

# **Verbesserung der Biokompatibilität metallischer Implantate durch kovalente Anbindung einer quervernetzten Kollagenschicht**

Dissertation zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie  
der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Jochen Abke**

aus Neuburg

2003

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. K. Heckmann.

Promotionsgesuch eingereicht am: 28. Mai 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 2003

Vorsitzender: Prof. Dr. W. Kunz

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. K. Heckmann

Prof. Dr. C. Steinem

Prof. Dr. R. Köster

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2000 bis Mai 2003 am Labor für Grenzflächenchemie der Universität Regensburg mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogrammes „Grenzfläche zwischen Werkstoff und Biosystem“ und der Bayerischen Forschungstiftung im Rahmen des Programmes „Forbiomat“.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Zwischen- und Abschlussberichten der Forschungsprojekte sowie als Posterabstracts veröffentlicht:

- Materials Week, München, 2001
- Aachen Colloquium on Biomaterials, Aachen, 2002
- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Dresden, 2002
- IBI, Rostock, 2003 (*Biomaterialien* **2003**, 4(2), 84)

Meinem geschätzten Lehrer,

**Herrn Prof. Dr. Klaus Heckmann,**

danke ich an dieser Stelle sehr herzlich für die stete Bereitschaft zur Diskussion und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank **Herrn Dr. Rainer Müller** für die Themenstellung, die vielen wertvollen fachlichen wie privaten Diskussionen und Unternehmungen sowie sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>A. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1 Definition und historische Entwicklung von Biomaterialien</b>	<b>1</b>
<b>2 Problemstellung</b>	<b>4</b>
<b>3 Lösungsansätze</b>	<b>5</b>
3.1 Repassivierende Tantal/Tantaloxidschichten auf Edelstahloberflächen	5
3.2 Beschichtung von metallischen Implantatmaterialien mit einer kovalent gebundenen, quervernetzten Kollagenschicht	5
<b>B. Grundlagen</b>	<b>8</b>
<b>1 Metallische Implantatmaterialien</b>	<b>8</b>
1.1 Historische Entwicklung	8
1.2 Mechanische Eigenschaften	9
1.3 Korrosionseigenschaften	10
1.4 Biologische Eigenschaften	12
<b>2 Titan und Titanlegierungen</b>	<b>13</b>
2.1 Titan	13
2.2 Titanlegierungen	15
2.3 Technische Verwendung	15
2.4 Medizinische Eigenschaften und Anwendungen	16
2.5 Oberflächenvorbehandlung	17
2.6 Oberflächenanalytik	17
<b>3 Tantal</b>	<b>18</b>
<b>4 Medizinischer Edelstahl</b>	<b>21</b>
4.1 Eisen	21
4.2 Stahl	21
4.3 Edelstahl	21
<b>5 Cobalt-Legierungen</b>	<b>23</b>
5.1 Hochtemperatur-Legierungen (Superalloys)	23

Inhaltsverzeichnis		II
5.2	Magnetische Legierungen	23
5.3	Hartmetall-Legierungen	23
5.4	Medizinisch relevante Legierungen	24
<b>6</b>	<b>Silan-Haftvermittler</b>	<b>25</b>
6.1	Anwendungen	26
6.2	Aminopropyltriethoxysilan und Isocyanatopropyltriethoxysilan	27
6.3	Analytik der Haftvermittlerschichten	28
6.4	Untersuchung der Haftvermittlerschichten auf ihre chemische Stabilität	30
6.5	Synthese von Dimethoxytritylaminohexanol (DAH)	30
<b>7</b>	<b>Kollagen</b>	<b>32</b>
7.1	Struktureller Aufbau	32
7.2	Anwendungsgebiete von Kollagen	35
7.3	Künstliche Kollagenquervernetzung	35
7.4	Analytik der Quervernetzungen	38
7.5	Vergleich der einzelnen Quervernetzungsarten	42
<b>8</b>	<b>Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen</b>	<b>43</b>
8.1	Adsorptive Bindung	43
8.2	Kovalente Anbindung	46
<b>C.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>50</b>
<b>1</b>	<b>Verwendete Materialien</b>	<b>50</b>
1.1	Titan und Titanlegierung	50
1.2	Tantalierter Edelstahl	50
1.3	Cobaltbasislegierung	50
1.4	Modelloberflächen	51
1.5	Kollagen und Gelatine	51
1.6	Chemikalien	51
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>53</b>
2.1	Oxidation der Oberflächen	53
2.2	Kernreaktionsanalyse	53
2.3	Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)	53

Inhaltsverzeichnis		III
2.4	Bestimmung der Hydroxylgruppen mit Trifluoressigsäureanhydrid	53
2.5	Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM)	53
2.6	Bestimmung der Oberflächenrauigkeit	54
2.7	Aufnahmen mit dem Auflichtmikroskop	54
2.8	Silanisierung von Substratoberflächen	54
2.9	Infrarotspektroskopie	54
2.10	Bestimmung der Aminogruppen mit sulpho-SDTB	54
2.11	Aktivierung mit bifunktionellen Linkern	55
2.12	Anbindung von Dimethoxytritylaminohexanol (DAH)	55
2.13	Auslagerungsversuche mit APTES	56
2.14	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Kollagenmaterialien	56
2.15	Quervernetzung von Kollagen	56
2.16	Bestimmung der freien Aminogruppen mit TNBS	57
2.17	Bestimmung der Schrumpfungstemperatur mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC)	57
2.18	Herstellung der Kollagenprobekörper (Filme)	58
2.19	Sterilisation der Probekörper	58
2.20	Kollagenasetest	58
2.21	Gewinnung von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC)	58
2.22	Zytotoxizitätstest	59
2.23	Immobilisierung von Peroxidase	59
2.24	Immobilisierung von Kollagen	59
2.25	Untersuchung der biochemischen und chemischen Stabilität der Kollagenbeschichtung	60
2.26	Untersuchung der mechanischen Stabilität der Kollagenbeschichtung	60
2.27	Darstellung von Dimethoxytritylaminohexanol	61
<b>D. Ergebnisse</b>		<b>63</b>
<b>1 Charakterisierung der metallischen Werkstoffe</b>		<b>63</b>
1.1	Chemische Analyse der Metalloberflächen	63
1.2	Topographische Struktur der Metalloberflächen	64
<b>2 Aktivierung der Metalloberflächen</b>		<b>69</b>
2.1	Qualitativer Nachweis durch Infrarotspektroskopie	69
2.2	Halbquantitativer Nachweis durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie	71

Inhaltsverzeichnis	IV	
2.3	Hochaufgelöste XPS-Spektren	72
2.4	Quantitativer Nachweis mit s-SDTB und DAH	73
2.5	Chemische Stabilität der Haftvermittlerschicht	75
2.6	Zytotoxizitätstest der oxidierten und aktivierten Metalloberflächen	76
<b>3</b>	<b>Charakterisierung der biologischen Plattform</b>	<b>77</b>
3.1	AFM-Aufnahmen	77
3.2	Aminosäurezusammensetzung der verwendeten Kollagene und Gelatine	78
3.3	Quervernetzung von Kollagen und Gelatine	79
<b>4</b>	<b>Kombination beider Plattformen</b>	<b>86</b>
4.1	Anbindung von Peroxidase	86
4.2	Immobilisierung von Kollagen	87
4.3	Visualisierung des immobilisierten Kollagens mit AFM	89
4.4	Untersuchung der angebondenen Kollagenschicht auf biochemische, chemische und mechanische Stabilität	89
4.5	Zytotoxizitätstests auf Metalloberflächen	94
<b>E.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
<b>1</b>	<b>Werkstoffplattform</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b>Biologische Plattform</b>	<b>103</b>
<b>3</b>	<b>Kombination beider Plattformen</b>	<b>108</b>
<b>F.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>G.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>H.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>I.</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>122</b>

## **A. Einleitung**

Die folgende Arbeit beschäftigt sich mit der Modifizierung von metallischen Implantaten, und damit einem Thema auf dem Gebiet der Biomaterialien. Zu Beginn sollen deshalb einige wichtige Definitionen und Konzepte sowie ein kurzer historischer Abriss des noch jungen Forschungsgebietes vorgestellt werden.

### **1 Definition und historische Entwicklung von Biomaterialien**

Ein Biomaterial ist definiert als jede pharmakologisch unwirksame Substanz oder eine Kombination mehrerer Substanzen, natürlichen oder künstlichen Ursprungs, die zeitweilig oder dauerhaft, eigenständig oder als Teil eines Ganzen, jedwedes Gewebe, Organ oder jegliche Funktion des Körpers behandelt, verbessert oder ersetzt.<sup>[1]</sup>

Obwohl der Ausdruck „Biomaterialien“ erst etwa seit Ende der 60er Jahre verwendet wird, begann ihr Einsatz entsprechend der obigen Definition bereits im Altertum. Von den Römern, den Chinesen und den Azteken ist die Verwendung von Zahngold bekannt und im Laufe der Jahrhunderte wurde immer wieder der Einsatz von Glasaugen oder Holzzähnen schriftlich festgehalten. Eine größere Bedeutung bekam das Gebiet aber erst mit der Entwicklung von aseptischen Operationstechniken gegen Ende des 19. Jahrhunderts. Die Zeit bis etwa 1940 war hauptsächlich von der Untersuchung verschiedener Metalle und Legierungen, die aus der technischen Entwicklung bekannt waren, geprägt. Mit dem Aufkommen der Kunststoffindustrie in den 30er Jahren eröffnete sich ein ganz neues Feld potentieller Materialien. Aufgrund großer Fortschritte auf dem Gebiet der Operationstechniken war in den 50er Jahren dann auch der Ersatz von Blutgefäßen oder Herzklappen möglich.

Als Beispiel für die Verwendung von Biomaterialien außerhalb des Körpers ist noch die Dialyse zu nennen, die 1944 entwickelt wurde, und seit 1960 routinemäßig eingesetzt wird.

Eine Zusammenstellung der wichtigsten Biomaterialien und ihrer Einsatzgebiete ist in Tabelle 1 gegeben.

**Tabelle 1 : Biomaterialien und ihre Anwendungsgebiete<sup>[2]</sup>**

Anwendungsgebiet	Verwendete Materialien
<b>Skelett</b>	
Gelenkersatz (Hüfte, Knie)	Titan, Ti6Al4V, Edelstahl, Polyethylen (PE)
Knochenplatten	Edelstahl, Cobaltbasislegierungen
Knochenzement	Poly(methylmethacrylat) (PMMA)
Reparatur von Knochendefekten	Hydroxylapatit (HAP)
Künstliche Sehnen und Bänder	Teflon, Dacron
Zahnimplantate	Titan, Aluminiumoxid, Calciumphosphat
<b>Herz- Kreislaufsystem</b>	
Gefäßersatz	Dacron, Teflon, Polyurethane (PU)
Herzklappen	Modifiziertes Gewebe, Edelstahl, Kohlefaser
Katheter	Silikon, Teflon, PU
<b>Organersatz</b>	
Künstliches Herz	PU
Hautersatz	Silikon-Kollagen-Komposit
Künstliche Niere (Dialyse)	Cellulose, Polyacrylnitril
Herz-Lungen-Maschine	Silikon
<b>Sinnesorgane</b>	
Innenohrschneckenersatz	Platinelektroden
Hornhaut	PMMA, Silikon, Hydrogele
Kontaktlinsen	Silikon-Acrylate, Hydrogele
Hornhautbefestigung	Kollagen, Hydrogele

## Biokompatibilität

Als Biokompatibilität wird offiziell die Fähigkeit eines Materials bezeichnet, eine angemessene Körperreaktion nach seiner Verwendung hervorzurufen.<sup>[1]</sup>

Die sehr allgemein gehaltene Definition begründet sich in der Vielzahl von Materialien und Einsatzgebieten im Bereich der Biomaterialien, die zu ganz unterschiedlichen Anforderungen bezüglich der Biokompatibilität führen. So dürfen z.B. künstliche Blutgefäße oder alle Oberflächen in einer Herz-Lungen-Maschine auf keinen Fall die Blutgerinnung auslösen, ein künstliches Hüftgelenk dagegen muss vor allem in der Lage sein, große mechanische Lasten zu tragen und diese auf den Knochen zu übertragen und bei einer Kon-

taktlinse bzw. einer künstlichen Hornhaut stehen die optischen Eigenschaften im Vordergrund.

Auf dem speziellen Gebiet der Implantate im Knochenkontakt existiert noch eine weitere Unterteilung der Materialien in drei Klassen:

### **Biotoleranz**

Wenn ein Implantat nicht vom Organismus aufgelöst oder abgebaut werden kann, wird es durch eine Weichgewebsschicht abgekapselt. Direkt nach der Implantation lagern sich auf der Oberfläche körpereigene Serumproteine ab, die während der Adsorption eine Änderung ihrer Konformation bzw. ihres Oxidationszustandes erfahren. Dies führt zum Auftreten inflammatorischer Reaktionen und letztlich zu einer Distanzosteogenese. D.h. der Spalt zwischen Knochen und Implantat wird vom Körper nicht durch neugebildeten Knochen geschlossen. Als Beispiele sind hier Stahl oder Cobaltbasislegierungen zu nennen.<sup>[3]</sup>

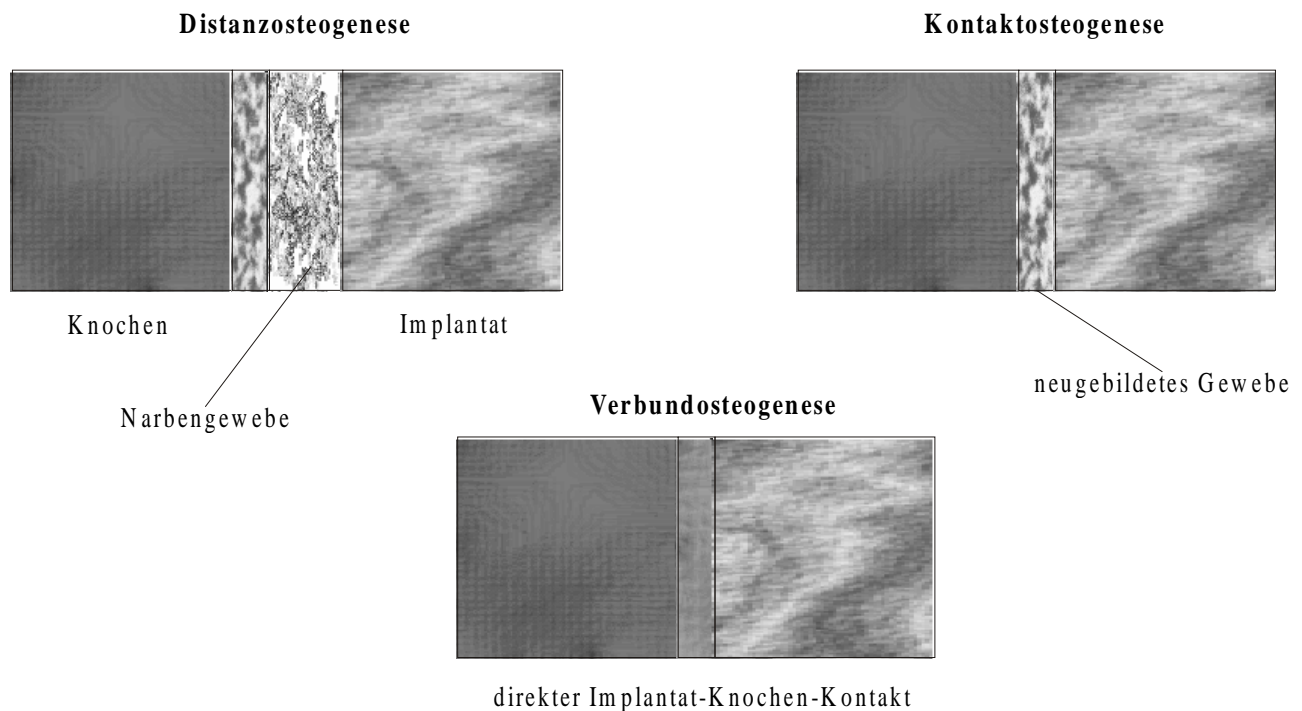
### **Bioinertheit**

Ein Implantat wird nicht mehr als körperfremd identifiziert, wenn die Serumproteine während ihrer Adsorption keine Konformationsänderung erfahren. Es werden keine Reaktionen im umliegenden Gewebe ausgelöst und man spricht von einem bioinerten Material. Es kommt zu punktförmigen Verbindungen zwischen Metall und Knochen, einer sogenannten Kontaktosteogenese. Beispiele für metallische Biomaterialien sind hier Titan und seine Legierungen.<sup>[3]</sup>

### **Bioaktivität**

Bei manchen Werkstoffen kommt es zu einer direkten chemischen Verbindung zwischen dem umliegenden Gewebe und der Implantatoberfläche. Es entsteht eine zugfeste Verbindung mit optimierten Integrationseigenschaften, eine sogenannte Verbundosteogenese. Solche Materialien wie etwa Hydroxylapatit oder Kollagen werden daher als bioaktive Substanzen bezeichnet.<sup>[3]</sup>

Der Einfluss der verschiedenen Materialeigenschaften auf das Einwachsverhalten eines Implantates im Knochenkontakt ist nochmals zusammenfassend in Abbildung 1 wiedergegeben.



**Abbildung 1: Distanz-, Kontakt- und Verbundosteogenese**

## 2 Problemstellung

Es konnten bisher keine Implantatmaterialien mit bioaktiven Eigenschaften und zugleich ausreichender biomechanischer Belastbarkeit für die Frakturversorgung oder den Gelenkersatz gefunden werden. Lösungsansätze waren bisher vor allem die Herstellung von Composit-Materialien aus metallischem Implantat und einer Beschichtung aus Hydroxylapatit. Durch die großen Duktilitätsunterschiede zwischen metallischer Unterlage und Beschichtungsmaterial kam es an mechanisch belasteten Stellen allerdings zu Rissbildungen oder einem Versagen der Bindung zwischen Metall und Keramik.<sup>[4]</sup>

In der Frakturversorgung wird am häufigsten Edelstahl eingesetzt. Hier erfolgt der Korrosionsschutz durch die Bildung einer chromreichen Oxidschicht auf der Oberfläche. Wird diese, z.B. durch Rissbildung oder Kratzer verletzt, kann es zur Ausbildung von Lokalelementen und verstärkter Korrosion durch Lochfraß kommen.<sup>[5]</sup> Außerdem besteht die Gefahr von allergischen Reaktionen auf die Legierungsbestandteile Nickel und Chrom. Zur Verbesserung der Implantateigenschaften wurden deshalb Hartstoffbeschichtungen aus TiN oder diamant-ähnlichem Kohlenstoff aufgebracht.<sup>[6;7]</sup> Aber auch hier besteht das Problem der harten und spröden Beschichtung auf einem duktilen, metallischen Untergrund und die Möglichkeit der Ablösung der Schicht.

### 3 Lösungsansätze

#### 3.1 Repassivierende Tantal/Tantaloxidschichten auf Edelstahloberflächen

Ein in der Abteilung für Funktionswerkstoffe in der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg entwickeltes Verfahren zur Verbesserung der Korrosionseigenschaften von Edelstahl basiert auf der Aufbringung eines Schichtsystems aus Tantal und Tantaloxid. Auch hier kann eine Rissbildung oder Verletzung der Oxidschicht durch äußere mechanische Einwirkung nicht verhindert werden. Im Gegensatz zum reinen Edelstahl kommt es unter physiologischen Bedingungen aber zu einer sofortigen Repassivierung und einer Wiederherstellung des Korrosionsschutzes. Das Konzept wird in Abbildung 2 nochmals schematisch verdeutlicht. Die Wirksamkeit konnte durch Korrosionsstrommessungen während gezielter mechanischer Belastung durch einen 4-Punkt-Biegeversuch gezeigt werden.<sup>[5]</sup>

Die in Würzburg hergestellten Oberflächen werden in dieser Arbeit entsprechend der im folgenden Abschnitt vorgestellten Verfahren weiter modifiziert.

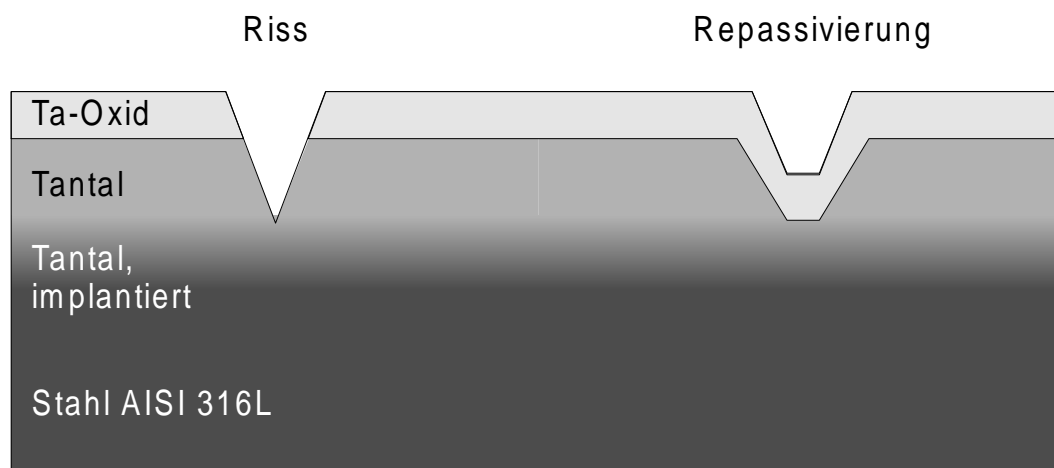


Abbildung 2: Schematische Darstellung der repassivierenden Tantal/Tantaloxidschicht auf Edelstahl<sup>[8]</sup>

#### 3.2 Beschichtung von metallischen Implantatmaterialien mit einer kovalent gebundenen, quervernetzten Kollagenschicht

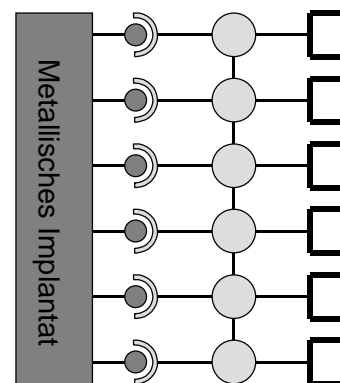
Trotz einer Beschichtung durch Tantal besitzen weder Edelstahl noch die anderen gängigen Implantatmetalle wie Reintitan sowie Titan- und Cobaltbasislegierungen die gewünschte bioaktive Oberfläche. In dieser Arbeit soll deshalb eine Biologisierung der Me-

taloberflächen durch die kovalente Anbindung einer quervernetzten Kollagenschicht untersucht werden. Sie wird im Weiteren an einem Modell verschiedener Plattformen beschrieben.

### 3.2.1 Die Werkstoffplattform

Die in Abbildung 3 schematisch dargestellte Werkstoffplattform besteht aus einem metallischen Implantatmaterial, auf dessen Oberfläche durch geeignete Verfahren ein Silanhaftvermittler angebonden wird. Dabei ist sowohl das metallische Substratmaterial als auch der Haftvermittler variabel und verschiedenen Anwendungen anzupassen. Wichtig ist in allen Fällen das Vorhandensein von Hydroxylgruppen auf der Oberfläche als Grundvoraussetzung für die Anbindung eines Haftvermittlers. Im ersten Teil dieser Arbeit soll nun der Einfluss sowohl verschiedener metallischer Ausgangsmaterialien als auch unterschiedlicher oxidativer Vorbehandlungsschritte auf die Anbindung von zwei Silanhaftvermittlern bestimmt werden. Es werden Reintitan, zwei Titanlegierungen, die bereits erwähnte tantalisierte Edelstahloberfläche, eine Cobaltbasislegierung sowie ein aminofunktioneller und ein isocyanathaltiger Haftvermittler untersucht.

**Abbildung 3:** Werkstoffplattform aus metallischem Implantat mit Hydroxylgruppen ( $\text{—}\bullet$ ) und angebundenem Haftvermittler mit funktionellen Gruppen ( $\text{—}\circ\text{—}\square$ ).

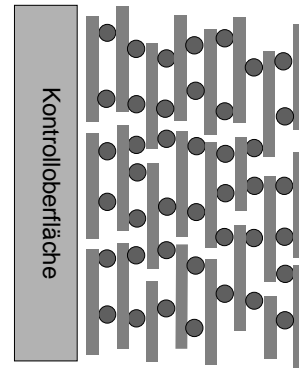


### 3.2.2 Die biologische Plattform

Die biologische Plattform besteht grundsätzlich aus einer dünnen Kollagenschicht. Um eine ausreichende Stabilität unter physiologischen Bedingungen zu gewährleisten, ist eine zusätzliche chemische Quervernetzung durch geeignete Verfahren notwendig. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen deshalb verschiedene Quervernetzungsmethoden etabliert und auf unterschiedliche Kollagenarten angewendet werden. Es gilt, den Einfluss der chemischen Behandlung auf chemische, physikalische, biochemische und biologische Parameter zu untersuchen. Getestet wurden zwei hoch fibrilläre Kollagene, ein lösliches, niedermoleku-

lares Kollagen, alle vom Typ I, und ein stark hydrolysiertes Kollagen, d.h. Gelatine. Für die Quervernetzung standen ein wasserlösliches Carbodiimid und Glutaraldehyd zur Verfügung. Als nichtmetallische Kontrolloberfläche diente Polystyrol (PS).

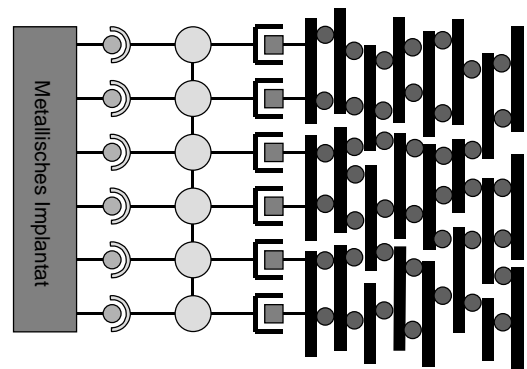
**Abbildung 4: Biologische Plattform aus Kollagenfasern ( — ) nach chemischer Quervernetzung (●) auf Polystyrol.**



### 3.2.3 Die Kombination beider Plattformen

Im letzten Teil der Arbeit sollen schließlich die beiden unabhängig von einander entwickelten Plattformen kombiniert werden, um damit das gesteckte Ziel eines bioaktiven Implantates zu erreichen. Dies erfolgt über die gezielte kovalente Bindung der quervernetzten Kollagenschicht an die funktionellen Gruppen des Silanhaftvermittlers der Werkstoffplattform.

**Abbildung 5: Schematischer Aufbau des biologisierten Implantates**



## **B. Grundlagen**

Das folgende Kapitel behandelt die theoretischen Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden. So werden in der Reihenfolge des in der Einleitung dargestellten Schichtaufbaus die metallischen Implantatmaterialien, die Silanhaftvermittler, das Kollagen und abschließend die Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen vorgestellt.

### **1 Metallische Implantatmaterialien<sup>[9-11]</sup>**

In der Prothetik (Zahnimplantate, künstl. Hüftgelenke) und der Frakturbehandlung (Knochenbrüche) sind metallische Implantate unentbehrlich. Durch ihre einzigartige Kombination aus Festigkeit und Elastizität sind sie in Bereichen mit hoher Zugspannungsbelastung Kunststoffen oder keramischen Materialien weit überlegen. Ein großes Problem der Metalle waren immer die geringe Korrosionsbeständigkeit und die damit verbundene schlechte Biokompatibilität. In den letzten 50 Jahre wurden auf diesen Gebieten aber große Fortschritte gemacht.

#### **1.1 Historische Entwicklung**

Der erste schriftliche Hinweis auf die Verwendung von Metall auf chirurgischem Gebiet stammt aus dem Jahre 1565. Petronius empfahl die Verwendung von Goldplatten für die Reparatur von Gaumenspalten. Die eigentliche Entwicklung der Metallimplantate begann allerdings erst am Ende des 19. Jahrhunderts mit der Einführung steriler Arbeitstechniken, die das Infektionsrisiko bei Operationen stark verringerten, und mit der Entdeckung der Röntgenstrahlen. Es begann die Untersuchung unterschiedlicher Metalle und Legierungen auf ihre biologische Verträglichkeit und eine gezielte, interdisziplinäre Materialentwicklung für den medizinischen Bereich.

Ein chronologischer Ablauf der Einführung verschiedener Metalle und Legierungen auf medizinischem Gebiet ist in Tabelle 2 zu sehen.

**Tabelle 2: Metalle in der Orthopädie** <sup>[12]</sup>

Metall/Legierung	Jahr	Anwendung	Eigenschaften/Probleme
Vanadium Stahl	1912	Knochenplatten	Korrosion
gegossenes CoCrMo	1937	Zahnimplantate	gute Verträglichkeit
	1938	Orthopädische Implantate	gute Verträglichkeit, Festigkeit
302 Edelstahl	1938	Kochenplatten/-schrauben	Korrosionsbeständigkeit
316 Edelstahl	1946	Implantate zur Frakturheilung	bessere Korrosionsbeständigkeit und Festigkeit
Titan	1965	Hüftimplantate	Korrosionsbeständigkeit, Biokompatibilität
316L Edelstahl	1968	Implantate zur Frakturheilung	weitere Verbesserung in Korrosionsbeständigkeit und Festigkeit
MP35N	1972	Hüftimplantate	hohe Festigkeit
Ti6Al4V	1974	Implantate zur Frakturheilung	hohe Festigkeit, Biokompatibilität
	1976	Hüftimplantate	Festigkeit, Elastizitätsmodul
geschmiedetes CoCrMo	1978	Hüftimplantate	höchste Dauerfestigkeit
22-13-5 Edelstahl	1981	Hüftimplantate, Traumabehandlung	Festigkeit, schmiedbar
Ti6Al7Nb	1982	Hüftimplantate	Festigkeit, Biokompatibilität

## 1.2 Mechanische Eigenschaften

Obwohl Metalle in vielen Bereichen Kunststoffen und Keramiken überlegen sind, können auch sie nicht alle geforderten Eigenschaften auf einmal besitzen. So wird die Zähigkeit eines Materials höher, wenn die Reißfestigkeit geringer wird. Entsprechend verhält es sich mit der Biegefestigkeit und der Verformbarkeit. Eine Bruchdehnung kann bei sehr hoher Biegefestigkeit fast ganz eliminiert werden. Es gilt also, für den jeweiligen Anwendungszweck das entsprechende Material auszuwählen.

Grundsätzlich kann man zwischen wenig belasteten Implantaten (z.B. Platten und Schrauben in der Kieferorthopädie) und stark belasteten Implantaten (z.B. Hüft- und Knieprothesen) unterscheiden. Für die zweite Gruppe ist die Biegefestigkeit die ausschlaggebende Größe.

Allerdings muß eine Kraftübertragung vom Knochen auf das Implantat und umgekehrt erfolgen können. Nur wenn die mechanischen Eigenschaften des verwendeten Metalles denen des Knochens so ähnlich wie möglich sind, kommt es zur Neubildung von Knochen und einem Einwachsen des Implantates. Sind die Eigenschaften zu unterschiedlich, kommt

es zu sogenannten Mikrobewegungen zwischen Knochen und Implantat. Aspenberg et al.<sup>[13]</sup> untersuchten den Einfluss von Mikrobewegungen auf das Einwachsverhalten von Titan im Kaninchenmodell. Dabei kam es nur in der „bewegungslosen“ Gruppe zu einer Knochenbildung.

Breme<sup>[10]</sup> definiert deshalb die Biofunktionalität (BF) als wichtigste mechanische Kenngröße für ein metallisches Implantat als Quotient aus Biegefestigkeit ( $\sigma_b$ ) und Youngschem Elastizitätsmodul (E):

$$BF = \frac{\sigma_b}{E}$$

Die Biofunktionalitäten der wichtigsten Implantatmetalle sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Sie verdeutlicht die Überlegenheit von Titan und seinen Legierungen im Vergleich zu den anderen Metallen. Trotzdem erreicht keines der Metalle ein mit Knochen vergleichbares Elastizitätsmodul.

**Tabelle 3: Biofunktionalität verschiedener Implantatmetalle**

	$\sigma_b$ [MPa]	E [x10 <sup>3</sup> MPa]	BF
316L Edelstahl	250	210	1,2
CoCr, gegossen	300	200	1,5
CoNiCr, geschmiedet	500	220	2,3
Titanlegierungen	550	105	5,2
cp-Ti	200	100	2
cp-Ta	150	120	1,3
Knochen	30-200	10-20	1,5-10

### 1.3 Korrosionseigenschaften<sup>[11]</sup>

Bei Metallen sind die Korrosionseigenschaften von elementarer Bedeutung. Grundlage für die Korrosionsbeständigkeit ist in allen Fällen die Bildung einer passivierenden und dichten Oxidschicht. Diese muss sich nach einer Beschädigung, z.B. durch chirurgische Instrumente oder Verschleiß, wieder nachbilden.

Betrachtet man die auftretenden Korrosionsprozesse genauer, kann zwischen einem gleichmäßigen Angriff der gesamten Oberfläche und örtlich begrenzter Korrosion unterschieden werden. Der erste Fall kommt relativ selten vor, da diese Prozesse durch eine ent-

sprechende Materialauswahl unterbunden werden können. Bei Biomaterialien sind es vor allem fünf Arten von örtlich begrenzter Korrosion, die häufig auftreten.

*Lochkorrosion* tritt bei Metallen mit Passivschicht auf. Dazu gehören die meisten unedlen Metalle. Sie wird durch die unter physiologischen Bedingungen vorhandenen Chloridionen gefördert. Sie beginnt immer an schwachen Stellen in der Passivschicht und führt zu Löchern unterschiedlicher Größe.

*Spaltkorrosion* ist immer mit dem Vorhandensein spezieller geometrischer Strukturen wie Kanten, Spalten oder Ecken verbunden. Diese führen zu einer schlechten Verbindung exponierter Bereiche mit dem Bulkmaterial.

*Galvanische Korrosion* tritt bei einer leitenden Verbindung zwischen Metallen mit unterschiedlichem elektrochemischen Potential auf. Dabei kann es sich um unterschiedliche Metalle, aber auch um verschiedene Zustände eines Redoxsystemes handeln (hervorgerufen durch unterschiedliche pH-Werte oder O<sub>2</sub>-Partialdrücke).

*Korngrenzen-Angriff* begründet sich in einer ungünstigen metallographischen Struktur und wird durch falsche Temperaturbehandlungen noch gefördert. Besonders gefährdet sind z.B. CrNi-Stähle, bei denen sich an den Korngrenzen Chrom-Carbide bilden, die in diesem Bereich zu einer Verarmung an Chrom führen, welches für die spontane Passivierung verantwortlich ist.

*Korrosion durch mechanische Belastung* erfolgt bei ständiger Zerstörung der Passivschicht oder der Bildung von Rissen oder Spalten im Material, die sich durch die auftretenden Korrosionsprozesse noch weiter vergrößern können.

Die verwendeten Implantatmetalle unterscheiden sich trotz der Entwicklung immer neuer Legierungen auf diesem Gebiet immer noch erheblich. Bei Messungen der Korrosionsstromdichte zeigten Titan und seine Legierungen sowie Tantal und Niob eine höhere Beständigkeit als 316L und geschmiedetes CoNiCr.<sup>[10]</sup> Zum gleichen Ergebnis kamen Zitter et al.<sup>[14]</sup> bei der Messung der Polarisationsbeständigkeit verschiedener Materialien. Steinemann<sup>[15]</sup> verglich die Korrosionsraten von CoCrMo-Legierungen und Edelstahl mit denen von Titan und seinen Legierungen *in vivo*. Es ergaben sich Werte von 20-26  $\mu\text{g cm}^{-2}$  pro Tag für die Cobaltbasislegierungen und Stähle und ca. 11  $\mu\text{g cm}^{-2}$  pro Tag für Titan und seine Legierungen. Vergleicht man diese Werte mit dem europäischen Standard für

die Korrosionsbeständigkeit von metallischen Biomaterialien im Bereich der Zahnmedizin von  $< 11 \mu\text{g cm}^{-2}$  pro Tag, erfüllen nur Titan und seine Legierungen diese Anforderungen.

#### 1.4 Biologische Eigenschaften

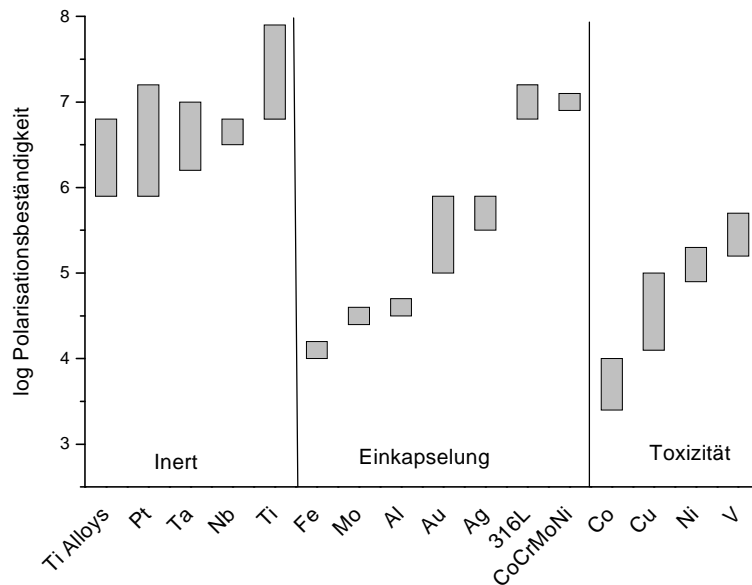
Die biologischen Eigenschaften eines Metalles hängen stark von seinen Korrosionseigenschaften ab. Folgende Reaktionen können nach einer Implantation auftreten:

- Eine direkte Reaktion des Gewebes auf das Implantat oder Korrosionsprodukte, die z.B. zu lokalen Entzündungen führen kann.
- Eine indirekte Reaktion auf das Implantat oder Korrosionsprodukte durch Transport und Anreicherung von Metallionen im Körper. Beim Überschreiten kritischer Konzentrationen kann es zu Krankheiten und Allergien kommen.
- Durch Korrosion und die damit verbundenen elektrochemischen Prozesse kann es zu massiven Störungen des Elektrolythaushaltes in der Implantatumgebung kommen.
- Schädigung des umliegenden Gewebes durch Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in entzündeten Zellen.

Nach der Reaktion die ein Metall im Organismus hervorruft, kann man sie in drei Gruppen einteilen:

- Die *inerten* Metalle, die zu keiner Reaktion führen
- Metalle, die durch eine Weichteilschicht *abgekapselt* werden
- *Toxische* Metalle, die zu starken Reaktionen und einem Absterben von Zellen führen.

Dass das Korrosionsverhalten, gemessen an der Polarisationsbeständigkeit, für die Biokompatibilität verantwortlich ist, zeigt Abbildung 6. Es sind klare Unterschiede zwischen den drei Gruppen zu erkennen. Die Werte für 316L und CoCrMoNi stehen nicht in Einklang mit der im Korrosionskapitel angegebenen Literatur. Trotzdem gibt die Darstellung einen Überblick über das biologische Verhalten der üblichen Metalle und Legierungen. Die Polarisationsbeständigkeit ist definiert als  $\Delta E/I\Delta$ , wobei  $\Delta E$  eine äußerlich angelegte Spannungsänderung ist, und  $\Delta I$  der dadurch hervorgerufene Stromfluss in der korrodierenden Elektrode. Für kleine Werte von  $\Delta E$  ist  $\Delta I$  direkt proportional zum Korrosionsstrom und damit zur Korrosionsrate.



**Abbildung 6: Korrosionsbeständigkeit und Gewebereaktion auf verschiedene Metalle und Legierungen<sup>[16]</sup>**

Nähere Informationen über das biologische Verhalten der einzelnen Implantatmetalle werden in den folgenden Kapiteln gegeben.

## 2 Titan und Titanlegierungen

### 2.1 Titan

Titan steht in der 4 Hauptgruppe des Periodensystems und hat die Ordnungszahl 22. Es ist ein Leichtmetall und tritt in zwei Modifikationen auf, der hexagonalen  $\alpha$ -Form und der kubischen  $\beta$ -Form.<sup>[17]</sup> Es überzieht sich an Luft mit einer schützenden Oxidschicht, die nach 2 Stunden 1,7 nm beträgt, nach 40 Tagen 3,5 nm dick ist und nach 4 Jahren 25 nm erreicht hat.<sup>[18;19]</sup> Titan wird von Flusssäure und heißen Säuren leicht angegriffen. Es ist aber widerstandsfähig gegenüber Salpetersäure sowie verdünnter Salz- und Schwefelsäure. Das Korrosionsverhalten von Titan kann durch die Zugabe geringer Mengen an Edelmetall, wie zum Beispiel Palladium, verbessert werden ohne die mechanischen Eigenschaften zu verschlechtern.<sup>[20]</sup>

Grundsätzlich zeichnet sich Titan durch geringes Gewicht, große mechanische Festigkeit und geringe thermische Ausdehnung aus. Der hohe Schmelzpunkt von ca. 1600 °C ist nur

von theoretischem Nutzen, da sich die mechanischen Eigenschaften bereits oberhalb von 400 °C stark verschlechtern.<sup>[17]</sup>

Die mechanischen Eigenschaften von Titan sind stark von der Reinheit des Metalls abhängig. Man unterscheidet hochreines Titan und „commercially pure“ Titan (cp-Titan) in vier Reinheitsgraden (Grad 1 bis 4). Mit steigendem Sauerstoffgehalt steigen die Zugfestigkeit und die Streckfestigkeit stark an und die Bruchdehnung nimmt ab.<sup>[21]</sup>

### 2.1.1 Geschichtliches

Gregor und Klaproth entdeckten 1791 bzw. 1795 unabhängig voneinander das Oxid eines unbekanntes Metalles. Der Name entstand in Anlehnung an die Titanen der griechischen Mythologie. Die Herstellung des reinen Metalls war durch die hohe Affinität von Titan zu Sauerstoff, Stickstoff und Kohlenstoff sehr schwierig und gelang erst 1924 *van Arkel* und *de Boer*. Die erste Reduktion des Dioxides erfolgte bereits 1825 durch *Berzelius*.<sup>[17;21]</sup>

### 2.1.2 Vorkommen und Gewinnung

Titan ist ein weit verbreitetes Element und liegt mit einem Massenanteil von 0,6 % in der Erdkruste auf Platz 9 der häufigsten Elemente. Der Ionenradius von Titan ist denen der häufigsten Metalle Aluminium, Eisen und Magnesium sehr ähnlich, weshalb es in geringen Mengen überall vorkommt. Vorkommen mit höheren Titangehalten sind allerdings selten. Die wichtigsten Titan-Mineralien sind Anatas ( $\text{TiO}_2$ ), Ilmenit ( $\text{FeTiO}_3$ ), Perovskit ( $\text{CaTiO}_3$ ) und Rutil ( $\text{TiO}_2$ ). Von wirtschaftlichem Interesse sind wegen der Verarbeitbarkeit nur die Ilmenit- und Rutil-Vorkommen. Die Hauptförderländer sind Australien, Norwegen und Kanada.<sup>[17]</sup>

Die Herstellung von metallischem Titan erfolgt ausschließlich über die Reduktion von Titan-tetrachlorid. Dieses wird aus  $\text{TiO}_2$  durch Reaktion mit Chlorgas und Koks gewonnen und anschließend mehrfach aufgereinigt. Die Reduktion zum Metall erfolgte früher mit Natrium (*Hunter-Prozess*), mittlerweile aber fast ausschließlich durch Magnesium (*Kroll-Prozess*), da es mit Titan weder Mischkristalle noch intermetallische Verbindungen eingeht.

Reinstes, auch bei tiefen Temperaturen walzbares Metall erhält man durch das Verfahren von *van Arkel* und *de Boer*. Hierbei zersetzt man Titan-tetraiodid-Dämpfe an sehr dünnen,

heißen Wolfram-Fäden (chemischer Transportprozess). In halbtechnischem Maßstab wird die Herstellung von Titan auch elektrolytisch durchgeführt. Ausgangsmaterialien sind  $\text{TiCl}_4$  und  $\text{NaCl}$ . Das eingesetzte  $\text{NaCl}$  wird an der Kathode zersetzt und das entstehende Natrium reduziert schrittweise  $\text{TiCl}_4$  zum Metall. Der Energiebedarf beträgt nur etwa 40 % des Kroll-Prozesses. Eine großtechnische Herstellung hat sich bisher aber noch nicht durchsetzen können.<sup>[21-23]</sup>

## 2.2 Titanlegierungen<sup>[21;24]</sup>

Hauptziel der Legierung von Titan mit anderen Elementen ist die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften. Die Steigerung der Korrosionsbeständigkeit wurde bereits erwähnt. Grundsätzlich unterscheidet man  $\alpha$ -,  $(\alpha+\beta)$ - und  $\beta$ -Legierungen. In Tabelle 4 sind die mechanischen Eigenschaften von Reintitan, der zwei etablierten  $(\alpha+\beta)$ -Legierungen  $\text{Ti6Al7Nb}$  und  $\text{Ti6Al4V}$  sowie der relativ neuen, sich in Erprobung befindlichen,  $\beta$ -Legierungen  $\text{Ti15Mo}$  und  $\text{Ti15Mo5Zr3Al}$  angegeben. Die zugesetzten 15 % Molybdän stabilisieren die kubische  $\beta$ -Mikrostruktur bei Raumtemperatur.

**Tabelle 4: Mechanische Eigenschaften von Reintitan und ausgewählten Titanlegierungen<sup>[24]</sup>**

Legierung	Zugfestigkeit [MPa]	0,2 % Streckfestigkeit [MPa]	Bruchdehnung [%]
cp-Ti (Grade 2)	241	172	24
Ti6Al7Nb	1115	929	13
Ti6Al4V	1076	940	15
Ti15Mo	874	544	21
Ti15Mo5Zr3Al	882	870	20

Die beiden  $(\alpha+\beta)$ -Legierungen zeigen vergleichbare Ergebnisse, wohingegen sich die  $\beta$ -Legierungen durch geringere Festigkeit und höhere Duktilität auszeichnen. Das unlegierte Reintitan zeigt die höchste Bruchdehnung bei der geringsten mechanischen Belastbarkeit.

## 2.3 Technische Verwendung<sup>[21]</sup>

In der chemischen Industrie wird cp-Titan und Palladium-haltiges Titan im Apparate- und Anlagenbau verwendet. Dabei dient Titan sowohl als Konstruktions- als auch als Beschichtungsmaterial. Es führt zu einer längeren Lebensdauer der Anlagen und Geräte, zu geringeren Wartungskosten und vermindert die Eisenkontamination in den Produkten. In

der Nahrungsmittelindustrie wird Titan wegen seiner Resistenz gegenüber den meisten organischen Säuren für Rührer und Behälter eingesetzt. Die Papierindustrie schätzt es wegen seiner Stabilität gegen Hypochlorit, Chlorit und  $\text{ClO}_2$ . Aufgrund seiner Beständigkeit gegenüber Meerwasser findet es außerdem Anwendung im maritimen Bereich.

Der größte Verbraucher von Titanlegierungen ist die Luftfahrtindustrie. In Unterschalltriebwerken liegt der Titangehalt zwischen 20 und 35 %. Bei den Flugzeughüllen liegt der Titangehalt zwischen etwa 8 % bei zivilen Flugzeugen und mehr als 25 % bei Militärmaschinen. Die Gewichtsersparnis durch den Einsatz von Titan und seiner Legierungen kann bis zu 20 % betragen.

## 2.4 Medizinische Eigenschaften und Anwendungen

Die Biokompatibilität von Titan und Titanlegierungen wurde ausführlich beschrieben.<sup>[25]</sup> Sie wird belegt durch zwei wichtigen Beobachtungen: Zum einen die sehr positive Gewebeanantwort auf Titanoberflächen und zum anderen das Ausbleiben von allergischen Reaktionen. Neben der langjährigen klinischen Erfahrung lässt sie sich auch aus der breiten Anwendung von  $\text{TiO}_2$  in der Kosmetikindustrie ableiten. Durch die Passivierung besteht die Oberfläche eines Titanimplantates ebenfalls aus Titandioxid.<sup>[26]</sup>

Bei der Herstellung von Titanlegierungen verwendet man normalerweise nur nicht-toxische Elemente, um die Biokompatibilität zu erhalten bzw. zu steigern. Ausnahme ist hier Ti6Al4V. Allerdings konnte in *in vivo* Tierversuchen gezeigt werden, dass, obwohl Vanadium zu unerwünschten biologischen Reaktionen führt, die Biokompatibilität von Ti6Al4V mit der Vanadium-freier Legierungen zu vergleichen ist.<sup>[24]</sup>

Die Biokompatibilität von Titan und seinen Legierungen wurde in einer Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen bestätigt, von denen hier nur einige exemplarisch aufgeführt werden sollen. Eine Vielzahl von Zelltypen wie Epithelzellen<sup>[27]</sup>, Fibroblasten<sup>[28-31]</sup>, Chondrozyten<sup>[27]</sup> sowie knochenbildende Zellen<sup>[32-34]</sup> unterschiedlichen Ursprungs adhären gut auf Titanoberflächen. Die Zelldichte ist mit der auf Zellkulturpolystyrol zu vergleichen.<sup>[35]</sup> Gerber et al.<sup>[36]</sup> fanden *in vitro* im Vergleich zu anderen Implantatmetallen bei Titan eine verbesserte biologische Antwort. Ungersböck et al.<sup>[37]</sup> untersuchten im Kaninchenmodell die Kontaktfläche zwischen verschiedenen Biomaterialien und Weichteilge-

webe. Die Explantate wurden histologisch untersucht und die Zellzahl und die Kapselbildung quantifiziert. In allen Fällen war die Reaktion auf die Titanoberfläche am geringsten.

## 2.5 Oberflächenvorbehandlung

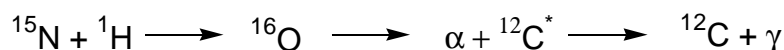
Die in dieser Arbeit untersuchten Metalloberflächen Reintitan, Ti6Al4V und Ti6Al7Nb wurden zur Erzeugung definierter Oberflächenzustände verschiedenen Oxidationsprozessen unterworfen. Angewendet wurden zwei elektrochemische Verfahren und ein nass-chemisches Ätzverfahren mit Salpetersäure. Die galvanostatischen ( $0,26 \text{ mA cm}^{-2}$ ; 1000 s) und potentiostatischen ( $5 \text{ V}_{\text{SCE}}$ ; 2 s) Oxidationsbedingungen wurden ausgewählt, weil sie in Voruntersuchungen die größten Unterschiede im Wasserstoffgehalt der Oxidschicht gezeigt hatten. Dieser ist proportional zu den vorhandenen Hydroxylgruppen und damit zu den möglichen Anbindungsstellen für einen Silanhaftvermittler. Als Modelloberflächen standen zusätzlich mit Reintitan besputterte Wafer zur Verfügung.

## 2.6 Oberflächenanalytik

Die hier für die Titanmaterialien vorgestellten Methoden wurden, bis auf die Kernreaktionsanalyse, auch auf die anderen Metalloberflächen angewendet und werden dort nicht mehr explizit erwähnt.

### 2.6.1 Kernreaktionsanalyse

Der Wasserstoff in den Oxidschichten sollte im Wesentlichen aus dem Wasser stammen und in Form von Titanoxidhydrat ( $\text{TiO}(\text{OH})_2$ ) vorliegen. Er kann tiefenaufgelöst über folgende Reaktion bestimmt werden:

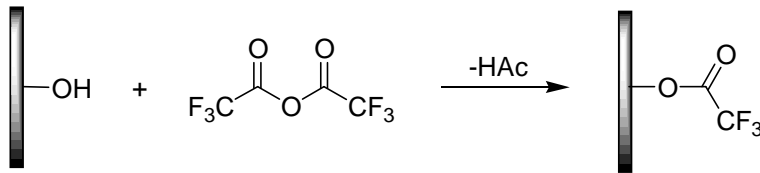


Der Nachweis des Wasserstoffs erfolgt über die vom angeregten Kohlenstoffkern  $^{12}\text{C}^*$  emittierte  $\gamma$ -Strahlung (4,43 MeV).

### 2.6.2 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Neben der klassischen Anwendung zu Bestimmung der Oberflächenzusammensetzung wurde ein weiteres Verfahren angewandt um relative Unterschiede zwischen den oberflächlich zugänglichen Hydroxylgruppen auf den Metallen zu bestimmen. Dazu werden

die metallischen Oberflächen entsprechend Abbildung 7 gasförmigem Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) ausgesetzt. Die relativen Mengen an gebildetem Trifluoressigsäureester können anschließend durch XPS und Integration des Fluorpeaks bestimmt werden.<sup>[38]</sup>



**Abbildung 7: Anbindung von Trifluoressigsäure an Metalloberflächen**

### 2.6.3 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Oberflächentopographie der einzelnen Metalloberflächen sowie die immobilisierten Proteine wurden mittels AFM visualisiert. Bei diesem Mikroskopieverfahren wird eine sehr feine Nadel (Cantilever) über die Oberfläche der Probe geführt. Die Auslenkung des Cantilevers in der Höhe und die seitliche Verdrillung wird über einen Laserstrahl optisch verfolgt. Im contact-Modus besteht, wie der Name schon sagt, ein direkter Kontakt zwischen Spitze und Oberfläche. Im non-contact-Modus sind es elektrostatische Wechselwirkungen und van der Waals-Kräfte, die die Auslenkung verursachen.

### 2.6.4 Mechanisches Tastschnittverfahren

Das Messprinzip beim mechanischen Tastschnittverfahren ist dem der Rasterkraftmikroskopie sehr ähnlich. Es wird ein harter Tastfühler, meist ein Diamant oder ein Hartmetall über die zu untersuchende Oberfläche geführt. Er ist an der Spitze einer leicht biegsamen Messzunge befestigt, deren Durchbiegung, je nach Messaufbau, induktiv oder über Widerstandsänderungen erfasst wird. Dadurch sind neben der Rauigkeit auch Aussagen über die Profilhöhe, die Rillenbreite oder die Schiefe bzw. Steilheit der Oberflächenstrukturen zugänglich.

## 3 Tantal

Tantal steht mit der Ordnungszahl 73 zusammen mit Vanadium und Niob in der 5. Nebengruppe des Periodensystems. Es handelt sich um ein platin-graues, hartes Metall. Es ist elastisch und lässt sich walzen und schmieden. Der Schmelzpunkt liegt bei ca. 3000°C.

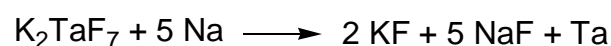
Tantal ist ein unedles Metall, überzieht sich aber an Luft wie Titan mit einer schützenden Oxidschicht. Bei Temperaturen oberhalb 300 °C oxidiert es schnell. Unterhalb 100 °C zeigt es allerdings eine extreme Widerstandsfähigkeit gegenüber den meisten organischen und anorganischen Säuren mit Ausnahme von Flusssäure.<sup>[39]</sup>

### 3.1.1 Geschichtliches

1802 entdeckte A. G. Ekeberg das Oxid eines neuen Elementes, das er in Anlehnung an Tantalus aus der griechische Mythologie Tantal nannte, da es sich in Säure nicht löst und „schmachten muss und seinen Durst nicht löschen kann, wie Tantalus in der Unterwelt“. Erst 100 Jahre später gelang Bolton die erste Isolierung des Elementes.<sup>[40]</sup>

### 3.1.2 Vorkommen und Gewinnung

Tantal gehört mit einer Konzentration von 2,1 g/t in der Erdkruste zu den seltenen Elementen. Es ist mehr als 10 mal seltener als Niob, mit dem es vergesellschaftet über die ganze Welt verstreut vorkommt. Ein Großteil der Reserven liegt in einem Gürtel von Thailand über Malaysia und China bis nach Indonesien. Die Gewinnung erfolgt nach Aufarbeitung der Erze und Anreicherung von Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub> fast ausschließlich durch Aufschluss des Oxids mit konzentrierter Flusssäure und Reduktion des gewonnenen Fluorides mit Natrium.<sup>[39]</sup>



### 3.1.3 Verwendung auf technischem Gebiet

Etwa 50 % der Weltproduktion von Tantal wird für die Herstellung von Kondensatoren verwendet. Darüber hinaus wird es im chemischen Apparatebau als korrosionsfester Werkstoff für Behälterauskleidungen, Wärmetauscher und Pumpenteile geschätzt.<sup>[39;40]</sup>

### 3.1.4 Biologische Eigenschaften und Verwendung auf medizinischem Gebiet

Die Korrosionsbeständigkeit von Tantal wurde von Zitter et al.<sup>[41]</sup> *in vitro* mit der anderer Implantatmetalle verglichen. Sie konnten eine niedrigere Korrosionsstromdichte und eine höhere Korrosionsfestigkeit für Tantal im Vergleich zu Titan und Ti6Al4V nachweisen. Sowohl van Mulder et al.<sup>[42]</sup> als auch Tengvall et al.<sup>[43]</sup> sehen Tantal unter biologisch rele-

vanten Bedingungen als „Edelmetall“. Tantalpulver (10 – 50  $\mu\text{m}$ ) zeigte *in vitro* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von menschlichen Fibroblasten.<sup>[44]</sup> Es konnte kein Unterschied zu Titan festgestellt werden. Gerber et al.<sup>[36]</sup> gruppieren Tantal in Bezug auf seinen biologischen Einfluss zusammen mit cp-Titan und 316L Edelstahl ein.

In Implantationsversuchen mit Tantal in unterschiedlichen Formen (Folie, Draht, Stab oder Kugel) konnte Osseointegration des Implantates gezeigt werden. Es kam zu einem direkten Knochen-Metall-Kontakt ohne Einkapselung oder Bildung einer Weichgeweschicht. Die Versuche wurden sowohl an Tieren<sup>[45-48]</sup> als auch an Menschen<sup>[49-51]</sup> durchgeführt. Im Tierversuch führte die Verwendung von Tantal bei der Knochenfixation zu einem verbesserten Heilungsprozess im Vergleich zu Edelstahl und Niob.<sup>[52]</sup> Nach Tümmler et al.<sup>[53]</sup> besitzen Tantal und Titan im Vergleich zu Cobaltbasislegierungen nicht leitende Oxidschichten. Diese führen nicht zu einer Denaturierung der adsorbierten Proteine und ermöglichen somit eine Osseointegration.

Wegen seiner hohen Dichte wird es in Pulverform als Kontrastmittel für Röntgenuntersuchungen des Atem- und Verdauungstraktes verwendet.<sup>[54;55]</sup> Seit den 40er Jahren wird Tantal in Form von Platten oder Netzen bei der Behandlung von Schädeltraumata eingesetzt.<sup>[56;57]</sup> Auch bei Knochenbrüchen und Implantaten im Kiefer wurde es erfolgreich verwendet.<sup>[50;51;58]</sup>

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Tantal für mehr als 50 Jahre erfolgreich in Tierversuchen und klinischen Anwendungen eingesetzt worden ist. Trotzdem ist seine Verwendung als Biomaterial heute nur sehr begrenzt. Gründe dafür sind der hohe Preis bei schlechter Verfügbarkeit und Probleme bei der Herstellung. Dazu kommt noch die starke Konkurrenz durch Titan, Titanlegierungen und Cobaltbasislegierungen.<sup>[59]</sup>

In dieser Arbeit wird Tantal, wie bereits in der Einführung beschrieben, als Beschichtungsmaterial für medizinischen Edelstahl verwendet. Daneben stehen wie bei Titan tantalisierte Wafer als Modelloberflächen zu Verfügung.

## 4 Medizinischer Edelstahl

### 4.1 Eisen

Eisen ist wahrscheinlich das häufigste Element unseres Erdballs. In der Erdkruste beträgt sein Anteil nur etwa 5 %, der Anteil an der Gesamtmasse wird allerdings auf 37 % geschätzt. Es kommt in der Natur aufgrund seines unedlen Charakters fast ausschließlich in Verbindungen vor. Von Eisenerzen spricht man bei Gesteinen, die mehr als 20 % Eisen enthalten.

Die Entdeckung von Eisen ist zeitlich nicht genau festzulegen. Bereits in ägyptischen Gräbern von etwa 4000 v. Chr. hat man kleine Eisengegenstände gefunden. Die Eisenzeit in Europa wird in etwa von 800 v. Chr. bis zum Jahre 0 datiert.

Abhängig vom Kohlenstoffgehalt unterscheidet man zwischen nicht schmiedbarem Roheisen und schmiedbarem Stahl.<sup>[60]</sup>

### 4.2 Stahl

Stahl besitzt einen Kohlenstoffgehalt kleiner 2,1 %. Es ist die wichtigste Form des technischen Eisens, in die 90 % der Weltproduktion an Roheisen überführt werden. Grundsätzlich erfolgt die Herstellung durch Oxidation der Verunreinigungen (C, Si, Mn, P, S) mit Sauerstoff. Es bildet sich eine Oxidschlacke und Stahl. Bei den technischen Verfahren verwendet man heute im Wesentlichen das LD-Verfahren (Linz-Donawitz-Verf.) sowie das Elektrostahlverfahren. Die älteren Bessemer, Thomas- und Siemens-Martin-Verfahren haben kaum noch Bedeutung.<sup>[61]</sup>

### 4.3 Edelstahl

Die Eigenschaften keines anderen Metalles lassen sich durch Legierungsmaßnahmen und Wärmebehandlung in so großem Umfang verändern wie die des Eisens.<sup>[60]</sup> Die Zahl der bekannten Eisen- und Stahlsorten geht in die Tausende. Erfunden wurde Edelstahl im Jahre 1904 von Leon Guillet.<sup>[9]</sup> Der Einsatz auf medizinischem Gebiet begann 1926, als Strauss den 18Cr8Ni Edelstahl mit einem Gehalt an 2 – 4 % Molybdän und Spuren von Kohlenstoff patentierte. Dieser hatte eine ausreichende Korrosionsbeständigkeit unter physiologischen Bedingungen.<sup>[62]</sup>

Heute werden in der Orthopädie hauptsächlich die zwei Legierungen 316L und 22-13-5 eingesetzt, deren Hauptbestandteile in Tabelle 5 angegeben sind.

**Tabelle 5: Zusammensetzung von 316L und 22-13-5 Edelstahl**

Legierung	Mn [%]	Cr [%]	Ni [%]	Mo [%]	Fe [%]
316L	< 2	17-19	13-15,5	2-3	Rest
22-13-5	4-6	20,5-23,5	11,5-13,5	2-3	Rest

Hierbei verbessern Chrom und Molybdän vor allem die Korrosionsbeständigkeit, wohingegen der im Vergleich zu technischen Stählen relativ hohe Nickelgehalt die austenitische, nichtmagnetische Mikrostruktur stabilisiert.<sup>[9]</sup>

Die Dichte von Edelstahl ist etwa doppelt so hoch wie die von Titan. Allerdings ist das Gewicht bei vielen kleinen Implantaten nicht ausschlaggebend. Die mechanischen Eigenschaften sind stark abhängig von der Herstellung und Vorbehandlung. So hat geschmiedetes Material die geringste, kalt-gezogenes die größte Festigkeit.<sup>[62]</sup>

In Bezug auf die Korrosionsbeständigkeit ist der 22-13-5 Edelstahl dem 316L überlegen. Dies wurde sowohl mit elektrochemischen Tests als auch in Inkubationsversuchen untersucht.<sup>[9]</sup> Die Verschleißfestigkeit der medizinischen Edelstähle ist gut und vergleichbar mit der von Cobalt-Legierungen.<sup>[63]</sup>

Die Biokompatibilität wurde in einer Vielzahl von *in vitro*- und *in vivo*-Tests untersucht. Sie bescheinigen 316L und 22-13-5 neben dem langjährigen erfolgreichen klinischen Einsatz die Eignung als Implantatmaterial.<sup>[64]</sup>

Allerdings kommt es aufgrund des hohen Nickelgehaltes bei einigen Personen zu Komplikationen durch eine vorhandene Nickelallergie. In diesen Fällen musste man bisher auf Titanimplantate zurückgreifen. Eine weitere Möglichkeit stellen die sich gerade in Erprobung befindlichen Nickel-freien Edelstähle dar. Sie sind den bisherigen Stählen in ihren mechanischen Eigenschaften und der Korrosionsbeständigkeit überlegen und haben in Bezug auf ihre biologischen Eigenschaften bereits positive Ergebnisse erbracht.<sup>[62]</sup>

Verwendung finden Edelstahlimplantate vor allem in der Frakturheilung und in künstlichen Hüftgelenken.<sup>[62]</sup>

## 5 Cobalt-Legierungen

Fast alle der heute verwendeten Cobalt-Legierungen basieren auf den Arbeiten von Elwood Haynes, der um die Jahrhundertwende den Einfluss von Chrom als Legierungsbestandteil für Cobalt, aber auch für Nickel und Eisen untersuchte.<sup>[65]</sup> Heute werden über 60 % der Jahresproduktion an Cobalt für die Herstellung von Legierungen verwendet. Die große Zahl an unterschiedlichen Systemen lässt sich zu einigen Hauptgruppen zusammenfassen.<sup>[66]</sup>

### 5.1 Hochtemperatur-Legierungen (Superalloys)

Die vor allem in der Luftfahrtindustrie als Turbinenschaufeln und in Plattenform zur Auskleidung von Gasauslässen bei Turbinen verwendeten Hochtemperatur-Legierungen sind eine komplexe Mischung verschiedener Elemente. Häufige Legierungsbestandteile und ihre Eigenschaften sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

**Tabelle 6: Einfluss von Legierungsbestandteilen in Cobalt Superalloys**

Element	Effekt
Chrom, Aluminium	Verbesserung der Oxidations- und Korrosionsbeständigkeit bei hohen Temperaturen
Molybdän, Wolfram, Tantal, Niob	Mischkristallverfestigung
Titan, Nickel	Verfestigung durch Bildung intermetallischer Cobalt-Nickel- bzw. Cobalt-Titan-Verbindungen
Kohlenstoff	Verfestigung durch Carbidbildung mit Legierungsbestandteilen

### 5.2 Magnetische Legierungen

Cobalt-Legierungen werden für die Herstellung von Dauermagneten für verschiedenste Anwendungen hergestellt. Die wichtigsten sind hierbei die Gruppen der Alnico-Legierungen - bestehend aus Nickel, Eisen, Aluminium und Cobalt - sowie Legierungen aus Seltenerdmetallen wie Samarium oder Praseodym und Cobalt.

### 5.3 Hartmetall-Legierungen

Die sog. Stellite-Legierungen zeichnen sich vor allem durch eine hohe Verschleißfestigkeit aus. Die Legierungsbestandteile sind neben Cobalt und Chrom Wolfram, Molybdän, Nickel, Eisen und Kohlenstoff. In den letzten 100 Jahren hat sich an den Zusammensetzungen nicht viel verändert. Allerdings konnte durch eine kontrolliertere Sauerstoffzugabe und

damit eine gleichmäßigere Verteilung der Hartmetallcarbide eine stark verbesserte Verschleißfestigkeit erzielt werden.

## 5.4 Medizinisch relevante Legierungen

Die erste Anwendung einer Cobalt-Legierung auf medizinischem Gebiet erfolgte in der Zahnmedizin. Man verwendete eine unter dem Namen „Vitallium“ bekannte Legierung aus Cobalt, Chrom, Molybdän, Kohlenstoff und Silizium. Sie konnte einfach gegossen und damit in unterschiedlichsten Formen hergestellt werden. Sie zeichnete sich durch hohe Festigkeit bei geringer Dichte, gute Korrosionsfestigkeit und gute biologische Verträglichkeit aus.<sup>[66;67]</sup>

Die chemische Zusammensetzung der heute am häufigsten verwendeten Cobalt-Legierung CoCrMo sowie der in dieser Arbeit verwendeten Legierung MP35N (CoNiCrMo) sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Von CoCrMo existiert eine gegossene und eine geschmiedete Form. Diese unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer chemischen Zusammensetzung.<sup>[9;67]</sup>

**Tabelle 7: Chemische Zusammensetzung wichtiger Cobaltbasislegierungen**

Legierung	Cr [%]	Mo [%]	Ni [%]	Fe [%]	Mn [%]	Ti [%]	Co [%]
CoCrMo	26-30	5-7	< 1	< 1	< 1	-	Rest
CoNiCrMo	19-21	9-10	33-37	< 1	< 0,15	< 1	Rest

Die mechanischen Eigenschaften einer Legierung hängen stark von ihrer Mikrostruktur ab. Je gleichmäßiger und feinkörniger sie ist, desto besser sind die mechanischen Eigenschaften. Das ist der Hauptgrund für die Unterschiede zwischen gegossenem und geschmiedetem CoCrMo. Durch das Schmieden werden die hauptsächlich für die Festigkeit verantwortlichen Carbide gleichmäßig verteilt und führen zu den überlegenen mechanischen Eigenschaften. Zwar kann die gegossene Legierung durch spezielle Hitze- und Druckbehandlungen verbessert werden, die Fähigkeiten des geschmiedeten Materials werden aber nicht erreicht.<sup>[67]</sup>

Die Korrosionsbeständigkeit von Cobaltlegierungen unter physiologischen Bedingungen hat sich sowohl in *in vivo* als auch in *in vitro* Versuchen als geeignet herausgestellt.<sup>[64]</sup>

Auch die auf technischem Gebiet geschätzte Verschleißfestigkeit wurde in mechanischen Tests und Hüft- bzw. Kniegelenkssimulatoren untersucht und positiv bewertet.<sup>[68]</sup>

Die Biokompatibilität wurde ebenfalls in verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Tests untersucht und für chirurgische Implantate als geeignet befunden.<sup>[63;64]</sup>

Cobaltlegierungen werden aufgrund ihrer herausragenden mechanischen Eigenschaften, ihrer guten Korrosionsfestigkeit und der bemerkenswerten Verschleißigenschaften vor allem beim Gelenkersatz eingesetzt.<sup>[67]</sup>

## 6 Silan-Haftvermittler<sup>[69]</sup>

Das Konzept, dass eine Bindung zwischen zwei unterschiedlichen Materialien nur durch eine dritte, haftvermittelnde Substanz ermöglicht wird, die mit den beiden anderen eine gleichermaßen gute Bindung eingeht, wurde schon von Plato erwähnt. Er versuchte damit das aus den vier gegensätzlichen Elementen Feuer, Wasser, Erde und Luft bestehende Universum zu erklären:

Dass sich zwei Bestandteile allein und ohne einen Dritten wohl verbinden, ist nicht möglich; denn ein bestimmtes Band in der Mitte muss die Verbindung zwischen beiden schaffen. Das schönste aller Bänder aber ist das, welches sich selbst und das Verbundene, soweit möglich, zu einem macht. [...] Verhält sich der mittlere so zum letzten wie der erste zum mittleren und wiederum wie der letzte sich zum mittleren so der mittlere zum ersten, dann wird, da der mittlere zum ersten und letzten wird, der letzte und der erste aber beide zum mittleren, daraus notwendig folgen, dass alle dieselben seien. [PLATO, Timaios]

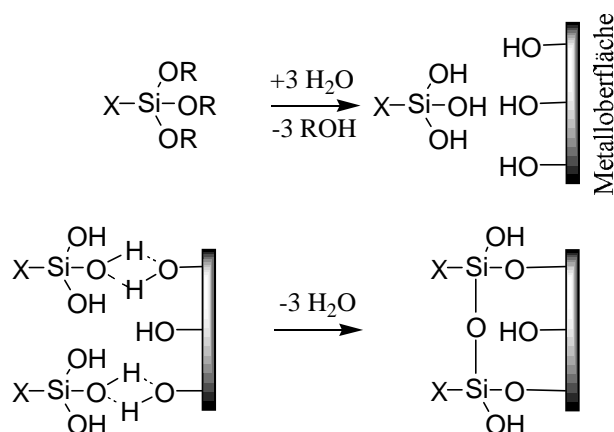
Obwohl das Auftragen von organischen Polymeren auf anorganische Oberflächen schon relativ lange durchgeführt wurde (z.B. Schutzlackierungen auf unedlen Metallen), bekam das Konzept der Haftvermittlung erst im 20. Jahrhundert eine technische Bedeutung. Vor allem nach der Entwicklung der Kompositmaterialien 1940 entstand ein Bedarf an neuen, verbesserten Bindungstechniken.

Die damals hergestellten glasfaserverstärkten Epoxidharze zeigten zwar eine sehr hohe Anfangsfestigkeit, die sich aber nach kurzer Zeit und insbesondere nach Einwirkung von Feuchtigkeit oder Temperaturschwankungen stark verschlechterte. Diese Beobachtung wird durch einen Bindungsverlust des Polymers mit den hydrophilen Glasoberflächen durch das Eindringen von Wasser und die unterschiedlichen thermischen Ausdehnungskoeffizienten erklärt. Durch den Einsatz von Haftvermittlern konnte die Bindung zwischen

den beiden Komponenten des Kompositmaterials stark verbessert werden. Die bifunktionellen Moleküle konnten sowohl mit der Glasoberfläche, als auch mit dem Polymer eine stabile Bindung eingehen. Seit den fünfziger Jahren wurden für eine Vielzahl von Materialkombinationen Haftvermittlersysteme entwickelt und etabliert. Die Bindung zum anorganischen Substrat kann durch kovalente oder ionische Bindung sowie durch Komplexbildung erfolgen. Die Haftung zum Polymer erfolgt in der Regel durch kovalente Bindungen.

In der Gruppe der Haftvermittler besitzen organofunktionelle Silane eine herausragende Rolle. Sie ermöglichen eine starke Bindung zwischen einer organischen Beschichtung, wie einem Polymer, und einem anorganischen Substrat, meistens ein Metall oder Glas. Sie haben in der Regel die allgemeine Struktur  $\text{RSiX}_3$ . Hierbei ist X eine leicht hydrolysierbare Gruppe, wie z.B. ein Ethoxy- oder Methoxy-Rest. R bezeichnet einen hydrolysestabilen, organischen Rest. Die durch Hydrolyse entstehenden Silanolgruppen  $\text{Si-OH}$  können mit Hydroxylgruppen auf anorganischen Substraten (z.B. Metallen) und Silanolgruppen anderer Haftvermittlermoleküle kondensieren und kovalente  $\text{Si-O-M}$ -Bindungen bilden. Der Rest R enthält eine funktionelle Gruppe, die eine Bindung zum Polymer ermöglicht. Üblich sind hier Hydroxyl-, Amino-, Isocyanat-, Methacryl- oder Epoxid-Gruppen.

Die Anbindung eines Silanhaftvermittlers an eine Metalloberfläche durch Wasserstoffbrückenbindungen und Kondensationsreaktionen ist in Abbildung 8 zu sehen.



**Abbildung 8: Hydrolyse eines Silanhaftvermittlers und Kondensation mit einer Metalloberfläche**

## 6.1 Anwendungen<sup>[69]</sup>

Die klassische Anwendung der Silane ist wie bereits erwähnt die Haftvermittlung zwischen anorganischen und organischen Materialien. Hier sind zum einen die glasfaserver-

stärkten oder mit mineralischen Füllstoffen versetzten Kompositmaterialien zu nennen, zum anderen die Anbindung von Kunststoffen, Farben oder Lacken auf Metalloberflächen. Daneben haben sich noch weitere Anwendungsgebiete erschlossen. Dazu gehören unter anderem:

- Der Einsatz als Hydrophobierungsmittel für keramische Isolatoren und im Fassadenschutz
- Die gezielte chemische Veränderung von chromatographischem Säulenmaterial
- Die Beschichtung von oxidischem Elektrodenmaterial
- Die Anbindung aktiver Substanzen an anorganische Trägermaterialien für die heterogene Katalyse
- Die Verwendung von Silanen mit quartären Ammoniumsalzen für antibakterielle und „anti-fouling“ Beschichtungen
- Die Peptidsynthese mit Glas als stationärer Phase
- Die Immobilisierung von Enzymen für analytische und chromatographische Verfahren sowie in Fermentern.

## 6.2 Aminopropyltriethoxysilan und Isocyanatopropyltriethoxysilan



**Abbildung 9: Strukturformeln der Haftvermittler Aminopropyltriethoxysilan (APTES, I) und Isocyanatopropyltriethoxysilan (IPTES, II)**

APTES gehört zu den am besten untersuchten und auch großtechnisch angewandten Haftvermittlern. Seine Strukturformel ist in Abbildung 9 zu sehen. Mit der eingebrachten Aminogruppe ist es möglich, die unterschiedlichsten Systeme anzubinden. Die Beschichtung von Glas<sup>[70]</sup>, Kieselgel<sup>[71]</sup> und verschiedener Metalle wie Eisen, Aluminium oder Kupfer<sup>[72-74]</sup> wurde ausführlich untersucht. Auch organische Materialien wie Cellulose<sup>[75]</sup> oder Teflon<sup>[70]</sup> lassen sich modifizieren.

Auf dem Gebiet der Biomaterialien sind vor allem Puleo et al. zu nennen, die sich ausgiebig mit der Anbindung von APTES an CoCrMo aber auch Ti6Al4V beschäftigt ha-

ben.<sup>[38;76-80]</sup> Neben der Untersuchung der aufgebrachtten Silanschichten wurde Trypsin als Modellprotein an die Oberfläche angebunden und auf seine Aktivität hin untersucht. Außerdem wurde mit Hilfe von APTES Fibrinogen auf NiTi-Oberflächen angebunden<sup>[81;82]</sup>, RGD-Sequenzen (Arginin-Glycin-Asparaginsäure) auf SiO<sub>2</sub> immobilisiert<sup>[83]</sup> und das antithrombogene Thrombomodulin an Glas gebunden<sup>[84]</sup>. Für die kovalente Anbindung von biologischen Systemen an Titan und seine Legierungen existieren neben der bereits erwähnten Arbeit von Puleo weitere Veröffentlichungen. Xiao et al.<sup>[85]</sup> sowie Gawalt et al.<sup>[86]</sup> immobilisierten RGD-Sequenzen auf Ti6Al4V, Jennissen et al.<sup>[87]</sup> aktivierten Titanpulver und Titanplättchen mit APTES und banden Ubiquitin und BMP-2 (Bone Morphogenic Protein) kovalent an die Oberfläche an. Nanci et al.<sup>[88]</sup> beschichteten Titan mit Albumin und alkalischer Phosphatase. Untersuchungen zur Anbindung von Proteinen an Tantal wurden von Tsuruta et al.<sup>[89]</sup> durchgeführt, die Trypsin und BSA (bovines Serum Albumin) über APTES auf einer Tantalelektrode immobilisierten.

Die Struktur des zweiten in dieser Arbeit verwendeten Silanhaftvermittlers ist ebenfalls in Abbildung 9 zu sehen. Die vorhandene Isocyanatgruppe hat im Vergleich zu APTES den Vorteil, dass sie auch ohne weitere Aktivierung direkt mit Amino- oder Hydroxylgruppen reagieren kann. Auf dem Gebiet der Biomaterialien gibt es nur wenige relevante Veröffentlichungen. Seongbong<sup>[90]</sup> modifizierte Polyethylenglykol mit IPTES zur Herstellung von kovalent gebundenen, Protein-abweisenden Schichten auf Glas. Udipi et al.<sup>[91]</sup> beschichteten Tantaloberflächen mit einem anti-inflammatorisch wirkenden Komplex. Die kovalente Bindung erfolgte ebenfalls durch direkte Reaktion mit IPTES.

### **6.3 Analytik der Haftvermittlerschichten**

#### **Qualitative und quantitative Untersuchung der Haftvermittlerschichten**

Zum Nachweis der Haftvermittlerschichten wurden reflexive IR-Messungen, die Röntgenphotoelektronenspektroskopie sowie ein UV-spektroskopisches Verfahren unter Einsatz des Reagenzes Sulfo-succinimidyl-dimethoxytrityl-butyrate (Sulfo-SDTB) eingesetzt.<sup>[92]</sup> Bei letzterem nutzt man den hohen Extinktionskoeffizienten des Dimethoxytritylkations, um die geringen Oberflächenkonzentrationen von Aminogruppen zu bestimmen. In einer ersten Reaktion bindet man den Dimethoxytritylrest über einen Spacer an die zugänglichen Aminogruppen der Oberfläche. In einem zweiten Schritt wird anschließend das Tritylkation abgespalten und photometrisch bestimmt (Abbildung 10). Die Nachweisgrenzen liegen

im Nanomolbereich. Diese Methode wurde für diese Arbeit auf den Modelloberflächen etabliert und auf die realen Proben übertragen.

Für die Quantifizierung von IPTES wurde analog zu sulfo-SDTB ein kommerziell nicht erhältlicher Farbstoff synthetisiert, der über eine Aminogruppe mit den oberflächlichen Isocyanatgruppen des Haftvermittlers reagieren kann. Der weitere Reaktionsverlauf verläuft analog sulfo-SDTB. Der Syntheseweg zum Dimethoxytritylaminohexanol (DAH) ist am Ende dieses Kapitels angegeben (Abbildung 13).

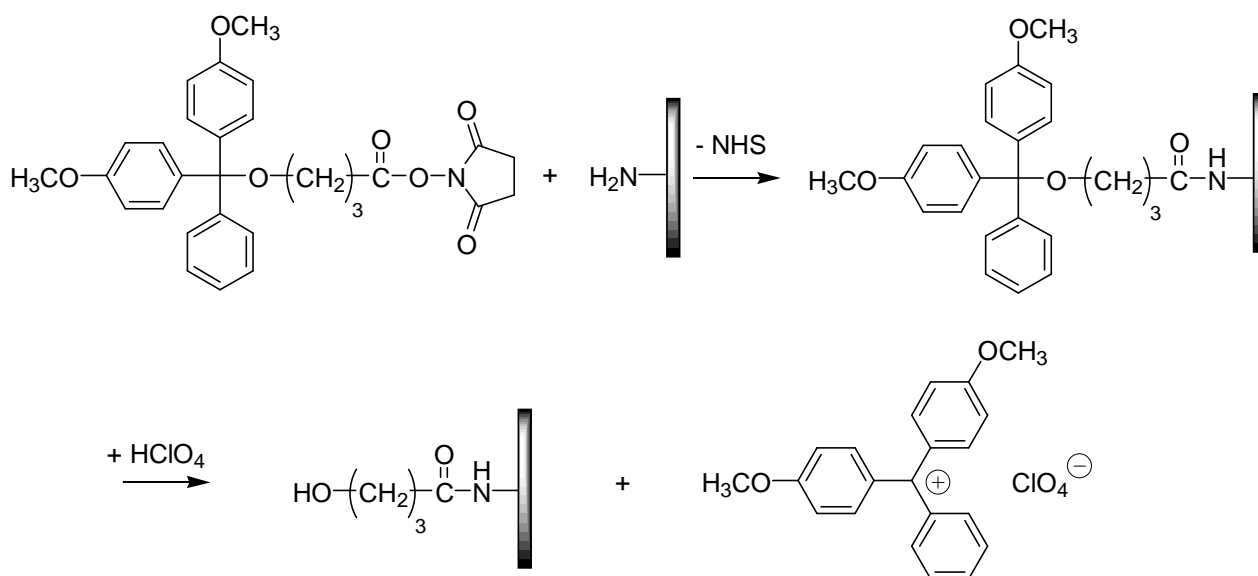


Abbildung 10: Nachweis von APTES mit sulfo-SDTB

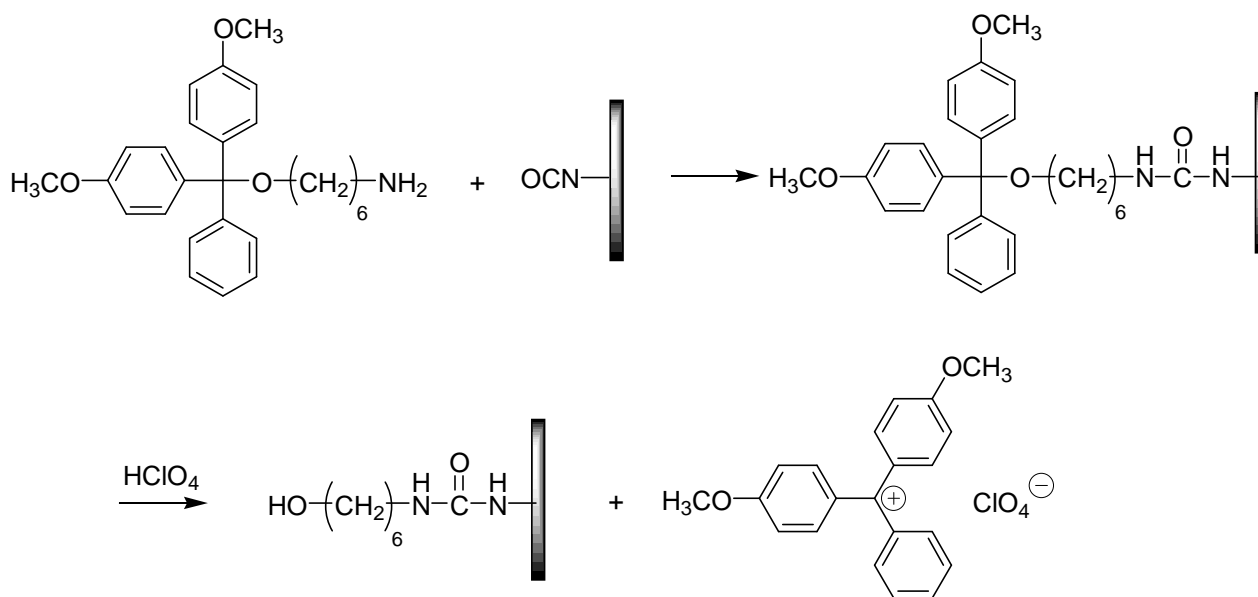
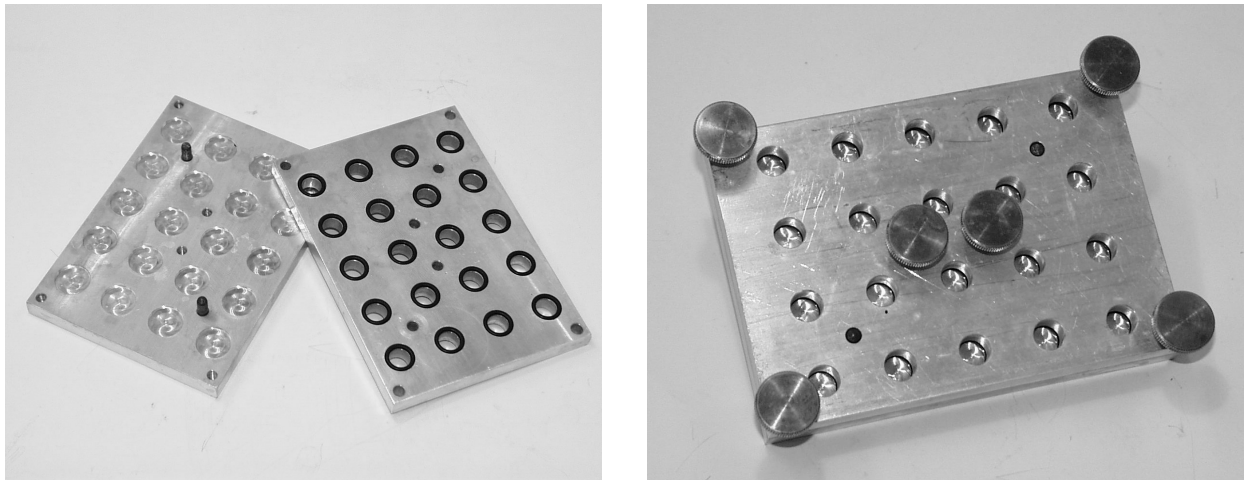


Abbildung 11: Nachweis von IPTES mit DAH

Eines der größten Probleme bei der Quantifizierung der Aminogruppen war der Bezug der bestimmten Farbstoffmenge auf eine exakte Oberfläche. Bei allen verwendeten Proben war

immer nur eine Seite von Bedeutung, die andere entweder unbeschichtet oder nicht oxidiert. Bei den Wafern kamen zusätzlich noch die unregelmäßigen Bruchkanten hinzu, die eine Berechnung der Oberfläche unmöglich machten. Nach einer Vielzahl von nicht erfolgreichen Versuchen zur Maskierung der Unterseiten und Kanten mit Tesafilm oder thermoplastischen Kunststoffen wurde schließlich eine Beschichtungsform entworfen und in der mechanischen Werkstatt der Universität Regensburg gebaut. Sie besteht aus einer Bodenplatte mit 20 Vertiefungen entsprechend der Form und Dicke der zu untersuchenden Proben und einer Auflage mit 20 Löchern und Dichtungsringen, die auf die Bodenplatte geschraubt wird (Abbildung 12). Dadurch kann der Bereich auf der Oberfläche, der mit der Farbstofflösung in Kontakt kommt, auf eine reproduzierbare und gleiche Fläche begrenzt werden.



**Abbildung 12: Beschichtungsform für quantitative Untersuchungen**

#### **6.4 Untersuchung der Haftvermittlerschichten auf ihre chemische Stabilität**

Am Beispiel von APTES wurde die chemische Stabilität der Haftvermittler auf der Oberfläche durch Inkubation in Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeiten aus der Lösung entnommen und der Restgehalt an Aminogruppen mit sulfo-SDTB quantifiziert. Wegen der hydrolysierbaren Isocyanatgruppe ist ein solcher Versuch mit IPTES nicht möglich.

#### **6.5 Synthese von Dimethoxytritylaminohexanol (DAH)**

Wie in Abbildung 13 zu sehen, handelt es sich bei der Herstellung um eine dreistufige Synthese. In der ersten Stufe wird durch eine Schmelzkondensation zwischen Aminohexanol (I) und Phthalsäureanhydrid (II) Hydroxyhexylphthalimid (III) hergestellt. Dieses wird

in der zweiten Stufe mit Dimethoxytritylchlorid (IV) zu Dimethoxytritylhexylphthalimid (V) umgesetzt. Letzter Schritt ist dann die Freisetzung der Aminogruppe durch Hydrazinolyse des Phthalimids und die Bildung des Endproduktes Dimethoxytritylhexylamin (VII). Die Synthese erfolgte entsprechend den Vorschriften von Agathocleous<sup>[93]</sup> und Aviñó.<sup>[94]</sup>

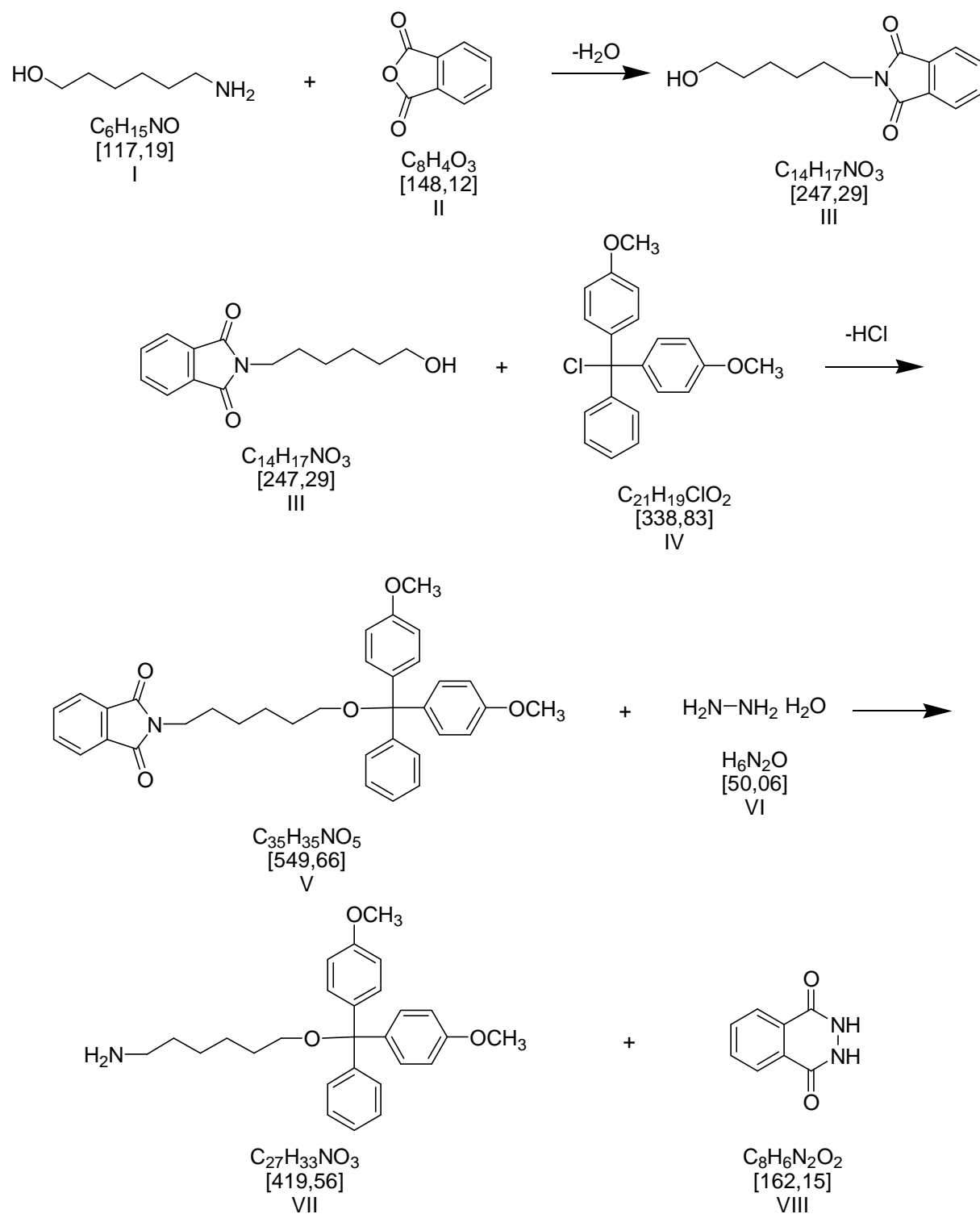


Abbildung 13: Synthese von Dimethoxytritylaminohexanol

## 7 Kollagen<sup>[95-97]</sup>

Kollagen ist das häufigste Protein bei Säugetieren und macht etwa ein Viertel des Gesamtproteingewichts aus. Es ist der wichtigste Faserbestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel, Blutgefäßen und Zähnen. Um den Anforderungen in den unterschiedlichen Geweben gerecht zu werden, wird die Grundstruktur jeweils entsprechend modifiziert. In menschlichem Gewebe kommen mehr als 15 verschiedene Arten von Kollagenen vor, von denen der Großteil bereits umfassend untersucht und charakterisiert ist.

### 7.1 Struktureller Aufbau

Die Grundstruktureinheit des Kollagens, das Tropokollagen, besteht aus drei Polypeptidketten gleicher Größe. Die Zusammensetzung hängt vom Typ des Kollagens ab. Das in dieser Arbeit verwendete Typ I Kollagen besteht aus zwei unterschiedlichen Ketten, von denen eine doppelt vorhanden ist.

Charakteristisch für das Kollagenmolekül ist der hohe Anteil an Glycin und Prolin sowie das Vorkommen von Hydroxyprolin und Hydroxylysin in der Aminosäuresequenz. Der Anteil der einfachsten Aminosäure Glycin beträgt dabei fast ein Drittel.

Tropokollagen ist ein Stäbchenmolekül von etwa 300 nm Länge und einer Dicke von etwa 1,5 nm. Es besteht aus einer dreisträngigen Helix, die sich aus drei  $\alpha$ -helikalen Peptidketten zusammensetzt. In dieser kompakten Struktur ist auch der hohe Anteil an Glycin begründet. Nur diese kleine Aminosäure (AS) hat im Inneren des Helixkabels ausreichend Platz.

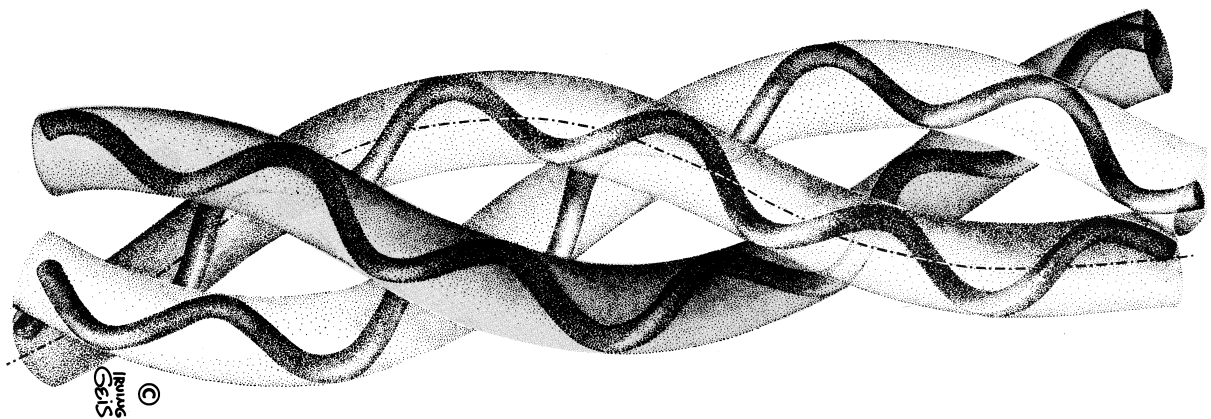
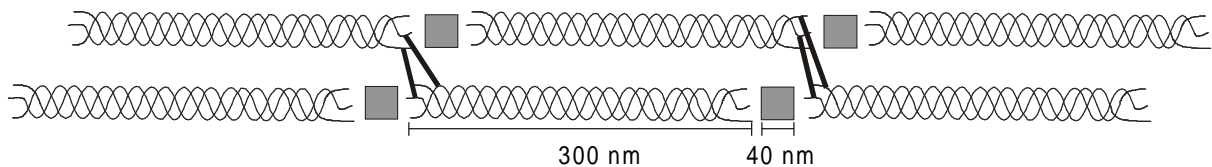


Abbildung 14: Kollagen Tripelhelix<sup>[98]</sup>

Schon der Austausch einer einzigen Aminosäure kann weitreichende Folgen haben. Bei der Krankheit *Osteogenesis imperfecta* ist ein Glycinrest gegen ein Cystein ausgetauscht. Damit verliert das Molekül die Fähigkeit zur Bildung hochgeordneter Faserstrukturen und es kommt zu schwerwiegenden Knochendeformationen.

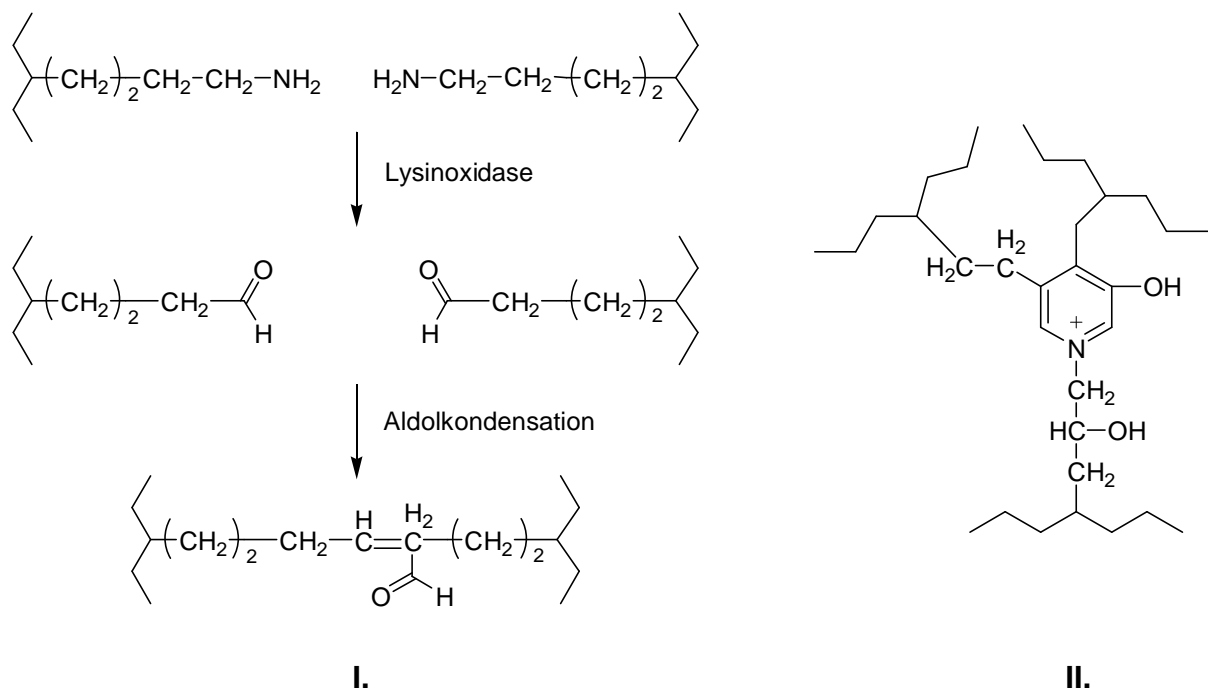
Der Zusammenhalt der Helix erfolgt hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den peptidischen CO- und NH-Gruppen. Ab einer bestimmten Temperatur beginnen diese Bindungen aufzubrechen und aus den stäbchenförmigen Molekülen entstehen ungeordnete Knäuel. Man bezeichnet die Temperatur, bei der 50 % der Struktur zerstört ist, als Schmelztemperatur  $T_m$ .

Die übergeordnete Struktureinheit des Kollagens, die Kollagenfaser oder Kollagenfibrille entsteht aus vielen Tropokollagenmolekülen durch eine gestaffelte Anordnung, wie sie in Abbildung 15 zu sehen ist. In einer Reihe sind die einzelnen Moleküle durch 40 nm breite Lücken voneinander getrennt und zur benachbarten Reihe um 68 nm versetzt, was zu den charakteristischen Querstreifen führt.



**Abbildung 15: Struktureller Aufbau einer Kollagenfaser und Lage der intermolekularen Quervernetzungen**

Neben den Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt bei den Kollagenfasern eine zusätzliche Stabilisierung durch kovalente Quervernetzungen, die nach der Zusammenlagerung der Tropokollagenmoleküle gebildet werden. Intramolekulare Querbrücken werden von zwei oxidierten Lysin-Seitenketten über eine Aldolkondensation gebildet. Für intermolekulare Vernetzungen kommen nur vier ganz bestimmte Reste in Frage: zwei Lysinreste am nicht-helikalen C- bzw. N-terminalen Ende des Moleküls und zwei Hydroxylysinreste an den beiden Enden der helikalen Bereiche. Aus jeweils zwei Hydroxylysinen und einem Lysin bildet sich eine Hydroxypyridiniumbrücke zwischen drei Polypeptidketten. Die resultierenden chemischen Strukturen sind in Abbildung 16 dargestellt, die Lage der Quervernetzungen sind bei der Faserstruktur mit angegeben.



**Abbildung 16: Natürliche Quervernetzungen in Kollagen, intramolekular (I.) und intermolekular (II.)**

Ausmaß und Art der Quervernetzung sind stark von Art und Alter des Gewebes abhängig.

Entsprechend der Schmelztemperatur bei Tropokollagen existiert für fibrilläres Kollagen ebenfalls ein vergleichbarer Parameter. Bei der sogenannten Schrumpfungstemperatur  $T_s$  kommt es zu einem plötzlichen Zusammenziehen der Kollagenfasern.

Untersuchungen der Schmelz- und Schrumpfungstemperaturen von Kollagen verschiedener Tierarten ergaben einen Zusammenhang zwischen thermischer Stabilität des Kollagens und der Körpertemperatur des Tieres. Außerdem wurde festgestellt, dass ein hoher Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin die Helix stabilisiert.

**Tabelle 8: Abhängigkeit der thermischen Stabilität von Kollagen von der Körpertemperatur**

Kollagenquelle	Prolin & Hydroxyprolin [AS/1000 AS]	Thermische Stabilität [°C]		Körpertemperatur [°C]
		$T_s$	$T_m$	
Haut der Kalbes	232	65	39	37
Haut des Haies	191	53	29	24-28
Haut des Dorsch	155	40	16	10-14

## 7.2 Anwendungsgebiete von Kollagen <sup>[96;99]</sup>

Kollagen wird schon sehr lange bei der Gerbung chemisch verändert und in Form von Leder vielfältig eingesetzt. Seine Hydrolyseprodukte werden als Gelatine oder Klebstoffe verwendet. Erst in den letzten Jahrzehnten entwickelte sich ein vermehrtes Interesse an Kollagen für den Einsatz auf medizinischem Gebiet.

Grundsätzlich muss man zwischen zwei verschiedenen Herangehensweisen unterscheiden. Bei der einen geht man von kollagenreichem Gewebe aus, dass von Natur aus in der gewünschten Form und Struktur vorliegt. Dieses wird durch chemische Veränderung, meist chemische Quervernetzung mit Glutaraldehyd, in ein implantierbares Material überführt. Beispiele hierfür sind Herzklappen, Sehnen, Bänder, Blutgefäße und Pericardium.

Daneben steht die Isolierung und Reinigung von Kollagen aus tierischem Gewebe und die Gewinnung unterschiedlicher Produkte durch klassische polymerchemische Methoden. Die wichtigsten Formen und ihre Anwendungsgebiete sind in Tabelle 9 zu sehen.

**Tabelle 9: Medizinische Anwendungen von Kollagenprodukten**

Matrix Form	Medizinische Anwendung	
Membran (Filme, Blätter)	Reparatur von oralem Gewebe, Wundabdeckungen, Hauttransplantationen	
Porös (Schwamm, Filz, Fasern)	Blutstillung, Wundabdeckung, Knorpelreparatur, plastische Weichteilvergrößerung	
Gel	Drug Delivery	
Lösung	plastische Weichteilvergrößerung	
Faden	Reparatur von Sehnen und Bändern, Nähte	
Tuben (Membran, Schwamm)	Reparatur von Nerven und Gefäßen	
Komposit	Kollagen / Synth. Polymer	Reparatur von Gefäßen und Haut, Wundabdeckung
	Kollagen / Keramik	Knochenreparatur

## 7.3 Künstliche Kollagenquervernetzung <sup>[100-102]</sup>

Um eine ausreichende *in vivo*-Stabilität zu gewährleisten, ist eine zusätzliche, künstliche Quervernetzung von Kollagen notwendig. Dafür kommen unterschiedliche physikalische und chemische Verfahren in Frage. Ausgangspunkt für die meisten Quervernetzungen sind die  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysin- und Hydroxylysinreste und die Carboxylgruppen der Asparagin- und Glutaminsäure.

### 7.3.1 Physikalische Verfahren

Der grundlegende Vorteil der physikalischen Verfahren ist, dass sie keine Chemikalien verwenden, die zu Irritationen führen können. Allerdings sind andere unerwünschte Nebenreaktionen nicht auszuschließen. Zu nennen sind hier die Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (254 nm, UV) und das Dehydrothermalverfahren (DHT). Durch die UV-Strahlung werden in den aromatischen Resten von Phenylalanin und Thyrosin freie Radikale gebildet, die dann untereinander zu Quervernetzungen abreagieren. Vorteil ist dabei die kurze Reaktionszeit. Beim Dehydrothermalverfahren wird dem Kollagen unter Vakuum bei erhöhter Temperatur Wasser entzogen. Dadurch entstehen aus freien Carbonsäure- und Aminogruppen neue Amidbindungen, die zu einer Stabilisierung des Moleküls führen. Um eine vollständige Umsetzung zu erreichen ist, allerdings eine Reaktionszeit von mehreren Tagen notwendig.<sup>[102]</sup>

### 7.3.2 Chemische Methoden

Die chemischen Quervernetzungsreagenzien lassen sich nochmals in zwei Gruppen unterteilen:

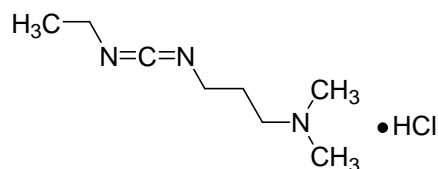
- Reagenzien, die eine Bindung zwischen zwei freien Aminogruppen ermöglichen (z.B. Glutaraldehyd)
- Reagenzien, die durch Aktivierung der freien Carboxylgruppen zu einer Neubildung von Amidbindungen führen (z.B. Carbodiimide)

Theoretischen Berechnungen zufolge existieren etwa siebenmal mehr Möglichkeiten zur Bildung von Amidbindungen als für die Verknüpfung von zwei Aminogruppen.

Trotzdem ist Glutaraldehyd (GA) das wichtigste und am häufigsten eingesetzte Quervernetzungsreagenz. Die erste erfolgreiche Anwendung auf dem Gebiet der Implantatquervernetzung erfolgte in den späten 60er Jahren durch Carpentier. Glutaraldehyd liegt in wässriger Lösung meist nicht als Monomer vor, sondern polymerisiert zu unterschiedlich langen Ketten, die aber ihre Reaktionsfähigkeit beibehalten. Neben dem Vorteil dadurch weiter voneinander entfernte Aminogruppen zu verknüpfen, besteht als Nachteil aber die Möglichkeit einer Hydrolyse und der unerwünschten Freisetzung von Glutaraldehyd im Organismus.<sup>[103-105]</sup>

Eine andere Möglichkeit ist die Verwendung von Hexamethylendiisocyanat (HDI), das ebenfalls zwei Aminogruppen verbindet. Die Quervernetzung erfolgt wegen der Hydrolyselabilität der Isocyanatgruppen in organischen Lösungsmitteln (Isopropanol, DMSO). Die Eigenschaften von HDI-quervernetztem Gewebe bezüglich Schrumpfungstemperatur, mechanischen Eigenschaften und enzymatischer Stabilität sind mit denen nach Glutaraldehyd-Quervernetzung zu vergleichen. Allerdings sind die cytotoxischen Effekte bei HDI geringer als bei Glutaraldehyd.<sup>[106;107]</sup>

Um neue Amidbindungen zwischen freien Carboxyl- und Aminogruppen einzuführen verwendet man entweder die Acyl-Azid-Methode (AA) oder ein wasserlösliches Carbodiimid, wie z.B. Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimid (EDC).



**Abbildung 17: Strukturformel von EDC**

In beiden Fällen erfolgt eine Aktivierung der Carbonsäure, die anschließend mit sterisch zugänglichen Aminogruppen reagiert. Bei der EDC-Quervernetzung setzt man zusätzlich noch N-Hydroxysuccinimid (NHS) als Hilfsreagenz zu. Es bildet mit der aktivierten Carboxylgruppe ein ebenfalls aktives, aber hydrolysestabileres Zwischenprodukt, und unterdrückt damit eine unerwünschte Umlagerung der aktivierten Carbonsäure zu einem stabilen N-Acylharnstoff. In beiden Fällen dienen die Reagenzien nur zur Aktivierung und werden nicht in das Kollagen eingebunden.

Die Aktivierungsreaktionen sind in beiden Fällen recht unterschiedlich und zusammen mit den Mechanismen der anderen Quervernetzungen in Abbildung 18 zu sehen.

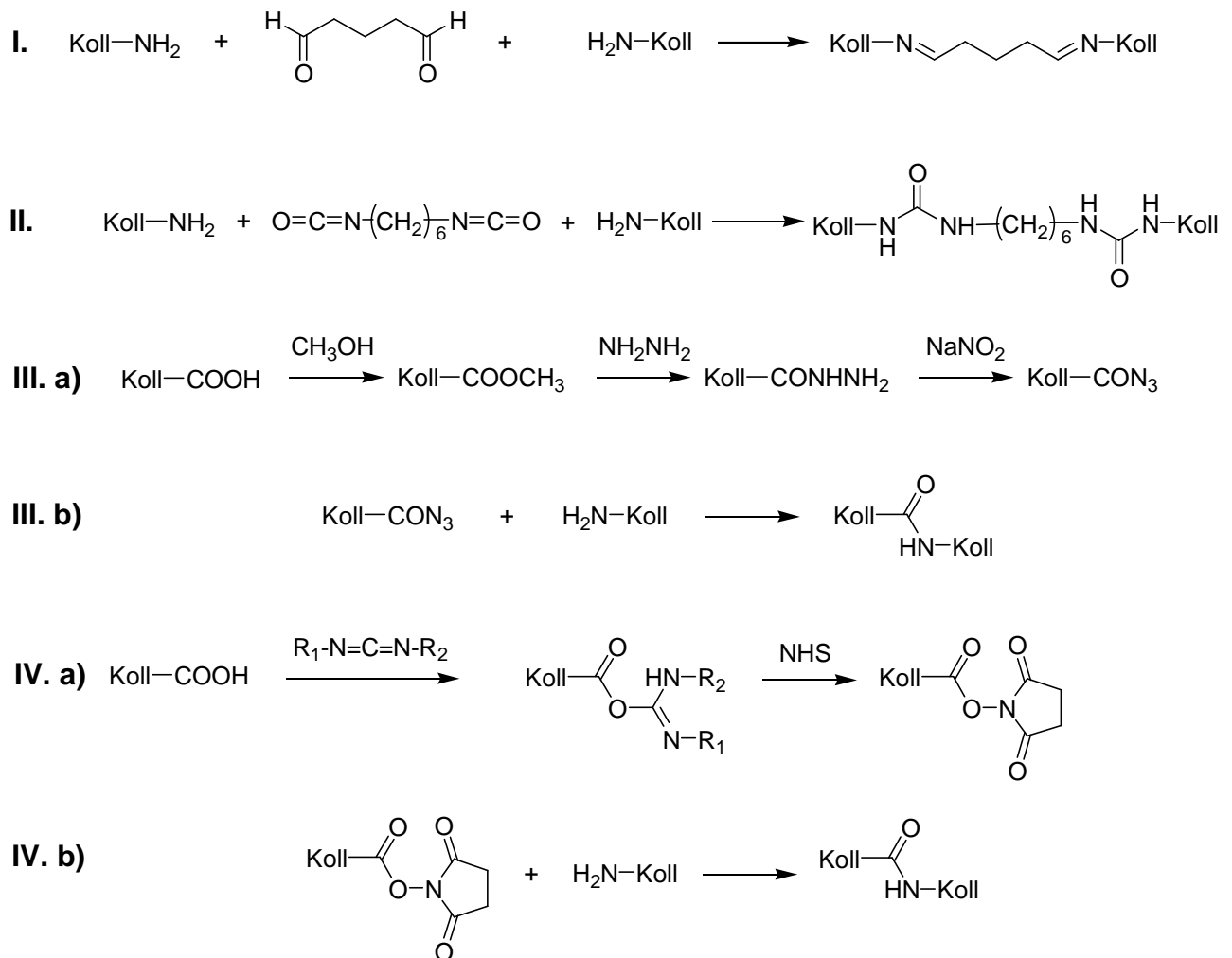


Abbildung 18: Chemische Quervernetzung bei Kollagen mit Glutaraldehyd (I), HDI (II), der Acyl-Azid-Methode (III) und EDC/NHS (IV)

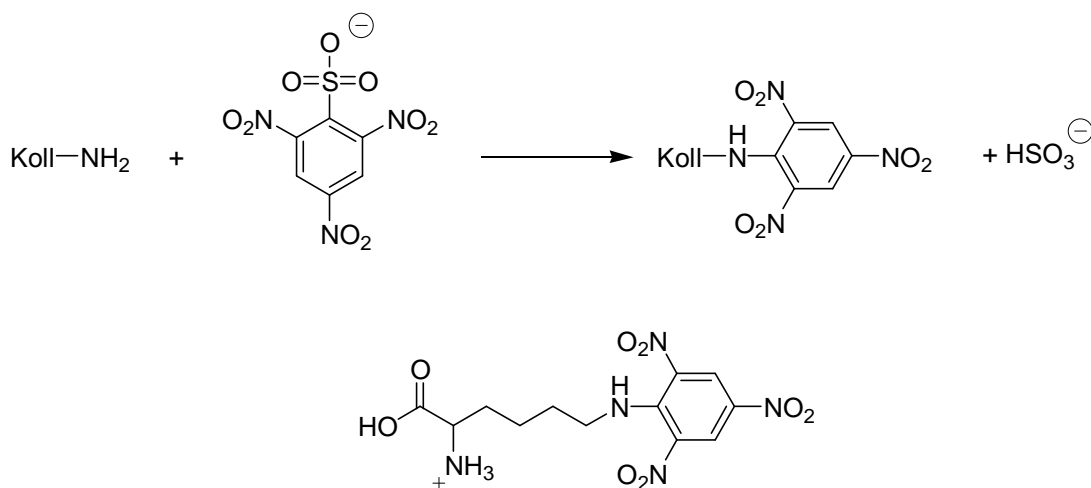
## 7.4 Analytik der Quervernetzungen

Um die durch die Quervernetzung im Kollagen hervorgerufenen Veränderungen zu bestimmen und zu quantifizieren, existieren verschiedene Möglichkeiten.

### 7.4.1 Bestimmung der freien Aminogruppen mit Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)<sup>[101]</sup>

Wie bereits im letzten Absatz erwähnt, verlaufen die meisten Quervernetzungsarten über die freien  $\epsilon$ -Aminogruppen der Lysin- und Hydroxylysinreste. Je höher der Grad der chemischen Quervernetzung in einem Material ist, desto geringer ist die Konzentration an noch vorhandenen Aminogruppen. Zur Quantifizierung dieser Menge verwendet man Trinitrobenzolsulfonsäure. Wie in Abbildung 19 zu sehen ist, reagiert der Farbstoff mit den

freien Aminogruppen zu einem stabilen Trinitrobenzolderivat. Nach Hydrolyse des Kollagenmoleküls kann die Konzentration der dann löslichen, modifizierten Lysinreste photometrisch bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde eine Vorschrift von Bubnis et al.<sup>[108]</sup> angewendet und optimiert. Insbesondere ein vor der photometrischen Bestimmung durchgeführter Ausschüttelschritt mit Diethylether führte zu großen Messfehlern. Dieser soll Pikrinsäure, die durch Hydrolyse des Farbstoffs entsteht, und die modifizierten  $\alpha$ -Aminogruppen vom N-terminalen Ende jeder Peptidkette aus dem Reaktionsgemisch entfernen. Allerdings führte die manuelle Extraktion mit einem Scheidetrichter zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen. Zur Lösung dieses Problems wurde schließlich die komplette Bestimmung in autoklavierbaren Schraubdeckelgläsern durchgeführt. In diesen konnte der Extraktionsschritt reproduzierbar mit einem Überkopfschüttler erfolgen. Dies führte neben einem enormen Zeitgewinn auch zu reproduzierbaren Ergebnissen mit geringen Fehlern.



**Abbildung 19: Umsetzung von Kollagen mit TNBS im basischen Milieu und Struktur des photometrisch bestimmten Lysinderivates nach der Hydrolyse in Salzsäure.**

#### 7.4.2 Bestimmung der Schrumpfungstemperatur mit Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Genau wie die natürliche Quervernetzung der Kollagenfasern einen Einfluss auf deren Schrumpfungstemperatur hat, kann man auch die künstliche Quervernetzung anhand dieser Kennzahl verfolgen. Je höher die Quervernetzung, desto stabiler verhält sich die Kollagenfaser gegenüber thermischer Denaturierung. Die DSC ist ein vor allem in der Polymerchemie eingesetztes Verfahren zu Bestimmung von Glas-, Kristallisations- und Schmelzübergängen. Die experimentelle Anordnung besteht aus zwei Öfen, die mit der

Probe und einer Referenz befüllt werden. Die Temperatur wird über einen bestimmten Bereich verändert und die Temperaturdifferenz auf null geregelt. Vollzieht sich nun in der Probe ein Übergang, im Fall des Kollagens der endotherme Schrumpfungsprozess, muss dem Probensystem von aussen Energie zugeführt werden, um die Temperatur zur Referenz konstant zu halten. Der Temperaturbereich und die benötigte Heizleistung werden über einen Computer ausgegeben.

### **7.4.3 Bestimmung der biochemischen Stabilität durch Kollagenaseinkubation**

Grundlegendes Ziel der Quervernetzung ist die Verbesserung der Stabilität der Kollagenschicht *in vivo*. Zum Abbau von Kollagen im Körper trägt vor allem ein bestimmtes Enzym, die Kollagenase, bei. Es kann spezifisch Peptidbindungen in den Tripelhelixbereichen des Kollagens spalten und führt zu einem Aufbrechen der geordneten Struktur. Anschließend ist das sonst sehr widerstandsfähige Kollagen auch dem Angriff anderer Proteasen ausgesetzt.

Zur Optimierung der Quervernetzungsprozesse können Kollagenaseversuche auch *in vitro* durchgeführt werden. Man verwendet dazu eine Kollagenase, die von dem Bakterium *Clostridium histolyticum* produziert wird. Die quervernetzten Kollagenproben werden für bestimmte Zeit in einem kollagenasehaltigen Puffer inkubiert und anschließend die Restmengen an Kollagen bestimmt.

### **7.4.4 Bestimmung der Zytotoxizität der quervernetzten Kollagene durch Adhäsions- und Proliferationsuntersuchungen mit humanen mesenchymalen Stammzellen (H-MSC)**

Bei Stammzellen handelt es sich um undifferenzierte Zellen, die zur Proliferation, Selbsterneuerung und zur Produktion einer Vielzahl differenzierter Zellen und zu Regeneration von Gewebe fähig sind. Sie haben die Fähigkeit, sich nahezu unbegrenzt zu teilen und damit die Stammzellpopulation aufrecht zu erhalten. *In vitro* kann man diese Zellen daher über längere Zeiträume vermehren.

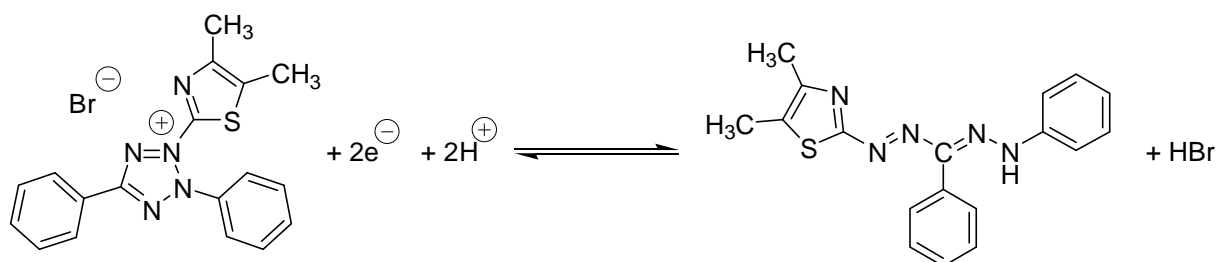
In der aktuellen öffentlichen Diskussion stehen die embryonalen Stammzellen, die aus sehr frühen Embryonalstadien, den Blastozysten, gewonnen werden. Man unterscheidet sog. totipotente Stammzellen, bei der die Entwicklung eines gesamten Individuums aus einer

Zelle möglich ist, und pluripotente Stammzellen, die sich zu unterschiedlichen Geweben und Organen entwickeln können.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen handelt es sich um sog. adulte bzw. gewebsspezifische Stammzellen. Beim Menschen sind mittlerweile über 20 verschiedene Arten aus kaum regenerationsfähigem Gewebe wie dem Gehirn und stark regenerativem Gewebe wie Blut, Leber, Haut, Haaren oder der Darminnenwand bekannt. Diese besitzen nur noch begrenzte Differenzierungsfähigkeit in Richtung bestimmter Gewebearten. Am besten untersucht sind die hämatopoetischen Stammzellen, die für die ständige Regeneration des Blutes zuständig sind. Aus den aus dem Knochenmark zu gewinnenden mesenchymalen Stammzellen können sich Gewebe wie Knochen, Knorpel, Muskeln oder Fett entwickeln.

Die Differenzierung zu den jeweils unterschiedlichen Zelltypen wird wahrscheinlich hauptsächlich von externen Faktoren beeinflusst. Dazu gehört der Kontakt mit benachbarten Zellen und extrazellulärer Matrix, das lokale Milieu sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren.<sup>[109-111]</sup> Die Entscheidung, in dieser Arbeit für die Adhäsions- und Proliferationsuntersuchungen mesenchymale Stammzellen zu verwenden, beruht auf der Möglichkeit damit auch den Einfluss der Kollagenschicht auf das Differenzierungsverhalten der Zellen in Richtung Knochen zu untersuchen.

Für die Zytotoxizitätsuntersuchungen wird eine bestimmte Anzahl von Zellen auf die Proben aufgebracht und die Zahl der vitalen Zellen auf der Oberfläche nach einem Tag (Adhäsion) und nach sieben Tagen (Proliferation) bestimmt. Die Quantifizierung erfolgt mit einem etablierten Verfahren, dem sog. MTT-Test. Hierbei wird durch die aktiven Mitochondrien der lebenden Zellen ein Tetrazolderivat (Methylthiazoltetrazolium, MTT) in ein Formazanderivat überführt, welches photometrisch bestimmt wird (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Reduktion von MTT**

## 7.5 Vergleich der einzelnen Quervernetzungsarten

Leider existieren in der Literatur keine vergleichenden Untersuchungen aller gängigen Quervernetzungsarten mit identischen Bedingungen und Ausgangsmaterialien. Trotzdem ist es möglich, sich einen Überblick über den Einfluss der einzelnen Methoden auf die oben genannten Charakterisierungsmöglichkeiten zu verschaffen.

Weadock et al.<sup>[112]</sup> untersuchten den Einfluss von Glutaraldehyd (GA), ultraviolettem Licht (UV), dem Dehydrothermalverfahren (DHT) und Cyanamid (CA), einem Carbodiimid, welches analog EDC reagiert, auf Kollagen aus Rinderhaut. Dabei zeigte sich durch Quervernetzung mit UV, DHT und CA nur eine geringfügig verbesserte Kollagenasestabilität im Vergleich zur unbehandelten Probe. Durch die Verwendung von Glutaraldehyd oder einer Kombination aus DHT und CA konnte eine stark erhöhte, und für beide Methoden in etwa vergleichbare Stabilität erreicht werden. In einer anderen Studie verglichen ebenfalls Weadock et al.<sup>[102]</sup> nur die physikalischen Methoden UV und DHT untereinander. Als Ausgangsmaterial wurde bovines Typ 1 Kollagen verwendet. Im Gegensatz zu den vorigen Ergebnissen konnte hier aber durch einen geringeren Druck bzw. eine andere UV-Lichtquelle, eine stark verminderte Löslichkeit in verdünnter Essigsäure und Pepsinlösung gefunden werden.

Lee et al.<sup>[113]</sup> konnten durch Cyanamid, im Gegensatz zu einer Quervernetzung durch GA und EDC, keine erhöhte Denaturierungstemperatur bei bovinem Pericardium feststellen. Für GA ergaben sich geringfügig höhere Werte als für EDC. Dafür zeigten die EDC-quervernetzten Proben eine bessere Stabilität gegenüber Kollagenase.

Van Wachem et al.<sup>[106]</sup> verglichen die Quervernetzung von Kollagen aus Schafshaut mit GA, HDI, AA und EDC. Bezüglich der Schrumpfungstemperatur zeigten sich bei EDC und AA die besten Ergebnisse, GA und HDI lagen etwas darunter. Der mit TNBS bestimmte Restgehalt an freien Aminogruppen war für HDI, AA und EDC vergleichbar, nach einer Quervernetzung mit GA war er klar niedriger. Im Zellversuch mit humanen Fibroblasten zeigten mit GA und HDI quervernetzte Proben geringe Cytotoxizität durch verringertes Zellwachstum, während bei AA und EDC ein leicht verbessertes Zellwachstum zu messen war.

Einen Vergleich zwischen DHT- und EDC-Quervernetzung von bovinem Typ 1 Kollagen führten Pieper et al. durch<sup>[114]</sup>. Sie konnten durch die DHT-Methode keinen Einfluss auf

die Denaturierungstemperatur und die Kollagenasestabilität feststellen. Die freien Aminogruppen wurden geringfügig verringert. Große Veränderungen ergaben sich durch die Quervernetzung mit EDC. Diese Ergebnisse konnten durch die Kombination beider Methoden noch etwas verbessert werden. In Zellversuchen mit Fibroblasten und Myoblasten konnten bei Verwendung eines mit EDC und Ethanol quervernetzten Materials keine cytotoxischen Eigenschaften nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse von Olde Damink et al.<sup>[115;116]</sup> sowie Charulata et al.<sup>[117]</sup>, die Schafshautkollagen mit EDC bzw. Rattenschwanzkollagen mit GA bzw. AA quervernetzten, sind bezüglich der bestimmten Schrumpfungstemperaturen und freien Aminogruppen mit den Ergebnissen von van Wachem zu vergleichen.

Obwohl die meisten Arbeiten von unterschiedlichen Ausgangsmaterialien und Quervernetzungsreagenzien ausgehen, ist anhand der Daten ersichtlich, dass durch EDC ein vergleichbar hoher Quervernetzungsgrad zu erreichen ist wie mit Glutaraldehyd. Bezüglich der Biokompatibilität ist EDC dem Glutaraldehyd überlegen.

## **8 Immobilisierung von Proteinen an Oberflächen**

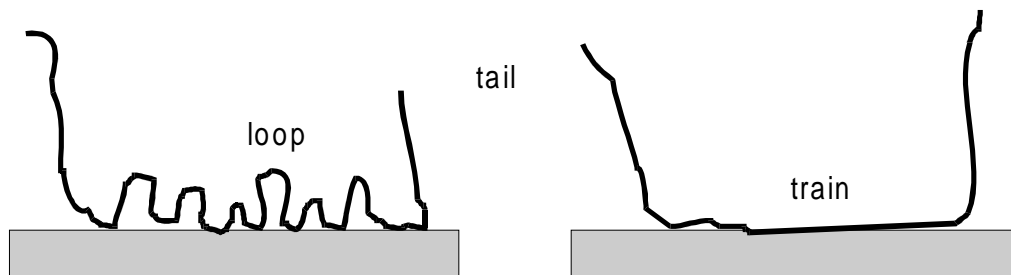
### **8.1 Adsorptive Bindung**

#### **8.1.1 Grundlagen der Polymeradsorption an Oberflächen<sup>[118;119]</sup>**

Flexible Polymere in Lösung besitzen eine hohe konformative Entropie aufgrund der vielen Zustände, die die einzelnen Segmente der Polymerkette einnehmen können. Je besser das Lösungsmittel ist, desto größer ist das Polymerknäuel und damit die Entropie. Durch Adsorption an eine Oberfläche geht ein Teil dieser Entropie verloren. Deshalb findet Adsorption nur statt, wenn der auftretende Entropieverlust durch die Anziehungskraft zwischen Polymer und Oberfläche kompensiert wird.

Die Konformation, die adsorbierte Polymere auf der Oberfläche annehmen, ist abhängig von der Qualität des Lösungsmittels. Je besser das Lösungsmittel, desto mehr direkter Kontakt („trains“) ist nötig, um den Entropieverlust auszugleichen. Ist das Lösungsmittel schlechter, treten sogenannte „loops“ viel häufiger auf. Diese führen ebenfalls zu einer höheren Oberflächenkonzentration an Polymer als bei einem guten Lösungsmittel. In bei-

den Fällen ragen die Polymerenden („tails“) relativ weit in die Lösung, um den Entropieverlust zu minimieren (Abbildung 21). Die thermodynamische Erklärung dafür, dass sich aus einem schlechten Lösungsmittel mehr Polymer auf eine Oberfläche abscheidet als aus einem guten, ist also der geringere Entropieverlust der weniger kompakten Polymerketten.



**Abbildung 21: Adsorption eines flexiblen Polymers aus einem schlechten (links) und guten (rechts) Lösungsmittel**

### 8.1.2 Proteinadsorption<sup>[119]</sup>

Grundsätzlich handelt es sich bei Proteinen auch um Polymere und einige ihrer Eigenschaften sind mit denen von flexiblen Polymeren zu vergleichen. Im Adsorptionsverhalten ergeben sich allerdings grundlegende Unterschiede. Im Gegensatz zu flexiblen Polymeren handelt es sich bei Proteinen meist um hoch geordnete Strukturen mit geringer Entropie. Die durch die Adsorption auftretenden konformativen Änderungen können zu einer Entropieerhöhung und somit sogar zu einer spontanen Adsorption auf eigentlich abstoßenden Oberflächen führen.

Die vier wichtigsten Faktoren, die die Adsorption von Proteinen auf Oberflächen beeinflussen, sollen im Folgenden deshalb etwas genauer besprochen werden.

#### *Elektrostatistische Effekte*

In einer wässrigen Umgebung ist davon auszugehen, dass sowohl das Protein als auch die Substratoberfläche elektrisch geladen sind. Sie sind von Gegenionen umgeben und man spricht von der Elektrischen Doppelschicht. Nähert sich ein Protein der Oberfläche, so überlappen die beiden Doppelschichten und es kommt zu einer elektrostatischen Wechselwirkung. Diese führt zu einer Änderung in der Gibbs-Energie. Untersuchungen haben allerdings ergeben, dass der absolute Wert dieser Änderung nur sehr gering ist. Für den Ladungsausgleich zwischen Protein und Oberfläche sind niedermolekulare oder anorganische Gegenionen verantwortlich. Für sie ist das Protein ein viel schlechteres „Lösungs-

mittel“ als die wässrige Umgebung, weshalb die höchste Affinität zwischen Protein und Oberfläche bei Systemen mit ausgeglichener Ladungsverteilung besteht, bei denen keine zusätzlichen Ionen benötigt werden.

#### *Londonsche Kräfte und van-der-Waals-Wechselwirkungen*

Über theoretische Berechnungen ist es möglich, grobe Aussagen über die Größenordnung der van-der-Waals-Kräfte zwischen Protein und Oberfläche zu machen. Ihr Einfluss auf die Änderung der Gibbs-Energie für die Adsorption auf Metalloberflächen ist etwa 10 bis 100 fach so groß wie der Beitrag der elektrischen Doppelschicht.

#### *Hydratationsänderungen*

Sind sowohl die Proteinoberfläche als auch die Substratoberfläche hydrophil, ist es wahrscheinlich, dass nach der Adsorption ein dünner Wasserfilm zwischen beiden Schichten zurückbleibt und es zu keinen großen Hydratationsänderungen kommt. Anders sieht es aus, wenn eine oder beide der Oberflächen hydrophob ist. In diesem Fall würde eine Dehydratation den Adsorptionsprozess fördern.

Der Einfluss des Proteins auf diesen Effekt ist nur sehr schwer zu bestimmen, da Ausmaß und Größe der hydrophoben Bereiche stark von der Struktur und Geometrie des Proteins abhängen, die sich aber während der Adsorption verändern können. Ein grundsätzlicher Einfluss ist aber bestätigt worden.

Auch bei der Substratoberfläche ist der Einfluss der Hydrophobie schwierig zu beurteilen, da sich durch eine Modifikation meist auch die Oberflächenladung ändert. Trotzdem konnte die Änderung der Gibbs-Energie durch Proteinadsorption auf eine hydrophobe Oberfläche bestimmt werden. Sie liegt nochmals 3 bis 10 mal höher als die der van-der-Waals-Wechselwirkungen.

#### *Änderungen in der Proteinstruktur*

Proteine adsorbieren wegen ihrer Überstruktur nicht wie flexible Polymere in den bereits erwähnten train-loop-tail-Konformationen. Eine generelle Beobachtung ist, dass die Dicke einer adsorbierten Proteinschicht mit den Ausmaßen des Moleküls in Lösung vergleichbar ist. Das spricht für eine kompakte Struktur der Proteine, selbst wenn sie auf der Oberfläche konformative Änderungen eingehen.

Größere Veränderungen in der durch Wasserstoffbrücken stabilisierten Sekundärstruktur der Proteine sind nur dann zu erwarten, wenn mit der Substratoberfläche ebenfalls die Möglichkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen besteht. Die damit verbundene Erhöhung in der konformativen Entropie trägt allerdings nur in geringem Maße zur Änderung der Gibbs-Energie bei.

Es ist ein gegenteiliger Effekt zu erwarten, wenn keine Möglichkeit für Wasserstoffbrückenbindungen besteht.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Adsorption von Proteinen auf Oberflächen ein komplexer Prozess ist, der von mehreren Faktoren abhängt, die sich untereinander beeinflussen. Auf hydrophoben Oberflächen adsorbieren alle Proteine auch unter elektrostatisch ungünstigen Bedingungen. Auf hydrophilen Oberflächen hängt die Affinität davon ab, wie bereitwillig das Protein seine Struktur verändert um durch einen Gewinn an konformativer Energie negative Effekte zu kompensieren.

## 8.2 Kovalente Anbindung

Die im letzten Abschnitt vorgestellten Grundlagen der Proteinabsorption gelten natürlich auch für die kovalente Immobilisierung, da eine Annäherung und Anlagerung des Proteins an die aktivierte Metalloberfläche Voraussetzung für eine kovalente Bindung ist.

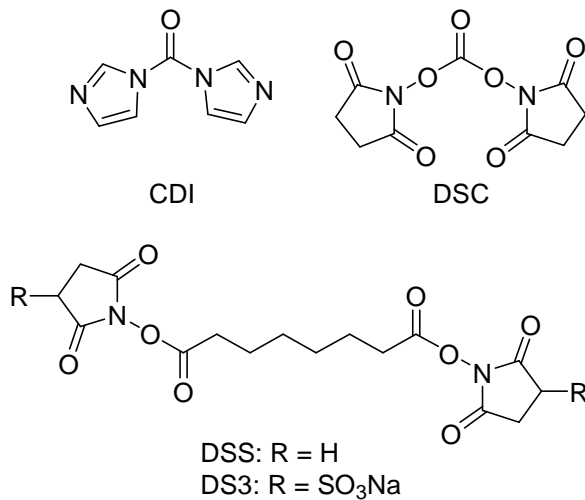
### 8.2.1 Bindung an APTES

Die durch APTES eingeführte Aminogruppe ist ohne weitere Aktivierung nicht in der Lage, kovalente Bindungen mit einem Protein (Kollagen) einzugehen. In dieser Arbeit wurden deshalb zwei verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen die Verwendung von homobifunktionellen Linkern und zum andern die direkte Anbindung an den Haftvermittler im Rahmen der Quervernetzung über die aktivierten Carbonsäuren des Kollagens.

#### *Verwendung von Linkern*

Die vier verwendeten Linker Carbonyldiimidazol (CDI)<sup>[120;121]</sup>, Disuccinimidylcarbonat (DSC)<sup>[122]</sup> sowie Disuccinimidylsuberat (DSS)<sup>[123]</sup> und Disulfosuccinimidylsuberat (DS3)<sup>[124]</sup> wurden bereits zur Aktivierung aminofunktioneller Oberflächen verwendet. Ihre Strukturformeln sind in Abbildung 22 wiedergegeben. In allen Fällen erfolgt die Anbindung durch eine nucleophile Substitution des Imidazol- bzw. Hydroxysuccinimidylrestes

durch eine Aminogruppe des Haftvermittlers und des Kollagens. Im Falle von CDI und DSC ist das Endprodukt ein substituierter Harnstoff, im Falle von DSS und DS3 sind es zwei Amidbindungen, die durch eine C8-Kette verbunden sind.



**Abbildung 22: Strukturformeln der homobifunktionellen Linker CDI, DSC, DSS und DS3**

### *Direkte Anbindung*

Eine direkte Anbindung des Kollagens an den Haftvermittler kann im Rahmen der Quervernetzung erfolgen. Hierbei reagieren einige der durch EDC/NHS aktivierten Carbonsäuren des Kollagens mit den Aminogruppen der Haftvermittleroberfläche zu Amidbindungen. Allerdings ist durch dieses Verfahren keine kovalent angebundene, unquervernetzte Proteinschicht herzustellen.

### **8.2.2 Bindung an IPTES**

Im Gegensatz zu APTES ist hier keine weitere Aktivierung notwendig. Die durch den Haftvermittler eingeführte Isocyanatgruppe kann direkt mit den Aminogruppen des Kollagens zu einem substituierten Harnstoff reagieren. Das gebildete Endprodukt ist demnach identisch mit der durch APTES und CDI bzw. DSC erhaltenen kovalenten Bindung.

### **8.2.3 Anbindung von Peroxidase als Modellprotein**

Für erste vergleichende Untersuchungen zwischen den einzelnen Immobilisierungsstrategien wurde das Enzym Peroxidase als Modellprotein angebunden. Durch die direkte Anbindung eines Enzyms hat man die Möglichkeit, auch noch sehr geringe Mengen an Protein an der Oberfläche durch entsprechend lange Inkubationszeit mit der Substratlösung

nachzuweisen. Durch den nur schwer zu bestimmenden Einfluss der Immobilisierung auf die Enzymaktivität können nur relative Proteinmengen angegeben werden. Aus diesem Grund wurde auch keine gleichzeitige Anbindung und Quervernetzung durchgeführt.

Die Immobilisierung von Peroxidase wurde in der Literatur schon mehrfach beschrieben. Häufig erfolgte eine Anbindung an Gold über ein NHS-aktiviertes langkettiges Thiol.<sup>[125-127]</sup> Aber auch die kovalente Bindung an aminofunktionelle<sup>[128]</sup> und carbonsäurehaltige<sup>[129]</sup> Oberflächen sowie die adsorptive Beschichtung einer TiO<sub>2</sub>-Oberfläche<sup>[130]</sup> wurden beschrieben.

#### 8.2.4 Anbindung von Kollagen

Entsprechend der Peroxidase erfolgte auch die Immobilisierung von Kollagen anhand der vorgestellten Methoden. Die Quantifizierung des Kollagens erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Sirius-Rot. Der eigentlich für die histologische Färbung von Kollagen verwendete Farbstoff bindet sich adsorptiv an die fibrillären Strukturen des Proteins und wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen für die Quantifizierung herangezogen.<sup>[131-134]</sup>

In der Literatur ist die kovalente Immobilisierung von Kollagen vor allem auf nichtmetallischen Oberflächen wie Cellulose<sup>[135]</sup>, Polyvinylalkohol<sup>[135]</sup> und Silikon<sup>[136]</sup> beschrieben. Peng et al.<sup>[137]</sup> beschichteten die Oberfläche von dentalen Titanimplantaten über eine Zwischenschicht von Polyethylen-co-vinylalkohol kovalent mit Kollagen. Auf dem Gebiet der metallischen Oberflächen ist vor allem die Arbeitsgruppe Worch zu nennen, die sowohl Reintitan als auch Ti6Al4V adsorptiv mit Kollagen beschichtete und untersuchte.<sup>[138-141]</sup>

#### 8.2.5 Untersuchung der angebundenen Kollagenschicht auf biochemische, chemische und mechanische Stabilität

Die Untersuchung von kovalent und adsorptiv gebundenen Kollagenschichten auf unterschiedlichen Metalloberflächen auf ihre chemische und biochemische Stabilität erfolgte entsprechend der bereits vorgestellten Methoden auf Seite 30 und Seite 40. Die mechanische Stabilität wurde anhand dreier verschiedener Verfahren getestet:

- Die Haftung einer Kollagenschicht in trockenem Zustand wurde durch einen Abzieh-test in Anlehnung an DIN ISO 2409 untersucht. Dazu wurden adsorptiv und kovalent

gebundene Schichten mit Tesafilm beklebt und die Oberflächen nach Abziehen des Klebestreifens durch Auflichtmikroskopie visualisiert.

- Kollagenschichten im feuchten Zustand wurden durch einen spitzen Gegenstand (Spatel, Pinzette) mechnischer Belastung ausgesetzt. Auch hier wurden die Oberflächen anschließend unter dem Mikroskop fotografiert.
- Als praxisnaher Test wurden abschließend orthopädische Schrauben aus Ti6Al4V und Ti6Al7Nb kovalent und adsorptiv mit Kollagen beschichtet, in einen Rinderknochen geschraubt und die verbleibende Kollagenmenge auf den Schrauben mit Sirius-Rot bestimmt.

## **C. Material und Methoden**

### **1 Verwendete Materialien**

#### **1.1 Titan und Titanlegierung**

Verwendet werden Plättchen aus Reintitan (Grade 2), Ti6Al4V und Ti6Al7Nb (Fa. Hege-  
düs) mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Dicke von 2 mm. Die Politur erfolgte  
durch die Fa. Hededüs mit der Vorpolierpaste 113 GZW B1 (Fa. Menzerna).

Für die mechanischen Stabilitätstests werden Schrauben aus Ti6Al4V (Sx664T, Fa. Ae-  
sculap) und Ti6Al7Nb (A98.582, Fa. Synthes) verwendet.

#### **1.2 Tantalierter Edelstahl**

Es werden Plättchen aus 316L-Edelstahl mit einem Durchmesser von 15,5 mm und einer  
Dicke von 1 mm, beschichtet mit 200 nm Tantal und 70 nm Tantaloxid verwendet. Die  
Tantalschichten werden am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe in der Medizin und Zahn-  
heilkunde, Universität Würzburg, mittels Kathodenzerstäubung (PVD-Anlage, Balzers  
PLS 570) eines Tantaltargets hergestellt. Die Sputter-Bedingungen sind: Basisdruck  $10^{-4}$   
Pa, Arbeitsgasdruck 0.7 Pa Argon, Sputter-Leistung 400 W und Abscheiderate 0.3 nm/s  
für Tantal und Tantaloxid. Vor der Beschichtung werden die Substrate 20 min mittels  
Plasmaätzen gereinigt: Argon-Gasdruck 0,7 Pa, Bias-Spannung 145 V, Leistung 300 W.  
Der Übergang von Tantal zur Tantaloxidbeschichtung erfolgt ohne Prozessunterbrechung  
durch Reduzierung des Argongaspartialdruckes und Zugabe von Sauerstoff zum Prozess-  
gas.

#### **1.3 Cobaltbasislegierung**

Verwendet werden Plättchen der Cobaltlegierung MP35N (Fa. Jaeckl) mit einem Durch-  
messer von 15,5 mm und einer Dicke von 2 mm. Die Polierung erfolgte analog den Titan-  
materialien.

## 1.4 Modelloberflächen

In Vergleichsuntersuchungen werden Siliziumwafer der Fa. Infineon, besputtert mit 100 nm Titan oder Tantal, sowie 24-Well-Platten der Fa. Nunc verwendet.

## 1.5 Kollagen und Gelatine

Als Kollagenmaterial wird bovines und equines fibrilläres Typ-I-Kollagen der Fa. Innocoll verwendet, das sowohl in dispergierter als auch in gefriergetrockneter dreidimensionaler Form vorliegt. Es wird aus Achillessehnen durch Hitzedenaturierung, saure Hydrolyse und Pepsinabbau gewonnen. Außerdem wird säurelösliches Kalbshautkollagen (Fa. Fluka) und Gelatine aus Schweinehaut (Fa. Fluka) verwendet.

*Rekonstitution von fibrillärem Kalbshautkollagen:* 100 mg Kalbshautkollagen werden in 100 ml 10 mM Essigsäure gelöst. Man gibt 100 ml Phosphatpuffer (133 mM, pH=7,0, 4°C) hinzu und zentrifugiert die trübe Lösung für 5 min bei 4°C und 5000 g. Der klare Überstand wird abdekantiert und über Nacht bei 37°C in einem abgedeckten Becherglas stehen gelassen. Die so erhaltene eingetrübte Lösung wird bei Raumtemperatur für 15 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die erhaltenen Fibrillen werden mit 66,6 mM Phosphatpuffer (pH=7,0) gewaschen und nochmals zentrifugiert.

## 1.6 Chemikalien

### Lösungsmittel

Alle Lösungsmittel werden in z.A. Reinheit verwendet. Das Toluol für die Silanisierung wird zusätzlich über Molekularsieb (4 Å, Fa. Merck) getrocknet und unter Argon gelagert. Für alle wässrigen Systeme wird Millipore-Wasser verwendet.

### Quervernetzungs- und Aktivierungsreagenzien

N,N'-Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid Hydrochlorid, EDC (Fluka, Biochemika).  
Das Reagenz wurde nach Erhalt in Chargen zu 1 g eingefroren.

N-Hydroxysuccinimid, NHS (Fluka, z.A.)

Glutaraldehyd, GA (Fluka, 25 % in Wasser)

Carbonyldiimidazol, CDI (Fluka, purum)

Disuccinimidylsuberat, DSS (Sigma, minimum 95 %)

Disulphosuccinimidylsuberat, DS3 (Sigma, ca. 90 %)

Disuccinimidylcarbonat, DSC (Aldrich, techn.)

**Analytische Reagenzien**

Sulfo-succinimidyl-dimethoxytrityl-butyrate, sulpho-SDTB (Pierce)

Sirius Rot, Direkt Rot F3B (Fluka)

Trinitrobenzolsulfonsäure, TNBS (Fluka, 1 M in Wasser, Biochemika). Die Lösung wurde nach Erhalt in 1 ml Chargen eingefroren um einer Zersetzung zur Pikrinsäure vorzubeugen.

Peroxidase aus Meerrettich (Fluka, 700 U/mg)

Wasserstoffperoxid, 30 % (Merck, z.A.)

Orthophenylendiamin-Dihydrochlorid, OPD (Fluka, purum)

Perchlorsäure, 70 % (Merck, z.A.)

**Synthesechemikalien**

Aminohexanol (Fluka, purum)

Hydrazin Monohydrat (Fluka, purum)

Dimethoxytritylchlorid (Merck, z.S.)

Phthalsäureanhydrid (Merck, z.S.)

**Haftvermittler**

Aminopropyltriethoxysilan, APTES (ABCR)

Isocyanatopropyltriethoxysilan, IPTES (ABCR)

**Puffer und Waschlösungen**

Morpholinoethansulfonsäure Monohydrat, MES (Fluka,  $\geq 99\%$ )

Phosphat-gepufferte Salzlösung, PBS (Fluka, Tabletten zum Auflösen)

Natriumhydrogencarbonat (Merck, z.A.)

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck, z.A.)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, z.A.)

Citronensäure-Monohydrat (Merck, z.A.)

Triton X-100 (Sigma)

Natriumhydroxid (Merck, z.A.)

Borsäure (Merck, z.A.)

Essigsäure, 100 % (Merck, z.A.)

Salzsäure, 37 % (Merck, z.A.)

Salpetersäure, 65 % (Merck, z.A.)

## 2 Methoden

### 2.1 Oxidation der Oberflächen

Die elektrochemische Vorbehandlung der Titanmaterialien erfolgt am Institut für Werkstoffwissenschaft, Universität Dresden, unter galvanostatischen ( $0,26 \text{ mA cm}^{-2}$ ; 1000 s) und potentiostatischen ( $5 V_{\text{SCE}}$ ; 2 s) Oxidationsbedingungen. Die erhaltenen Plättchen werden ohne weitere Vorbehandlung verwendet. Zur nasschemischen Oxidation werden alle Proben, in Anlehnung an ASTM F86, für jeweils 5 min im Ultraschallbad in Aceton, Toluol, Aceton, Ethanol und Wasser gewaschen und anschließend für 10 min in 32,5 %  $\text{HNO}_3$  im Ultraschallbad geätzt. Die Proben werden mit Wasser gewaschen und im Vakuum getrocknet.

### 2.2 Kernreaktionsanalyse

Die Ergebnisse der Kernreaktionsanalysen der unterschiedlich oxidierten Oberfläche werden uns ebenfalls vom Institut für Werkstoffwissenschaft, Universität Dresden zur Verfügung gestellt.

### 2.3 Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)

Die Elementverteilung auf den Oberflächen wird durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie mit dem Modell PHI 5700 (Physical Electronics) unter Verwendung von monochromatischer Al- $K_{\alpha}$ -Strahlung bestimmt.

### 2.4 Bestimmung der Hydroxylgruppen mit Trifluoressigsäureanhydrid

Die unterschiedlich oxidierten Metallplättchen werden zusammen mit 3 ml Trifluoressigsäureanhydrid für 30 min in offenen Schnappdeckelgläsern in einem Exsikkator gelagert und anschließend mittels XPS untersucht. Die integrierte Fläche des Fluorsignals ist als relativer Hydroxylgruppengehalt angegeben.

### 2.5 Aufnahmen mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM)

AFM-Untersuchungen der beschichteten und unbeschichteten Oberflächen werden im contact- oder non-contact-Modus mit einem Autoprobe CP (Fa. Park Scientific Instru-

ments) und einem SiN-Cantilever durchgeführt. Die vermessenen Ausschnitte haben eine Größe von 1x1 bzw. 10x10  $\mu\text{m}$ .

## 2.6 Bestimmung der Oberflächenrauigkeit

Die Oberflächenrauigkeiten der verwendeten Metalloberflächen werden über das mechanische Tastschnittverfahren mit einem Perthometer S6P (Fa. Feinprüf Perthometer GmbH) bestimmt. Angegeben ist der Mittelrauhwert (RA)  $\pm$  Standardabweichung einer Zwölf-fachbestimmung.

## 2.7 Aufnahmen mit dem Auflichtmikroskop

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem Dialux 20 (Fa. Leitz), ausgestattet mit einer PENTAX<sup>NOEd</sup> Spiegelreflexkamera, durchgeführt.

## 2.8 Silanisierung von Substratoberflächen

Die Beschichtung mit Aminopropyltriethoxysilan (APTES) sowie Isocyanatopropyltriethoxysilan (IPTES) erfolgt, falls nicht anders angegeben, aus 1,5 %igen toluolischen Lösungen unter Rückfluss für 3 h in einer Argonatmosphäre. Für die Bestimmung der Adsorptionsisothermen werden die Konzentrationen an Haftvermittler variiert ( $5 \cdot 10^{-4}$ ;  $1 \cdot 10^{-2}$ ; 0,1; 1; 5; 10; 15; 20; 30 und 50 mg/ml). Aminosilanbeschichtete Proben werden aufeinanderfolgend 2 x 1 min in Chloroform, 2 x 1 min in Methanol und 1 min in Wasser im Ultraschallbad gewaschen. Die isocyanatbeschichteten Oberflächen werden einmal mit Toluol gespült. Alle Proben werden anschließend im Vakuum getrocknet.

## 2.9 Infrarotspektroskopie

IR-Spektren der Oberflächen werden mit einem JASCO FT/IR-610 in gerichteter Reflexion mit Hilfe einer RAIR-Einheit (Spec30, Einfallswinkel  $30^\circ$ , Pike-Technologies) aufgenommen. Als Background werden geätzte Oberflächen verwendet. Die Auswertung erfolgt mit dem Programm „Spectra Analysis for Windows 95/NT“ Ver. 1.53.03 der Fa. Jasco.

## 2.10 Bestimmung der Aminogruppen mit sulpho-SDTB

*Herstellung der Farbstofflösung:* 600  $\mu\text{g}$  sulpho-SDTB werden in 200  $\mu\text{l}$  Dimethylformamid gelöst und man gibt 42 mg  $\text{NaHCO}_3$  in 9,8 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zu.

*Farbstoffanbindung:* Die zu charakterisierenden Plättchen werden in die beschriebene Beschichtungsform eingebaut und für 30 min bei RT mit der frisch hergestellten Farbstofflösung inkubiert. Anschließend wird die Lösung abgesaugt und man wäscht mit Wasser 3 x hintereinander, 1 x 10 min und nochmals 3 x nacheinander in der Form. Die Plättchen werden der Maske entnommen, kurz unter fließendem Wasser gespült und vorsichtig trockengetupft.

*Farbstofffreisetzung:* Die Plättchen werden in Präparategläsern mit 1,5 ml HClO<sub>4</sub> (35%) überschichtet und das Dimethoxytritylkation innerhalb von 15 min unter gelegentlichem Umschütteln freigesetzt.

*Vermessung:* Die Lösungen werden in PS-Einmalküvetten überführt und bei 494,6 nm mit einem Lambda 18 UV/VIS-Spektrometer (Fa. Perkin Elmer) vermessen. Die Quantifizierung erfolgt über eine vorher aufgenommene Eichgerade. Alle Messungen werden als Fünffachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

## 2.11 Aktivierung mit bifunktionellen Linkern

APTES beschichtete Oberflächen werden für 2 h in einer Lösung von 0,01 mmol/ml DS3 in PBS (pH=7,4), DSS in DMF sowie CDI und DSC in Acetonitril aktiviert (jeweils 1,5 ml in Präparategläsern). Es wird einmal mit dem entsprechenden Lösungsmittel gespült und im Vakuum getrocknet.

## 2.12 Anbindung von Dimethoxytritylaminohexanol (DAH)

DAH dient zur Charakterisierung von aktivierten APTES- und IPTES-Oberflächen. Die Synthese erfolgt entsprechend 2.27.

Zur Anbindung von Dimethoxytritylaminohexanol werden aktivierte Titan- und Tantaloberflächen in 10 mg/ml Farbstoff in Acetonitril über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Acetonitril und Trocknen im Vakuum werden die Plättchen in die Beschichtungsmaske eingebaut und die Absorption bei 494 nm nach Zugabe von 35 % HClO<sub>4</sub> bestimmt. Die Anbindung des Farbstoffs an die mit Isocyanat aktivierten Oberflächen erfolgt analog durch direkte Inkubation der silanisierten und getrockneten Proben

ohne weiteren Vorbehandlungsschritt. Alle Messungen werden als Fünffachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **2.13 Auslagerungsversuche mit APTES**

Mit APTES beschichtete Ti- und Ta-Wafer werden für 15 und 72 h in wässrigen, gepufferten Systemen bei pH=4 (Citrat-Puffer), pH=7,4 (PBS), pH=10,5 (Borsäure-Puffer) sowie für 1, 2, 3, 15 und 48 h pH=9,5 (Borsäure-Puffer) ausgelagert, mit Wasser gespült und die verbleibende Konzentration an Aminogruppen mit sulpho-SDTB bestimmt. Die Messungen werden als Fünffachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **2.14 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Kollagenmaterialien**

Die vier verschiedenen Ausgangsmaterialien (5 mg) werden in 6 N Salzsäure für 24 h bei 120°C hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mit einem Amino Acid Analyzer LC 5001 (Fa. Biotronic) und dem Säulenmaterial BTC 2710 untersucht. Das Ergebnis ist angegeben als die Anzahl an Aminosäuren pro 1000 Aminosäuren als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung einer Dreifachbestimmung.

### **2.15 Quervernetzung von Kollagen**

Die Quervernetzung aller Proteine wird in MES-Puffer (pH 5,5) mit der entsprechenden Konzentration an EDC und  $\frac{1}{4}$  dieser Konzentration an NHS durchgeführt. Die Reaktionszeit beträgt - abgesehen von der zeitabhängigen Quervernetzung - 4 h. Alle Proben werden vor der Quervernetzung mindestens 90 min in MES-Puffer inkubiert und vorhandene Luftblasen durch kurzes Evakuieren entfernt. Anschließend wird jeweils 2 x 1 h mit 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 4 x 30 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen und ebenfalls im Vakuum getrocknet. Dreidimensionale Schwämme werden nach der Waschprozedur entwässert (1 h in 80 % Aceton, 1 h in 100 % Aceton, 2 x 2h in 100 % Aceton, über Nacht in 100 % Aceton) und im Vakuum getrocknet.

Die Quervernetzung mit Glutaraldehyd erfolgt in frisch hergestellter Lösung (6,25 mg/ml) für 4 h. Die Waschschrte entsprechen denen der EDC-Quervernetzung.

## 2.16 Bestimmung der freien Aminogruppen mit TNBS

Getrocknete Kollagenproben (Filme oder Schwämmchen) werden zu jeweils 1-2 mg in 20 ml Schraubdeckelgläser (Fa. Schott, autoklavierbar) eingewogen. Man gibt 1 ml 4 %  $\text{NaHCO}_3$  und 1 ml 0,5 % TNBS-Lösung (1 ml der eingefrorenen 1 M Lösung wird auf 58,6 g aufgefüllt) zu und lässt für 3 h bei 40 °C reagieren. Nach der Zugabe von 3 ml 3 N HCl erfolgt die Hydrolyse der Proben für 1 h bei 120 °C. Nachdem die Proben abgekühlt sind, wird 5 ml Wasser zugegeben und 3x mit 15 ml Diethylether ausgeschüttelt. Das Ausschütteln erfolgt ebenfalls in den Schraubdeckelgläsern in einem Überkopfschüttler (REAX 2, Fa. Heidolph). Nach dem Ausschütteln werden die Lösungen in Präparategläser überführt und Etherreste bei 40°C im Wasserbad entfernt. Die Absorption der Lösungen wird in PMMA-Einmalküvetten bei 346 nm bestimmt. Die Berechnung der Aminogruppenkonzentration erfolgt über den literaturbekannten und durch eigene Messungen bestätigten Extinktionskoeffizienten für das Lysin-Dinitrophenylderivat von  $1,46 \cdot 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 346 nm. Zur Herstellung des Blanks wird pro Quervernetzungs- zustand bei einer Probe die Salzsäure bereits vor der Farbstofflösung zugegeben, sonst aber keine Änderungen vorgenommen. Durch die Salzsäure werden die vorhandenen Aminogruppen protoniert und können nicht mehr mit dem Farbstoff reagieren. Man vermischt die so erhaltenen Lösungen gegen Wasser und verwendet die dem Mittelwert am nächsten liegende Probe als Blank für die eigentliche Messung. Die Messungen werden als Fünffachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 2.17 Bestimmung der Schrumpfungstemperatur mittels Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Calorimetrische Messungen werden mit einer DSC-7 (Fa. Perkin Elmer), ausgestattet mit einem RC 6 Cryostaten (Fa. Lauda), als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Temperatur- und Enthalpie-Kalibrierung erfolgt mit hochreinem Indium (Schmelzpunkt 156,61 °C). Unquervernetzte Kollagenproben werden für 5 min mit Wasser benetzt, überschüssiges Wasser durch Abtupfen mit Papiertüchern entfernt und die Proben in Aluminiumpännchen verschlossen. Quervernetzte Proben werden aus dem letzten Waschwasser entnommen und ebenfalls trockengetupft. Für die Untersuchung des rekonstituierten Kalbshautkollagens wird der unquervernetzte und im Zentrifugenglas quervernetzte Rück-

stand verwendet. Die Heizrate beträgt 5 °C/min in einem Temperaturbereich von 15 bis 95 °C. Die Schrumpfungstemperatur wird als Onset-Wert des auftretenden endothermen Peaks bestimmt. Die Messungen werden als Dreifachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **2.18 Herstellung der Kollagenprobekörper (Filme)**

Auf dem Boden von 24-Well-Platten oder Wafern werden 100  $\mu$ l einer 0,1 %igen Kollagendispersion bzw. Gelatinelösung verteilt und bei 37 °C eingetrocknet. Anschließend werden die Proteinschichten wie oben beschrieben quervernetzt und gewaschen.

### **2.19 Sterilisation der Probenkörper**

Die zweidimensionalen Probenkörper (Kollagen auf PS- und Metalloberflächen) werden mittels Ethylenoxid (EO) bei einer Gaskonzentration von 1000-1200 mg/l, einer Temperatur von 50-60°C und einer Feuchte des Sterilgutes von 40-80 % sterilisiert. Zur Verflüchtigung des EO's werden die Proben vor der weiteren Benutzung 2 Tage lang trocken gelagert.

### **2.20 Kollagenasetest**

Die zu untersuchenden Proben werden mit 1 ml einer Kollagenase P Lösung (Boehringer, Mannheim) in einer Konzentration von 1 mg/ml überschichtet und für verschiedene Zeiträume inkubiert (0 h; 1,5 h; 3 h; 6 h; 24 h; 6 d). Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der jeweilige Überstand verworfen, mit PBS gespült und der verbliebene Kollagenrestanteil mit Sirius-Rot 2 Stunden lang inkubiert. Danach wird das Sirius-Rot mittels 500  $\mu$ l 0,1 M NaOH solubilisiert und die Färbung im ELISA-Reader bei 540 nm quantifiziert. Die Messungen werden als Vierfachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **2.21 Gewinnung von humanen mesenchymalen Stammzellen (MSC)**

Nach einer Knochenmarkspunktion von Patienten werden die im Punktat enthaltenen adhären Zellen amplifiziert, die nicht adhären Blut(vorläufer)zellen werden während der Kultivierungsphase verworfen und die verbliebenen MSC nach 14 Tagen in den Versuch aufgenommen.

## 2.22 Zytotoxizitätstest

Zur Bestimmung des zellulären Adhäsionsverhaltens auf zweidimensionalen Probenkörpern werden 50.000 MSC auf die sterilisierten Proben aufgebracht, mit 2 ml Zellkulturmedium (Dulbecco's modified eagles medium, DMEM) überschichtet und nach 24 Stunden Inkubation die zellulären Adhäsionsraten bestimmt. Hierzu wird das Medium abgezogen, nicht und nur leicht adhärenente Zellen durch zweimaliges Spülen mit PBS abgewaschen und die verbliebene Zellzahl mittels MTT-Test (MTT-Testkit, Fa. Promega) bestimmt. Bei der Ermittlung des Proliferationsverhaltens beträgt die Ausgangszellzahl 20.000 MSC und die Inkubationszeit 7 Tage. Die Quantifizierung erfolgt ebenfalls mittels MTT-Test. Die Messungen werden als Vierfachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 2.23 Immobilisierung von Peroxidase

Die Anbindung der Peroxidase erfolgt durch Inkubation der aktivierten Waferoberflächen in einer Lösung von 0,15 mg/ml Peroxidase in PBS für 2 h. Diese wird, um eine exakte Flächenberechnung zu ermöglichen, ebenfalls in der Beschichtungsmaske durchgeführt. Anschließend wird 2 x 1 min und 2 x 15 min mit einem Waschpuffer (12,2 g NaCl und 0,5 ml Triton X-100 in 1 l PBS) gewaschen und die Proben außerhalb der Maske unter fließendem Wasser abgespült. Die Farbentwicklung erfolgt durch Inkubation mit 2 ml Substratlösung (60 mg Orthophenylendiamin, 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,73 g Zitronensäure, 1,2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O in 100 ml H<sub>2</sub>O) und Reaktionsabbruch nach 15 min durch Zugabe von 1 ml 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Absorption wird bei 490 nm in PS-Einmalküvetten bestimmt. Die Messungen werden als Vierfachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

## 2.24 Immobilisierung von Kollagen

Die zu beschichtenden Plättchen werden wie beschrieben aktiviert und für 4 h in 0,1 % Pferdekollagensuspension inkubiert. Für die gleichzeitige Anbindung und Quervernetzung wird der Suspension zusätzlich 5 mg/ml EDC und 1,25 mg/ml NHS zugesetzt. Anschließend werden die Proben unter fließendem Wasser abgespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Zur Quantifizierung werden die kollagenbeschichteten Plättchen in die Beschichtungsmaske eingebaut und für 30 min mit 0,1 % Sirius Rot in 0,5 M Essigsäure ge-

färbt. Anschließend wird 5 x 1 min in der Beschichtungsform mit 0,1 M Essigsäure gewaschen. Die gefärbten Proben werden in Präparategläsern mit 1 ml 0,5 M Natronlauge überschichtet und der Farbstoff innerhalb von 30 min unter gelegentlichem Umschütteln gelöst. Die Vermessung erfolgt bei 550 nm in PS-Einmalküvetten und die Berechnung der Kollagenmenge durch eine auf Wafer-Oberflächen bestimmte Eichgerade. Die Messungen werden als Vierfachbestimmung durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

### **2.25 Untersuchung der biochemischen und chemischen Stabilität der Kollagenbeschichtung**

Die Versuche werden entsprechend Punkt 2.13 und 2.20 auf kollagenbeschichteten Metalloberflächen durchgeführt.

### **2.26 Untersuchung der mechanischen Stabilität der Kollagenbeschichtung**

#### **Abziehtest mit Tesafilm**

Auf APTES-beschichteten und unbeschichteten Waferoberflächen werden 100  $\mu$ l einer 0,01 %igen Pferdekollagensuspension in 10 mM Essigsäure eingetrocknet und mit 1 mg/ml EDC in MES quervernetzt, gewaschen und getrocknet. Ein Streifen Tesafilm wird über eine Hälfte des Plättchens geklebt und wieder abgerissen, wobei nicht kovalent gebundene Fibrillen von der Oberfläche abgelöst werden. Anschließend wird die Oberfläche im Auflichtmikroskop visualisiert.

#### **Mechanische Belastung durch spitzen Gegenstand**

Auf APTES-beschichteten und unbeschichteten realen Oberflächen werden 100  $\mu$ l einer 0,1 %igen Pferdekollagensuspension eingetrocknet und mit 1 mg/ml EDC quervernetzt. Nach dem Waschen wird im feuchten Zustand versucht, einen Teil der Schicht mit einer Pinzette von der Oberfläche zu kratzen. Das Resultat wird im Auflichtmikroskop visualisiert.

#### **Schraubversuche in Rinderknochen**

APTES-beschichtete und unbeschichtete medizinische Schrauben aus Ti6Al7Nb und Ti6Al4V werden in eine 0,1 %ige Pferdekollagensuspension getaucht und die eingetrocknete Schicht quervernetzt (1 mg/ml EDC) gewaschen und mit 0,1 % Sirius Rot in 0,5 M

Essigsäure gefärbt. Anschließend werden die Schrauben in vorgebohrte Löcher in einen Rinderoberschenkelknochen geschraubt und wieder heraus gedreht. Die verbleibende Menge an Kollagen wird durch Lösen des Farbstoffes in 0,5 M Natronlauge photometrisch bestimmt.

## 2.27 Darstellung von Dimethoxytritylaminohexanol

### 1. Stufe: Synthese von Hydroxyhexylphthalimid

5 g (42 mmol) Aminohexanol und 6,31 g (42 mmol) Phthalsäureanhydrid werden in einem Kolben vorgelegt und bei 150–160 °C geschmolzen. Nach 15 min lässt man die entstandene zähe Masse abkühlen und erhält ein festes Produkt. Das Rohprodukt wird aus Petrolether (60/80) umkristallisiert und man erhält ein farbloses Pulver. **Ausbeute:** 7,55 g (71 %). **Schmp.:** 43 °C (Lit. 43-45 °C). **<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,82 (m, 2H, arom. CH Phthalimid), 7,69 (m, 2H, arom. CH, Phthalimid), 3,67 (m, 4H, -N-CH<sub>2</sub>-, -O-CH<sub>2</sub>-), 1,8-1,3 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-). **IR (KBr):** 3507 cm<sup>-1</sup> (s, v O-H), 3062 cm<sup>-1</sup> (w, v C-H arom.), 2925, 2861 cm<sup>-1</sup> (m, v C-H aliph.), 1770, 1713 cm<sup>-1</sup> (s, v C=O), 1440 cm<sup>-1</sup> (δ CH<sub>2</sub>)

### 2. Stufe: Synthese von Dimethoxytritylhexylphthalimid

Pyridin wird über Nacht über KOH getrocknet und über Natriumhydrid abdestilliert. Die Edukte werden im Ölpumpenvakuum getrocknet, die Glasgeräte ausgeheizt. Die Reaktion wird unter Feuchtigkeitsausschluss in der Glovebox durchgeführt. 4,10 g (20 mmol) Hydroxyhexylphthalimid und 7,44 g (22 mmol) Dimethoxytritylchlorid werden in 80 ml Pyridin gelöst. Man lässt 17 h bei Raumtemperatur rühren und gibt 2 ml Methanol zu. Nach einer weiteren Stunde wird das Pyridin abgezogen und der Rückstand in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gelöst. Man schüttelt je 3x mit 4 % NaHCO<sub>3</sub> und gesättigter NaCl-Lösung aus, trocknet die organische Phase über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und zieht das Lösungsmittel ab. Das Rohprodukt wird mit Diethylether:Petrolether 1:1 chromatographiert und man erhält das Endprodukt als gelbliches Öl. **Ausbeute:** 9,0 g (81 %). **<sup>1</sup>H NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>):** δ 7,82 (m, 2H, arom. CH, Phthalimid), 7,69 (m, 2H, arom. CH Phthalimid), 7,42-7,12 (m, 9H, arom. CH), 6,81 (d, 4H, arom. CH, neben -OCH<sub>3</sub>), 3,76 (s, 6H, -OCH<sub>3</sub>), 3,65 (t, 2H, -N-CH<sub>2</sub>-), 3,01 (t, 2H, -O-CH<sub>2</sub>), 1,7-1,25 (m, 8H, -CH<sub>2</sub>-). **IR (Film):** 3072 cm<sup>-1</sup> (w, v C-H arom.), 2933, 2835 cm<sup>-1</sup> (m, v C-H aliph.), 1771, 1710 cm<sup>-1</sup> (s, v C=O), 1444 cm<sup>-1</sup> (δ CH<sub>2</sub>), 829 cm<sup>-1</sup> (s, δ C-H arom., disubst.), 721 cm<sup>-1</sup> (s, δ C-H arom., monosubst.)

### 3. Stufe: Synthese von Dimethoxytritylaminohexanol

3,64 g (6,6 mmol) Dimethoxytritylhexylphthalimid werden in 45 ml Methanol vorgelegt. 4 ml (67 mmol) Hydrazin-Hydrat in 10 ml Methanol werden zugegeben. Man lässt über das Wochenende bei Raumtemperatur rühren. Anschließend wird der entstandene Niederschlag abgesaugt und das Lösungsmittel abgezogen. Der Rückstand wird in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gelöst. Man schüttelt je 3 x mit 4 %  $\text{NaHCO}_3$  und gesättigter  $\text{NaCl}$ -Lösung, trocknet die organische Phase über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und zieht das Lösungsmittel ab. Das Rohprodukt, ein gelbliches Öl, wird anfangs mit Dichlormethan:Methanol 95:5, am Ende mit Dichlormethan:Methanol 65:35 chromatographiert und man erhält das Endprodukt als gelbliches Öl. **Ausbeute:** 1,8 g (65 %).  **$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  7,45-7,15 (m, 9H, arom. -CH), 6,82 (d, 4H, arom. CH neben  $-\text{OCH}_3$ ), 3,78 (s, 6H,  $-\text{OCH}_3$ ), 3,03 (t, 2H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-$ ), 2,72 (t, 2H,  $-\text{N}-\text{CH}_2-$ ), 1,66-1,25 (m, 8H,  $-\text{CH}_2-$ ). **IR (Film):**  $3735\text{ cm}^{-1}$  (m,  $\nu$  N-H),  $3067\text{ cm}^{-1}$  (w,  $\nu$  C-H arom.),  $2933, 2858\text{ cm}^{-1}$  (m,  $\nu$  C-H aliph.),  $1508\text{ cm}^{-1}$  (s,  $\nu$  C=C arom.),  $1457\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta$   $\text{CH}_2$ ),  $829\text{ cm}^{-1}$  (s,  $\delta$  C-H arom., disubst.),  $761, 705\text{ cm}^{-1}$  (s,  $\delta$  C-H arom., monosubst.)

## D. Ergebnisse

### 1 Charakterisierung der metallischen Werkstoffe

#### 1.1 Chemische Analyse der Metalloberflächen

##### 1.1.1 Elementzusammensetzung

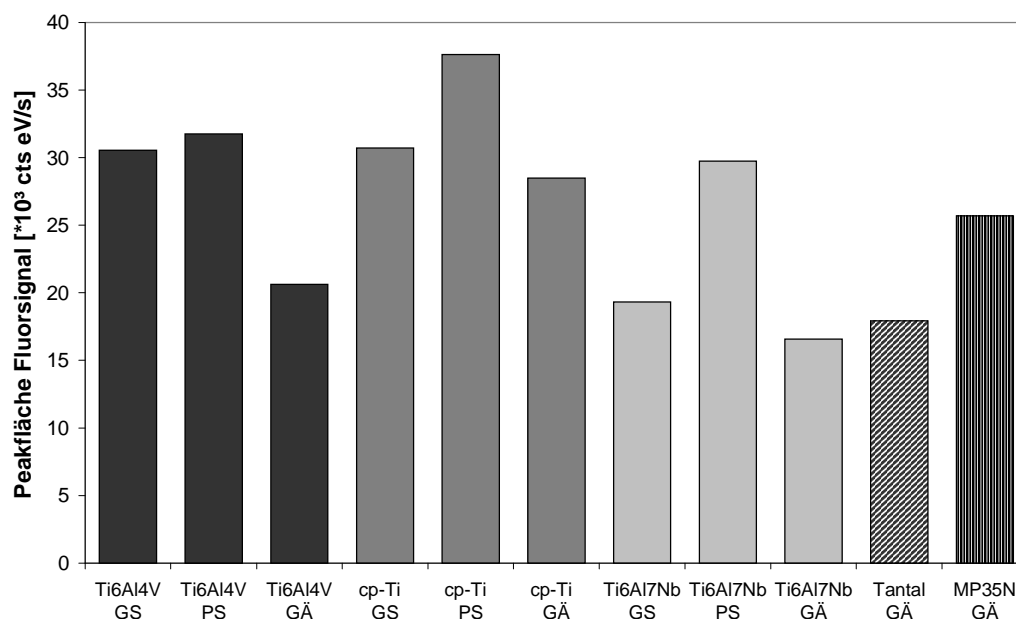
**Tabelle 10: XPS-Messungen auf Metalloberflächen**

Oberfläche	C1s [%]	O1s [%]	Al2p [%]	N1s [%]	Ti2p [%]	P2p [%]	Ta4f [%]
Tantal geätzt	0,77	70,47	--	--	--	--	27,13
Ti6Al4V geätzt	8,68	61,55	4,26	1,44	24,07	--	--
Ti6Al4V galvanostatisch	5,34	63,68	4,20	0,53	22,15	2,99	--
Ti6Al4V potentiostatisch	4,08	65,66	2,53	0,45	22,30	4,37	--

Die nach einem Sputterschritt zur Entfernung von Verunreinigungen bestimmten Elementzusammensetzungen der realen Proben sind in Tabelle 10 wiedergegeben. Sie zeigen nur geringe Kohlenstoffspuren in der Tantaloxidschicht. Auf den Ti6Al4V-Oberflächen sind alle Legierungsbestandteile außer Vanadium zu erkennen. Auf den elektrochemisch oxidierten Proben wurde Phosphor gefunden und die geätzte Probe zeigte einen erhöhten Stickstoff- und Kohlenstoffgehalt.

##### 1.1.2 Hydroxylgruppengehalt der Oberflächen

Die mit Hilfe von Trifluoressigsäureanhydrid bestimmten zugänglichen Hydroxylgruppen auf den unterschiedlichen Metalloberflächen ergeben das in Abbildung 23 zu sehende Bild. Bei den Titanmaterialien hat die potentiostatisch vorbehandelte Probe immer den höchsten Wert, die nasschemisch geätzte immer den niedrigsten. Vergleicht man Ti6Al4V, cp-Ti und Ti6Al7Nb untereinander, findet man für Reintitan die höchste Konzentration an Hydroxylgruppen, gefolgt von der Vanadium-Legierung. Ebenfalls recht hohe Werte wurden für die Cobaltlegierung gemessen, wohingegen auf der Tantaloberfläche ein im Vergleich sehr niedriger Wert bestimmt wurde.



**Abbildung 23: Mit TFAA bestimmter relativer Hydroxylgruppengehalt auf galvanostatisch (GS) oder potentiostatisch (PS) oxidierten bzw. nasschemisch geätzten (GÄ) Metalloberflächen**

Für die unterschiedlich vorbehandelten Titanmaterialien wurde die Oberflächenkonzentration an Wasserstoff zusätzlich durch Kernreaktionsanalyse bestimmt (Tabelle 11). Die Werte für die elektrochemisch vorbehandelten Ti6Al4V- und cp-Ti-Proben lagen zum Abgabetermin dieser Arbeit leider noch nicht vor. Wegen der guten Übereinstimmung der bereits gemessenen Daten mit den Ergebnissen der TFAA-Bestimmung sind allerdings auch für die restlichen Messungen vergleichbare Ergebnisse zu erwarten.

**Tabelle 11: Oberflächenkonzentrationen an Wasserstoff in Atom-%**

	galvanostatisch	potentiostatisch	nasschemisch
Ti6Al4V	--	--	20
cp-Titan	--	--	24
Ti6Al7Nb	18,9	35,3	18

## 1.2 Topographische Struktur der Metalloberflächen

### 1.2.1 Oberflächenrauigkeitsbestimmung

Die durch das mechanische Tastschnittverfahren bestimmten Oberflächenrauigkeiten der verwendeten Metalloberflächen sind in Tabelle 12 angegeben. Die Ergebnisse variieren im

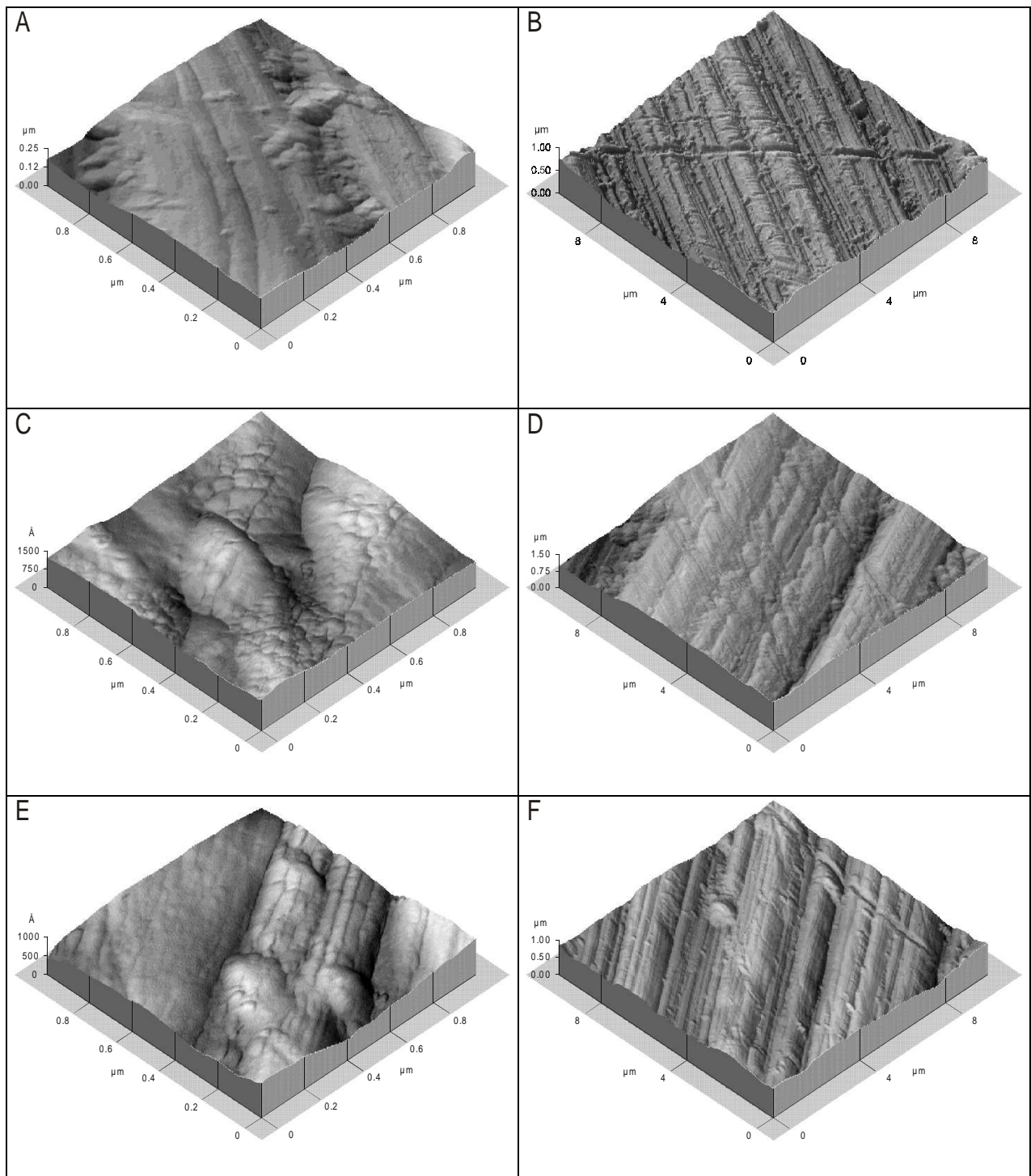
Rahmen der Fehler nicht stark voneinander. Die in den AFM-Aufnahmen zu sehenden Unterschiede können mit dieser Methode nicht wiedergegeben werden.

**Tabelle 12: Oberflächenrauigkeiten der verwendeten Metalloberflächen**

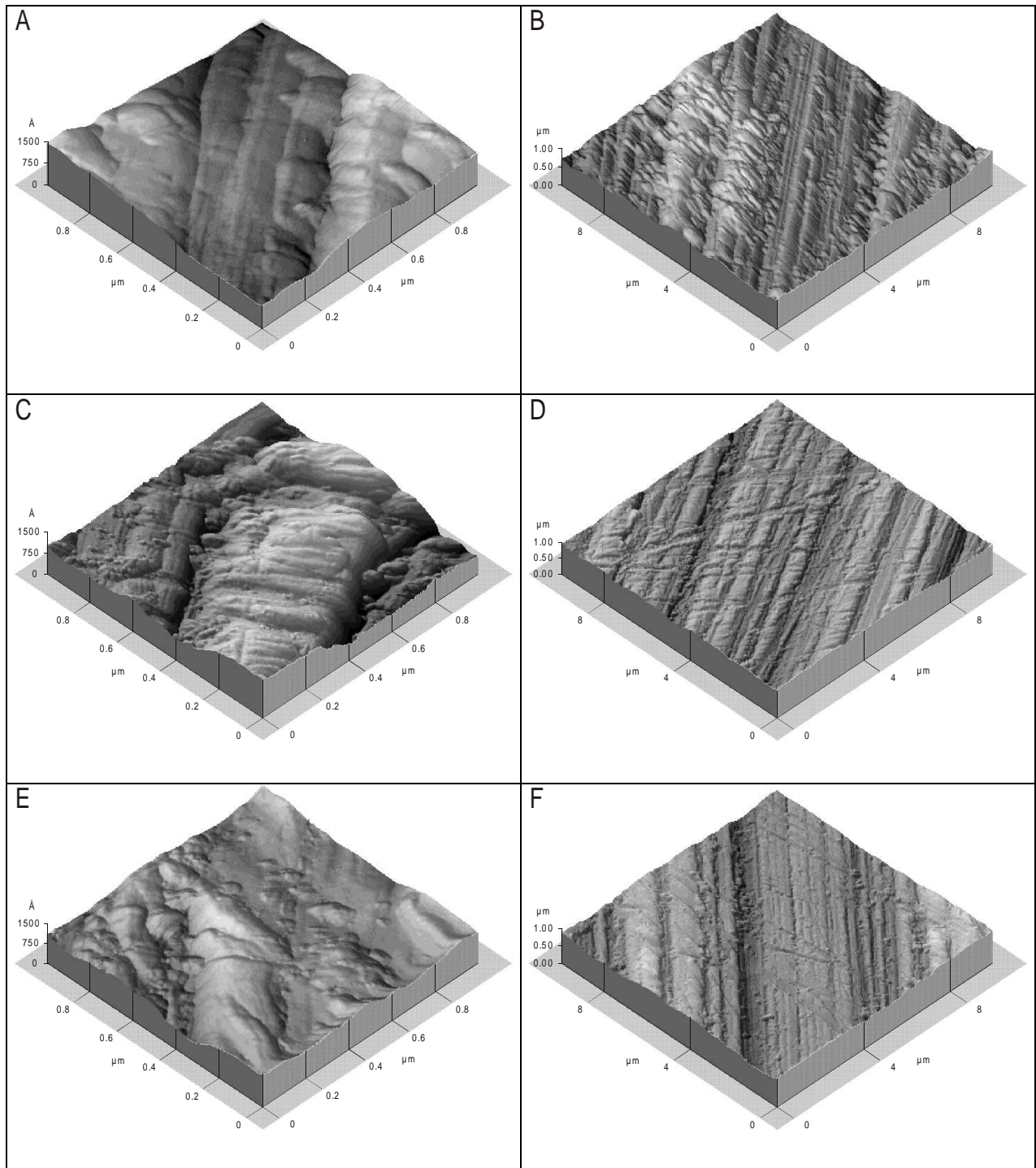
	RA	[ $\mu\text{m}$ ]
cp-Ti GS	0,12	$\pm$ 0,02
cp-Ti PS	0,12	$\pm$ 0,03
cp-Ti GÄ	0,12	$\pm$ 0,02
Ti6Al4V GS	0,09	$\pm$ 0,01
Ti6Al4V PS	0,10	$\pm$ 0,02
Ti6Al4V GÄ	0,10	$\pm$ 0,02
Ti6Al7Nb GS	0,12	$\pm$ 0,03
Ti6Al7Nb PS	0,13	$\pm$ 0,03
Ti6Al7Nb GÄ	0,09	$\pm$ 0,01
MP35N GÄ	0,13	$\pm$ 0,03
316L Tantal/Tantaloxid GÄ	0,11	$\pm$ 0,00
Ti-Wafer GÄ	0,08	$\pm$ 0,01
Ta-Wafer GÄ	0,08	$\pm$ 0,01

### 1.2.2 AFM-Aufnahmen

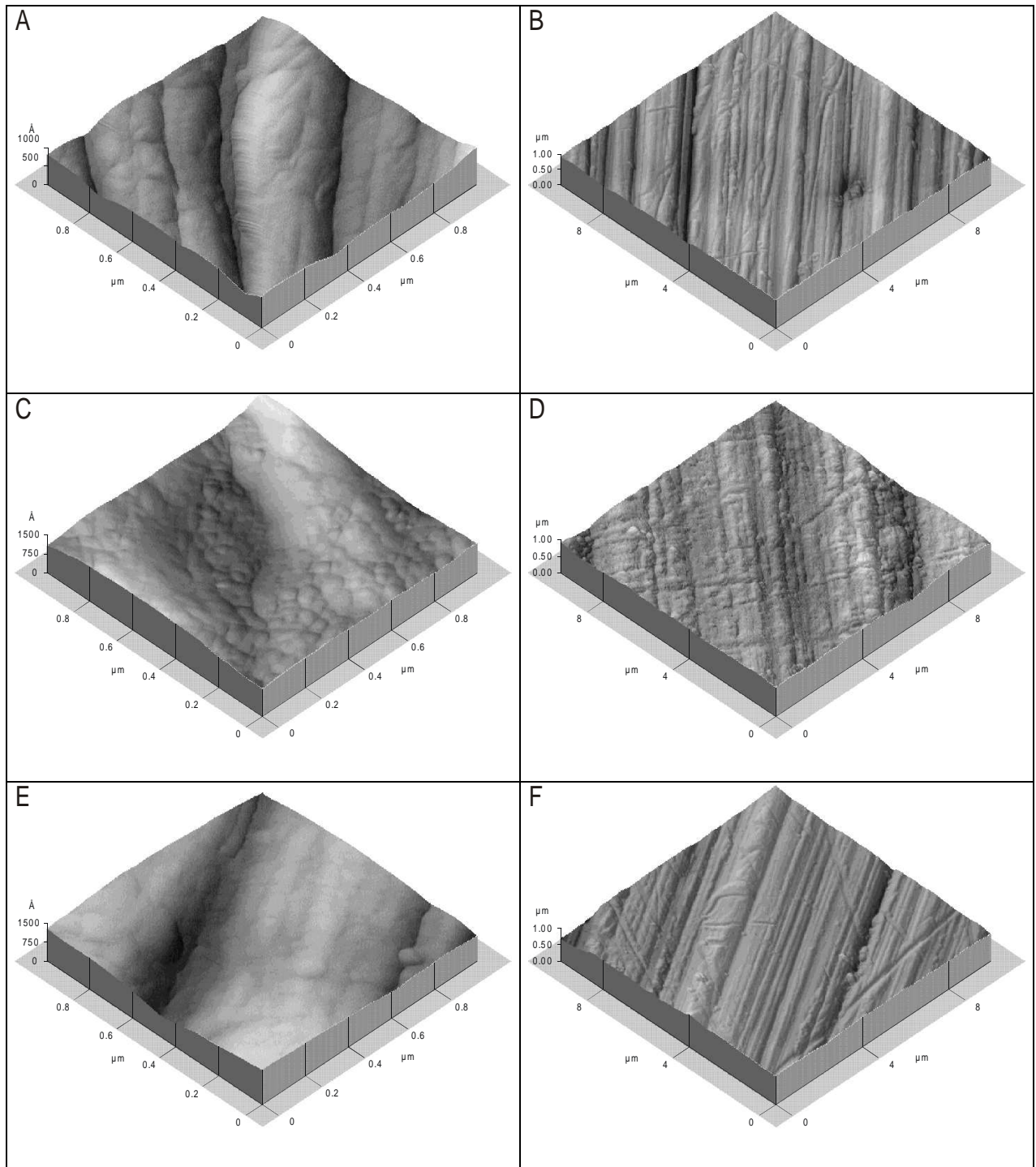
Die folgenden Abbildungen zeigen die Oberflächentopographie der verwendeten Metalloberflächen in jeweils zwei Vergrößerungen. Es sind Ausschnitte von  $10 \times 10$  bzw.  $1 \times 1 \mu\text{m}$  wiedergegeben. Auf den Titanmaterialien erkennt man besonders in der geringen Auflösung starke Furchen und Kratzer, die bei den elektrochemisch oxidierten Proben nicht so ausgeprägt und scharfkantig sind. Am deutlichsten sind die Unterschiede beim Reintitan (Abbildung 24). Betrachtet man die mikroskopische Rauigkeit in der hohen Auflösung, ergibt sich bei der Nb-Legierung ein ähnliches Bild. Bei Ti6Al4V hingegen sind nach elektrochemischer Oxidation größere Unebenheiten zu erkennen. Ein Vergleich zwischen galvanostatischer und potentiostatischer Vorbehandlung zeigt die größere Rauigkeit für die galvanostatische Oxidation. Durch sie bilden sich, wie in der hohen Auflösung zu erkennen ist, viele kleine Erhebungen auf der Oberfläche. Auf der tantalisierten Oberfläche ist bei Bild B ein Loch in der Beschichtung zu erkennen, Bild A zeigt, dass die Schicht aus vielen kleinen Partikeln besteht. Die Oberfläche der Coballegierung MP35N hat eine sehr glatte und gleichmäßige Struktur.



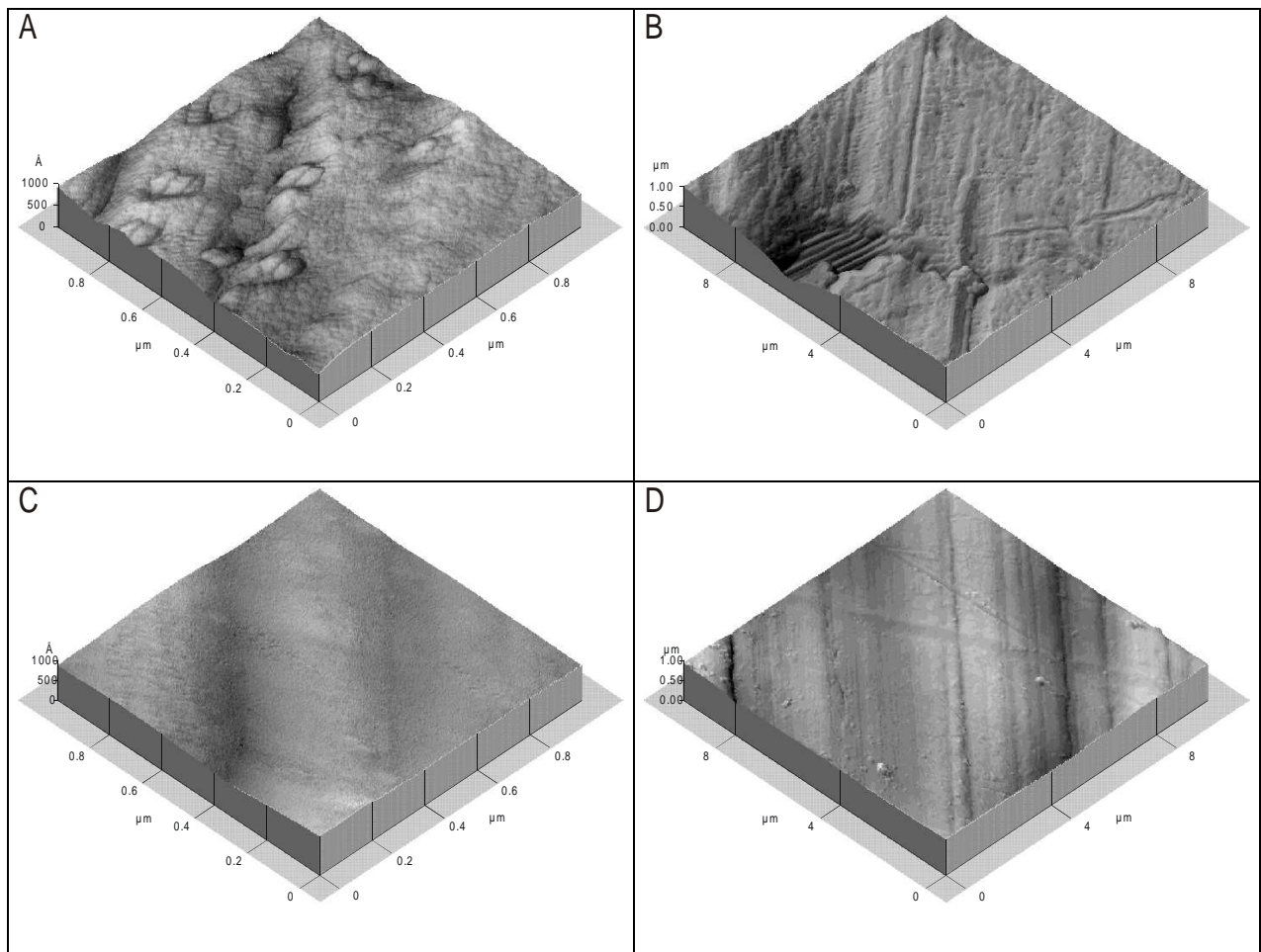
**Abbildung 24 : AFM-Aufnahmen nasschemisch (A,B); galvanostatisch (C,D) und potentiostatisch (E,F) oxidiertes Reintitan-Oberflächen**



**Abbildung 25: AFM-Aufnahmen nasschemisch (A,B); galvanostatisch (C,D) und potentiostatisch (E,F) oxidierter Ti6Al4V-Oberflächen**



**Abbildung 26: AFM-Aufnahmen nasschemisch (A,B); galvanostatisch (C,D) und potentiostatisch (E,F) oxidiertes Ti6Al7Nb-Oberflächen**



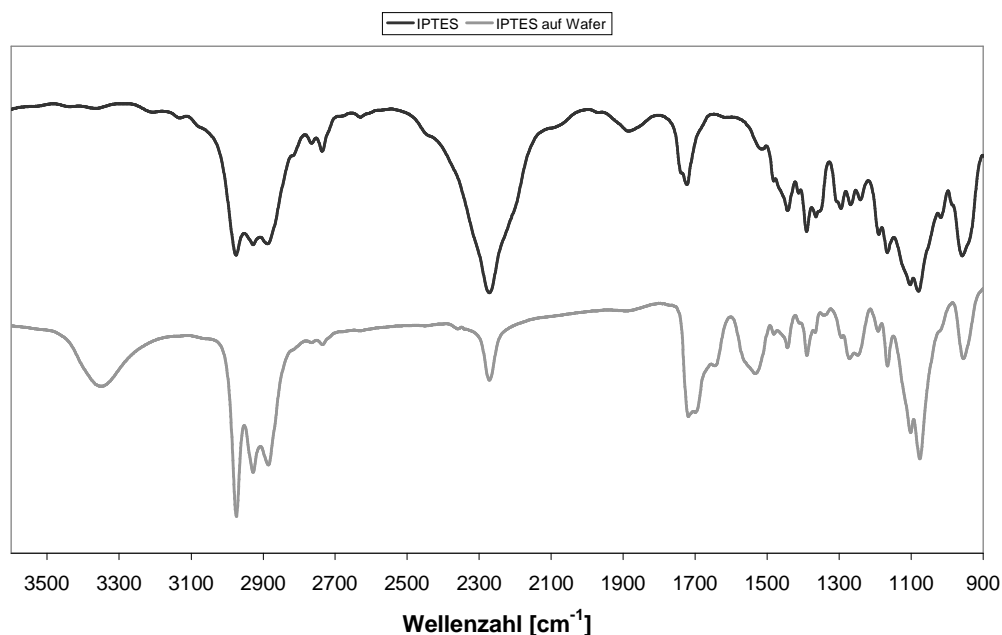
**Abbildung 27: AFM-Aufnahmen nasschemisch oxidiert-er tantalisierter Stahloberflächen (A,B) und MP35N Plättchen (C,D)**

## 2 Aktivierung der Metalloberflächen

### 2.1 Qualitativer Nachweis durch Infrarotspektroskopie

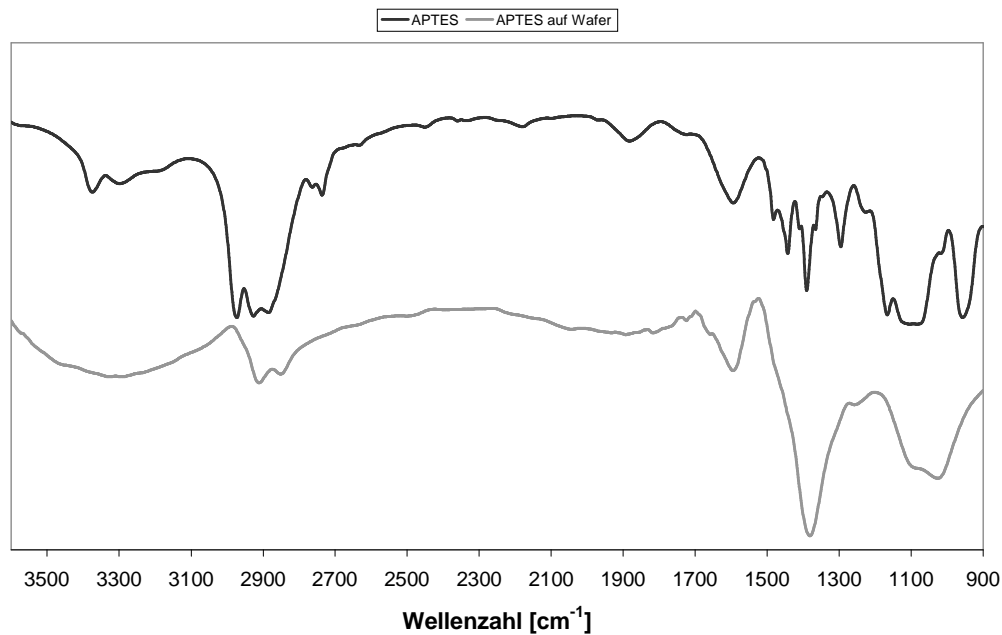
Qualitative Aussagen über die Anbindung der Silane liefert die reflexive IR-Spektroskopie. Abbildung 28 zeigt das Spektrum von IPTES als Film und gebunden an eine Tantalwaferoberfläche, aufgenommen als reflexives IR-Spektrum. Beide Spektren sind charakterisiert durch die Valenz- und Deformationsschwingungen der  $\text{CH}_2$ -Gruppen zwischen  $3000$  und  $2900$  bzw.  $1450$  bis  $1250$   $\text{cm}^{-1}$ , die Valenzschwingungen der Si-O-Si-Bindungen zwischen  $1150$  und  $1050$   $\text{cm}^{-1}$ , die Schwingungen von Si-OEt bzw. Si-OH bei  $950$   $\text{cm}^{-1}$  sowie der Isocyanatgruppe bei  $2271$   $\text{cm}^{-1}$ . Außerdem sind in beiden Spektren Carbonylschwingungen bei  $1720$  und  $1650$   $\text{cm}^{-1}$  zu erkennen. Sie sind beim angebondenen Haftvermittler viel stärker und durch eine Reaktion der Isocyanatgruppe mit Wasser zu einer Carbaminsäure bzw. mit Ethanol zu einem Polyurethan zu erklären. Entsprechend ist

auch die Intensität der Isocyanatschwingung beim reinen Haftvermittler viel größer. Auf der Waferoberfläche ist zusätzlich eine Si-OH-Schwingung bei  $3350\text{ cm}^{-1}$  zu sehen.



**Abbildung 28: IR-Spektren von IPTES als Film (oben) und angebonden an einen Tantalwafer (unten)**

Abbildung 29 zeigt die Spektren von APTES als Film und angebonden an die Oberfläche eines Titanwafers. Das Spektrum des reinen Haftvermittlers ist durch die Valenz- und Deformationsschwingungen der CH<sub>2</sub>-Gruppen zwischen 3000 und 2900 bzw. 1450 bis 1250 cm<sup>-1</sup>, die Valenzschwingungen der Si-O-Si-Bindungen zwischen 1150 und 1050 cm<sup>-1</sup>, die Schwingungen von Si-OEt bzw. Si-OH bei 950 cm<sup>-1</sup> sowie zwei Banden bei 3370 und 1600 cm<sup>-1</sup>, die den Aminogruppen zugeschrieben werden, charakterisiert. Nach der Anbindung ist eine breite Bande zwischen 3500 und 3000 cm<sup>-1</sup> zu erkennen, hervorgerufen durch die Aminogruppen sowie durch die infolge der Hydrolyse des Haftvermittlers entstandenen Silanolgruppen und Ethanol. Die breite Bande von etwa 1500 bis 1300 cm<sup>-1</sup> ist sehr wahrscheinlich eine Kombination der CH<sub>2</sub>-Deformationsschwingungen und einer Amin-Kohlendioxid-Bande. Letztere entsteht durch Adsorption von Kohlendioxid und die Bildung von Carbonat- und Hydrogencarbonatspezies. Außerdem ist zu erkennen, dass die Intensität der Bande bei 950 stark abnimmt und sich die Bande um 1100 cm<sup>-1</sup> zu kleineren Wellenzahlen verschiebt. Das lässt auf eine Hydrolyse mit anschließender Kondensation des Haftvermittlers schließen.



**Abbildung 29: IR-Spektren von APTES als Film (oben) und angebonden an einen Titanwafer (unten)**

## 2.2 Halbquantitativer Nachweis durch Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Die Röntgenphotoelektronenspektroskopie erlaubt halbquantitative Untersuchungen der Silan-beschichteten Oberflächen. In Tabelle 13 sind die Elementzusammensetzungen verschiedener silanisierter Oberflächen angegeben. Im Vergleich zu den unbeschichteten Oberflächen ist die Anbindung der Haftvermittler durch die Einführung von Silizium eindeutig zu erkennen. Daneben nimmt der Kohlenstoffgehalt stark zu, der Sauerstoffgehalt ab. Relative Vergleiche zwischen den angebondenen Haftvermittlermengen lassen sich ebenfalls aus der Elementzusammensetzung ablesen. Dabei zeigen nach APTES-Beschichtung die geätzten Ti6Al4V- und Tantaloberflächen die höchsten Konzentrationen, gefolgt von den galvanostatisch und den potentiostatisch oxidierten Oberflächen. Der Siliziumgehalt auf der Isocyanat-beschichteten Tantaloberfläche liegt in einem mittleren Bereich.

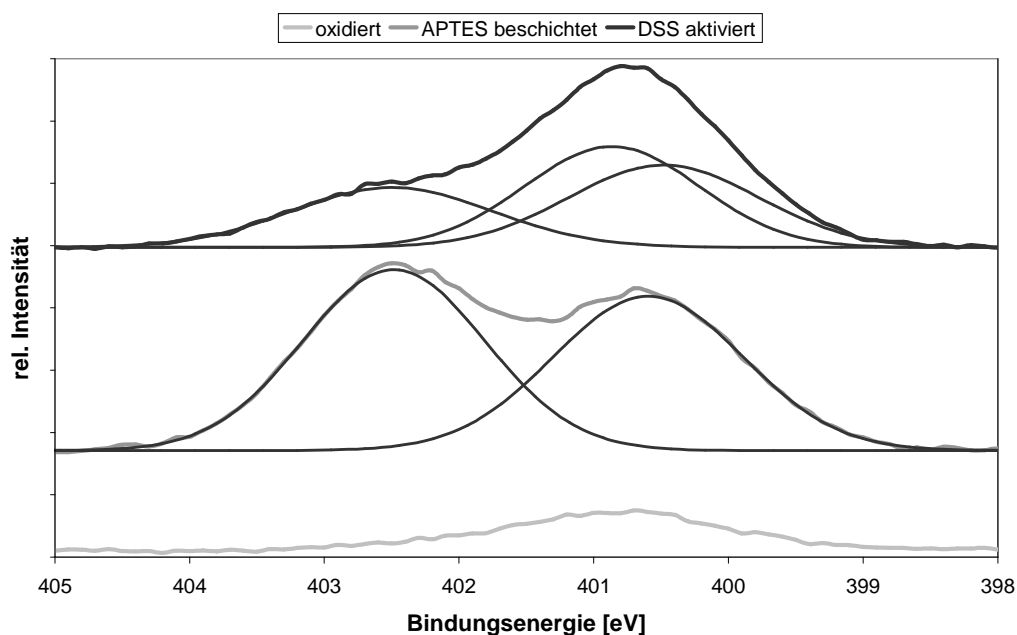
Der fehlende Stickstoffgehalt auf den tantalisierten Oberflächen lässt sich begründen durch eine Überlagerung des Tantal- und Stickstoffpeaks, die eine Bestimmung unmöglich macht.

**Tabelle 13: XPS-Messungen auf beschichteten Metalloberflächen**

Beschreibung	C1s[%]	O1s[%]	Al2p[%]	N1s[%]	Ti2p[%]	P2p[%]	Si2p[%]	Ta4f[%]
Tantal APTES	43,93	38,12	--	--	--	--	5,92	12,03
Tantal IPTES	36,84	46,24	--	--	--	--	3,67	13,08
Ti6Al4V GÄ APTES	30,19	46,34	1,71	3,77	9,66	--	6,34	--
Ti6Al4V GS APTES	27,62	49,74	0,72	4,27	6,95	3,28	5,13	--
Ti6Al4V PS APTES	25,80	51,45	1,25	3,99	11,02	2,86	2,55	--

### 2.3 Hocho aufgelöste XPS-Spektren

Betrachtet man die hocho aufgelösten Spektren der Stickstoffregion von nasschemisch oxidierten und APTES-beschichteten Ti6Al4V-Oberflächen (Abbildung 30), ist auch hier die Einführung von Aminogruppen durch den Haftvermittler klar zu erkennen. Die beiden Peaks entsprechen der protonierten (402,5 eV) und der freien (400,7 eV) Form der Aminogruppe. Ebenfalls gezeigt ist die Anbindung eines Aktivierungsreagenzes an den Haftvermittler am Beispiel von Disuccinimidylsuberat. Neben einem geringen Restanteil an protonierten Aminogruppen ist das durch die Reaktion zwischen aktivierter Carbonsäure und Haftvermittler entstandene Amid (400,4 eV), und das Imid (400,9 eV) des zweiten, noch aktiven Endes des Linkers, zu erkennen (NHS-Ester). Die Peak-Deconvolution erfolgte mit Microcal Origin 6.0.



**Abbildung 30: Hocho aufgelöste XPS-Spektren der Stickstoffregion unterschiedlicher Aktivierungszustände auf Ti6Al4V**

## 2.4 Quantitativer Nachweis mit s-SDTB und DAH

### 2.4.1 Adsorptionsisothermen von APTES auf Titan- und Tantalwafern

Beschichtet man Tantal- und Titanwafer bei sonst gleichbleibenden Reaktionsbedingungen und steigender APTES-Konzentration und bestimmt anschließend die Anzahl der Aminogruppen an der Oberfläche, ergibt sich folgendes Bild (Abbildung 31):

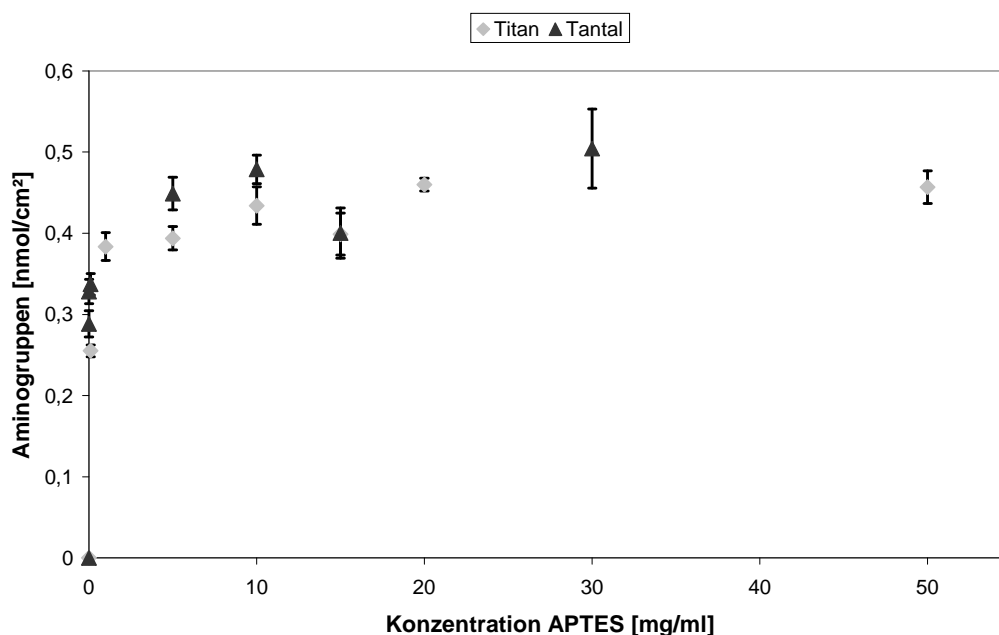


Abbildung 31: Adsorptionsisothermen von APTES auf Titan- und Tantalwafern

Die Oberflächenkonzentration an Aminogruppen steigt auf beiden Oberflächen bei geringen Silankonzentrationen stark an und erreicht bei etwa 1 % einen Sättigungswert von knapp unter 5 nmol Aminogruppen pro  $\text{cm}^2$ . Die Form der Kurve erinnert an eine Langmuir-Isotherme.

### 2.4.2 Aminogruppenbestimmungen mit sulpho-SDTB

Neben den auf den Modelloberflächen bestimmten Adsorptionsisothermen wurde der Einfluss der unterschiedlichen realen Metalloberflächen und deren oxidativer Vorbehandlung auf die Anbindung von APTES untersucht. Dazu wurden alle Oberflächen unter identischen Bedingungen mit APTES beschichtet (wasserfreies Toluol, 1,5 % APTES, 120 °C, 3 h) und anschließend die oberflächlich zugänglichen Aminogruppen quantifiziert. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, ergeben sich bei Ti6Al4V die höchsten Werte wie auch die

größten Unterschiede zwischen den einzelnen Vorbehandlungen. Bei Reintitan konnte kein Einfluss des Oxidationsverfahrens auf die Aminogruppenkonzentration festgestellt werden. Die absolute Konzentration war vergleichbar mit derjenigen auf der potentiostatisch vorbehandelten Ti6Al4V Oberfläche und den beiden elektrochemisch oxidierten Ti6Al7Nb Proben. Nach nasschemischem Ätzen konnte auf Ti6Al7Nb eine deutlich geringere Aminogruppenkonzentration nachgewiesen werden. Die Konzentration von Aminogruppen auf den mit Tantal und Tantaloxid beschichteten Stahlplättchen ist mit der auf Reintitan vergleichbar. Auf der Oberfläche der Cobaltbasislegierung konnte nur eine geringe Konzentration an Aminogruppen bestimmt werden.

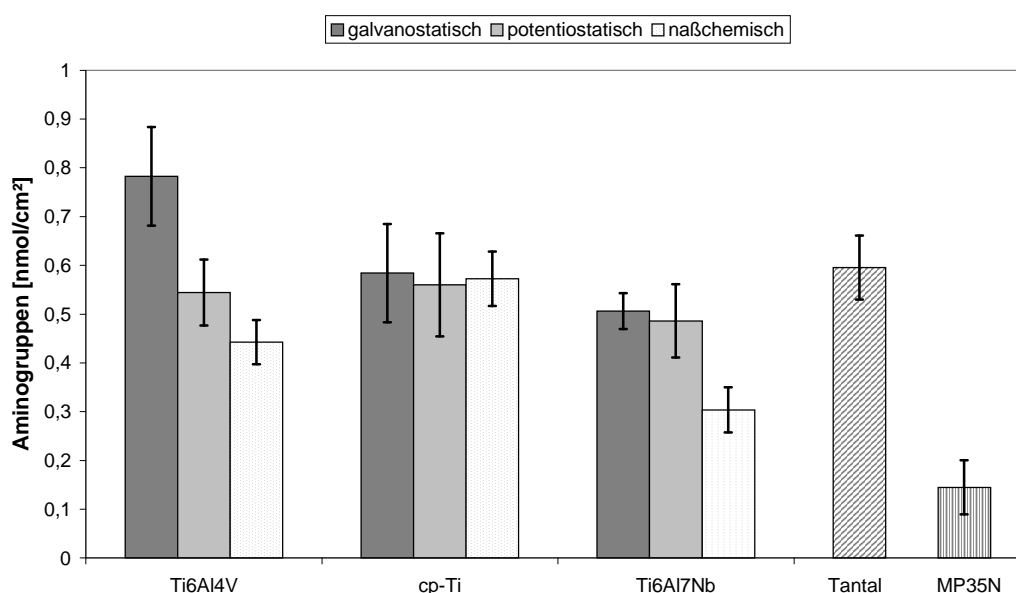
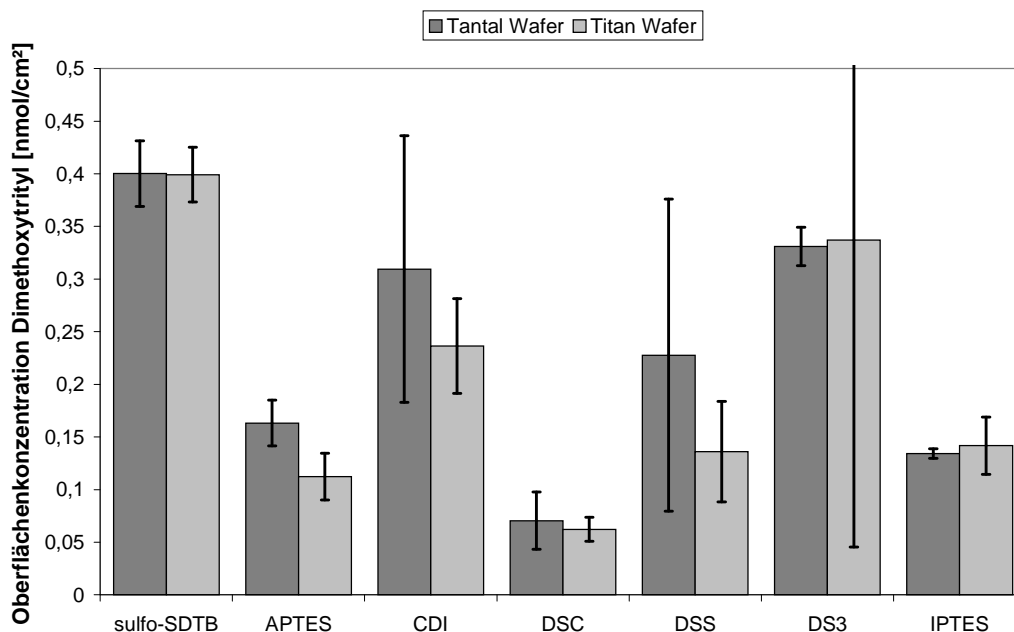


Abbildung 32: Aminogruppenkonzentrationen auf APTES beschichteten Metalloberflächen

### 2.4.3 Bestimmung der Oberflächenkonzentration an aktiven Gruppen mit DAH

Die Konzentration der oberflächlich gebundenen reaktiven Gruppen nach einer Aktivierung der APTES-beschichteten Metalloberflächen mit den homobifunktionellen Linkern DS3, DSS, CDI und DSC wurde durch Anbindung des Farbstoffes DAH bestimmt. Entsprechend erfolgte die Quantifizierung der Isocyanatgruppen nach der Beschichtung mit IPTES. Alle Untersuchungen wurden auf tantalisierten und titanbeschichteten Wafern durchgeführt. Als Vergleich ist der mit sulpho-SDTB bestimmte Wert für die Aminogruppenkonzentration mit angegeben (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Quantifizierung von funktionellen Gruppen auf Modelloberflächen**

Aus Abbildung 33 geht klar hervor, dass durch die direkte Bestimmung von APTES mit sulfo-SDTB die im Vergleich höchsten Konzentrationen bestimmt werden können. Mit den verwendeten Aktivierungsreagenzien bzw. Linkermolekülen kann immer nur ein Teil der vorhandenen Aminogruppen aktiviert werden. Die besten Ergebnisse zeigten hier Carbonyldiimidazol und Disulfosuccinimidylsuberat, gefolgt von Disuccinimidylsuberat. Auf den mit Disuccinimidylcarbonat aktivierten Oberflächen wurde sogar weniger Farbstoff nachgewiesen als unspezifisch auf der aminofunktionellen Oberfläche gebunden wurde (APTES). Die geringen Werte auf der IPTES-beschichteten Oberfläche sprechen, wie die IR-Untersuchungen, für einen deaktivierten Haftvermittler.

## 2.5 Chemische Stabilität der Haftvermittlerschicht

Die chemische Stabilität der hergestellten APTES-Schichten wurde durch Auslagerungsversuche bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Als Oberflächen dienten wiederum die mit Tantal und Titan besputterten Wafer. Wie in Abbildung 34 zu sehen ist, sind die Silanschichten bei sauren pH-Werten stabil, hydrolysieren aber in basischem Milieu recht schnell. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 verringert sich innerhalb der ersten 15 Stunden die Aminogruppenkonzentration auf etwa die Hälfte, bleibt aber dann stabil. Abbildung 35 zeigt den gleichmäßigen Abbau der Haftvermittlerschicht bei einem pH-

Wert von 9,5. Größere Unterschiede in der Stabilität der Haftvermittlerschichten auf Titan und Tantal konnten nicht gefunden werden.

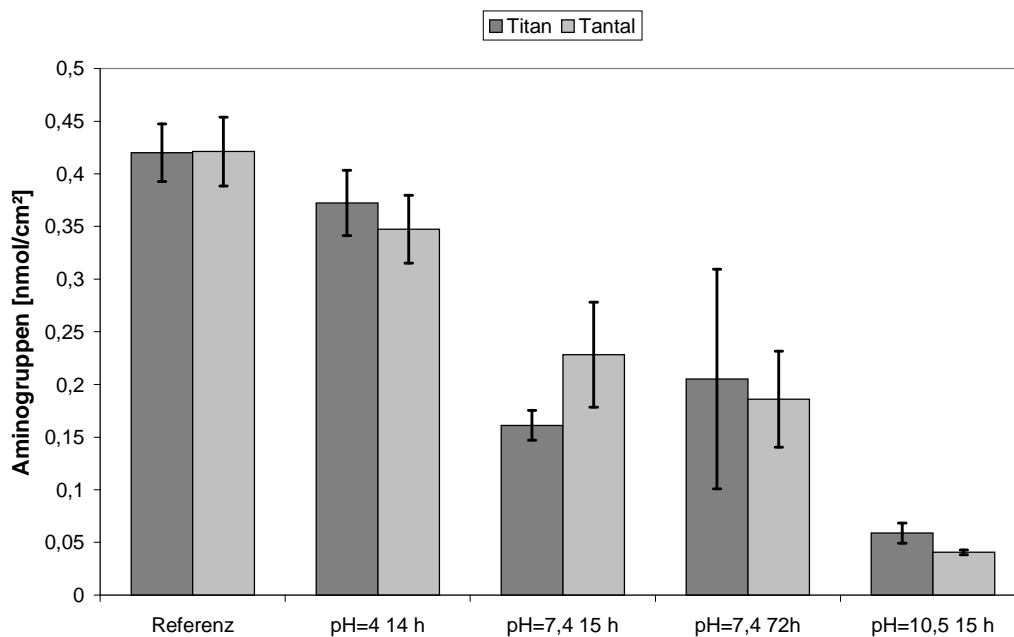


Abbildung 34: Auslagerungsversuche bei pH=4; pH=7,4 und pH=10,5

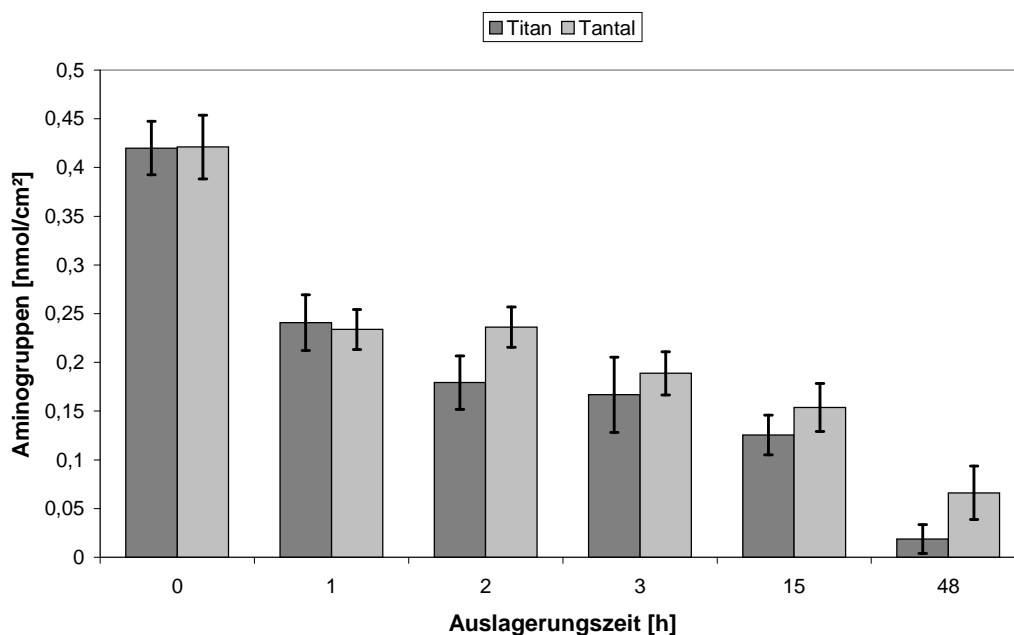


Abbildung 35: Auslagerungsversuche bei pH=9,5

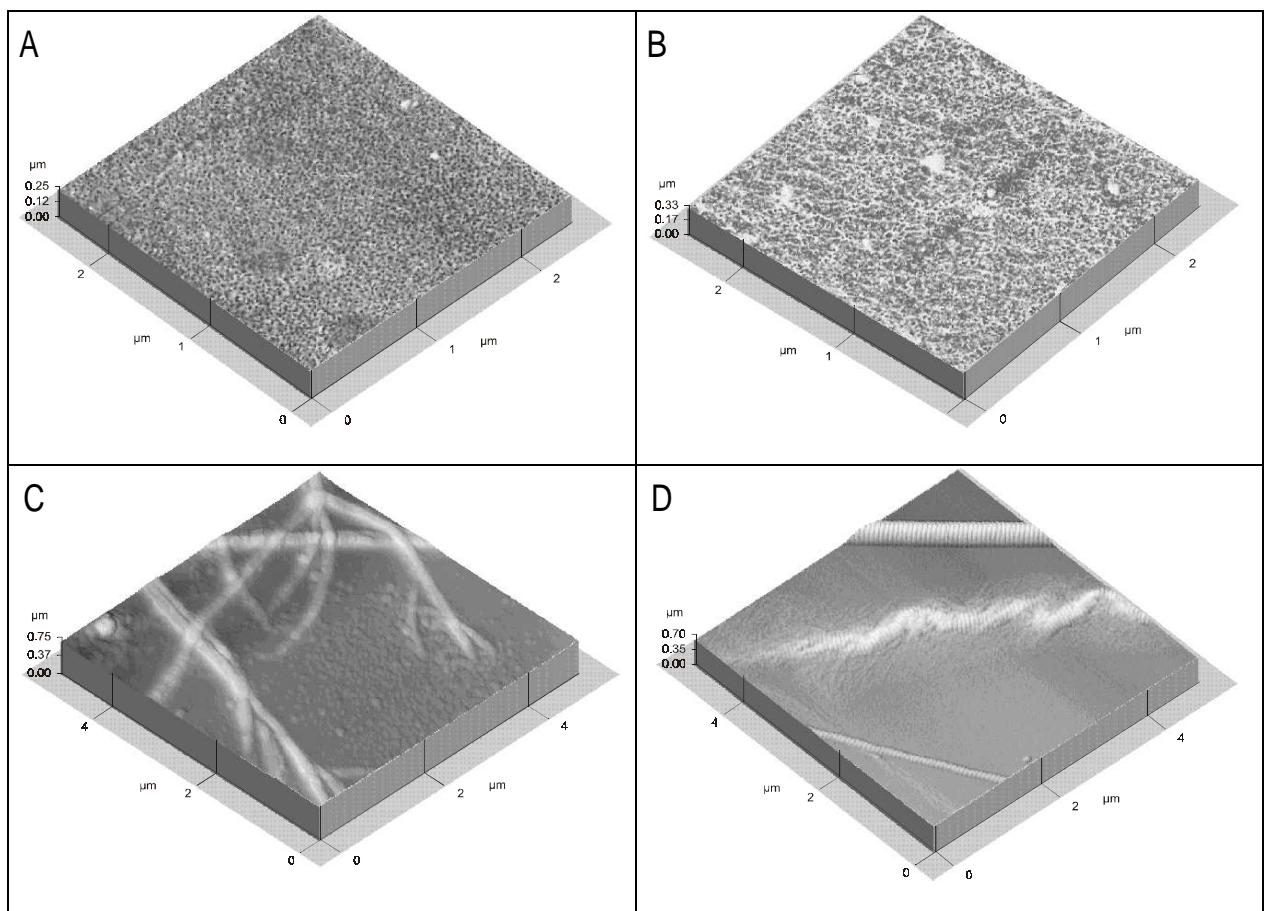
## 2.6 Zytotoxizitätstest der oxidierten und aktivierten Metalloberflächen

Die Ergebnisse werden im letzten Punkt dieses Kapitels zusammen mit den Daten für die kollagenbeschichteten Metalloberflächen vorgestellt.

### 3 Charakterisierung der biologischen Plattform

#### 3.1 AFM-Aufnahmen

Die folgenden Abbildungen zeigen die Struktur der verwendeten Proteine auf Wafer-Oberflächen, visualisiert durch Rasterkraftmikroskopie. Der zunehmende fibrilläre Charakter ist gut zu erkennen. Bild A zeigt einen gleichmäßigen Gelatinefilm, beim Kalbshautkollagen (B) sind bereits größere Aggregate und faserartige Strukturen zu erkennen. Beim rekonstituierten Kalbshautkollagen sind deutlich die Fibrillen zu sehen (Bild C). Beim Pferdeshautkollagen sind außerdem die charakteristischen Querstreifen zu erkennen (Bild D). Im Gegensatz zu den niedermolekularen Proteinen kommt es allerdings nicht mehr zu einer vollständigen Oberflächenbeschichtung, sondern zu einer unregelmäßigen Belegung mit Fibrillen. Gelatine und Kalbshautkollagen sind in einer höheren Auflösung dargestellt um die vorhandenen Unterschiede besser abzubilden. Die Struktur des rekonstituierten Kalbshautkollagens wurde im non-contact-Verfahren aufgenommen, da sich die Fibrillen durch einen direkten Kontakt mit dem Cantilever zu sehr verformten.



**Abbildung 36: AFM-Aufnahmen von Gelatine (A), Kalbshautkollagen (B), rekonstituiertem Kalbshautkollagen (C) und Pferdeshautkollagen (D) auf Waferoberflächen**

### 3.2 Aminosäurezusammensetzung der verwendeten Kollagene und Gelatine

In Tabelle 14 sind die Aminosäurezusammensetzungen der fibrillären Kollagene bovinen und equinen Ursprungs sowie des löslichen Tropokollagens aus Kalbshaut und Gelatine angegeben. Sie ist für alle untersuchten Proteine sehr ähnlich. Das schwefelhaltige Cystein war in keiner der Proben vorhanden, kleine Mengen an Tyrosin wurden überall gefunden. Keine Unterschiede ergaben sich auch im Gehalt an carbonsäurehaltigen Aminosäuren. Unterschiede ergaben sich allerdings im Iminosäuregehalt (Prolin- und Hydroxyprolin) sowie in der Anzahl an vorhandenen Lysin- und Hydroxylysinresten. Bei den fibrillären Kollagenen hat Pferdekollagen im Vergleich zum bovinen Material einen deutlich höheren Lysin- und Hydroxylysin-Gehalt. Die hydrolysierte Gelatine aus Schweinehaut zeigte sowohl bei den Iminosäuren als auch bei Lysin die höchsten Werte.

**Tabelle 14 : Aminosäurezusammensetzung der verwendeten Kollagene und Gelatine**

	Pferdekoll. [AS/1000 AS]	Rinderkoll. [AS/1000 AS]	Kalbshautkoll. [AS/1000 AS]	Gelatine [AS/1000 AS]
Hydroxyprolin	104 ± 7	103 ± 12	107 ± 8	107 ± 5
Asparaginsäure/Asparagin	50 ± 1	53 ± 1	53 ± 1	53 ± 1
Threonin	22 ± 1	20 ± 2	22 ± 1	20 ± 1
Serin	39 ± 5	35 ± 5	35 ± 5	36 ± 4
Glutaminsäure/Glutamin	97 ± 2	97 ± 3	95 ± 2	95 ± 1
Prolin	142 ± 6	147 ± 7	137 ± 6	150 ± 5
Glycin	219 ± 15	222 ± 5	226 ± 11	213 ± 12
Alanin	120 ± 2	124 ± 9	117 ± 5	121 ± 4
Cystein	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Valin	28 ± 2	27 ± 1	28 ± 2	25 ± 2
Methionin	4 ± 3	2 ± 3	2 ± 3	4 ± 4
Isoleucin	13 ± 1	15 ± 2	17 ± 2	14 ± 2
Leucin	32 ± 2	30 ± 2	32 ± 2	29 ± 3
Tyrosin	5 ± 1	3 ± 1	4 ± 1	5 ± 0
Phenylalanin	19 ± 2	18 ± 1	18 ± 1	16 ± 1
Histidin	11 ± 1	7 ± 2	6 ± 1	8 ± 0
Hydroxylysin	13 ± 1	10 ± 1	8 ± 1	9 ± 1
Lysin	26 ± 4	21 ± 1	34 ± 4	36 ± 7
Arginin	56 ± 1	61 ± 4	58 ± 2	58 ± 2

### 3.3 Quervernetzung von Kollagen und Gelatine

#### 3.3.1 Quervernetzung mit EDC und NHS

Die Quervernetzung der verschiedenen Proteine mit EDC und NHS wurde bezüglich des EDC:NHS-Verhältnisses, der EDC-Konzentration und der Reaktionszeit untersucht. Als Analytik diente die Bestimmung der freien Aminogruppen mit TNBS. In Abbildung 37 ist zu sehen, dass das Verhältnis zwischen EDC und NHS nicht zu klein werden darf, da sonst die Quervernetzung nur noch schlecht oder gar nicht mehr funktioniert. Als optimaler Wert stellte sich ein Verhältnis von 1:4 heraus, das in allen weiteren Versuchen verwendet worden ist. Der Einfluss der Reaktionszeit auf den Gehalt an freien Aminogruppen bei den verschiedenen Proteinen ist in Abbildung 38 dargestellt. Es ergibt sich ein recht einheitliches Bild mit einem starken Rückgang an Aminogruppen innerhalb der ersten Stunde. Bei Reaktionszeiten größer 4 h kann bei den fibrillären Kollagenen keine, bei Kalbshautkollagen und Gelatine nur noch eine minimale Verringerung der freien Aminogruppen erzielt werden. Die fibrillären Kollagene zeigen einen höheren Endpunkt als das Kalbshautkollagen und die Gelatine. Bei allen weiteren Quervernetzungen wurde die Reaktionszeit konstant bei 4 h belassen. Abbildung 39 zeigt den Verlauf der Quervernetzung bei steigender EDC-Konzentration. Die freien Aminogruppen nehmen stark ab, der Grad der Quervernetzung somit zu. Mit Konzentrationen größer als 20 mg/ml EDC kann der Quervernetzungsgrad kaum noch erhöht werden. Auch hier zeigen die fibrillären Kollagen keine so hohe Quervernetzung wie Kalbshautkollagen und Gelatine.

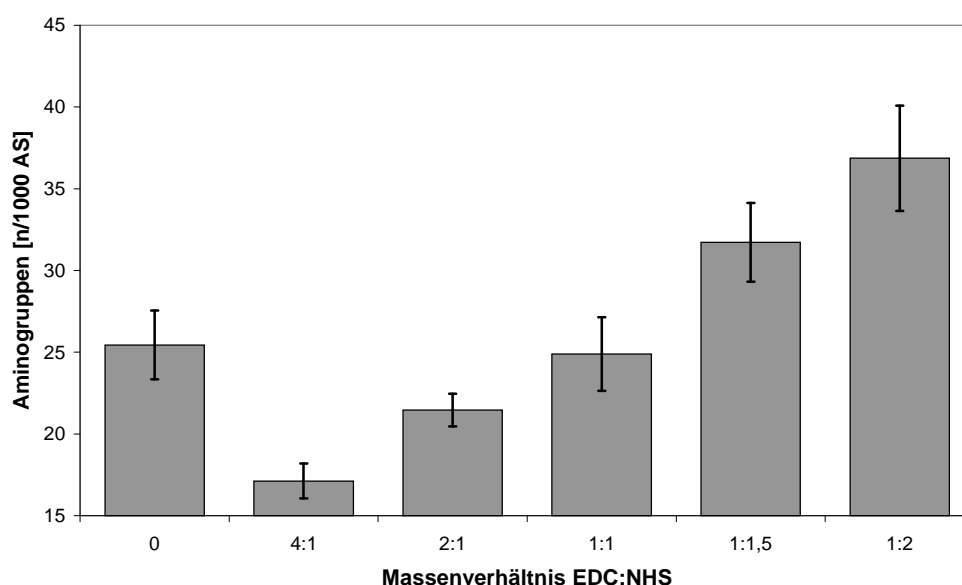


Abbildung 37: Einfluss des EDC:NHS-Verhältnisses auf den Quervernetzungsgrad von Gelatine

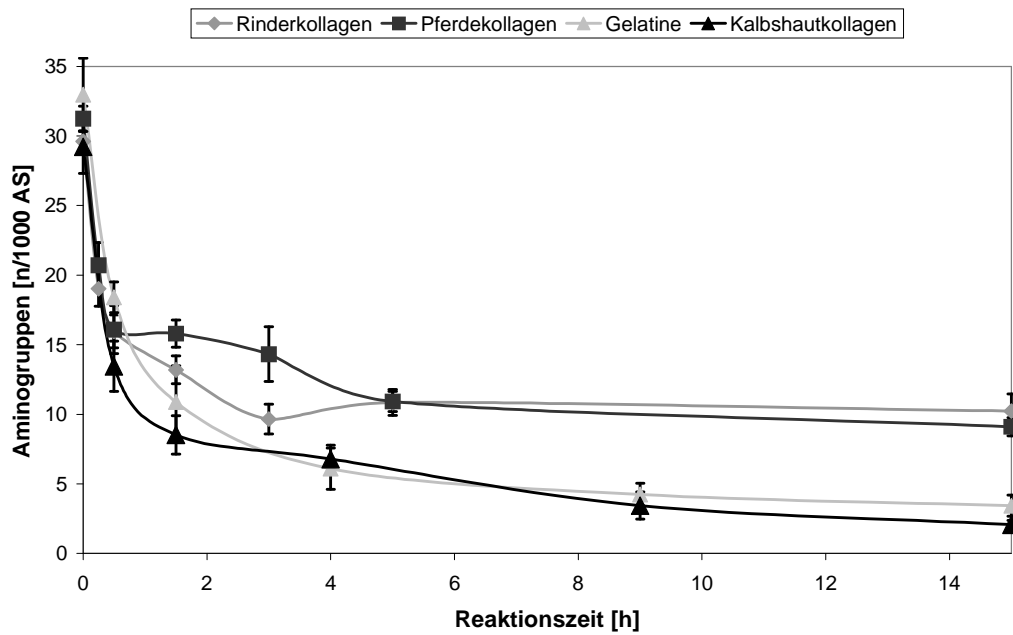


Abbildung 38: Zeitabhängigkeit der Quervernetzung

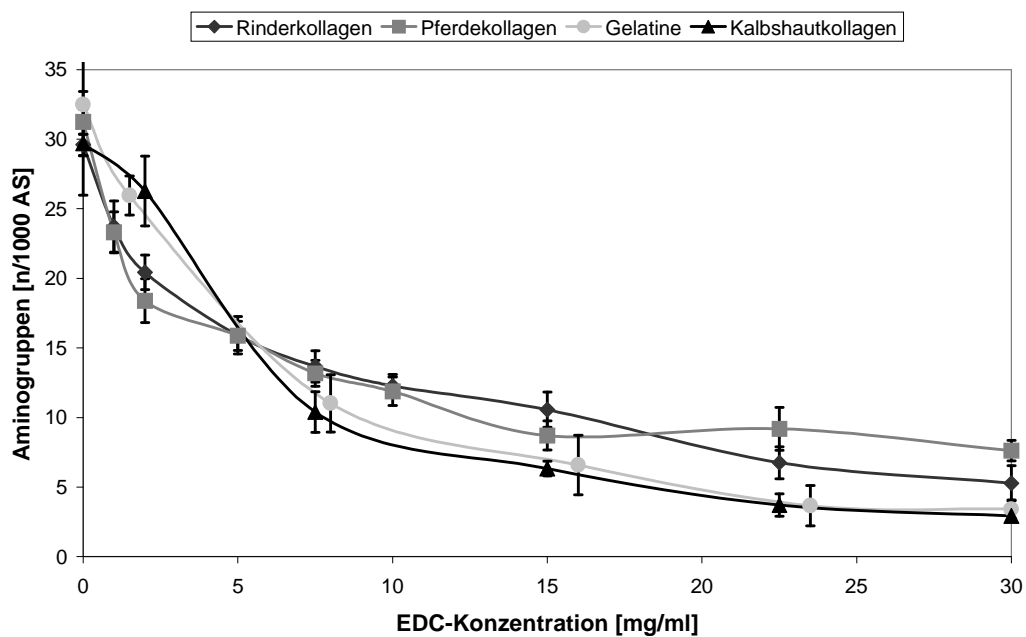


Abbildung 39: Konzentrationsabhängigkeit von EDC auf die Quervernetzung

### 3.3.2 Quervernetzung mit Glutaraldehyd

Neben EDC wurden zu Vergleichszwecken alle Ausgangsmaterialien in einer Lösung von 6,25 mg/ml Glutaraldehyd in PBS quervernetzt. Die Ergebnisse der Aminogruppenbestimmung sind in Tabelle 15 wiedergegeben. Die Werte von etwa 5 verbleibenden Aminogruppen für die drei Kollagene stehen im Einklang mit den durch 30 mg/ml EDC erhaltenen Daten. Bei Gelatine konnte mit 3 Aminogruppen pro 1000 AS ein geringerer Wert erreicht werden.

**Tabelle 15 : Freie Aminogruppen nach Glutaraldehyd Quervernetzung**

	Aminogruppen [n/1000 AS]
Rinderkollagen	4,4 ± 0,3
Pferdekollagen	4,7 ± 0,3
Kalbshautkollagen	5,6 ± 0,5
Gelatine	2,8 ± 0,2

### 3.3.3 Bestimmung der Schrumpfungstemperatur mit DSC

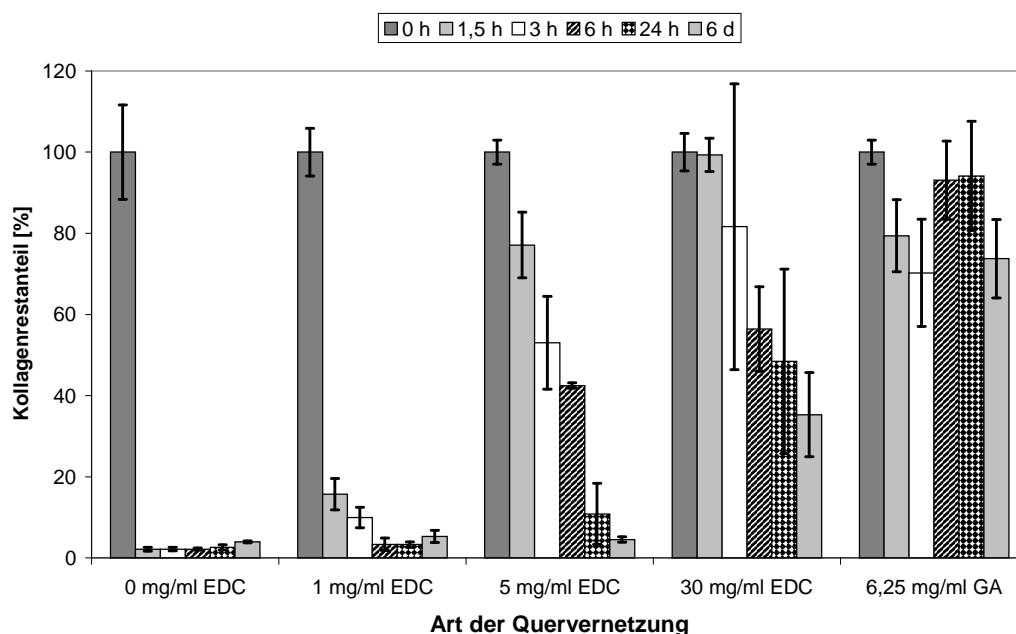
Die Schrumpfungstemperatur aller Kollagene wurde in unquervernetzter Form und nach Quervernetzung mit 5 mg/ml bzw. 30 mg/ml EDC bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 angegeben. Folgende Aussagen können getroffen werden: Bei allen Kollagenarten nimmt durch die Quervernetzung mit EDC/NHS die Schrumpfungstemperatur stark zu. Bei den unquervernetzten Proben steigt die Schrumpfungstemperatur vom Kalbshautkollagen über das rekonstituierte Kalbshautkollagen zu den beiden fibrillären Kollagenen ebenfalls stark an. Dabei liegt der Wert des Pferdekollagens nochmals etwa 5 % höher als der des Rinderkollagens. Nach der Quervernetzung sind nur noch sehr geringe Unterschiede zwischen Rinder- und Pferdekollagen festzustellen. Allerdings liegen sie immer deutlich über den Werten des Kalbshautkollagens. Der große Unterschied zwischen fibrillärem und nicht-fibrillärem Kalbshautkollagen im unquervernetzten Zustand tritt bei einem geringen Quervernetzungsgrad ebenfalls auf. Wird mit 30 mg/ml EDC quervernetzt, verschwinden diese Unterschiede. Auch durch eine Quervernetzung mit Glutaraldehyd konnte bei allen Kollagenen eine deutliche Erhöhung der Schrumpfungstemperatur erreicht werden. Auch hier zeigten Rinder- und Pferdekollagen im Vergleich die höchsten, und untereinander fast identische Werte. Die Schrumpfungstemperatur des rekonstituierten Kalbshautkollagens lag im Gegensatz zu den EDC-quervernetzten Proben nur geringfügig niedriger. Die geringste hydrothermale Stabilität wurde für Kalbshautkollagen bestimmt.

**Tabelle 16: Schrumpfungstemperaturen unquervernetzter und quervernetzter Kollagenproben**

	Rinderkollagen	Pferdekollagen	Kalbshautkollagen	fibr. Kalbshautkoll.
	T <sub>s</sub> [°C]	T <sub>s</sub> [°C]	T <sub>s</sub> [°C]	T <sub>s</sub> [°C]
nicht quervern.	54,2 ± 0,1	57,8 ± 0,1	37,5 ± 0,3	49,5 ± 0,2
5 mg/ml EDC	78,4 ± 0,4	76,5 ± 0,2	51,4 ± 1,3	64,7 ± 1,6
30 mg/ml EDC	86,3 ± 0,1	85,7 ± 0,2	75,4 ± 0,1	74,6 ± 1,4
6,25 mg/ml GA	76,4 ± 0,5	76,0 ± 0,1	55,6 ± 0,7	72,3 ± 0,3

### 3.3.4 Biochemische Stabilität der quervernetzten Proteine

Die biochemische Stabilität von Kollagen- und Gelatinefilmen auf Thermanoxplättchen wurde durch Inkubation mit Kollagenase und anschließende Quantifizierung der verbleibenden Proteinmenge mit Sirius-Rot untersucht. Bei Rinderkollagen (Abbildung 40) und Pferdekollagen (Abbildung 41) zeigt sich bei unquervernetzten Filmen bereits nach 1,5 Stunden Kollagenaseinkubation ein nahezu vollständiger Abbau der beiden Kollagenarten. Während ein geringer Quervernetzungsgrad (1 mg/ml EDC) bei Rinderkollagen noch keine Erhöhung der Stabilität feststellen lässt, zeigt sich im Falle des Pferdekollagens bereits eine deutliche Verbesserung. Bei höheren Quervernetzungsgraden kann für das Pferdekollagen eine Stabilität gegenüber enzymatischen Abbau von mehr als sechs Tagen erreicht werden. Unter gleichen Bedingungen wird das Rinderkollagen um ca. 50 % abgebaut. Durch Quervernetzung mit Glutaraldehyd kann nur bei Rinderkollagen eine vergleichbare biochemische Stabilität erreicht werden.



**Abbildung 40: Kollagenrestanteil nach Kollagenaseinkubation bei Rinderkollagen**

Es wurde eine stark verringerte Stabilität von Kalbshautkollagen (Abbildung 42) und Gelatine (Abbildung 44) gegenüber enzymatischer Inkubation im Vergleich zu den fibrillären Kollagenen festgestellt. Mit EDC konnte bei Kalbshautkollagen keine Stabilität über 1,5 h Inkubationszeit hinaus erreicht werden, bei der Gelatine war kein Einfluss der Quervernetzung auf die Stabilität nachzuweisen. Nach Glutaraldehyd-Quervernetzung konnte beim Kalbshautkollagen nach 6 Tagen, bei Gelatine nach 6 Stunden noch ein Restanteil an Pro-

tein nachgewiesen werden. Beim Kalbshautkollagen zeigt sich allerdings, wie beim Rinderkollagen, ein Anstieg der Proteinmenge bei den letzten Zeitpunkten. Die Stabilität von rekonstituiertem, fibrillärem Kalbshautkollagen ist für die niedrigen Quervernetzungsgrade und die GA-Quervernetzung mit der des löslichen Kalbshautkollagens zu vergleichen. Nur nach Quervernetzung mit 30 mg/ml EDC ist eine deutlich verbesserte Stabilität zu sehen.

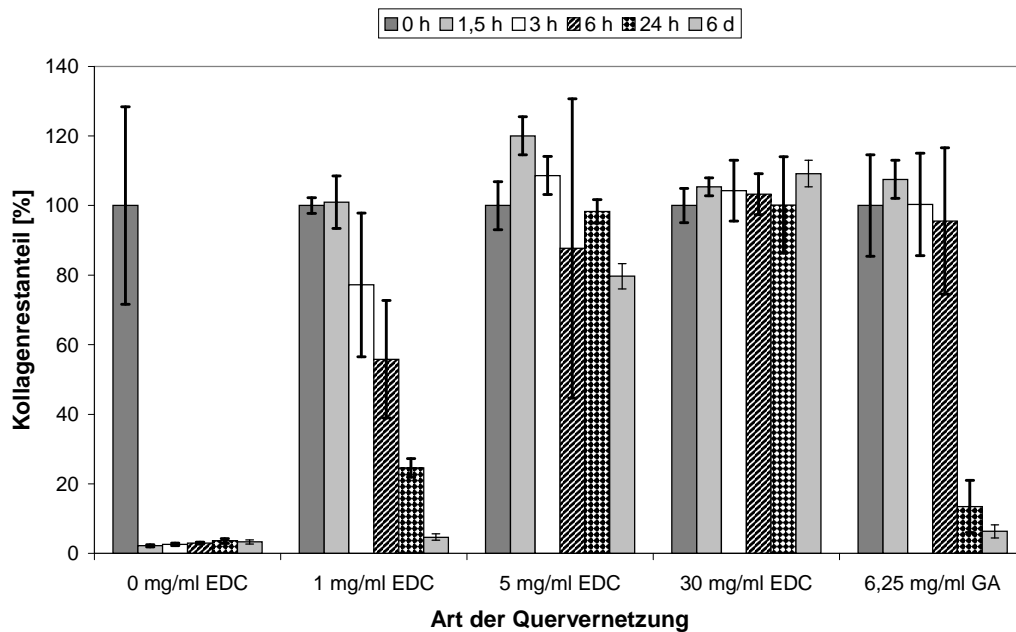


Abbildung 41: Kollagenrestanteil nach Kollagenaseinkubation bei Pferdekollagen

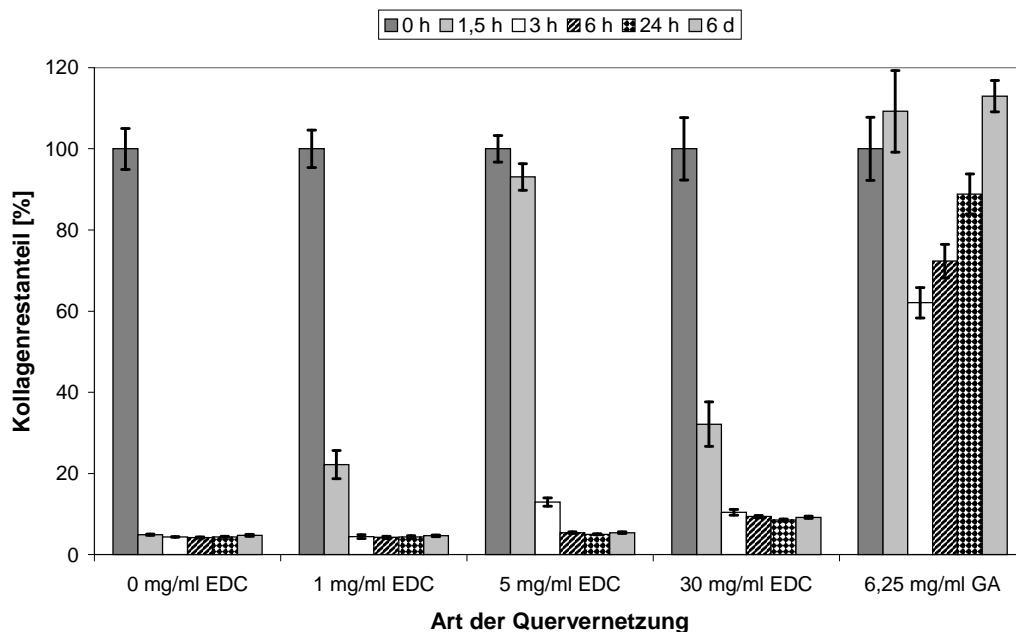


Abbildung 42: Kollagenrestanteil nach Kollagenaseinkubation bei Kalbshautkollagen

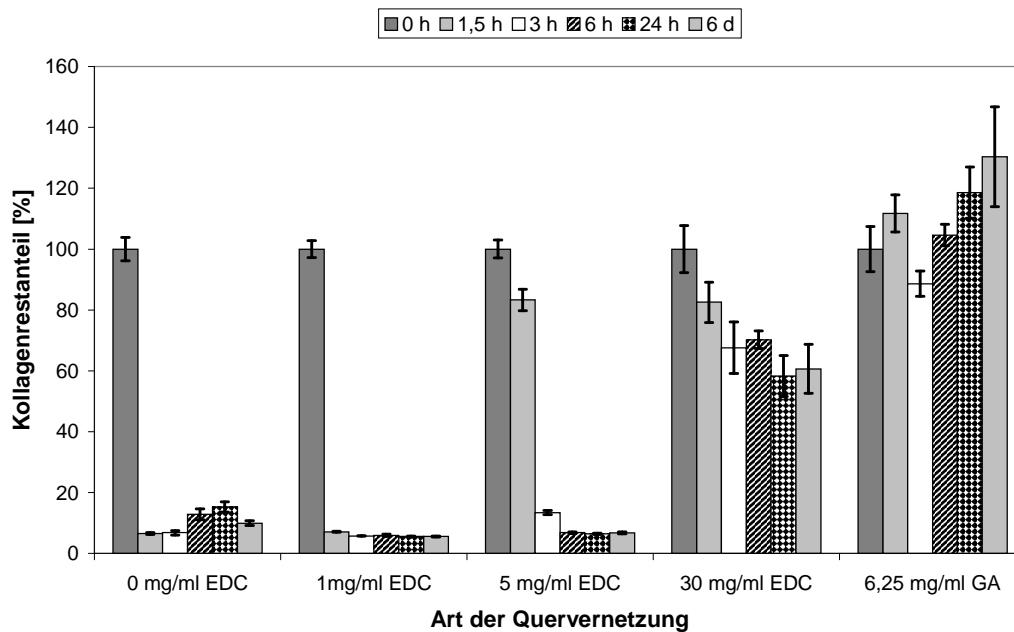


Abbildung 43: Kollagenrestanteil nach Kollagenaseinkubation bei rekonstituiertem Kalbshautkollagen

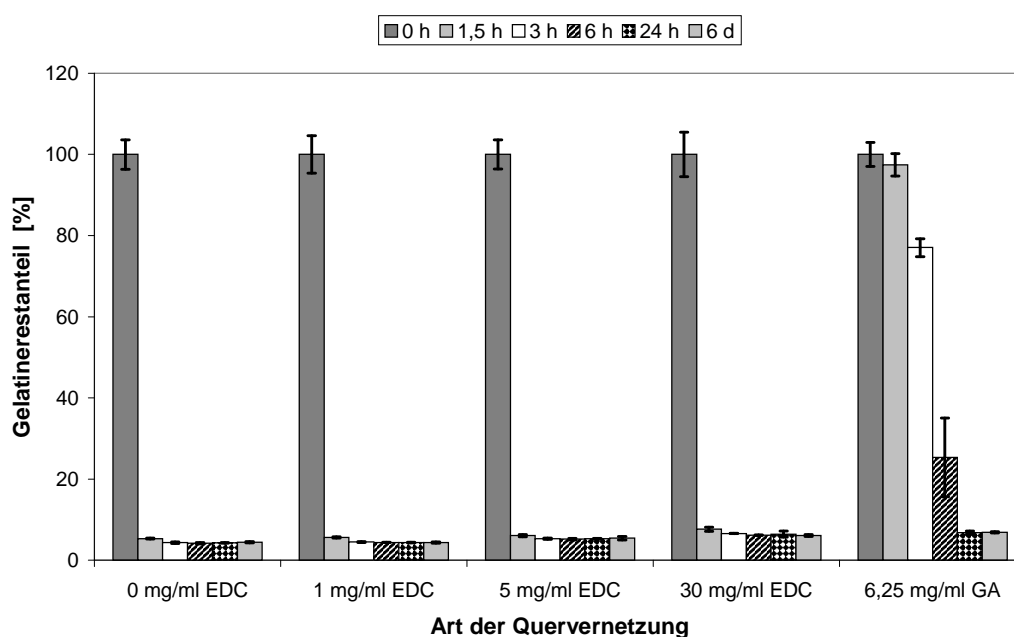
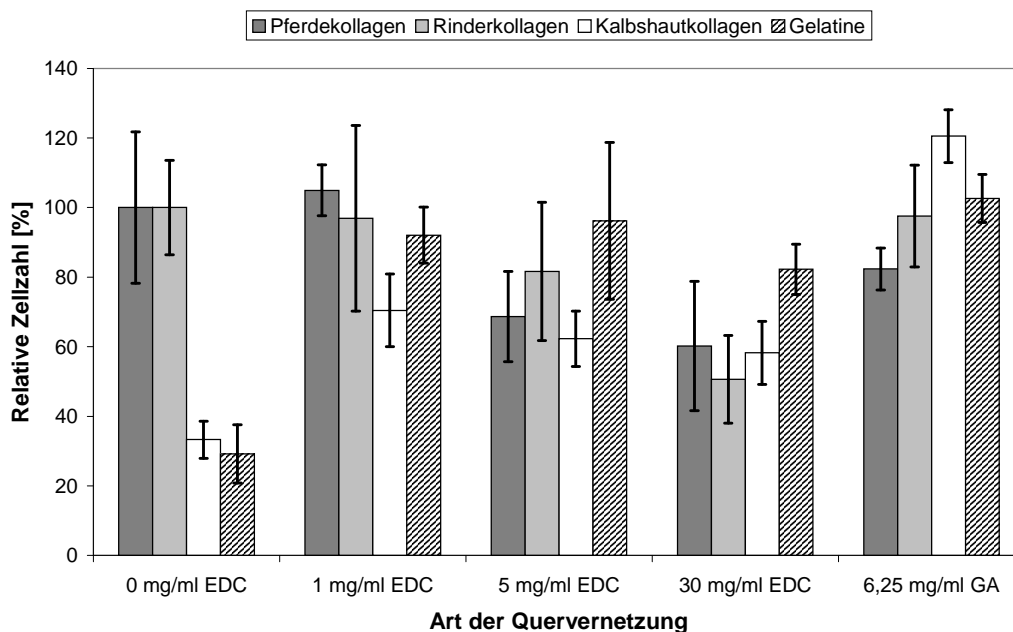


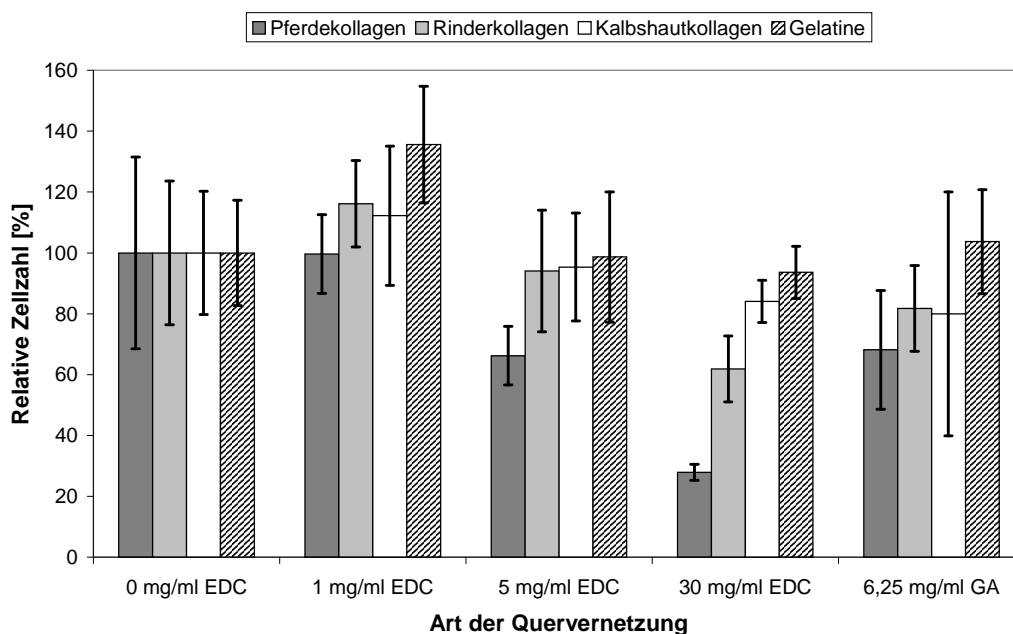
Abbildung 44: Gelatinrestanteil nach Kollagenaseinkubation bei Gelatine

### 3.3.5 Zytotoxizitätstests der quervernetzten Kollagenmaterialien

Um den Einfluss der Quervernetzung der Ausgangsmaterialien auf das biologische System zu untersuchen, wurden Adhäsions- und Proliferationsversuche mit mesenchymalen Stammzellen auf PS-Oberflächen mit unterschiedlich quervernetzten Kollagen- und Gelatinefilmen durchgeführt.



**Abbildung 45: Zelladhäsion von mesenchymalen Stammzellen auf unterschiedlichen Kollagenmaterialien**



**Abbildung 46: Zellproliferation von mesenchymalen Stammzellen**

Eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Materialien ergaben sich nur bei der Adhäsion auf unquervernetzten Filmen. Hier zeigten die fibrillären Kollagene eine in etwa dreifache Zellzahl (Abbildung 45). Bei quervernetzten Filmen sowie bei der nach 7 Tagen bestimmten Proliferation (Abbildung 46) ergaben sich im Rahmen der Fehler keine größeren Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen. Vergleicht man die einzelnen Quervernetzungs Zustände miteinander, zeigte sich ein Trend zu reduzierter Zelladhäsion und Zellproliferation bei zunehmender EDC-Konzentration. Die auf Glutaraldehyd-

quervernetzten Filmen bestimmte Zellzahl lag bei der Adhäsion im Bereich der niedrig EDC-quervernetzten Proben, bei der Proliferation im Bereich der hoch EDC-quervernetzten Filme. Auch hier zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen.

## 4 Kombination beider Plattformen

Die bisherigen Ergebnisse beruhen auf getrennten Untersuchungen der metallischen Implantatwerkstoffe sowie der organischen Beschichtungsmaterialien. Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Kombination beider Plattformen und der Untersuchung des Endproduktes vorgestellt.

### 4.1 Anbindung von Peroxidase

Die Ergebnisse zur Quantifizierung der aktiven Gruppen auf Metalloberflächen mit DAH wurden bereits vorgestellt. In Abbildung 47 und Abbildung 48 ist zu sehen, wie sich diese aktivierten Oberflächen zur Immobilisierung von Proteinen eignen. Als Modellprotein wurde in ersten Untersuchungen Peroxidase verwendet. Sowohl auf Titanwafern als auch auf Tantalwafern ist durch Aktivierung der Oberfläche und kovalente Bindung ein Mehrfaches an Peroxidase zu immobilisieren als durch rein adsorptive Anbindung. In beiden Fällen zeigen CDI, DSC und DS3 die besten Ergebnisse, DSS aktiviert am schlechtesten. Ohne Aktivierung von APTES ist keine Immobilisierung erkennbar. Ebenfalls eine sehr hohe Immobilisierung wurde auf Tantal durch den Haftvermittler IPTES erreicht.

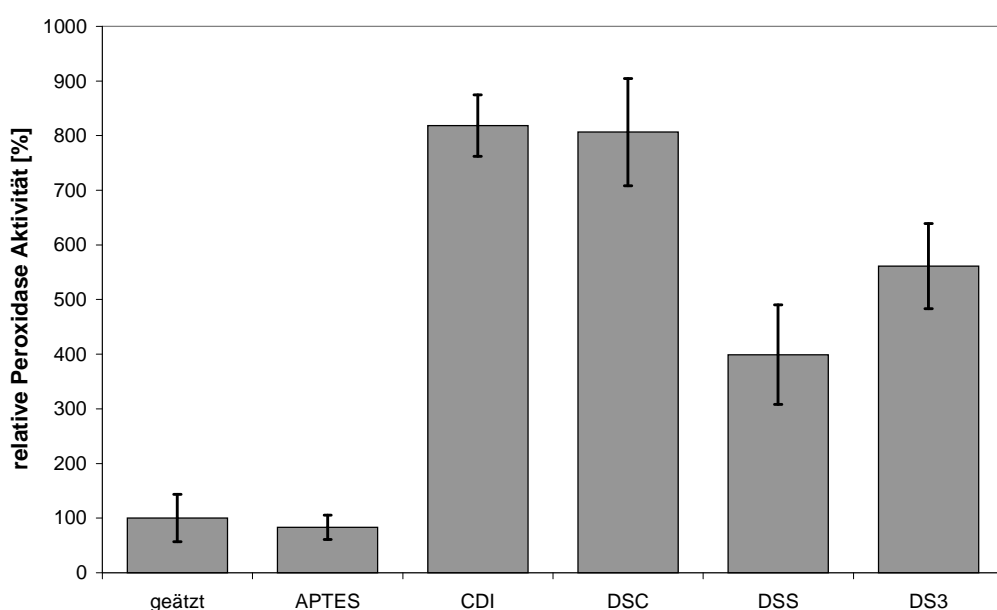


Abbildung 47: Peroxidaseaktivität auf aktivierten Reintitan-Oberflächen

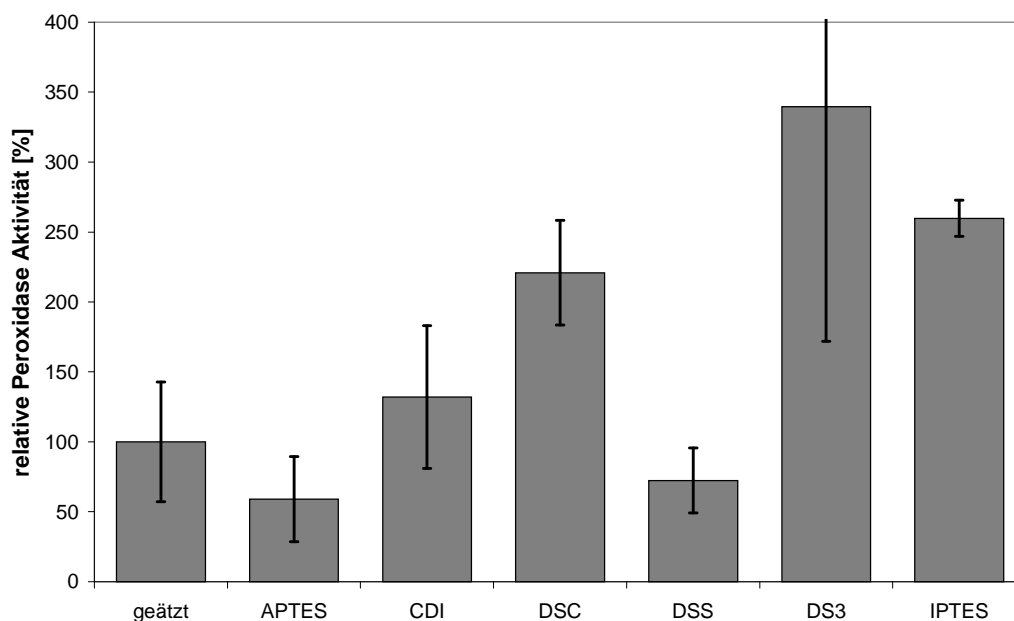


Abbildung 48: Peroxidaseaktivität auf aktivierten Tantal Oberflächen

## 4.2 Immobilisierung von Kollagen

### 4.2.1 Immobilisierung auf Modelloberflächen

Abbildung 49 zeigt die Ergebnisse von Immobilisierungsversuchen von Pferdekollagen auf unterschiedlich aktivierten Titan- und Tantalwafern. Auf beiden Oberflächen konnte nur durch die gleichzeitige Anbindung und Quervernetzung mit EDC eine im Vergleich zur geätzten Oberfläche eindeutig erhöhte Kollagenmenge nachgewiesen werden. Durch DS3-Aktivierung konnte nur geringfügig mehr, auf der IPTES-beschichteten Oberfläche etwas weniger immobilisiertes Kollagen als auf den unbehandelten Proben bestimmt werden. Die geringste Konzentration wurde, wie bei der Peroxidase, auf den APTES-beschichteten Plättchen gemessen.

### 4.2.2 Immobilisierung auf realen Oberflächen

Die Immobilisierung von Pferdekollagen auf Tantal-besputterten Stahlplättchen und galvanostatisch vorbehandelten Ti6Al4V-Proben in unterschiedlichen Aktivierungszuständen ergab ein ähnliches Bild wie auf den untersuchten Wafer-Oberflächen. Auch hier konnte durch gleichzeitige Anbindung und Quervernetzung mit EDC die höchste Kollagenmenge immobilisiert werden, die Affinität der Kollagenfasern zu der APTES-beschichteten Oberfläche war wieder am geringsten. Im Gegensatz zu Abbildung 50 konnte aber weder auf

DS3-aktivierten noch auf IPTES-beschichteten Plättchen eine mit der geätzten Probe vergleichbare Menge Kollagen gemessen werden. Außerdem konnte bis auf die APTES-beschichteten Plättchen in allen Fällen eine höhere Kollagenkonzentration auf den Tantaloberflächen nachgewiesen werden.

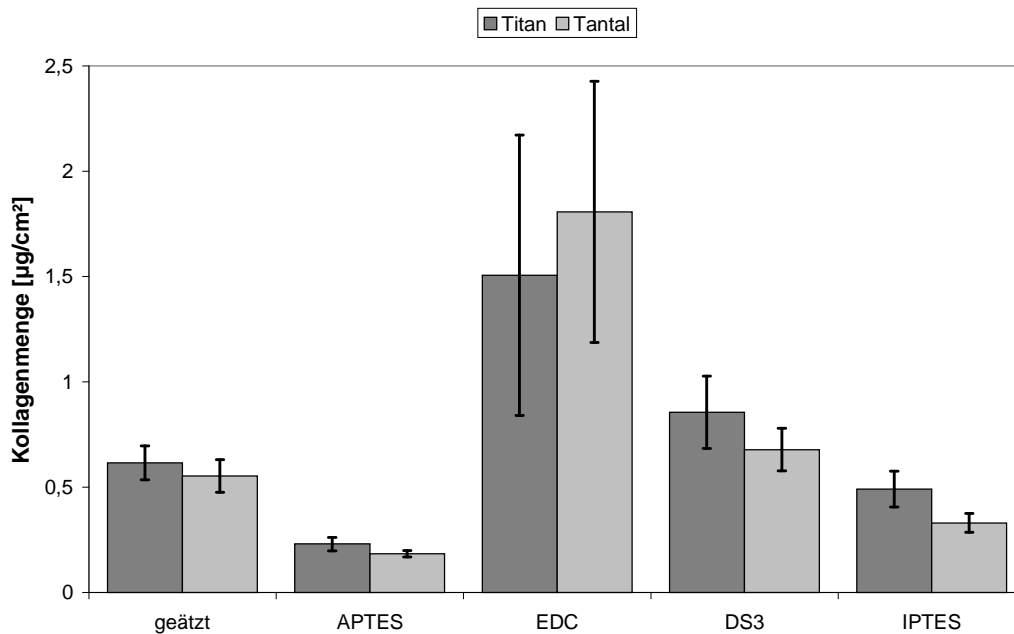


Abbildung 49: Immobilisierte Pferdekollagenmenge auf Titan- und Tantal-Oberflächen

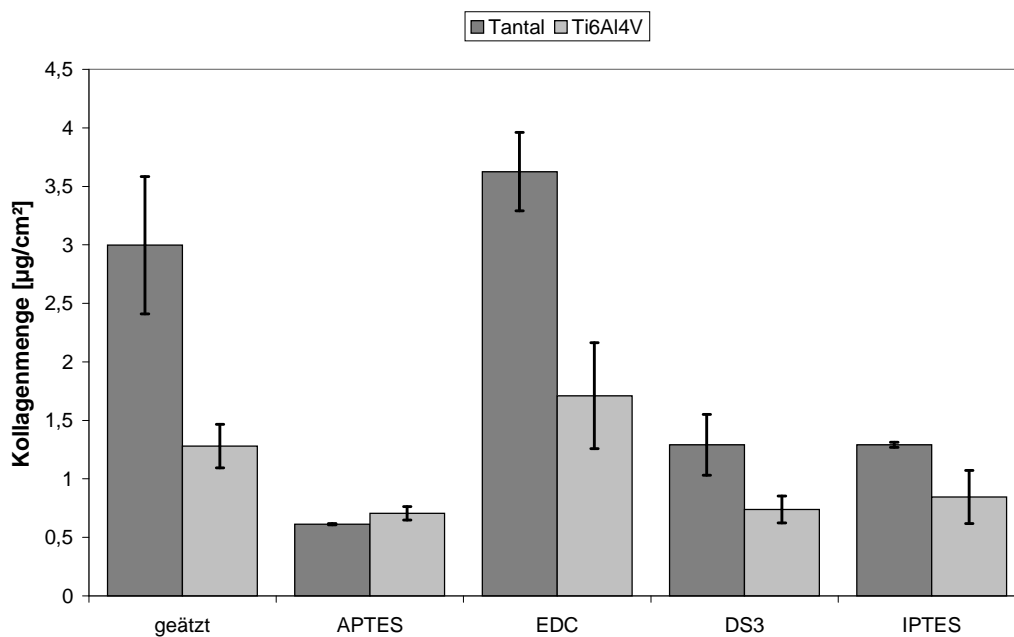


Abbildung 50: Immobilisierte Pferdekollagenmenge auf Tantal-beschichteten Stahlplättchen und Ti6Al4V

### 4.3 Visualisierung des immobilisierten Kollagens mit AFM

Analog zu den Aufnahmen auf Wafern wurde beispielhaft das durch DS3 an die realen Oberflächen gebundene Pferdekollagen mit Rasterkraftmikroskopie visualisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 wiedergegeben. Es lassen sich keine Unterschiede zwischen den beiden Oberflächen feststellen und die Aufnahmen sind mit denen auf Wafern zu vergleichen. Auf den glatten Modelloberflächen ist die Darstellung der Fibrillen allerdings klarer.

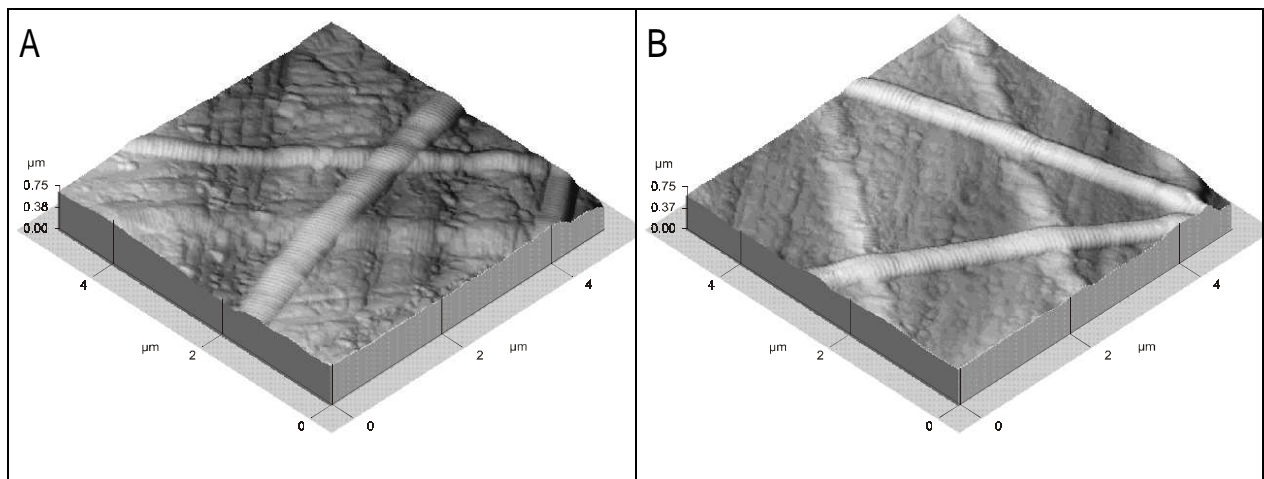


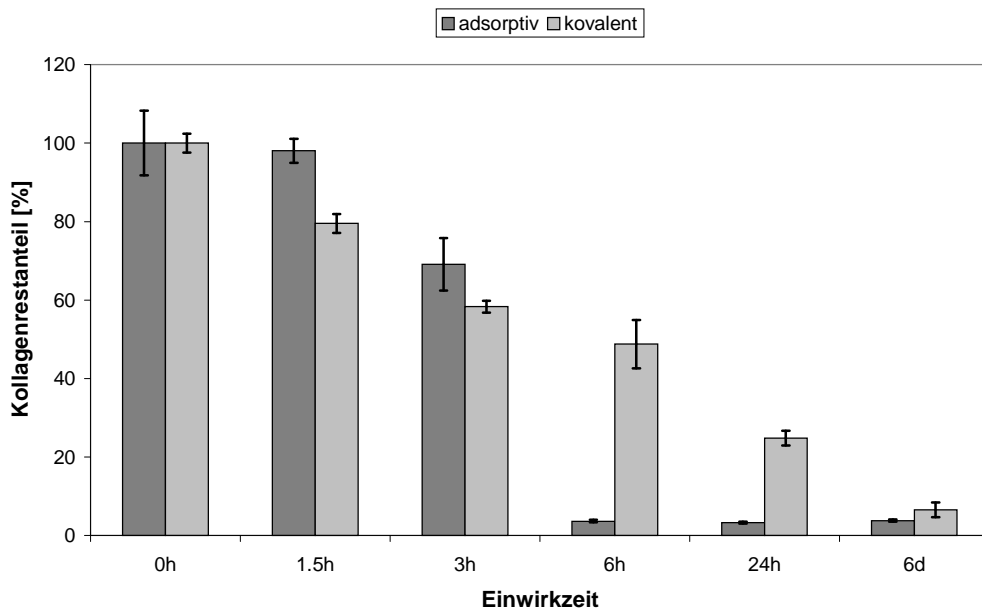
Abbildung 51: AFM-Aufnahmen von immobilisiertem Pferdekollagen auf Ti6Al4V (A) und tantalisiertem Edelstahl (B).

### 4.4 Untersuchung der angebondenen Kollagenschicht auf biochemische, chemische und mechanische Stabilität

Analog zu den Kollagenaseversuchen auf PS bzw. den Auslagerungsversuchen mit reinen Haftvermittlerschichten, wurden Versuche mit kovalent und adsorptiv gebundenen Kollagenfilmen auf Wafern und realen Metalloberflächen durchgeführt.

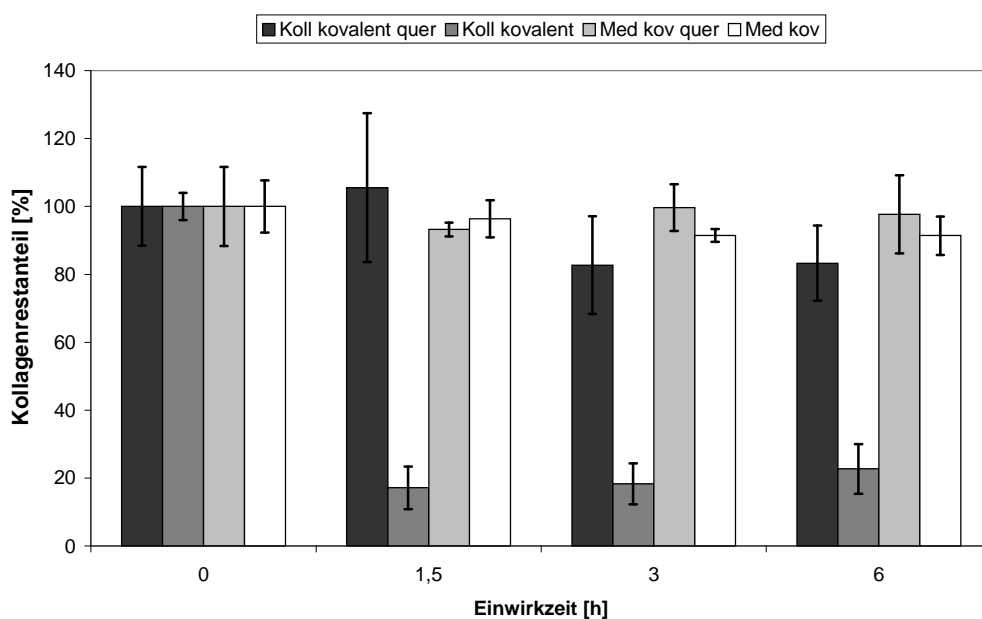
#### Biochemische Stabilität

Erste Versuche wurden mit kovalent (APTES+DS3) und adsorptiv gebundenen Pferdekollagenschichten auf tantalisierten Wafern durchgeführt. Zur Stabilisierung wurden die Schichten mit 1 mg/ml EDC quervernetzt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 52. Nach anfänglich noch gleichförmigem Reaktionsverlauf ist nach 6 Stunden ein plötzlicher Abfall der adsorptiv gebundenen Kollagenmenge zu beobachten, während sich die kovalent gebundene Schicht kontinuierlich verringert. Auf titanbeschichteten Wafern konnten keine Unterschiede zwischen adsorptiver und kovalenter Immobilisierung gefunden werden.

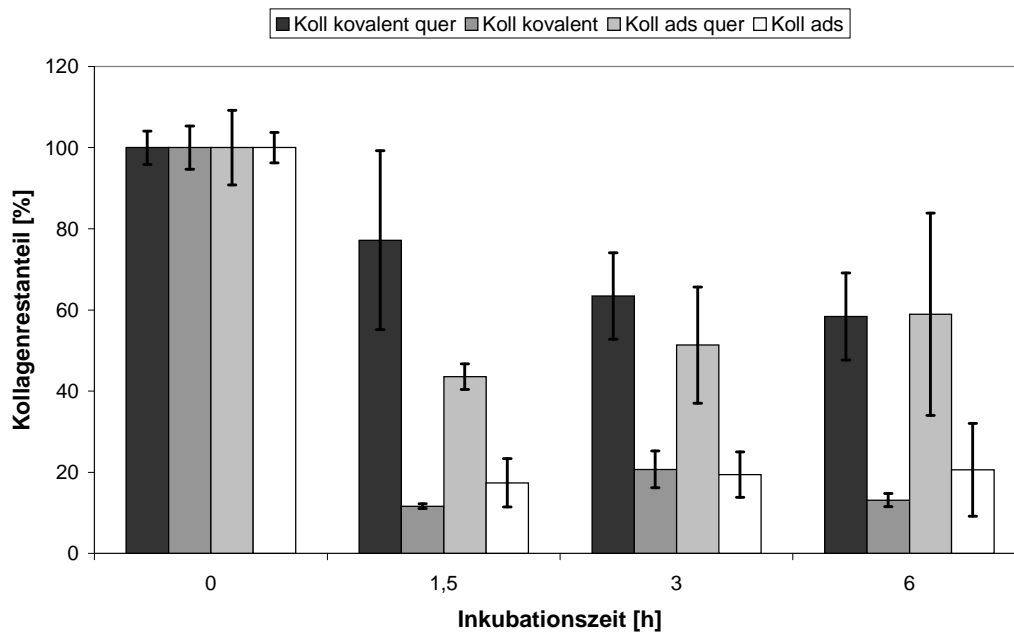


**Abbildung 52: Enzymatische Stabilität adsorptiv und kovalent (APTES+DS3) gebundener Kollagenschichten**

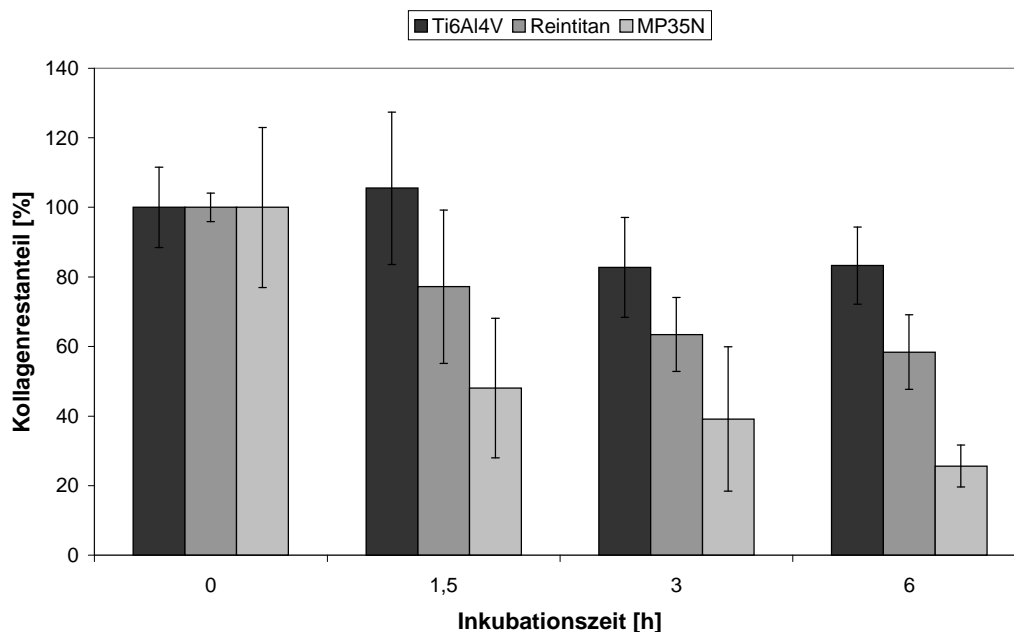
Diese Ergebnisse sollten nun auf die realen Metalloberflächen übertragen werden. Exemplarisch wurden drei Substrate verwendet, die nach APTES-Beschichtung einen hohen (Ti6Al4V GS), einen mittleren (cp-Ti GÄ) und einen niedrigen (MP35N GÄ) Aminogruppengehalt aufweisen (vgl. Abbildung 32). Neben den Kollagenaseversuchen wurden zusätzlich Inkubationsversuche ohne Enzym unter identischen Bedingungen (Medium, Temperatur, Zeit) durchgeführt. Verwendet wurde rekonstituiertes Kalbshautkollagen, die Quervernetzung erfolgte mit 5 mg/ml EDC.



**Abbildung 53: Kollagenrestanteil quervernetzter und unbehandelter Kollagenfilme auf Ti6Al4V nach enzymatischer Degradation und Mediumauslagerung**



**Abbildung 54: Enzymatische Stabilität adsorptiv und kovalent gebundener Kollagenschichten mit und ohne Quervernetzung auf Reintitan**



**Abbildung 55: Enzymatische Stabilität kovalent gebundener, quervernetzter Kollagenfilme auf Ti6Al4V, Reintitan und MP35N**

Abbildung 53 verdeutlicht nochmals den großen Einfluss der chemischen Quervernetzung auf die enzymatische Stabilität von Kollagen. Nach der Inkubation im Medium ohne Enzym konnten auf Ti6Al4V keine Unterschiede zwischen quervernetztem und unquervernetztem Kollagen festgestellt werden. Auf Reintitan und MP35N ergaben sich nach Medi-

uminkubation ebenfalls identische Werte, unabhängig von der Anbindung und dem Quervernetzungsgrad.

Abbildung 54 zeigt neben den großen Unterschieden zwischen unquervernetztem und quervernetztem Kollagen eine geringfügig bessere Stabilität des kovalent gebundenen Films durch einen langsameren Abbau bis 3 h. Die in Abbildung 55 wiedergegebene enzymatische Stabilität der kovalent gebundenen, quervernetzten Kollagenschichten auf den drei Substratoberflächen verdeutlicht einen Zusammenhang zwischen den für die kovalente Anbindung zur Verfügung stehenden Aminogruppen und der gemessenen Stabilität. Je höher die Aminogruppenkonzentration auf der Oberfläche ist, umso stabiler verhält sich die angebondenen Kollagenschicht gegenüber enzymatischer Degradation.

### Chemische Stabilität

Der Einfluss der in Abbildung 35 wiedergegebenen Hydrolyse der Haftvermittlerschicht bei pH=9,5 auf die Stabilität von unterschiedlich kovalent gebundenen Kollagenschichten wurde durch Inkubationsversuche mit tantalisierten und titanbeschichteten Wafern untersucht. Verwendet wurde fibrilläres Pferdekollagen, die Quervernetzung der EDC-Probe erfolgte mit 1 mg/ml EDC. Im Gegensatz zu den Immobilisierungsversuchen wurde auf allen Oberflächen eine konstante Kollagenmenge von 10 µg immobilisiert. Abbildung 56 zeigt einen geringen Rückgang der Kollagenmenge um maximal 20 % innerhalb von 48 Stunden und keinen Einfluss der Anbindungsart auf die Stabilität.

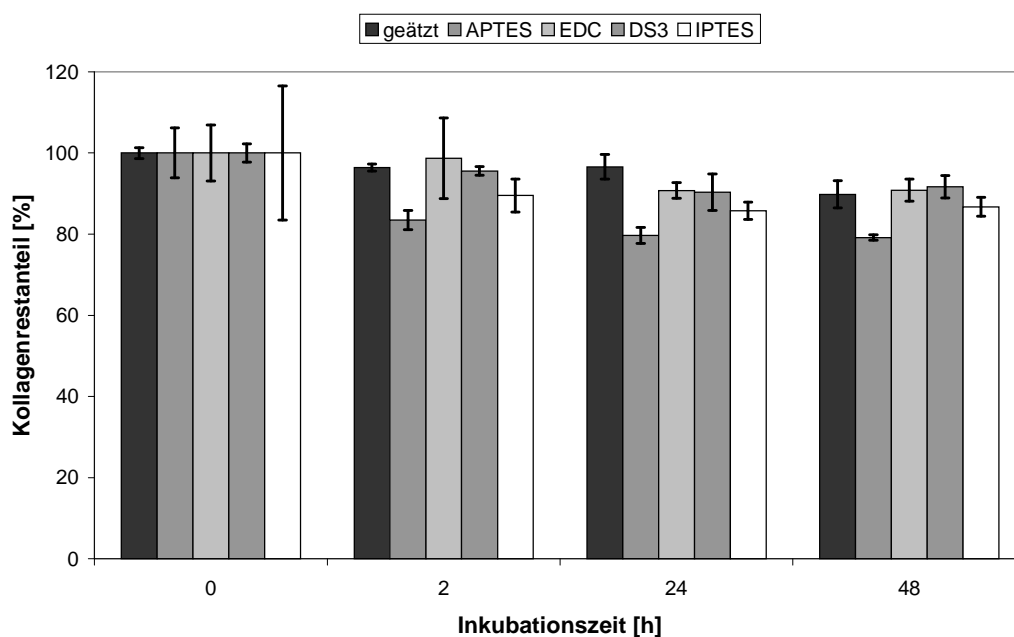
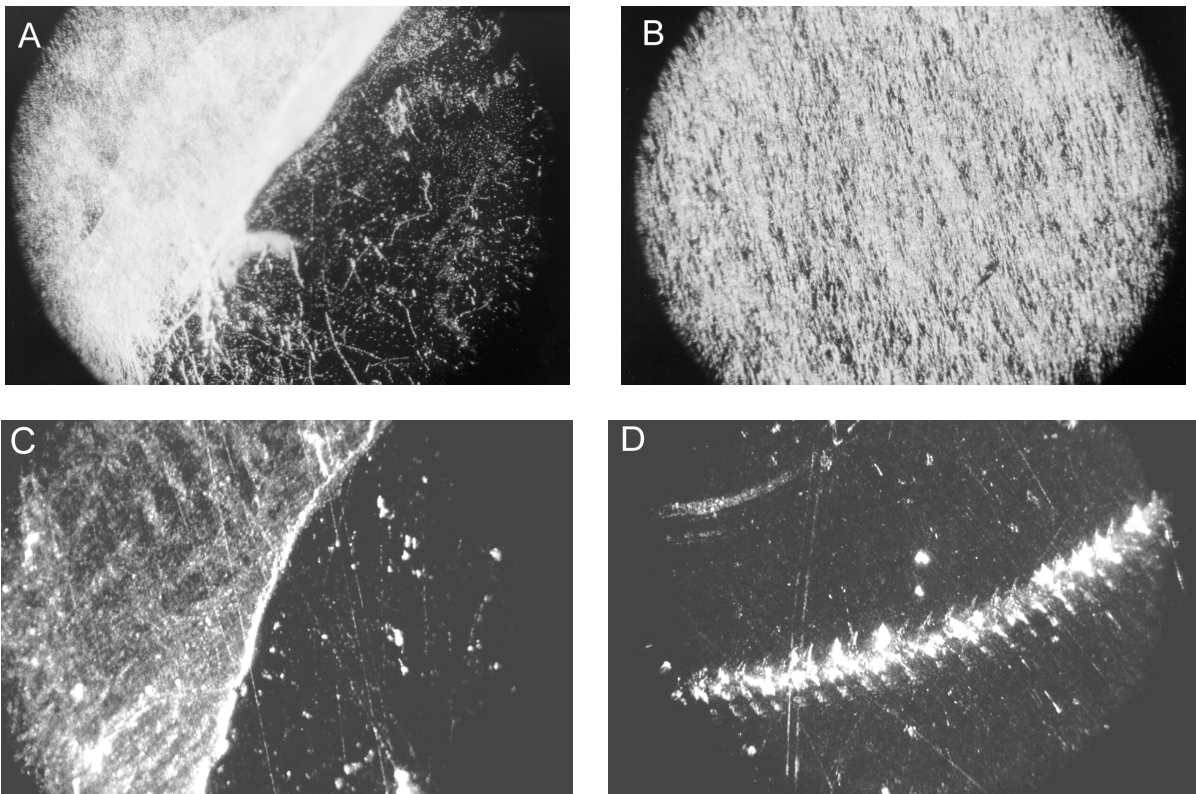


Abbildung 56: Kollagenrestanteil nach Auslagerung bei pH=9,5 auf tantalisierten Wafern

### Mechanische Stabilität

Die mechanische Haftung von adsorptiv und kovalent gebundenen, quervernetzten Pferde-kollagenfilmen wurde im trockenen Zustand durch einen Abziehtest mit Tesafilm untersucht, im feuchten Zustand durch mechanische Belastung mit einem spitzen Gegenstand (Pinzette, Spatel). Die Ergebnisse wurden mit dem Auflichtmikroskop visualisiert und sind in Abbildung 57 wiedergegeben. Die Kollagenschicht für die Versuche im feuchten Zustand hatte die 10fache Dicke, um eine ausreichende, interne Stabilität zu gewährleisten. In beiden Versuchen ergab sich ein vergleichbares Bild. Ohne kovalente Bindung kam es zu einem Adhäsionsbruch zwischen Kollagenschicht und metallischer Unterlage. Im trockenen Zustand sind nach dem Abziehen des Tesafilms nur noch vereinzelt Fibrillen zu erkennen (Bild A, rechts unten), die unbeklebte Hälfte ist noch vollständig belegt (Bild A, links oben). Die feuchte Schicht ließ sich mit einem Spatel komplett von der Unterlage ablösen (Bild C, rechts unten). Bestand eine kovalente Bindung zwischen Metall und Kollagen, konnte nach dem Abziehtest keine optische Veränderung der Schicht festgestellt werden (Bild B). Im feuchten Zustand (Bild D) ist eindeutig der durch die Spatelspitze verursachte Kratzer zu erkennen, der aber nicht zu einer Ablösung der Schicht führte.



**Abbildung 57: Mikroskopische Aufnahmen (100x) der mechanischen Stabilitätstests im trockenen (A, B) und feuchten (C,D) Zustand**

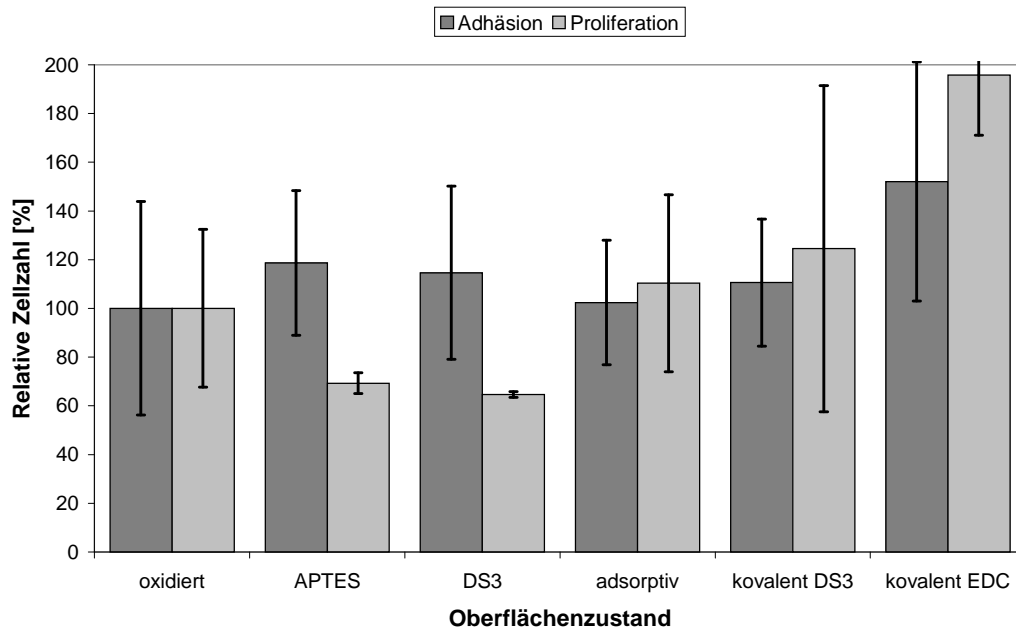
In einem praxisnahen Test wurden abschließend mit Pferdekollagen beschichtete, orthopädische Schrauben aus Ti6Al4V und Ti6Al7Nb in einen Rinder Oberschenkelknochen geschraubt und die verbleibende Kollagenmenge mit Sirius-Rot quantifiziert. Es konnten allerdings keine Unterschiede zwischen adsorptiver und kovalenter Bindung gefunden werden. Ausschlaggebend für die Haftung waren der Durchmesser des vorgebohrten Lochs im Knochen und die Oberflächenstruktur der Schrauben. Bei einem kleinen Durchmesser und hoher mechanischer Belastung wurde die Kollagenschicht vollständig entfernt. Bei etwas größeren Durchmessern blieb sie bis auf die Außenkanten der Gewinde erhalten. Auf den Schrauben aus Ti6Al4V, die eine sehr raue, sandgestrahlte Oberfläche aufwiesen, war der Großteil des Kollagens auch bei kleinen Lochdurchmessern und hohen mechanischen Belastungen nicht mehr von den Schrauben zu entfernen, unabhängig davon, ob die Anbindung adsorptiv oder kovalent erfolgte.

#### **4.5 Zytotoxizitätstests auf Metalloberflächen**

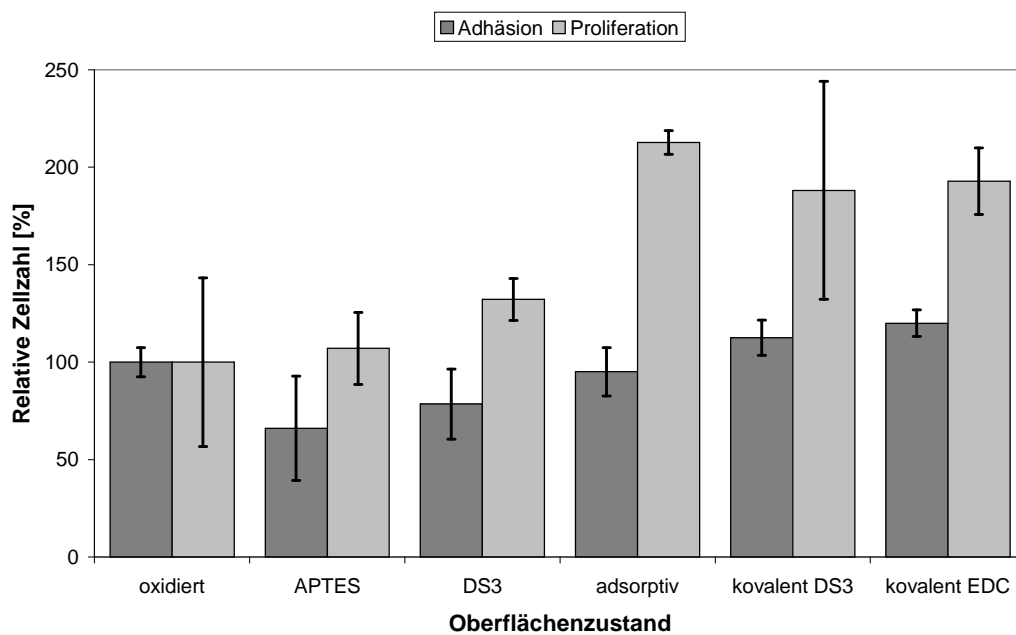
Abschließend wurden Adhäsions- und Proliferationsversuche mit mesenchymalen Stammzellen auf kovalent und adsorptiv beschichteten Metalloberflächen durchgeführt. Als Substratmaterialien dienten tantalbesputtete Stahlplättchen, beschichtet mit Pferdekollagen und Ti6Al4V, beschichtet mit löslichem Kalbshautkollagen. Die Ergebnisse für die oxidierten und aktivierten Oberflächen ohne Kollagenbeschichtung sind ebenfalls in Abbildung 58 und Abbildung 59 angegeben.

Auf Ti6Al4V konnte, im Vergleich zu der galvanostatisch oxidierten Referenzprobe, nur durch eine kovalente Anbindung von Kollagen mit EDC eine verbesserte Zelladhäsion und -proliferation erreicht werden. Nach 24 h ergaben sich auf den übrigen Oberflächenzuständen vergleichbare Zellzahlen. Die Proliferationsergebnisse auf den silanbeschichteten und DS3-aktivierten Proben fielen geringfügig schlechter aus als auf der Referenzprobe.

Auf tantalisierten Stahlplättchen konnten bei der Zelladhäsion nur sehr geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Oberflächenzuständen festgestellt werden. Nur auf den silaniserten und DS3-aktivierten Proben ergaben sich leicht verringerte Adhäsionsraten. Die Ergebnisse nach 7 Tagen zeigen allerdings eine eindeutig verbesserte Proliferation auf kollagenbeschichteten Oberflächen im Vergleich zu den unbeschichteten Zuständen. Dabei hatte die Art der Kollagenanbindung keinen Einfluss auf das zelluläre Verhalten.



**Abbildung 58: Adhäsion und Proliferation von MSC auf mit Kalbshautkollagen beschichteten und unbeschichteten Ti6Al4V-Oberflächen**



**Abbildung 59: Adhäsion und Proliferation von MSC auf mit Pferdekollagen beschichteten und unbeschichteten tantalisierten Stahloberflächen**

## E. Diskussion

### 1 Werkstoffplattform

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Biokompatibilität von Implantaten aus Ti6Al4V und tantalbeschichtetem Edelstahl 316L. Als Vergleichsmaterialien wurden Reintitan, die Titanlegierung Ti6Al7Nb und die Cobaltbasislegierung MP35N verwendet. Alle Ausgangsmaterialien standen in einer nasschemisch mit Salpetersäure oxidierten Form zur Verfügung, von den Titanmaterialien lagen zusätzlich noch jeweils zwei elektrochemisch oxidierte Zustände vor. Am Beginn dieser Arbeit stand die Untersuchung der oxidierten Oberflächen auf ihre Elementzusammensetzung mittels Röntgenphotoelektronenspektroskopie und ihre topographische Struktur mittels Rasterkraftmikroskopie.

Betrachtet man die Elementzusammensetzung der unterschiedlich aktivierten Ti6Al4V-Oberflächen (vgl. S. 63), so sind keine großen Unterschiede zu erkennen. Der Phosphorgehalt von 3 bzw. 4 % bei den elektrochemisch oxidierten Proben begründet sich in dem als Elektrolyt verwendeten Phosphatpuffer. Entsprechend wurde bei der in Salpetersäure geätzten Probe ein leicht erhöhter Stickstoffgehalt gefunden. Das Fehlen von Vanadium in der Oxidschicht wurde bereits in der Literatur beschrieben<sup>[142]</sup>. Die Elementzusammensetzung der gesputterten Tantal/Tantaloxidschicht zeigt neben Tantal und Sauerstoff nur sehr geringe Kohlenstoffverunreinigungen. Da diese Probe identische Wasch- und Ätzschritte wie die nasschemisch oxidierte Ti6Al4V-Probe durchlaufen hat, können die höheren Kohlenstoffkonzentrationen bei der Titanlegierung nur aus dem Herstellungsprozess herühren.

Aus der durch Rasterkraftmikroskopie erhaltenen Oberflächentopographie der unterschiedlichen Metalloberflächen lassen sich folgende Erkenntnisse ableiten (vgl. S. 66-69): Bei Titan und den Titanlegierungen stammt die in allen 10x10 µm Ausschnitten zu erkennende Struktur von der mechanischen Politur der Oberfläche. Bei der zwar identisch polierten, aber viel härteren Cobaltlegierung, sind die Schleifspuren kaum zu erkennen. Selbst die 1x1 µm Auflösung zeigt eine fast ebene Oberfläche.

Auf der durch einen Sputterprozess entstandenen Tantal/Tantaloxidoberfläche sind in der hohen Auflösung unterschiedlich große Partikel zu erkennen, die durch den Targetbe-

schuss entstehen und sich auf der Oberfläche niederschlagen. Auf dem 10x10  $\mu\text{m}$  Ausschnitt ist ein Defekt in der Tantalbeschichtung und die darunter liegende Edelstahloberfläche zu sehen. Es wird deutlich, dass die durch die Politur der 316L-Plättchen entstandene Struktur durch die Besputterung überdeckt und nivelliert wird.

Für die Titanoberflächen sollte der Einfluss der oxidativen Vorbehandlung auf die Topographie untersucht werden. Hier zeigte sich in den 10x10  $\mu\text{m}$  Ausschnitten, dass bei den nasschemisch oxidierten Proben die Strukturierung der Oberfläche am ausgeprägtesten ist. Die durch potentiostatische und galvanostatische Behandlung entstandenen Proben zeigen eine weichere Oberflächenstruktur durch einen stärkeren Abtrag von Ecken und Kanten. Am deutlichsten sind die Unterschiede für Reintitan. Dagegen ist in der hohen Auflösung eine Zunahme der Mikrorauhigkeit durch die elektrochemische Oxidation zu beobachten. Dies ist bei Ti6Al4V am ausgeprägtesten. Bei den galvanostatisch oxidierten Proben ist vor allem bei Reintitan und Ti6Al7Nb eine „blumenkohlartige“ Struktur zu erkennen. Mögliche Ursachen für die beobachteten strukturellen Veränderungen der Oberflächen sind bei den Legierungen die binäre Struktur aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Phasen. Hierbei stabilisiert Aluminium die hexagonale  $\alpha$ -Phase, Vanadium bzw. Niob die kubisch-flächenzentrierte  $\beta$ -Phase. Born<sup>[143]</sup> führt die unterschiedliche Stabilität der beiden Phasen in einem  $\text{HNO}_3$ -HF-Säurebad auf ihre elektrochemischen Potentiale zurück. Die Zunahme der Rauigkeit resultiert also möglicherweise aus einer unterschiedlich starken Oxidation der verschiedenen Phasen. Bei Reintitan sind es Kristallkörner bzw. die Korngrenzen, die zu einer ungleichmäßigen Oxidation führen können. Daneben ist es auch denkbar, dass es sich bei den gefundenen Strukturen um eine Vorstufe zu den von Scharnweber<sup>[144]</sup> beschriebenen Bläschen auf viel stärker oxidierten Oberflächen der gleichen Materialien handelt. Hierbei kommt es an der Grenzfläche zwischen Oxidschicht und Bulkmaterial zu einer Oxidation von Wasser unter Sauerstoffentwicklung.

Neben der Ausbildung einer reproduzierbar dicken und dichten Passivierungsschicht auf den Metalloberflächen sollten durch die verschiedenen Oxidationsprozesse vor allem Hydroxylgruppen gebildet werden, die eine Grundvoraussetzung für die Anbindung von Silanhaftvermittlern darstellen. Die relativen Unterschiede in den Oberflächenkonzentrationen an Hydroxylgruppen wurden mit Hilfe von Trifluoressigsäureanhydrid und XPS bestimmt (vgl. S. 64). Hier ergaben sich für die potentiostatisch oxidierten Proben die höch-

sten Werte, obwohl dies eigentlich für die unter drastischeren Bedingungen galvanostatisch oxidierten Proben erwartet wurde. Eine mögliche Erklärung kann die kurze Oxidationszeit sein. Die anfänglich als  $\text{Ti}(\text{OH})_4$  vorliegende Oxidschicht wandelt sich erst mit der Zeit durch Wasserabspaltung in Titandioxid um.

Im Falle von  $\text{Ti}_6\text{Al}_7\text{Nb}$  und für die geätzten Proben korrelieren die Ergebnisse der Hydroxylgruppenbestimmung mittels XPS sehr gut mit der Kernreaktionsanalyse.

Es galt nun, die Einflüsse der unterschiedlichen Materialien und Oxidationsverfahren auf das Anbindungsverhalten der verwendeten Silanhaftvermittler APTES und IPTES zu untersuchen. Erste qualitative Messungen wurden mittels reflexiver IR-Spektroskopie auf metallisierten Wafern durchgeführt (vgl. S. 70f). Diese eignen sich aufgrund ihrer glatten Oberflächen und der geringen Lichtstreuung besonders für eine Vermessung der dünnen Haftvermittlerschichten. Für APTES stehen die Ergebnisse in Einklang mit den Arbeiten von Boerio et al.<sup>[72-74]</sup>, die Filme auf  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ , Aluminium, Eisen und Kupfer untersuchten. Für IPTES existieren keine vergleichbaren Untersuchungen in der Literatur, das Spektrum ist aber eindeutig zuzuordnen. Allerdings wird ein Teil der Isocyanatgruppen während der Anbindung durch entstandenes Ethanol oder Wasser aus der Luft bzw. den organischen Lösungsmitteln deaktiviert. Dies wird durch die Quantifizierung der Isocyanatgruppen bestätigt. Auf Tantal- und Titanoberflächen ergaben sich entsprechende Ergebnisse. Auf den viel rauerer, realen Proben konnten keine aussagekräftigen Spektren erhalten werden.

Durch XPS-Messungen (vgl. S. 72) konnte durch die Einführung von Silizium und die Zunahme von C und N die Anbindung der beiden Haftvermittler ebenfalls nachgewiesen werden. In allen Fällen waren die darunter liegenden Metalloxidschichten noch in stark abgeschwächter Form zu erkennen. Hoch aufgelöste Spektren der Stickstoffregion auf APTES-beschichteten  $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ -Oberflächen zeigen, dass ein Teil der Aminogruppen in protonierter Form vorliegt. Grund dafür ist der letzte mit destilliertem Wasser durchgeführte Waschschriff nach der Silanbeschichtung, bei dem sich durch gelöstes Kohlendioxid ein leicht saurer pH-Wert nicht vermeiden lässt. Nachdem die weitere Aktivierung aber entweder in basisch gepufferten wässrigen Systemen oder in organischen Lösungsmitteln unter Zusatz einer sterisch gehinderte Base durchgeführt wird, stellte dies kein Problem dar. Das zeigt auch das hochaufgelöste Spektrum der DSS-aktivierten Oberfläche, bei dem

neben der Einführung eines Amidstickstoffes ein starker Rückgang der protonierten Aminogruppen zu erkennen ist. Für tantalisierte Oberflächen waren entsprechende Messungen nicht möglich, da sich der Tantal- und der Stickstoffpeak überlagern.

Mit den Ergebnissen waren auch erste halbquantitative Vergleiche zwischen einzelnen Oberflächen möglich. Für die geätzte Oberfläche von Ti6Al4V und des tantalisierten Edelstahls ergab sich ein vergleichbarer Si-Gehalt. Nach einer Beschichtung mit IPTES ergab sich auf der Tantaloberfläche ein im Vergleich zur APTES-Beschichtung geringerer Si-Gehalt. Auch die Art der oxidativen Vorbehandlung hatte einen starken Einfluss auf die Oberflächenkonzentration an Silizium, die bei der nasschemisch oxidierten Probe am höchsten war. Mit nur etwa 2,5 % am geringsten war er bei der potentiostatisch vorbehandelten Probe. Diese Ergebnisse lassen sich nicht durch die mit TFAA bestimmten Unterschiede in der Hydroxylgruppenkonzentration erklären.

Mit Hilfe von sulpho-SDTB konnten quantitative Aussagen über die Konzentration an Aminogruppen auf den APTES-beschichteten Oberflächen getroffen werden. Dieses Reagenz ermöglicht aufgrund seines sehr hohen Extinktionskoeffizienten die Bestimmung sehr geringer Mengen an Aminogruppen. Zu beachten ist hierbei, dass sowohl APTES als auch IPTES als sehr kurzkettige Haftvermittler keine „self assembled monolayer“ ausbilden, sondern bei entsprechender Silankonzentration Multilayer unterschiedlicher Dicke.<sup>[145;146]</sup>

Der Verlauf der Adsorptionsisothermen (vgl. S. 73) auf Titan- und Tantalwafern ist deshalb nicht durch die Ausbildung eines Monolayers zu erklären. Wahrscheinlich bildet sich bereits bei sehr geringen Gleichgewichtskonzentrationen eine vollständige Belegung der Oberfläche. Bei steigender APTES-Konzentration im Lösungsmittel bilden sich Haftvermittlerschichten zunehmender Dicke. Für den Farbstoff, der nur mit oberflächlich zugänglichen Aminogruppen reagieren kann, sind die unteren Schichten nicht erreichbar und es kommt zu der gemessenen, gleichbleibenden Aminogruppenkonzentration. Für die weitere Anbindung von Kollagen haben die nicht zu bestimmenden Aminogruppen aber entsprechend auch keine Bedeutung. Auf den beiden Modelloberflächen, auf denen ein Einfluss der Rauigkeit ausgeschlossen werden kann, ergaben sich keine Unterschiede. Die maximal bestimmte Konzentration von knapp unter 0,5 nmol Aminogruppen pro cm<sup>2</sup> liegt etwas niedriger als die für cp-Titan und Tantal auf realen Oberflächen gemessenen Werte. Dieser Unterschied ist aber sicherlich mit den verschiedenen Rauigkeiten zu erklären.

Der Vergleich aller realen Proben nach identischen Beschichtungen mit APTES ergab für die meisten Oberflächenzustände eine Aminogruppenkonzentration zwischen 0,5 und 0,55 nmol/cm<sup>2</sup> (vgl. S. 74). Ein Vergleich dieser Werte und der XPS-Ergebnisse mit Literaturdaten<sup>[145-147]</sup> zeigt recht gute Übereinstimmung und lässt auf eine Belegung mit einem dünnen Multilayer ( $n < 5$ ) mit einer Dicke kleiner 2,5 nm schließen.

Der Einfluss der oxidativen Vorbehandlung, die sich, wie bereits diskutiert, auf die Hydroxylgruppen und die Rauigkeit der Oberflächen auswirkt, auf die Konzentration der Aminogruppen nach APTES-Beschichtung soll anhand Tabelle 17 zusammengefasst werden. Für die meisten Oberflächen ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Betrachtet man beispielsweise die galvanostatisch oxidierte Vanadiumlegierung führt eine mittlere Hydroxylgruppenkonzentration und eine hohe Rauigkeit zu einer hohen Aminogruppenkonzentration. Für die potentiostatisch vorbehandelte Probe liegen alle Werte in einem mittleren Bereich. Nach nasschemischer Oxidation führt ein niedriger Hydroxylgruppengehalt und eine mittlere Rauigkeit zu einer geringen Aminogruppenkonzentration. Allerdings führt diese Betrachtung nicht in allen Fällen zu einem schlüssigem Ergebnis. Gerade im Falle der Cobaltlegierung steht die geringe Aminogruppenkonzentration in Widerspruch zum bestimmten Hydroxylgruppengehalt. Eine mögliche Ursache dafür ist neben der Oberflächenrauigkeit der hohe Nickelgehalt von etwa 30 % in der Legierung. Nach Plueddemann<sup>[148]</sup> hat das Oxid einen sehr hohen IEP von 11 und es konnten keine guten Ergebnisse mit Silanhaftvermittlern auf Nickel erreicht werden. Denkbar ist, dass der hohe Fluorgehalt aus ionischen Wechselwirkungen zwischen Trifluoressigsäure und der Oberfläche resultiert, die mit dem Haftvermittler nicht möglich sind bzw. die Aminogruppen für die Bestimmung maskieren. Ein Vergleich mit Literaturdaten ist trotz der Arbeiten von Puleo et. al.<sup>[77;78;146]</sup> auf CoCrMo wegen der unterschiedlichen Zusammensetzungen der beiden Cobaltbasislegierungen nicht möglich.

In manchen Gruppen lässt sich auch ein direkter Zusammenhang zwischen Hydroxylgruppengehalt, der Oberflächenkonzentration an Wasserstoff und der Menge an gebundenem Haftvermittler feststellen. Am deutlichsten wird das für die geätzten Titanmaterialien. Aber auch bei der Nb-Legierung wirken sich große Unterschiede im Wasserstoffgehalt auf die Anbindung des Haftvermittlers aus. Wie erwartet führte eine höhere Hydroxylgrup-

penkonzentration auch zu einer verstärkten Anbindung von Haftvermittler und damit zu einer größeren Anzahl an oberflächlich zugänglichen Aminogruppen.

**Tabelle 17 : Einfluss der Vorbehandlung auf die Aminogruppenkonzentration nach APTES-Beschichtung. (+ = hoch, o = mittel, - = niedrig)**

Oberfläche	OH-Gruppen	Rauhigkeit	NH <sub>2</sub> -Gruppen	Übereinstimmung
Ti6Al4V GS	o	+	+	+
Ti6Al4V PS	o	o	o	+
Ti6Al4V GÄ	-	o	-	+
cp-Ti GS	o	o	o	+
cp-Ti PS	+	o	o	-
cp-Ti GÄ	o	o	o	+
Ti6Al7Nb GS	-	o	-	+
Ti6Al7Nb PS	o	-	-	+
Ti6Al7Nb GÄ	-	o	-	+
316L Tantal/Tantaloxid GÄ	-	+	o	+
MP35N GÄ	o	-	--	-

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch IR-Spektroskopie und XPS eine Anbindung von APTES auf die verschiedenen Implantatmetalle bestätigt werden konnte. Durch sulpho-SDTB konnten darüber hinaus freie Aminogruppen auf den Oberflächen nachgewiesen und quantifiziert werden. Ein Einfluss der oxidativen Vorbehandlung der Titanmaterialien auf die Silananbindung konnte teilweise nachgewiesen und mit den durchgeführten Oberflächenuntersuchungen erklärt werden. Die im Vergleich höchste Aminogruppenkonzentration auf der galvanostatisch verbehandelten Ti6Al4V-Oberfläche wird durch die Hydroxylgruppenbestimmung und die XPS-Ergebnisse nicht gestützt. Sie beruht möglicherweise auf einer größeren Mikrorauhigkeit der Probe und damit einer höheren, für den Farbstoff zugänglichen Oberfläche.

Die Quantifizierung der zugänglichen, und durch IPTES eingeführten funktionellen Gruppen erfolgte mit dem selbst synthetisierten, aminofunktionellen Farbstoff DAH (vgl. S. 75). Die auf Modelloberflächen durchgeführten Untersuchungen bestätigen die bereits durch die IR-Spektroskopie beobachtete Deaktivierung der Isocyanatgruppen während der Anbindung.

Die ebenfalls mit DAH bestimmte Aktivierungsleistung der aminofunktionellen Oberflächen mit bifunktionellen Linkern zeigt, dass mit keinem der Reagenzien die mit sulpho-SDTB bestimmte Konzentration an Aminogruppen erreicht werden konnte. Der Grund dafür könnten bei den langkettigen Linkern DS3 und DSS die Bildung von „Loops“ der beiden aktiven Enden mit der Oberfläche sein. Bei allen Reagenzien besteht die Möglichkeit einer unvollständigen Reaktion mit den theoretisch vorhandenen Aminogruppen und die Hydrolyse der bereits aktivierten Gruppen durch Wasser aus der Luft oder den organischen Lösungsmitteln.

Das durch Inkubationsversuche bestimmte Verhalten der APTES-Schichten in saurem und basischem Milieu (vgl. S. 76) ist literaturkonform<sup>[149]</sup>. Unter basischen Bedingungen kommt es zu einer raschen Hydrolyse der Haftvermittlerschichten; bei niedrigen pH-Werten sind sie stabil. Unterschiede ergaben sich allerdings zu der Arbeit von Puleo<sup>[146]</sup>, der auf Ti6Al4V dicke APTES-Filme aus hochkonzentrierten, wässrigen Lösungen aufbrachte und in Zellkulturmedium auslagerte. Nach einem starken Abfall der Aminogruppenkonzentration innerhalb der ersten 15 h, kam es zu keinem gleichbleibenden Wert, wie er in dieser Arbeit bestimmt wurde, sondern zu einer kompletten Hydrolyse der Haftvermittlerschicht innerhalb von 72 h. Der Unterschied zu den hier vorgestellten Ergebnissen beruht wahrscheinlich auf einer unvollständigen Kondensation der Silanolgruppen durch die Anbindung bei Raumtemperatur und einem nachträglichen Trocknungsschritt bei nur 45 °C. Die Auslagerung bei pH=9,5 (vgl. S. 76) zeigt ebenfalls eine starke Verringerung der Aminogruppen innerhalb der ersten Stunde. Diese ist wie bei pH=7,4 auf die Hydrolyse von oberflächlich und nur schwach gebundenen Haftvermittlermolekülen zurückzuführen. Der anschließende langsame und gleichmäßige Rückgang der Aminogruppenkonzentration spricht für die schrittweise Hydrolyse eines vollständig kondensierten, dreidimensionalen Siloxannetzwerkes.

Abschließende Zytotoxizitätsuntersuchungen auf Ti6Al4V und Tantal-beschichtetem 316L ergaben im Vergleich zu nur oxidierten Oberflächen keinen nennenswerten negativen Einfluss auf Zelladhäsion und -proliferation (vgl. S. 95f).

## 2 Biologische Plattform

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der verwendeten Kollagene und der Gelatine ergab nur sehr geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen (vgl. S. 78). Das Fehlen von Cystein in allen Proben zeigt an, dass keine Spuren anderer Kollagentypen und kein Prokollagen, das Disulfidbrücken enthält, vorhanden ist. Die geringen Mengen an Thyrosin können nur aus noch vorhandenen, nicht-helikalen Telopeptiden an beiden Enden der Helix stammen.<sup>[150]</sup> Es gibt einen Zusammenhang zwischen der thermischen Stabilität eines Kollagens und seinem Gehalt an Prolin und Hydroxyprolin.<sup>[151]</sup> Dies wird besonders deutlich bei Tieren mit unterschiedlicher Körpertemperatur wie z.B. Fischen und Warmblütern.<sup>[95]</sup> Je höher die Temperaturen sind, denen ein Organismus ausgesetzt wird, desto höher muss auch seine thermische Stabilität sein. Kaltwasserfische haben demnach den geringsten Iminosäuregehalt, Warmblüter den höchsten. Die Unterschiede im Prolingehalt der hier untersuchten Säugetierkollagene sind sehr gering und beruhen auf den verschiedenen Geweben, aus denen die Kollagene gewonnen werden. Deutliche Unterschiede ergaben sich in der Anzahl der Lysin- und Hydroxylysinreste. Diese Aminosäuren sind für die natürliche intra- und intermolekulare Quervernetzung notwendig.<sup>[152]</sup> Mit zunehmender Lysin-Hydroxylierung steigt nach Notbohm<sup>[153]</sup> auch die hydrothermale Stabilität des Kollagens.

Die durchgeführte Quervernetzung der Proteine wurde anfänglich ausschließlich über die Konzentration der freien Aminogruppen verfolgt und optimiert (vgl. S. 79f). Das bestimmte optimale Massenverhältnis von 4:1 zwischen EDC und NHS wird in der Literatur von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt und angewendet.<sup>[106;113;154-156]</sup> Der Grund für den Rückgang der Quervernetzungsleistung bei zunehmender NHS-Konzentration ist eine Reaktion zwischen EDC und NHS, die eine Konkurrenzreaktion zur Aktivierung der Carbonsäuren darstellt. Hierbei reagieren 3 Moleküle NHS unter Aktivierung mit EDC zu einem Succinimidoxycarbonyl- $\beta$ -alaninhydroxysuccinimidester, der unter Kohlendioxidabspaltung zu Bernsteinsäure, Hydroxylamin und  $\beta$ -Alanin hydrolysiert.<sup>[157]</sup>

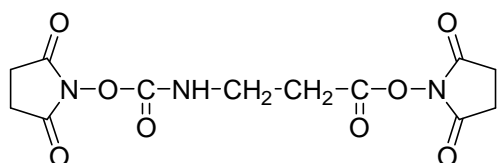


Abbildung 60: Reaktionsprodukt aus EDC und NHS

Nachdem es während der Amidbildung wieder freigesetzt wird, hat NHS in der geringeren Konzentration katalytische Wirkung auf die beabsichtigte Quervernetzung von Kollagen.

Sowohl die Konzentrations- als auch die zeitabhängige Quervernetzung der Ausgangsmaterialien zeigten einen vergleichbaren Reaktionsverlauf für die einzelnen Proteine (vgl. S. 80). Nur zwischen den fibrillären Kollagenen und den nichtfibrillären, niedriger molekularen Materialien zeigten sich Unterschiede in der minimal erreichbaren Zahl an verbleibenden Aminogruppen nach der Quervernetzung. Ursache dafür ist höchstwahrscheinlich die sterische Hinderung mancher Aminogruppen in der hochgeordneten Struktur des fibrillären Kollagens. Bei Kalbshautkollagen und Gelatine sind sie leichter zugänglich und stehen für die Aktivierung und Amidbildung zur Verfügung. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass die Anzahl an  $\epsilon$ -Aminogruppen in unquervernetztem Material abhängig von der Kollagenquelle ist. Ofner et al.<sup>[158]</sup> bestimmten  $33 \cdot 10^{-5}$  mol/g in Gelatine aus Knochen. Das entspricht 33 Aminogruppen in einem aus 1000 Aminosäuren bestehenden Kollagenmolekül. Dieser im Vergleich höchste Gehalt an Lysin und Hydroxylysin wurde durch die Aminosäurezusammensetzung bestätigt. Eine Quervernetzung mit EDC/NHS resultierte in drei verbleibenden Aminogruppen pro 1000 AS. Beide Werte sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar. Pieper et al.<sup>[159]</sup> veröffentlichten Daten für Typ I Kollagen aus bovinen Achillessehnen. In unquervernetztem Zustand wurden 33 freie Aminogruppen pro 1000 AS gefunden. Eine Quervernetzung mit 6,4 mg/ml EDC führte zu einer Verringerung auf 20 Aminogruppen. Wissink et al.<sup>[156]</sup> untersuchten ebenfalls Typ I Kollagen aus den Achillessehnen von Rindern und bestimmten 27 freie Aminogruppen in nativem Zustand und 14 nach Quervernetzung mit 8 mg/ml EDC. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen dieser Arbeit recht gut. Exakte Vergleiche sind allerdings wegen der unterschiedlichen Ausgangsmaterialien und variierender Quervernetzungsbedingungen nur schwer durchzuführen.

Entsprechendes gilt auch für die Quervernetzung mit Glutaraldehyd (vgl. S. 81). Hierbei ist noch zu beachten, dass im Vergleich zu EDC ausschließlich Aminogruppen notwendig sind, um eine neue Bindung zu knüpfen. Der verbleibende Aminogruppengehalt von ca. 5 pro 1000 AS für die drei Kollagene und 3 für Gelatine liegt in einem üblichen Bereich.<sup>[106;158;160]</sup>

Neben der Konzentration der freien Aminogruppen wurde außerdem der Einfluss der Quervernetzung auf die Schrumpfungstemperatur der Kollagene bestimmt. Unter der hydrothermalen Schrumpfung von Kollagen versteht man die dramatische Verkürzung der Fasern um etwa 80 % der ursprünglichen Länge unter Einwirkung von Wasser bei einer bestimmten Temperatur. Dies wird einer Denaturierung der helikalen Bereiche unter Aufbrechen der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zugeschrieben.<sup>[161;162]</sup> Die Temperatur, bei der dieser endotherme Prozess beginnt, wird als Schrumpfungstemperatur bezeichnet und kann mittels DSC bestimmt werden. Eine Erhöhung der Temperatur ist gleichbedeutend mit einer verbesserten Stabilität des Kollagens.<sup>[163]</sup> Nachdem für diese Messungen ein intaktes Kollagenmolekül nötig ist, können kollagenhaltige Gewebe wie z.B. Herzklappen und Sehnen, aber auch Kollagenfasern und Tropokollagen untersucht werden, Gelatine dagegen nicht. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse (vgl. S. 81) zeigen, dass durch eine Quervernetzung mit EDC/NHS oder Glutaraldehyd die Schrumpfungstemperatur im Vergleich zum nativen Zustand drastisch erhöht werden kann. Am größten ist der Unterschied beim löslichen Kalbshautkollagen, bei dem sich die Schrumpfungstemperatur um 38 °C erhöhen lässt. Für die anderen Proben lag die Erhöhung bei 25 bzw. 32 °C. Diese Werte sind vergleichbar mit Ergebnissen von quervernetztem Schafshautkollagen<sup>[164]</sup> oder Rattenschwanzkollagen.<sup>[165]</sup> Wird der Quervernetzungsgrad verringert, so sinkt auch die gemessene Schrumpfungstemperatur.

Unterschiede zwischen den einzelnen Kollagenen konnten sowohl im quervernetzten als auch im unquervernetzten Zustand gefunden werden. Am eindrucksvollsten ist der Vergleich zwischen löslichem und durch Rekonstitution erzeugtem fibrillärem Kalbshautkollagen im unquervernetzten Zustand. Hier wird die Schrumpfungstemperatur durch die höher geordnete, fibrilläre Struktur und die dadurch erzeugten zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindungen um 12 °C erhöht. Entsprechend der in den Grundlagen vorgestellten Definition müsste man beim Kalbshautkollagen besser von der Schmelz- als von Schrumpfungstemperatur sprechen. Beiden liegt aber der gleiche Effekt zu Grunde, so dass die Ergebnisse grundsätzlich vergleichbar sind. Auch die natürliche Quervernetzung hat einen großen Einfluss auf die Schrumpfungstemperatur. Sie wird sowohl durch das Alter des Tieres als auch durch die mechanische Belastung des Gewebes verstärkt. Das erklärt den Unterschied zwischen dem Kalbshautkollagen und den Kollagenen aus Achillessehnen von Rindern und Pferden. Der geringe Unterschied zwischen Pferd und Rind beruht höchstwah-

scheinlich auf dem höheren Alter der Pferde zum Zeitpunkt der Schlachtung. Die hier gefundenen Schrumpfungstemperaturen decken sich gut mit den Ergebnissen der Aminosäurezusammensetzung. Bei einem hohen künstlich erzeugten Quervernetzungsgrad sind nur noch Unterschiede zwischen den nativen fibrillären und den beiden löslichen Kalbshautkollagenen zu erkennen. Hier macht sich ebenfalls der natürliche Quervernetzungsgrad bemerkbar, der bei den hochmolekularen Innocoll-Kollagenen viel höher ist. Durch Quervernetzung mit EDC konnten höhere Schrumpfungstemperaturen erreicht werden als mit Glutaraldehyd. Dies wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[106]</sup> Die Stabilität des Kollagens wird anscheinend durch die Bildung zusätzlicher Amidbindungen, wie sie bei einer Quervernetzung mit EDC entstehen, stärker erhöht als durch die Verknüpfung der vorhandenen Aminogruppen mit, teilweise als Polymer vorliegendem, Glutaraldehyd. Außerdem zeigte sich nach der Quervernetzung mit Glutaraldehyd eine deutlich erhöhte thermische Stabilität des rekonstituierten Kalbshautkollagens im Vergleich zum nicht-fibrillären Ausgangsmaterial. Es muss also bereits eine fibrilläre Struktur vorhanden sein, um eine effektive Stabilisierung durch Glutaraldehyd zu gewährleisten.

Die Quervernetzung hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die biochemische Stabilität der Kollagenproben, die *in vitro* durch Inkubation mit bakterieller Kollagenase untersucht wurde (vgl. S. 82ff). So konnte in Einklang mit der Literatur durch Quervernetzung mit EDC die Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau für alle Kollagene verbessert werden<sup>[113;166;167]</sup>. Nur bei Gelatine zeigte sich keine Veränderung zum nativen Zustand. An den Ergebnissen lässt sich zeigen, wie stark die Stabilität vom Fibrillationsgrad des Ausgangsmaterials abhängt, der auch die Schrumpfungstemperatur bestimmt. Neben den beiden Extremen, dem Pferdekollagen, das mit der höchsten Schrumpfungstemperatur nach Quervernetzung mit 30 mg/ml EDC keinerlei Abbau mehr zeigte, und der bei jeder EDC-Konzentration vollständig abgebauten Gelatine, ist dies vor allem bei Kalbshautkollagen zu sehen. Nach einer gezielten Rekonstitution können bei einem hohen Quervernetzungsgrad nach 6 Tagen noch 60 % des ursprünglichen Kollagens nachgewiesen werden. Ohne Rekonstitution ist bereits nach 3 h bei gleicher Quervernetzung ein vollständiger Abbau zu verzeichnen. Allerdings ist aus den Daten auch ersichtlich, dass die hydrothermale Stabilität nach Quervernetzung mit 30 mg/ml EDC nicht mit der biochemischen Stabilität übereinstimmen muss. Die unterschiedlichen Resistenzen von Pferde- und Rinderkollagen bzw. der beiden Kalbshautkollagene werden nicht durch entsprechende Schrumpfungstempera-

turen bestätigt. Wahrscheinlich ist durch die hohe Quervernetzung zwar die maximale hydrothermale Stabilität der Kollagenmoleküle erreicht, aber die spezifischen Angriffsstellen der Kollagenase unterschiedlich stark blockiert. Der Unterschied zwischen dem fibrillären und nicht-fibrillären Kalbshautkollagen ist damit leicht zu verstehen, bei Rinder- und Pferdekollagen müssen dagegen geringe Unterschiede im strukturellen Aufbau für die deutlichen Unterschiede verantwortlich sein.

Die sehr gute Kollagenasestabilität aller Glutaraldehyd-quervernetzter Proben, die gerade bei den niedermolekularen Materialien beeindruckend ist und nicht im Einklang mit der Literatur steht,<sup>[112;113]</sup> hat ihre Ursache wahrscheinlich in der analytischen Methode der Kollagenrestbestimmung. So färbt der verwendete Farbstoff Sirius-Rot das eingesetzte Enzym Kollagenase ebenso wie Kollagen. Durch den Abbau der quervernetzten Proben wird eingebauter Glutaraldehyd durch Hydrolyse der Schiff-Basen wieder frei und steht für neue kovalente Bindungen zur Verfügung. Die bestimmte Proteinmenge besteht also höchstwahrscheinlich aus einer Mischung aus restlichem Kollagen und angebundener Kollagenase. Unterstützt wird diese Theorie durch den bei längeren Zeiten steigenden Kollagenrestanteil bei den beiden Kalbshautkollagenen.

Abschließend wurde noch der Einfluss der EDC-Quervernetzung auf Zelladhäsion und –proliferation von mesenchymalen Stammzellen untersucht (vgl. S. 85f). Eindeutige Unterschiede ergaben sich hier nur bei der Zelladhäsion im unquervernetzten Zustand. Dieser ist durch ein Auflösen von Kalbshautkollagen und Gelatine im 37 °C warmen Zellkulturmedium zu erklären. Sonst zeigten sich keine größeren Unterschiede mit einer Tendenz zu einer verminderten Adhäsion und Proliferation bei hohen Quervernetzungsgraden. Wissink et al.<sup>[168]</sup> zeigten auf vergleichbaren Kollagenfilmen bei zunehmendem Quervernetzungsgrad eine verringerte Zelladhäsion und eine verbesserte Zellproliferation von humanen Endothelzellen. Die auch in dieser Arbeit gefundene verringerte Zelladhäsion lässt sich durch eine zunehmende Deaktivierung der für die Zelladhäsion verantwortlichen Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) im Rahmen der Quervernetzung erklären. Die gegenteiligen Proliferationsergebnisse resultieren möglicherweise aus den unterschiedlichen Zellarten und einem längeren Versuchszeitraum, bei dem sich die höhere Stabilität der stärker quervernetzten Filme auswirkt. Die guten Ergebnisse der Glutaraldehyd-quervernetzten Proben beruhen möglicherweise auf einem zu geringen Versuchszeit-

raum. Erst mit zunehmendem Abbau der quervernetzten Proben könnte es zu einer vermehrten Freisetzung von cytotoxischem Glutaraldehyd kommen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Quervernetzung von Kollagen mit EDC und NHS anhand der Analyse der freien Aminogruppen etabliert und optimiert wurde. Durch die Quervernetzung konnten erhöhte Schrumpfungstemperaturen und eine stark verbesserte Resistenz gegenüber bakterieller Kollagenase erreicht werden. Zelladhäsion- und Proliferation wurden nur bei sehr hohen Quervernetzungsgraden vermindert.

Als ideales Beschichtungsmaterial stellte sich das Pferdekollagen heraus, welches bereits bei geringen Quervernetzungsgraden eine sehr hohe Kollagenasestabilität erreichte.

### **3 Kombination beider Plattformen**

Der letzte Teil dieser Arbeit bestand in der Kombination der bisher getrennt voneinander betrachteten Plattformen.

In ersten Versuchen zur kovalenten Anbindung von Proteinen an die aktivierten Metalloberflächen wurde das Enzym Peroxidase verwendet. In den auf Wafern durchgeführten Untersuchungen konnte sowohl auf Titan als auch auf Tantal ein Vielfaches der Proteinmenge kovalent an die Oberfläche gebunden werden, als rein adsorptiv immobilisiert wurde (vgl. S. 86f). Allerdings gibt es für die verschiedenen Linker kein einheitliches Bild. Auf Titan konnte außerdem fast die dreifache Menge an Peroxidase nachgewiesen werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde wegen der guten Ergebnisse bei Tantal und um auf organische Lösungsmittel verzichten zu können, auf das wasserlösliche DS3 als Linker zurückgegriffen. Auch die Verwendung von IPTES zeigte entgegen den bisherigen Ergebnissen eine hohe Immobilisierungsrate und wurde weiter untersucht.

Die abschließenden Immobilisierungsversuche, die mit fibrillärem Pferdekollagen durchgeführt wurden, ergaben sowohl auf den Modelloberflächen als auch auf den realen Oberflächen ein vergleichbares Bild (vgl. S. 88f). Im Vergleich zu den geätzten Oberflächen waren die immobilisierten Kollagenmengen auf APTES-beschichteten Oberflächen immer geringer. Die Ursache dafür ist in der unterschiedlichen Oberflächenladung zu suchen, die für die Metalloxydoberflächen negativ<sup>[169]</sup> und für die silanisierten Oberflächen durch die protonierten Aminogruppen positiv ist. Dies wird durch die hochaufgelösten ESCA-Daten

bestätigt und durch die Anbindung aus verdünnter Essigsäure noch verstärkt. Der Literatur zufolge hat Kollagen einen IEP von 9<sup>[170]</sup>, liegt also ebenfalls hauptsächlich positiv geladen vor. Es sind demnach vor allem elektrostatische Effekte, die für die unterschiedlichen auf den Oberflächen adsorbierten Mengen verantwortlich sind. Durch die Aktivierung mit DS3 oder die Verwendung von IPTES als Haftvermittler konnten vergleichbare Mengen an Kollagen immobilisiert werden, wie sie auch auf den unbeschichteten Oberflächen nachgewiesen wurden. Nur durch die gleichzeitige Anbindung und Quervernetzung konnte mehr Kollagen an die Oberfläche gebunden werden. Allerdings führt dieses Verfahren nicht zu einer dünnen gleichmäßigen Schicht, sondern zu einer recht unregelmäßigen, dicken Belegung. Die absolute Menge an immobilisiertem Kollagen auf den realen Proben liegt mit  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  für Tantal im gleichen Bereich wie die von Geißler et al.<sup>[139]</sup> publizierte Menge für fibrilläres Kalbshautkollagen auf Ti6Al4V. Grund für die geringere Adsorption auf den galvanostatisch geätzten Ti6Al4V-Proben sind wahrscheinlich durch Transport und Lagerung der in Dresden hergestellten Plättchen entstandene Verunreinigungen auf der Oberfläche. Die erhaltenen Proben wurden keinen weiteren Reinigungsschritten unterworfen, um die Oxidschichten nicht zu verändern.

Die großen Unterschiede zwischen der kovalenten Immobilisierung von Peroxidase und Kollagen sind mit Sicherheit in ihren stark unterschiedlichen Molekulargewichten und den damit verbundenen Löslichkeiten begründet. So lässt sich das kleine, wasserlösliche Protein Peroxidase durch die Waschschrte teilweise wieder von der Oberfläche lösen, wenn es nicht kovalent gebunden ist. Mit dem unlöslichen, fibrillären Kollagen ist das nicht möglich.

Durchgeführte Kollagenaseversuche an adsorptiv und kovalent gebundenen, quervernetzten Kollagenfilmen auf Metalloberflächen zeigten dennoch Vorteile für die kovalenten Proben (vgl. S. 90). Der sprunghafte Rückgang des adsorptiv gebundenen Kollagens auf tantalisierten Wafern ist auf einen Adhäsionsbruch zwischen Metalloberfläche und Kollagenschicht, und nicht auf einen gleichmäßigen Abbau durch das Enzym zurückzuführen.

Auf den realen Oberflächen konnte ein Zusammenhang zwischen oberflächlich verfügbaren Aminogruppen und der Stabilität der kovalent gebundenen Schicht gegenüber enzymatischer Degradation gefunden werden (vgl. S. 91). Das spricht für zusätzliche kovalente

Bindungen zwischen Metall und Kollagen, die ein Ablösen von niedermolekularen, durch den enzymatischen Abbau entstandenen, Bruchstücken von der Oberfläche verhindern.

In Auslagerungsversuchen mit kovalent und adsorptiv immobilisierten Kollagenschichten in Medium sowie in einem basischen Puffer konnten keine Unterschiede zwischen den Anbindungsarten festgestellt werden (vgl. S. 92). In allen Fällen blieb die Kollagenmenge auf der Oberfläche über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant. Eine Ablösung des Kollagens durch die Hydrolyse der darunterliegenden Haftvermittlerschicht, wie sie bei pH = 9,5 durchaus möglich gewesen wäre, fand nicht statt.

In Modellversuchen konnte durch kovalente Anbindung eine eindeutig verbesserte mechanische Haftung zwischen Metall und Kollagen nachgewiesen werden. Dies zeigte sich sowohl im trockenen als auch im feuchten Zustand (vgl. S. 93).

Als abschließende Untersuchungen wurden Zelladhäsions- und Proliferationsversuche auf unbeschichteten und kollagenbeschichteten galvanostatisch oxidierten Ti6Al4V-Plättchen sowie auf nasschemisch geätzten, tantalisierten Edelstahlplättchen durchgeführt (vgl. S. 95). Die Kollagenschichten wurden zur Stabilisierung mit einer Konzentration von 5 mg/ml EDC quervernetzt. Im Vergleich zu den unbehandelten Oberflächen konnte weder durch kovalente noch durch adsorptive Kollagenbeschichtung eine eindeutige Verbesserung der Adhäsion nach 24 h erreicht werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten von Geißler et al.<sup>[139]</sup>, die nur innerhalb der ersten Stunde Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen unbeschichteten und kollagenbeschichteten Ti6Al4V-Oberflächen nachweisen konnten. Bei der Zellproliferation nach 7 Tagen konnte auf den Tantaloberflächen eine eindeutige Verbesserung durch Beschichtung mit fibrillärem Kollagen nachgewiesen werden. Allerdings konnte kein Unterschied zwischen kovalenter und adsorptiver Immobilisierung gefunden werden. Auf den Titanlegierungsoberflächen konnte nur durch die gleichzeitige Anbindung und Quervernetzung von löslichem Kalbshautkollagen eine verbesserte Proliferation nachgewiesen werden. Es ist wahrscheinlich, dass sowohl die adsorptiv als auch kovalent durch DS3 gebundene dünne Kollagenschicht im warmen Zellkulturmedium relativ schnell von der Oberfläche gelöst wurde und sich die Ergebnisse deshalb nicht von der unbeschichteten Probe unterschieden. Nur die durch EDC angebundene Schicht hatte lange genug Bestand, um einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation zu haben.

Die im letzten Abschnitt diskutierten Ergebnisse zeigen, dass die kovalente Immobilisierung von Proteinen auf den verwendeten Implantatmetallen mit den vorgestellten Methoden möglich ist. Durch sie konnte eine verbesserte Stabilität gegenüber enzymatischem Abbau, eine erhöhte mechanische Stabilität und eine erhöhte Zellproliferation erzielt werden.

## F. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Verbesserung der Biokompatibilität von Ti6Al4V und tantalbeschichteten Stahloberflächen durch die kovalente Anbindung mit quervernetztem Kollagen. Dies sollte erreicht werden durch eine optimierte oxidative Vorbehandlung der Oberflächen, die Anbindung von Silanhaftvermittlern und die kovalente Immobilisierung von bioaktivem Kollagen mit anschließender Quervernetzung. Die Anbindung der Haftvermittler konnte hinreichend qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden. Ein Einfluss der oxidativen Vorbehandlung wurde festgestellt. Durch die Quervernetzung von Kollagen konnte eine stark verbesserte Stabilität gegenüber enzymatischer Degradation ohne negative Einflüsse auf das zelluläre Verhalten gefunden werden. Eine kovalente Bindung zwischen Protein und Implantatoberfläche konnte mit Hilfe des Enzyms Peroxidase gezeigt werden und wurde auf Kollagen übertragen. Kovalent gebundenes Kollagen zeigte im Vergleich zu rein adsorptiv gebundenen Schichten eine verbesserte enzymatische und mechanische Stabilität. Eine verbesserte Biokompatibilität, angezeigt durch eine erhöhte Zellproliferation, konnte eindeutig nur durch die Immobilisierung von Pferdekollagen auf tantalisierten Stahloberflächen nachgewiesen werden. Allerdings ergaben sich vergleichbare Ergebnisse für kovalent und adsorptiv beschichtete Implantatoberflächen. Gerade wegen der vielversprechenden Ergebnisse der auf Metalloberflächen durchgeführten Kollagenaseversuche und den mechanischen Tests könnten an dieser Stelle längerfristige *in vitro*- und *in vivo* Untersuchungen den eindeutigen Vorteil der kovalenten Anbindung noch bestätigen. Geplant sind hierbei ausführliche Differenzierungstests der mesenchymalen Stammzellen sowie eine subkutane Implantation in Nacktmäuse. In Form von Ringen ist eine anwendungsortspezifische Eignung als Wirbelsäulenimplantat im Kaninchen vorgesehen.

## G. Abkürzungsverzeichnis

---

AA	Acyl-Azid-Methode
AFM	Rasterkraftmikroskopie
APTES	Aminopropyltriethoxysilan
AS	Aminosäure
BF	Biofunktionalität
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	bovines Serum Albumin
CA	Cyanamid
CDI	Carbonyldiimidazol
cp	commercially pure
DAH	Dimethoxytritylaminohexanol
DHT	Dehydrothermalverfahren
DS3	Disulfosuccinimidylsuberat
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DSC	Disuccinimidylcarbonat
DSS	Disuccinimidylsuberat
E	Elastizitätsmodul
EDC	Ethyl-dimethylaminopropyl-carbodiimid
GA	Glutaraldehyd
GÄ	naßchemisch geätzt
GS	Galvanostatisch oxidiert
HAP	Hydroxylapaptit
HDI	Hexamethylendiisocyanat
H-MSC	humane mesenchymale Stammzellen
IPTES	Isocyanatopropyltriethoxysilan
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MTT	Methylthiazoltetrazolium
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
PMMA	Poly(methylmethacrylat)
PS	Polystyrol
PS	Potentiostatisch oxidiert
PU	Polyurethan
RA	Arithmetischer Mittenrauhwert
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
Sulfo-SDTB	Sulfo-succinimidyl-dimethoxytrityl-butytrat
TFAA	Trifluoressigsäureanhydrid
TNBS	Trinitrobenzolsulfonsäure
UV	ultraviolett
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie
$\sigma_b$	Biegefestigkeit

---

## H. Literaturverzeichnis

- [1.] D. F. Williams, *Definitions in Biomaterials. Progress in biomedical Engineering*, 4 ed. Elsevier, Amsterdam **1987**.
- [2.] *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, (Eds.: B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons) **1996**, p. 3.
- [3.] G. Heimke, in *Osseo-integrated implants*, (Ed.: G. Heimke), CRC Press, Boca Raton **1990**.
- [4.] W. J. Shen, K. C. Chung, G. J. Wang, R. E. McLaughlin, *Journal of Arthroplasty* **1992**, 7 43-49.
- [5.] F. Macionczyk, B. Gerold, R. Thull, *Surface and Coatings Technology* **2001**, 142-144 1084-1087.
- [6.] R. Lappalainen, A. Anttila, H. Heinonen, *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1998**, 118-127.
- [7.] T. Suka, *Journal of the Japanese Orthopaedic Association* **1986**, 60 637-647.
- [8.] F. Macionczyk, R. Thull, in *FORBIOMAT II 1. Statusbericht 2000 / 2001*, (Ed.: J. Probst), Bayerischer Forschungsverbund Biomaterialien, **2001**, pp. 33-42.
- [9.] R. H. Shetty, W. H. Ottersberg, in *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials, Vol. 1*, (Ed.: D. L. Wise), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong **1995**, pp. 509-540.
- [10.] H. J. Breme, J. A. Helsen, in *Metals as Biomaterials*, (Eds.: H. J. Breme, J. A. Helsen), John Wiley & Sons Ltd, Chichester **1998**, pp. 1-36.
- [11.] D. Scharnweber, in *Metals as Biomaterials*, (Eds.: H. J. Breme, J. A. Helsen), John Wiley & Sons Ltd, Chichester **1998**, pp. 101-152.
- [12.] D. I. Bardos, in *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials, Vol. 1*, (Ed.: D. L. Wise), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong **1995**, pp. 541-547.
- [13.] P. Aspenberg, S. Goodman, S. Toksvig-Larsen, L. Ryd, T. Albrektsson, *Acta Orthopaedica Scandinavica* **1992**, 63 141-145.
- [14.] H. Zitter, H. Plenk, Jr., *Journal of Biomedical Materials Research* **1987**, 21 881-896.
- [15.] S. G. Steinemann, in *Evaluation of Biomaterials*, (Eds.: G. D. Winter, J. L. Leray, K. De Groot), Wiley, London **1980**, pp. 1-34.
- [16.] S. G. Steinemann, S. M. Perren, in *Titanium Science and Technology*, (Eds.: G. Lütjering, U. Zwicker, W. Bunk), DGM, Oberursel **1985**, pp. 1327-1334.
- [17.] *Römpp Chemie Lexikon*, 9. ed (Eds.: J. Falbe, M. Regitz) Thieme, Stuttgart **1992**, pp. 4626-4628
- [18.] U. Zwicker, *Z. Metallk.* **1959**, 50 261-268.
- [19.] U. Zwicker, *Z. Metallk.* **1958**, 49 179-184.

- [20.] M. Stern, H. Wissenberg, *J. Electrochem. Soc.* **1959**, 106 755-759.
- [21.] H. Sibum, V. Güther, O. Roidl, H. U. Wolf, in *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Eds.: B. Elvers, S. Hawkins, W. Russey), VCH, Weinheim **1995**, pp. 95-122.
- [22.] R. I. Jaffee, *Titanium '80. Science and Technology.*, The Metallurgical Society of AIME, Warrendale **1980**, pp. 53-74.
- [23.] T. Ikeshima, in *Proc. 5th Int. Conf. Titanium, München 1984*, (Eds.: G. Lütjering, U. Zwicker, W. Bunk), DGM, Oberursel **1985**, p. p. 3 ff.
- [24.] J. A. Disegi, *Injury* **2000**, 31 Suppl 4 14-17.
- [25.] D. F. Williams, *Biocompatibility of Clinical Implant Materials* **1981**, 1 99-127.
- [26.] O. E. Pohler, *Injury* **2000**, 31 Suppl 4 7-13.
- [27.] D. M. Brunette, *Experimental Cell Research* **1989**, 167 203-217.
- [28.] E. T. den Brabe, H. V. Jansen, M. J. de Boer, H. J. E. Croes, M. Elwenspoek, L. A. Ginsel, J. A. Jansen, *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, 40 425-433.
- [29.] D. M. Brunette, *Experimental Cell Research* **1986**, 164 11-26.
- [30.] M. Kononen, M. Hormia, J. Kivilahti, J. Hautaniemi, I. Thesleff, *Journal of Biomedical Materials Research* **1992**, 26 1325-1341.
- [31.] T. R. Gould, L. Westbury, D. M. Brunette, *Journal of Prosthetic Dentistry* **1984**, 52 418-420.
- [32.] K. T. Bowers, J. C. Keller, B. A. Randolph, D. G. Wick, C. M. Michaels, *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* **1992**, 7 302-310.
- [33.] C. R. Howlett, M. D. Evans, W. R. Walsh, G. Johnson, J. G. Steele, *Biomaterials* **1994**, 15 213-222.
- [34.] J. Qu, B. Chehroudi, D. M. Brunette, *Oral Diseases* **1986**, 2 102-115.
- [35.] D. M. Brunette, in *Titanium in Medicine*, (Eds.: D. M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen), Springer, Berlin **2001**, pp. 485-512.
- [36.] H. Gerber, S. M. Perren, in *Evaluation of Biomaterials*, (Eds.: G. D. Winter, J. L. Leray, K. de Groot), John Wiley, Chichester **1980**, pp. 307-314.
- [37.] A. Ungersbock, O. Pohler, S. M. Perren, *Bio-medical Materials and Engineering* **1994**, 4 317-325.
- [38.] D. A. Puleo, *Biomaterials* **1996**, 17 217-222.
- [39.] K. Anderson, K. Reichert, R. Wolf, in *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Eds.: B. Elvers, S. Hawkins, W. Russey), VCH, Weinheim **1995**, pp. 71-83.
- [40.] *Römpp Chemie Lexikon*, 9. ed (Eds.: J. Falbe, M. Regitz) Thieme, Stuttgart **1992**, pp. 4453-4454
- [41.] H. Zitter, H. Plenk, Jr., *Journal of Biomedical Materials Research* **1987**, 21 881-896.
- [42.] J. van Mulder, M. Pourbaix, in *Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions*, (Ed.: M. Pourbaix), Pergamon, Oxford **1966**, pp. 251-255.

- [43.] P. Tengvall, I. Lundstrom, *Clinical Materials* **1992**, 9 115-134.
- [44.] H. Plenk Jr., in *Evaluation of Biomaterials*, (Eds.: G. D. Winter, J. L. Leray, K. de Groot), John Wiley, Chichester **1980**, pp. 399-403.
- [45.] G. Pflügler, H. Plenk Jr., N. Böhler, F. Grundschober, S. Schider, in *Biomaterials 1980*, (Eds.: G. D. Winter, D. F. Gibbons, H. Plenk Jr.), John Wiley, Chichester **1982**, pp. 45-49.
- [46.] P. Alberius, *Acta Anatomica* **1983**, 115 310-318.
- [47.] A. S. Aronson, N. Jonsson, P. Alberius, *Skeletal Radiology* **1985**, 14 207-211.
- [48.] H. Plenk Jr., G. Pflügler, S. Schider, N. Böhler, F. Grundschober, in *The cementless fixation of hip endoprostheses*, (Ed.: E. Morsher), Springer-Verlag, Berlin **1984**, pp. 174-177.
- [49.] F. Grundschober, G. Kellner, J. Eschberger, H. Plenk Jr., in *Biomaterials 1980*, (Eds.: G. D. Winter, D. F. Gibbons, H. Plenk Jr.), John Wiley, Chichester **1982**, pp. 365-370.
- [50.] S. J. Goldberg, R. P. Porper, P. Chyzus, J. M. Friedman, *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **1976**, 41 32-38.
- [51.] B. Heinrich, E. H. Pruin, J. Eschberger, G. Kellner, H. Plenk, Jr., *Österreichische Zeitschrift für Stomatologie* **1978**, 75 214-224.
- [52.] L. Rabenseifner, W. Kusswetter, P. H. Wunsch, M. Schwab, *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete* **1984**, 122 349-355.
- [53.] H. P. Tümmler, R. Thull, in *Biological and Biomechanical Performance of Biomaterials*, (Eds.: P. Christel, A. Meunier, A. J. C. Lee), Elsevier, Amsterdam **1986**, pp. 403-408.
- [54.] E. Kammler, W. Weller, W. T. Ulmer, E. Bruckmann, *Pneumologie* **1972**, 146 241-249.
- [55.] P. J. Friedman, G. M. Tisi, *Radiology* **1972**, 104 523-535.
- [56.] S. A. Wexler, B. R. Frueh, D. C. Musch, M. A. Pachtman, *Ophthalmology* **1985**, 92 671-675.
- [57.] H. J. Gerhardt, G. Muhler, D. Szdzuy, F. Biedermann, *Zentralblatt für Neurochirurgie* **1979**, 40 85-94.
- [58.] G. L. Burke, *Can.Med.Assoc.J.* **1940**, 73 125-128.
- [59.] J. Black, *Clinical Materials* **1994**, 16 167-173.
- [60.] *Römpp Chemie Lexikon*, 9. ed (Eds.: J. Falbe, M.Regitz) Thieme, Stuttgart **1990**, pp. 1088-1091.
- [61.] *Römpp Chemie Lexikon*, 9. ed (Eds.: J. Falbe, M.Regitz) Thieme, Stuttgart **1991**, pp. 4273-4274.
- [62.] J. A. Disegi, L. Eschbach, *Injury* **2000**, 31 Suppl 4 2-6.
- [63.] D. F. Williams, *Biocompatibility of Clinical Implant Materials* **1981**, 1 99-127.
- [64.] A. C. Fraker, in *Metals Handbook*, (Ed.: C. Robb), Inst. of Metals, London **1987**, pp. 1324-1335.
- [65.] P. Crook, *Advanced Materials & Processes* **1994**, 145 27-30.

- [66.] H. Sibum, V. Güther, O. Roidl, H. U. Wolf, in *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, (Eds.: B. Elvers, S. Hawkins, W. Russey), VCH, Weinheim **1995**, pp. 293-300.
- [67.] A. Marti, *Injury* **2000**, *31 Suppl 4* 18-21.
- [68.] H. A. McKellop, I. C. Clarke, *Functional Behaviour of Orthopaedic Biomaterials* **1984**, *2* 51-85.
- [69.] E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, 2 ed. Plenum Press, New York **1991**.
- [70.] R. Dhamodharan, T. J. McCarthy, *Macromolecules* **1999**, *32* 4106-4112.
- [71.] T. G. Waddell, D. E. Leyden, M. T. DeBello, *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* 5303-5307.
- [72.] F. J. Boerio, L. Armogan, S. Y. Cheng, *Journal of Colloid and Interface Science* **1980**, *73* 416-424.
- [73.] F. J. Boerio, C. A. Gosselin, R. G. Dillingham, H. W. Liu, *Journal of Adhesion* **1981**, *13* 159-176.
- [74.] F. J. Boerio, J. W. Williams, *Organic Coatings and Applied Polymer Science Proceedings* **1982**, *47* 4-8.
- [75.] M. U. De la Orden, M. C. Matias, C. G. Sanchez, J. M. Urreaga, *Spectroscopy Letters* **1999**, *32* 993-1003.
- [76.] D. A. Puleo, *Materials Research Society Symposium Proceedings* **1994**, *331* 269-274.
- [77.] D. A. Puleo, *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29* 951-957.
- [78.] D. A. Puleo, *Biomaterials* **1996**, *17* 217-222.
- [79.] D. A. Puleo, *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29* 951-957.
- [80.] D. A. Puleo, *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, *37* 222-228.
- [81.] K. Endo, *Dental Materials Journal* **1995**, *14* 199-210.
- [82.] K. Endo, *Dental Materials Journal* **1995**, *14* 185-198.
- [83.] A. El Ghannam, P. Ducheyne, I. Shapiro, R. Composto, *Key Engineering Materials* **2002**, *218-220* 245-248.
- [84.] H. S. Han, S. L. Yang, H. Y. Yeh, J. C. Lin, H. L. Wu, G. Y. Shi, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* **2001**, *12* 1075-1089.
- [85.] S. J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. Sigrist, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1997**, *8* 867-872.
- [86.] E. S. Gawalt, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, K. S. Midwood, J. E. Schwarzbauer, J. Schwartz, *Langmuir* **2003**, *19* 200-204.
- [87.] H. P. Jennissen, T. Zumbrink, M. Chatzinikolaidou, J. Steppuhn, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **1999**, *30* 838-845.
- [88.] A. Nanci, J. D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal, M. D. McKee, *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *40* 324-335.

- [89.] H. Tsuruta, H. Tsubomura, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1988**, *19* 151-162.
- [90.] S. Jo, K. Park, *Biomaterials* **2000**, *21* 605-616.
- [91.] K. Udipi, R. L. Ornberg, K. B. Thurmond, II, S. L. Settle, D. Forster, D. Riley, *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *51* 549-560.
- [92.] A. D. Cook, U. B. Pajvani, J. S. Hrkach, S. M. Cannizzaro, R. Langer, *Biomaterials* **1997**, *18* 1417-1424.
- [93.] D. C. Agathocleous, P. C. B. Page, R. Cosstick, I. J. Galpin, A. G. McLennan, M. Prescott, *Tetrahedron* **1990**, *46* 2047-2058.
- [94.] A. Avino, R. G. Garcia, F. Albericio, M. Mann, M. Wilm, G. Neubauer, R. Eritja, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1996**, *4* 1649-1658.
- [95.] L. Stryer, *Biochemie*, 4 ed. Spektrum, Heidelberg **1990**, pp. 273-286.
- [96.] M. E. Nimni, in *Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering, Part A: Materials*, Vol. 1, (Ed.: D. L. Wise), Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong **1995**, pp. 1229-1243.
- [97.] A. J. Bailey, R. G. Paul, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists* **1998**, *82* 104-110.
- [98.] D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, 1 ed. (Eds.: A. Maelike, W. Müller-Esterl) VCH, Weinheim **1992**, p. 156.
- [99.] S. T. Li, *Biotechnological Polymers* **1993**, 66-81.
- [100.] E. Khor, *Biomaterials* **1997**, *18* 95-105.
- [101.] W. A. Bubnis, C. M. Ofner, III, *Analytical Biochemistry* **1992**, *207* 129-133.
- [102.] K. S. Weadock, E. J. Miller, L. D. Bellincampi, J. P. Zawadsky, M. D. Dunn, *Journal of Biomedical Materials Research* **1995**, *29* 1373-1379.
- [103.] E. Gendler, S. Gendler, M. E. Nimni, *Journal of Biomedical Materials Research* **1984**, *18* 727-736.
- [104.] M. Moczar, J. P. Mazzucotelli, P. Bertrand, M. Ginat, J. Leandri, D. Loisanche, *ASAIO Journal* **1994**, *40* M697-M701.
- [105.] D. Wiebe, J. Megerman, G. J. L'Italien, W. M. Abbott, *Surgery* **1988**, *104* 26-33.
- [106.] P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, J. Feijen, P. Nieuwenhuis, *Journal of Biomedical Materials Research* **1994**, *28* 353-363.
- [107.] L. H. H. Olde Demink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1995**, *6* 429-434.
- [108.] W. A. Bubnis, C. M. Ofner, III, *Analytical Biochemistry* **1992**, *207* 129-133.
- [109.] G. Badura-Lotter, in *Stammzellenforschung und therapeutisches Klonen*, (Eds.: F. S. Oduncu, U. Schroth, W. Vossenkuhl), Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen **2002**, pp. 78-99.
- [110.] J. Rohwedel, in *Humane Stammzellen*, (Ed.: C. Hauskeller), Pabst Science Publishers, Lengerich **2002**, pp. 18-32.

- [111.] H. M. Beier, in *Humane Stammzellen*, (Ed.: Bundesministerium für Bildung und Forschung), Stuttgart, Schattauer **2001**, pp. 55-70.
- [112.] K. Weadock, R. M. Olson, F. H. Silver, *Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs* **1984**, *11* 293-318.
- [113.] J. M. Lee, H. H. L. Edwards, C. A. Pereira, S. I. Samii, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1996**, *7* 531-541.
- [114.] J. S. Pieper, A. Oosterhof, P. J. Dijkstra, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials* **1999**, *20* 847-858.
- [115.] L. H. H. O. Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, *17* 679-684.
- [116.] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, *17* 765-773.
- [117.] V. Charulatha, A. Rajaram, *Biomaterials* **2003**, *24* 759-767.
- [118.] M. A. Cohen Stuart, *Surfactant Science Series* **1998**, *75* 1-25.
- [119.] W. Norde, *Surfactant Science Series* **1998**, *75* 27-54.
- [120.] P. Zhuang, D. A. Butterfield, *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, *47* 1329-1342.
- [121.] H. P. Jennissen, T. Zumbink, M. Chatzinikolaidou, J. Steppuhn, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **1999**, *30* 838-845.
- [122.] M. Beier, J. D. Hoheisel, *Nucleic Acids Research* **1999**, *27* 1970-1977.
- [123.] A. Kondoh, K. Makino, T. Matsuda, *Journal of Applied Polymer Science* **1993**, *47* 1983-1988.
- [124.] S. C. Lin, F. G. Tseng, H. M. Huang, C. Y. Huang, C. C. Chieng, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371* 202-208.
- [125.] F. G. Zaugg, N. D. Spencer, P. Wagner, P. Kernen, A. Vinckier, P. Groscurth, G. Semenza, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, *10* 255-263.
- [126.] M. Darder, K. Takada, F. Pariente, E. Lorenzo, H. D. Abruna, *Analytical Chemistry* **1999**, *71* 5530-5537.
- [127.] D. Hobara, Y. Uno, T. Kakiuchi, *Physical Chemistry Chemical Physics* **2001**, *3* 3437-3441.
- [128.] J. Tiller, P. Berlin, D. Klemm, *Biotechnology and Applied Biochemistry* **1999**, *30* 155-162.
- [129.] S. V. Rao, K. W. Anderson, L. G. Bachas, *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, *65* 389-396.
- [130.] L. R. D. da Silva, Y. Gushikem, L. T. Kubota, *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **1996**, *6* 309-315.
- [131.] D. A. Lee, E. Assoku, V. Doyle, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1998**, *9* 47-51.
- [132.] M. Marotta, G. Martino, *Analytical Biochemistry* **1985**, *150* 86-90.
- [133.] H. Tullberg-Reinert, G. Jundt, *Histochemistry and Cell Biology* **1999**, *112* 271-276.

- [134.] B. J. Walsh, S. C. Thornton, R. Penny, S. N. Breit, *Analytical Biochemistry* **1992**, *203* 187-190.
- [135.] Y. Tabata, S. V. Lonikar, F. Horii, Y. Ikada, *Biomaterials* **1986**, *7* 234-238.
- [136.] T. Okada, Y. Ikada, *Journal of Biomedical Materials Research* **1992**, *26* 1569-1581.
- [137.] C. Peng, S. Tsutsumi, K. Matsumura, N. Nakajima, S. H. Hyon, *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *54* 241-246.
- [138.] D. Becker, U. Geissler, U. Hempel, S. Bierbaum, D. Scharnweber, H. Worch, K. W. Wenzel, *Journal of Biomedical Materials Research* **2002**, *59* 516-527.
- [139.] U. Geissler, U. Hempel, C. Wolf, D. Scharnweber, H. Worch, K. W. Wenzel, *Journal of Biomedical Materials Research* **2000**, *51* 752-760.
- [140.] S. Rogler, D. Scharnweber, H. Worch, *Journal of Materials Science Letters* **1999**, *18* 577-579.
- [141.] S. Rossler, D. Scharnweber, C. Wolf, H. Worch, *Journal of Adhesion Science and Technology* **2000**, *14* 453-465.
- [142.] T. M. Lee, E. Chang, C. Y. Yang, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1998**, *9* 439-448.
- [143.] C. Sittig, M. Textor, N. D. Spencer, M. Wieland, P. H. Vallotton, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1999**, *10* 35-46.
- [144.] D. Scharnweber, R. Beutner, S. Roessler, H. Worch, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2002**, *13* 1215-1220.
- [145.] S. J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer, H. Sigrist, *Langmuir* **1998**, *14* 5507-5516.
- [146.] D. A. Puleo, *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, *37* 222-228.
- [147.] S. J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer, M. Wieland, B. Keller, H. Sigrist, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1997**, *8* 867-872.
- [148.] E. P. Plueddemann, *Silane Coupling Agents*, 2 ed. Plenum Press, New York **1991**.
- [149.] Z. Xu, Q. Liu, J. A. Finch, *Applied Surface Science* **1997**, *120* 269-278.
- [150.] E. M. Brown, H. M. Farrell, Jr., R. J. Wildermuth, *Journal of Protein Chemistry* **2000**, *19* 85-92.
- [151.] J. Rosenbloom, M. Harsch, S. Jimenez, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1973**, *158* 478-484.
- [152.] K. Reiser, R. J. McCormick, R. B. Rucker, *FASEB Journal* **1992**, *6* 2439-2449.
- [153.] H. Notbohm, S. Mosler, M. Bodo, C. Yang, H. Lehmann, B. Baetge, P. K. Mueller, *Journal of Protein Chemistry* **1992**, *11* 635-643.
- [154.] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, *17* 765-773.
- [155.] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, *17* 679-684.

- [156.] M. J. B. Wissink, R. Beernink, J. S. Pieper, A. A. Poot, G. H. M. Engbers, T. Beugeling, W. G. van Aken, J. Feijen, *Biomaterials* **2001**, 22 151-163.
- [157.] H. Gross, L. Bilk, *Tetrahedron* **1968**, 24 6935-6939.
- [158.] C. M. Ofner, III, W. A. Bubnis, *Pharmaceutical Research* **1996**, 13 1821-1827.
- [159.] J. S. Pieper, P. M. van der Kraan, T. Hafmans, J. Kamp, P. Buma, J. L. C. van Susante, W. B. van den Berg, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials* **2002**, 23 3183-3192.
- [160.] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **1995**, 6 460-472.
- [161.] D. Achet, X. W. He, *Polymer* **1995**, 36 787-791.
- [162.] A. Finch, D. A. Ledward, *Biochimica et Biophysica Acta* **1972**, 278 433-439.
- [163.] W. K. Loke, E. Khor, *Biomaterials* **1995**, 16 251-258.
- [164.] F. H. Heijmen, J. S. du Pont, E. Middelkoop, R. W. Kreis, M. J. Hoekstra, *Biomaterials* **1997**, 18 749-754.
- [165.] V. Charulatha, A. Rajaram, *Biomaterials* **2003**, 24 759-767.
- [166.] K. Weadock, R. M. Olson, F. H. Silver, *Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs* **1984**, 11 293-318.
- [167.] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, 17 679-684.
- [168.] M. J. Wissink, M. J. van Luyn, R. Beernink, F. Dijk, A. A. Poot, G. H. Engbers, T. Beugeling, W. G. van Aken, J. Feijen, *Thrombosis and Haemostasis* **2000**, 84 325-331.
- [169.] S. Roessler, R. Zimmermann, D. Scharnweber, C. Werner, H. Worch, *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* **2002**, 26 387-395.
- [170.] M. Iijima, Y. Moriwaki, Y. Kuboki, *Journal of Crystal Growth* **1994**, 137 553-560.

## I. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors für Grenzflächenchemie, Frau Martina Kreuzer, Herrn Ahmed Eljaouhari und Frau Dalila Bouakline für das angenehme Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus:

Herrn Dr. R. Kujat und Herrn Dr. P. Angele für die Durchführung der Zell- und Kollagenaversuche sowie ihren Beistand in medizinischen und biologischen Fragestellungen.

Herrn Dr. D. Scharnweber für die Bereitstellung der elektrochemisch vorbehandelten Titanoberflächen sowie die Organisation der Kernreaktionsanalysen.

Herrn Dr. F. Macionczyk für die Beschichtung der Edelstahloberflächen mit Tantal bzw. Tantaloxid.

Herrn Dr. H. Wendt und der Firma Infineon für die zur Verfügung gestellten Wafer.

Herrn Dr. J. Vancea für die Durchführung der XPS-Untersuchungen.

Frau Dr. E. Schnell für die Durchführung der AFM-Aufnahmen.

Herrn H. Berghausen für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzungen.

Frau H. Preuschl für die Bestimmung der Oberflächenrauigkeiten.

Herrn Martin Brandl, Herrn Albert Brennauer, Herrn Andreas Köllnberger, Herrn Heiko Werner und Herrn Christian Zettler für ihre Freundschaft während des Studiums und hofentlich darüber hinaus.

Meiner Freundin Angelika für ihre Liebe und ihren Beistand.

Meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung im Laufe meiner universitären Ausbildung.

## **Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Arbeit selbständig angefertigt und nur die im Literaturverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die elektrochemisch oxidierten Titanoberflächen sowie die Ergebnisse der Kernreaktionsanalysen wurden mir vom Institut für Werkstoffwissenschaft der Universität Dresden zur Verfügung gestellt.

Die Beschichtung der Edelstahloberflächen mit Tantal und Tantaloxid erfolgte am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe in der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg.

Die Kollagenase- und Zellversuche wurden in der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt.