

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Kopf- und Neurozentrum / Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie

Kommissarischer Klinikdirektor: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent.

Henning Hanken

## **Photofunktionalisation und Oberflächenplasmaaktivierung dentaler Titanimplantate *in vitro***

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Oliver Heinrich

aus Kiel

Hamburg 2017

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.12.2017**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Ralf Smeets**

**Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Petra Schmage**

# Inhaltsverzeichnis

|           |   |          |
|-----------|---|----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b> |
| 1.1.      | Dentale Implantate  | 1        |
| 1.2       | Geschichte  | 1        |
| 1.3.      | Implantataufbau   | 3        |
| 1.3.1.    | Allgemeiner Aufbau  | 3        |
| 1.3.2.    | Implantatform   | 3        |
| 1.3.3.    | Implantatlängen und –durchmesser  | 4        |
| 1.4.      | Titan als Implantatmaterial   | 4        |
| 1.5.      | Oberflächendesign   | 5        |
| 1.5.1.    | Titan-Plasmaspritzen (TPS)  | 5        |
| 1.5.2.    | Sandstrahlen ( <i>Sand-Blasting</i> )   | 6        |
| 1.5.3.    | Säureätzen ( <i>Acid-Etching</i> )  | 6        |
| 1.5.4.    | Sandstrahlen und Säureätzen ( <i>Sand-Blasting</i> und <i>Acid-Etching</i> )                          | 7        |
| 1.5.5.    | Sandstrahlen und Säureätzen ( <i>Sand-Blasting</i> und <i>Acid-Etching</i> ) mit<br>Hydrophilisierung | 7        |
| 1.5.6.    | Anodische Oxidation   | 7        |
| 1.5.7.    | Lasersinterung  | 8        |
| 1.6.      | Knochenqualität   | 8        |
| 1.7.      | Knochenheilung (primär/sekundär)  | 9        |
| 1.8.      | Implantateinheilung   | 10       |
| 1.9.      | Implantationsverfahren  | 11       |
| 1.10.     | Osseointegration  | 13       |
| 1.10.1.   | Auswirkungen des Implantatoberflächendesigns auf die Osseointegration                                 | 14       |
| 1.10.2.   | Einfluss von Risikofaktoren auf die Osseointegration  | 20       |
| 1.11.     | UV-Photofunktionalisation   | 20       |
| 1.11.1.   | Einfluss der UV-Photofunktionalisation auf Titanoberflächen, Grundlagen                               | 20       |
| 1.11.2.   | Wirkungen <i>in vitro</i>   | 21       |
| 1.11.3.   | Wirkungen <i>in vivo</i> und am Menschen  | 22       |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 1.12.     | Kaltplasma-Oberflächenaktivierung   | 23        |
| 1.12.1.   | Einfluss der Kaltplasma-Oberflächenaktivierung auf Titanoberflächen,<br>Grundlagen              | 23        |
| 1.12.2.   | Wirkungen <i>in vitro</i>   | 23        |
| 1.12.3.   | Wirkungen <i>in vivo</i>  | 24        |
| <b>2.</b> | <b>Ziele und Arbeitshypothesen vorliegender Studie</b>  | <b>25</b> |
| <b>3.</b> | <b>Material und Methoden</b>  | <b>26</b> |
| 3.1.      | Geräte  | 26        |
| 3.2.      | Reagenzien  | 26        |
| 3.3.      | Zellen  | 27        |
| 3.4.      | Materialien   | 27        |
| 3.5.      | Probekörper   | 28        |
| 3.6.      | Grundlagenuntersuchung  | 29        |
| 3.6.1.    | XPS-Analyse   | 29        |
| 3.6.2.    | Elektronenmikroskopie und Konfokalmikroskopie   | 32        |
| 3.6.3.    | Kontaktwinkelmessung  | 34        |
| 3.7.      | <i>in-vitro</i> : Kultivierung muriner immortalisierter Präosteoblasten<br>(Zelllinie MC3T3-E1) | 37        |
| 3.8.      | <i>in-vitro</i> : Assays mit der Zellkultur   | 39        |
| 3.8.1.    | LDS: Morphologie, Zellzahl (Attachment)   | 39        |
| 3.8.2.    | BrdU: Proliferation   | 41        |
| 3.8.3.    | XTT: Viabilität   | 42        |
| 3.8.4.    | LDH: Zytotoxizität  | 43        |
| 3.9.      | Ablauf der <i>in-vitro</i> Untersuchungen   | 44        |
| 3.10.     | Statistische Analyse  | 48        |
| <b>4.</b> | <b>Ergebnisse</b>   | <b>49</b> |
| 4.1.      | Ergebnisse der Grundlagenuntersuchung   | 49        |
| 4.1.1.    | Oberflächenchemie (XPS)   | 49        |
| 4.1.2.    | Elektronenmikroskopie und Rauheitsanalyse   | 54        |
| 4.1.3.    | Kontaktwinkelmessung  | 64        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 4.2.       | Ergebnisse der Zellkultur  | 69         |
| 4.2.1.     | LDS (Zellzahl und Morphologie)                                   | 69         |
| 4.2.2.     | BrdU   | 74         |
| 4.2.3.     | XTT  | 77         |
| 4.2.4.     | LDH  | 79         |
| <b>5.</b>  | <b>Diskussion</b>  | <b>81</b>  |
| 5.1.       | Einordnung der Ergebnisse in den derzeitigen Stand der Forschung | 81         |
| 5.1.1.     | Oberflächenplasmaaktivierung                                     | 82         |
| 5.1.2.     | UV- Photofunktionalisation                                       | 84         |
| 5.1.3.     | Titanproben  | 86         |
| 5.1.4.     | Zellen   | 87         |
| 5.2.       | Diskussion der Ergebnisse  | 88         |
| 5.2.1.     | Oberflächenchemie  | 88         |
| 5.2.2.     | Oberflächentopographie / Rauheit                                 | 93         |
| 5.2.3.     | Oberflächenenergie und Kontaktwinkel                             | 96         |
| 5.2.4.     | Zellzahl und Morphologie   | 99         |
| 5.2.5.     | Proliferation  | 102        |
| 5.2.6.     | Viabilität   | 104        |
| 5.2.7.     | Zytotoxizität  | 105        |
| <b>6.</b>  | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>107</b> |
| <b>7.</b>  | <b>Summary</b>   | <b>108</b> |
| <b>8.</b>  | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                     | <b>109</b> |
| <b>9.</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>                                      | <b>111</b> |
| <b>10.</b> | <b>Danksagung</b>  | <b>128</b> |
| <b>11.</b> | <b>Lebenslauf</b>  | <b>129</b> |
| <b>12.</b> | <b>Eidesstattliche Versicherung</b>                              | <b>130</b> |

# **1. Einleitung**

## **1.1. Dentale Implantate**

Dentale Implantate sind ein mechanisch hergestellter Ersatz für eine fehlende Zahnwurzel. Diese Wurzelduplikate sind körperfremdes Material aus Zirkoniumdioxid oder Titan, welches möglichst permanent im Körper des Patienten bleiben soll. Mit dem auf ihnen abgestützten Aufbau, der einen einzelnen Zahn ersetzt oder eine größere Zahnlücke mit einer Brücke schließt, wird den Kaubelastungen standgehalten und ein festsitzend oder herausnehmbarer Zahnersatz hergestellt. Auch völlig zahnlose Kiefer können versorgt werden (Bundeszahnärztekammer und Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde 2008). Heutzutage werden laut der Deutschen Gesellschaft für Implantologie (DGI) allein in Deutschland über eine Millionen Implantate pro Jahr inseriert (Deutsche Gesellschaft für Implantologie). Die Erfolgsraten liegen bei über 96% nach 2,5 Jahren (Funato et al. 2013). Hierfür sind nicht nur die Beschaffenheit des Implantats und die gewählte Suprastruktur sowie das Knochenangebot und die Knochenqualität Voraussetzungen, sondern auch das Implantationsverfahren des behandelnden Zahnarztes, zu dem auch Okklusions-, Hygiene- und Nachsorgekonzept gehören (Adell et al. 1981, Meredith 1998). Heutzutage stehen dem Behandler hervorragende Hilfsmittel für die individuelle Fallplanung zur Verfügung. Die digitale Volumentomographie mit anschließender Softwarebearbeitung ermöglicht als Beispiel eine simulierte dreidimensionale Positionierung des Implantats. Dabei können auch die anatomischen Strukturen und die Knochenqualität beurteilt werden (Nickenig und Spiekermann 2006). Auch mit dem stetig steigenden Anspruchsverhalten der Patienten, hervorragende ästhetische Ergebnisse zu erhalten, wird diese Form des Zahnersatzes immer mehr an Bedeutung gewinnen.

## **1.2. Geschichte**

Der Ursprung dentaler Implantate geht tausende von Jahren zurück. Dies belegt ein Ausgrabungsfund eines Schädels aus Honduras, bei dem ersetzte Unterkieferfrontzähne sichergestellt werden konnten. Der Zahnarzt *Amadeo Bobbio* konnte 1972 radiologisch nachweisen, dass diese Ersatzzähne aus Elfenbein der Maya zu Lebzeiten inseriert worden waren, da sie osseointegriert waren (Bobbio 1972). Zu Anfang des 19. Jahrhunderts rückten überwiegend alloplastische (Blei, Silber, Gold, Platin, Kautschuk, Porzellan), wurzelanalog geformte Implantatkörper in den Vordergrund, die in Extraktionsalveolen eingebracht wurden (Berry 1988). Zum Ende des 19. Jahrhunderts

wurde erstmals, auch auf Grund der Entwicklung von Lokalanästhetika, das Implantatbett durch Bohrungen chirurgisch aufbereitet. Der hohen Misserfolgsrate folgten dann viele einzelne Schritte der Verbesserung bis zur modernen zahnärztlichen Implantologie. Ab 1895 wurde die implantologische Nachkontrolle durch die Entdeckung der Röntgenstrahlen möglich und 1939 wick *Dr. Strock* mit seinem neuen Implantatdesign, welches eine Art Gewinde aufwies, von der gängigen Form der Zahnwurzel ab. Erstmals nutzte er rostfreie holzschraubenähnliche Implantate aus der Chrom-Kobalt-Molybdän-Legierung „Vitallium“ (Strock 1939). Seine Idee wurde von *Formiggini* 1958 über Heliokollidalschrauben aus Tantal bis hin zu den 1962 von *Chercheve* verbesserten Doppelhelixhohlschrauben überarbeitet (Watzek und Blahout 1993). 1960 stellte *Joachim Weiskopf* mit einer retrospektiven Studie klar, dass die großen Nachteile, wie die Zerstörung des Prothesenlagers durch periimplantäre, entzündliche Veränderungen der 1937 von *Müller* eingeführten subperiostalen Gerüste, den kurzen therapeutischen Nutzen nicht rechtfertigen (Mitteldeutsche Vereinigung für Zahnärztliche Implantologie). Seit 1960 wandelte sich das Verständnis, dass Edelmetalle als Material das Mittel der Wahl seien. Wegen ihrer guten Materialeigenschaften und der Biokompatibilität und der damit verbundenen Studienerfolge rückten Keramik (Aluminiumoxidkeramik) und Titan immer mehr in den Vordergrund (Schnutenhaus 2011). 1962 sprach sich *Scialom* für Nadelimplantate aus Tantal aus, einzeln oder in Reihe gesetzt als Nadelstraße wie es *Pruin* 1971 förderte (Pruin 1980). 1966 folgten auch Blattimplantate aus Titan von *Linkow*. Sie verteilten die Kaukräfte als Extensionsimplantate auf ein ausgedehntes Knochenareal, was besonders bei kompromittierten Knochenverhältnissen günstig war (Linkow 1975). Heutzutage sind die mit *Linkow* verbundene fibroossäre Einscheidung und die invasive Implantatbettpräparation durch die Osseointegration und die fortgeschrittenen Möglichkeiten der Knochenaugmentation jedoch obsolet. Während *Branemark* 1969 den Vorgang der ossären Einheilung prägte, entwickelte sich die Implantologie zu einer weit verbreiteten Therapieform. Er implantierte erstmals schraubenförmige Implantate aus reinem Titan, welche während der Einheilphase nicht belastet wurden (Branemark 1985). Die Entwicklung ging 1971 mit schraubenartigen Titanimplantaten von *Heinrich* weiter (Müller 1980). Des Weiteren wurde deutlich, dass Titanimplantate mit rauen Oberflächen Implantaten mit glatteren Oberflächen überlegen sind (Bowers et al. 1992). 1972 zeigten Aluminiumoxidkeramiken erstmals gute Ergebnisse bei der Einheilung, die Frakturanfälligkeit wurde jedoch ebenfalls dokumentiert (Haubenreich et al. 2005). Zirkoniumdioxidkeramiken haben in der heutigen Zeit neben den reinen Titanlegierungen wieder an Bedeutung als Implantatmaterialien gewonnen.

### **1.3. Implantataufbau**

#### **1.3.1. Allgemeiner Aufbau**

Heute gängige mehrteilige dentale Implantatsysteme setzen sich aus Implantatbasis, einem Abutment und der Suprakonstruktion zusammen. Neben den gängigen zweiteiligen Implantatmodellen (das Abutment wird mit der Basis verbunden), gibt es auch einteilige Implantate (die Basis und das Abutment sind zusammenhängend) (Hahn 2005).

Individuell und vom jeweiligen Hersteller abhängig sind die Konizität und die Art des Gewindes. Davon hängt auch die Insertionstechnik ab. Das Material der Wahl bleibt immer noch Titan, auch wenn Zirkoniumdioxid-Implantate auf dem Markt sind. Angepasst an das Implantat und den jeweiligen Zahnersatz gibt es verschiedenste Abutments. So sind verschieden abgewinkelte Abutments, Locatoren, Kugelpopfattachements, Druckknöpfe und Magneten für Steg- und Brückenkonstruktionen oder Vollprothesen gängige Möglichkeiten, um eine Suprakonstruktion zu verankern.

#### **1.3.2. Implantatform**

Aufbauend auf der oben beschriebenen historischen Entwicklung sind moderne Implantate in der Regel schraubenförmig und zylindrisch mit parallelen Wänden oder konisch wie es die natürliche Zahnwurzelform vorgibt. Die zylindrischen Implantate erreichen ihre Primärstabilität, sie bezeichnet die Festigkeit des Implantats im Knochen direkt nach der Insertion, ohne dass Heilungsvorgänge stattgefunden haben (Laxman und Amreena 2012) vgl. Kapitel 2.1., durch eine Klemmpassung, die auf der Basis eines kleiner dimensionierten Implantatbetts beruht (Läkamp 2006). Die schraubenförmigen Implantate erreichen ihre Primärstabilität durch das Eindrehen in passgenaue Implantatlager (Läkamp 2006). Heutige Unterschiede sind eher gering und beziehen sich auf Aspekte wie die Gewindegeometrie und leichte Abweichungen in den Konizitäten. Sich verjüngende Schraubenimplantate verteilen okklusal angreifende Kräfte besser auf angrenzenden Knochen als zylindrische Schraubentypen (Glauser et al. 2004). Auf Grund der Ähnlichkeit der anatomischen Wurzelform zum Implantat ist die Knochenperforation weniger wahrscheinlich (Garber et al. 2001).

### **1.3.3. Implantatlängen und –durchmesser**

Mittlere Implantatlängen liegen zwischen 9-13mm. Unter 8mm spricht man von kurzen und bei mehr als 13mm von langen Implantaten (Olate et al. 2010). Verschiedene Studien zeigen keinen signifikanten Zusammenhang bezogen auf das Überleben rauer Implantate in Abhängigkeit auf die Implantatlänge (Kotsovilis et al. 2009). Sie sollte so lang wie möglich unter Schonung der anatomischen Strukturen (Knochenangebot / Unterkiefernerve) und unter Einhaltung der vorgegebenen Abstände gewählt werden. Die okklusale Kraftverteilung auf kurze Implantate ist nicht gleichmäßig auf die Oberfläche verteilt, sondern auf den krestalen kortikalen Teil konzentriert und kurze Implantate weisen bei vergleichbaren Überlebensraten im Vergleich mit Implantaten mittlerer Länge mehr Mikromobilität auf (Pierrisnard et al. 2003, Lahrach 2014). Heutzutage gängige Implantatdurchmesser liegen zwischen 3 und 7mm, im Mittel bei 3,5-4,2mm und werden wie die Länge durch chirurgische, prothetische und ästhetische Aspekte bestimmt. Mit dem Durchmesser steigt die Kraftverteilungsfläche auf den Knochen, was Kraftspitzen minimiert (Ivanoff et al. 1997). Die Überlebensrate der Implantate korreliert nicht mit ihrem Durchmesser (Renouard und Nisand 2006).

### **1.4. Titan als Implantatmaterial**

Gängige Dentalimplantate bestehen heutzutage aus Reintitan cp Ti oder der Titanlegierung Ti6Al4V. Nach der *American Society for Testing and Materials* (ASTM) wird die Gruppe des Reintitans cp Ti in Grade 1-4, welche die gleichen interstitiellen chemischen Komponenten (O, C, N, Fe) in ansteigender prozentualer Menge enthalten, und in Grad 5 für Ti6Al4V, unterteilt. Die Legierung enthält 6% Aluminium und 4% Vanadium. Im Allgemeinen steigen die mechanischen und physikalischen Eigenschaften von Grad 1 bis Grad 5, je höher jedoch die Festigkeit desto niedriger die Bruchdehnungsgrenze. Grad 2 wird hauptsächlich in der Dentalimplantatindustrie verwendet (Elias et al. 2008).

*Rao et al.* kamen zu dem Schluss, dass freigesetzte Aluminiumionen langfristig Alzheimer verursachen könnten und *Steinemann* erklärte, dass eine mögliche Zytotoxizität und unerwünschte Gewebereaktionen durch Vanadium aus Ti6Al4V resultieren könnten (Steinemann 1980, Rao et al. 1996). Die ionisierende Wirkung der Legierungszusätze führte im Tierversuch mit Minischweinen zu einer verzögerten Osseointegration (Saulacic et al. 2012). Für die Knochenheilung ist der große Unterschied in der Steifheit zwischen dem Titanimplantat (Young-Modul von 103-120 GPa) und dem Knochen (10- 30 GPa)

eher schlecht (Elias et al. 2008). Dennoch ist ihr Elastizitätsmodul (E-Modul) dem Knochen näher als jedes andere Implantatmaterial. Nur das E-Modul von reinem Titan ist noch ähnlicher (Niinomi 1998). Dies ist wiederum förderlich, da es an der Knochen-Implantat-Grenzfläche zu einer günstigeren Spannungsverteilung führt (Bidez und Misch 1992).

Die mechanische Stabilität von Titanimplantaten kann durch den Zusatz von Zirkon erhöht werden. *In vitro* wurde für Titan-Zirkon-Legierungen eine gute Biokompatibilität und *in vivo* eine verbesserte Osseointegration nachgewiesen (Assis et al. 2005, Gottlow et al. 2012).

## **1.5. Oberflächendesign**

Die Oberflächenrauheit wird in Makro-, Mikro- und Nano-Rauheit unterteilt. Die primäre Implantat- und die Langzeitstabilität kann unter Verwendung von Makrorauheit erhöht werden, indem sich das Implantat mit dem umgebenden Knochen verblockt (Barfeie et al. 2015). Die Makrorauheit bezeichnet den Millimeterbereich bis zu 10 $\mu$ m und wird durch Gegebenheiten wie das Gewinde oder auch die makroskopische Oberflächenbearbeitung hergestellt. Mit steigender Makrorauheit kann jedoch das Periimplantitisrisiko steigen und es kann einen Übertritt von Ionen bewirken (Becker et al. 2000). Eine moderate Rauheit von 1-2 $\mu$ m kann dieses Risiko eingrenzen (Albrektsson und Wennerberg 2005). Die Mikrorauheit entspricht der Größenordnung von 1 bis 10 $\mu$ m. Eine Weiterentwicklung stellt die Nano-Technologie dar, die sich in einem Bereich von 1 bis 100nm bewegt. Eine Vielzahl von Techniken wurde verwendet, um diese Rauheiten zu erzeugen. Die Titanplasmabestrahlung, das Bestrahlen mit Keramikpartikeln, das Säureätzen, Korundstrahlen, Kombinationen aus den beiden vorigen Techniken, und die Anodisation sind Beispiele (Le Guehennec et al. 2007). Neben den subtraktiven Verfahren werden auch additive Verfahren wie Plasma-, Titan- oder Hydroxylapatitbeschichtungen angewandt. Chemische Rückstände und Kontaminationen durch Rückstände aus dem Bearbeitungsprozess auf der Implantatoberfläche beeinträchtigen die Osseointegration (Massaro et al. 2002).

### **1.5.1. Titan-Plasmaspritzen (TPS)**

Beim Titan-Plasmaspritzen (TPS) wird Titan-Pulver bei hoher Temperatur in einen Plasmabrenner eingeleitet. Hier kondensieren und verschmelzen die Titanpartikel auf der Oberfläche der Implantate. Es bildet sich ein Film, der 40-50 $\mu$ m dick sein muss, um

einheitlich zu sein. Die sich ergebende TPS Beschichtung hat eine durchschnittliche Rauheit von ca.  $7\mu\text{m}$  (Le Guehennec et al. 2007). In einer präklinischen Studie war der prozentuale Knochen / Implantat-Kontakt für die Implantate mit TPS-Oberflächen im Vergleich mit plasmagespritzten HA beschichteten Implantaten schlechter (Taba Junior et al. 2003).

### **1.5.2. Sandstrahlen (*Sand-Blasting*)**

Weitere Möglichkeiten der Oberflächenbearbeitung (Aufrauung) der Titanimplantate besteht darin, sie mit Partikeln, welche über Druckluft beschleunigt werden und somit hohe Geschwindigkeiten erreichen, zu bestrahlen. Es handelt sich um Partikel, die je nach Größe unterschiedliche Oberflächenrauheiten hinterlassen (Rosa et al. 2012). Beispielhaft sind Aluminiumoxid- und Titanoxid- und Calciumphosphat-Teilchen wie HA (Kim et al. 2008). Trotz verschiedenster Reinigungsverfahren besteht die Möglichkeit, dass z.B.  $\text{Al}_2\text{O}_3$  als Verunreinigung auf der Oberfläche verbleibt, was die Osseointegration negativ beeinflussen kann (Aparicio et al. 2003).  $\text{Al}_2\text{O}_3$  und  $\text{TiO}_2$  erhöhen die mechanische Stabilität, aber nicht die Osseointegration (Abrón et al. 2001). Der durch resorbierbare osteokonduktive Calciumphosphate wie HA, wodurch eine reine Titanoberfläche entsteht, erreichte Knochen-Implantat-Kontakt (KIK), ist mit den anderen Bestrahlungsarten vergleichbar (Müller et al. 2003).

### **1.5.3. Säureätzen (*Acid-Etching*)**

Es ist auch möglich Titanimplantate mit Säuren (z.B.  $\text{HCl}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  und  $\text{HF}$ ) aufzurauen. Säureätzen erzeugt Mikrorauheiten im Bereich von  $0,5\text{-}2\mu\text{m}$ . Auch das dual acid-etching, bei dem die Implantate für mehrere Minuten in einer Mischung aus konzentriertem Chlorwasserstoff und Schwefelsäure oberhalb von  $100^\circ\text{Celsius}$  erhitzt werden, ist eine Option, Mikrorauheiten zu erzeugen (Massaro et al. 2002, Zinger et al. 2004). Beide Varianten können durch die Oberflächenvergrößerung die Osseointegration erhöhen. Das Fibrin-Gerüst kann möglicherweise besser an doppelt geätzte Implantatoberflächen binden und nachfolgend die Anhaftung von osteogenen Zellen und somit die Knochenapposition fördern (Davies 1998, Trisi et al. 2002).

#### **1.5.4. Sandstrahlen und Säureätzen (Sand-Blasting und Acid-Etching)**

Durch das Sandstrahlen und Ätzen von Implantatoberflächen entsteht eine Schicht Titandihydrid ( $\text{TiH}_2$ ) welche zwischen Metall und Oberflächenoxidschicht liegt und es wird eine Rauheit  $S_a$  von 1-2 $\mu\text{m}$  erzeugt. Das Abstrahlen induziert eine Rauheitssteigerung und eine kristalline Veränderung der Oberfläche des Titans. Durch den Ätzbvorgang werden kristalline Veränderungen weitergeführt. Es kommt zur Transformation von Ti zu  $\text{TiH}_2$  an der Oberfläche. Sobald das Implantat nicht mehr durch das Vakuum der Produktion oder der Verpackung geschützt ist, bildet sich eine dünne native Oxidschicht welche die Titandihydridschicht überlagert und stabilisiert (Conforto et al. 2004). Eine durch diese Oberfläche bedingte höhere lokale Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der primären Heilungsphase, könnten ein Faktor für eine bessere und schnellere Einheilung sein (Kieswetter et al. 1996).

#### **1.5.5. Sandstrahlen und Säureätzen (Sand-Blasting, Acid-Etching) mit Hydrophilisierung**

Eine hydrophile Oberfläche kann erzeugt werden, indem das sandgestrahlte und geätzte Implantat in einer Stickstoffatmosphäre gespült und anschließend bis zur Insertion in Kochsalzlösung gelagert wird (Rupp 2006). SLActive® Implantate (Straumann®, 4052 Basel, Schweiz) erreichen *in-vivo* bereits nach 6 Wochen Stabilität im Knochen und die Heilungszeit ist im Vergleich zu den nicht hydrophilen Implantatoberflächen wie SLA® von 12 auf 6 Wochen reduziert (Buser et al. 2004, Schwarz et al. 2007). Aus einem Tierversuch im Schweinmodell ging hervor, dass hydrophile Implantatoberflächen den Knochen / Implantat-Kontakt im Vergleich zu sandgestrahlten und geätzten Implantaten noch verbessern können (Trisi et al. 2002). *In-vitro* kommt es zudem zu einer höheren Osteoblastenaktivität (Zhao et al. 2005).

#### **1.5.6. Anodische Oxidation**

Mikro- oder nanoporöse Oberflächen können durch *Micro-Arc Oxidation* (MAO) oder auch durch die potentiostatische oder galvanostatische anodische Oxidation von Titan in Säuren ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ , HF) unter Anlegen einer bestimmten Stromstärke und Spannung hergestellt werden. Dabei hängt die erzielte Rauheit von den verschiedenen Parametern, wie Stromstärke, Spannung, der Konzentration der Säuren, Elektrolyttemperatur etc. ab. Entlang des Ionenflusses wird die Oxidschicht auf dem

Titanium in Bereichen verdickt, in anderen Bereichen wird die Oxidschicht auch aufgelöst und es entstehen Mikro- und Nanorauheiten. Dabei verändert sich auch die Kristallinität der Titanoxidschicht (Jackson und Ahmed 2007). Histomorphometrische und histologische Untersuchungen ergaben, dass die frühe Osseointegration nach anodischer Oxidation von Implantatplättchen aus Titan im Vergleich zur unbehandelten Versuchsgruppe besser war (Sharma et al. 2016). An Stellen der Oxidschicht, die nach der MAO Calcium-Ionen enthält, erhöht sich neben der Adhäsion der Osteoblasten auch ihre Viabilität und metabolische Aktivität (Ribeiro et al. 2015).

### **1.5.7. Lasersinterung**

Mit dem additiven Verfahren „*Direct metal laser sintering*“ (DMLS) lassen sich individuelle Implantate aus Ti-6Al-4V mit Oberflächen im Mikro- und Nanometerbereich herstellen, indem Titanpuderschichten reproduzierbarer Dicke, Schicht für Schicht, auf der Basis eines virtuellen Modells, von einem Laser zusammenschmolzen und miteinander verbunden werden (Hollander et al. 2006). Im Vergleich von unbehandelten DMLS Implantaten mit sandgestrahlten und geätzten DMLS Implantaten, war die Knochenregeneration bei letzteren *in vivo* besser (de Wild et al. 2013). Im *In-vivo*-Versuch im Schafmodell wurde nach 2 und 8 Wochen kein signifikanter Unterschied im KIK zwischen maschinieren, sandgestrahlt und geätzten und DMLS Implantaten festgestellt (Stübinger et al. 2013). Die Osteoblastendifferenzierung und die Produktion von knochenmorphogenetischen Proteinen waren auf DMLS Proben höher als auf geätzten Proben (Mangano et al. 2010).

Es lassen sich auch gezielt bestimmte Bereiche eines Implantats mit einem gebündelten Laserstrahl einer Wellenlänge bearbeiten. Diese saubere Methode erschafft Oberflächen im Nanometerbereich und vergrößert die Oberflächenoxidschicht. Die Kombination von Oberflächenbereichen im Mikro- und Nanometerbereich kann zu einer höheren Zellviabilität und einer geringeren anfänglichen Entzündungsreaktion führen (Palmquist et al. 2011, Palmquist et al. 2013).

## **1.6. Knochenqualität**

Die Klassifikation der Knochenqualität erfolgt auch heutzutage noch klassischerweise nach *Lekholm & Zarb (1985)*. Hier werden 4 Klassen unterschieden. Von Klasse 1 mit fast

ausschließlich homogener Kompakta, über die Klassen 2 und 3 mit dünner werdender Kompakta und engmaschiger Spongiosa, bis zu Klasse 4 mit dünner Kompakta und weitmaschiger Spongiosa. Des Weiteren existiert die Klassifikation in Dichteklassen nach *Misch und Judy (1990)*. Dieser Einteilung nach ist eine bestimmte Knochenstruktur für bestimmte Kieferbereiche typisch. Die Dichteklasse 1 mit dichter Kompakta ist repräsentativ für den anterioren Unterkiefer. Die Dichteklasse 2 mit dichter poröser Kompakta und engmaschiger Spongiosa ist im anterioren Oberkiefer (OK) und im posterioren Unterkiefer (UK) zu finden. Die Dichteklasse 3 mit dünner poröser Kompakta und weitmaschiger Spongiosa ist im posterioren OK und ebenfalls im posterioren UK zu finden. Die freie trabekuläre Spongiosa, welche typisch für den posterioren OK ist, steht für die Dichteklasse 4. *Truhlar et al.* bestätigen dies und fügen hinzu, dass die Klassen 1 und 4 nach der *Lekholm & Zarb*-Klassifikation wesentlich seltener vorkommen als 2 und 3 (*Truhlar et al. 1997*). Nichtsdestotrotz vermag diese Klassifikation lediglich einen Ausblick zu geben. Knochendichteverhältnisse sind je nach Patientensituation individuell (*Truhlar et al. 1997*). Die Unterschiede in der Knochendichte bedeuten sowohl Vor- als auch Nachteile in Bezug auf die Osseointegration eines Implantats. Eine hohe Dichte führt bei der Insertion zügig zu einer guten Primärstabilität und einer großen Osseointegrationsfläche auf Kosten einer verminderten enossalen Gefäßversorgung, bei geringer Dichte stellt es sich andersrum dar. *Tada et al.* deuteten an, dass Bereiche mit dichter Spongiosa besser geeignet seien, um Implantate aufzunehmen (*Tada et al. 2003*).

## **1.7. Knochenheilung (primär/sekundär)**

### **Primäre Knochenheilung**

Der Zwischenraum der Knochenenden wird nach der primären Knochenheilung ohne die Bildung einer Vorstufe wie Bindegewebe direkt mit neuem Knochen gefüllt. Voraussetzung für das Einsprossen von Gefäßen und das Einwachsen von mesenchymalen Zellen ist die Stabilität und Bewegungsfreiheit der Knochenpartien. Darüber hinaus muss eine geringe Spaltbreite gewährleistet werden (*Bohndorf et al. 2006*). Bei Einhaltung dieser Parameter spielen hier die Osteoklastentätigkeit oder der Knochenersatz eine untergeordnete Rolle. Im Vordergrund steht die Knochenapposition durch Osteoblasten. In der ersten Phase entstehen bei kleinen Spaltbreiten von 150-250µm Lamellenknochen und bei Breiten von >200µm konzentrische Lamellen (*Schenk 1987*). Darauf folgend werden über längere Zeit neben der Revaskularisation auch

Gefäßkanäle durch Knochenablagerungen eingengt und es entstehen neue Osteone, die strukturelle Einheit des primären Haverschen Knochens. Die Substitution der durch den Knochenbruch entstandenen avaskulären, nekrotischen Bereiche und der „Havers-Knochenumbau“ der Kortikalis stellen die kompakte Struktur des Knochens wieder her (Pfeil et al. 2014).

### Sekundäre Knochenheilung

Bei der sekundären Knochenheilung kommt es auf Grund der Instabilität im Knochenspalt zunächst zur Bildung eines Knorpelkallus (Faserknorpel und Bindegewebe) und in dem von der Bruchstelle entfernten Teil zur Bildung eines Knochenkallus. Über die Mechanismen der chondralen Ossifikation und des „Havers-Knochenumbaus“, mit dem Einwachsen der Osteone in den Knochenkallus, entsteht mit der Zwischenstufe des Geflechtknochens, kompakter Lamellenknochen (Pfeil et al. 2014).

### **1.8. Implantateinheilung**

Die Implantateinheilung verläuft nach der in Kapitel 2 beschriebenen Osseointegration und die initialen knöchernen Heilungsvorgänge an der Insertionsstelle ähneln der primären Knochenheilung. Neben der Revaskularisierung des Knochen-Implantat-Übergangs entsteht durch Osteoblasten ein Geflechtknochen, der durch den „Havers-Knochenumbau“ zu Lamellenknochen umstrukturiert wird (Schenk und Buser 1998).

Wie für den Erfolg bei der primären Knochenheilung ist bei der Implantateinheilung die Osteoblastenaktivität entscheidend. Diese lässt sich über das Rekrutment, das Attachment, die Proliferation und die Differenzierung beurteilen.

Je höher das Rekrutment, desto höher ist die Anzahl an Osteoblasten am Implantat, die Knochen bilden. Das Attachment, also die Anzahl an gebundenen Osteoblasten, hat auf ihre Proliferation und Differenzierung Einfluss. Über bestimmte Proteine können Osteoblasten an bestimmten Implantatoberflächen binden und somit einen strukturellen Verbund zwischen Knochen und Implantat erzielen (Ramazanoglu und Oshida 2011). Die Proliferation (Zellteilung und –wachstum) kompensiert das Absterben von Osteoblasten. Die Differenzierung beschreibt die Entwicklung des unreifen Osteoblasten zum sekretorischen Osteoblasten, der die Knochenmatrix mineralisiert. Hierbei entstehen zu einem kleinen Teil Osteozyten und Bone Lining Cells, der Großteil der Zellen geht jedoch in die Apoptose (Parfitt 1990).

## 1.9. Implantationsverfahren

Generell wird unterschieden in zwei verschiedene Einheilungsarten und in verschiedene Implantationszeitpunkte. Darauf aufbauend unterscheiden sich weiterhin Konzepte des Belastungszeitpunktes des Implantates über die prothetische Versorgung.

### Einheilung (offen / geschlossen)

Man unterscheidet in zwei verschiedene Einheilungsarten: offen (einzeitig, transgingivale Einheilung) oder geschlossen (zweizeitig, subgingivale Einheilung).

Die zweizeitige Vorgehensweise beinhaltet das setzen des Implantates auf Höhe des Knochenniveaus und den Verschluss der darüber liegenden Gingiva. Nach der Einheilung wird das Implantat in einem zweiten Eingriff freigelegt und ein Gingivaformer eingesetzt, der später von dem Abutment ersetzt wird, um die prothetische Versorgung aufzunehmen. Die geschlossene Einheilung wurde von *Branemark et al.* propagiert und zeigte sichere und gute Ergebnisse (Branemark et al. 1977). Die Vorteile der geschlossenen Einheilung liegen darin, dass das Risiko für auf das Implantat wirkende Belastungen gering ist und daraus resultierende nicht erwünschte Mikrobewegungen während der Einheilphase unwahrscheinlich sind und die Osseointegration ungehindert ablaufen kann. Eine fibröse Einkapselung statt der gewünschten Osseointegration entsteht jedoch erst ab Mikrobewegungen zwischen 50-150µm (Szmukler-Moncler et al. 1998). Negativ ist der nach der Einheilung erforderliche Zweiteingriff für die Freilegung, der bei offener Einheilung entfällt (Cardelli et al. 2013).

Für die offene Einheilung kommen sowohl die typischen zweiteiligen Implantate, als auch die oben genannten einteiligen Implantate in Frage. Im Laufe der Zeit konnte gezeigt werden, dass bezogen auf den Knochenverlust, keine signifikanten Unterschiede im Langzeiterfolg von geschlossen - und offen eingeheilten Implantaten bestehen und der Erfolg nach offener Einheilung sowohl bei ein- als auch zweiteiligen Implantaten gegeben ist (Collaert und De Bruyn 1998, Cochran 2000, Cecchinato et al. 2004). Bei der offenen Einheilung kommt es, je nachdem ob ein- oder zweiteilige Implantate verwendet werden, bei ersteren zum Wegfall der Verbindungsstelle zwischen Implantatbasis und Abutment. Somit kommt es nicht zu einer Retentionsnische für Bakterien (Quirynen und van Steenberghe 1993) und weniger Entzündungszellen (Broggini et al. 2003). Die offene Einheilung bietet die Möglichkeit der sofortigen Versorgung, mit dem oben genannten Risiko von Mikrobewegungen.

### Implantationszeitpunkt (sofort / verzögert / spät)

Die Sofortimplantation beinhaltet die sofortige Implantation in die so gering wie möglich verletzte Alveole direkt nach der Extraktion. Der Knochen muss marginal und apikal entzündungsfrei sein, es muss ein vertikaler Implantat-Knochen-Kontakt von mindestens 3-5mm über den Apex hinaus garantiert sein und die Ausmaße des Implantates müssen zumindest apikal größer als die Alveole sein, um eine ausreichende Primärstabilität zu garantieren. Diese Methode ist besonders verbunden mit der Sofortbelastung jedoch risikobehaftet (Penarrocha et al. 2004). Die verzögerte Implantation bedeutet, den Eingriff 2-4 Wochen nach dem Zahnverlust durchzuführen. Wie *Esposito et al.* schon für die Sofortimplantation beschrieb, könnte eventuell einem Hart- und Weichgewebsverlust vorgebeugt werden (Esposito et al. 2010). Von der Spätimplantation spricht man bei einer Implantation nach kompletter Verknöcherung der Alveole. Ein früher Implantationszeitpunkt kann positive Effekte auf die Ästhetik auf Kosten eines höheren Risikos in Bezug auf die erfolgreiche Osseointegration haben. Allgemein muss der Zeitpunkt mit den patientenindividuellen medizinischen, dentalen und anatomischen Risikofaktoren abgewogen werden (Hammerle und Glauser 2000).

### Belastungszeitpunkt: sofort (ohne oder mit Okklusionskontakt) / früh / spät (konventionell oder verzögert)

Die Sofortversorgung beschreibt die Versorgung mit Zahnersatz bis spätestens 48 Stunden nach der Implantation. Die Sofortbelastung beschreibt die Eingliederung eines Zahnersatzes mit vollem oder reduzierten Okklusionskontakt bis spätestens 48 Stunden nach der Implantation (Cochran et al. 2004). Von der frühen Belastung wird bei der Eingliederung von Zahnersatz mit vollem oder reduzierten Okklusionskontakt frühestens nach 48 Stunden und spätestens nach 3 Monaten nach der Implantation gesprochen. Die späte Belastung beschreibt die Eingliederung von Zahnersatz mindestens 3-6 Monate nach der Implantation (Jurdzik 2010).

*Baj et al.* beschreiben zum einen, dass die Verkürzung des Zeitraumes bis zur Belastung der Implantate von 12-24 Wochen auf 6-8 Wochen den Implantaterfolg nicht verändert und die verkürzte Zeitspanne bis zur Belastung besonders bei zahnlosen Patienten gängig ist, und zum anderen, dass die Überlebensrate der Implantate unter Sofortbelastung der konventionellen Belastung ähnelt (Baj et al. 2016). Laut *Glauser et al.* können eine Überbelastung und ein schwacher Halt im Knochen besonders zusammen

mit frühen Belastungszeitpunkten zu einem Implantatmisserfolg führen (Glauser et al. 2004).

### **1.10. Osseointegration**

Seit der Entdeckung und Beschreibung der Osseointegration von Titan durch *P.I. Branemark* in den 50er bis 70er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts, werden Implantate aus Titan als lasttragende Pfeiler zur funktionellen und ästhetischen Rekonstruktion der Kiefer verwendet (Branemark et al. 1970). In diesem Zusammenhang sind die Begrifflichkeiten der Osteoinduktion, -konduktion, -genese und Osseointegration zu klären. Die Osteoinduktion ist ein Vorgang bei dem die Knochenbildung stimuliert wird. Undifferenzierte Vorläuferzellen werden zu knochenbildenden Zellen (Albrektsson und Johansson 2001). Zellmediatoren (Wachstumsfaktoren) wie *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) erhöhen die Osteoblastenformation und führen zu einer Induktion der Osteogenese, somit zu einer gesteigerten Knochenbildung (Wilson-Hench 1987, Klokkevd und Jovanovic 2002). Die Osteokonduktion bezeichnet das Knochenwachstum auf einer Oberfläche. Eingebrachtes Material dient als Gerüst für die Knochenneubildung und –Ausbreitung. Dabei penetriert der eigene Knochen in dieses Material (Wilson-Hench 1987). Die ursprüngliche Definition der Osseointegration beinhaltete die direkte Abscheidung von Knochen auf die Implantatoberfläche. Die direkte funktionelle und strukturelle Verbindung zwischen vitalem Knochengewebe und der Oberfläche eines lasttragenden Implantats wurde später als Osseointegration definiert (Branemark 1959, Branemark et al. 1977, Branemark 1983). Implantate wirken bei der Einheilung somit wie ein Zellgerüst (Att et al. 2007, Att et al. 2009c). Als erstes bildet sich ein Blutkoagulum auf der Implantatoberfläche. Dies enthält ein Fibrinnetzwerk als Leitstruktur für Kapillareinsprossung, zur Osteoblastendifferenzierung und zur Proliferation dieser Zellen. An das sekretierte Osteopontin lagern sich Calciumphosphatkomplexe an, die später kristallisieren. Die regenerative Einheilung schließt mit der Kollagenmineralisation ab (Strietzel 2002). Im Laufe dieses Prozesses wird der Geflechtknochen zu laminärem Knochen umgebaut, wobei die Migration von Osteoblastenvorläuferzellen und deren Anlagerung an die Implantatoberfläche, sogenannte Kontaktosteogenese, von Beginn an essentiell sind (Strietzel 2002, Gutwald et al. 2010).

Die Osseointegration wurde durch *Branemark* definiert als direkte strukturelle und funktionelle feste Verbindung zwischen der Oberfläche eines belasteten Implantats und des umliegenden Knochens (Branemark 1959, Branemark 1983). Nachdem *Branemark* die Osseointegration zuerst beschrieben hatte, wurde dieser Begriff einige Male weiter

spezifiziert. *Albrektsson et al.* definierten ihn als unter dem Lichtmikroskop sichtbaren funktionellen und strukturellen Verbund zwischen Knochengewebe und der Oberfläche eines Implantats (Albrektsson et al. 1981). Auf histologischer Ebene ist es als direkte Verankerung von einem Implantat durch die Knochenformation rund um das Implantat herum ohne das Vorhandensein von Bindegewebe am Knochen-Implantat-Übergang beschrieben (Parithimarkalaignan und Padmanabhan 2013). Klinisch wird die Osseointegration auch über biomechanische Prüfvorgänge beschrieben. Die feste Verankerung vom eingebrachten Implantat im Knochen unter Belastung kann beispielsweise mit Hilfe der Resonanz-Frequenz-Analyse (RFA) gemessen werden. Hier wurde jedoch auch schon beschrieben, dass die RFA am humanen Oberkiefer als indirektes Verfahren nicht mit der Primärstabilität aus direkten Verfahren übereinstimmen muss (Lagarie 2012).

### **1.10.1. Auswirkungen des Implantatoberflächendesigns auf die Osseointegration**

Der wesentliche Faktor einer vollständigen Osseointegration ist durch den Werkstoff Titan sehr gut möglich, da es ein geringes spezifisches Gewicht, hohe Hitzebeständigkeit, hohe Härte und vor allem eine sehr gute Korrosionsbeständigkeit aufweist, welche durch die Oberflächenoxidschicht charakterisiert wird (Kasemo 1983). Reines Titan als solches ist ein bioinertes Material. Es reagiert chemisch nicht mit dem Knochen und wirkt an sich auch nicht verstärkend auf eine Osseointegration. Kommt es mit Sauerstoff in Verbindung, bildet sich innerhalb von Millisekunden eine Oxidschicht, die auch „Selbtheilung“ genannt wird. Die Zusammensetzung der Oberflächenoxidschicht (u.a.  $\text{TiO}$ ,  $\text{TiO}_2$  und  $\text{Ti}_2\text{O}_3$ ) ist abhängig von der Dicke, wobei  $\text{TiO}_2$  die stabilste Verbindung ist (Vaquila et al. 1999). Mit diesem Wissen wurden und werden verschiedene Oberflächenmodifikationen entwickelt um die Bioaktivität von Titanimplantaten zu ermöglichen und zu verbessern, da die Oberflächenbeschaffenheit ein entscheidender Faktor für die Osseointegration ist (Albrektsson et al. 1981). Ebenfalls die Fertigungs-Parameter des Implantats; Form und Legierung spielen eine bedeutende Rolle bei der Einheilung. In diesem Zusammenhang bedeutet Oberflächenoptimierung den Vorgang der Kontaktosteogenese effizienter, schneller und stärker zu gestalten, also das Anwachsen des Knochens durch technische Modifikation für den Behandler und den Patienten zu verbessern (Wennerberg und Albrektsson 2010).

Für ein erfolgreiches Implantat ist anfänglich die Primärstabilität essentiell. Sie ergibt sich aus mehreren Faktoren, wie die Klemmwirkung des Implantats im Knochen, die

Knochenqualität und -Quantität, die Implantatgeometrie, die Platzierung und die Implantationsweise. Einheilungsprozesse haben hier noch nicht stattgefunden. Die Festigkeit nach Insertion ist das Fundament für ein erfolgreiches Einheilen und der erste Schritt für eine erfolgreiche Osseointegration und den Ausschluss einer bindegewebigen Einheilung (Friberg et al. 1991, Ivanoff et al. 1996). Darauf basiert die Sekundärstabilität. Sie bezeichnet die darauf folgende Implantatverankerung durch Wundheilungsvorgänge, Knochenbildung und Remodellierung, ohne dass es vorher durch übermäßigen Druck am Implantat-Knochen-Übergang zur Kompression von Blutgefäßen oder gar zu Nekrosen gekommen ist (Isoda et al. 2012).

Die Oberflächen von dentalen Implantaten lassen sich über topographische, biologische und chemische Eigenschaften determinieren. Sowohl das Design, als auch die Oberflächen haben über die Jahre grundlegende Anpassungen und Veränderungen erfahren. Moderne Implantatsysteme verfügen über eine optimierte Oberflächentopographie, wenige über eine optimierte Oberflächenchemie, biologisierte oder pharmazeutisch modifizierte Oberflächen sind Gegenstand der Forschung (Schlottig 2011).

Veränderungen von Ladung, Struktur und Polarität der Implantatoberfläche, sind Möglichkeiten zur Optimierung (Danna et al. 2015). Auch chemische Methoden, wie z.B. Oxidation und Plasmabehandlung, genauso wie topographische Modifikationen (z.B. Partikelbeschichtung), Druckstrahlen oder chemische Abrasivtechniken sind Gegenstand aktueller Forschung (Carlsson et al. 1989, Jimbo et al. 2008, Hayashi et al. 2012, Karlsson et al. 2012, Chowdhary et al. 2015). *Canullo et al.* wiesen nach, dass durch eine Erhöhung der Oberflächenenergie als Maß von ungebundenen Oberflächenatomen, die Fähigkeit eines Materials zu osseointegrieren durch verbesserte Zelladhäsion erleichtert wird (Canullo et al. 2016). Die Oberflächenenergie kann in unpolare (disperse) und polare Komponenten (polare Gruppen, elektrische Ladungen, freie Radikale, sowie Rauheiten auf der Oberfläche) unterteilt werden (Staack et al. 2008).

Im Vergleich von Implantaten mit moderat rauen ( $S_a = 1-2\mu\text{m}$ ) und rauen Oberflächen ( $S_a > 2\mu\text{m}$ ) zu glatten ( $S_a < 0,5\mu\text{m}$ ) oder leicht rauen Oberflächen ( $S_a = 0,5-1\mu\text{m}$ ) weisen erstere eine bessere Osseointegration auf (Wennerberg und Albrektsson 2009). Periimplantäre Entzündungen können hingegen durch glatte Oberflächen begünstigt werden (Subramani et al. 2009). Heutzutage werden deshalb für dentale Implantate fast nur moderat raue Oberflächen verwendet. Natives Titan kann durch verschiedene Verfahren modifiziert werden, von denen sich die subtraktive Technik (Sandstrahlen, Säureätzen) durchgesetzt hat. Additive Techniken (z.B. Titan-Plasma- oder

Hydroxylapatitbeschichtung) stehen im Hintergrund (Schlottig 2011). Implantatoberflächen werden durch neue Produktionstechniken auch im Nanometerbereich 1-100nm modifiziert (Albrektsson und Wennerberg 2004). Diese erzeugten Rauheiten im Nanometerbereich wirken sich durch die Erhöhung der Oberflächenenergie verbessernd auf die Hydrophilie und die Adhäsion von Zellen aus und unterstützen die Bindung von Fibrin, Matrixproteinen und Wachstumsfaktoren, wodurch es zu einer verbesserten Osseointegration kommt (Dohan Ehrenfest et al. 2010). Unbekannt ist jedoch, ob es eine „optimale“ Oberflächentopographie für eine selektive Adsorption von Proteinen und Anlagerung von Osteoblasten gibt (Le Guehennec et al. 2007). Der Knochen-Implantat-Kontakt von modernen Implantaten liegt bei fabrikneuen Implantaten nach Osseointegration bei ca. 65-73% (Alharbi et al. 2014).

Als mögliche weitere biologisch aktive Implantatbeschichtungen bzw. chemische Modifikationen werden u.a. Calciumphosphatverbindungen wie Hydroxylapatit, Wachstumsfaktoren, Bisphosphonate, Fluoride, bioaktive Gläser, Titaniumnitrid und plasmapolymerisiertes Allylamin (PPAAm) / Ethylendiamin (PPEDA) diskutiert.

### Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ )

Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) ist eine sehr biokompatible Beschichtung, da es mit 40 Prozent die hauptsächliche anorganische Komponente des Knochens ist (Xuereb et al. 2015). Durch diese Beschichtung kommt es zu einer bi-direktionalen Knochenformation vom Knochen und aber auch von der bioaktivierten Oberfläche des Implantats aus (Weinlaender 1991). Problematisch für den klinischen Langzeiterfolg sind die Ablösung des Calciumphosphats vom Implantat und die schlecht kontrollierbare Auflösungsgeschwindigkeit (Mehdikhani-Nahrkhalaji et al. 2015). Verschiedene Aufbringmethoden werden daher erforscht. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass hydroxylapatitbeschichtete Oberflächen im Vergleich zu konventionell säuregeätzten Implantatoberflächen einen ähnlichen Knochen-Implantat-Kontakt aufwiesen, aber im Nanometerbereich die Qualität des Gewebes um die HA-beschichteten Implantate besser war (Jimbo et al. 2012). Eine weitere *in vivo* Studie zeigte, dass im ersten Monat der Einheilung der Knochen-Implantat-Kontakt von hydroxylapatitbeschichteten Implantaten besser war, nach drei Monaten jedoch kein signifikanter Unterschied zu unbeschichteten Implantaten vorlag (Gobbato et al. 2012).

## Wachstumsfaktoren

Die Ankopplung von Wachstumsfaktoren könnte durch Schaffung einer osteoinduktiven Oberfläche eine Vergrößerung des Anwendungsbereichs dentaler Implantate auf kompromittierte Knochenverhältnisse bedeuten. Einige Studien, vor allem mit BMP-2 und -7 zeigen positive Ergebnisse. Yoo *et al* zeigten, dass die Inkorporation von BMP-2 in eine calciumphosphat-beschichtete Titanimplantatoberfläche nach 3 Wochen *in vivo* einen positiven Effekt auf die Knochenapposition und die Osseointegration hat (Yoo et al. 2014). Das direkt auf das Titanimplantat aufgebrachte BMP-2 hatte in dieser Studie jedoch keinen signifikanten positiven Effekt, lediglich zu der Vergleichsgruppe der Titanimplantate ohne Beschichtung. Wie bei anderen Proteinbeschichtungen spielt die Freisetzungsrate des BMP-2 eine entscheidende Rolle und somit die Trägersubstanz des BMP auf dem Implantat. Inadäquat gewählt kann es die Wirkung des BMP über die Tragfähigkeit bzw. Absorbierbarkeit sogar negativ beeinflussen, mit ungewollter Stimulation der Osteoklastogenese als Folge (Liu et al. 2007a). Somit kann hierdurch die Osteokonduktivität der Implantatoberfläche beeinträchtigt werden. BMPs stimulieren die Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung nicht nur der Knochenvorläuferzellen, sondern auch der Osteoklasten in einem frühen Stadium (Pham et al. 2011). Die Knochenresorption kann so direkt dem Appositionsprozess entgegenwirken und das Nettovolumen von neu abgelagertem Knochen in Gegenwart von BMPs niedriger als in Abwesenheit von BMPs sein. Die aufgebrachte Konzentration der Faktoren ist entscheidend, da es bei zu hoher Konzentration zu einer überschießenden Produktion von intrinsischen BMP-Inhibitoren kommt (Rosen 2006, Liu et al. 2007b). Eine optimale Beschichtungsmethode ist bisher nicht beschrieben (Yoo et al. 2014).

## Bisphosphonate

Bisphosphonate sind pharmazeutische aktive Substanzen, welche hemmend auf die Osteoklastentätigkeit wirken und somit indirekt zu einem Erhalt der Knochendichte und des Knochenvolumens führen (Grötz und Kreuzsch 2006). Sobald sich die Bisphosphonate von der Oberflächenbeschichtung des Implantats lösen, wird das Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels zu Gunsten des Knochenaufbaus verschoben. Schon bei niedriger Dosis ist die Osteoklastenbildung und –Aktivität nachweisbar verringert. Außerdem bewirken sie die Verkürzung der osteoklastären Lebensdauer durch Induktion der Apoptose und das Gleichgewicht verschiebt sich auf Grund der abnehmenden Rekrutierungsrate zu Gunsten der Osteoblasten (Fleisch 2001, Abtahi 2013). Im Bereich der Implantatbeschichtung finden sich hauptsächlich die folgenden drei

Bisphosphonate: Ibandronat, Zoledronsäure und Alendronat. Implantate mit einer bisphosphonatgebundenen Fibrinogenschicht wiesen *in vivo* mit der Radio-Frequenz-Analyse nach 6 Monaten eine bessere Stabilität auf und intraorale Röntgenbilder zeigten weniger Knochenverlust jeweils nach sowohl 2 als auch 6 Monaten (Abtahi et al. 2012). *Abtahi et al.* stellten fest, dass die Ausdrehkraft von bisphosphonatbeschichteten Implantaten höher war als bei einer nativen Kontrollgruppe. Dabei wurden die Implantate im Rattenmodell in eine Extraktionsalveole implantiert und nach 2 Wochen explantiert (Abtahi et al. 2013). Unerwünschte Nebenwirkungen von systemischen Bisphosphonaten sind beispielsweise Osteonekrosen im Kieferbereich. An Titanoberflächen von Implantaten gebundene Zoledronsäure bleibt hauptsächlich lokalisiert um das Implantat herum mit minimaler systemischer Verteilung (McKenzie et al. 2011). Es stellt sich jedoch trotzdem die Frage, wie stark die verschiedenen Wirkstoffe der Bisphosphonatbeschichtung systemisch wirken.

## Fluoride

Titan reagiert sehr reaktionsfreudig auf Fluoridionen unter Bildung von löslichem  $TiF_4$ . Zahnimplantate aus Titan können in Fluoridlösungen chemisch behandelt werden, um eine mikrorauhe, fluoridhaltige Oberfläche zu erzeugen, welche die Osseointegration unterstützen kann, indem die Osteoblastendifferenzierung verbessert wird (Ellingsen et al. 2004). Ein mit Flusssäure geätztes Implantat kann die Fluoridionen in ihre Oxidschicht einbauen. Somit wird die Oberfläche gleichzeitig geätzt/aufgeraut und mit Fluoridionen biologisiert (Cooper et al. 2006).

## Bioaktive Gläser

Auf Siliziumdioxid (<60 Masse-%) basierende bioaktive Gläser sind resorbierbare, osteokonduktive Materialien, welche einen festen chemischen Verbund mit Knochen eingehen können. Je nachdem wie hoch der Anteil der Oxide  $SiO_2$ ,  $Na_2O$ ,  $CaO$  und  $P_2O_5$  ist, verändern sich die biologischen Eigenschaften (O'Donnell 2012). Die Beschichtung von Titanimplantaten mit bioaktivem Glas wurde als nicht toxisch und biokompatibel gewertet und eine Untersuchung nach 12 Monaten nach der Implantation am Menschen zeigte, dass die Osseointegration von mit bioaktiven Gläsern beschichteten- mit den HA-beschichteten Implantaten vergleichbar ist (Mistry et al. 2011). In der anterioren Maxilla inserierte, mit bioaktivem Glas beschichtete Implantate wiesen laut *Mistry et al.* in einem Zeitraum von bis zu 12 Monaten nach prothetischer Versorgung im Gegensatz zu HA-

beschichteten Implantaten einen geringeren Knochenverlust und weniger Lücken im Knochen-Implantat-Übergang auf (Mistry et al. 2016).

### Titaniumnitrid

Eines von vielen Verfahren Titanimplantate mit einer Titaniumnitridschicht zu belegen, ist die *Physical Vapour Deposition* (PVD). Problematisch ist die Adhäsion der Nitridschicht (doppelt so hart) auf dem Titanmaterial des Implantats auf Grund verschiedener Oberflächenhärte. Das Verfahren „*duplex treatment*“ mit einer Plasmanitrierung für die Härtung des Titans und anschließender Aufbringung einer Titaniumnitridschicht soll dieses Problem beheben (Tong et al. 2011). Titanimplantate mit Titaniumnitridoberfläche haben eine hohe Härte und sind sehr korrosionsbeständig, darüber hinaus reduziert sie die Entzündung des periimplantären Gewebes (Scarano et al. 2003a). *In vitro* wurde gezeigt, dass die Titaniumnitridoberfläche auf SLA® Proben die Zellproliferation stimuliert (Durual et al. 2011). Die Rauheitswerte der Oberfläche blieben nach der Aufbringung der Titaniumnitridschicht unverändert und *in vivo* wurde im Tiermodell mit Ratten gezeigt, dass die Heilung um die Implantate mit Titaniumnitridschicht vergleichbar mit den unbehandelten war (Scarano et al. 2003b). Die Farbe der Implantate verändert sich zu gold, was ästhetisch günstig sein kann, da das Durchscheinen durch die Gingiva verhindert wird. Die Zelluläre Adhäsion ist vom Implantatmaterial und ihrer Oberflächenbeschaffenheit vor der Beschichtung abhängig. Im Vergleich ist die Zellkolonisation *in vitro* für Titaniumnitrid höher als für Zirkoniumnitrid (Prachar et al. 2015).

### Plasmapolymerisiertes Allylamin (PPAAm) / Ethylendiamin (PPEDA)

Mittels Plasmapolymerisation können positiv geladene, nanometerdünne Beschichtungen auf Implantatoberflächen aufgebracht werden. In Studien wurden u.a. unbeschichtete Titanlegierungen (Ti6Al4V) mit plasmapolymerisierten Allylamin- und plasmapolymerisierten Ethylendiamin-Beschichtungen verglichen. In einer Studie wurden dazu humane osteoblasten-ähnliche Zellen *in vitro* und der Knochen-Implantat-Kontakt *in vivo* untersucht (Gabler et al. 2014). Maßgeschneiderte konische Titan-Implantate wurden dazu an der medialen Tibia weiblicher Ratten eingesetzt. Nach einem Follow-up von sechs Wochen wurde der KIK durch Histomorphometrie bestimmt. Die Quantifizierung der Zellhaftung zeigte eine signifikant höhere Scherbeanspruchung für MG-63-Zellen auf PPAAm- und PPEDA- im Vergleich zu unbeschichtetem Titan (Ti6Al4V). Unbeschichtete

Titanimplantate zeigten den niedrigsten KIK (40,4%) nach 6 Wochen Einheilzeit. Implantate mit PPAAm- zeigten eine deutliche, aber nicht signifikante Steigerung des KIK (58,5%) und Implantate mit PPEDA-Beschichtung einen deutlich erhöhten KIK (63,7%) nach 6 Wochen (Gabler et al. 2014).

### **1.10.2. Einfluss von Risikofaktoren auf die Osseointegration**

Als Gründe für mangelnde Osseointegration sehen *Piattelli et al.* beispielsweise eine zu frühe Belastung des Implantats und einen zu hohen Einbringdruck mit einhergehender Wärmeentwicklung an (Piattelli et al. 1998). Im Vergleich zeigte ein erhöhter Einbringdruck, beschränkt auf kompakten Mandibularknochen *in vivo* jedoch eine erhöhte Primärstabilität ohne Knochennekrosen (Trisi et al. 2011). Neben der oben genannten Operationstechnik und der Knochenqualität spielt auch die Belastung durch die Suprastruktur eine Rolle für späte Misserfolge. Eine inadäquate Belastung und Parafunktionen können zu Implantatverlusten führen (Biffar et al. 2011). Gerade bei Patienten bei denen der multifaktorielle Prozess der Osseointegration als problematisch einzustufen ist oder bei komplexen Fällen sollen Oberflächenoptimierungen eine Verbesserungen der Osseointegration von Implantaten ermöglichen, um die Misserfolgsrate zu senken. Zu dieser Gruppe gehören, bedingt durch eine schlechtere Wundheilung, u.a. Patienten mit Diabetes mellitus. Höhere Implantatverlusten können die Folge sein (Mellado-Valero et al. 2007). Gründe für defizitäre Knochenumbauprozesse können auch u.a. eine Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich oder die systemische Therapie mit Bisphosphonaten sein (Ihde et al. 2009, Kasai et al. 2009). Ein weiteres Benefit einer optimierten Implantatoberfläche könnte die Möglichkeit der frühzeitigeren Belastung sein, was die Wartezeiten bis zum Erhalt der Suprastruktur minimieren würde.

## **1.11. UV-Photofunktionalisation**

### **1.11.1. Einfluss der UV-Photofunktionalisation auf Titanoberflächen, Grundlagen**

Die UV-Photofunktionalisation ist eine Oberflächenmodifikation der Titan-Implantatoberfläche. Durch die lagerungsbedingte Alterung von Implantaten kommt es zu

einer Degradation des Materials (Suzuki et al. 2009). Die Oberfläche wird hydrophob und es sind viele Hydrocarbonverbindungen aus der Atmosphäre nachzuweisen (Ogawa 2014). Als Folge daraus vermindert sich die Bioaktivität. Die UV-Photofunktionalisation ist die Bestrahlung der Implantate mit ultraviolettem Licht, wodurch die Oberfläche superhydrophil wird und die Hydrocarbonverbindungen und andere Kontaminationen durch einen Reinigungseffekt entfernt werden. Die Oberfläche wird elektropositiv, nachdem sie vorher elektronegativ war (Iwasa et al. 2010).

### **1.11.2. Wirkungen *in vitro***

*Aita. et al.* stellten bei einem Vergleich von nicht photofunktionalisierten, über 48 Stunden UVA-photofunktionalisierten (Spitzenwellenlänge 360nm) und über 48 Stunden UVC-photofunktionalisierten (Spitzenwellenlänge 250nm) säuregeätzten Titanoberflächen mit humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* fest, dass nach 3 Stunden 8 mal mehr Zellen und nach 24 Stunden 3 mal mehr Zellen an die UVC-photofunktionalisierten Oberflächen migriert waren im Vergleich zu den nicht photofunktionalisierten oder UVA-photofunktionalisierten Oberflächen (Aita et al. 2009a). Plasma-elektrolytisch oxidierte (MAO) Titanproben wurden mit UVA-Licht (Spitzenwellenlänge von 360nm) oder UVC-Licht (Spitzenwellenlänge von 250nm) für bis zu 24h vorbehandelt. UVC-Photofunktionalisation förderte die Anhaftung, Ausbreitung, Proliferation und Differenzierung von humanen osteoblasten-ähnlichen Osteosarkom-Zellen (MG-63) auf der Titanoberfläche. Diese Einflüsse wurden jedoch nur nach UVC-Photofunktionalisation beobachtet. Die verbesserte Bioaktivität korrelierte im wesentlichen mit der Menge an Ti-OH-Gruppen, die bei der Verbesserung der Hydrophilie eine wichtige Rolle spielt und mit der Entfernung von Kohlenwasserstoffen auf der Titanoberfläche (Gao et al. 2013). In einer weiteren Studie wurden aus Knochenmark von Ratten stammende Osteoblasten auf unbehandelten und UV-photofunktionalisierten Titanoberflächen kultiviert (Iwasa et al. 2010). Die Anzahl der auf UV-photofunktionalisierten Titanoberflächen adhärenen Osteoblasten war 5-fach und 2-fach größer nach 3 und 24 Stunden Inkubationszeit als die Anzahl auf unbehandelten Oberflächen. Des Weiteren wurden auf diesen Titanoberflächen kultivierte Osteoblasten mechanisch durch Vibrationskraft und enzymatisch durch Trypsin-Behandlung abgelöst. Die Zelladhäsion nach 24h Inkubationszeit und 3h Inkubationszeit war 50-60% / 110-120% höher im Vergleich zur Osteoblastenadhäsion auf unbehandelten Titanoberflächen (Iwasa et al. 2010). Nach der Produktion von Titanimplantaten kommt es zu einer „Titanalterung“. Im Vergleich lag der

Knochen-Implantat-Kontakt bei weniger als 60% bei den gealterten und über 90% bei den neu präparierten Implantatoberflächen und beim Attachement von osteogenen Zellen *in vitro* lag der Unterschied bei 20% zu 50% zu Gunsten der neuen Oberflächen. Die UV-Photofunktionalisation forciert die Zellattraktion, kehrt die zeitabhängige biologische Degradation von Titanoberflächen um und wandelt die Oberflächeneigenschaft durch die Beseitigung der Kohlenwasserstoffverunreinigungen von hydrophob zu superhydrophil (Ogawa 2014). Mit einer Erhöhung der Migration, Annheftung und Mineralisation von humanen Osteoblasten auf 4 Wochen gealterten UV-photofunktionalisierten Titanplättchen im Vergleich zu nicht photofunktionalisierten alten und nicht photofunktionalisierten neuen Titanplättchen stellten *Hori et al.* eine gesteigerte Bioaktivität von Osteoblasten durch die UV-Photofunktionalisation fest (Hori et al. 2010).

### **1.11.3. Wirkungen *in vivo* und am Menschen**

Die *in vitro* Ergebnisse konnten *in vivo* bestätigt werden. Durch die Oberflächenfunktionalisation kommt es zu einer Erhöhung der osteokonduktiven Potenz und die Prozentzahl des Knochen-Implantat-Kontakts auf maschinieren und säuregeätzten Titanproben nach 4 Wochen Einheilzeit steigert sich auf fast 100% (Aita et al. 2009b). Nach der UV-Photofunktionalisation verlief die Einheilung rund vier mal schneller. Eine positive Korrelation mit der UV-Dosis gab es zum Zellattachement und zur Proteinadsorptionsrate, eine negative mit dem atomaren Restgehalt an Kohlenstoff auf der Implantatoberfläche. Beim Vergleich neu präparierter Titanoberflächen zu vier Wochen alten Implantaten, benötigen diese mehr als die zweifache Einheilzeit für die gleiche Rate an Osseointegration (Att und Ogawa 2012).

Der Vergleich von 168 bei Patienten gesetzten Implantaten mit einer 15-minütigen UV-Photofunktionalisation vor der Insertion zu 222 nicht photofunktionalisierten Implantaten ergab in einer retrospektiven Studie eine schnellere Zunahme des Implantatstabilitätsquotienten (ISQ), so dass UV-photofunktionalisierte Implantate früher belastet werden konnten (Funato et al. 2013). Ein schnellerer Anstieg des ISQ als für in der internationalen Literatur beschriebene nicht UV-photofunktionalisierte Implantate wurde auch in einer Fallkontrollstudie mit 4 partiell zahnlosen Patienten gemessen (Funato und Ogawa 2013). Hier wurden 7 UV-photofunktionalisierte Implantate in kompromittiertem Knochen (frische Extraktionsalveolen, vertikal augmentierter Knochen, simultaner Knochenaufbau oder vorheriger Implantatmisserfolg) eingebracht.

## **1.12. Kaltplasma-Oberflächenaktivierung**

### **1.12.1 Einfluss der Kaltplasma-Oberflächenaktivierung auf Titanoberflächen, Grundlagen**

Die Plasmaaktivierung gilt als weiterer Ansatz zur Reduktion von produktionsbedingten Oberflächenverunreinigungen von Titanimplantaten, Erhöhung der Oberflächenenergie und somit Herstellung einer bioaktiven Oberfläche. Plasma entsteht bei kontinuierlicher Energiezufuhr zu Materie, die vom festen über den flüssigen in den gasförmigen Zustand übergeht bevor bei weiterer Energiezufuhr die Atomhülle aufgebrochen wird und geladene Teilchen entstehen (negativ geladene Elektronen und positiv geladene Ionen) (Diener Electronic GmbH & Co KG 2008). Ansätze zur Oberflächenaktivierung durch Plasma gab es schon in den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts. Aufgrund des Aufwandes und der Kosten für das gleichzeitig unzuverlässige Equipment haben sie sich jedoch nicht durchgesetzt (Aronsson et al. 1997). Bei älteren Geräten musste mit hohen Temperaturen und / oder niedrigen Drücken gearbeitet werden. Neuere portable Kaltplasmageräte (z.B. Diener Yocto III) machen die Oberflächenbehandlung bei Raumtemperatur im klinischen Umfeld möglich und könnten vielversprechende Möglichkeiten bieten (Teixeira et al. 2012). Kaltplasmageräte unter atmosphärischem Druck können unkompliziert zur Desinfektion kontaminierter Implantatoberflächen genutzt werden. Die antimikrobielle Wirkung auf adhärente orale Mikroben korrelierte mit der Behandlungsdauer (Rupf et al. 2010).

### **1.12.2. Wirkungen *in vitro***

Die Oberflächenplasmaaktivierung von Titanplättchen im Vergleich zu unbehandelten Plättchen in einer *in vitro*-Studie von *Canullo et al.* zeigte nach 2 und nach 8 Stunden eine signifikant höhere Fibroblastenadhäsion, nach 48 Stunden aufgrund der Sättigung der Plättchen mit Fibroblasten allerdings nicht mehr (Canullo et al. 2013). Durch die Bestrahlung von Titanplättchen verschiedener Topologie mit einem Kaltplasma (99% Argon / 1% Sauerstoff) bei atmosphärischem Druck wurde der Wasserkontaktwinkel signifikant gesenkt und die Verbreitung von menschlichen osteoblasten-ähnlichen Osteosarkom-Zellen auf den Plättchen unterstützt sowie die Zellgröße erhöht. Darüber hinaus war die Viabilität auf den plasmaaktivierten abgestrahlten und geätzten Titanoberflächen höher (Duske et al. 2012).

Eine weitere Studie beschreibt, dass eine 5-minütige Niederdruck-Hochfrequenz-Sauerstoff-Kaltplasmaaktivierung der Oberfläche von kommerziell erhältlichem, reinem Titan (CP-Ti), Ti6Al4V und Titan nach Kathodenzerstäubung/Vakuumbeschichtung („*sputtered*“) bessere Ergebnisse hinsichtlich der Bioaktivität (MG-63 Zellen) im Vergleich zu unbehandeltem erbringen kann (Tseng et al. 2013).

### **1.12.3. Wirkungen *in vivo***

Signifikant höhere Ausdrehkräfte sowie eine signifikant höhere Belegung mit Knochenzellen wurden für die Argon-Kaltplasmaaktivierung nach Insertion dentaler Implantate in die Tibia im Hundemodell nachgewiesen, jedoch kein vermehrter Knochen-Implantat-Kontakt (Guastaldi et al. 2013). *Coelho et al.* stellten jedoch im Hundemodell fest, dass nach der Oberflächen-Kaltplasmaaktivierung nach 3 Wochen der Knochen-Implantat-Kontakt um über 300% und die Belegungsrate durch Knochen um über 30% über der von nicht plasmabehandelten Titanimplantaten lag (Coelho et al. 2012). Eine sechzigsekündige Kaltplasmaaktivierung pro Fläche war bezogen auf die Kontrolle und einer zwanzigsekündigen Kaltplasmaaktivierung pro Fläche hinsichtlich der Ausdrehwerte signifikant überlegen, wie aus den Ergebnissen einer weiteren Studie hervorgeht (Teixeira et al. 2012).

## 2. Ziele und Arbeitshypothesen vorliegender Studie

### Ziele

Die Ziele dieser Dissertation sind zum einen die Darstellung der physikalisch-chemischen Veränderungen auf glatten und rauen Titanoberflächen nach einem definierten Zeitintervall der Oberflächenfunktionalisierung mit UV-Licht oder Argon- bzw. Sauerstoffplasma. Zum anderen wird das Zellverhalten von murinen Präosteoblasten auf oberflächenfunktionalisierten glatten und rauen Titanoberflächen *in vitro* untersucht. Die Ergebnisse des Standards (nicht oberflächenbehandelte Titanoberflächen) werden dazu mit den Ergebnissen des ergänzten Standards (photofunktionalisierte / kaltplasmafunktionalisierte Titanimplantate) und untereinander verglichen.

### Arbeitshypothesen

- Es kommt bezüglich der Oberflächenchemie nach UV-Photofunktionalisation und Plasmaaktivierung zu einer signifikanten Abnahme von Kohlenstoffverbindungen und einer Zunahme der Oxidschicht auf den Titanoberflächen
- Die Oberflächentopographie wird durch die Oberflächenfunktionalisationen nicht verändert
- Der Kontaktwinkel eines Tropfens Wasser auf der Oberfläche von Titan ist nach Oberflächenfunktionalisation signifikant niedriger als bei nicht funktionalisierten Titanoberflächen
- Das Zellattachement von murinen Präosteoblasten wird durch UV-Licht und Kaltplasma beschleunigt und signifikant mehr Zellen adhärieren auf der Oberfläche des funktionalisierten Titans im gleichen Zeitintervall nach Besiedelung
- Die Morphologie ist nach den oberflächenfunktionalisierenden Verfahren verändert, die Zellfläche ist größer, es sind mehr Zellausläufer vorhanden
- Die Proliferation und die Viabilität sind nach beiden oberflächenfunktionalisierenden Verfahren signifikant höher
- Bezüglich der Zytotoxizität gibt es zwischen den durch UV-Licht oder Kaltplasma behandelten Titanoberflächen und nicht funktionalisierten Oberflächen keine signifikanten Unterschiede

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Geräte**

- TheraBeam® Super Osseo (Ushio Inc., Tokyo, Japan): 12 minütige UV-Photofunktionalisation, UV-Licht verschiedener Spektren, Intensität von ca. 0.05 mW/cm<sup>2</sup> ( $\lambda = 360\text{nm}$ ) und 2 mW/cm<sup>2</sup> ( $\lambda = 250\text{nm}$ )
- Yocto III (Diener Electronic GmbH, Jettingen, Deutschland): 12 minütige pure Sauerstoff- oder Argonplasmaaktivierung (Sauerstoff- oder Argongas), Bedingungen der Behandlung: 24 W und -0,5 mbar
- Kratos Axis-Nova (Kratos Analytical, Manchester, Großbritannien)
- Rasterelektronenmikroskop Evo MA25 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Interferometrie- und Konfokalmikroskop S neox (Sensofar, Terrassa, Spanien)
- Kontaktwinkelmessgerät Surfens universal (OEG® GmbH, Frankfurt, Deutschland) Fluoreszenzmikroskop ECLIPSE TS 100 (Nikon, Houston, USA)
- Brutschrank Innova® CO-48-230 (New Brunswick Scientific Co., Inc., Eddison, USA)
- ELISA reader Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA) mit Filtern für 410nm, 450nm, 650nm, 655nm, 690nm
- Sterilbank: Microflow Biological Safety Cabinet (Astec Microflow, Bioquell, Andover, UK)
- Mikroskop mit Phasenkontrast Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Neubauer improved Zählkammer (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Ultraschall-Wasserbad (Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, Deutschland)

#### **3.2. Reagenzien**

- Isopropanol (Fluka chemie AG, Buchs, Schweiz, Art. Nr.: 34965-1L)
- MEM-alpha, nucleosides Medium (Gibco™, Invitrogen™, Paisley, Großbritannien, Art. Nr.: 12571063)
- 0.05% Trypsin-EDTA (1X), Phenol Red (Gibco™, Invitrogen™, Paisley, Großbritannien, Art. Nr.: 25300-054)
- L-Glutamin, 200 mM (Sigma-Aldrich®, Munich, Deutschland, Art. Nr.: G7513)
- DPBS (Gibco™, Invitrogen™, Paisley, Großbritannien, Art. Nr.: 14190-094)

- Penicillin/Streptomycin (Gibco™, Invitrogen™, Paisley, Großbritannien, Art. Nr.: 15140-122)
- Fötale Kälberserum (Gibco™, Invitrogen™, Paisley, Großbritannien, Art. Nr.: 10106-169)
- Trypanblau-Lösung (Sigma-Aldrich®, München, Deutschland, Art. Nr.: T8154)
- LDH Cytotoxicity Assay Kit Promokine® (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland, Art. Nr.: PK-CA577-K313)
- XTT-Assay Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, Art. Nr.: 11465015001)
- BrdU-Assay Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, Art. Nr.: 11647229001)
- Fluoreszindiacetat (FDA) (Sigma-Aldrich®, München, Deutschland, Art. Nr.: F7378-5G )
- Propidiumiodid (Gibco™, Invitrogen™, Paisley, Großbritannien, Art. Nr.: P4170-10MG)

### **3.3. Zellen**

- Murine immortalisierte Präosteoblasten MC3T3-E1 (C57BL/6, Sigma-Aldrich®, München, Deutschland)

### **3.4. Materialien**

- T175 Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 83.1812.002)
- Petri-Schalen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.:83.1801)
- 96 Well Mikrotiterplatten mit Flachboden (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 83.1835)
- 12 Well Testkultur Testplatten 12, TPP® (Sigma-Aldrich®, München, Deutschland, Art. Nr.: 92412)
- 24 Well Tissue Culture Plate, flat bottom (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 83.1836.500)
- 6 Well Tissue Culture Plate, flat bottom (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 83.1839)

- 4 Well Tissue Culture Plate, flat bottom, quadriPERM (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.:94.6077.307)
- 50ml Falcon tubes, Greiner (Sigma-Aldrich®, Munich, Germany, Art. Nr.: 227261)
- 15ml Falcon tubes, BD Falcon (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art. Nr.:352097)
- Sterile OP Tücher (Hartmann, Paul Ltd., Heywood, UK Art. Nr.: 2523123)
- Sterile Handschuhe (Cardinal Health™ Esteem™ von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art. Nr.:2D72PT75)
- Pipettierhilfe pipetus (Hirschmann Loaborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland)
- Pasteurpipetten (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, Art. Nr. 4518.1)
- 25ml Serologische Pipette (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 86.1685.001)
- 10ml Serologische Pipette (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 86.1254.001)
- 5ml Serologische Pipette, BD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Art. Nr.:356543)
- Pipettenspitzen 0,1-10µl (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland, Art. Nr.: 70.1130.210)
- Pipettenspitzen 20µl, SafeSeal Tips Premium (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland, Art. Nr.: 692151)
- Pipettenspitzen 200µl, SafeSeal Tips Premium (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland, Art. Nr.: 692069)
- Pipettenspitzen 1000µl (SafeSeal Tips Premium, Biozym, Art. Nr.: 692078)

### **3.5. Probekörper**

#### Titanplättchen

- Plättchen aus Reintitan mit Promote® Oberfläche (Camlog®, Basel, Schweiz), S(a)0,5-2µm, gammasterilisiert und in kommerziell erhältlicher Verpackung gelagert, 15mm Durchmesser, 1,5mm Höhe
- Plättchen aus Reintitan mit smooth pickled Oberfläche (Camlog®, 4053 Basel, Schweiz), S(a)<0,5µm, gammasterilisiert und in kommerziell erhältlicher Verpackung gelagert, 15mm Durchmesser, 1,5mm Höhe

## Kontrollplättchen

- RM-A: Plättchen aus Polyurethan mit 0,1% Zinkdiethyldithiocarbamat (ZDEC) (Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, Hadano, Kanagawa, Japan). Dieses Versuchsmaterial, welches gegenüber Präosteoblasten zytotoxisch ist, wurde in den *in vitro* Tests für das Attachment, die Proliferation und die Viabilität als Negativkontrolle und in dem *in vitro Test* für die Zytotoxizität als Positivkontrolle eingesetzt.
- Plättchen aus Polyester, farblos, 15mm Durchmesser, 0,2mm Höhe (Wako Chemicals, Osaka, Japan, Art. Nr.: 160-08893) Dieses Versuchsmaterial wurde in dem *in vitro Test* für die Zytotoxizität als Negativkontrolle eingesetzt. In den *in vitro* Tests für das Attachment, die Proliferation und die Viabilität wurde es als Kontrolle für falsch positive Ergebnisse eingesetzt.

## **3.6. Grundlagenuntersuchung**

Bezüglich der Grundlagen wurden die Oberflächenchemie mit einem Röntgen-Photoelektronenspektrometer (*X-ray photoelectron spectroscopy: XPS*), die Oberflächentopographie und -rauheit elektronen- und konfokalmikroskopisch und der Kontaktwinkel über die dynamische Kontaktwinkelmessung nach der Norm (ASTM D7334 und DIN 55660-2) bei der Robert Mathys Stiftung (RMS) (Bettlach, Schweiz) bestimmt.

### **3.6.1. XPS-Analyse**

Die XPS-Messungen wurden mit einem Kratos Axis-Nova (Kratos Analytical, Manchester, UK) durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden im Hochvakuum die Elektronen der Titanplättchen mit Röntgenstrahlen sehr stark angeregt. Dadurch verlassen Elektronen ihr Atom und folgend auch die Probenoberfläche. Die Energie dieser Photoelektronen wird mit einem hemisphärischen Analysator analysiert und ihre Bindungsenergie berechnet. Dies ermöglicht die quantitative Ermittlung der chemischen Zusammensetzung in den oberen 5-10nm der Probe.

Zunächst wurden von jeweils 3 nativen rauen Titanplättchen die Oberflächenchemie mit einem Röntgen-Photoelektronenspektrometer (*X-ray photoelectron spectroscopy*: XPS) bestimmt. Im Anschluss erfolgte bei 3 rauen Titanplättchen eine 12minütige UV-Photofunktionalisation als auch bei jeweils 3 weiteren rauen Titanplättchen eine Aktivierung im Plasmaofen mit Sauerstoff und zum anderen mit Argon über 12 Minuten. Danach erfolgt erneut die Beurteilung der Oberflächenchemie (Diagramm 1). Die Oberflächenbehandlung wurde direkt vor dem Einschleusen in das Röntgen-Photoelektronenspektrometer (XPS) durchgeführt.

Die Proben wurden auf einem Punkt in der Mitte der Platte analysiert. Die folgenden Einstellungen wurden verwendet:

- Röntgenquelle: monochromatische AlK $\alpha$  Bestrahlung (1486,7 eV), 225 W, Einstrahlwinkel von 54,6° (in Bezug auf die Normal-Oberfläche)
- Sputtering: -
- Electron Neutralisator: On
- Analysebereich: 700 x 300  $\mu$ m (FOV1, Slot)
- Analyse-Zeit: 26 bis 100s pro detailliertem Spektrum, 386s pro Übersichts-Spektrum
- Analyseinstrument: halbkugelförmig, senkrecht zur Probenoberfläche
- Detaillierte Spektren: 40 eV Durchlassenergie und 0,1 eV Intervallgröße (FWHM Ag3d<sub>5/2</sub> / 2: 0,6 eV)
- Übersichts-Spektren: 80 eV Pass Durchlassenergie und 0,5 eV Intervallgröße (FWHM Ag3d<sub>5/2</sub> / 2: 1,0 eV)

Es wurde konstant der Analysemodus benutzt.

#### Hill-Gleichung

Die Gleichung wurde 1910 ursprünglich für die Beschreibung der Bindung von Sauerstoff an Hämoglobin angewendet. Im Falle des Hämoglobins bindet Sauerstoff bis zum Grad der Sättigung leichter, je mehr Bindungsstellen schon besetzt sind. Die Gleichung beschreibt die kooperative (Wechselwirkung verschiedener Untereinheiten in einem Enzym) Bindung eines Substrates an einen Liganden (Hill 1910). In unserer Gleichung sind die Oxide der Ligand welcher an das Substrat Titan bindet.

$$r = \frac{n[S]^n}{K_d + [S]^n}$$

S= Substrat

n= Anzahl der substratgebundenen Liganden

$K_d$ =Dissoziationskonstante

Die Dicke der Oxidschicht auf dem metallischen Substrat wurde auf der Basis der Konzentrationen des metallischen und oxidierten Titans abgeschätzt (Hill-Gleichung) (Hill 1910). Die mittlere Eindringtiefe, vor einem Energieverlust, von Photoelektronen vom Ti2p Orbital in eine Titandioxidverbindung von 2,17nm wurde mit der Formel von *Tanuma et al.* berechnet (Tanuma et al. 2003). Die Dicke auf den Proben wurde mit einem Faktor von 0,88 korrigiert, um die Rauheit der Proben zu berücksichtigen (Gunter et al. 1997).

### Datenverarbeitung

Die Spektren wurden unter Verwendung von CasaXPS Software (V2.3.14, Casa Software Ltd., UK) analysiert. Die Spitzenwert-Verschiebung wurde durch Bezugnahme auf aliphatischen Kohlenstoff auf 285 eV korrigiert. Die Flächen der Spitzenwerte wurden nach Subtraktion eines iterativen Shirley Hintergrundes angegeben, dann durch die von Kratos vorgegebenen Empfindlichkeitsfaktoren korrigiert und anschließend die Zusammensetzung, bei der eine homogene Verbindung angenommen wurde, bestimmt.

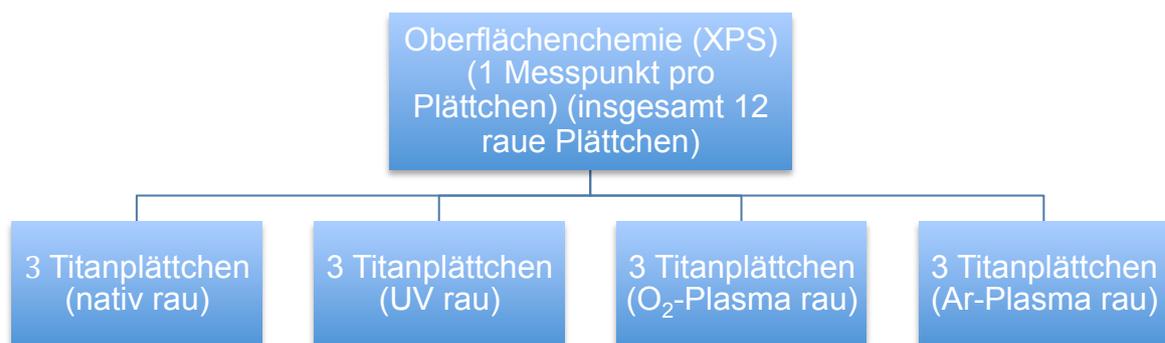


Diagramm 1: Plättchenanzahl und deren Verteilung für die XPS-Analyse; rau

### **3.6.2. Elektronenmikroskopie und Konfokalmikroskopie**

Mit dem Rasterelektronenmikroskop wurden hochauflösende Bilder der Oberflächentopographie der Plättchen in verschiedenen Vergrößerungen angefertigt, um die Struktur der Oberflächen bildlich darzustellen. Mit der Konfokalmikroskopie wurden, der Einstellung des Mikroskops entsprechend, die Makro- als auch die Mikrorauheit gemessen und mit entsprechender Software visualisiert.

Zunächst wurden von jeweils 3 nativen rauen Titanplättchen elektronenmikroskopisch die Oberflächentopographie bei der RMS (2544, Bettlach, Schweiz) bestimmt. Im Anschluss erfolgte bei 3 rauen Titanplättchen eine 12minütige UV-Photofunktionalisation als auch bei jeweils 3 weiteren rauen Titanplättchen eine Aktivierung im Plasmaofen mit Sauerstoff und zum anderen mit Argon über 12 Minuten. Danach erfolgt auch auf diesen die Beurteilung der Oberflächentopographie (Diagramm 2). Neben der Bestimmung der Oberflächentopographie wurde auf all diesen Plättchen auch Rauheitsmessungen (Makro- und Mikrorauheit) (Diagramm 3) mit einem Interferometrie- und Konfokalmikroskop durchgeführt.

#### Elektronenmikroskopie

- Rasterelektronenmikroskop Evo MA25 (Zeiss, 73447 Oberkochen, Germany)
- Software: Image Access Premium (Imagic, 8152 Glattbrugg, Schweiz)

#### Rauheitsmessung

- Gerät: S neox Interferometrie und Konfokalmikroskop (Sensofar, Spanien)
- Probenvorbereitung: keine
- Modus: Konfokalmikroskopie
- Objektiv: 20X, 50X
- Bildbearbeitung "Stitching": 6 x 1 (20x), 1x1 (50X)
- Analysierte Fläche: 4,8 x 0,66mm, Länge gemäß ISO 4288
- Datenverarbeitung: MountainsMap Software (Version 6.2.7487, Digital Surf, Besançon, Frankreich)
- Form Entfernung: Topographie: Polynomfunktion zweiten Grades
  
- Filter: Rauheit & Welligkeit: Gauß-Filter
- Kernel Rauheit: Doppel-Gauß-Filter

- angepasster Abstand  $\lambda_c$ : 800 $\mu\text{m}$  nach ISO 4288 in den meisten Fällen, 80 $\mu\text{m}$  um die Mikrorauheit zu bestimmen

An bestimmten Stellen wurde kein Signal erhalten (siehe "NM" in Topographien). Wenn die Bereiche dieser Areale klein waren (<1000 Pixel), wurden deren Höhen interpoliert (Änderung (der Dichte) von Bildpunkten (und damit besonders der Kontraste) durch die Berechnung benachbarter Bildpunkte), indem die Höhe von Arealen in der Nähe berücksichtigt wurde.

Wenn dies nicht möglich war, wurde das Label "NM" in den Topographien für "no mark" verwendet. Um die Rauheitsparameter zu bestimmen, wurden mehr als 12 Linienprofile aus den Topographien nach der Form-Entfernung extrahiert.

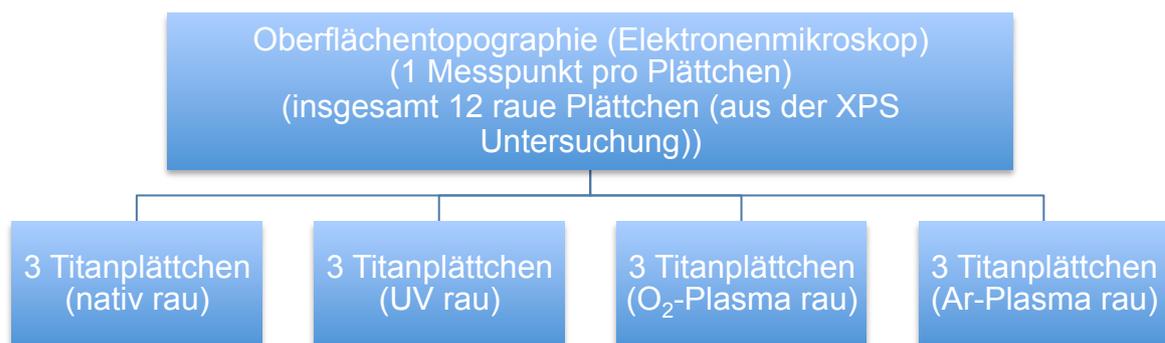


Diagramm 2: Plättchenanzahl und deren Verteilung für die Analyse der Oberflächentopographie mit dem Elektronenmikroskop; rau

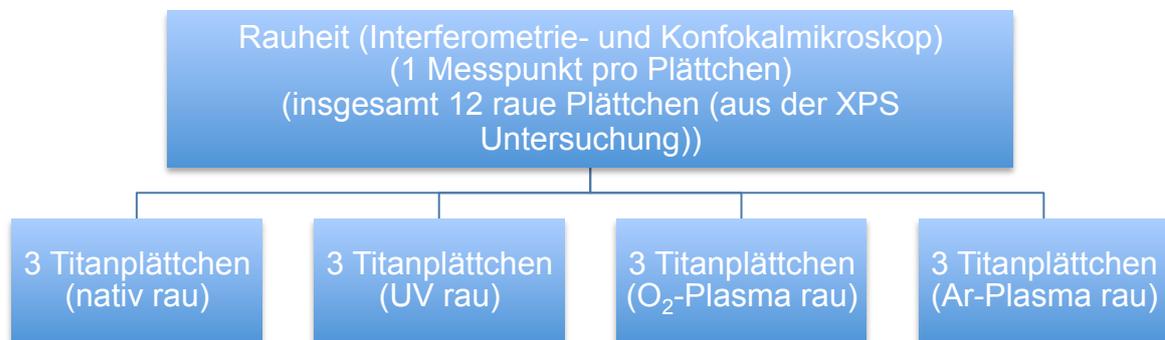


Diagramm 3: Plättchenanzahl und deren Verteilung für die Analyse der Rauheit mit dem Interferometrie- und Konfokalmikroskop; rau

### **3.6.3. Kontaktwinkelmessung**

Durch die bei der RMS (2544 Bettlach, Schweiz) durchgeführten dynamischen Kontaktwinkelmessungen nach der Norm (ASTM D7334 und DIN 55660-2) wurde das Benetzungsverhalten der Titanplättchen analysiert. Hierbei wird ein sich kontinuierlich vergrößernder Wassertropfen auf das jeweilige Titanplättchen aufgebracht. Jeweils nach der Einstellung des Gleichgewichtstropfens wird am Übergang von Tropfen zu Oberfläche des Titanplättchens jeweils links und rechts automatisiert der Kontaktwinkel im sogenannten Dreiphasenpunkt gemessen. Lediglich die Basislinie als Referenzlinie, welche die Oberfläche des jeweiligen Plättchens wiedergibt, wird per Hand nahegestellt. Aus den kontinuierlich erzeugten Kontaktwinkeln werden automatisiert Mittelwerte bestimmt. Der entstehende Kontaktwinkel hängt dabei einerseits von der Oberflächenrauheit und der Oberflächenchemie des Titanplättchens und andererseits von der der Flüssigkeit ab. Diesbezüglich spielen die polaren/ unpolaren Gruppen der aufeinandertreffenden Substanzen die Hauptrolle. Wir haben als Flüssigkeit Wasser (polar) mit bekannter Oberflächenspannung verwendet (polarer Anteil von 51, unpolarer Anteil von 21,8 (Software Surfens 4.3. Benutzerhandbuch)) verwendet. Ein großer Kontaktwinkel bedeutet wenig polare Gruppen auf der Oberfläche und eine hydrophobe

Oberfläche. Der Wassertropfen zerfließt nur sehr wenig. Ein kleiner Kontaktwinkel entsteht, wenn die Oberflächen des Titanplättchens und der Testflüssigkeit Wasser beide polare Gruppen enthalten und sich somit anziehen. Hier breitet sich der Tropfen gut auf der Oberfläche des Titanplättchens aus und man spricht von einer hydrophilen Oberfläche. Die Extreme dieser Gegensätze sind die Superhydrophobie, auch Lotuseffekt (Tropfen perlt auf der Oberfläche) genannt, und die Superhydrophilie. Bei der Superhydrophilie zerfließt der Flüssigkeitstropfen förmlich auf der Oberfläche und die Kontaktwinkel sind klein. Das Maß der Hydrophilie lässt sich mit dem Kontaktwinkel überprüfen, denn je kleiner dieser ist, desto hydrophiler ist das Titanplättchen. Zusätzlich werden hierbei Bilder der Tropfen erstellt.

Der Kontaktwinkel wurde an jeweils 2 Titanplättchen (rau/glatt) pro Versuchsgruppe (nativ, UV, Ar-Plasma, O<sub>2</sub>-Plasma) ermittelt (Diagramm 4). Die Bestrahlung der Titanplättchen erfolgte unmittelbar vor der dynamischen Kontaktwinkelmessung, mit dem Kontaktwinkelmessgerät (Surftens universal OEG® GmbH, Frankfurt, Deutschland). Es wurde an 3 verschiedenen Stellen gemessen und mit der zugehörigen Software Surftens 4.3. (OEG GmbH, Frankfurt, Deutschland) automatisiert ausgewertet.

#### Dynamische Kontaktwinkelmessung

- Gerät: Kontaktwinkelmessgerät Surftens universal (OEG® GmbH, Frankfurt, Deutschland)
- Probenvorbereitung: keine
- Testflüssigkeit: Wasser
- Messbereich: 1°—180° Kontaktwinkel
- Kamera: s/w USB 2.0 CMOS-Kamera 1,3 Megapixel
- Dispenssystem: manuelles Direktdispenssystem
- Lichtquelle: LED-Beleuchtung mit Kondensator
- Optik: Mikroobjektiv 0,8x
- Datenverarbeitung: Software: Surftens 4.3. (OEG GmbH, Frankfurt, Deutschland)

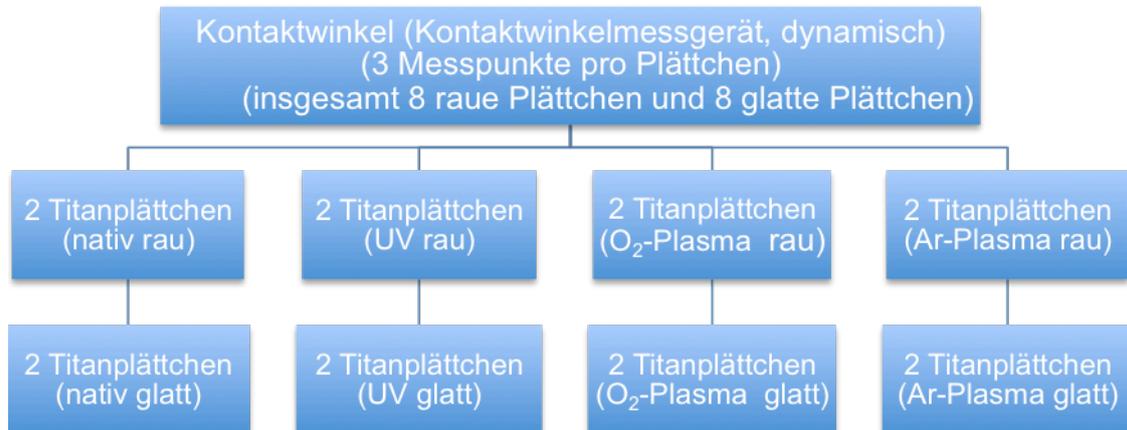


Diagramm 4: Plättchenanzahl und deren Verteilung für die Analyse der Kontaktwinkeln mit dem Kontaktwinkelmessgerät, dynamisch; rau und glatt

### **3.7. *in-vitro*: Kultivierung muriner immortalisierter Präosteoblasten (Zelllinie MC3T3-E1)**

Hierbei handelt es sich um eine etablierte Zelllinie von Präosteoblasten, die obwohl sie murinen Ursprungs ist, als gute Alternative für die *in vitro* Testung von Biomaterialien angesehen werden und repräsentativ für osteogenes Wachstum ist (Czekanska et al. 2012).

#### **Komplett-Wachstumsmedium**

Das Basismedium für diese Zelllinie ist Alpha Minimum Essential Medium 500ml mit Ribonukleosiden, Desoxyribonucleosiden, 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat, aber ohne Ascorbinsäure (GIBCO, Gaithersburg, MD 20877, USA). Um das vollständige Wachstumsmedium zu erhalten, werden 50ml fetales Kälberserum (FBS) (Endkonzentration 10%), 5ml Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration: 100units/ml Penicillin & 100µg/ml Streptomycin) dem Basismedium hinzugefügt und bis zum Verbrauch für bis zu einem Monat bei 4° Celsius gelagert.

#### **Kulturbedingungen**

Die Zellen werden in Zellkulturflaschen (T-175) bei 37° Celsius im Brutschrank kultiviert. Die Atmosphäre setzt sich aus 95% Luft und 5% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) zusammen.

#### **Subkultivierung**

Die Zellen vom Typ MC3T3-E1 wurden in T-175er Zellkulturflaschen mit 19ml Komplett-Wachstumsmedium in einem Subkulturverhältnis von 1:6 kultiviert und an jedem vierten Tag weiterpassagiert. Die Subkonfluenz und die Morphologie der Kultur wurden phasenmikroskopisch überprüft.

Um die Zellen zu passagieren wurde der Überstand abgesaugt und mit 10ml Phosphate Buffered Saline (PBS) gespült. Nachdem Schwenkbewegungen durchgeführt wurden, wurde der Überstand abpipettiert. Darauf wurden 6ml Trypsin 0,05% auf die Zellen pipettiert und die Zellkulturflasche für 5 Minuten im Brutschrank bei 37° Celsius, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach erfolgte das Schwenken der Zellkulturflasche und die mikroskopische Überprüfung der Ablösung der Zellen. Im Anschluss wurden 6ml Wachstumsmedium

hinzugegeben und mehrmalig hoch und runterpipettiert um Verklumpungen zu lösen und die Trypsinierung zu stoppen. Falls gewünscht, konnten zur Erhöhung der Zelldichte und/oder zum Wechseln des Mediums, die Zellen bei 1500 rpm in 50ml Falcon Tubes zentrifugiert werden und die Zelldichte durch Zugabe von Zellkulturmedium angepasst werden. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges hoch- und runterpipettieren resuspendiert.

Nach dem Subkulturverhältnis von 1:6 wurden die Aliquots der Zellen in neue T175-Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank bei 37° Celsius, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Zellzählung

Das Zählen der Zellen findet unter dem Mikroskop in einer verbesserten Neubauer Zählkammer statt. 10µl Zellsuspension werden mit 90µl Trypanblau-Lösung gemischt, in die Zählkammer pipettieren und die 4 Großquadrate ausgezählt. Der Durchschnitt pro Großquadrat ergibt die Zelldichte der unverdünnten Zellsuspension in 10<sup>4</sup> Zellen pro ml.

### Aussähen der gewünschten Zellzahl auf Prüfmuster

Aus den inkubierten Zellen wurden Zellsuspensionen aus Komplet-Wachstumsmedium und Zellen hergestellt. Für die LDH-, BrdU-, XTT-Assays und das Live-Dead-Staining (LDS); 72h enthält 1ml der Zellsuspension 5,5 x 10<sup>4</sup> Zellen und für LDS; 2, 24h enthält 1ml 2,4 x 10<sup>5</sup> Zellen. Pro Well wurde 1ml Zellsuspension gleichmäßig auf die Prüfmuster aufgetragen. Es wurden 24-Well Zellkultur Platten verwendet. Für das LDS wurden 12-Well Zellkultur-Platten verwendet. Der Zellzahlunterschied zwischen dem Zeitpunkt 72h und den Zeitpunkten 2h und 24h wurde später rechnerisch angepasst.

Danach wurden die Platten in den Brutschrank überführt und bei 37° Celsius, 5% CO<sub>2</sub> je nach Zeitintervall inkubiert. Für die anschließenden XTT- und BrdU-Assays, sowie für das LDS wurden jeweils separate Prüfmuster inkubiert. Die LDH-Assays konnten mit dem Zellkultur-Überstand aus diesen Platten durchgeführt werden. Als Kontroll-Ansätze wurden auch reines Medium, reine Zellen, Wako/ RM-A (Positiv- / Negativkontrolle) und für den BrdU-Assay als Hintergrundkontrolle reine Zellen, auf die später keine BrdU-Markierungs-Lösung pipettiert wurde, ausgesät.

Während der Inkubationszeit werden die Wells unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Die Zellen um die Prüfmuster herum sollten gleichmäßig ausgesät werden und eine typische Morphologie aufweisen. Die mit der Positiv-Kontrolle inkubierten Zellen mussten hierfür abgerundet erscheinen.

### **3.8. *in-vitro*: Assays mit der Zellkultur**

1. LDS: Morphologie, Zellzahl (Attachment)

2. BrdU: Proliferation

3. XTT: Viabilität

4. LDH: Zytotoxizität

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach 2, 24 und 72 Stunden und die Viabilität nach 48h. Für die Bestimmung der Zytotoxizität und der Proliferation wurden die Zellen über mehrere Tage inkubiert und nach 24, 48 und 72h analysiert. Die Assays, mit denen Aktivitäten oder Komponenten im Medium gemessen wurden, wurden immer einen Tag nach Mediumwechsel durchgeführt. Die Viabilitäts-, Zytotoxizitäts- und die Proliferationsassays wurden in 2 Replikaten ausgeführt.

#### **3.8.1. LDS: Morphologie, Zellzahl (Attachment)**

Der folgende Vorgang wurde nach 2, 24 und 72 Stunden Kultivierung durchgeführt.

##### LDS

Für das Live-Dead-Staining muss zuerst Fluoreszindiacetat (FDA) Bestands-Lösung angesetzt werden. Hierfür werden 5 mg/ml FDA in Aceton gelöst und in lichtundurchlässigen Röhrchen bei -20° Celsius gelagert. Zusätzlich wird Propidiumiodid- (PI) Bestands-Lösung angesetzt. 50 µg/ml PI werden in PBS gelöst und in lichtundurchlässigem Röhrchen bei 4° Celsius gelagert. Um nun die FDA-Arbeits-Lösung anzusetzen muss 40µl FDA-Bestands-Lösung in 10ml PBS pipettiert und gut gemischt werden. 500µl FDA-Arbeits-Lösung und 60µl PI- Bestands-Lösung werden in ein Well mit

Prüfmuster geben und vorsichtig gemischt. Nach kurzer Inkubation von 3 Minuten in Raumtemperatur wird das Titanplättchen entnommen, in 37° Celsius warmem PBS gewaschen, um die nicht adhärenen Zellen zu entfernen. Die Fotografie erfolgt in 3 verschiedenen Vergrößerungen (4x, 10x, 20x) von 5 Stellen des Plättchens (mittig, oben, rechts, unten, links) unter dem Fluoreszenzmikroskop und die Auszählung der Zellen wird mit einer Software ImageJ (Release 1.5h, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) automatisiert durchgeführt.

Wirkprinzip:

Lebensfähige Zellen umgibt eine intakte Plasmamembran und sie haben eine intrazelluläre Esteraseaktivität, welche durch die esteraseabhängige Hydrolyse von nicht fluoreszierendem, polaren, lipophoben, membrangängigen Fluoreszindiacetat (FDA) zu dem grün fluoreszierenden Metaboliten Fluoreszin dargestellt wird. In der intakten Zelle liegt nun Fluoreszin vor und diese lipophile, nicht membrandurchdringende, hochpolare fluoreszierende Verbindung ist wegen ihrer Polarität nicht in der Lage, über die Plasmamembran zu diffundieren. Fluoreszin wird somit innerhalb der lebenden Zellen zurückgehalten, wodurch eine grüne Fluoreszenz im Zytoplasma entsteht.

Propidiumiodid hingegen kann nicht lebensfähige Zellen mit nicht intakter/ beschädigter Plasmamembran erkenntlich machen, indem es nur in Zellen mit nicht intakter Zellmembran eindringen kann. Hier lagert es sich in die DNS ein. So kommt es zu einer roten Fluoreszenz in den Zellkernen nicht lebensfähiger Zellen (Sigma-Aldrich 2017, Jones und Senft 1984).

### Zellzahl

Die Auszählung der Zellen erfolgt automatisiert mit der Software ImageJ (Release 1.5h, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) auf Grundlage der mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder. Es werden nur die lebenden, grün fluoreszierenden Zellen gezählt.

### Morphologie

Die Morphologie der Zellen ist auf den aufgenommenen Bildern gut zu erkennen, da der Fluoreszenzfarbstoffs Fluoreszin auch die Zellausläufer klar sichtbar darstellt. Der Kontrast von grünen Zellen auf einem anthraziten Hintergrund ist sehr gut.

### **3.8.2. BrdU: Proliferation**

#### *BrdU-Assay*

Das "Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)" Test-Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Nach 24, 48 und 72 Stunden der Kultivierung wurden die Zellen in den einzelnen Zellkulturgefäßen mit 100µl BrdU-Markierungs-Lösung für 2 Stunden unter Zellkulturbedingungen markiert. Für die BrdU-Markierungs-Lösung wurde BrdU-Markierungs-Lösung 1:100 in Zellkulturmedium verdünnt. In die Wells für die Hintergrundkontrolle wurde keine BrdU-Markierungs-Lösung pipettiert. Dann wurde der Überstand wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1ml FixDenat Reagenz pro Well fixiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Ab hier konnte unsteril gearbeitet werden. Dann wurden die fixierten Zellen für 1 Stunde mit 1ml Anti-BrdU-POD-Arbeits-Lösung pro Well inkubiert. Um Anti-BrdU-POD-Arbeits-Lösung anzusetzen muss zuvor Anti-BrdU-POD-Bestands-Lösung angesetzt werden, indem 1,1ml Aqua dest. in das Bestandsgefäß gegeben wurde, um dann 10 Minuten zu vortexen. Zum Abschluss musste noch Anti-BrdU-POD-Bestands-Lösung 1:100 mit Antibody-Verdünnungs-Lösung verdünnt werden. Der Überstand wurde abgesaugt. Danach wurde 3 Mal für 5 Minuten mit 1ml pro Well Waschpuffer gewaschen und der Überstand abgesaugt. Nach abgeschlossener Substratreaktion (1ml Substrat-Lösung pro Well) zur Farbentwicklung mit Tetramethylbenzidin (TMB) (20 Minuten bei Raumtemperatur), folgte die Detektion der Immunkomplexe in einer 96-Well Platte durch die Zugabe von 100µl des Überstands und 25µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, um die Reaktion zu stoppen, und unter Messung der Extinktion mit einem Multi-Well-Spektrophotometer (ELISA reader). Das Messen der optischen Dichte geschah mit Filtern für eine Referenzwellenlänge bei 450nm und 690nm im Biorad 680 Micro plate reader.

#### Wirkprinzip:

Da die Replikation der genomischen DNS die Grundlage der zellulären Proliferation ist, quantifiziert der BrdU-Test diese indirekt, indem während der S-Phase der Mitose von proliferierenden Zellen nicht Thymidin sondern das Pyrimidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in die neusynthetisierte DNS eingebaut wird. Dann denaturiert FixDenat die DNS, damit der an Peroxidase gekoppelte Testsystem-Antikörper (Anti-BrdU-POD), unter Bildung eines Immunkomplexes, an das inkorporierte BrdU binden kann. Die an den Komplex konjugierte Peroxidase setzt das danach zugegebene Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen Farbstoff um. Durch die Zugabe von Schwefelsäure in der 96-Well Platte schlägt der Farbstoff dann nach gelb um. Es folgt die

photometrische Messung. Die Anzahl proliferierender Zellen korreliert mit der Farbintensität und der Menge an neu eingebautem BrdU in der DNS. Andersherum bedingt eine hohe Zellschädigung niedrige Extinktionen. Eine Positivkontrolle (Zellen nur mit Zellkulturmedium behandelt), bei der die Substratumsetzung als maximal (100% BrdU-Inkorporation) und eine Negativkontrolle, bei der die Substratumsetzung als minimal galt, wurden als Referenz verwendet (Reichl, Roche Diagnostics GmbH 2008, Roche Diagnostics GmbH 2013).

### **3.8.3. XTT: Viabilität**

#### *XTT-Assay*

Das "Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Nach 48h Kultivierung wurde das Elektronen-Kupplungs-Reagenz mit der XTT-Markierungs-Reagenz (1:50 verdünnt) vermischt und 50µl in jedes Zellkulturgefäß gegeben. Nach 4 Stunden unter Zellkulturbedingungen im Brutschrank bei 37° Celsius, 5% CO<sub>2</sub> wurde die Substratumsetzung quantifiziert, indem die Extinktion von 100 µl Aliquots in einer neuen 96-Well Platte mit einem Multi-Well-Spektrophotometer (ELISA reader) gemessen wurde. Das Messen der optischen Dichte geschieht mit Filtern für eine Referenzwellenlänge bei 450nm und 690nm im Biorad 650 Micro plate reader.

#### Wirkprinzip:

Das Testergebnis spiegelt die metabolische Aktivität lebender Zellen wieder, indem der Einfluss der einzelnen Testplättchen auf die intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Präosteoblasten analysiert wird. Das Tetrazolium-Salz XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) reagiert nach 48h Inkubationszeit mit den aktiven intramitochondrialen Dehydrogenasen der Präosteoblasten. Tetrazolium-Salze werden in Gegenwart eines Elektronenkupplungsmittels im Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System zu wasserlöslichem Formazan gespalten, welches zur Atmungskette der Mitochondrien gehört, und ist nur in metabolisch intakten Zellen aktiv, da der Vorgang an die NAD(P)H-Produktion durch Glykolyse gebunden ist. Die Intensität der orangenen Farbbildung wird photometrisch über ein Microtiterplattenlesegerät wiedergegeben und analysiert. Es besteht eine direkte Korrelation der Menge des gebildeten Formazan Farbstoffs und der Anzahl der metabolisch aktiven Zellen in der Kultur (Reichl, Roche Diagnostics GmbH 2008, Roche Diagnostics GmbH 2016).

### **3.8.4. LDH: Zytotoxizität**

#### *LDH-Assay*

Das "LDH-Zytotoxizität Assay Kit II" (BioVision, Milpitas, CA 95035, USA) wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zusammengefasst wurden nach 24, 48 und 72 Stunden der Kultivierung 10µl des Zellkultur-Überstandes aus den Kulturgefäßen mit 100µl der Lactatedehydrogenase-Reaktionsmischung in eine 96-Well Platte überführt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von hier an konnte unsteril gearbeitet werden. Die LDH-Reaktionsmischung bestand aus 200µl WST Substrate Mix und 10ml LDH-Assay Buffer. Die Reaktion wurde mit Stopp-Lösung gestoppt und die Extinktion mit einem Multi-Well-Spektrophotometer (ELISA reader) gemessen. Die Messung der optischen Dichte geschah bei 450nm und 650nm (Referenz) im Biorad 680 Micro plate reader.

#### Wirkprinzip:

Für den *in-vitro* Zytotoxizitätstest ist das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) grundlegend. Es ist im Zytoplasma von Zellen aktiv. Gehen Präosteoblasten zu Grunde, wird es freigesetzt und die LDH-Aktivität ist im Zellkulturmedium über einen enzymatischen Kopplungstest, bestehend aus zwei Redoxreaktionen, messbar. Laktat wird durch die LDH zu Pyruvat oxidiert. Gleichzeitig wird  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}/\text{H}^+$  reduziert, indem Wasserstoff vom Substrat Laktat übertragen wird. Wasserstoff vom  $\text{NADH}/\text{H}^+$  wird durch Diaphorase auf das gelbfarbene Tetrazolium-Salz (INT) (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) transferiert. Es folgt dann die Reduktion von INT zu Formazan-Salz während das  $\text{NADH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  oxidiert wird. Es kommt zu einem roten Farbumschlag. Also hängt die Höhe der kolorimetrischen Farbstoffmessung von der Menge des gebildeten Formazan-Salzes, welche direkt proportional zur Anzahl geschädigter Zellen ist, ab und korreliert mit der Menge an freigesetzter LDH im Überstand. Eine Positivkontrolle (RM-A), bei der die Substratumsetzung als maximal 100% (Zellen vollständig lysiert) und eine Negativkontrolle, bei der die Substratumsetzung als minimal 0% (Zellen nur mit Zellkulturmedium behandelt) angenommen wird, werden als Referenz verwendet. Dementsprechend ist die LDH-Enzymaktivität im Überstand hoch oder niedrig (Reichl, Roche Diagnostics GmbH 2008, BioVision 2016).

### **3.9. Ablauf der *in-vitro* Untersuchungen**

Nach Erfassung der Grundlagenparameter erfolgte eine *in vitro* Beurteilung im Zellkulturlabor. Hierzu wurden insgesamt 172 glatte und 208 raue Titanplättchen verwendet (Diagramm 5).

Von den 172 glatten Plättchen waren 43 Plättchen nativ, 43 Plättchen über 12 Minuten UV-oberflächenfunktionalisiert, 43 Plättchen über 12 Minuten Ar-Plasma-aktiviert und 43 Plättchen über 12 Minuten O<sub>2</sub>-Plasma-aktiviert. Jeweils 16 Plättchen aus jeder Gruppe wurden für das LDS verwendet. Für die Messzeitpunkte nach 2h und 24h wurden jeweils 6 Plättchen aus jeder Gruppe verwendet. Für den Messzeitpunkt nach 72h wurden 4 Plättchen aus jeder Gruppe verwendet. Jeweils 6 Plättchen aus jeder Gruppe wurden für die Viabilitätsmessung nach 48h verwendet. Jeweils 21 Plättchen aus jeder Gruppe wurden für die Proliferationsmessung verwendet, 6 Plättchen jeder Gruppe für die Messzeitpunkte nach 24h und 48h und 9 Plättchen jeder Gruppe für den Messzeitpunkte nach 72h.

Von den 208 rauen Plättchen waren 52 Plättchen nativ, 52 Plättchen über 12 Minuten UV-oberflächenfunktionalisiert, 52 Plättchen über 12 Minuten Ar-Plasma-aktiviert und 52 Plättchen über 12 Minuten O<sub>2</sub>-Plasma-aktiviert. Jeweils 16 Plättchen aus jeder Gruppe wurden für das LDS verwendet. Für die Messzeitpunkte nach 2h und 24h wurden jeweils 6 Plättchen aus jeder Gruppe verwendet. Für den Messzeitpunkt nach 72h wurden 4 Plättchen aus jeder Gruppe verwendet. Jeweils 9 Plättchen aus jeder Gruppe wurden für die Viabilitätsmessung nach 48h verwendet. Jeweils 27 Plättchen aus jeder Gruppe wurden für die Proliferationsmessung verwendet, jeweils 9 Plättchen jeder Gruppe zu den Untersuchungszeitpunkten 24h, 48h und 72h.

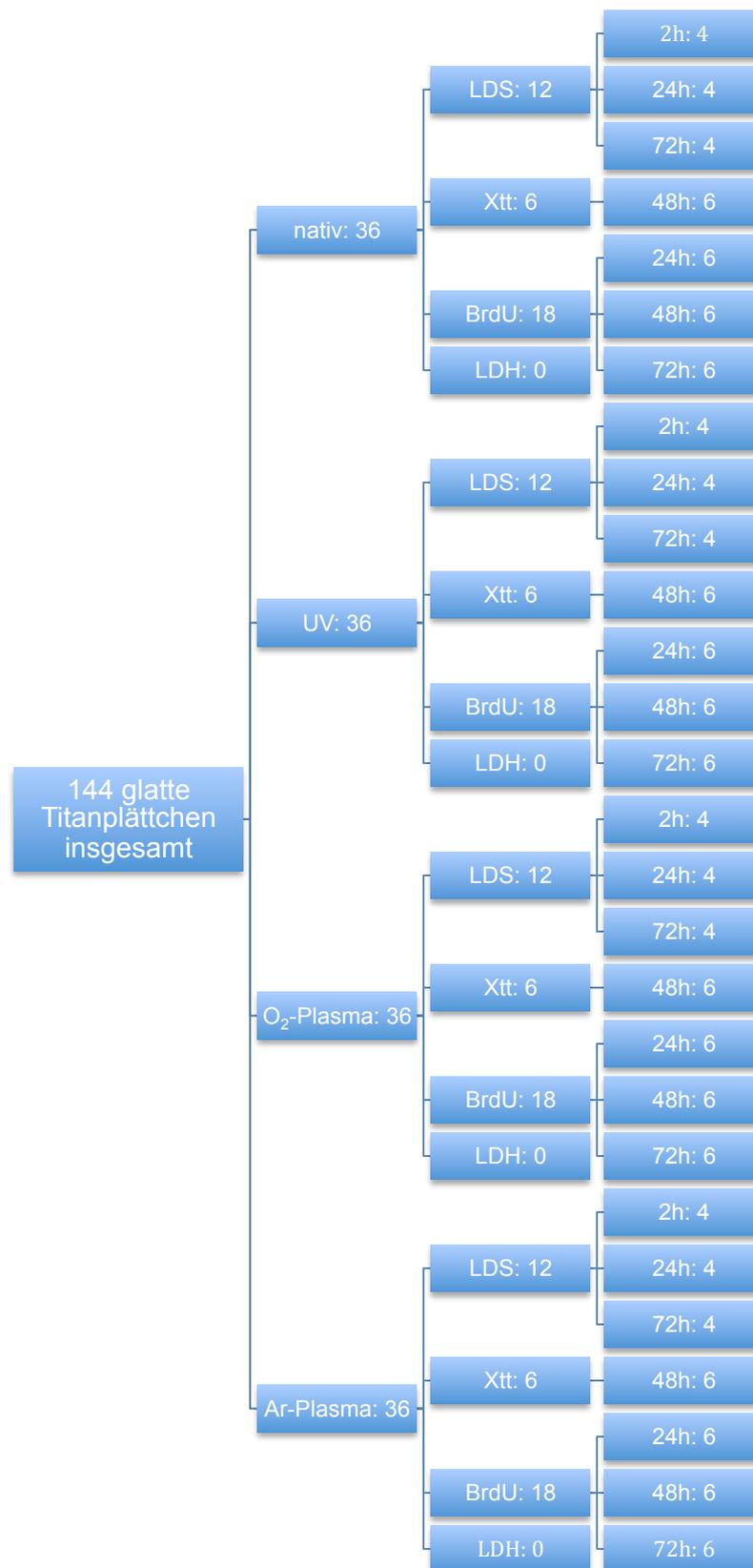
Die Titanplättchen wurden in Zellkulturplatten (12- und 24- Well) gegeben und mit Nährmedium sowie den präparierten Zellen (1ml mit  $5,5 \times 10^4$  Zellen und für LDS; 2, 24h: 1ml mit  $2,4 \times 10^5$  Zellen) beschickt. Die Plättchen wurden bei 37° C in einem Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub>-Athmosphäre inkubiert.

Als Negativ-, bzw. Positivkontrolle wurden RM-A und Wako verwendet. Da diese unsteril sind, erfolgte die Sterilisation unter der sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Handschuhe und OP-Tücher. Für jede Prüfmuster-Sorte wurde eine Petrischale mit Isopropanol (100%) gefüllt. Die Prüfmuster wurden in die Petrischale gelegt, so dass die Prüfmuster gut mit Isopropanol bedeckt waren. Nach 5 Minuten wurden die Prüfmuster manuell auf ein steriles Tuch gelegt und dort für 10 Minuten getrocknet.

Die Zellen wurden dann zu den Zeitpunkten 2h, 48h und 72h bezüglich (1) Anheftungsverhalten (Live-Dead-Staining: LDS), zum Zeitpunkt 48h bezüglich (2) Viabilität und zu den Zeitpunkten 24h, 48h und 72h bezüglich (3) Toxizitätsreaktion und (4) Proliferation untersucht.

Für die Toxizitätsuntersuchung mussten keine weiteren Titanplättchen verwendet werden, da der Überstand aus der Versuchsreihe von BrdU und XTT untersucht wurde.

a)



b)



Diagramm 5: Plättchenanzahl und deren Verteilung für die *in vitro* Untersuchung; a) glatt, b) rau

Für den beim LDS untersuchten Inkubationszeitpunkt 72h wurde damit die Präosteoblasten die Plättchen nicht überwuchern, eine kleinere Zellzahl von 55.000 Zellen pro Well verwendet. Zu allen anderen Zeitpunkten wurden 240.000 Zellen pro Well benutzt. Damit die Zellzahlen nach 72h mit den anderen beiden Untersuchungszeitpunkten (2h, 24h) vergleichbar bleiben, und um zwischen den Zeitpunkten einen Wachstumsvergleich anstellen zu können, muss also nach der Zellzählung beim Zeitpunkt 72h mit dem Faktor 4,364 ( $240.000/55.000$ ) multipliziert werden.

### **3.10. Statistische Analyse**

Mit Hilfe von IBM® SPSS® Statistics 23 Software (IBM®, Armonk, New York, USA) wurde die statistische Analyse durchgeführt.

Für die statistische Analyse der LDH-Assays rau und glatt wurden jeweils 6 Proben ( $n=6$ ) für jede Gruppe (unbehandelt, UV, Ar-Plasma, O<sub>2</sub>-Plasma) und 4 Positivkontrollen ( $n=4$ , RM-A) zum Zeitpunkt 24h in die Rechnung einbezogen.

Für die statistische Analyse der BrdU- und XTT-Assays der rauhen und glatten Proben wurden pro Gruppe (unbehandelt / Positivkontrolle, UV, Ar-Plasma, O<sub>2</sub>-Plasma) und Zeitpunkt (24h, 48h, 72h), (XTT nur 48h) 6 Proben ( $n=6$ ) verwendet.

Für die Zellzählung mittels LDS wurden pro Zeitpunkt (2h, 24h, 72h) bei 4x Vergrößerung sowohl für die rauhen als auch für die glatten Proben 20 Werte ( $n=20$ ) für jede Gruppe (unbehandelt / Positivkontrolle, UV, Ar-Plasma, O<sub>2</sub>-Plasma) ausgewertet. Dabei wurden 4 Proben (5 Werte pro Probe) pro Gruppe verwendet.

Für die statistische Auswertung der Kontaktwinkel (paarig: rechts und links) konnten für raue/ glatte Proben in den jeweiligen Gruppen Fallzahlen von  $n=154/ 219$  für unbehandelt (Positivkontrolle),  $n=63 /85$  für UV,  $n=22/44$  für O<sub>2</sub>-Plasma und  $n=22/27$  für Ar-Plasma ausgewertet werden.

Die Zellkultur-Experimente wurden in 3er-Gruppen (LDH/BrdU/XTT) und in 2er-Gruppen (LDS) in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Um Unterschiede zwischen den Testgruppen und den Vergleichsgruppen anzustellen, wurden *Kruskal-Wallis* Tests mit *post-hoc Bonferroni* Korrektur angewendet. P-Werte  $\leq 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Oberflächenparameter nach jeder einzelnen Oberflächenbehandlung wurden über 2-seitige *t*-Test statistisch ausgewertet. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt ( $p \leq 0.05$ ).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der Grundlagenuntersuchung

#### 4.1.1. Oberflächenchemie (XPS)

Die Übersichts-Spektren der Titanplättchen zeigten prominente Signale von Sauerstoff, Titan und Kohlenstoff (Abbildung 1 und Tabelle 1). In Abhängigkeit der analysierten Plättchen gab es zusätzlich Spuren von Stickstoff, Fluor, Magnesium, Silicium, Schwefel und / oder Kalzium.

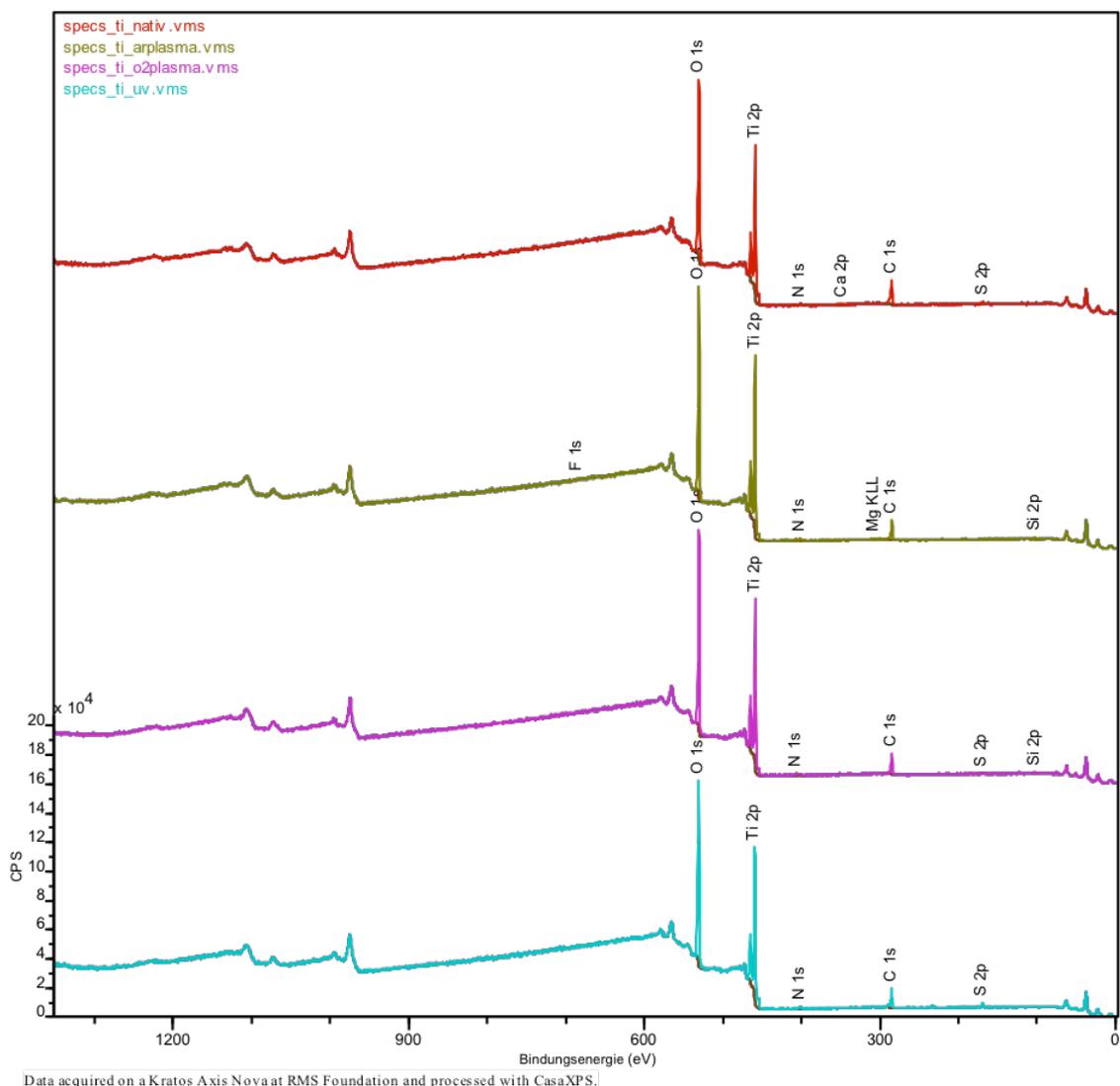
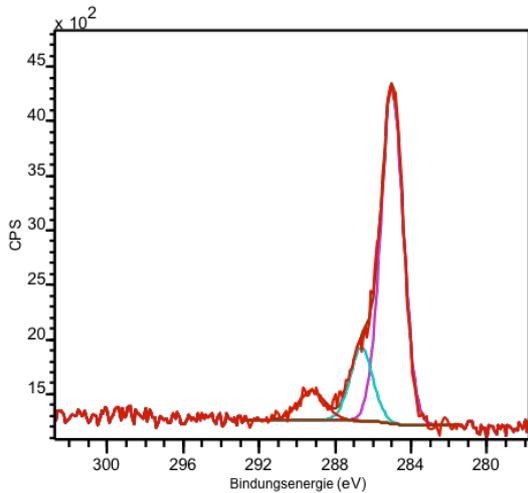


Abbildung1: Übersichtsspektren der Titanplättchen, nativ, nach Ar-Plasmaaktivierung, nach O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung, nach UV-Photofunktionalisation (von oben nach unten). Nicht markierte Signale sind von anderen Orbitalen der genannten Elemente, z.B. O<sub>2s</sub> bei 23 eV.

| Behandlung             | Konzentration [at%] auf rauen Plättchen |        |        |     |      |       |                    |                  |                   |                  |                      |     |      |     |     |     |
|------------------------|---|--------|--------|-----|------|-------|--------------------|------------------|-------------------|------------------|----------------------|-----|------|-----|-----|-----|
|                        | Ti <sub>met</sub>                       | Ti(II) | Ti(IV) | O I | O II | O III | C <sub>aliph</sub> | C <sub>C-O</sub> | C <sub>COOx</sub> | N <sub>org</sub> | N <sub>nitrate</sub> | F   | Mg   | Si  | S   | Ca  |
| nativ                  | 1.3                                     | 1.4    | 19     | 40  | 11   | 3     | 14                 | 4.0              | 3.4               | 1.2              | 0.3                  | 0.0 | 0.0  | 0.0 | 0.8 | 0.2 |
| nativ                  | 1.4                                     | 1.2    | 20     | 40  | 11   | 3     | 15                 | 4.4              | 3.3               | 1.2              | 0.0                  | 0.0 | 0.04 | 0.0 | 0.6 | 0.0 |
| nativ                  | 1.3                                     | 1.3    | 20     | 42  | 10   | 2     | 14                 | 3.9              | 3.3               | 1.0              | 0.2                  | 0.0 | 0.0  | 0.0 | 0.5 | 0.0 |
| Ar-Plasma              | 0.7                                     | 0.7    | 23     | 46  | 8    | 4     | 12                 | 2.6              | 1.3               | 0.8              | 0.5                  | 0.2 | 0.04 | 0.7 | 0.0 | 0.0 |
| Ar-Plasma              | 0.7                                     | 0.8    | 23     | 46  | 8    | 4     | 12                 | 2.7              | 1.2               | 0.8              | 0.5                  | 0.5 | 0.0  | 0.6 | 0.0 | 0.0 |
| Ar-Plasma              | 0.8                                     | 0.7    | 23     | 47  | 8    | 3     | 12                 | 2.6              | 1.1               | 1.1              | 0.7                  | 0.2 | 0.0  | 0.8 | 0.0 | 0.1 |
| O <sub>2</sub> -Plasma | 0.8                                     | 0.9    | 22     | 44  | 8    | 5     | 13                 | 2.7              | 0.9               | 0.6              | 0.8                  | 0.0 | 0.0  | 1.1 | 0.2 | 0.0 |
| O <sub>2</sub> -Plasma | 0.8                                     | 0.9    | 22     | 44  | 8    | 4     | 13                 | 2.7              | 0.9               | 0.5              | 0.9                  | 0.7 | 0.0  | 0.5 | 0.0 | 0.0 |
| O <sub>2</sub> -Plasma | 0.8                                     | 0.9    | 23     | 44  | 8    | 4     | 13                 | 2.8              | 1.2               | 0.6              | 0.9                  | 0.2 | 0.0  | 0.9 | 0.0 | 0.0 |
| UV                     | 1.1                                     | 1.3    | 21     | 38  | 14   | 5     | 12                 | 3.0              | 2.0               | 1.5              | 0.2                  | 0.0 | 0.0  | 0.0 | 1.6 | 0.0 |
| UV                     | 1.3                                     | 1.3    | 22     | 43  | 10   | 4     | 13                 | 2.9              | 1.6               | 0.4              | 0.4                  | 0.0 | 0.0  | 0.4 | 0.0 | 0.0 |
| UV                     | 1.2                                     | 1.2    | 22     | 42  | 10   | 3     | 13                 | 3.0              | 1.7               | 0.7              | 0.3                  | 0.0 | 0.0  | 0.6 | 0.5 | 0.0 |

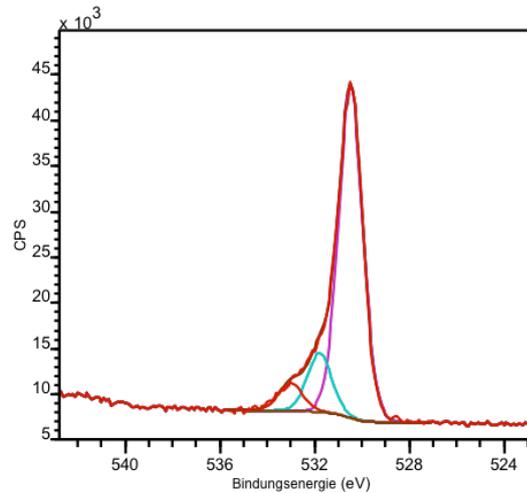
Tabelle 1: Oberflächenzusammensetzung der Plättchen. Die Messunsicherheit der Konzentrationen liegt für die Hauptelemente bei 15% und bis zu 100% für die Spurenelemente(<1 at%).

**O1s**



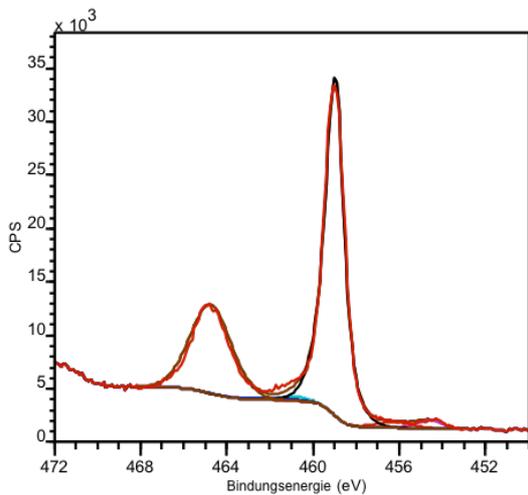
Data acquired on a Kratos Axis Nova at RMS Foundation and processed wi

**Ti2p**



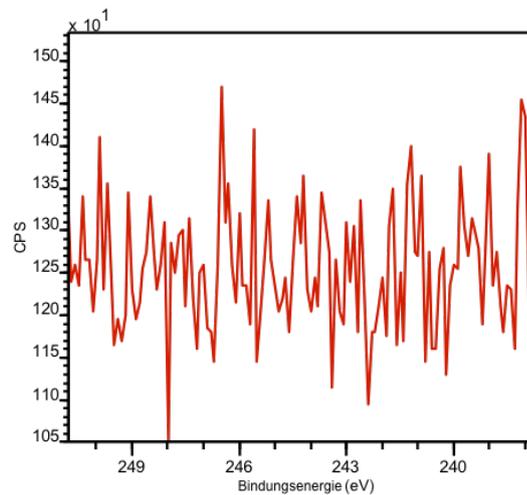
Data acquired on a Kratos Axis Nova at RMS Foundation and processed wi

**C1s**



Data acquired on a Kratos Axis Nova at RMS Foundation and processed wi

**Ar2p**



Data acquired on a Kratos Axis Nova at RMS Foundation and processed wi

Abbildung 2: Detaillierte Spektren auf rauem Plättchen nach Ar-Plasma-Behandlung

Zusätzlich zu den Übersichts-Spektren wurden detaillierte Spektren von Sauerstoff 1s, Titan 2p, Kohlenstoff 1s und Argon 2p angefertigt. Abbildung 2 zeigt ein Beispiel eines Plättchens nach der Argon-Plasmabehandlung. Die anderen Plättchen, nativ, O<sub>2</sub>-Plasma- und UV- behandelt, zeigten ähnliche Spektren. Das Signal von Sauerstoff wurde mit drei Spitzenwerten versehen: Dem Haupt-Spitzenwert bei einer Bindungsenergie von  $530,4 \pm 0,1$  eV ist TiO und TiO<sub>2</sub> zuzuordnen. Es gab zwei weitere Spitzenwerte bei höheren Bindungsenergien von 531,8 und 533,0 eV. Der erste ist durch OH-Gruppen auf dem Metall und in organischen Verbindungen entstanden. Der spätere könnte auf Grund von

doppelt gebundenem Sauerstoff oder auf Grund von adsorbiertem Wasser auf der Probenoberfläche entstanden sein. Das Signal von Ti2p besteht aus Doppelspitzenwerten  $Ti2p_{3/2}$  und  $Ti2p_{1/2}$  auf Grund der Spin-Bahn-Aufspaltung. Der wichtigste Beitrag ist von Titan mit der Oxidationsstufe IV ( $TiO_2$ ) bei  $458,9 \pm 0,1$  eV ( $Ti2p_{3/2}$ ) und  $464,7 \pm 0,1$  eV ( $Ti2p_{1/2}$ ). Ähnliche Doppelspitzenwerte wurden auf Grund von metallischem Titan bei  $Ti2p_{3/2}$   $454,4 \pm 0,1$  eV und auf Grund von halb oxidiertem Titan bei  $460,6 \pm 0,1$  eV gefunden. Das Signal von Kohlenstoff 1s zeigte auf Grund von aliphatischem Kohlenstoff, welcher verwendet wurde, um die Probeladung zu korrigieren, einen Hauptspitzenwert bei 285,0 eV. Es wurden kleinere Spitzenwerte bei 286,6 eV und  $289,1 \pm 0,1$  eV gemessen, welche Kohlenstoff gebunden an Sauerstoff ( $C_{C-O}$ ) und Kohlenstoff gebunden an mehrere Sauerstoffatome ( $C_{COOx}$ ) zugeordnet werden können. Argon wurde nicht nachgewiesen. Selbst die dem Argon-Plasma ausgesetzten Proben wiesen kein Argon auf der Probenoberfläche auf. Das Signal von Stickstoff 1s bestand aus zwei Spitzenwerten. Der eine bei  $401 \pm 0,5$  eV ist organischen Verbindungen oder Ammoniumsalzen zuzuordnen und der zweite bei  $407,5 \pm 0,5$  eV stammt von Nitraten. Fluor 1s war bei  $685 \pm 0,5$  eV einzuordnen, was auf die Fluoride zurückzuführen ist. Magnesium und Calcium waren als Oxide gegenwärtig. Silicium 2p hatte einen Wert von  $102 \pm 0,5$  eV, was auf an Sauerstoff gebundenes Silicium zurückzuführen ist, wie es in Silikaten oder Silikonöl zu finden ist. Die Silikate können von demineralisiertem Wasser stammen. Schwefel war auf Grund von Sulfatgruppen auf der Probenoberfläche.

Der Anteil von metallischem Titan in der Oberfläche der Plättchen verringerte sich mit den Plasmabehandlungen, was auf eine Zunahme der Oxidschicht durch die Plasmabehandlung schließen lässt. Die Dicke der Oxidschicht betrug nativ ca.  $7,4 \pm 0,1$  nm (Messunsicherheit 25% der gegebenen Werte). Nach den Plasmabehandlungen wuchs diese um 16 bis 20% auf eine Dicke von  $8,7 \pm 0,2$  nm. Während der UV-Photofunktionalisation kam es zu einem geringfügigen, aber immer noch statistisch signifikanten (2-seitiger *t*-Test:  $p = 0,01$ , Konfidenzintervall 95%) Wachstum um 4 bis 6% auf eine Dicke von  $7,7 \pm 0,1$  nm.

Die Konzentration von Sauerstoff aus Titanoxid (O I) stieg durch die Oberflächenbehandlungen in der Oberfläche der Titanplättchen an (Tabelle 1 / Abbildung 3). Dies war erstens der Fall, weil die organische Verschmutzung, welche das Substrat überlagerte, reduziert wurde (siehe nächster Absatz), und zweitens, weil die Oxidschicht anwuchs.

Der Gesamtgehalt von Hydroxiden (O II) wurde durch die Plasmabehandlungen verringert, was vor allem durch die Reduktion von organischen Hydroxiden (Reduktion der  $C_{C-O}$ ) verursacht wurde (Tabelle 1 / Abbildung 3).

Auf der anderen Seite gab es einen Anstieg von O III, welches Sauerstoff mit einer Doppelbindung oder adsorbiertem Wasser zuzuordnen ist (Abbildung 3). Dies ist hauptsächlich auf den Anstieg von Nitraten auf den plasmabehandelten Oberflächen zurückzuführen, während die Menge von Ester- und Carboxylgruppen abnahmen ( $C_{COOx}$ )(Tabelle 1).

Abbildung 3 stellt die verringerte Gesamtmenge an Kohlenstoff nach den Oberflächenbehandlungen als Atomverhältnis zu Titan dar. Die Gesamtmenge an Kohlenstoff verringerte sich von  $21,8 \pm 0,6$  Atmosphärenprozent (at%) auf den unbehandelten Titanplättchen zu  $15,8 \pm 0,2$  at% nach der Ar-Plasmaaktivierung, bzw. auf  $16,8 \pm 0,4$  at% nach der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung und auf  $17,2 \pm 0,7$  at% nach der UV-Photofunktionalisation. Der Rückgang war für alle Oberflächenbehandlungen ( $p < 0,002$ ) statistisch signifikant, wobei zwischen den verschiedenen Behandlungen nur der Unterschied zwischen dem O<sub>2</sub>- und dem Ar-Plasma statistisch signifikant (2 seitiger *t*-Test  $p = 0,03$ , Konfidenzintervall 95%) war. Prozentual ausgedrückt sank die Gesamtmenge an Kohlenstoff in at% von 100% auf den unbehandelten Titanplättchen um 27,5% nach der Ar-Plasmaaktivierung, um 22,9% nach der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung und um 21,1% nach der UV-Funktionalisierung.

Spuren von Fluoriden und Silikaten wurden wahrscheinlich während der Plasmabehandlungen auf die Oberfläche gebracht, da diese Elemente auf den unbehandelten Titanplättchen nicht nachgewiesen wurden (Tabelle 1). Auf der anderen Seite wurde Schwefel fast vollständig mit den Plasmabehandlungen entfernt. Im Gegensatz hierzu scheint die UV-Photofunktionalisation weniger wirksam zu sein (Tabelle 1).

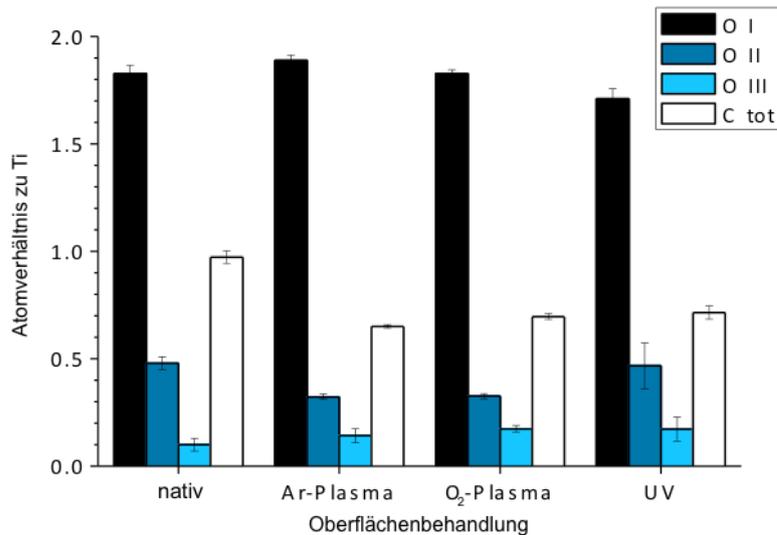


Abbildung 3: Atomverhältnisse von O I, O II, O III und C gesamt zu Titan vor und nach Oberflächenbehandlung.

#### **4.1.2. Elektronenmikroskopie und Rauheitsanalyse**

##### Oberflächentopographie

Die REM-Aufnahmen der Titanplättchen zeigten eine raue Oberfläche mit sowohl einer Makrorauheit als auch einer überlagerten Mikrorauheit (Abbildungen 4-7). Nur sehr wenige Partikel sind vom Sandstrahlen auf der Oberfläche der Titanplättchen verblieben. Die Titanplättchen, die dem Sauerstoffplasma ausgesetzt waren, zeigten Zonen mit kleinen Körnchen ( $\varnothing$  0,1 bis 0,5 $\mu\text{m}$ ) auf den flachen Bereichen der Ätz-Struktur (Abbildung 6, Körnchen markiert). Zwischen den unbehandelten Plättchen und denen, die mit dem Ar-Plasma oder mit UV behandelt wurden, konnten keine Unterschiede in der Oberflächenstruktur beobachtet werden.

Abbildung 4: REM-Aufnahme natives Plättchen

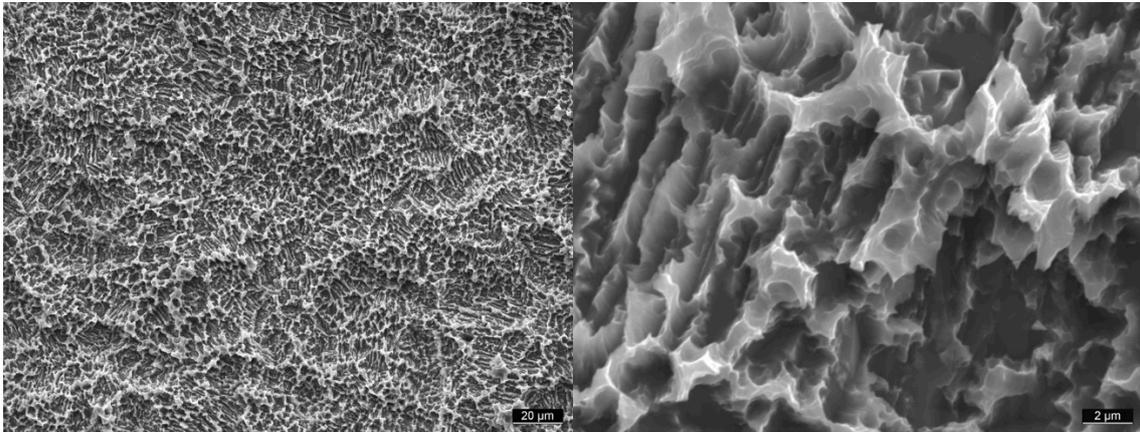


Abbildung 5: REM-Aufnahme Ar-Plasma

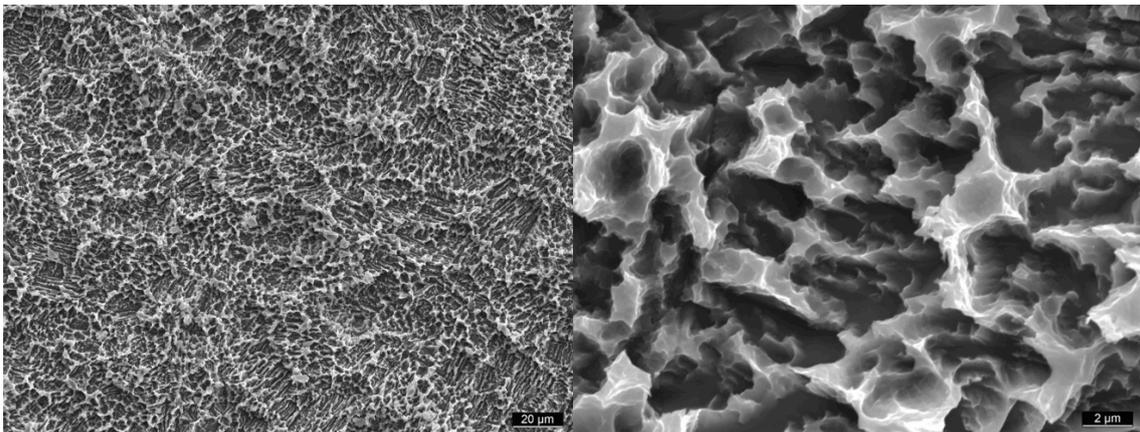


Abbildung 6: REM-Aufnahme O<sub>2</sub>-Plasma

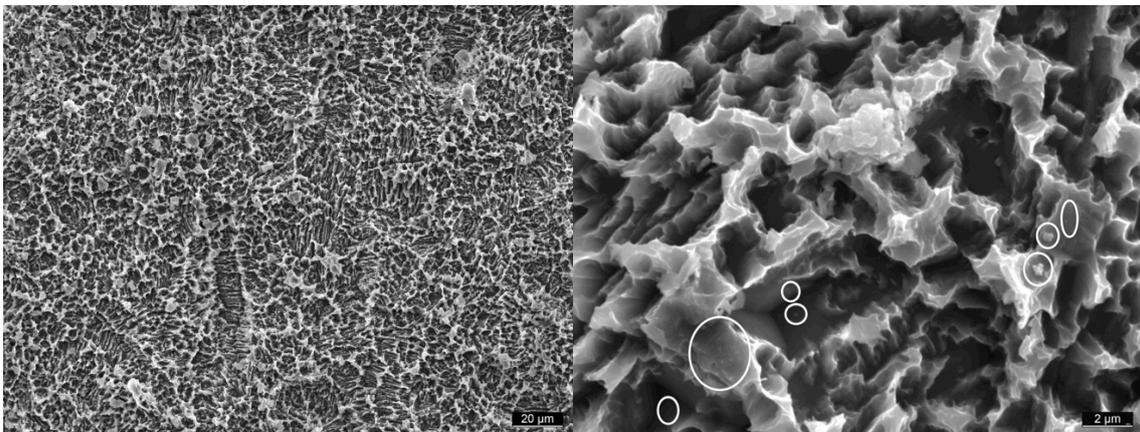
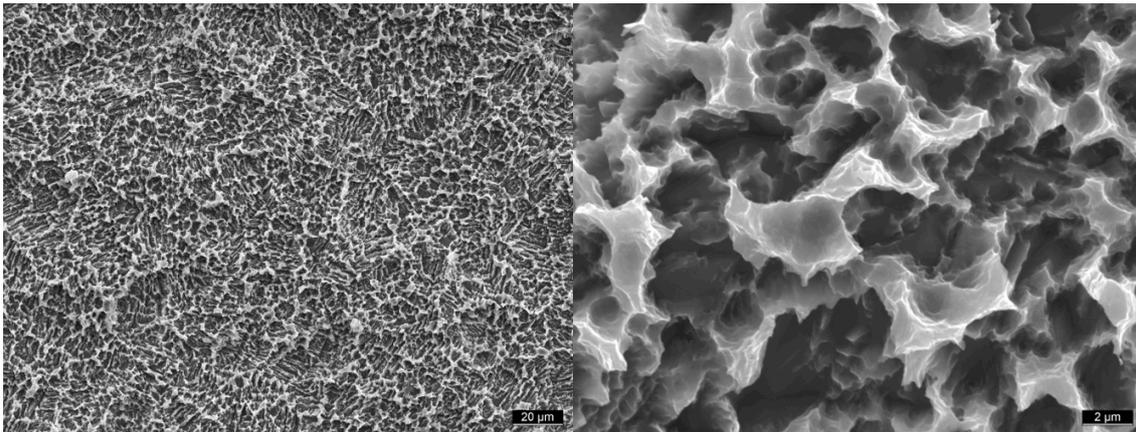


Abbildung 7: REM-Aufnahme UV



Abbildungen 4-7: REM-Aufnahmen der rauen Titanplättchen, li: Makro- und re: Mikrorauheit.

### Rauheit

Die mit der konfokalen Mikroskopie erzeugten Topographien, werden in Abbildung 8 bis 11 gezeigt. In Übereinstimmung mit den REM-Aufnahmen zeigen sie ausgeprägte schmale Spitzen und Täler.

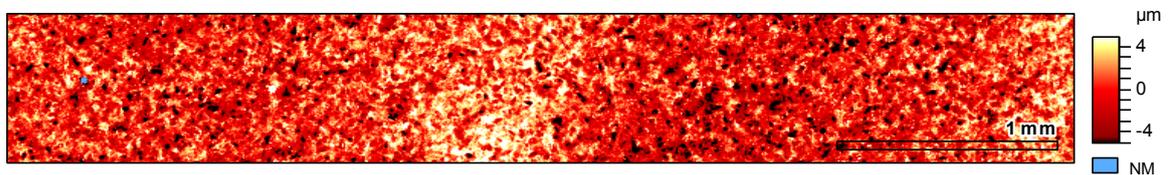
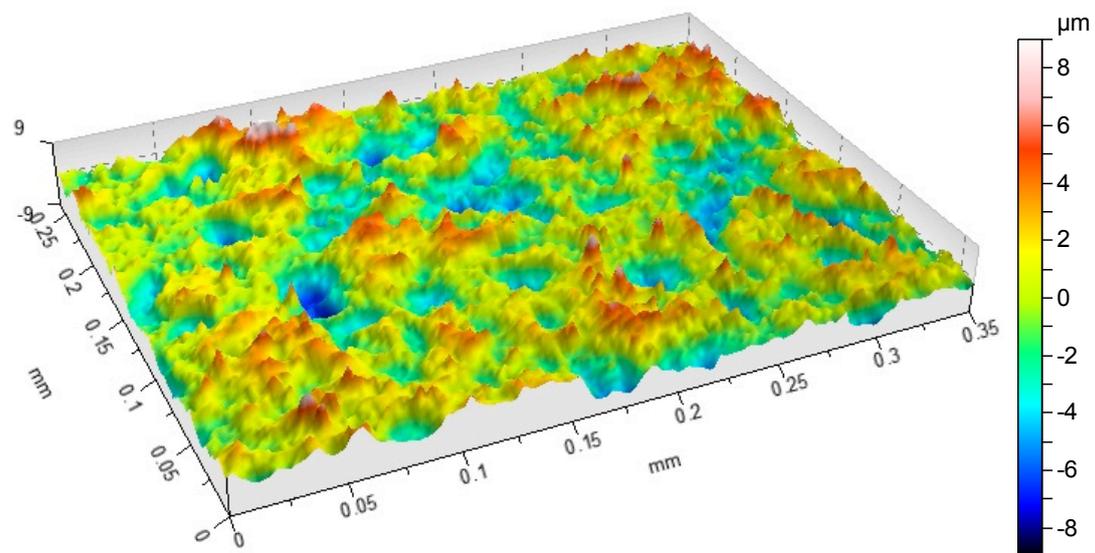
Mit dem 20x-Objektiv wurden Topographien mit 4,8mm langen Profilen erzeugt (Abbildung 12). Die Makro-Rauheitswerte wurden unter Berücksichtigung von mehr als 20 Profilen ((Tabelle 2), Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung und Abbildung 13) ermittelt.

Die mittlere arithmetische Rauheit ( $R_a$ ) lag zwischen 1,8 und 2,0 $\mu\text{m}$  auf allen Titanplättchen. Zusätzlich zu den üblichen Rauheitsparametern wurden Kernel-Rauheitsparameter bestimmt. Die Kernel-Rauheit ( $R_k$ ) ist die allgemeine Rauheit, wobei die Gipfel ( $R_{pk}$ ) und die Täler ( $R_{vk}$ ) gesondert gemessen werden. Die  $R_k$ -Werte lagen zwischen 5,7 und 6,2 $\mu\text{m}$  für alle Titanplättchen. Die Spitzen waren relativ ausgeprägt mit relativ hohen  $R_{pk}$  Werten bis 2,6 $\mu\text{m}$ . Die Täler ergaben  $R_{vk}$  Werte um 2,6-3 $\mu\text{m}$ . Es gab keine relevanten Unterschiede zwischen den Plättchen nach den verschiedenen Oberflächenbehandlungen.

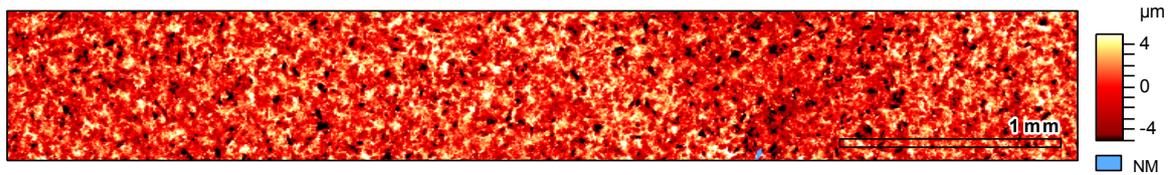
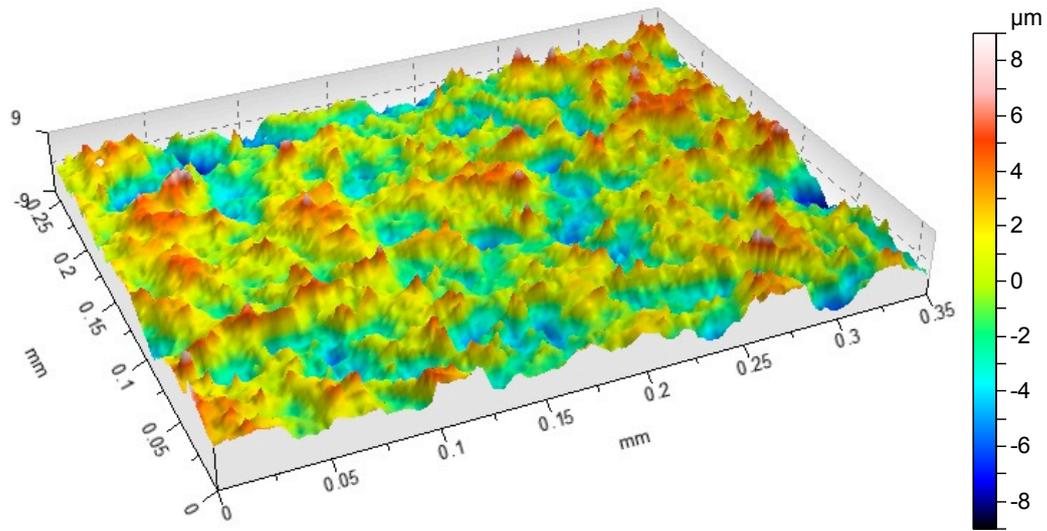
Für das Anwachsen einer Zelle auf einer Oberfläche ist die Mikrorauheit ein wichtiger Faktor. Die Rauheitsparameter der Mikrorauheit wurden zusätzlich bestimmt, indem ein kürzerer angepasster Objektivabstand von 80 $\mu\text{m}$  anstelle von 800 $\mu\text{m}$  (Abbildung 14 / Tabelle 3) verwendet wurde. Die Anwendung dieses Filters erlaubt eine Nivellierung der

makroskopischen Struktur und eine Bestimmung der mikroskopischen Strukturen. Im Gegensatz zur makroskopischen Rauheit war die Mikrorauheit auf den rauen Titanplättchen hoch ( $R_a$  1.2 bis 1.3 $\mu\text{m}$  und  $R_k$  3.9 bis 4.2 $\mu\text{m}$ ). Wie zuvor beobachtet, waren die Spitzen ( $R_{pk}$ ) der Titanplättchen relativ ausgeprägt bei Werten von 1,9 bis 2 $\mu\text{m}$ , während die Tiefe der Täler ( $R_{vk}$ ) bei 1,9-2,1 $\mu\text{m}$  lag. Es gab weder in der Makro- noch in der Mikrorauheit statistisch relevante Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Plättchen (Abbildung 13 und Abbildung 14).

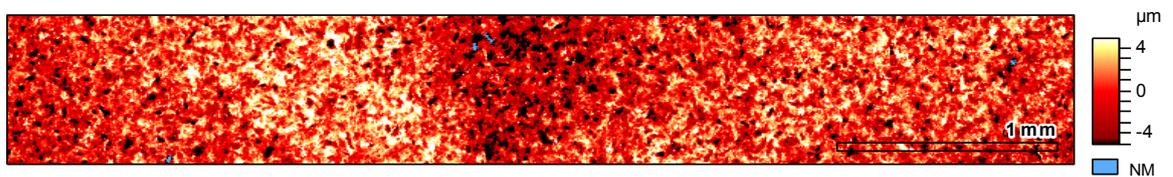
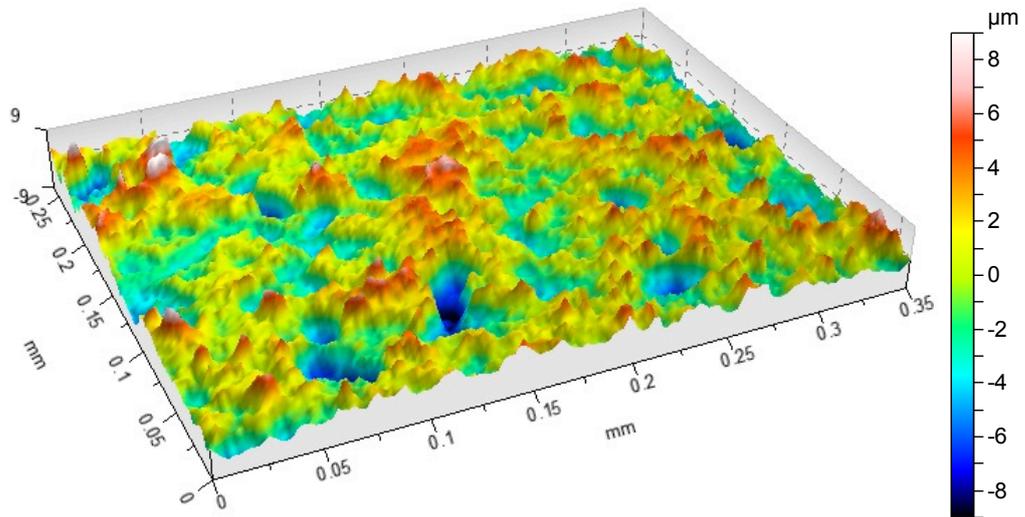
8) nativ



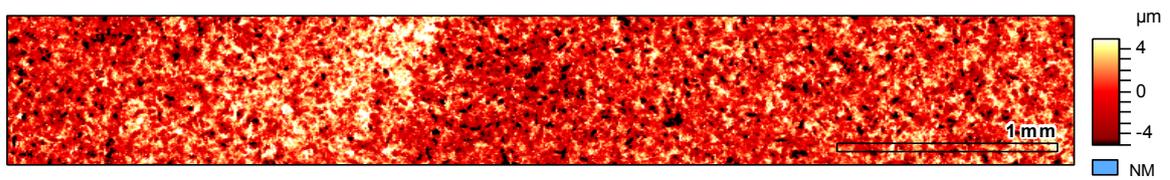
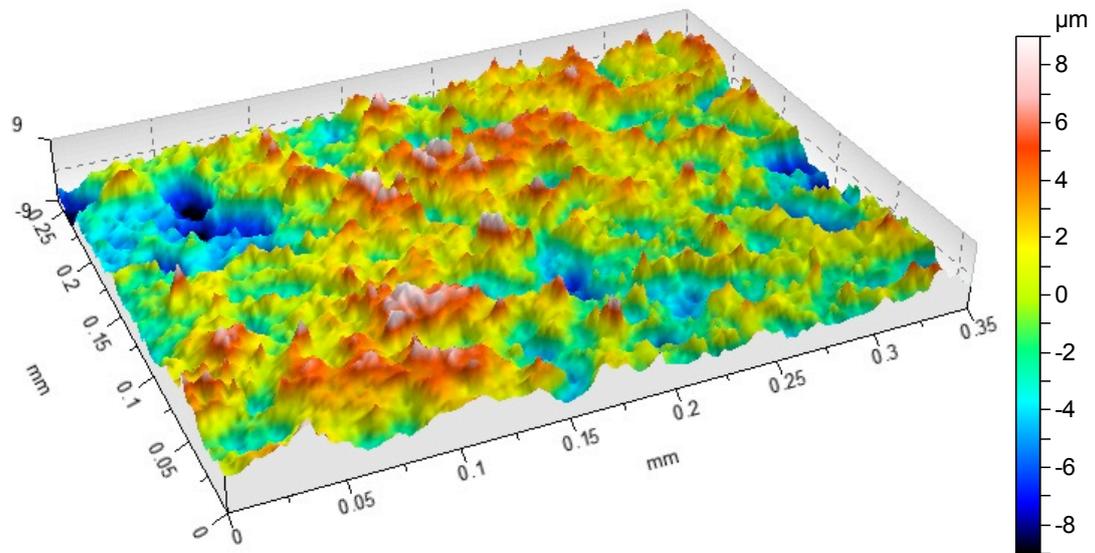
9) Ar-Plasma



10) O<sub>2</sub>-Plasma



11) UV



Abbildungen 8-11: Topographie der rauhen Plättchen: 3 dimensionale Präsentation mit hochauflösendem (50x) Objektiv und Farbdarstellung mit großer Analysefläche (20x Objektiv)

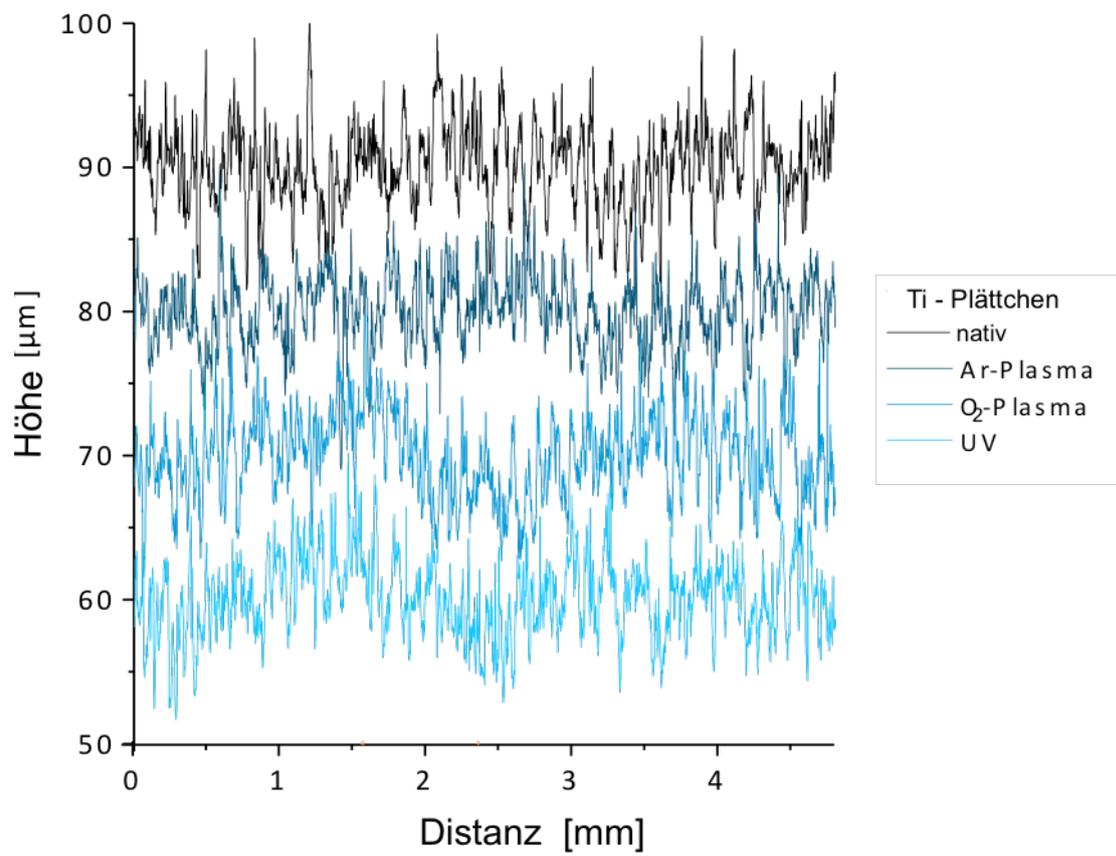


Abbildung 12: Profile, die aus den Topographien extrahiert wurden. Für eine bessere Visualisierung wurden die Profile im Diagramm verschoben

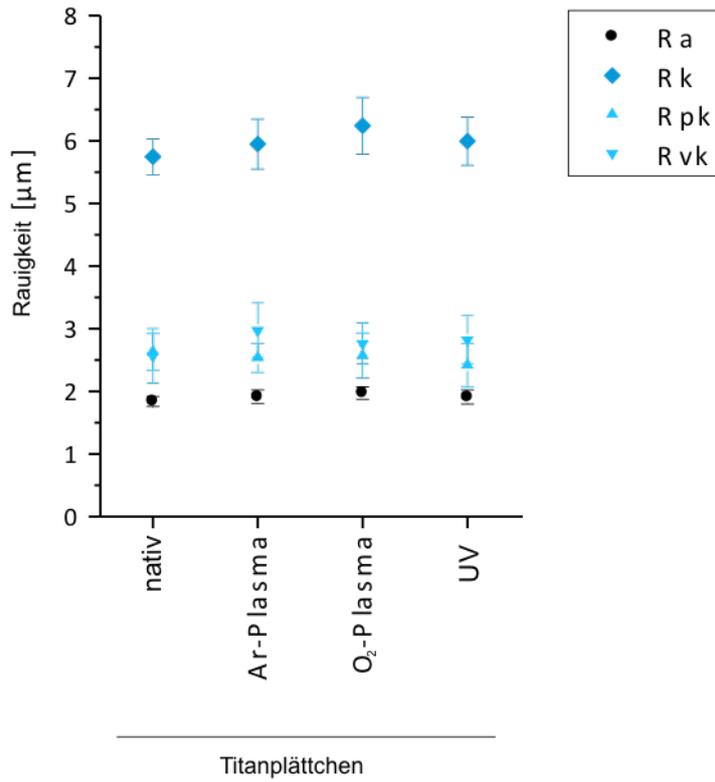


Abbildung 13: Vergleich der Makrorauheitswerte (Ra, Rk, Rpk und Rvk) mit einem Objektivabstand von 800µm

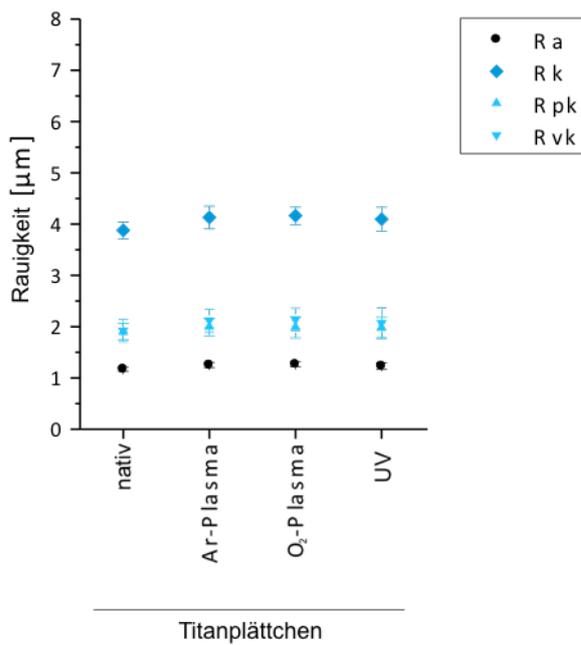


Abbildung 14: Vergleich der Mikrorauheitswerte (Ra, Rk, Rpk und Rvk) mit einem verkürzten Objektivabstand von 80µm

|                      |                        | Titanplättchen rau |                |                |                |
|----------------------|------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|
|                      |                        | nativ              | Ar-Plasma      | O2-Plasma      | UV             |
| Rauheit              | Ra [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.8 $\pm$ 0.1      | 1.9 $\pm$ 0.1  | 2.0 $\pm$ 0.1  | 1.9 $\pm$ 0.1  |
|                      | Rq [ $\mu\text{m}$ ]   | 2.4 $\pm$ 0.1      | 2.4 $\pm$ 0.1  | 2.5 $\pm$ 0.1  | 2.4 $\pm$ 0.1  |
|                      | Rsk                    | 0.1 $\pm$ 0.1      | -0.1 $\pm$ 0.2 | 0.0 $\pm$ 0.1  | 0.0 $\pm$ 0.1  |
|                      | Rku                    | 3.4 $\pm$ 0.3      | 3.5 $\pm$ 0.3  | 3.3 $\pm$ 0.3  | 3.4 $\pm$ 0.3  |
|                      | Rp [ $\mu\text{m}$ ]   | 7.7 $\pm$ 0.7      | 7.9 $\pm$ 0.7  | 7.8 $\pm$ 0.8  | 7.7 $\pm$ 0.7  |
|                      | Rv [ $\mu\text{m}$ ]   | 6.4 $\pm$ 0.6      | 7.1 $\pm$ 0.7  | 6.8 $\pm$ 0.4  | 7.0 $\pm$ 0.8  |
|                      | Rz [ $\mu\text{m}$ ]   | 14.1 $\pm$ 1.0     | 15.0 $\pm$ 1.0 | 14.6 $\pm$ 1.0 | 14.7 $\pm$ 1.2 |
|                      | Rsm [ $\mu\text{m}$ ]  | 43 $\pm$ 3         | 42 $\pm$ 4     | 42 $\pm$ 3     | 42 $\pm$ 3     |
| Welligkeit           | Rdq [ $^\circ$ ]       | 31 $\pm$ 1         | 33 $\pm$ 1     | 33 $\pm$ 1     | 34 $\pm$ 2     |
|                      | Wa [ $\mu\text{m}$ ]   | 0.8 $\pm$ 0.2      | 0.5 $\pm$ 0.1  | 1.0 $\pm$ 0.2  | 0.8 $\pm$ 0.1  |
|                      | Wq [ $\mu\text{m}$ ]   | 0.9 $\pm$ 0.2      | 0.6 $\pm$ 0.1  | 1.1 $\pm$ 0.2  | 0.9 $\pm$ 0.1  |
|                      | Wsk                    | -0.1 $\pm$ 0.2     | 0.1 $\pm$ 0.2  | 0.1 $\pm$ 0.3  | -0.1 $\pm$ 0.4 |
|                      | Wku                    | 1.9 $\pm$ 0.3      | 1.9 $\pm$ 0.3  | 1.8 $\pm$ 0.2  | 1.9 $\pm$ 0.3  |
|                      | Wp [ $\mu\text{m}$ ]   | 0.8 $\pm$ 0.2      | 0.6 $\pm$ 0.1  | 0.9 $\pm$ 0.2  | 0.8 $\pm$ 0.2  |
|                      | Wv [ $\mu\text{m}$ ]   | 0.9 $\pm$ 0.2      | 0.6 $\pm$ 0.1  | 1.0 $\pm$ 0.2  | 0.9 $\pm$ 0.1  |
| Wz [ $\mu\text{m}$ ] | 1.7 $\pm$ 0.5          | 1.2 $\pm$ 0.2      | 1.9 $\pm$ 0.3  | 1.6 $\pm$ 0.3  |                |
| Kernel-Rauheit       | Rk [ $\mu\text{m}$ ]   | 5.7 $\pm$ 0.3      | 5.9 $\pm$ 0.4  | 6.2 $\pm$ 0.5  | 6.0 $\pm$ 0.4  |
|                      | Rpk [ $\mu\text{m}$ ]  | 2.6 $\pm$ 0.3      | 2.5 $\pm$ 0.2  | 2.6 $\pm$ 0.4  | 2.4 $\pm$ 0.4  |
|                      | Rvk [ $\mu\text{m}$ ]  | 2.6 $\pm$ 0.4      | 3.0 $\pm$ 0.4  | 2.8 $\pm$ 0.3  | 2.8 $\pm$ 0.4  |
|                      | Mr1 [%]                | 10 $\pm$ 1         | 9 $\pm$ 1      | 9 $\pm$ 1      | 10 $\pm$ 1     |
|                      | Mr2 [%]                | 89 $\pm$ 1         | 88 $\pm$ 1     | 88 $\pm$ 1     | 89 $\pm$ 1     |
|                      | A1                     | 130 $\pm$ 21       | 119 $\pm$ 16   | 122 $\pm$ 26   | 117 $\pm$ 23   |
|                      | A2                     | 148 $\pm$ 30       | 176 $\pm$ 39   | 161 $\pm$ 29   | 163 $\pm$ 29   |
|                      | Rpk* [ $\mu\text{m}$ ] | 6.5 $\pm$ 0.9      | 6.5 $\pm$ 1.2  | 6.8 $\pm$ 1.8  | 6.7 $\pm$ 1.2  |
|                      | Rvk* [ $\mu\text{m}$ ] | 5.1 $\pm$ 0.8      | 6.4 $\pm$ 1.5  | 5.4 $\pm$ 0.8  | 6.2 $\pm$ 1.2  |

Tabelle 2: Makrorauheitswerte# nach ISO 4287, 4288 und 13565-2. Mittelwert und  $\pm$  Standardabweichung

#)R<sub>a</sub> ist der arithmetische Mittelwert der Rauheit und R<sub>q</sub> der quadratische Mittelwert der Rauheit. R<sub>sk</sub> ist der Versatz (negative Werte zeigen an, dass Täler über die Gipfel dominieren, positive Werte zeigen an, dass Spitzen dominant sind). R<sub>ku</sub> ist die Kurtosis (Werte über 3 zeigen, dass die Spitzen schmaler sind als bei einer Normalverteilung, Werte kleiner als 3 zeigen, dass die Spitzen breiter sind). R<sub>p</sub> ist die maximale Spitzenhöhe des Rauheitsprofils, R<sub>v</sub> die maximale Taltiefe des Rauheitsprofils und R<sub>z</sub> die maximale Höhe des Rauheitsprofils. Der Abstandsparameter R<sub>sm</sub> ist die mittlere Breite der Profilelemente und R<sub>dq</sub> der quadratische Mittelwert des Gefälles des Rauheitsprofils. Die Welligkeitsparameter werden wie die Rauheitsparameter, nur auf die Welligkeit angewendet. R<sub>k</sub> ist die Kernel-Rauheit (Rauheit unter Vernachlässigung der höchsten Gipfel und der niedrigsten Täler), R<sub>pk</sub> die reduzierte Spitzenhöhe, R<sub>vk</sub> die reduzierte Tälertiefe, MR1 das Obermaterial-Verhältnis (Material, welches während eines Verschleißtestes abgetragen würde), Mr2 das untere Material-Verhältnis (das gesamte Material, welches abgetragen würde, bis nur noch die tiefsten Täler bleiben), A1 der obere Bereich, A2 der untere Bereich, R<sub>pk</sub>\* die Spitzenhöhe und R<sub>vk</sub>\* die Taltiefe.

|                       | Titanplättchen rau     |                |               |               |               |
|-----------------------|------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
|                       | nativ                  | Ar-Plasma      | O2-Plasma     | UV            |               |
| <b>Rauheit</b>        | Ra [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.2 $\pm$ 0.0  | 1.3 $\pm$ 0.0 | 1.3 $\pm$ 0.1 | 1.2 $\pm$ 0.1 |
|                       | Rq [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.5 $\pm$ 0.0  | 1.6 $\pm$ 0.1 | 1.6 $\pm$ 0.1 | 1.5 $\pm$ 0.1 |
|                       | Rsk                    | 0.3 $\pm$ 0.1  | 0.3 $\pm$ 0.1 | 0.2 $\pm$ 0.1 | 0.3 $\pm$ 0.1 |
|                       | Rku                    | 3.1 $\pm$ 0.2  | 3.1 $\pm$ 0.1 | 3.1 $\pm$ 0.1 | 3.2 $\pm$ 0.2 |
|                       | Rp [ $\mu\text{m}$ ]   | 3.5 $\pm$ 0.1  | 3.8 $\pm$ 0.2 | 3.8 $\pm$ 0.2 | 3.8 $\pm$ 0.2 |
|                       | Rv [ $\mu\text{m}$ ]   | 2.8 $\pm$ 0.1  | 3.0 $\pm$ 0.1 | 3.0 $\pm$ 0.1 | 3.0 $\pm$ 0.2 |
|                       | Rz [ $\mu\text{m}$ ]   | 6.3 $\pm$ 0.2  | 6.8 $\pm$ 0.3 | 6.8 $\pm$ 0.3 | 6.7 $\pm$ 0.3 |
|                       | Rsm [ $\mu\text{m}$ ]  | 25 $\pm$ 1     | 26 $\pm$ 2    | 26 $\pm$ 1    | 26 $\pm$ 1    |
| <b>Welligkeit</b>     | Rdq [°]                | 29 $\pm$ 1     | 31 $\pm$ 1    | 31 $\pm$ 1    | 32 $\pm$ 1    |
|                       | Wa [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.4 $\pm$ 0.1  | 1.3 $\pm$ 0.1 | 1.6 $\pm$ 0.1 | 1.4 $\pm$ 0.1 |
|                       | Wq [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.6 $\pm$ 0.1  | 1.5 $\pm$ 0.1 | 1.8 $\pm$ 0.1 | 1.6 $\pm$ 0.1 |
|                       | Wsk                    | -0.1 $\pm$ 0.1 | 0.0 $\pm$ 0.1 | 0.0 $\pm$ 0.1 | 0.0 $\pm$ 0.1 |
|                       | Wku                    | 1.8 $\pm$ 0.1  | 1.9 $\pm$ 0.1 | 1.8 $\pm$ 0.1 | 1.8 $\pm$ 0.1 |
|                       | Wp [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.3 $\pm$ 0.1  | 1.4 $\pm$ 0.1 | 1.4 $\pm$ 0.1 | 1.4 $\pm$ 0.1 |
|                       | Wv [ $\mu\text{m}$ ]   | 1.4 $\pm$ 0.1  | 1.5 $\pm$ 0.1 | 1.5 $\pm$ 0.1 | 1.5 $\pm$ 0.1 |
|                       | Wz [ $\mu\text{m}$ ]   | 2.8 $\pm$ 0.2  | 2.9 $\pm$ 0.2 | 3.0 $\pm$ 0.2 | 2.8 $\pm$ 0.2 |
| <b>Kernel-Rauheit</b> | Rk [ $\mu\text{m}$ ]   | 3.9 $\pm$ 0.2  | 4.1 $\pm$ 0.2 | 4.2 $\pm$ 0.2 | 4.1 $\pm$ 0.2 |
|                       | Rpk [ $\mu\text{m}$ ]  | 1.9 $\pm$ 0.2  | 2.0 $\pm$ 0.2 | 2.0 $\pm$ 0.2 | 2.0 $\pm$ 0.2 |
|                       | Rvk [ $\mu\text{m}$ ]  | 1.9 $\pm$ 0.2  | 2.1 $\pm$ 0.2 | 2.1 $\pm$ 0.2 | 2.1 $\pm$ 0.3 |
|                       | Mr1 [%]                | 10 $\pm$ 1     | 10 $\pm$ 1    | 10 $\pm$ 1    | 9 $\pm$ 1     |
|                       | Mr2 [%]                | 88 $\pm$ 1     | 88 $\pm$ 1    | 88 $\pm$ 1    | 88 $\pm$ 1    |
|                       | A1                     | 93 $\pm$ 12    | 95 $\pm$ 11   | 97 $\pm$ 14   | 94 $\pm$ 15   |
|                       | A2                     | 114 $\pm$ 18   | 130 $\pm$ 24  | 129 $\pm$ 19  | 121 $\pm$ 24  |
|                       | Rpk* [ $\mu\text{m}$ ] | 5.9 $\pm$ 1.3  | 6.2 $\pm$ 0.8 | 6.5 $\pm$ 1.4 | 6.3 $\pm$ 1.4 |
|                       | Rvk* [ $\mu\text{m}$ ] | 4.4 $\pm$ 0.8  | 5.5 $\pm$ 1.6 | 5.3 $\pm$ 0.9 | 6.1 $\pm$ 1.9 |

Tabelle 3: Mikrorauheitswerte# mit verkürztem angepassten Objektivabstand von 80 $\mu\text{m}$ .  
Mittelwert und  $\pm$  Standardabweichung

### **4.1.3. Kontaktwinkelmessung**

Von den 6 Messdurchgängen waren bei den glatten nativen Plättchen alle auswertbar und der Tropfen war klar als solcher auf dem Plättchen zu erkennen (Abbildung 15). Die Messungen ergaben Kontaktwinkel von  $73,1 \pm 6,7^\circ$  (Abbildung 16 / Tabelle 4). Im Vergleich zu den unbestrahlten glatten Titanplättchen hatten die drei Bestrahlungsarten eine deutliche und statistisch signifikante (Tabelle 5) Reduktion des Kontaktwinkels zur Folge, wobei Ar-Plasma mit  $4,0 \pm 1,6^\circ$  statistisch signifikant den niedrigsten Wert aufwies. Hier war je Plättchen ein Messdurchgang auswertbar, alle anderen Messungen mussten verworfen werden. Auf beiden Plättchen waren jeweils 2 Messungen in der Gruppe der UV-Photofunktionalisation und der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung auswertbar. Mit einem Mittelwert der Kontaktwinkel von  $9,8 \pm 1,5^\circ$  für die UV-photofunktionalisierten und  $6,6 \pm 3,7^\circ$  O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten Titanplättchen sind die Wirkungen dieser Bestrahlungen statistisch signifikant leicht weniger wirksam, was die Erzeugung von Hydrophilie angeht. Im Vergleich ist O<sub>2</sub>-Plasma statistisch signifikant leicht wirksamer als die UV-Photofunktionalisation. Unabhängig von der Art der Bestrahlung, war der Wassertropfen kaum fotografisch festzuhalten, da die Flüssigkeit auf dem Plättchen zerfloss (Abbildung 15).

Die Untersuchung der rauen Titanplättchen zeigte ein ganz ähnliches Ergebnis (Abbildung 16 / Tabelle 4). Die unbehandelten rauen Titanplättchen wiesen einen Mittelwert der Kontaktwinkel von  $113,3 \pm 9,9^\circ$  auf und alle Messdurchgänge waren auswertbar (Abbildung 16 / Tabelle 4). Die UV-Photofunktionalisation erzeugte, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle, bei 2 auswertbaren Messdurchgängen pro Plättchen, einen kleineren Mittelwert von  $12,2 \pm 3,4^\circ$ . Die Messdurchgänge für die Ar- und O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung ergaben Werte die gen Null strebten, wobei die Unterschiede wieder nur zwischen den Plasmaaktivierungen nicht statistisch signifikant waren (Tabelle 5). Auf Grund der enormen Hydrophilie war der Wassertropfen kaum fotografisch festzuhalten, da die Flüssigkeit auf dem Plättchen zerfloss (Abbildung 15).

Prozentual gesehen bedeutet dies, für die glatten Proben, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, eine Verkleinerung des Kontaktwinkels um 95% bei Ar-Plasma, 91% bei O<sub>2</sub>-Plasma und 87% bei UV, für die rauen Proben annähernd 100% bei Ar-Plasma und O<sub>2</sub>-Plasma und 89% bei UV.

Zusammengefasst wiesen sowohl die maschinieren als auch die sandgestrahlten und geätzten Titanplättchen nach Oberflächenbehandlung eine Reduktion des dynamischen Kontaktwinkels auf, was eine Umwandlung der Oberfläche von hydrophob zu (super)hydrophil bedeutet (Tabelle 4). Vor der Oberflächenbehandlung waren die

dynamischen Kontaktwinkel der sandgestrahlten und geätzten höher als die der maschinieren Titanplättchen, die rauhen Plättchen waren also hydrophober als die glatten. Die Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Titanplättchen waren statistisch signifikant, auch zwischen UV-Photofunktionalisation und Plasmaaktivierung, aber nicht zwischen O<sub>2</sub>- and Ar-Plasmaaktivierung (Tabelle 5).

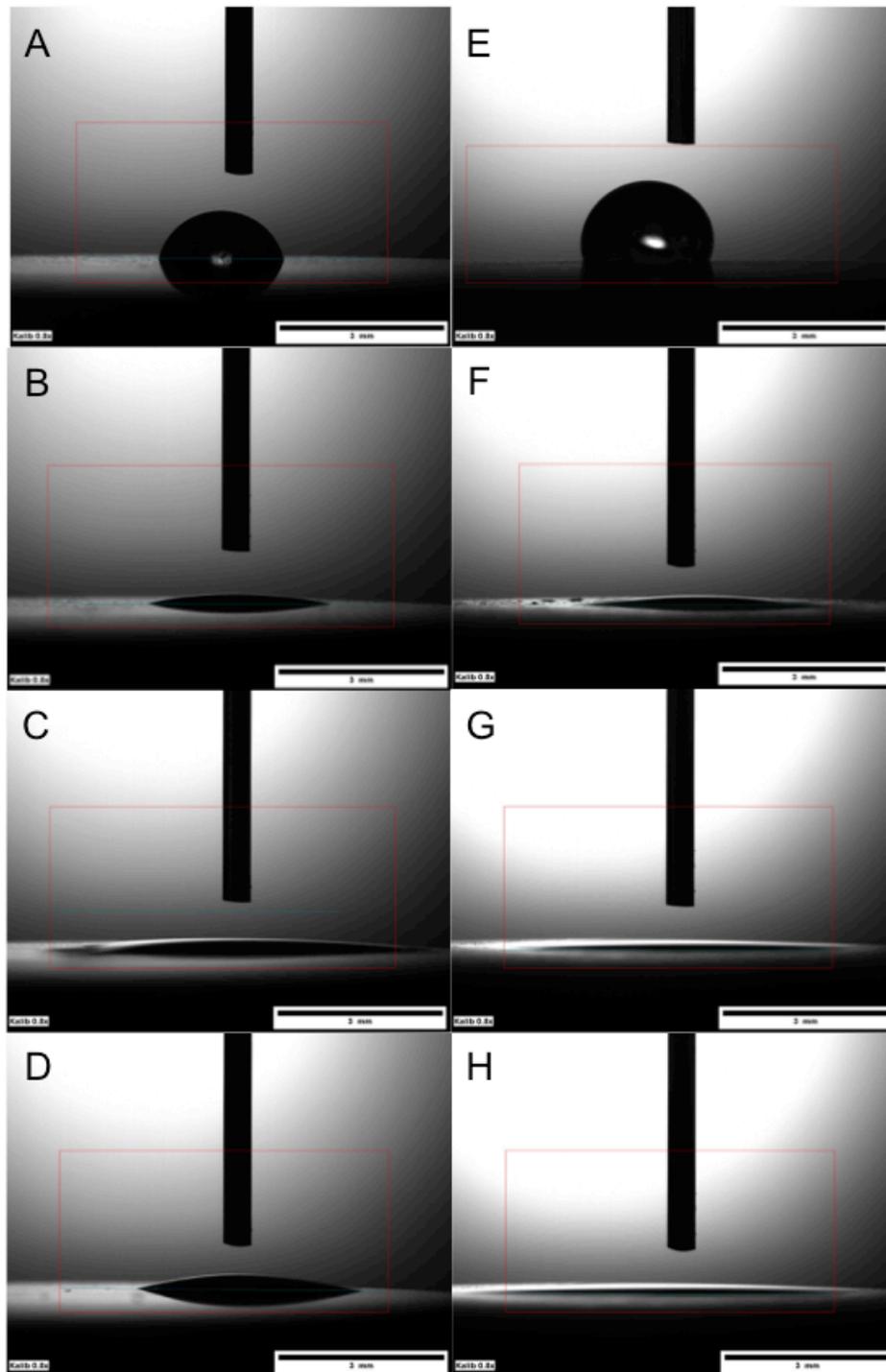


Abbildung 15: Drop Shape Analyse (beispielhaft, statische Tropfen), A-D glatte Plättchenoberfläche, E-H raue Plättchenoberfläche. A und E nativ, B und F nach 12 Minuten UV-Photofunktionalisation, C und G nach 12 Minuten O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung, D und H nach 12 Minuten Ar-Plasmaaktivierung

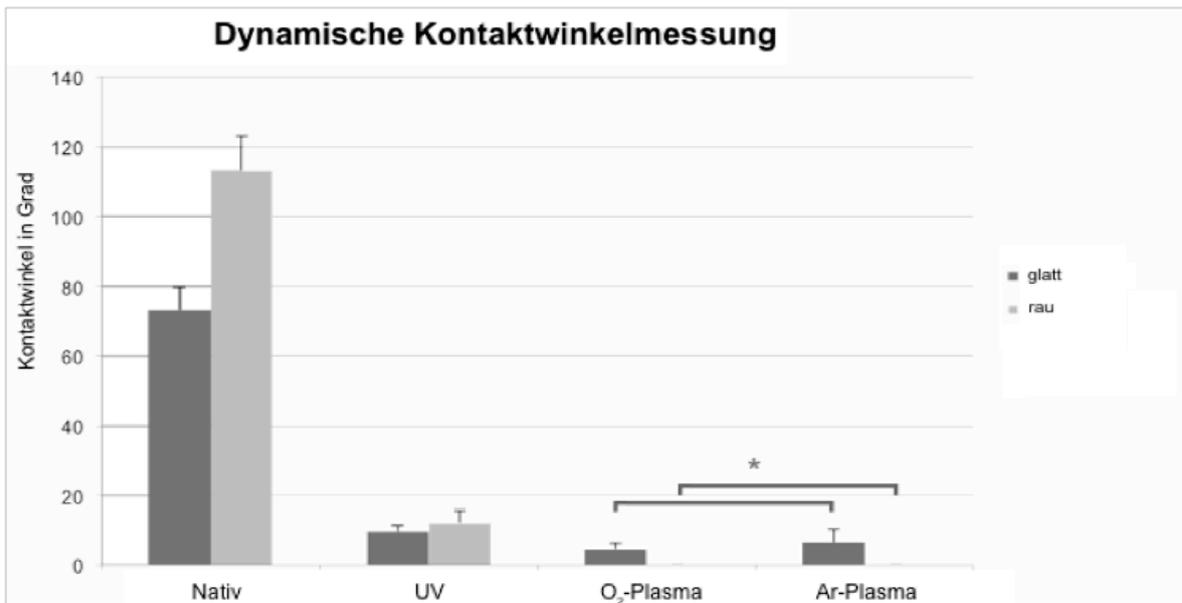


Abbildung 16: Ergebnisse der dynamischen Kontaktwinkelmessung in Grad, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung auf glatten und rauhen Plättchen. \* $p > 0,05$ . Alle anderen Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch signifikant.

| Kontaktwinkel                 | Durchschnitt    |
|-------------------------------|-----------------|
| glatt, nativ                  | 73.1 $\pm$ 6.7  |
| glatt, UV                     | 9.8 $\pm$ 1.5   |
| glatt, Ar-Plasma              | 4.0 $\pm$ 1.6   |
| glatt, O <sub>2</sub> -Plasma | 6.6 $\pm$ 3.7   |
| rau, nativ                    | 113.3 $\pm$ 9.9 |
| rau, UV                       | 12.2 $\pm$ 3.4  |
| rau, Ar-Plasma                | 0               |
| rau, O <sub>2</sub> -Plasma   | 0               |

Tabelle 4: Ergebnisse der dynamischen Kontaktwinkel Messung in Grad, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

| Vergleich                                      | P-Werte   |
|--|-----------|
| glatt, nativ versus UV                         | P < 0.001 |
| glatt, nativ versus O <sub>2</sub> -Plasma     | P < 0.001 |
| glatt, nativ versus Ar-Plasma                  | P < 0.001 |
| glatt, UV versus O <sub>2</sub> -Plasma        | P < 0.001 |
| glatt, UV versus Ar-Plasma                     | P < 0.001 |
| glatt, O <sub>2</sub> -Plasma versus Ar-Plasma | P = 1.000 |
| rau, nativ versus UV                           | P < 0.001 |
| rau, nativ versus O <sub>2</sub> -Plasma       | P < 0.001 |
| rau, nativ versus Ar-Plasma                    | P < 0.001 |
| rau, UV versus O <sub>2</sub> -Plasma          | P < 0.001 |
| rau, UV versus Ar-Plasma                       | P < 0.001 |
| rau, O <sub>2</sub> -Plasma versus Ar-Plasma   | P = 0.167 |

Tabelle 5: Statistische Ergebnisse der dynamischen Kontaktwinkelmessung, *Kruskal-Wallis*-Test, Signifikanzniveau gesetzt bei  $p \leq 0.05$ .

## **4.2. Ergebnisse der Zellkultur**

### **4.2.1. LDS (Zellzahl und Morphologie)**

#### Zellzahl

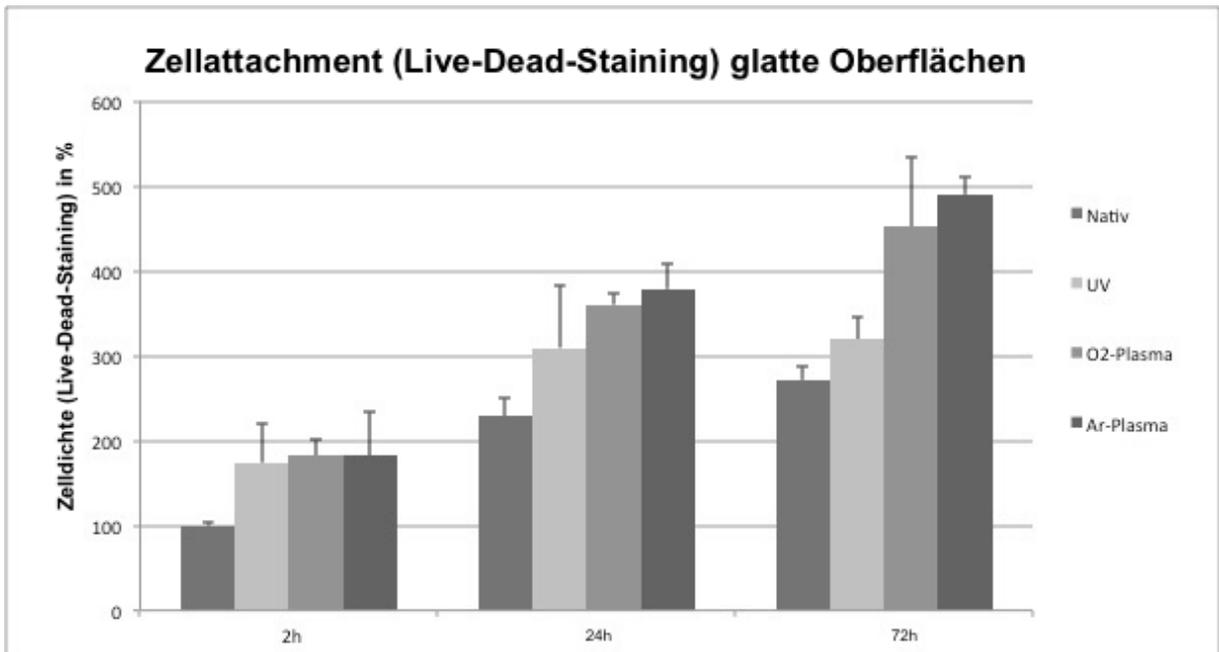
Während einer Inkubationszeit von 72h (drei Untersuchungszeitpunkte 24, 48 und 72h) vergrößerte sich die Zellzahl fortlaufend, mit einem über den Zeitraum höheren Anstieg auf den rauen Oberflächen (Abbildung 17 a and b). Die Zellzahl auf den Plättchen nach Oberflächenbehandlung war verglichen mit der Zellzahl auf den nativen immer signifikant höher (Tabelle 6).

Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Ar-plasmaaktivierten und den UV-photofunktionalisierten glatten Plättchen nach 24h und 72h (signifikant mehr Zellen auf den Ar-plasmaaktivierten Oberflächen), während nur nach 72h zwischen den O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten und den UV-photofunktionalisierten glatten Plättchen signifikante Unterschiede bestanden (signifikant mehr Zellen auf den O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten Oberflächen).

Die Untersuchung der rauen Plättchen ergab lediglich nach 2h statistisch signifikante Unterschiede. Eine signifikant höhere Zahl angewachsener Zellen wiesen die Ar-plasmaaktivierten Plättchen im Vergleich sowohl mit den UV-photofunktionalisierten, als auch im Vergleich mit den O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten Plättchen auf.

Im Vergleich der oberflächenfunktionalisierten Plättchen lassen sich mit wenigen Ausnahmen keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen, vor allem zwischen den beiden Plasma-Behandlungen lässt sich lediglich zu einem Zeitpunkt (2h) auf den rauen Plättchen ein gerade noch statistisch signifikanter Unterschied  $p=0,0082$  bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0.0083$  nachweisen.

a)



b)

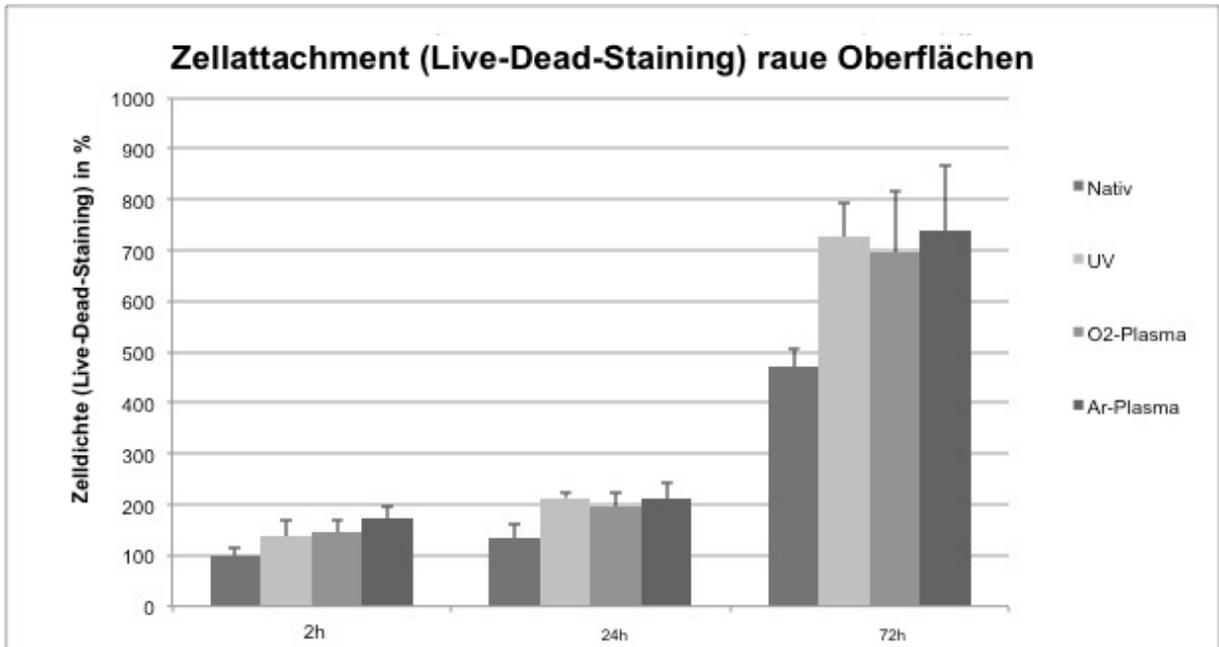


Abbildung 17 a und b: Zellattachment (Live-Dead-Staining) der Präosteoblasten auf glatten (a) und rauhen (b) Titanplättchen nach 2, 24 and 72 Stunden Inkubationszeit. Für eine bessere Visualisierung der Unterschiede sind die Ergebnisse in Prozent der Negativkontrolle (2h Ergebnisse der native Titanplättchen)  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

|                | Nativ vs. UV        | Nativ vs. O <sub>2</sub> -Plasma | Nativ vs. Ar-Plasma | UV vs. O <sub>2</sub> -Plasma | UV vs. Ar-Plasma    | O <sub>2</sub> -Plasma vs. Ar-Plasma |
|----------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| LDS 2h, glatt  | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>              | <b>P &lt; 0.001</b> | P=0.672                       | P=0.474             | P=0.609                              |
| LDS 24h, glatt | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>              | <b>P &lt; 0.001</b> | P=0.012                       | <b>P=0.001</b>      | P=0.123                              |
| LDS 72h, glatt | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>              | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>           | <b>P &lt; 0.001</b> | P=0.117                              |
| LDS 2h, rau    | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>              | <b>P &lt; 0.001</b> | P=0.062                       | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P=0.0082</b>                      |
| LDS 24h, rau   | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>              | <b>P &lt; 0.001</b> | P=0.839                       | P=0.372             | P=0.465                              |
| LDS 72h, rau   | <b>P &lt; 0.001</b> | <b>P &lt; 0.001</b>              | <b>P &lt; 0.001</b> | P=0.451                       | P=0.720             | P=0.327                              |

Tabelle 6: Statistische Ergebnisse des LDS nach 2, 24 und 72h, Kruskal-Wallis Test, Signifikanzniveau bei  $p \leq 0.0083$  nach Bonferroni Korrektur

### Morphologie

Die Zellen wurden direkt auf die Plättchen ausgesät. Die Verteilung und das Wachstum der Präosteoblasten auf den maschinieren glatten Oberflächen erschien entlang der Spuren des Herstellungsprozesses zu verlaufen (Abbildung 18 A-D). Allgemein gesehen waren die Zellen auf den Plättchen nach den Oberflächenbehandlung größer und ausgestreckter im Vergleich zu der Morphologie auf unbehandelten Plättchen. Abbildung 18 zeigt repräsentative Bilder nach einer Inkubationszeit von 24h.

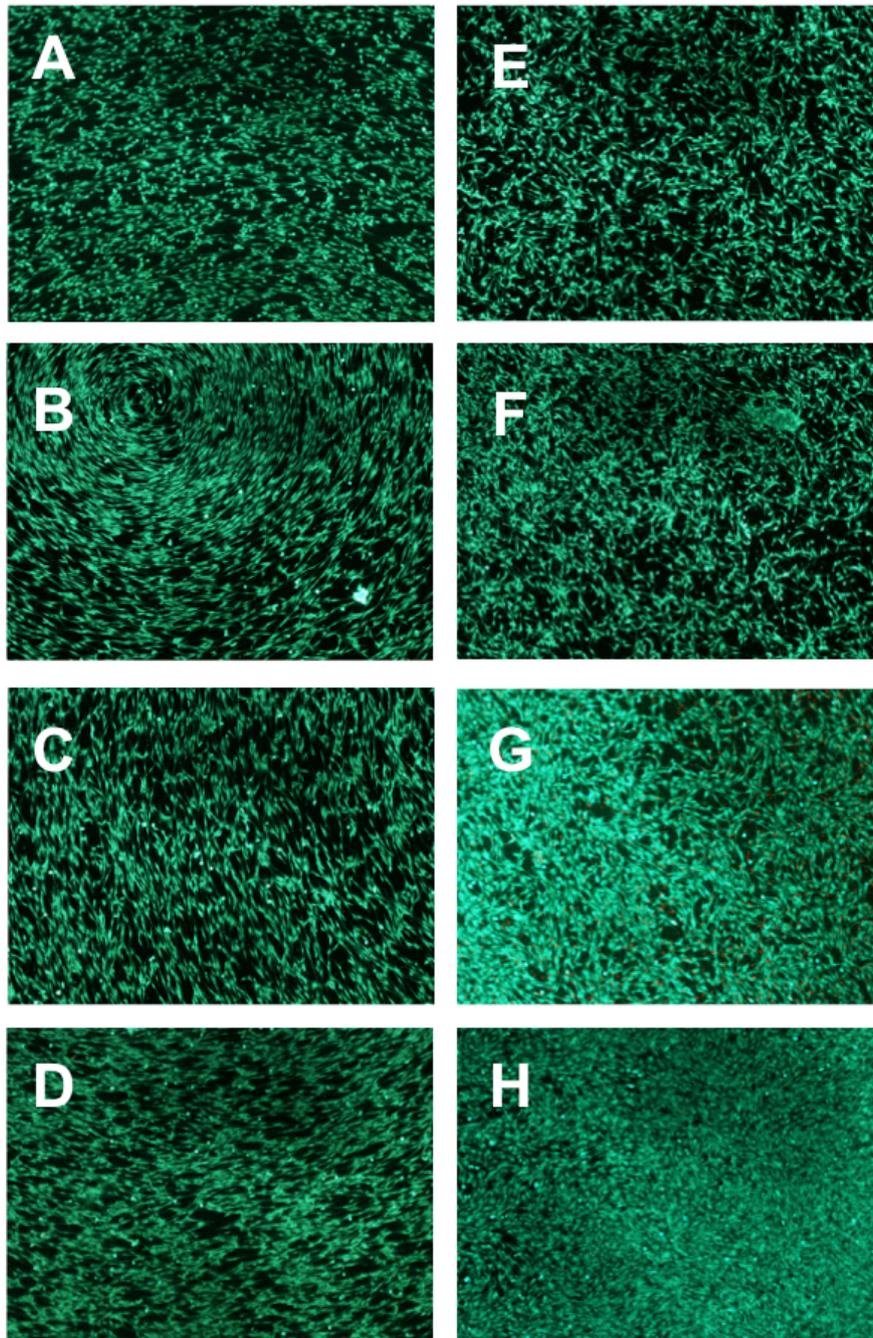


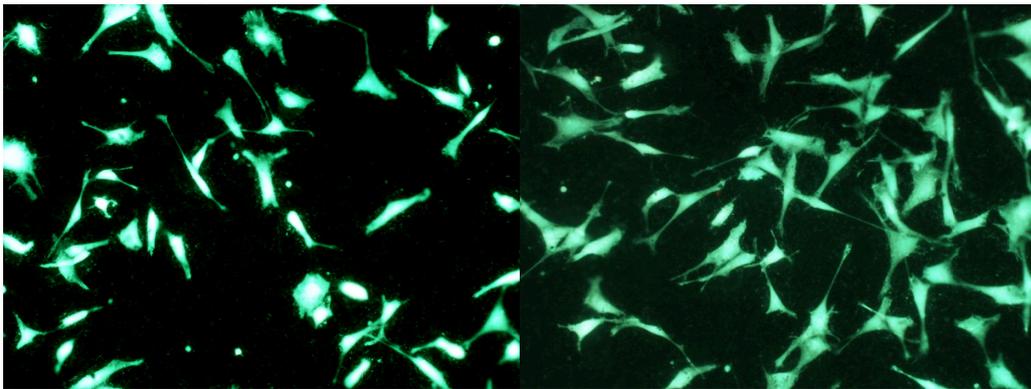
Abbildung 18: Repräsentative Beispiele vom LDS mit 4x Vergrößerung, nach 24h A-D glatte Oberfläche, E-H raue Oberfläche. A und E nativ, B und F nach UV-Photofunktionalisation, C und G nach O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung und D und H nach Ar-Plasmaaktivierung.

In der Morphologie der Zellen lassen sich zum Zeitpunkt 2h in der 20x Vergrößerung Unterschiede zwischen den Zellen auf den nativen und den oberflächenfunktionalisierten Titanplättchen gut erkennen (Abbildung 19 und Abbildung 20). Sie wirken abgeflachter,

sind mehr auf der Oberfläche ausgebreitet und weisen längere und mehr Zellausläufer auf, dieser Unterschied gilt in geringerem Maße auch zwischen den nativen glatten und rauen Plättchen (Abbildung 19 und Abbildung 20). Die Zellfläche auf den behandelten Plättchen erscheint größer als die auf den unbehandelten. Dieser Effekt erscheint auf den rauen Plättchen weniger ausgeprägt. Ein aussagekräftiger Unterschied bezüglich der Morphologie zwischen den oberflächenbehandelten (UV, O<sub>2</sub>- und Ar-Plasma) Plättchen ist nicht erkennbar.

a)

b)



c)

d)

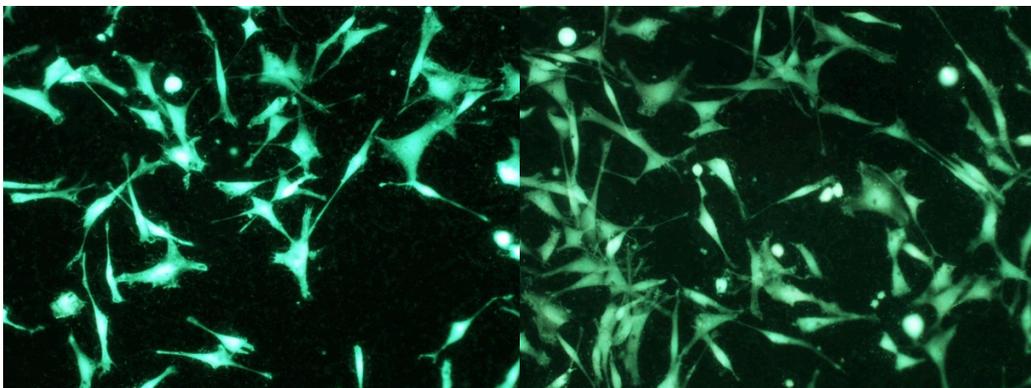
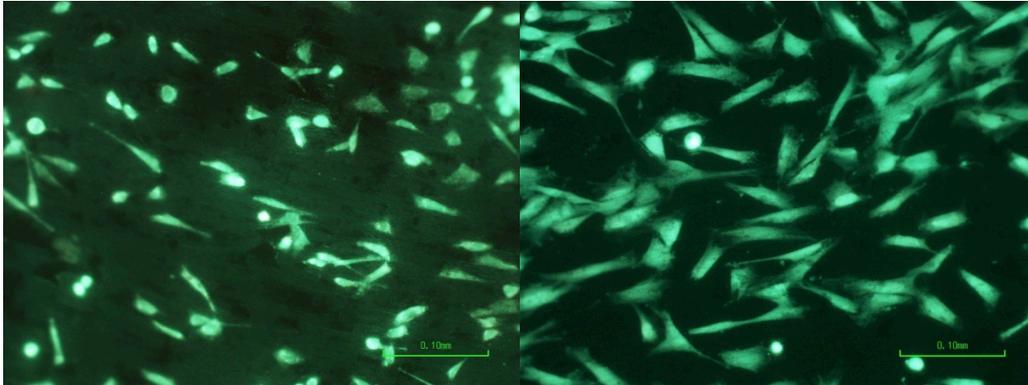


Abbildung 19: Repräsentative Beispiele vom LDS nach 2h in 20x Vergrößerung: ausgebreitete Zellen mit Zellausläufern auf behandelten rauen Plättchen im Vergleich zu nativen rauen Plättchen: a) nativ, b) Ar-Plasma, c) O<sub>2</sub>-Plasma, d) UV

a)

b)



c)

d)

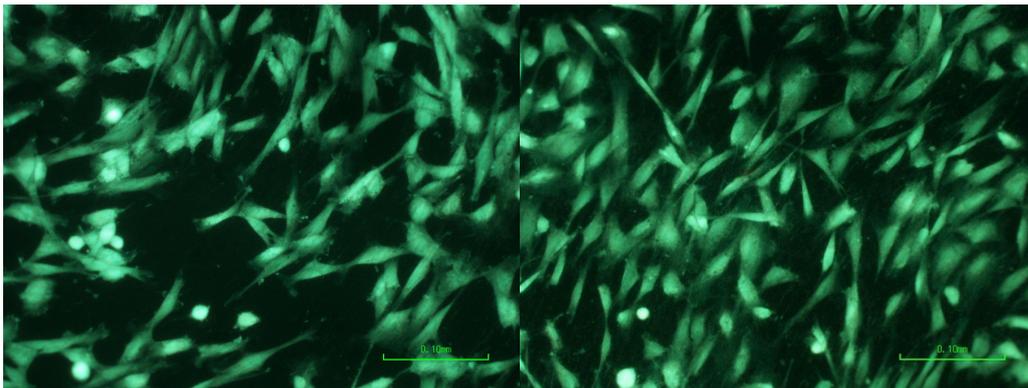


Abbildung 20: Repräsentative Beispiele vom LDS nach 2h in 20x Vergrößerung: ausgebreitete Zellen mit Zellausläufern auf behandelten glatten Plättchen im Vergleich zu nativen glatten Plättchen: a) nativ, b) Ar-Plasma, c) O<sub>2</sub>-Plasma, d) UV

#### **4.2.2. BrdU**

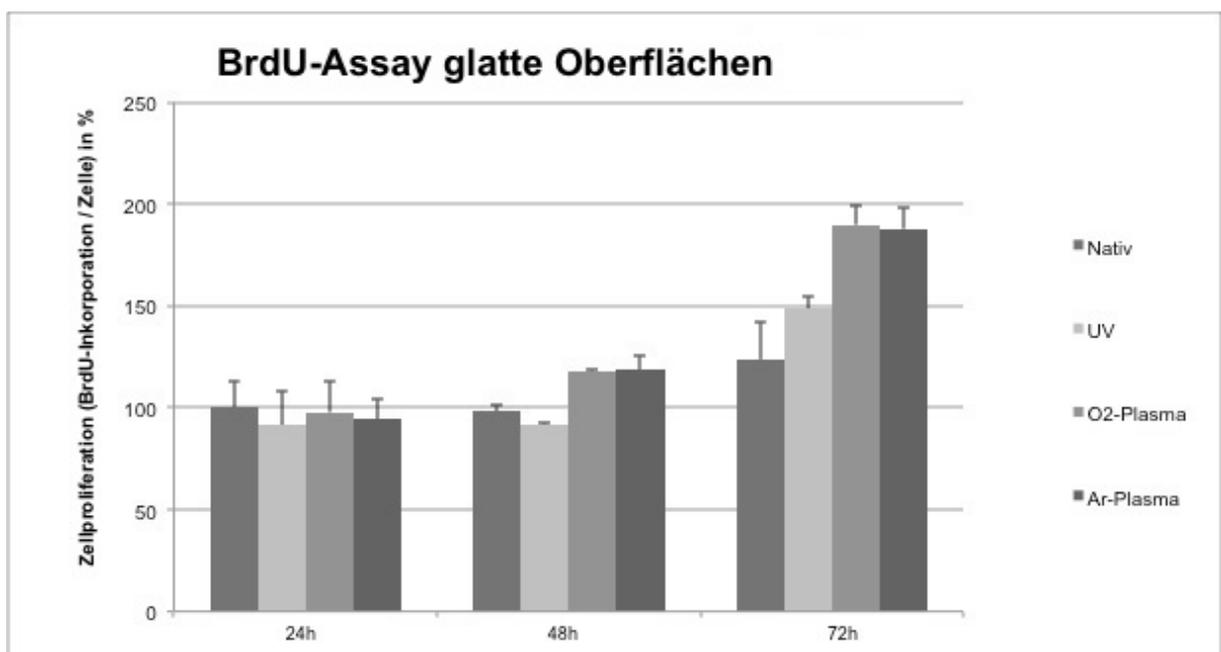
Während einer Inkubationszeit von 72h (drei Untersuchungszeitpunkte 24, 48 und 72h) nahm die BrdU Inkorporation der Präosteoblasten auf den rauen Plättchen fortlaufend zu. Auf den glatten Plättchen war dies jedoch für die Präosteoblasten auf den nativen und den UV-behandelten Plättchen zwischen den Zeitpunkten 24h und 48h nicht der Fall, der Anstieg wurde erst nach 72h deutlich (Abbildung 21 a und b). Insgesamt waren die Proliferationswerte auf den rauen Plättchen nach der Inkubationszeit höher als auf den glatten.

Die BrdU Inkorporation der Präosteoblasten auf plasmaaktivierten Plättchen war verglichen mit der auf nativen und UV-photofunktionalisierten nach 48h und 72h auf glatten Plättchen und auf rauen Plättchen nach 24h höher (Abbildung 21). Die Ergebnisse sind nur nach 72h auf den glatten- und nach 24h auf rauen Plättchen statistisch signifikant, es stellt sich ein marginaler Vorteil der Zellproliferation nach Plasmaaktivierung dar (Tabelle 7).

Einzelnen aufgeführt bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Ar-plasmaaktivierten und den UV-photofunktionalisierten glatten Plättchen nach 48h (signifikant höhere Proliferationswerte auf den Ar-plasmaaktivierten Oberflächen), während nach 72h zwischen den O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten und den UV-photofunktionalisierten glatten Plättchen signifikante Unterschiede bestanden (signifikant höhere Proliferationswerte auf den O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten Oberflächen). Nach 72h waren darüber hinaus die Proliferationswerte der Präosteoblasten auf allen oberflächenbehandelten Plättchen im Vergleich mit den nativen glatten Plättchen statistisch signifikant höher.

Die Untersuchung der rauen Plättchen ergab lediglich nach 24h statistisch signifikante Unterschiede. Statistisch signifikant höhere Proliferationswerte wurden auf den O<sub>2</sub>- und Ar-plasmaaktivierten Plättchen im Vergleich mit sowohl den nativen als auch den UV-photofunktionalisierten Plättchen, nachgewiesen.

a)



b)

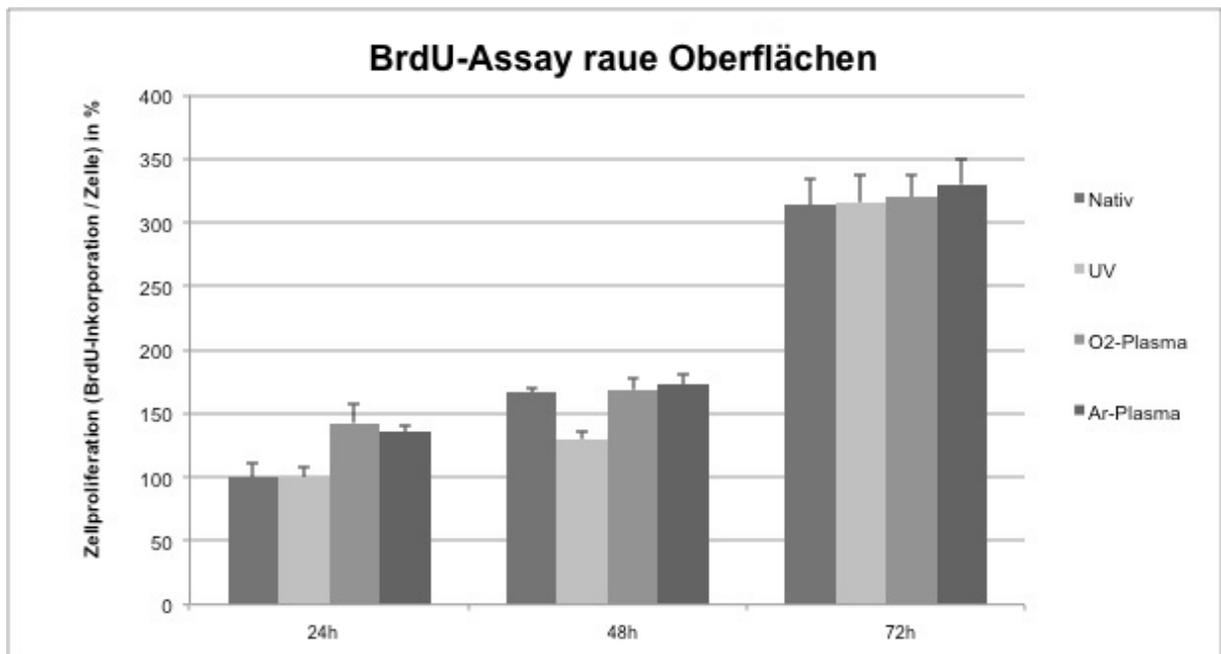


Abbildung 21: Zellproliferation (BrdU-assay) der Präosteoblasten auf glatten (a) und rauhen (b) Titanplättchen nach 24, 48 und 72h Inkubationszeit. Für eine bessere Visualisierung der Unterschiede sind die Ergebnisse in Prozent der Negativkontrolle angegeben (24h Ergebnisse der native Plättchen) ± Standardabweichung

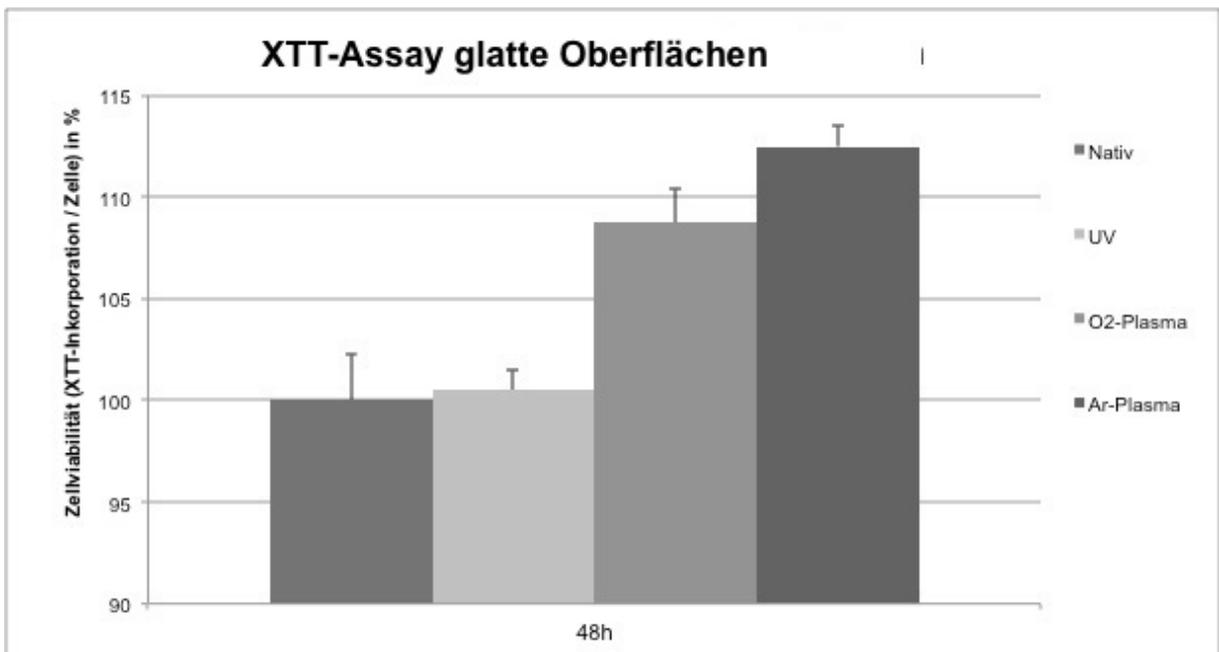
|                | Nativ vs. UV   | Nativ vs. O <sub>2</sub> -Plasma | Nativ vs. Ar-Plasma | UV vs. O <sub>2</sub> -Plasma | UV vs. Ar-Plasma | O <sub>2</sub> -Plasma vs. Ar-Plasma |
|----------------|----------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| BrdU 24h glatt | P=0.078        | P=0.423                          | P=0.286             | P=0.286                       | P=0.522          | P=0.670                              |
| BrdU 48h glatt | P=0.037        | P=0.055                          | P=0.037             | P=0.037                       | <b>P=0.004</b>   | P=1.000                              |
| BrdU 72h glatt | <b>P=0.006</b> | <b>P=0.006</b>                   | <b>P=0.004</b>      | <b>P=0.004</b>                | P=0.010          | P=0.423                              |
| BrdU 24h rau   | P=0.937        | <b>P=0.002</b>                   | <b>P=0.002</b>      | <b>P=0.002</b>                | <b>P=0.002</b>   | P=0.310                              |
| BrdU 48h rau   | P=1.000        | P=0.180                          | P=0.041             | P=0.132                       | P=0.310          | P=0.623                              |
| BrdU 72h rau   | P=0.818        | P=0.310                          | P=0.009             | P=0.589                       | P=0.039          | P=0.169                              |

Tabelle 7: Statistische Ergebnisse des BrdU-Assays nach 24, 48 und 72h Inkubationszeit, *Kruskal-Wallis* Test, Signifikanzniveau gesetzt bei  $p \leq 0.0083$  nach *Bonferroni* Korrektur

### 4.2.3. XTT

Die XTT Substratumsetzung der Präosteoblasten nach einer Inkubationszeit von 48h war auf plasmaaktivierten Plättchen verglichen mit der Substratumsetzung auf nativen- und UV-behandelten Plättchen höher (Abbildung 22 a und b). Die Unterschiede zwischen den nativen und plasmaaktivierten Plättchen zeigten sowohl für raue als auch für glatte Plättchen statistische Signifikanz (Tabelle 8). Zusätzlich war die Substratumsetzung auf den O<sub>2</sub>- und Ar-plasmaaktivierten rauen Plättchen verglichen mit der Substratumsetzung auf den UV-photofunktionalisierten rauen Plättchen signifikant höher, was eine größere Viabilität der Zellen auf dieser Oberfläche indiziert.

a)



b)

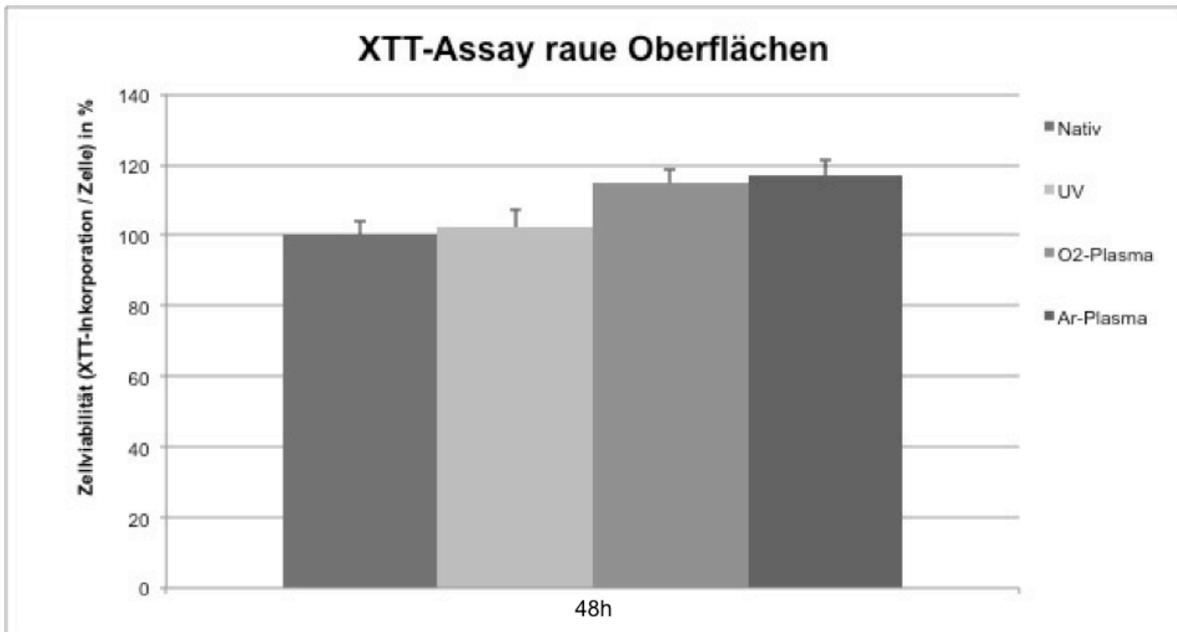


Abbildung 22: Zellviabilität (XTT-Assay) der Präosteoblasten auf glatten (a) und rauhen (b) Titanplättchen nach 48h Inkubationszeit. Für eine bessere Visualisierung der Unterschiede sind die Ergebnisse in Prozent der Negativkontrolle angegeben (48h Ergebnisse der native Plättchen) ± Standardabweichung

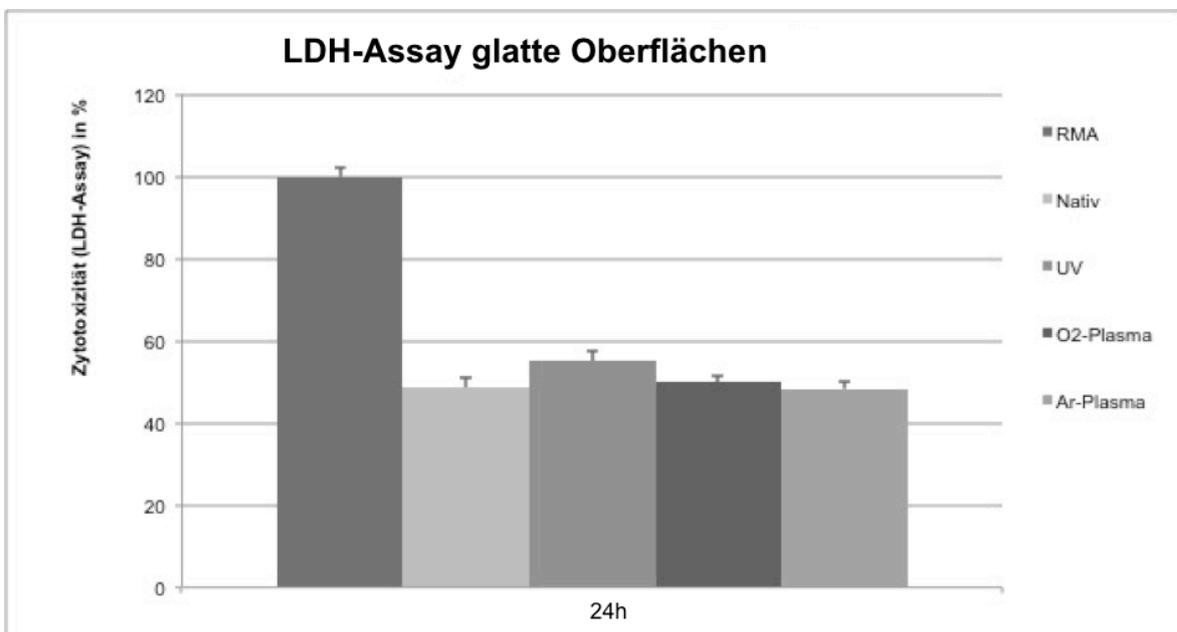
|               | Nativ vs. UV | Nativ vs. O <sub>2</sub> -Plasma | Nativ vs. Ar-Plasma | UV vs. O <sub>2</sub> -Plasma | UV vs. Ar-Plasma | O <sub>2</sub> -Plasma vs. Ar-Plasma |
|---------------|--------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| XTT 48h glatt | P=0.078      | <b>P=0.004</b>                   | <b>P=0.006</b>      | P=0.025                       | P=0.011          | P=0.855                              |
| XTT 48h rau   | P=0.310      | <b>P=0.002</b>                   | <b>P=0.002</b>      | <b>P=0.002</b>                | <b>P=0.002</b>   | P=0.065                              |

Tabelle 8: Statistische Ergebnisse des XTT-Assays nach 48h Inkubationszeit, *Kruskal-Wallis* Test, Signifikanzniveau gesetzt bei  $p \leq 0.0083$  nach *Bonferroni* Korrektur

#### 4.2.4. LDH

Die Zytotoxizität wurde mit dem LDH-Assay nach 24h Inkubationszeit bewertet und mit RM-A Plättchen verglichen. Weder die behandelten noch die unbehandelten rauen und glatten Titanplättchen waren zytotoxisch (Abbildung 23 a und b). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht statistisch signifikant (Tabelle 9).

a)



b)

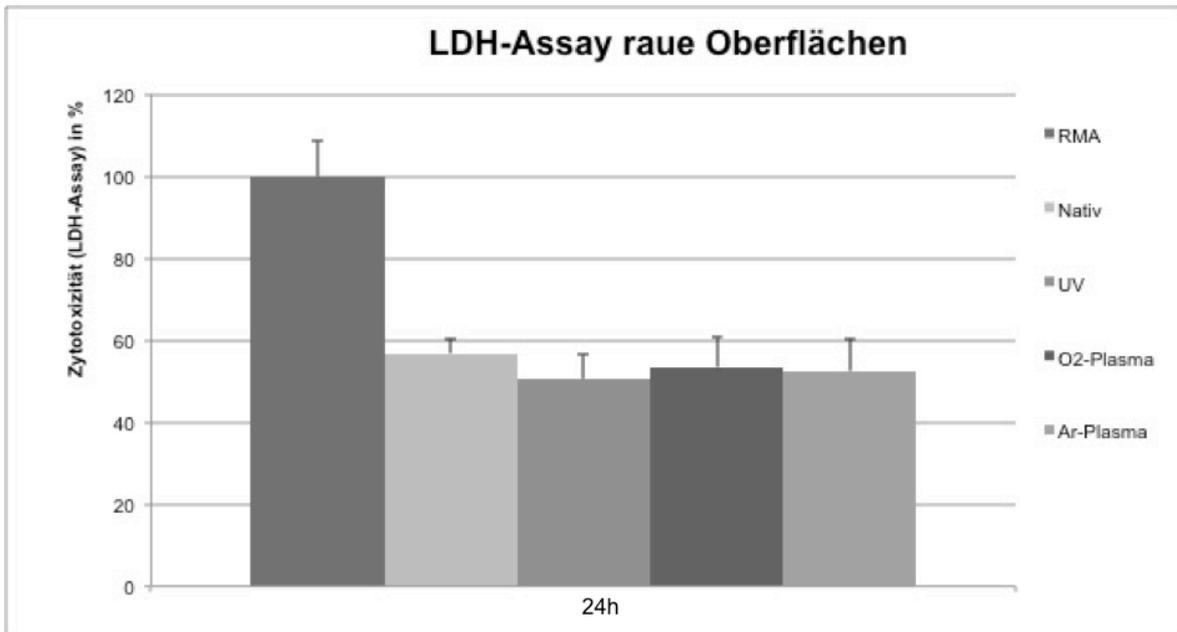


Abbildung 23: Zytotoxizität (LDH-Assay) der Präosteoblasten auf glatten (a) und rauhen (b) Titanplättchen nach 24h Inkubationszeit. Für eine bessere Visualisierung der Unterschiede sind die Ergebnisse in Prozent der Negativkontrolle angegeben (24h Ergebnisse der RM-A-Plättchen)  $\pm$  Standardabweichung

|               | Nativ vs. UV | Nativ vs. O <sub>2</sub> -Plasma | Nativ vs. Ar-Plasma | UV vs. O <sub>2</sub> -Plasma | UV vs. Ar-Plasma | O <sub>2</sub> -Plasma vs. Ar-Plasma |
|---------------|--------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|------------------|--------------------------------------|
| LDH 24h glatt | P=0.296      | P=0.109                          | P=0.199             | P=1.000                       | P=1.000          | P=0.631                              |
| LDH 24h rau   | P=0.010      | P=0.297                          | P=0.109             | P=0.200                       | P=0.522          | P=0.631                              |

Tabelle 9: Statistische Ergebnisse des LDH-Assays nach 24h Inkubationszeit, *Kruskal-Wallis* Test, Signifikanzniveau gesetzt bei  $p \leq 0.0083$  nach *Bonferroni* Korrektur

## **5. Diskussion**

### **5.1. Einordnung der Ergebnisse in den derzeitigen Stand der Forschung**

Eine Oberflächenfunktionalisation durch UV-Licht oder Kaltplasmaaktivierung mit Argon oder Sauerstoff führte, unabhängig von der Topographie des Titanplättchens, sowohl auf rauhen als auch auf glatten Titanproben zu einer Bioaktivierung der Oberfläche, ohne die Topographie signifikant zu verändern. Es wurden eine signifikante Reduktion oberflächlicher Kohlenstoffverbindungen und eine Vergößerung der Oxidschicht nachgewiesen. Darüber hinaus wiesen die Titanproben eine sehr hydrophile Oberfläche auf. Obwohl deutlich mehr Zellen auf bioaktivierten Oberflächen adhärten, waren die Auswirkungen auf Proliferations- und Viabilitätsassays eher gering. Die Zellen auf den bioaktivierten Oberflächen erschienen mikroskopisch größer, abgeflachter und mit mehr Zellausläufern. Im Vergleich der beiden Verfahren sind die Proliferationsergebnisse für die Kaltplasmaaktivierung verglichen mit der UV-Funktionalisierung signifikant höher.

Die von früheren Studien festgestellten Verunreinigungen und die zeitliche Degradation der Implantatoberfläche zwischen der Herstellung und Implantation sind für die Bioaktivität der Oberfläche der Titanimplantate hinderlich (Hori et al. 2010). Neben den Ansätzen, bereits in der Herstellung Verunreinigungen zu vermeiden und die Degradation umzukehren, z.B. indem Titanimplantate in Kochsalzlösung gelagert werden (Buser et al. 2004), sind UV-Photofunktionalisation oder die Kaltplasmaaktivierung einfache und in der Praxis anwendbare Lösungen, die die Osseointegration steigern können.

Eine Reihe von Studien haben die positiven Effekte von UV-Photofunktionalisation oder Kaltplasmaaktivierung auf Titanoberflächen untersucht, aber diese ist, nach bestem Wissen der Autoren, die erste, in der überprüft wird, ob die Methoden in der Verbesserung der physikalischen Materialcharakteristika und Zellreaktionen auf Titanoberflächen unter kontrollierten Bedingungen und gleicher Funktionalisierungszeit vergleichbar sind.

In einer aktuellen Studie haben *Canullo et al.* die Effekte von einer 3-stündigen UV-Photofunktionalisation und einer 12-minütigen Ar-Kaltplasmaaktivierung von verschiedenen rauhen Titanoberflächen untersucht und verglichen. Die Zelladhäsion von sowohl MC3T3-E1- und MG-63-Zellen nach 10 Minuten und die Proteinadsorption, als Ausblick auf das Einheilungsvermögen *in vivo*, da die Wechselwirkung von Blutproteinen und der Implantatoberfläche als einer der ersten Schritte im Osseointegrationsprozess abläuft (MacDonald et al. 2002), war unabhängig von der Rauheit nach beiden Verfahren signifikant erhöht. Die Unterschiede zwischen den beiden Funktionalisierungsverfahren waren jedoch nicht signifikant (Canullo et al. 2016).

In einer Studie von *Noro et al.*, in der eine wesentlich längere UV-Photofunktionalisation mit einer O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung von Keramik-Oberflächen (TZP) verglichen wird, führte eine O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung zu einer Abnahme des Kohlenstoffgehaltes und einer Zunahme von positiv geladenen Hydroxylgruppen an der Keramikoberfläche und nach beiden Verfahren zur Superhydrophilität (Noro et al. 2013). *Watanabe et al.* beschrieben 2012 für diesen Vergleich keine signifikanten Unterschiede für die Zahl der adhärenierten Zellen (Watanabe et al. 2012). *Kobune et al.* beschrieben mit ihrer Studie von 2014 einen leichten Vorteil von der O<sub>2</sub>-Kaltplasmaaktivierung auf die Funktionalisation von TZP Oberflächen (Kobune et al. 2014). Ein Vergleich zwischen Ar- und O<sub>2</sub>-Kaltplasmaaktivierung wurde bisher nicht beschrieben.

Weiterhin gibt es nur sehr wenige Studien, in denen praxistaugliche kurze Funktionalisationsprotokolle für UV-Licht oder Kaltplasma verwendet wurden. Auch wenn die Ergebnisse dieser Studie bestätigen, dass eine UV-Photofunktionalisation ähnlich effektiv wie eine Kaltplasmaaktivierung sein kann, scheint, wie *Canullo et al.* ebenso zeigten, mit einer längeren Applikationszeit der UV-Photofunktionalisation eine weitere Effektivitätssteigerung erreichbar zu sein (Canullo et al. 2016).

Vergleichsstudien mit ähnlicher Funktionalisationsdauer wären hilfreich, um die festgestellten Ergebnisse besser interpretieren zu können. Darüber hinaus fehlen klar definierte Funktionalisierungsprotokolle. Neben verschiedenen Aktivierungszeiten spielen für die Effektivität der UV-Funktionalisation auch die verwendeten Wellenlängen eine große Rolle (Att et al. 2009a, Gao et al. 2013) und für die Plasmaaktivierung ziehen Änderungen des Gasgemisches unterschiedliche Ergebnisse nach sich (Seo et al. 2014).

Die Ergebnisse dieser Studie deuten an, dass Kaltplasma bei der Oberflächenaktivierung von Titan effektiver und effizienter sein könnte.

### **5.1.1. Oberflächenplasmaaktivierung**

Hochdruck- / Hochtemperaturplasma wird schon lange in der industriellen Fertigung von Implantaten verwendet, ist jedoch auf Grund der hohen Temperaturen und Gasdrücke aufwendig und teuer. Dabei wird zudem die Oberflächenstruktur der Implantate verändert. Die neue Generation von Kaltplasmageräten ist kompakt und lässt sich auf Grund der geringeren Kosten in den Klinikalltag integrieren. Sie aktivieren die Oberfläche ohne die Oberflächenintegrität zu verändern und verhindern somit den Verlust der mit der bestimmten Oberflächenstruktur verbundenen spezifischen Vorteile. Mit der Gewährleistung einer gleichbleibenden Oberfläche können somit die Effekte durch

Lagerungszeit/Alterung auf Implantatoberflächen durch Oberflächenplasmaaktivierung ohne Oberflächenveränderungen reversiert werden.

Eine Steigerung der Hydrophilie, die Vergrößerung der Oxidschicht, die vermehrte Adhäsion und eine gesteigerte Viabilität und Proliferation von Präosteoblasten sind in dieser Studie nach Kaltplasmabestrahlung von Titanoberflächen beschrieben worden.

Darüber hinaus wurden von *Annunziata et al.* ähnliche Sterilisationseffekte wie für die UV-Photofunktionalisation für die Ar-Kaltplasmaaktivierung auf verunreinigten Titanoberflächen ermittelt (Annunziata et al. 2016).

Die bisherigen Studien auf dem Gebiet weisen jedoch keine einheitlichen Plasmabehandlungsparameter auf. Nach bestem Wissen der Autoren, wird nur in wenigen Studien ebenfalls das Yocto III Plasmagerät von Diener verwendet (Canullo et al. 2014). Andere Geräte wie z.B. Plasma R von Sweden & Martina (Canullo et al. 2016), Colibri von Gambetti (Canullo et al. 2013) oder VEP-1000 von ULVAC (Kobune et al. 2014) haben andere Plasmabehandlungsparameter und Gasgemische. Hinzu kommt, dass beispielsweise der vielfach verwendete KinPen von INP (Coelho et al. 2012) lediglich mehrmals hintereinander mehrere kleine Bereiche einer Probe bestrahlt und nicht die ganze Probe. Somit sind die Ergebnisse schwer zu vergleichen.

Die Auswirkung kleinster Abweichungen der Plasmabehandlungsparameter zeigte eine Studie von *Seo et al.*, in der nanotubuläre Titanproben mit einem portablen Kaltplasma-Gerät bei atmosphärischem Druck plasmaaktiviert wurden und lediglich das Gasgemisch verändert wurde. Die 10-minütigen Oberflächenaktivierungen führten für beide Gruppen durch eine verbesserte Hydrophilität und eine Veränderung der Oberflächenchemie zu Verbesserungen in Bezug auf Anheftung, Proliferation und Viabilität von MC3T3-E1-Zellen im Vergleich mit nicht behandelten Proben. Die auf Stickstoff basierende Plasmaaktivierung war jedoch der auf komprimierter Luft basierenden Plasmaaktivierung überlegen (Seo et al. 2014).

*Noro et al.* beschrieben für die O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung von TZP Oberflächen eine Überlegenheit der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche (Noro et al. 2013). Hinzu erschweren die verschiedenen Materialien, die untersucht wurden, die Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Die Ar-Plasmaaktivierung steigerte die biomechanische Fixation und Knochenformation von mit bioaktivem Keramikpulver abgestrahlten Titanimplantaten noch bis zu 30 Tage

nach der Aktivierung (Guastaldi et al. 2013). Wie stark dieser Effekt mit der Zeit abnimmt muss noch geklärt werden.

Zu den Zeitpunkten 2 und 4 Wochen *in vivo* war der Removal Torque von aluminiumgestrahlten und säuregeätzten Titanimplantaten in einer über 20 Sekunden Ar-Plasmaaktivierten Gruppe höher als in der nicht aktivierten und schlechter als in einer über 60 Sekunden aktivierten. *Teixeira et al.* zeigten damit, die mit steigender Bestrahlungszeit ansteigende Wirkung der Plasmaaktivierung (Teixeira et al. 2012). Ab welcher Bestrahlungsdauer dieser Effekt nicht mehr steigerbar ist bleibt fraglich.

Zusammengefasst kam es, wie die Ergebnisse zeigen, auch in dieser Studie, immer zu einem Benefit durch die Plasmaaktivierung unabhängig vom Gasgemisch. Sowohl die Nutzung von Sauerstoff als auch von Argon führte in dieser Studie zu einer verbesserten Osteoblastenfunktion, wobei die Zellen auf den Titanplättchen nach der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung in den Viabilitäts- und Proliferationsassays teilweise bessere Werte aufwiesen, diese waren jedoch statistisch nicht signifikant. Inwiefern sich bestätigen lässt, dass Ar-Plasma, wie die Ergebnisse dieser Studie andeuten, die leicht wirksamere Variante darstellt, um eine für Zellen attraktivere Oberfläche zu erzeugen, sollte in weiteren Studien überprüft werden.

### **5.1.2. UV-Photofunktionalisation**

UV-Strahlung führt zu einer Oberflächenreinigung, Kohlenstoffentfernung, Vergrößerung der Oxidschicht und steigert die Hydrophilie von Implantatmaterialien aus Titan und Zirkon. *In vitro* wurden Verbesserungen der Adhäsion, Viabilität, Proliferation und Morphologie von Zellen beschrieben.

Darüber hinaus ist die Verringerung von menschlichen oralen Bakterien und eine reduzierte Biofilmbildung *in vitro* nach der UV-Photofunktionalisation von maschinieren Titanoberflächen im Vergleich mit unbehandelten nachgewiesen worden (de Avila et al. 2015). *Riley et al.* zeigten durch eine UV-Photofunktionalisation geringer Intensität eine Bakterienverlustrate von 800 Millionen / cm<sup>2</sup> auf kommerziell reinem Titan auf (Riley et al. 2005). Dieser Effekt könnte für die Behandlung einer Periimplantitis nützlich sein.

Die UV-Photofunktionalisation wird schon seit geraumer Zeit zur Optimierung von Titanoberflächen eingesetzt. Wie auch für die Plasmabehandlung ist es schwer, die Ergebnisse von verschiedenen Studien zu vergleichen, da die Bestrahlungsparameter stark variieren. Zudem sind die meisten der in Studien beschriebenen Protokolle sehr lang

und eignen sich wenig für den Vergleich mit dem von uns genutzten Gerät mit kurzer Bestrahlungszeit, welches für den Einsatz direkt vor der Implantation konzipiert ist. Hinzu kommt die nachgewiesene unterschiedlich starke Wirkung verschiedener Wellenlängen (Aita et al. 2009a). Der in dieser Studie genutzte UV-Ofen erzeugt eine Mischung von UVA- und UVC-Strahlen.

Nach derzeitigem Wissensstand wird lediglich in den Studien von *Minamikawa et al.*, *Funato et al.*, *Roy et al.* und *Tuna et al.* das gleiche UV-Photofunktionalisationsgerät verwendet wie in dieser Studie (Funato et al. 2013, Minamikawa et al. 2014, Tuna et al. 2015, Roy et al. 2016). Bei ähnlichen Bestrahlungsparametern ist lediglich in der Studie von *Roy et al.* auch die Bestrahlungszeit mit unseren 12 Minuten identisch. Bei den anderen Studien war die Funktionalisationszeit 15 Minuten.

Die Bestrahlung von Titanoberflächen mit ultraviolettem Licht konnte *in vitro* und *in vivo* zeigen, dass die Osteoblastenaktivität, der KIK und die Parameter für die Osseointegration stiegen (Aita et al. 2009b). *Att et al.* zeigten eine Überlegenheit nach UVC- im Gegensatz zur UVA-Photofunktionalisation (Att et al. 2009a). Die Bestrahlungszeit war jedoch länger und lag bei 48 Stunden, welche jedoch in der zahnärztlichen Praxis nur äußerst schwierig umzusetzen wären. *Lorenzetti et al.* beschrieben eine UVB-Photofunktionalisation von TiO<sub>2</sub> Oberflächen von 5 Stunden als hydrophilitätssteigernd (Lorenzetti et al. 2015) und *Att et al.* zeigten diesen Effekt für eine Mischung aus Wellenlängen im Bereich von UV-A und -C nach 24h für Keramik-Proben (Att et al. 2009b). *Gao et al.* haben getrennt die Wirkung von sowohl UVC- als auch UVA-Strahlen auf Titanoberflächen (MAO) untersucht. Der Kohlenstoffgehalt wurde nach Behandlung durch beide Wellenlängen ähnlich stark verringert. Die Oxidschicht war jedoch nach UVC- höher als nach UVA-Photofunktionalisation (Gao et al. 2013).

Es existieren kaum Ergebnisse für die in dieser Studie genutzte kurze Bestrahlungszeit von 12 Minuten, aber viele Untersuchungen, die eine deutliche Steigerung der Bioaktivität von Titanoberflächen nach UV-Photofunktionalisation von mehreren Stunden zeigen (Liu et al. 2007a, Iwasa et al. 2010). Da in dieser Studie die Steigerung der Proliferation und der Viabilität der Präosteoblasten sowie die Senkung des Kontaktwinkels auf den UV-photofunktionalisierten Titanplättchen geringer war, gab es bezüglich dieser Parameter eine Überlegenheit der Kaltplasmaaktivierung bei gleicher Bestrahlungszeit von 12 Minuten.

Ob und inwiefern sich diese Unterlegenheit mit einer anderen Aktivierungszeit ausgleichen ließe, bleibt auf Grund einer fehlenden Eichkurve ungewiss. Auch die Ergebnisse anderer Publikationen, die sich mit UV-Photofunktionalisation oder

Plasmaaktivierung befasst haben, lassen sich auf Grund der schon besprochenen unterschiedlichen Behandlungsparameter nicht aussagekräftig vergleichen. Somit bleibt es offen, ob eine längere oder auch kürzere Funktionalisationszeit zu einer vergleichbaren Effektivität der beiden Varianten führen würde und ob diese für die UV-Photofunktionalisation noch im für die Praxis realisierbaren Bereich liegen würde.

### **5.1.3. Titanproben**

Die Aufrauung der Titanoberfläche ist eine anerkannte Methode zur Optimierung der Osseointegration und zur Vergrößerung des KIK (Grassi et al. 2006). Die benutzten Titanplättchen mit der Camlog® Promote® Oberfläche, moderat rau, sandgestrahlt und geätzt, wie sie auch bei Camlog® Implantaten zum Einsatz kommt, stellen somit realitätsnahe Testobjekte dar. Als weitere Probengruppe wurden als Referenz Titanplättchen mit glatter, maschinierter Oberfläche verwendet, wie sie z.B. für Implantatabutments verwendet werden (Happe und Holthaus 2014). Der Erfolg von Camlog®-Implantaten mit Promote®-Oberfläche ist gut dokumentiert und liegt in einer Studie von *Franccchini et al.* bei einem Untersuchungszeitraum von bis zu 6 Jahren bei 99,5% (Franchini et al. 2011).

Dennoch gibt es verschiedene Ansätze, den Erfolg noch zu verbessern. Ansätze um die Osseointegration auch nach dem Herstellungszyklus noch zu beschleunigen und zu verbessern erscheinen im Hinblick auf Kriterien wie beispielsweise geringes Knochenangebot oder Implantate mit reduzierter Oberfläche durch Höhen- oder Durchmesserreduktion als Gegenstand aktueller Forschung (Ueno et al. 2010a).

Nichtsdestotrotz finden auch eine ganze Reihe weiterer Implantatoberflächen Anwendung und es stellt sich die Frage, ob sich die Ergebnisse dieser Studie auch auf diese anwenden lassen.

Die Forschungsarbeit von *Minamikawa et al.* bestätigte den gleichermaßen positiven Effekt auf die Bioaktivität und Osteokonduktivität von einer 15-minütigen UV-Photofunktionalisation von sowohl rauen als auch glatten Ti6Al4V-Oberflächen (Minamikawa et al. 2014) und *Canullo et al.* bestätigten darüber hinaus die gesteigerte Bioaktivität von Ar-Plasma unabhängig von der Oberflächentopographie (glatt/rau (machined/SLA)) von Titanimplantaten (Canullo et al. 2016). *Noro et al.* bestätigten auch auf TZP (Keramik) Oberflächen einen positiven Effekt von O<sub>2</sub>-Plasma in Hinblick auf die positive Beeinflussung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Oberfläche

(Noro et al. 2013). *Duske et al.* zeigten, dass die Wirkung von einem gemischten O<sub>2</sub>/Ar-Plasma hinsichtlich Kontaktwinkelsenkung und Zellfläche auf Titanimplantaten unabhängig von der Oberflächentopographie förderlich ist (Duske et al. 2012). Weitere Forschungsergebnisse unterstreichen, dass andere Oberflächen wie die von Zirkoniumdioxidkeramiken oder Co-Cr-Alloys, ebenfalls mit der UV-Photofunktionalisation positiv modifiziert werden können (Att et al. 2009a, Brezavšček 2012). *Shon et al.* zeigten für Zirkonimplantate nach einer He-Plasmaaktivierung eine erhöhte Osseointegration (Shon et al. 2014). Genauso waren, wie *Baier et al.* bestätigten, andere Oberflächen als Titan mit der Plasmaaktivierung bioaktivierbar. Die Ar-Plasmaaktivierung von glatten Germanium- und Co-Cr-Mo-Oberflächen zeigte eine bessere Fibroblasten-Zelladhäsion (Baier et al. 1984).

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen insgesamt die positive Wirkung von sowohl Kaltplasmaaktivierung als auch UV-Photofunktionalisation - unabhängig von der Oberflächentopographie - auf Titanoberflächen.

#### **5.1.4. Zellen**

Um einen möglichst realistischen Ausblick auf das Verhalten in späteren *in vivo* Tests zu geben, wurden in dieser Studie für die *in vitro*-Tests eine etablierte Zelllinie von murinen Präosteoblasten (MC3T3-E1) benutzt, mit der reliable Ergebnisse möglich sind. Obwohl sie murinen Ursprungs sind, werden sie als gute Alternative für die *in vitro* Testung von Biomaterialien angesehen und sind repräsentativ für osteogenes Wachstum (Czekanska et al. 2012). Die verwendeten Standardtestreihen ermöglichen vergleichbare Ergebnisse zu Proliferation, Viabilität und Zytotoxizität und erlauben eine prognostische Aussage über die Unterschiede initialer Reaktionen knochenbildender Zellen auf funktionalisierte Titanoberflächen.

Alternativ werden in der Literatur Fibroblasten verwendet, die jedoch keine Aussage über die osteogene Potenz eines Biomaterials liefern können. Der Ausblick einer schnelleren und besseren Fibroblastenadhäsion ist jedoch für Abutments ein Ansatz für eine bessere Anlagerung der Weichgewebemanschette und Versuche, die Bakterieninvasion zu minimieren (Dorkhan et al. 2014). In verschiedenen Studien wurde ein positiver Effekt für Fibroblasten auf UV-oberflächenfunktionalisierten und plasmaaktivierten Titanoberflächen beschrieben (Canullo et al. 2013, Lee et al. 2015, Satue et al. 2016).

Ob und in wie weit sich die Ergebnisse dieser Studie auf die komplexen Zusammenhänge in einem lebenden biologischen System übertragen lassen, bleibt mit einem *in vivo* Versuch abzuwarten.

## **5.2. Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1. Oberflächenchemie**

In dieser Studie wurde die Veränderung der Oberflächenchemie in Hinblick auf C, Ti, O im Vergleich mit der UV-Photofunktionalisation und der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung besonders durch die Ar-Plasmaaktivierung deutlich. Die O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung und die UV-Photofunktionalisation hatten eine weniger starke Wirkung. Die Reduktion von C durch die Ar-Plasmaaktivierung war jedoch nur im Vergleich mit der UV-Photofunktionalisation statistisch signifikant. Mit sinkendem Kohlenstoff- und höherem Ti<sup>+</sup>-Gehalt wird es für die negativ geladenen Osteoblastenhüllen einfacher an die Titanoberfläche zu binden und es kommt zu einer gesteigerten Interaktion (Iwasa et al. 2010), was für eine gesteigerte Osseointegration förderlich sein kann.

Auf den nativen Titanplättchen wurde organisches Material (C, N, O) zusammen mit Nitraten, Fluoriden, Magnesium, Silikaten, Sulfaten und / oder Calcium nachgewiesen. Die Kaltplasmabehandlung der Titanplättchen führte zu etwas dickeren Oxidschichten und zu einer besseren Reduktion von organischem Material und Sulfaten im Vergleich zu der UV-Behandlung. Generell waren sowohl nach den Plasmaaktivierungen als auch nach der UV-Photofunktionalisation alle Kohlenstoffkonzentrationen relativ niedrig zwischen  $15,8 \pm 0,2$  und  $17,2 \pm 0,7$  at%. Die Ergebnisse zeigten sowohl nach der UV-Photofunktionalisation als auch nach der Plasmaaktivierung eine Reduktion der Hydrocarbonverbindungen und eine Erhöhung von Ti und O auf der Titanoberfläche. Carbonverbindungen sind Verunreinigungen aus der Umgebungsluft und entstehen durch den Kontakt mit CO<sub>2</sub> und CO (Kim et al. 2003). Die Reduktion von Hydrocarbonverbindungen über UVA basiert auf dem photokatalytischen Effekt. Durch die Anregung der Moleküle während der UV-Photofunktionalisation und der Plasmaaktivierungen können diese mit den Hydrocarbonverbindungen der Oberfläche zu Wasser und CO<sub>2</sub> reagieren und werden dann abgepumpt (Vesel et al. 2006). Somit erklärt sich, dass ein kleineres C/O Verhältnis auf der Oberfläche der mit photofunktionalisierten und plasmaaktivierten Titanplättchen vorliegt. Die Reduzierung von Hydrocarbonverbindungen durch UVC hingegen basiert auf dem wirkungsvolleren

photolytischen Effekt, bei dem viele OH-Radikale gebildet werden (Son et al. 2009, Gao et al. 2013). Zusätzlich wurde wahrscheinlich durch die Oxidation des vorhandenen Stickstoffs auf der Probenoberfläche Nitrate erzeugt (die Gesamtmenge an Stickstoff war auf allen Proben ähnlich, was zeigt, dass Stickstoff weder von der Oberfläche entfernt noch von einem möglichen Leck auf die Oberfläche aufgebracht wurde). Zusätzlich wurden Fluoride und Silikate durch die Behandlungen auf die Probenoberfläche aufgebracht, während aber weniger Nitratgruppen durch die UV-Photofunktionalisation erzeugt wurden. Auf der anderen Seite wurden Sulfate durch die UV-Photofunktionalisation nicht entfernt. Die Reduktion von organischem Material war bei der Argon-Plasmaaktivierung gegenüber dem Sauerstoffplasma wirksamer, während mit dem Sauerstoffplasma mehr Nitratgruppen erstellt wurden (jeweils  $p = 0,03$ ). Die Unterschiede zwischen diesen Behandlungen waren weder relevant noch statistisch signifikant. Nachdem die Plättchen mit Argon-Plasma aktiviert wurden, konnte kein Argon auf der Probenoberfläche detektiert werden. Ein Grund für die Abwesenheit von Argon, sogar nach Argonplasmaaktivierung, kann die Überlagerung durch andere Elemente sein. Ein Grund, warum kleinste Spuren von Calcium und Magnesium lediglich auf den unbehandelten und den argonplasmaaktivierten Proben nachgewiesen wurde, kann der Herstellungsprozess sein oder auch der Gebrauch der gleichen Bestrahlungsgeräte mit verschiedenen Materialien sein. Nachgewiesene Fluoride können aus dem Wasser, mit dem die Plättchen beim Produktionsprozess gespült wurden, stammen. Andere Veränderungen der Elementzusammensetzung stehen miteinander in Verbindung, indem sich die prozentuale Verteilung der Elemente lediglich durch die veränderte Oberflächenchemie, mit gesunkenem Kohlenstoff- und vergrößertem Sauerstoff- und Titananteil, verschiebt.

Die Effekte von UV-Photofunktionalisation und Kaltplasmaaktivierung in der Veränderung der Oberflächenchemie von glatten und rauen Titanplättchen wurden in verschiedensten Studien beschrieben. Die Zelladhäsion an der Titanoberfläche korreliert positiv mit der UV-Dosis und negativ mit den Kohlenstoffresten (Hori et al. 2010). Genauso zeigten Kaltplasmaaktivierungen ähnliche Effekte an der Oberfläche für die Verringerung von Kohlenstoff und die Erhöhung der Werte für Titan und Sauerstoff (Guastaldi et al. 2013, Danna et al. 2015).

*Aita et al.* reduzierten mit der UV-Photofunktionalisation den Kohlenstoffgehalt von säuregeätzten Titanoberflächen in at% von >50% auf <20% nach 48-stündiger Bestrahlung. Die Verringerung des Kohlenstoffgehaltes und die Zunahme des Sauerstoffgehaltes an der Oberfläche korrelierten dabei mit der UV-Funktionalisationszeit. Sie schlussfolgerten, dass die initiale Zelladhäsion mit der verbleibenden Menge an

Kohlenstoff an der Titanoberfläche korrelieren könnte (Aita et al. 2009b). Diese zeitabhängige Beeinflussung des Kohlenstoff- und Sauerstoffanteils wurde von *Att et al.* auch für Zirkonoberflächen nachgewiesen (Att et al. 2009b). Eine Verringerung des Kohlenstoffgehaltes und eine Zunahme des Sauerstoffgehaltes in der Oberfläche von Zirkonproben wurde auch von *Brezavšček* beschrieben (Brezavšček 2012). Die Ergebnisse dieser Studie gehen damit konform, dass eine Sauerstoffzunahme und eine Reduktion des Kohlenstoffs stattgefunden haben und werfen gleichzeitig die Frage auf, ob eine längere Bestrahlungszeit zu einer weiteren Reduktion des Kohlenstoffs oder Vergrößerung des Sauerstoffanteils geführt hätte. Die Untersuchungen von mäßig rauen Titanoberflächen nach UV-Photofunktionalisation von *Altmann et al.* lieferten ähnliche Ergebnisse. Der Oberflächenanteil von Kohlenstoff sank von 39 auf 7 at% (Altmann et al. 2013). Im Jahr 2009 beschrieben auch *Att et al.*, dass die UV-Photofunktionalisation in der Lage sei, die Hydrocarbonanteile an der Oberfläche gealterter Titanoberflächen signifikant zu reduzieren, ohne die Oberflächentopographie zu verändern. Im Vergleich von UVA und UVC-Photofunktionalisation von Titanoberflächen stellte sich heraus, dass nur UVC in der Lage ist, den gestiegenen Kohlenstoffgehalt auf der Oberfläche von gealterten Titanproben wieder auf das Niveau von neuen Proben zu reduzieren (Att et al. 2009a). Eine 15-minütige UV-Photofunktionalisation (Therabeam Affiny, Ushio) von Titanimplantaten direkt vor der Implantation führte zu einem veränderten Atomverhältnis zwischen C/Ti von 109% vor und 38% nach der UV-Photofunktionalisation, wie *Funato et al.* beschrieben (Funato et al. 2013). *Gao et al.* haben getrennt die Wirkung von sowohl UVC als auch UVA auf Titanoberflächen (MAO) untersucht. Der Ti 2p Spitzenwert war nach UVC- höher als nach UVA-Photofunktionalisation. Der C 1s Spitzenwert wurde durch beide Wellenlängen ähnlich stark verringert. Der Spitzenwert für O 1s war nach UVC- prominenter als nach UVA-Photofunktionalisation (Gao et al. 2013). Die Reduktion von Kohlenstoff und der Anstieg von Titan und Sauerstoff gehen konform mit den Ergebnissen von *Park et al.*, die anodisch oxidierte Titanimplantate nach 24-stündiger UVC-Photofunktionalisation untersuchten (Park et al. 2013). *Han et al.* beschrieben, dass die Kohlenstoffzusammensetzung der Oberfläche von Titanimplantaten (MAO) nach 0,5 oder 2h UVA-Photofunktionalisation in destilliertem Wasser nur geringfügig unterschiedlich waren (Han et al. 2008). 30 Minuten UV-photofunktionalisierte (6 mW/cm<sup>2</sup> ( $\lambda = 312\text{nm}$ )) Titanplättchen (Grad IV) wiesen nach XPS Untersuchung eine Reduktion des Kohlenstoffanteils von 52,2 auf 46,5 at% und eine Vergrößerung des Titan- und Sauerstoffanteils von 12,6 auf 13,5 at% und 31,8 auf 35,2 at% an der Oberfläche auf (Petzold et al. 2010). Hierfür wurden Titanimplantate mit abgestrahlten oder geätzten Oberflächen für 12 Minuten im SuperOsseo Therabeam Gerät von Ushio UV-photofunktionalisiert. Unabhängig von der Geometrie der Implantate konnte eine

Reduktion des Kohlenstoffanteils und eine Vergrößerung des Titan- und Sauerstoffanteils nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde in der XPS Analyse eine Zunahme von Titanhydroxid und eine Abnahme von H<sub>2</sub>O nachgewiesen. Die Autoren schlossen daraus, dass diese Hydroxylgruppen zusammen mit anderen freien Bindungsstellen der Oxide, den durch die Photofunktionalisation hervorgerufenen Effekt der Superhydrophilie ausmachen, was, für die in der Studie nachgewiesene, verbesserte Interaktion mit Zellen und biologischem Gewebe verantwortlich sein könnte (Roy et al. 2016). *Hayashi et al.* zeigten den negativen biologischen Effekt von Hydrocarbon auf Titanoberflächen (Grad 2, hochglanzpoliert) *in vitro* auf, indem ein größeres Atomverhältnis zwischen C/Ti von 1 im Gegensatz zu 0,3 die Osteoblastenfunktion stark reduzierte (Hayashi et al. 2014). *Tuna et al.* zeigten, dass die oben beschriebene Reduktion von Kohlenstoff und die Erhöhung des Sauerstoffanteils auch auf Zirkonoberflächen unabhängig von der Rauheit nach einer 15-minütigen UV-Photofunktionalisation mit dem SuperOsseo Therabeam Gerät von Ushio erfolgen kann (Tuna et al. 2015). Das Implantatmaterial und die Rauheit scheinen also weniger erheblich für die erwünschte Wirkung der UV-Photofunktionalisation. Der Kohlenstoffgehalt säuregeätzter Titanproben (Grad 2) sank nach einer UV-Photofunktionalisation von 48h von ca. 60 at% auf < 20 at% und erhöhte die Bioaktivität (Ueno et al. 2010b). *Att und Ogawa* haben die Korrelation zwischen der Reduktion der Hydrocarbonverbindungen, der erhöhten Hydrophilie, der vermehrten Zelladhäsion und der vermehrten Zellproliferation durch die UV-Photofunktionalisation aufgezeigt (Att und Ogawa 2012). Mit der Ausnahme der geringen Veränderung der Proliferation durch die UV-Photofunktionalisation, lässt sich diese Korrelation auch in den Ergebnissen dieser Studie feststellen.

*Aronsson et al.* wiesen mit Ihren Untersuchungen darauf hin, dass die Plasmaaktivierung sehr parametersensitiv ist, und dass mit Ar- oder O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung der Karbongehalt der Oberfläche signifikant und reproduzierbarer als mit anderen Methoden reduziert werden kann (Aronsson et al. 1997). Die von *Cvelbar et al.* festgestellte Steigerung des Titan- und Sauerstoffgehalts sowie Verminderung von Kohlenstoffverunreinigungen an der Oberfläche von Titanproben nach zwanzigsekündiger O<sub>2</sub>-Kaltplasmaaktivierung und Bildung einer TiO<sub>2</sub>-Schicht geht konform mit den Ergebnissen dieser Studie (Cvelbar et al. 2012). Wie aus den Ergebnissen dieser Studie hervorgeht, haben auch *Teixeira et al.* nach der Argon-Plasmaaktivierung eine Reduktion von Kohlenstoff festgestellt. Vor der Behandlung mit dem KinPen™ war dieser hauptsächlich in Form von Kohlenwasserstoff auf der Oberfläche gestrahlter und geätzter Titanplättchen Grad IV nachzuweisen. Eine maximale Reduktion von fast 8% wurde nach der kürzeren Ar-Plasmaaktivierungszeit von 20s pro Quadrant nachgewiesen. Eine längere Bestrahlung von 60s pro Quadrant erbrachte keine Vorteile in der Reduktion von Kohlenstoff (Teixeira et al. 2012). *Coelho et*

*al.* beschrieben eine Reduktion von Kohlenstoff von 23% mit einhergehender Steigerung des Anteils von Titan (11%) und Sauerstoff (16%) nach einer Argon-Plasmaaktivierung mit dem KinPen™ von 60s pro Quadrant eines Titanplättchens (Coelho et al. 2012). Ähnliche Ergebnisse beschrieben *Guastaldi et al.* für eine mit resorbierbarem bioaktivem Keramikpulver abgestrahlte Titanoberfläche (Guastaldi et al. 2013). *Giro et al.* untersuchten Titanimplantate (Ti-6Al-4V) mit einer Calciumphosphatoberfläche vor und nach Argon-Plasmaaktivierung mit dem KinPen™ von insgesamt 80s, 20s pro Quadrant. Wie in den anderen Untersuchungen zeigte sich nach der Argon-Plasmaaktivierung eine Reduktion des Kohlenstoffanteils von 38 at% auf 18 at% und eine Vergrößerung des Sauerstoffanteils von 11 at% auf 53 at%. Kohlenstoff war vor der Behandlung hauptsächlich in Form von Kohlenwasserstoff nachzuweisen (Giro et al. 2013). *Danna et al.* untersuchten die Wirkung einer luftbasierten (16% Sauerstoff, 1% Wasserstoff und 78% Stickstoff) Plasmaaktivierung mit dem KinPen™ von insgesamt 80s, 20s pro Quadrant, auf sowohl abgestrahlte und säuregeätzte als auch auf calciumphosphatbeschichtete Titanimplantate. Im Vergleich war die Reduktion von Kohlenstoff um 16% auf den calciumphosphatbeschichteten Titanimplantaten größer als die Reduktion um 7% auf den abgestrahlten und säuregeätzten Titanimplantaten (Danna et al. 2015).

Zu beachten ist, dass in den oben genannten Untersuchungen mit dem KinPen™ gearbeitet wurde, ein Gerät, welches immer nur punktuell die Oberfläche bestrahlt und dadurch weniger effektiv ist, als Geräte, die eine komplette Probe bestrahlen können. Prozentual ausgedrückt sank die Gesamtmenge an Kohlenstoff in dieser Studie in at% von 100% auf den unbehandelten Titanplättchen um maximal 27,5% nach der Argon-Plasmaaktivierung von 12 Minuten. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten wie die genannten Studien eine Steigerung von Titan und Sauerstoff an der Oberfläche mit ebenfalls einer maximalen Steigerung nach Ar-Plasmaaktivierung von Titan mit der Oxidationsstufe IV ( $Ti^{4+}$ ) aus ( $TiO_2$ ) (Ti (IV)) um 17% und Sauerstoff aus Titanoxid (O I) um 14%.

Die Ergebnisse von *Noro et al.* zeigten ähnlich zu den Ergebnissen in dieser Studie, dass eine zehnmündige Sauerstoff-Plasmaaktivierung von Zirkon-Oberflächen (TZP) nach 10-minütiger Lagerung an der Luft eine größere aber nicht statistisch signifikante Reduktion des Kohlenstoffgehaltes und eine nicht statistisch signifikante größere Zunahme des prozentualen Anteils an Sauerstoff bewirken kann, als eine zweistündige UV-Photofunktionalisation (Noro et al. 2013). *Watanabe et al.* untersuchten ebenfalls Unterschiede zwischen einer UV-Photofunktionalisation von 2 Stunden und einer zehnmündigen  $O_2$ -Plasmaaktivierung von sandgestrahlten und geätzten TZP-

Oberflächen. Auch hier war die O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung in der Reduktion des Kohlenstoffgehaltes und in der Erhöhung von Hydroxylgruppen nicht statistisch signifikant besser (Watanabe et al. 2012).

Bezüglich der Reduktion von Kohlenstoff und Erhöhung von Sauerstoff und Titan an der Oberfläche lässt sich durch vorhandene Studien konstatieren, dass alle Oberflächenbehandlungen zur Steigerung der osseointegrativen Fähigkeiten von Titan förderlich sein können.

Auf Grund verschiedener Protokolle und nicht signifikanter Unterschiede in vergleichenden Studien, für die O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung nur auf Keramik- nicht auf Titan-Proben, müssen weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigen, ob, wie in dieser Studie bezüglich der Oberflächenchemie festgestellt, die Ar-Plasmaaktivierung die effektivste Variante darstellt.

### **5.2.2. Oberflächentopographie / Rauheit**

In der Elektronenmikroskopie, bezüglich der Topographie und der Oberflächenrauheitsparameter lagen keine Unterschiede zwischen den nativen und den oberflächenbehandelten Plättchen vor. Obwohl die Heißlasmaaktivierung eine subtraktive Oberflächenaktivierungsmethode darstellt (de Queiroz et al. 2014), wurden durch die Kalt-Plasmaaktivierungen keine quantifizierbaren Strukturveränderungen der Oberfläche festgestellt. Eine Oberflächenfunktionalisation durch UV-Licht oder Kaltplasmaaktivierung mit Argon oder Sauerstoff führt, unabhängig von der Topographie des Titanplättchens, sowohl auf rauen als auch auf glatten Titanproben zu einer Bioaktivierung der Oberfläche, ohne die Topographie signifikant zu verändern. Die Oberflächenbehandlungen von Titanplättchen führten unter Studienbedingungen nicht zu strukturellen-, topographischen- oder Rauheitsänderungen.

Die konfokale Mikroskopie sowie die Rasterelektronenmikroskopie eignen sich auf Grund ihrer großen Messfläche, ihrer guten Auflösung und ihres großen Messumfangs sehr gut zur Untersuchung der Oberflächentopographie, weshalb diese Untersuchungsmethoden in vielen Publikation verwendet wurden. Um technischen Limitationen (weit auseinander liegende Spitzen und Täler) unbeachtet lassen zu können, wurden mehr als 20 Profile für die Makrorauheit ausgewertet, um aussagekräftige Werte zu erlangen. Die von uns untersuchte Oberfläche der rauen Probegruppe mit sandgestrahlter und geätzter Oberfläche, zeigte eine für sie typische Oberflächentopographie mit Makrorauheiten und

überlagerten Mikrorauheiten. Die meisten Partikel vom Sandstrahlen sind durch das anschließende Reinigungs- / Ätzverfahren entfernt worden.

*Teixeira et al.* unterstrichen die Wirksamkeit des Ätzvorgangs, indem nach dem Ätzvorgang auf den von ihnen untersuchten, mit Aluminium abgestrahlten und geätzten Titanoberflächen, keine Rückstände des Strahlungsmaterials nachgewiesen werden konnten (Teixeira et al. 2012).

Moderat raue Implantatoberflächen ergeben die höchsten Knochen-Implantat-Kontaktwerte, auch wenn dies kontrovers gesehen wird (Wennerberg und Albrektsson 2009), dennoch lässt sich die Osseointegration noch steigern, wie es die *in vitro* Ergebnisse dieser Studie erhoffen lassen. Da die Oberfläche eine essentielle Rolle in der Knochenformation spielt, ist es Inhalt der heutigen Forschung diese moderat rauen Oberflächen weiterzuentwickeln, um die Osseointegration zu steigern. In diesem Zuge ist es interessant die Oberfläche zu konditionieren und zu funktionalisieren, um die anfänglichen Zellreaktionen für die Knochenformation zu beschleunigen. Wie bereits beschrieben gibt es einige Möglichkeiten die gewünschte Rauheit zu erzeugen, es herrscht jedoch Uneinigkeit darüber, ob eine Methode effektiver als eine andere anzusehen ist. Die gängigste Methode scheint die Ätzung zu sein (Jemat et al. 2015). Auf solchen gestrahlten und geätzten, als auch auf glatten, polierten Oberflächen bewirkten die von uns untersuchten Oberflächenmodifikationen durch UV und Kaltplasma keine signifikanten Veränderungen. Die positiven Effekte der erhöhten Osseointegration nach der UV-Photofunktionalisation oder Kaltplasmaaktivierung basieren also in erster Linie nicht auf einer Veränderung der Oberflächentopographie. Somit könnte ggf. jede Implantatoberfläche verbessert werden ohne Änderung ihrer individuellen Charakteristika und Eigenschaften.

Die UV-Photofunktionalisation vermag die zeitliche Degradation der Bioaktivität von mikro-nano-hybrid-rauen Titanoberflächen, ähnlich wie die von uns untersuchte hybrid-raue Oberfläche, mit einer überlagerten Mikrorauheit, im Gegensatz zu der Degradation auf mikrorauen Oberflächen, zu verlangsamen, indem die Elektropositivität erhalten bleibt (Iwasa et al. 2011). Die Elektropositivität der Ausgangsoberfläche spielt also eine Rolle, aber die Oberflächenintegrität wird durch die UV-Photofunktionalisation nicht verändert. Auch in anderen Studien wurde die Oberflächentopographie/ Rauheit von sowohl Titanplättchen (Park et al. 2013, Ogawa 2014) als auch von Zirkonplättchen (Brezavšček 2012) durch die UV-Photofunktionalisation nicht signifikant verändert. *Gao et al.* stellten ebenfalls eine minimale, jedoch nicht statistisch signifikante, Änderung der Rauheit der von Ihnen untersuchten Titanoberflächen sowohl nach UVA- als auch nach UVC-Photofunktionalisation fest (Gao et al. 2013). *Hirakawa et al.* bestätigten dies auch nach

24 Stunden UVA-Photofunktionalisation (Hirakawa et al. 2013). UVC-Photofunktionalisation von anodisiertem Titan führte ebenso nicht zu einer Veränderung der Rauheit (Park et al. 2013).

*Canullo et al.* beschrieben die Topographie einer Titanoberfläche nach Ar-Kaltplasmaaktivierung als unverändert (Canullo et al. 2013). Auch eine zehnmütige O<sub>2</sub>-Kaltplasmaaktivierung von Zirkonplättchen (TZP) führte zu keiner relevanten Veränderung der Oberflächentopographie, wie *Watanabe et al.* und *Kobune et al.* beschrieben (Watanabe et al. 2012, Kobune et al. 2014). *Shon et al.* haben für raue und glatte Zirkonoberflächen (PIM) nach Helium-Kaltplasmaaktivierung keinen signifikanten Unterschied in der Oberflächenrauheit feststellen können (Shon et al. 2014).

Im Gegensatz dazu beschrieben *Tseng et al.*, dass eine 5-minütige Niederdruck-Hochfrequenz-Sauerstoff-Kaltplasmaaktivierung der Oberfläche von kommerziell reinem Titan (CP-Ti), Ti6Al4V und Titan nach Kathodenzerstäubung/Vakuumbeschichtung („sputtered“) eine geringe aber statistisch signifikante Erhöhung der Oberflächenrauheit im Nanometerbereich durch das anfängliche Auftreffen von energiereichen Sauerstoffplasmateilchen bewirkt. Nach längerer Aktivierungszeit von 10 und 30 Minuten sank diese wieder, da die Partikel mit längerer Wirkungszeit die Oberflächenoxidschicht bereits gebildet hatten und sich die Rauheit durch das weitere Auftreffen der Partikel wieder nivellierte und somit der Unterschied zur Ausgangsrauheit nicht mehr statistisch signifikant war (Tseng et al. 2013). *Aronsson et al.* wiesen darauf hin, dass Kaltplasmaaktivierungen jedoch keine Veränderungen hervorrufen müssen (Aronsson et al. 1997). *De Queiroz et al.* und *Tavares et al.* stellten nach der industriellen Argon-Heißplasmaaktivierung (600° Celsius) von Titanoberflächen eine Zunahme der Rauheit auf von 0,027 auf 0,11µm fest (Tavares et al. 2009, de Queiroz et al. 2014). Hier wird der Unterschied zwischen der industriell angewendeten Hochenergieplasmaaktivierung (Heißplasma), die zu topographischen Oberflächenmodifizierung führt, und der Kaltplasmaaktivierung deutlich, welche nur die physikochemischen Eigenschaften verändert ohne die Oberflächenintegrität zu verändern.

Die Ergebnisse dieser Studie ergaben keine signifikanten Veränderungen der Rauheit nach der Kaltplasmaaktivierung, was aber durch andere Versuchsbedingungen begründet sein dürfte. Verschiedene Plasmageräte, Gasarten, Bestrahlungszeiten etc. können zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Ebenso wurde von *Aronsson et al.* auf mögliche Veränderungen der Oberfläche durch Stark/Heißplasmaaktivierungen hingewiesen (Aronsson et al. 1997).

Durch fehlende Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen ergeben die Rauheitsergebnisse dieser Studie somit keinen Anhaltspunkt für eine Beeinflussung von Zellen auf der Titanoberfläche, weder durch UV-Photofunktionalisation noch durch die Kaltplasmaaktivierung. Andere Parameter scheinen hierfür verantwortlich zu sein.

### **5.2.3. Oberflächenenergie und Kontaktwinkel**

Die Kontaktwinkelmessung ist ein gut validiertes und akzeptiertes Verfahren, welches standardmäßig zur Ermittlung der Oberflächenenergie eines Prüfkörpers verwendet wird. Gerade das Verfahren des dynamischen Kontaktwinkels verspricht höchste Genauigkeit (Krüss GmbH 2017). Da die Temperatur den Kontaktwinkel manipulieren kann, wurde eine Temperaturschwankung von  $\pm 2^\circ$  Celsius bei  $21\text{-}23^\circ$  Celsius eingehalten, da die Abhängigkeit der Temperatur zum Kontaktwinkel in diesem Bereich vernachlässigbar klein erscheint (Park und Aluru 2009). Eine Abhängigkeit des Kontaktwinkels zur Rauheit der Proben konnte vernachlässigt werden.

Der entstehende Kontaktwinkel hängt einerseits von der Oberflächenchemie und – topographie des Titanplättchens und andererseits von der benetzenden Flüssigkeit ab. Diesbezüglich spielen die polaren und unpolaren Gruppen der aufeinandertreffenden Substanzen eine große Rolle. In dieser Studie wurde Wasser (polar) als Flüssigkeit mit bekannter Oberflächenspannung verwendet (polarer Anteil von 51, unpolarer Anteil von 21,8 (Software SurfTens 4.3. Benutzerhandbuch)) verwendet. Ein großer Kontaktwinkel bedeutet wenig polare Gruppen auf der Oberfläche und eine hydrophobe Oberfläche ( $\theta > 90^\circ$ ). Ein kleiner Kontaktwinkel entsteht, wenn die Oberflächen des Titanplättchens und der Testflüssigkeit polare Gruppen enthalten und sich somit „anziehen“. Der Tropfen breitet sich gut auf der Oberfläche des Titanplättchens aus und man spricht von einer hydrophilen Oberfläche ab einem Kontaktwinkel  $< 45^\circ$ . Die Extreme dieser Gegensätze sind die Superhydrophobie ( $\theta > 160^\circ$ ), auch Lotuseffekt genannt, und die Superhydrophilie ( $\theta < 5^\circ$ ) (Att et al. 2009a), wobei die genaue Definition über den Kontaktwinkel kontrovers, da nicht für alle Materialrauheiten gleich anzuwenden, ist und auf Grund von Messlimitationen auch noch bei Werten höher als  $5^\circ$  liegen kann (Drelich und Chibowski 2010). Bei Superhydrophilie zerfließt der Flüssigkeitstropfen förmlich auf der Oberfläche und die Kontaktwinkel streben gen Null. Für die Oberflächen dentaler Titanimplantate ist das Maß der Hydrophilie sehr ausschlaggebend, da ein hydrophileres Implantat zu einem schnelleren Einwachsen des Knochens führt (Iwasa et al. 2010). Eine nicht verunreinigte Titanoberfläche weist einen kleineren Kontaktwinkel auf und ist somit hydrophiler als eine kontaminierte Oberfläche (RMS Foundation 2010). Im Vergleich mit der statischen

Kontaktwinkelmessung, bei der ein Tropfen eines bestimmten Volumens gemessen wird, führt die dynamische Kontaktwinkelmessung zu einer erhöhten Zuverlässigkeit bei rauen Proben, da Inhomogenitäten ausgeglichen werden können (Krüss GmbH 2017).

Die Benetzungseigenschaft als Indikator für die Oberflächenenergie wird durch die UV-Photofunktionalisation signifikant verbessert (Al Qahtani et al. 2015). Eine 15-minütige UV-Photofunktionalisation führte auch auf rauen und glatten Zirkonoberflächen zur Umwandlung der hydrophoben in eine hydrophile Oberfläche mit drastisch verringerten Kontaktwinkeln (Tuna et al. 2015). Die Reduktion des Kontaktwinkels auf Titanplättchen wurde von *Duske et al.* als abhängig von der Gasmischung der Kaltplasmaaktivierung und der Bestrahlungsdauer beschrieben (Duske et al. 2012). Die wirksamste Reduktion des Kontaktwinkels auf Titanplättchen wurde durch die Gasmischung 1% Sauerstoff und 99% Argon erreicht. Auch mit reinem Argon-Plasma strebten die Kontaktwinkel auf abgestrahlten und säuregeätzten Oberflächen, wie in dieser Untersuchung, gegen Null und die glatteren Oberflächen zeigten Winkel über Null. Das Maß der Reduktion des Kontaktwinkels durch UV-Funktionalisierung ist, wie *Aita et al.* gezeigt haben, material- und zeitabhängig. Superhydrophilität wurde für maschinerte Titanplättchen nach 24-stündiger UV-Funktionalisierung und für raue Plättchen bereits nach 1 Stunde erreicht (Aita et al. 2009b). Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen bei gleicher Bestrahlungszeit ein schnelleres Absinken von Kontaktwinkeln auf den rauen Proben, vermutlich weil eine aufgeraute Oberfläche mehr Fläche bietet und mehr Energie aufnehmen kann, im Vergleich zu maschinerten, glatten Proben, nicht nur für die UV-Funktionalisierung, sondern auch für die Kaltplasmabehandlung. *Shon et al.* haben für raue und glatte Zirkonoberflächen (PIM) nach Helium-Plasmaaktivierung eine starke Reduzierung des Kontaktwinkels feststellen können (Shon et al. 2014). Die Wirkung der Kontaktwinkelreduktion scheint sowohl mit Helium, Argon oder Sauerstoff gleichermaßen möglich, ein direkter Vergleich jedoch auf Grund verschiedener Geräte, verschiedener Parameter, unterschiedlicher Messgeräte, verschiedener Probematerialien und unterschiedlich langer Aktivierungszeiten nur schwer möglich aber auch nicht erforderlich.

*Tseng et al.* beschrieben, dass eine 5-minütige Niederdruck-Hochfrequenz-Sauerstoff-Kaltplasmabehandlung der Oberfläche von kommerziell reinem Titan (CP-Ti), Ti6Al4V und Titan nach Kathodenzerstäubung/Vakuumbeschichtung eine geringe aber statistisch signifikante Erhöhung des Kontaktwinkels auf Grund einer gesteigerten Oberflächenrauheit bewirkt. Nach längerer Aktivierungszeit von 10 und 30 Minuten nahmen die Winkel wieder ab und der Unterschied war nicht mehr statistisch signifikant. Auf Grund des sich lediglich im Nanometerbereich befindlichen Unterschiedes der Rauheit spielt für die Winkelveränderung wohl auch die Veränderung der Oberflächenchemie über

die Zeit eine Rolle (Tseng et al. 2013). Eine Argon-Plasmaaktivierung nach sowohl 20s und 60s hatte nach *Teixeira et al.* eine Erhöhung der Oberflächenenergie auf mehr als das dreifache zur unbehandelten Probestruppe zur Folge (Teixeira et al. 2012). Die von *Guastaldi et al.* beschriebene Argon-Plasmaaktivierung von Titanoberflächen, die eine mit einem resorbierbaren bioaktiven Keramikpulver abgestrahlte Oberfläche aufwies, erhöhte die Oberflächenenergie ebenfalls (Guastaldi et al. 2013).

*Danna et al.* zeigten, dass sich die Oberflächenenergie nach einer luftbasierten (16% Sauerstoff, 1% Wasserstoff und 78% Stickstoff) Plasmaaktivierung von insgesamt 80 Sekunden auf abgestrahlten und säuregeätzten Titanimplantaten stärker erhöht als auf calciumphosphatbeschichteten Titanimplantaten (Danna et al. 2015), was auf eine wie in dieser Studie ebenfalls festgestellte Oberflächentopographieabhängigkeit der Kontaktwinkelreduktion hindeuten könnte.

*Noro et al.* beschrieben, dass für Keramik (TZP)-Oberflächen eine 10-minütige Sauerstoff-Plasmaaktivierung eine größere Reduktion des Kontaktwinkels und somit eine größere Erhöhung der Oberflächenenergie verglichen mit einer 2-stündigen UV-Photofunktionalisation bringen kann (Noro et al. 2013). Die Ergebnisse dieser Studie beschrieben ebenfalls einen größeren Effekt einer jedoch zwölfminütigen Sauerstoff-Plasmaaktivierung im Vergleich mit einer ebenso langen UV-Photofunktionalisation für Titanoberflächen.

*Buser et al.* zeigten, dass eine weitere Möglichkeit der Erhaltung einer superhydrophilen Oberfläche die Lagerung von Implantaten in physiologischer Kochsalzlösung ist. *In vivo* konnte somit der KIK gesteigert werden (Buser et al. 2004). Die Ergebnisse von *Noro et al.* bestätigten, dass sich die Hydrophilität von TZP-Oberflächen für 20 Tage erhalten lässt, wenn sie in doppelt destilliertem Wasser, Natriumchlorid- oder Natriumhydroxidlösung oder Ethanol gelagert werden (Noro et al. 2013).

Die Mikro- und Nanostruktur und die chemische Zusammensetzung beeinflussen die Benetzungseigenschaften eines Materials und modellieren somit die initialen Ereignisse und die biologische Kaskade am Übergang zwischen Material und Gewebe (Rupp et al. 2014). *Bacakova et al.* weisen darauf hin, dass eine moderat hydrophile und positiv geladene Oberfläche zu einer optimalen Zelladhäsion führt, da die Verbindungsmoleküle ansonsten denaturieren können (Bacakova et al. 2011). In dieser Studie waren die unbehandelten mikrorauen Plättchenoberflächen hydrophober als die unbehandelten maschinieren Plättchenoberflächen. Die meisten momentan genutzten dentalen Implantate haben moderat raue Oberflächen von 1-2µm, um einer Periimplantitis vorzubeugen und den Übergang von Ionen („*ionic leakage*“) zu vermeiden (Le Guehennec

et al. 2007). Darüber hinaus scheinen Implantatoberflächen mit moderaten Rauheiten von 1-2µm optimal für die Osteoblastenproliferation und- differenzierung zu sein (Andrukhov et al. 2016). Nach allen Oberflächenbehandlungen in dieser Studie sanken die dynamischen Kontaktwinkel der Wassertropfen massiv und die hydrophoben Oberflächen wurden (super)hydrophil. Auf den Oberflächen der rauen Probengruppen sank der Kontaktwinkel nach der Bestrahlung stärker als auf den Oberflächen der glatten Probengruppe. Es kam nach der Kaltplasmaaktivierung zu signifikant geringeren Kontaktwinkeln als nach UV-Photofunktionalisation und somit nach einem Behandlungszyklus von 12 Minuten zu einer besseren Steigerung der Oberflächenenergie nach Kaltplasmaaktivierung. Auch wenn *Aita et al.* eine von der Funktionalisationszeit abhängige Zunahme der Hydrophilität für die UV-Photofunktionalisation von Titan beschrieben (Aita et al. 2009b), erscheint ein längerer als der verwendete Funktionalisationszyklus (12 Minuten) für die klinische Anwendung unvorteilhaft.

Im Vergleich der Effizienz der beiden Plasmaaktivierungen liegt effektiv kein statistisch signifikanter Unterschied vor. Die Ergebnisse der gesteigerten Hydrophilie können einen Hinweis für ein höheres osteogenes Potential in einer folgenden *in vivo* Studie geben.

#### **5.2.4. Zellzahl und Morphologie**

Die Zellen wirkten auf den oberflächenbehandelten Titanplättchen größer und mehr auf der Oberfläche ausgebreitet, was auf Optimierung der Oberfläche hindeutet, die nach der Oberflächenbehandlung für die Kultivierung von Osteoblasten förderlicher ist. Die Zellzahlen erhöhten sich auf allen Titanplättchen stetig. Zu jedem Zeitpunkt wuchsen statistisch signifikant mehr Zellen auf den oberflächenbehandelten Plättchen. Ein relevanter Unterschied zwischen den Verfahren wurde lediglich auf den glatten Oberflächen mit einem Vorteil für die Kaltplasmaaktivierung nachgewiesen.

Die Zelladhäsion auf Titan ist stark abhängig von der Rauheit der Oberfläche, eine moderat raue Oberfläche kann eine positive Knochenreaktion hervorrufen (Wennerberg und Albrektsson 2009), denn durch die Oberflächenvergrößerung ist die Anlagerungsfläche für Knochenzellen größer als auf glatten Oberflächen. Die Adhäsionsfähigkeit scheint aber auch noch von mehreren Faktoren, wie der positiven Ladung an der Oberfläche oder der Dicke der Oxidschicht abzuhängen (Martin et al. 1995, Iwasa et al. 2010). Die positive Korrelation zwischen der Erhöhung der Oxidschicht durch die UV-Photofunktionalisation und die Oberflächenplasmaaktivierung und der vermehrten Zelladhäsion bestätigen die Ergebnisse dieser Studie. Erst adhäreren die

murinen Präosteoblasten und dann proliferieren sie. Zu den frühen Messzeitpunkten ist ersichtlich, dass ihre Form auf den unbehandelten Titanplättchen eher rund und ohne Ausläufer ist und die oberflächenbehandelten Plättchen mehr Zellen mit Zellausläufern aufweisen. Die Oberflächenmodifikation beschleunigt also die Anheftung von Zellen und die Ausbildung von Zellausläufern. Es wurde zudem beschrieben, dass Osteoblasten auf UV-photofunktionalisierten Titanplättchen mehr Vinculin sezernierten. Dies zeigt zum einen eine gesteigerte Fähigkeit, an die Titanoberfläche - und zum anderen an einander binden zu können (Iwasa et al. 2010).

In einigen Publikationen wurde gezeigt, dass die gesteigerte Oberflächenenergie und Hydrophilie zu einer verbesserten Zellreaktion führen kann (Aita et al. 2009a, Duske et al. 2012), worauf auch die Ergebnisse dieser Studie hinweisen. Die vermehrte Zelladhäsion könnte auch auf die Entstehung von positiver Ladung auf der Plättchenoberfläche zurückgeführt werden, wie Iwasa et al. für die UV-Funktionalisierung nachwies (Iwasa et al. 2010). Die höchsten Werte sowohl für Titan mit der Oxidationsstufe IV ( $Ti^{4+}$ ) als auch der Zelladhäsion nach 2h wurden auf rauen Titanplättchen nach der Ar-Plasmaaktivierung gemessen und könnten somit korrelieren.

Im Vergleich mit unbehandelten Titanplättchen war die Fibroblastenadhäsion in einer anderen Studie nach Kaltplasmaaktivierung *in vitro* signifikant erhöht (Canullo et al. 2013). Nach Kaltplasmaaktivierung konnte auch für humane Gingivafibroblasten eine um 20% gesteigerte anfängliche Fibroblastenadhäsion und -proliferation nachgewiesen werden (Lee et al. 2015). Dies könnte die anfängliche Anlagerung und Proliferation von Zellen um Abutments herum begünstigen und somit die Haftung und Ausbildung der Weichgewebsmanschette positiv beeinflussen.

Die primäre Adhäsion von primären humanen Alveolarknochen-Osteoblasten (*primary human alveolar bone osteoblasts* (PHABO)) ist laut Altmann et al. hauptsächlich durch die Oberflächentopographie geregelt und wird durch raue Oberflächen gefördert (Altmann et al. 2013). Dabei lassen sich Zellzahlen nur in vernachlässigbarer Weise durch die UV-Photofunktionalisation modulieren. Diese Aussage ist konträr zu Studien, die die UV-Photofunktionalisation *in vitro* als förderlich für die Zellzahl/-adhäsion und Morphologie beschreiben. Begründet scheint der Unterschied durch das Verzichten auf die Verwendung von im Medium enthaltener Substanzen, die, auf die in anderen Studien verwendeten Osteoprogenitorzellen, und nicht wie von Altmann et al. verwendete voll ausgebildete Osteoblasten, stimulierend wirken können (Coelho und Fernandes 2000).

Es ergaben sich in dieser Untersuchung auf den rauen Titanplättchen höhere Zellzahlen als auf den glatten, was klar auf eine oberflächentopographische Abhängigkeit hindeutet,

aber die Zahl der adhärennten Zellen wurde sowohl durch die UV-Photofunktionalisation als auch durch die Plasmaaktivierung noch einmal deutlich gesteigert. Ähnliche Ergebnisse konnten *Duske et al. in vitro* mit humanen osteoblasten-ähnlichen Osteosarkom-Zellen auf (99% Argon / 1% Sauerstoff) plasmaaktivierten Titan-Oberflächen verschiedener Topographien zeigen. Auf jeder der verschiedenen rauen Oberflächen erleichterte die Kaltplasmaaktivierung das Zellwachstum und die Zellfläche erhöhte sich signifikant. Im Vergleich der Zellfläche untereinander auf den verschiedenen Oberflächen, zeigten sich die Zellen auf den rauen SLA-Proben am kleinsten, da sich die Zellen sehr eng an die dreidimensionale Oberflächenstruktur, auch in die Tiefe des Oberflächenreliefs, anpassten und die Zellfläche zweidimensional evaluiert wurde (*Duske et al. 2012*).

Die Morphologie der in dieser Studie verwendeten murinen immortalisierten Präosteoblasten auf den kaltplasmaaktivierten und UV-photofunktionalisierten Titanplättchen unterschied sich ebenfalls von der Morphologie der Zellen auf den unbehandelten Plättchen. Die Zellen auf den Plättchen nach Oberflächenbehandlung wirkten abgeflachter, mehr auf der Oberfläche ausgebreitet und wiesen längere und insgesamt mehr Zellausläufer auf. Weniger deutlich gilt dies auch im Vergleich der rauen und glatten nativen Plättchen. Wie durch *Duske et al.* ebenfalls beschrieben, war der Anstieg der Zellfläche nach der Oberflächenfunktionalisation auf den rauen Oberflächen im Vergleich mit den glatten weniger ausgeprägt, da diese bereits vor der Funktionalisation eine sehr attraktive Oberflächentopographie bieten. Ein aussagekräftiger Unterschied bezüglich der Morphologie zwischen den oberflächenbehandelten (UV, O<sub>2</sub>- und Ar-Plasma) Plättchen ist nicht erkennbar.

Die Wirkung einer 10-minütigen O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung zeigte nach 24 Stunden in einer Studie von *Kobune et al.* im Vergleich zur 2-stündigen UVC-Funktionalisierung von TZP-Oberflächen ein leicht besseres Ergebnis auf die Zellanheftung menschlicher oraler Keratinozyten und nur nach der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung kam es zur Verbesserung der Zellmorphologie (*Kobune et al. 2014*). *Watanabe et al.* beschrieben in einer ähnlichen Studie für diesen Vergleich keine signifikanten Unterschiede für die Zahl der adhärennten Zellen (*Watanabe et al. 2012*).

Auch der Vergleich der Zelladhäsion auf verschiedenen Titanoberflächen nach einer 3 stündigen UV-Photofunktionalisation und einer 12-minütigen Ar-Kaltplasmaaktivierung führt zu keinem signifikanten Unterschied in der Zelladhäsion. Für sowohl Zirrongestrahlte und säuregeätzte als auch für maschinerte Oberflächen waren die Adhäsionswerte nach der Ar-Plasmaaktivierung leicht besser (*Canullo et al. 2016*).

Die Ergebnisse der Zellzählung dieser Studie bestätigen diese Tendenzen. Für die glatten Proben bedeutet die Kaltplasmaaktivierung im Vergleich mit der UV-Photofunktionalisation eine signifikante, für Ar-Plasmaaktivierung nach 24 und 72h und nach O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung nach 72h vorhandene Zelldichtenvergrößerung. Auf den rauen Proben waren die Unterschiede geringer. Lediglich nach 2 Stunden war die Ar-Plasmaaktivierung der O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung und der UV-Photofunktionalisation statistisch signifikant überlegen.

Es bleibt abzuwarten, ob die *in vitro*-Ergebnisse *in vivo* bestätigt werden können – dass die Funktionalisierung zu einer beschleunigten und verbesserten Osteoblastenadhäsion und somit zur Osseointegration führt. Eine weitere Frage ist, zu welchem Ausmaß die *in vitro* festgestellte effektivere Attraktivitätssteigerung für Osteoblasten durch Kaltplasma im Vergleich zu UV einen Effekt *in vivo* haben wird.

### **5.2.5. Proliferation**

Auf den glatten Titanproben waren die Werte des Proliferationsassays lediglich nach 48 Stunden nach der Argon-Plasmaaktivierung verglichen mit der UV-Photofunktionalisation signifikant höher, nach 72 Stunden waren durch alle Oberflächenbehandlungen signifikant höhere Werte verglichen zu den nativen Proben sowie im Einzelvergleich nach O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung signifikant höher als nach UV-Photofunktionalisation. Für raue Proben erschien nach Kaltplasmaaktivierung ein die Proliferation signifikant fördernder Effekt nach 24 Stunden im Vergleich zu den nativen Plättchen.

In der Literatur werden moderate Rauheiten von Oberflächen auch mitunter als problematisch dargestellt, da einige Zellfunktionen geschwächt und nicht alle gestärkt werden können. Mikrorauere Oberflächen verstärken die Osteoblastendifferenzierung, schwächen aber die Proliferation mit der Folge von schnellerer Knochenformation, aber geringerer Dichte (Ogawa et al. 2002, Ogawa und Nishimura 2003, Bachle und Kohal 2005, Takeuchi et al. 2005). Glatte Oberflächen seien im Gegensatz zu strukturierten Ti-Unite Oberflächen für die Proliferation von primären humanen Alveolarknochen Osteoblasten (PHABO) förderlich (Altmann et al. 2013). *Zhu et al.* haben konträre Ergebnisse festgestellt, in denen deutlich wurde, dass raue Oberflächen und eine größere Oxidschicht die Osteoblastenproliferation durchaus fördern (Zhu et al. 2004). Unterschiede der Rauheit im Nanometerbereich <100nm (Giljean et al. 2014) und <21nm (Cai et al. 2006) sollen auf die Proliferation keinen Einfluss haben. In dieser Studie

wuchsen zwar mehr Zellen auf den rauen - im Vergleich zu den glatten Oberflächen, aber die Werte des Proliferationsassays waren nicht im gleichen Maße höher.

*Att et al.* kamen auf geätzten Titanoberflächen zu dem Resultat, dass die Proliferation das Ergebnis der adhärierten Zellen widerspiegelt (*Att et al. 2009a*). *Ueno et al.* zeigten in einem BrdU-Assay für Osteoblasten aus dem Knochenmark von Ratten auf säuregeätzten Titanplättchen nach UV-Funktionalisation bessere Werte im Vergleich zu nativen Plättchen (*Ueno et al. 2010b*). Der kontroverse Zusammenhang zwischen Hydrophilie und Proliferation scheint jedoch durch die vielen veränderbaren Faktoren wie die Zellart, dem Assay und dem zugehörigen Substrat und dem Veränderungsgrad der Hydrophilisierung veränderbar zu sein (*Att et al. 2009a*). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten zwar starke Verbesserungen in der Zelladhäsion und der Hydrophilie der funktionalisierten Plättchen aber geringere Veränderungen im Proliferationsassay besonders nach der UV-Photofunktionalisation.

*Coelho et al.* beschrieben einen Zusammenhang, dass durch die Erhöhung der Oberflächenenergie nach Ar-Plasmaaktivierung die Proliferation steigt und diese die Osseointegration fördern könne (*Coelho et al. 2012*), so wie es auch für die UV-Funktionalisation beschrieben wurde (*Att et al. 2009a, Ueno et al. 2010b*). *De Queiroz et al.* fanden hingegen keinen signifikanten Unterschied der Proliferationswerte von CHO-k1-Zellen auf Argon-heißplasmaaktivierten Titanoberflächen zur Kontrollgruppe (*de Queiroz et al. 2014*).

Insgesamt zeigten in der vorliegenden Studie die murinen Präosteoblasten eine bessere, aber nicht immer statistisch signifikant höhere BrdU-Inkorporation auf plasmaaktivierten Titanplättchen im Vergleich mit der auf UV-photofunktionalisierten Titanplättchen, was auf einen Vorteil für die Osteoblastenproliferation nach Kaltplasmaaktivierung hindeuten könnte.

Der Einsatz eines anderen Proliferationsassays könnte sinnvoll sein, um die Reliabilität der erhobenen Parameter zu überprüfen. In der vorliegenden Studie wurde die Zellproliferation nur durch ein BrdU-Assay ausgewertet, welches ausschließlich auf die S-Phase des Zellzyklus abzielt. Um genauere Ergebnisse zu erzielen könnte es interessant sein, auch andere Phasen des Zellzyklus zu bewerten, um dann klären zu können, ob die Funktionalisierungen auf bestimmte Phasen des Zellzyklus ggf. doch förderlich wirken und inwiefern ggf. eine Modulation durch Oberflächenbehandlung erfolgt.

Entscheidenden Einfluss auf die Proliferation mit Parametern wie die Rauheit, die Hydrophilie, die positive Ladung und die Oxidschicht der Titanoberfläche scheint die UV-Photofunktionalisation laut dieser Studie nicht nehmen zu können.

Es bleibt jedoch abzuwarten, ob sich die festgestellten Effekte der wenn auch geringen Verbesserung der Proliferationswerte *in vivo* bestätigen lassen.

### **5.2.6. Viabilität**

Die murinen Präosteoblasten zeigten nach 48 Stunden Inkubationszeit auf rauhen plasmaaktivierten Titanoberflächen eine statistisch signifikant höhere Viabilität im Vergleich zu unbehandelten Oberflächen wie auch zu UV-photofunktionalisierten Plättchen. Auf glatten plasmaaktivierten Titanoberflächen zeigten sie eine statistisch signifikant höhere Viabilität im Vergleich mit den unbehandelten.

*Hayashi et al.* zeigten in ihren Untersuchungen von nanostrukturierten TiO<sub>2</sub>-Oberflächen, dass die UV-Funktionalisation in Bezug auf die Viabilität (MTT-Assay) der Zellen keinen nennenswerten Erfolg brachte (Hayashi et al. 2012). Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen dies, da bei geringer Verbesserung, kein statistisch signifikanter Unterschied zu den unbehandelten Plättchen nach 48 Stunden Inkubationszeit nachzuweisen war. In der Untersuchung von *Ueno et al.* ergab sich für die Osteoblastenviabilität nach 24 Stunden auf rauhen, säuregeätzten Titanplättchen ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen UV-photofunktionalisierten und nativen Plättchen (Ueno et al. 2016). Die Steigerung der Viabilität war zwar vorhanden, aber ähnlich der Ergebnisse dieser Studie nach UV-Fotofunktionalisation, nicht signifikant.

*Duske et al.* konnten eine statistisch signifikante Steigerung der metabolischen Aktivität von humanen osteoblasten-ähnlichen Osteosarkom-Zellen auf (99% Argon / 1% Sauerstoff) plasmaaktivierten SLA-Oberflächen nachweisen (Duske et al. 2012).

Sowohl *Tavares et al.* als auch *De Queiroz et al.* zeigten, dass die Viabilität von CHO-K1-Zellen auf glatten und polierten Titanoberflächen nach Argon-Heißplasmaaktivierung anstieg (Tavares et al. 2009, de Queiroz et al. 2014). *Tseng et al.* beschrieben, dass eine 5-minütige Niederdruck-Hochfrequenz-Sauerstoff-Kaltplasmabehandlung der Oberfläche von kommerziell reinem Titan (CP-Ti) und Ti6Al4V-Alloy eine Erhöhung der Viabilität von humanen osteoblasten-ähnlichen Osteosarkom-Zellen (MG-63) ermöglicht, diese aber nach längerer Aktivierungszeit von 10 und 30 Minuten wieder absinkt (Tseng et al. 2013). Die gesteigerte Oberflächenrauheit könnte einen positiven Effekt auf die metabolische Aktivität haben. Nach längerer Aktivierungszeit wird die Rauheit wieder nivelliert, was das Ergebnis, von *Tseng et al.* erklären könnte.

Nach der Kaltplasmaaktivierung, unabhängig vom verwendeten Gas, ist der Viabilitätssteigernde Effekt in dieser Studie niedrig, aber deutlicher als der nach der UV-Photofunktionalisation. In der Untersuchung von *Kobune et al.* kam es hingegen im Vergleich von 10 Minuten O<sub>2</sub>-plasmaaktivierten und über 2 Stunden UVC-photofunktionalisierten Zirkonplättchen zu keinem statistisch signifikanten Unterschied in der Viabilität von humanen oralen Keratinozyten (*Kobune et al.* 2014).

Zusammenfassend scheint die UV-Photofunktionalisation einen deutlich geringeren Effekt auf die Viabilität zu haben, der nicht mit der Viabilitätssteigerung bei murinen Präosteoblasten nach Plasmaaktivierung vergleichbar ist. Aus der Literatur geht hervor, dass dies auch mit verlängerter Funktionalisationszeit nicht kompensierbar zu sein scheint.

Es bleibt abzuwarten, ob der Effekt der Verbesserung der Viabilität einen Effekt *in vivo* hat.

### **5.2.7. Zytotoxizität**

Weder die unbehandelten noch die behandelten Titanplättchen zeigten in dieser Studie Anzeichen für eine Zytotoxizität. Die Positivkontrolle RM-A zeigte eine signifikant höhere Zytotoxizität. Dies konnte ebenfalls im LDS visualisiert werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden auf den Titanplättchen lediglich wenige bis keine toten Zellen gezählt.

*Ueno et al.* fanden heraus, dass die intrazelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Osteoblasten auf UV-oberflächenfunktionalisierten Titanplättchen, unabhängig von der Oberflächentopographie sowohl auf rauen und säuregeätzten als auch auf glatten (maschinieren) Titanproben um 40-50% niedriger war (*Ueno et al.* 2016). Der durch diese intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies entstehende oxidative DNS-Schaden in den Osteoblasten auf UV-oberflächenfunktionalisierten Titanplättchen sank in gleichem Maße.

Nach der UV-Photofunktionalisation von Titanproben wurden von *Petzold et al.* keine Unterschiede in der Zytotoxizität im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt (*Petzold et al.* 2010).

Eine weitere Studie von *Tavares et al.* zeigte, dass unbehandelte Titanoberflächen auf Grund der dünneren Oxidschicht, geringerer Hydrophilie und geringerer Korrosionsresistenz eine höhere Genotoxizität aufwiesen als Oberflächen nach Argon-Heißplasmaaktivierung (*Tavares et al.* 2009). *De Queiroz et al.* zeigten, dass der

intrazelluläre oxidative Stress von CHO-k1 Zellen auf Titanplättchen nach der Argon-Heißplasmaaktivierung geringer war und zu einem erhöhten zellulären Überleben führte. Zusammengefasst stieg die Biokompatibilität (de Queiroz et al. 2014).

*Tseng et al.* beschrieben, dass eine 5-minütige Niederdruck-Hochfrequenz-Sauerstoff-Kaltplasmabehandlung der Oberfläche von kommerziell reinem Titan (CP-Ti) und Ti6Al4V zu einem erhöhten Zellüberleben führte (Tseng et al. 2013).

Da die gute Biokompatibilität sowohl vor als auch nach den drei Oberflächenfunktionalisationen (Ar-/O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung/UV-Photofunktionalisation) unverändert ist, lässt sich ein positives Fazit für die *in vivo* Ergebnisse der Osseointegration erwarten, ohne das es zu zytotoxischen Reaktionen kommt.

## **6. Zusammenfassung**

Eine Oberflächenfunktionalisation durch UV-Licht oder Kaltplasmaaktivierung mit Argon oder Sauerstoff führte unter Studienbedingungen, unabhängig von der Topographie des Titanplättchens, sowohl auf rauen als auch auf glatten Titanproben zu einer Bioaktivierung der Oberfläche ohne die Oberflächenstruktur, -topographie oder -rauheit signifikant zu verändern. Die XPS-Analyse ergab nach der Kaltplasmabehandlung etwas dickere Oxidschichten und eine signifikant bessere Reduktion von organischem Material, oberflächlicher Kohlenstoffverbindungen und Sulfaten im Vergleich zur UV-Behandlung. Die O<sub>2</sub>-Plasmaaktivierung und die UV-Photofunktionalisation hatten hierbei eine weniger starke Wirkung als Kaltplasma auf Argonbasis. Die Reduktion von Kohlenstoff durch die Argon-Plasmaaktivierung war jedoch nur im Vergleich mit der UV-Photofunktionalisation statistisch signifikant. Ebenfalls kam es bei der Messung der Oberflächenenergie durch Kontaktwinkelmessung nach der Kaltplasmaaktivierung zu signifikant geringeren dynamischen Kontaktwinkeln als nach UV-Photofunktionalisation. Sowohl die glatten als auch die rauen Proben wiesen nach der Funktionalisation (super)hydrophile Oberflächen auf.

Murine Präosteoblasten wirkten auf den oberflächenbehandelten Titanplättchen größer und mehr auf der Oberfläche ausgebreitet. Die Zellzahlen erhöhten sich auf allen Titanplättchen stetig. Zu jedem Zeitpunkt wuchsen jedoch statistisch signifikant mehr Zellen auf den oberflächenbehandelten Plättchen. Ein relevanter Unterschied zwischen den Verfahren wurde lediglich auf den glatten Oberflächen mit einem Vorteil für die Kaltplasmaaktivierung nachgewiesen. Obwohl die Anzahl der adhärenierten Zellen auf den UV- und kaltplasmabehandelten Oberflächen deutlich höher ist als auf unbehandelten Titanplättchen, sind die Unterschiede bezüglich der Proliferation und der Viabilität nicht eindeutig signifikant besser. Im Vergleich der beiden Verfahren sind die Proliferationsergebnisse nach Kaltplasmaaktivierung verglichen mit der UV-Photofunktionalisation signifikant höher, die Viabilitätsmessung ergibt eine ähnliche Tendenz.

Aufgrund der Tatsache, dass *in-vitro*-Ergebnisse nur eine begrenzte Aussagefähigkeit haben, ist eine *in vivo*-Studie empfehlenswert, um zu ergründen, in welchem Maße sich die festgestellten Ergebnisse nach Funktionalisation auch in der Komplexität eines biologischen Systems bestätigen lassen.

## **7. Summary**

Surface functionalization by means of UV light or cold plasma activation, with argon or oxygen, led to a bioactivation of the surface without significant changes of surface structure, topography or roughness, regardless of the topography of the titanium platelet on both rough and smooth titanium samples. The XPS analysis revealed a slightly thicker oxide layer after the cold plasma treatment and a significantly better reduction of organic material, superficial carbon compounds and sulfates compared to the UV treatment. The O<sub>2</sub> plasma activation and the UV photofunctionalization had a less powerful effect than argon-based cold plasma. However, only the reduction of carbon by argon plasma activation was statistically significant compared with UV photofunctionalization. The measurement of the surface energy by contact angle measurement after the cold plasma activation also led to significantly lower dynamic contact angles than after UV photofunctionalization. Both the smooth and rough samples showed (super) hydrophilic surfaces after functionalization.

Murine pre-osteoblasts appeared larger and more spread out on the surface of the surface-treated titanium platelets. Cell numbers increased steadily on all titanium platelets. However, each time statistically significantly more cells grew on the surface-treated platelets. A relevant difference between the methods has been demonstrated only on the smooth surfaces whereby, the cold plasma activation proved to be more advantageous. Although the number of adherent cells on the UV and cold plasma treated surfaces is significantly higher than on untreated titanium platelets, the differences in proliferation and viability are not clearly significantly better. In the comparison of the two methods the proliferation results after cold plasma activation are significantly higher compared to the UV photofunctionalisation, the viability measurement shows a similar tendency.

Due to the fact that *in vitro* results are of limited value, an *in vivo* study is recommended to investigate the extent to which the results obtained after functionalization can also be confirmed in the complexity of a biological system.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Aluminiumoxid  |
| Ar                             | Argon  |
| ASTM                           | <i>American Society for Testing and Materials</i>                                |
| at%                            | Athmosphärenprozent  |
| BMP                            | <i>Bone Morphogenetic Protein</i>  |
| BrdU                           | Pyrimidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin  |
| C                              | Kohlenstoff  |
| CaO                            | Calciumoxid  |
| CHO-K1-Zellen                  | Ovarzellen des chinesischen Hamsters   |
| Co                             | Cobalt   |
| CO                             | Kohlenstoffmonoxid   |
| CO <sub>2</sub>                | Kohlenstoffdioxid  |
| cp Ti                          | <i>Commercially pure titanium</i> (Reintitan)                                    |
| Cr                             | Chrom  |
| DGI                            | Deutschen Gesellschaft für Implantologie   |
| DMLS                           | <i>Direct metal laser sintering</i> (direkte Lasersinterung von Metall)          |
| DNS                            | Desoxyribonucleinsäure   |
| E-Modul                        | Elastizitätsmodul  |
| Fab-Fragment                   | <i>Fragment antigen binding-</i> (Antigen-bindendes Fragment eines Antikörpers)  |
| FDA                            | Fluoreszindiacetat   |
| Fe                             | Eisen  |
| Gpa                            | Gigapascal   |
| h                              | Stunden  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Schwefelsäure  |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | Schwefelsäure  |
| HCl                            | Salzsäure  |
| HNO <sub>3</sub>               | Salpetersäure  |
| H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> | Phosphorsäure  |
| HA                             | Hydroxylapatit   |
| Hcl                            | Salzsäure  |
| HF                             | Flusssäure   |
| HF                             | Fluorwasserstoff   |
| HNO <sub>3</sub>               | Salpetersäure  |
| INT                            | Tetrazolium-Salz (2-[4-Iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) |
| ISQ                            | Implantatstabilitätsquotienten   |
| KIK                            | Knochen-Implantat-Kontakt  |
| LDH                            | Laktatdehydrogenase  |
| LDS                            | Live-Dead-Staining (Lebend-Tod-Färbung)  |
| MAO                            | <i>Micro-Arc Oxidation</i> (Plasma-elektrolytische-Oxidation)                    |
| MC3T3-E1                       | Murine immortalisierte Präosteoblasten   |
| MG-63-Zellen                   | humane osteoblasten-ähnliche Osteosarkom-Zellen                                  |
| mM                             | Millimolar   |
| Mo                             | Molybdän   |
| Mpa                            | Megapascal   |
| MTT                            | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid                       |
| mW                             | Milliwatt  |
| N                              | Stickstoff   |
| Na <sub>2</sub> O              | Natriumoxid  |

|  |  |
|--|--|
| NADH/H <sup>+</sup> und NAD <sup>+</sup> | Oxidationsstufen von Nicotinamidadenindinukleotid  |
| O I                                      | Sauerstoff aus Titanoxid   |
| O/ O <sub>2</sub>                        | Sauerstoff   |
| OH                                       | Hydroxide  |
| OK                                       | Oberkiefer   |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>            | Phosphorpentoxid   |
| PBS                                      | <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)                             |
| PHABO                                    | <i>primary human alveolar bone osteoblasts</i> (primäre humane Alveolarknochen-Osteoblasten) |
| PI                                       | Propidiumiodid   |
| PIM                                      | Pulverspritzguss   |
| PPAAm                                    | plasmapolymerisiertes Allylamin  |
| PPEDA                                    | plasmapolymerisiertes Ethylendiamin  |
| PVD                                      | <i>Physical Vapour Deposition</i> (pyhsikalische Gasphasenabscheidung)                       |
| Ra                                       | mittlere arithmetische Rauheit   |
| REM                                      | Rasterelektronenmikroskop  |
| RFA                                      | Resonanz-Frequenz-Analyse  |
| Rk                                       | Kernel-Rauheit   |
| RM-A                                     | Plättchen aus Polyurethan mit 0,1% Zinkdiethyldithiocarbamat                                 |
| Rpk                                      | Gipfelhöhe der Kernel-Rauheit  |
| rpm                                      | revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)  |
| Rvk                                      | Tälertiefe der Kernel-Rauheit  |
| S <sub>a</sub>                           | Flächenbezogener Rauheitswert  |
| SiO <sub>2</sub>                         | Siliciumdioxid   |
| SLA                                      | <i>Sandblasting with large grit followed by Acid Etching</i> (sandgestrahlt und geätzt)      |
| Ti                                       | Titan  |
| Ti (IV)                                  | Titan mit der Oxidationsstufe IV (Ti <sup>4+</sup> ) aus (TiO <sub>2</sub> )                 |
| Ti <sub>2</sub> O <sub>3</sub>           | Titan(III)-oxid  |
| Ti6Al4V                                  | Titanalloy mit 6% Aluminium und 4% Vanadium  |
| TiF <sub>4</sub>                         | Titan(IV)-fluorid  |
| TiH <sub>2</sub>                         | Titandihydrid  |
| TiO                                      | Titanoxid  |
| TiO <sub>2</sub>                         | Titandioxid  |
| TMB                                      | Tetramethylbenzidin  |
| TPS                                      | Titan-Plasmaspritzen   |
| TZP                                      | polykristallines tetragonales Zirkoniumdioxid  |
| UK                                       | Unterkiefer  |
| UV                                       | Ultraviolett-Licht   |
| UVA                                      | Ultraviolett-Licht Wellenlängenbereich 380-315nm   |
| UVB                                      | Ultraviolett-Licht Wellenlängenbereich 315-280nm   |
| UVC                                      | Ultraviolett-Licht Wellenlängenbereich <280nm  |
| W  | Watt   |
| Wako                                     | Plättchen aus Polyester  |
| XPS                                      | <i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> (Röntgen-Photoelektronenspektroskopie)               |
| XTT                                      | 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide                     |
| µg                                       | Mikrogramm   |
| µl                                       | Mikroliter   |

## **9. Literaturverzeichnis**

- Abron, A., Hopfensperger, M., Thompson, J., Cooper, L. (2001). "Evaluation of a predictive model for implant surface topography effects on early osseointegration in the rat tibia model." *J Prosthet Dent*: 85(1): 40–6.
- Abtahi, J. (2013). *Bisphosphonates and implants in the jaw bone*, Medical Dissertations No 1348, Linköping University.
- Abtahi, J., Agholme, F., Sandberg, O., Aspenberg, P. (2013). "Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw." (1544-0591 (Electronic)).
- Abtahi, J., Tengvall, P., Aspenberg, P. (2012). "A bisphosphonate-coating improves the fixation of metal implants in human bone. A randomized trial of dental implants." (1873-2763 (Electronic)).
- Adell, R., Lekholm, U., Rockler, B., Branemark, P. I. (1981). "A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw." (0300-9785 (Print)).
- Aita, H., Att, W., Ueno, T., Yamada, M., Hori, N., Iwasa, F., Tsukimura, N., Ogawa, T. (2009a). "Ultraviolet light-mediated photofunctionalization of titanium to promote human mesenchymal stem cell migration, attachment, proliferation and differentiation." *Acta Biomater*: 5(8): 3247-57.
- Aita, H., Hori, N., Takeuchi, M., Suzuki, T., Yamada, M., Anpo, M., Ogawa, T. (2009b). "The effect of ultraviolet functionalization of titanium on integration with bone." *Biomaterials*: 30(6): 1015-25.
- Al Qahtani, M. S., Wu, Y., Spintzyk, S., Krieg, P., Killinger, A., Schweizer, E., Stephan, I., Scheideler, L., Geis-Gerstorfer, J., Rupp, F. (2015). "UV-A and UV-C light induced hydrophilization of dental implants." (1879-0097 (Electronic)).
- Albrektsson, T., Branemark, P. I., Hansson, H. A., Lindstrom, J. (1981). "Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man." *Acta Orthop Scand*: 52(2): 155-170.
- Albrektsson, T., Johansson, C. (2001). "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration." (0940-6719 (Print)).
- Albrektsson, T., Wennerberg, A. (2004). "Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them." *Int J Prosthodont*: 17(5): 536-543.
- Albrektsson, T., Wennerberg, A. (2005). "The impact of oral implants—past and future, 1966-2042." *J Can Dent Assoc*: 71(5): 327.
- Alharbi, H. M., Babay, N., Alzoman, H., Basudan, S., Anil, S., Jansen, J. A. (2014). "Bone morphology changes around two types of bone-level implants installed in fresh extraction sockets - a histomorphometric study in Beagle dogs." *Clin Oral Implants Res*: 26(29): 1106-1112.
- Altmann, B., Kohal, R. J., Steinberg, T., Tomakidi, P., Bachle-Haas, M., Wennerberg, A., Att, W. (2013). "Distinct cell functions of osteoblasts on UV-functionalized titanium- and zirconia-based implant materials are modulated by surface topography." (1937-3392 (Electronic)).

Andrukhov, O., Huber, R., Shi, B., Berner, S., Rausch-Fan, X., Moritz, A., Spencer, N. D., Schedle, A. (2016). "Proliferation, behavior, and differentiation of osteoblasts on surfaces of different microroughness." (1879-0097 (Electronic)).

Annunziata, M., Canullo, L., Donnarumma, G., Caputo, P., Nastri, L., Guida, L. (2016). "Bacterial inactivation/sterilization by argon plasma treatment on contaminated titanium implant surfaces: In vitro study." (1698-6946 (Electronic)).

Aparicio, C., Gil, F. J., Fonseca, C., Barbosa, M., Planell, J. A. (2003). "Corrosion behavior of commercially pure titanium shot blasted with different materials and size of shot particles for dental implant applications." *Biomaterials*: 24(2): 263–73.

Aronsson, B. O., Lausmaa, J., Kasemo, B. (1997). "Glow discharge plasma treatment for surface cleaning and modification of metallic biomaterials." *J Biomed Mater Res*: 35(1): 49-73.

Assis, S. L., Rogero, S. O., Antunes, R. A., Padilha, A. F., Costa, I. (2005). "A comparative study of the in vitro corrosion behavior and cytotoxicity of a superferritic stainless steel, a Ti-13Nb-13Zr alloy, and an austenitic stainless steel in Hank's solution." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*: 73(1): 109-16.

Att, W., Hori, N., Iwasa, F., Yamada, M., Ueno, T., Ogawa, T. (2009a). "The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys." (1878-5905 (Electronic)).

Att, W., Ogawa, T. (2012). "Biological aging of implant surfaces and their restoration with ultraviolet light treatment: a novel understanding of osseointegration." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 27(4): 753-761.

Att, W., Takeuchi, M., Suzuki, T., Kubo, K., Anpo, M., Ogawa, T. (2009b). "Enhanced osteoblast function on ultraviolet light-treated zirconia." (1878-5905 (Electronic)).

Att, W., Tsukimura, N., Suzuki, T., Ogawa, T. (2007). "Effect of supramicron roughness characteristics produced by 1- and 2-step acid etching on the osseointegration capability of titanium." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 22(5): 719-728.

Att, W., Yamada, M., Ogawa, T. (2009c). "Effect of titanium surface characteristics on the behavior and function of oral fibroblasts." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 24(3): 419-431.

Bacakova, L., Filova, E., Parizek, M., Ruml, T., Svorcik, V. (2011). "Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants." (1873-1899 (Electronic)).

Bachle, M., Kohal, R. J. (2005). "A systematic review of the influence of different titanium surfaces on proliferation, differentiation and protein synthesis of osteoblast-like MG63 cells." (0905-7161 (Print)).

Baier, R., Meyer, A., Natiella, J. R., Natiella, R. R., Carter, J. M. (1984). "Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results." (0021-9304 (Print)).

Baj, A., Lo Muzio, L., Lauritano, D., Candotto, V., Mancini, G. E., Gianni, A. B. (2016). "Success of immediate versus standard loaded implants: a short literature review." (0393-974X (Print)).

Barfeie, A., Wilson, J., Rees, J. (2015). "Implant surface characteristics and their effect on osseointegration." (1476-5373 (Electronic)).

- Becker, W., Becker, B. E., Ricci, A., Bahat, O., Rosenberg, E., Rose, L. F., Handelsman, M., Israelson, H. (2000). "A prospective multicenter clinical trial comparing one- and two-stage titanium screw-shaped fixtures with one-stage plasma-sprayed solid-screw fixtures." *Clin Implant Dent Relat Res*: 2(3): 159–65.
- Berry, A. (1988). "Lead roots of teeth for implantation." *Journal of Dental Sciences*: 8(1): 549-553.
- Bidez, M. W., Misch, C. F. (1992). "Force transfer in implant dentistry: Basic concepts and principles." *J. Oral Implantol*: 18(3): 264–274.
- Biffar, R., Ehrenfeld, M., Gernet, W., Schwenger, N. (2011). *Zahnärztliche Prothetik*.
- BioVision. (2016). "LDH-Cytotoxicity Colorimetric Assay Kit II." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <http://www.biovision.com/documentation/datasheets/K313.pdf>.
- Bobbio, A. (1972). "The first endosseous alloplastic implant in the history of man." *Bull Hist Dent*: 20(1): 1-6.
- Bohndorf, K., Imhof, H., Fischer, W. (2006). *Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 2. Aufl.: 22.
- Bowers, K. T., Keller, J. C., Randolph, B. A., Wick, D. G., Michaels, C. M. (1992). "Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro." (0882-2786 (Print)).
- Branemark, P. I. (1959). "Vital microscopy of bone marrow in rabbit." *Scand J Clin Lab Invest*: 11 Supp 38: 1-82.
- Branemark, P. I. (1983). "Osseointegration and its experimental background." *J Prosthet Dent*: 50(3): 399-410.
- Branemark, P. I. (1985). "Einführung in die Osseointegration." In: Branemark, P. I., Zarb, G., Albrektsson, T.: *Gewebeintegrierter Zahnersatz. Osseointegration in klinischer Zahnheilkunde*. Quintessenz, Berlin: 11-76.
- Branemark, P. I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B. O., Lindstrom, J., Ohlsson, A. (1970). "Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies." (0036-5556 (Print)).
- Branemark, P. I., Hansson, B. O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O., Ohman, A. (1977). "Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period." *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*: 16: 1-132.
- Brezavšček, M. (2012). *Effect of UV treatment on the osteoconductivity of a zirconia-based implant material*, Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Zahnmedizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- Broggini, N., McManus, L. M., Hermann, J. S., Medina, R. U., Oates, T. W., Schenk, R. K., Buser, D., Mellonig, J. T., Cochran, D. L. (2003). "Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface." (0022-0345 (Print)).
- Bundeszahnärztekammer und Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (2008). "5.01 Wissenschaftlich abgesicherte Patienteninformation der Bundeszahnärztekammer und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und

Kieferheilkunde. Patienteninformation." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von [http://www.dgzmk.de/uploads/tx\\_szdgzmkdocuments/5\\_01\\_implantate.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/5_01_implantate.pdf).

Buser, D., Brogini, N., Wieland, M., Schenk, R. K., Denzer, A. J., Cochran, D. L., Hoffmann, B., Lussi, A., Steinemann, S. G. (2004). "Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. ." *J Dent Res*: 83(7): 529–533.

Cai, K., Bossert, J., Jandt, K. D. (2006). "Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?" (0927-7765 (Print)).

Canullo, L., Cassinelli, C., Gotz, W., Tarnow, D. (2013). "Plasma of argon accelerates murine fibroblast adhesion in early stages of titanium disk colonization." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 28(4): 957-962.

Canullo, L., Genova, T., Tallarico, M., Gautier, G., Mussano, F., Botticelli, D. (2016). "Plasma of Argon Affects the Earliest Biological Response of Different Implant Surfaces: An In Vitro Comparative Study. LID - 0022034516629119 [pii]." (1544-0591 (Electronic)).

Canullo, L., Penarrocha-Oltra, D., Marchionni, S., Bagan, L., Penarrocha-Diago, M. A., Micarelli, C. (2014). "Soft tissue cell adhesion to titanium abutments after different cleaning procedures: preliminary results of a randomized clinical trial." (1698-6946 (Electronic)).

Cardelli, P., Cecchetti, F., Montani, M., Bramanti, E., Arcuri, C. (2013). "Clinical assessment of submerged vs non-submerged implants placed in pristine bone." (1974-5648 (Print)).

Carlsson, L. V., Albrektsson, T., Berman, C. (1989). "Bone response to plasma-cleaned titanium implants." (0882-2786 (Print)).

Cecchinato, D., Olsson, C., Lindhe, J. (2004). "Submerged or non-submerged healing of endosseous implants to be used in the rehabilitation of partially dentate patients." (0303-6979 (Print)).

Chowdhary, R., Halldin, A., Jimbo, R., Wennerberg, A. (2015). "Influence of Micro Threads Alteration on Osseointegration and Primary Stability of Implants: An FEA and In Vivo Analysis in Rabbits. LID - 10.1111/cid.12143 [doi]." (1708-8208 (Electronic)).

Cochran, D. L. (2000). "The scientific basis for and clinical experiences with Straumann implants including the ITI Dental Implant System: a consensus report." (0905-7161 (Print)).

Cochran, D. L., Monton, D., Weber, H. P. (2004). "Consensus statements and recommended clinical procedures regarding loading protocols for endosseous dental implants." (0882-2786 (Print)).

Coelho, M. J., Fernandes, M. H. (2000). "Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation." (0142-9612 (Print)).

Coelho, P. G., Giro, G., Teixeira, H. S., Marin, C., Witek, L., Thompson, V. P., Tovar, N., Silva, N. R. (2012). "Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces." *J Biomed Mater Res A*: 100(7): 1901-1906.

Collaert, B., De Bruyn, H. (1998). "Comparison of Branemark fixture integration and short-term survival using one-stage or two-stage surgery in completely and partially edentulous mandibles." (0905-7161 (Print)).

Conforto, E., Caillard, D., Aronsson, B. O., Descouts, P. (2004). "Crystallographic properties and mechanical behaviour of titanium hydride layers grown on titanium implants. ." *Philosophical Magazine*: 84(7): 631-645.

Cooper, L. F., Zhou, Y., Takebe, J., Guo, J., Abron, A., Holmen, A., Ellingsen, J. E. (2006). "Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c.p. titanium endosseous implants." *Biomaterials*: 27(6): 926-936.

Cvelbar, U., Modic, M., Kovač, J., Lazović, S., Filipič, G., Vujošević, D., Junkar, I., Eleršič, K., Brühl, S. P., Canal, C., Belmonte, T., Mozetič, M. (2012). "Plasma functionalization of titanium surface for repulsion of blood platelets." *Surface and Coatings Technology*: 211: 200-204.

Czekanska, E. M., Stoddart, M. J., Richards, R. G., Hayes, J. S. (2012). "In search of an osteoblast cell model for in vitro research." (1473-2262 (Electronic)).

Danna, N. R., Beutel, B. G., Tovar, N., Witek, L., Marin, C., Bonfante, E. A., Granato, R., Suzuki, M., Coelho, P. G. (2015). "Assessment of Atmospheric Pressure Plasma Treatment for Implant Osseointegration." (2314-6141 (Electronic)).

Davies, J. E. (1998). "Mechanisms of endosseous integration." *Int J Prosthodont*: 11: 391–401.

de Avila, E. D., Lima, B. P., Sekiya, T., Torii, Y., Ogawa, T., Shi, W., Lux, R. (2015). "Effect of UV-photofunctionalization on oral bacterial attachment and biofilm formation to titanium implant material." (1878-5905 (Electronic)).

de Queiroz, J. D., Leal, A. M., Terada, M., Agnez-Lima, L. F., Costa, I., Pinto, N. C., de Medeiros, S. R. (2014). "Surface modification by argon plasma treatment improves antioxidant defense ability of CHO-k1 cells on titanium surfaces." (1879-3177 (Electronic)).

de Wild, M., Schumacher, R., Mayer, K., Schkommodau, E., Thoma, D., Bredell, M., Kruse Gujer, A., Grätz, K. W., E., W. F. (2013). "Bone regeneration by the osteoconductivity of porous titanium implants manufactured by selective laser melting: a histological and micro computed tomography study in the rabbit." *Tissue Engineering: Part A*: 19(23-24): 2645–2654.

Deutsche Gesellschaft für Implantologie "Deutsche Gesellschaft für Implantologie- Wissen für Patienten; Zahnimplantate Infoportal." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <http://www.dginet.de/web/dgi/warum>.

Diener Electronic GmbH & Co KG (2008). *Plasmatechnik*, Aufl.2: 7-15.

Dohan Ehrenfest, D. M., Coelho, P. G., Kang, B. S., Sul, Y. T., Albrektsson, T. (2010). "Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography." *Trends Biotechnol*: 28(4): 198-206.

Dorkhan, M., Yucel-Lindberg, T., Hall, J., Svensater, G., Davies, J. R. (2014). "Adherence of human oral keratinocytes and gingival fibroblasts to nano-structured titanium surfaces." (1472-6831 (Electronic)).

- Drelich, J., Chibowski, E. (2010). "Superhydrophilic and superwetting surfaces: definition and mechanisms of control." (1520-5827 (Electronic)).
- Durual, S., Pernet, F., Rieder, P., Mekki, M., Cattani-Lorente, M., Wiskott, H. W. A. (2011). "Titanium nitride oxide coating on rough titanium stimulates the proliferation of human primary osteoblasts." (1600-0501 (Electronic)).
- Duske, K., Koban, I., Kindel, E., Schroder, K., Nebe, B., Holtfreter, B., Jablonowski, L., Weltmann, K., Kocher, T. (2012). "Atmospheric plasma enhances wettability and cell spreading on dental implant metals." (1600-051X (Electronic)).
- Elias, C. N., Lima, J. H. C., Valiev, R., Meyers, M. A. (2008). Biomedical applications of titanium and its alloys. *The Journal of The Minerals, Metals & Materials Society (TMS)*: 60(3): 46-49.
- Ellingsen, J. E., C.B., J., Wennerberg, A., Holmen, A. (2004). "Improved retention and bone-to-implant contact with fluoride-modified titanium implants. ." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 19(5): 659–66.
- Esposito, M. A., Koukouloupoulou, A., Coulthard, P., Worthington, H. V. (2010). "Interventions for replacing missing teeth: dental implants in fresh extraction sockets (immediate, immediate-delayed and delayed implants)." (1469-493X (Electronic)).
- Fleisch, H. A. (2001). "Molekulare Wirkmechanismen der Bisphosphonate: Osteoklasten im Fadenkreuz." *Pharmazie in unserer Zeit*: 30(6): 500-504.
- Franchini, I., Capelli, M., Fumagalli, L., Parenti, A., Testori, T. (2011). "Multicenter retrospective analysis of 201 consecutively placed camlog dental implants." (0198-7569 (Print)).
- Friberg, B., Jemt, T., Lekholm, U. (1991). "Early failures in 4,641 consecutively placed Branemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses." (0882-2786 (Print)).
- Funato, A., Ogawa, T. (2013). "Photofunctionalized dental implants: a case series in compromised bone." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 28(6): 1589-1601.
- Funato, A., Yamada, M., Ogawa, T. (2013). "Success rate, healing time, and implant stability of photofunctionalized dental implants." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 28(5): 1261-1271.
- Gabler, C., Zietz, C., Gohler, R., Fritsche, A., Lindner, T., Haenle, M., Finke, B., Meichsner, J., Lenz, S., Frerich, B., Luthen, F., Nebe, J. B., Bader, R. (2014). "Evaluation of osseointegration of titanium alloyed implants modified by plasma polymerization." (1422-0067 (Electronic)).
- Gao, Y., Liu, Y., Zhou, L., Guo, Z., Rong, M., Liu, X., Lai, C., Ding, X. (2013). "The effects of different wavelength UV photofunctionalization on micro-arc oxidized titanium." (1932-6203 (Electronic)).
- Garber, D. A., H., S., Salama, M. A. (2001). "Two-stage versus one-stage—is there really a controversy?" *J Periodontol*: 72(3): 417–421.
- Giljean, S., Bigerelle, M., Anselme, K. (2014). "Roughness statistical influence on cell adhesion using profilometry and multiscale analysis." (1932-8745 (Electronic)).

- Giro, G., Tovar, N., Witek, L., Marin, C., Silva, N. R., Bonfante, E. A., Coelho, P. G. (2013). "Osseointegration assessment of chairside argon-based nonthermal plasma-treated Ca-P coated dental implants." (1552-4965 (Electronic)).
- Glauser, R., Sennerby, L., Meredith, N., Rée, A., Lundgren, A., Gottlow, J., Hämmerle, C. H. (2004). "Resonance frequency analysis of implants subjected to immediate or early functional occlusal loading: successful vs. failing implants." *Clin Oral Implants Res*: 15(4): 428–434.
- Gobbato, L., Arguello, E., Martin, I. S., Hawley, C. E., Griffin, T. J. (2012). "Early bone healing around 2 different experimental, HA grit-blasted, and dual acid-etched titanium implant surfaces. A pilot study in rabbits." (1538-2982 (Electronic)).
- Gottlow, J., Dard, M., Kjellson, F., Obrecht, M., Sennerby, L. (2012). "Evaluation of a new titanium- zirconium dental implant: a biomechanical and histological comparative study in the mini pig." *Clin Implant Dent Relat Res*: 14(4): 538-545.
- Grassi, S., Piattelli, A., de Figueiredo, L. C., Feres, M., de Melo, L., Iezzi, G., Alba, R. C. J., Shibli, J. A. (2006). "Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces." (0022-3492 (Print)).
- Grötz, K. A., Kreusch, T. (2006). "Wissenschaftliche Stellungnahme: Deutsche Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde: Zahnärztliche Betreuung von Patienten unter und nach Bisphosphonat Medikation." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von [http://www.dgzmk.de/uploads/tx\\_szdgzmkdocuments/Zahnaerztliche\\_Betreuung\\_von\\_Patienten\\_unternach\\_Bisphosphonat-Medikation.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Zahnaerztliche_Betreuung_von_Patienten_unternach_Bisphosphonat-Medikation.pdf).
- Guastaldi, F. P., Yoo, D., Marin, C., Jimbo, R., Tovar, N., Zanetta-Barbosa, D., Coelho, P. G. (2013). "Plasma treatment maintains surface energy of the implant surface and enhances osseointegration." *Int J Biomater* 2013: 354125.
- Gunter, P. L. J., Gijzeman, O. L. J., Niemantsverdriet, J. W. (1997). "Surface roughness effects in quantitative XPS: magic angle for determining overlayer thickness " *Applied Surface Science*: 115(4): 342-346.
- Gutwald, R., Gellrich, N.-C., Schmelzeisen, R. (2010). "Einführung in die zahnärztliche Chirurgie und Implantologie " 2. Auflage Elsevier.
- Hahn, J. (2005). "One-Piece Root-Form Implants: A Return to Simplicity." *Journal of Oral Implantology*: 31(2): 77-84.
- Hammerle, C. H., Glauser, R. (2000). "Clinical evaluation of dental implant treatment." (0906-6713 (Print)).
- Han, Y., Chen, D., Sun, J., Zhang, Y., Xu, K. (2008). "UV-enhanced bioactivity and cell response of micro-arc oxidized titania coatings." (1742-7061 (Print)).
- Happe, A., Priv.-Doz. Dr., Holthaus, P., ZTM (2014). "Abutment-Material und -Design: Einfluss auf das periimplantäre Weichgewebe; Zeitgemäße Gestaltung von Implantat-Abutments ".
- Haubenreich, J. E., Robinson, F. G., West, K. P., Frazer, R. Q. (2005). "Did we push dental ceramics too far? A brief history of ceramic dental implants." (1050-6934 (Print)).

- Hayashi, M., Jimbo, R., Lindh, L., Sotres, J., Sawase, T., Mustafa, K., Andersson, M., Wennerberg, A. (2012). "In vitro characterization and osteoblast responses to nanostructured photocatalytic TiO<sub>2</sub> coated surfaces." (1878-7568 (Electronic)).
- Hayashi, R., Ueno, T., Migita, S., Tsutsumi, Y., Doi, H., Ogawa, T., Hanawa, T., Wakabayashi, N. (2014). "Hydrocarbon Deposition Attenuates Osteoblast Activity on Titanium." (1544-0591 (Electronic)).
- Hill, A. V. (1910). "The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I." *J. Physiol*: 40: 4-7.
- Hirakawa, Y., Jimbo, R., Shibata, Y., Watanabe, I., Wennerberg, A., Sawase, T. (2013). "Accelerated bone formation on photo-induced hydrophilic titanium implants: an experimental study in the dog mandible." (1600-0501 (Electronic)).
- Hollander, D. A., von Walter, M., Wirtz, T., Sellei, R., Schmidt-Rohlfing, B., Paar, O., Erli, H.-J. (2006). "Structural, mechanical and in vitro characterization of individually structured Ti-6Al-4V produced by direct laser forming." (0142-9612 (Print)).
- Hori, N., Ueno, T., Suzuki, T., Yamada, M., Att, W., Okada, S., Ohno, A., Aita, H., Kimoto, K., Ogawa, T. (2010). "Ultraviolet light treatment for the restoration of age-related degradation of titanium bioactivity." (0882-2786 (Print)).
- Ihde, S., Kopp, S., Gundlach, K., Konstantinovic, V. S. (2009). "Effects of radiation therapy on craniofacial and dental implants: a review of the literature." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*: 107(1): 56-65.
- Isoda, K., Ayukawa, Y., Tsukiyama, Y., Sogo, M., Matsushita, Y., Koyano, K. (2012). "Relationship between the bone density estimated by cone-beam computed tomography and the primary stability of dental implants." (1600-0501 (Electronic)).
- Ivanoff, C. J., Sennerby, L., Johansson, C., Rangert, B., Lekholm, U. (1997). "Influence of implant diameters on the integration of screw implants. An experimental study in rabbits." *Int J Oral Maxillofac Surg*: 26(2): 141-8.
- Ivanoff, C. J., Sennerby, L., Lekholm, U. (1996). "Influence of mono- and bicortical anchorage on the integration of titanium implants. A study in the rabbit tibia." (0901-5027 (Print)).
- Iwasa, F., Hori, N., Ueno, T., Minamikawa, H., Yamada, M., Ogawa, T. (2010). "Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism." (1878-5905 (Electronic)).
- Iwasa, F., Tsukimura, N., Sugita, Y., Kanuru, R. K., Kubo, K., Hasnain, H., Att, W., Ogawa, T. (2011). "TiO<sub>2</sub> micro-nano-hybrid surface to alleviate biological aging of UV-photofunctionalized titanium." (1178-2013 (Electronic)).
- Jackson, M. J., Ahmed, W. (2007). *Surface Engineered Surgical Tools and Medical Devices*. Springer Science & Business Media, Berlin: 21-47.
- Jemat, A., Ghazali, M. J., Razali, M., Otsuka, Y. (2015). "Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants." (2314-6141 (Electronic)).
- Jimbo, R., Coelho, P. G., Bryington, M., Baldassarri, M., Tovar, N., Currie, F., Hayashi, M., Janal, M. N., Andersson, M., Ono, D., Vandeweghe, S., Wennerberg, A. (2012). "Nano

hydroxyapatite-coated implants improve bone nanomechanical properties." (1544-0591 (Electronic)).

Jimbo, R., Sawase, T., Baba, K., Kurogi, T., Shibata, Y., Atsuta, M. (2008). "Enhanced initial cell responses to chemically modified anodized titanium." (1523-0899 (Print)).

Jones, K. H., Senft, J. A. (1984). "An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide." *J Histochem Cytochem*: 33(1): 77-9.

Jurdzik, B. A. (2010). Prognose von Implantaten und Zahnersatz nach Sofortbelastung-eine Literaturübersicht, Inauguraldissertation zur Erlangung des Zahnmedizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert- Ludwigs- Universität Freiburg im Breisgau.

Karlsson, J., Jimbo, R., Fathali, H. M., Humberto, O., Schwartz-Filho, H. O., Hayashi, M., Halvarsson, M., Wennerberg, A., Andersson, M. (2012). "In vivo biomechanical stability of osseointegrating mesoporous TiO(2) implants." (1878-7568 (Electronic)).

Kasai, T., Pogrel, M. A., Hossaini, M. (2009). "The prognosis for dental implants placed in patients taking oral bisphosphonates." *J Calif Dent Assoc*: 37(1): 39-42.

Kasemo, B. (1983). "Biocompatibility of titanium implants: surface science aspects." *J Prosthet Dent*: 49(6): 832-837.

Kieswetter, K., Schwartz, Z., Hummert, T. W., Cochran, D. L., Simpson, J., Dean, D. D., Boyan, B. D. (1996). "Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. ." *J Biomed Mater Res*: 32(1): 55–63.

Kim, H., Choi, S. H., Ryu, J.-J., Koh, S.-Y., Park, J.-H., Lee, I. S. (2008). "The biocompatibility of SLA-treated titanium implants." (1748-605X (Electronic)).

Kim, M. C., Song, D. K., Shin, H. S., Baeg, S. H., Kim, G. S., Boo, J. H., Han, J. G., Yang, S. H. (2003). "Surface modification for hydrophilic property of stainless steel treated by atmospheric-pressure plasma jet." *Surf. Coat. Technology*: 171(1-3): 312–316.

Klokkevold, P. R., Jovanovic, S. A. (2002). "Advanced Implant Surgery and Bone Grafting Techniques." In: Newman, Takei, Carranza. Carranza's Clinical Periodontology, 9. Aufl., W.B. Saunders, Philadelphia: 907–8.

Kobune, K., Miura, T., Sato, T., Yotsuya, M., Yoshinari, M. (2014). "Influence of plasma and ultraviolet treatment of zirconia on initial attachment of human oral keratinocytes: expressions of laminin gamma2 and integrin beta4." (1881-1361 (Electronic)).

Kotsovilis, S., Fourmouis, I., Karoussis, I. K., Bamia, C. (2009). "A systematic review and meta-analysis on the effect of implant length on the survival of rough-surface dental implants." *J Periodontol*: 80(11): 1700-18.

Krüss GmbH (2017). "Dynamic contact angle." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <http://www.kruss.de/services/education-theory/glossary/dynamic-contact-angle/>.

Lagarie, S. (2012). Knöchernen Verankerung und Primärstabilität von dentalen Implantaten im Oberkiefer des Menschen Eine experimentelle Untersuchung, Diss., Univ. Erlangen, Nürnberg.

- Lahrach, M. A. (2014). Numerische Untersuchungen der Grenzabmaße enossaler dentaler Implantate Medizinischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn; Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffwissenschaften.
- Läkamp, J. (2006). Elektronenmikroskopische Untersuchung des Implantat/Knochen-Interface von sofortbelastbaren Implantaten, Universitätsklinikum Münster Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie; Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms - Universität Münster
- Laxman, R. P., Amreena, G. (2012). "Primary stability: The password of implant integration." *Journal of Dental Implants*: 2(2): 103-109.
- Le Guehennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., Amouriq, Y. (2007). "Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration." *Dent Mater*: 23(7): 844-854.
- Lee, J. H., Kim, Y. H., Choi, E., Kim, K. M., Kim, K. N. (2015). "Air atmospheric-pressure plasma-jet treatment enhances the attachment of human gingival fibroblasts for early peri-implant soft tissue seals on titanium dental implant abutments." (1502-3850 (Electronic)).
- Linkow, L. I. (1975). "Blattimplantologie " *Zahnärztl Praxis*; 16: 356-359.
- Liu, Y., Enggist, L., Kuffer, A. F., Buser, D., Hunziker, E. B. (2007a). "The influence of BMP-2 and its mode of delivery on the osteoconductivity of implant surfaces during the early phase of osseointegration." (0142-9612 (Print)).
- Liu, Y., Huse, R. O., de Groot, K., Buser, D., Hunziker, E. B. (2007b). "Delivery mode and efficacy of BMP-2 in association with implants." (0022-0345 (Print)).
- Lorenzetti, M., Dakischew, O., Trinkaus, K., Lips, K. S., Schnettler, R., Kobe, S., Novak, S. (2015). "Enhanced osteogenesis on titanium implants by UVB photofunctionalization of hydrothermally grown TiO<sub>2</sub> coatings." (1530-8022 (Electronic)).
- MacDonald, D. E., Deo, N., Markovic, B., Stranick, M., Somasundaran, P. (2002). "Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles." (0142-9612 (Print)).
- Mangano, C., De Rosa, A., Desiderio, V., d'Aquino, R., Piattelli, A., De Francesco, F., Tirino, V., Mangano, F., Papaccio, G. (2010). "The osteoblastic differentiation of dental pulp stem cells and bone formation on different titanium surface textures." *Biomaterials*: 31(13): 3543–3551.
- Martin, J. Y., Schwartz, Z., Hummert, T. W., Schraub, D. M., Simpson, J., Lankford, J. J., Dean, D. D., Cochran, D. L., Boyan, B. D. (1995). "Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63)." (0021-9304 (Print)).
- Massaro, C., Rotolo, P., De Riccardis, F., Milella, E., Napoli, A., Wieland, M., Textor, M., Spencer, N. D., Brunette, D. M. (2002). "Comparative investigation of the surface properties of commercial titanium dental implants. Part I: chemical composition." *J Mater Sci Mater Med*: 13(6): 535-48.
- McKenzie, K., Dennis Bobyn, J., Roberts, J., Karabasz, D., Tanzer, M. (2011). "Bisphosphonate remains highly localized after elution from porous implants." (1528-1132 (Electronic)).

- Mehdikhani-Nahrkhalaji, M., Fathi, M. H., Mortazavi, V., Mousavi, S. B., Akhavan, A., Haghghat, A., Hashemi-Beni, B., Razavi, S. M., Mashhadiabbas, F. (2015). "Biodegradable nanocomposite coatings accelerate bone healing: In vivo evaluation." (1735-3327 (Print)).
- Mellado-Valero, A., Ferrer Garcia, J. C., Herrera Ballester, A., Labaig Rueda, C. (2007). "Effects of diabetes on the osseointegration of dental implants." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*: 12(1): 38-43.
- Meredith, N. (1998). "Assessment of implant stability as a prognostic determinant." (0893-2174 (Print)).
- Minamikawa, H., Ikeda, T., Att, W., Hagiwara, Y., Hirota, M., Tabuchi, M., Aita, H., Park, W., Ogawa, T. (2014). "Photofunctionalization increases the bioactivity and osteoconductivity of the titanium alloy Ti6Al4V." (1552-4965 (Electronic)).
- Mistry, S., Kundu, D., Datta, S., Basu, D. (2011). "Comparison of bioactive glass coated and hydroxyapatite coated titanium dental implants in the human jaw bone." (1834-7819 (Electronic)).
- Mistry, S., Roy, R., Kundu, B., Datta, S., Kumar, M., Chanda, A., Kundu, D. (2016). "Clinical Outcome of Hydroxyapatite Coated, Bioactive Glass Coated, and Machined Ti6Al4V Threaded Dental Implant in Human Jaws: A Short-Term Comparative Study." (1538-2982 (Electronic)).
- Mitteldeutsche Vereinigung für Zahnärztliche Implantologie "Subperiostale Implantologie" [Stand: 01.05.2017, 15:15], von [https://www.dginet.de/web/dgi/lvmvzi\\_geschichte\\_p\\_p\\_id=dgitabbedarticles\\_WAR\\_dgitabbedarticlesportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_pos=2&p\\_p\\_col\\_count=3&dgitabbedarticles\\_WAR\\_dgitabbedarticlesportlet\\_tab=192980](https://www.dginet.de/web/dgi/lvmvzi_geschichte_p_p_id=dgitabbedarticles_WAR_dgitabbedarticlesportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=2&p_p_col_count=3&dgitabbedarticles_WAR_dgitabbedarticlesportlet_tab=192980).
- Müller, W. D., Gross, U., Fritz, T., Voigt, C., Fischer, P., Berger, G., Rogaschewski, S., Lange, K. P. (2003). "Evaluation of the interface between bone and titanium surfaces being blasted by aluminium oxide or bioceramic particles. ." *Clin Oral Implants Res*: 14(3): 349–56.
- Müller, K. (1980). "Die Quintessenz der oralen Implantologie. Quintessenz, Berlin: 15-20."
- Nickenig, H. J., Spiekermann, H. (2006). "CT/DVT-basierte implantatprothetische Führungsschablonen vs. traditionelle Orientierungsschablonen." *Deutscher Ärzte-Verlag Köln; Zahnärztl Impl*; 22(4).
- Niinomi, M. (1998). "Mechanical properties of biomedical titanium alloy. ." *Mat. Sci. Eng: A* 243(1-2): 231–236.
- Noro, A., Kaneko, M., Murata, I., Yoshinari, M. (2013). "Influence of surface topography and surface physicochemistry on wettability of zirconia (tetragonal zirconia polycrystal)." (1552-4981 (Electronic)).
- O'Donnell, M. D. (2012). Melt-Derived Bioactive Glass. In: Jones, J. R., Clare, A. G.: *Bio-Glasses: An Introduction*. John Wiley & Sons, Chichester: 13-28.
- Ogawa, T. (2014). "Ultraviolet photofunctionalization of titanium implants." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 29(1): 95-102.

- Ogawa, T., Nishimura, I. (2003). "Different bone integration profiles of turned and acid-etched implants associated with modulated expression of extracellular matrix genes." (0882-2786 (Print)).
- Ogawa, T., Sukotjo, C., Nishimura, I. (2002). "Modulated bone matrix-related gene expression is associated with differences in interfacial strength of different implant surface roughness." (1059-941X (Print)).
- Olate, S., Lyrio, M. C., de Moraes, M., Mazzonetto, R., Moreira, R. W. (2010). "Influence of diameter and length of implant on early dental implant failure." *J Oral Maxillofac Surg*: 68(2): 414-9.
- Palmquist, A., Emanuelsson, L., Branemark, R., Thomsen, P. (2011). "Biomechanical, histological and ultrastructural analyses of laser micro- and nano-structured titanium implant after 6 months in rabbit." (1552-4981 (Electronic)).
- Palmquist, A., Johansson, A., Suska, F., Branemark, R., Thomsen, P. (2013). "Acute inflammatory response to laser-induced micro- and nano-sized titanium surface features." (1708-8208 (Electronic)).
- Parfitt, A. M. (1990). "Bone-forming cells in clinical conditions." In: Hall, B. K.: *Bone*, Aufl. 1, The osteoblast and osteocyte. Telford Press, Caldwell (NJ): 351-430.
- Parithimarkalaignan, S., Padmanabhan, T. V. (2013). "Osseointegration: An Update." *The Journal of the Indian Prosthodontic Society*: 13(1): 2–6.
- Park, J. H., Aluru, N. R. (2009). "Temperature-dependent wettability on a titanium dioxide surface." *J Molecular Simulation*: 35(1–2): 31–37.
- Park, K. H., Koak, J. Y., Kim, S.-K., Han, C. H., Heo, S. J. (2013). "The effect of ultraviolet-C irradiation via a bactericidal ultraviolet sterilizer on an anodized titanium implant: a study in rabbits." (1942-4434 (Electronic)).
- Penarrocha, M., Uribe, R., Balaguer, J. (2004). "Immediate implants after extraction. A review of the current situation." (1137-2834 (Print)).
- Petzold, C., Rubert, M., Lyngstadaas, S. P., Ellingsen, J. E., Monjo, M. (2010). "In vivo performance of titanium implants functionalized with eicosapentaenoic acid and UV irradiation." (1552-4965 (Electronic)).
- Pfeil, J., Biberthaler, P., Niethard, F. U. (2014). *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Aufl.: 308-310.
- Pham, L., Beyer, K., Jensen, E. D., Rodriguez, J. S., Davydova, J., Yamamoto, M., Petyk, A., Gopalakrishnan, R., Mansky, K. C. (2011). "Bone morphogenetic protein 2 signaling in osteoclasts is negatively regulated by the BMP antagonist, twisted gastrulation." (1097-4644 (Electronic)).
- Piattelli, A., Piattelli, M., Mangano, C., Scarano, A. (1998). "A histologic evaluation of eight cases of failed dental implants: is bone overheating the most probable cause?" *Biomaterials*: 19(7-9): 683-690.
- Pierrisnard, L., Renouard, F., Renault, P., Barquins, M. (2003). "Influence of implant length and bicortical anchorage on implant stress distribution." *Clin Implant Dent Relat Res*: 5(4): 254-62.

Prachar, P., Bartakova, S., Brezina, V., Cvrcek, L., Vanek, J. (2015). "Cytocompatibility of implants coated with titanium nitride and zirconium nitride." (0006-9248 (Print)).

Pruin, E. H. (1980). "Erfahrungen mit der enossalen Implantologie. In: Franke, J. (Hrsg): Der heutige Stand der Implantologie-Ein Symposium. Hanser, München: 89-110."

Quirynten, M., van Steenberghe, D. (1993). "Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study." (0905-7161 (Print)).

Ramazanoglu, M., Oshida, Y. (2011). "Osseointegration and Bioscience of Implant Surfaces - Current Concepts at Bone-Implant Interface." *Implant Dentistry - A Rapidly Evolving Practice*, Prof. Ilser Turkyilmaz (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/16936. von: <http://www.intechopen.com/books/implant-dentistry-a-rapidly-evolving-practice/osseointegration-and-bioscience-of-implant-surfaces-current-concepts-at-bone-implant-interface>.

Rao, S., Ushida, T., Tateishi, T., Okazaki, Y., Asao, S. (1996). "Effect of Ti, Al, and V ions on the relative growth rate of fibroblasts (L929) and osteoblasts (MC3T3-E1) cells." *Bio-Medical Materials and Engineering*: 6(2) :79-86.

Reichl, F.-X. "Etablierte Tests, Metabolische Untersuchungen." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <http://www.dent.med.uni-muenchen.de/exponent-0.96.4/index.php?section=73>.

Renouard, F., Nisand, D. (2006). "Impact of implant length and diameter on survival rates." (1600-0501 (Electronic)).

Ribeiro, A. R., Oliveira, F., Boldrini, L. C., Leite, P. E., Falagan-Lotsch, P., Linhares, A. B., Zambuzzi, W. F., Fragneaud, B., Campos, A. P., Gouvea, C. P., Archanjo, B. S., Achete, C. A., Marcantonio, E., Jr., Rocha, L. A., Granjeiro, J. M. (2015). "Micro-arc oxidation as a tool to develop multifunctional calcium-rich surfaces for dental implant applications." (1873-0191 (Electronic)).

Riley, D. J., Bavastrello, V., Covani, U., Barone, A., Nicolini, C. (2005). "An in-vitro study of the sterilization of titanium dental implants using low intensity UV-radiation." (0109-5641 (Print)).

RMS Foundation (2010). "Kontaktwinkelmessungen in der RMS: Newsletter 10/10 Ausgabe August." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von [https://www.rms-foundation.ch/fileadmin/newsletter/newsletter\\_10\\_d\\_01.pdf](https://www.rms-foundation.ch/fileadmin/newsletter/newsletter_10_d_01.pdf).

Roche Diagnostics GmbH (2008). "Apoptosis, Cytotoxicity and Cell Proliferation; 4th edition." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.htm>.

Roche Diagnostics GmbH (2013). "Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11647229001bul.pdf>.

Roche Diagnostics GmbH (2016). "Cell Proliferation Kit II (XTT), Colorimetric assay (XTT based) for the non-radioactive quantification of cell proliferation and viability." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Roche/Bulletin/1/11465015001bul.pdf>.

Rosa, M. B., Albrektsson, T., Francischone, C. E., Schwartz Filho, H. O., Wennerberg, A. (2012). "The influence of surface treatment on the implant roughness pattern." (1678-7765 (Electronic)).

Rosen, V. (2006). "BMP and BMP inhibitors in bone." (0077-8923 (Print)).

Roy, M., Pompella, A., Kubacki, J., Szade, J., Roy, R. A., Hedzelek, W. (2016). "Photofunctionalization of Titanium: An Alternative Explanation of Its Chemical-Physical Mechanism." (1932-6203 (Electronic)).

Rupf, S., Lehmann, A., Hannig, M., Schäfer, B., Schubert, A., Feldmann, U., Schindler, A. (2010). "Killing of adherent oral microbes by a non-thermal atmospheric plasma jet." (1473-5644 (Electronic)).

Rupp, F., Gittens, R. A., Scheideler, L., Marmur, A., Boyan, B. D., Schwartz, Z., Geis-Gerstorfer, J. (2014). "A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects." (1878-7568 (Electronic)).

Rupp, F. S., L; Olshanska, N; de Wild, M; Wieland, M. & Geis-Gerstorfer, J. (2006). "Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. ." J Biomed Mater Res A: 76(2): 323-334.

Satue, M., Gomez-Florit, M., Monjo, M., Ramis, J. M. (2016). "Improved human gingival fibroblast response to titanium implants coated with ultraviolet-irradiated vitamin D precursor and vitamin E." (1600-0765 (Electronic)).

Saulacic, N., Bosshardt, D. D., Bornstein, M. M., Berner, S., Buser, D. (2012). "Bone apposition to a titanium-zirconium alloy implant, as compared to two other titanium-containing implants." Eur. Cells Mater: 23: 273–288.

Scarano, A., Piattelli, M., Vrespa, G., Caputi, S., Piattelli, A. (2003a). "Bacterial adhesion on titanium nitride-coated and uncoated implants: an in vivo human study." (0160-6972 (Print)).

Scarano, A., Piattelli, M., Vrespa, G., Petrone, G., Iezzi, G., Piattelli, A. (2003b). "Bone healing around titanium and titanium nitride-coated dental implants with three surfaces: an experimental study in rats." (1523-0899 (Print)).

Schenk, R. K. (1987). "Cytodynamics and Histodynamics of Primary Bone Repair." In: Lane, J. M.: Fracture Healing. Churchill-Livingstone, New York: 23-32.

Schenk, R. K., Buser, D. (1998). "Osseointegration: a reality." (0906-6713 (Print)).

Schlottig, F. (2011). "Implantatoberflächen - Stand der Technik." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <http://www.zmk-aktuell.de/zahnheilkunde/implantologie/story/implantatoberflaechen-stand-der-technik-teil-1.html>.

Schnutenhaus, D. S. (2011). "Vollkeramische Implantate – ein evidenzbasiertes Verfahren?" [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <https://www.zwp-online.info/fachgebiete/implantologie/prothetik/vollkeramische-implantate-ein-evidenzbasiertes-verfahren>.

Schwarz, F., Herten, M., Sager, M., Wieland, M., Dard, M., Becker, J. (2007). "Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive) and

- conventional SLA titanium implants:A pilot study in dogs." *J Clin Periodontol*: 34(1): 78–86.
- Seo, H. Y., Kwon, J. S., Choi, Y. R., Kim, K. M., Choi, E. H., Kim, K. N. (2014). "Cellular attachment and differentiation on titania nanotubes exposed to air- or nitrogen-based non-thermal atmospheric pressure plasma." (1932-6203 (Electronic)).
- Sharma, A., McQuillan, A. J., Shibata, Y., Sharma, L. A., Waddell, J. N., Duncan, W. J. (2016). "Histomorphometric and histologic evaluation of titanium-zirconium (aTiZr) implants with anodized surfaces." (1573-4838 (Electronic)).
- Shon, W. J., Chung, S. H., Kim, H.-K., Han, G.-J., Cho, B.-H., Park, Y.-S. (2014). "Peri-implant bone formation of non-thermal atmospheric pressure plasma-treated zirconia implants with different surface roughness in rabbit tibiae." (1600-0501 (Electronic)).
- Sigma-Aldrich (2017). "PA0100 SIGMA, Plant Cell Viability Assay Kit, Fluorescent staining system to highlight viable and non-viable cells." [Stand: 01.05.2017, 15:15], von <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/pa0100?lang=de&region=DE>.
- Son, H. S., Ko, G., Zoh, K. D. (2009). "Kinetics and mechanism of photolysis and TiO<sub>2</sub> photocatalysis of triclosan." (1873-3336 (Electronic)).
- Staack, D., Fridman, A., Gutsol, A., Gogotsi, Y., Friedman, G. (2008). "Nanoscale corona discharge in liquids, enabling nanosecond optical emission spectroscopy." (1521-3773 (Electronic)).
- Steinemann, S. (1980). "Corrosion of surgical implants—in vivo and in vitro tests." In: Winter, G.; Leray, J.; de Groot, K.: *Evaluation of biomaterials*. Wiley, New York: 355-360.
- Strietzel, F. (2002). "Einheilung der Implantate - Grundlagen der Osseointegration. ." In: Reichart P. H.; Becker, J. E.; Neukam, J.; Schliephake, F. W.; Schmelzeisen, H.: *Curriculum Chirurgie Band I (zahnärztliche Chirurgie)* Quintessenz Verlag, Berlin: 414-416.
- Strock, A. E. (1939). "Experimental work on a method for the replacement of missing teeth by direct implantation of a mental support into the alveolus." *Am J Orthod*: 25: 467-472.
- Stübinger, S., Mosch, I., Robotti, P., Sidler, M., Klein, K., Ferguson, S. J., von Rechenberg, B. (2013). "Histological and biomechanical analysis of porous additive manufactured implants made by direct metal laser sintering: a pilot study in sheep." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*: 101(7): 1154–1163.
- Subramani, K., Jung, R. E., Molenberg, A., Hammerle, C. H. (2009). "Biofilm on dental implants: a review of the literature." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 24(4): 616-626.
- Suzuki, T., Hori, N., Att, W., Kubo, K., Iwasa, F., Ueno, T., Maeda, H., Ogawa, T. (2009). "Ultraviolet Treatment Overcomes Time-Related Degrading Bioactivity of Titanium." *Tissue Engineering Part A*: 15(12): 3679-88.
- Szmukler-Moncler, S., Salama, H., Reingewirtz, Y., Dubruille, J. H. (1998). "Timing of loading and effect of micromotion on bone-dental implant interface: review of experimental literature." (0021-9304 (Print)).

Taba Junior, M., Novaes Junior, A. B., Souza, S. L., Grisi, M. F., Palioto, D. B., Pardini, L. C. (2003). "Radiographic evaluation of dental implants with different surface treatments: an experimental study in dogs." *Implant Dent*: 12(13): 252–8.

Tada, S., Stegaroiu, R., Kitamura, E., Miyakawa, O., Kusakari, H. (2003). "Influence of implant design and bone quality on stress/strain distribution in bone around implants: a 3-dimensional finite element analysis." (0882-2786 (Print)).

Takeuchi, K., Saruwatari, L., Nakamura, H. K., Yang, J.-M., Ogawa, T. (2005). "Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface." (1549-3296 (Print)).

Tanuma, S., Powell, C. J., Penn, D. R. (2003). "Calculation of electron inelastic mean free paths (imfps) VII. Reliability of the tpp-2m imfp predictive equation " *Surf Interface Anal*: 35(3): 268-275.

Tavares, J. C., Cornelio, D. A., da Silva, N. B., de Moura, C. E. B., de Queiroz, J. D. F., Sa, J. C., Alves, C., Jr., de Medeiros, S. R. B. (2009). "Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro." (1879-3185 (Electronic)).

Teixeira, H. S., Marin, C., Witek, L., Freitas, A., Jr., Silva, N. R., Lilin, T., Tovar, N., Janal, M. N., Coelho, P. G. (2012). "Assessment of a chair-side argon-based non-thermal plasma treatment on the surface characteristics and integration of dental implants with textured surfaces." *J Mech Behav Biomed Mater*: 9: 45-49.

Tong, Y., Guo, T. W., Wang, J., Liang, H. F., Qian, M. (2011). "Effects of plasma nitriding and TiN coating duplex treatment on wear resistance of commercially pure titanium." *Adv Mater Res*: 217-218: 1050-1055.

Trisi, P., Lazzara, R., Rao, W., Rebaudi, A. (2002). "Bone-implant contact and bone quality: evaluation of expected and actual bone contact on machined and osseotite implant surfaces. ." *Int J Periodontics Restorative Dent*: 22(6): 535–45.

Trisi, P., Todisco, M., Consolo, U., Travaglini, D. (2011). "High versus low implant insertion torque: a histologic, histomorphometric, and biomechanical study in the sheep mandible." (1942-4434 (Electronic)).

Truhlar, R. S., Orenstein, I. H., Morris, H. F., Ochi, S. (1997). "Distribution of bone quality in patients receiving endosseous dental implants." (0278-2391 (Print)).

Tseng, W. Y., Hsu, S. H., Huang, C. H., Tu, Y. C., Tseng, S. C., Chen, H. L., Chen, M. H., Su, W. F., Lin, L. D. (2013). "Low pressure radio-frequency oxygen plasma induced oxidation of titanium--surface characteristics and biological effects." (1932-6203 (Electronic)).

Tuna, T., Wein, M., Swain, M., Fischer, J., Att, W. (2015). "Influence of ultraviolet photofunctionalization on the surface characteristics of zirconia-based dental implant materials." (1879-0097 (Electronic)).

Ueno, T., Ikeda, T., Tsukimura, N., Ishijima, M., Minamikawa, H., Sugita, Y., Yamada, M., Wakabayashi, N., Ogawa, T. (2016). "Novel antioxidant capability of titanium induced by UV light treatment." (1878-5905 (Electronic)).

Ueno, T., Yamada, M., Hori, N., Suzuki, T., Ogawa, T. (2010a). "Effect of ultraviolet photoactivation of titanium on osseointegration in a rat model." (0882-2786 (Print)).

- Ueno, T., Yamada, M., Suzuki, T., Minamikawa, H., Sato, N., Hori, N., Takeuchi, K., Hattori, M., Ogawa, T. (2010b). "Enhancement of bone-titanium integration profile with UV-photofunctionalized titanium in a gap healing model." (1878-5905 (Electronic)).
- Vaquila, I., Vergara, L. I., Passeggi Jr, M. C. G., Vidal, R. A., Ferrón, J. (1999). "Chemical reactions at surfaces: titanium oxidation." *Surface and Coatings Technology*: 122(1): 67-71.
- Vesel, A., Mozetic, M., Drenik, A., Milosevic, S., Krstulovic, N., Balat-Pichelin, M., Poberaj, I., Babic, D. (2006). "Cleaning of porous aluminium titanate by oxygen plasma. ." *Plasma Chem. Plasma Process*: 26(6): 577–584.
- Watanabe, H., Saito, K., Kokubun, K., Sasaki, H., Yoshinari, M. (2012). "Change in surface properties of zirconia and initial attachment of osteoblastlike cells with hydrophilic treatment." (1881-1361 (Electronic)).
- Watzek, G., Blahout, R. (1993). *Historischer Rückblick. Enossale Implantate in der oralen Chirurgie.*
- Weinlaender, M. (1991). "Bone growth around dental implants." (0011-8532 (Print)).
- Wennerberg, A., Albrektsson, T. (2009). "Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review." *Clin Oral Implants Res*: 20 Suppl 4: 172-84.
- Wennerberg, A., Albrektsson, T. (2010). "On implant surfaces: a review of current knowledge and opinions." *Int J Oral Maxillofac Implants*: 25(1): 63-74.
- Wilson-Hench, J. (1987). "Osteoinduction." In: Williams, D. F.: *Progress in biomedical engineering*, Aufl. 4. *Definitions in biomaterials*. Elsevier, Amsterdam: 29.
- Xuereb, M., Camilleri, J., Attard, N. J. (2015). "Systematic review of current dental implant coating materials and novel coating techniques." (0893-2174 (Print)).
- Yoo, D., Tovar, N., Jimbo, R., Marin, C., Anchieta, R. B., Machado, L. S., Montclare, J., Guastaldi, F. P. S., Janal, M. N., Coelho, P. G. (2014). "Increased osseointegration effect of bone morphogenetic protein 2 on dental implants: an in vivo study." (1552-4965 (Electronic)).
- Zhao, G., Schwartz, Z., Wieland, M., Rupp, F., Geis-Gerstorfer, J., Cochran, D. L., Boyan, B. D. (2005). "High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure." (1549-3296 (Print)).
- Zhu, X., Chen, J., Scheideler, L., Reichl, R., Geis-Gerstorfer, J. (2004). "Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses." (0142-9612 (Print)).
- Zinger, O., Anselme, K., Denzer, A., Habersetzer, P., Wieland, M., Jeanfils, J., Hardouin, P., Landolt, D. (2004). "Time-dependent morphology and adhesion of osteoblastic cells on titanium model surfaces featuring scale-resolved topography." *Biomaterials*: 25(14): 2695–711.

## **10. Danksagung**

In tiefster Dankbarkeit meiner Familie und meiner Freundin gewidmet.

Ich bedanke mich für die exzellente wissenschaftliche Betreuung durch Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Ralf Smeets, Dr. med. Dr. med. dent. Anders Henningsen und Dr. med. Dr. med. dent. Clarissa Precht.

Auch bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors unter der Leitung von Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Lan Kluwe für die großartige Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Ein weiterer Dank gilt der RMS Foundation (Dr. Roman Heuberger) für die gute Zusammenarbeit und Dr. rer. nat. Antje Jeschke aus dem Institut für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikums Eppendorf für die Bereitstellung von Zellkulturen.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei der Camlog Foundation (Françoise Peters, Dr. Alex Schär und Dr. Markus Kraft) für die finanzielle Unterstützung dieses Projektes. Ebenfalls gilt mein Dank sowohl der Ushio Inc. als auch der Diener Electronic GmbH für das kostenlose Bereitstellen des UV-Bestrahlungs- als auch des Kaltplasmabestrahlungsgerätes. Einen potentiellen Interessenkonflikt erkläre ich für ausgeschlossen.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Oliver Marcus Heinrich  
Geburtsdatum: 20. November 1991  
Geburtsort: Kiel  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: Deutscher & US-Amerikaner  
Sprachkenntnisse: Deutsch & Englisch: Muttersprache  
Französisch & Latein: gute Schulkenntnisse

### Schulbildung

1996-1999 Grundschule Russee, Kiel  
1999-2010 Humboldt Gymnasium, Kiel

### Studium

2010-2015 Studium der Zahnmedizin am Universitätsklinikum Eppendorf  
18.11.2011 Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
29.04.2013 Zahnärztliche Vorprüfung  
09.12.2015 Zahnärztliche Prüfung  
16.07.2015 Promotion  
-dato

### Beruf

01.07.2016 Assistenz Zahnarzt  
-dato



Hamburg, 21.07.2017, \_\_\_\_\_

Oliver Heinrich

## **12. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.



Hamburg, 21.07.2017, \_\_\_\_\_

Oliver Heinrich