

Abschlussbericht Dialimplant LKO

I. Kurze Darstellung des Vorhabens

Im Rahmen des BMBF-Projektes in Zusammenarbeit mit der Biotronik SE & Co.KG und weiteren Projektpartnern sollte ein kardiovaskuläres Implantat zur Bestimmung des Kaliumgehalts im Blut des Patienten einschließlich einer Telemetrieinheit, die ein kabelloses Monitoring der bestimmten Werte ermöglicht, entwickelt werden. Die Expertise des Lehrstuhls für Korrosion und Oberflächentechnik der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (LKO) – explizit im Bereich der Herstellung und Modifikation von Nanostrukturen auf Metalloxiden und deren Wechselwirkung mit biologischen Systemen ⁻¹⁻³ zielte darauf ab, eine biokompatible Beschichtung des Gehäuses dieses Sensors zu entwickeln, die eine Stenose im Blutgefäß und somit eine gesundheitliche Gefährdung des Patienten ausschließt, sowie eine Membran mit den selben Eigenschaften, die durchlässig für Kalium ist und dessen Diffusion ins Innere des Implantats gewährleistet. Die vor Projektbeginn vereinbarten Arbeitspakete des LKO umfassten insbesondere:

1. Herstellung und Optimierung von Nanoröhrenschichten auf Titangehäusen. Umwandlung dieser in mechanisch stabilere Titanoxycarbid Strukturen.
2. Erzeugung einer Stützstruktur im Titangehäuse. Diese soll die Membran auf der Außenseite stabilisieren und als Widerlager für die aufzunehmenden Quelldrücke der Hydrogele dienen.
3. Zusammenfügen der TiO₂ Nanoröhrenschichten und der profilierten Gehäuse. Durch ein geeignetes Ätzverfahren soll die aufgewachsene Nanoröhrenschicht von der Rückseite her geöffnet werden und somit die angestrebte Nanoröhrenmembran auf dem Sensorfenster entstehen.
4. Herstellung von Nanoröhrenschichten für Projektpartner z.B. für die Evaluation in vivo, in der eine oberflächenanalytische Charakterisierung der Nanoröhrenschichten vor und nach der Implantation (SEM, XPS, elektrochemische Methoden) geplant ist.

Grundlage der Teilnahme des LKO am Forschungsvorhaben ist die jahrelange Erfahrung mit Titan bzw. Titandioxid, welche schon an sich eine ausgesprochen hohe Biokompatibilität aufweisen,^{3,4} wie auch mit der Mikro- und Nanostrukturierung ebendieser. Namentlich sind besonders folgende Vorarbeiten mit Beteiligung des Lehrstuhls zu nennen:

- **Nanosize and Vitality: TiO₂ Nanotube Diameter Directs Cell Fate³**

Versuche mit mesenchymalen Stammzellen zeigten, dass Adhäsion, Ausbreitung, Wachstum und Differenzierung auf Titanoxid-Nanotube-Arrays stark vom Durchmesser der Nanoröhren abhängen. So konnte gezeigt werden, dass Durchmesser von 100 nm und größer zur Apoptose der Zellen führen [siehe Abbildung 1].³ Diesen Effekt ausnutzend könnte eine Beschichtung des Sensors entwickelt werden, die ein Anlagern von im Blutkreislauf auftretenden Zellen und damit eine Stenose verhindert.

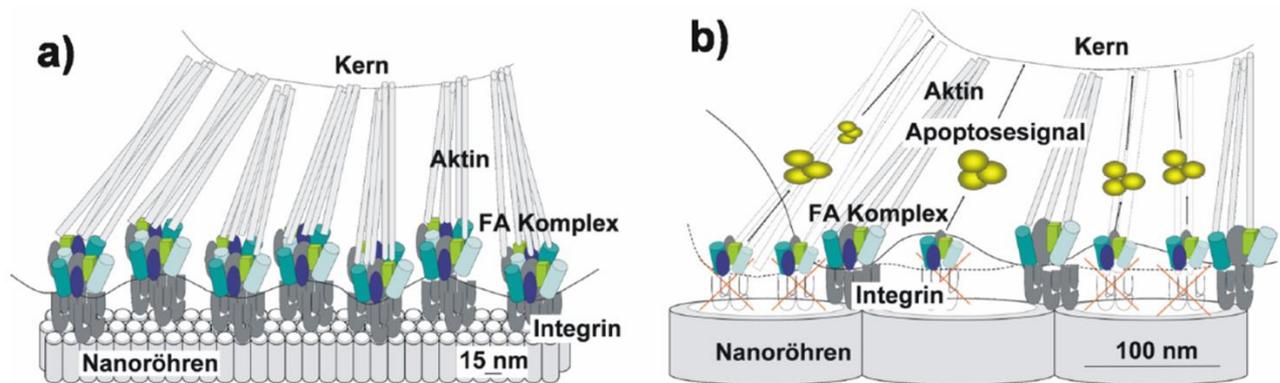


Abbildung 1: Modell für die Aggregation von Integrinen und die Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen. a: Stark angeregte Aggregation von Integrinen auf 15 nm; b: verstärkte Induzierung von Apoptosesignalen auf 100 nm Röhrendurchmessern.³

- **TiO₂ nanotube layers: Flexible and electrically active flow-through membranes⁵**

Am LKO wurden Membranen aus Titanoxid-Nanoröhren entwickelt. Sie bestehen aus quadratischen Feldern (Kantenlänge der Größenordnung 100 µm) aus durchgängigen Nanotube-Verbänden. Sie könnten neben der Stützstruktur Teil des Fensters zwischen Blutkreislauf und Sensorinnerem

sein, das den Kaliumtransport gewährleistet, nicht erwünschte Blutbestandteile jedoch abhalten und Biofouling verhindern soll.

Des Weiteren ergab eine Literaturrecherche des LKO bezüglich Verfahren, Biofouling (insbesondere die Proteinanlagerung) zu verhindern folgende patentgeschützte Technologie:⁶

- **Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) Layers on Metal Oxide Surfaces: Surface-Analytical Characterization and Resistance to Serum and Fibrinogen Adsorption⁷**

“Poly(l-lysine)-g-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) is a member of a family of polycationic PEG-grafted copolymers that have been shown to chemisorb on anionic surfaces, including various metal oxide surfaces, providing a high degree of resistance to protein adsorption. PLL-g-PEG-modified surfaces are attractive for a variety of applications including sensor chips for bioaffinity assays and blood-contacting biomedical devices. The analytical and structural properties of PLL-g-PEG adlayers on niobium oxide (Nb_2O_5), tantalum oxide (Ta_2O_5), and titanium oxide (TiO_2) surfaces were investigated using reflection-absorption infrared spectroscopy (RAIRS), angle-dependent X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS).“

Während der gesamten Projektdauer wurde eng mit den Projektpartnern zusammengearbeitet. Regelmäßig wurden Projekttreffen und Telefonkonferenzen abgehalten und Proben zur Beschichtung bzw. Analyse und zur Implantation in Versuchsschweine ausgetauscht. Die Herstellung von lasergefertigten Stützstrukturen wurde als Unterauftrag an das Fraunhofer IWS in Dresden und das Bayerische Laserzentrum in Erlangen vergeben. Auch hier bestand rege Korrespondenz um die Möglichkeiten und Grenzen der Laserablation an die Anforderungen des Projekts anzupassen.

II. Eingehende Darstellung der Ergebnisse nach Projektjahren

1. Jahr

Im ersten Halbjahr 2011 wurde ein Elektrolytssystem für die Anodisierung basierend auf Ethylenglycol (EG), Wasser und Ammoniumfluorid (NH_4F) entwickelt, welches es ermöglicht, die Durchmesser der Nanoröhren im Bereich von 10 bis 300 nm einzustellen. Variiert wurden hierzu der Wassergehalt des Elektrolyten von 5 bis 55 vol%, der NH_4F -Gehalt von 1 bis 30 g/l, die Anodisierungsdauer von 2 bis 16 h und die Anodisierungsspannung von 0 bis 120 V. Als ideal erwiesen sich zwei Systeme (EG 87 vol% / H_2O 13 vol% / 3g/l NH_4F und EG 85 vol%, H_2O 15 vol% / 5g/l NH_4F), da hier Nanoröhren sowohl auf flachen (2D) als auch auf komplexen Geometrien (3D) homogen aufgewachsen werden können. Durch Änderung von Anodisierungsdauer und -spannung können in diesen Elektrolytssystemen Nanoröhren mit Längen von bis zu 5 μm und Durchmessern von 10 bis 300 nm erzeugt werden. Abbildung 2 zeigt rasterelektronenmikroskopische Aufsichten der so hergestellten Schichten.

In Zelltests wurde das Verhalten in vitro der unterschiedlichen Nanoröhrenschichten mit mesenchymalen Stammzellen untersucht. Hierfür wurden 5000 Zellen pro cm^2 auf die Oberflächen mit Nanoröhren unterschiedlicher Durchmesser aufgebracht und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Zellzahl nach 24 h, 3 Tagen und 6 Tagen bestimmt. Während bei Röhrendurchmessern von 10 bzw. 30 nm die Zellzahl innerhalb der drei Tage in vergleichbarem Maße wie bei einer kompakten Schicht steigt, wächst sie ab einem Durchmesser von 100 nm nicht signifikant an (vgl. Abbildung 2). Dieses Verhalten kann als Apoptose (programmierter Zelltod) interpretiert und potentiell in einer Anti-Biofoulingschicht eingesetzt werden. Diese Ergebnisse zeigen des Weiteren, dass die zellabweisende Eigenschaft von Nanoröhren mit 100 nm Durchmessern auch auf größere Durchmesser übertragbar ist, wie sie für die Anwendung von Nanoröhrenmembranen gefordert werden.

Neben Testsubstraten wurden auch Dummy-Gehäuse bereits erfolgreich mit Nanoröhrenschichten modifiziert. Die Dummy-Gehäuse wurden hierfür von BIOTRONIK geliefert. Es zeigte sich, dass auch auf den 3D – Strukturen, wie sie bei

Dummy-Gehäusen vorliegen, TiO₂ Nanoröhrenschichten sehr homogen erzeugt werden können. Diese Dummy-Gehäuse mit Nanoröhrenschichten wurden für weitere Untersuchungen an Biotronik zurückgesandt.

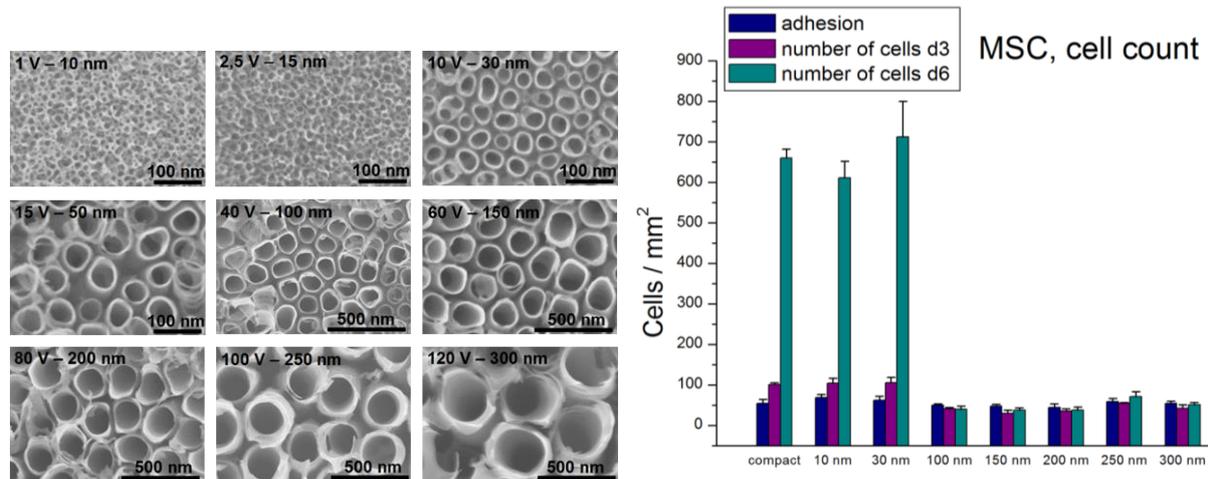


Abbildung 2: Links: Aufsichten der erzeugten Nanoröhrenschichten (hergestellt in Ethylenglycol/H₂O/NH₄F). Rechts: Zellzahl auf Nanoröhrenschichten unterschiedlicher Durchmesser nach 24 Stunden, 3 und 6 Tagen. Ab Durchmessern von 100 nm wird eine Adhäsion von Zellen unterdrückt.

Für eine höhere mechanische Stabilität der Nanoröhrenschichten ist es zweckdienlich, die erzeugten TiO₂ Nanoröhrenstrukturen in Titancarbid (TiC) bzw. Titanoxycarbid umzuwandeln. Dies kann durch einen Hochtemperaturprozess in Acetylenatmosphäre bewerkstelligt werden. Hierzu wurde am LKO eine Ofenanlage mit einstellbarer Gasatmosphäre aufgebaut und Carbonisierungsversuche durchgeführt. Es gelang, sowohl 2D-Testsubstrate als auch 3D-Testkörper welche zuvor mit TiO₂ Nanoröhren beschichtet wurden in TiC umzuwandeln. In Abbildung 3 sind Röntgendiffraktogramme von 2D-Proben dargestellt sowie den Vergleich zweier carbonisierter Teströhrchen.

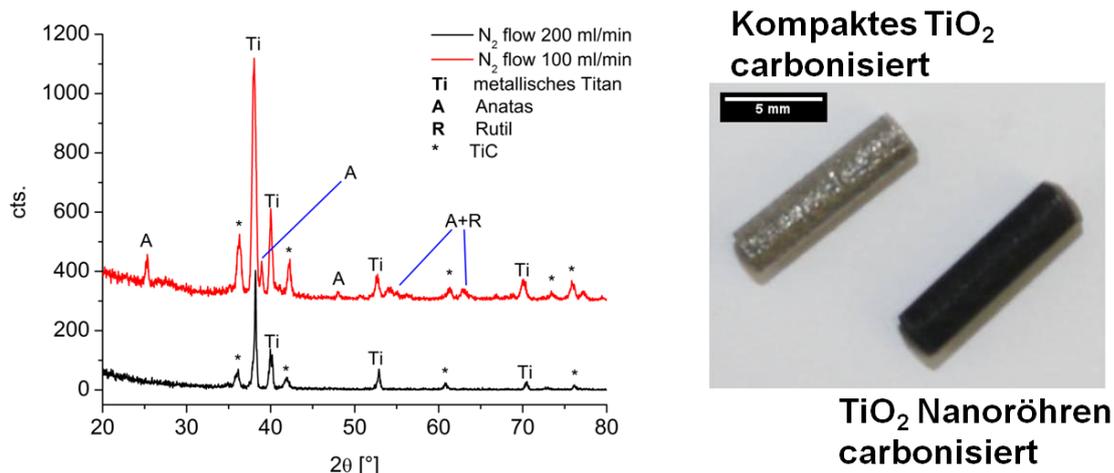


Abbildung 3: Links: Röntgendiffraktogramme carbonisierter Nanoröhrenschichten mit Röhrendurchmessern von 200 nm bei 900 °C für 5 min. Bei vollständiger Carbonisierung verschwinden die Anatas- und Rutilpeaks. Rechts: Makroskopischer Vergleich von carbonisierten kompakten Oxidschichten (metallisch glänzend) und Nanoröhrenschichten (schwarz).

Daraus wird ersichtlich, dass je nach eingestellten Gasflussparametern die Umwandlung des Titanoxids in Titancarbid gesteuert werden kann. In beiden Messungen in Abbildung 3 betrug der Acetylenfluss 50 ml/min. Bei Stickstofffluss von 200 ml/min resultierte eine vollständige Umwandlung des Oxids zu Titancarbid, während bei einem Stickstofffluss von 100 ml/min noch Anatas- und Rutilpeaks des Titanoxids zu sehen sind, was auf eine Mischphase (Titanoxycarbid) hindeutet. Es zeigte sich, dass eine Temperatur von 900 °C mit einer Auslagerzeit von 5 Minuten die besten Umwandlungen zu Carbiden bewirkt. In Abbildung 3 rechts sind zwei carbonisierte Teströhrchen zu sehen. Das mit Nanoröhren versehene Substrat zeigt einen deutlichen Farbumschlag zu schwarz, während die natürliche Oxidschicht der nicht anodisierten Probe zu dünn ist, um die Carbonisierung ersichtlich werden zu lassen (TiC: makroskopisch schwarz).

Zur Erzeugung eines Stützgitters in bzw. auf Titansubstraten wurden verschiedene Techniken evaluiert (z.B. Mikrofräse, μ -EDM und Laserablation), von denen sich nur die Locherzeugung via Laserablation als praktikabel erwies. Erste Vorversuche dazu wurden am Fraunhofer IWS in Dresden durchgeführt; Konzeptionierung und Erzeugung eines Stützgitters wurden in Kooperation mit dem Bayerischen Laserzentrum in Erlangen durchgeführt (jeweils Unteraufträge). Auf Titanfolien der

Dicke 50, 75 und 100 μm wurden Muster von hexagonalen Löchern mit einem Durchmesser von ca. 20 μm und einem Lochmittenabstand von ca. 60 μm generiert. Das gesamte Muster ist kreisförmig und misst 4 mm im Durchmesser (vgl. Abbildung 4 oben links). Die REM-Aufnahmen in Abbildung 4 zeigen, dass zwischen Lasereintritt- und Austrittseite erhebliche Unterschiede bestehen: Prozessbedingt entsteht auf der Eintrittseite des Lasers, um das erzeugte Loch, ein Auswurf thermischen Oxids. Einerseits können darauf keine Nanoröhren erzeugt werden und andererseits limitiert dieser den minimalen Lochabstand, da der Auswurf frischer Löcher die bereits bestehenden Nachbarlöcher blockieren kann. Im Gegensatz dazu zeigt die Laseraustrittseite kleinere Lochdurchmesser und kaum thermisches Oxid auf der Oberfläche. In Zusammenarbeit mit dem IMTEK Freiburg wurde gezeigt, dass Stützgitter mit einem Lochdurchmesser von 20 μm das Hydrogel bei einem Druck von 8 bar zurückhalten können, während es durch Löcher mit einem Durchmesser von 100 μm hindurchgedrückt wird („Hydrogelspaghetti“). Diese Stützgitter wurden für Diffusions- und mechanische Tests also auch für den Aufbau des Hydrogeltestplatzes an die Projektpartner Biotronik Erlangen, Biotronik Berlin und IMTEK Freiburg versandt. In nachfolgenden Schritten (vgl. Abbildung 4 rechts oben) wurde exemplarisch gezeigt, dass auch die Oberflächen dieser Stützgitter mit Nanoröhren (Durchmesser 200 nm) modifiziert und anschließend carbonisiert werden können. Hervorzuheben ist dabei, dass sich bei der Carbonisierung von 900 °C sowohl die Nanoröhren als auch das gesamte Stützgitter formtreu verhalten.

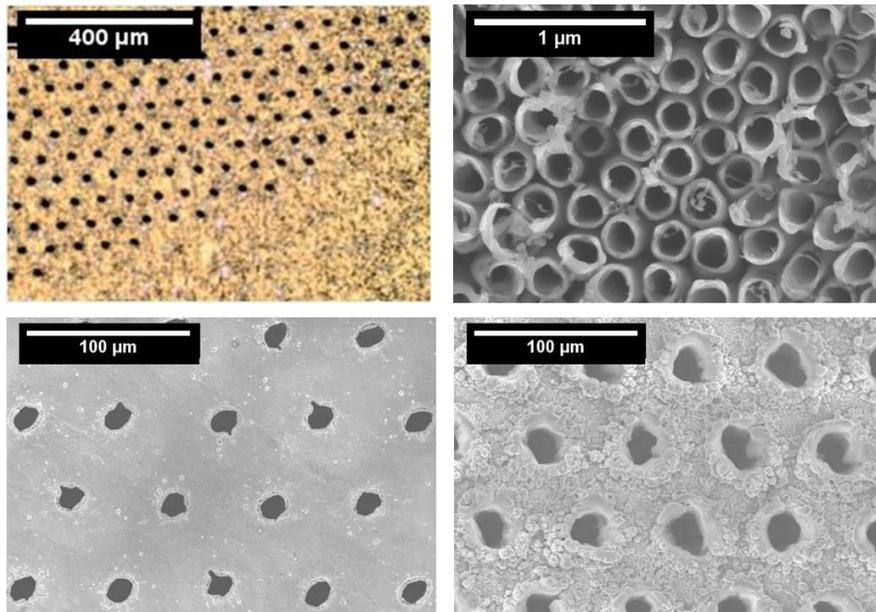


Abbildung 4: Links oben: lichtmikroskopische Aufnahme des Stützgitters (Rand des Musters). Rechts oben: carbonisierte Nanoröhren auf der Laseraustrittseite eines Stützgitters. Links unten: Laseraustrittseite eines Stützgitters. Rechts unten: Lasereintrittseite mit Oxid auswürfen.

Zur Erzeugung einer Membran aus TiO_2 Nanoröhren wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt (vgl. Abbildung 5):

- a) Laserbohrung von Sacklöchern in Titanfolien und Erzeugung von carbonisierten Nanoröhrenschichten auf der Rückseite; nasschemisches Öffnen der Kanäle von Sacklochseite aus. Für diesen Ansatz wurde ein Ätzsystem entwickelt, das es erlaubt, homogen und zeitlich definiert zu ätzen, ebenso wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Nanoröhren quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. Die Nanoröhrenlänge in Abhängigkeit der Anodisierungszeiten zeigt ein beschränktes Wachstum (Grund hierfür ist vor allem das chemische Auflösen der Nanoröhrenspitzen im Elektrolyten). Mit der erarbeiteten Ätzlösung ($\text{HNO}_3/\text{HF}/\text{CH}_3\text{COOH}$) konnte eine lineare Abhängigkeit der Ätztiefe von der Ätzdauer gefunden werden. Der angestrebte Ätzabtrag von ca. $10\ \mu\text{m}$ ist dabei innerhalb von 80 min realisierbar. Diese Dauer scheint für die Herstellung akzeptabel kurz, ist andererseits aber lang genug, um ein homogenes Ergebnis zu gewährleisten. Die Evaluation der Laserlochtiefe steht noch aus (Zusammenarbeit/ Unterauftrag BLZ Erlangen).

- b) Ablösen einer anodisch hergestellten Nanoröhrenschichten vom Substrat und anschließendes Öffnen der Nanoröhrenböden über HF-Dampf. Auf diese Weise konnten erfolgreich Membranen erzeugt werden. Abbildung 5 (links unten) zeigt, dass beinahe alle Röhrenböden geöffnet werden konnten. Diese Membranen sind mechanisch jedoch sehr instabil und bedürfen der Optimierung.
- c) Derselbe Anodisationsprozess, der bei Titan zu Nanoröhren führt, erzeugt auf Aluminium oxidische Nanoporen. Um mechanisch belastbarere Membranen zu erzeugen, wurden erste Versuche unternommen, bei denen eine dünne Aluminiumschicht auf eine 6 µm dünne Titanfolie rückseitig aufgesputtert wird. Wird das Substrat lange genug von der Titanseite her anodisiert, durchdringen die Nanoröhren die Titanfolie vollständig und wachsen als Poren im Aluminium weiter. Indem dieses später nasschemisch abgelöst wird, entsteht eine Membran. Während des gesamten Vorgangs wird eine gitterförmige Fläche des Titansubstrats von Photolack vor der Anodisierung geschützt. Diese Stege bleiben metallisch und sollen mehr Stabilität gewährleisten (sie können anschließend in einem zweiten Schritt anodisiert werden, um auch dort den Effekt der Apoptose zu erzielen). In Abbildung 5 ist ein erster Versuch dokumentiert (rechts unten). Der rechte Bereich der Probe war gänzlich von einem O-Ring bedeckt und wurde deswegen nicht anodisiert. Entsprechend bestehen die Gitterstege aus Photolack, während dazwischen kompaktes Titanoxid liegt. Der Photolack im linken Bildbereich wurde vom Elektrolyten angegriffen und die Quadrate dazwischen wurden anodisiert; sie weisen Nanoröhren auf. Bereiche in denen die Nanoröhrenschicht abgeplatzt ist, bestätigen die darunter liegenden Aluminiumporen.

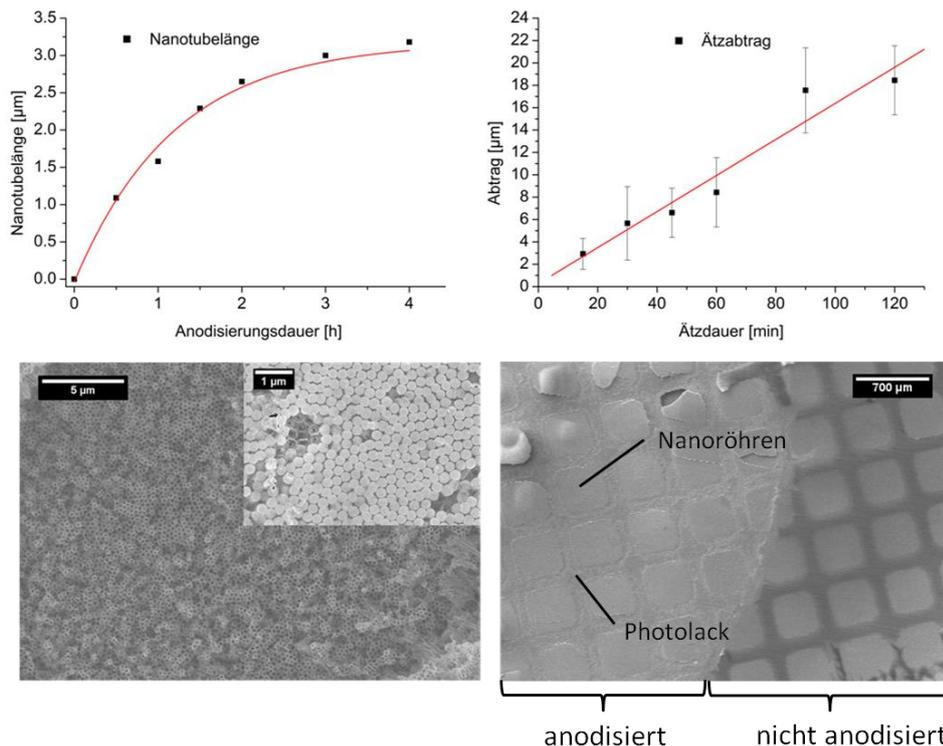


Abbildung 5: Oben: Evaluierung der Prozessparameter für nasschemisches Öffnen der Sacklöcher (Ansatz a). Links unten: noch geschlossene (Inset) und über HF-Dampf geöffnete Nanoröhrenböden (Ansatz b). Rechts unten: Per Photolack geschützte metallische Gitterstruktur und anodisierte Quadrate (Ansatz c).

2. Jahr

Im Jahr 2012 wurden Nanoröhrenschichten auf Proben unterschiedlicher Geometrie aufgebracht um den Projektpartnern für Versuche zur Verfügung gestellt zu werden. Darunter beschichtete Titanbleche mit Kantenlängen von 1,5 cm und 2,5 cm und einer Stärke von 100 µm. Insgesamt wurden 69 Proben dieser Art an BIOTRONIK für Biokompatibilitätstest (Hämolyse etc.) gesendet. Ebenso an BIOTRONIK gingen sechs Proben zur Evaluierung eines geeigneten Sterilisationsverfahrens. Untersucht wurden der Einfluss von Sterilisation mittels Wasserdampf und Ethylenoxid auf die Morphologie der Nanoröhren. Bei beiden Verfahren wurden Proben mit Röhrendurchmessern von 100 nm und 200 nm getestet; zusätzlich wurden carbonisierte Schichten mit Röhrendurchmessern von 200 nm untersucht. Die Begutachtung der Schichten nach der Sterilisation ergab, dass beide Methoden geeignet sind, die Behandlung mit Ethylenoxid jedoch wegen geringerer thermischer

Belastung der Schichten vorzuziehen ist. Für die *in vivo*-Tests der Nanoröhrenschichten wurde ein Verfahren entwickelt, die Implantatoberflächen nur teilweise zu modifizieren, um an den explantierten Prüfkörpern einen direkten Vergleich zwischen beschichtetem und reinem Titan zu sehen. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass Nanoröhrenschicht und Referenz während des Versuches an derselben Stelle im kardiovaskulären System verbleiben und der gleichen Wechselwirkung mit Blutbestandteilen ausgesetzt sind. Hierfür werden die Bereiche der Implantate, die nicht modifiziert werden sollen, mit einem Lack bedeckt, der im für die Anodisierung verwendeten Elektrolyten nicht löslich ist (Turco Form Mask 527 HT). Nach der elektrochemischen Behandlung kann der Lack rückstandsfrei vom Prüfkörper abgezogen werden. Abbildung 6 (links) zeigt einen entsprechend behandelten Körper. 15 Implantatkörper wurden auf diese Weise zur Hälfte mit Nanoröhren des Durchmessers 100 nm beschichtet und für die *in vivo*-Tests an BIOTRONIK versandt. In Abbildung 6 ist auf der rechten Seite außerdem eine Rasterelektronenmikroskopieaufnahme zu sehen, die die erfolgreiche Modifikation der Implantate dokumentiert. Des Weiteren wurde gezeigt, dass es möglich ist, das Sensorgehäuse (hier Hohlzylinder) ausschließlich außen (im Kontakt mit Blut), jedoch nicht im Inneren mit einer Nanoröhrenmodifikation auszustatten. Hierfür wurde eine Presspassung mit hohlen Kunststoffhülsen verwendet, die ein Eindringen des Elektrolyten in das Sensorgehäuse unterbindet. Kontaktiert wurde das Gehäuse über einen Titandraht, der durch eine der Hülsen gefädelt und in Berührung mit dem Metallkörper des Gehäuses gebracht wurde.

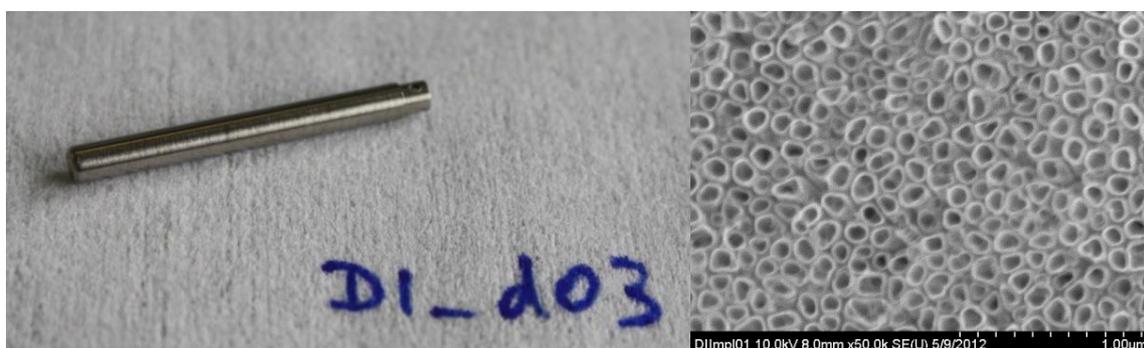


Abbildung 6: Links: zur Hälfte mit Nanoröhren beschichteter Implantatprüfkörper. Rechts: REM-Aufnahme der erzeugten Schicht mit Nanoröhrendurchmessern von 100 nm.

Die *in vitro* Zellkulturtests an Nanoröhrenschichten wurden im Jahr 2012 für carbonisierte Strukturen (höhere mechanische Stabilität) wiederholt. Untersucht

wurden rein oxidische Schichten mit Nanoröhrendurchmessern von 15, 100 und 200 nm als Referenz bzw. carbonisierte Schichten mit 200 nm Durchmessern. Wieder wurden 5000 mesenchymale Stammzellen pro cm^2 auf den Schichten ausgesiedelt und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Zellzahl nach 72 h bestimmt. Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse. Deutlich lässt sich abermals der Unterschied zwischen den Nanoröhren mit Durchmessern von 15 nm und jenen mit Durchmessern ≥ 100 nm sehen: bei 15 nm beträgt die Dichte der Zellen $90/\text{mm}^2$ während sie bei keiner der anderen Schichten $60/\text{mm}^2$ übersteigt.

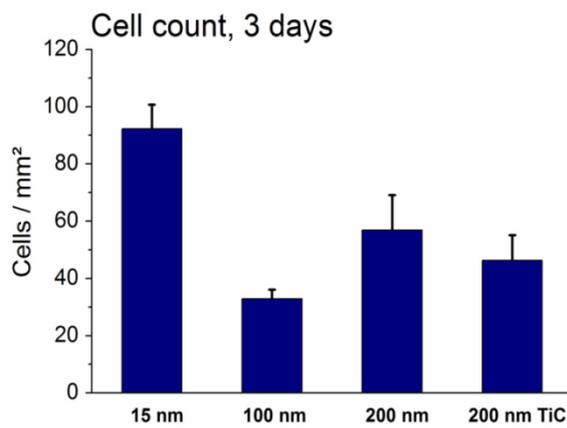


Abbildung 7: Zellkulturtests an Nanoröhrenschichten. Schichten mit Nanoröhrendurchmesser ≥ 100 nm weisen deutlich geringere Zellzahlen auf als die Schichten mit Durchmessern von 15 nm. Der Effekt bleibt auch nach Carbonisierung der Schichten bestehen.

Die Herstellung einer Stützstruktur kombiniert mit einer Nanoröhrenmembran erwies sich als äußerst komplex (siehe Ansatz (a) , Abschnitt 1. Jahr). Kern der Problematik ist vermutlich, dass die gelaserten Sacklöcher keine klar definierte und einheitliche Tiefe sondern eine gewisse Verteilungsbreite bezüglich dieser aufweisen. So ist es nicht möglich, in allen Sacklöchern einen gleichzeitigen Durchbruch der Nanoröhrenschicht zu erzielen.

Erschwert wird das Wachstum der Nanoröhren an den Böden der Sacklöcher abermals durch prozessbedingtes thermisches Oxid. Gemeinsam mit den Projektpartnern wurde sich auf einen modularen Aufbau des Sensors geeinigt. Aus Gründen der Praktikabilität konnte nun der kombinierte Ansatz verworfen und eine getrennte Herstellung von Stützgitter und Nanoröhrenmembran favorisiert werden.

Ansatz (b) behandelte die Realisierung einer Membran, indem eine Nanoröhrenschicht in einer Mischung aus Wasser und Methanol vom Titansubstrat gelöst wurde und die Böden über HF-Dampf geöffnet wurden. Dieses Vorgehen wurde verfeinert, in dem das chemische Öffnen der Membrankanäle durch Ätzen in einem Argon-Plasma ersetzt wurde. Abbildung 8 zeigt eine auf diese Weise geöffnete Membran. Zu erkennen ist, dass die Böden der Nanoröhren sehr homogen und kontrolliert geöffnet werden können. Allerdings bleibt das zuvor beschriebene Problem bestehen, dass diese Membranen aufgrund fehlender Stützstruktur sehr fragil sind, was das Handling erschwert. Carbonisierungsversuche zur Erhöhung der mechanischen Stabilität zeigten, dass diese Membranen die beim Prozess herrschende Temperatur von 900 °C nicht überstehen.

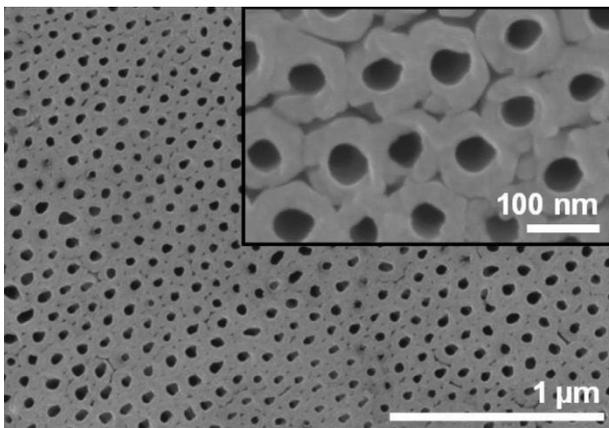


Abbildung 8: Im Wasser-Methanol-Gemisch abgelöste und später mittels Ar-Plasma geöffnete Nanoröhrenschicht.

Auch Ansatz (c), der die selbstorganisierte Entstehung von Poren in Aluminium ausnutzen soll, wurde im Zeitraum 2012 weiter verfolgt. Hierfür wird eine dünne Aluminiumschicht auf die Rückseite des Titansubstrats aufgedampft. Durchdringen die Nanoröhren beim Anodisieren in den nicht photolithographisch geschützten Feldern das Substrat vollständig, wachsen sie als Poren im Aluminium weiter. Nach selektiver nasschemischer Entfernung des Aluminiumoxids bliebe eine von Titanstegen stabilisierte Membran übrig. So hergestellte Membranen sind in Abbildung 9 dokumentiert; jedoch traten im Verlauf der Experimente vereinzelt Probleme im Zusammenhang mit der Aluminiumschicht zutage. Beim Aufdampfen der Schicht und bei Variation der Aushärtetemperatur des Photolacks (wichtiger Parameter für die Stabilität des Lacks im Elektrolyten) entstehen thermische Spannungen, die zu einer

teilweisen Delamination der Aluminiumschicht vom Titansubstrat während der weiteren Prozessierung führen können.

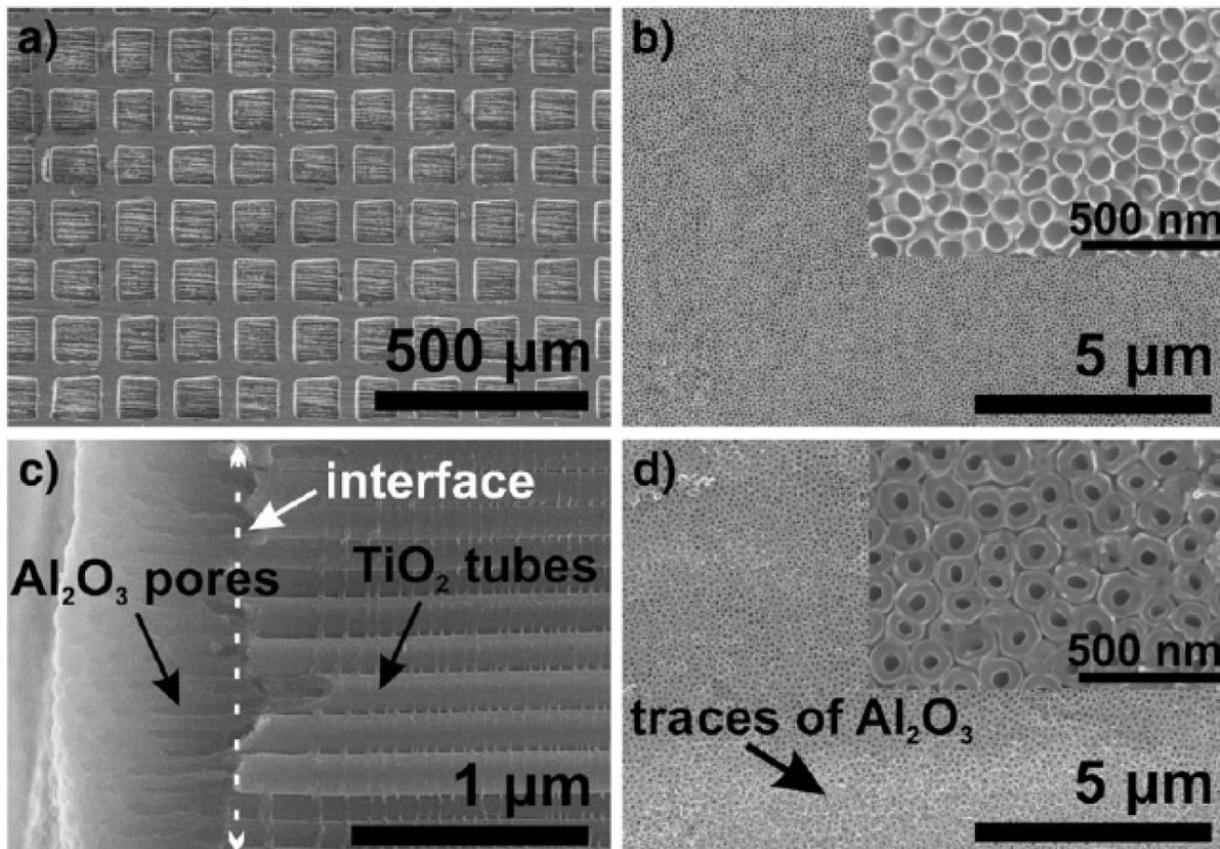


Abbildung 9: a) Photolithographisch erzeugte Gitterstruktur mit Membranfenstern. b) und d) Vorder- bzw. Rückseite eines Membranfensters mit vollständig geöffneten Kanälen. c) Übergang der Nanoröhren in Poren am Übergang vom Titansubstrat in die aufgedampfte Aluminiumschicht.

Um trotzdem reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und weiterhin den Vorteil des photolithographischen Teilschritts auszunutzen (mechanische Stabilität durch metallische Stege) wurde das Konzept modifiziert, was die Erfordernis der Aluminiumschicht gegenstandslos machen soll: Seit August befindet sich ein Hitachi IM4000 Ion Milling System am Lehrstuhl für Korrosion und Oberflächentechnik. Hiermit können Oberflächen mittels eines Argonstrahls sehr definiert poliert werden. Das Titansubstrat (mit photolithographischem Muster) wird anodisiert, bis die es vollständig von Nanoröhren durchzogen ist. Von hinten werden die Röhrenböden dann in einem Polierschritt geöffnet. Abbildung 10 zeigt REM-Aufnahmen einer solchen Membran. Links zu sehen sind die geöffneten Nanoröhren. Varianzen im Innendurchmesser resultieren aus nicht ganz gleichmäßigem Röhrenwachstum,

können jedoch mit steigender Polierdauer verringert werden. Im rechten Bild sind Risse in den Bereichen mit Nanoröhren zu erkennen, die vermutlich aufgrund des Wärmeeintrags beim Polieren entstehen und mit Optimierung der Parameter des Ion Milling Prozesses verhindert werden können.

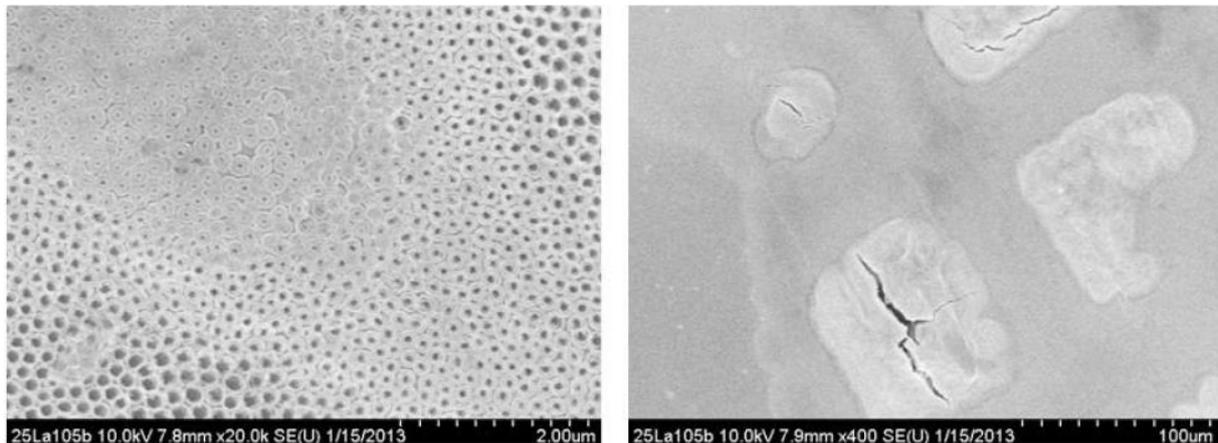


Abbildung 10: Rückseite der Membran nach dem Polieren im Argonstrahl. Die Nanoröhren sind vom Boden her geöffnet, jedoch kommt es zu Rissen in den Membranfenstern, vermutlich aufgrund des Wärmeeintrags beim Argonsputtern (rechts).

Der Fortschritt am LKO im beschriebenen Bearbeitungszeitraum vom 01.01.2012 – 31.12.2012 ist innerhalb der gesetzten Zielerreichung. Es wurden Untersuchungen entsprechend der Antragsstellung des Teilvorhabens durchgeführt und viel versprechende Ergebnisse erhalten.

Die Oberflächenmodifikation von Dummygehäusen mit Nanoröhren wurde verwirklicht und Implantatprüfkörper für *in vivo* Tests an BIOTRONIK versandt. Des Weiteren wurden Versuche zur Sterilisierbarkeit der Nanoröhrenschicht durchgeführt und die Empfehlung für Sterilisierung mittels Ethylenoxid ausgesprochen.

Stützgitter wurden konzipiert und ein Unterauftrag zur Herstellung vergeben; die erzeugten Stützgitter wurden zum Einsatz in den Hydrogeltestplätzen an die Projektpartner geliefert. Außerdem wurde gezeigt, dass die Stützgitter mit Nanoröhren beschichtet werden können.

3. Jahr

Im Verlauf des dritten Jahres der Projektlaufzeit wurde – in ständiger Absprache mit den Projektpartnern – unter anderem an der Optimierung der Stützgitter gearbeitet. Einen großen Teil dieses Themenkomplexes nahm die Entfernung des prozessbedingten thermischen Oxids um die Laserbohrungen auf der Lasereintrittseite ein. Verfahren die hierzu evaluiert wurden waren mechanisches Abschleifen/Polieren der Proben und das nasschemische Ätzen, welches aus Gründen der Prozessierbarkeit den Vorzug erhielt. Abbildung 11 zeigt Bilder der Lasereintrittseite vor und nach dem Ätzen (3,5 min in *in HF:HNO₄:H₂O 1:3:12*).

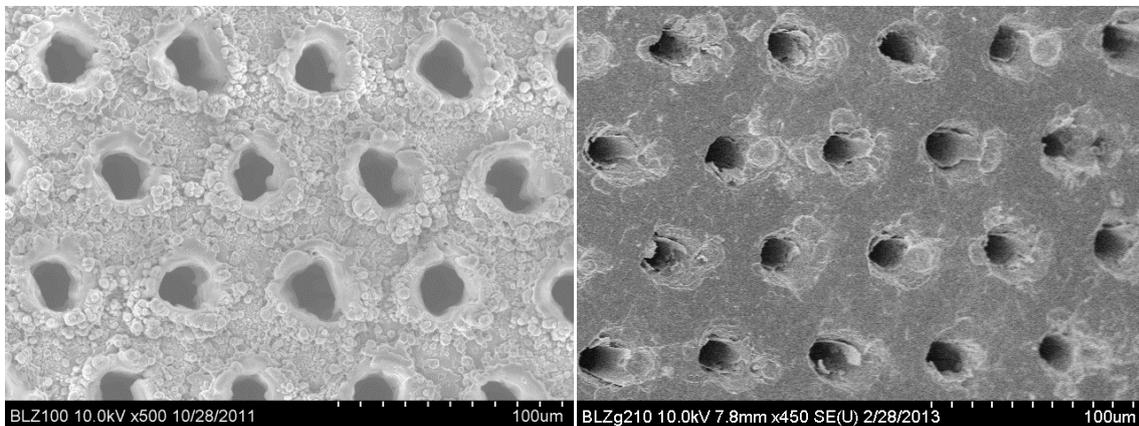


Abbildung 11: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Lasereintrittseite der Stützgitter. Das nasschemische Ätzen ermöglicht die Entfernung des prozessbedingten thermischen Oxids um den Rand der Laserbohrungen.

Die Rücksprache mit den Projektpartnern zeigte, dass die Dichtigkeit der Hydrogeltestplätze einige Herausforderungen barg. Aus diesem Grund wurde die Geometrie der in den Testplätzen verwendeten Gitter an eine vom IMTEK Freiburg hergestellte Aufnahmescheibe angepasst. CAD Zeichnungen der fortan runden Stützgitter mit selbem Lochmuster (Durchmesser der Bohrungen 20 µm, Lochmittenabstand 60 µm) wurden dem BLZ zur Verfügung gestellt und die gelieferten Stützgitter an die entsprechenden Projektpartner verteilt.

Der Ersatz der Nanoröhrenmembran durch die Kombination Stützgitter/Polymermembran bzw. das Sandwichen der Polymermembran (IMTEK)

zwischen einer Nanoröhrenmembran und dem Stützgitter wurde in den Projekttreffen diskutiert.

Die Stabilität, Reproduzierbarkeit und Händelbarkeit von Titandioxidmembranen wurde durch eine Optimierung des Anodisationsprozesses durch Temperaturkontrolle verbessert.⁸ Dazu wurden die Membranen in einem zweistufigen Anodisationsprozess bei konstanten 20°C hergestellt (60V, 3600s; 150V, 5s; 0.135 M NH₄F, 2 vol% H₂O, Ethylenglykol), die zweite Anodisationsstufe dient dem Ablösen der Membran vom Substrat.⁹ Die mit Temperaturregellung erzeugten Membranen zeigen eine deutlich geringere Neigung zum Brechen und deutlich reproduzierbarere Verläufe der Stromdichte während der Herstellung (siehe Abbildung 12).

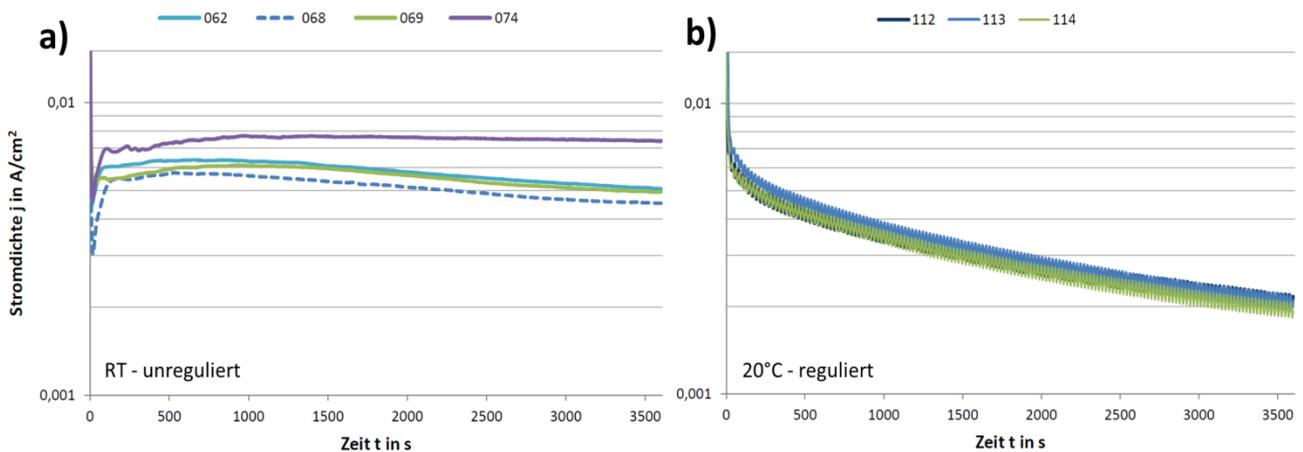


Abbildung 12: Verlauf der Stromdichte mehrere Proben während der Anodisation einer TiO₂-Membranschicht unter identischen Bedingungen. a) unregulierte Temperatur; b) erhöhte Reproduzierbarkeit durch Regulierung der Temperatur auf 20°C.

Im in-vitro Versuch zeigte sich, dass die mit Nanoröhren beschichteten Dummy-Zylinder von Gewebe umschlossen wurden. Es wurde daraus gefolgert, dass die zellabweisende Wirkung der Nanostruktur durch eine Anlagerung von Proteinen teilweise aufgehoben wird.¹⁰ Deshalb wurde im letzten Projektjahr untersucht, wie die Adsorption von Proteinen auf der Titandioxidoberfläche verhindert werden kann. Ausgehend von der patentierten Beschichtung mit PLL-PEG von Textor et al. wurden verschiedene Ansätze zur Minimierung der Proteinadhäsion untersucht.

Abbildung 13 beschreibt die Quantifizierung der Proteinadsorption von Bovinem Serum Albumin (BSA) bzw. Meerrettichperoxidase (HRP) aus einer 0.1 mM Lösung in Phosphatpuffer (24h, 4°C). Abbildung 13 a-f zeigt die charakteristischen

Proteinfragmente^{11,12} der Aminosäuren Asparaginsäure (blau) und Prolin/Valin (grün) aufgenommen mit der Methode Sekundärionen-Flugzeit-Massenspektrometrie (ToF-SIMS), welche eine Nachweisgrenze im Bereich von wenigen ppm aufweist. Zur Modifikation wurden Phosphonische Säuren verwendet, da diese sehr starke und stabile Bindungen mit TiO₂ eingehen.^{13,14} Die Adsorption auf unbehandelten TiO₂-Nanoröhren (a und d, Positivkontrolle) wurde verglichen mit TiO₂-Nanoröhren modifiziert mit selbstangelagerten Monolagen (SAMs) von b) (6-{2-[2-(2-Methoxyethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-hexyl)phosphonischer Säure (EGP, Sikemia) und c) (6-{2-[2-(2-Hydroxyethoxy)-ethoxy]-ethoxy}-hexyl)phosphonischer Säure (EGHP, Sikemia). Des weiteren wurden e) eine hydrophobe SAM Beschichtung (Octadecylphosphonische Säure, ODP, Sigma-Aldrich) und f) PLL-PEG (Susos) als Negativkontrolle untersucht. Die SAMs von EGP und EGHP konnten die Proteinadsorption vergleichbar verhindern wie das patentgeschützte PLL-PEG. Auch eine colorimetrische Nachweisreaktion auf des Protein HRP,¹⁴ welche in Abbildung 13 g dargestellt ist, zeigte dass auf EGP- bzw. EGHP-modifizierten Nanoröhren kaum Protein adsorbierte, während eine Positivkontrolle (AV, 3-Aminopropyltriethoxysilan in Kombination mit Ascorbinsäure; ein gebräuchlicher Proteinkoppler)¹⁴ deutlich HRP nachwies.

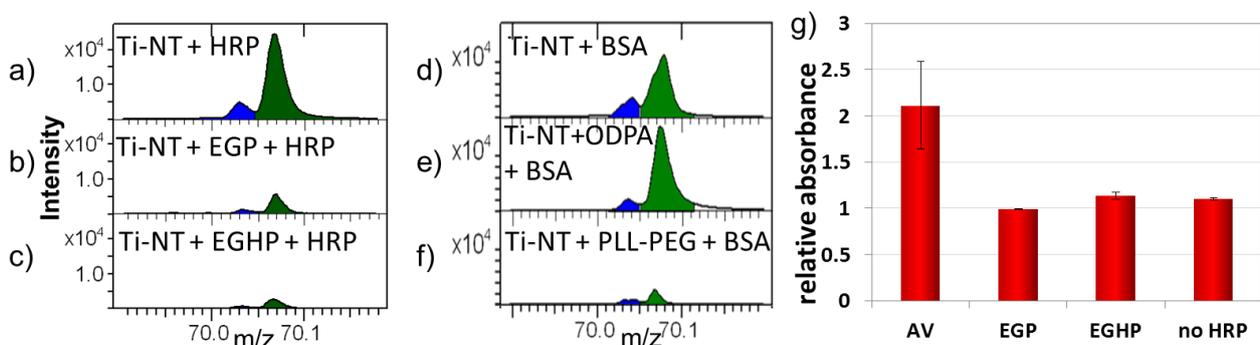


Abbildung 13: a-f) ToF-SIMS Spektren der für Proteine charakteristischen Region Asparaginsäure und Valin-Prolin für unterschiedliche Beschichtungsmethoden. g) colorimetrischer Aktivitätsnachweis von HRP für unterschiedliche Beschichtungsmethoden.

Des weiteren wurden Plasma-modifizierte Siliziumwafer (IMTEK) mittels ToF-SIMS untersucht. Die Fragmentation der Proben Soft_1, MB_I, MB_II und MB_III unterscheidet sich hauptsächlich in der relativen Intensität der C_xH_yO_z- und C_xH_y-Fragmente (vgl. Abbildung 14), welche mit der Zusammensetzung des Plasmas

korreliert. Alle Filme sind homogen dicker als 3nm, da Substratsignale (Si^+ , SiH^+) nur auf der Referenz detektierbar waren.

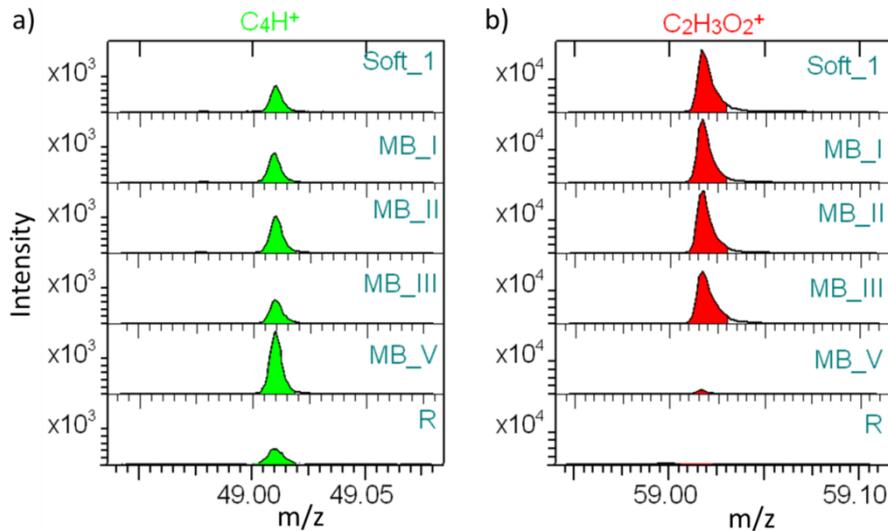


Abbildung 14: ToF-SIMS Spektren Plasma-beschichteter Siliziumwafer (IMTEK) unterschiedlicher Beschichtungsmethoden.

Der Fortschritt am LKO im beschriebenen Bearbeitungszeitraum vom 01.01.2013 – 30.09.2013 ist innerhalb der gesetzten Zielerreichung. Es wurden Untersuchungen entsprechend der Antragsstellung des Teilvorhabens und der Diskussion in den Projekttreffen durchgeführt und viel versprechende Ergebnisse erhalten.

III. Kurzfassung des Schlussberichts

TiO_2 -Nanoröhrenschichten mit Durchmessern von 100 nm – 300 nm wurden im Verlauf des Projektes entwickelt, zu Titancarbid modifiziert und im in-vitro Test untersucht. Alle Durchmesser zeigten eine Apoptose-fördernde Wirkung. Dummy-Gehäuse konnten ebenfalls erfolgreich mit Nanoröhren modifiziert und carbonisiert werden. Im in-vivo Versuch erfolgte Gewebeanlagerung an den mit Nanoröhren modifizierten Dummies, was ursächlich auf Anlagerung von Serumproteinen zurückzuführen ist. Daher wurden verschiedene Methoden zur proteinabweisenden Beschichtung der TiO_2 -Struktur untersucht, phosphonische Säuren mit Oligoethylglykolfunktionalitäten zeigten die vielversprechendsten Ergebnisse. Stützgitter wurden für den Testplatz sowie den Sensoraufbau konzipiert und hergestellt (Durchmesser der Bohrungen 20 μm , Lochmittenabstand 60 μm) und das durch die Laserbohrungen entstandene thermische Oxid konnte durch nasschemisches Ätzen erfolgreich entfernt werden.

Die Herstellung von TiO₂-Nanoröhrenmembranen wurde im Verlauf des Projekts zur Erhöhung der Stabilität optimiert. Dazu wurden mittels Photolack Gitterstege in die Membran integriert und das Wachstum wurde durch Temperaturregelung kontrolliert. Ein Vergleich mehrerer Ansätze zur Herstellung stabiler Nanoröhrenmembranen ergab die Öffnung der Röhrenböden mit einem Ion-Milling System als vielversprechendste Methode.

- [1] P. Roy, S. Berger, P. Schmuki *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 2904.
- [2] R. Hahn, A. Ghicov, J. Salonen, V.-P. Lehto, P. Schmuki *Nanotechnology* **2007**, *18*, 105604.
- [3] S. Bauer, Doktorarbeit „Selbstorganisierte Titandioxid-Nanoröhren als biorelevante Schichten auf titanbasierten Implantatwerkstoffen“ **2009**, LKO, FAU.
- [4] X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, *Mater. Sci. Eng.* **2004**, *R 47*, 49.
- [5] S.P. Albu, A. Ghicov, S. Berger, H. Jha, P. Schmuki *Electrochem. Commun.* **2010**, *12*, 1352.
- [6] J.A. Hubbell, M. Textor, D.L. Elbert, S. Finken, R. Hofer, N.D. Spencer, L. Ruiz-Taylor. **2005**. Multifunctional polymeric surface coatings in analytic and sensor devices. U.S. Patent US 6884628 B2, filed April 28, 2000, and issued April 26, 2005.
- [7] N.-P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D.L. Elbert, J.A. Hubbell, N.D. Spencer *Langmuir* **2001**, *17*, 489.
- [8] J. Josten, Bachelorarbeit „Optimierung von TiO₂- Nanoröhrenmembranen und Evaluation der Proteindiffusion“ **2013**, LKO, FAU.
- [9] Y. Jo, I. Jung, I. Lee, J. Choi, Y. Tak *Electrochemistry Communications* **2010**, *12*, 616.
- [10] J. Park, S. Bauer, A. Pittrof, M.S. Killian, P. Schmuki, K. von der Mark *Small* **2012**, *8*, 98.
- [11] M. Henry, P. Bertrand *Surf. Interf. Anal.* **2009**, *41*, 105.
- [12] D.S. Mantus, B.D. Ratner, B.A. Carlson, J.F. Moulder *Anal.Chem.* **1993**, *65*, 1431.
- [13] R. Helmy, A.Y. Fadeev *Langmuir* **2002**, *18*, 8924.
- [14] M.S. Killian, Doktorarbeit „Organic Modification of TiO₂ and other Metal Oxides with SAMs and Proteins - a Surface Analytical Investigation“ **2013**, LKO, FAU.

Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN -	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Abschlussbericht DialImplant LKO	
4. Autor(en) [Vorname(n), Name(n)] Sebastian Bauer, Andreas Pittroff, Christian Lehmann, Manuela S. Killian, Robert Hahn, Patrik Schmuki	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.10.2013
	6. Veröffentlichungsdatum -
	7. Form der Publikation -
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Lehrstuhl für Korrosion und Oberflächentechnik Martensstr. 7 91058 Erlangen	9. Ber. Nr. Durchführende Institution -
	10. Förderkennzeichen 16SV5463
	11. Seitenzahl 20
12. Fördernde Institution (Name, Adresse) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 14
	14. Tabellen 0
	15. Abbildungen 14
16. Zusätzliche Angaben -	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum) VDI/VDE/IT	
18. Kurzfassung <p>TiO₂-Nanoröhrenschichten mit Durchmessern von 100 nm – 300 nm wurden im Verlauf des Projektes entwickelt, zu Titancarbid modifiziert und im in-vitro Test untersucht. Alle Durchmesser zeigten eine Apoptose-fördernde Wirkung. Dummy-Gehäuse konnten ebenfalls erfolgreich mit Nanoröhren modifiziert und carbonisiert werden. Im in-vivo Versuch erfolgte Gewebeanlagerung an den mit Nanoröhren modifizierten Dummies, was ursächlich auf Anlagerung von Serumproteinen zurückzuführen ist. Daher wurden verschiedene Methoden zur proteinabweisenden Beschichtung der TiO₂-Struktur untersucht, phosphonische Säuren mit Oligoethylenglykolfunktionalitäten zeigten die vielversprechendsten Ergebnisse.</p> <p>Stützgitter wurden für den Testplatz sowie den Sensoraufbau konzipiert und hergestellt (Durchmesser der Bohrungen 20 µm, Lochmittenabstand 60 µm) und das durch die Laserbohrungen entstandene thermische Oxid konnte durch nasschemisches Ätzen erfolgreich entfernt werden.</p> <p>Die Herstellung von TiO₂-Nanoröhrenmembranen wurde im Verlauf des Projekts zur Erhöhung der Stabilität optimiert. Dazu wurden mittels Photolack Gitterstege in die Membran integriert und das Wachstum wurde durch Temperaturregelung kontrolliert. Ein Vergleich mehrerer Ansätze zur Herstellung stabiler Nanoröhrenmembranen ergab die Öffnung der Röhrenböden mit einem Ion-Milling System als vielversprechendste Methode.</p>	
19. Schlagwörter -	
20. Verlag -	21. Preis -

Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN -	2. type of document (e.g. report, publication) final report
3. title Final Report Dialmplant LKO	
4. author(s) (first name(s), family name) Sebastian Bauer, Andreas Pittroff, Christian Lehmann, Manuela S. Killian, Robert Hahn, Patrik Schmuki	5. end of project 30.09.2013
	6. publication date -
	7. form of publication -
8. performing organization(s) (name, address) Lehrstuhl für Korrosion und Oberflächentechnik Martensstr. 7 91058 Erlangen	9. originator's report no. -
	10. reference no. 16SV5463
	11. no. of pages 20
12. sponsoring agency (name, address) Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 14
	14. no. of tables 0
	15. no. of figures 14
16. supplementary notes -	
17. presented at (title, place, date) -	
18. abstract Layers of TiO ₂ nanotubes with diameters ranging from 100 nm – 300nm were successfully produced, transformed into TiC and examined in in-vitro studies within the course of the project. All diameters showed increased apoptosis of adhering cells. Additionally, sensor dummies were modified with nanotubes and carbonized. The in-vivo examination showed tissue growing on the nanotube-covered dummies, which potentially was caused by protein adsorption from serum. Consequently, a variety of methods to render the nanotubes protein resistant was examined, with phosphonic acids containing oligoethyleneglycol functional groups showing the most promising results. Supporting grids were designed and produced (hole diameter 20 µm, pore distance 60 µm) for the testing apparatus as well as the sensor and the thermal oxide caused by the laser drilling could successfully be removed in a wet-chemical etching step. The production of TiO ₂ -nanotube membranes was optimized towards increased stability of the membranes within the project. Therefore, lithographic patterning and control over the anodization temperature were employed. Several approaches for the optimized production of nanotube membranes were compared. The opening of the tube bottoms in an ion milling step proved to be the most promising method .	
19. keywords -	
20. publisher -	21. price -