteoblasten sind für den Prozess der Knochenapposition verantwortlich. Dazu positionieren sie sich schichtweise in der Nähe der Knochenoberfläche und beginnen Knochenmatrix anzulagern. Diese Matrix wird als Osteoid bezeichnet und beschreibt den noch nicht vollständig ausmineralisierten Knochen. Im Laufe dieses Prozesses mauern sich die Osteoblasten in den neuen Knochen ein und werden zu Osteozyten. Der Durchmesser der Osteoblasten liegt bei etwa 20 μm [11]. Die umgewandelten Osteozyten erstrecken sich über einem Bereich von 20 bis 60 μm [11].

Die Osteozyten sind durch ein Netzwerk aus feinsten Versorgungskanälen, den Canaliculi, verbunden. Über dieses Netzwerk findet eine biochemische Signalübertragung und der Stoffwechsel zwischen dem Blutsystem und den Osteozyten statt. Durch diese Verbindungen können die Osteozyten durch die kalzifizierte, interzelluläre Substanz, in der sie eingebaut sind, versorgt werden. Die Versorgung kann jedoch nur bis zu einer Entfernung von

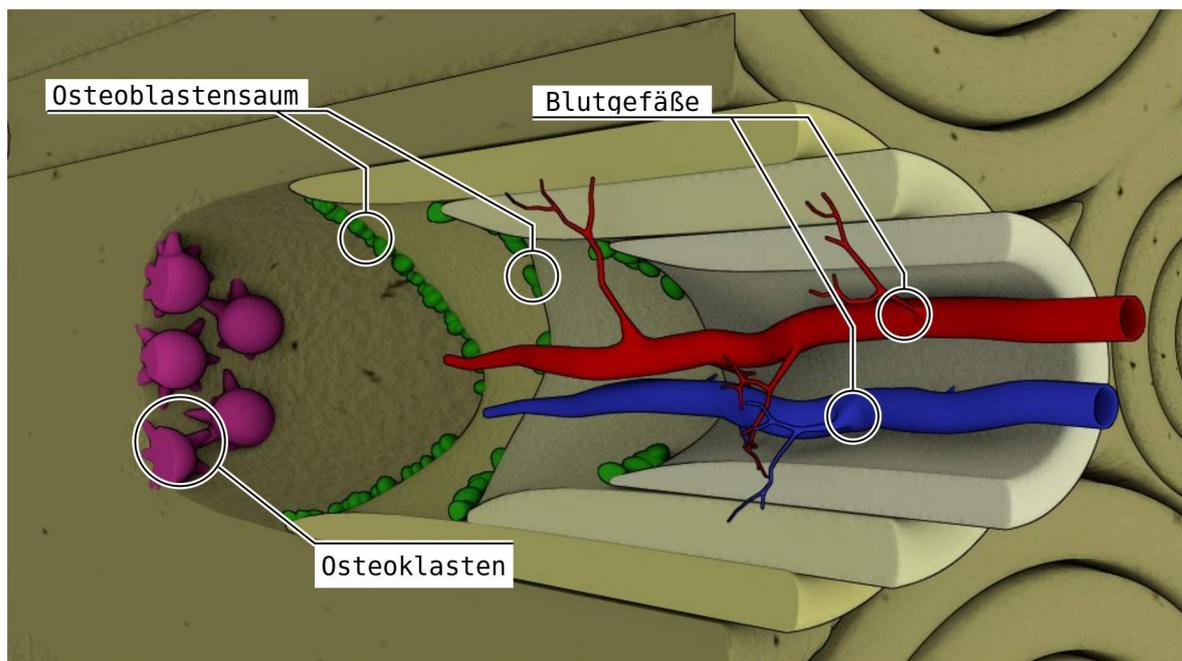


Abb. 2.1.: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der Osteogenese. Die Osteoklasten lösen den alten Knochen auf. Die Osteoblasten bilden schichtweise neuen Knochen auf der Oberfläche. Dieser Kanal, in dessen Zentrum die Versorgungsgefäße des Knochens verlaufen, wird als HARVERS-Kanal bezeichnet.

maximal 0,5 mm von einem Kapillargefäß aus aufrecht erhalten werden. Die Kapillargefäße befinden sich dabei im Zentrum des HAVERS-Kanals oder seinen Seitenarmen, den VOLKMANN-Kanälen [12]. Der HAVERS-Kanal hat einen Durchmesser von etwa 50 µm und ist von 4 bis 20 konzentrischen Lamellenknochen mit einer Dicke von 3 bis 7 µm umschlossen [12]. Dieses Konstrukt wird auch als Osteon bezeichnet und erfordert einen Freiraum von mindestens 150 µm, um sich auszubilden [13].

Während die Osteoblasten den Knochen aufbauen, sind es die Osteoklasten, die für die Resorption der Knochenmatrix verantwortlich sind. Sie differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und regulieren durch Zersetzung von Knochen auch den Blutkalziumspiegel [8]. Dazu positionieren sie sich auf der Oberfläche des Knochens. Dort bilden sie mit ihrem Bürstensaum (*ruffled border*) einen abgeschlossenen Bereich. In diesem Bereich bilden die Zellen aus CO₂ und H₂O Salzsäure. Durch die Säure wird der pH-Wert abgesenkt und das mineralische Hydroxylapatit aufgelöst [14]. Durch lysosomale Enzyme werden die organischen Bestandteile, wie die Kollagenfasern, aufgespalten. Die aufgelösten Bestandteile des Knochens werden als eingekapseltes Phagozom durch die Zelle transportiert und dann in den Kreislauf freigegeben. Durch den Knochenabbauprozess entstehen die typischen Einbuchtungen, die HOWSHIP'schen Lakunen [15]. Die Osteoklasten haben in etwa eine Ausdehnung von 100 µm [11].

2.1.2. Osseointegration

Wird in den Knochen ein Implantat eingesetzt, wird dabei das Ziel verfolgt, dass sich der Knochen und das Implantat stabil miteinander verbinden. Dabei bildet der Organismus ein einfassendes Knochenlager um den eingesetzten Fremdkörper. Dieser Prozess wird als Osseointegration bezeichnet. Diese verläuft in drei, sich einander überlappenden Phasen [16]. Die erste und wichtigste Phase ist die Einleitung der Osseointegration¹, in der die Proliferation der Osteogenesenzellen im Wundbereich und auf der Implantatoberfläche stattfindet. Ausgelöst wird diese Phase durch die Verletzung des Knochengewebes, welche zum Beispiel durch das Bohren und Eindrehen des Implantats in den Lagerknochen herbeigeführt wird. Durch die einsetzende Wundheilung entsteht ein periimplantäres Fibringerüst. Die Implantatoberfläche adsorbiert Proteine aus dem Blutplasma, die sich als Biofilm auf der Oberfläche anlagern. Beide, Fibringerüst und Biofilm, begünstigen das direkte Aufsetzen von knochenbildenden Zellen auf der Implantatoberfläche und die Zelladhäsion [16, 17]. Die zweite Phase ist die *de novo* Knochenbildungsphase. Hier finden die Differenzierung und Synthese von knochenbildenden Zellen statt. Es bildet sich eine Proteinmatrix auf der Implantatoberfläche und der Knochenbildungsprozess durch die Osteoblasten beginnt [16]. Die ersten beiden Phasen werden als Kontaktosteogenese bezeichnet, die bestimmend für die Bindung zwischen Implantatoberfläche und Knochen ist.

In der späteren dritten Phase beginnt der Remodellingprozess. Zusätzlich zu der Knochenapposition kommt die Resorption durch Osteoklastentätigkeit hinzu. Der Knochen wird dabei nicht nur erneuert, sondern auch an die vorherrschenden äußeren Belastungen angepasst.

¹engl. Phasenbezeichnung: osteoconduction

2.2. Physikalische Grundlagen

2.2.1. Elastizitätsmodul - Strukturmodul

Das Elastizitätsmodul E gibt das Verhältnis zwischen der mechanischer Spannung σ und der Dehnung ε an. Die mechanische Spannung ergibt sich aus dem Verhältnis der Kraft F und der Fläche A . Die Dehnung wird aus dem Verhältnis der Längenänderung ΔL zur ursprünglichen Länge L_0 gebildet.

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon} = \frac{F \cdot L_0}{A \cdot \Delta L} \quad (2.1)$$

Die Verwendung der 1. Ordnung des isotropen Anteils des Spannungs- und Dehnungstensors ist jedoch nur zulässig, solange es sich bei der zu untersuchenden Probe auch um einen isotropen Körper handelt. Dies trifft auf schaum- oder schwammartigen Körper nicht zu. Eine mikroskopisch exakte Beschreibung der elastischen Verformung erfordert somit die Einbeziehung von höheren Ordnungen.

Wie in der Fachliteratur über solche offenporösen Implantatmaterialien, gibt der verwendete Begriff des Elastizitätsmoduls auch in den folgenden Abschnitten dieser Arbeit nur eine makroskopische Beschreibung des elastischen Verhaltens der untersuchten Materialien wieder.

2.2.2. Oberflächenspannung

Die Oberflächenspannung beruht auf den anziehenden Kräften, die die Moleküle untereinander ausüben. Sie beschreibt das benetzende Verhalten von Flüssigkeiten mit anderen Gegenständen. Die anziehenden Kräfte zwischen den Molekülen in einer Flüssigkeit werden Kohäsionskräfte genannt. Die Kräfte zwischen den Flüssigkeitsmolekülen und einem anderen Körper sind als Adhäsionskräfte bekannt [18].

Das Verhältnis dieser beiden Kräfte beschreibt das benetzende Verhalten der Flüssigkeit mit diesem Körper. Der Lotuseffekt ist ein Beispiel dafür, dass die Adhäsionskräfte zwischen einem Wassertropfen und einer Unterlage gegenüber den Kohäsionskräften des Wassers sehr

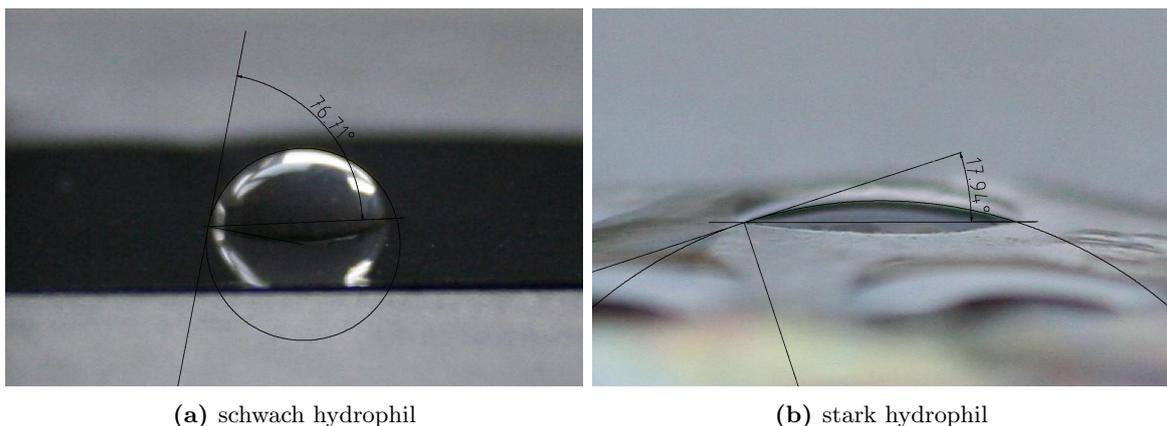


Abb. 2.2.: Messung des Kontaktwinkels eines Wassertropfens auf einer schwach hydrophilen und einer stark hydrophilen Titanoberfläche.

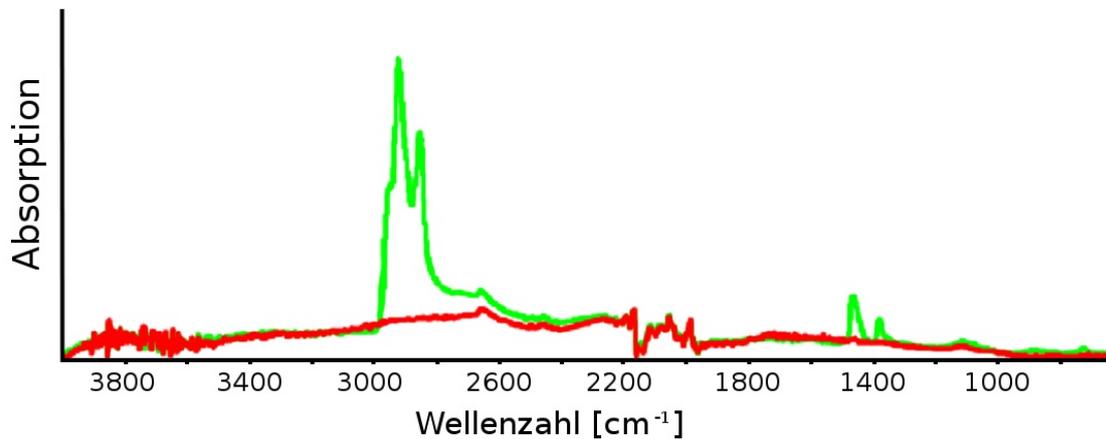


Abb. 2.3.: Infrarot-Spektrum einer Metalloberfläche vor (■) und nach (■) einer Behandlung mit atmosphärischem Plasma [11]. Die Absorptionsbanden der organischen Verunreinigungen verschwinden durch die Behandlung.

klein sind. Im Fall keiner oder schlechter Benetzung mit Wasser spricht man von hydrophoben² Oberflächen. Der umgekehrte Fall, dass die Adhäsion stärker als die Kohäsion ist, beschreibt eine hydrophile³ Oberfläche. Der Grad der Benetzung wird durch den Kontaktwinkel beschrieben [19]. Ein Winkel über 90° bezeichnet eine hydrophobe Oberfläche, kleiner als 90° eine hydrophile. In Abbildung 2.2 sind eine schwach hydrophile und eine stark hydrophile Oberfläche einer Titanfolie dargestellt. Der in dieser Abbildung eingezeichnete Winkel ist nur als theoretische Darstellung und nicht als exakte Messung zu verstehen. Physikalisch ausführlicher wird der Effekt des Kontaktwinkels durch die YOUNGSCHE Gleichung beschrieben [20]. Da diese Arbeit aber keine Kontaktwinkelbestimmungen beinhaltet, soll dieser Abschnitt nur den Unterschied zwischen hydrophilen und hydrophoben Oberflächen verdeutlichen. Es wird an dieser Stelle nicht näher auf den Kontaktwinkel eingegangen.

Normale, unbehandelte Metalloberflächen haben eine hydrophobe oder sehr schwach hydrophile Oberfläche. Die Ursache dafür liegt in der Ablagerung von Atomen und Molekülen aus der Luft auf der Materialoberfläche, wobei insbesondere Kohlenwasserstoffe und Kohlenstoff-Sauerstoff-Verbindungen dabei eine bedeutende Rolle spielen [21–23]. Durch einer Plasma-Behandlung werden die Verunreinigungen mit Ionen beschossen, die ausreichend Energie und Impuls haben, um die verunreinigenden Atome und Moleküle herauszuschlagen [24]. Im Diagramm 2.3 sind zwei Messungen einer Infrarot-Spektroskopie dargestellt, die den Vorgang der Oberflächenreinigung verdeutlichen [11]. Der grüne Graph zeigt eine mit Kohlenstoffverbindungen verunreinigte Metalloberfläche. Der rote Graph zeigt die Metalloberfläche nach einer Behandlung mit atmosphärischem Plasma. Nach der Behandlung sind die Absorptionsbanden von organischen Verunreinigungen bei ca. 1400 und 2900 cm^{-1} verschwunden. Sind die Bindungen der Oberfläche wieder freigelegt, können auch die Wassermoleküle wieder besseren Kontakt herstellen, was letztendlich eine hydrophile Oberfläche darstellt.

²wasserabweisend

³wasserliebend

2. Theoretische Grundlagen

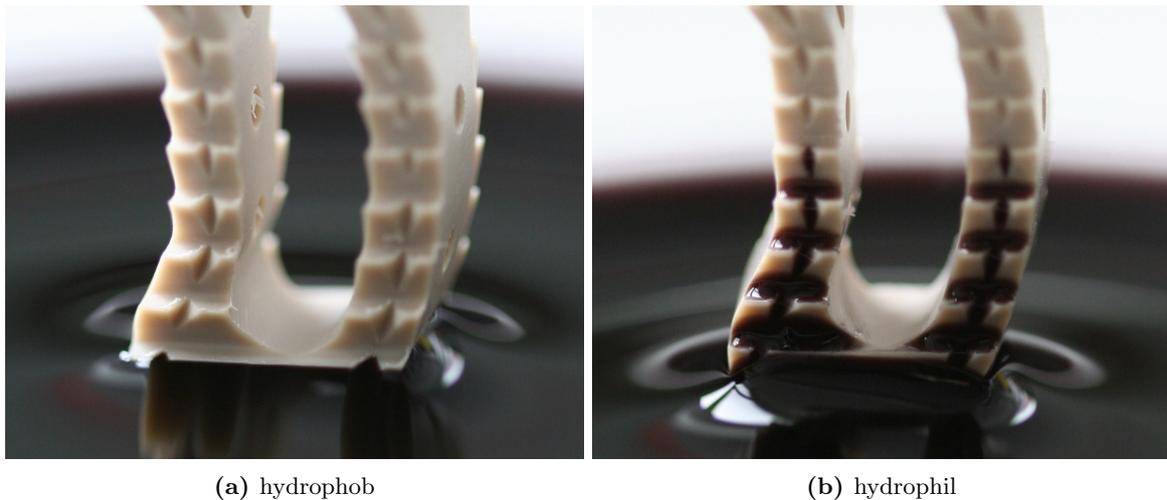


Abb. 2.4.: Darstellung der Benetzung (in schwarz angefärbten Wasser) einer hydrophoben und einer hydrophilen Oberfläche von PEEK-Cages.

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei unterschiedliche Geräte zur Reinigung der Oberflächen verwendet: eine Niederdruckplasmakammer (Nano PCCE, diener electronic GmbH, Deutschland) und ein atmosphärischer Plasmajet (Plasma Beam, diener electronic GmbH, Deutschland).

Eine Beschichtung durch eine Silica-Matrix, wie sie in den folgenden Abschnitten beschrieben wird, führt zwangsläufig zu einer vollständig wasserbenetzenden Oberfläche. Siliziumdioxid gilt, unabhängig von einer Plasmabehandlung, als vollständig benetzendes Material [25].

Niederdruckplasma

Niederdruckplasmen lassen sich, je nach Anwendungsbereich, sowohl mit atomaren Gasen (z. B. Argon, Helium) als auch mit molekularen Gasen (z. B. Sauerstoff, Stickstoff) erzeugen. Für diese Arbeit wurde das überwiegend stark ätzende Gas Sauerstoff zur Oberflächenreinigung verwendet. Wird ein Plasma bei atmosphärischen Druck gezündet, kommt es zu starken Wechselwirkungen zwischen den neutralen Teilchen der Atmosphäre und den angeregten geladenen Teilchen. Durch die Stoßprozesse geben die angeregten Teilchen Energie ab und heizen dadurch die gesamte Atmosphäre auf.

Wird jedoch der Druck in der Brennkammer der Plasmakanlage und somit die Gesamtanzahl der Teilchen reduziert, reduziert sich auch die Wahrscheinlichkeit für eine Wechselwirkung zwischen neutralen und geladenen Teilchen deutlich. Das Plasma bleibt kalt. Durch die geringe Wärmeenergie des Niederdruckplasmas ist dieses besonders geeignet, um Polymeroberflächen zu reinigen, ohne diese dabei thermisch zu verformen oder gar zu zerstören [11].

Dieser Prozess der Oberflächen säuberung durch ein Sauerstoffplasma lässt sich ebenfalls für den Kunststoff Polyäthyletheretherketon (PEEK) anwenden [26]. In der Abbildung 2.4 ist ein Wirbelsäulenimplantat (Cage), welches aus diesem Kunststoff besteht, dargestellt. Das Implantat wird beispielhaft für alle in dieser Arbeit verwendeten Polymerkörper über eine Zeitspanne von 10 min dem Niederdruckplasma ausgesetzt. Zur Verdeutlichung der Reinigung

und Aktivierung der Kunststoffoberfläche wird das untere Ende des Cages von oben herab mit Wasser in Kontakt gebracht. Zur besseren Darstellung des Wassers auf der Polymeroberfläche wird dieses mit schwarzer Tinte eingefärbt. Nur an der gesäuberten hydrophilen Oberfläche ist zu beobachten, wie die Flüssigkeit selbstständig an der Implantatstruktur nach oben klettert.

Atmosphärischer Plasmajet

Die äußere, potentialfreie Elektrode des atmosphärischen Plasmajets wird durch einen flexiblen Schlauch mit dem Arbeitsgas, der Druckluft (trocken und ölfrei) und der Hochspannung (bis zu 10 kV) versorgt (eine Skizze mit der technischen Darstellung des verwendeten Plasmajets ist in Abb. A.1 im Anhang auf Seite 100 beigelegt). Durch diese flexible Versorgungsverbinding kann die Elektrode von freier Hand über den Anwendungsbereich bewegt werden. Im Bereich der Entladungszone der Elektrode wird das eingeleitete Prozessgas durch einen Lichtbogen angeregt und in den Plasmazustand überführt [11]. Das entstehende Plasma wird durch den Druckluftstrom aus dem Düsenkopf herausgeblasen [27]. Der Plasmastrahl hat im Austrittsbereich einen Durchmesser von 5 mm. In einer Entfernung von etwa 1 cm von der Düse ist der gelblich-weiß schimmernde Strahl bei Tageslicht mit dem Auge nicht mehr wahrnehmbar. Die Arbeitstemperatur des Plasmastrahls liegt bei etwa 330 °C.

2.3. NanoBone[®]-Technologie

Die Produkte aus der NanoBone[®]-Technologie bestehen im Wesentlichen aus synthetisch hergestelltem Hydroxylapatit, welches in einer nanoporösen Silicagelmatrix eingebettet ist. Sie sind Knochenersatzmaterialien, die in der orthopädischen sowie der Dental- und der Trauma-chirurgie eingesetzt werden. Sie werden verwendet um Knochendefekte zu therapieren und unzureichendes Knochengewebe wieder aufzubauen. Ein Knochenersatzmaterial wird besonders dann erforderlich, wenn es sich um überkritische Defekte handelt, die der Organismus nicht mehr selbstständig ausbessern kann. Um eine gute Wirkungsweise zu erzielen, wird in dem Biomaterial die Nanostruktur der extrazellulären Knochenmatrix nachempfunden.

Die Abbildungen 2.5 zeigen einzelne Produkte aus der NanoBone[®]-Reihe, die von einem

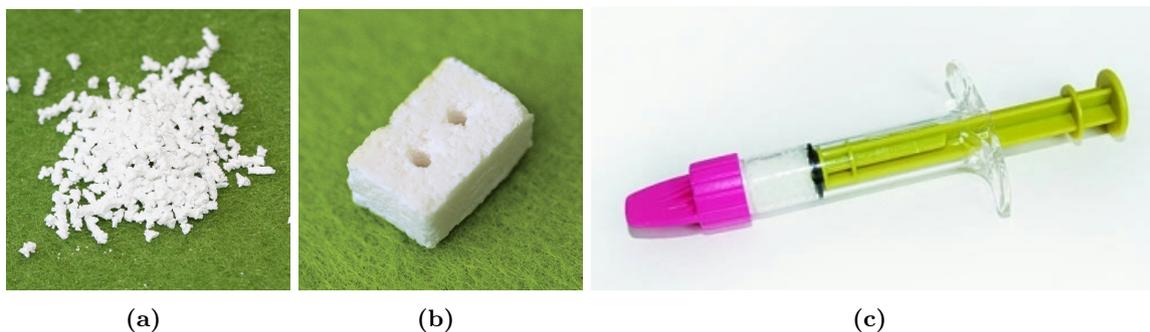


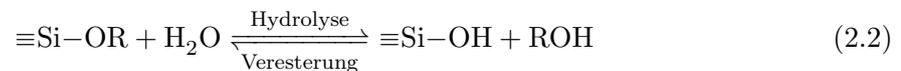
Abb. 2.5.: Abbildungen von NanoBone[®]-Produkten: Granulat (a), Block (b) und Putty (c) [Quelle: Artoss GmbH].

2. Theoretische Grundlagen

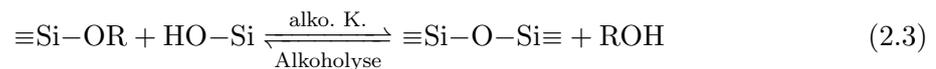
Granulat und Block bis hin zu einer kneteartigen Putty reichen. Ergänzend werden in Zukunft vielleicht Mikroteilchen und Beschichtungsmöglichkeiten von Implantaten hinzukommen, die sich momentan noch im Entwicklungsstadium befinden.

2.3.1. Sol-Gel-Prozess

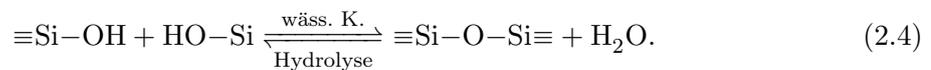
Ein Sol ist ein kolloiddisperses System [28]. In diesem System bilden sich kleine Partikel (1 bis 100 nm), die je nach weiterer Handhabung als Pulver benutzt werden können oder zu komplexen Gelstrukturen agglomerieren [29]. Die Abbildungen 2.6(a) bis (c) stellen schematisch die Unterschiede zwischen Sol, Pulver und Gel dar. Dieser Vorgang kann im Wesentlichen durch zwei chemische Prozesse beschrieben werden: die Hydrolyse und die (Poly-)Kondensation. Ausgehend von einem tetraedischen Alkoxidpräkursor (z. B. Tetramethylorthosilicat, Tetraethylorthosilicat) lassen sich die zwei Prozesse in drei Gleichungen ausdrücken [30]. Durch die Hydrolyse



wird die Restgruppe gegen eine Hydroxylgruppe ausgetauscht und es entsteht Kieselsäure ($\text{Si}(\text{OH})_4$). Die Kondensation wird in zwei Teilprozesse gegliedert: die alkoholische Kondensation



und die wässrige Kondensation



Während der Kondensation verknüpfen sich zwei Si-Moleküle über eine Si–O–Si-Verbindung, die auch als Siloxan bezeichnet wird. Durch das Fortschreiten der Kondensation agglomerieren immer mehr Si-Moleküle über Siloxane und Wasserstoffbrückenbindungen [31] zu größeren Partikeln, zyklischen Ringen oder langen Ketten. Neben dem Diagramm in der Abbildung

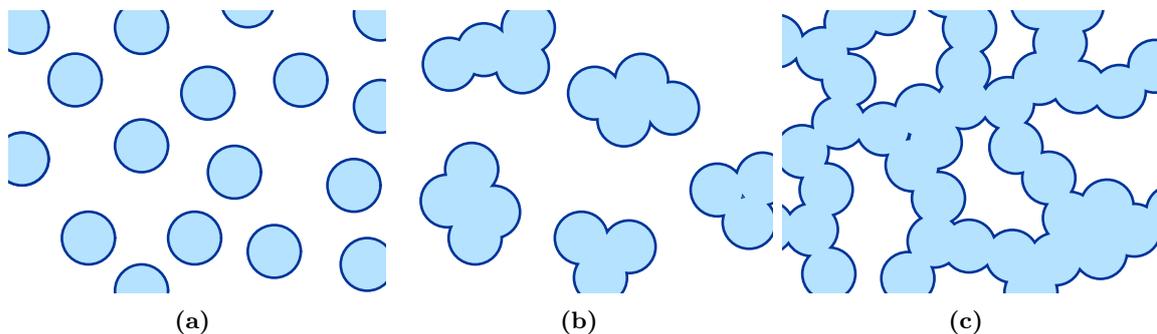


Abb. 2.6.: Schematische Darstellung der Partikelaggregation für ein Sol (a), Pulver (b) und Gel (c) (Abb. nach [25]).

2.7(a), das die Solstabilität und Gelatationszeit in Abhängigkeit vom pH-Wert zeigt, veranschaulicht die Abbildung 2.7(b) diesen Vorgang anhand einer schematischen Darstellung.

Beschleunigt und gesteuert werden kann dieser Prozess über das Molverhältnis von Wasser oder Lösungsmittel zum Präkursor und der Reaktionszeit sowie dem Druck. Eine besondere Rolle kommt dabei dem Katalysator zu, der sowohl saurer als auch basischer Natur sein kann [25,30,32]. Damit lässt sich nicht nur die Gelatationszeit auf etwa ein Zehntel reduzieren, sondern auch gezielt die Porosität steuern [33]. Der Katalysator beeinflusst dabei maßgeblich den pH-Wert, welcher wiederum Einfluss auf die Partikelgröße und -aggregation nimmt. In dem Buch *Sol-Gel-Science* von BRINKER und SCHERER [30], das sich stark an den Arbeiten von ILER [25] orientiert, werden vier pH-Wert Bereiche beschrieben: $\text{pH} < 2$, pH 2 bis 7, pH 7 bis 10 und $\text{pH} > 10$ [25,30]. Bei pH 2 liegt der isoelektrische Punkt, an dem die Si-Partikel nach außen hin neutral sind und keine Kraftereinwirkung in elektrischen Feldern spüren. Im Bereich des isoelektrischen Punktes (pH 1 bis 3) ist das Sol metastabil, das heißt, die Gelatationszeit ist dementsprechend hoch (s. Abb. 2.7(a)). Unterhalb von pH 2 bekommen die Si-Partikel eine positive Oberflächenladung und die Gelbildungszeit sinkt mit abnehmenden pH-Wert. Ebenso verlässt das Sol mit zunehmenden pH-Wert den metastabilen Bereich und kommt in eine Phase der schnellen Aggregation (pH 4 bis 7).

In dieser Phase agglomerieren die kleinen Primärpartikel, die frei in der Lösung diffundieren, zu großen Clustern, die sich wiederum zu noch größeren Clustern vernetzen (s. Abb. 2.8(a) bis (d)) [32].

Bei einer ausreichenden Salzmenge im Sol erweitert sich die Aggregationsphase bis zu einem pH von 10,5. Sind jedoch keine Salze vorhanden, stabilisiert sich das Sol und es findet keine Agglomeration der Partikel statt. Aufgrund des Strebens nach einer Reduzierung der freien Energie kommt es jedoch zu einem Materiestrom von kleinen zu großen Kolloiden. Dabei werden kleine Partikel immer kleiner und große wachsen an. Die Gesamtanzahl der Partikel nimmt ab. Dieser Vorgang wird als OSTWALD-Reifung bezeichnet [25,30].

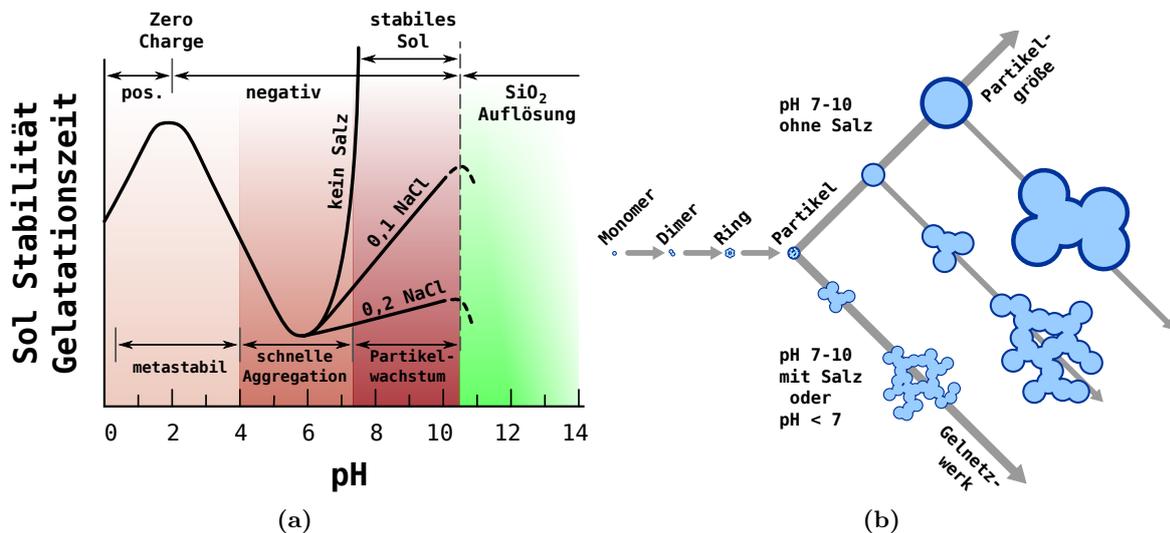


Abb. 2.7.: Beeinflussung der Solstabilität und Gelatationszeit (a) sowie die Partikelgröße und das Gelnetzwerk (b) durch den pH-Wert [25,30].

2. Theoretische Grundlagen

Bei der Vernetzung der Primärpartikel zu Clustern, die dann wiederum zu noch größeren Partikeln agglomerieren, entstehen selbstähnliche Strukturen. Diese Strukturen werden als dreidimensionales massen-fraktales Netzwerk (das Gel) bezeichnet und zeichnen sich durch vergleichsweise große Oberflächen bei kleinen Volumina aus [35]. Für ein euklidisches Objekt gilt, dass sich seine Masse m proportional zum Volumen V verhält, welches durch seine Abmessungen in allen drei Raumrichtungen r^3

$$m \sim r^3 \quad (2.5)$$

beschrieben werden kann. Dabei gibt die Zahl 3 die massen-fraktale Dimension $1 < d_f < 3$ wieder. Diese Dimension kann je nach Struktur variieren. Die Abbildung 2.8(e) verdeutlicht die selbstähnliche Struktur anhand der Sierpinski-Pyramide. Für das theoretische Beispiel der Pyramide ergibt sich die fraktale Dimension d_f nach der Gleichung

$$d_f = \frac{\log n}{\log g} \quad (2.6)$$

mit der Anzahl n der unterteilten Objekte und der Gitterbreite g zu

$$d_f = \frac{\log 4}{\log 2} = 2. \quad (2.7)$$

Durch Messung der Kleinwinkelstreuung von Röntgenstrahlen (SAXS) an fraktalen Strukturen kann deren Dimension ermittelt werden [32, 36].

Je nach dem welches Material in den Poren des Gels vorzufinden ist, wird die Bezeichnung festgelegt: Hydrogel (Wasser), Alkogel (Alkohol) oder Aerogel (Luft). Die Kapillarkraft in

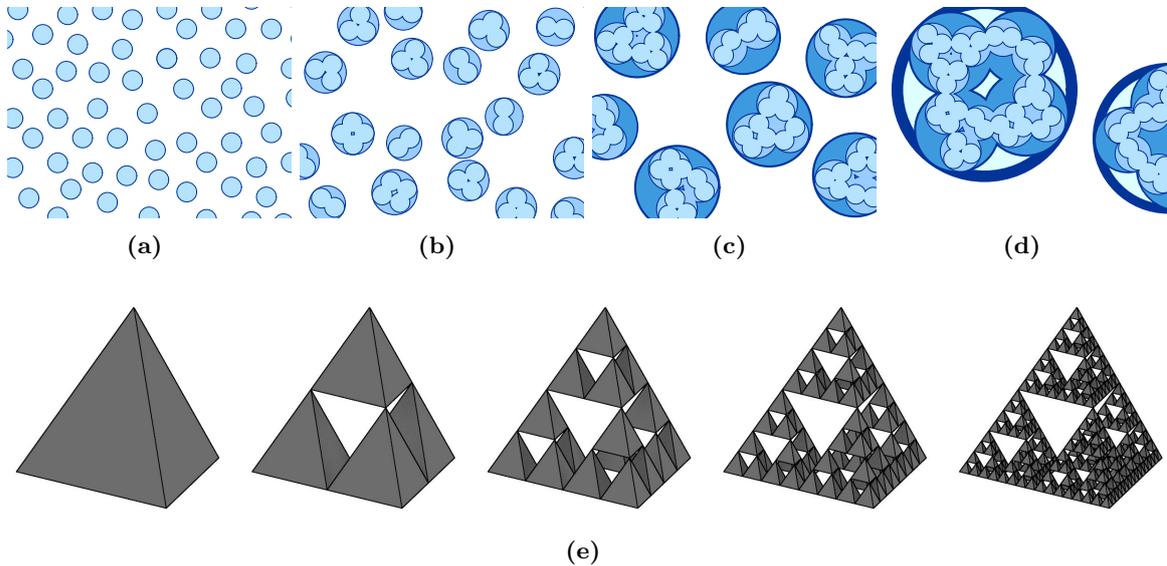


Abb. 2.8.: (a)-(d) Cluster-Cluster-Aggregation: aus den Primärteilchen (ganz links) bilden sich Cluster die wiederum Cluster bilden [32]. (e) Sierpinski-Pyramide mit fraktaler Struktur als mathematisches Modell für poröse Materialien [34].

den Poren des Gels sorgt dafür, dass bei der Trocknung des Gels, die Gelstruktur zusammengedrückt wird und ein Xerogel entsteht. Durch überkritische Trocknung bleibt die Struktur erhalten und es wird ein Aerogel erzeugt [25].

2.3.2. Synthetisches Hydroxylapatit

Ursprünglich wurde das NanoBone[®]-Granulat aus Hydroxylapatit (HA) hergestellt, das aus bovinem Knochen gewonnen wurde. Im Zuge der Promotionsarbeit von U. WEBER [37] wurde eine nasschemische Fällungskammer aufgebaut. Diese dient dazu um synthetisches HA herzustellen, das in seiner Zusammensetzung und Morphologie stark dem menschlichen HA ähnelt.

Für die Fällungsreaktion werden Calciumchlorid (CaCl_2) und Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) in getrennten Behältern in deionisiertem Wasser (VE-Wasser) aufgelöst. Die Struktur der bei der Fällung entstehenden HA-Kristallite kann über die Temperatur, den pH-Wert und der Lösungskonzentration variiert werden. Um für die Fällung einen pH-Wert von 7,8 bei Raumtemperatur einzustellen, wird dem Behälter mit dem gelösten Phosphatsalz 25 %ige Ammoniumhydroxidlösung (NH_4OH) hinzugegeben. Durch die Konzentration in den Behältern mit den Salzlösungen wird für die Fällung das molare Mischverhältnis zwischen Kalzium und Phosphor auf das gleiche Verhältnis von 1,67, wie im menschlichen HA [38], eingestellt. Nach dieser Fällung wird der HA-Schlicker durch mehrmalige Unterdruckfiltration mit VE-Wasser von den verbliebenen Nebenprodukten (NH_4Cl , NaCl) gesäubert. Abschließend wird der HA-Schlicker mit Ethanol gefiltert. Dabei werden die Wassermoleküle durch den Ethanol ersetzt. Als Endprodukt der HA-Herstellung entsteht ein Ethanol-HA-Schlicker mit etwa 10 % Feststoffgehalt.

Die TEM-Abbildung 2.9(a) zeigt die Struktur der HA-Kristallite. Die nadelförmigen dunklen Striche sind die Kalziumphosphatplättchen in einer Draufsichtsperspektive. Im Diagramm der

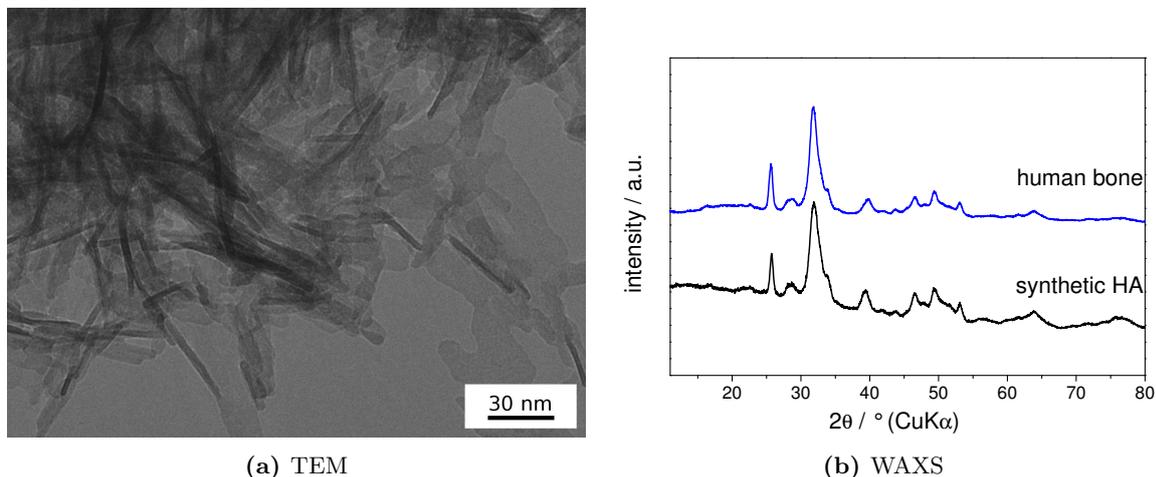


Abb. 2.9.: (a) Die TEM-Aufnahme stellt die Struktur der synthetischen Hydroxylapatit-Plättchen dar [Quelle: AG Nanostrukturierte Materialien]. (b) Das Diagramm vergleicht die Weitwinkelröntgenstreuukurven von synthetischen HA mit dem HA im menschlichem Knochen [Quelle: AG Nanostrukturierte Materialien].

2. Theoretische Grundlagen

Abbildung 2.9(b) werden die Röntgenstreu曲ven vom synthetischen HA mit dem HA im menschlichen Knochen gegenübergestellt. Die Messung zeigt, dass das synthetische HA dem menschlichen HA sehr ähnlich ist.

2.3.3. Herstellung von NanoBone[®]

Seit dem Jahr 2003 stellt die Firma Artoss ihre Knochenaufbaumaterialien auf Basis des Sol-Gel-Prozesses her, die durch das Patent DE10338634 geschützt sind [39].

Für die Herstellung des Sols wird als Prekursor Tetraethylorthosilikat (TEOS) verwendet, das zusammen mit 2-molarer Essigsäure unter ständigem Rühren (500 U/min) in einem Massenverhältnis von 1,56 zur Hydrolyse gebracht wird. Der einsetzende Hydrolyseprozess ist eine exotherme Reaktion, die über den Temperaturverlauf nachvollzogen werden kann. Nach etwa 115 min erreicht die Dispersion ein Temperaturmaximum von etwa 35 °C. Weitere 10 min nach dem Erreichen des Temperaturmaximums ist die Hydrolyse abgeschlossen. Vor einer Weiterverarbeitung wird das Sol auf 4 °C heruntergekühlt, um die einsetzende Kondensation einzudämmen.

Anschließend wird das Sol mit synthetischem Hydroxylapatit vermischt und im nächsten Schritt zum NanoBone[®]-Granulat weiterverarbeitet. Das Mischverhältnis zwischen dem SiO₂ aus dem Sol und dem HA liegt bei 24 zu 76 Gew.%. Während des Trocknungsprozesses entsteht ein Xerogel, das die fraktalen Strukturen zum größten Teil wieder zerstört. Abschließend wird das Material einem Temperprozess von 700 °C unterzogen, um es von verbliebenden zelltoxischen Alkylgruppen zu befreien [40].

2.3.4. Anwendung von NanoBone[®]

Für das erste Modellimplantat aus Titanschaum (Kap. 4) wird synthetisches Hydroxylapatit in dem oben beschriebenen Sol unter Zugabe von Ethanol dispergiert. Sowohl das Hydroxylapatit als auch das Sol stammen aus der Produktion der Firma Artoss. Die flüssige Dispersion wird, vor dem Einsetzen der Gelation, auf rotierende Implantate in einem Sprühprozess aufgetragen. Die genaueren Angaben zu Herstellung der Beschichtungslösung werden im Abschnitt 4.3.3 aufgelistet.

Im zweiten Modellimplantat aus Polyetheretherketon (Kapitel 5) wird ausschließlich mit NanoBone[®] S39 beschichtet. Das Material ist aus der zweiten Granulatproduktionsreihe und wird mit dem synthetischem Hydroxylapatit aus der firmeneigenen Fällungsproduktion hergestellt. In der zweiten Reihe wird das SiO₂/HA Massenverhältnis von 24/76 auf 39/61 geändert und dadurch die spezifische Oberfläche von 85 m²/g auf 207 m²/g um ein Vielfaches erhöht [41].

2.3.5. Löslichkeit von NanoBone[®]

Für eine Zulassung für den U.S. amerikanischen Markt durch die FDA (Food and Drug Administration) ist eine biologische Beurteilung von medizinischen Produkten notwendig. Dazu gehört für das NanoBone[®]-Biomaterial ein qualitativer und quantitativer Nachweis von keramischen Abbauprodukten (nach ISO 10993-14). Für diesen Test wird das Biomaterial für fünf Tage in einer TRIS-HCl-Lösung⁴ mit einem pH-Wert von 7,4 bei 37 °C gelagert. Die

⁴ Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Untersuchung soll das Verhalten der Probe in Körperflüssigkeiten widerspiegeln. Das Ergebnis zeigt keine Löslichkeit des Biomaterials.

Dennoch ist es möglich das NanoBone[®]-Material im Laborversuch wieder aufzulösen. Dazu müssen die beiden Komponenten des Biomaterials, die SiO₂-Matrix und das Hydroxylapatit, in zwei getrennten Prozessen entfernt werden.

Osteoklasten bauen NanoBone[®] ab, indem sie durch eine Protonenpumpe und einen Chloridionenkanal in einem abgegrenzten Bereich auf der Knochenoberfläche Salzsäure entstehen lassen [42]. Dadurch wird der pH-Wert auf 4,5 abgesenkt und das Knochenmineral aufgelöst [14]. Im Labor wird das kristalline Hydroxylapatit ebenfalls durch eine Säure entfernt.

Im zweiten Schritt wird das Si-Gel in einer Lauge gelöst. Das Diagramm 2.7(a) auf Seite 11 zeigt, dass sich das SiO₂ ab einem pH-Wert von mehr als 10,5 auflösen wird.

Die beiden Teilprozesse zum Entfernen von NanoBone[®]-Schichten werden in dieser Arbeit durch Essigsäure und Natronlauge realisiert.

2.3.6. Wirkungsweise von NanoBone[®]

Bis heute konnte die vollständige Wirkungsweise der NanoBone[®]-Technologie durch die Wissenschaft nicht eindeutig geklärt werden. Bei der Anwendung wird das Material mit autologem Blut vermischt. Durch die Koagulation des Blutes bildet sich ein Fibrinnetzwerk auf der Oberfläche. Es wird davon ausgegangen, dass bei einem Kontakt des Biomaterials mit dem autologen Blut des Patienten, sich die Proteine aus dem Blut auf der nanoporösen Oberfläche ablagern. Dadurch wird das Biomaterial hinter den körpereigenen Proteinen „versteckt“ und nicht mehr als Fremdkörper angesehen, was eine Infektion und Abstoßungsreaktion bedeuten würde.

Das Biomaterial wird im Laufe der Zeit vollständig abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt, im sogenannten Remodellingprozess. Eingeleitet wird dieser Prozess durch einen Matrixwechsel, bei dem die Siliziummatrix, die das Hydroxylapatit umlagert, vollständig gegen organisches Gewebe ausgetauscht wird (s. Abb. 2.10). Dieser Wechsel kann nicht nur *in vivo* nach wenigen Tagen [43, 44], sondern auch *in vitro* bei der Lagerung von beschichteten Implantaten im humanen Blut beobachtet werden [45]. Die Untersuchung zeigt ein Absinken des Siliziumgehaltes von 100 % auf etwa 20 % innerhalb der ersten halben Stunde. Nach dem Durchlauf des Matrixwechsels ist davon auszugehen, dass der Remodellingprozess des Biomaterials beginnt.

Dabei wird das Biomaterials durch die natürliche Osteoklastentätigkeit abgebaut. Dem Organismus scheinen Reize übermittelt zu werden, dass es sich bei dem Biomaterial um alten

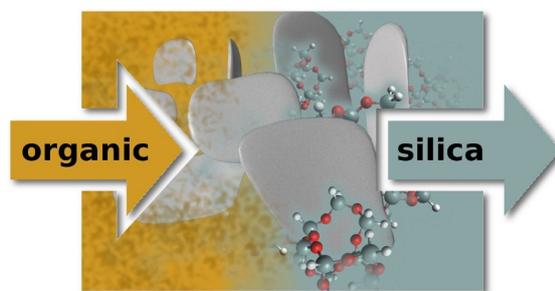


Abb. 2.10.: Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Matrixwechsels, der den NanoBone[®]-Remodellingprozess einleitet. Die SiO₂-Matrix, die die HA-Plättchen umlagert, wird aufgelöst und durch organisches Material ersetzt.

2. Theoretische Grundlagen

Knochen handelt. Dieser muss nicht nur abgebaut, sondern auch gleichzeitig durch Osteoblastentätigkeit neu aufgebaut werden. So wird nach kurzer Zeit das synthetische Material vollständig zu neuem Knochen remodelt.

3. Untersuchungsmethoden

3.1. Mikroskopie

Für die Untersuchung und Charakterisierung der hergestellten Proben werden sowohl Licht- als auch Elektronenmikroskope verwendet. Die Proben aus den tierexperimentellen Studien werden nach der Säge-Schliff-Technik nach DONATH und BREUER angefertigt [46]. Die Betrachtung und digitale Aufnahme der histologischen Dünnschliffe erfolgt mit dem Durchlichtmikroskop Axioskop 40 (Zeiss, Deutschland), der Digitalkamera AxioCam MRc5 (Zeiss) und der Software AxioVision 4.8 (Zeiss). Die Proben für eine elektronenmikroskopische Untersuchung werden mit dem Ultramikrotom LEICA EM UC6 (Leica, Deutschland) präpariert. Es werden sowohl rasterelektronenmikroskopische (DSM 960, Zeiss) als auch transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (EM 912 OMEGA, Zeiss) angefertigt. Zusätzlich wird für eine Elementanalyse mit dem Rasterelektronenmikroskop die energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) angewendet.

3.2. Tierexperimentelle Studie

Im Rahmen dieser Arbeit werden zwei tierexperimentelle Studien durchgeführt. Dazu ist es erforderlich, die getesteten Modellimplantate vor der Implantierung zu sterilisieren beziehungsweise während des gesamten Herstellungsprozesses steril zu arbeiten. Weiterhin ist es notwendig, vor der Operation zu bestätigen, dass das Implantat keine toxischen Eigenschaften aufweist. Neben den Voruntersuchungen spielt die Tierspezies eine entscheidene Rolle.

3.2.1. Sterilisation und steriles Arbeiten

Soweit dies möglich ist, findet der Herstellungsprozess der Modellimplantate innerhalb der definierten Atmosphäre einer reinen Werkbank der Klasse 2 statt (HeraSafe HSP12, Heraeus, Deutschland). Die fertig beschichteten Implantate werden durch Heißluft sterilisiert. Je nach Abhängigkeit der Dauer der Sterilisation ist die Heißlufttemperatur zu wählen (s. Tab. 3.1) [47, 48].

Für die Sterilisation werden in einem Trockenschrank (Binder, Deutschland) die beschichteten Implantate in Glasvials gelagert und 180 min einer Temperatur von 160 °C ausgesetzt. Anschließend werden die Glasvials mit gammasterilisierten Gummistopfen keimdicht verschlossen.

Tab. 3.1.: Übersicht der Haltezeiten in Abhängigkeit der Temperatur für eine Heißluftsterilisation [47, 48].

Dauer/min	Temp./°C
10	200
30	180
180	160

3. Untersuchungsmethoden

3.2.2. Zytotoxizitätstest

Hat ein Implantat die physikalischen und chemischen Überprüfungen erfolgreich absolviert (s. Tab. 2.1 auf S. 3), muss die Biokompatibilität kontrolliert werden. Dies wird durch *in vitro* Tests realisiert. Dazu wird eine definierte Anzahl an Zellen (z. B. Fibroblasten (L-929, ATCC LGC Standards, UK) oder menschlichen Osteosarkomazellen (MG-63, ATCC LGC Standards, UK)) auf der Probenoberfläche angesiedelt. Nach einem im Vorfeld der Studie festgelegten Zeitraum, der in der Regel ein paar Tage umfasst, wird die Anzahl der Zellen ausgezählt und deren Entwicklung untersucht. Dies kann sowohl durch eine einfache Beschreibung des äußerlichen Erscheinungsbildes oder aber durch eine Charakterisierung der chemischen Interaktionen bestimmter Zusatzstoffe in der Zellnährlösung erfolgen. Zu dem letzteren Punkt zählt der Live-Dead und der XTT-Test. Beim Live-Dead-Test können lebende von toten Zellen durch Fluoreszenzmarker unterschieden werden [49]. Durch die Zugabe von Calcein-Aceton-Methylester bilden lebende Zellen grün fluoreszierendes Calcein. Weiterhin wird das rot fluoreszierende Ethidium Homodimer-1 als Farbmateriale hinzugegeben, das nur beschädigte Zellmembranen, wie bei toten Zellen, durchdringen kann [50]. Eine Auszählung der jeweiligen grün und roten beziehungsweise lebendig und toten Zellen erfolgt in einem Fluoreszenzmikroskop. Bei einem XTT-Test wird das Absorptionsverhalten der Zelllösung durch Formazan gemessen [51]. Die Menge an Formazan ist abhängig von der mitochondrialen Dehydrogenase, welche die Vitalität der Zellen widerspiegelt [52]. Aufgrund der bestimmten Zellreaktionen mit dem Implantatsmaterial wird eine Einteilung in toxisch¹, inert², bioaktiv³ oder degradabel⁴ vorgenommen [11].

Bei einer Beschreibung des äußerlichen Erscheinungsbildes können unter anderem folgende Situationen auftreten: Eine weit ausgebreitete Zelle, die sich flach an der Oberfläche anschmiegt, deutet auf eine nichttoxische Oberfläche hin, auf der sich der Organismus wohl fühlt. Zieht sich die Zelle jedoch zusammen und bildet eine kugelartige Form, kann es sich um eine abgestorbene Zelle handeln, die infolge einer giftigen Oberfläche nicht überlebensfähig war. Das Vorkommen kugelartiger Zellformen kann ebenfalls auch auf Platzmangel oder eine Zelldifferenzierung hindeuten.

3.2.3. Tiermodell - New Zealand White Rabbit

Auf eine erfolgreiche *in vitro* Studie folgt eine *in vivo* Studie, bei der das Implantat in einem lebenden Organismus untersucht wird. Dazu gibt es unterschiedliche Tiermodelle, wobei nicht jedes Modell für jede Untersuchung geeignet erscheint. Je kleiner das Tier, desto schneller ist der Stoffwechsel [9, 53].

Das Kaninchenmodell gilt als etabliertes Standardmodell für die Untersuchungen von Dentalimplantaten oder Implantaten in dieser Größenordnung [54–56]. Da die angefertigten Modellimplantate in dieser Größenordnung liegen, wird auch das Kaninchenmodell gewählt. Das Kaninchen hat einen etwa dreimal so schnellen Stoffwechsel wie der Mensch [9]. Dadurch ergeben sich die in Tabelle 3.2 abgebildeten Umrechnungszeiten für den gesamten Knochenremodellingprozess. Unabhängig von dem Implantat, ob Titan- oder PEEK-Stift, wird in

¹Bildung von Gewebsnekrose

²Bildung einer nicht-adhärennten Bindegewebskapsel um das Implantat

³Bildung einer Bindung zwischen Gewebe und Implantat

⁴Ersetzen des Implantates durch Gewebe

Tab. 3.2.: Die Tabelle zeigt den Zyklus des kortikalen Knochenremodelings für Kaninchen, Hund und Mensch (Zeitangaben in Wochen) [9].

Phase	Kaninchen	Hund	Mensch
Aktivierung	0,5	0,5	1,0
Resorption	1,0	1,5	2,0
Ruhephase / Umkehr	0,5	1,0	1,5
Formation	4,5	10,0	13,0
gesamt	6,0	12,0	17,0
Faktor	1x	2x	3x

den Operationen immer gleich verfahren. Die Operation unterliegt den europäischen Richtlinien für einen artgerechten Handhabung mit Labortieren (DE 86/609/CEE) und wird von der lokalen Tierschutzbehörde unter dem Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-027/09 autorisiert. Die Tiere werden mit Wasser und Standardlaborfutter ernährt.

Für die Operation werden weibliche NEW ZEALAND WHITE RABBITS (Charles River Laboratories, Deutschland) mit einem Körpergewicht von 3,5 bis 4,0 kg verwendet. Vor der Operation werden die Tiere mit einer Mischung aus 10 % Ketamine (bela-pharm, Deutschland) und 2 % Xylazine (Rompun[®], Bayer AG, Deutschland) und 10 min nach Beginn noch einmal mit 0,3 ml Atropin (0,5 mg/ml, ratiopharm, Deutschland) anesthesiert. Als Antibiotikum wird Penicillin (i. M. 150.000 i. E., Infectocillin, Infectopharm, Deutschland) injiziert. Zusätzlich wird vor der Operation Lidocaine (Xylocitin-loc, Mibe GmbH, Deutschland) und nach der Operation für 3 Tage im Trinkwasser Novaminsulfon (500 mg/ml, ratiopharm, Deutschland) als Analgetikum verabreicht.

Während der Operation werden die Kaninchen in der Rückenlage mit angewinkelten Hinterläufen auf dem Operationstisch positioniert. Der Kniebereich wird vor der Operation ausgerasiert und mit Povidon-Iod (Betaisodona) desinfiziert. Zu Beginn der Operation wird ein sagittaler Schnitt am Knie durch die Epidermis, das Muskelgewebe und das Periost vorgenommen, um den Knochen freizulegen. Die Positionierung des Implantates wird während der Operation durch Röntgenaufnahmen ermittelt. Während des Bohrens wird die Wunde mit Kochsalzlösung gekühlt. Dies geschieht um Hitzeschäden zu vermeiden, da es bereits ab Temperaturen von 45 °C zur Proteinkoagulation, zum Zelltod von Osteozyten und Gewebenekrose im Knochenlager kommen kann [17]. Nach dem Bohren wird die Wunde mit Kochsalzlösung ausgespült. Anschließend wird das Implantat gesetzt, mit Gentamicin gespült und Periost, Muskelfasern sowie Epidermis wieder vernäht. Nach der Standzeit werden die Tiere mit dem Wirkstoff Pentobarbital (Release[®], Richter Pharma, Deutschland) euthanasiert.

3. Untersuchungsmethoden

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

Unter der Annahme, dass sich die Tendenz in Richtung zementfreier Implantate weiter entwickelt, stößt man unweigerlich auf modifizierte Oberflächen. Die Modifikationen sollen die Osseointegration des Knochengewebes in die Implantatstruktur verbessern. Dafür ist es notwendig, dass die Implantatstruktur eine dreidimensionale interkonnektierende Porosität aufweist, welche ein Hineinwachsen des Knochens ermöglicht. Dieses Kapitel wird sich mit genau diesen offenporigen Strukturen befassen. Das Ziel wird dabei sein, aus Titan ein Modell für orthopädische Implantate zu entwickeln. Das Modell soll eine dreidimensionale Oberflächenstruktur aufweisen und in einem Kleintierversuch Aufschluss über die Gewebe-Oberflächen-Wechselwirkungen liefern. Zur Ergebniserfassung wird ein neuer Auswertungsalgorithmus verwendet, der die Osseointegration mit objektiven und vergleichbaren Zahlen beschreibt. Außerdem wird an diesem Modell eine Beschichtung mit osteoinduktiver Wirkung getestet und dabei der Einfluss auf das Einwachsen des Knochens dokumentiert.

4.1. Struktur und Eigenschaften von Titan

Mit einem Anteil von 0,56 % steht das Element Titan an 9. Stelle der Elementhäufigkeiten in unserer Erdkruste. Im Bereich der Medizintechnik liegen das Leichtmetall und seine Legierungen als Implantatmaterial wohl an 1. Stelle, um Knochendefekte zu überbrücken oder andere Implantate zu fixieren. Besonders bei Eingriffen im Bereich der Hüfte, dem Knie, schweren Knochenbrüchen oder Zahnimplantaten spielt das Titan eine bedeutende Rolle.

Titan ist ein allotropes Element, was bedeutet, dass es in zwei oder mehr Strukturformen bei gleichem Aggregatzustand vorkommen kann. Es wechselt beim Übersteigen der Transus-temperatur von 882 °C von der α in die β -Phase. Die Gitterstruktur wechselt dabei von einer hexagonal dichten Packung in eine kubisch raumzentrierte Anordnung [57–60]. In der Tabelle 4.1 sind einige Eigenschaften des Titans im Vergleich zu anderen Metallen dargestellt. Die Transus-temperatur für *commercial pure* (cp) Titan verändert sich mit dem Reinheitsgrad und den Legierungsanteilen, wie in Tabelle 4.2 aufgelistet.

Titan reagiert sehr stark mit Sauerstoff und bildet bei Kontakt mit Luft sofort eine Passivierungsschicht auf der Oberfläche aus. Diese hauptsächlich amorphe Titandioxidschicht erreicht etwa eine Dicke von 1,5 bis 10 nm und schützt das Metall vor weiterer Korrosion [22, 65, 66]. Neben dem Titandioxid, das auch als Titan-(IV)-Oxid bezeichnet wird, gibt es weitere Titan-Sauerstoff-Verbindungen, wie in Tabelle 4.3 dargestellt. Die drei bekanntesten Phasen des Titandioxids sind Rutil, Anatas und Brookit, wobei Brookit aufgrund seiner Instabilität nur selten vorkommt [67]. Das Diagramm in Abbildung 4.1(a) zeigt die Druck- und Temperaturabhängigkeit der Phasen des Titandioxids. Bei einer hohen Temperaturbehandlung des Titans entsteht Rutil, durch welches Sauerstoffionen problemlos hindurch diffundieren können. Die Oxidschicht wächst somit in das Titan hinein [61] und kann je nach Dauer der Temperatureinwirkung das gesamte Metall durchoxidieren. Zu dicke Oxidschichten

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

Tab. 4.1.: Die Auflistung vergleicht einzelne Eigenschaften zwischen Titan, Eisen, Nickel und Aluminium [61].

Eigenschaften	Einheit	Ti	Fe	Ni	Al
Schmelztemp.	°C	1670	1538	1445	660
Transustemp.	°C	$\beta \xrightarrow{882} \alpha$	$\gamma \xrightarrow{912} \alpha$	-	-
Kristallstruktur		bcc \rightarrow hex	bcc \rightarrow hex	fcc	fcc
Elastizitätsmodul	GPa	115	215	200	72
Dichte	10^3kg m^{-3}	4.5	7.9	8.9	2.7
therm. Ausdehnungskoeffizient	10^{-6}K^{-1}	8.4	11.8	13.4	23.1
therm. Leitfähigkeit	$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$	20	80	90	237
spez. Wärmekapazität	$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$	523	450	440	900
Schutz vor Korrosion		sehr hoch	gering	mittel	hoch
Reaktion mit Sauerstoff		sehr hoch	gering	gering	hoch
Preis des Metalls		sehr hoch	gering	hoch	mittel

Tab. 4.2.: Die Tabelle listet eine Übersicht von Bezeichnungen für cp-Ti und deren Legierung mit entsprechender Transustemperatur auf [61].

Bezeichnung	Zusammensetzung in Gew.%	Transustemp. °C
Grade 1	cp-Ti (0,2 Fe; 0,18 O)	890
Grade 2	cp-Ti (0,3 Fe; 0,25 O)	915
Grade 3	cp-Ti (0,3 Fe; 0,35 O)	920
Grade 4	cp-Ti (0,5 Fe; 0,40 O)	950
Grade 7	Ti- 0,2 Pd	915
Grade 12	Ti- 0,3 Mo- 0,8 Ni	880
Ti-6-4	Ti- 6Al - 4V (0,20 O)	995

führen zum Verlust der relativ elastischen Eigenschaften des Titans und machen es dadurch als Implantatsmaterial unbrauchbar [68]. Zur Veranschaulichung sei hierbei gesagt, dass cp Titan ein Kompressionsmodul von 126 GPa [69], Anatas von 178 bis 194 GPa [70,71] und Rutil von 126 GPa [71] aufweist. Messungen von Titandioxid in der Cotunnitstruktur¹ zeigen sogar ein Kompressionsmodul von 431 GPa, was es somit zum härtesten bekannten Oxid macht [72].

Die Passivierungsschicht auf dem Titan ist die Hauptkomponente der Biokompatibilität für dieses Material. Eine Schicht von wenigen nm ist bereits ausreichend, um das Implantat vor Korrosion durch Körperflüssigkeiten zu schützen [65, 73]. Die Schicht wird im menschlichen Organismus im Laufe der Jahre sogar weiter verstärkt [65, 66]. Durch die Oxidschicht auf titanhaltigen Implantaten wird auch die Zelladhäsion verbessert. Dies zeigt sich durch ein die auf ein verstärktes Zellspreeding und einer besseren Organisation des Zellgerüsts auf einer Titanoberfläche [74].

Die Bildung der Passivierungsschicht ist zwingend erforderlich für den Einsatz von Titan

¹ Chlorbleistruktur (PbCl_2)

4.1. Struktur und Eigenschaften von Titan

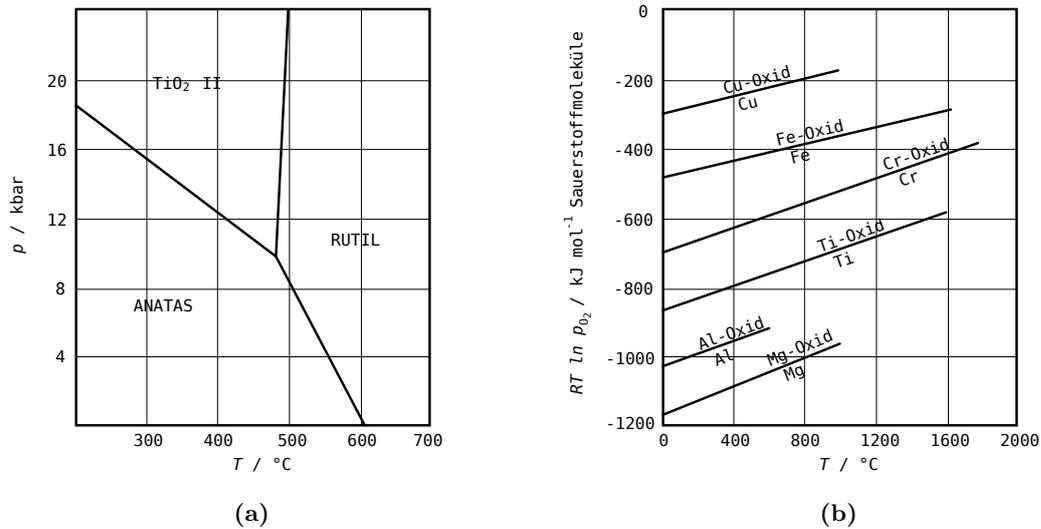


Abb. 4.1.: (a) Das Diagramm zeigt die auftretenden Phasen von Titandioxid [62]. (b) In dem Diagramm werden die Oxidationsenthalpien einiger Metalle dargestellt [63].

als Implantatmaterial. Eine Umbildung in sprödes Rutil bei hohen Temperaturen muss jedoch vermieden werden, um den Stofftransport beim Sintern nicht durch die Oxidhäute zu stören und die duktilen Eigenschaften des Titans zu verlieren. Die technischen Sintertemperaturen für einphasige Pulver liegen bei etwa $2/3$ bis $4/5$ der Schmelztemperatur (in Kelvin) [63, 75]. Daraus ergibt sich für Titan mit einer Schmelztemperatur von 1670 °C ein Sinterbereich von etwa 1020 bis 1280 °C . Eine große Oberfläche, wie bei verpressten Formteilen aus Metallpulver, haben eine erhöhte Neigung mit der Umgebungsatmosphäre zu reagieren. Eine Aussage für die Oxidationsneigung liefert die freie Enthalpie

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln p_{O_2} \quad (4.1)$$

mit der Gaskonstanten R , der absoluten Temperatur T und dem Sauerstoffdruck p_{O_2} [63]. Aus dem Diagramm in der Abbildung 4.1(b) lässt sich entnehmen, dass bei einer Sintertemperatur von 1200 °C die freie Enthalpie unterhalb von -650 kJ/mol liegen muss, um Oxidschichtenbildung zu verhindern und bereits vorhandene Oxidschichten zurück zu bilden.

Tab. 4.3.: Die Tabelle zeigt eine Übersicht der Oxidformen des Titans [64].

Name	chem. Formel	Farbe	Dichte	Schmelzpkt.
Titan-(II)-Oxid	TiO	hellbraun	$4,88\text{ g/cm}^3$	1750 °C
Titan-(III)-Oxid	Ti ₂ O ₃	violett	$4,56\text{ g/cm}^3$	2139 °C
Titan-(IV)-Oxid	TiO ₂	weiß	$4,24\text{ g/cm}^3$	1855 °C

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

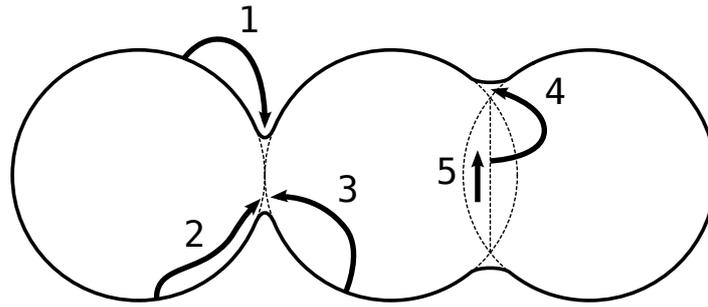


Abb. 4.3.: Die Abbildung zeigt für den Sinterprozess eine schematische Darstellung der Transportwege von Materie zum Sinterhals über

1. Verdampfungs-Kondensation
2. Oberflächendiffusion
3. Volumendiffusion, von Oberfläche ausgehend
4. Volumendiffusion, von Korngrenzen ausgehend (Schwindung)
5. Grenzflächendiffusion entlang der Korngrenze (Schwindung) [76].

Der Sinterprozess kann in drei Stadien eingeteilt werden. Ausgehend von einer idealen Kugelpackung zu Beginn, ist das erste Stadium das Anfangsstadium. In diesem bilden sich Sinterhalse aus und die Kugelzentren nähern sich leicht an. Das Zweite wird als das Schwindungsstadium bezeichnet, in dem die Poren beginnen zu zuwachsen. Im Endstadium haben sich dann die Ausgangspartikel in kuboktaedrische Körner umgewandelt [76]. Für den Materialtransport sind verschiedene Diffusionsprozesse verantwortlich, die in Abbildung 4.3 dargestellt werden.

Durch die Annäherung der Kornzentren, besonders im Schwindungsstadium, tritt eine Volumenreduzierung ein. Diese kann in Abhängigkeit von der Korngrenzen- und Volumendiffusion sowie der Porenoberfläche je Einheitsvolumen und der Differenz von Korngrenzfläche und Porenfläche berechnet werden [76]. Im Diagramm 4.2 sind für unterschiedliche Sintertemperaturen eines Titanmikropulvers (Korngröße $\sim 3 \mu\text{m}$, Agglomerate 15 bis $20 \mu\text{m}$) die Längenschrumpfungen aufgetragen. Etwa 6 % sind dabei nach einer Stunde bei 1200°C (Ramp: $10^\circ\text{C}/\text{min}$) zu erwarten [60]. Mit anderen Titanlegierungen sind sogar bis zu 12 % aufgetreten [77].

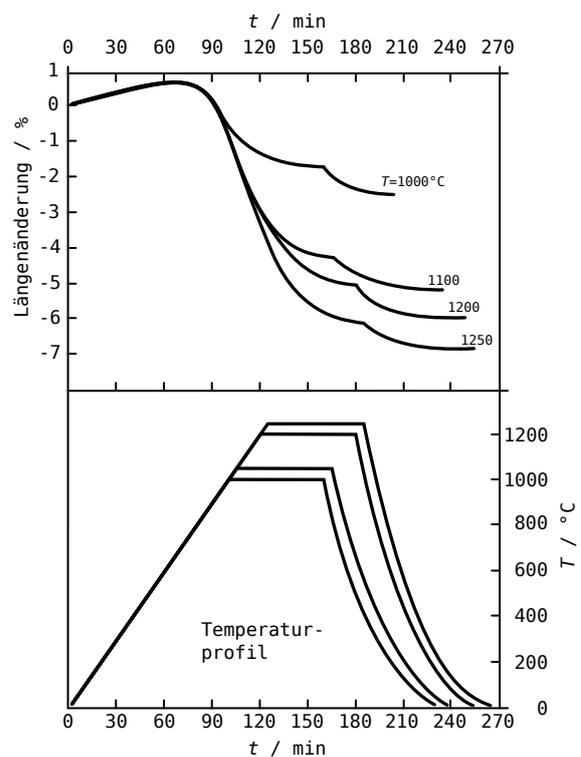


Abb. 4.2.: Das Diagramm zeigt die Sinterschwindung von Titan in Abhängigkeit von unterschiedlichen Temperaturen [60].

4.2. Stand der Forschung

Der aktuelle Implantattrend im Bereich der orthopädischen Chirurgie geht in Richtung zementfreier und modularer Systeme [78]. Die Aktualität und auch das gesellschaftliche Interesse an dieser Entwicklung werden zum Beispiel durch das Ende 2012 an der Universität Rostock bewilligte Forschungsprojekt: „Bioaktiv beschichtete zementfreie Implantate“ unter der Leitung von Professor Bader² verdeutlicht.

Die Ursache dieser Entwicklung ist in dem immer höheren Alter der Patienten zu finden. Diese neigen durch ihren altersbedingten Verlust an Beweglichkeit verstärkt zu Osteoporose und Atrophie. Die Folgen sind Knochenrückbildungen und Implantatlockerungen, was letztendlich zu Revisionsoperationen führt. Des Weiteren führt die gesteigerte Lebenserwartung der Patienten zu einer Erhöhung der Revisionsoperationen aufgrund von Materialermüdung der Implantate [3]. Gut einzementierte Implantate lassen sich nicht entfernen, ohne große Schäden an der umlagerten Knochenstruktur zu verursachen. Auf Basis dieser Erkenntnis ist besonders bei jüngeren Patienten eine Zementierung zu vermeiden [3]. In den Operationsbereichen müssen teilweise hochgradige Knochendefekte therapiert werden, die kaum Verankerungsmaterial für Revisionsimplantate bereitstellen [78]. Implantatstrukturen mit einem interkonnektierenden Porensystem bieten gerade für eine zementfreie Fixierung ein hohes Erfolgspotenzial. Diese Implantatstrukturen bringen gegenüber herkömmlichen orthopädischen Implantaten zwei wesentliche Vorteile mit.

Zur Verdeutlichung des ersten Vorteils hilft die Betrachtung des Elastizitätsmoduls (E-Modul). Das Elastizitätsmodul des humanen Knochens (Kortikalis) liegt in etwa bei 10 bis 30 GPa [5, 57, 79, 80] und variiert je nach Ausrichtung der Kollagenfasern und der Menge an anorganischen Bestandteilen [11]. Einfaches cp Titan hat einen Wert von 105 GPa [57]. Das Missverhältnis zwischen den E-Modulen des Implantatmaterials und des angrenzenden Knochengewebes wird in früheren Studien als Hauptursache für den Implantatverlust identifiziert [13, 81, 82]. Um dem Missverhältnis in der Elastizität entgegen zu wirken, werden neue Legierungen (z. B. Titan-Molybdän-Zirconium-Ferrum (TMZF), Titan-Niob-Zirconium-Tantal (TNZT) [57, 83]) oder neue Materialien (z. B. Polymere) entwickelt.

Neben der Veränderung der Materialbestandteile funktioniert auch die Variante der Neustrukturierung des Metalls, um den E-Modul zu beeinflussen. Es werden dabei auf unterschiedlichste Weise Metallschäume hergestellt. Unter anderem durch ein Plasmasprühverfahren, in dem eine Porosität durch das Aufsprühen von geschmolzenem Metallpartikeln erfolgt [84–86]. Der Nachteil dieser Methode ist, dass sich nur Porositäten auf der Implantatoberfläche erzeugen lassen. Eine andere Variante verwendet ein Gemisch aus Titanpulver und einem Polymer, welches dann beim Aufheizen ausschäumt und dem Titanpulver eine schaumartige Grundstruktur verleiht [87]. Eine vollständige Porosität, die sich auf das gesamte Implantat bezieht, liefert das Versintern von Titanfasern [85, 88–91]. Eine weitere, einfach zu handhabende Variante ist die Platzhaltermethoden [5, 92–94]. Dabei wird das Metallpulver mit einem Platzhalter vermischt und verpresst. Der dadurch gewonnene Grünkörper kann durch mechanische Bearbeitung zu seiner Endkontur geformt werden. Nach dem Herauslösen des Platzhalters lässt sich das Pulvergerüst zu einem stabilen Formkörper mit einem interkonnektierenden Porensystem versintern. Durch das Mischverhältnis zwischen Metallpulver und

²Pressemitteilung vom 21.12.2012, <http://www.uni-rostock.de/aktuelles/pressemitteilungen/detailansicht-pressemitteilung/news-artikel/bioaktiv-beschichtete-zementfreie-implantate/>

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

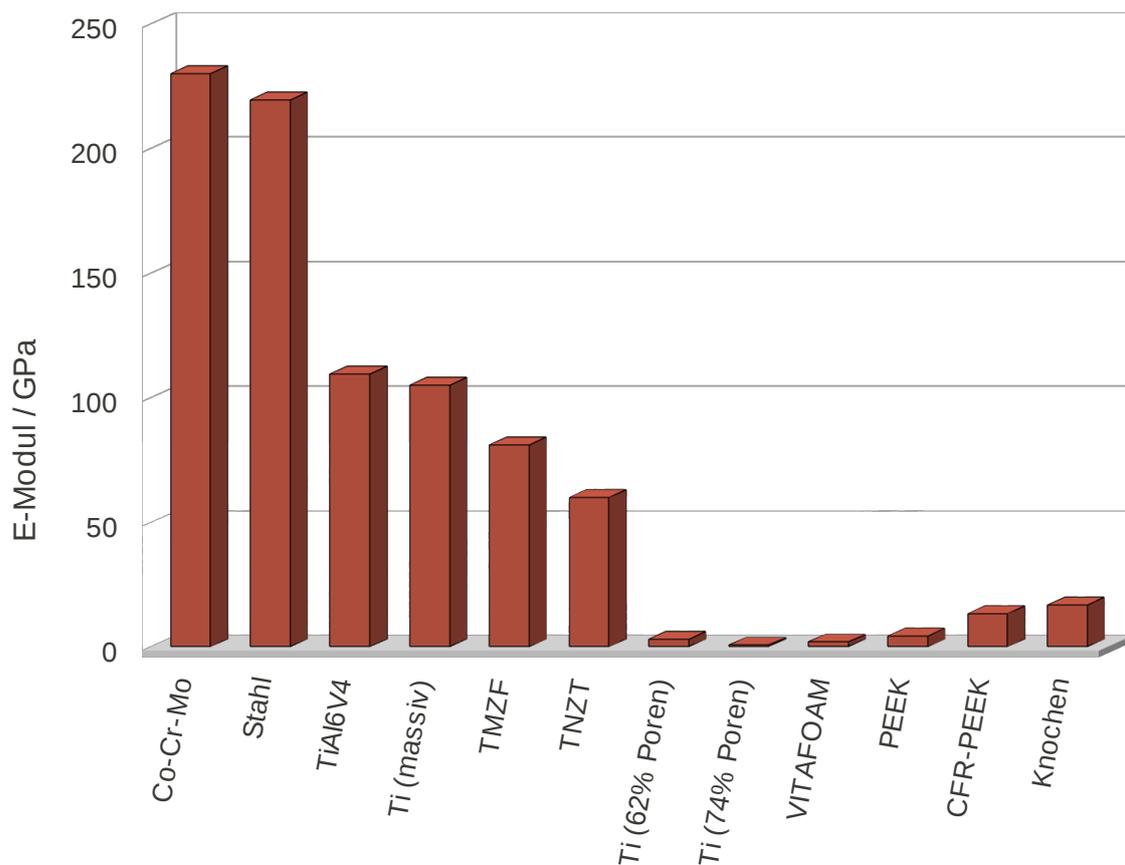


Abb. 4.4.: Darstellung des Elastizitätsmodul für unterschiedliche Implantatmaterialien nach [5, 11, 57, 79, 80].

Ti-Mo-Zr-Fe (TMZF), Ti-Nb-Zr-Ta (TNZT), mit Kohlenstoffasern verstärkt (CFR)

Platzhalter und die Partikelgrößen kann die Porosität und die Porengröße gesteuert werden.

Durch die Neustrukturierung des Metalls kann eine erhebliche Verbesserung des Elastizitätsmoduls vorgenommen werden [95]. Der Metallschaum VITAFOAMTM kann unter anderem ein Elastizitätsmodul von 1,2 bis 2,8 GPa für Reintitan mit einer Porosität von 76 % und einer Porengröße von 150 bis 600 μm erreichen [96]. Das Diagramm 4.4 zeigt eine Übersicht von Implantatmaterialien und die dazugehörigen Elastizitätsmodule. Der Aspekt der Elastizität spielt jedoch für diese Arbeit keine wesentliche Rolle und sei nur der Vollständigkeit mit aufgeführt.

Der zweite Vorteil liegt darin, dass in diese schwammartige Grundstruktur der Knochen hineinwachsen kann. In den folgenden Abschnitten wird daher das Hauptaugenmerk auf diesen Aspekt der interkonnektierenden Struktur gelegt. Die Verbundfläche zwischen Gewebe und Implantat wird enorm vergrößert und bietet somit bessere Chancen, die mechanischen Belastungen vom Implantat auf das umliegende Knochengewebe zu übertragen. Das erlaubt es, Implantatmaterialien mit dieser Struktur, gewindefrei und ohne Knochenzement auf Dauer im Patienten zu fixieren [97–100].

4.3. Entwicklung des Modellimplantates (TS)

Beabsichtigt man das Hineinwachsen von Knochen in eine interkonnektierende Porenstruktur, spielt die Porengröße und die Konnektivität der Poren eine wesentliche Rolle. Durch die Konnektivität der Poren untereinander wird gewährleistet, dass die Zellen auch weiter im Implantatinneren liegende Poren erreichen können. Dabei ist es wichtig die Dimension der Poren an die Größenordnung der Zellen und auszubildene Knochenstrukturen anzupassen (s. Abschn. 2.1.1). Ab einem Porendurchmesser von 150 μm ist der Organismus in der Lage Osteonen auszubilden [13]. In der Literatur variieren die Angaben zum optimalen Porendurchmesser in etwa von 50 bis 336 μm für den minimalen und von 400 bis 557 μm für den maximalen Wert [87, 100–103].

In diesen offenporige Metallimplantat wächst aber nicht zwingend Knochen ein. Nach dem WOLFF'schen Gesetz wird sich in Abhängigkeit von der vorherrschenden Belastung und der Übertragung der Belastung ins Implantatinnere die Knochenstruktur anpassen [104]. Nach neueren Erkenntnissen ist dazu eine dynamische mechanische Umgebung zwingend erforderlich [105–107]. So ist es nicht verwunderlich, wenn sich in Studien im Zentrum von offenporösen Implantaten kein neuer Knochen ausbildet [108]. Die Arbeiten von BARRÈRE untersuchen offenporige Metallschäume mit einer Kalzium-Phosphat-Beschichtung. Dabei zeigt sich neben Knochenwachstum im Implantatinneren auch ein erhöhtes Aufkommen von Fettzellen [102, 103]. Die Studien, die sich mit offenporigen Implantatstrukturen befassen, unabhängig ob mit oder ohne osteoinduktiven Beschichtungen, führen keine systematische Erfassung des Knochenwachstums in Abhängigkeit der Implantattiefe durch. Aber gerade dieser Aspekt erfordert eine genauere Untersuchung in Hinblick auf den überarbeiteten Erkenntnissen von WOLFF's Gesetz. Wie weit wächst Knochen in eine offenporige Struktur hinein? Wie lässt sich das Wachstum in Abhängigkeit von der Implantattiefe objektiv erfassen? Zusätzlich zu diesen Fragestellungen soll an diesen Implantatstrukturen der Einfluss einer NanoBone[®]-Beschichtung untersucht werden, die bereits erfolgreich auf massiven Dentalimplantatoberflächen angewendet wurde [45].

4.3. Entwicklung des Modellimplantates (TS)

Im ersten Schritt dieses Kapitels wird ein Modellimplantat mit dreidimensionaler Oberfläche für ein Kleintierexperiment entwickelt. Die Oberflächenstruktur des Modells soll sich dabei an orthopädischen Implantaten orientieren und ein interkonnektierendes Porensystem aufweisen. Während der Implantation muss das Modell ohne Gewinde oder Zement fixiert werden können.

Im zweiten Schritt wird eine homogene und reproduzierbare Beschichtung auf der Implantatoberfläche aufgetragen. Die Beschichtung basiert auf der NanoBone[®]-Technologie, deren osteoinduktive Wirkung aus früheren Studien bekannt ist [109–111].

Im dritten Schritt wird das beschichtete Modellimplantat in einem tierexperimentellen Versuch untersucht. Dabei wird die Einwachstiefe des Knochens in die Implantatstruktur dokumentiert und der Einfluss der osteoinduktiven Beschichtung erarbeitet.

4.3.1. Design des Modellimplantates

Für diese Studie wird der Titanschaum über die Platzhaltermethode [5, 6] hergestellt. Dazu wird ein Titanpulver (Gesellschaft für Elektrometallurgie mbH, Deutschland) mit einer

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

Korngröße von 50 bis 90 μm mit einem pulverförmigen Platzhalter (Ammoniumhydrogencarbonat, M S Laborausstattung, Deutschland) vermischt. Das verwendete Titanpulver ist cp Titan vom Grad 2 (s. Tab. 4.2 auf S. 22) und für die Verwendung als medizinisches Produkt zugelassen. Die Pulverpartikel zeichnen sich durch scharfkantige unregelmäßige Formen aus. Durch Aussieben werden die Pulverpartikel des Platzhalters auf eine Korngröße von 212 bis 600 μm eingestellt. Der Platzhalter und das Titan werden in einem Verhältnis von 2 g Titan zu 1 g Platzhalter homogen vermischt. In der Literatur wird unter anderem die Zugabe von Lösungsmitteln erwähnt, um eine Segregation der beiden Pulver zu vermeiden. Da ein Lösungsmittel bei unvollständigem Entfernen eine toxische Zellreaktion hervorrufen kann, wird darauf verzichtet. Durch die Korngröße des Platzhalters und dem Mischverhältnis wird die offenporigen Struktur definiert, die sich an den knochenformenden Zellen und den ausgebildeten Knochenformationen orientiert (s. Abschn. 2.1.1).

Anschließend erfolgt eine Verdichtung des Gemisches zu einem zylinderförmigen Grünkörper mit einem Durchmesser von 1,0 cm und einer Höhe von mindestens 1,5 cm bei einem uniaxialen Druck von

$$p = \frac{75 \text{ kN}}{\pi \cdot (0,5 \text{ cm})^2} \approx 955 \text{ MPa.} \quad (4.2)$$

Aus dem ungesinterten Grünkörper (s. Abb. 4.6(a)) wird mechanisch die Implantatform herausgearbeitet. Aufgrund der scharfkantigen Partikelform des Titanpulvers können sich die einzelnen Körner ineinander verhaken und verkeilen. Dadurch erhält der ungesinterte Grünkörper die notwendige Stabilität für den Prozess der mechanischen Verarbeitung.

Als Grundform für das Modell wird ein Kegelstumpf gewählt, der sich aufgrund seiner konischen Form im späteren Bohrloch (künstlicher Defekt) verkeilen kann und somit die nötige Primärstabilität (s. Anhang Abb. A.2) liefert. Die technische Zeichnung in Abbildung 4.5 zeigt das theoretische Implantatmodell. Das Modell hat einen oberen Durchmesser von 3,2 mm und einen Unteren von 4,0 mm sowie eine Länge von 9,0 mm. In der Skizze ist bereits die Einteilung in Mantel- (0,5 mm Rand, ■) und Kernzone (■) vorgenommen worden, die in Abschnitt 4.4.2 ausführlich erläutert wird. Die Kegelform selbst ist an ein Pilot- und Erweiterungsbohrset (E3001, E3004, F3004, Bone Management[®], Hager & Meisinger GmbH, Deutschland) aus dem dentalen Implantationsbereich angepasst.

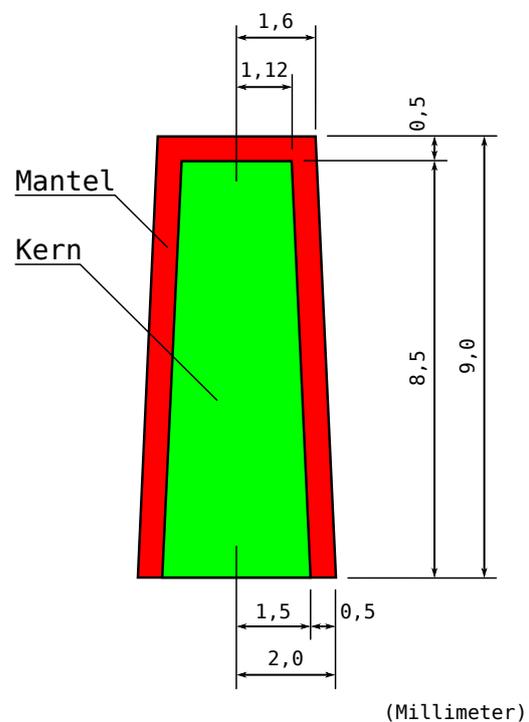


Abb. 4.5.: Technische Zeichnung mit den theoretischen Sollwerten des Implantates (Angaben in Millimeter). In der Skizze ist die später folgende Einteilung (s. Abschn. 4.4.2) in Mantel- (0,5 mm Rand, ■) und Kernzone (■) eingezeichnet.

4.3. Entwicklung des Modellimplantates (TS)

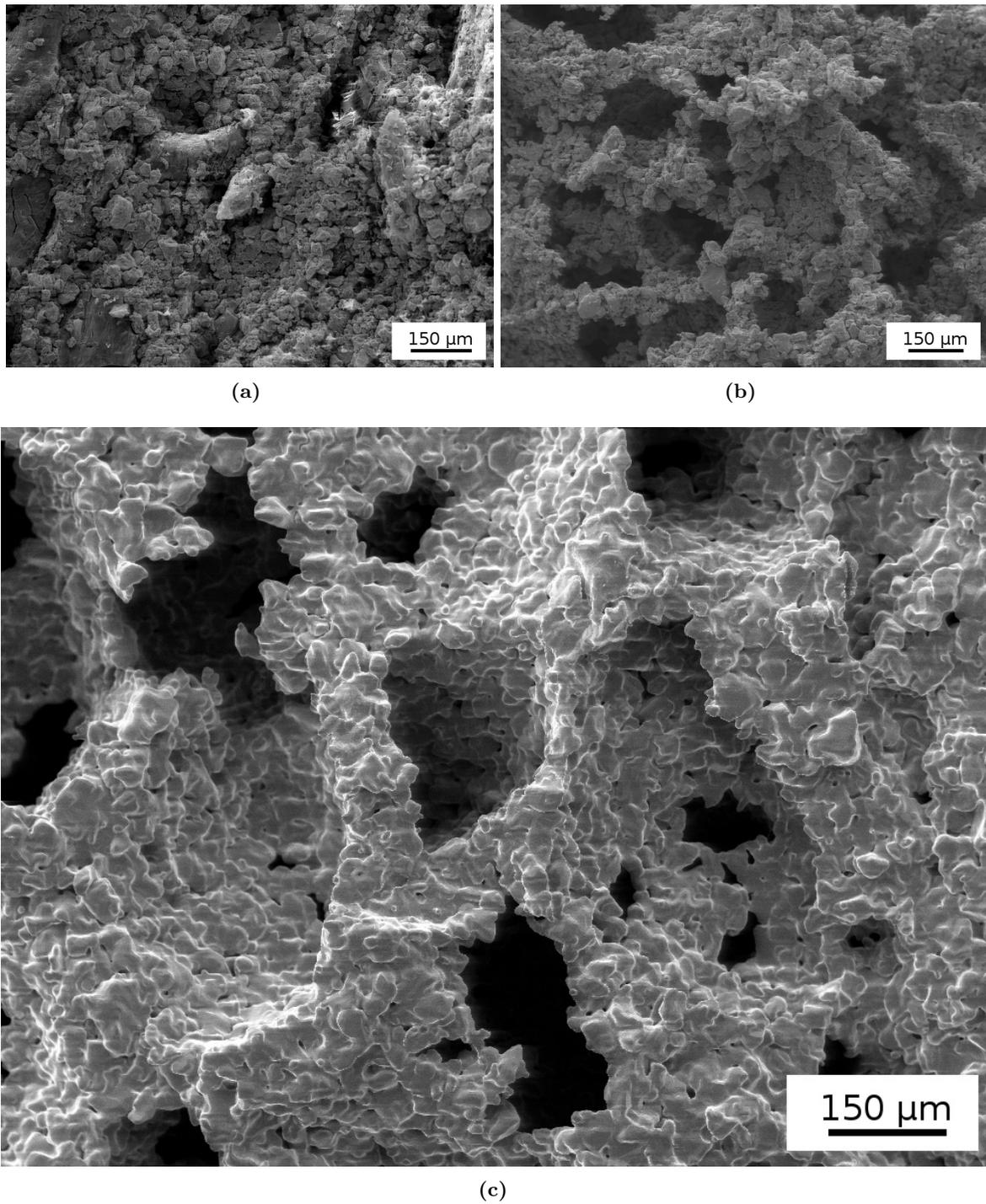


Abb. 4.6.: Einzelne Zwischenschritte des Herstellungsprozesses der Titanimplantate: (a) Grünkörper aus Titanpulver und Platzhalter; (b) Grünkörper nach Herauslösen des Platzhalters; (c) Fertiggestelltes Implantatmodell nach Sintervorgang.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

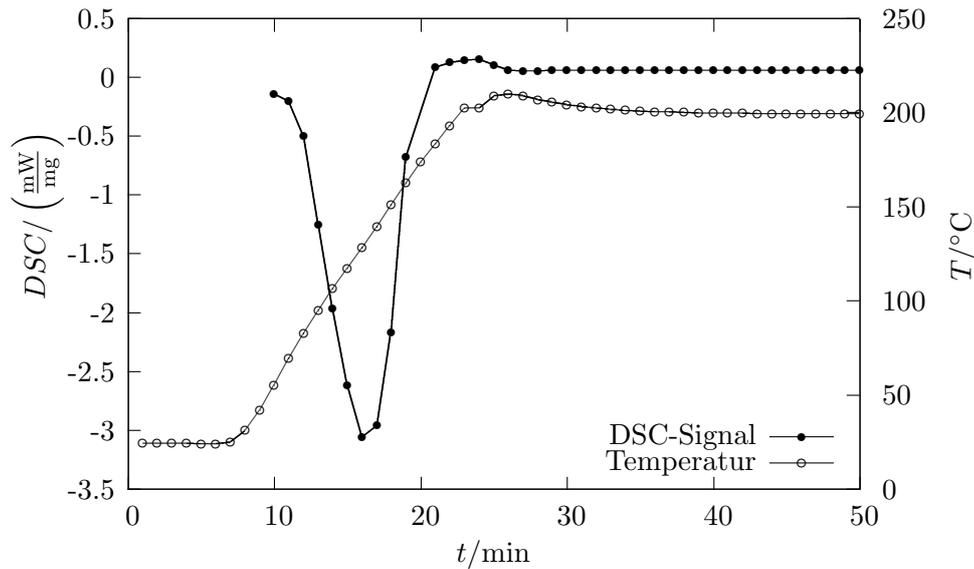


Abb. 4.7.: Das Diagramm zeigt das endothermes DSC-Signal vom Herauslösen des Platzhalters [112].

Das als Platzhalter verwendete Ammoniumhydrogencarbonat zersetzt sich beim Erhitzen



in Ammoniak, Wasser und Kohlenstoffdioxid. Da Ammoniak als gesundheitsschädliches Gas eingestuft ist, ist es sehr wichtig, dass das Ammoniumhydrogencarbonat vollständig aus dem Metallschaum entfernt wird. In Abbildung 4.7 ist eine Messung der dynamischen Differenzkalorimetrie (DSC) gezeigt, in welcher der endotherme Zersetzungsprozess des Platzhalters im Grünkörper untersucht wird.

Dabei zeigt sich, dass der Platzhalter bei einer Temperatur von 50 °C bis 200 °C nach etwa 10 min herausgelöst ist. Um durch die korrosive Wirkung des Ammoniaks den Vakuumpumpstand nicht zu schädigen, wird für das Herauslösen des Platzhalters eine Membranpumpe verwendet und die Abgase werden direkt in eine geeignete Abzugsvorrichtung geleitet. Dieser Schritt erfolgt bei 150 °C für zwei Stunden unter einem Druck von 0,5 Pa. Das ungesinterte Titanpulver mit herausgelöstem Platzhalter ist in Abbildung 4.6(b) dargestellt.

Im folgenden Sinterprozess wird die Probe innerhalb von drei Stunden auf 1200 °C geheizt und für zwei Stunden bei dieser Temperatur gehalten. Der gesamte Vorgang muss dabei unter einem Hochvakuum von mindestens 1 mPa (= 10⁻⁵mbar) ablaufen, um eine schädliche Oxidation des Titans zu vermeiden.

Die fertig gesinterte Struktur der Implantatmodelle ist in Abbildung 4.6(c) dargestellt. Ein vollständiges Implantat wird im Bild 4.8 gezeigt. Für diese Abbildung wird aus einem Datensatz von μ CT-Aufnahmen (Skyscan 1172, Bruker-microCT, Belgien) ein dreidimensionales Modell rekonstruiert und gerendert. Die rote Schnittfläche liefert dabei einen Eindruck von der Porosität, die das gesamte Implantat durchzieht. Vor der weiteren Verwendung der Titanschaumstifte werden diese eine halbe Stunde in reinem Alkohol gespült. Dieser Schritt dient dazu, um mögliche Verunreinigungen auszuwaschen und Keime abzutöten, die beim

Transport vom Sinterofen zur sterilen Werkbank mit der Beschichtungsanlage eingetreten sein können.

Während des Herausarbeitens des Implantates aus dem Grünkörper an einer Drehbank entstehen Abweichungen zwischen den theoretischen Sollwerten und der realen Abmessungen des Kegelstumpfes. Des Weiteren ruft das Sinterverfahren eine Schrumpfung des Formkörpers hervor. Stichprobenartig werden fertige Implantate mit einer Feinmessschraube vermessen und die realen Abmessungen ermittelt. Die fertigen Implantate haben einen minimalen Durchmesser $\varnothing_{\text{oben}}$ von $(2,93 \pm 0,04)$ mm, einen maximalen Durchmesser $\varnothing_{\text{oben}}$ von $(3,70 \pm 0,03)$ mm und eine Höhe von $(8,87 \pm 0,08)$ mm (s. Tab. 4.4). Testimplantationen, die mit dem Bohrset im toten Knochen durchgeführt werden, zeigen trotz der Abweichung zwischen theoretischer und realer Implantatabmessung eine gute Positionierung und Verankerung der Implantate im Defekt. Es ist somit keine Anpassung der realen Abmessung an die theoretischen Sollwerte notwendig.

Tab. 4.4.: Die Tabelle zeigt eine Übersicht der theoretischen Sollgrößen sowie die gemessenen Größen des Implantatmodells.

Bez.	soll/mm	gemessen/mm
$\varnothing_{\text{oben}}$	3,2	$2,93 \pm 0,04$
$\varnothing_{\text{unten}}$	4,0	$3,70 \pm 0,03$
Höhe	9,0	$8,87 \pm 0,08$

4.3.2. Porosität des Modellimplantates

Anhand der vorgenommenen μ CT-Aufnahmen von fertig gesinterten Implantatmodellen (s. Abb. 4.8) wird eine Charakterisierung der Porosität vorgenommen. Dabei zeigt sich, dass es zu keinen Komplikationen durch eine Segregation der Ausgangspulver gekommen ist. Aus den μ CT-Daten ergibt sich eine Porosität von 46 %. Des Weiteren wird ein Anteil von weniger als 0,2 % an eingeschlossenen Poren, die nicht mit dem interkonnektierenden Netzwerk verbunden sind, ermittelt. Auf Grund dessen, dass 99,8 % der Poren miteinander verbunden sind, ist es berechtigt, von einem Titanschaum mit interkonnektierender Struktur zu sprechen.

Nach dem Ablauf der tierexperimentellen Studie werden auch die histologischen Präparate auf ihre Porosität hin untersucht. Die zweidimensionalen, histologischen Dünnschliffe des Tierversuches zeigen ein

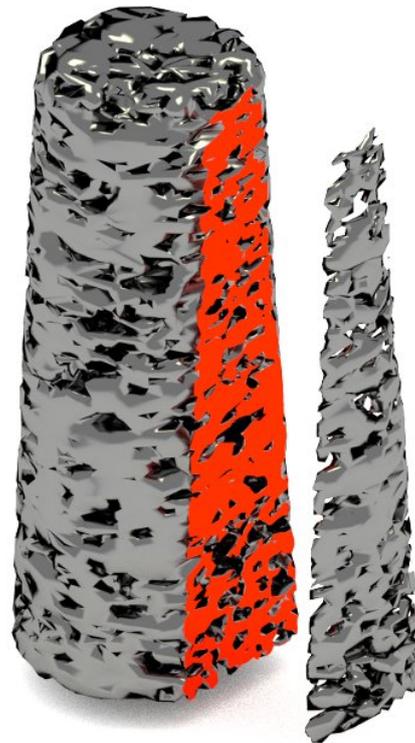


Abb. 4.8.: Darstellung eines Implantatmodells aus Titanschaum. Das Modell wurde aus einer μ CT-Aufnahme rekonstruiert. Die rot eingefärbte Schnittfläche durch das Modell gibt einen Einblick in die offenporige Struktur im Inneren des Implantates.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

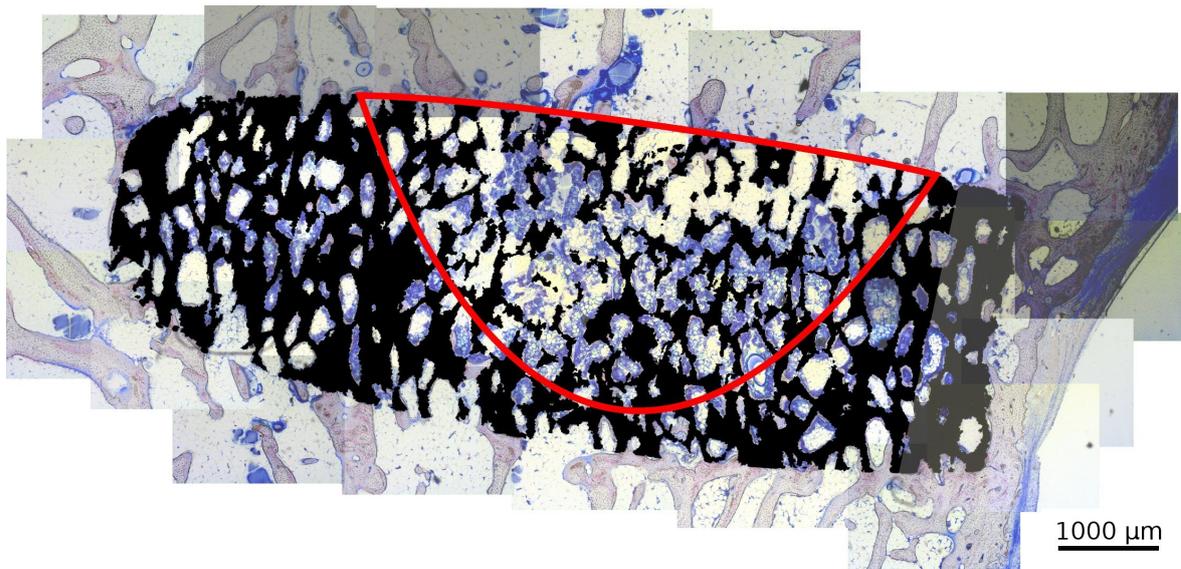


Abb. 4.9.: Abbildung eines histologischen Dünnschliffes mit den Auswirkungen der Segregation auf die Porosität. Der rot markierte Bereich zeigt eine höhere Porendichte im Vergleich zur restlichen Implantatfläche.

Verhältnis zwischen Hohlraumfläche und Gesamtfläche von $0,42 \pm 0,03$. Bei einem einzelnen Implantat aus der tierexperimentellen Studie zeigen sich deutliche Anzeichen einer Segregation der Pulver bei der Herstellung (s. Abb. 4.9, rot markierter Bereich). Der segregierte Bereich zeigt dabei ein Flächenverhältnis zwischen Hohlraum- und Gesamtfläche von 0,63. Das Verhältnis des restlichen Bereiches von diesem Implantat liegt bei 0,40. Dieser Effekt hat ebenfalls Auswirkungen auf die histomorphometrische Auswertung und wird im noch folgenden Abschnitt 4.4.2 diskutiert.

4.3.3. Beschichtung des Modellimplantates

Die Modelle für orthopädische Implantate aus Titanschaum werden in einem Spin-Spray-Coating-Verfahren beschichtet. Dazu wird der zu beschichtende Körper um eine Achse rotiert (Spin) und gleichzeitig einem Sprühnebel (Spray) mit der Beschichtungslösung ausgesetzt. Dieser Prozess wird mit einer computergesteuerten Anlage durchgeführt, die im Folgenden näher erläutert wird. Die Beschichtungsanlage wurde in den Diplomarbeiten von GLASS und ADAM entwickelt und in entsprechenden Veröffentlichungen dokumentiert [113, 114]. Die Parameter für zum Beispiel die Beschichtungsdispersion, -dauer und -rotation in dieser Studie sind stark an den Untersuchungen dieser Vorarbeiten orientiert.

Die Beschichtungslösung, die im Folgenden auch als Ansatz bezeichnet wird, basiert auf der NanoBone[®]-Technologie. Vom Ansatz wird eine Gesamtmasse von 300 g hergestellt, um den systematischen Fehler möglichst gering zu halten. Insgesamt werden 1,5 g synthetisches Hydroxylapatit (HA, s. Abschn. 2.3.2) mittels eines Ultraschall-Homogenisierer (Digital Sonifier[®] 450, Branson Ultrasonics Corporation, USA) in 295,78 g reinem Ethanol dispergiert. Anschließend wird 2,72 g hydrolisiertes Sol (s. Abschn. 2.3.3) der Dispersion zugegeben. Da

4.3. Entwicklung des Modellimplantates (TS)

der Energieeintrag durch den Ultraschall zu einem Temperaturanstieg der Dispersion führt, wird vor der Zugabe des Sols die gesamte Lösung auf 5 °C heruntergekühlt. Im letzten Schritt wird das Sol in der HA-Ethanol-Lösung durch 1 s Ultraschallpulse (0,5 s Pause zw. den Pulsen) bei 10 % der Gesamtleistung homogen zerteilt. Der Beschichtungsansatz hat somit einen HA-Anteil von etwa 0,5 %. Das SiO₂ zu HA Verhältnis in der gelierten Beschichtung liegt bei 24 zu 76 % und orientiert sich an dem Knochenaufbaugranulat NanoBone[®].

Die Abbildung 4.10 zeigt die computergesteuerte Beschichtungsanlage mit einigen ihrer integrierten Komponenten. Das zu beschichtende Implantat wird in einem Dreibackenfutter aus Edelstahl (s. Abb. 4.10(5)) eingespannt. Die Rotationsachse des Spannftters verläuft parallel zur Translationsachse eines Schlittens an dem das Futter montiert ist. Der Schlitten kann entlang der Translationsschiene unterschiedliche Stationen innerhalb der Beschichtungsanlage anfahren.

Durch einen, in die Anlage integrierten Plasmajet (s. Abb. 4.10(4)) wird im ersten Schritt die Oberfläche gesäubert und hydrophilisiert. Eine hydrophile Oberfläche ist eine Grundvoraussetzung, um die Beschichtungslösung auf den inneren Bereich des Implantates aufzubringen. Der Benetzungsunterschied mit einer Flüssigkeit zwischen hydrophilen und hydrophoben Oberflächen wurde in Abschnitt 2.2.2 auf Seite 6 näher erläutert. Da der Plasmajet lediglich

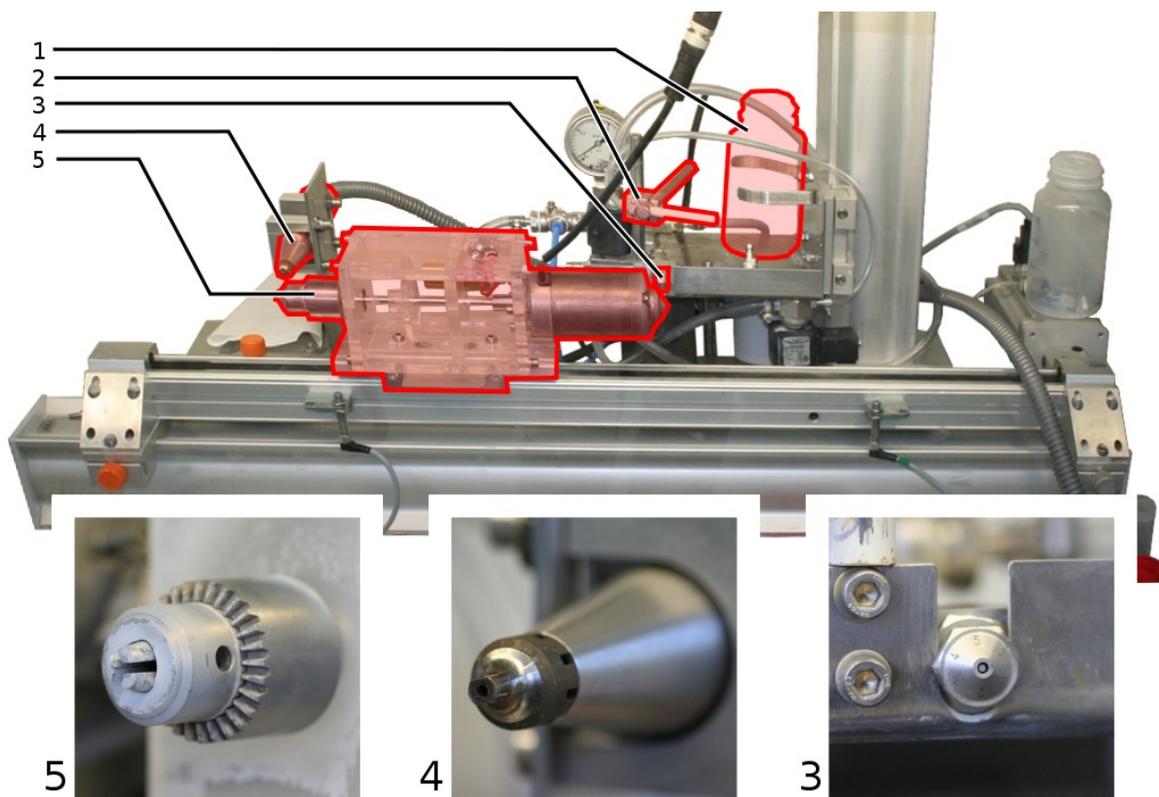


Abb. 4.10.: Abbildung der Beschichtungsanlage mit Platz für Vorratsbehälter der Sprühlösung (1), Trocknungsgebläse (2), Sprühdüse (3), Plasmajet (4) und beweglicher Schlitten mit Dreibackenfutter zum Einspannen der Implantate (5).

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

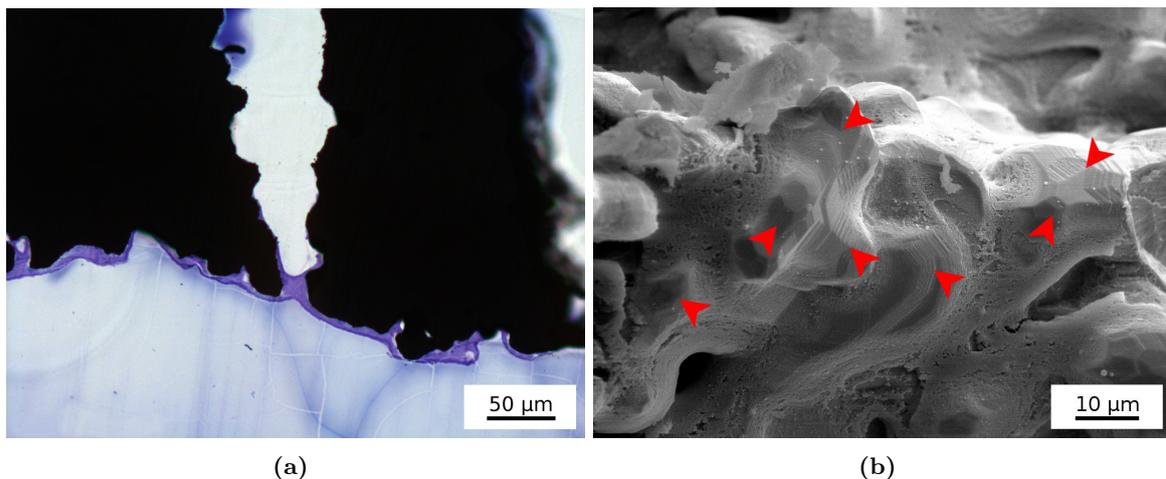


Abb. 4.11.: Hat das Implantat zu viel thermische Energie, dann geliert das Sol am Rand (a) ohne sich zu verteilen und der Kernbereich (b) wird teilweise nicht beschichtet (►).

einen Durchmesser von etwa 5 mm hat, kann er nicht das gesamte Implantat (Länge 9 mm) abdecken. Dazu wird in den 20 s der Plasmabehandlung das rotierende Implantat fünfmal vor und zurück durch die Plasmaflamme bewegt. Durch das Reinigen mit dem Plasmajet wird dem Implantat sehr viel thermische Energie zugeführt. Diese Energie sorgt bei einem sofortigen Auftragen des Ansatzes dafür, dass der Alkohol verdunstet und das Sol nur auf der Oberfläche kondensiert, bevor es sich vollständig auf der inneren offenporigen Struktur verteilt hat. Die Abbildung 4.11(a) zeigt aufgrund der hohen thermischen Energie zu früh kondensierte Schichten, die die Porenhäule am Rand des Implantates verschließen. Somit dringt nicht ausreichend Beschichtungsmaterial ins Innere der Implantatstruktur vor und die Beschichtung weist Lücken auf (s. Abb. 4.11(b) ►).

Wie das Diagramm in Abbildung 4.12 zeigt, ist nach etwa 25 s im laminaren Luftstrom der Flowbox das Implantat von 130 °C auf unter 40 °C heruntergekühlt [45]. In den Beschichtungsprozess wird deshalb eine Pause von 30 s zwischen der Plasmabehandlung und der Beschichtung eingebaut.

Die Arbeiten von GLASS und ADAM [113,114] untersuchten auch die Entstehung von Trocknungsrisse in der Schicht (s. Abb. 4.13(a)). Dabei zeigte sich, dass bei gleichbleibendem Beschichtungsvolumen eine Wiederholung von verkürzten Beschichtungszyklen zu einer Reduzierung der Trocknungsrisse führt. Die Abbildung 4.13(b) zeigt schematisch die Reduzierung der Trocknungsrisse durch eine Erhöhung der Beschichtungszyklen bei gleichem Schichtvolumen. Die gesamten Untersuchungen zum Beschichtungsprozess der Modellimplantate wird mit 6 Wiederholungen je Vorgang umgesetzt.

Die Beschichtungslösung (s. Abb. 4.10(1)) wird durch eine Sprühdüse (s. Abb. 4.10(3)) auf die Modellimplantate aufgetragen. Dazu wird das rotierende Implantat dem Sprühkegel für ein definiertes Zeitintervall ausgesetzt. Die Intervallzeit der Voruntersuchungen variiert von 0,5 bis 2,0 s. Die Werte werden in Anlehnung an die Untersuchungen zur Beschichtung von Dentalimplantaten von ADAM [113] ausgewählt. Dabei zeigt sich, dass aufgrund der größeren Oberfläche der offenporigen Struktur der Modellimplantate eine erhöhte Menge vom Ansatz

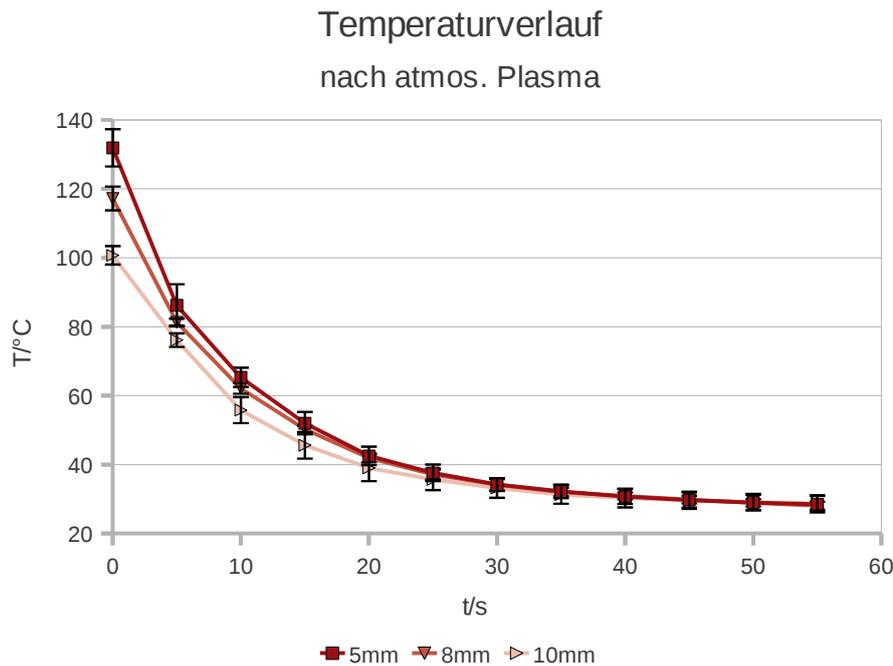


Abb. 4.12.: Diagramm mit der Abkühlrate eines Dentalimplantates aus Titan im laminaren Luftstrom der Flowbox nach dem Erhitzen durch die Behandlung mit einem Plasmajet [45]. Die unterschiedlichen Kurven zeigen Temperaturverläufe mit unterschiedlichen Abständen (5, 8 und 10 mm) zwischen der Düse des Plasmajets und der Titanprobe.

aufgetragen werden muss. Bei zu geringen Zeiten werden vornehmlich Einbuchtungen mit hohen Kapillarkräften beschichtet. Die Abbildung 4.13(c) zeigt eine unzureichende 6 mal 0,5 s beschichtete Oberfläche. Die blauen Pfeile (►) markieren beschichtete Stellen. Eine 6 fache Beschichtung zu je 2,0s zeigt ein gutes Beschichtungsergebnis mit einer homogenen Schicht (s. Abb. 4.15(a) bis (f)).

Vor der Einleitung des abschließenden Trocknungsschrittes wird eine 5 s Pause eingerichtet, um eine ganzflächige Verteilung der Beschichtungsdispersion zu ermöglichen. Während des Trocknungsprozesses erfolgt eine 30 s lang andauernde Behandlung im Luftstrom der Trocknungsdüse (s. Abb. 4.10(2)). Sowohl die Trocknungsdüse als auch die Beschichtungsdüse werden mit einem ölfreien Kompressor (CARAT 106/E, fiac AIR COMPRESSORS, Italien) betrieben, der auch für medizinische Anwendungen zugelassen ist. Der gesamte Beschichtungsprozess wird bei einer Probenrotation von 300 Umdrehungen in der Minute durchgeführt.

Die Tabelle 4.5 zeigt zusammengefasst die vorgenommenen Variationen zur Untersuchung und Charakterisierung des Beschichtungsprozesses der Titanstifte. In der Abbildung 4.14 ist der Beschichtungsablauf in einem Prozessdiagramm zusammengefasst.

Um eventuell verbliebende Ethylgruppen aus der Beschichtung zu entfernen, wird das Implantat nach dem Beschichtungsprozess im Niederdruckplasma behandelt. Das Diagramm A.3 im Anhang (auf S. 101) zeigt, dass die abschließende Plasmabehandlung zu keiner Veränderung in der Struktur der Schicht führt.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

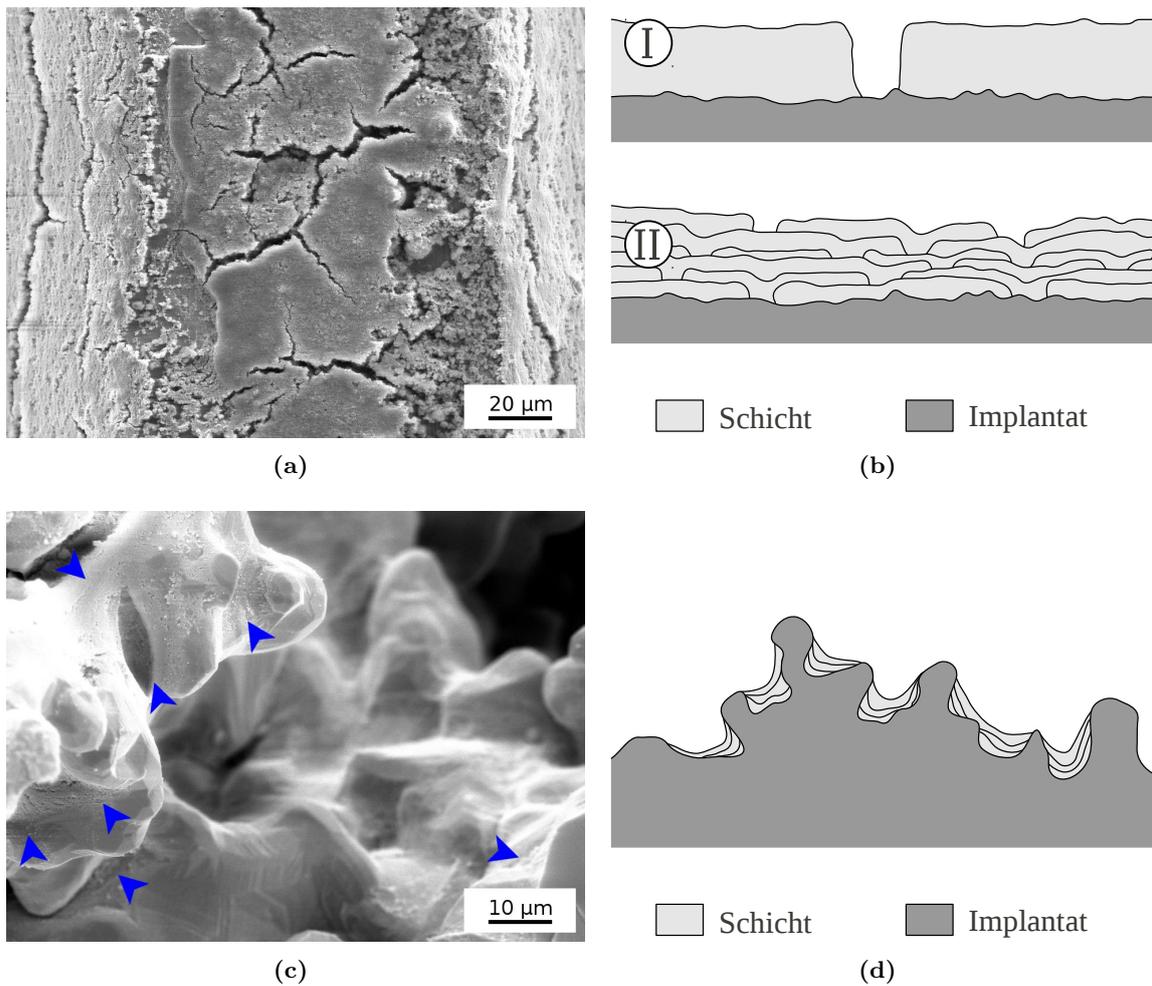


Abb. 4.13.: (a) Durch zu dickes Auftragen der Beschichtungslösung entstehen Risse in der Schicht durch den Trocknungsvorgang [113]. (b) Trocknungsrisse bei gleichem Schichtvolumen mit einer einmaligen (I) und einer sechsfachen Beschichtung (II). (c) Durch zu kurze Sprühzeiten entsteht keine zusammenhängende Schicht (▶). (d) Schematische Darstellung der Schichtanlagerung wenn nicht ausreichend Beschichtungsmaterial aufgetragen wird.

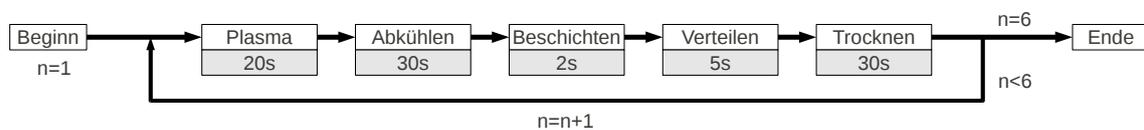


Abb. 4.14.: Prozessdiagramm des gesamten Beschichtungsablaufes mit $n=6$ Wiederholungen.

In den Arbeiten von ADAM werden Untersuchungen zur Schichthaftung der Hydroxylapatit enthaltenden Sol-Gel-Beschichtung durchgeführt [45]. Diese werden durch standardisierte Haftzugtests nach der DIN 50125-E5-16-50 erbracht. Dazu werden zwei Titanflächen mit einem

Tab. 4.5.: Auflistung der Prozessparameter, die für die Voruntersuchungen variiert wurden und die letztendlich festgelegten Beschichtungsparameter.

Beschreibung	Untersuchungsbereich	festgelegte Parameter
Beschichtungsdispersion		
Feststoffgehalt HA		0,5 Gew.%
aufgetragene Schicht		
Verhältnis SiO ₂ /HA		24/76
Schichtdicke	0 bis 10 µm	3 bis 5 µm
Parameter Beschichtungsanlage		
Plasma Rotation		300 U/min
Plasma Dauer		20 s
Plasma Abstand		8 mm
Plasma Abkühlpause	2 s, 30 s	30 s
Beschichtung Rotation		300 U/min
Beschichtung Sprühdauer	0,5 bis 2 s	2 s
Beschichtung Trocknungsdauer		15 s
Wiederholungen		6

Tab. 4.6.: Die Tabelle zeigt Messungen von der Schichthaftung der NanoBone[®]-Schicht auf Titan in Abhängigkeit von der Schichtdicke [45]. Die Mindestanforderung von 22 MPa nach den Richtlinien der U.S. Food and Drug Administration für hydroxylapatithaltige Schichten [115] wurde deutlich erfüllt.

Schichtdicke	5 µm	10 µm	15 µm
Haftzugfestigkeit in N/mm ²	33 ± 12	44 ± 2	35 ± 4

Epoxydharzkleber verleimt. Auf einer der beiden Titanflächen wird vor dem Verleimen die zuvor beschriebene NanoBone[®]-Beschichtung aufgetragen. Nach dem Austrocknen des Klebers wird die uniaxiale Kraft gemessen, die nötig ist, um die beiden Flächen wieder auseinander zu reißen. Anschließende EDX-Untersuchungen der beiden Klebeflächen haben gezeigt, dass sich die Schicht nicht vom Titan gelöst hat, sondern der Kleber von der Schicht abgerissen ist. Die bindende Kraft zwischen Titan und Beschichtung kann somit nicht ermittelt werden, jedoch wird die von der U.S. Food and Drug Administration geforderte Mindesthaftung für hydroxylapatithaltige Schichten von 22 MPa dabei deutlich überschritten. In der Tabelle 4.6 sind die gemessenen Kräfte für unterschiedliche Schichtdicken aufgelistet, bei denen der Kleber abgerissen ist.

4.3.4. Eigenschaften der Beschichtung im µm-Bereich

Dieser Abschnitt beinhaltet die Untersuchung und Charakterisierung der Beschichtung auf dem gesamten Implantat, die nach den Parametern aus dem Prozessdiagramm in der Abbil-

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

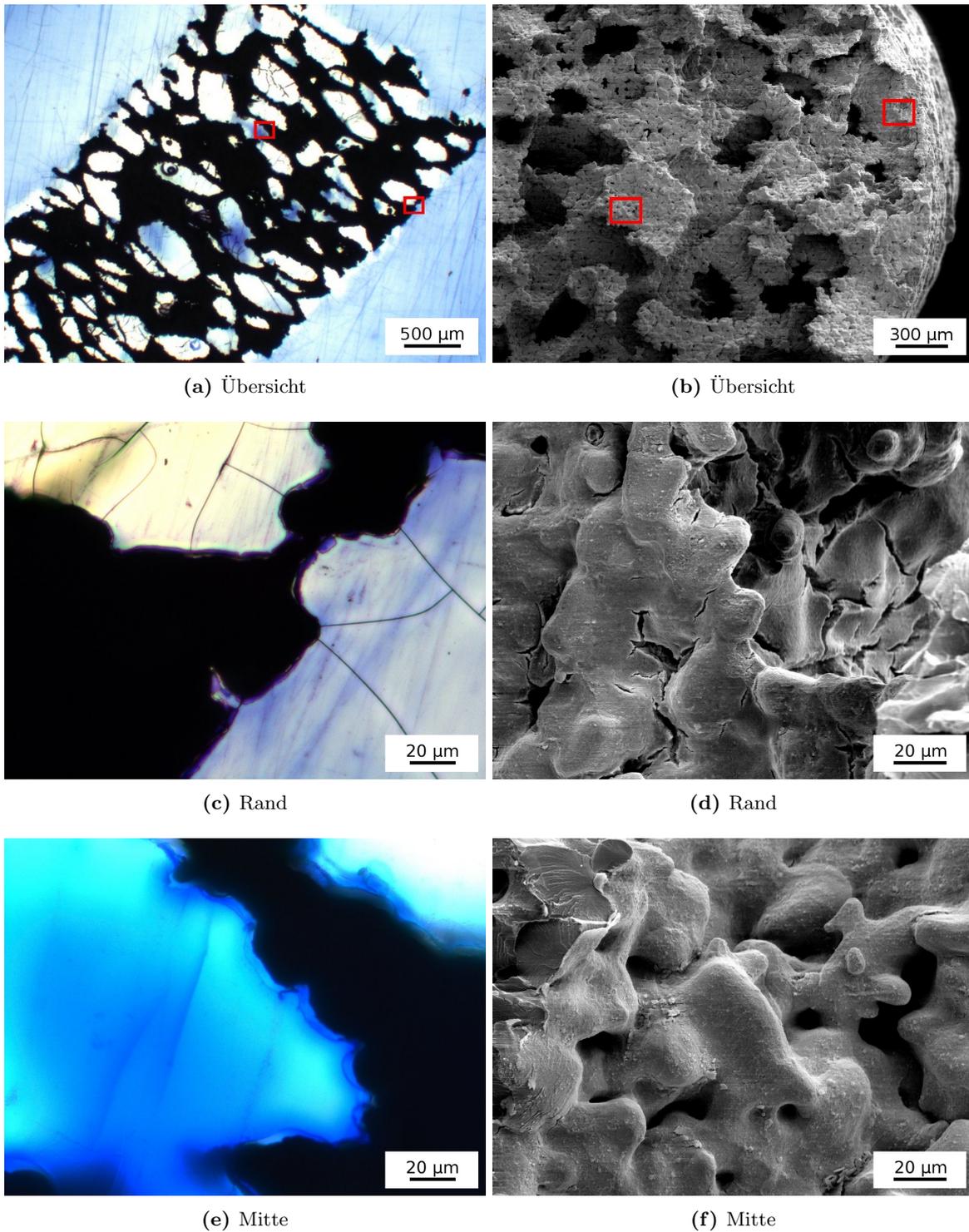


Abb. 4.15.: Die Abbildung (a) zeigt eine lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme eines beschichteten eingebetteten Implantates mit exemplarisch ausgewählten Stellen zur Untersuchung der Schichtdicke am Rand (c) und in der Mitte (e). Die Abbildung (b) zeigt eine elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme mit exemplarisch ausgewählten Stellen zur Untersuchung der Oberflächenmorphologie der Schicht am Rand (d) und in der Mitte (f).

dung 4.14 beschichtet werden. Dazu werden beschichtete Testimplantate entlang der Transversalebene in der Mitte der Längsachse zerbrochen. Ein Teil des Implantates wird in Polymethylmethacrylat eingebettet und mit der Dünnschlifftechnik (s. Abschn. 3.1) aufgearbeitet. Der andere Teil wird für eine elektronenmikroskopische Untersuchung präpariert.

Durch eine Reduzierung der Menge des aufgetragenen Ansatzes je Beschichtungsvorgang, in Kombination mit einer mehrmaligen Wiederholung dieses Vorgangs, kann die Rissbildung durch Trocknung bei gleichbleibender Schichtdicke unterdrückt werden (s. Abb. 4.13(b)). Durch eine Mehrfachbeschichtung mit geringen Materialvolumen werden die kleinen Risse durch die neue Deckschicht verschlossen. Die elektronenmikroskopische Aufnahme 4.15(d) vom Implantatrand zeigt jedoch trotz vorbeugender Maßnahmen den Effekt von Trocknungsrisen in der Beschichtung. Dieser Effekt ist in der Mitte des Implantates nicht mehr zu finden (s. Abb. 4.15(f)). Das Auftreten dieses Effektes ausschließlich im Randbereich deutete auf eine Ungleichverteilung der Beschichtungslösung hin. Das würde bedeuten, dass die Schichtdicke zwischen Rand- und Mittelbereich der Implantate variiert. Diese Annahme kann durch die Auswertung der Dünnschliffpräparate nicht bestätigt werden.

In der Abbildung 4.15(a) ist ein entsprechendes Dünnschliffpräparat des Implantates mit Untersuchung zur Dicke der aufgetragenen Beschichtung dargestellt. Die eingezeichneten Markierungen symbolisieren exemplarisch ausgewählte Ausschnitte am Rand (4.15(c)) und in der Mitte (4.15(e)) des Implantates.

Zur Bestimmung der Schichtdicke werden an weiteren Probeimplantaten exemplarische Ausschnitte von der Mitte und dem Rand der Implantate gewählt. An diesen Positionen werden lichtmikroskopische Aufnahmen (400-fache Vergrößerung) erstellt, an denen die Länge der Implantatoberfläche vermessen (AxioVision 4.8, Zeiss, Deutschland) wird. Zusätzlich wird in den Aufnahmen die Fläche der aufgetragenen Schicht markiert (Gimp, GNU Image Manipulation Program) und anschließend vermessen (AxioVision 4.8). Der Mittelwert der Schichtdicke ergibt sich aus dem Quotienten der Beschichtungsfläche durch die Länge. Die Bilder 4.15(c) und (e) zeigen, dass die Schicht nahezu homogen aufgetragen wird. An vereinzelt Stellen mit Knicken oder Abstufungen in der Implantatstruktur treten kleine Risse in der Beschichtung auf. Diese Risse werden nicht gesondert behandelt und tragen zum Mittelwert der Schichtdicke bei. Für die Schichtdicke in der Mitte der Implantate wird ein Wert von $4,0\ \mu\text{m}$ ermittelt. Am äußeren Rand beträgt die Schichtdicke $2,6\ \mu\text{m}$.

In der Morphologieuntersuchung der aufgetragenen Schicht im Elektronenmikroskop (s. Abb. 4.15(d) und (f)) zeigt sich, dass durch das Sprüh-Spin-Coating-Verfahren in Kombination mit einer Plasmabehandlung auf der gesamten Oberfläche eine nahezu homogene Verteilung und Struktur der Schicht erstellen lässt. Es gibt keine Bereiche im Implantatinneren, an denen die Implantatstruktur durch die Schicht hindurch zu sehen ist. Bis auf das Auftreten von Trocknungsrisen am Implantatrand sind keine Unterschiede feststellbar.

4.3.5. Eigenschaften der Beschichtung im nm-Bereich

Kleinwinkelstreuexperimente mit Röntgenstrahlen ergeben für die Beschichtung eine fraktale Dimension von $d_f = 2,6$ [113]. Dabei zeigt sich, dass mit der Abnahme des Feststoffgehaltes von Hydroxylapatit in der Beschichtungsdispersion, die fraktale Dimension kleiner wird. Das bedeutet, die Oberfläche wird bei gleichem Volumen größer.

In der Abbildung 2.9(a) auf Seite 13 wird eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten Hydroxylapatitkristallite dargestellt. Diese Kristallitplättchen sind

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

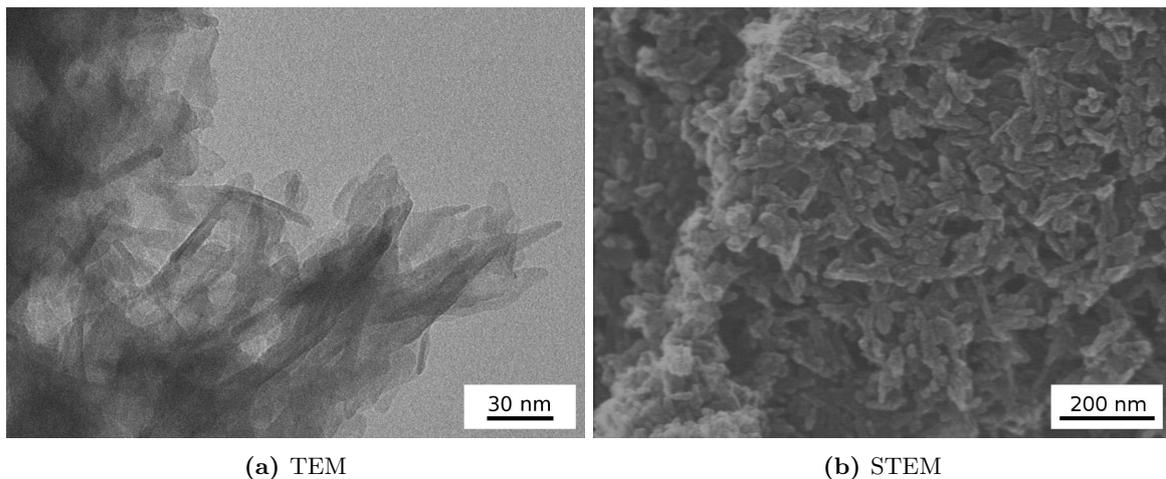


Abb. 4.16.: (a) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme der Beschichtung. Darstellung von Hydroxylapatitplättchen, die in einer SiO_2 -Matrix ummantelt wurden. (b) Hochaufgelöste rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Beschichtung. Es sind die SiO_2 ummantelten HA-Kristallit zu erkennen. (Bildquelle: AG Nanostrukturierte Materialien)

auch in der Abbildung 4.16(a) wiederzufinden, die eine Aufnahme der Beschichtungslösung zeigt. Dabei ist die Struktur der HA-Plättchen durch die SiO_2 -Ummantelung nicht mehr scharf darstellbar. Wie die HA-Plättchen oder ihre Agglomerate vom SiO_2 umlagert werden, zeigt die elektronenmikroskopische Rasteraufnahme in Abbildung 4.16(b). Es sind keine scharfkantigen Strukturen der Kristallitplättchen zu sehen, da diese unter der gelierten Umhüllung des Sols verborgen sind.

4.4. Tierexperimentelle Studie (TS)

Die Untersuchungszeitpunkte werden auf 4 (**4W**) und 12 Wochen (**12W**) festgelegt. Nach 4 Wochen soll die frühe Einheilphase untersucht werden. Durch die lange Standzeit von 12 Wochen hat der Organismus ausreichend Zeit, um auch Knochengewebe im Inneren der Implantatstruktur aufzubauen.

Den Kaninchen werden die Implantate, orthogonal zur Sagittalebene, medial in den distalen Femur eingesetzt. Die Studie wird in drei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe ist die Kontrollgruppe (**KGr**), die aus unbehandelten Titanschaumstiften mit hydrophober Oberfläche besteht. Die Zweite ist die Gruppe mit hydrophilen Oberflächen (**HGr**), die durch eine Plasmabehandlung erreicht wird. Die dritte Gruppe ist die beschichtete Gruppe (**BGr**), die in einem Spin-Spray-Coating Prozess mit einer NanoBone[®]-Schicht überzogen wird. Alle Gruppen bestehen zu jedem Zeitpunkt aus sechs Implantaten. In Abbildung 4.17(a) ist die Gruppeneinteilung schematisch dargestellt. In Tabelle 4.17(b) ist eine Übersicht der einzelnen Implantatbezeichnungen aufgelistet.

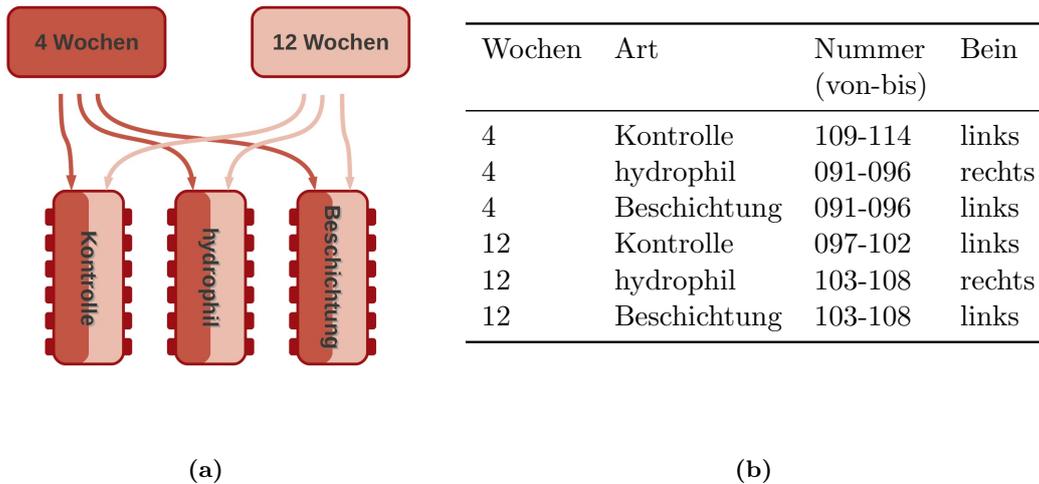


Abb. 4.17.: (a) Schematische Übersicht der untersuchten Versuchsgruppen der tierexperimentellen Studie. (b) Tabellarische Übersicht der verwendeten Implantatbezeichnungen.

4.4.1. Zytotoxizitätstest des Implantatmodells

Um sicherzustellen, dass bei der Herstellung oder der Beschichtung der Titanformkörper keine toxischen Eigenschaften entstehen, wird ein direkter Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu werden alle Proben vor der Besiedelung mit Zellen in einem Umluftofen für 4 Stunden bei 160 °C sterilisiert. Anschließend werden Zellen in gleicher Anzahl *in vitro*, sowohl auf der unbehandelten (**KGr**), als auch auf der plasmabehandelten (**HGr**) und der beschichteten Titanschaumoberfläche (**BGr**), für jeweils 2 und 4 Tage, angesiedelt. Für diese Untersuchungen werden Fibroblasten (L929) verwendet. Zwischen der KGr und der BGr wird zusätzlich ein Test mit menschlichen Osteosarkomazellen (MG-63) vorgenommen, die ebenfalls für 2 und 4 Tage angesiedelt werden.

Die Auswertung der Versuche erfolgt durch elektronenmikroskopische Aufnahmen. Aus der Struktur und Form der Zellen lassen sich Aussagen über den physischen Zustand der Zelle treffen (s. Abschn. 3.2.2 auf S. 18).

Die Abbildungen 4.18(a) bis (c) zeigen die gewachsenen Zellen auf der Oberfläche des Titanschaumes, sowohl für die KGr, die HGr als auch die BGr. Es ist deutlich das Zellspreading zu erkennen. Das Ausbreiten der Zelle auf der Implantatoberfläche deutet auf eine vitale Lebensumgebung hin. Im Vergleich zu den beiden unbeschichteten Gruppen ist in der BGr das Spreading geringer. Die Zellen bilden eher selten Flächen, die in alle Richtungen wachsen, sondern vielmehr kleine eindimensionale Streifen. Der Test mit menschlichen Osteosarkomazellen (s. Abb. 4.18(d) und (e)) zeigt kaum Unterschiede im Zellspreading zwischen den Gruppen. Auch in der BGr strecken sich die Zellen auf der gesamten Oberfläche aus. Eine Oberflächentoxizität, die zum Absterben der Zellen führen würde, kann deutlich ausgeschlossen werden.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

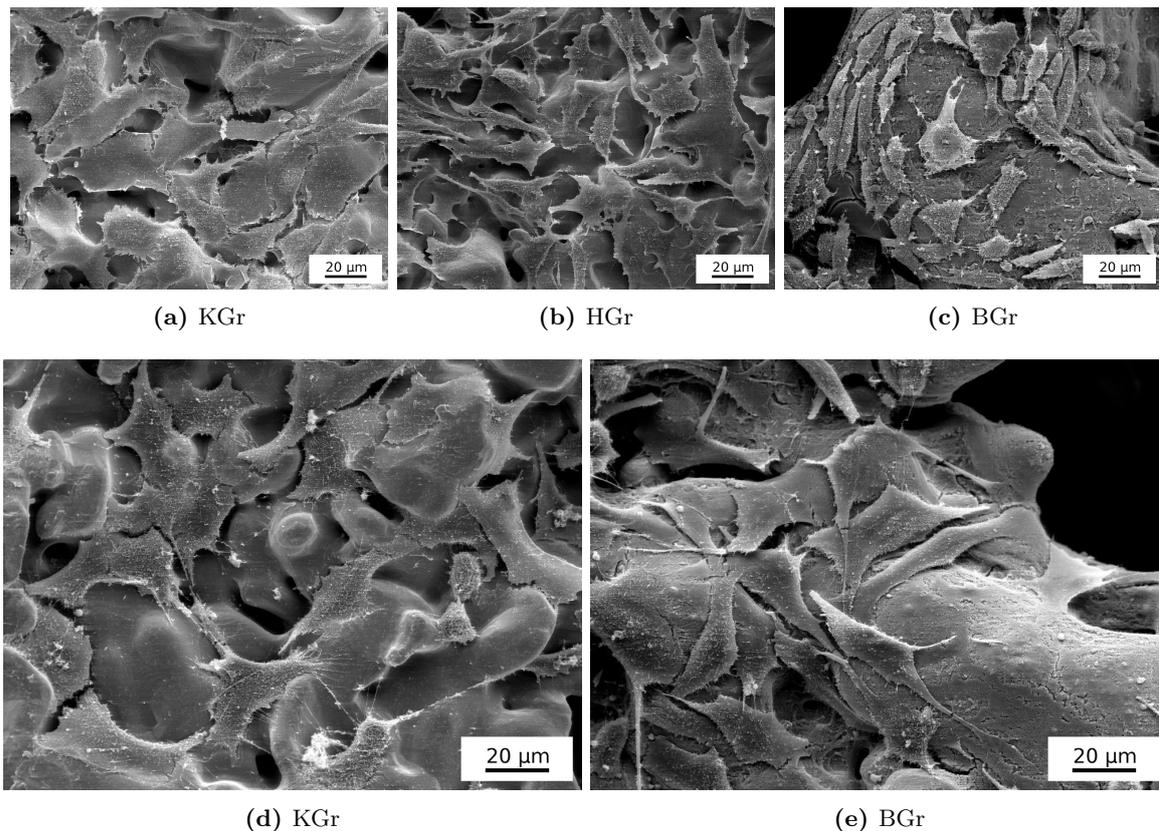


Abb. 4.18.: Die Abbildungen (a) bis (c) zeigen das Zellwachstum von L929 Zellen auf der Implantatoberfläche der KGr, HGr und BGr nach 2 Tagen. Die Abbildungen (d) und (e) zeigen das Zellwachstum von MG-63 Zellen auf der Implantatoberfläche der KGr und BGr nach 2 Tagen.

4.4.2. Theoretisches Modell zur histomorphometrischen Evaluation

In der statistischen Auswertung werden die Ergebnisse der *in vivo* Studie für die Aussagen des Knochen-Implantat-Kontaktes³ (**BIC**) und der Knochen-Fläche⁴ (**BA**) zusammengefasst. Für die Erhebung der Messdaten werden extra angelegte Skripte in der semiautomatischen Software AxioVision 4.8 (Zeiss, Deutschland) angewendet. Durch diese Skripte ist es unter anderem möglich, den Gesamtumfang eines Implantates automatisiert zu erfassen oder bestimmte Farbwerte einer Fläche zuzuordnen und anschließend zu vermessen.

In den histologischen Dünnschliffpräparaten wird bei einer Betrachtung im Durchlichtmikroskop durch das Metall des Implantates kein Licht transmittiert, das Implantat wird schwarz abgebildet und kann dadurch mit der Software automatisch erfasst werden. Daraus folgt auch, dass die Beschichtung nicht automatisch erfasst werden kann, da sie in ihrer Farbe der Knochensubstanz sehr ähnlich beziehungsweise identisch ist. Auch wenn die dünnen Schichten kein Knochen sind, werden sie per Definition der Knochenstruktur zugeordnet,

³engl.: bone-to-implant-contact, kurz BIC

⁴engl.: bone-area, kurz BA

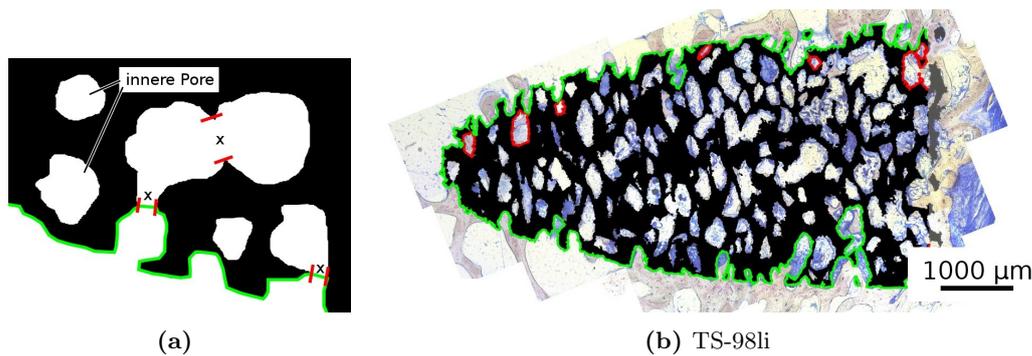


Abb. 4.19.: Die Abbildung (a) zeigt eine schematische Darstellung der Porenhalsdefinition und die Durchführung der BIC-Messung nach dem Outlinemodell. In der Abbildung (b) wird die Anwendung des Outlinemodells veranschaulicht (grüne Linie für BIC-Messung, rote Linie sind abgeschnittene Poren nach der Porenhalsdefinition).

um die semiautomatische Vermessung anwenden zu können. Dies wird einheitlich für alle Titanschaumimplantate und Messmethoden zur Erfassung der gesuchten Kenngrößen durchgeführt.

Im Folgenden wird die Standardmethode zur Erfassung des Knochen-Implantat-Kontaktes beschrieben. Diese Methode ist nicht direkt für die Vermessung von Implantatstrukturen mit einer interkonnektierenden Porosität geeignet. Daher wird im folgenden Unterpunkt „Zonenmodell - Neue Methode“ auf der Seite 44 eine neuentwickelte Methode zur Einteilung des Implantates in einen Mantel- und Kernbereich beschrieben. Diese Auswertung ermöglicht eine Aussage über die Eindringtiefe des Knochens in das Implantatgerüst.

In der Auswertung für alle drei Gruppen: Kontrollgruppe (**KGr**), hydrophile Gruppe (**HGr**) und beschichtete Gruppe (**BGr**) nach der Standardmethode zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der KGr und der HGr. Deshalb wird im nächsten Schritt, in dem das Zonenmodell Anwendung findet, nur die KGr mit der BGr verglichen. Dies betrifft sowohl die histologische als auch die histomorphometrische Evaluation. Bei vereinzelten Punkten der histologischen Auswertung werden jedoch Vergleiche mit der HGr eingebunden.

Outlinemodell - Standardmethode

Eine häufig verwendete Standardvariante zur statistischen Erfassung der Knochenapposition auf der Implantatoberfläche ist die software-gestützte Erfassung des Knochen-Implantat-Kontaktes [116–118]. Dazu wird auf digitalen Aufnahmen von histologischen Dünnschliffpräparaten eine gesamte Umfangslinie (Outline) um das Implantat gelegt. Ausgehend von dieser Umfangslinie werden im zweiten Schritt alle Bereiche von dieser Linie weggeschnitten, an denen kein Knochen das Implantat berührt. Das Verhältnis aus beiden Werten ergibt den BIC-Wert.

Diese Messmethode wird auch für die Titanschaumimplantate, unter Berücksichtigung von zusätzlichen Definitionen, durchgeführt. Dabei werden unter anderem die inneren abgeschlossene Poren nicht mitgemessen, da sie nicht direkt mit der Implantatoberfläche des histologischen Präparates verbunden sind. Des Weiteren wird ein Porenhals x definiert, der den

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

Übergang von einer Pore zur nächsten darstellt. Für alle Porenhälse $x < 30 \mu\text{m}$, werden die dahinterliegenden Poren von der Messung ausgeschlossen. Die schematische Abbildung 4.19(a) zeigt die Definition der Strecke x , innere abgeschlossene Poren sowie die grüne Outline, entlang der die BIC-Messung vorgenommen wird.

Das Ziel dieser Einschränkungen ist es, ein überschaubares Ergebnis der *in vivo* Studie in einem möglichst kleinen Zeitfenster zu erarbeiten. Aufgrund der so erfassten Übersicht wird die weiterführende zeitintensivere Auswertung festgelegt. Das Ergebnis dieser Outlinemessung wurde im Rahmen des Bioceramics Kongress 2011 in einer Posterpräsentation vorgestellt und in der Zeitschrift KEY ENGINEERING MATERIALS veröffentlicht [119].

Abgesehen von der fehlenden Information der Einwachtiefe des Knochens in die Implantatstruktur birgt diese Auswertung noch weitere Probleme in sich. Es werden keine abgeschlossenen Poren berücksichtigt, unabhängig davon, in welcher Distanz sie sich vom Implantatrand befinden. Des Weiteren kann die statistische Schwankung der Messtiefe der Outline ins Implantatinnere stark variieren, je nach zufälliger Verteilung der Poren. In Abbildung 4.19(b) ist die vermessene Outline, aus der später der BIC ermittelt wird, in die Aufnahme des histologischen Präparates grün eingezeichnet. Die roten Markierungen beschreiben die Poren, die durch die zuvor beschriebene Definition der Porenhälse aus der Auswertung herausgenommen werden.

Ein Versagen dieser Auswertung wird in Abschnitt 4.4.3 anhand der Abbildung 4.21(b) deutlich gemacht. Eine durch Segregation verursachte Veränderung der Porosität führt zu einer starken Abweichung der Outline im Vergleich zu allen anderen Implantaten.

Zonenmodell - Neue Methode

Das vorangegangene Modell zur Auswertung liefert keine Aussage über die Eindringtiefe des Knochens in das Implantat. Daher ist es ungeeignet, um Implantatstrukturen auszuwerten, in denen das Hineinwachsen des Knochens in diese Struktur dokumentiert werden soll. Ein neues Modell wird benötigt, welches das Implantat vom äußeren Rand bis zum inneren Kern in Zonen einteilt. Diese Zonen repräsentieren die jeweilige Eindringtiefe.

Erste Überlegungen beinhalteten Abstufungen von drei und mehr Zonen. Das bedeutet, je mehr Zonen eingeteilt werden, desto geringer wird die Abstufung zwischen den Werten der Zonen ausfallen. Da jedes Tier jedoch ein Individuum mit einem individuellen Stoffwechsel- und Knochenregenerationsprozess ist, kann dies zu großen statistischen Schwankungen in den Messwerten führen. Das hat zur Folge, dass kleinere Diskrepanzen nicht mehr signifikant wahrgenommen werden können. Aus diesem Grund wird die Einteilung auf zwei Zonen, den Kern und den Mantel, beschränkt.

Die Einteilung erfolgte nach einer Gleichverteilung der entstehenden Einzelvolumen in den Zonen, was bei einer Manteldicke von 0,5 mm der Fall ist.

$$V = \frac{1}{3}\pi h(r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2) \quad (4.4)$$

$$V_{\text{gesamt}} = 91,99 \text{ mm}^3 \quad (4.5)$$

$$V_{\text{Kern}} = 46,15 \text{ mm}^3 \quad (4.6)$$

$$\begin{aligned} V_{\text{Mantel}} &= V_{\text{gesamt}} - V_{\text{Kern}} \quad (4.7) \\ &= 45,84 \text{ mm}^3 \approx V_{\text{Kern}} \quad (4.8) \end{aligned}$$

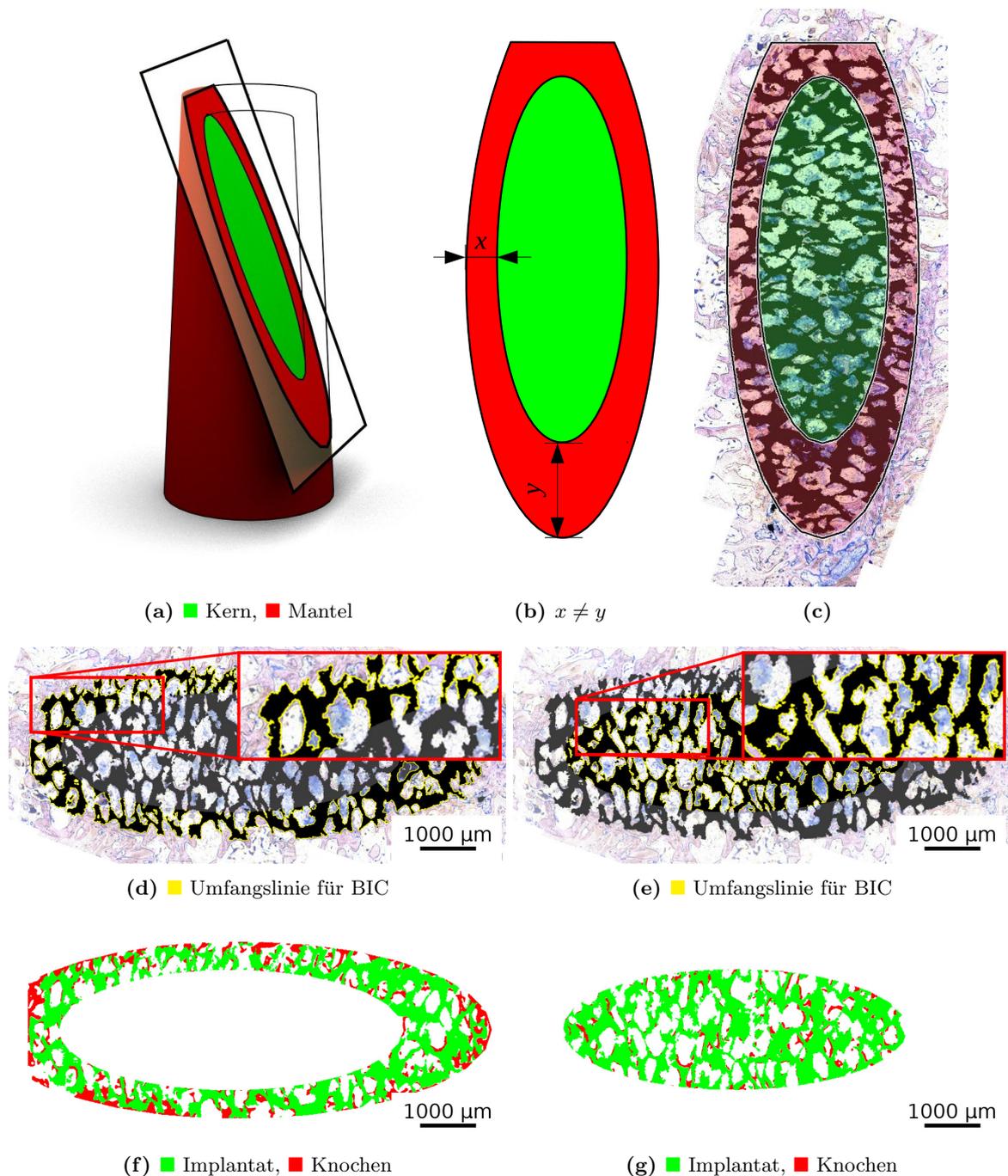


Abb. 4.20.: Die Abbildung (a) zeigt die Schnittebene des Dünnschliffes durch die histologische Aufarbeitung. In der Darstellung (b) sind die resultierenden Zonen auf der Schnittebene aus dem 3D-Modell eingezeichnet. Die Länge x ist ungleich y , was die Notwendigkeit der 3D-Rekonstruktion verdeutlicht. In der Abbildung (c) sind die berechneten Zonen in die lichtmikroskopische Aufnahme des histologischen Präparates eingezeichnet. Der zu messende Knochen-Implantat-Kontakt wird entlang der gelb eingezeichnete Linie bestimmt, jeweils für die Mantel- (d) und die Kernzone (e). Die zu messende Knochenfläche wird rot markiert, jeweils für die Mantel- (f) und Kernzone (g). Alle Abbildungen beziehen sich auf das Implantat TS-92li.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

In Abbildung 4.5 auf der Seite 28 wurde die technische Zeichnung des Implantates mit der Zoneinteilung dargestellt.

Da es unmöglich ist, bei der Präparation der histologischen Dünnschliffe das Implantat exakt entlang der Implantatsrotationsachse aufzuschleifen, werden die Zonen einer perspektivischen Verzerrung unterzogen. Dieses Problem ist in Abbildung 4.20(b) anhand von zwei Punkten (x und y) dargestellt.

Um die Zonen an die Verzerrung anzugleichen wird für jedes Implantat aus dem zuvor zugrunde gelegten Zonenmodell eine Bestimmung dieser Zonen vorgenommen. Dazu wird im ersten Schritt das Implantat auf dem histologischen Schliff vermessen. Durch diese Daten lässt sich der Schnittwinkel mit der Rotationsachse und die Position der Schnittfläche rekonstruieren und in einem dreidimensionalen Modell darstellen. Die Rekonstruktion der Schliefflächen erfolgt mit der Software Blender (Blender Foundation, Niederlande). In Abbildung 4.20(b) ist die Neuberechnung der Schlieffläche für das Implantat TS-91li dargestellt. Das Bild der Neuberechnung wird abschließend auf die histologische Aufnahme mit der Grafiksoftware Gimp (GNU Image Manipulation Program) übertragen. Das Ergebnis ist eine lichtmikroskopische Aufnahme mit den zuvor bestimmten Zonen, wie sie in Abbildung 4.20(c) für das Implantat TS-91li dargestellt sind.

Die Messung erfolgt an den zoneneingeteilten histologischen Aufnahmen. Wie in Abbildung 4.20(d) und (e) durch die gelbe Linie dargestellt, wird die Gesamumfangslinie (■), auch innere abgeschlossene Poren) der Implantatzone ermittelt. Von dieser Linie werden die Bereiche ohne Knochenkontakt entfernt.

Die Abbildungen 4.20(f) und (g) zeigen die markierten Bereiche mit Knochen (■) und mit Implantat (■), aus denen die Knochenfläche berechnet wird. Die Knochenfläche selbst stellt dabei das Verhältnis zwischen

$$\frac{\text{Fläche des Knochens}}{\text{Gesamtfläche der Zone} - \text{Fläche des Implantates}} = \text{BA} \quad (4.9)$$

dar.

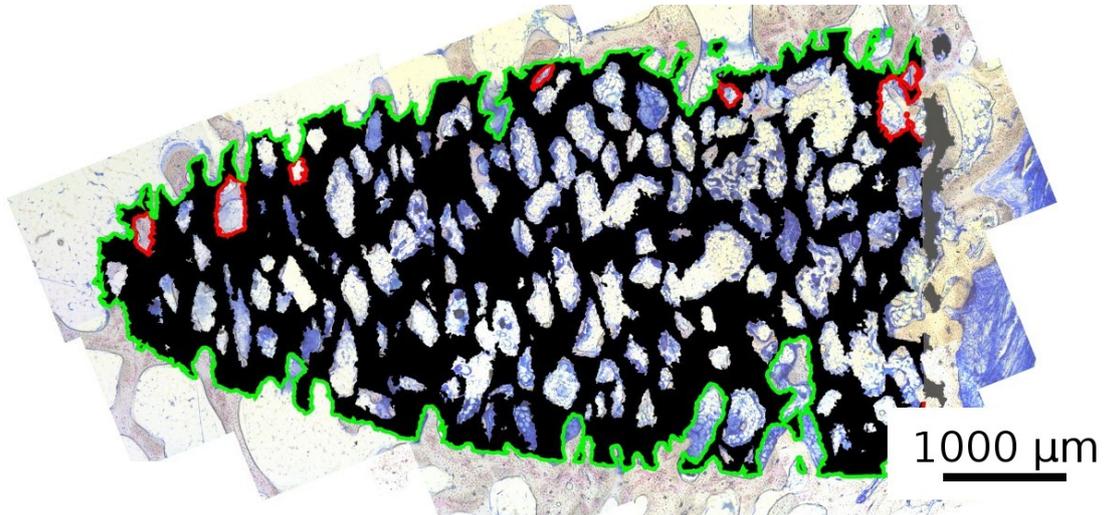
4.4.3. Histomorphometrische Auswertung

Die Abbildung 4.21(a) zeigt exemplarisch die grüne Linie, entlang der, nach dem Verfahren des Outlinemodells, der BIC ermittelt wird. Die rote Linie definiert dabei Poren, die durch die Porenhalsdefinition, die im vorangegangenen Abschnitt 4.4.2 erläutert wurde, nicht berücksichtigt werden.

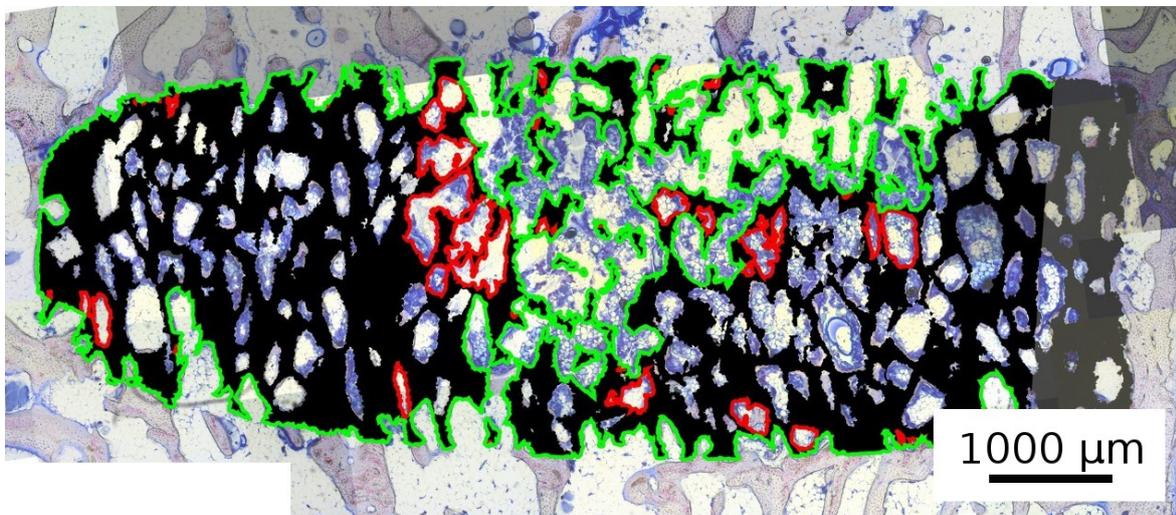
Das Diagramm in Abbildung 4.22 stellt die Ergebnisse der BIC-Messung mit dem modifizierten Outlinemodell dar. Das Diagramm ist in die zwei Standzeiten 4 und 12 Wochen unterteilt. Jeder Zeitpunkt zeigt je einen Messwert für die Kontrollgruppe (**KGr**, links), die hydrophile Gruppe (**HGr**, Mitte) und die beschichtete Gruppe (**BGr**, rechts). Die einzelnen Messwerte sind zusätzlich im Anhang in Tabelle A.1 aufgelistet. Das Implantat TS-105li aus der BGr nach einer Dauer von 12 Wochen wird aufgrund der durch Segregation (s. Abschn. 4.3.2) verursachten Abweichung nicht in die Statistik aufgenommen. Anhand der grünen Linie für die BIC-Messung wird in Abbildung 4.21(b) verdeutlicht, dass das Outlinemodell für dieses Implantat nicht anwendbar ist. Die Messlinie schwankt nicht nur in im äußeren Bereich um das Implantat, sondern durchzieht das Implantat vollständig. Dadurch bekommt der zu messende BIC einen überdurchschnittlich hohen Anteil an den Osseointegrationsverhältnissen

aus dem Inneren des Implantates und ist somit nicht mehr mit der restlichen Gruppe vergleichbar.

Die Diagramme in Abbildung 4.23(a) und (b) zeigen die Ergebnisse der histomorphometrischen Vermessung der histologischen Dünnschliffpräparate nach der Einteilung in die Mantel- und die Kernzone. Die Diagramme sind jeweils in die zwei Standzeiten 4 Wochen (links) und



(a) KGr 12W



(b) BGr 12W

Abb. 4.21.: Die Abbildungen zeigen BIC-Messungen nach dem Outlinemodell, die entlang der grünen Linie (■) vorgenommen wird. Die roten Linien (■) markieren Bereiche, die nach den Zusatzdefinitionen nicht mitgemessen werden. Die Abbildung (a) zeigt eine problemlose Anwendung des Outlinemodells. In (b) wird das histologische Präparat TS-105li gezeigt, in dem durch Segregation eine veränderte Porosität eingetreten ist und somit zu keiner Anwendbarkeit des Outlinemodells führt.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

12 Wochen (rechts) gegliedert. Die Zeiten sind wiederum in die Kontroll- (rot) und Beschichtungsgruppe (grün) unterteilt. Beide Gruppen haben eine weitere Unterteilung in die Mantel- und Kernzone (unterschiedliche Farbstärke). Diese Auswertung umfasst alle Implantate, auch das im Outlinemodell exkludierte Implantat TS-105li wird in dieser Statistik mit integriert.

Die im Text mit angegebenen p -Werte, welche die Signifikanz zwischen den Diskrepanzen symbolisieren, werden jeweils durch einen WELCH-Test ermittelt.

Die HGr ist nach dem Zonenmodell nicht Teil der Auswertung, da in der folgenden Evaluation nach dem Outlinemodell keine signifikante Diskrepanz zur KGr festzustellen ist. Es wird daher angenommen, dass nach einem Zeitraum von mehr als 4 Wochen kein Effekt einer hydrophilen Implantatoberfläche mehr zu beobachten ist. Daher werden die zeitaufwendigen Arbeitsschritte der Zoneneinteilung, BIC- und BA-Markierungen eingespart und die HGr aus der Zonenmodellauswertung ausgeschlossen.

Die BIC-Werte gleicher Gruppen sind zwischen dem Outline- und dem Zonenmodell nicht direkt vergleichbar. Unter dem Aspekt, dass der BIC mit zunehmender Eindringtiefe in das Implantat abnimmt, ist es möglich, dass der Outlinewert im Vergleich zum Mantelwert des Zonenmodells sowohl größer als auch kleiner werden kann. Die Messlinie des Outlinemodells kann in seiner Eindringtiefe je nach Porenanordnung stark schwanken und dabei sogar bis in den Kernbereich vordringen.

BIC nach dem Outlinemodell

Die Ergebnisse der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) Messung nach dem Outlinemodell sind in Diagramm 4.22 grafisch dargestellt.

Nach 4 Wochen kann anhand der Messung keine signifikante Diskrepanz zwischen der KGr und der HGr festgestellt werden (KGr: 36 %; HGr: 34 %; $p > 0,1$). Beide Gruppen weisen aber Unterschiede zur BGr auf (KGr: 36 %; BGr: 44 %; $p < 0,1$ und HGr: 34 %; BGr: 44 %; $p < 0,01$).

Ein ähnliches Resultat liefert die Messung für die Präparate nach 12 Wochen. Zwischen der KGr (37 %) und der HGr (37 %; $p > 0,1$) zeigt sich erneut keine signifikante Diskrepanz. Der Vergleich dieser beiden Gruppen mit der BGr zeigt hingegen wieder deutliche Unterschiede (KGr: 37 %; BGr: 51 %; $p < 0,01$ und HGr: 37 %; BGr: 51 %; $p < 0,05$).

Innerhalb einer Gruppe treten zwischen den Zeitpunkten von 4 und 12 Wochen, sowohl in der KGr (4W: 36 %; 12W: 37 %; $p > 0,1$) als auch in der HGr (4W: 34 %; 12W: 37 %; $p > 0,1$) und in der BGr (4W: 44 %; 12W: 51 %; $p > 0,1$), keine bedeutsamen Abweichungen auf.

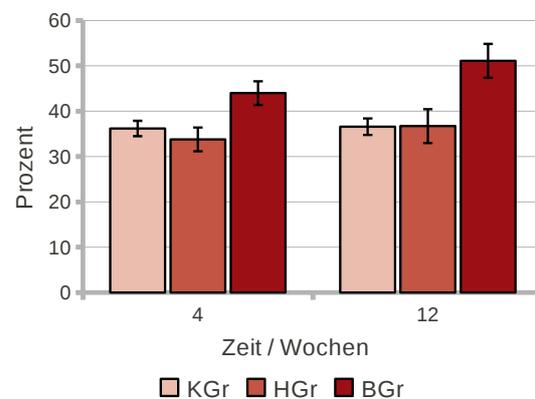
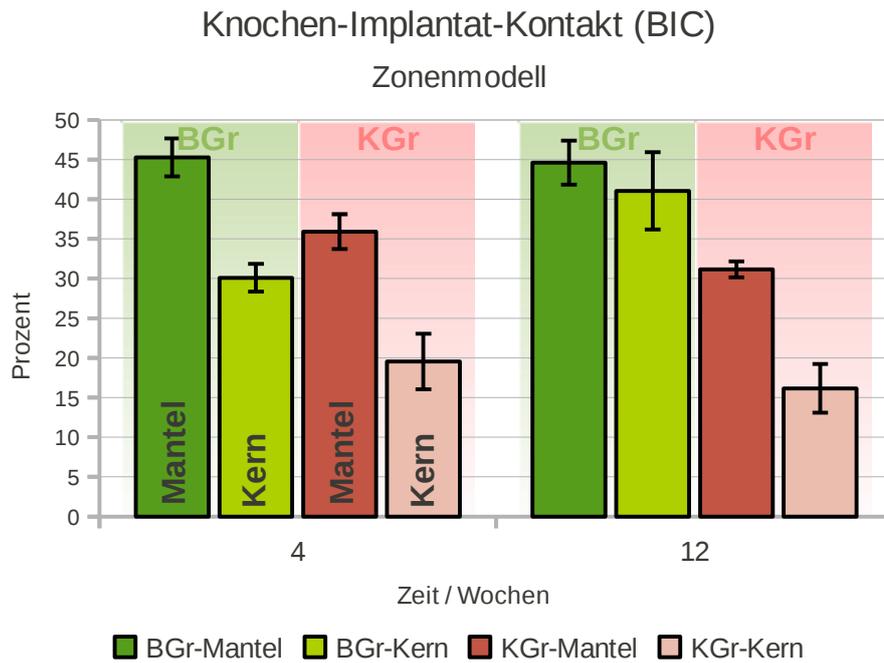
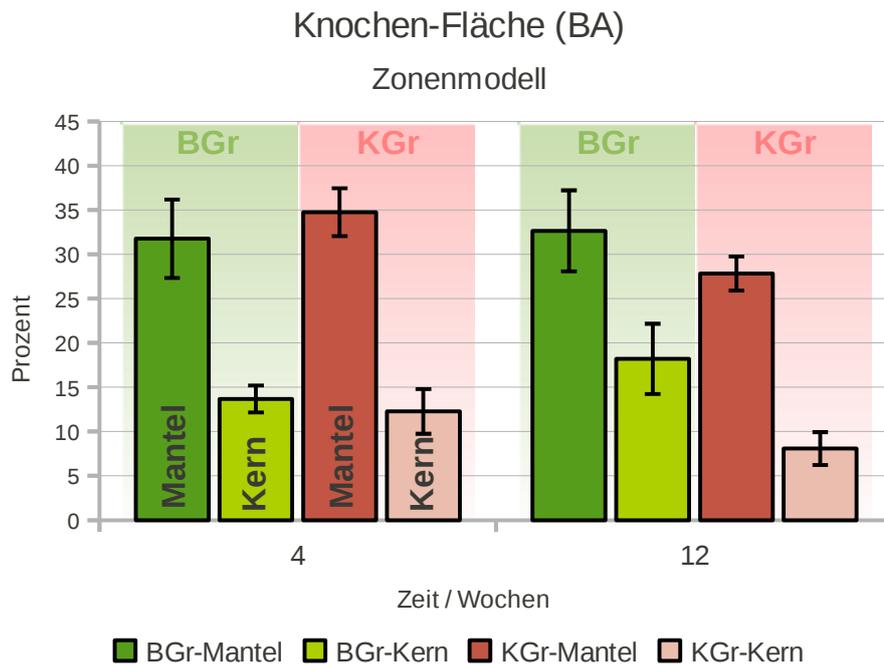


Abb. 4.22.: Ergebnisse der Knochen-Implantat-Kontakt-Messung (BIC) für die Kontrollgruppe (KGr), die hydrophile (HGr) und die beschichtete Gruppe (BGr) nach dem Outlinemodell.



(a)



(b)

Abb. 4.23.: Ergebnisse der Knochen-Implantat-Kontakt- (BIC) und Knochen-Fläche-Messung (BA) für die Kontroll- (KGr) und Beschichtungsgruppe (BGr) nach dem Zonenmodell.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

BIC nach dem Zonenmodell

Die Ergebnisse der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) Messung nach dem Zonenmodell sind in Diagramm 4.23(a) grafisch dargestellt.

Die statistische Erfassung der BIC-Werte in der KGr und BGr ergibt, dass alle Mantelzonenwerte größer als die dazugehörigen Werte der Kernzonen sind.

Das bedeutsamste Ergebnis der BIC-Messung liefern die Werte der BGr nach 12 Wochen. Die Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat im Kern des Implantates (41 %) erreicht fast den Wert der Mantelzone (45 %; $p > 0,1$). In der KGr weisen die Werte für Mantel (31 %) und Kern (16 %) eine signifikante Diskrepanz auf ($p < 0,01$).

Nach 4 Wochen zeigen sich bereits erste signifikante Unterschiede in den Gruppen, sowohl in der Mantel- (KGr: 36 %; BGr: 45 %; $p < 0,05$) als auch in der Kernzone (KGr: 20 %; BGr: 30 %; $p < 0,05$). Diese Differenz in den Gruppen verstärkt sich nach 12 Wochen ebenfalls in der Mantel- (KGr: 31 %; BGr: 45 %; $p < 0,01$) und in der Kernzone (KGr: 16 %; BGr: 41 %; $p < 0,01$).

Die Mantelzonenwerte in der BGr bleiben in der Zeit von 4 (45 %) zu 12 Wochen (45 %; $p > 0,1$) stabil. In der KGr hingegen ist ein leichtes Absinken des Mantelwertes von 4 (36 %) nach 12 Wochen (31 %; $p < 0,1$) zu beobachten. In den Kernzonen ist in der BGr sogar ein Anstieg zu verzeichnen (4W: 30 %; 12W: 41 %, $p < 0,1$), wohingegen der BIC-Wert in der Kernzone der KGr leicht absinkt, jedoch ohne signifikante Diskrepanz (4W: 20 %; 12W: 16 %; $p > 0,1$).

BA nach dem Zonenmodell

Die Ergebnisse der Messung der Knochenflächen (BA) nach dem Zonenmodell sind im Diagramm 4.23(b) grafisch dargestellt.

In beiden Gruppen sind alle Werte der Mantelzonen deutlich größer als die dazugehörenden Werte der Kernzonen. Die Diskrepanzen für alle Vergleiche zwischen Mantel- und Kernzone sind signifikant.

Zwischen der BGr und der KGr tritt nach 4 Wochen sowohl in der Mantelzone (KGr: 35 %; BGr: 32 %; $p > 0,1$) als auch in der Kernzone (KGr: 12 %; BGr: 14 %; $p > 0,1$) keine signifikante Diskrepanz auf. Auch nach 12 Wochen ist in der Mantelzone kein bedeutender Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen (KGr: 28 %; BGr: 33 %; $p > 0,1$). In der Kernzone zeigt sich gegenüber dem Wert der KGr (8 %; $p < 0,1$) ein leicht erhöhter Wert in der BGr (18 %).

Ähnlich dem leichten Absinken des BIC-Wertes im Mantel der KGr von 4 nach 12 Wochen zeichnet sich auch ein vergleichbares Verhalten im BA-Wert ab. Der Wert sinkt in diesem Zeitraum von 35 % auf 28 % ($p < 0,1$) ab.

4.4.4. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgt durch eine Beschreibung des Gewebes und der Zellen anhand von einzelnen, exemplarisch ausgewählten Dünnschliffpräparaten. Entdeckte Besonderheiten und Auffälligkeiten werden durch dazugehörige Abbildungen verdeutlicht. Dabei werden nur die Kontrollgruppe (**KGr**) und die Beschichtungsgruppe (**BGr**) miteinander verglichen, da nur diese beiden Gruppen ausführlich statistisch ausgewertet wurden. In verein-

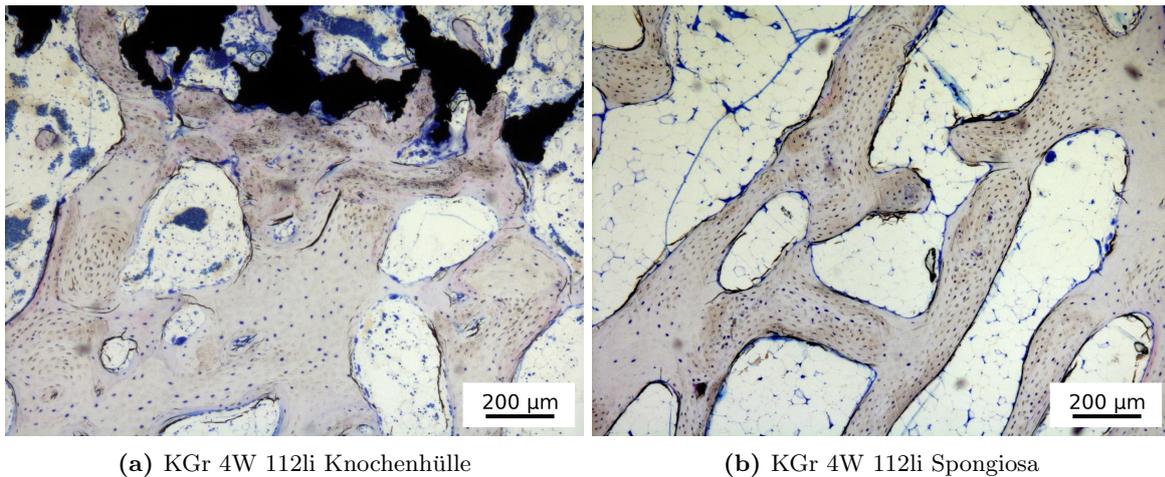


Abb. 4.24.: Vergleich zwischen dem neu gebildeten Implantat einhüllenden Knochenlager und der unbeschädigten Knochenspongiosa (auch distaler Femur) nach 4 Wochen.

zelten Beschreibungen von ungewöhnlichen Auffälligkeiten wird auch die hydrophile Gruppe (**HGr**) untersucht.

4 Wochen

Beide Gruppen, sowohl die KGr als auch die BGr, zeigen sehr kräftigen, neu gebildeten Knochen um das Implantat herum. Die Struktur dieses Knochenlagers ist kompakter (Abb. 4.24(a)) als die umliegenden Strukturen der Spongiosa (Abb. 4.24(b)), die nicht durch den operativen Eingriff beschädigt wurden.

Bei einer detaillierteren Vergrößerung werden jedoch Unterschiede in den Gruppen deutlich. Die beschichtete Gruppe hat eine ausgeprägte Kontaktosteogenese, bei der die Trabekel der Knochenhülle sehr intensiv mit der Implantatoberfläche verwachsen sind. Wie die Abbildung 4.25(a) zeigt, sind die Trabekel sehr gut an die Implantatstruktur angepasst und deuten bis auf vereinzelte kleine Lücken (▶) auf eine kompakte Verbindung zwischen Metall und Knochen hin.

Auch an weiteren Stellen sind aktive Osteoblastensäume und Osteoidbildung im Bereich der Implantatoberfläche zu finden. In einzelnen Bereichen kann bereits ausmineralisierter Knochen dokumentiert werden. Die Osteoklastentätigkeit wird als normal eingeschätzt.

In der KGr zeigen sich ähnliche Aktivitäten im Bereich der Osteogenese durch Osteoblastensäume und Osteoidbildung. Die Präparate weisen eine ebenso starke Ausbildung der Trabekel in der Knochenhülle auf, die in Richtung der Implantatoberfläche orientiert sind. Es ist eine deutliche Kontaktosteogenese feststellbar, die jedoch im Vergleich zur BGr insgesamt von minderer Qualität ist. Dies zeigt sich beim genaueren Betrachten der direkten Verbindungen zwischen Implantat und Knochenstruktur. Im direkten Vergleich zwischen der BGr und der KGr (s. Abb. 4.25(a) und (b)) hat die Knochenformation, die das Implantat einfasst, eine viel schwächer ausgeprägte Anpassung an die Unebenheiten der Implantatoberfläche. Die Präparate zeigen zwar viele Kontaktpunkte des Knochens mit hervorstehenden Kanten und Unebenheiten der Implantatstruktur, diese werden jedoch immer wieder durch Lücken (▶)

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

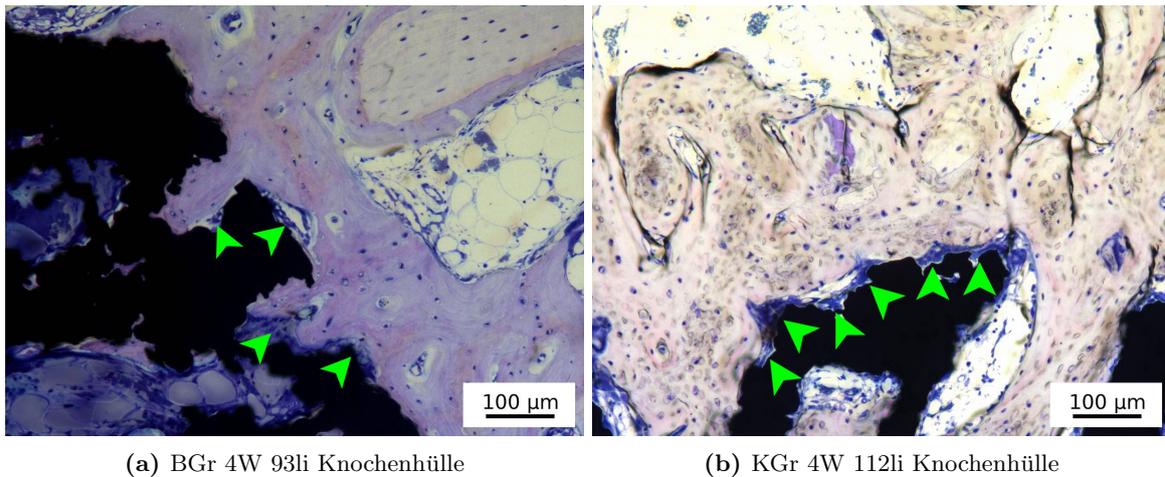


Abb. 4.25.: Vergleich des einhüllenden Knochenlagers zwischen der beschichteten Gruppe und der Kontrollgruppe nach 4 Wochen. Die Markierungen (▶) deuten auf Lücken in der Verbindung zwischen Knochen und Implantat.

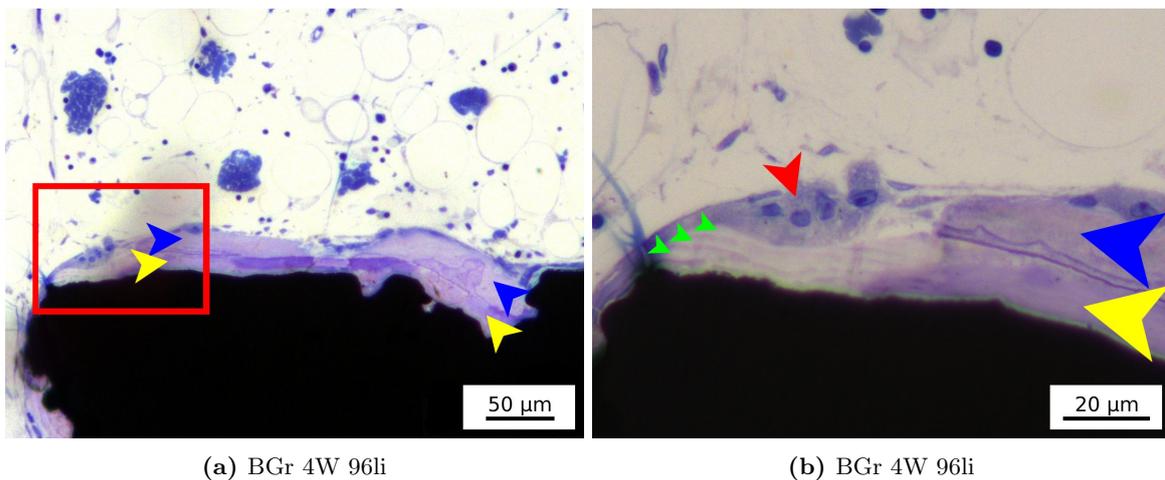


Abb. 4.26.: (a) Nach 4 Wochen hat sich teilweise neuer Knochen (▶) gebildet, der in dünnen Schichten auf der Beschichtung (▶) aufwächst. (b) Der vergrößerte Ausschnitt zeigt, dass die Beschichtung genauso wie der Knochen über Osteoklastentätigkeit abgebaut wird. Die 6 mal aufgetragenen Teilschichten (▶) der Gesamtbeschichtung (▶) werden von neugebildeten Knochen (▶) überlagert und anschließend von einem Osteoklast (▶) aufgelöst.

unterbrochen. Die Abbildung 4.25(b) zeigt, wie die Knochenfront an einzelne Kontaktpunkte des Implantatsteges auftrifft, sich jedoch nicht vollständig an die Struktur anpasst.

In einigen Abschnitten der BGr, in denen keine Trabekel aus der Knochenhülle Kontakt zum Implantat hergestellt haben, können stellenweise neu entstehende Knochen-schichten, die auf der Implantatoberfläche gebildet oder auf der Beschichtung aufgelagert sind, dokumentiert werden. Die Abbildung 4.26(a) zeigt den Rand des Implantates mit stellenweise noch

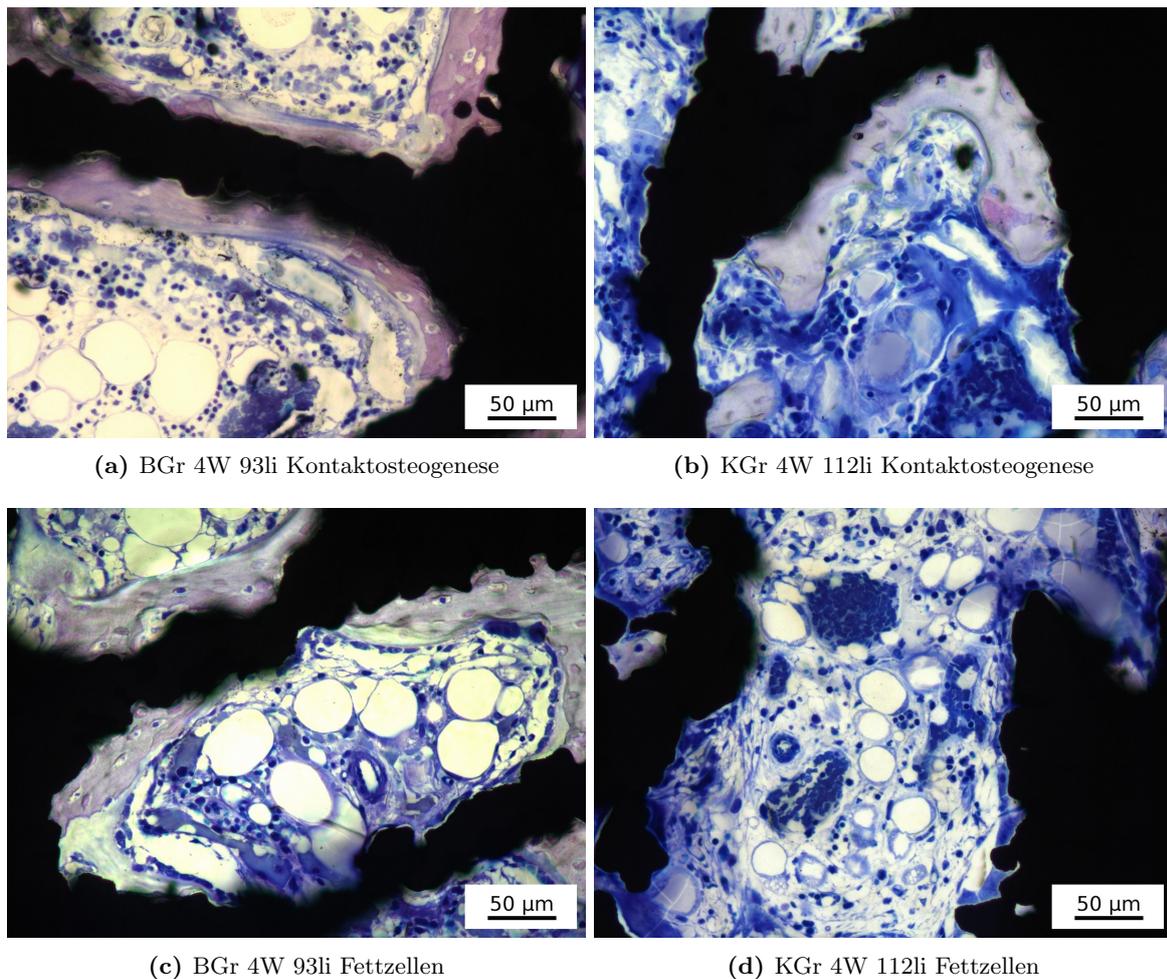


Abb. 4.27.: Gewebekonstruktion im Zentrum der Implantate nach 4 Wochen. In der BGr (a) bilden sich hauptsächlich dünne Knochenstrukturen auf der Porenoberfläche, wohingegen in der KGr (b) die Knochenkonstrukte etwas voluminöser ausfallen. Auffällig dominant verteilt im Weichgewebe sind die Fettzellen in der BGr (c). In der KGr (d) haben sie einen geringeren Anteil am Weichgewebe.

vorhandener Beschichtung (kräftige, lila Einfärbung), auf der neuer Knochen gebildet wird. Auf der Beschichtung hat sich eine dünne Knochenstruktur gebildet, die von der Implantatoberfläche aus wegwächst. In der vergrößerten Abbildung 4.26(b) ist zu erkennen, dass die Reste der Beschichtung (▶), auf der sich neuer Knochen (▶) aufgelagert hat, durch Osteoklastentätigkeit abgebaut wird. Der Osteoklast (▶) in der Abbildung hat sich auf der Oberfläche angesiedelt und beginnt die Schicht sowie den aufgelagerten Knochen abzubauen. In diesem demineralisierten Bereich lassen sich die Einzelschichten (▶) aus den sechs Beschichtungsdurchläufen (s. Abschn. 4.3.3) deutlich unterscheiden.

Für die KGr können keine vergleichbaren Stellen dokumentiert werden, in denen sich dünne Knochenstrukturen, wie in der Abbildung 4.26(a), auf der Oberfläche bildeten und von der

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

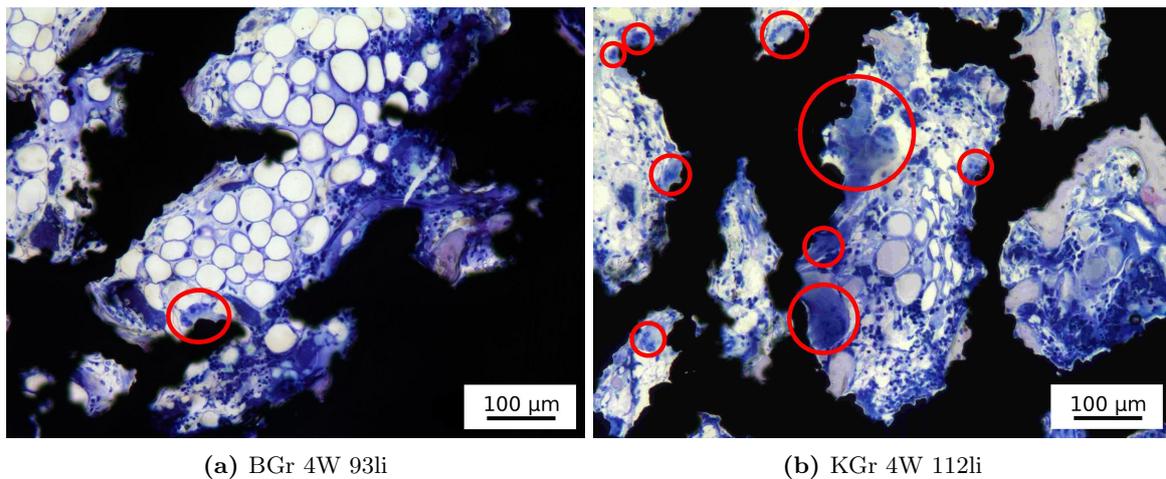


Abb. 4.28.: In den Abbildungen ist das Makrophagenaufkommen in der BGr (a) und der KGr (b) nach 4 Wochen markiert (○). Während in der BGr nur vereinzelt Auftreten von kleinen Makrophagen (ca. 5 Zellkerne) dokumentiert wurde, hatte die KGr ein sehr stark erhöhtes Verhalten sowohl im Aufkommen als auch im Volumen. Die größte Zelle in der Abbildung mit ca. 30 Zellkernen.

Implantatoberfläche aus weggewachsen sind.

Für beide Gruppen gibt es weiter im Zentrum des Implantates nur vereinzelte Knochenneubildungen, die durch gute Kontaktosteogenese gekennzeichnet sind. In der BGr waren diese Neubildungen dünne Schichten, die sich sehr intensiv an die Oberfläche schmiegen und teilweise eine Ausdehnung bis zu mehreren 100 µm erreichen können (s. Abb. 4.27(a)). Der Knochen in der KGr passen sich gut an die Oberfläche des Implantates an, sind aber tendenziell voluminöser und von geringerer Ausdehnung auf der Porenoberfläche (s. Abb. 4.27(b)).

Neben dem Knochen ist in den Poren der BGr vorwiegend das Fettmark dominierend. Vereinzelt gibt es auch Bindegewebe, Gefäße und rotes Knochenmark mit blutbildenden Zellen (s. Abb. 4.27(c)). In der KGr sind Fett- und Knochenmark sowie das blutbildende Gewebe schwächer ausgeprägt. Die Poren und die Hohlräume in dieser Gruppe sind vorwiegend mit Bindegewebe gefüllt (s. Abb. 4.27(d)).

Auf der Implantatoberfläche gibt es in der KGr eine ungewöhnlich hohe Anzahl von Makrophagen. Die Abbildung 4.28(b) zeigt anhand eines Ausschnittes die mit roten Kreisen markierten Phagozytose-betreibenden Riesenzellen, die aus fusionierten Makrophagen entstehen und teilweise mit mehr als zehn Zellkernen auf über 200 µm angewachsen sind. Die Makrophagen der BGr sind mit etwa 3 bis 5 Zellkerne nur bis zu 50 µm groß (s. Abb. 4.28(a)).

12 Wochen

Beide Gruppen zeigen auch nach 12 Wochen eine sehr kompakte Knochenhülle um das Implantat. Wie auch nach 4 Wochen, ist die Kontaktosteogenese in der BGr deutlich besser ausgeprägt. Die KGr weist wieder vorwiegend Knochenfronten auf, die an abstehenden Kanten und Stegen des Implantates Kontaktpunkte gebildet haben, aber nicht weiter in die raue Oberfläche des implantierten Fremdkörpers hineingewachsen sind. Es sind wieder viele

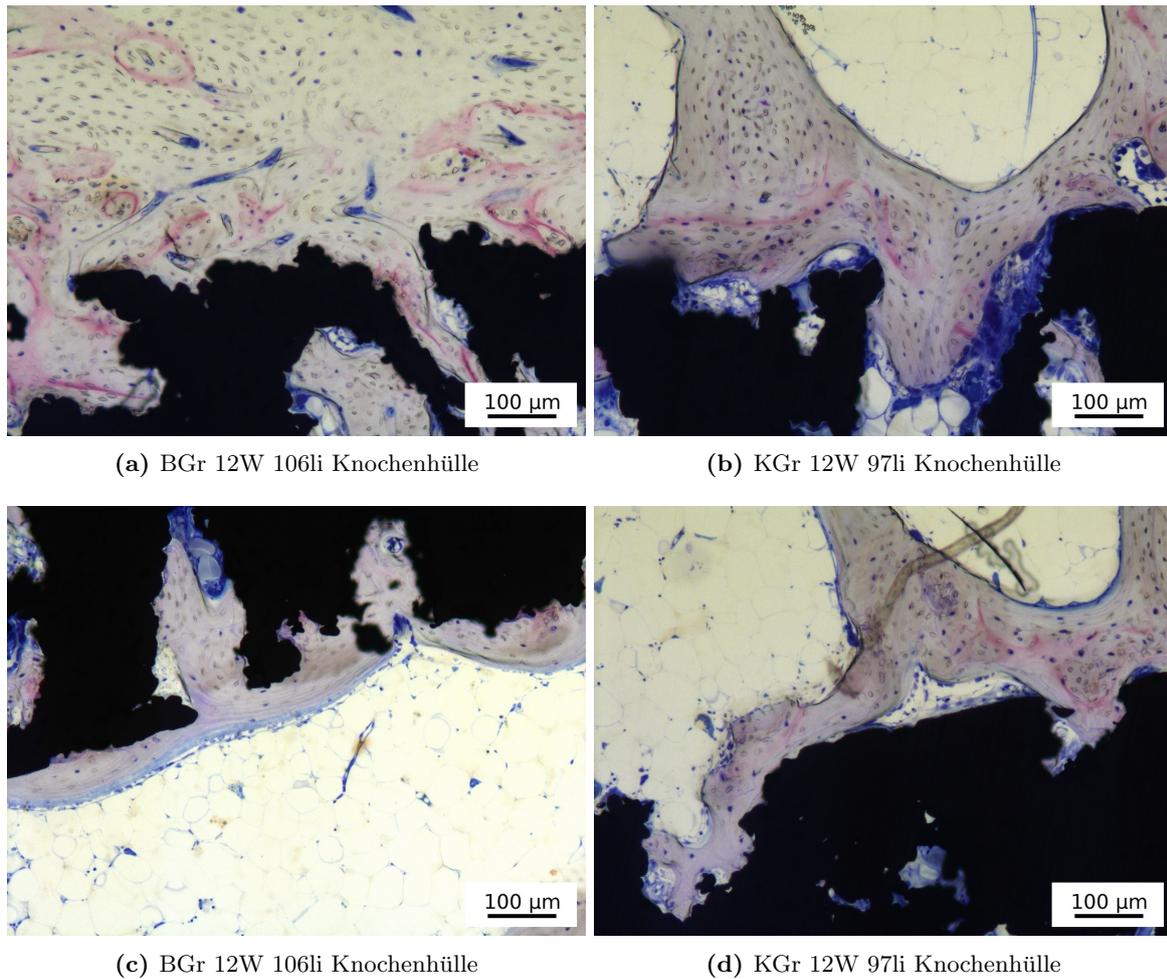


Abb. 4.29.: Vergleich des einhüllenden Knochenlagers zwischen der beschichteten Gruppe und der Kontrollgruppe nach 12 Wochen.

Lücken in der Kontaktfläche eines Trabekels zu dokumentieren (s. Abb. 4.29(b) u. (d)). Die BGr zeigt deutlich weniger Lücken in der Kontaktfläche einzelner Trabekel. Die Abbildung 4.29(a) zeigt den sehr kompakten Knochen der Knochenhülle, der sich nahezu lückenlos um die Implantatstruktur gelegt hat. In vereinzelt Abschnitten, in denen die Knochenhülle große Spalten aufweist, kann großflächiger neugebildeter Knochen, von der Implantatoberfläche wegwachsend, dokumentiert werden. Die Abbildung 4.29(c) stellt ein beschichtetes Implantat mit einem Spalt in der Knochenhülle von mehreren 100 µm dar. In diesem Bereich hat sich eine Knochenschicht auf der Implantatoberfläche gebildet. Der blauschimmernde Osteoblastensaum zeigt an, in welche Richtung der Knochen weiterwachsen würde. Knochenschichten, die von der Implantatoberfläche wegwachsen, können auch nach 12 Wochen nicht für die Kontrollgruppe beobachtet werden.

In den Poren im Inneren der Implantate der BGr zeigen die Präparate dünne Knochenschichten, die sich entlang der Porenoberfläche ausdehnen (s. Abb. 4.30(a)). Die Schichten

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

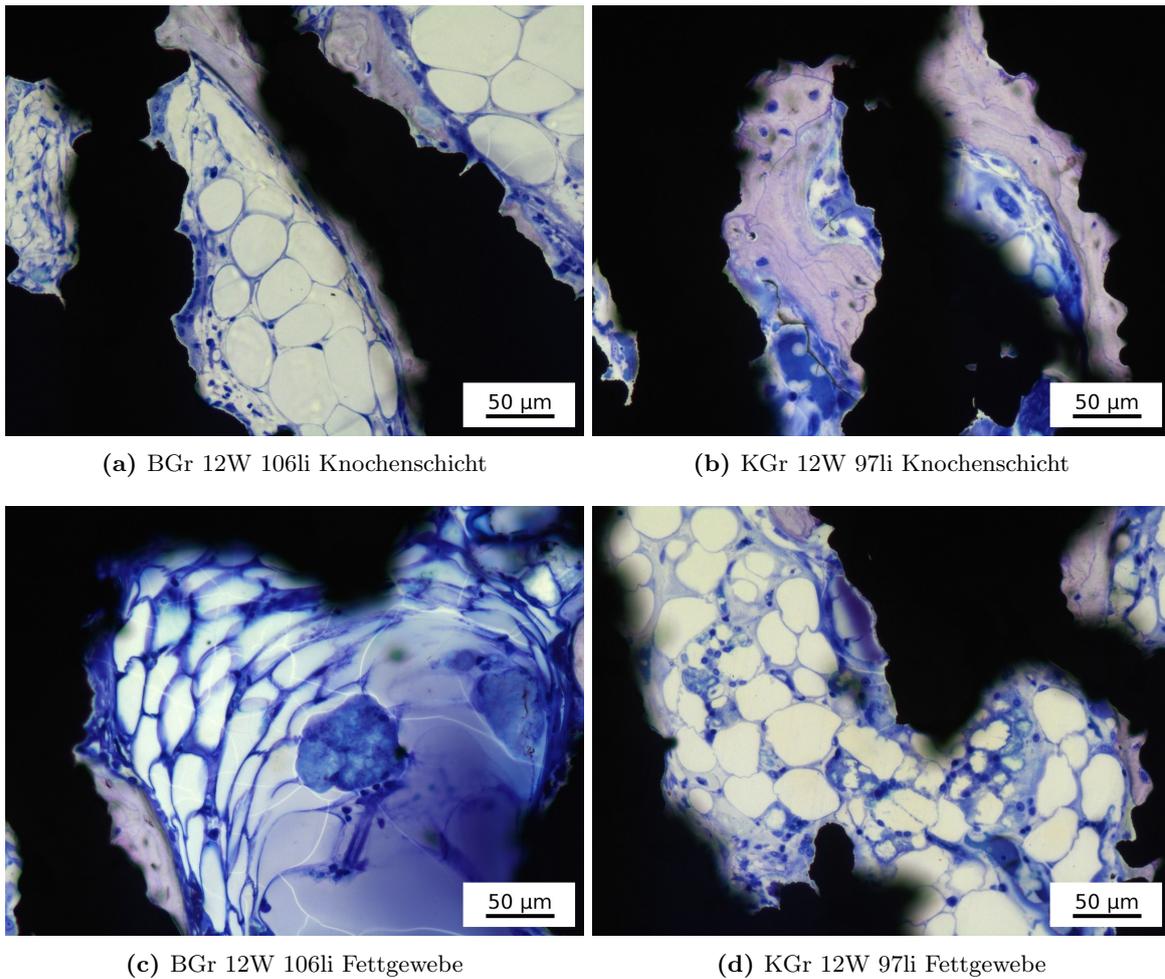


Abb. 4.30.: Gewebebildung im Zentrum der Implantate nach 12 Wochen. Wie nach 4 Wochen bilden sich in der BGr (a) hauptsächlich dünne Knochenschichten auf der Porenoberfläche, wohingegen in der KGr (b) die Knochenkonstrukte etwas voluminöser ausfallen. Auffällig dominant ist das Vorkommen von Fettzellen in der BGr (c). In der KGr (d) ist der Anteil an Fettgewebe nur leicht angestiegen gegenüber dem 4 Wochenzeitpunkt.

haben etwa eine Dicke von 10 bis 20 μm und können weite Bereiche der Porenoberfläche auskleiden. Voluminöse, runde Knochenflächen sind selten. In der KGr sind die Knochenstrukturen dicker. Sie zeigen auch eine sehr gute Kontaktosteogenese. Die Abbildung 4.30(b) stellt typische Knochenformationen mit einer Dicke von mehr als 50 μm dar. Beim Vergleich zwischen der BGr und der KGr zeigt sich, dass weniger Osteoblasten auf der Knochenoberfläche der Kontrolle angesiedelt sind.

In beiden Gruppen haben sich von 4 nach 12 Wochen deutlich mehr Fettzellen in den Poren des Implantatzentrums gebildet. In den Poren der BGr ist kaum noch rotes Knochenmark eingelagert. Es sind bedeutend mehr Adipozyten in den Poren lokalisiert. Das vorliegende Gewebe ist kein Fettmark mehr, sondern richtiges Fettgewebe oder sogenanntes Stapelfett.

Die Fettzellen wirken wie in die Hohlräume hineingequetscht, was sich dadurch bemerkbar macht, dass die Zellen weniger eine runde oder ovale Grundform haben, sondern vielmehr zusammengedrückte bananenähnliche Formen angenommen haben (s. Abb. 4.30(c)).

Die KGr zeigt keine so starke Verfettung. Trotzdem ist der Anstieg des Gehaltes an Adipozyten von 4 Wochen (s. Abb. 4.27(d)) nach 12 Wochen (s. Abb. 4.30(d)) deutlich wahrnehmbar. Insgesamt dominieren in den Poren lockeres Fettmark und Bindegewebe. Stellenweise sind auch Reste blutbildender Zellen vorhanden. Das nach 4 Wochen dokumentierte erhöhte Aufkommen von Riesenzellen hat sich wieder reduziert. Die Zellkernanzahl und Zellgröße sowie das gehäufte Auftreten hat sich im Vergleich zur BGr normalisiert.

4.5. Diskussion (TS)

Im Fokus dieses Abschnittes steht die Bewertung der Ergebnisse der *in vivo* Studie. Dabei werden Vergleiche und Zusammenhänge zwischen den einzelnen Gruppen: Kontrollgruppe (**KGr**), hydrophile Gruppe (**HGr**) und beschichtete Gruppe (**BGr**) hergestellt. Zum Beispiel werden die histologischen Befunde mit der histomorphometrischen Erfassung des Knochen-Implantat-Kontaktes (**BIC**) und der Knochen-Fläche (**BA**) verknüpft.

4.5.1. Fehlerdiskussion der histomorphometrischen Evaluation

Die Erfassung der BIC-Werte erfolgt mit der Software AxioVision. Mit deren Hilfe wird automatisch der Umfang der Implantate mit einem vektorisierten Spline nachgezeichnet. Dabei wird die schwarze Farbgebung der Implantate ausgenutzt, durch die sich die Implantate vom restlichen Gewebe abgrenzen. Liegt jedoch ein sehr geringer Farbkontrast oder sogar ein wechselnder Farbwert vor, kann keine automatische Konturbestimmung mittels der Software vorgenommen werden. Das bedeutet, dass Knochen, Beschichtungsreste oder Weichgewebe sich nicht automatisch markieren lassen. Dies führt genau dann zu einem Konflikt, wenn sich zwischen Implantat und Knochen noch Reste der Beschichtung befinden. Auf Grund des geringen Farbkontrastes zwischen Beschichtung und Knochen ist es mit der Software nicht möglich, diese Beschichtungsreste softwaregestützt zu isolieren und/oder dem Implantat zuzuordnen. Die Beschichtungsrückstände werden in der Regel von neu gebildetem Knochen überlagert (s. Abb. 4.26(a), 4.28(a) oder 4.29(c)). Die Zuordnung der Schichtreste zum zu messenden Knochen führt zu einer sehr geringen Verfälschung des Messwertes.

Nach dieser Definition zur histomorphometrischen Auswertung werden Beschichtungsrückstände mit als Knochenstruktur erfasst. Dies führt zu einem Fehler in der Messung. Bei der Beschichtung des Implantates TS-91li (BGr, 4 Wochen) ist es zu auffälligen Unregelmäßigkeiten gekommen. Dieses Problem zeigt sich erst in den Aufnahmen der histologischen Dünnschliffe. Dabei sind vereinzelte Poren sehr stark mit dem aufgetragenen Biomaterial ausgefüllt (s. Abb. 4.31(a)). Der Mittelwert und die Standardabweichung vom Mittelwert für die BIC-Messung der gesamten BGr im Mantelbereich liegt bei $(45, 28 \pm 2, 40)\%$. Würden alle verstopften Poren von TS-91li nicht als Knochen gewertet, dann würde der Wert auf $(44, 72 \pm 2, 12)\%$ absinken. Bei einer ausführlicheren Fehlerbetrachtung (der systematischen Fehler wird vernachlässigt) mit Einbeziehung eines 95 %iges Vertrauensniveaus, ergibt sich dann ein Wert von $(45 \pm 7)\%$ beziehungsweise ohne die Poren $(45 \pm 6)\%$. Für die Erfassung der Knochenfläche ist der Unterschied noch geringer, da sich der Mittelwert erst in der zweiten Nachkommastelle ändert.

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

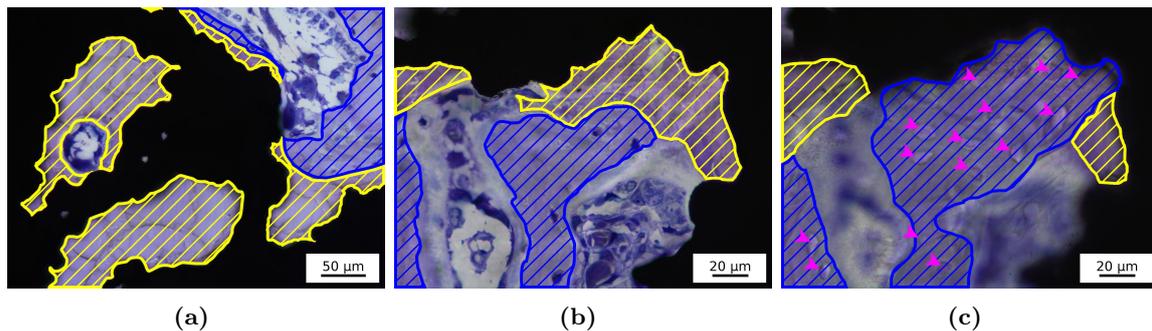


Abb. 4.31.: Beschichtung (///), Knochen (////), Osteozyt (▶)
(a) Poren am Implantatrand, die vollständig mit Biomaterial gefüllt sind.
(b)-(c) Beide Abbildungen zeigen die gleiche Position im Implantat TS-91li. Lediglich die Fokusebene wurde variiert, wodurch sich ein anderes Ausmaß des Knochens offenbarte. Die Knochenstruktur kann deutlich an den eingebauten Osteozyten identifiziert werden.

Aufgrund des sehr geringen Einflusses dieser verstopften Poren wird keine Sonderregel für das Implantat TS-91li eingeführt. Die Definition, dass Beschichtungsreste als Knochen gewertet werden, hat keinen signifikanten Einfluss auf das Endergebnis.

Eine weitere Unstimmigkeit ergibt sich aus der Fokusebene beim Mikroskopieren der histologischen Präparate. Das Problem wird durch die Abbildungen 4.31(b) und (c) verdeutlicht. Beide Aufnahmen zeigen dieselbe Position auf dem Implantat TS-91li bei variierender Fokusebene. So ist in der Ebene (b) nicht ersichtlich, dass der Knochen noch weiter reicht, so wie es in Bild (c) dargestellt wird. Der Knochen ist in der zweiten Darstellung scharf fokussiert und das restliche Weichgewebe ist unscharf. Der Knochen ist deutlich gekennzeichnet durch die kleinen Höhlen, in denen sich die Osteozyten eingemauert haben. Für die Auswertung sind nur Aufnahmen mit einem Fokus auf der Ebene mit dem Weichgewebe relevant. Eventuell weiterreichende Knochenstrukturen, die in den Aufnahmen nicht ersichtlich sind, werden nicht berücksichtigt.

4.5.2. Makrophagenaufkommen in der Kontrollgruppe

Die Aussage über ein erhöhtes Vorkommen großer Makrophagen auf der Implantatoberfläche der KGr nach 4 Wochen ist anschaulich in der Abbildung 4.32(a) bis (c) dargestellt. In den Abbildungen werden exemplarische Ausschnitte aus der KGr und der BGr gegenübergestellt. Zusätzlich wird auch die HGr in die Diskussion mit einbezogen.

Das erhöhte Vorkommen lässt eine Verunreinigung der Implantatoberfläche vermuten. Makrophagen sind phagozytosebetreibende Fresszellen, die zu mehrkernigen Riesenzellen fusionieren können. Sie sind Teil des Immunsystems und imstande, korpuskuläre Verunreinigungen in sich aufzunehmen und abzubauen [120]. Die beschichteten Implantate zeigen kein erhöhtes Aufkommen der Reinigungszellen. Ähnlich der Präparate der BGr zeigt auch die HGr kein erhöhtes Aufkommen.

Da das erhöhte Aufkommen der Riesenzellen sich nur auf die 4-Wochen-Präparate beschränkt, ist davon auszugehen, dass sich die Störung nach 12 Wochen reguliert hat. Des Weiteren ist durch die Beschränkung auf die KGr zu schlussfolgern, dass zwischen dem Auf-

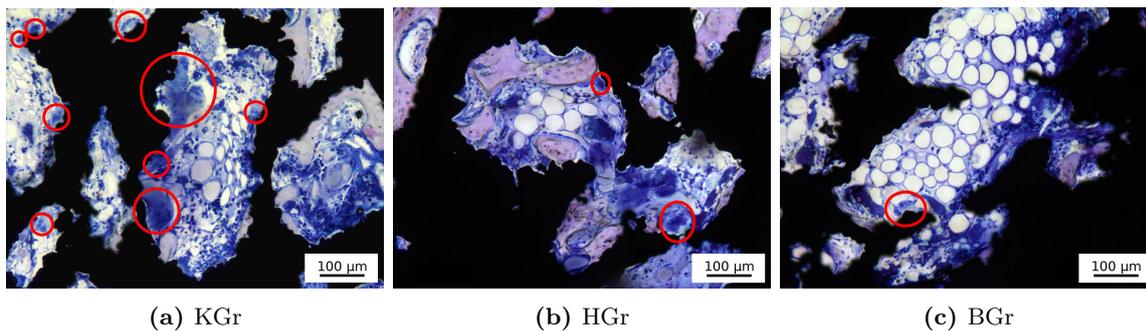


Abb. 4.32.: Ausschnitte aus allen drei Gruppen mit markierten (○) Makrophagen nach 4 Wochen. Die KGr hat eine deutlich erhöhte Anzahl an Makrophagen.

kommen dieser Zellen und der Plasmabehandlung in der HGr und BGr ein Zusammenhang besteht. Eine Plasmabehandlung zerstört Kohlenstoffverbindungen auf der Oberfläche [24]. Durch diesen Reinigungsprozess wird die Oberfläche auch hydrophil.

Da sich im Zelltest keine negativen Effekte durch die Verunreinigung zeigen und es auch im Tierexperiment zu keinen außergewöhnlichen Vorkommnissen, wie Entzündungen oder gar Abstoßung des Implantates, gekommen ist, ist davon auszugehen, dass die Verunreinigung keinen großen Einfluss auf den Organismus und der Osteogenese hat. Diese Aussage wird auch durch die BIC-Messung nach dem Outlinemodell gestützt, in der keine signifikanten Unterschiede zwischen der KGr und der HGr zu verzeichnen sind. Der Organismus ist in der Lage, selbstständig die kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen zu entfernen – ohne eine bemerkenswerte Einschränkung in der Osteogenese. Diese Aussage trifft nur auf den untersuchten Zeitpunkt nach 4 Wochen zu. Ob es in kleineren Zeitspannen einen Einfluss auf die Osteogenese gegeben hat, kann nicht geklärt werden.

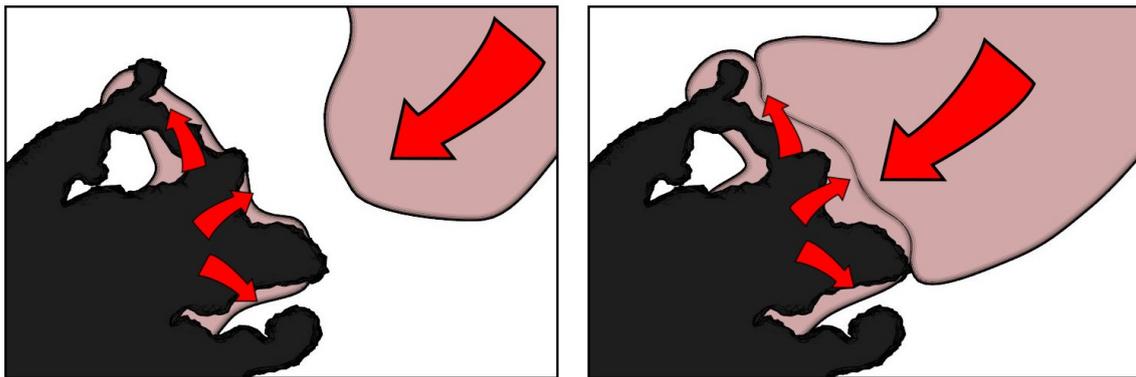
4.5.3. Einfluss der Schicht auf die Knochenbildung

Das Gesetz von WOLFF aus dem Jahre 1899 sagt aus, dass für die Entstehung von Knochen eine von außen wirkende Belastung zwingend erforderlich sein muss [104]. Unterschiedlich stark belastete Extremitäten zeigen somit auch Abweichungen in der Knochenstärke [121]. Das Gesetz wurde im Laufe der Jahre korrigiert und angepasst [106,107], so dass aus heutiger Sicht für die Knochenbildung eine nicht zu starke, dynamische Belastung notwendig ist.

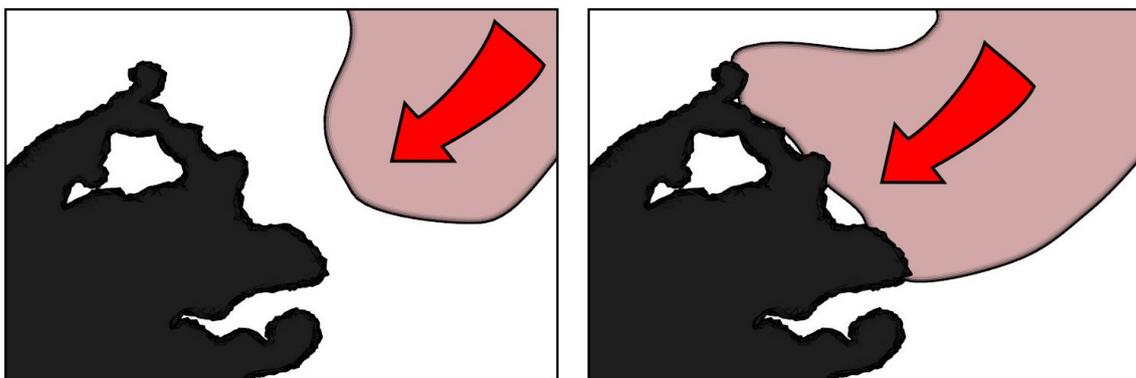
Bei massiven Implantaten wird die Belastung vom einhüllenden Knochenlager auf das Implantat übertragen und umgekehrt. Für eine Implantatstruktur mit interkonnektierenden Porensystem gilt dies auch, mit dem Unterschied, dass der Knochen in die Poren einwachsen kann. Dadurch wird der Verbund und die Kraftübertragung zwischen Implantat und Knochen verbessert. Das bedeutete, der Knochen im Implantatinneren braucht eine direkte Verbindung mit dem Knochenlager für eine Kraftübertragung. Weiterhin sollte theoretisch die Knochendichte, zum Zentrum des offenporigen Implantates hin, abnehmen, da die mechanische Belastung im Kernbereich gegen Null geht. Diese Annahme bestätigen auch die BIC und BA Messungen in der KGr, hohe Werte im Mantelbereich und niedrige im Kern (s. Abb. 4.23(a) und (b) auf S. 49).

Durch die Beschichtung wird die normale Regulierung der Knochendichte gestört. Die

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)



(a) mit Schichtwachstum von der Implantatoberfläche aus



(b) ohne Schichtwachstum von der Implantatoberfläche aus

Abb. 4.33.: (a) Schematische Darstellung der Kontaktosteogenese in der BGr. Es entsteht eine Knochenschicht auf der Implantatoberfläche, die den Trabekel des Knochenlagers entgegenwächst. (b) Schematische Darstellung der Kontaktosteogenese in der KGr und das Entstehen der kleinen Lücken im BIC.

äußere mechanische Einwirkung spielt keine entscheidende Rolle mehr. Die Beschichtung verursacht eine kontrollierte Osteoinduktion, auch wenn sie nicht notwendig ist. Diese Behauptung wird durch die BIC Messung der BGr nach 12 Wochen bestätigt. Der Kernbereich erreicht fast den Wert der Mantelzone. Die NanoBone[®]-Schicht wird kontrolliert umgebaut, da nur dünne Knochenschichten entstehen (im Vgl. dazu Knochenwucherungen z. B. durch BMP2-Injektionen [122]).

Die osteoinduktive Wirkung der Schicht zeigt sich auch am Implantatrand. Es entstehen Knochenschichten die von der Implantatoberfläche aus wegwachsen (s. Abb. 4.26(a) und 4.29(c)). Daraus lässt sich das Modell aus der Abbildung 4.33 ableiten. Knochen trabekel wachsen von an das Implantat heran. Die aus der Beschichtung gebildeten Knochenlagen wachsen vom Implantat weg. Beim Aufeinandertreffen dieser Knochenfronten fusionieren sie zu zusammenhängenden Strukturen, die das einhüllenden Knochenlager und somit die Osseointegration maßgeblich verbessern.

In der Kontrollgruppe können keine dünnen Knochenschichten, die von der Implantaoberfläche wegwachsen, dokumentiert werden. Die einzelnen Knochenformationen auf der Oberfläche der KGr haben hauptsächlich runde Querschnitte, was auf Trabekel mit einem Anschnitt durch die Transversalebene hindeutet. Es bleiben kleine Lücken und Spalten, in die der Knochen nicht vollständig hineingewachsen ist. Neben den histologischen Abbildungen 4.25(b) (auf S. 52) und 4.29(b) (auf S. 55), die die Lücken dokumentieren, zeigt auch der Vergleich der BIC-Werte zwischen der BGr und KGr im Mantel dieses Ergebnis. Die Beschichtung hat im Wesentlichen die kleinen Lücken geschlossen, was in höheren BIC resultiert. Die Knochenfläche ist hingegen im Mantelbereich in beiden Gruppen gleich groß. Es ist durch die Beschichtung nicht signifikant mehr Knochenvolumen gewachsen, aber der Knochen ist wesentlich besser auf der Oberfläche verwachsen.

4.5.4. Adipozyten im Kernbereich

Die histologische Auswertung zeigt sowohl für die KGr als auch für die BGr eine Zunahme von Fettzellen in den Poren vom Implantatkern. Besonders deutlich ist die Zunahme in der BGr, in der die Fettzellen die hämatopoetischen Weichgewebsstrukturen verdrängen (s. Abb. 4.30(c) auf S. 56). In den Poren bildet sich anfänglich rotes Fettmark mit vereinzelt Adipozyten, vielen Erythrozyten und Gefäßen. Mit der Zeit kommt es zu einer Rückbildung des blutbildenden Gewebes und die Anzahl der Fettzellen nimmt stark zu. Das gelbe Fettmark verdrängt das rote Mark. Wie anfangs erwähnt, ist diese Tendenz in beiden Gruppen dokumentierbar und wird anhand der Abbildungen 4.27(c)-(d) (auf S. 53) und 4.30(c)-(d) (auf S. 56) exemplarisch dargestellt. Die Einlagerung von Fettzellen in offenporösen Implantaten ist nicht ungewöhnlich und wurde bereits in den Arbeiten von BARRÈRE [102,103] dokumentiert. Dort zeigten sich ähnlich starke Fettzelleneinlagerungen in den Poren des Implantates. Es scheint, als habe das Implantatgerüst einen maßgeblichen Einfluss auf diesen Effekt ausübt. Es ist anzunehmen, dass die Metallstruktur eine ähnliche Bedeutung und Funktion übernimmt wie der spongiöse Knochen (s. Abb. 4.24(b) auf S. 51), in dem der Organismus gelbes Knochenmark einspeichert.

Die stark ausgeprägte Verfettung der Poren in der BGr wird zum einen Teil auf die Implantatstruktur zurückzuführen sein und zum anderen Teil ist sie ein Effekt der Kalzium-Phosphat-Beschichtung. Eine verstärkte Fettzellenbildung bei Kalziumphosphaten wurde bereits in früheren Studien dokumentiert [103,108,123]. Auch zeigte sich in früheren Studien mit NanoBone[®]-Granulat, dass es zu Knochenmarkbildung mit adipogenem Gewebe in den Poren der Granulatkörner kam [111,124]. Eine Beschichtung auf Grundlage der NanoBone[®]-Technologie hat demnach nicht nur Auswirkung auf die Knochenbildung, sondern auch auf die Entstehung von Fettgewebe.

Die unterschiedlichen Zellarten des Bindegewebes differenzieren sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC). Das Diagramm in Abbildung 4.34 zeigt die Differenzierung zu unterschiedlichen kolonieformenden Einheiten (CFU) und ausgereiften Zellen. Dabei entscheiden bestimmte Proteine, welche Ausbildung und Funktionen einzelne Zellen bekommen werden [125]. Welche Proteine und in welcher Weise durch das Biomaterial NanoBone[®] geschaltet werden, ist nicht vollständig geklärt. Die Bildung von Osteozyten, wie sie die histomorphometrische Evaluation in Abschnitt 4.4.3 gezeigt hat, konnte durch frühere Studien anhand von Knochenneubildungen im Bereich des Implantationsgebietes [109,126,127] mehrfach bestätigt werden. Ebenfalls ist eine Ausbildung von Knorpelgewebe durch Chondrozyten dokumentiert

4. Modellimplantat aus Titanschaum (TS)

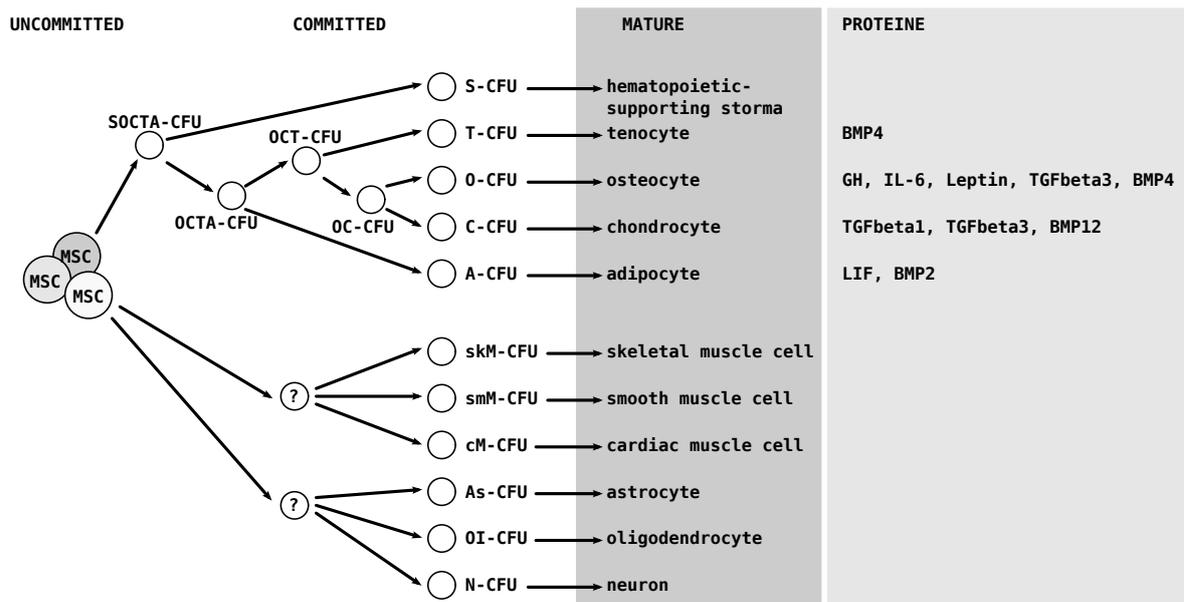


Abb. 4.34.: Differenzierung von Zellen aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) und welche Proteine diesen Vorgang auslösen (CFU - *colony forming unit*) [125].

worden [111]. Eine Erhöhung der Proliferation und Differenzierung von adipogenen Zellen, wie sie in früheren Studien beobachtet wurden [111, 124], konnte für das Biomaterial auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die im Zusammenhang mit NanoBone[®] dokumentierten Zelltypen (Adipo-, Chondro- und Osteozyten) stammen alle aus der gleichen OCTA-CFU. Das legt den Schluss nahe, dass das Biomaterial eine Ausdifferenzierung in diese Richtung stark unterstützt. Es gilt somit in weiteren Studien zu untersuchen, welche Proteine dafür sorgen, dass das NanoBone[®]-Biomaterial besonders eine Zellausbildung in den Zweig Adipo-, Osteo- und Chondrozyten auslöst.

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

Festkörper, die einer starken mechanischen Beanspruchung unterliegen, werden mit der Dauer der Beanspruchung zerstört. Dies zeigt sich zum Beispiel durch feine Risse oder Brüche im Material. Die Widerstandsfähigkeit gegenüber der mechanischen Einwirkung wird unter anderem durch die Größen Schub- oder Elastizitätsmodul beschrieben. Vergleicht man Metalle mit Polymeren auf ihre mechanischen Eigenschaften, dann scheinen die Kunststoffe als Implantationsmaterial überlegen zu sein, da sie dem Knochen wesentlich ähnlicher sind.

Polyethylethyketon (PEEK) ist eines dieser Polymere. Es wird schon seit Jahren in der medizinischen Chirurgie angewendet. Unter anderem wird es häufig als Abstandshalter, den sogenannten Cages, bei der Knochenfusionierung in der Wirbelsäule eingesetzt. Doch neben all den positiven Eigenschaften, wie Elastizitätsmodul, Röntgentransparenz oder Biokompatibilität, hat der Kunststoff einen schwerwiegenden Nachteil: die schlechte Zelladhäsion auf der Polymeroberfläche.

Die Untersuchungen in diesem Kapitel setzen genau da an, um diesen Nachteil zu beseitigen. Dabei soll die im vorangegangenen Teil dieser Arbeit beschriebene NanoBone[®]-Technologie so modifiziert und eingesetzt werden, dass eine Oberflächenbeschichtung entsteht, die das Problem der Zelladhäsion dauerhaft löst.

5.1. Polyaryl

PEEK ist ein Kunststoff, der in die Gruppe der Polyaryle eingeordnet wird. Polyaryl, wie sich aus dem Namen ableiten lässt, besteht es aus vielen Arylgruppen. Als Arylgruppe bezeichnet man die aromatischen Ringe aus sechs Kohlenstoffatomen in einer Ebene. Diese Ringe können durch unterschiedliche Moleküle miteinander verbunden werden (z. B. O, S, CO oder

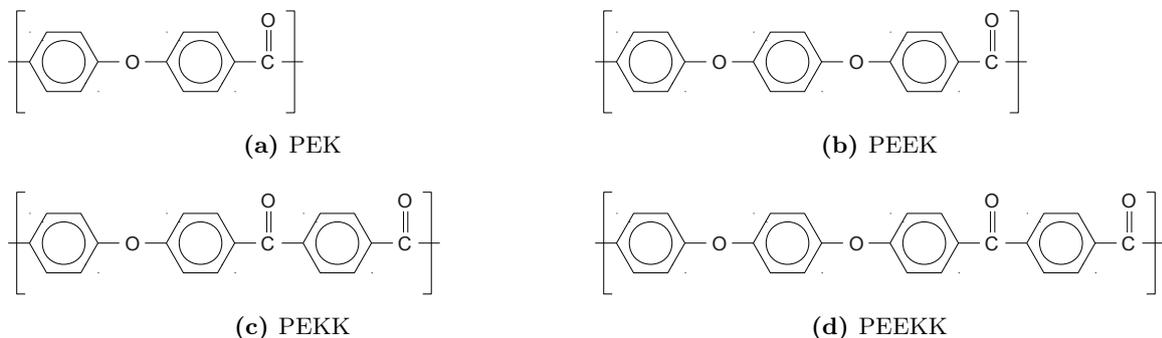


Abb. 5.1.: (a)-(d) Unterschiedlich synthetisierte Polyaryle.

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

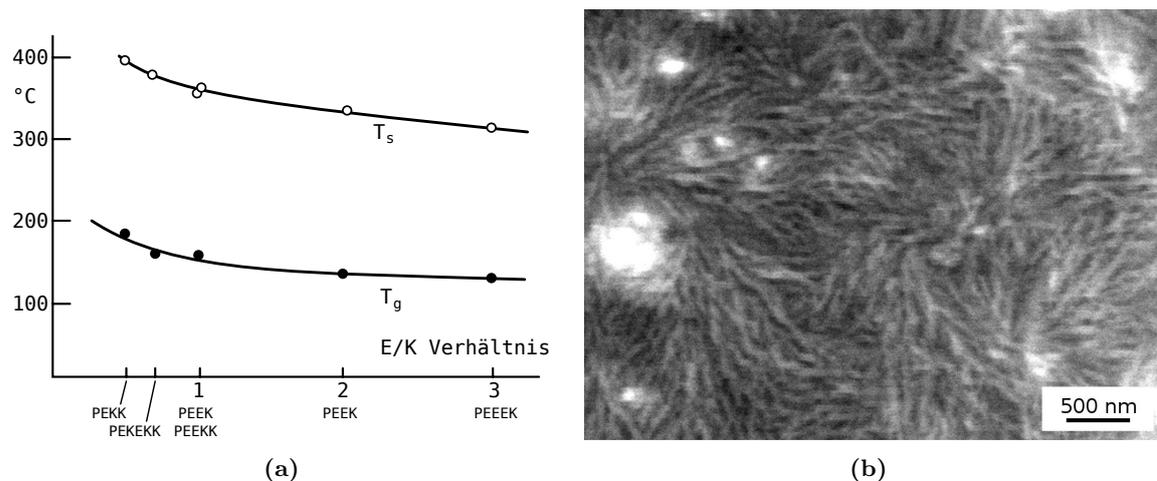


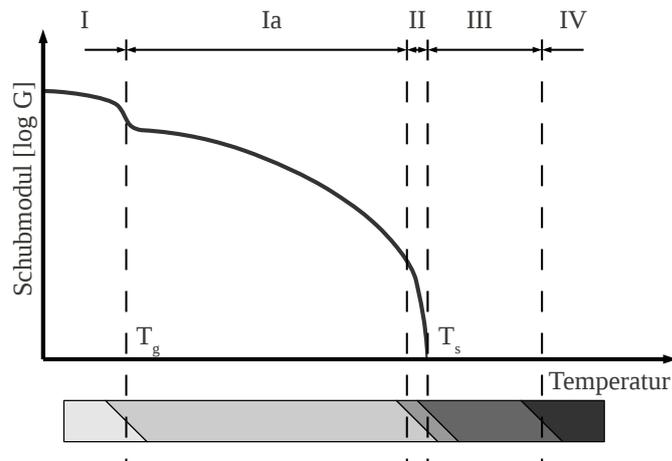
Abb. 5.2.: (a) Variation der Schmelz- und Glasübergangstemperatur mit dem Verhältnis zwischen Ether- und Ketogruppierungen [128].
(b) REM-Aufnahme mit der Struktur der Lamellenkristalle auf der Oberfläche von PEEK.

SO_2). Für die medizinische Anwendung sind dabei nur die Ether- (O) und Ketonverbindung (CO) von Interesse. Je nach Anzahl und Position des Ethers bzw. Ketons ergeben sich die Bezeichnungen für das jeweilige Polymer. Das A für Aryl wird dabei vereinfachend häufig weggelassen.

Durch eine unterschiedliche Kombination der Ether und Ketone zwischen den aromatischen Ringen lassen sich die mechanischen und thermischen Eigenschaften der Endpolymere beeinflussen [128]. In Abbildung 5.2(a) sind die Glasübergangs- und Schmelztemperaturen in Abhängigkeit des Ether-Keto-Verhältnisses dargestellt. Die Abbildungen 5.1(a) bis (d) zeigen einige Beispiele, unter anderem auch PEEK, die aus dem Copolymer PEK synthetisiert werden können [128].

5.2. Struktur und Eigenschaften von PEEK

Das Polymer PEEK wird der Rubrik der teilkristallinen Thermoplaste zugeordnet. Bei teilkristallinen Thermoplasten entstehen sogenannte Lamellenkristalle durch Faltung der Molekülketten, die sich mit amorphen Teilbereichen abwechseln [129]. Die Abbildung 5.2(b) zeigt die Lamellenstruktur auf der Oberfläche von PEEK. Die Kristallinität kann einen Maximalwert von 48% erreichen [128]. Je nach Temperatur liegt der Thermoplast im Glas-, Erweichungs-, Gummi-, Thermoplastizitäts- oder Zersetzungsgebiet vor. Unterhalb der Glasübergangstemperatur T_g verfügen die Polymerketten nicht über ausreichend thermische Energie, um aneinander entlang zu gleiten [130]. Das Material reagiert in diesem Bereich auf mechanischen Stress durch Streckung der kovalenten Bindungen [130]. Oberhalb von T_g werden die amorphen Bereiche zwischen den Polymerketten flexibler, da mit steigender Temperatur der Anteil von entspannten Dipolen im teilkristallinen PEEK zunimmt [130, 131]. Um eine Verbindung mit einer nanoporösen Struktur einer Oberfläche zu erzeugen, muss das Material bis in den Bereich des viskosen Fließverhaltens erhitzt werden. Dieser Bereich be-



Grauwert	Bereich	Eigenschaften	Verarbeitung
□	I Glas	spröde, amorphe Bereiche eingefroren	spanen
▒	Ia Erweichung	amorphe Bereiche thermoelastisch, kristalline Bereiche starr	spanen
■	II Gummi	Bereich aufschmelzender Kristallite, Kunststoff wird warmumformbar	Umformen z. B. Tiefziehen
■	III Thermoplastizität	viskoses Fließverhalten	Urformen, Schweißen
■	IV Zersetzung		
T_g	Glasübergangstemperatur		
T_s	Schmelztemperatur		

Abb. 5.3.: Einteilung von teilkristallinen Thermoplasten in unterschiedliche Temperaturbereiche (in Anlehnung an [128, 129]).

ginnt kurz vor der Kristallitschmelztemperatur T_s und reicht bis zu der Temperatur, an der der Kunststoff beginnt sich zu zersetzen. Im Diagramm der Abbildung 5.3 sind die Bereiche für teilkristalline Thermoplaste grafisch dargestellt.

Eine weitere Eigenschaft des Polymers PEEK ist, dass es nahezu verlustfrei von Röntgenstrahlung durchdrungen werden kann (s. Abb. 5.4(a)). Besonders bei größeren Implantaten bringt diese Röntgentransparenz Vorteile mit sich, da durch das Implantat keine Informationen verdeckt werden und die Positionierung vereinfacht wird.

Des Weiteren ist das Polymer biokompatibel [132, 133], hat eine starke Resistenz gegenüber Chemikalien und ist dafür bekannt, in den meisten Lösungsmitteln nicht löslich zu sein [134].

Besonders durch seine mechanischen Eigenschaften eignet sich PEEK als Implantatmaterial. Durch eine Verstärkung des Kunststoffes mit Kohlenstoff (CFR-PEEK) ist es möglich, das Material an den Elastizitätsmodul des Knochens anzugleichen (s. Abb. 4.4 auf S. 26).

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

Ebenso zeigen Untersuchungen zur Sterilisation und thermischen Alterungsprozessen nur vernachlässigbar geringe Abweichungen in der Belastbarkeit des Materials [135].

Somit lässt sich nur das eingangs erwähnte schlechte Zell-Polymer-Interface [4] als negative Eigenschaft nennen.

5.3. Verwendung von Kunststoffen in der Medizin

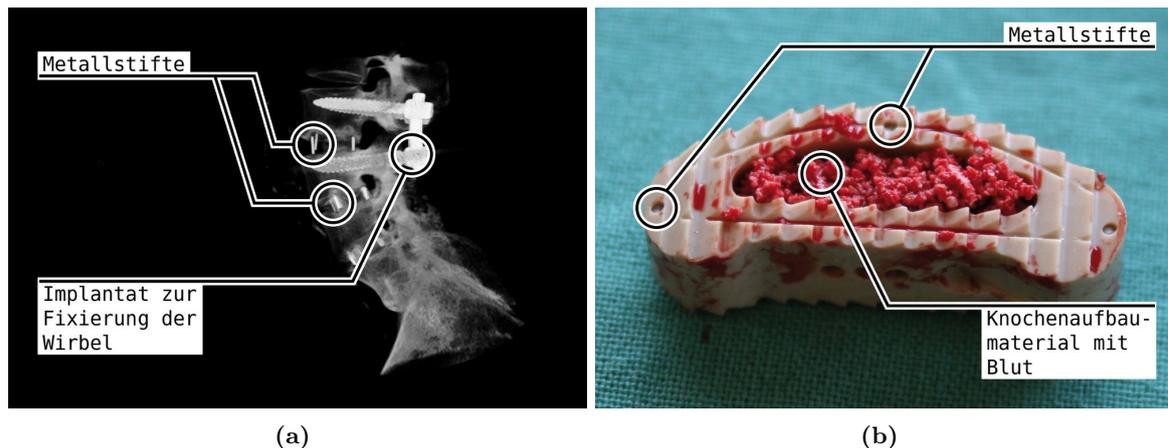


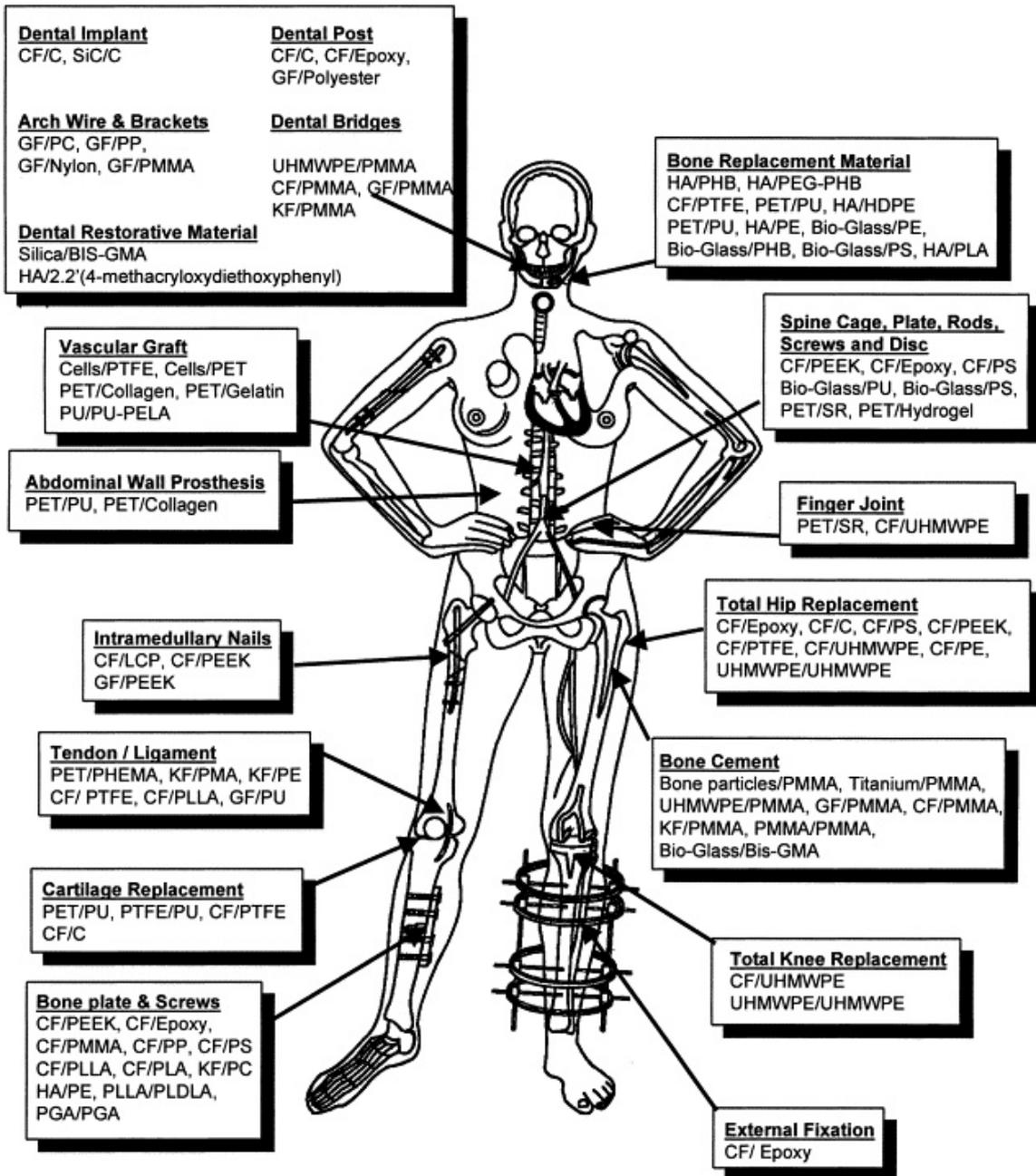
Abb. 5.4.: Die Abbildungen zeigen eine μ CT-Aufnahme von fusionierten Wirbeln (a) und ein Implantat (Cage) aus PEEK (b), das für die Fusionierung verwendet wird. Durch die Metallstifte kann das Implantat in der μ CT-Aufnahme lokalisiert werden. Der Hohlraum in dem Cage ist mit Knochenaufbaumaterial gefüllt, um den Prozess der Fusionierung zu beschleunigen [Quelle: Artoss GmbH].

Das Interesse an dem Kunststoff zum Einsatz als Implantatmaterial liegt etwa 30 Jahre zurück [137]. Die Kunststoffe, als Grundstoff für medizinische Geräte und Anwendungsmaterialien, haben schon lange Einzug gehalten in den medizinischen Alltag [136, 138]. Die Produktpalette reicht von Produkten ohne Patientenkontakt (z. B. Spritzen, Schläuche, Abdeckfolien) über Produkte mit temporären Patientenkontakt (z. B. Wundauflagen, Nahtmaterial und Katheter) bis hin zu dauerhaften Implantaten (z. B. künstliche Gelenke, dentale und orthopedische Implantate), wie sie in Abbildung 5.5 gezeigt werden.

Zu diesen Kunststoffen zählen auch die Copolymere Polyetheretherketon (PEEK) und Polyetherketonetherketon (PEKEKK), die insbesondere seit den 1980ern bevorzugt als Ausgangsmaterial für Cages verwendet werden [4].

Ein Cage ist ein Implantat aus dem Bereich der Wirbelfusionierung, welches heutzutage, als eine Anwendung von PEEK, sehr erfolgreich implantiert wird [80, 139] und sogar bessere Ergebnisse als ein Titancage erreicht [140]. Der Cage wird dabei als Abstandhalter zwischen zwei Wirbeln eingesetzt. Das Implantat kann nicht die Funktion einer degenerierten Bandscheibe ersetzen, weshalb die Wirbel versteift werden und zusammenwachsen. In Abbildung 5.4(a) ist eine Wirbelsäule mit implantierten PEEK-Cages dargestellt. Da der Kunststoff auf Röntgenaufnahmen nicht zu sehen ist, werden in das Implantat Metallstifte eingearbeitet, um die Position zu lokalisieren. In Abbildung 5.4(b) ist ein Cage kurz vor der Implantation

5.3. Verwendung von Kunststoffen in der Medizin



CF: carbon fibers, C: carbon, GF: glass fibers, KF: kevlar fibers, PMMA: Polymethylmethacrylate, PS: polysulfone, PP: Polypropylene, UHMWPE: ultra-high-molecular weight polyethylene, PLDLA: poly(L-DL-lactide), PLLA: poly (L-lactic acid), PGA: polglycolic acid, PC: polycarbonate, PEEK: polyetheretherketone; HA: hydroxyapatite, PMA: polymethylacrylate, BIS-GMA: bis-phenol A glycidyl methacrylate, PU: polyurethane, PTFE: polytetrafluoroethylene, PET: polyethyleneterephthalate, PEA: polyethylacrylate, SR: silicone rubber, PELA: Block co-polymer of lactic acid and polyethylene glycol, LCP: liquid crystalline polymer, PHB: polyhydroxybutyrate, PEG: polyethyleneglycol, PHEMA: poly(20hydroxyethyl methacrylate)

Abb. 5.5.: Medizinische Anwendungsbereiche von Kunststoffen [136].

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

dargestellt, der mit einem blutvermischem Knochenaufbaumaterial im Zentrum gefüllt ist. Das Knochenaufbaumaterial wird im Laufe der Einheilung durch neuen Knochen ersetzt, der die beiden anliegenden Wirbel dann miteinander fusioniert.

5.4. Stand der Forschung

PEEK hat ein schlechtes Knochen-Implantat-Interface. In der Literatur gibt es wenig Untersuchungen, die diese Behauptung dokumentieren. *In vitro* Untersuchungen zeigen sogar ähnlich gute Werte zwischen der Zelladhäsion von Osteoblasten auf Titan- und PEEK-Oberflächen [141]. Auf der anderen Seite gibt es aber eine Vielzahl von Studien, die das Knochen-Implantat-Interface zu verbessern versuchen, was die Behauptung eher bestätigt. Eine weitere Bestätigung liefert die Auswertung, zu der in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Studie. Sie wird zeigen, dass eine unbehandelte PEEK-Oberfläche ein wesentlich schlechteres Gewebe-Implantat-Interface hat, gegenüber einer behandelten Oberfläche. In den Studien, die versuchen, das Interface zwischen organischem Gewebe und Polymerimplantat zu verbessern, gibt es unterschiedliche Ansätze. Eine Variante ist dabei das Herstellen von Gemischen aus PEEK- und Hydroxylapatit-Pulvern die dann drucklos [142, 143] oder unter hohen Drücken [144] versintert werden. Des Weiteren lassen sich diese Pulvergemische auch als Ausgangsmaterialien für die 3D-Drucktechnik verwenden [145]. Eine einfache Beschichtung mit Hydroxylapatit hat sich bereits in *in vitro* Studien als Verbesserung der Zelladhäsion gezeigt [146]. Ebenso gibt es Varianten, die die guten Zelleigenschaften vom Titandioxid auf das Polymer übertragen, in dem die Kunststoffimplantate mit einer dünnen Titanschicht im Plasma-Sprüh-Verfahren überzogen werden [147–149]. Die Plasmabeschichtung lässt sich auch für Hydroxylapatitbeschichtungen verwenden [150, 151]. Auch eine einfache Plasmabehandlung bei geringen Temperaturen wirkt sich positiv auf die Biokompatibilität aus [26].

Diese Arbeit wird eine Pulverbeschichtung mit dem osteoinduktiven Knochenaufbaumaterial NanoBone[®] untersuchen. Diese Beschichtung ist ebenfalls darauf ausgerichtet, das Knochen-Implantat-Interface zu verbessern.

5.5. Entwicklung des Modellimplantates (PEEK)

5.5.1. Vorüberlegungen zur Beschichtung

Der in dieser Arbeit selbst entwickelte Lösungsansatz zur Verbesserung des Zell-Implantat-Kontaktes sieht eine Beschichtung auf Basis der NanoBone[®]-Technologie vor. Dabei soll zum einen der osseinduktive Effekt des Beschichtungsmaterials ausgenutzt werden. Zum anderen soll auch eine Implantatoberflächenmodifikation erreicht werden, die das Problem der schlechten Zelladhäsion dauerhaft löst. Als Hauptziel wird eine Beschichtungsmöglichkeit von Cages, wie sie für Wirbelfusionen eingesetzt werden, gesucht.

Da das Biomaterial selbst, je nach Menge und Partikelgröße, innerhalb von Wochen/Monaten vollständig resorbiert wird, kann eine einfache Beschichtung der Polymeroberfläche keinen Erfolg versprechen und das Problem der Zelladhäsion nicht lösen. Die aufgetragene Schicht würde ebenfalls resorbiert werden, was letztendlich wieder zu einer unvorteilhaften PEEK-Gewebe-Kontaktfläche führt.

Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben, ist das Biomaterial durch die Trocknung ein Xerogel geworden und weist kaum noch fraktale Strukturen auf. Dadurch hat es eine nanoporöse Oberfläche. Sollte es beim Aufbringen der Biomaterialschicht möglich sein, dass das Polymer diese nanoporöse Struktur adaptiert und durchdringt, kann eine so feinstrukturierte Implantatoberfläche geschaffen werden, die das Eindringen von Zellen und Organik nicht mehr ermöglicht. Dadurch wäre auch der Abbau des Biomaterials nicht mehr gegeben und ein PEEK-Gewebe-Kontakt tritt nicht mehr auf.

Zusätzlich wird der osteoinduktive Effekt des Materials in dem Bereich ausgenutzt, in dem das Biomaterial normal arbeitet. Ebenso wird nicht nur eine nanoporöse Struktur auf der Oberfläche erzeugt, sondern auch eine mikroskopische dreidimensionale Rauheit durch das Biomaterial, welche eine verbesserte Implantat-Gewebe-Verbindung liefern würde.

Diese Arbeit wird in diesem Kapitel untersuchen, ob das geschmolzene Polymer die Struktur des Biomaterials annimmt. Des Weiteren gilt es die Osteogenese dieser neuen Compositverbindung zu charakterisieren.

5.5.2. Erarbeitung der Pulverbeschichtung

Als Ausgangsmaterial für alle Untersuchungen wird ein Polyetheretherketon in Granulatform (VESTAKEEP[®]i2G, Evonik Degussa GmbH, Deutschland) verwendet. Das Granulat ist für die Anwendung von präklinischen, medizinischen Applikationen zugelassen. Das Material wird vom Hersteller standardmäßig einem Zytotoxizitätstest nach ISO 10993-5 unterzogen und erfüllt auch alle Anforderungen der amerikanischen Norm ASTM F2026¹. Es ist ein festes geruchloses Material mit einer Dichte von 1,3 bis 1,5 g/cm³ und einer Schmelztemperatur von 343 °C. Ab einer Temperatur von 450 °C beginnt der Bereich der thermischen Zersetzung, die giftige Gase wie Kohlenstoffdioxid oder -monoxid freisetzen kann [152]. Die Wärmeleitfähigkeit des Polymers² liegt bei 0,25 Wm⁻¹K⁻¹ [128].

Das Granulat wird in 60 min bei 360 °C und einem geringen Unterdruck von 0,5 Pa zu einem massiven Polymerblock geschmolzen. Der Unterdruck sorgt für eine Vermeidung von Lufteinschlüssen im Polymerblock. Aus diesem Block werden anschließend mechanisch kleinere Probekörper hergestellt, die dann beschichtet werden.

Wenn das Polymer über seine Schmelztemperatur in den Thermoplastizitätsbereich erhitzt wird, ändert es seine Phase und wird zu einer leicht transparenten, dunkelbraunen, zähflüssigen Masse. Aufgrund der geringen Wärmeleitfähigkeit lässt sich durch kurze thermische Energieeinträge nur die Oberfläche erhitzen beziehungsweise aufschmelzen. Durch die auf die Oberflächenschicht begrenzte Phasenumwandlung soll das Beschichtungsmaterial in die Oberfläche einsinken und nach der Dissipation der thermischen Energie eine feste Verbindung herstellen.

Zur Beschichtung wird NanoBone[®] S39-Granulat verwendet, das zuvor mit einer Kugelmühle (Janetzki KM-1, Polen) auf Stufe 14 5 min lang zu einem feinem Pulver verarbeitet wird. Um eine Verunreinigung bei diesem Prozess zu reduzieren, werden der Mörser und der Stößel der Mühle mit Seifenlauge gereinigt. Anschließend werden die Teile zweimal mit VE-Wasser gespült und dann mit 100 %igen Alkohol desinfiziert. Die Kugelmühle selbst wird in einer Laminar Flowbox untergebracht. Das resultierende Pulver hat nach dem Zerkleinerungsprozess

¹Standard Specification for Polyetheretherketone (PEEK) Polymers for Surgical Implant Applications

²zum Vergleich: Eichenholz 0,15 Wm⁻¹K⁻¹, Stahl 46 Wm⁻¹K⁻¹ [18]

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

eine Korngröße von 5 bis 100 μm (s. Abb. 5.6(a)).

Erste Vorversuche in einem Umluftofen haben gezeigt, dass es möglich ist, das NanoBone[®]-Pulver teilweise in die Oberfläche des Polymers einsinken zu lassen. In der elektronenmikroskopischen Aufnahme 5.6(b) sind durch \blacktriangleright gekennzeichnete Pulverkörner des Biomaterials abgebildet, die in die Kunststoffoberfläche eingesunken sind. Durch die eindringende Anregungsbirne des Elektronenstrahls können die eingesunkenen Konturen der Partikel abgebildet werden. Die Polymerumhüllung kann durch die Lamellenkristallbildung identifiziert werden.

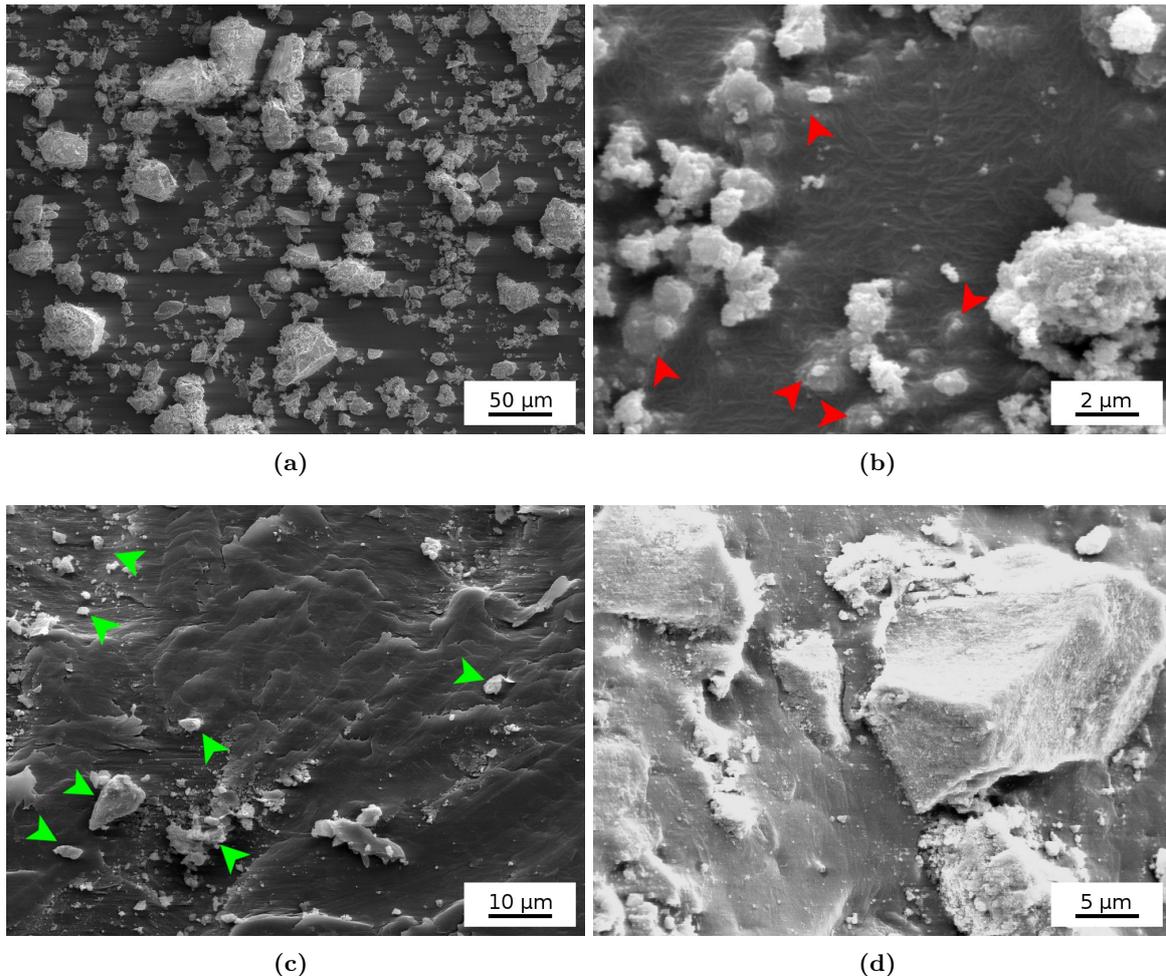


Abb. 5.6.: (a) Die Abbildung zeigt die Partikelgrößenverteilung von zu Pulver gemahlenem NanoBone[®] S39-Granulat.

(b) Durch Erhitzen verflüssigt sich das PEEK und die NanoBone[®]-Pulverpartikel sinken in die Oberfläche ein (\blacktriangleright).

(c) Bei unzureichender Temperaturzuführung entsteht keine Verbindung zwischen dem Polymer und dem Pulver. Die Pulverpartikel (\blacktriangleright) liegen nur oben auf.

(d) Durch einen heißen Luftstrom wurden Pulverpartikel auf die aufgeschmolzene Polymeroberfläche geschleudert und sind teilweise eingesunken.

5.5. Entwicklung des Modellimplantates (PEEK)

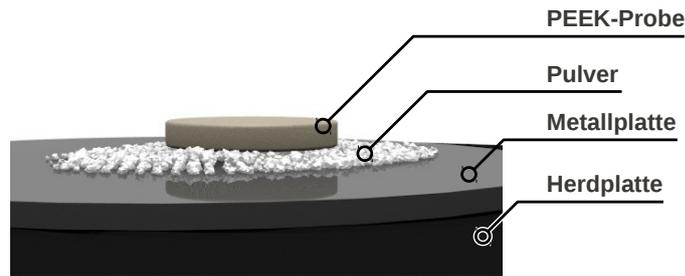


Abb. 5.7.: Schematische Abbildung des Aufbaus für die Vorversuche der PEEK-Beschichtung durch das Hotplate-Coating-Verfahren.

Zur Herstellung der Probe wurde das Polymer 30s lang bei 400 °C erhitzt, aus dem Ofen entnommen und anschließend mit dem Pulver bestreut. In den darauf folgenden Untersuchungen geht es darum, einen reproduzierbaren Beschichtungsprozess zu entwickeln, der eine homogene Schicht und die Anforderungen einer medizinischen Sauberkeit gewährleistet.

Dazu wird auch probiert, ob es möglich ist, das Biomaterialpulver auf hohe Temperaturen (bis zu 600 °C) zu erhitzen und dann den raumtemperaturwarmen Polymerkörper in das Pulver zu tauchen. Die Wärmekapazität des Beschichtungsmaterials ist für diesen Beschichtungsvorgang jedoch viel zu gering, um die nötige Wärme zu speichern, die zum Aufschmelzen der Polymeroberfläche nötig ist. Die Abbildung 5.6(c) zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Es hat sich kein Biomaterial mit dem Polymer verbunden. Die Pulverpartikel (➤) liegen nur auf der Polymeroberfläche auf.

Die Abbildung 5.6(d) zeigt das Ergebnis eines anderen Beschichtungsversuches. Dazu wird ein rotierender Polymerkörper in einem 600 °C heißen Luftstrom positioniert. Der Luftstrom lässt die Kunststoffoberfläche schmelzen. Zusätzlich wird das Biomaterial gezielt in den Aufbau eingestreut, so dass das Pulver vom heißen Luftstrom zur geschmolzenen Oberfläche transportiert wird. Die Abbildung zeigt die Polymeroberfläche mit Pulverpartikeln die teilweise in dem Kunststoff eingesunken sind.

Eine weitere untersuchte Methode ist das Hotplate-Coating-Verfahren. Dabei wird ein Schichtsystem aus einer Metallplatte und dem Polymerkörper aufgebaut. Der Aufbau ist in Abbildung 5.7 schematisch dargestellt. Zwischen der Metallplatte und der PEEK-Probe kommt eine wenige 100 µm dicke Biomaterialpulverschicht. In den Vorabversuchen zur Beschichtung wird die Metallplatte durch eine handelsübliche Herdplatte (ELTAC EK 18, Rommelsbacher ElektroHausgeräte GmbH, Deutschland) erwärmt. Die durch die Herdplatte erhitzte Metallplatte überträgt die thermische Energie auf das Biomaterial und das Polymer. Die Polymeroberfläche schmilzt und das Biomaterial versinkt in dem Kunststoff. Die Polymerkörper (Zylinderdurchmesser 5 mm, Höhe 1 mm) werden dabei nicht durch einen zusätzlichen Druck belastet. Nach der Dissipation der Wärmeenergie entsteht ein stabiler Verbund zwischen beiden Materialien.

Die Abbildung 5.8(a) zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche des beschichteten Probekörpers. In der Abbildung sind große und kleine versunkene Partikel zu erkennen, die aus der Oberfläche herausragen. Zwischen den verankerten Partikeln haben sich viele kleine lose Partikel in den Ecken und Vertiefungen dieser Struktur angelagert. Stellenweise ist zwischen den Partikeln die Polymeroberfläche zu erkennen. In der Abbildung

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

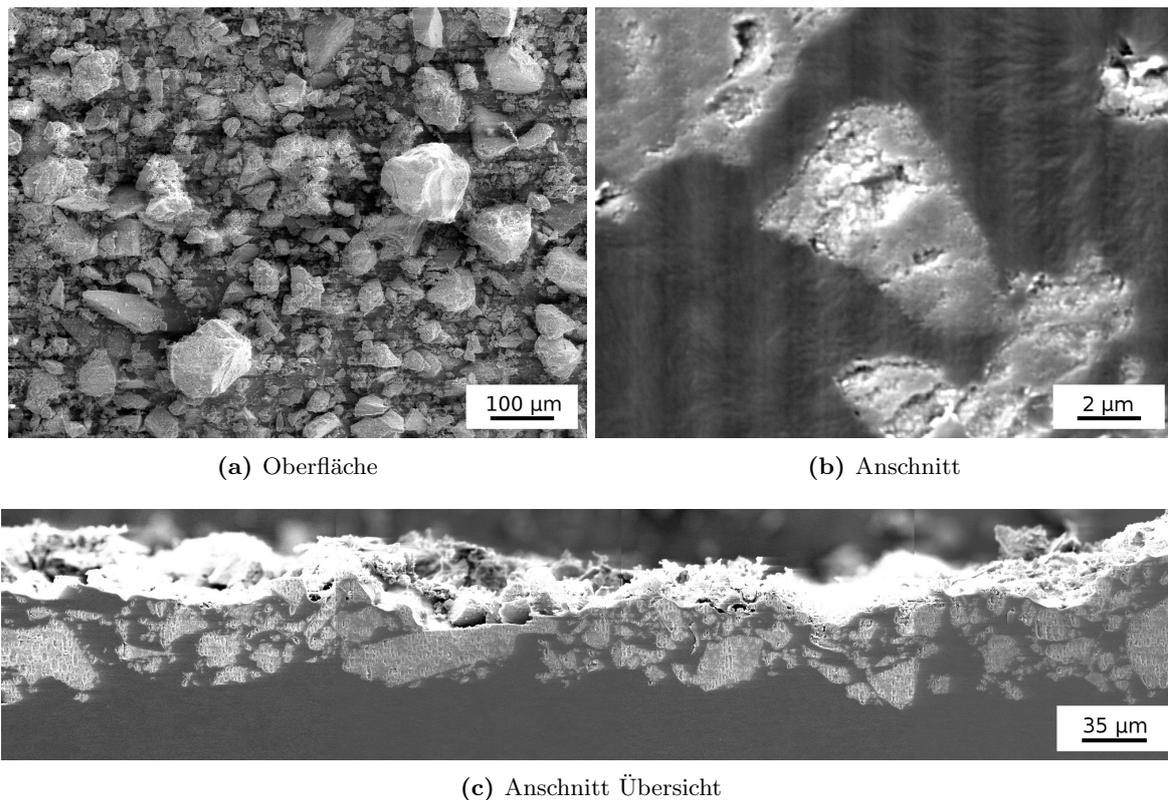


Abb. 5.8.: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur (a) und eines Anschnittes (b) von beschichteten PEEK-Proben nach dem Hotplate-Coating-Verfahren. (c) Übersichtsaufnahme des Anschnittes der aufgetragenen Pulverbeschichtung auf der Probenoberfläche.

5.8(b) ist mit hoher Vergrößerung ein Anschnitt der Beschichtung dargestellt, um den Verbund des Polymers mit dem Knochenaufbaumaterial zu verdeutlichen. Die Pulverpartikel sind fast vollständig vom Polymer ummantelt. Bis auf vereinzelte kleine Luftporen hat sich das Polymer vollständig der Kontur des Biomaterials angepasst. Das zeigt, dass das Polymer das Biomaterial nicht komplett durchdringt. Die Abbildung 5.8(c) zeigt einen größeren Bereich des Anschnittes, in dem die homogen aufgetragene NanoBone[®]-Pulverschicht zu sehen ist. Durch dieses Verfahren ist es möglich, auch großflächige Bereiche reproduzierbar zu beschichten.

5.5.3. Design der Implantatform

Die Vorversuche haben gezeigt, dass eine NanoBone[®]-Pulverbeschichtung durch das Hotplate-Coating-Verfahren durchgeführt werden kann. Der nächste Schritt besteht darin, das Beschichtungsverfahren so zu modifizieren, dass die Beschichtung auf ein Implantat aufgetragen wird. Das beschichtete Implantat wird anschließend in einem *in vivo* Experiment untersucht.

Um in der *in vivo* Studie wieder das etablierte Kaninchentiermodell anzuwenden, wird ein Implantatmodell entwickelt, das im Wesentlichen auch alle Charakteristika von Cages

(s. Abb. 5.9(a)) aufweist. Die Implantate sollen dabei gewindefrei sein, scharfkantige Absenkungen wie der Originalcage aufweisen und mit dem Pilot- und Erweiterungsbohrset aus dem dentalen Implantationsbereich (E3001, E3004, F3004, Bone Management[®], Hager & Meisinger GmbH, Deutschland) integriert werden können. Dazu wird ein Modell mit rotationssymmetrischer Grundform gewählt. Diese Grundform der Modellimplantate ist ein Kegelstumpf, in den ein Widerhakensystem eingearbeitet wird (s. Abb. 5.9(b)), wie es unter anderem bei handelsüblichen Dübeln angewendet wird. Am unteren Ende des Implantatmodells wird ein M2 Gewinde integriert, um den Stift während des Beschichtungsvorganges und der Implantation besser zu arretieren und zu führen.

5.5.4. Beschichtungsprozess

Für das gewählte Implantatmodell muss das Hotplate-Coating-Verfahren aus den Vorversuchen modifiziert werden. Für die Erzeugung der thermischen Energie wird ein Induktionsgenerator (TIG 30/100, Hüttinger Elektronik GmbH, Deutschland) gewählt. Die Hotplate wird durch eine zylindrische Edelstahlform mit einem Durchmesser von 1,5 cm ersetzt. Diese wird durch die Induzierung von Wirbelströmen stark erhitzt und kann diese thermische Energie an das Biomaterial und das Polymer übertragen. Die zylindrische Edelstahlform hat an einem Ende eine zylindrische Aussparung, in die der PEEK-Stift platziert wird. Zur einfacheren Handhabung ist die Induktionsform entlang der Rotationsachse in zwei Hälften teilbar, die sich durch zwei Schrauben miteinander arretieren lassen.

Nach dem Versenken des Implantates in der vorgesehenen Vertiefung in der Induktionsform, wird der freie Zwischenraum in dieser Aussparung mit dem gemahlenem NanoBone[®] aufgefüllt (s. Abb. 5.11(b)) und durch einen leichten uniaxialen Druck (von 130 bis 640 kPa)³ zusammengedrückt. Durch den Druck wird das Beschichtungspulver verdichtet und gibt dem

³ geschätzte Hebelkraft der Arme in der Arbeitsposition innerhalb einer Flowbox von 10 bis 50 N

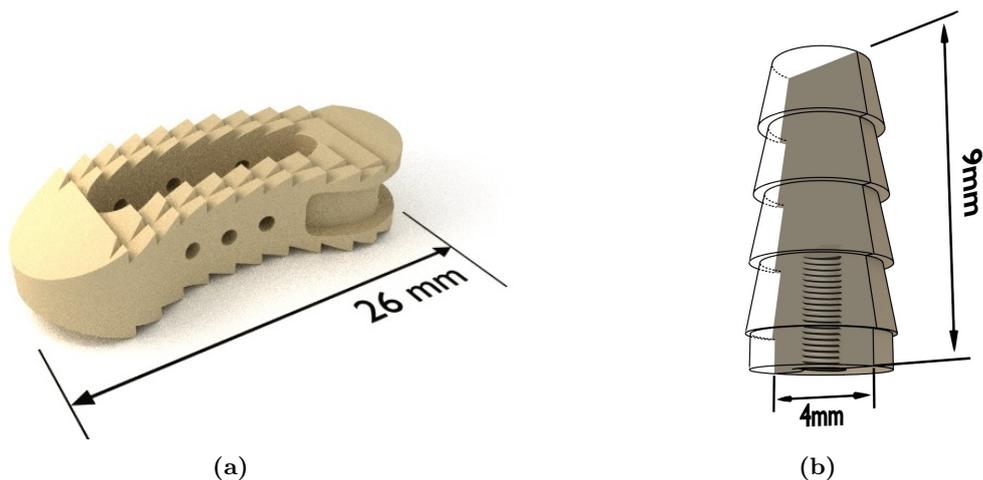


Abb. 5.9.: Die Abbildung zeigt eine 3D-Rekonstruktion eines Cages (a) und das rotations-symmetrische Implantationsmodell (b).

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

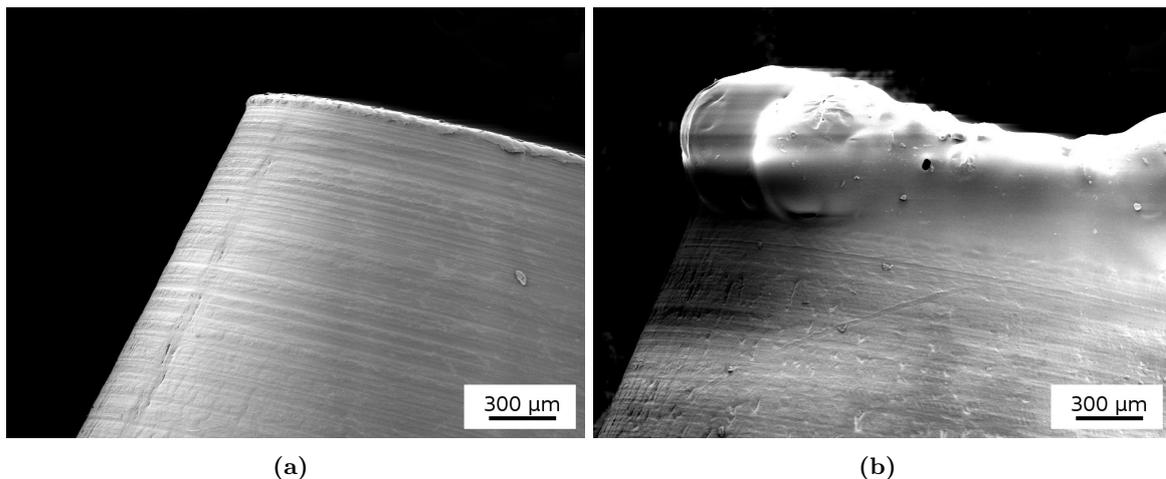


Abb. 5.10.: Die Abbildungen vergleichen Ausschnitte der Grundform der Implantatmodelle vor (a) und nach (b) einer Temperaturbehandlung.

aufschmelzendem Polymer eine Eingrenzung. Diese Eingrenzung sorgt dafür, dass der geschmolzene Kunststoff nur minimal seine Grundform verliert. Wird das Polymer bis in den Flüssigkeitsbereich erhitzt, wird es anfangen, sich aufgrund der Einwirkung der Kohäsionskräfte zu verformen. Diese sorgen dafür, dass der Körper sich einer Kugelform annähert. Bei sehr hohen Temperaturen (ab 450 °C) wird sich der Kunststoff zusätzlich auch zersetzen. Die Ausgasungen sowie kleine Lufteinschlüsse können zur Blasenbildung auf der Oberfläche führen. Die beiden Abbildungen 5.10(a) und (b) verdeutlichen die Verformung nach einer zu hohen und zu langen Temperaturbehandlung. Dieser Effekt wird sich nicht vollständig vermeiden lassen, kann aber durch Verringerung der Einwirkdauer und der Temperatur sowie einer formgebenden Eingrenzung reduziert werden.

Die mit Biomaterial und dem Implantat gefüllte Vertiefung in der Induktionsform wird mit einer Edelstahlabdeckung verschlossen (s.Abb. 5.11(b)). Dieses abgeschlossene System wird innerhalb der reinen Umgebung einer Laminar-Flowbox präpariert, um Verunreinigungen zu vermeiden. Anschließend wird die Induktionsform in den Induktor eingeführt und innerhalb weniger Sekunden (ca. 10 s) auf 400 °C getempert. Der gesamte Beschichtungsprozess ist schematisch in Abbildung 5.11(a) dargestellt. Nach dem Beschichtungsprozess wird die Induktionsform mit Isopropanol von außen gereinigt und innerhalb der Umgebung der reinen Werkbank das beschichtete Implantat entnommen und in einem Glasvial deponiert. Die Glasvials werden in einer abgedeckten Edelstahlbox zur Heißluftsterilisation bei 170 °C 4 Stunden lang getempert. Abschließend werden die Glasvials innerhalb der Flowboxumgebung mit gammasterilisierten Gummistopfen verschlossen und mit Aluminiumkappen transportsicher gemacht.

5.5.5. Charakterisierung der Beschichtung

Die beiden Abbildungen 5.12(a) und (a) zeigen die Oberflächenstruktur des Implantates vor und nach der Beschichtungsprozedur. Aufgrund der unregelmäßigen Größenverteilung der aufgetragenen Pulverpartikel, die das Implantat verdecken, kann kein direkter Rückschluss auf

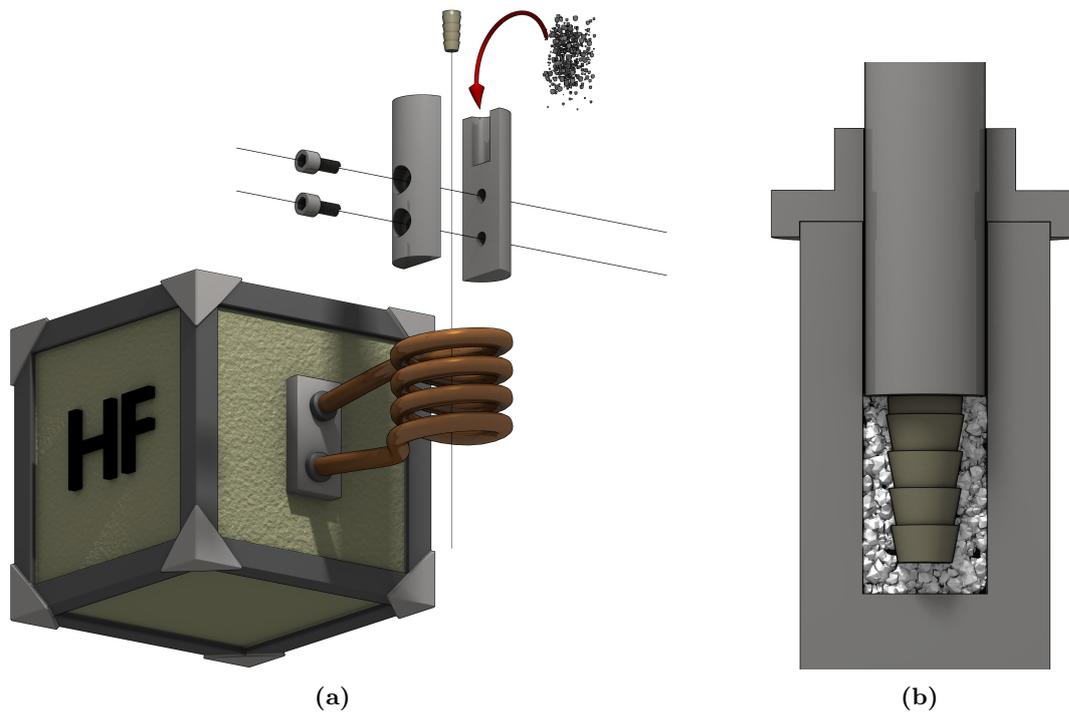


Abb. 5.11.: Die schematische Abbildung (a) zeigt den Aufbau der Induktionsanlage zur Implantatsbeschichtung mit Hochfrequenzgenerator (HF), Kupferspule (Induktor) sowie Induktionsform mit Implantat und Pulver. In der Detailansicht (b) wird ein Querschnitt der Induktionsform mit dem Pulver und dem Implantat dargestellt.

die Polymerform gegeben werden. Unabhängig davon verdeutlichen die beiden Abbildungen, dass die Grundform mit dem Widerhakensystem erhalten geblieben ist.

Im Detail ist das Ergebnis der Induktionsbeschichtung nicht von dem Ergebnis der Hotplate-Coating-Methode aus den Vorversuchen zu unterscheiden. Die Oberflächenstruktur (s. Abb. 5.13(a) im Vergl. mit Abb. 5.8(a) auf S. 72) ist nahezu identisch. Auch die Einbettung der Biomaterialpartikel in das Polymer zeigt im Anschnitt (s. Abb. 5.13(b)) die gleiche Verbindung wie die Probekörper aus den Voruntersuchungen (s. Abb. 5.8(b)). Die versunkenen Pulverkörner sind nahezu vollständig vom Polymer eingeschlossen. Der Kunststoff hat die Oberflächenstruktur des Biomaterials sehr gut adaptiert. Vereinzelt sind kleine Unebenheiten, Vertiefungen oder Lufteinschlüsse zu erkennen, die sich hauptsächlich in Bereichen des Biomaterials befinden, in die das geschmolzene Polymer nicht vorgedrungen ist. Auch die Übersicht des Anschnittes (s. Abb. 5.13(c)) zeigt, dass es nach der Modifizierung der Hotplate-Coating-Methode möglich ist, die Beschichtung homogen aufzutragen. Es sind unterschiedlich große Partikel zu erkennen, die in einer Schichtdicke von etwa 100 μm in das Polymer integriert wurden. Die Partikel sind nicht vollständig vom Kunststoff ummantelt. Etwa ein Drittel der Partikelfläche ragt aus dem Polymer heraus.

Um den Verbund und die Eindringtiefe des Polymers mit dem Biomaterial genauer zu untersuchen, wird aus beschichteten Proben die Schicht wieder heraus gelöst. Dies wird durch

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

zwei Teilschritte realisiert. Im ersten Schritt wird die Probe in 2,5-molarer Essigsäure für 6 Stunden gelagert, um das Hydroxylapatit zu demineralisieren. Im zweiten Schritt wird die Probe für 24 Stunden in 2-molarer Natronlauge gelagert, um das Silicagel aufzulösen.

Die Abbildung 5.14(a) zeigt die Polymeroberfläche nach dem Herauslösen der Beschichtung. Deutlich sind kraterähnliche Konturen zu erkennen, die das Polymer gebildet hat, um die Pulverpartikel einzufassen. Die einfassende Kante der Krater zeigt immer eine leichte Erhöhung gegenüber der restlichen Oberfläche. Eine Ursache könnte die stark benetzende Wirkung der NanoBone[®]-Oberfläche bei Wasserkontakt sein. Ein ähnlicher Effekt könnte sich bei Kontakt mit dem flüssigen Kunststoff einstellen, was dann zu den erhöhten Einfassungen um die NanoBone[®]-Partikel führt. Die Abbildung 5.14(b) zeigt einen stark vergrößerten Ausschnitt dieser Oberfläche. Die Struktur unterscheidet sich vollständig von den Bereichen der temperaturbehandelten PEEK-Oberfläche, die nicht mit NanoBone[®] in Kontakt gekommen ist (Vergl. glatte PEEK-Oberfläche in Abb. 5.6(b) auf S. 70). Die Abbildung mit dem herausgelösten Biomaterial zeigt deutlich, wie intensiv das Polymer die Oberflächenmorphologie der aufgetragenen Partikel adaptiert hat. Es ist davon auszugehen, dass die Struktur des Polymers sich noch feingliedriger in die Biomaterialoberfläche integriert. Diese im Nanometerbereich liegenden Strukturen sind aller Wahrscheinlichkeit nach durch die Kapillarkräfte beim Trocknungsprozess der Probe zerstört worden.

Um die Verbindung zwischen dem Biomaterial und dem Polymer besser zu charakterisieren, wird auf den Anschnitten beschichteter Implantatmodelle eine Elementanalyse mittels EDX-Spektroskopie durchgeführt. In der Abbildung 5.15 ist ein Anschnitt der beschichteten PEEK-Probe dargestellt, auf dem entlang der eingezeichneten roten Linie ein EDX-Spektrum aufgenommen wird. Die Elementhäufigkeit für Kohlenstoff (■), Silizium (■) und Kalzium (■) werden in den Diagrammen unterhalb der Abbildung dargestellt. Die Silizium- und Kalziumkurven sind nahezu identisch, was auf eine homogene Silica-Ummantelung des Hydroxylapatites hindeutet. Die Intensität des Kohlenstoffs im Polymer hat einen nahezu inversen

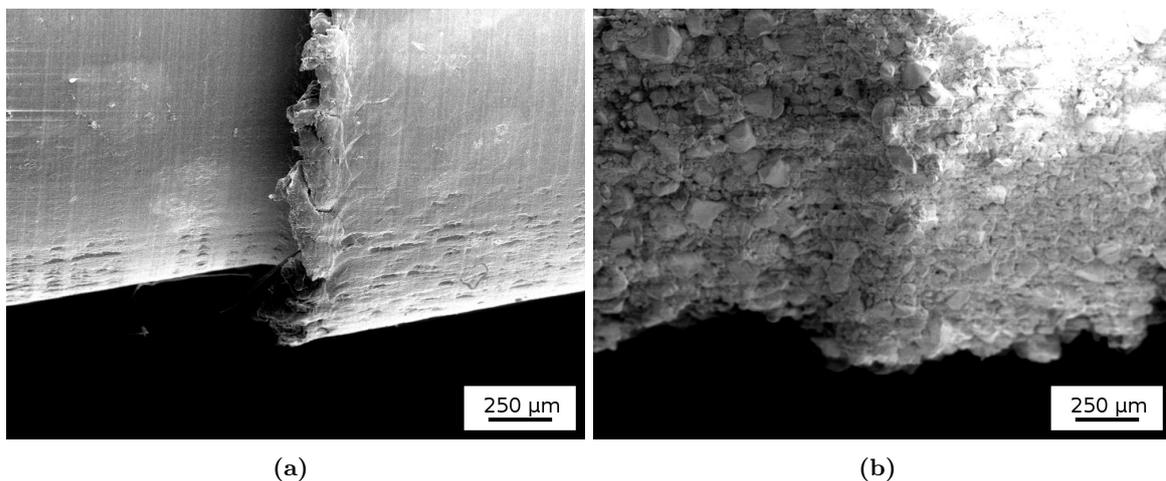


Abb. 5.12.: Die Abbildungen zeigen das Widerhakensystem des PEEK-Implantatmodells vor (a) und nach (b) dem Beschichtungsprozess. Die Grundform der Widerhaken ist auch nach der Beschichtung deutlich erkennbar.

5.5. Entwicklung des Modellimplantates (PEEK)

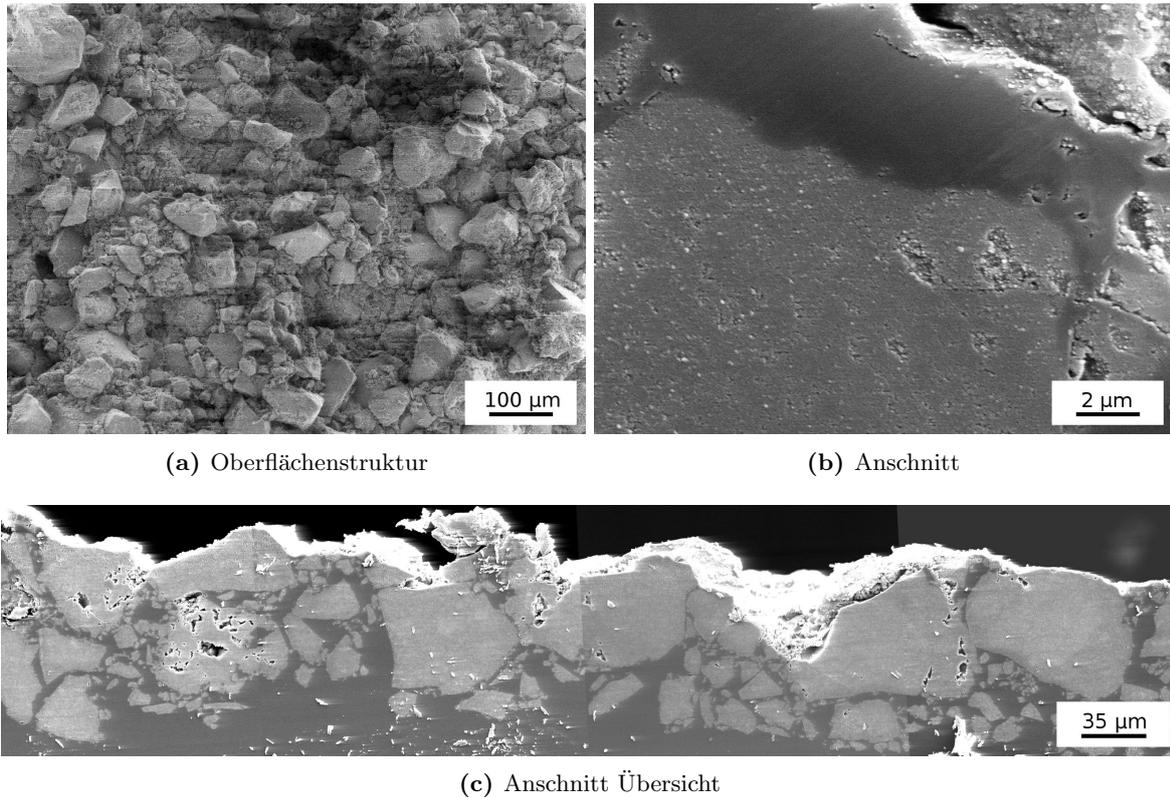


Abb. 5.13.: (a) Die Abbildung zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberflächenstruktur der beschichteten Implantatmodelle. (b) In der Abbildung wird der Anschnitt durch die Transversalebene eines beschichteten Implantatmodells dargestellt. (c) Die Abbildung zeigt eine Übersichtsaufnahme eines Anschnittes mit aufgetragenen Pulverbeschichtung. Durch das Beschichtungsverfahren können großflächige Bereiche homogen beschichtet werden.

Verlauf gegenüber den beiden Elementen Silizium und Kalzium, die dem Biomaterial zuzuordnen sind. Die Flanken der einzelnen Peaks in den Spektren verlaufen nicht senkrecht. Die Flankenbreite liegt in der gleichen Größenordnung wie die feingliedrigen Strukturen aus der Abbildung 5.14(b).

Um die Verbindung zwischen der Polymerstruktur und dem Biomaterial, welche sich in den Anschnitten (s. Abb. 5.13(c)), der Abbildung mit herausgelöstem NanoBone[®] (s. Abb. 5.14(b)) und dem EDX-Spektrum (s. Abb. 5.15) gezeigt hat, noch deutlicher abzubilden, werden 40 nm dicke Schnitte vom beschichteten Implantatmodell angefertigt und im Transmissionselektronenmikroskop (EM 912 OMEGA, Zeiss, Deutschland) untersucht. Die Abbildung 5.16(a) zeigt eine etwa 500 nm dicke Schicht (▶) aus Biomaterial und Polymer. Diese Schicht unterscheidet sich deutlich in ihrer Struktur vom reinen Polymer (▶). Entlang der Kontaktlinie zwischen beiden Materialien besteht ein Gradient, so dass keine scharfe Grenze zu erkennen ist. Auch innerhalb der Beschichtung gibt es keine scharfen Linien, die eine bestimmte Eindringtiefe des Polymers charakterisieren. Auf der Außenkante des Biomaterials liegt eine Schicht (▶), die durch ihre Struktur nicht den Granulatpartikeln zugeordnet werden kann und somit als

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

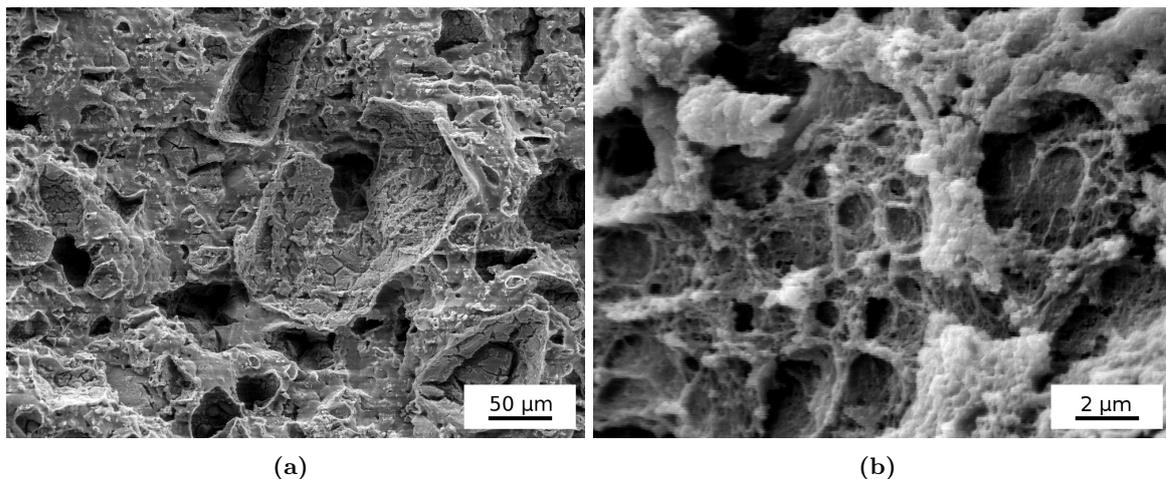


Abb. 5.14.: Die Abbildungen zeigen die Oberflächenstruktur eines beschichteten Implantatmodells nach dem Herauslösen der Beschichtung bei unterschiedlicher Vergrößerung.

Polymer deklariert werden muss. Das Polymer durchdringt die nanoporösen Pulverpartikel und füllt die Hohlräume auf. Dies führt zu einem feinen Polymergeflecht (s. Abb. 5.14(b)) in dem das Biomaterial eingewoben ist.

Die vergrößerte TEM-Aufnahme in Abbildung 5.16(b) zeigt ansatzweise die bekannten Nadelstrukturen (■), die durch die Hydroxylapatitplättchen (s. Abb. 2.9(a) auf S. 13) verursacht werden. Durch die Polymerummantelung lassen sich die HA-Kristallite nur undeutlich abbilden.

Auf die Implantate konnte eine Pulverschicht aus NanoBone[®] mit einer Partikelgröße von 5 bis 100 μm aufgetragen werden. Die Schichtdicke variierte dabei zwischen 60 und 120 μm. Die einzelnen Partikel sind dabei teilweise vollständig vom Kunststoff umhüllt. Der Kunststoff hat in etwa 1000 nm weitreichende Strukturen in die Partikel hinein gebildet.

Das makroskopische Beschichtungsergebnis der Implantate weist jedoch, trotz einer Variation der Dauer und Temperatur in Kombination mit der Eingrenzung, einzelne Lücken in der Beschichtung auf. Besonders im Bereich von Vertiefungen ist die Temperatur nicht ausreichend, um die Polymeroberfläche homogen aufzuschmelzen. Die Abbildungen 5.25(a) und (b) im Abschnitt 5.6.4 zur histomorphometrischen Auswertung werden exemplarische Bereiche zeigen, in denen die Beschichtung fehlerhaft durchgeführt wurde. Diese fehlerhaften Bereiche lassen sich nicht ohne technische Hilfsmittel und Kontamination der Implantate vor der Operation exakt charakterisieren. Daher können nur die Implantate mit deutlich erkennbaren Fehlern in der Beschichtung aussortiert werden.

5.6. Tierexperimentelle Studie (PEEK)

5.6.1. Zytotoxizitätstest der Modellimplantate

Eine mögliche toxische Wirkung der beschichteten Implantate wird durch ein XTT-Test untersucht. Das Ergebnis ist im Diagramm 5.17(a) dargestellt. Für den Test werden zwei identi-

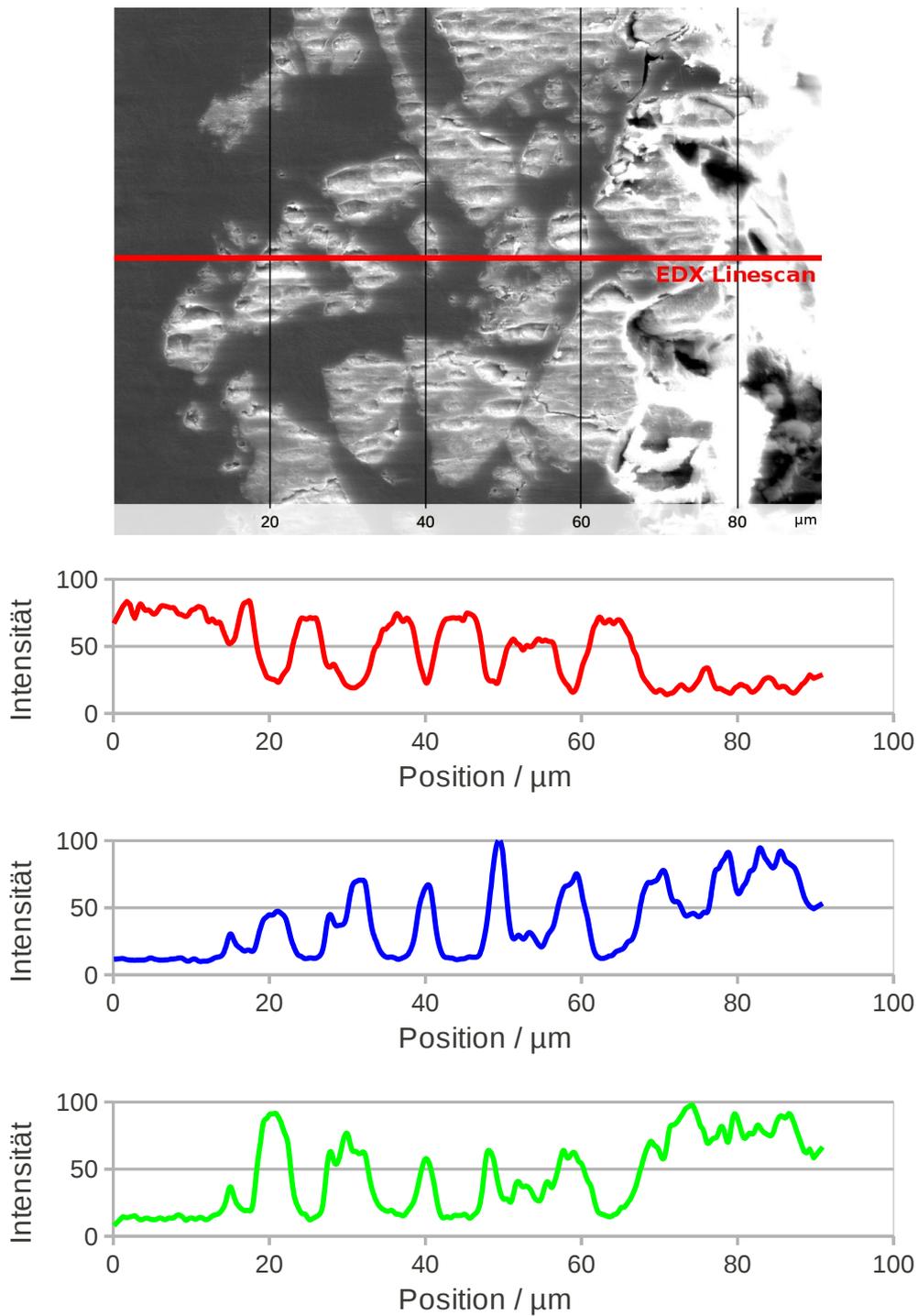


Abb. 5.15.: EDX-Linescan auf einem Anschnitt einer nach dem Hotplate-Coating-Verfahren beschichteten PEEK-Probe. Die Diagramme zeigen den Anteil der Elemente Kohlenstoff ■, Silizium ■ und Kalzium ■.

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

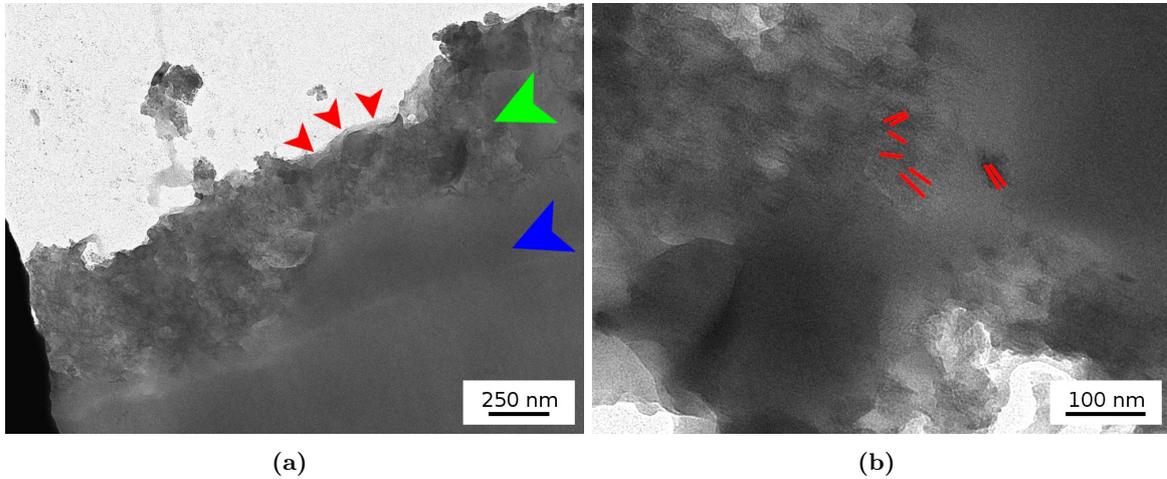


Abb. 5.16.: (a) TEM-Aufnahme einer etwa 500 nm dicken und mit PEEK durchzogenen Biomaterialschicht. (b) TEM-Aufnahme mit hoher Vergrößerung der PEEK-NanoBone[®]-Verbindung.

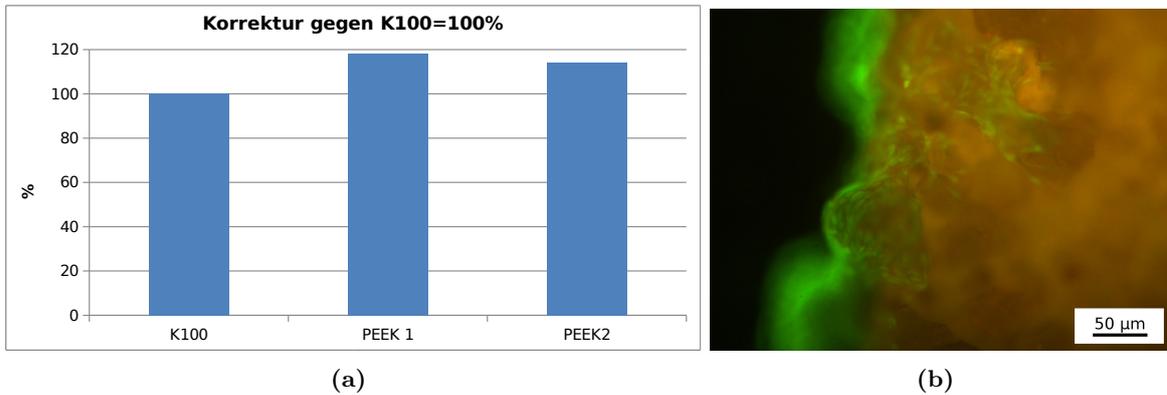


Abb. 5.17.: (a) Ergebnis des XTT-Zytotoxtest für zwei beschichtete PEEK-Implantate (PEEK1, PEEK2) und einer Kontrollgruppe (K100). (b) Fluoreszenzaufnahme mit grün leuchtenden, lebendigen Zellen auf einer beschichteten PEEK-Probe.

sche beschichtete Proben (PEEK1 und PEEK2) und eine Kontrollgruppe (K100) mit Zellen besiedelt. Nach zwei Tagen wird das Absorptionsverhalten der Zelllösung (s. Abschn. 3.2.2 auf S. 18) vermessen. Der *in vitro* Test zeigt eine leichte Erhöhung in der Zellvitalität der beschichteten Proben. Die lichtmikroskopischen Aufnahme 5.17(b) zeigt die Oberfläche einer beschichteten Probe mit grün fluoreszierenden Zellen, die sich dort angesiedelt haben. Die beschichteten Modellimplantate werden als nicht toxisch eingestuft.

5.6.2. Design der tierexperimentellen Studie

Für die tierexperimentelle Studie wird wieder das NEW ZEALAND Kaninchenmodell verwendet. Die Implantate werden im Bereich Kniegelenkes lateral in den Femur implantiert. Der Ablauf der Operation ist in Abschnitt 3.2.3 genauer ausgeführt.

Für den Versuch werden zwei Gruppen definiert: die unbehandelte Kontrollgruppe (**KGr**) und die beschichtete Versuchsgruppe (**BGr**). Beide Gruppen sind in die Standzeiten von 2 (**2W**), 4 (**4W**) und 6 Wochen (**6W**) gegliedert. Jede Gruppe besteht zu jeder Standzeit aus 6 Implantaten. Die Standzeiten werden so gewählt, dass die frühe Einheilphase beobachtet werden kann. Insbesondere soll durch die kurzen Zeitintervalle zwischen den Standzeiten eine Beschreibung des Matrixwechsels ermöglicht werden, durch den der NanoBone[®]-Remodellingprozess charakterisiert ist.

Das Tierexperiment verläuft ohne Komplikationen. Es werden keine außergewöhnlichen Ereignissen, Entzündungen, Abstoßungsreaktionen oder abnormales Verhalten der Tiere während der Standzeit des Versuches dokumentiert.

5.6.3. Histologische Auswertung

Für die Auswertung der Tierexperimente werden histologische Dünnschliffe nach der Sägeschliff-Technik nach DONATH und BREUER angefertigt [46]. Dazu wird das Knochenpräparat mit dem Implantat in Epoxidharz eingebettet. Nach dem Aushärten des Harzes wird die Probe aufgesägt, auf einem Objektträger fixiert, geschliffen und poliert und abschließend mit Giemsa Toluidin blau eingefärbt.

In beiden Gruppen, sowohl der Kontrollgruppe (KGr) als auch der beschichteten Gruppe (BGr), sind die Implantate gut eingewachsen. Die Abbildungen 5.18(a) bis (f) geben einen Überblick über den Implantat umlagernden Knochen. Es hat sich um die PEEK-Implantate (▶) ein kräftiges Knochenlager (▶) aus spongiosen Knochengeflecht gebildet. Es ist in dem einhüllenden Knochenlager zwischen der KGr und der BGr bei dieser Vergrößerungsstufe kein direkter Unterschied wahrnehmbar. Auch zwischen den einzelnen Zeitpunkten ist keine gravierende Abweichung in der Knochenhülle feststellbar. Bereits nach 2 Wochen hat sich eine ausgeprägte Knochenhülle um das Implantat gebildet, die sich nicht von den anderen Zeitpunkten unterscheiden lässt.

Bei höherer Vergrößerung der KGr zeigt sich in der lichtmikroskopischen Auswertung das für PEEK-Implantate bekannte Problem: ein schlechtes Knochen-Implantat-Interface. Das schlechte Interface wird durch Spalten zwischen dem neu gebildeten Knochen und dem Implantat in der KGr dokumentiert. Werden diese Ablösungen *post mortem* durch Präparations-effekte verursacht, befindet sich kein Biomaterial, wie zum Beispiel Zellen, in diesem Spalt. Da jedoch in den Spalten Zellen beobachtet werden können, die nur durch einen lebenden Organismus dorthin transportiert werden, ist von einer Ablösung *ante mortem* auszugehen. In den

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

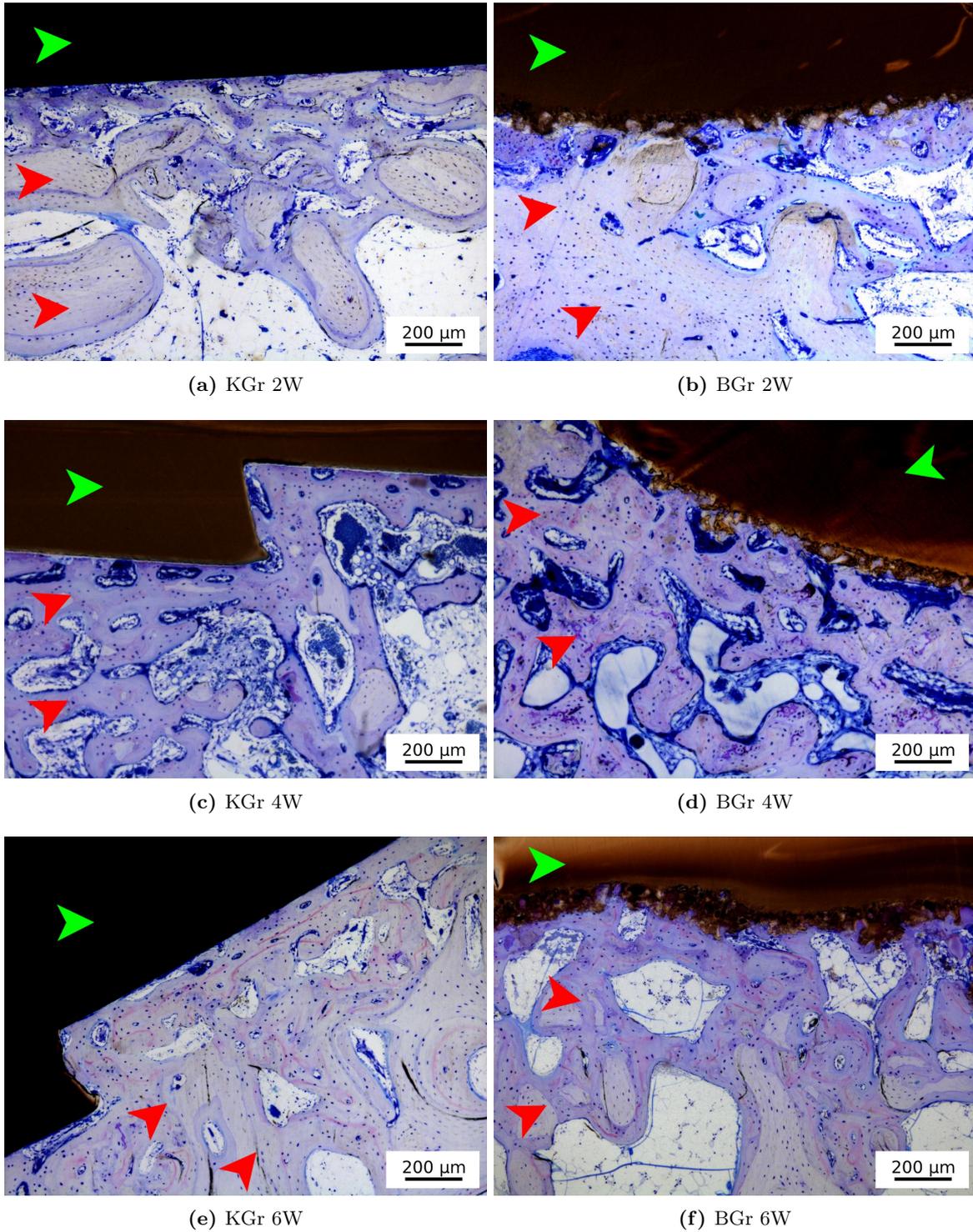


Abb. 5.18.: Exemplarische Übersicht des Knochenlagers zwischen der KGr und der BGr zu den drei verschiedenen Zeitpunkten (▶ Knochenlager, ▶ PEEK-Implantat).

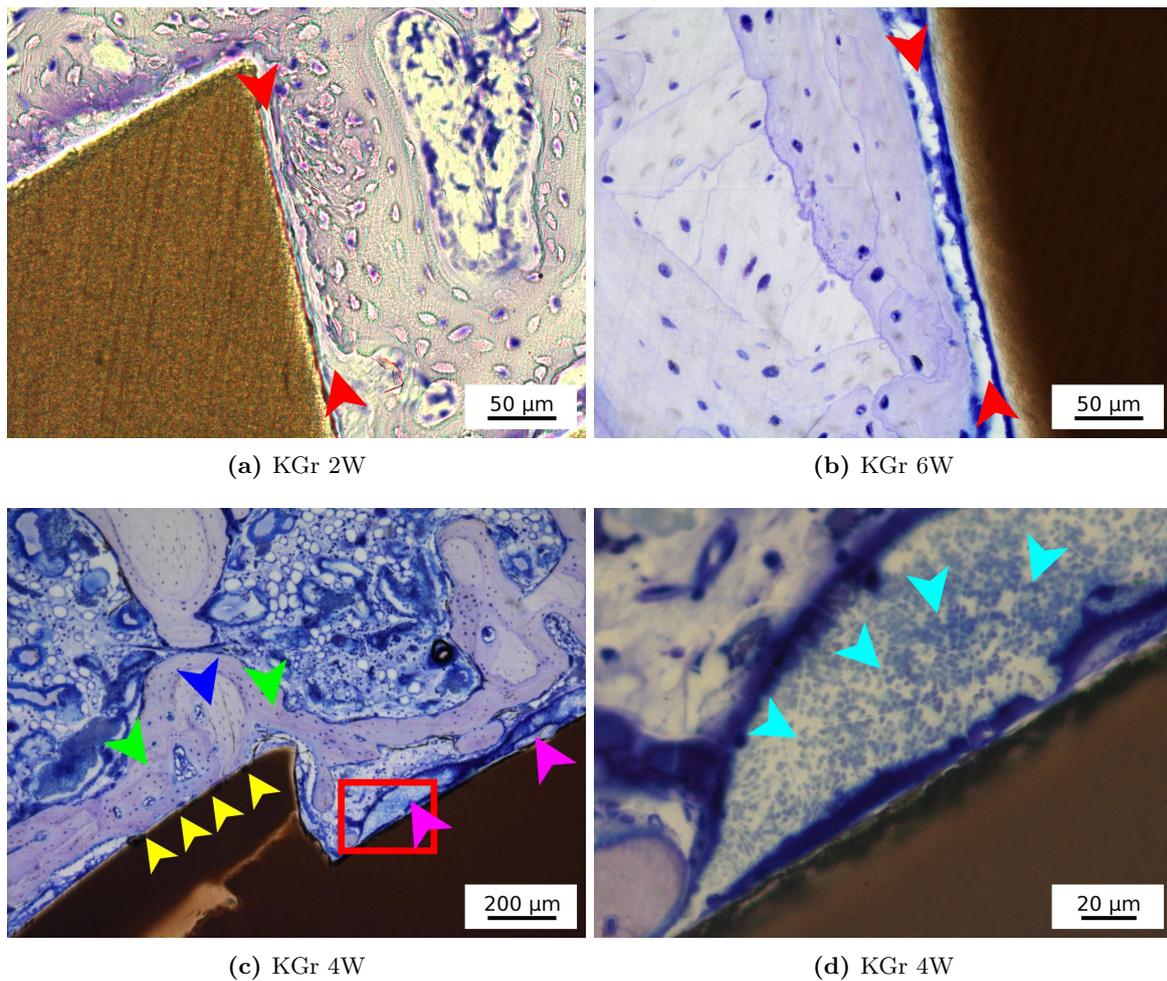


Abb. 5.19.: Unterschiedliche Gewebeablösungen von der Implantatoberfläche:
 (a-b) Ablösung des Knochens von der Implantatoberfläche vor der Euthanasie des Tieres. Die Knochenablösung wird durch ► Markierungen gekennzeichnet.
 (c) Die Abbildung zeigt eine starke Knochenneubildung (►) durch Umlagerung von altem Knochen (►). Die Knochenstruktur hat nur geringe Kontaktpunkte mit der Implantatoberfläche (►). Die starken Gewebeablösungen (►) verdeutlichen die schlechte Zelladhäsion der PEEK-Oberfläche.
 (d) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung (c) mit Thrombozyten (►) im abgelösten Bereich, die bestätigt, dass die Ablösung *ante mortem* eingetreten ist.

Abbildungen 5.19(a) bis (d) werden exemplarische Bereiche mit einer Ablösung des Gewebes vom Implantat (durch ► gekennzeichnet) für alle drei Standzeiten dargestellt. Die Spalten sind mit Zellen gefüllt, was auf eine Ablösung des Knochens vom Implantat zu Lebzeiten des Tieres hindeutet. Im Fall der beiden Abbildungen (5.19(a) und (b)) ist die Ablösung auf die Gewebeinteraktionen mit der Implantatoberfläche zurückzuführen. Deutlicher wird die schlechte Zelladhäsion auf der PEEK-Oberfläche in Abbildung 5.19(c) gezeigt. Das Implan-

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

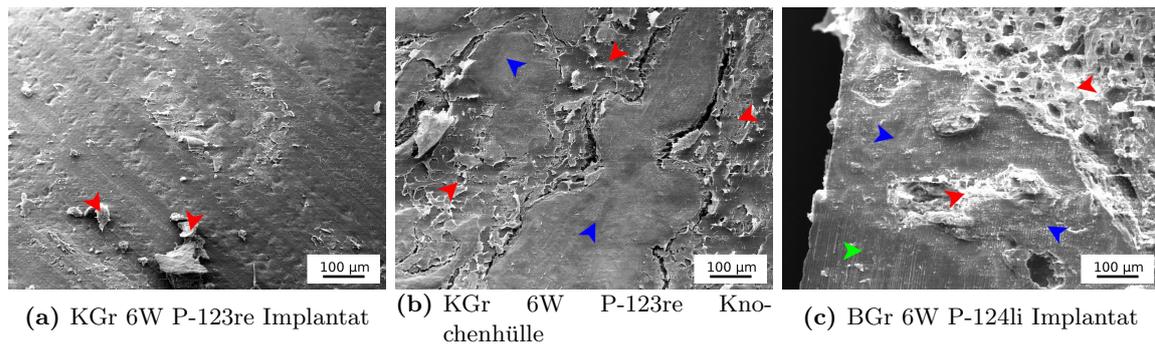


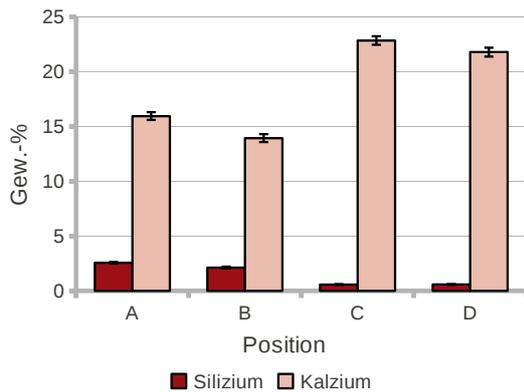
Abb. 5.20.: Die elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die Oberfläche des Implantates P-123re (a) mit Weichgeweberückständen und die abgelöste Knochenhülle (b) nach 6 Wochen aus der KGr. In der BGr (c) hat sich der Knochen nicht vom Implantat gelöst. Weichgewebe (▶), Knochen (▶) und PEEK (▶)

Das Implantat ist sehr gut von kompakten Knochenstrukturen und Trabekeln umhüllt. Der Knochen ist nicht mit der Implantatoberfläche verwachsen und an vielen Stellen abgelöst. Auf der rechten Implantatseite sind großflächige Weichgewebeablösungen (▶) zu erkennen. An dem Implantatzacken in der Bildmitte ist eine alte Knochenfläche (▶) direkt an der Implantatoberfläche angelagert. Der alte Knochen stammt wahrscheinlich noch von der Bohrung für die Implantierung und lieferte die Primärstabilität. Das Knochenstück ist von neuem Knochen (▶) umlagert. Dieser Bereich ist der einzige Abschnitt mit einem Knochen-Implantat-Kontakt (▶). Die Abbildung (d) zeigt einen Ausschnitt mit dem abgelösten Bereich aus Abbildung 5.19(c). In diesem Bereich befinden sich Thrombozyten, was auf eine Ablösung *ante mortem* hindeutet.

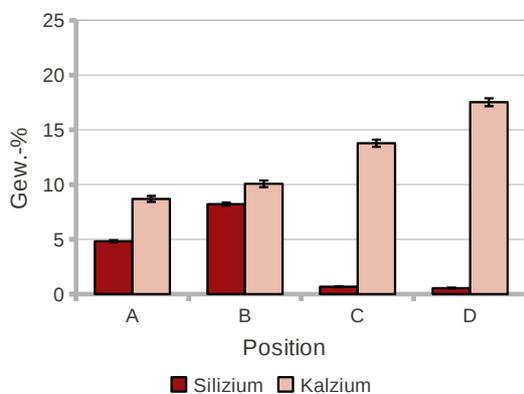
Das gleiche Resultat liefert auch eine elektronenmikroskopische Untersuchung. In der Gruppe von 6 Wochen wird jeweils ein beschichtetes und ein Kontrollgruppenimplantat zufällig ausgewählt und für eine elektronenmikroskopische Untersuchung aufbereitete. Während der Trocknungsphase des organischen Gewebes löst sich das Implantat aus der KGr selbständig aus dem umlagerten Knochen. Wie die Abbildung 5.20(a) zeigt, sind kaum organische Gewebereste (▶) auf der Implantatoberfläche haften geblieben. In der Abbildung 5.20(b) wird die Gegenseite der Implantatoberfläche, das einhüllende Knochenlager (▶) mit Weichgewebe (▶), dargestellt. Das Gewebe um das Implantat zeigt keine Spuren von einer gewaltsamen Trennung, in Form von zerrissenem Material. Das Implantat der BGr hingegen, das dem gleichen Aufbereitungsprozess unterzogen wird, sitzt nach der Trocknung immer noch stabil im einhüllenden Knochen eingebaut (s. Abb. 5.20(c)). Es ist zwischen dem Knochen (▶) und dem Implantat (▶) keine Riss- oder Lückenbildung zu erkennen.

Durch die Beschichtung der Implantate soll diese Ablösung vom Knochen, die in der Kontrollgruppe beobachtet wird, vermieden werden. Die histologischen Präparate der Beschichtungsgruppe zeigen keine Spalten oder Ablösungen zwischen Implantat und Knochenhülle. Es ist die gleiche Schichtstruktur aus den Untersuchungen vor der *in vivo* Studie zu erkennen. Die Partikel des Biomaterials, die in das Polymer eingesunken sind, zeigen einen ausgeprägten Verbund mit dem Knochen in den Bereichen, in denen sie aus dem Kunststoff herausragen.

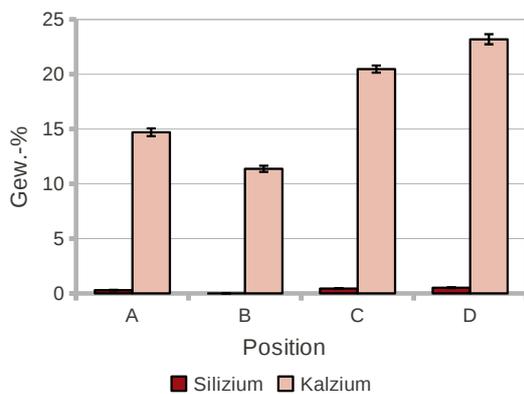
5.6. Tierexperimentelle Studie (PEEK)



(a) 2 Wochen



(b) 4 Wochen



(c) 6 Wochen

Abb. 5.21.: Darstellung des Silizium- und Kalziumanteils in Gewichts-% an den entsprechenden Positionen der EDX-Analyse aus Abb. 5.22(b) für 2, aus Abb. A.4(b) für 4 und aus Abb. A.5(b) für 6 Wochen.

Unabhängig von dem guten Verbund zwischen Implantat und Knochen durch die Beschichtung, der mit Sicherheit auch die Einleitung der Sekundärstabilitätsphase beschleunigen wird, muss der Abbauprozess des Biomaterials genauer charakterisiert werden. Dabei muss geklärt werden, ob der normale Remodellingprozess von NanoBone[®] stattfindet. Sollte die Beschichtung mit der Zeit vollständig abgebaut werden, würden die Zellen letztendlich wieder mit der Polymeroberfläche in direkten Kontakt kommen. Die temporäre Beschichtung würde dann das Problem des schlechten Knochen-Implantat-Interfaces nicht dauerhaft lösen können.

Die Voruntersuchungen im Abschnitt 5.5.5 dieser Arbeit zeigen, dass das PEEK in einer Größenordnung von etwa 1 μm in das Biomaterial eindringt. Die Frage, die im Folgenden also noch geklärt werden muss: *Reicht die Polymernanostruktur aus, um den Abbauprozess der Schicht dauerhaft zu be- und verhindern?*

Antworten auf diese Frage soll eine genauere Untersuchung des Remodellingprozesses, insbesondere der Matrixwechsel, liefern. Dieser findet in einem sehr frühen Stadium statt und leitet den Umbauprozess ein. Der Wechsel ist bereits nach sehr kurzen Zeitabschnitten vollständig abgeschlossen (s. Abschn. 2.3). Um also die Beständigkeit der Schicht zu charakterisieren, wird der Matrixwechsel als Indikator herangezogen.

Dazu werden auf den histologischen Präparaten der BGr zu allen drei Zeitpunkten an unterschiedlichen Stellen in der Schicht der Siliziumanteil durch EDX-Messungen bestimmt. Das Ergebnis zu diesen Untersuchungen für die 2 Wochen Standzeit wird in der Abbildung 5.22 dargestellt. Die Ergebnisse für die 4 und 6 Wochen Standzeit sind in Abbildung A.4 und A.5 im Anhang ab Seite 102 zu finden. Aus diesen EDX-Analysen werden zusätzlich die quantitativen Inten-

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

sitäten für Silizium und Kalzium extrahiert und in den Diagrammen 5.21(a) und (b) dargestellt, um Auffälligkeiten besser zu verdeutlichen.

In der Aufnahme 5.22(a) sind die Osteozyten (▶) markiert (gleiche Markierung der entsprechenden Abbildungen im Anhang). Sie charakterisieren den nahe gelegenen Knochenbereich, da sich in der elektronenmikroskopischen Aufnahme kein deutlicher Kontrast zwischen Knochen und Biomaterial abbilden lässt. Im Bereich der Osteozyten befindet sich definitiv Knochen. Damit wird verdeutlicht, dass die untersuchten Positionen im Biomaterial eine direkte Verbindung zum Knochengewebe haben und es sich nicht um vollständig vom Polymer eingekapselte Biomaterialpartikel handelt. Die raue Oberflächenkonturlinie des Implantates weist darauf hin, dass es sich in den untersuchten Bereichen auch um Biomaterial handelt. Die einzelnen Kurven aus dem Diagramm der Elementanalyse 5.22(c) sind alle auf den Goldanteil in der aufgesputterten Gold-Paladium-Schicht bei 2,12 keV ($M\alpha$) normiert (gleiche Normierung der entsprechenden Abbildungen im Anhang).

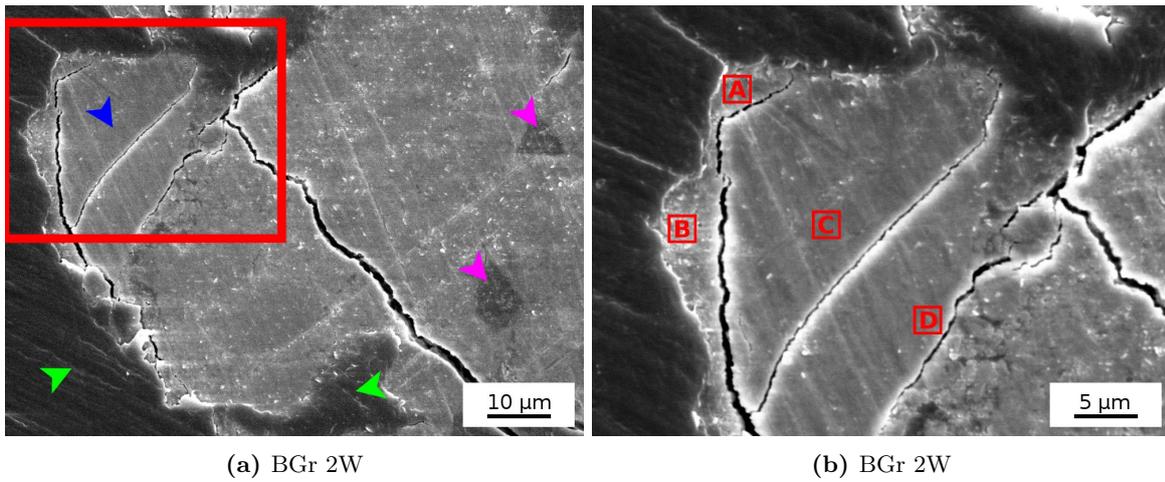
In den Spektren zeigen sich folgende Auffälligkeiten:

- Nach 2 und 4 Wochen sind deutliche Siliziumvorkommen nachweisbar. Nach 6 Wochen ist kein Silizium mehr nachweisbar, bis auf ganz vereinzelte Positionen (s. Anhang Abb. A.4).
- Die Siliziumpositionen (mit Ausnahme von Position B nach 4 Wochen) befinden sich immer im Grenzbereich zwischen dem Biomaterial und dem Polymer.
- Im Grenzbereich zwischen Biomaterial und Polymer ist der Kalziumanteil geringer gegenüber Positionen im Inneren des Biomaterials.

Um die aufgezählten Auffälligkeiten besser überblicken zu können, sind in den Diagrammen 5.21(a) bis (c) der Anteil an Silizium und Kalzium an den jeweiligen Positionen in Gewichts-% aufgetragen. Für 2 und 4 Wochen ist an den Positionen A und B deutlich ein Siliziumanteil gemessen worden. Ebenso werden in den Balkendiagrammen für alle drei Zeitpunkte die geringeren Kalziumwerte des Grenzbereiches (Positionen A und B) verdeutlicht.

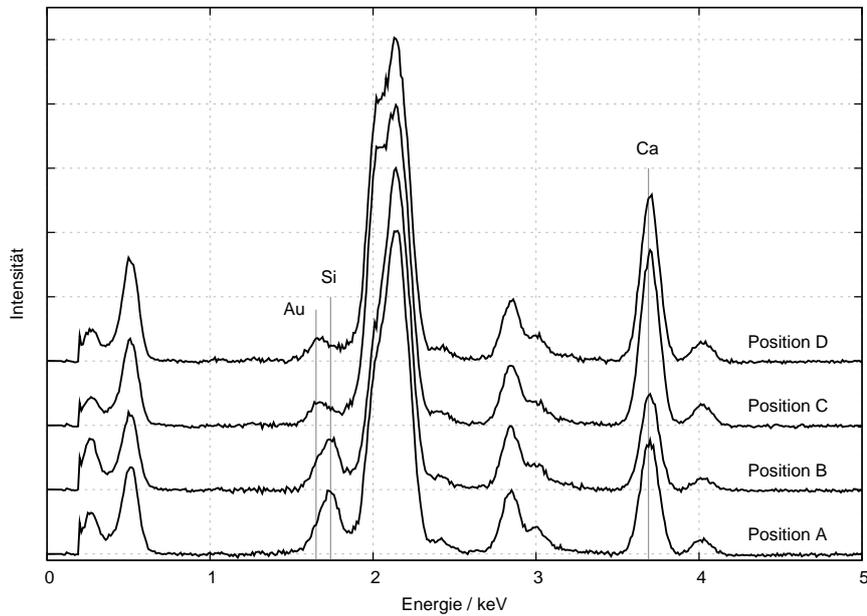
Zusätzlich zur Verdeutlichung wird in Abbildung 5.23 ein EDX-Mapping von einem in das Polymer integrierten Partikel des Biomaterials gezeigt. Die Untersuchung wird an einem histologischen Dünnschliffpräparat mit 2 Wochen Standzeit des Tieres durchgeführt. Die Punktanalysen der vorangegangenen EDX-Spektren haben bereits Siliziumvorkommen im Grenzbereich zwischen Polymer und Biomaterial bestätigt. Die Flächenanalyse liefert einen Eindruck über die gesamte Verteilung des Siliziums in diesem Grenzbereich.

Die Abbildungen 5.23(a) und (b) zeigen die untersuchte Fläche aus der Sicht einer licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahme. Das Biomaterial (▶) ist zu etwa zwei Drittel vollständig vom Polymer (►) ummantelt. Das nicht vom Kunststoff eingehüllte Drittel ist von Knochengewebe, das durch seine Osteozyten (►) identifiziert werden kann, umbaut. Der Ausschnitt in der Abbildung 5.23(c) zeigt die Kalziumverteilung (■), in der es keine signifikanten Unterschiede zwischen Knochen und Biomaterial gibt. Die rot markierten Bereiche (■) zeigen das Siliziumvorkommen. Der Matrixwechsel hat im Inneren des Biomaterials das Silizium vollständig abgebaut. Nur entlang des Grenzbereiches zwischen Biomaterial und Polymer zieht sich eine Spur aus Silizium. Diese Spur ist stellenweise sehr schwach ausgeprägt.



(a) BGr 2W

(b) BGr 2W



(c) BGr 2W

Abb. 5.22.: (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines beschichteten Implantates aus der *in vivo* Studie nach 2 Wochen. Das Biomaterial (▶), welches mit der PEEK-Implantatoberfläche (▶) verbunden ist, wurde von Knochen umlagert, der durch die Osteozyten (▶) identifiziert werden kann.

(b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung (a) mit Markierungen, die die Größe und Lage von EDX-Messungen wiedergeben.

(c) EDX-Spektrum zu den in Abbildung (b) markierten Positionen.

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

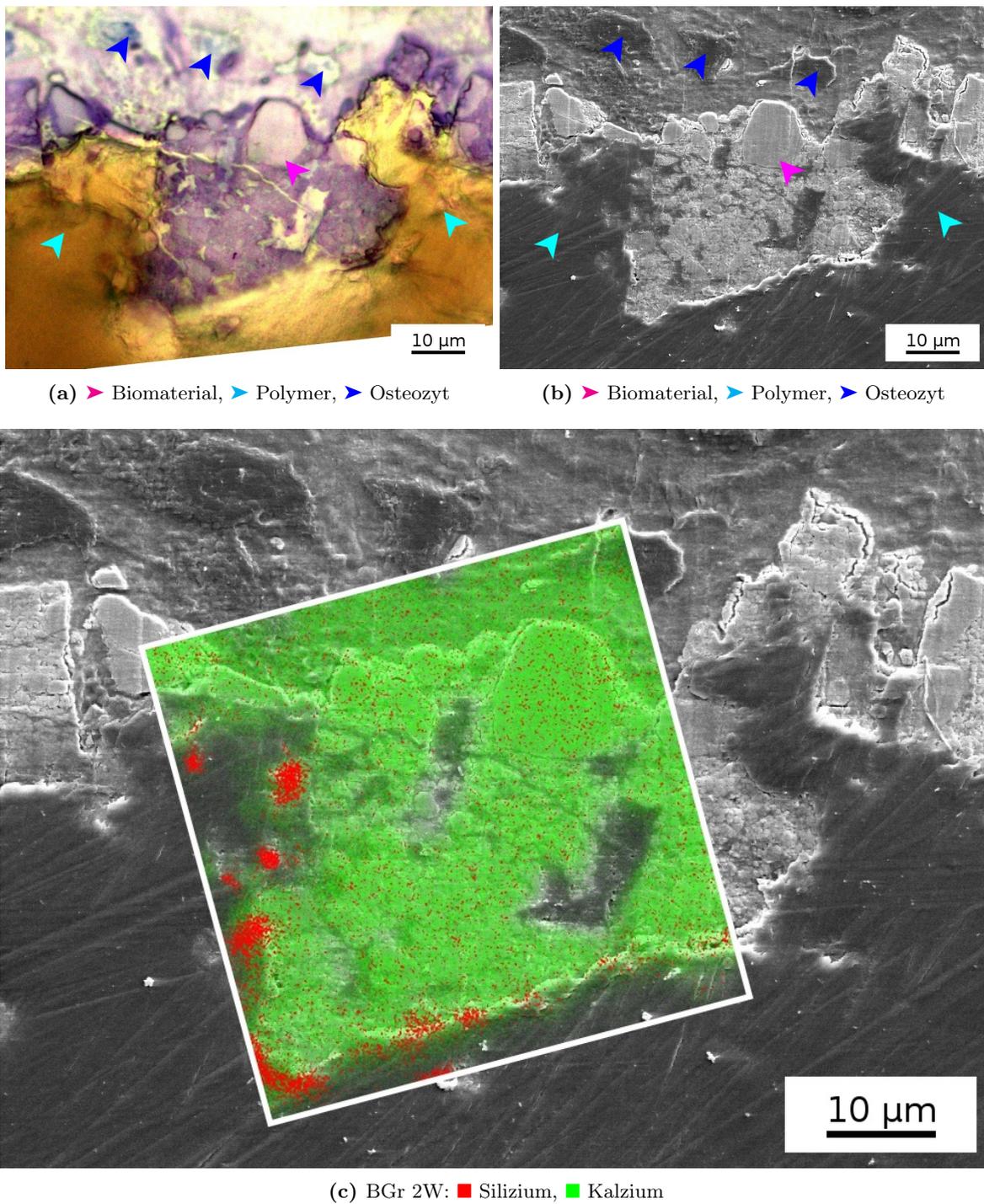


Abb. 5.23.: Die Abbildungen zeigen den selben Ausschnitt eines 2 Wochen Präparates der *in vivo* Studie sowohl als lichtmikroskopische (a) als auch elektronenmikroskopische Aufnahme (b). In Abbildung (c) ist in dem farbigen Bereich eine EDX-Flächenanalyse dargestellt. Die EDX-Analyse stellt den Silizium- und Kalziumgehalt dar.

5.6.4. Histomorphometrische Auswertung

Für eine statistische Erfassung der Ergebnisse der Studie wird an den Präparaten der Knochen-Implantat-Kontakt (BIC) gemessen. Für die Kontrollgruppe ist die Abgrenzung zwischen Implantat oder organischem Gewebe eindeutig, da sich das Implantat durch seine deutlichen Konturen stark hervorhebt. In der Beschichtungsgruppe ist die Definition nicht so deutlich, da durch die feine aufgeraute Struktur des Polymers und der integrierten Pulverpartikel des Biomaterials eine komplexe Oberflächengeometrie entstanden ist. Um die semiautomatische Auswertungssoftware Axiovision anwenden zu können, werden die Implantate in den Aufnahmen durch Helligkeit- und Kontrastregelungen oder vollständiges Schwarzfärben des Implantates aufgearbeitet. Für die beschichteten Implantate wird das aufgetragene Biomaterial als Teil des Implantates gewertet. Die Abbildungen 5.24(a) und (b) zeigen einen exemplarischen Ausschnitt eines beschichteten Implantates vor und nach der Aufarbeitung für die histomorphometrische Auswertung.

Die Spalten in der aufgetragenen Biomaterialsschicht, die auch bereits in Abschnitt 5.5.4 erwähnt wurden, sind auf den histologischen Präparaten deutlich wahrnehmbar. Die Abbildungen 5.25(a) und (b) zeigen Ausschnitte eines Implantates mit beschichteter Oberfläche (■) und Bereiche mit fehlerhafter Beschichtung (■). Die Bereiche ohne Beschichtung werden aus der BIC-Messung herausgenommen, da aus ihnen keine Information zum Einfluss der Beschichtung entnommen werden kann.

Das Diagramm in Abbildung 5.26 zeigt das Ergebnis der BIC-Messung. Auf der Abszissenachse sind die Standzeiten, 2, 4 und 6 Wochen, aufgetragen. Die Ordinate gibt den prozentualen BIC wieder.

Alle Werte der BGr sind größer als die dazugehörigen Werte der KGr. Nach 2 Wochen liegt der Wert der BGr bei 51 %, gegenüber einem Kontrollwert von 35 % ($p < 0,05$). Nach 4 Wochen gibt es keine signifikante Diskrepanz zwischen den Werten der beiden Gruppen

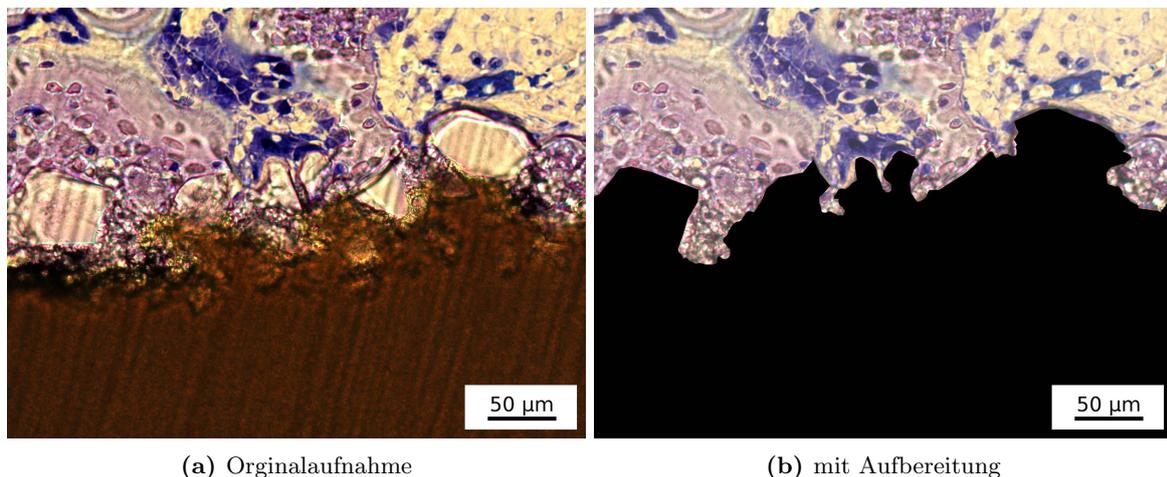


Abb. 5.24.: Die Abbildung verdeutlicht die digitale Aufbereitung der beschichteten histologischen Präparate zur Erfassung des BICs. Der exemplarische Ausschnitt (a) ist vor der Aufarbeitung und in Abbildung (b) danach.

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

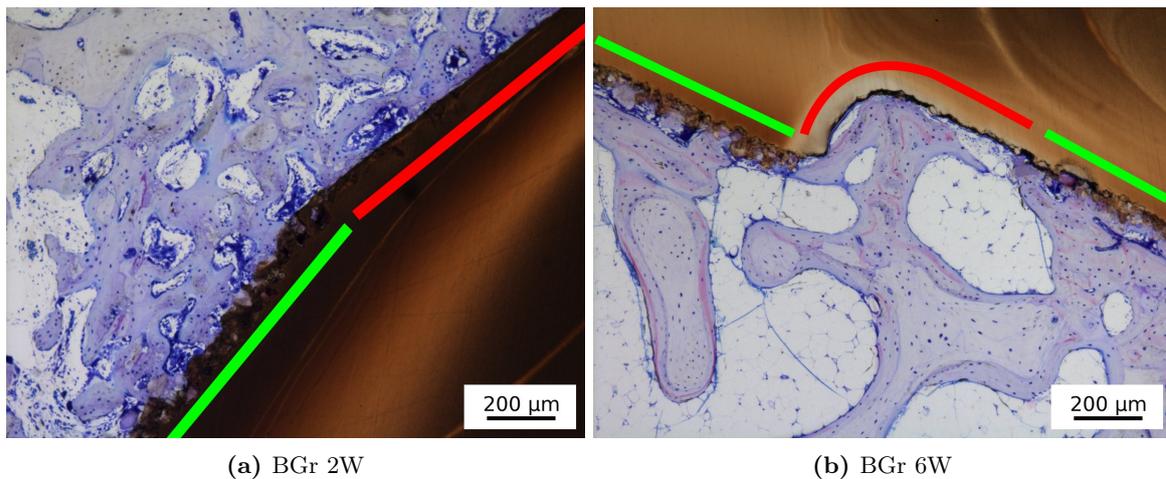


Abb. 5.25.: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit fehlerhaften Bereichen (■) in der Beschichtung (■) der Implantate der PEEK-Studie.

(KGr: 43 %; BGr: 50 %; $p > 0,1$). Nach 6 Wochen ist wieder eine annähernd gleiche Diskrepanz (KGr: 45 %; BGr: 59 %; $p < 0,01$) wie nach 2 Wochen zwischen den Gruppen zu messen.

Die Werte der KGr steigen mit der Zeit an, wobei aber nur zwischen dem 2 und 6 Wochenwert eine signifikante Diskrepanz vorliegt ($p < 0,05$). In der BGr gibt es so gut wie keine Veränderung zwischen 2 und 4 Wochen (2W: 51 %; 4W: 50 %; $p > 0,1$). Der Wert nach 6 Wochen zeigt nur gegenüber dem 4 Wochenwert eine deutliche Diskrepanz (2W: 51 %; 6W 59 %; $p > 0,1$ und 4W: 50 %; 6W 59 %; $p < 0,1$).

Die im Text mit angegebenen p -Werte, welche die Signifikanz zwischen den Diskrepanzen symbolisieren, werden jeweils durch einen WELCH-Test ermittelt.

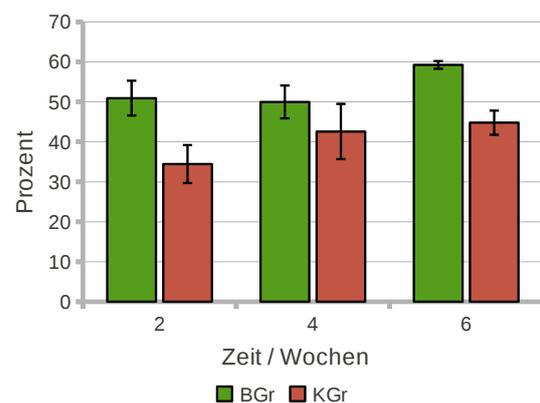


Abb. 5.26.: Ergebnis der BIC-Auswertung der *in vivo* Studie mit den pulverbeschichteten Implantatmodellen. Unterteilung des Diagramms in Beschichtungs- (BGr) und Kontrollgruppe (KGr) für 2, 4 und 6 Wochen.

5.7. Diskussion (PEEK)

5.7.1. Reproduzierbarkeit der Pulverbeschichtung

Der Beschichtungsprozess weist eine hohe Fehlerquote im makroskopischen Bereich auf. Als solche Fehler zählen zu starke Verformungen der Modellimplantate durch zu hohe Temperaturen und unvollständige Beschichtungen durch zu geringe Temperaturen. Durch die Verfor-

mung verliert das Implantat die Widerhakenstruktur. Bei zu starker Verformung kann das Implantat nicht mehr mit dem vorgesehenen Bohrset eingesetzt werden, aufgrund der Abweichung zwischen Bohrloch und Implantatform. Durch die zu geringen Temperaturen kann das Polymer nicht ausreichend aufgeschmolzen werden. Somit kann auch kein Verbund mit dem Biomaterial entstehen.

Durch einen uniaxialen Druck kann die Reproduzierbarkeit deutlich verbessert werden. Dabei werden die lockeren Partikel des Biomaterials zu einer negativen Implantatform verdichtet. Diese Form gibt dem aufschmelzenden Polymer eine Eingrenzung, die deutlich die makroskopischen Verformungen des Kunststoffes (s. Abb. 5.10(b)) eindämmt. Bei der Verdichtung der Pulverpartikel können jedoch auch Hohlräume und Inhomogenitäten entstehen, die trotz der Partikelkompression zu Fehlern in der Beschichtung führen. Des Weiteren kann die Verdichtung nicht innerhalb der reinen Umgebung der Flowbox automatisiert werden. Die Verdichtung wird nur durch eine manuelle Krafteinwirkung von etwa 10 bis 50 N erzielt. Die Schwankungen in der Krafteinwirkung sind somit ein grundlegendes Problem für die Reproduzierbarkeit und müssen für groß angelegte Produktionsstätten automatisiert werden. Dadurch kann auch der Druck der Kompression erhöht werden, was zu einer noch besseren Eingrenzung führen würde.

Ein weiteres Problem für die Reproduzierbarkeit der Beschichtung stellt die Herstellung der Implantate dar. Das dübelartige Widerhakensystem wird semiautomatisch an einer Drehbank erzeugt. Das Gewinde zur Fixierung des Implantates wird anschließend eingearbeitet. Geringe Toleranzen in der Position oder dem Winkel der Gewindebohrung führen zu deutlichen Lageunterschieden der einzelnen Implantate in der Induktionsform. Das hat zur Folge, dass sich die Implantatposition in dem inhomogenen Temperaturfeld ändert und auch die Dicke der verdichteten temperaturisolierenden Partikel um das Implantat variiert.

Im Nanometerbereich treten Schwankungen in der Beschichtung auf. Die TEM-Aufnahme in der Abbildung 5.16(a) (S. 80) zeigt Abstufungen in der Polymer-Biomaterial-Verbindung. Dieser Gradient ist nicht bei allen Pulverpartikeln zu finden. Stellenweise treten auch starke Kontraste zwischen den beiden Materialien auf, die davon zeugen, dass kein direkter Verbund stattgefunden hat. Auch die EDX-Flächenanalyse (s. Abb. 5.23(c) auf S. 88) zeigt solche Inhomogenitäten in der Siliziumspur im Grenzbereich zwischen Polymer und Biomaterial. Diese Inhomogenitäten können auch ein Indiz für den Grad der Polymer-Biomaterial-Verbindung sein. Je mehr Silizium vorhanden ist, desto stärker ist der Bereich mit dem Kunststoff durchdrungen und desto stärker wird der Matrixwechsel behindert.

In wie weit die Schwankungen im Nanometerbereich überhaupt eine Rolle für die Zelladhäsion spielen und ob sie überhaupt beeinflussbar sind, müssten weitere Untersuchungen und Studien klären. Auf makroskopischer Ebene konnte jedoch durch die Verdichtung des Pulvers die Reproduzierbarkeit der Beschichtung auf etwa 50 bis 80 % heraufgesetzt werden. Die fehlerhaft beschichteten Implantate werden aussortiert, was wiederum zu einer Erhöhung der Gesamtproduktion führt. Trotz der Verbesserung der Beschichtungstechnik zeigen sich in den histologischen Dünnschliffpräparaten Fehlstellen in der Schicht (s. Abb. 5.25 auf S. 90). Diese Fehlstellen werden aus der histomorphometrischen Auswertung ausgeschlossen. Diese unzureichend beschichteten Stellen offenbaren sich erst in der histologischen Auswertung, da sie zum einen nur wenige μm groß sind und zum anderen unter angepressten Pulverpartikeln verborgen liegen. Diese Pulverpartikel lockern sich zum Beispiel erst durch die mechanische Beanspruchung während der Operation.

5.7.2. Nanostrukturierte Polymeroberfläche

In der TEM-Aufnahme in der Abbildung 5.16(a) (S. 80) wird eine etwa 500 nm dicke Schicht abgebildet. Die NanoBone[®]-Pulverpartikel haben eine etwa 1 bis 2 Größenordnungen höhere Abmessung (s. Abb. 5.6(a) auf S. 70). Es ist davon auszugehen, dass sich im Übergangsbereich zwischen Polymer und Biomaterial ein Gradient ausbildet. Durch die hohe mechanische Belastung beim Anfertigen der TEM-Proben kommt es unweigerlich zu einem Abbrechen des spröden Biomaterials. Im Bereich dieser 500 nm Zone ist das Polymer so sehr mit dem Biomaterial verbunden, dass ein Herausbrechen verhindert wird. Innerhalb dieser 500 nm Zone ist die Beschichtung sehr stark mit dem Polymer durchzogen. Für Bereiche mit größerer Entfernung nimmt der Polymeranteil ab. Die Arretierung durch das Polymer reicht für diese größeren Entfernungen nicht mehr aus und die Pulverpartikel mit feinen Polymeradern reißen bei der Präparation ab.

Diese Verbundzone zwischen Polymer und Biomaterial spiegelt sich auch in den EDX-Analysen (s. Abb. 5.22 und im Anhang Abb. A.4 und A.5) wieder. Im Grenzbereich sinkt der prozentuale Kalziumanteil, weil der Kohlenstoffanteil steigt. Das Polymer dringt in das Biomaterial ein und adaptiert die nanostrukturierte Oberfläche der NanoBone[®]-Partikel. Diese Annahme wird auch durch die Abbildung 5.14(b), in der die Beschichtung wieder herausgelöst wurde, gestützt. Unter der Berücksichtigung, dass die Kapillarkräfte die feinste Polymerstruktur während des Trocknungsprozesses zerstört hat, ist von einer Oberflächenmorphologie auszugehen, die noch feiner ist als die in Abbildung 5.14(b) dargestellte.

5.7.3. Verbesserung der Osseointegration

Im folgenden Abschnitt wird der eventuell positiv eingetretene Effekt auf die Osseointegration diskutiert. Dabei werden die Ergebnisse der BIC-Messung und die Untersuchungen bezüglich des Matrixwechsels die Argumentation untermauern.

Verbesserung des BIC

Die Messung des BIC zeigt besonders für 2 und 6 Wochen eine signifikante Diskrepanz zwischen den beiden Versuchsgruppen: Kontrollgruppe (KGr) und Beschichtungsgruppe (BGr). Zu allen Zeitpunkten ist der BIC-Wert der BGr größer als der entsprechende Wert der KGr. Dieses Resultat ist eindeutig auf die osteoinduktiven Eigenschaften des Beschichtungsmaterials zurückzuführen. Diese Wirkungsweise zeigte sich auch im ersten Teil dieser Arbeit (s. Abschn. 4.4.3) und wurde auch in früheren Studien dokumentiert [110,153,154]. Die Beschichtung führt gerade in der frühen Osseointegrationsphase zu einer Verbesserung des BICs, der wiederum zu einer Verstärkung des einfassenden Knochenlagers führt, was somit die Lücke zwischen primärer und sekundärer Implantatstabilität reduziert.

Somit stellt die Beschichtung eine gute Alternative zu Proteininjektionen dar, die gelegentlich zu unkontrollierten Knochenwucherungen führen können [122,155], was besonders in der Nähe der Nervenkanäle in der Wirbelsäule fatale Folgen haben kann.

Erzeugung einer Oberflächenrauigkeit

Durch den Beschichtungsprozess adaptiert das Polymer die inverse Formgebung der Pulverpartikel. Dadurch entsteht eine nanostrukturierte Polymeroberfläche, deren Fasern und

Adern das Biomaterial durchziehen (s. Diskussionspunkt 5.7.2). Zum einen soll diese Struktur das Ansiedeln von Osteoklasten direkt auf der Implantatoberfläche verhindern, zum anderen führt diese Struktur aber auch zu einem generellen Aufrauen der Implantatoberfläche. Für Titanimplantate gibt es viele Studien die eine Verbesserung der Osseointegration durch raue Oberflächen dokumentieren. So wird zum Beispiel das Ausdrehmoment (*removal torque test*) durch eine raue Implantatstruktur gesteigert [156, 157]. Ebenso wird die Verbesserung der Zelladhäsion und Proliferation von Osteoblasten diesen Strukturen zugeschrieben [158]. Diese Effekte sind auf die Topologie der Oberfläche zurückzuführen. Das bedeutet, sie sollten auch auf Polymerimplantate zu beobachten sein. Damit bringt allein das Aufrauen der Oberfläche der PEEK-Implantate eine Verbesserung der Osseointegration mit sich.

Verbesserung der Zelladhäsion

Das Beschichtungsmaterial ist resorbierbar. Das bedeutet, es wird im Laufe der Zeit vollständig abgebaut. Dieser Prozess wird durch den natürlichen Vorgang des Knochenremodellings umgesetzt. Die an diesem Prozess beteiligten Osteoklasten sorgen somit auch dafür, dass das Beschichtungsmaterial abgebaut wird. Dadurch wird die Beschichtung, welche auf die Implantatoberfläche aufgetragen wurde, wieder entfernt. Das Endresultat wäre wieder eine Implantatoberfläche aus PEEK, auf der die Zellen schlecht adhäreren. Das würde die gesamte Beschichtung, abgesehen von einem Aufrauen der Oberfläche und der Verbesserung des BICs in der frühen Einheilphase, vollständig in Frage stellen. Die Ergebnisse der Untersuchungen bezüglich der entstandenen Verbindung zwischen Biomaterial und Polymer während der Beschichtung erfordern jedoch Korrekturen beziehungsweise Einschränkungen im Remodellingprozess des Beschichtungsmaterials.

Die Osteoklasten haben in etwa eine Größe von $100\ \mu\text{m}$ [11]. Sie setzen sich auf der Oberfläche von Knochen beziehungsweise auch NanoBone[®] (s. Abb. 4.26(b) auf S. 52) ab und stellen einen gesicherten Bereich mit ihrem Bürstensaum (*ruffled border*) her. In diesem Bereich werden die mineralischen Knochenanteile durch Salzsäure aufgelöst und als Phagozom abtransportiert (s. Abschn. 2.1.1 auf S. 3). Die organischen Anteile, wie zum Beispiel die Kollagenfasern, werden durch Enzyme zersetzt.

Eine theoretische Überlegung zu der guten Resorbierbarkeit⁴ des NanoBone[®]-Biomaterials geht davon aus, dass für einen schnellen Umbau des Biomaterials das Verhältnis zwischen Hydroxylapatit (HA) und organischem Gewebe entscheidend ist. Das bedeutet, wenn zu wenig organisches Material vorhanden ist, kann der Resorptionsprozess nicht oder nur sehr langsam ablaufen. Durch den Verbund im Nanometerbereich, der entsteht wenn das geschmolzene Polymer in die Nanoporen von NanoBone[®] eindringt (s. Abb. 5.16(a) auf S. 80), bildet sich eine raue Polymeroberflächenstruktur, bedingt durch die Korngrößen des Beschichtungspulver. Dieses Polymergeflecht ist etwa eine Größenordnung kleiner als die Osteoklasten. Das Polymer PEEK kann durch Zellaktivität nicht angegriffen werden. Den Osteoklasten ist es dadurch nicht möglich in diese Struktur einzudringen oder sie zu verändern. Theoretisch sind die Zellen dadurch nur in der Lage, für die obersten Ebenen der Beschichtung den abgesicherten Bereich aufzubauen und das Biomaterial aufzulösen. Hinzu kommt durch das Eindringen des Polymers eine Beeinflussung des Verhältnisses zwischen dem organischen und dem mineralischen Material, was die Resorbierbarkeit beeinträchtigt. Es ist davon auszugehen, dass in

⁴ im Vgl. zu gesinterten HA-Keramiken

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

dem 500 nm Verbundbereich zwischen Polymer und Biomaterial die Schicht durch die raue Polymerstruktur und dem Missverhältnis zwischen organischem und mineralischem Gewebe nicht abgebaut werden kann.

Osteoblasten, die sich dann zu Osteozyten (ca. 20 μm) umwandeln, sind eine Größenordnung kleiner als Osteoklasten. Sie können somit tiefer in die raue Implantatstruktur eindringen und eine direkte Verbindung mit den unteren Lagen der Beschichtung, die nicht aufgelöst wurden, eingehen. Basierend auf dieser theoretischen Überlegung kommt es zu keinem Zell-Polymer-Kontakt, womit das Problem der schlecht adhätierenden Zellen umgangen wäre.

Diese Theorie kann durch die *in vivo* Studie nicht überprüft werden, da der Remodellingprozess der Beschichtung nach 6 Wochen nicht abgeschlossen ist. Dieser Umbauprozess für NanoBone[®]-Partikel dieser Größe braucht Monate. Um diesen Prozess zu untersuchen, müssen Langzeitstudien durchgeführt werden, die den zeitlichen Rahmen für einen vollständigen Umbau des Biomaterials ermöglichen.

Einschränkung des Matrixwechsels

Die Theorie zur Lösung des Problems der Zelladhäsion kann in der *in vivo* Studie nicht bestätigt werden, da der Untersuchungszeitraum zu kurz gewählt ist. Dafür kann aber ein Teil des Remodellingprozess untersucht werden, der Matrixwechsel (s. Abschn. 2.3.6), der den Remodellingprozess einleitet.

Das bedeutet, die Untersuchung des Matrixwechsels könnte Indizien für den Ablauf des gesamten Remodellingprozesses liefern.

In der Studie von PUNKE et al. [43] wurde der Matrixwechsel an Meerschweinchen untersucht, denen NanoBone[®]-Granulat mit einem Partikeldurchmesser von etwa 600 μm implantiert wurde. Dabei zeigte sich, dass nach 2 Wochen der Umbau des Siliziums zu organischem Material vollständig abgeschlossen war.

Nach ROBERTS [9] besteht ein Zusammenhang zwischen der Größe eines Säugetiers und dem Stoffwechsel (s. Tab. 3.2 auf S. 19). Vergleicht man die Größen-Stoffwechsel-Verhältnisse der untersuchten Säugetiere aus dieser Studie, lässt sich daraus in grober Näherung ein 2 bis 3 mal so schneller Stoffwechsel für Meerschweinchen (gegenüber Kaninchen) ableiten. Berücksichtigt man zusätzlich die Größenunterschiede der NanoBone[®]-Partikel in der Studie von PUNKE et al. und die der PEEK-Beschichtung, sowie die eingeschränkte Zugänglichkeit durch die teilweise vorliegende Polymereinfassung (s. Abb. 5.27), kann eine Abschätzung über die Dauer des Matrixwechsels vorgenommen werden.

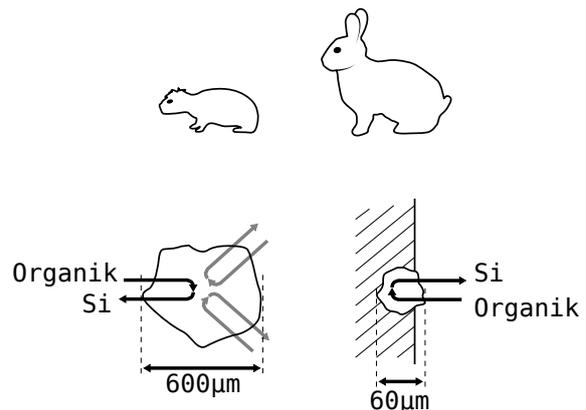


Abb. 5.27.: Schematische Veranschaulichung des Stoffwechselfaktors auf Basis der Tiergröße, des Partikelgrößen- und Transportwegfaktors für den Vergleich des Matrixwechsels zwischen der Studie mit Meerschweinchen [43] und der Studie mit Kaninchen (Teil dieser Arbeit).

Stoffwechselfaktor	ca. 2 bis 3
Partikelgrößenfaktor	ca. 0,1
Transportwegfaktor	ca. 2

Daraus ergibt sich theoretisch ein abgeschlossener Matrixwechsel für den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Test mit PEEK-Implantatmodellen nach etwa 6 bis 8 Tagen. Die EDX-Analysen aus Abschnitt 5.6.3 zeigen aber deutliche Siliziumspuren auch noch nach 2 und 4 Wochen. Die Positionen der Analysen und auch das EDX-Mapping zeigen aber auch, dass nur im Grenzbereich zwischen Polymer und Biomaterial Silizium zu finden ist. Das bedeutet, dass das Polymer, welches die Nanostruktur vom NanoBone[®] adaptiert hat und etwa 0,5 bis 1,0 μm tief in das Biomaterial eingedrungen ist, den Matrixwechsel signifikant behindert. Durch die Polymernanostruktur wird das Eindringen von Proteinen erschwert und der Abtransport von Silizium gestört. Nach 6 Wochen ist auch im Grenzbereich kein Silizium mehr zu finden. Das bedeutet, dass der Matrixwechsel nur behindert, aber nicht vollständig deaktiviert wird.

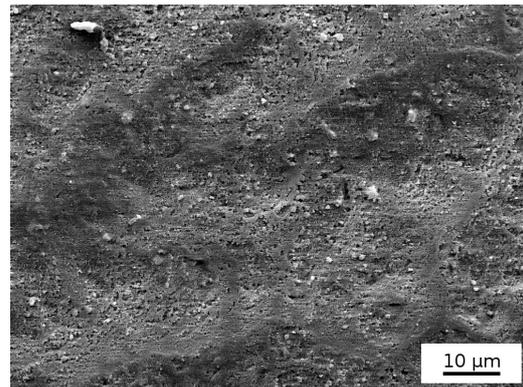
In wie weit diese Einschränkung Einfluss auf den weiteren Verlauf des Remodellingprozess hat, kann durch diese *in vivo* Studie nicht geklärt werden.

5. Modellimplantat aus Polyetheretherketon (PEEK)

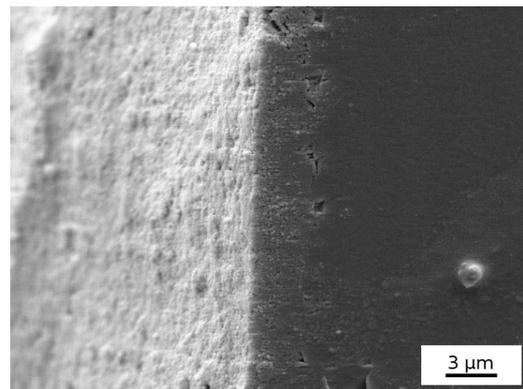
6. Zusammenfassung und Ausblick

Diese interdisziplinäre Arbeit untersucht die Anwendbarkeit und Verbesserungsmöglichkeiten der Osseointegration an zwei Modellimplantaten, offenporiges Metallschaumimplantat und Polyetheretherketon-Implantaten. Für die Realisierung der *in vitro* und *in vivo* Studien erfolgt eine sehr enge Zusammenarbeit mit der Mund-Kiefer-Chirurgie (MKG, Rostock) und dem Institut für experimentelle Chirurgie und zentrale Versuchstierhaltung.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird die Entwicklung eines Modells für orthopädische Implantate mit interkonnektierendem Porensystem beschrieben. Das Porensystem der Modellimplantate ermöglicht das Hineinwachsen des Knochens in diese Struktur für eine gewinde- und zementfreie Implantatfixierung. Auf dieses Modellimplantat wird zusätzlich eine NanoBone[®]-Beschichtung angewendet, um die Osseointegration zu verbessern. Die Beschichtung beruht auf dem Sol-Gel-Prozess. Die Beschichtungslösung wird in einem Nass-Sprüh-Verfahren auf den Modellimplantaten aufgetragen. Für eine homogene Beschichtung dieser offenporigen Struktur ist eine hydrophile Oberfläche zwingend notwendig. Die beschichteten Implantate werden im Vergleich mit einer Kontrollgruppe und einer Implantatgruppe nur mit hydrophiler Oberfläche für 4 und 12 Wochen in den distalen Femur von NEW ZEALAND Kaninchen implantiert. Die statistische Erfassung der Einwachstiefe des Knochens in die offenporige Struktur erforderte die Einführung eines Zonenmodells, bei dem jede Zone eine bestimmte Einwachstiefe widerspiegelt. In der Auswertung der *in vivo* Studie zeigt sich sowohl für die Kontrollgruppe als auch die beschichtete Gruppe ein geringeres Knochenwachstum im Inneren der Modellimplantate. Die hydrophile Gruppe wird nicht näher untersucht, da sich in Vorabauswertungen keine signifikanten Diskrepanzen zur Kontrollgruppe ergeben. Durch den Einfluss der Beschichtung wird der Knochen-Implantat-Kontakt signifikant



(a)



(b)

Abb. 6.1.: (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines beschichteten Cages nach dem Spray-Spin-Verfahren. (b) Querschnitt eines beschichteten Cages.

6. Zusammenfassung und Ausblick

verbessert. Die Knochenfläche bleibt jedoch nahezu konstant. Daraus folgt, dass die Beschichtung durch den normalen Knochenremodellingprozess zu dünnen Knochenschichten umgebaut wird. Zusätzlich zeigt sich durch die Beschichtung eine erhöhte Ausbildung von Adipozyten im Inneren des Implantates.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird die Entwicklung einer NanoBone[®]-Pulverbeschichtung auf Polyetheretherketon (PEEK)-Implantaten beschrieben. Die Beschichtung soll das Gewebe-PEEK-Interface verbessern. Die PEEK-Implantate werden vorab als Modell, in Anlehnung an Cages (Platzhalterimplantat für die Wirbelfusionierung) entwickelt. Die durchgeführten Untersuchungen zum Beschichtungsvorgang zeigen, dass das Polymer die Nanostruktur des Biomaterials während der Beschichtung adaptiert. Die beschichteten Modellimplantate werden ebenfalls im Femur von NEW ZEALAND Kaninchen implantiert. Da das Biomaterial mit der Zeit abgebaut wird, soll die *in vivo* Studie untersuchen, in wie weit die neue Nanostruktur des Polymers den Abbau des Biomaterials einschränkt. Die Auswertung bestätigt eine Einschränkung, die durch den verzögerten Matrixwechsel belegt wird. Zusätzlich verbessert die Beschichtung durch ihre osteoinduktive Wirkung den Knochen-Implantat-Kontakt um rund 10 %. Dadurch wird insgesamt durch die osteoinduktive Wirkung der Beschichtung, das Aufrauen der Implantatoberfläche und der Veränderung des Gewebe-Implantat-Interfaces ein positiver Effekt auf die Osseointegration ausgeübt.

Als Ausblick wird an dieser Stelle eine Kombination beider Beschichtungsverfahren angedacht. Da die aktuelle Wirtschaft und Forschung momentan sehr geprägt ist durch die Entwicklung von dreidimensionalen Druckanlagen, wird es in naher Zukunft keine Hürde sein, beliebige PEEK-Implantate mit einem interkonnektierenden Porensystem herzustellen. Der Druckprozess für Polymere basiert in der Regel auf einem Aufschmelzen der aufzutragenden Masse. Durch eine Integration der Beschichtung in den Druckprozess könnte theoretisch ein beschichtetes PEEK-Implantat gedruckt werden. Da sich das Spin-Spray-Coating-Verfahren präziser ausrichten und anwenden lässt, werden auch erste Versuche dazu durchgeführt. Die Abbildung 6.1(a) zeigt die Oberfläche eines PEEK-Implantates nach einer Beschichtung im flüssigen Sprühnebel. Die Schichthftung für diese Beschichtung liegt bei einem Druck p von etwa 2,4 MPa. Damit so eine Schicht auch eine FDA Zulassung bekommt und außerdem das Zell-PEEK-Interface auch dauerhaft verbessert, ist es notwendig, wieder eine permanente Verbindung zwischen Polymer und Schicht zu erzeugen. Dieser Schritt wird durch die Integration eines kleinen Rohrofens in die Beschichtungsanlage realisiert. In der Abbildung 6.1(b) ist ein Querschnitt dieser Beschichtung dargestellt, die den Verbund zwischen Polymer und Biomaterial nach der Temperaturbehandlung zeigt.

A. Anhang

A.1. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
BGr	beschichtete Gruppe
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
engl.	englisch
HGr	hydrophile Gruppe
i. E.	internationale Einheit
i. M.	intramuskuläre Injektion
KGr	Kontrollgruppe
s. Abb.	siehe Abbildung
s. Abschn.	siehe Abschnitt
s. Diagr.	siehe Diagramm
s. Kap.	siehe Kapitel
s. Tab.	siehe Tabelle
u. a.	unter anderem
Vgl.	Vergleich

A.2. Fachbegriffe

Begriff	Bedeutung
<i>ante mortem</i>	lateinisch für: vor dem Tod
BA	Knochenfläche (engl.: bone area)
BIC	Knochen-Implantat-Kontakt (engl.: bone-to-implant-contact)
hydrophil	altgriechisch für: Wasser liebend
hydrophob	altgriechisch für: Wasser fürchtend
<i>in vitro</i>	lateinisch für: im Glas
<i>in vivo</i>	lateinisch für: im Lebendigen
<i>post mortem</i>	lateinisch für: nach dem Tod

A.3. Ergänzende Abbildungen

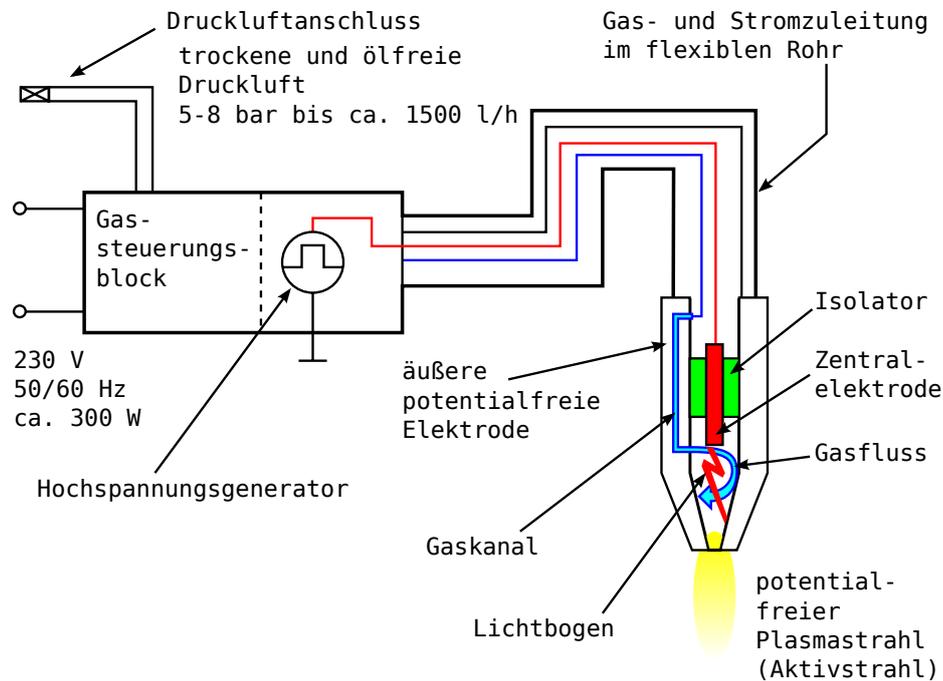


Abb. A.1.: Technische Skizze der verwendeten atmosphärischen Plasmajetanlage Plasma Beam (diener electronic GmbH) [27].

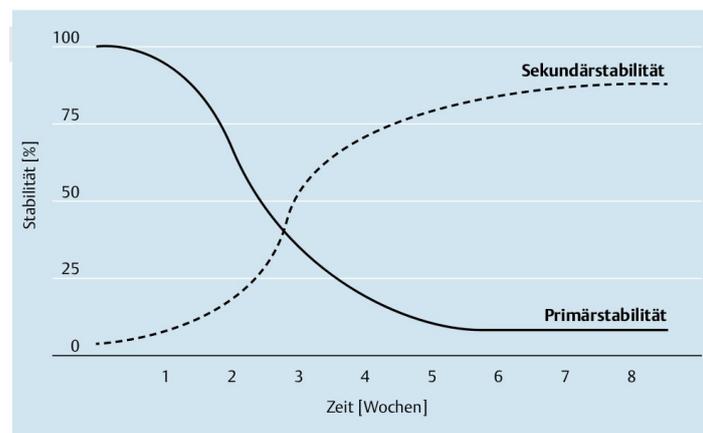


Abb. A.2.: Entwicklung der Primärstabilität (durchgezogene Linie) und der Sekundärstabilität (gestrichelte Linie) bei der Implantatheilung [17]. Die Primärstabilität entsteht durch die mechanische Verankerung des Implantat im erzeugten Bohrloch oder Defekt durch die Wirkung eines Gewindes oder Knochenzementes. Die Sekundärstabilität entsteht durch eine sich neu ausbildene Knochenhülle, die das Implantat einfasst.

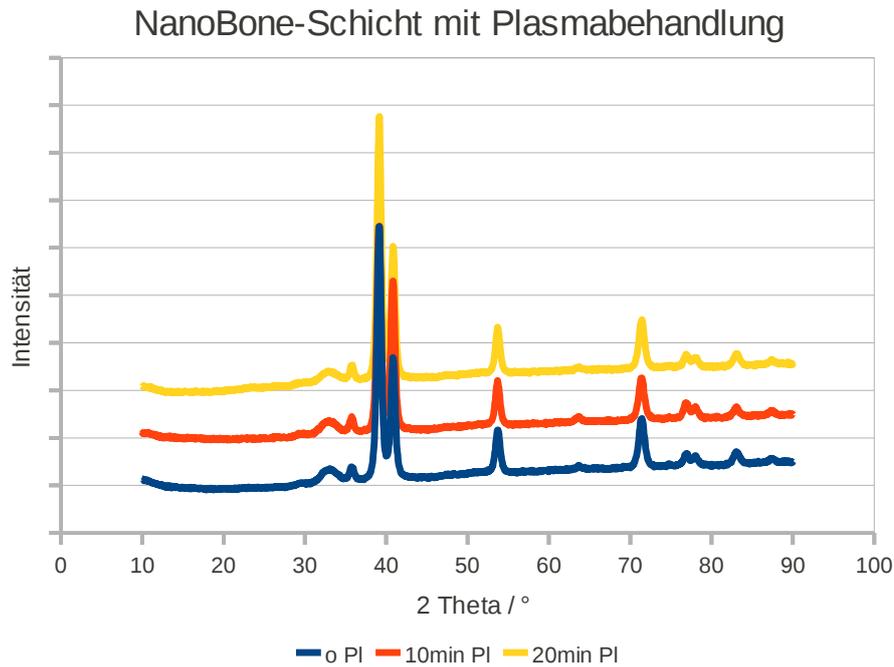
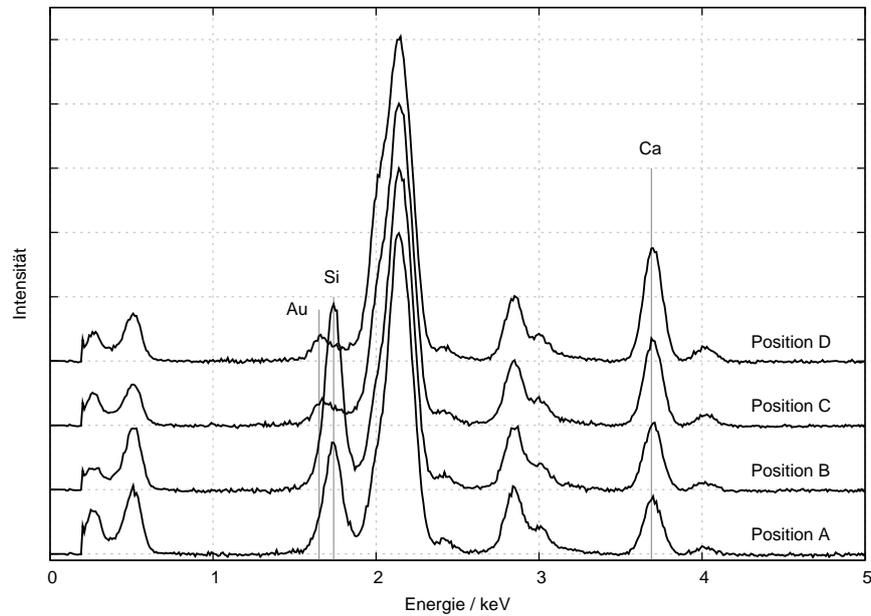
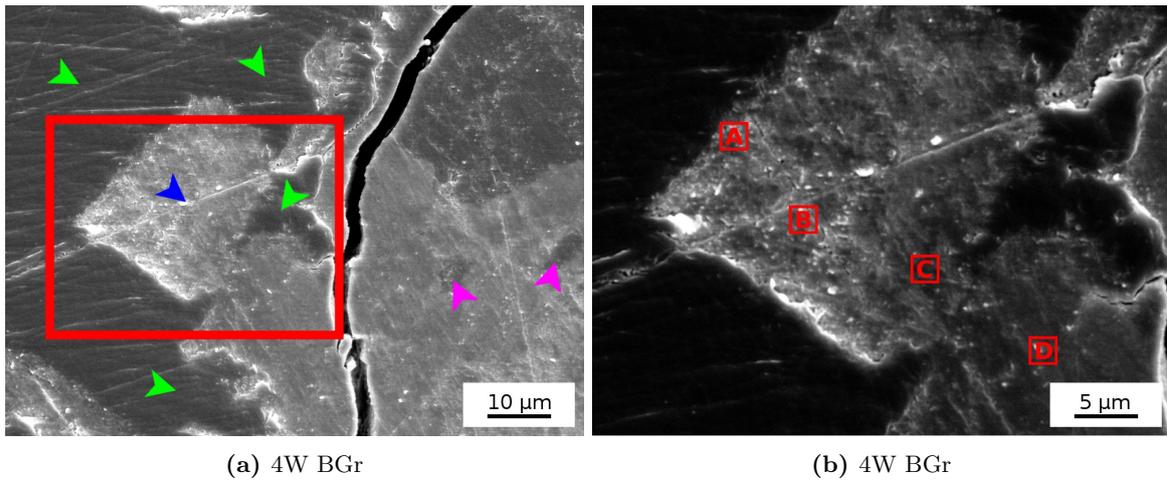


Abb. A.3.: Die mit NanoBone[®]-Dispersion beschichtete Titanscheiben zeigen keine Strukturänderungen in der Schicht nach einer Niederdruckplasmabehandlung.

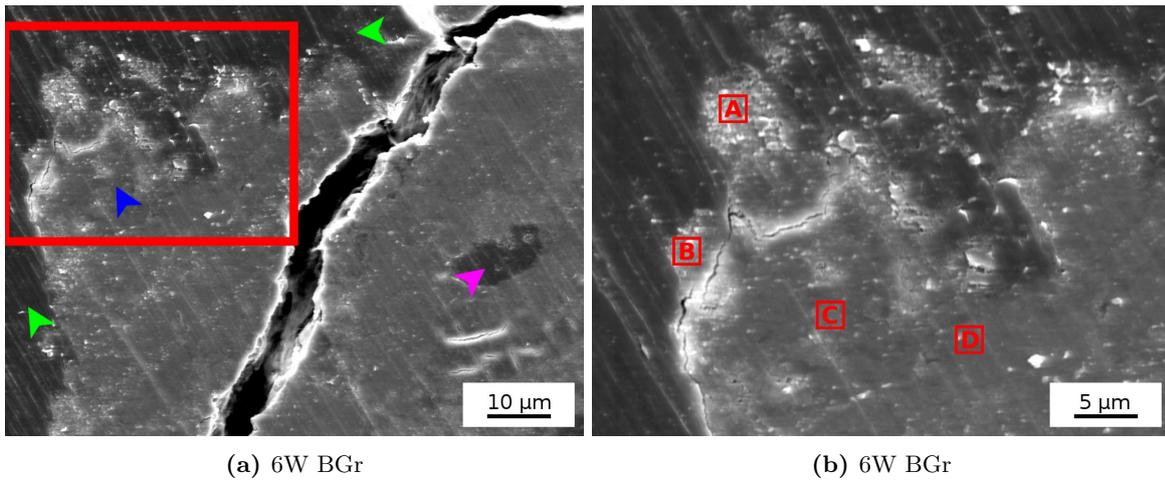
Tab. A.1.: Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der BIC- und BA-Messungen nach dem Outlinemodell und dem Zonenmodell mit der Abgabe der zugehörigen Standardabweichung vom Mittelwert.

<i>Outlinemodell BIC</i>				
Zeit/Wochen	KGr	BGr	HGr	
4	36,2 ± 1,7	44,0 ± 2,6	33,8 ± 1,6	
12	36,6 ± 1,8	51 ± 4	36,7 ± 1,3	
<i>Zonenmodell BIC</i>				
Zeit/Wochen	KGr-Mantel	KGr-Kern	BGr-Mantel	BGr-Kern
4	35,9 ± 2,2	20 ± 4	45,3 ± 2,4	30,1 ± 1,8
12	31,2 ± 1,1	16 ± 4	44,6 ± 2,8	41 ± 5
<i>Zonenmodell BA</i>				
Zeit/Wochen	KGr-Mantel	KGr-Kern	BGr-Mantel	BGr-Kern
4	34,8 ± 2,8	12,3 ± 2,6	32 ± 5	13,7 ± 1,6
12	27,8 ± 2,0	8,1 ± 1,9	33 ± 5	18 ± 4



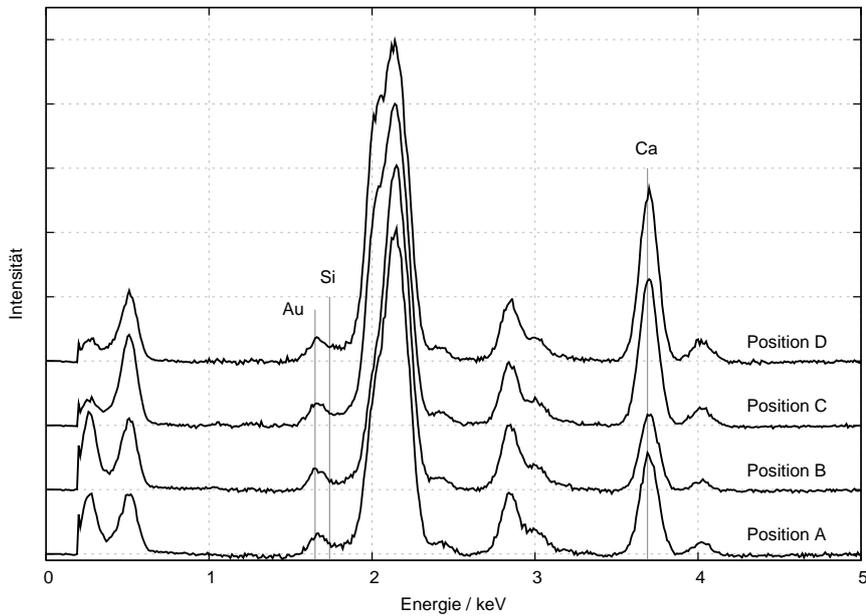
(c) 4W BGr

Abb. A.4.: (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines beschichteten Implantates aus der *in vivo* Studie nach 4 Wochen. Das Biomaterial (▶), welches mit der PEEK-Implantatoberfläche (▶) verbunden ist, wurde von Knochen umlagert, der durch die Osteozyten (▶) identifiziert werden kann.
(b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung (a) mit Markierungen die die Größe und Lage von EDX-Messungen wiedergeben.
(c) EDX-Spektrum zu den in Abbildung (b) markierten Positionen.



(a) 6W BGr

(b) 6W BGr



(c) 6W BGr

Abb. A.5.: (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines beschichteten Implantates aus der *in vivo* Studie nach 6 Wochen. Das Biomaterial (▶), welches mit der PEEK-Implantatoberfläche (▶) verbunden ist, wurde von Knochen umlagert, der durch die Osteozyten (▶) identifiziert werden kann.

(b) Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung (a) mit Markierungen die die Größe und Lage von EDX-Messungen wiedergeben.

(c) EDX-Spektrum zu den in Abbildung (b) markierten Positionen.

A.4. Verwendete Geräte, Materialien & Software

Geräte			
Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Land	Verwendung
AxioCam MRc5	Zeiss	Deutschland	Digitalkamera
Axioskop 40	Zeiss	Deutschland	Durchlichtmikroskop
Bone Management [®]	Hager & Meisinger GmbH	Deutschland	dentales Pilot- und Erweiterungsbohrset
Branson - Digi. Sonifier [®] 450	Branson Ultrasonics Corporation	USA	Ultraschall Homogenisierer
CARAT 106/E	fac AIR COMPRESSORS	Italien	Kompressor für Dentalanwendung, ölfrei, 5-7 bar
DSC 404C F1 Pegasus	NETZSCH-Gerätebau GmbH	Deutschland	dynamische Differenzkalorimetrie
DSM 960	Zeiss	Deutschland	Rasterelektronenmikroskop
ELTAC EK 18	Rommelspacher ElektroHausgeräte GmbH	Deutschland	Herdplatte
EM 912 OMEGA	Zeiss	Deutschland	Transmissionselektronenmikroskop
HeraSafe HSP12 (Klasse 2)	Heraeus	Deutschland	Laminar Flowbox
Janetzki KM-1		Polen	Kugelnähle
JEM-ARM200F	JEOL Ltd.	Japan	Transmissionselektronenmikroskop
LEICA EM UC6	Leica	Deutschland	Ultramikrotom
Nano PCCE	diener electronic GmbH	Deutschland	Niederdruckplasma
Plasma Beam	diener electronic GmbH	Deutschland	atmosph. Plasma
Skyscan 1172	Bruker-microCT	Belgien	µCT-Anlage
TIG 30/100	HÜTTINGER GmbH	Elektronik Deutschland	Induktionsgenerator

Materialien			
Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Land	Verwendung
Ammoniumhydrogencarbonat	M S Laborausstattung	Deutschland	Platzhalter für Titanschaum
Atropin	ratiopharm	Deutschland	zur Anästhesie
Essigsäure	SIGMA-ALDRICH®	Deutschland	HA auflösen
Ketamine	bela-pharm	Deutschland	zur Anästhesie
L929	ATCC LGC Standards	UK	Fibroblasten
MG-63	ATCC LGC Standards	UK	menschliche Osteosarkomazellen
Natronlauge	SIGMA-ALDRICH®	Deutschland	SiO ₂ -Matrix auflösen
New Zealand White Rabbit	Charles River Laboratories	Deutschland	Kaninchen für <i>in vivo</i> Studie
Novaminsulfon	ratiopharm	Deutschland	Analgetikum
Infectedillin	Infectopharm	Deutschland	Antibiotikum
Release®	Richter Pharma	Deutschland	zur Euthanasie
Rompun®	Bayer AG	Deutschland	zur Anästhesie
Titanpulver			
VESTAKEEP®	Evonik Degussa GmbH	Deutschland	PEEK-Granulat
Xylocitin-loc	Mibe GmbH	Deutschland	Analgetikum
Software			
Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Land	Verwendung
AxioVision 4.8	Zeiss	Deutschland	Software/ Präparate
Blender	Blender Foundation	Niederlande	Auswertung Erstellen von 3D-Modellen
DataViewer			
Gimp			
Matlab			

Abbildungsverzeichnis

2.1. Schematische Darstellung der Osteogenese mit Entstehungsprozess eines Harvers-Kanal	4
2.2. Kontaktwinkel eines Wassertropfens auf einer hydrophilen Titanoberfläche . .	6
2.3. IR-Spektrum einer Metalloberfläche vor und nach einer Behandlung mit atmosphärischem Plasma	7
2.4. Unterschied in der Benetzung zwischen hydrophober und hydrophiler PEEK-Oberfläche	8
2.5. Abbildungen von NanoBone [®] -Produkten	9
2.6. Schematische Darstellung der Partikelaggregation (Sol, Puder, Gel)	10
2.7. Diagramme mit Beeinflussung der Solstabilität und Gelatationszeit sowie Partikelgröße und Gelnetzwerk	11
2.8. Cluster-Cluster-Aggregation und Sierpinski-Pyramide mit fraktaler Struktur .	12
2.9. TEM: Aufnahme der synthetischen HA-Plättchenstruktur und WAXS Diagramm von synth. und humanen HA	13
2.10. Schematische Darstellung des Matrixwechsels	15
4.1. Phasendiagramm von TiO ₂ und Oxidationsenthalpien einiger Metalle	23
4.3. Schematische Darstellung der Transportwege von Materie für den Sinterprozess	24
4.2. Sinterschwindung des Titans in Temperaturabhängigkeit	24
4.4. Darstellung des Elastizitätsmodul für unterschiedliche Implantatmaterialien .	26
4.5. Technische Zeichnung mit den theoretischen Sollwerten des Titanimplantates	28
4.6. REM: Zwischenschritte der Herstellung des Implantatmodells aus Titanschaum	29
4.7. Diagramm mit endothermem DSC-Signal vom Herauslösen des Platzhalters .	30
4.8. 3D-Rekonstruktion des Titanschaumimplantates aus μ CT-Daten	31
4.9. Abbildung eines histologischen Dünnschliffes mit den Auswirkungen der Segregation auf die Porosität	32
4.10. Abbildung der Beschichtungsanlage	33
4.11. Histo und REM: Schlechte Beschichtung der Titanimplantate ohne Abkühlung	34
4.12. Diagramm mit der Abkühlrate eines Dentalimplantates aus Titan im laminaren Luftstrom der Flowbox	35
4.13. REM: Entstehung von Trocknungsrissen in der Beschichtung	36
4.14. Prozessdiagramm des gesamten Beschichtungsablaufes mit n=6 Wiederholungen.	36
4.15. Histo und REM: Übersichtsaufnahme und exemplarische Ausschnitte der Dicke und der Morphologie der Schicht am Rand und in der Mitte	38
4.16. TEM und REM: Aufnahme der Beschichtung	40
4.17. Übersicht der untersuchten Versuchsgruppen für das Titanschaumimplantat .	41
4.18. REM: Zellwachstum von L929 und MG-63 Zellen auf der Implantatoberfläche von der KGr, HGr und BGr nach 2 Tagen	42

4.19. Definition und Durchführung der Porenhalsdefinition	43
4.20. Schrittfolge für die Auswertung eines histologischen Dünnschliffpräparates . .	45
4.21. Histo: Anwendbarkeit und Nichtanwendbarkeit des Outlinemodells	47
4.22. Ergebnisse der Knochen-Implantat-Kontakt-Messung (BIC) für die Kontrollgruppe (KGr), die hydrophile (HGr) und die beschichtete Gruppe (BGr) nach dem Outlinemodell.	48
4.23. Ergebnisse der Knochen-Implantat-Kontakt- (BIC) und Knochen-Fläche-Messung (BA) für die Kontroll- (KGr) und Beschichtungsgruppe (BGr) nach dem Zonenmodell.	49
4.24. Histo: Vergleich zwischen Knochenlager und Spongiosa	51
4.25. Histo: Vergleich des Knochenlagers in der beschichteten und Kontrollgruppe nach 4 Wochen	52
4.26. Histo: Resorption des Biomaterials durch Osteoklastentätigkeit	52
4.27. Histo: Gewebebildung in den Poren im Implantatkern für beschichtete und Kontrollgruppe nach 4 Wochen	53
4.28. Histo: Makrophagenaufkommen in der beschichteten und Kontrollgruppe nach 4 Wochen	54
4.29. Histo: Vergleich des Knochenlagers in der beschichteten und Kontrollgruppe nach 12 Wochen	55
4.30. Histo: Gewebebildung in den Poren im Implantatkern für beschichtete und Kontrollgruppe nach 12 Wochen	56
4.31. Histo: Fehler in der histomorphometrischen Auswertung durch verstopfte Poren (mit Biomaterialschicht) und Fokusebene des Mikroskopes	58
4.32. Histo: Makrophagenaufkommen in der KGr, HGr und BGr nach 4 Wochen . .	59
4.33. Schematische Darstellung der Kontaktosteogenese mit und ohne Knochenwachstum von der Implantatoberfläche aus	60
4.34. Dia: Differenzierungsmöglichkeiten der mesenchymalen Stammzellen	62
5.1. Unterschiedlich synthetisierte Polyaryle	63
5.2. Variation der Schmelz- und Glasübergangstemperatur und Struktur der Lamellenkristalle	64
5.3. Einteilung von teilkristallinen Thermoplasten in unterschiedliche Temperaturbereiche	65
5.4. μ CT-Aufnahme mit fusionierten Wirbeln und ein Implantat (Cage) aus PEEK	66
5.5. Medizinische Anwendungsbereiche von Kunststoffen	67
5.6. REM: Ergebnisse der Voruntersuchungen zur Pulverbeschichtung von PEEK-Oberflächen	70
5.7. Schematischer Aufbau des Hotplate-Coating-Verfahren	71
5.8. REM: Oberfläche und Anschnitt eines PEEK-Beschichtungsversuchs	72
5.9. 3D-Modell von einem Cage und dem Implantatmodell aus PEEK	73
5.10. REM: Verformung von PEEK durch Temperaturbehandlung	74
5.11. Schematische Darstellung des Induktionsprozesses	75
5.12. REM: Vergleich zwischen unbeschichteten und beschichteten PEEK-Implantatmodell	76
5.13. REM: Oberfläche und Anschnitt der Pulverschicht auf den Implantatmodellen	77
5.14. REM: Beschichtetes PEEK-Implantat nach dem Herauslösen der Beschichtung	78

5.15. EDX-Linescan auf einem Anschnitt einer beschichteten PEEK-Probe	79
5.16. TEM: Ultradünnschnitte vom PEEK-Biomaterial-Verbund	80
5.17. Ergebnis des XTT-Zytotoxtest für beschichtete PEEK-Implantate	80
5.18. Histo: Exemplarische Übersicht des Knochenlagers zwischen der KGr und der BGr	82
5.19. Histo: Gewebeablösung in der KGr	83
5.20. REM: Unterschied zwischen KGr und BGr in der Knochenhülle nach 6 Wochen	84
5.21. Dia: Darstellung des Silizium- und Kalziumanteils nach 2, 4 und 6 Wochen . .	85
5.22. REM: EDX-Analysen der BGr nach 2 Wochen	87
5.23. Histo und REM: EDX-Flächenanalyse mit Kalzium- und Siliziumverteilung des Biomaterials nach 2 Wochen	88
5.24. Histo: Digitale Aufbereitung der histologischen Abbildungen der PEEK-Studie zur Bestimmung des BICs	89
5.25. Histo: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit fehlerhaften Bereichen in der Be- schichtung der Implantate der PEEK-Studie	90
5.26. Ergebnis der BIC-Auswertung der <i>in vivo</i> Studie mit den pulverbeschichteten Implantatmodellen	90
5.27. Schematische Veranschaulichung des Stoffwechselfaktors auf Basis der Tier- größe, des Partikelgrößen- und Transportwegsfaktors	94
6.1. (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme der Oberfläche eines beschichteten Cages nach dem Spray-Spin-Verfahren. (b) Querschnitt eines beschichteten Cages.	97
A.1. Technische Skizze der verwendeten atmosphärischen Plasmajetanlage Plasma Beam (diener electronic GmbH) [27].	100
A.2. Entwicklung der Primärstabilität und der Sekundärstabilität	100
A.3. Strukturuntersuchung der NanoBone [®] -Schicht nach einer Plasmabehandlung	101
A.4. REM: EDX-Analysen der BGr nach 4 Wochen	102
A.5. REM: EDX-Analysen der BGr nach 6 Wochen	103

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

2.1. Übersicht von Materialeigenschaften für den medizinischen Einsatz	3
3.1. Zeiten für Heißluftsterilisation	17
3.2. Zyklus des kortikalen Knochenremodelings für Kaninchen, Hund und Mensch	19
4.1. Eigenschaften von Titan, Eisen, Nickel und Aluminium	22
4.2. Bezeichnungen von cp-Ti und deren Legierung	22
4.3. Übersicht der Titanoxide	23
4.4. Die Tabelle zeigt eine Übersicht der theoretischen Sollgrößen sowie die gemessenen Größen des Implantatmodells.	31
4.5. Auflistung der Prozessparameter, die für die Voruntersuchungen variiert wurden und die letztendlich festgelegten Beschichtungparameter.	37
4.6. Messwerte der Schichthaftung von der NanoBone [®] -Schicht auf Titan in Abhängigkeit der Schichtdicke	37
A.1. Tabellarische Auflistung der Ergebnisse der BIC- und BA-Messungen nach dem Outlinemodell und dem Zonenmodell mit der Abgabe der zugehörigen Standardabweichung vom Mittelwert.	101

Tabellenverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] Renée Fuhrmann. Fehlerursachen bei der Implantation von Hüftendoprothesen. Pressekonzferenz der Bundesärztekammer, 2009.
- [2] Hans-H Moll and Cornelia Engel. Künstliches Hüftgelenk, Hüft-Totalendoprothese, HTEP. www.solitude24.de.
- [3] Ursula Marschall, Madleine Worringer, Uwe Repschläger, and Rainer Riedel. Hüftendoprothetik: Wohin geht der Weg? *BARMER*, 2006.
- [4] Steven M. Kurtz and John N. Devine. PEEK biomaterials in trauma, orthopedic, and spinal implants. *Biomaterials*, 28(32):4845–4869, 2007.
- [5] M. Bram, A. Laptev, H. P. Buchkremer, and D. Stöver. Herstellung von hochporösen, endkonturnahen Titan-Formkörpern für biomedizinische Anwendungen. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 35(4):213–218, 2004.
- [6] Forschungszentrum Jülich GmbH. Implantate mit poröser Aussenschicht sowie Verfahren zur Herstellung derselben, 2008.
- [7] M. Schaldach. Implantierbare Materialien. *Klin. Wschr.*, pages 1029–1039, 1975.
- [8] Reiner Bartl, Emmo von Tresckow, and Christoph Bartl. *Bisphosphonat-Manual*. Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- [9] W. E. Roberts, P. K. Turly, N. Brezniak, and P. J. Fielder. Implants: bone physiology and metabolism. *Journal California Dental Association*, 15:54–61, 1987.
- [10] Hugo Maaß. Knochenwachstum und Knochenaufbau. pages 736–750, 1924.
- [11] E. Wintermantel. *Medizintechnik - Life Science Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 2009.
- [12] Jörg Jerosch, Augustinus Bader, and Günter Uhr. *Knochen: Curasan-Taschenatlas spezial*. Thieme, 2002.
- [13] Diane M. Robertson, Leon St. Pierre, and Ramlal Chahal. Preliminary observations of bone ingrowth into porous materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 10:335–344, 1976.
- [14] Uwe Kornak, Günter Delling, and Stefan Mundlos. Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten. *Deutsches Ärzteblatt*, 19:1258–1268, 2003.

- [15] Margit Pavelka and Jürgen Roth. *Funktionelle Ultrastruktur*. Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [16] Rüdiger Junker, Athanasios Dimakis, Maurice Thoneick, and John A. Jansen. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clinical Oral Implants Research*, 20:185–206, 2009.
- [17] Werner Götz. Osseointegration - Biologische und klinische Grundlagen. *ZWR - Das Deutsche Zahnärzteblatt*, 119:550–561, 2010.
- [18] Paul A. Tipler. *Physik*. Spektrum Akademischer Verlag, 2000.
- [19] M. Mantel and J. P. Wightman. Influence of the surface chemistry on the wettability of stainless steel. *Surface and Interface Analysis*, 21(9):595–605, 1994.
- [20] Denica Nikolova. Charakterisierung und Modifizierung der Grenzflächen im Polymer-Metall-Verbund, 2005.
- [21] D. F. O’Kane and K. L. Mittal. Plasma cleaning of metal surfaces. *Journal of Vacuum Science & Technology*, 11(3):567–569, 1973.
- [22] M. Taborelli, M. Jobin, P. Francois, P. Vaudaux, M. Tonetti, S. Szmukler-Moncler, J. P. Simpson, and P. Descouts. Influence of surface treatment developed for oral implants on the physical and biological properties of titanium. *Clinical Oral Implants Research*, 8:208–216, 1997.
- [23] C. Massaro, P. Rotolo, F. De Riccardis, E. Milella, A. Napoli, M. Wieland, M. Textor, N.D. Spencer, and D.M. Brunette. Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13:535–548, 2002.
- [24] B. Kasemo and J. Lausmaa. Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination, and preparation procedures. *J Biomed Mater Res: Applied Biomaterials*, 22:145–158, 1988.
- [25] Ralph K. Iler. *The chemistry of silica: solubility, polymerization, colloid and surface properties, and biochemistry*. John Wiley & Sons Ltd., 1979.
- [26] D. Briem, S. Strametz, K. Schröder, N.M. Meenen, W. Lehmann, W. Linhart, A. Ohl, and J.M. Rueger. Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16:671–677, 2005.
- [27] diener electronic. *Atmosphärisches Plasma - Plasmabeam, Aufbau- und Funktionsprinzip, Plasma Jet*. <http://www.plasma.de/de/plasmaanlagen/atpl.aufbau.html> (26.06.13).
- [28] *Brockhaus ABC Chemie Band 1 A-K*. VEB F.A. Brockhaus Verlag Leipzig, 1965.
- [29] Larry L. Hench and Jon K. West. The sol-gel process. *Chem. Rev.*, 90:33–72, 1990.

- [30] C. Jeffrey Brinker and George W. Scherer. *Sol-Gel-Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press, 1990.
- [31] Helmut Karl Schmidt. Das Sol-Gel-Verfahren : anorganische Synthesemethoden. *Chemie in unserer Zeit*, 35:176–184, 2001.
- [32] Thomas Gerber and Bernhard Himmel. Untersuchungen zur Struktur und zur Strukturbildung von amorphen und glasigen Festkörpern, 1987.
- [33] E.J.A. Pope and J.D. Mackenzie. Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 87(1–2):185–198, October 1986.
- [34] Mirek Majewski. A tutorial on the realistic visualization of 3D Sierpinski fractals. *Computers & Graphics*, 22(1):129 – 142, 1998.
- [35] Dale W. Schaefer, James E. Martin, Pierre Wiltzius, and David S. Cannell. Fractal geometry of colloidal aggregates. *Phys. Rev. Lett.*, 52(26):2371–2374, June 1984.
- [36] Birgit Knoblich. Aggregationsstrukturen von SiO₂ in wässriger Lösung, 1999.
- [37] Ulf Weber. Calciumorthophosphate mit kontrollierter Kristallmorphologie und ein injizierbares, poröses Biomaterial: Materialentwicklung und Charakterisierung, 2013.
- [38] Sergey V. Dorozhkin and Matthias Epple. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angewandte Chemie*, 114(17):3260–3277, 2002.
- [39] Thomas Gerber. Hydroxyapatite granulate for production of e.g. bone substitutes and bone- growth materials comprises calcium phosphate crystallites embedded in a silicon dioxide xerogel matrix, March 2005.
- [40] Sven Radefeldt. Entwicklung und Charakterisierung eines hochporösen Formkörpers zum Einsatz als Knochenaufbaumaterial, 2010.
- [41] C. Ganz, W. Xu, G. Holzhüter, W. Götz, B. Vollmar, and Th. Gerber. Comparison of bone substitutes in a tibia defect model in wistar-rats. *Key Engineering Materials*, 493-494:732–738, 2012.
- [42] F. Jakob and D. Felsenberg. Grundlagen des Knochenstoffwechsels und pharmakologische Daten. *Der MKG-Chirurg*, 6(2):72–79, 2013.
- [43] Ch. Punke, T. Zehlicke, T. Just, G. Holzhüter, T. Gerber, and H. W. Pau. Matrix change of bone grafting substitute after implantation into guinea pig bulla. *Folia Morphologica*, 71(2):109–114, 2012.
- [44] Weiguo Xu, Gerd Holzhüter, Heiko Sorg, Daniel Wolter, Solvig Lenz, Thomas Gerber, and Brigitte Vollmar. Early matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91B(2):692–699, 2009.
- [45] Martin Adam. Nanostrukturierte Beschichtung auf Implantaten zur Erhöhung der Osseointegration, 2013.

- [46] K. Donath and G. Breuner. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *Journal of Oral Pathology*, 11:318–326, 1982.
- [47] Bruno P. Kremer and Horst Bannwarth. *Einführung in die Laborpraxis*. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [48] H. Rüden and W.-D. Kampf. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
- [49] P.F. Dehn, C.M. White, D.E. Connors, G. Shipkey, and T.A. Cumbo. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (HEPG2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 40(5-6):172–182, 2004.
- [50] Zheng Dong, Manjeri A. Venkatachalam, Joel M. Weinberg, Pothana Saikumar, and Yogendra Patel. Protection of ATP-depleted cells by impermeant strychnine derivatives: Implications for glycine cytoprotection. *The American Journal of Pathology*, 158(3):1021 – 1028, 2001.
- [51] Neal W. Roehm, George H. Rodgers, Stephen M. Hatfield, and Andrew L. Glasebrook. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt {XTT}. *Journal of Immunological Methods*, 142(2):257 – 265, 1991.
- [52] Dominic A. Scudiero, Robert H. Shoemaker, Kenneth D. Paull, Anne Monks, Siobhan Tierney, Thomas H. Nofziger, Michael J. Currens, Donna Seniff, and Michael R. Boyd. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17):4827–4833, 1988.
- [53] Elke Slaets, Geert Carmeliet, Ignace Naert, and Joke Duyck. Early trabecular bone healing around titanium implants: A histologic study in rabbits. *Journal of Periodontology*, 78:510–517, 2006.
- [54] N. Meredith, F. Shagaldi, D. Alleyne, L. Sennerby, and P. Cawley. The application of resonance frequency measurements to study the stability of titanium implants during healing in the rabbit tibia. *Clinical Oral Implants Research*, 8(3):234–243, 1997.
- [55] Antonio Scarano, Fabio Di Carlo, Manlio Quaranta, and Adriano Piattelli. Bone response to zirconia ceramic implants: An experimental study in rabbits. *Journal of Oral Implantology*, 29(1):8–12, February 2003.
- [56] Jaebum Lee, Janet H. Sieweke, Nancy A. Rodriguez, Peter Schüpbach, Håkan Lindström, Cristiano Susin, and Ulf M. E. Wikesjö. Evaluation of nano-technology-modified zirconia oral implants: a study in rabbits. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(7):610–617, 2009.
- [57] Marc Long and H.J Rack. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. *Biomaterials*, 19(18):1621 – 1639, 1998.

- [58] J.E.G. González and J.C. Mirza-Rosca. Study of the corrosion behavior of titanium and some of its alloys for biomedical and dental implant applications. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 471(2):109 – 115, 1999.
- [59] M. Peters and C. Leyens. *Titan und Titanlegierungen*. Wiley-VCH, 2002.
- [60] B.B. Panigrahi, M.M. Godkhindi, K. Das, P.G. Mukunda, and P. Ramakrishnan. Sintering kinetics of micrometric titanium powder. *Materials Science and Engineering: A*, 396(1–2):255 – 262, 2005.
- [61] G. Lütjering and J.C. Williams. *Titanium - Engineering materials and processes*. Springer Berlin Heidelberg, 2003.
- [62] F. Dachille et al. Pressure-temperature studies of anatase, brookite, rutile and TiO₂-II. *The American Mineralogist*, 53:1929–1939, 1968.
- [63] Werner Schatt, Klaus-Peter Wieters, and Bernd Kieback. *Pulvermetallurgie - Technologien und Werkstoffe*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [64] S. Hasse and E. Brunhuber. *Giesserei Lexikon*. Fachverlag Schiele & Schoen, 2000.
- [65] J. Pan, D. Thierry, and C. Leygraf. Electrochemical impedance spectroscopy study of the passive oxide film on titanium for implant application. *Electrochimica Acta*, 41(7–8):1143 – 1153, 1996.
- [66] J.W. Choi, S. J. Heo, J. Y. Koak, S. K. Kim, Y. J. Lim, S. H. Kim, and J. B. Lee. Biological responses of anodized titanium implants under different current voltages. *Journal of Oral Rehabilitation*, 33:889–897, 2006.
- [67] M.D. Earle. The electrical conductivity of titanium dioxide. *Physical Review*, 61:56–62, 1942.
- [68] K. H. Kim and N. Ramaswamy. Electrochemical surface modification of titanium in dentistry. *Dental Materials Journal*, 28:20–36, 2009.
- [69] Werner Köster. Die Poisson'sche Konstante der Metalle. *Applied Scientific Research, Section A*, 4(4):329–336, 1954.
- [70] V. Swamy and L.S. Dubrovinsky. Bulk modulus of anatase. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 62(4):673 – 675, 2001.
- [71] J. K. Dewhurst and J. E. Lowther. High-pressure structural phases of titanium dioxide. *Phys. Rev. B*, 54:R3673–R3675, Aug 1996.
- [72] L.S. Dubrovinsky et al. Materials science: The hardest known oxide. *Nature: Brief Communications*, 410:653–654, 2001.
- [73] T.P. Redi. *Titan und Stahl in der Knochenchirurgie*. Springer-Verlag, 1975.

- [74] R.K. Sinha, F Morris, S.A. Shah, and R.S. Tuan. Surface composition of orthopaedic implant metals regulates cell attachment, spreading, and cytoskeletal organization of primary human osteoblasts in vitro. *Clin Orthop Relat Res*, (305):258–272, August 1994.
- [75] *Brockhaus ABC Chemie Band 2 L-Z*. VEB F.A. Brockhaus Verlag Leipzig, 1965.
- [76] H. Salmang and H. Scholze. *Keramik*. Springer Berlin Heidelberg, 2007.
- [77] E. Aust, W. Limberg, R. Gerling, B. Oger, and Th. Ebel. Herstellung einer komplexen Titan-Knochenschraube aus Metallpulverspritzguss. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 36(9):423–428, 2005.
- [78] S. Winkler, F.-X. Köck, C. Baier, H.-R. Springorum, A. Beifuß, P. Lechler, J. Grifka, and J. Schaumburger. Revisionsimplantate der Zukunft. *Der Orthopäde*, 41(1):58–65, 2012.
- [79] Garrett Ryan, Abhay Pandit, and Dimitrios Panagiotis Apatsidis. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials*, 27(13):2651–2670, May 2006.
- [80] L. Mastronardi, A. Ducati, and L. Ferrante. Anterior cervical fusion with polyetheretherketone (PEEK) cages in the treatment of degenerative disc disease. Preliminary observations in 36 consecutive cases with a minimum 12-month follow-up. *Acta Neurochirurgica*, 148:307–312, 2006.
- [81] H. U. Cameron, I. Macnab, and R. M. Pilliar. A porous metal system for joint replacement surgery. *International Journal of Artificial Organs*, 1:104–109, 1978.
- [82] W. C. Head, D. J. Bauk, and R. H. Jr Emerson. Titanium as the material of choice for cementless femoral components in total hip arthroplasty. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 311:85–90, 1995.
- [83] Rajarshi Banerjee, Soumya Nag, John Stechschulte, and Hamish L. Fraser. Strengthening mechanisms in Ti–Nb–Zr–Ta and Ti–Mo–Zr–Fe orthopaedic alloys. *Biomaterials*, 25(17):3413 – 3419, 2004.
- [84] H. Hahn and W. Palich. Preliminary evaluation of porous metal surfaced titanium for orthopedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 4:571–577, 1970.
- [85] Yong-Shun Chang, Hai-Ou Gu, Masanori Kobayashi, and Masanori Oka. Influence of various structure treatments on histological fixation of titanium implants. *The Journal of Arthroplasty*, 13(7):816 – 825, 1998.
- [86] Shigeru Nishiguchi, Hirofumi Kato, Masashi Neo, Masanori Oka, Hyun-Min Kim, Tadasashi Kokubo, and Takashi Nakamura. Alkali- and heat-treated porous titanium for orthopedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54(2):198–208, 2001.
- [87] Jean-Philippe St-Pierre, Maxime Gauthier, Louis-Philippe Lefebvre, and Maryam Tabrizian. Three-dimensional growth of differentiating MC3T3-E1 pre-osteoblasts on porous titanium scaffolds. *Biomaterials*, 26(35):7319 – 7328, 2005.

- [88] Juliette van den Dolder, Edward Farber, Paul H.M. Spauwen, and John A. Jansen. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 24(10):1745 – 1750, 2003.
- [89] Vassilios I. Sikavitsas, Juliette van den Dolder, Gregory N. Bancroft, John A. Jansen, and Antonios G. Mikos. Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67A(3):944–951, 2003.
- [90] Jia Ping Li, Pamela Habibovic, Mirella van den Doel, Clayton E. Wilson, Joost R. de Wijn, Clemens A. van Blitterswijk, and Klaas de Groot. Bone ingrowth in porous titanium implants produced by 3D fiber deposition. *Biomaterials*, 28(18):2810 – 2820, 2007.
- [91] H.C. Kroese-Deutman, J.W.M. Vehof, P.H.M. Spauwen, P.J.W. Stoelinga, and J.A. Jansen. Orthotopic bone formation in titanium fiber mesh loaded with platelet-rich plasma and placed in segmental defects. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 37(6):542 – 549, 2008.
- [92] G. Rausch, T. Hartwig, M. Weber, and O. Schulz. Herstellung und Eigenschaften von Titanschäumen. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 31(6):412–414, 2000.
- [93] C.E. Wen, Y. Yamada, K. Shimojima, Y. Chino, T. Asahina, and M. Mabuchi. Processing and mechanical properties of autogenous titanium implant materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(4):397–401, 2002.
- [94] J.P. Li, S.H. Li, K. de Groot, and P. Layrolle. Preparation and characterization of porous titanium. *Key Engineering Materials*, 218:51–54, 2002.
- [95] Sandra C. P. Cachinho and Rui N. Correia. Titanium scaffolds for osteointegration: mechanical, in vitro and corrosion behaviour. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(1):451–457, 2008.
- [96] A. Schuh, J. Luyten, R. Vidael, W. Hönle, and T. Schmickal. Porous titanium implant materials and their potential in orthopedic surgery. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 38(12):1015–1018, 2007.
- [97] H. U. Cameron, R. M. Pilliar, and I. Macnab. The rate of bone ingrowth into porous metal. *Journal of Biomedical Materials Research*, 10(2):295–302, 1976.
- [98] H. Kienapfel, C. Sprey, A. Wilke, and P. Griss. Implant fixation by bone ingrowth. *The Journal of Arthroplasty*, 14(3):355–368, 1999.
- [99] R. M. Pilliar, H. U. Cameron, A. G. Binnington, J. Szivek, and I. Macnab. Bone ingrowth and stress shielding with a porous surface coated fracture fixation plate. *Journal of Biomedical Materials Research*, 13(5):799–810, 1979.
- [100] R. M. Pilliar. Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth. *Clinical Orthopaedics*, 176:42–51, 1983.

- [101] J. D. Bobyn, R. M. Pilliar, H. U. Cameron, and G. C. Weatherly. The optimum pore size for the fixation of porous-surfaced metal implants by the ingrowth of bone. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 150:263–270, 1980.
- [102] F. Barrère, C. M. van der Valk, G. Meijer, R. A. J. Dalmeijer, K. de Groot, and P. Layrolle. Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 67B(1):655–665, 2003.
- [103] Florence Barrère, Chantal M. van der Valk, Remco A. J. Dalmeijer, Gert Meijer, Clemens A. van Blitterswijk, Klaas de Groot, and Pierre Layrolle. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 66A(4):779–788, 2003.
- [104] Julius Wolff. Die Lehre von der functionellen Knochengestalt. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin*, 155(2):256–315, 1899.
- [105] L.E. Lanyon and C.T. Rubin. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *Journal of Biomechanics*, 17(12):897 – 905, 1984.
- [106] C.H. Turner. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone*, 23(5):399 – 407, 1998.
- [107] Christopher Ruff, Brigitte Holt, and Erik Trinkaus. Who’s afraid of the big bad Wolff?: “Wolff’s law” and bone functional adaptation. *American Journal of Physical Anthropology*, 129(4):484–498, 2006.
- [108] Y.L. Liu, J. Schoenaers, K.de Groot, J.R.de Wijn, and E. Schepers. Bone healing in porous implants: a histological and histometrical comparative study on sheep. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11(11):711–717, 2000.
- [109] Thomas Gerber, Gerd Holzhüter, Werner Götz, Volker Bienengraber, Kai-Olaf Henkel, and Elisabeth Rumpel. Nanostructuring of biomaterials – a pathway to bone grafting substitute. *European Journal of Trauma*, 32:132–140, 2006.
- [110] Werner Götz, Thomas Gerber, Barbara Michel, Stefan Lossdörfer, Kai-Olaf Henkel, and Friedhelm Heinemann. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone[®]) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clinical Oral Implants Research*, 19(10):1016–1026, October 2008.
- [111] Werner Götz, Solvig Lenz, Christoph Reichert, Kai-Olaf Henkel, Volker Bienengraber, Laura Pernicka, Karsten K.H. Gundlach, Tomasz Gredes, Thomas Gerber, Tomasz Gedrange, and Friedhelm Heinemann. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48:589–596, 2010.
- [112] Holger Keuer. Entwicklung von Titanoberflächen mit einer dreidimensionalen Rauigkeit, 2009.

- [113] Martin Adam. Entwicklung eines Verfahrens zur Beschichtung von Zahnimplantaten auf der Basis der NanoBone[®]-Technologie, 2009.
- [114] Christian Glaß. Entwicklung und Aufbau einer Anlage für die Beschichtung von orthopädischen Implantaten, 2009.
- [115] U.S. Food and Drug Administration. *Guidance Document for Testing Orthopedic Implants With Modified Metallic Surfaces Apposing Bone Or Bone Cement*, April 1994.
- [116] Heinrich Wehrbein, Beat R. Merz, Christoph H. F. Hämmerle, and Niklaus P. Lang. Bone-to-implant contact of orthodontic horizontal implants in humans subjected to loading. *Clinical Oral Implants Research*, 9(5):348–353, 1998.
- [117] Carl-Johan Ivanoff, Göran Widmark, Carin Hallgren, Lars Sennerby, and Ann Wennerberg. Histologic evaluation of the bone integration of TiO₂ blasted and turned titanium microimplants in humans. *Clinical Oral Implants Research*, 12(2):128–134, 2001.
- [118] Lars Rasmusson, Karl-Erik Kahnberg, and Albert Tan. Effects of implant design and surface on bone regeneration and implant stability: An experimental study in the dog mandible. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 3(1):2–8, 2001.
- [119] Holger Keuer, Cornelia Ganz, Weigu Xu, Bernhard Frerich, and Thomas Gerber. Bioactive coating on porous materials with an interconnected pore system to improve osseointegration. *Key Engineering Materials*, 493-494:499–503, 2012.
- [120] H. Huber and H. H. Fudenberg. Die immunologische Funktion von Monocyten und Makrophagen. *Klinische Wochenschrift*, 20:1061–1068, 1969.
- [121] Henry H. Jones, James D. Priest, Wilson C. Hayes, Carol Chinn Tichenor, and Donald A. Nagel. Humeral hypertrophy in response to exercise. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 59-A:204–208, 1977.
- [122] Paul J Harwood and Peter V Giannoudis. Application of bone morphogenetic proteins in orthopaedic practice: their efficacy and side effects. *Expert Opinion on Drug Safety*, 4(1):75–89, 2005. PMID: 15709900.
- [123] Atsumasa Uchida, Sydney Nade, Eric McCartney, and William Ching. Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, 3(1):65–77, 1985.
- [124] Th. Gerber, S. Lenz, G. Holzhüter, W. Götz, K. Helms, C. Harms, and Th. Mittlmeier. Nanostructured bone grafting substitutes – a pathway to osteoinductivity. *Key Engineering Materials*, 493-494:147–152, 2012.
- [125] José J. Minguell, Alejandro Erices, and Paulette Conget. Mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226:507–520, 2001.
- [126] C. Harms, K. Helms, T. Taschner, I. Stratos and A. Ignatius, T. Gerber, S. Lenz, S. Rammelt, B. Vollmar, and T. Mittlmeier. Osteogenic capacity of nanocrystalline bone cement in a weight-bearing defect at the ovine tibial metaphysis. *International Journal of Nanomedicine*, 7:2883 – 2889, 2012.

- [127] Mark Kirchhoff, Solvig Lenz, Kai-Olaf Henkel, Bernhard Frerich, Gerd Holzhüter, Sven Radefeldt, and Thomas Gerber. Lateral augmentation of the mandible in minipigs with a synthetic nanostructured hydroxyapatite block. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96B(2):342–350, 2011.
- [128] Hans Domininghaus, Peter Elsner, Peter Eyerer, and Thomas Hirth. *Kunststoffe - Eigenschaften und Anwendungen*, volume 7. Springer Berlin Heidelberg, 2008.
- [129] Martin Bonnet. *Kunststoffe in der Ingenieur Anwendung*. Vieweg+Teubner, 2009.
- [130] Steven M. Kurtz. *PEEK biomaterials handbook*. Elsevier Science, 2011.
- [131] Pengtao Huo and Peggy Cebe. Temperature-dependent relaxation of the crystal-amorphous interphase in poly(ether ether ketone). *Macromolecules*, 25:902–909, 1992.
- [132] L. M. Wenz, K. Merritt, S. A. Brown, A. Moet, and A. D. Steffee. In vitro biocompatibility of polyetheretherketone and polysulfone composites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 24(2):207–215, 1990.
- [133] C. Morrison, R. Macnair, C. MacDonald, A. Wykman, I. Goldie, and M.H. Grant. In vitro biocompatibility testing of polymers for orthopaedic implants using cultured fibroblasts and osteoblasts. *Biomaterials*, 16(13):987–992, 1995.
- [134] K. A. Jockisch, S. A. Brown, T. W. Bauer, and K. Merritt. Biological response to chopped-carbon-fiber-reinforced peek. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26(2):133–146, 1992.
- [135] H. Xin, D.E.T. Shepherd, and K.D. Dearn. Strength of poly-ether-ether-ketone: Effects of sterilisation and thermal ageing. *Polymer Testing*, 32(6):1001 – 1005, 2013.
- [136] S Ramakrishna, J Mayer, E Wintermantel, and Kam W Leong. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology*, 61(9):1189 – 1224, 2001.
- [137] D.F. Williams, A. McNamara, and R.M. Turner. Potential of polyetheretherketone (PEEK) and carbon-fibre-reinforced PEEK in medical applications. *Journal of Materials Science Letters*, 6(2):188–190, 1987.
- [138] S.L. Evans and P.J. Gregson. Composite technology in load-bearing orthopaedic implants. *Biomaterials*, 19(15):1329 – 1342, 1998.
- [139] Der-Yang Cho, Wen-Rei Liao, Wen-Yen Lee, Jung-Tung Liu, Chung-Lian Chiu, and Pon-Chun Sheu. Preliminary experience using a polyetheretherketone (PEEK) cage in the treatment of cervical disc disease. *Neurosurgery*, 51(6):1343–1350, 2002.
- [140] Yu-Cheng Chou, Der-Cherng Chen, Wanhua Annie Hsieh, Wu-Fu Chen, Pao-Sheng Yen, Tomor Harnod, Tsung-Lang Chiou, Yuh-Lin Chang, Chain-Fa Su, Shinn-Zong Lin, and Shin-Yuan Chen. Efficacy of anterior cervical fusion: Comparison of titanium cages, polyetheretherketone (PEEK) cages and autogenous bone grafts. *Journal of Clinical Neuroscience*, 15(11):1240 – 1245, 2008.

- [141] Karen B. Sagomonyants, Marcus L. Jarman-Smith, John N. Devine, Michael S. Aronow, and Gloria A. Gronowicz. The in vitro response of human osteoblasts to polyetheretherketone (PEEK) substrates compared to commercially pure titanium. *Biomaterials*, 29(11):1563 – 1572, 2008.
- [142] M. S. Abu Bakar, M. H. W. Cheng, S. M. Tang, S. C. Yu, K. Liao, C. T. Tan, K. A. Khor, and P. Cheang. Tensile properties, tension–tension fatigue and biological response of polyetheretherketone–hydroxyapatite composites for load-bearing orthopedic implants. *Biomaterials*, 24:2245–2250, 2003.
- [143] Shucong Yu, Kithva Prakash Hariram, Rajendra Kumar, Philip Cheang, and Khor Khiam Aik. In vitro apatite formation and its growth kinetics on hydroxyapatite/polyetheretherketone biocomposites. *Biomaterials*, 26(15):2343–2352, 2005.
- [144] K.L. Wong, C.T. Wong, W.C. Liu, H.B. Pan, M.K. Fong, W.M. Lam, W.L. Cheung, W.M. Tang, K.Y. Chiu, K.D.K. Luk, and W.W. Lu. Mechanical properties and in vitro response of strontium-containing hydroxyapatite/polyetheretherketone composites. *Biomaterials*, 30(23-24):3810–3817, 2009.
- [145] K.H Tan, C.K Chua, K.F Leong, C.M Cheah, P Cheang, M.S Abu Bakar, and S.W Cha. Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone–hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials*, 24:3115–3123, 2003.
- [146] Alan J. Barton, Richard D. Sagers, and William G. Pitt. Bacterial adhesion to orthopedic implant polymers. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(3):403–410, 1996.
- [147] SD Cook and AM Rust-Dawicki. Preliminary evaluation of titanium-coated PEEK dental implants. *Journal of Oral Implantology*, 21(3):176–181, 1995.
- [148] S.-W Ha, A Gisep, J Mayer, E Wintermantel, H Gruner, and M Wieland. Topographical characterization and microstructural interface analysis of vacuum-plasma-sprayed titanium and hydroxyapatite coatings on carbon fibre-reinforced poly(etheretherketone). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8(12):891–896, 1997.
- [149] Cheol-Min Han, Eun-Jung Leea, Hyoun-Ee Kima, Young-Hag Kohb, Keung N. Kimc, Yoon Hac, and Sung-Uk Kuh. The electron beam deposition of titanium on polyetheretherketone (PEEK) and the resulting enhanced biological properties. *Biomaterials*, 31(13):3465–3470, 2010.
- [150] S.-W. Ha, J. Mayer, B. Koch, and E. Wintermantel. Plasma-sprayed hydroxylapatite coating on carbon fibre reinforced thermoplastic composite materials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5(6-7):481–484, 1994.
- [151] S.-W. Ha, M. Kirch, F. Birchler, K.-L. Eckert, J. Mayer, E. Wintermantel, C. Sittig, I. Pfund-Klingenfuss, M. Textor, N. D. Spencer, M. Guecheva, and H. Vonmont. Surface activation of polyetheretherketone (PEEK) and formation of calcium phosphate coatings by precipitation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 8:683–690, 1997.

- [152] Evonik. *VESTAKEEP i2G - Sicherheitsdatenblatt*. Evonik Degussa GmbH.
- [153] Martin Adam, Cornelia Ganz, Weiguo Xu, Hamit R. Sarajian, Bernhard Frerich, and Thomas Gerber. How to enhance osseointegration – roughness, hydrophilicity or bio-active coating? *Key Engineering Materials*, 493-494:467–472, 2012.
- [154] K. Abshagen, I. Schrodi, T. Gerber, and B. Vollmar. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute nanobone: *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91A(2):557–566, 2009.
- [155] Setti S. Rengachary. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, 13:1–6, 2002.
- [156] Ann Wennerberg, Carin Hallgren, Carina Johansson, and Stefano Danelli. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clinical Oral Implants Research*, 9(1):11–19, 1998.
- [157] Perry R. Klokkevold, Paul Johnson, Soheila Dadgostari, John E. Davies, Angelo Caputo, and Russel D. Nishimura. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research*, 12(4):350–357, 2001.
- [158] Despina D Deligianni, Nikoleta D Katsala, Petros G Koutsoukos, and Yiannis F Missirlis. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*, 22(1):87 – 96, 2000.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit in dieser Form wohl mit Sicherheit nie zustande gekommen wäre. Insbesondere ...

- Prof. Dr. Thomas Gerber für die Überlassung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit,
- der Firma Artoss (Dr. Walter Gericke und Mitarbeiter) für die Nutzung von technischen und finanziellen Ressourcen
- die AG Nanostrukturierte Materialien: Dr. Gerd Holzhüter, Dr. Cornelia Ganz, Dr. Ulf Weber, Dr. Martin Adam, Richard Dietrich, Anja Clasen und Petra Wilhelm für thematische Diskussionen und Hilfestellungen zu dieser Arbeit,
- Dr. Uwe Hoppe für die wissenschaftlichen Ratschläge und unterhaltsame Lebensgeschichten,
- Ulrike Schröder für die stets offenen Ohren für alle Ängste, Sorgen und Nöte,
- Daniel Wolter und Dorothea Gütschow für die Probenaufbereitung sowie Zellversuche,
- Sigrid Reincke für die Unterstützung bei der Durchführung und Betreuung der Tierversuche,
- Dr. Weiguo Xu und Anton Schubert für die zusammen geschwitzten Stunden im OP,
- die mechanische Feinwerkstatt des physikalischen Instituts,
- Prof. Dr. Werner Götz für die hilfreiche Unterstützung und Einführung in die Osteogenese,
- Dr. Heiner Martin für die Durchführung der μ CT-Messungen,
- Christian Fabry für die Durchführung der Haftzugtests.

Weiterhin Isabelle (war wirklich sehr wichtig und hilfreich), Jan (für all die Glückskleeblätter), Gunnar (für moralische Fürworte), Matti (für Ablenkung auf der Straße), Mel (Mil Beijos) und meinen Eltern.

Habt vielen Dank für Eure Hilfe und Unterstützung.