

**Universität
Rostock**



Traditio et Innovatio

**Polymerbasierte Additive
zur verbesserten Applikation
synthetischer Knochenersatzmaterialien**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von Franziska Zaage aus Rostock,
geb. am 22. September 1987 in Ribnitz-Damgarten

Rostock, 22. November 2017

1. Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Gerber
Institut für Physik
Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Christoph Schick
Institut für Physik
Universität Rostock

3. Gutachter:

PD Dr. Dr. Peer W. Kämmerer
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie - Plastische Operationen
Universitätsmedizin Mainz

Datum der Einreichung: 22. November 2017

Datum der Verteidigung: 22. Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Grundlagen	4
2.1. Knochengewebe	4
2.2. Knochendefekte	5
2.3. Knochenersatzmaterial	6
2.4. Trägermaterial	8
2.5. Biologische Wirksamkeit von SiO ₂ im Knochen	8
2.6. NanoBone [®] Technologie	10
2.6.1. Synthetisches Hydroxylapatit	11
2.6.2. Sol-Gel-System SiO ₂	12
2.6.3. Wirkungsweise und Matrixwechsel	17
2.7. Sterilisation von Medizinprodukten	17
3. Untersuchungsmethoden	19
3.1. Rheologie	19
3.2. Dynamische Differenzkalorimetrie	21
3.3. Tube Inversion Test	21
3.4. Röntgenkleinwinkelstreuung - SAXS	22
3.5. Rasterelektronenmikroskopie	23
3.6. Auflöseverhalten im Medium	23
3.7. Elementaranalyse	24
3.8. Gelpermeationschromatographie	25
3.9. Tierexperimentelle Studien	25
3.9.1. Histologische Evaluierung	29
3.9.2. Histomorphometrie	29
4. Trägermaterial aus Polyvinylpyrrolidon	32
4.1. Polyvinylpyrrolidon	33
4.2. Mechanische Eigenschaften	35
4.2.1. Rheologie	36

4.3. Struktur des Trägermaterial-Granulat-Komposits	41
4.3.1. Auflösverhalten im Medium	42
4.3.2. Rasterelektronenmikroskopie und Elementaranalyse	43
4.4. Tierexperimentelle Studie	44
4.4.1. <i>in vitro</i> Ergebnisse	44
4.4.2. Histologische Evaluierung	44
4.4.3. Histomorphometrie	48
4.5. Matrixwechsel	53
4.6. Zusammenfassung Trägermaterial auf PVP-Basis	56
5. Trägermaterial aus Poloxamer	58
5.1. Poloxamer	59
5.2. Struktur und mechanisch-thermische Eigenschaften	63
5.2.1. Gelpermeationschromatographie	64
5.2.2. Dynamische Differenzkalorimetrie	66
5.2.3. Tube Inversion Test	70
5.2.4. Rheologie	71
5.2.5. Röntgenkleinwinkelstreuung	77
5.2.6. Zusammenfassung der strukturellen und mechanischen Materi- aleigenschaften	82
5.3. Struktur des Trägermaterial-Granulat-Komposits	84
5.3.1. Auflösverhalten im Medium	85
5.3.2. Rasterelektronenmikroskopie und Elementaranalyse	87
5.4. Tierexperimentelle Studie	90
5.4.1. <i>in vitro</i> Ergebnisse	90
5.4.2. Tiermodell A - Ratte	90
5.4.3. Tiermodell B - Poloxamer im Kaninchen	101
5.5. Matrixwechsel	109
5.5.1. Matrixwechsel im Rattenmodell	109
5.5.2. Matrixwechsel im Kaninchenmodell	112
5.6. Zusammenfassung Trägermaterial auf Poloxamer-Basis	114
6. Zusammenfassung und Ausblick	117
A. Anhang	120
Literaturverzeichnis	123

1 Einleitung

Knochendefekte können in den unterschiedlichsten Bereichen des menschlichen Skeletts auftreten, in Folge von Unfällen, entzündungs- oder tumorbedingten Störungen, usw. Sie benötigen je nach Ausmaß und Defektlage eine medizinische Versorgung bei der unter anderem Knochenersatzmaterialien angewendet werden. Insbesondere in der Orthopädie und Unfallchirurgie, aber auch in der Zahnheilkunde bzw. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie werden Knochenersatzmaterialien zum Auffüllen von Defekten verwendet, welche sich aufgrund ihrer Größe nicht von selbst regenerieren können [1]. Diese bestimmte Defektgröße wird auch als kritische Defektgröße (critical size defect) bezeichnet, welche mit Hilfe von verschiedenen Materialien, wie z. B. Autografts, Allografts, Xenografts oder synthetische Knochenersatzmaterialien, gefüllt werden können. Sie alle bringen Vor- und Nachteile mit sich und müssen wesentliche Kriterien für eine erfolgreiche Knochenneubildung erfüllen: Osteoinduktion, Osteokonduktion und Osteogenese [2]. Die Entscheidung, welches Material in den Knochen implantiert wird, hängt zum Teil vom Wunsch des Patienten ab, jedoch auch von der Präferenz des ausführenden Chirurgen.

Autogener Knochen, welcher dem Namen nach vom Patienten selbst stammt, ist derzeit noch der "Goldstandard" aufgrund seiner hervorragenden osteogenen Eigenschaft. Jedoch bringt die Eigenknochenspende auch einige Benachteiligungen mit sich. Neben einem zweiten notwendigen Eingriff am Patienten um die Knochenspende zu erhalten, kann dieser mit Schmerzen oder Einschränkungen der Beweglichkeit einhergehen [3–5]. Ebenfalls kann es sein, dass die Menge an verfügbarem Knochen nicht ausreicht, um den Defekt zu füllen. Auch die Resorption des eigenen Knochenmaterials bzw. dessen Remodeling in neuen stabilen und gesunden Knochen kann ungleichmäßig von statten gehen. Allografts und Xenografts, also Spenderknochen eines fremden Individuums gleicher bzw. anderer Gattung sind aufgrund von Immunreaktionen nur begrenzt einsetzbar und können im ungünstigsten Fall zu Infektionen und Abstoßungsreaktionen führen.

Synthetische Knochenersatzmaterialien stellen eine sichere Alternative dar, jedoch müssen sie speziell die strukturellen, physikalischen und biologischen Eigenschaften des jeweiligen Knochenlagers imitieren können. Biokompatibilität und Biodegradabili-

tät sind ebenfalls zu erfüllende Voraussetzungen für eine funktionelle Defektheilung, ohne größere Nebenwirkungen hervorzurufen [2, 4].

Die Entwicklung von synthetischen Knochenersatzmaterialien ist daher ein besonders interessanter und umfangreicher Forschungsschwerpunkt in der Knochenregeneration.

Calcium-Phosphat (CaP) Komponenten sind umfangreich studierte Materialien aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit zu den anorganischen Komponenten des Knochens. Die am häufigsten studierten CaPs sind Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphate (α -TCP und β -TCP). CaP Knochenersatzmaterialien sind häufig in Form von Granulaten erhältlich, welche in den Defekt appliziert werden können und durch osteokonduktive Eigenschaften zu Knochenwachstum führen [6]. Die Osteoinduktivität und auch die Resorbierbarkeit der Materialien ist dabei von ihrer Zusammensetzung und ihrer Struktur abhängig.

Wie bereits oben erwähnt, hängt die Wahl des verwendeten Knochenersatzmaterials auch vom Chirurgen ab. Um die Vorzüge eines synthetischen Materials zu verbessern, kann eine optimierte Handhabbarkeit einen großen Beitrag leisten. Die Granulate der synthetischen Knochenersatzmaterialien sind häufig schwer zu händeln, da das lose Material nur schwer an den Defekt anpassbar ist und bei starken Blutungen sogar herausgepült werden kann. Ein modellierbares Trägermaterial, welches adhäsive und kohäsive Eigenschaften (Klebrigkeit) besitzt, um die Granulatkörner aneinander zu binden, könnte die Anwendung erleichtern. Dabei muss das Trägermaterial selbst biokompatibel sein und eine ausreichend hohe Löslichkeit aufweisen, um die Wirkung oder die Resorption des Granulates nicht einzuschränken. Polymere, aber auch Nanopartikeln können z. B. in Form von Hydrogelen die Grundlage für solch ein Trägermaterial bilden [7–12].

In dieser Arbeit wird die Wechselwirkung von Silica-Nanopartikeln mit Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Poloxamer untersucht, um ein modulierbares Trägermaterial zu entwickeln, welches das etablierte NanoBone (NB) Granulat S39 in ein direkt applizierbares Produkt verwandelt. Die Anforderungen an dieses Produkt waren neben der verbesserten Handhabbarkeit auch die bleibende Biokompatibilität und eine mindestens gleich gute physiologische Wirkung. Die Wirkungsweise des NB Granulat S39 zeichnet sich durch den Austausch der SiO_2 -Matrix mit einer körpereigenen organischen Matrix innerhalb weniger Tage aus (Matrixwechsel). Dieses resultiert in eine schnelle Knochenneubildung *in vivo* [13–15]. Als eine weitere Anforderung soll die Sterilisierbarkeit des Produktes mittels Gammabestrahlung ermöglicht werden. Die Klebrigkeit und die damit einhergehenden mechanischen und strukturellen Eigenschaften des Trägermaterials kann durch verschiedene Parameter variiert werden. Die

Konzentration des ausgewählten Polymers oder der Silicapartikel, die Strahlungsdosis und das Volumenverhältnis von Trägermaterial zu Knochenersatzmaterial sind entscheidend für eine erfolgreiche Anwendung.

Die Arbeit ist in zwei Teile untergliedert, die sich nach dem verwendeten Polymer richten. Bei dem ersten Polymer PVP handelt es sich um ein Molekül, welches als pharmazeutischer Hilfsstoff in der Industrie bekannt ist [16]. Es zeichnet sich durch seine quervernetzenden Eigenschaften aus, die durch die Gammabestrahlung erzeugt werden können [17]. Dadurch können weniger oder stärker vernetzte Gele entstehen, die z. B. den zeitlichen Zerfall von Produkten und die Freisetzung von Wirkstoffen beeinflussen können [7]. In Kombination mit SiO₂ Nanopartikeln können diese Netzwerke weiter in ihren mechanischen Eigenschaften reguliert werden, ebenso gleicht das SiO₂ einem Drug Delivery System, um den oben erwähnten Matrixwechsel anzuregen. Neben mechanischen Tests zur Belastbarkeit des Trägermaterials wurden daher auch Löslichkeitsversuche durchgeführt, um die Stabilität des Systems zu überprüfen. Weitere strukturelle Untersuchungen fanden mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie statt. Nach dem die ausgewählten Materialien erfolgreich *in vitro* auf ihre Biokompatibilität untersucht wurden, konnten sie in ein Tiermodell implantiert werden, um die vollständige physiologische Wirksamkeit des Produktes beurteilen zu können.

Im zweiten Teil bildet das Polymer Poloxamer die Grundlage für die Entwicklung des Trägermaterials. Dieses nichtionische Triblock-Copolymer zeichnet sich durch einen Sol-Gel-Übergang bei Temperatur- oder Konzentrationserhöhung aus. Aufgrund seiner gelbildenden Eigenschaft wird es in vielen pharmazeutischen Produkten angewandt [16]. Inwieweit die Gelbildung durch die zusätzlichen Silicapartikel beeinflusst wird und wie sich die mechanischen und strukturellen Eigenschaften durch verschiedene Zusammensetzungen verändern, ist Gegenstand dieser Arbeit und wurde mit unterschiedlichen mechanischen Tests, Löslichkeitsversuchen, REM und Röntgenkleinwinkelstreuung untersucht. Wie im ersten Abschnitt wurde nach erfolgreichem Biokompatibilitätstest *in vitro* auch dessen Funktion und Wirksamkeit *in vivo* geprüft. Durch die verschiedenen Materialkombinationen sollte letzten Endes ein Trägermaterial entwickelt werden, welches alle bereits genannten Anforderungen erfüllt und zur Marktreife gebracht werden kann.

2 Grundlagen

2.1. Knochengewebe

Etwa 206 Knochen besitzt das ausgewachsene menschliche Skelett [18]. Sie bilden einen Teil des Bewegungs- und Stützapparates und schützen zugleich die inneren Organe [19]. Knochen sind gut durchblutete, lebendige Organe und dienen als größter Kalziumspeicher des Körpers [20]. Ebenso werden im Knochenmark primär die roten Blutkörperchen, die Blutplättchen und die weißen Blutkörperchen gebildet [21]. Knochen ist ein Verbundgewebe, welches verschiedene organische und anorganische Bestandteile enthält, die eine extrazelluläre Matrix bilden. In dieser Matrix sind Knochenzellen, die Osteozyten, eingelagert, sie entstehen aus den Osteoblasten. Beide Zelltypen sind am Knochenumbau, dem so genannten Remodelling Prozess, beteiligt. Die Osteoblasten sind dabei die knochenbildenden Zellen, sie regulieren die Mineralisierung und auch die Aktivität der Osteoklasten. Die Osteoklasten bilden den Gegenpart zu ihnen und sind für die Resorption des Knochengewebes verantwortlich. Die aktiven Osteoklasten sitzen auf dem Knochengewebe und bilden Resorptionslakunen, in denen durch freigesetzten Wasserstoff und Chlorid-Ionen der pH Wert an dieser Stelle auf 4,5 herabgesetzt wird und die Calciumverbindung auflöst.

Das Osteoid, also die organische Matrix, besteht zu 90-95 % aus Kollagen Typ I und weiteren Proteinen wie Osteonectin, Osteocalcin, Proteoglykane und knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP), u.w.. Sie ist für die Biege- und Zugbelastbarkeit des Knochens verantwortlich. Die Zugbelastbarkeit von organischem Knochengewebe wird auf ca. 10 kg/mm² abgeschätzt [22]. Die Mineralisierung der Knochenmatrix ist anorganisch und macht in etwa 70 % des Knochen-Trockengewichtes aus. Der Hauptbestandteil davon ist Hydroxylapatit (HA) mit einem Karbonatgehalt von 4-6 %. Diese Form des HAs ist leichter löslich als kristallin reines HA [23]. Neben dem Calcium und Phosphat können im Knochen auch andere Minerale gespeichert werden, wie z. B. Magnesium, Natrium, Kalium, Silicium, Chlor, Fluor, andere Spurenelemente, aber auch körperfremde Substanzen wie z. B. Schwermetalle [20]. Der mineralische anorganische Bestandteil des Knochens ist für dessen Druckstabilität verantwortlich. In der Abbildung 2.1 (a) sind die Zug- und Drucktrajektoren des oberen Femurs einge-

zeichnet [24], ausgerichtet an dieser Kraftbeanspruchung ergeben sich die daneben abgebildeten Spongiosastrukturen (b) im Femurhals und Femurkopf [25].

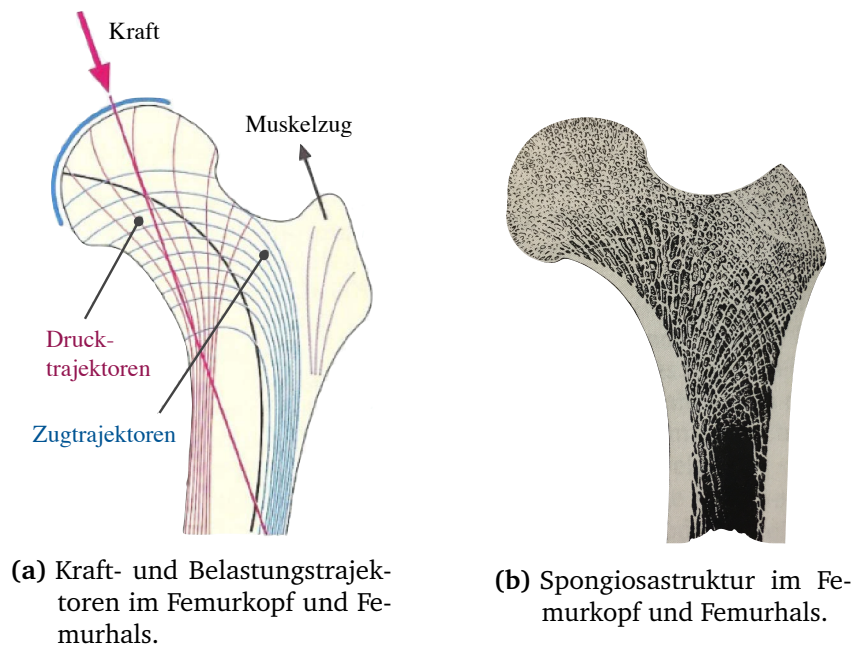


Abbildung 2.1.: Die spongiöse Struktur passt sich der Funktionalität des jeweiligen Knochens an und wird anhand der auf ihn einwirkenden Zug- und Druckkräfte gebildet. ((a) aus [24] (b) aus [25])

2.2. Knochendefekte

Schäden oder Defekte in der Knochenstruktur können durch eine Disbalance zwischen Auf- und Abbau des Knochengewebes entstehen. Diese Störung kann zum einen genetisch bedingte Ursachen haben, aber auch Entzündungsreaktionen, toxische Substanzen oder gar Tumore können dieses Gleichgewicht durcheinander bringen [26]. Als Folge können Substanzverlust oder überschüssiges Gewebe auftreten, oder die Bildung von minderwertigem Knochengewebe, womit ein Funktionsverlust der Knochen einhergehen kann [27]. Natürlich zählen auch Frakturen oder andere Traumata zu den Knochendefekten, welche jedoch häufig eine äußere Kraft als Ursache haben (ausgenommen Ermüdungsbrüche). Neben den Ursachen der Knochendefekte klassifiziert man diese auch in lasttragende und nicht lasttragende Defekte. Bei den lasttragenden Knochendefekten werden ganze Knochen durch Endoprothesen oder Knochensegmente durch Tissue Engineering Produkte ersetzt, die die volle Funktion übernehmen sollen. Knochenersatzmaterial, wie es in dieser Arbeit verwendet wird, dient als Füllmaterial und strukturelle Stütze des Knochengewebes, jedoch sind diese Implantate nicht direkt für die Verwendung bei lasttragenden Anwendungen indiziert.

In Kombination mit anderen osteosynthetischen Systemen, bei Revisionen finden sie ihre Anwendung. Als allein stehendes Produkt werden sie beispielsweise zum Aufbau des Kieferknochens für Zahnimplantate verwendet.

2.3. Knochenersatzmaterial

Knochendefekte können ab einer kritischen Größe, welche auch von der Lokalisation des Defektes abhängt, nicht mehr eigenständig heilen und stellen ein wichtiges klinisches Problem dar [28]. Um solche Defekte wieder zu schließen, können sie mit Knochenersatzmaterialien aufgefüllt werden. Knochenersatzmaterialien sind mit ungefähr 3.5 Millionen Implantationen weltweit pro Jahr das zweithäufigste implantierte Gewebe nach Blut [29]. Sie finden Verwendung in der Orthopädie, Neurochirurgie und Zahnmedizin, um Knochendefekte zu füllen und zu reparieren. Das Einbringen von Knochenersatzmaterial ist notwendig, um die natürliche Knochenheilung anzuregen. Die wesentlichen Elemente der Knochenregeneration sind die Osteogenese, Osteoinduktion und Osteokonduktion und führt letztendlich zum Zusammenschluss von umliegenden Knochen und transplantiertem Material, der so genannten Osteointegration. Als Implantatmaterial kommen verschiedene Produkte unterschiedlichen Ursprungs in Frage, Ziel aller angewandten Materialien zur Unterstützung der Knochenregeneration ist die *”Restitutio ad integrum”* [23]. Man unterscheidet die Knochenersatzmaterialien im wesentlichen zwischen autogenem Knochen, allogenem Knochen, xenogenem Knochen oder alloplastischem Material.

Autograft Der Goldstandard ist bisweilen die autologe Knochenaugmentation, denn Eigenknochen ist ein sicheres Knochenaufbaumaterial, da keine Abstoßungsreaktionen des Körpers zu erwarten sind. Je nach Defektgröße kommen für einen Knochenaufbau mit Eigenknochen Transplantate aus der Hüfte, dem Kinn oder aus dem Unter- oder Oberkieferkamm in Frage. Der so eingesetzte neue Knochen liefert eine stabile Struktur und regt die Knochenneubildung und die Osteointegration an. Nachteilig ist jedoch, dass ein zusätzlicher Eingriff gemacht werden muss, bzw. ein zweiter Defekt entsteht, welcher unter anderem auch zu Komplikationen oder Schmerzen führen kann [30].

Allograft Eine schmerzfreie Alternative zum körpereigenem Knochen bietet der Fremdknochen. Das allogene Material steht als frisches, frisch gefrorenes, gefriergetrocknetes oder entmineralisiert-gefriergetrocknetes Knochenimplantat zur Verfügung und wird für Sterilitätszwecke zuvor bestrahlt. Der Spenderknochen muss hierfür bestimmte Kriterien erfüllen, die zum Empfänger passen, ähnlich wie bei anderen

Transplantationen. So kann ein zweiter Eingriff am Patienten vermieden werden, eine Immunreaktion auf den Fremdknochen ist jedoch nicht auszuschließen.

Xenograft Xenogene Knochenersatzmaterialien stammen aus tierischem Gewebe und haben eine identische Zusammensetzung und Morphologie wie humaner Knochen. Häufig vertreten sind Xenografts aus Rinderknochen, aufgrund der einfachen Beschaffungsmöglichkeit und den geringen Kosten [31], ein bekanntes xenogenes Biomaterial ist BioOss[®] (Geistlich Biomaterials, Wolhuser, Schweiz). Viele Patienten und auch Chirurgen wollen aufwendige Operationen zur Gewinnung von Eigenknochen vermeiden und verwenden daher häufig xenogene Knochenersatzmaterialien. Aber insbesondere bei BioOss[®] hat sich herausgestellt, dass zwar der Knochenaufbau angeregt wird, jedoch nicht der Abbau des implantierten Biomaterials. Der Verbleib des Biomaterials im Defekt ist zwar nicht besonders vom Nachteil, kann jedoch z. B. für spätere Dentalimplantate hinderlich sein.

Alloplasts Alloplastische Materialien sind synthetische Knochenersatzmaterialien, welche z. B. aus Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit und Silicium oder aus deren Kombination bestehen. Der große Vorteil dieser Materialien ist, dass kein fremdes oder tierisches Material in den Defekt gebracht werden muss. Die synthetischen Materialien bilden ein Gerüst für das Wachstum von eigenem Knochen entlang ihrer vorgegebenen Struktur. Neben ihrer Biokompatibilität zeigen sie nur sehr geringe Fremdkörperreaktionen, selten Entzündungsreaktionen und werden gut vom Organismus resorbiert. Dabei erfüllen sie wichtige Eigenschaften wie die Osteointegration und Osteokonduktion. Das in der Arbeit verwendete NanoBone[®] (NB) ist ein vollsynthetisches Biomaterial aus Hydroxylapatit-Nanokristallen (HAnC), welche von einer porösen Kieselgelmatrix (SiO₂-Gelmatrix) ummantelt sind. Hydroxylapatit (HA) und SiO₂ stehen hier in einem Verhältnis von 61:39 (wt.%) [32, 33]. Die Technologie hinter dem NB Produkt, sowie dessen Wirkungsweise und Anwendung wird noch im Folgenden beschrieben.

An dieser Stelle soll noch auf ein weiteres alloplastisches Knochenersatzmaterial eingegangen werden, welches in Form einer applizierbaren Paste auf dem Markt erwerblich ist. Bei dem synthetische Biomaterial Actifuse Mikrogranulat (Baxter International Inc., Deerfield, IL, USA) handelt es sich um ein gesintertes Biomaterial aus synthetischem, silicatsubstituiertem HA, mit einem Massenverhältnis von 992:8 HA:SiO₂ und einer Porosität von 80 %. Die Actifuse Putty ist eine Weiterentwicklung, bei der das Mikrogranulat in ein Trägermaterial auf Polymerbasis eingehüllt ist, welches nach Herstellerangaben aus 25 - 30 wt.% Poloxamer besteht. Die Actifuse Putty bietet daher als kommerziell erhältliches Produkt eine hervorragende Vergleichsgruppe für diese Arbeit.

2.4. Trägermaterial

Insbesondere synthetische Knochenersatzmaterialien in Form von Granulaten sind schwer zu handhaben, was den Verbleib im Defekt und die Anpassung an ihn anbelangt. Die Entwicklung eines modelierbaren Trägermaterials kann dazu beitragen, die Handlingeigenschaften von diesen Knochenersatzmaterialien zu optimieren und ein ready-to-use Produkt zu etablieren. Als Trägermaterialien eignen sich Hydrogele, die zum Beispiel durch die Vernetzung von biokompatiblen Polymeren in wässriger Lösung eine Art Klebrigkeit erzeugen [34] und somit die kleinen Granulatkörner zusammenhalten können. Der Grad der Vernetzung kann dann über die Polymerkonzentration oder durch physikalische Vernetzung mit Strahlungsquellen gesteuert werden. Als Strahlungsquelle eignet sich UV-Strahlung, Gammastrahlung oder auch Elektronenstrahlung [35–37]. Die beiden Polymere PVP und Poloxamer bilden eine geeignete Grundlage als Trägermaterial, da sie Biokompatibel und gut löslich in Wasser sind [34, 36, 38]. Die Polymere können zusätzlich mit einem SiO_2 -Sol gemischt werden, um ihre mechanischen und biologischen Eigenschaften zu modifizieren. In Verbindung mit den SiO_2 -Nanopartikeln entstehen Polymer-Nanokomposite, bei denen die Polymerketten eine starke Wechselwirkung mit den Nanopartikeln eingehen. Wie bei Sargsyan et al. (2007) beschrieben, tritt ein verändertes mechanisches und thermisches Verhalten einzelner Polymerketten an der Oberfläche und in der Nähe von SiO_2 Partikeln auf [39, 40]. Ebenso kann die Aggregation der Nanopartikel durch die Bindung der Polymerketten eingeschränkt werden [41–43]. Die Polymer-Nanokomposite aus PVP bzw. Poloxamer mit SiO_2 sollen in dieser Arbeit genauer untersucht und deren Eigenschaften beschrieben werden.

2.5. Biologische Wirksamkeit von SiO_2 im Knochen

Silicium (Si) ist das 14. Element im Periodensystem und gehört zur Kohlenstoffgruppe (4. Hauptgruppe). Silicium ist ein Halbmetall und besitzt daher Eigenschaften von Metallen und auch von Nichtmetallen. Das elementare Silicium ist nicht toxisch und in gebundener Form als Silicat sogar sehr wichtig für den menschlichen Organismus. Die wasserlöslichen Formen von Si werden aus der Nahrung zum Teil im Darm absorbiert oder über die Nieren ausgeschieden, etwa 4-8 h nach der Nahrungsaufnahme [44]. Eine abnormale Anlagerung von großen Siliciummengen in gesunden Menschen oder Tieren konnte nicht beobachtet werden. Die orale Toxizität von elementarem Si oder organischem Si ist nicht bekannt. Aguilar et. al (2009) zeigten, dass keinerlei Auffälligkeiten bei erhöhter Si-Zufuhr in Mäusen und Ratten auftraten, selbst wenn die tägliche Dosis um das 1000x überschritten wurde [45]. Eine erhöhte Si-Konzentration im Serum konnte bisher nur bei Dialyse-Patienten nachgewiesen werden. Bei Ih-

nen tritt eine erhöhte Einlagerung von Si auf, da die eingeschränkte Nierenfunktion die Ausscheidung des überflüssigen Siliciums verhindert [46, 47]. Durchschnittlich speichert der menschliche Körper etwa 20 mg/kg Körpergewicht an Si, diese Menge nimmt jedoch mit ansteigendem Alter ab. Silicium scheint für die Knochenbildung und -reifung essentiell notwendig zu sein.

In den 70er Jahren zeigte die Wissenschaftlerin Edith M. Carlisle, dass Si eine wichtige Rolle in der Mineralisierung von Knochen spielt [48]. Mit Hilfe einer Elektronenstrahlmikronalyse konnte sie den Si-Gehalt in jungen Mäusen und Ratten messen und nachweisen, dass insbesondere bei jungen Tieren eine 25x höhere Si-Konzentration im Osteoid vorliegt im Vergleich zum umliegenden Gewebe. Diese nimmt jedoch mit zunehmender Calcium-Konzentration im erwachsenen Knochen wieder ab. Ebenso zeigt sie, dass die Mineralisierungsrate des Knochens durch Si-Zugabe beschleunigt werden kann.

1981 gelang es Carlisle zu zeigen, dass Si einen direkten Effekt auf die Kollagenbildung hat und so die Knochenmatrix besser kalzifiziert werden kann. Dazu wurden Hühner in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, die einen erhielten eine Diät mit wenig Silicium und die anderen eine Si-reiche Diät. Die Tiere wurden über 4 Wochen beobachtet und anschließend ihre Schädelplatten genauer untersucht. Abgesehen davon, dass die Hühner mit zusätzlicher Si-Substitution ein deutlich vitaleres Erscheinungsbild hatten, so waren auch ihre Schädelknochen besser kalzifiziert [49]. Das Silicium für die Skelettentwicklung von Bedeutung ist, konnte auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden [50, 51].

Silicium bindet an Glykosaminoglykanen, nimmt Einfluss auf die Vernetzung von Kollagen und Proteoglykanen [49, 52, 53], und kann in allen Geweben und Organen nachgewiesen werden. Die höchsten Konzentrationen von Si lassen sich jedoch in Knochen, Haut, Haaren, Arterien und Nägeln nachweisen [44]. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass Si die Kollagen Typ I Synthese stimuliert und die Differenzierung von Osteoblasten anregt. Price et al. (2013) beschreibt die Zusammenhänge zwischen den Halbleitereigenschaften von Silicium, insbesondere von dessen piezoresistiven Effekt und den piezoelektrischen Eigenschaften der Kollagenmatrix des unausgewachsenen Skeletts unter Belastung [54, 55]. Silicium könnte also eine Rolle im elektrochemischen Prozess der Mineralisierung spielen, welcher aber noch nicht genau verstanden ist. Viele verschiedene Studien zeigten, dass das Frakturrisiko durch Si-Nahrungsergänzung signifikant gemindert werden konnte [56–64]. In einem Versuch mit Rennpferden wurden drei verschiedene Futtermittlervarianten getestet, bei der zum einen der Silicium-Gehalt gering gehalten wurde, eine weitere Gruppe bekam eine mittlere Si-Gabe und die dritte Gruppe erhielt eine erhöhte Si-Gabe. Die Pferde mit mittlerer und erhöhter Silicium Zufuhr zeigten später signifikant bessere Rennergebnisse und weniger Lahm-

heiten oder Frakturen. Bei der Analyse der Knochendichte im Röhrrbein zeigten die Pferde mit der höchsten Si-Zufuhr die besten Ergebnisse [61]. Abschließend ist noch zu berichten, dass auch bei postmenopausalen Tieren eine angeregte Knochenbildung, eine erhöhte Knochendichte und eine geringere Ca-Ausscheidung durch eine Silicium-Substitution festgestellt werden konnte [64]. Dieser Zusammenhang wäre besonders für Osteoporosepatienten von großer Bedeutung und könnte dem fortschreitenden Knochenschwund entgegenwirken.

Der positive Effekt der Si-Zugabe in der Knochenregeneration ist daher auch für implantierbare Knochenersatzmaterialien von großem Interesse. Durch lokal platziertes Silicium konnten bereits verschiedene Arbeitsgruppen eine erhöhte Knochenneubildung und eine verbesserte Osteoinduktion in Knochendefekten nachweisen [65–67]. Man geht davon aus, dass durch Si eine elektronegative Oberfläche im Defekt geschaffen wird, welches zur Knochenbildung anregt. Ebenso könnte das Silicium bei der Resorption des Knochenersatzmaterials frei gesetzt werden und dadurch direkt die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten anregen.

2.6. NanoBone[®] Technologie

Die NanoBone[®] (NB) Produkte basieren auf einem synthetischen Hydroxylapatit, welcher in einer porösen Silicagematrix eingebettet ist. Diese Komposition unterstützt die optimale Wirkungsweise, da sie in ihrer Mikro- und Nanostruktur der extrazellulären Knochenmatrix nachempfunden ist. NB Produkte finden im klinischen Umfeld ein breites Anwendungsgebiet und sind als drei Varianten in der Orthopädie, Dental- und Traumachirurgie im Einsatz. Die Grundlage bildet das NB Granulat, welches in patienteneigenem Blut getränkt wird, um zum einen die Poren des mikriporösen Granulates zu füllen und zum anderen um bereits erste Proteine auf die synthetische Oberfläche zu bringen. Das Gemisch besitzt eine pastöse Konsistenz und kann leicht in den Körper implantiert werden. Alternativ dazu gibt es eine direkt applizierbare Paste, die NanoBone[®] Putty. Hier ist das Granulat bereits in einem Trägermaterial, basierend auf einem Hydrogel mit Polyvinylpyrrolidone (PVP) und SiO₂, gebunden. Dieses ready-to-use Produkt kann direkt in den Defekt eingebracht werden und muss vorher nicht mit Patientenblut getränkt werden. Als dritte Applikationsform existiert der NanoBone[®] Block, ein stabiler Formkörper, welcher ebenso an die Gegebenheiten des Defektes angepasst werden kann. Auch dieser sollte zuvor mit Patientenblut getränkt werden, aus den gleichen oben genannten Gründen.

In der vorliegenden Arbeit werden nur das NB Granulat und die Putty betrachtet. Um die Notwendigkeit der Weiterentwicklung der Produkte zu begründen, muss man noch mal die beiden metabolischen Systeme betrachten, die hinter den Produkten stehen. Bei dem NB Granulat wäre dieser einfach zu beschreiben. Durch die Anlagerung der

Proteine aus dem Patientenblut am Granulat (oder Block) wird die Zellaktivität am Biomaterial angeregt. Jedoch bringt dieser Prozess auch Fehlerquellen mit sich. Der Koagulationsprozess dauert im Vergleich zu der straff organisierten Behandlungszeit zu lange. Wird jedoch nicht sorgfältig und ausreichend lange getränkt, besteht die Möglichkeit, dass weiterhin Lufteinschlüsse bestehen bleiben. Diese können dann Entzündungsreaktionen im Gewebe hervorrufen. Wird andererseits zu lange abgewartet, kann sich ein Fibrinnetzwerk um das Biomaterial herum bilden, welches dann ebenfalls Probleme nach der Implantation im Defekt hervorrufen kann. Das Fibrinnetzwerk muss zuerst, ähnlich wie ein Hämatom, abgebaut werden, bevor die eigentliche Interaktion mit dem Biomaterial beginnen kann. Die Vaskularisierung des Defektbereiches ist schlechter und der Prozess der Defektheilung wird stark verzögert. Durch die NB Putty soll diesen Fehlerquellen vorgebeugt werden. Hier übernehmen die SiO₂-Nanopartikel im Trägermaterial die Aufgaben der Proteine und regen die Zellaktivität am Biomaterial an. Dieser Effekt ist natürlich nicht so stark ausgeprägt wie bei körpereigenem Blut, jedoch hat das SiO₂ eine positive Wirkung auf die Knochenheilung, wie es bereits in Kapitel 2.5. beschrieben wurde. Ein weiterer Vorteil des Trägermaterials ist auch eine lockerere Packung des Granulates im Defekt. Damit kann eine verbesserte Vaskularisierung erreicht werden und ebenfalls muss weniger kompaktes Biomaterial abgebaut werden. Der Austausch des synthetischen Biomaterials in körpereigenes, organisches Material wird auch als Matrixwechsel bezeichnet und soll am Ende des Kapitels noch einmal genauer beschrieben werden. Zuvor wird auf die grundlegende Struktur des nanokristallinen HAs und der hochporösen Silicamatrix eingegangen. Neben der Silicamatrix des Granulates soll auch auf das SiO₂ des Trägermaterial eingegangen werden und wie sich die verschiedenen SiO₂-Sol-Gel-Systeme verhalten.

2.6.1. Synthetisches Hydroxylapatit

Eine weitere Komponente des hier beschriebenen Knochenersatzmaterials ist ein nanokristallines, synthetisches Hydroxylapatit (nCHA, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), welches über eine nasschemische Fällungsreaktion hergestellt wird. Calciumchlorid (CaCl₂) und Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) werden in wässriger Lösung bei einem molaren Verhältnis von Ca/P = 1,67 zur Fällung gebracht, wobei der pH Wert mittels Ammoniumhydroxid auf 7,8 eingestellt wird. Dieser Prozess läuft bei Raumtemperatur unter Normaldruckbedingungen ab und führt zu einer nichtstöchiometrischen Fällung, so dass einige Phosphatgruppen durch Hydrogenphosphat substituiert werden und ein calciumdefizitäres HA entsteht, welches anschließend dreifach mit vollständig entionisiertem Wasser gespült wird, um die Restionen Na⁺, Cl⁻ und NH₄⁻ zu entfernen. Das genaue Verfahren zur Herstellung und die Reaktionsparameter wurden im Rahmen der

Dissertation von Weber (2013) entwickelt und beschrieben [68]. HA Kristalle weisen eine vielfältige Morphologie auf, welche stark von den Syntheseparametern (Temperatur, pH, Druck) abhängt. Die nach Weber entwickelten HA-Nanokristalle weisen eine knochenmineralähnliche Morphologie auf. Die Abbildung 2.2 zeigt eine transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des ncHA (a) und dessen Röntgenbeugungsbild (b) im Vergleich zu humanem Knochen.

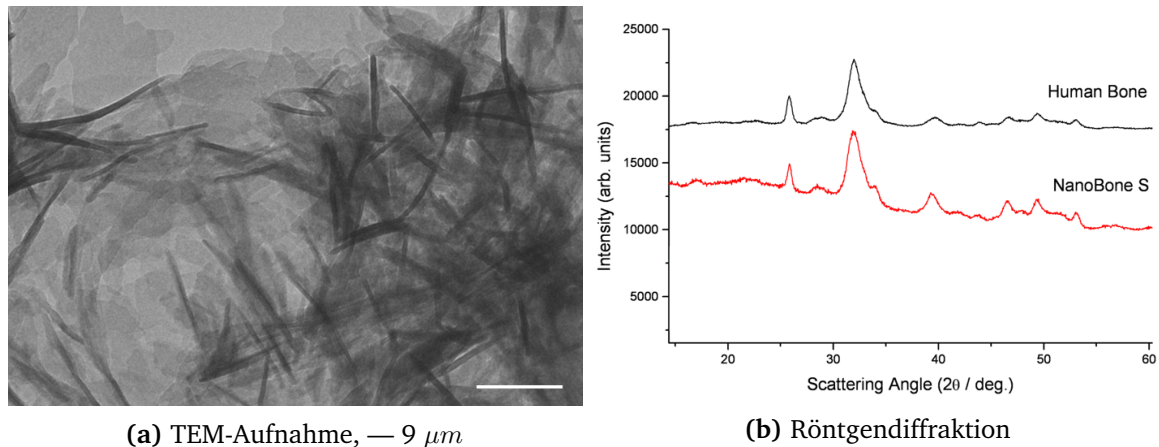


Abbildung 2.2.: (a) HA-Nanokristalle im Transmissionselektronenmikroskop und (b) Röntgendiffraktometrie des synthetischen Materials (rote Kurve) im Vergleich zu humanen Knochen (schwarze Kurve), aus [68].

Im transmissionselektronenmikroskopischen Bild wird die nadelförmige Struktur der HA-Nanokristalle deutlich (Abbildung 2.2 (a)), ebenso ist hier ihre Dimension erkennbar. Die durchschnittliche Dicke der HA-Plättchen beträgt etwa 4 nm. Ebenso lässt sich auf dem transmissionselektronenmikroskopischen Bild eine Silica-Hydrogelhülle um das kompakte Granulat erkennen, welche sich als heller Mantel darstellt. Dieses synthetisch entwickelte ncHA zeigte bei den röntgendiffraktometrischen Untersuchungen identische Peaks wie die des humanen Knochens (Abbildung 2.2 (b)). Die Morphologie der NB-Kristalle entspricht demnach biologischen Hydroxylapatit.

2.6.2. Sol-Gel-System SiO_2

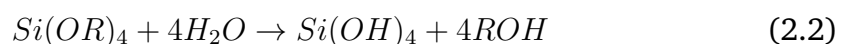
Die Sol-Gel-Technologie ist ein Bottom-Up-Verfahren zur Herstellung nanostrukturierter Materialien, bei denen die Strukturen durch chemische Prozesse aufgebaut werden und den physikalisch-chemischen Grundsätzen der molekularen und atomaren Selbstorganisation unterliegt. Ausgangsmaterialien sind Metalle oder Halbmetalle, die von einem Anhang umgeben sind und in einem Lösungsmittel gelöst vorliegen. Diese Anhänge können durch eine katalysierte Hydrolysereaktion abgetrennt werden. Die daraus entstehenden Dispersionen enthalten Partikel, welche durch Kondensation weiter miteinander reagieren und Primärpartikel des Ausgangsmaterials bilden. Diese Primärpartikel sind als kolloidales Sol unter bestimmten Bedingungen stabil und

zwischen 1 und 1000 nm groß. In dieser Größenordnung unterliegen die Teilchen der Brownschen Molekularbewegung und kurzreichweitigen Wechselwirkungen wie van-der-Waals- oder Coulombkräfte, bedingt durch ihre Oberflächenladungen [69]. Die Primärpartikel können zu fraktalen Clustern aggregieren und unter gewissen Reaktionsbedingungen (Temperatur, Druck, pH - Wert) eine dichte Packung oder ein Netzwerk und Gele bilden. In Abhängigkeit von dem Herstellungsverfahren (Lösungsmittel, Trocknung, usw.) können Hydrogele bzw. Xerogele oder Aerogele entstehen. Im weiteren werden SiO_2 -Sol-Gel-Systeme beschrieben, die durch hydrolytische Verfahren aus Tetraethylorthosilikat (TEOS) oder aus Natriumwasserglas gewonnen werden (Abbildung 2.3). Die beiden so entstehenden Kieselsole finden ebenfalls zwei verschiedene Anwendungen im NB System. Die TEOS Kieselsole stellen die Silicamatrix dar, in der das synthetische HA eingebettet wird und so das Granulat bilden. Das aus dem Natriumwasserglas gewonnene Kieselisol bildet eine Grundlage für das Trägermaterial der NB Putty.



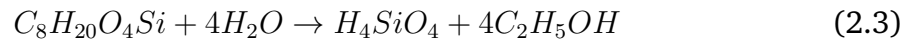
Abbildung 2.3.: Solgewinnung

Tetraethylorthosilikat (TEOS) SiO_2 -Sole können mittels Alkoxid als Precursor über eine Hydrolysereaktion gewonnen werden. Allgemein wird in wässriger Lösung ein Ligand R vom Silicium-Alkoxid abgetrennt und durch ein Hydroxyl-Ion ersetzt (Gl. 2.1).



Dieser Prozess kann mit entsprechender Wassermenge, Lösungsmittel und Katalysator (sauer oder basisch) bis zu vier mal ablaufen (Gl. 2.2) und im Fall von TEOS alle Ligandengruppen OR durch OH-Gruppen ersetzen. Das TEOS Molekül besteht aus einem Si-Atom mit vier Ethylgruppen als Liganden und läuft nach folgender

Hydrolysereaktion ab:



Unter Abspaltung von Ethanol findet die vollständige Hydrolyse statt, so dass 4 OH-Gruppen am Si-Atom binden. Nach der Hydrolyse entstehen $Si(OH)_4$ - Tetraeder, die unter Abspaltung von Wasser oder Ethanol Siloxanverbindungen bilden und kondensieren (Gleichungen 2.4 und 2.5). Weitere hydrolysierte Moleküle können an bereits kondensierte Moleküle anbinden und verschiedene Strukturen bilden.



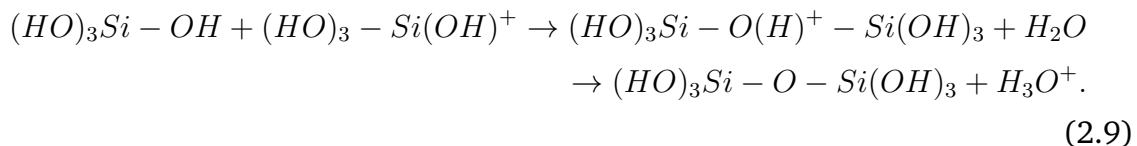
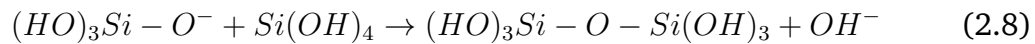
Natriumwasserglas Die Gewinnung von einem Kieselsol (SiO_2 -Sol) ohne Alkylreste erfolgt einfach durch Ionenaustausch von Natriumwasserglas. Natriumwasserglas ($Na_2O(SiO_2)_x \cdot xH_2O$, mit $x=1,2,3,4$) ist in Wasser gelöstes Natriumsilikat und besteht aus SiO_2 Polyedern, deren Kondensation durch die gebundenen Natriumionen an den ungesättigten Sauerstoffatomen verhindert wird. Natriumwasserglas hat durch die Alkalisalze ($Si-ONa$) die Eigenschaft, in wässriger Lösung alkalisch zu reagieren. Die Umwandlung des Alkalisalzes in eine Silanolgruppe ($Si-ONa$ wird zu $Si-OH$) geschieht mit Hilfe eines Ionenaustauschers. Gelöste Ionen können durch Ionen gleicher Ladung ersetzt werden, d. h., stärker bindende Ionen ersetzen schwächer bindende Ionen im Ionenaustauschermaterial. Die Aktivierung des Ionenaustauschers kann beispielsweise mit verdünnter Salzsäure durchgeführt werden, sodass dieser mit Protonen beladen ist. Durch den Kontakt des Natriumwasserglas mit dem Kationenaustauscher, werden die Natriumionen gegen die Protonen nach folgender Reaktionsgleichung ausgetauscht:



Da die Silanolgruppen sehr reaktiv sind, unterliegt die Kieselsäure bei sauren oder basischen Bedingungen einer exothermen, intermolekularen Kondensationsreaktion mit Wasserabspaltung:



Jede Si-OH Gruppe neigt dazu, eine Si-O-Si Bindung zu bilden. Der Aufbau dieser Siloxanverbindungen führt zur konsequenten Vergrößerung des Moleküls. Bei pH-Wert > 2 wird die Wasserabspaltung durch Deprotonierung (Gl. 2.8) und bei $\text{pH} < 2$ durch Protonierung (Gl. 2.9) katalytisch eingeleitet:



Neben Ringbildung und Kettenverzweigung der Monomere führen drei- und vierbindige Si-Einheiten zur Vernetzung der Ketten, diese ungeordnete Kondensationsreaktion resultiert in kugelförmige, amorphe Polykieselsäuren.

Sol-Gel-Übergang Wie bereits beschrieben, findet während der Hydrolyse eine Kondensation der Monomere statt. Die Lösung bleibt bei 25°C über einen längeren Zeitraum stabil, so lange die Konzentration der Monomere kleiner als 100 ppm ist. Mit zunehmender Konzentration bilden sich Dimere und größere Moleküle, welche letztendlich vernetzen können. Nach Iler (1979) läuft die Gelbildung in 3 Stufen ab [70]

- 1) Partikelbildung: Polymerisation von Monomeren und Dimeren
- 2) Partikelwachstum
- 3) Vernetzung der Partikel zu Ketten und Netzwerken

Das Partikelwachstum ist wie die Hydrolyse vom pH-Wert abhängig (Abbildung 2.3), nach Iler ist das Partikelwachstum in drei pH - Bereiche unterteilt: $< \text{pH} 2$, $\text{pH} 2-7$ und $> \text{pH} 7$. Der pH Wert 2 stellt dabei eine Grenze dar, da hier der isoelektrische Punkt (IEP) von SiO_2 ist, d. h. die Oberflächenladung ist in der Summe gleich Null. Unterhalb des IEP ist die Kondensationsrate proportional zur H^+ Konzentration. Im pH-Bereich zwischen 2 und 7 sind zunehmend negative Ladungen (O^-) an der Oberfläche und die Kondensationsrate ist proportional zur OH^- Konzentration. Ab einem pH Wert von 7 wird eine weitere Grenze erreicht. Hier sind die Ladungen so groß, dass es zu Coulombabstoßung der Partikel kommt. Im basischen Bereich findet dementsprechend keine Gelbildung, sondern nur noch Partikelwachstum statt, mit gleichzeitiger

Abnahme der Partikelanzahl (Ostwald-Reifung). Die Aggregation zu Netzwerken und Gelen ist dem sauren Bereich vorbehalten. Die größte zeitliche Stabilität der SiO_2 -Sole ist im pH-Bereich von 1,5 bis 3, die schnellste Gelbildung läuft zwischen pH 4 bis 6 ab.

SiO_2 -Gele sind weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernt. An diesen Sauerstoffatomen können sich teilweise offene Bindungen, OH-Gruppen oder Alkyl-Gruppen, je nach Herstellung und pH Wert, befinden. Durch weitere Temperaturbehandlungen können SiO_2 -Gele in Gläser oder Kristalle überführt werden. Als kristalline oder glasartige Form ist es fast vollständig vernetzt und nur gering in Wasser löslich. Die Aufnahme von SiO_2 im Körper ist dann nur erschwert möglich. Die vorliegende Struktur des SiO_2 nimmt einen großen Einfluss auf dessen physiologische Wirksamkeit. Das schwach verknüpfte Netzwerk eines SiO_2 Gels kann besser resorbiert werden. Wie bereits bei Iler (1979) beschrieben, liegt deren Löslichkeit im Wasser, bei 25°C und pH 2 bis 8, im Bereich von 100 ppm bis 150 ppm.

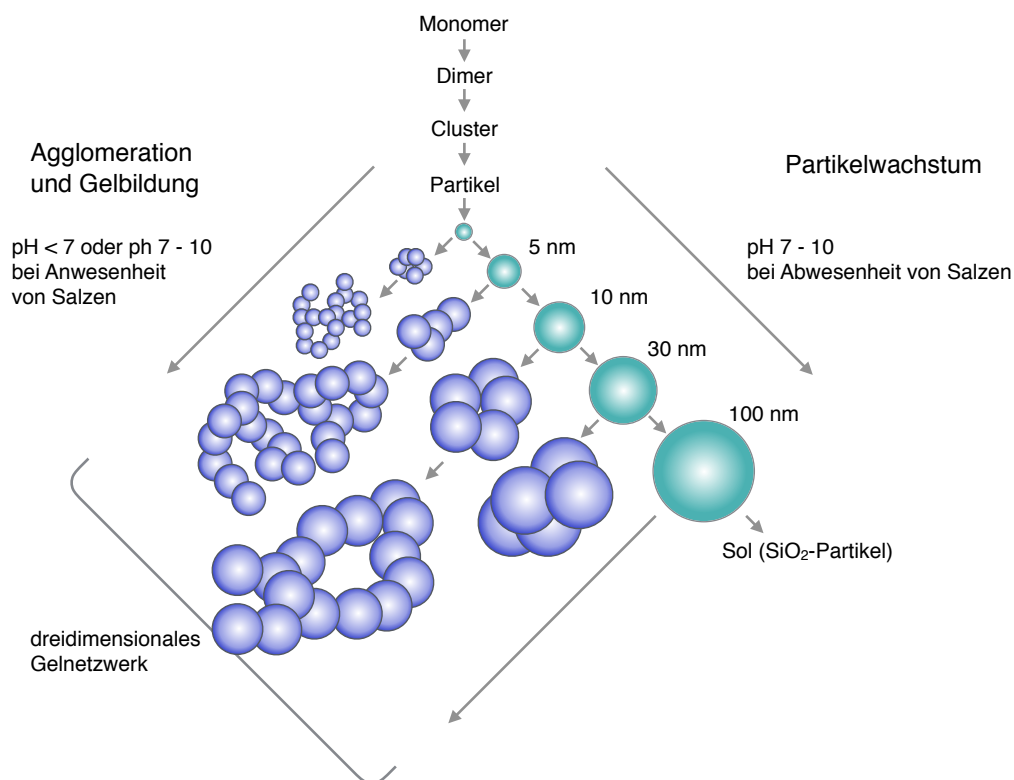


Abbildung 2.4.: Partikelbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert (nach Brinker (1990) [69]).

2.6.3. Wirkungsweise und Matrixwechsel

Wie im Abschnitt zuvor beschrieben, liegt NB nach der Herstellung in Form von Granulat vor. Die große innere Oberfläche des Granulates (ca. $206,8 \text{ m}^2/\text{g}$) bildet die Grundlage für den Schlüsselmechanismus - dem Matrixwechsel, bei dem die Kieselgelmatrix durch eine organische Matrix ersetzt wird. Dabei binden autologe Proteine aus dem Blut an die Nanoporen des Granulates und bedecken die gesamte Oberfläche. Durch die poröse Struktur wird der Defektbereich schnell vaskularisiert, was auch durch den Matrixwechsel begünstigt wird, wobei wichtige Proteine der Osteogenese (u.a. BMP, Osteocalcin, Osteopontin) an diesem Prozess beteiligt sind ([13, 71]). Wie beim natürlichen Remodelling-Prozess wird nun, anstatt Knochen, das synthetische Hydroxylapatit von Osteoklasten abgebaut. Parallel findet ein Aufbau von neuem natürlichen Knochen durch Osteoblasten statt.

Der Matrixwechsel als gesamter Mechanismus ist zur Zeit noch nicht vollständig verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es, weitere Teilschritte zwischen dem Austausch von SiO_2 und organischem Material zu verstehen und vor allem den Einfluss des Polymers im Trägermaterial auf den Matrixwechsel zu untersuchen.

2.7. Sterilisation von Medizinprodukten

Die Sterilisation von Knochenersatzmaterialien stellt wie bei allen anderen Medizinprodukten einen wesentlichen Prozess zur Prävention von Wundinfektionen dar. Unter Sterilität versteht man die Abwesenheit lebensfähiger Mikroorganismen, wobei nach der Norm EN 556 ein Sterilitäts-Sicherheits-Niveau SAL (Sterility Assurance Level) von 10^{-6} gefordert wird, d. h. unter einer Million sterilisierter Einheiten darf nur eine kontaminiert sein [72, 73]. Die Wahl des Sterilisationsverfahrens richtet sich nach den Eigenschaften des zu sterilisierenden Materials (z. B. Temperaturbeständigkeit) und nach Art und Umfang der Kontamination. Die üblichen Methoden zur Sterilisation von Knochenimplantaten sind das Autoklavieren und die Bestrahlung mit Kobalt-60 (Co^{60}) γ -Strahlung.

Das Autoklavieren ist eine thermische Sterilisation mit Wasserdampf, wobei das Material über eine definierte Zeit auf $121 \text{ }^\circ\text{C}$ bei zwei bar Druck erhitzt wird. Die Luft im inneren des Autoklaven wird dabei vollständig durch Wasserdampf ersetzt. Nach der Einwirkungszeit wird das Gerät abgeschaltet und das Sterilgut kühlt auf Raumtemperatur herunter. Ein Nachteil bei diesem Verfahren ist, dass das Sterilgut durch den Wasserdampf feucht wird und vor der Lagerung getrocknet werden muss. Ein sicherer Sterilisationseffekt kann ebenso nur dann erwartet werden, wenn definitiv keine Luft mehr im Autoklaven vorhanden ist.

Bei der Sterilisation mittels Gammastrahlung können Produkte, einschließlich ihrer

Endverpackung, bei geringer thermischer Belastung [74], von Keimen befreit werden. Hierzu wird das Material in einem Bestrahlungsbehälter der Co^{60} γ -Strahlung ausgesetzt. Das künstliche Radionuklid Co^{60} wird durch Neutronenbeschuss des natürlich vorkommenden Kobalt-59 in Kernreaktoren gewonnen. Pro Kobaltatom werden zwei Gammaquanten mit 1,1 MeV und 1,3 MeV emittiert. Um die gewünschte Mindestdosis zu garantieren, wird das Sterilgut in einem Dosisintervall von 10- 40 kGy über 5 - 10 Stunden bestrahlt. Als durchschnittliche Bestrahlungsdosis ergeben sich dann z. B. 25 kGy, welche nach EN 556 als Standarddosis für Medizinprodukte angegeben ist. Geringere Strahlungsdosen können nur bedingt für Medizinprodukte angewandt werden und sind mit einer weiteren Analyse auf Endotoxine verknüpft, um die Sterilität zu garantieren. Trotz der vermiedenen Temperaturbelastung kann die Sterilisation mit ionisierender Strahlung die Materialeigenschaften deutlich beeinflussen und z. B. zu einer Vernetzung von bestimmten Polymeren führen. Dieser Aspekt muss bei der Entwicklung eines polymerbasierten Trägermaterials genau berücksichtigt werden. Da die Gammasterilisation ein einfaches und sehr zuverlässiges Verfahren darstellt, soll in dieser Arbeit ein Trägermaterial entwickelt werden, welches nach dieser Methode sterilisiert werden kann.

3 Untersuchungsmethoden

Im folgenden Kapitel werden die verwendeten Methoden, Geräte und die damit verbundenen Parameter angeführt, welche zur Analyse der einzelnen Trägermaterialkombinationen und der applizierbaren Produkte von Bedeutung sind. Es soll kurz die Zusammenhänge einer Methode beschreiben, um die daraus resultierenden Ergebnisse einordnen zu können.

3.1. Rheologie

Die mechanische Beständigkeit oder auch Klebrigkeit von Materialien, also ihre Fließfähigkeit und Deformation durch Einwirkung äußerer Kräfte, kann mittels Oszillationsrheologie bestimmt werden. Die feststoffähnlichen bzw. flüssigkeitsähnlichen Eigenschaften der Materialien hinterlassen einen charakteristischen viskoelastischen Fingerabdruck. Die molekulare Struktur von Polymeren nimmt wesentlichen Einfluss auf die Viskoelastizität. Neben der Viskosität gibt es charakteristische Unterschiede im Speicher- und Verlustmodul. Somit können Rückschlüsse auf die Verarbeitungsmerkmale der möglichen Trägermaterialien getroffen werden. Mit dem Oszillationsrheometer ARES (T. A. Instruments, New Castle, USA) werden das Fließverhalten und viskoelastische Eigenschaften unter Abhängigkeit von der Scherrate (Strain Sweep Test, SST), von der Temperatur (Temperature Ramp Test, TRT) oder der Frequenz (Frequency Sweep Test, FST) untersucht. Die Messung des komplexen Schubmoduls in Abhängigkeit von den genannten Größen gibt Aufschluss über das Schwingungsverhalten viskoelastischer Körper unter einer oszillierenden Scherbelastung. In ihm wird die auf die Probe einwirkende Schubspannung mit der resultierenden Scherdeformation verknüpft. Allgemein hat der Schubmodul die Form einer komplexen Zahl, welche sich aus folgender Gleichung ergibt:

$$G^* = G' + iG'' \quad (3.1)$$

Der Realteil G' beschreibt den elastischen Anteil. Dieser ist proportional zu dem Anteil der Deformationsenergie, der im Material gespeichert wird und nach der Ent-

lastung wieder aus dem Material gewonnen werden kann. Die Deformation beschreibt im Oszillationsrheometer die lokale Scherung materieller Flächen relativ und parallel zueinander, welche reversibel ist. Aus der zeitlichen Ableitung der Deformation bzw. Scherung lässt sich die Scherrate ermitteln, welche ein Maß für die mechanische Belastung ist. Der Imaginärteil G'' beschreibt den viskosen Anteil. Dieser entspricht dem Verlustanteil der Energie, welche z. B. durch innere Reibung in Wärme umgewandelt wird. G' wird daher auch als Speichermodul und G'' als Verlustmodul bezeichnet.

Mit dem FST Test kann über Speicher- und Verlustmodul die Stabilität der Lösung charakterisiert werden. Durch die Änderung der Scherfrequenz bei gleichbleibender Temperatur und Scherrate kann man auf die Molekülstruktur schließen oder den Vernetzungsvorgang des Systems untersuchen. Das dabei dominantere Modul bestimmt die Eigenschaft des Materials, so zeigen nicht oder nur schwach vernetzte Systeme größere Verlustmodule ($G' < G''$). Höher vernetzte Systeme besitzen ein größeres Speichermodul ($G' > G''$), welches bei Festkörpern sogar um ein vielfaches größer als das Verlustmodul ist ($G' \gg G''$).

Durch den SST kann man zwischen newtonschem und nicht-newtonschem Verhalten der Materialien unterscheiden. Newtonsche Flüssigkeiten zeigen unabhängig von der mechanischen Belastung, also in diesem Fall der Scherrate, eine konstante Viskosität, bei gleichbleibender Temperatur und Frequenz. Nicht-newtonsche Flüssigkeiten nehmen entweder mit zunehmender Belastung in ihrer Viskosität zu (scherverdickend) oder ab (scherverdünnend). Dieses Verhalten wird als dilatand bzw. strukturviskos bezeichnet und deutet auf einen zeitlichen, reversiblen Auf- oder Abbau der inneren Struktur hin. Dieses ist insbesondere für Sol-Gel-Systeme charakteristisch, bei denen die Partikel unterschiedliche Wechselwirkungen miteinander eingehen.

Mittels TRT kann der temperaturabhängige Sol-Gel-Übergang und somit auch die Gelbildungstemperatur bestimmt werden. Dadurch können Aussagen über die Temperaturbeständigkeit der Materialien getroffen werden.

Die verschiedenen Komposite werden im Kegel-Platte-Messsystem untersucht. Je 2,5 ml einer Probe werden in den planen Probenhalter gegeben, welcher fest steht während der Kegel rotiert. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Parameter für die einzelnen Testverfahren aufgelistet:

Tabelle 3.1.: Parameter Oszillationsrheometer

Testmethode	Temperatur	Frequenz	Scherrate
TRT	0 - 40 °C	1 Hz	1 s ⁻¹
SST	22 bzw. 37 °C	1 Hz	0,1 - 1000 s ⁻¹
FST	22 bzw. 37 °C	0,01 - 100 Hz	1 s ⁻¹

Die mechanische Stabilität, welche bereits angesprochen wurde, wird in dieser Arbeit als charakteristische Eigenschaft des zu entwickelnden Trägermaterials angesehen. Sie beschreibt keine direkte Messgröße. Als mechanisch stabil werden hier vielmehr Gele angesehen, deren Struktur nicht durch geringe äußere Belastungen sofort zerstört werden. Da die Trägermaterialien jedoch eine gewisse Modellierbarkeit aufweisen sollen, werden sie Fließfähigkeit zeigen. Die Unterschiede der auftretenden Fließverhalten werden als unterschiedlich mechanisch stabil eingestuft.

3.2. Dynamische Differenzkalorimetrie

Um das thermische Verhalten verschiedener Materialien und Kompositionen zu analysieren, wird mittels dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC - *differential scanning calorimetry*) der Wärmestrom der Probe und dessen Unterschied zu einer Referenzprobe gemessen. Durch die abgegebene oder aufgenommene Wärmemenge beim Aufheizen, Abkühlen oder beim Durchlaufen isothermer Prozesse kommt es zu einer Temperaturdifferenz zwischen der Probe und der Referenz. Eigenschaften wie Schmelzpunkt, Glasübergang, spezifische Wärmekapazität eines Stoffes, sowie die Vernetzung und Strukturbildung können durch charakteristische endotherme oder exotherme Peaks bestimmt werden. Der Einfluss von Nanopartikeln wie SiO_2 auf die Strukturbildung kann durch die möglichen Abweichungen der Peaks analysiert werden. Die Kalorimetrieanalyse der Trägermaterialien wird mit einem Perkin-Elmer Pyris1 DSC (Perkin-Elmer Instruments, USA) durchgeführt, die Proben durchlaufen dabei ein gleichmäßiges Aufheizen und Abkühlen im Temperaturbereich von -5 bis 40 Grad. Aufgrund der sprunghaften Strukturveränderung wird eine Heizrate von 10K/min gewählt. Das Temperaturprogramm kann als Loop dreifach durchlaufen werden, wobei zwischen dem Aufheizen und Abkühlen über 2 Minuten einer isothermer Prozess, zur Einstellung eines thermischen Gleichgewichts, statt findet. Die Datensätze können gemittelt zu einer DSC Kurve zusammengefasst werden. Um die Messkurven miteinander vergleichen zu können, wurden die Daten auf die Masse der Probe normiert.

3.3. Tube Inversion Test

Der Übergang eines Sols zum Gel kann qualitativ über einen einfachen Tube Inversion Test bestimmt werden. Dieser sehr simple Test, bei dem ein Probenröhrchen mit der Analysesubstanz gefüllt ist und auf den Kopf gedreht wird, ist die einfachste Methode, um das temperaturabhängige Phasenverhalten molekularer Gele zu analysieren [75, 76]. Dieser Test ist daher besonders für das thermoreversible Polymer Poloxamer

geeignet, auf dessen Eigenschaften später noch genauer eingegangen wird. Für den Test werden verschiedene Poloxamer Lösungen und Komposite mit SiO_2 zu je 15 ml in jeweils einem Greiner-Probenröhrchen abgefüllt. Mit einer konstanten Heizrate von 0,5 K/min wird die Probe im Temperaturbereich von 0 - 30 °C aufgewärmt, nach jedem Heizschritt wird die Temperatur für 1 Minute gehalten, damit die Probe ihr thermisches Gleichgewicht erlangt. Anschließend wird die Probe dann auf den Kopf gedreht. Die Temperatur, bei der die Lösung kein Fließverhalten mehr zeigt, wird notiert und als Gelübergangstemperatur bestimmt. Aufgrund der angesprochenen thermoreversiblen Eigenschaft des Polymers, kann der Versuch mehrfach mit einer Probe durchgeführt werden.

3.4. Röntgenkleinwinkelstreuung - SAXS

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (Small-Angle X-ray Scattering, SAXS) ist eine etablierte Methode zur dimensionellen Charakterisierung von Objekten im Nanometerbereich [77]. Wird Materie von Röntgenstrahlung durchstrahlt, werden die Elektronenhüllen der Atome zum Schwingen angeregt und senden Sekundärwellen gleicher Frequenz aus, die miteinander interferieren können. Die Kleinwinkelstreuung betrachtet die Interferenz der Sekundärwellen bei kleinen Winkeln. Grundlage der Interpretation solcher Streuexperimente ist das Konzept von Guinier, welches davon ausgeht, dass ein einzelnes, isoliert gedachtes Partikel eine Kleinwinkelstreuung liefert [78].

Aus den Streukurven lassen sich Strukturbildungen der kolloiden Partikel ableiten. Inhomogenitäten, die Orientierung und die Regelmäßigkeit ihrer Anordnung können so bestimmt werden. Für diese Arbeit ist insbesondere der Einfluss der SiO_2 -Nanopartikel und deren mögliche Strukturbildung in Wechselwirkung mit dem Poloxamer von Interesse. Mittels Röntgenkleinwinkelstreuung lassen sich sowohl Aggregate der SiO_2 -Partikel detektieren, als auch die Strukturen der mizellaren Lösungen des Poloxamers.

Die Verbindung von SiO_2 -Nanopartikeln und PVP-Molekülen ist wohlbekannt und werden unter Kapitel 4.1 beschrieben. Inwieweit Poloxamer als Trägermaterial einen Einfluss auf die Strukturbildung des SiO_2 nimmt, soll mittels Röntgenkleinwinkelstreuung analysiert werden.

Die Messungen werden an einer Kratky Röntgenkleinwinkelkamera durchgeführt, welche einen unendlich langen Primärstrahl als Kollimationssystem verwendet. Die zu untersuchende Probe wird dazu in eine Glaskapillare mit einem Durchmesser von 1 mm gefüllt und in der Röntgenanlage positioniert. Als Röntgenquelle dient eine Kupfer K_α Strahlung. Die Röntgenröhre wird bei einer Beschleunigungsspannung

40 kV und einem Röhrenstrom von 40 mA betrieben. Das Signal wird auf Photoplatten (Image Plate - IP) detektiert, welche anschließend mit einem IP-Reader ausgelesen werden können, um die Streukurven zu ermitteln. Alle IPs werden für eine Sekunde mit dem Primärstrahl belichtet, um einen Ausgangspunkt zum Auslesen der Streukurven zu haben. Des Weiteren wird zur Kalibrierung eine Referenzprobe aus Silberbehenat verwendet. Sie weist charakteristische Peaks auf, welche eindeutigen q -Werten zugeordnet werden können. Aus den so ermittelten Streukurven können die weiteren Korrelationsfunktionen berechnet werden, welche dann Aufschlüsse zu den Strukturgrößen liefert.

3.5. Rasterelektronenmikroskopie

Mittels elektronenmikroskopischer Verfahren lässt sich die Oberflächenstruktur und Elementzusammensetzung von Materialien charakterisieren. Das Rasterelektronenmikroskop DSM 960 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ist mit einem energiedispersiven Röntgenspektrometer (EDX) von SAMx (Saint Laurent du Var, Frankreich) ausgestattet. Die durch den Elektronenstrahl angeregten Atome senden eine Röntgenstrahlung mit elementespezifischer Energie aus. Die charakteristische Röntgenstrahlung wird mit der SAMx-Software IdFix erfasst und ausgewertet. Die EDX-Spektren geben Aufschlüsse über die Elementzusammensetzungen der Proben. Dadurch kann auch der zeitliche Ablauf beim Austausch zwischen der SiO_2 -Matrix und der organischen Matrix analysiert werden. Für hochauflösende Bilder und zur Vermeidung von elektrischen Gegenfeldern wurden sowohl die verschiedenen Proben, als auch die histologischen Präparate mit einer 3nm dünnen Gold-Paladium-Schicht in einem SC7620 Mini Sputter Coater bedampft. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen und die EDX-Spektren wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 10kV aufgenommen.

3.6. Auflöseverhalten im Medium

Im Allgemeinen gibt die Löslichkeit an, in welchem Umfang ein Reinstoff in einem Lösungsmittel gelöst werden kann, sowie dessen homogene Verteilung im Lösungsmittel auftritt. Dabei unterscheidet man zwischen der qualitativen und quantitativen Löslichkeit. Bei der qualitativen Löslichkeit wird festgelegt, ob das zu analysierende Material im erkennbaren Maße in dem Lösungsmittel löslich ist. Die quantitative Löslichkeit bestimmt hingegen die genaue Stoffmenge, die sich maximal in einem Einheitsvolumen des Lösungsmittels löst.

Bei der Verwendung des Trägermaterials in Kombination mit dem Knochenersatzmate-

rial, in Form einer applizierbaren Putty, kann es vorkommen, dass die Defektbereiche stark bluten. Ein schnelles Auflösen der Putty, bevor sie ihre eigentliche Aufgabe erfüllt, ist in dieser Situation nicht erwünscht. Das Trägermaterial muss so entwickelt werden, das es kohäsiv und adhäsiv genug gegenüber dem Granulat ist, um insgesamt mechanisch stabil zu sein, aber es darf auch nicht völlig unlöslich sein. Um das genaue Verhalten der entwickelten Trägermaterialien zu bewerten, wird je $1,00\text{ g} \pm 0,05\text{ g}$ der zu testenden Putty in 7ml simulierter Körperflüssigkeit (SBF) bei 37°C inkubiert. Innerhalb der ersten 90 Minuten wird das Material insgesamt acht mal aus der SBF Lösung entnommen und das Gewicht der verbleibenden Putty bestimmt. Entscheidend ist der Anteil an zusammenhängenden Material. Abgelöste Fragmente werden bereits als gelöst betrachtet. Alle Putties werden in dreifacher Wiederholung bezüglich ihres Lösungsverhalten beobachtet und die verbleibende Masse des ungelösten Materials bestimmt. Mit diesem Versuch lässt sich qualitativ beurteilen, welche Putty dann z. B. am stabilsten in stark blutenden Defekten wäre.

3.7. Elementaranalyse

Um die Wechselwirkung der Trägermaterialien mit dem Knochenersatzmaterial zu untersuchen, wird quantitativ der elementare Kohlenstoff im bzw. am Granulat bestimmt, welches zuvor aus den applizierbaren Putties herausgespült werden muss. Dazu werden die verschiedenen Trägermaterial-Granulat-Komposite für 24 h in vollständig entionisiertem Wasser (VE Wasser) bei 10°C inkubiert und anschließend bei ca. 35°C getrocknet, um oberflächliche Ablagerungen des Polymers zu determinieren. Als Vergleichsprobe dient das reine Granulat, welches nach dem gleichen Verfahren behandelt wird. Die einzelnen Proben werden lichtmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Anschließend wird eine exakte Einwaage jeder Probe im Flash EA 112 (Thermo Finnigan) auf bis zu 1800°C mit reinem Sauerstoff katalytisch verbrannt. Nach der Reduzierung der enthaltenden Stickoxide zu molekularem Stickstoff mittels eines Trägergases werden die definierten Trägergase CO_2 , H_2O , SO_2 und N_2 gaschromatographisch separiert und nacheinander einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor zugeführt. Die einzelnen Elemente werden als Peaks technisch exakt in definierter Reihenfolge detektiert. Zum einen können die Elemente so eindeutig identifiziert werden (qualitativ) und zum anderen auch ihre Menge über die Peakfläche der Signale bestimmt werden (quantitativ). Durch die bekannte Einwaage ergibt sich ein genauer Massenanteil der Elemente.

3.8. Gelpermeationschromatographie

Durch die Bestrahlung mit Gamma kann es wie bereits erwähnt zu Veränderungen der Polymerketten kommen. Eine Methode um diese Änderungen der Polymerketten und Molekülgrößen zu analysieren, ist die Gelpermeationschromatographie (GPC). Dieses Verfahren beruht auf den Unterschieden in den Molekülgrößen. Dabei wird die Trennung in einer Kolonne durchgeführt, die mit porösem Gel gefüllt ist. Kleine Moleküle dringen in die Poren des mit Lösemittel gequollenen Gels ein. Innerhalb der Poren bewegen sich die Partikel nur noch durch Diffusion und ihre Elution wird daher verzögert. Die großen Moleküle hingegen können nicht in die Poren eindringen und wandern schnell durch die Kanäle zwischen den Gelpartikeln und werden somit am schnellsten ausgewaschen. Die mittelgroßen Teilchen können nur teilweise in die Poren eindringen und werden chronologisch nach den großen Teilchen, aber vor den kleinen Teilchen eluiert. Die Molmassen der einzelnen Fraktionen werden durch den Vergleich mit Kalibriersubstanzen bestimmt. Eine Änderung der Kettenlänge durch Gammabestrahlung oder auch anderen Prozessen, wie der Alterung des Materials, kann so ermittelt werden. Die Messungen wurden von dem BASF-Analytics Labor durchgeführt.

3.9. Tierexperimentelle Studien

Ziel dieser Arbeit ist es, ein biokompatibles Trägermaterial zu entwickeln, welches die Handlungseigenschaften der handelsüblichen NB Putty verbessert und zu dem auch mittels Gammabestrahlung sterilisierbar ist.

Um die Biodegradierbarkeit und den Einfluss des Trägermaterials auf die Wirksamkeit des Knochenersatzmaterials zu bestimmen, müssen tierexperimentelle Studien durchgeführt werden. Die komplexen Prozesse und Mechanismen des lebenden Organismus treten in Wechselwirkung mit dem applizierten Biomaterial. Der Einfluss der verschiedenen Trägermaterialien kann daher nur im Tierexperiment vollständig untersucht werden. Vor den tierexperimentellen Studien muss jedoch unbedingt die Unbedenklichkeit der verwendeten Materialien nachgewiesen werden. Dazu wird *in vitro* die Biokompatibilität und Toxizität der verschiedenen Putties in einem indirekten Zytotoxizitätstest, dem XTT-Test, untersucht. Nach erfolgreich abgeschlossenem *in vitro* Test erfolgt die Untersuchung des Materials *in vivo*. Die Biomaterialien werden dazu in zwei verschiedenen Tiermodellen getestet.

Die tierexperimentellen Studie wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Mund,- Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie durchgeführt. In dessen Zell- und molekularbiologischen Labors wurden zuvor die Zellviabilitätstests *in vitro*

durchgeführt und anschließend die histologischen Präparate für die Bewertung der Implantatmaterialien angefertigt.

Voruntersuchungen *in vitro* Bevor ein Biomaterial bzw. ein Medizinprodukt seine Anwendung findet, muss zunächst dessen Biokompatibilität überprüft werden. Durch *in vitro* Tests wie dem Live-Dead-Test oder dem XTT-Test werden bestimmte Zellen (z. B. murine Fibroblasten (L-929, ATCC LGC Standards, UK)) über eine bestimmte Zeit mit dem zu untersuchenden Material in Kontakt gebracht und anschließend dessen Erscheinungsbild untersucht. Dabei spielt ihre Viabilität und Entwicklung eine entscheidende Rolle, aber auch deren Anzahl auf dem Material oder im Medium.

Der Zytotoxizitätstest XTT ist ein Zellproliferationstest, bei dem das Aborptionsverhalten der Zelllösung durch Formazan gemessen wird. Die Menge an absorbierten Formazan ist dabei von der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität abhängig, welche die Vitalität der Zellen widerspiegelt. Es ist ein indirektes Testverfahren zur Bestimmung der Biokompatibilität und wurde mit dem Cell Proliferation Kit II, Fa. Roche durchgeführt. Die Putties werden für 24 h bei $T = 37^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 mit dem Zellmedium inkubiert (RP- MI1640+NKS/FCS). Anschließend wird das Zellmedium von den Putties entfernt und zu L929- Zellen hinzugegeben über 24 h bei $T = 37^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 . Danach werden die L929-Zellen mit XTT (sodium 3-[1-phenyl-amino-carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulphonic acid hydrate) behandelt. In lebenden Zellen wird das Tetrazolium-Salz XTT in das orangefarbene, lösliche Formazan umgewandelt. Tote Zellen können kein Formazan aus XTT bilden. Die Formazanbildung wird photometrisch quantifiziert und der Grad der Zytotoxizität der Testsubstanzen kann angegeben werden, wobei eine Zellaktivität von über 70 % als biokompatibel gilt.

Tiermodell A - Wistar Ratten Für die erste tierexperimentelle Studie werden männliche Wistar-Ratten (Körpergewicht von 350g bis 450g, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-101/11). Die Tiere werden während des Versuches in Einzelkäfigen gehalten, unter Bereitstellung von Standardlaborfutter für Nager und Wasser ad libitum. Zusätzlich wird nach der Operation Carprofen (Rimadyl[®], Zoetis Germany GmbH, Berlin, Deutschland) gespritzt und für 5 Tage im Trinkwasser Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-Ratiopharm[®], 500 mg/ml, Ratiopharm, Deutschland) als Analgetikum verabreicht. Für die Operationen werden die Ratten mit intraperitonealer Injektion, einer Mischung aus 40 mg Ketaminhydrochlorid (Ketamin[®] 10 % Belarpharm, Vercha, Deutschland) und 3,5 mg Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2 %, Bayer Health Care Animal Health Leverkusen, Deutschland) auf 400 g Körpergewicht, anästhesiert.

Die narkotisierten Tiere werden in Rückenlage auf einer beheizten Unterlage, zur

Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, positioniert. Nach der Rasur des Hinterlaufes und dessen Desinfektion mit Povidon-Iod (Betasisodona[®], Mundiapharma, Limburg, Deutschland) wird ein 2 cm langer Hautschnitt am oberen Bereich des Schienbeins zum Freilegen der Tibia gemacht. Ein im Durchmesser 3,5 mm großer und 5 mm tiefer Defekt wird mit einem Dentalbohrer (SU 100, BEGO, Bremen, Deutschland) unter ständiger Kühlung mit 0.9 %iger NaCl-Lösung in den proximalen Tibiaschaft gesetzt. Anschließend wird das Biomaterial in den Defektbereich implantiert (Ab-



Abbildung 3.1.: Proximaler Tibiadefekt der Ratte. Die genaue Defektlage kann im Mikro-CT nach Explantation kontrolliert werden (invertiertes Bild).

bildung 3.1). Die Wunden werden mit resorbierbaren Fäden verschlossen (Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Nach den Versuchszeiträumen von 12, 21 und 63 Tagen (n = 7 je Zeitpunkt) werden die Tiere mit einer Mischung aus 120 mg Ketaminhydrochlorid (Ketamin[®] 10 % Belarpharm, Vercha, Deutschland) und 10 mg Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2 %, Bayer Health Care Animal Health Leverkusen, Deutschland), mit einer Dosis von 180 mg/kg euthanasiert und es erfolgt die Probenentnahme.

Tiermodell B - New Zealand White Rabbit Im zweiten Tierversuch werden weiblichen New Zealand White Rabbits (Körpergewicht 3000g bis 4500g, Alter 18-20 Wochen, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-013/15). Die Tiere werden während des Versuches in Einzelkäfigen gehalten, unter Bereitstellung von Standardlaborfutter für Kaninchen und Wasser (letzteres ad libitum). Vor der Operation werden die Tiere mit einer Mischung aus 30-60 mg/kg Ketaminhydrochlorid (Ketamin[®] 10 %, Belarpharm, Vercha, Deutschland) und 5 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2 %, Bayer Health Care Animal Health Leverkusen, Deutschland) subcutan in die Nackenfalte anästhesiert und das Antibiotikum Penicillin (i. M. 150.000 i. E., Infectocillin, Infectopharm, Deutschland) injiziert.

Zusätzlich wird vor der Operation Lidocaine (Xylocitin-loc, Mibe GmbH, Deutschland) und nach der Operation (über 5 Tage) im Trinkwasser Metamizol-Natrium (Novaminsulfon-Ratiopharm[®], 500 mg/ml, Ratiopharm, Deutschland) als Analgetikum verabreicht. Während der Operation werden die Kaninchen in der Rückenlage mit angewinkelten Hinterläufen auf dem Operationstisch positioniert. Der Kniebereich wird vor der Operation ausrasiert und mit Povidon-Iod (Betasisodona[®], Mundiapharma, Limburg, Deutschland) desinfiziert. Ein sagitaler Schnitt am Knie durch die Epidermis, das Muskelgewebe und das Periost wird vorgenommen, um den Knochen freizulegen. Ein im Durchmesser 5 mm großer und 10 mm tiefer Defekt wird mit einem Dentalbohrer (SU 100, BEGO, Bremen, Deutschland) unter ständiger Kühlung mit 0.9%iger NaCl-Lösung in die Kondyle des Femur gesetzt (Abbildung 3.2). Nach dem Bohren wird die Wunde mit Kochsalzlösung und Gentamicin ausgespült. Anschließend wird das Biomaterial in den Defektbereich implantiert. Periost, Muskelfasern sowie Epidermis werden mit resorbierbaren Fäden vernäht (Vicryl[®], Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Nach den Versuchszeiträumen von 4, 8 und 12 Wochen (n = 5 je Zeitpunkt) werden die Tiere mit Ketaminhydrochlorid (Ketamin[®] und Xylazinhydrochlorid (Rompun[®] 2%, Bayer Health Care Animal Health Leverkusen, Deutschland) narkotisiert und mit der Injektionslösung T61 (MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland) euthanasiert. Anschließend erfolgt die Probenentnahme.



Abbildung 3.2.: Distal gesetzter, femoraler Kondylendefekt im Kaninchen. Die genaue Defektlage kann im Mikro-CT nach Explantation kontrolliert werden (invertiertes Bild).

Alle Gewebeproben aus den Tierversuchen werden für 48h in in 4%igen Formalin fixiert. Die Proben mit NB Produkten werden in der Defektmittte geteilt und anschließend eine Hälfte für 3-4 Wochen in 20%iger EDTA-Lösung (pH 7,2 - 7,4) entmineralisiert. Die entkalkten Proben werden anschließend in Paraffin eingebettet, um aus den Blöcken 3-5 μm dünne Schnitte anzufertigen, welche für histologische Färbemethoden und für die Rasterelektronenmikroskopie, sowie die energiedispersive

Röntgenspektroskopie aufgearbeitet werden können. Aus der anderen Hälfte der NB Proben, sowie den Actifuse Proben werden Dünschliffe nach der Säge-Schliff-Technik von Donath und Breuer angefertigt [79]. Die Proben werden dafür in Technovit 9100 eingebettet und nach dem Aushärten des Harzes aufgesägt, um die Proben auf einem Objektträger zu fixieren. Die Proben werden anschließend auf 50-70 μm geschliffen und poliert.

3.9.1. Histologische Evaluierung

Bei der histologischen Färbung bindet sich ein in Lösung befindlicher Farbstoff an definierte Gewebestrukturen. Durch unterschiedliche Farbstoffe und Färbemethoden lassen sich verschiedene biologische Details darstellen. Die histologische Evaluierung der NB Proben erfolgte an Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitten, die der Actifuse Proben an Giemsa Tuloidinblau gefärbten Schliffen.

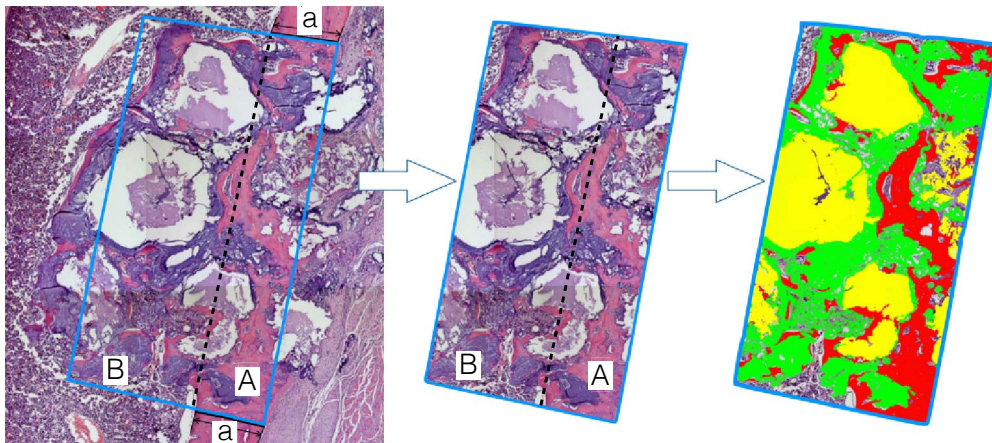
Die verwendete Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine weit verbreitete Routinefärbemethode und wird häufig pathologisch als Übersichtsfärbung angewandt. Die beiden Farbstoffe reagieren dabei pH-Wert abhängig. So färbt das Hämatoxylin, welches auf dem natürlichen basischen Farbstoff Hämalan beruht, alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau, z. B. Zellkerne, Ribosomen und DNA. Der synthetische Farbstoff Eosin hingegen färbt alle basischen bzw. acidophilen Bestandteile rot, z. B. Mitochondrien, Proteine und Kollagen.

Giemsa Tuloidinblau eignet sich besonders zum Anfärben von Schliffpräparaten. Im Gegensatz zu anderen Farbstoffen kann es nämlich in das dichte Epoxidharz eindringen und das eingeschlossene Gewebe in unterschiedliche Blautönen färben. Die verschiedenen Blautönung entsprechen dabei der relativen Elektronendichte des jeweiligen Gewebes.

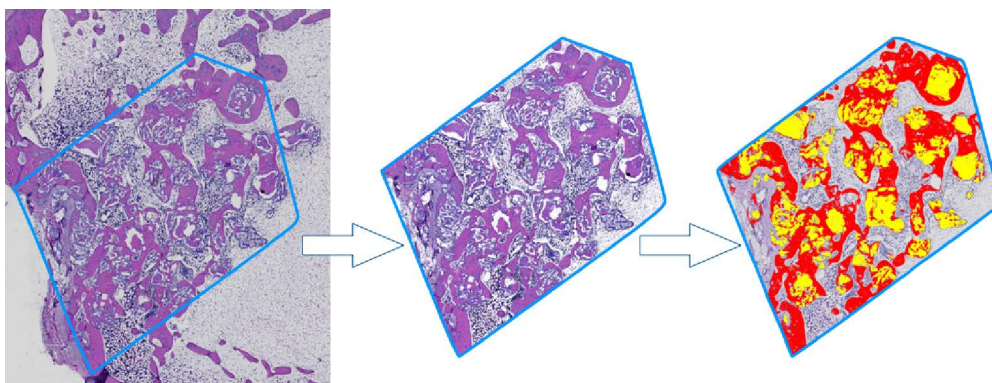
Für die histologische Evaluierung werden die gefärbten Präparate mit dem Lichtmikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) bei 5-facher und 20-facher Vergrößerung fotografiert. Die Zusammensetzung der Einzelaufnahmen eines Präparates für die histomorphometrische Analyse erfolgt mit der Software AxioVision (AxioVision 40, Vers. 4.8, Carl Zeiss, Jena, Deutschland).

3.9.2. Histomorphometrie

Anhand der gefärbten histologischen Präparate kann eine histomorphometrische Quantifizierung des neu gebildeten Knochens und des verbleibenden Biomaterials durchgeführt werden. Mit Adobe Photoshop CC (2015.1.2) wurden die ROIs (Region of Interest) festgelegt, die verschiedenen Gewebestrukturen markiert und dessen Flächenanteil im Vergleich zum ROI prozentual ermittelt.



(a) — Region of Interest Tibiadefekt in der Ratte. Unterteilung in Kortikalis (A) und Markraum (B). Weitere Parameter: a — Kortikalisbreite



(b) — Region of Interest Femurdefekt im Kaninchen mit Polygonzug

Abbildung 3.3.: Festlegung des Region of Interest für die histomorphometrische Auswertung. (a) Ratte, (b) Kaninchen

Der auszuwertende Defektbereich sollte möglichst einheitlich gewählt werden. Für die Tibiadefekte im Rattenmodell wird dazu jeweils der Mittelwert der Kortikalisbreite (vgl. Abbildung 3.3 (a)) bestimmt und diese in dreifacher Verlängerung in den Defekt eingezeichnet und durch eine gerade Linien oben und unten verbunden. Dieser Region of Interest (ROI) kann als gesamter Defekt ausgewertet werden oder in die Bereiche Kortikalis (A) und Markraum (B) unterteilt werden. Der kortikale Defektbereich ist in diesem Modell insbesondere zur Beurteilung der Stabilität des Defekte notwendig. Je schneller das Trägermaterial in diesem Defektbereich abgebaut wird und neuer Knochen gebildet werden kann, umso schneller kann der Defekt stabilisiert werden. Im femuralen Kondylendefekt der Kaninchen gibt es keinen so prägnanten Parameter zur Standardisierung des ROIs, hier wird ein Polygonenzug um den Defektbereich gelegt, welcher jedoch durch "Bohrkanten" erkennbar ist (vgl. Abbildung 3.3 (b)). Anschließend werden neu gebildeter Knochen in rot und das verbleibende Biomaterial in gelb (Granulat) und in grün (Trägermaterial) markiert und die Flächenanteile bestimmt. Der statistische Vergleich der Gruppen wurde mit der einseitigen Varianz-

analyse (ANOVA) durchgeführt. Signifikante Unterschiede wurden anschließend mit einem Post Hoc Test untersucht, um festzulegen, in welchen Gruppen dieser Unterschied auftritt. Statistische Signifikanz ergibt sich für $p \leq 0,0167$. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS (IBM SPSS Statistic Vers. 20) durchgeführt.

4 Trägermaterial aus Polyvinylpyrrolidon

In diesem Kapitel wird ein Trägermaterial entwickelt und analysiert, welches auf einem Hydrogel basiert. Dieses Hydrogel besteht aus dem Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) und SiO₂-Nanopartikeln, welche in verschiedenen Konzentrationen getestet wurden. Ebenfalls wurden die verschiedenen Komposite mittels Gammastrahlung quervernetzt. Die Messungen der Proben vor und nach der Bestrahlung geben Informationen über den Grad der Quervernetzung und dessen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der Komposite. Der Grad der Quervernetzung kann über die Polymerkonzentration oder über die Strahlungs-dosis beeinflusst werden.

Als Grundlage der Entwicklung dient die im Kapitel 2.6 beschriebene NB Putty. Das Hydrogel dieser Putty besteht aus 6 wt.% PVP, 3 wt.% SiO₂ und 91 wt.% H₂O und ist nicht quervernetzt. Diese Putty wird als Kontrollgruppe für die folgenden Versuche verwendet. Ausgehend von ihrer Zusammensetzung wurde für die weiteren Proben die PVP-Konzentration bis auf 3 wt.% reduziert, bei einer gleich bleibenden 3 %igen SiO₂-Konzentration (Rest H₂O). Zwei PVP Proben (6 wt.% und 3 wt.%) wurden mit einer auf 5 wt.% erhöhten SiO₂-Konzentration (Rest H₂O). Die Bestrahlung der Proben erfolgte extern bei der Synergy Health Radeberg GmbH (Radeberg, Deutschland) nach ISO 13485. Die Proben wurden standardgemäß mit einer durchschnittlichen Strahlungs-dosis von 25 kGy (nach EN 556) bestrahlt und mit einer reduzierten Strahlungs-dosis von durchschnittlich 17,5 kGy. Durch die reduzierte Strahlungs-dosis konnte der Einfluss der Gammabestrahlung auf die Quervernetzung des Polymers untersucht werden.

Nachdem die verschiedenen Zusammensetzungen in ihren Handlingeigenschaften charakterisiert wurden, sollte eine quervernetzte Variante ausgewählt werden, um sie mit dem Knochenersatzmaterial zu kombinieren. Dieses Gesamtkomposit ergab ebenso eine ready-to-use Putty, vergleichbar mit der Kontrollgruppe. Um die strukturellen Unterschiede zwischen der quervernetzten Testgruppe und der nicht quervernetzten Kontrollgruppe und auch deren biologische Wirksamkeit zu testen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Die Mikro- und Nanostruktur der zu testenden Putties wurde mittels Elektronenmikroskopie, energiedispersiver Röntgenspektroskopie, Ele-

mentaranalyse und Löslichkeitstests genauer untersucht. Die biologische Wirksamkeit des Materials konnte jedoch nur durch einen Versuch im lebenden Organismus getestet werden, dazu wurde zuvor die Bioverträglichkeit mittels Zellkulturtest untersucht, um die Unbedenklichkeit der Materialien zu gewährleisten. Anschließend wurden die entwickelte Versuchspatty und die Kontrollpatty in einem Tierversuch getestet.

4.1. Polyvinylpyrrolidon

Das Polymer Polyvinylpyrrolidon (PVP) (Abbildung 4.1) ist ein amorphes, hygroskopisches Pulver und ist aus seiner früheren Verwendung als Blutplasmaersatz besonders bekannt. In der Industrie wird PVP in zahlreichen Applikationen als Bindemittel verwendet. Insbesondere im Bereich der pharmazeutischen Industrie ist es ein wichtiger Hilfsstoff [80, 81]. In Medikamenten kann PVP als Bindemittel die Freisetzung des Wirkstoffes beeinflussen. Bei quervernetzten Produkten, kann sogar der zeitlichen Zerfall des Produktes gesteuert werden, da je nach Vernetzungsgrad die Resorptionszeit im Organismus variiert [82].

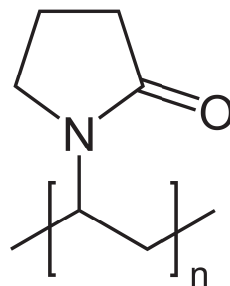


Abbildung 4.1.: PVP Strukturformel

PVP entsteht aus der Polymerisation von freien Radikalen des N-Vinylpyrrolidon C_6H_9NO in Wasser oder Isopropanol, wodurch die charakteristische Kettenstruktur der Produkte entsteht. Der Grad der Polymerisation, klassifiziert durch den K-Wert, ist entscheidend für die mechanischen Eigenschaften in wässriger Lösung. Der K-Wert steht im direkten Zusammenhang mit der mittleren molaren Masse des Polymers und somit mit dessen Kettenlänge. Das für die Arbeit verwendete PVP Kollidon (Sigma Aldrich, Deutschland), klassifiziert als K-90, hat eine mittlere Molare Masse von 360.000 g/mol und eine Kettenlänge von ca. 3.240 Wiederholungseinheiten. Aufgrund dieser hohen Kettenlänge kann man PVP in wässriger Lösung durch Gammabestahlung leicht quervernetzen (Abbildung 4.2). Durch die Bestrahlung entstehen zum einen freie Sauerstoffradikale im Wasser, welche dann die Vinylkette oder den Pyrrolidon-Ring öffnen können. Dort entstehen dann sogenannte Makroradikale, welche dann mit anderen Makroradikalen eine kovalente Bindung eingehen können. Das PVP Molekül

kann an dieser Stelle eine neue Verknüpfung bilden und sich vernetzen. Zum anderen kann die hochenergetische Gammastrahlung auch die kovalenten Bindungen der PVP-Moleküle direkt zerstören. Die so entstandenen Makroradikale bilden durch inter- und intramolekulare Bindungen die Quervernetzungen des PVPs [83,84]. Durch diese Quervernetzung entstehen Gelnetzwerke, welche hohe mechanische Stabilitäten aufweisen können. Während das nicht quervernetzte PVP stark strukturviskos ist [17], ist dessen quervernetzte Variante nur noch gering scherverdünnend. Alsarra et al. (2011) zeigte, dass ab Konzentrationen von 6 wt.% PVP sogar Rheopexie auftreten kann [85], d. h. dass das quervernetzte PVP nicht nur bei zunehmender Scherbeanspruchung eine Scherverdickung mit höheren Viskositäten auftritt, sondern auch bei einer dauerhaften konstanten Scherbelastung. Die Ursache beider Fließeigenschaften ist ähnlich, da es bei Beiden zu einer Änderung der inneren Struktur kommt und die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln größer wird. Ein positiver Nebeneffekt der Quervernetzung durch Gammabestrahlung ist die gleichzeitige stattfindende Sterilisierung.

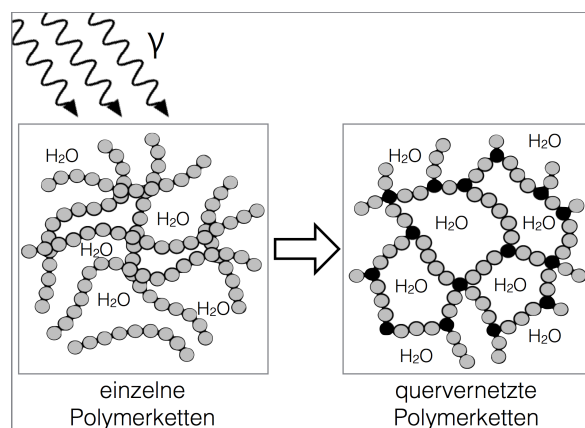


Abbildung 4.2.: Quervernetzung der PVP-Moleküle in wässriger Lösung durch Gammabestrahlung

Des Weiteren lassen sich Hydrogele auf PVP Basis herstellen, wenn das Polymer mit einem Sol-Gel-System wie z. B. SiO_2 kombiniert wird. Dabei kann die positive bioaktive Wirkung des SiO_2 , wie sie im Kapitel 2.5 beschrieben ist, bei der Entwicklung des Trägermaterials mit einbezogen werden. Es kann dadurch mit dem Trägermaterial eine Art Drug-Delivery-System für SiO_2 entwickelt werden, welches einen positiven Effekt auf die Knochenheilung haben kann.

Die Nanopartikel allein aggregieren jedoch zu Clustern und Gelnetzwerken, wie es unter Kapitel 2.6.2 beschrieben ist. Durch die Kombination mit PVP kann diese Aggregation beeinflusst werden. Die Silanolgruppen an der Partikeloberfläche binden mittels Wasserstoffbrücken an den elektronegativen inneren Amidgruppen der PVP-Seitenkette [41] (Abbildung 4.3). Die SiO_2 -Partikel können vollständig vom PVP-Molekül umgeben werden, sodass deren Aggregation verhindert wird.

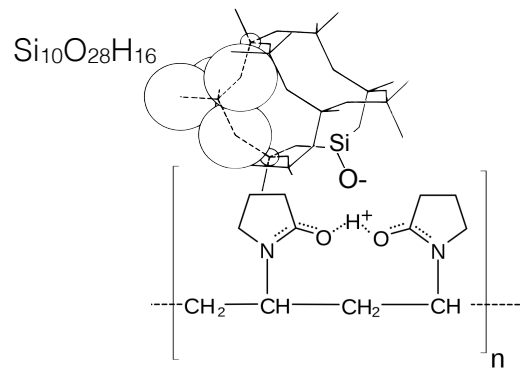


Abbildung 4.3.: Verbindung von SiO_2 mit PVP-Molekülen.

Wie stark der Sol-Gel-Übergang beeinflusst wird, hängt von der Partikel- und Polymerkonzentration ab. Bei beispielsweise niedrigen PVP-Konzentrationen werden weniger SiO_2 -Partikel eingehüllt. Die freien Partikel können weiterhin ungehindert miteinander aggregieren. Dieses soll verhindert werden, da vernetzte SiO_2 -Partikel geringere bioaktive Eigenschaften besitzen als unvernetzte Partikel [86]. Außerdem ist das SiO_2 -Gel ein sehr poröses Gel und zeigt keine viskoelastischen Eigenschaften. Dieses entspreche nicht den gestellten Anforderungen der Handhabbarkeit. Um das Vernetzen der Nanopartikel zu verhindern, müssen diese von ausreichend PVP-Molekülen umgeben sein. Dadurch können dann Gele entstehen, die eine höhere mechanische Stabilität aufweisen [41]. Die Primärpartikel aus dem SiO_2 -Sol haben eine durchschnittliche Größe von 1,3-1,6 nm [86], welches mittels SAXS-Untersuchungen bestimmt wurde. Durch die Kombination mit PVP kommt es zu einer Änderung des pH-Wertes und die Primärpartikel wachsen auf ca. 2-2,3 nm an. Die maximale Clustergröße wurde ebenfalls von Dietrich (2016) auf 4 nm bestimmt, welche sich bei geringen Partikelkonzentrationen und ausreichend hoher Polymerkonzentration nicht verändert, da alle SiO_2 -Aggregate von PVP umgeben sind.

Um die Freisetzung des SiO_2 aus dem Polymer-Nanokomposit noch weiter zu steuern, können diese Hydrogele durch Gammabestrahlung quervernetzt werden. Dadurch ergeben sich wiederum veränderte mechanische und biologische Eigenschaften, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollen.

4.2. Mechanische Eigenschaften

Um ein optimal klebriges, aber auch modellierbares Trägermaterial zu entwickeln, welches gute Handlungseigenschaften mit sich bringt, können verschiedene Untersuchungen zur Mechanik des Prüfmaterials durchgeführt werden. Im folgenden Abschnitt wurden verschiedene Komposite aus PVP, SiO_2 und Wasser bezüglich ihrer Elastizität und Viskosität analysiert, wobei der Effekt der Quervernetzung durch Gam-

mabestahlung ebenfalls untersucht wurde. Durch die Quervernetzung sollte eine höhere Stabilität des Gelnetzwerkes erreicht werden. Insbesondere der Vergleich von Speicher- und Verlustmodul der Proben vor und nach Gammabestahlung gibt Aufschluss über den Vernetzungsgrad. Auch die Abhängigkeit des Vernetzungsgrades von der Polymerkonzentration und der Nanopartikelkonzentration wurde so untersucht. Dabei war die maximale Nanopartikelkonzentration auf 5-5,8 wt.% limitiert, da das Sol einen maximalen Feststoffgehalt von 6 % besitzt und sich das PVP nicht direkt mit dem Sol vermischen lässt. Zusätzlich wird also immer eine geringe Menge Wasser benötigt. Für diese Arbeit wurden Proben mit 6 wt.%, 5 wt.%, 4 wt.%, und 3 wt.% PVP mit 3 wt.% bzw. 5 wt.% SiO₂ und Wasser (wt.% Rest) angefertigt. Die Bestandteile wurden zusammengegeben, kräftig geschüttelt und für 24 h kalt gestellt. Am nächsten Tag konnten die homogenen Lösungen für die verschiedenen Experimente verwendet werden. Die gleichen Ansätze wurden zur Gammabestahlung geschickt und nach der Quervernetzung auf gleiche Weise analysiert.

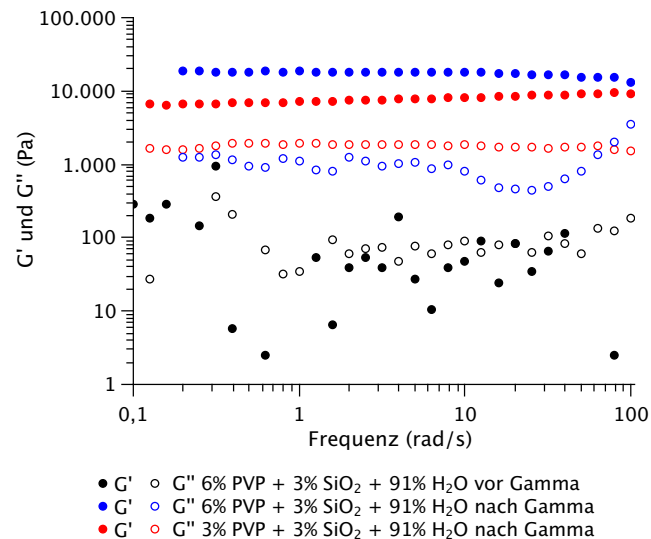
4.2.1. Rheologie

Mittels Oszillationsrheometer kann der Zusammenhang zwischen den mechanischen Eigenschaften und der Quervernetzung untersucht werden. Auch der Grad der Quervernetzung kann so ermittelt werden. Alle Proben wurden jeweils dreifach gemessen und der Mittelwert gebildet. Auf die Darstellung der Messabweichungen wurde verzichtet, da die Fehler innerhalb der Auflösungsgrenze des Gerätes lagen. Alle quervernetzten Proben wurden mit einer Bestrahlungsdosis von 25 kGy quervernetzt, sofern es nicht anders angegeben ist.

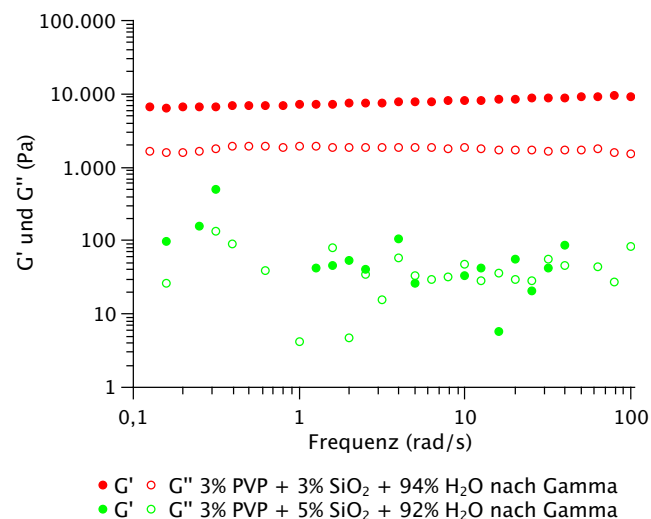
Zunächst wurden im FST die Speicher- und Verlustmodule der Proben bestimmt. Aus dem Verhältnis des Speichermoduls G' zum Verlustmodul G'' können Aussagen zur Vernetzung des Systems getroffen werden. Je größer G' gegenüber G'' ist, umso vernetzter ist das System.

Der Frequency Sweep Test wurde bei konstanten 22 °C und einer Scherrate von 1 s⁻¹ durchgeführt.

Die Abbildung 4.4 (a) zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf für eine 6 %ige PVP Probe in Kombination mit 3 wt.% SiO₂, vor der Quervernetzung (schwarz) und dieselbe Zusammensetzung nach der Quervernetzung mit Gammastrahlung (blau). Ebenso ist eine 3 %ige PVP Lösung mit 3 wt.% SiO₂ nach der Quervernetzung (rot) dargestellt. Vor der Gammabestahlung hat das System noch keine Quervernetzungen ausgebildet, welches an den diskontinuierlichen Verläufen von G' und G'' zu erkennen ist. Nach der Vernetzung mit Gammastrahlung ergeben sich für G' und G'' sehr lineare Kurvenverläufe. Für beide quervernetzten Proben ist G' größer als G'' , die Molküle



(a) Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') in Abhängigkeit von der PVP Konzentration und der Vernetzung, nicht quervernetzt (schwarz) und quervernetzt (blau, rot). Die SiO_2 -Konzentration ist konstant.



(b) Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') der quervernetzten Proben in Abhängigkeit von der SiO_2 Konzentration, 3 wt.% SiO_2 (rot) und 5 wt.% SiO_2 in (grün), die PVP-Konzentration ist konstant 3 wt.%.

Abbildung 4.4.: Frequency Sweep Test zur Bestimmung von Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') bei 22°C und einer Scherrate von 1 s^{-1} .

sind stark vernetzt und deren Bindung kann durch die Scherbelastung nicht getrennt werden. Die Differenz zwischen den beiden Modulen steigt mit zunehmender PVP-Konzentration, da mit ihr der Grad der Quervernetzung zunimmt. In der visuellen Kontrolle erschienen die quervernetzten Proben wie ein festes Gel. Die nicht quervernetzten Proben waren hingegen eher instabil, aber recht klebrig.

Des Weiteren wurde versucht durch Erhöhung der SiO_2 -Konzentration, bei konstanten

3 wt.% PVP, eine vergleichbare Vernetzung zu erreichen.

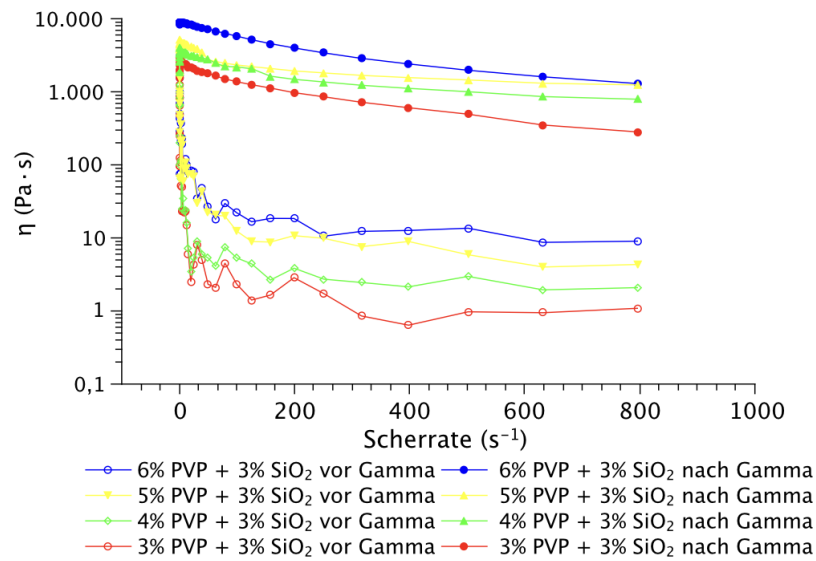
In der Abbildung 4.4 (b) ist das Ergebnis für die quervernetzte Probe aus 3 wt.% PVP und 5 wt.% SiO₂ (grün) im Vergleich zur quervernetzten Probe aus 3 wt.% PVP und 3 wt.% SiO₂ (rot) dargestellt. Da die SiO₂-Partikel ein eigenständiges Netzwerk ausbilden können, würde man auch hier eine erhöhte mechanische Stabilität erwarten. Bei der ersten visuellen Kontrolle zeigte die Probe ebenfalls eine gute Klebrigkeit und entsprechende Handlungseigenschaften. Dieser Eindruck verschwand aber nach kurzem Kneten in der Hand und die Probe begann zu zerfließen.

Durch die Messungen im FST konnte dieser Eindruck bestätigt werden. Die erhöhte SiO₂-Konzentration verhindert eine ausreichende Quervernetzung der PVP-Moleküle, bzw. aggregieren so viele SiO₂-Partikel miteinander, dass ein Gelnetzwerk aus SiO₂-Clustern entsteht, welches unter der Scherbelastung zusammenbricht. Dieses Verhalten spiegelt sich in dem diskontinuierlichen Verlauf der grünen Kurve in Abbildung 4.4 (b) wieder. Die verschiedenen mechanischen Eindrücke zwischen unvernetzten und quervernetzten Proben konnten durch den FST bestätigt werden und sollten durch ein weiteres rheologisches Experiment untersucht werden.

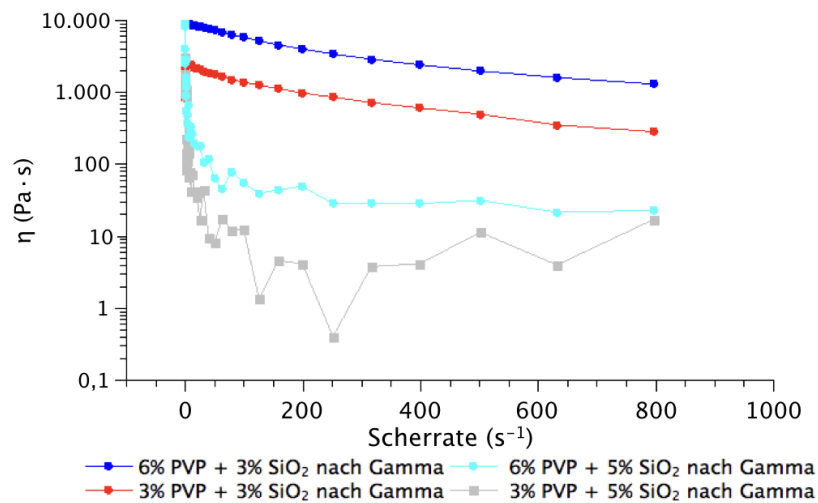
Die Messung der Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate gibt weitere Aufschlüsse über die molekulare Vernetzung der Hydrogele. Die Messung im SST-Verfahren wurde bei konstanten 22 °C und einer Frequenz von 6,82 rad/s durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.5 dargestellt. Alle Proben zeigen hier eine von der PVP-Konzentration abhängige Ausgangsviskosität (a), bei konstanter SiO₂-Konzentration. Für die quervernetzten Proben sind größere Viskositäten zu messen. Ebenso ist in dem Diagramm ein scherverdünnendes, pseudoplastisches Verhalten für alle Proben zu erkennen. Die Strukturviskosität der quervernetzten Proben ist deutlich geringer als die der nicht quervernetzten Proben. Dieses ist auf die starke Quervernetzung der PVP-Moleküle zurückzuführen.

Allgemein zeigen PVP-Lösungen zwischen 2 und 10 wt.% PVP-Anteil (nicht quervernetzt) ein starkes thixotropes Verhalten [17]. Für 3%ige und 6%ige PVP Proben konnte von Alsarra et al. (2011) gezeigt werden, dass nach der Quervernetzung mit Gammabestahlung (15 kGy und 20 kGy) nur eine geringe bis vernachlässigbare Thixotropie zu beobachten ist (3 wt.% PVP), bzw. sogar Rheopexie für die 6%igen PVP Proben auftritt. Nach der Quervernetzung ist die Beweglichkeit der Moleküle stark eingeschränkt und ein zerfließen findet nicht mehr statt [85]. Da die Ursachen für Thixotropie und Strukturviskosität ähnlich sind, ist die auftretende Veränderung der scherverdünnenden Fließeigenschaft auf die Quervernetzung zurückzuführen. Die hier noch beobachtbare Strukturviskosität, bei allen Proben, kann auch auf die

SiO₂-Partikel zurückgeführt werden. Kleinere fragile Netzwerke aus Nanopartikeln verursachen ein leichtes Fließverhalten des Systems.



(a) Bestimmung der Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate für verschiedene PVP Konzentrationen nicht quervernetzt (vor γ -Bestrahlung) und quervernetzt (nach γ -Bestrahlung)



(b) Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate. Die Erhöhung der SiO₂ Konzentration führt zu Gelbildung über SiO₂-Cluster. Alle Proben sind quervernetzt.

Abbildung 4.5.: Strain Sweep Test zur Bestimmung der Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate bei 22 °C und einer Frequenz von 6,82 rad/s.

Erhöht man die SiO₂-Konzentration, kann also eine zusätzliche Vernetzung des Systems über die Nanopartikel erreicht werden. Dadurch ergeben sich für quervernetzte Proben stärkere thixotrope Eigenschaften, wie sie in der Abbildung 4.5 (b) zu erkennen sind. Die hellblaue Kurve mit 6 wt.% PVP und 5 wt.% SiO₂ zeigt, dass bei der zunehmenden Scherbelastung das Gelnetzwerk zerstört wird und die Probe

in ein Fließverhalten übergeht. Dabei gehen vor allem die Nanopartikelstrukturen kaputt. Die Nanopartikel können jedoch nach Beendigung der Scherbeanspruchung wieder miteinander aggregieren und die Ausgangsviskosität des Systems wird wieder erreicht. Die gewünschte mechanische Stabilität kann dadurch nicht erreicht werden, da das Nanopartikelnetzwerk zu fragil ist und der Grad der Quervernetzung unter den PVP-Molekülen durch den erhöhten SiO_2 -Anteil zu gering ist. Als zweites wurde eine Probe mit 3 wt.% PVP mit 5 wt.% SiO_2 gemessen (graue Kurve Abb. 4.5 (b)). Bei dieser Probe war der Grad der Quervernetzung durch den niedrigen PVP-Gehalt nochmals geringer. Die Silicapartikel konnten leichter und vermehrt miteinander aggregieren und ein Netzwerk bilden. Diese Probe zeigt dementsprechend ein deutlicheres scherverdünnendes Verhalten und größere mechanische Instabilität als z. B. die vergleichbare rote Kurve mit weniger Nanopartikeln (3 wt.% PVP und 3 wt.% SiO_2).

Eine weitere Möglichkeit, um die Quervernetzung zu steuern, ist die Variation der Strahlungsdosis. Wie bereits im Kapitel 2.7 erwähnt, ist diese jedoch nur bedingt möglich, wenn gleichzeitig eine Sterilität des Produktes erreicht werden soll. Die Reduzierung der durchschnittlichen Strahlungsdosis auf 17,5 kGy erwies sich als machbar. Für die viskoelastische Analyse wurden daher 2 Proben mit unterschiedlichem PVP-Gehalt (3 bzw. 6 wt.%) in Kombination mit 3 wt.% SiO_2 (Rest H_2O) mit dieser Strahlungsdosis quervernetzt und im Oszillationsrheometer die Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate gemessen. In der Abbildung 4.6 sind die Ergebnisse dieser Messung dargestellt. Um die Abhängigkeit der Quervernetzung von der Strahlungsdosis zu untersuchen, wurden ebenfalls die Daten der nicht bestrahlten Proben (0 kGy) und der voll bestrahlten Proben (25 kGy) abgebildet.

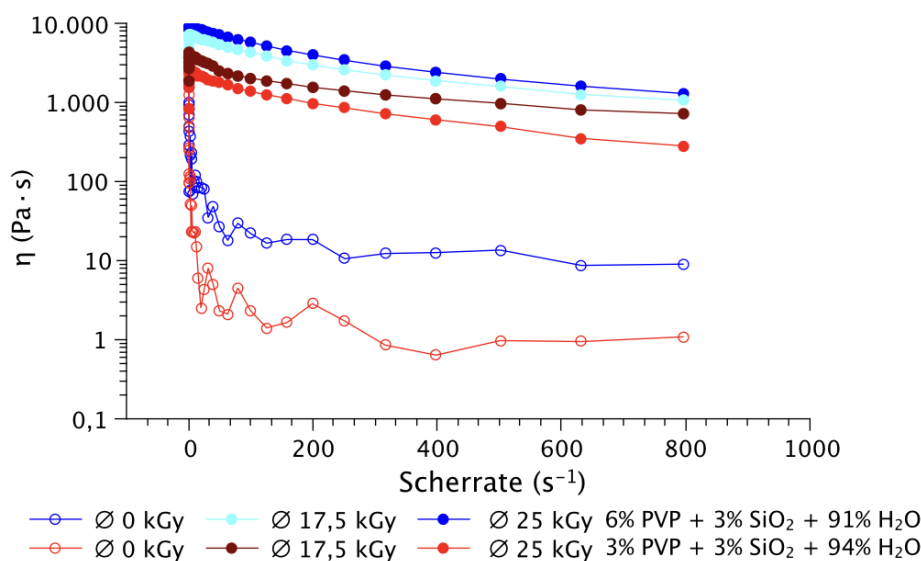


Abbildung 4.6.: Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate bei unterschiedlichen Strahlungsdosen (0 kGy, 17,5 kGy, 25 kGy).

Während die beiden unbestrahlten, nicht quervernetzten Proben ein starkes scherverdünnendes Verhalten zeigen und damit die geringste mechanische Belastbarkeit aufweisen, sind die bestrahlten, quervernetzten Proben nur gering strukturviskos und formstabil. Für die 6 wt.% PVP sind keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von den angewandten Strahlungsdosen erkennbar.

Bei der 3 %igen PVP-Probe ist bei der geringeren Strahlungsdosis eine höhere Viskosität beobachtbar. Dieses kann aber nicht auf eine stärkere Vernetzung zurückzuführen werden. Vor der Messung wurden die Proben optisch begutachtet und es fiel auf, dass sich bei der 3 %igen PVP-Probe fast 45 wt.% des Wassers oberhalb des quervernetzten Gels abgesetzt hatten. Da nur das quervernetzte Probenmaterial gemessen wurde, muss man diesen Anteil abziehen und die Feststoffanteile korrigieren. Damit erhöht sich die PVP-Konzentration der Probe im quervernetzten Anteil auf 5,4 wt.%. Die Strahlungsdosis von 17,5 kGy in Kombination mit 3 wt.% PVP reicht nicht aus, um eine hinreichende Quervernetzung zu erreichen. Die hier gemessene Probe könnte man mit der quervernetzten 5 %igen Probe aus Abbildung 4.5 (a) vergleichen. Zwischen ihnen gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Ansatz mit der verringerten Strahlungsdosis für das Trägermaterial auf PVP-Basis nicht weiter verfolgt. Die weiteren Analysen wurden mit Proben durchgeführt, welche mittels 25 kGy quervernetzt wurden.

4.3. Struktur des Trägermaterial-Granulat-Komposits

Um eine applizierbare und funktionsfähige Putty zu entwickeln, wurde die Kombination von 6 wt.% PVP bzw. 3 wt.% PVP und 3 wt.% SiO₂ für das Trägermaterial ausgewählt, um es mit dem Biomaterial NB Granulat S39 zu kombinieren. Die Variation der SiO₂-Konzentration erwies sich in der Voruntersuchung als nicht geeignet, da eine Vernetzung der Nanopartikel auftritt, welche zu fragilen mechanischen Eigenschaften führte.

Der Fokus für die weiteren Untersuchungen lag auf den quervernetzten Trägermaterialien, da hier der Effekt der Sterilität durch Gammabestrahlung genutzt werden kann. Als nicht quervernetzte Kontrollgruppe wurde ausschließlich die NB Putty verwendet (Putty A). Ihr Trägermaterial besteht aus 6 wt.% PVP, 3 wt.% SiO₂ und 91 wt.% H₂O und ihre Sterilität wird über ein Autoklaviervverfahren erreicht. Ausgehend von dieser Kontrollgruppe wurde ein Komposit gleicher Zusammensetzung, in Kombination mit dem NB Granulat S39, quervernetzt und getestet (Putty B). Die Verringerung der PVP Konzentration zeigte in den rheologischen Messungen keine signifikanten Unterschiede. Daher wurde als eine weitere Variante nur die PVP Konzentration von 3 wt.% in Kombination mit 3 wt.% SiO₂ getestet (Putty C).

Neben dem Auflöseverhalten der quervernetzten Proben im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um strukturelle Unterschiede im Mikro- und Nanobereich zu analysieren.

4.3.1. Auflösverhalten im Medium

Ein Ziel bei der Entwicklung eines modellierbaren Trägermaterials ist die Formbeständigkeit des zu applizierenden Produktes in der Defektregion. Dieses bedeutet vor allem, dass sich die Putty nicht sofort auflösen darf damit sie z. B. bei starken Blutungen nicht aus dem Defektbereich gespült wird. Dazu wurden je $1,00 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ der oben genannten ausgewählten Materialkombinationen in 7ml simulierter Körperflüssigkeit (SBF) bei 37°C inkubiert. Nach den Zeitpunkten $t = (1, 10, 15, 30, 45, 60, 90)$ min wurde das Material aus der SBF-Lösung entnommen und das Gewicht der verbleibenden Putty bestimmt. Entscheidend war dabei der Anteil an zusammenhängendem Material. Abgelöste Fragmente wurden nicht mehr mit einbezogen. Alle Putties wurden in dreifacher Wiederholung bezüglich ihres Lösungsverhalten beobachtet und die verbleibende Masse des ungelösten Materials bestimmt. Die Abbildung 4.7 zeigt die prozentuale Mengenabnahme der Putties mit der Zeit.

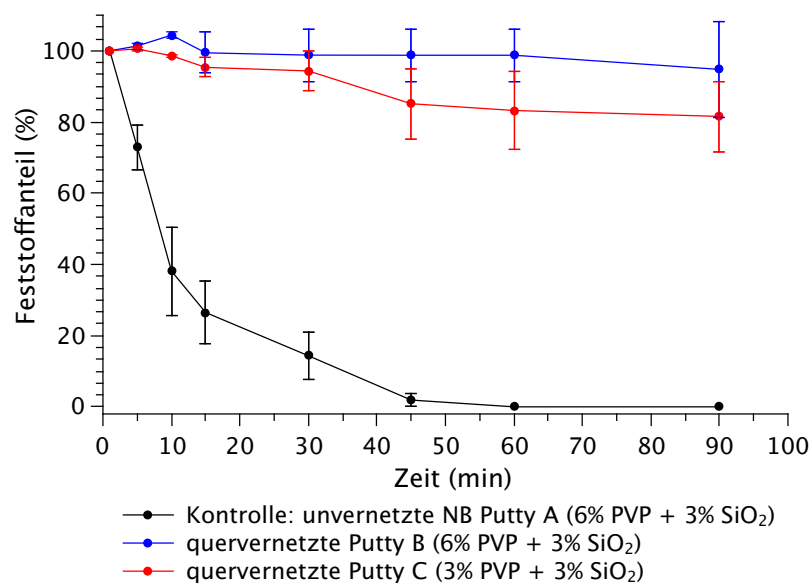


Abbildung 4.7.: Löslichkeit bei 37°C der verschiedenen PVP Putties in simulierter Körperflüssigkeit

Die Kontrollgruppe, nicht quervernetzte Putty A, zeigt eine schnelle Abnahme des zusammenhängenden Feststoffanteils (schwarze Kurve). Diese Kontrollgruppe würde dementsprechend aus einem stark blutenden Defekt herausgespült werden. Zwischen der Kontrollgruppe und den beiden quervernetzten Putties ist ein signifikant hoher Unterschied festzustellen. Die quervernetzte Putty B verlor fast gar kein Gewicht (blaue

Kurve, 6 wt.% PVP + 3 wt.% SiO₂) und die Putty C nur sehr wenig (rote Kurve, 3 wt.% PVP + 3 wt.% SiO₂). Der Unterschied zwischen den beiden quervernetzten Putties ist nicht signifikant. Der Löslichkeitsversuch bestätigt damit die deutlich schlechteren Resultate aus den rheologischen Untersuchungen für nicht quervernetzte Proben.

4.3.2. Rasterelektronenmikroskopie und Elementaranalyse

Für die Wirksamkeit des Knochenersatzmaterials ist es besonders wichtig, dass das verwendete Trägermaterial dessen Struktur im wesentlichen nicht beeinflusst. Das verwendete NB Granulat S39 besitzt durch seine hohe Porosität eine große innere Oberfläche mit ca. 206,8 m²/g. Ein Eindringen des Polymers könnte eventuell dazu führen, dass die Anlagerung von Zellen verhindert oder verzögert wird.

Da PVP in Lösungen als Knäuel, mit Knäueldurchmessern zwischen 1 und 100 nm vorliegt [87], könnte es theoretisch in die durchschnittlich 16 nm großen Poren des Granulates eindringen. Bei der Herstellung der Putty wurde das Granulat zuvor mit etwas SiO₂-Sol getränkt, welches gelierte und somit die Poren des Granulates füllte. Somit konnten auch Lufteinschlüsse vermieden werden. Um das Granulat herum entstand eine Hydrogelhülle. Die Wechselwirkung der Hydrogelhülle mit dem restlichen Trägermaterial sollte durch die Elementaranalyse untersucht werden und ob das Polymer in die Poren eingedrungen war bzw. ob es an der Oberfläche des Granulates anhaftete.

Zunächst wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von den gefrietrockneten Putties angefertigt, um das unterschiedliche Erscheinungsbild des Trägermaterials beim Autoklavieren und beim Gammabestrahlen zu untersuchen. Die Abbildung 4.8 zeigt, dass das quervernetzte Trägermaterial das Granulat deutlich kompakter umschließt (b) als bei der autoklavierten Putty (a). Ob diese kompaktere Hülle durch die Quervernetzung auch allgemein einen Einfluss auf die Bindung des Trägermaterials an das Granulat hat, wurde durch die Elementaranalyse bestimmt.

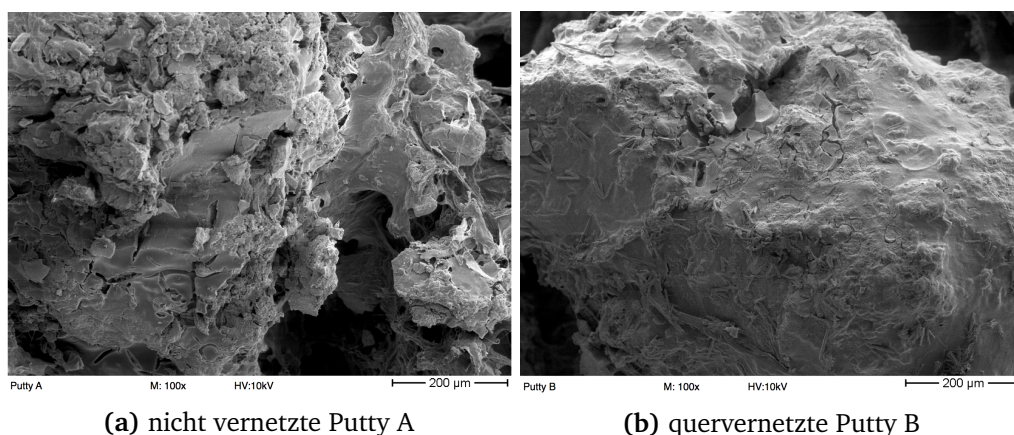


Abbildung 4.8.: REM Aufnahmen der gefrietrockneten Putties. 100 x, Maßstab 200 µm.

Jeweils 4 Proben jeder Gruppe wurden vom Institut für Chemie an der Universität Rostock mittels Elementaranalyse untersucht. Die autoklavierte Putty A, die mit Gamma quervernetzte Putty B und das reine NB Granulat S39 wurden ausreichend mit entionisiertem Wasser gepült, anschließend getrocknet und der elementare Kohlenstoffgehalt bestimmt. Ein erhöhter Kohlenstoffgehalt würde auf Polymerreste im oder an der Oberfläche des Granulats deuten. Die Ergebnisse der Elementaranalyse sind in der Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1.: Ergebnisse Elementaranalyse

Probe	Elementarer Kohlenstoff C [%]				Mittelwert \pm SD
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	
NB S39	0,048	0,056	0,051	0,065	0,0528 % \pm 0,004 %
Putty A	0,052	0,046	0,061	0,056	0,0538 % \pm 0,006 %
Putty B	0,059	0,064	0,055	0,048	0,0565 % \pm 0,007 %

Der gemessene Kohlenstoffgehalt ist für alle Gruppen verschwindend gering und beide gepülten Putties zeigen keinen signifikant höheren Kohlenstoffgehalt als das reine NB S39. Weder das autoklavierte, noch das quervernetzte PVP dringt dementsprechend in die Poren ein bzw. sind nach dem Spülvorgang noch an der Oberfläche angelagert.

4.4. Tierexperimentelle Studie

4.4.1. *in vitro* Ergebnisse

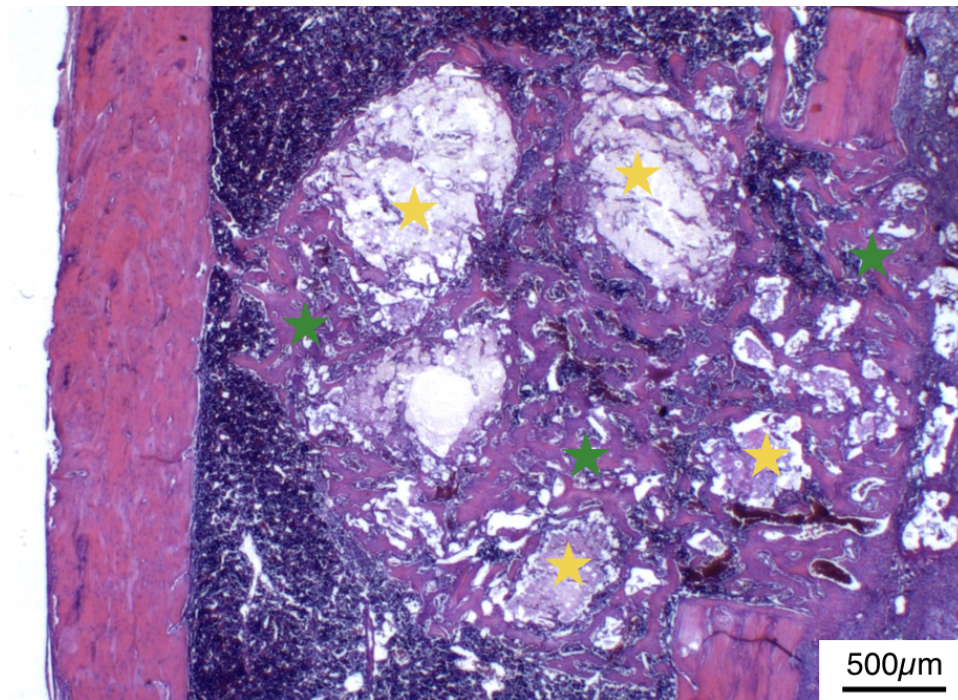
In den toxikologischen Voruntersuchungen wurden keine Auffälligkeiten beobachtet. Die Zellaktivität auf der nicht quervernetzten Putty A und der quervernetzten Putty B aus dem XTT Test lag überhalb der festgelegten Grenze von 70 % . Ein Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden. Die Differenzen lagen innerhalb des Messfehlers. Beide Putties sind demnach nicht toxisch und können ohne weitere Bedenken in einem Tiermodell getestet werden.

4.4.2. Histologische Evaluierung

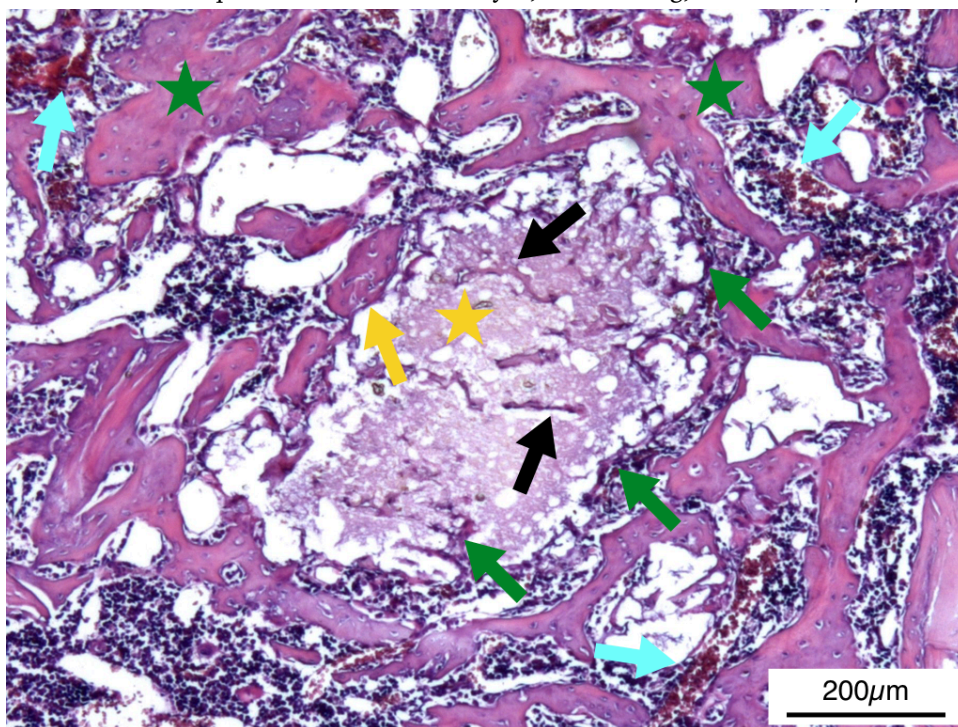
Für die Putties basierend auf einem PVP-Trägermaterial wurde das unter Kapitel 3.9 beschriebene Tiermodell mit Wistar Ratten gewählt, um die biologische Wirksamkeit der Produkte *in vivo* zu testen. Für die Funktionsfähigkeit der Materialien ist entscheidend, wie gut das verwendete Biomaterial resorbiert wird und wie schnell der Defekt

durch Knochenneubildung geschlossen werden kann. Die nicht quervernetzte Putty A und die quervernetzte Putty B wurden in einen Tibiadefekt implantiert. Nach den Standzeiten von 12, 21 und 63 Tagen wurden die Explantate, wie zuvor beschrieben, für die weiteren Untersuchungen präpariert und histologisch begutachtet.

Die folgende Abbildung 4.9 zeigt das HE gefärbte Präparat der nicht quervernetzten Putty nach 12 Tagen. In der Abbildung 4.9 (a) kann man den gesamten Defektbereich in der Tibia der Ratte erkennen. Der Röhrenknochen ist mit dem Biomaterial gefüllt (gelbe Sterne), wobei nach 12 Tagen bereits neu gebildeter Knochen (grüne Sterne) und Bindegewebe zwischen den Granulatkörnern zu erkennen ist. Das verwendete Trägermaterial ist nach 12 Tagen vollständig resorbiert und in den histologischen Präparaten nicht mehr nachweisbar. Dieses spricht für eine sehr gute Vaskularisierung des Defektbereiches, welche insbesondere durch die lockere Anordnung des Granulates im Trägermaterial erreicht werden kann. Die sehr gute Vaskularisierung wird in der vergrößerten Ansicht des Defektes in Abbildung 4.9 (b) besonders deutlich. Die blauen Pfeile markieren die großen Blutgefäße, welche sich zwischen Knochen und Biomaterial befinden. Ebenso ist gut zu erkennen, dass das Biomaterial von Knochen und Gewebe durchsetzt ist (schwarze Pfeile), an den Granulaträndern lassen sich Osteoklasten beobachten (grüne Pfeile), welche für den Abbau von Knochen und Biomaterial zuständig sind. Ebenso lassen sich in der Nähe des Granulates und an der Oberfläche des neu gebildeten Knochens Osteoblastensäume beobachten (gelbe Pfeile), die an dieser Stelle neuen Knochen bilden. Nach 12 Tagen lässt sich bereits der Matrixwechsel beobachten.



(a) Gesamter Defektbereich in der Tibia der Ratte, 12 Tage nach der Implantation mit der nicht quervernetzten PVP Putty A, HE Färbung, Maßstab 500 μm



(b) Vergrößerter Defektbereich, 12 Tage nach der Implantation mit der nicht quervernetzten PVP Putty A, HE Färbung, Maßstab 200 μm

Abbildung 4.9.: Histologische Aufnahmen der nicht quervernetzten PVP Putty A, HE Färbung. Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, gelbe Pfeile - Osteoblastensäume, grüne Pfeile - Osteoklasten, schwarze Pfeile - Gewebestraßen, blaue Pfeile - Blutgefäße.

Der gesamte Remodeling Prozess, also die Umwandlung des synthetischen Hydroxylapatits in Knochen, ist nach 63 Tagen deutlich fortgeschrittener, wie es in der Abbildung 4.10 zu erkennen ist. Die Kortikalis ist nach diesem Zeitraum bereits geschlossen, sodass der Defektbereich dadurch Stabilität erreicht. Das Biomaterial wird weiterhin durch Osteoklasten resorbiert. Der im Markraum nicht benötigte Knochen wird langsam wieder abgebaut und durch Weichgewebe und Knochenmark ersetzt.

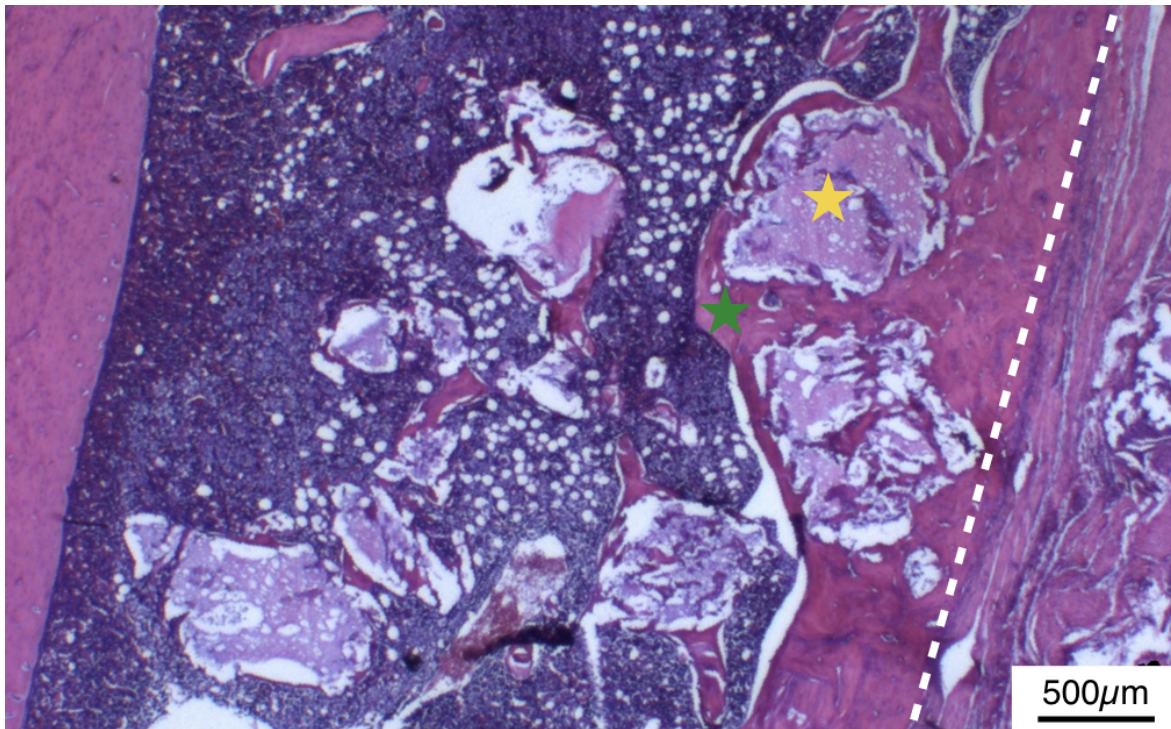


Abbildung 4.10.: Gesamter Defektbereich in der Tibia der Ratte, 63 Tage nach der Implantation mit der nicht quervernetzten PVP Putty A, HE Färbung, Maßstab 500 μm . Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, weiß gestrichelte Linie zeigt die geschlossene Kortikalis.

Vergleichend zu dieser histologischen Bewertung zeigen sich für die quervernetzte Putty ähnliche Ergebnisse nach den verschiedenen Standzeiten. Bereits nach 12 Tagen ist auch hier der Defektbereich gut vaskularisiert, Gewebe und Knochen durchsetzen das implantierte Material.

Der Umbauprozess ist zu allen Versuchszeiten erkennbar, der Matrixwechsel des Granulates ist mit zunehmender Standzeit fortgeschrittener. Das Biomaterial wird von Osteoklasten abgebaut und neuer Knochen durch Osteoblasten gebildet. Dennoch gibt es zu der nicht vernetzten Putty einen signifikanten Unterschied. Zu allen Versuchszeiten ist das Trägermaterial großflächig im Defektbereich nachweisbar. Problematisch wird dieses besonders für das Zuwachsen der Kortikalis, wie es auch in der Abbildung 4.11 zu erkennen ist. Die vollständige Defektheilung, die eine geschlossene Kortikalis erfordert, wird massiv durch das nur sehr langsam resorbierte quervernetzte

Trägermaterial gehemmt. Im kortikalen Defektbereich entsteht zu wenig stabilisierender Knochen, so dass es unter Umständen auch später zu Frakturen kommen kann. Eine geschlossene Kortikalis, ohne großflächige Trägermaterialreste im kortikalen Defektbereich, konnte innerhalb der 63 Tage nicht beobachtet werden.

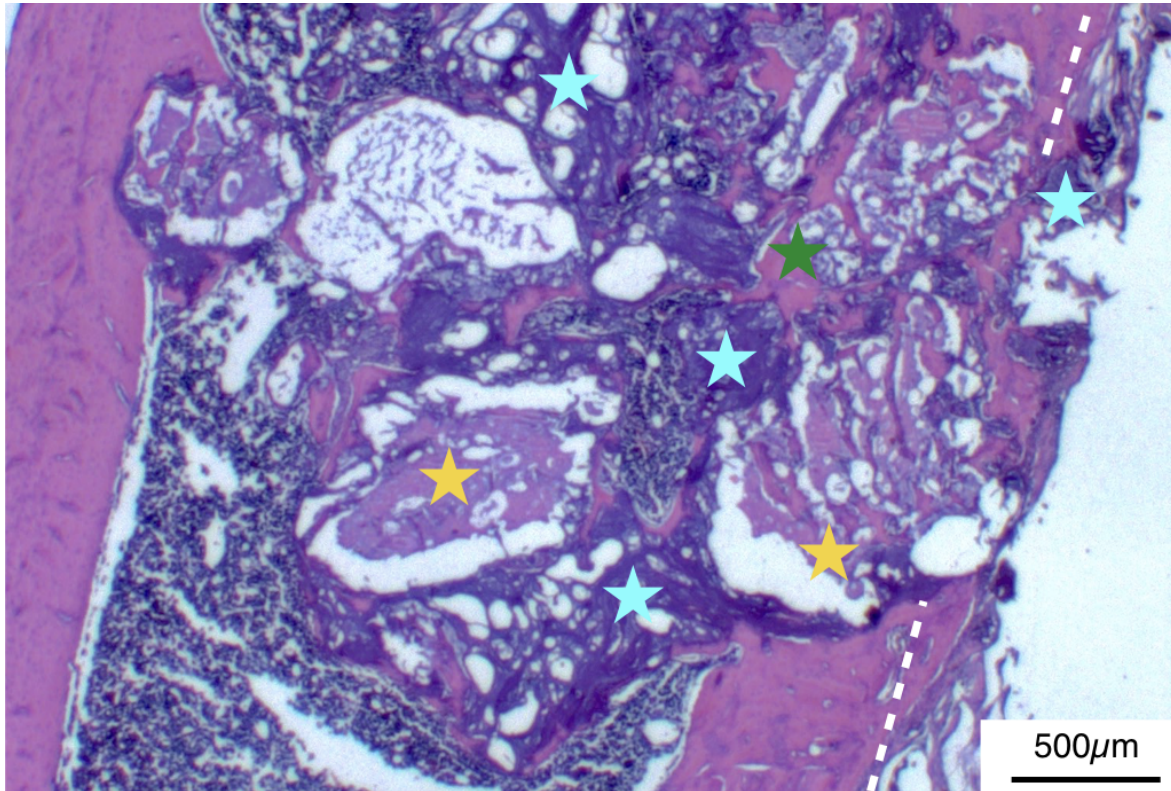


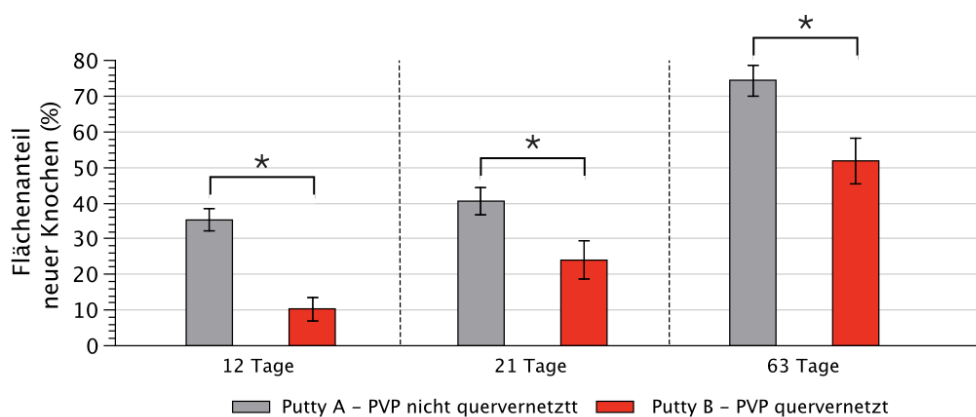
Abbildung 4.11.: Gesamter Defektbereich in der Tibia der Ratte, 63 Tage nach der Implantation mit der quervernetzten PVP Putty B, HE Färbung, Maßstab 500 μm . Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial (Granulat), blaue Sterne - quervernetztes Trägermaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, unterbrochene weiß gestrichelte Linie deutet auf die noch nicht geschlossene Kortikalis.

4.4.3. Histomorphometrie

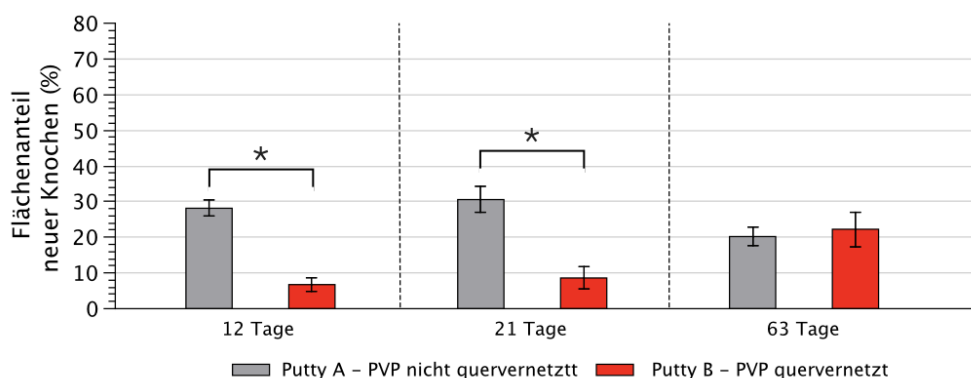
Um die quantitativen Unterschiede in der Knochenneubildung und im Abbau des Biomaterials (Granulat und Trägermaterial) zu bestimmen, wurde eine histomorphometrische Analyse durchgeführt. Die Flächenanteile an neugebildetem Knochen und Biomaterial im Verhältnis zum gesamten Defektbereich wurden wie unter Kapitel 3.8.5 ermittelt und miteinander verglichen. Der gesamte Defektbereich wurde dabei in die beiden Bereiche Markraum und kortikaler Defektbereich unterteilt. Beide Bereiche stellen nämlich unterschiedliche Anforderungen an das Biomaterial. Während zunächst neuer Knochen im gesamten Defektbereich gebildet wird, muss dieser im Markraum wieder abgebaut werden. Die Diaphyse enthält nur Knochenmark, welches für die Blutbildung des gesamten Organismus zuständig ist.

Durch die Unterteilung des Defektbereiches in der histomorphometrischen Analyse soll der Abbau des neuen Knochens im Markraum untersucht werden. Ebenso kann im kortikalen Defektbereich der notwendige Knochenaufbau verfolgt werden. Theoretisch könnte der Anteil an neu gebildeten Knochen im kortikalen Defektbereich 100% betragen. Diese 100% wurden aber im Rahmen des Experiments nicht beobachtet, da bei den Untersuchungszeiträumen auch das Biomaterial noch nicht vollständig abgebaut war und auch Knochenvorläuferzellen nicht mit berechnet wurden.

Der Abbau des Biomaterials ist im gesamten Defektbereich erwünscht. In der Abbildung 4.12 sind die histomorphometrischen Daten zur Knochenneubildung der nicht quervernetzten Putty A (grau) und der quervernetzten Putty B (rot) dargestellt. Im Diagramm (a) sind die Daten des kortikalen Defektbereiches abgebildet, im Diagramm (b) sieht man die Daten für den Markraum.



(a) Kortikaler Defektbereich



(b) Markraum

Abbildung 4.12.: Histomorphometrie: Flächenanteile des neu gebildeten Knochens in der Kortikalis und im Markraum, grau - nicht quervernetzte Putty A, rot - quervernetzte Putty B

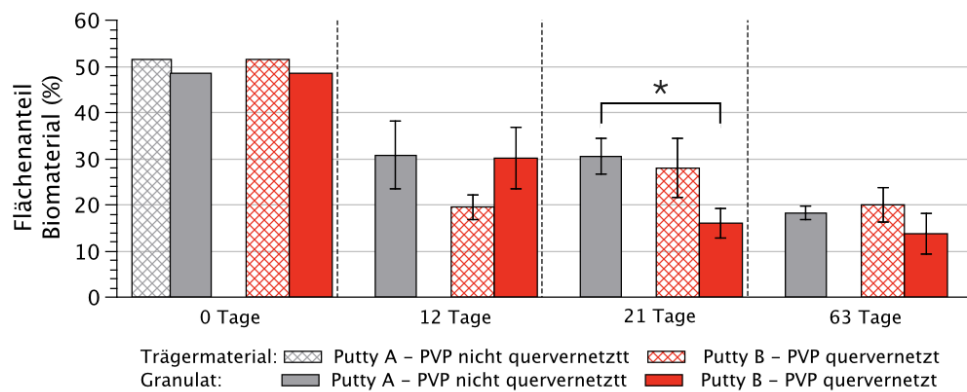
Im kortikalen Defektbereich (Abbildung 4.12 (a)) ist zu erkennen, dass für beide Gruppen der Flächenanteil an neu gebildetem Knochen stetig zunimmt, wobei die

nicht quervernetzte Putty A signifikant mehr Knochen zu jedem Zeitpunkt aufweist als die quervernetzte Putty B. Wie aus der histologischen Bewertung bereits hervor ging, ist bei der nicht vernetzten Putty A nach 63 Tagen die Kortikalis geschlossen, dieses lässt sich auch durch den bereits sehr hohen prozentualen Flächenanteil an Knochen mit durchschnittlich 74,44 % bestätigen. Die restlichen 25 % setzen sich aus noch verbleibenden Granulat und Weichgewebe zusammen, welches sich aber noch im Remodelling-Prozess befindet. Eine ausreichende Stabilität des Defektes kann nach 63 Tagen für die nicht quervernetzte Putty angenommen werden. Für die quervernetzte Putty B lässt sich hingegen nach 63 Tagen erst ein durchschnittlicher Knochenanteil von 51,83 % beobachten. Das der restliche Anteil des kortikalen Defektbereiches besteht überwiegend aus einem großen Anteil an Trägermaterial und Granulat. Im Markraum (Abbildung 4.12 (b)) lässt sich ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden PVP Gruppen erkennen. Die nicht quervernetzte Putty A erreicht zu früheren Zeitpunkten signifikant höhere Werte beim Knochenanteil, als die quervernetzte Putty B (12 und 21 Tage). Ebenso ist bei der nicht quervernetzten Putty A bereits ein Rückgang des Knochenanteils nach 63 Tagen zu erkennen, da Markraum keine Verwendung für ihn besteht. Bei der quervernetzten Putty B ist ein Anstieg des Knochenanteils nach 63 Tagen im Markraum zu beobachten.

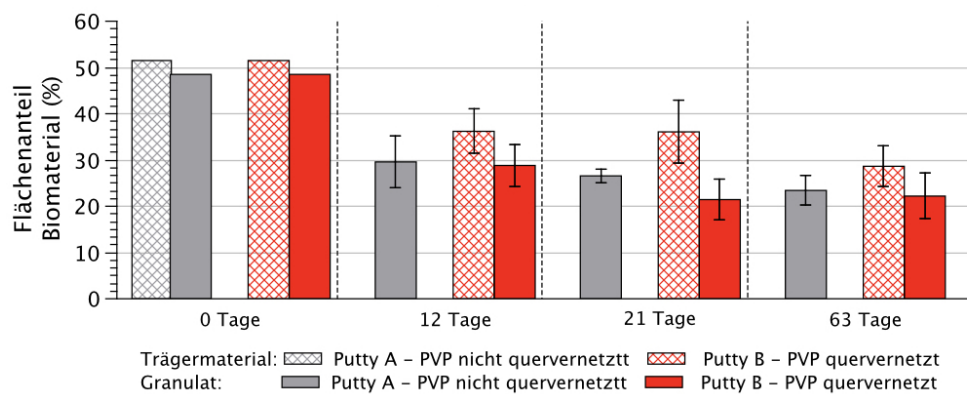
Um die Anteile des verbleibenden Biomaterials zu bestimmen, wurden zunächst die Volumenanteile an Trägermaterial und Granulat aus der Zusammensetzung der Putty berechnet. Daraus konnten Flächenanteile bestimmt werden wie sie zum Zeitpunkt 0 vorliegen, wenn der Defekt komplett mit dem Knochenersatzmaterial ausgefüllt ist. Da sich die beiden Putties lediglich darin unterscheiden, ob sie quervernetzt werden oder nicht, sind die Anteile bei beiden Gruppen identisch. Sowohl die nicht quervernetzte Putty A, als auch die quervernetzte Putty B bestehen zu 48,5 % aus Granulat und zu 51,5 % aus Trägermaterial. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.13 dargestellt ((a) kortikaler Defektbereich und (b) Markraum).

Wie auch aus der histologischen Bewertung hervorging, ist in der Histomorphometrie kein Trägermaterial für die nicht quervernetzte Putty A zu messen. Das nicht quervernetzte PVP wird innerhalb der ersten 12 Tage vollständig im gesamten Defektbereich resorbiert. Bei der quervernetzten Putty B konnte zu jedem Zeitpunkt ein Flächenanteil für das verbleibende Trägermaterial gemessen werden. Aus der histomorphometrischen Analyse des gesamten Defektbereiches geht hervor, dass die quervernetzte Putty B aber größere Abbauraten für das Granulat zeigt, als Putty A. (Die Abbauraten sind in Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt)

Im kortikalen Defektbereich (Abbildung 4.13 (a)) lässt sich nach 12 Tagen ein gleich großer Abbau des Granulates für beide Gruppen feststellen. Nach 21 Tagen ist der Anteil des verbleibenden Granulates in der quervernetzten Putty sogar signifikant



(a) Kortikalis



(b) Markraum

Abbildung 4.13.: Histomorphometrie: Flächenanteile des noch vorhandenen Biomaterials (gekreuzt - Trägermaterial, gefüllt - Granulat) in der Kortikalis und im Markraum, grau - nicht quervernetztes Putty A, rot - quervernetztes Putty B

geringer als bei der nicht quervernetzten Putty A, jedoch scheint hier das Granulat von durchschnittlich mehr Kleber umgeben zu sein. Nach 63 Tagen gibt es keine signifikanten Unterschiede im Anteil des nicht resorbierten Granulats in beiden Gruppen. Die Abbauraten des Granulats, verglichen zum Ausgangswert, sind nahezu identisch. Nachteilig für die quervernetztes Putty B ist jedoch, dass das vorhandene Trägermaterial auch nach 63 Tagen nicht vollständig abgebaut werden konnte. Der Anteil des quervernetzten Trägermaterials reduziert sich durchschnittlich um 31,5% im Vergleich zum Tag 0 (mit Ausnahme des 21 Tage Wertes). Die Verbleibenden 20% des Trägermaterials innerhalb der Kortikalis können jedoch zu unerwünschten Instabilitäten bis hin zu Frakturen führen. Dieses gilt es bei der Bewertung der Funktionsfähigkeit der quervernetzten Putty B zu berücksichtigen.

Im Markraum (Abbildung 4.13 (b)) sind statistisch keine signifikanten Unterschiede zwischen der nicht quervernetzten und der quervernetzten Putty zu erkennen. Im Vergleich zum kortikalen Defektbereich konnte im Markraum keine signifikante Änderung in der Resorption des Granulats gemessen werden. Beim Trägermaterial

konnte für die nicht quervernetzte Putty kein verbleibender Anteil bestimmt werden, wie auch im kortikalen Defektbereich. Der Abbau des quervernetzten Trägermaterials (Putty B) ist im Markraum nach 12 Tagen signifikant geringer als in der Kortikalis. Bei 21 und 63 Tagen wurde geringfügig mehr Trägermaterial im Markraum als in der Kortikalis gemessen.

In der nachfolgenden Tabelle 4.2 sind alle Flächenanteile des neu gebildeten Knochens, des verbleibenden Trägermaterials und des nicht resorbierten Granulates für die nicht quervernetzte Putty A und für die quervernetzte Putty B dargestellt. Neben der Unterteilung in den kortikalen Defektbereich und Markraum sind auch die Flächenanteile für den gesamten ausgewerteten Defekt gegeben. Am kritischsten ist das im Defekt verbleibende Trägermaterial bei der quervernetzten Putty B zu bewerten. Ob die überwiegend signifikant geringere Knochenneubildung bei der quervernetzten Putty B auf einen zeitlich verzögerten Matrixwechsel zurückzuführen ist und ob dieser eventuell durch das Trägermaterial beeinflusst wurde, muss im Weiteren untersucht werden.

Tabelle 4.2.: Histomorphometrische Daten

Gesamter Defekt						
	Knochen in %		Granulat in %		Trägermaterial in %	
	A	B	A	B	A	B
0 Tage	0	0	48,5	48,5	51,5	51,5
12 Tage	30,65 ± 2,19	8,09 ± 2,30	30,20 ± 4,67	28,88 ± 4,21	0	30,13 ± 3,39
21 Tage	32,64 ± 2,49	14,29 ± 3,63	27,77 ± 1,62	19,44 ± 2,89	0	32,95 ± 6,39
63 Tage	38,37 ± 2,43	33,08 ± 4,93	21,02 ± 2,37	19,17 ± 4,37	0	25,52 ± 3,84
Kortikaler Defekt						
	Knochen in %		Granulat in %		Trägermaterial in %	
	A	B	A	B	A	B
0 Tage	0	0	48,5	48,5	51,5	51,5
12 Tage	35,26 ± 3,13	10,34 ± 3,30	30,70 ± 7,35	30,11 ± 6,75	0	19,54 ± 2,70
21 Tage	40,54 ± 3,76	23,99 ± 5,29	30,48 ± 3,85	16,03 ± 3,13	0	27,95 ± 6,47
63 Tage	74,44 ± 4,32	51,83 ± 6,50	15,86 ± 2,63	13,74 ± 4,41	0	20,00 ± 3,65
Markraum						
	Knochen in %		Granulat in %		Trägermaterial in %	
	A	B	A	B	A	B
0 Tage	0	0	48,5	48,5	51,5	51,5
12 Tage	28,14 ± 2,17	6,75 ± 1,83	29,59 ± 5,51	28,82 ± 4,63	0	36,20 ± 4,86
21 Tage	30,57 ± 3,71	8,60 ± 3,06	26,56 ± 1,54	21,44 ± 4,46	0	36,08 ± 6,85
63 Tage	20,21 ± 2,56	22,26 ± 4,85	23,41 ± 3,14	22,20 ± 4,87	0	28,64 ± 4,47

4.5. Matrixwechsel

Im vorherigen Abschnitt wurden die histologischen Unterschiede zwischen der nicht quervernetzten Putty A und der quervernetzten Putty B beschrieben und histomorphometrisch ausgewertet. Um den Einfluss der beiden Trägermaterialien auf den Matrixwechsel zu untersuchen, werden in diesem Abschnitt die histologischen Präparate mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Dafür wurden die Schnittpräparate auf Kunststoffobjektträger aufgebracht und nicht angefärbt, um sie für die REM Analyse weiter präparieren zu können.

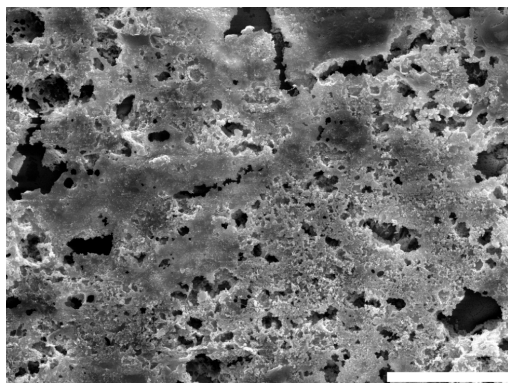
Der Matrixwechsel ist, wie bereits im Kapitel 2.6.3 beschrieben, ein Schlüsselmechanismus, bei dem die synthetische SiO_2 -Matrix durch eine körpereigene organische Matrix ausgetauscht wird. Den Fortschritt des Matrixwechsels kann man qualitativ am SiO_2 -Gehalt der Probe beurteilen. Je mehr SiO_2 noch vorhanden ist, umso schuppiger erscheint die Struktur des Granulates, da die Silicamatrix sehr spröde ist. Beim Schneiden der histologischen Präparate kommt es dann zu dieser Struktur. Mit der Zeit nimmt der SiO_2 -Gehalt ab und die Fläche wird ebenmäßiger. Dieser Übergang kann besonders gut mit dem REM beobachtet werden. Dazu wurden die Proben aus der tierexperimentellen Studie mit einer 3 nm dünnen Palladium-Goldschicht besputtert. Neben den topographischen Abbildungen können im REM mittels EDX-Analyse auch lokale Elementzusammensetzungen ermittelt werden.

An jeweils 5 Positionen je Präparat wurden die EDX-Spektren aufgezeichnet, so dass der zeitliche Verlauf der SiO_2 -Abnahme für die verschiedenen Trägermaterialien untersucht werden konnte. Die genaue biologische Wirkungsweise des SiO_2 für den Knochenaufbau wurde bereits im Kapitel 2.5 ausführlich beschrieben. Sollte das quervernetzte Trägermaterial die Freisetzung des SiO_2 verzögern, könnte dieses die geringere Knochenneubildung bei der Putty B begründen.

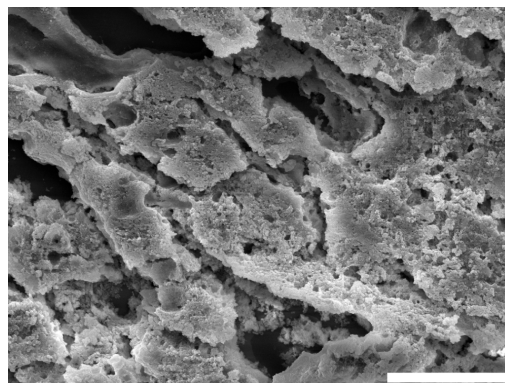
In der Abbildung 4.14 sind REM Aufnahmen der nicht quervernetzten Putty A (a, c, e) und der quervernetzten Putty B (b, d, f) dargestellt. Hier lässt sich bereits ein erster Eindruck bezüglich des Matrixwechsels gewinnen. Die SiO_2 -haltigen Proben sind durch eine schuppige Oberflächenstruktur erkennbar.

Zwischen der nicht quervernetzten Putty A und der quervernetzten Putty B sind zeitliche Unterschiede im Matrixwechsel zu erkennen. Nach 12 Tagen ist für beide Gruppen eine lockere SiO_2 -Matrix erkennbar. Bei der Putty B ist eine deutliche schuppige Struktur erkennbar, für die nicht quervernetzte Gruppe ist diese nur noch angedeutet erkennbar. Die Putty A enthält nach 12 Tagen weniger SiO_2 als die Putty B. Nach 21 Tagen ist für die nicht quervernetzte Gruppe bereits der Übergang in eine organische Matrix zu erkennen, während bei der quervernetzten Putty B immer noch eine leichte schuppige Topographie erkennbar ist. Hier ist der Wechsel der synthetischen Matrix in

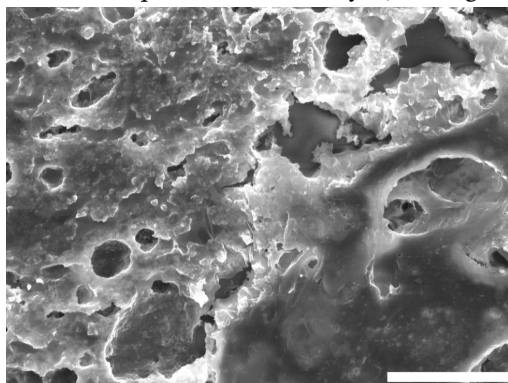
eine organische Matrix erst nach 63 Tage zu erkennen. Beide Gruppen zeigen eine ähnliche Oberflächenstruktur und es ist für beide Gruppen anzunehmen, dass der Matrixwechsel abgeschlossen ist.



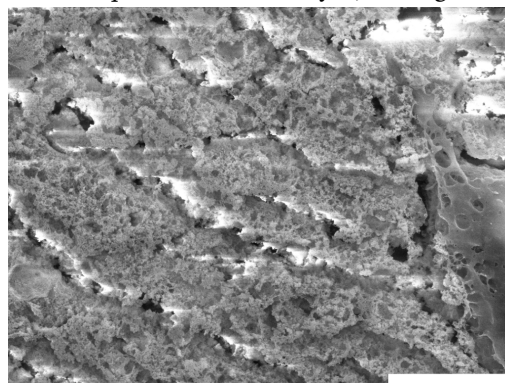
(a) nicht quervernetzte Putty A, 12 Tage



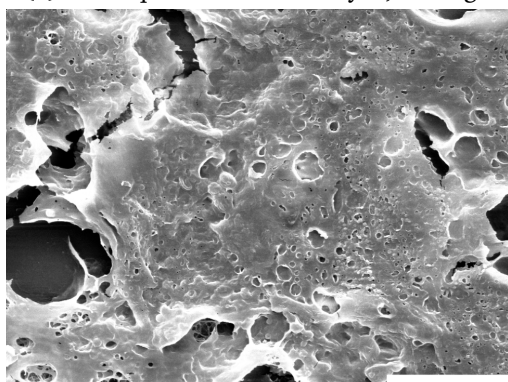
(b) quervernetzte Putty B, 12 Tage



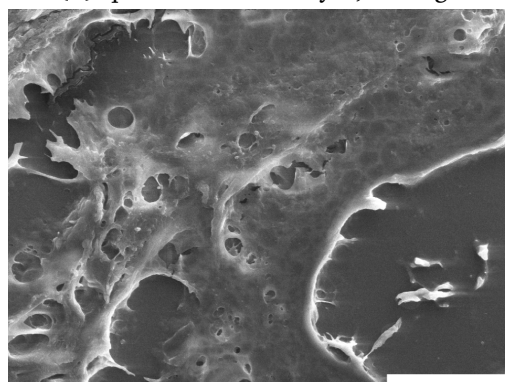
(c) nicht quervernetzte Putty A, 21 Tage



(d) quervernetzte Putty B, 21 Tage



(e) nicht quervernetzte Putty A, 63 Tage



(f) quervernetzte Putty B, 63 Tage

Abbildung 4.14.: Matrixwechsel der nicht quervernetzten PVP Putty A (links) und der quervernetzten PVP Putty B (rechts). Bei der Putty A ist bereits nach 12 Tagen eine ebenere Struktur erkennbar (a), während Putty B noch die typische SiO_2 -haltige Topographie aufweist (b). Nach 21 Tagen ist für die Putty A bereits eine organische Matrix erkennbar (c), bei Putty B wird die Oberflächenstruktur auch etwas ebener (d), der SiO_2 -Gehalt nimmt ab. Nach 63 Tagen (e, f) zeigen beide Proben eine organische Matrix, SiO_2 ist in beiden Proben nicht mehr zu erwarten. Maßstab $20 \mu\text{m}$.

Um den zeitlichen Unterschied semi-quantitativ zu bestimmen, wurden die aufgenommenen EDX-Spektren der jeweiligen Proben gemittelt und gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4.15).

Da die Präparate kein Calcium und Phosphor mehr enthielten, konnte kein Referenzwert für den Si-Peak festgelegt werden. Absolute Messungen des Si-Gehalt konnten nicht durchgeführt werden. Die Vergleichbarkeit der Spektren ist über die genaue Einhaltung aller Messparameter gegeben, sodass sich die Spektren relativ zueinander vergleichen lassen.

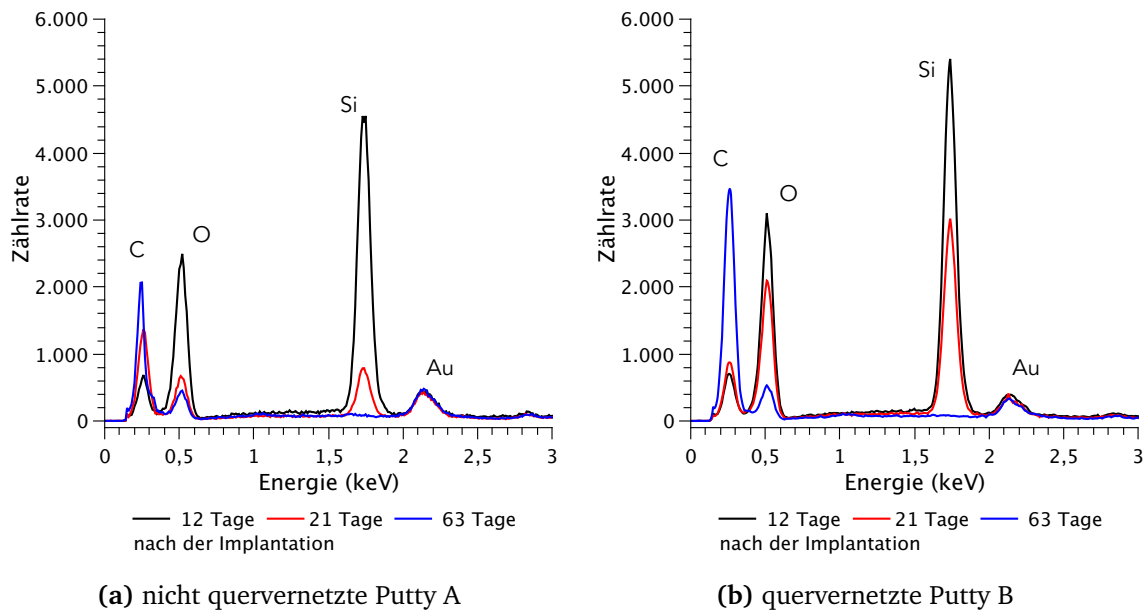


Abbildung 4.15.: EDX Spektren der nicht quervernetzten Putty A (links) und der quervernetzten Putty B (rechts) nach 12, 21 und 63 Tagen.

Für beide Proben ließ sich das Silica sehr gut mittels EDX detektieren. Nach 12 Tagen konnten Si-Peaks für beide Proben ermittelt werden, wobei der Si-Peak der quervernetzten Putty B etwas höher im Vergleich zur Putty A ist. 21 Tage nach der Implantation konnte in den REM-Aufnahmen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Proben beobachtet werden. Dieses kann durch die EDX-Spektren bestätigt werden. Bei der Kontrollgruppe (Putty A) ist nach 21 Tagen nur noch ein kleiner Si-Peak erkennbar, während sich für die quervernetzte Putty B ein mehr als drei mal so großer Peak abzeichnet. Nach 63 Tagen konnte bei beiden Proben kein Silica mehr nachgewiesen werden.

Für beide Proben ist neben der Abnahme des Si-Peaks ein ansteigender Kohlenstoff Peak zu beobachten. Die Zunahme des Kohlenstoffs lässt sich durch den Austausch der Silicamatrix in eine organische Matrix begründen.

Da bei der quervernetzten Gruppe nach 12 und 21 Tagen deutlich höhere Si-Gehalte nachgewiesen werden konnten, lässt sich daraus ableiten, dass durch die

Quervernetzung ein zeitverzögertes Drug-Delivery-System für SiO₂ erreicht wurde. Dieses hatte einen direkten Einfluss auf die Knochenneubildung im Defekt. Für die Putty B wurden zeitverzögert vergleichbare Werte zur Putty A ermittelt. Wie bei der histomorphometrischen Analyse des gesamten Defektbereiches sind auch im Si-Gehalt der Präparate nach 63 Tagen keine signifikanten Unterschiede mehr erkennbar.

4.6. Zusammenfassung Trägermaterial auf PVP-Basis

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass PVP als Trägermaterial bei der Implantation in den Knochen gute biokompatible Eigenschaften aufweist und somit eine gute Grundlage für ein Trägermaterial liefert. Besonders die Kombination von im Wasser gelösten PVP mit SiO₂-Nanopartikeln liefert eine gute Grundlage, um das lose NanoBone[®] in eine leicht applizierbare Putty zu überführen. Verschiedene PVP- und Nanopartikel-Konzentrationen wurden kombiniert und analysiert. Im Fokus stand dabei die Analyse, inwieweit eine Quervernetzung durch Gammabestrahlung einen Einfluss auf die mechanischen und biophysiologicalen Eigenschaften des Trägermaterials hat. Getestet wurden unvernetzte und quervernetzte Proben, wobei der Vernetzungsgrad im wesentlichen durch die Bestrahlungsdosis und durch die PVP-Konzentration geregelt werden konnte.

Die PVP-Konzentration wurde von 3 wt.% bis 6 wt.% variiert. Auch eine Abhängigkeit von der Nanopartikelkonzentration wurde analysiert, es wurden 3 wt.% bzw. 5 wt.% SiO₂ im Trägermaterial verwendet. Die Variation der Strahlungsdosis war durch die Anforderung der Sterilität des Produktes limitiert, welche gleichzeitig neben der Quervernetzung durch die Bestrahlung erreicht werden sollte. Die unvernetzten Proben wurden nicht bestrahlt (0 kGy) und die anderen Proben wurden mit durchschnittlich 25 kGy bzw. 17,5 kGy quervernetzt.

Durch die rheologischen Experimente wurde gezeigt, dass die quervernetzten Proben deutlich größere mechanische Stabilitäten besitzen als unvernetzte Proben.

Eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften konnte nicht durch eine Erhöhung der Nanopartikelkonzentration erzielt werden, da ein fragiles Netzwerk aus SiO₂ entstand, welches bei mechanischer Beanspruchung zu zerfließen begann (Strukturviskosität). Obwohl die Nanopartikel nach einer mechanischen Belastung wieder miteinander aggregieren, erfüllt dieses nicht die Anforderungen einer formbaren Putty. Der SiO₂-Gehalt wurde deshalb auf 3 wt.% festgelegt.

Signifikante Unterschiede des Vernetzungsgrad und der mechanischen Eigenschaften in Abhängigkeit von den gewählten Strahlungsdosen von 17,5 kGy und 25 kGy konnte nicht festgestellt werden. Bei der geringeren PVP-Konzentration und der geringeren Strahlungsdosis kam es allerdings zu einer unregelmäßigen Quervernetzung, bei der sich Wasserreste absetzten.

Als Trägermaterial für die Kombination mit dem NB Granulat S39 wurde eine Zusammensetzung von 3 wt.% SiO₂ mit 6 wt.% bzw. 3 wt.% PVP (Rest H₂O) ausgewählt und mit einer Gammastrahlung von 25 kGy quervernetzt. Eine nicht quervernetzte Variante aus 3 wt.% SiO₂ und 6 wt.% PVP diente als Kontrollgruppe, welche bereits als "NanoBone® | putty" CE zertifiziert und kommerziell erhältlich ist.

Als erstes wurde in einem Löslichkeitsversuch die Formbeständigkeit der Putties verglichen, wie sie z. B. bei stark blutenden Defekten erforderlich ist. Am stabilsten waren dabei die quervernetzten Proben, welche keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der PVP-Konzentration aufwiesen. Aufgrund dieser Tatsache wurde im weiteren Verlauf nur die Zusammensetzung von 3 wt.% SiO₂ und 6 wt.% PVP untersucht, wegen dessen Äquivalenz zur Kontrollgruppe.

Mittels Rasterelektronenmikroskopie wurde gezeigt, dass das quervernetzte Trägermaterial mit dem Granulat eine deutlich kompakter Einheit ergab. Dennoch war die Verbindung des Komposits nur oberflächlich, da in der Elementaranalyse der gespülten Versuchs- und Kontrollgruppe keine Polymerrückstände nachgewiesen werden konnten.

Um die biologische Wirksamkeit der Materialien zu beurteilen, mussten beide Proben in einem lebenden Organismus getestet werden. Nachdem die Proben mittels XTT-Test in ihrer Unbedenklichkeit bestätigt wurden, konnten sie in das Tibiamodell der Ratte implantiert werden, um die Defektheilung in Abhängigkeit von der Quervernetzung zu untersuchen.

Durch histomorphometrische Analysen wurde gezeigt, dass bei beiden Proben das Biomaterial resorbiert wurde und sich neuer Knochen gebildet hatte. Ein besonders auffälliger Unterschied zwischen den Gruppen war der Verbleib des quervernetzten Trägermaterials im Defekt, welches über alle Versuchszeiten großflächig präsent war. Bei der Kontrollgruppe war bereits nach 12 Tagen kein Trägermaterial mehr zu beobachten. Das nicht abgebaute, quervernetzte Trägermaterial führte unterdessen zu einer Verzögerung der Defektheilung. Dieses spiegelte sich sowohl in den histomorphometrischen Daten wieder, als auch bei der EDX-Analyse des Matrixwechsels. Nach 63 Tagen waren keine signifikanten Unterschiede in der Histomorphometrie und im Matrixwechsel beobachtbar. Demnach kann durch die Quervernetzung ein zeitlich verzögertes Durg-Delivery-System für SiO₂ etabliert werden. Jedoch ist der Verbleib des Trägermaterials kritisch zu bewerten. Die Kortikalis der Tiere, welche die quervernetzte Putty implantiert bekamen, war nicht vollständig geschlossen und häufig von dem Trägermaterial durchsetzt. Dieses führte zu Instabilitäten der Tibia und es entstanden zum Teil unerwünschte Frakturen. Da dieses Risiko als sehr wahrscheinlich und als besonders negativ bewertet werden muss, kann das PVP-basierte und quervernetzte Additiv nicht als erfolgreich eingestuft werden.

5 Trägermaterial aus Poloxamer

Aus dem vorherigen Kapitel ist bekannt, dass Polymere durch Gammastrahlung quervernetzt werden können. Neben der Korrelation vom Grad der Quervernetzung zu der Bestrahlungsdosis und der Polymerkonzentration gibt es auch einen Zusammenhang zu der Kettenlänge des verwendeten Polymers. Je länger das Polymermolekül ist, um so mehr Quervernetzungspunkte können bei der Gammabestrahlung entstehen. Das starke Quervernetzungen von Molekülen auch zu Nachteilen bezüglich deren Resorbierbarkeit führen können, wurde im Kapitel zuvor gezeigt. Daher soll nun ein weiteres Polymer mit deutlich geringerer Molekülgröße auf dessen Eignung als Trägermaterial untersucht werden. Durch die kürzeren Polymerketten wird nur eine geringe Vernetzung erreicht. Bei der Wahl des verwendeten Polymers muss natürlich die Biokompatibilität gegeben sein und die mechanischen Eigenschaften sollten dem Anwendungsbereich entsprechen.

Pluronic, bekannt auch als Poloxamere, gehören zu dieser Art Polymere. Es gibt mehr als 30 solcher nicht toxischen, nicht ionischen Tenside. Sie finden eine breite Anwendung in der Industrie, Kosmetik und Pharmazie. Um ein mechanisch stabiles Trägermaterial herzustellen, welches in Kombination mit dem NB Granulat S39 funktioniert, werden in diesem Kapitel verschiedene Materialkombinationen aus Poloxamer 407 (von 20 bis 30 wt.%) und SiO₂ (0 wt.%, 3 wt.%, 4,5 wt.%) entwickelt und getestet. Um den Effekt der Bestrahlung auf die Vernetzung der Moleküle zu untersuchen, wurden alle Proben mit γ -Strahlung bestrahlt. Daraus resultierende mechanische Eigenschaften oder eine Änderung der Moleküle wurden anschließend untersucht. Es galt eine geeignete Materialkombination zu finden, welches den Anforderungen einer ready-to-use Putty entspricht. Wie bei den PVP-Putties wurde ein besonders geeignetes Trägermaterial mit dem Knochenersatzmaterial NB Granulat S39 kombiniert und weitere Untersuchungen bezüglich ihrer Struktur und biologischen Wirksamkeit durchgeführt. Wie auch zuvor wurden elektronenmikroskopische Verfahren, Elementanalysen, und Löslichkeitstests angewandt, und ebenso eine Gelpermeationschromatographie zur Bestimmung der Molaren Masse nach der Gammabestrahlung. Nach Testung der Biokompatibilität wurde auch die Poloxamer-basierten Additive

im Tiermodell getestet, um die biologische Wirksamkeit zu untersuchen. Als bereits zugelassene Vergleichsgruppe diente die Actifuse Putty ABX, welche ebenfalls ein Trägermaterial aus Poloxamer besitzt (Kapitel 2.3).

5.1. Poloxamer

Poloxamere sind Triblock-Copolymere und bestehen aus Ethylen-Oxid- und Propylen-Oxid-Blöcken, die in einer X-Y-X Struktur angeordnet sind. Die Polymere werden bei 120 °C und hohem Druck synthetisiert. Zu einer Lösung aus Propylen-Glykol und einer alkalischen Lösung als Katalysator werden zunächst nach und nach die Propylen-Oxid-Monomere gegeben und anschließend die Ethylen-Oxid-Monomere. Danach wird der Katalysator neutralisiert und das ausgefallene Salz von dem Gemisch entfernt. So lassen sich Poloxamere mit Molekülgrößen von 1100 bis 14000 g/mol herstellen, welche im flüssigen, pastösen oder festen Zustand vorkommen [88]. Der Reaktionsablauf ist schematisch in Abbildung 5.1 dargestellt.

Durch die Anordnung der Polymerketten in einem hydrophoben Polypropylenoxid-Block (PPO), welcher von hydrophilen Polyethylenoxid-Ketten (PEO) umgeben ist, ergeben sich die amphiphilen Eigenschaften des Polymers, so dass Poloxamer in Lösung in verschiedenen Strukturen vorliegen kann. Die vielen Ether-Sauerstoffatome der hydrophilen Anteile können Wasserstoffbrückenbindungen mit den umgebenden Wasserstoffmolekülen bilden. Die hydrophoben Anteile der Moleküle lagern sich aufgrund des hydrophoben Effekts aneinander. Dieser als Mizellenbildung bekannte Prozess läuft dabei spontan ab. Eine Entropiezunahme ist hier die treibende Kraft, da Wassermoleküle freigesetzt werden, die zuvor mit den Tensidmolekülen assoziiert waren. Es kommt zu einem Umklappen der mittleren hydrophoben Molekülkette [89, 90]. Die Mizellen entstehen ab einer bestimmten Massenkonzentration, welche auch als kritische Mizellenbildungskonzentration beschrieben wird. Sie können sich zu einem physikalischen Gel vernetzen. Die Mizellenbildung und der Übergang zum Gel ist dabei stark von der Temperatur anhängig.

Das in dieser Arbeit verwendete Poloxamer P407 (oder auch Kolliphor P407 oder Lutrol F127) ist ein Feststoff und wasserlöslich. Es wird aus dem hydrophoben Polypropylen glykol hergestellt, welches eine durchschnittliche molare Masse von 4000 g/mol besitzt, dem dann das hydrophile Polyethylenoxid hinzugeführt wird. Der PEO Anteil beträgt dann in etwa 70 % der gesamten Molekülgröße. Je nach Hersteller variiert die molare Masse in einem Bereich von 9840 - 14600 g/mol. In der chemischen Struktur $\text{H}(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_a-(\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3-\text{CH}_2)_b-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_a-\text{OH}$ liegt a bei 101 Wiederholungseinheiten und b bei 56 Wiederholungseinheiten, wenn man von der maximalen molaren Masse ausgeht. Bei der Synthese entstehen nicht nur ausschließlich identi-

sche Moleküle gleicher Kettenlänge. Neben den langen Polymerketten können auch Ketten geringerer molarer Masse synthetisiert werden. Für Poloxamer ist es wohl bekannt, dass die Synthese eine bimodale Molekularverteilung ergibt [91–93].

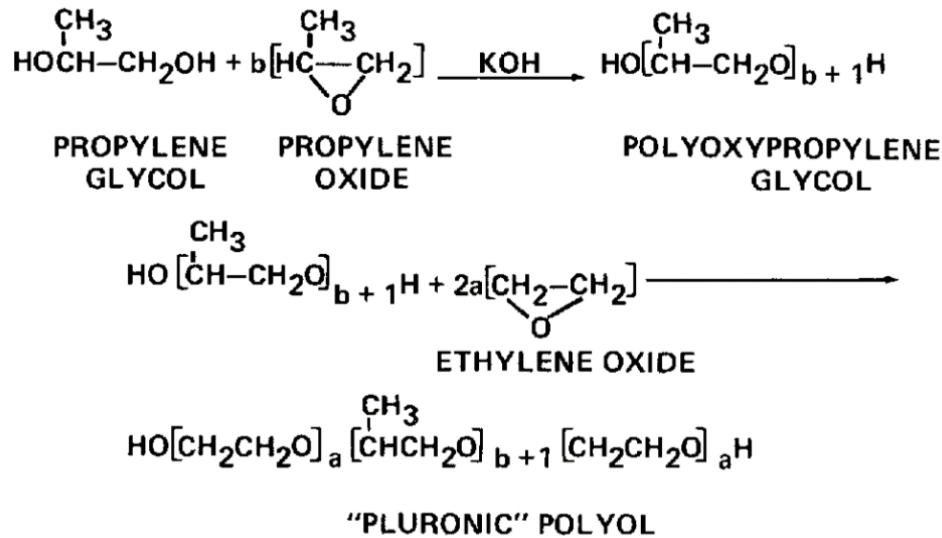


Abbildung 5.1.: Synthese des Poloxamer Triblock-Copolymers nach Schmolka [94]

Der Mechanismus der Kettenbildung ist in der Literatur von Simons (1960) und Steiner (1964) gut beschrieben [95, 96]. Besonders interessant an dieser Verteilung ist allerdings, dass sich der Anteil der Ketten niedrigerer molarer Masse durch oxidativen Stress erhöhen lässt [91]. Die längeren Molekülketten können in kürzere zerfallen, wenn man sie höheren Temperaturen aussetzt. So kann z. B. ein beschleunigter Alterungstest, bei der die Proben über 30 Tage bei 60 °C gelagert werden, um ca. 9 Monate Realzeit zu simulieren, Auswirkungen auf die Verteilung der Polymerketten im Produkt haben. Dennoch sind die besonderen thermoreversiblen und gelbildenden Eigenschaften dieses Polymers nicht gefährdet. Diese kleineren Moleküle besitzen durchschnittlich ein Gewicht von 5600 g/mol. Die Mizellenbildung ist dabei eng mit der Kettenlänge des PPO Kernes verbunden, da er erst ab einer bestimmten Länge umklappen kann. Beezer et al. (1992) zeigten, dass das Molekulgewicht des PPO Kernes mindestens 750 g/mol betragen muss [97]. Hecht und Hoffmann (1995) konnten Mizellen ab einer gesamten Molaren Masse von 1279 g/mol nachweisen [90]. Wie bereits oben erwähnt bilden die Polymerketten ab einer bestimmten kritischen Konzentration Mizellen in wässriger Lösung, der *cmc* (critical micelle concentration). Die entropische Kraft des hydrophoben Effekts ist dabei stark temperaturabhängig. Neben der *cmc* ist auch eine kritische Temperatur zur Mizellenbildung notwendig (*cmt* - critical micelle temperature). Beide Größe stehen in einem starken Zusammenhang, bei höheren Temperaturen sinkt die *cmc* bzw. bei höheren Polymerkonzentrationen sind niedrigere Temperaturen für die Mizellenbildung notwendig. Damit sich die

Mizellen in einer Struktur anordnen und der Übergang zum Gel stattfindet, muss die Temperatur weiter erhöht werden. Diesem Phasenübergang wird eine kritische Gelbildungstemperatur (c_{gt} - critical gel temperature) zugeordnet. Der Zusammenhang von Temperatur, Polymerkonzentration und der Phase ist in der Abbildung 5.2 dargestellt.

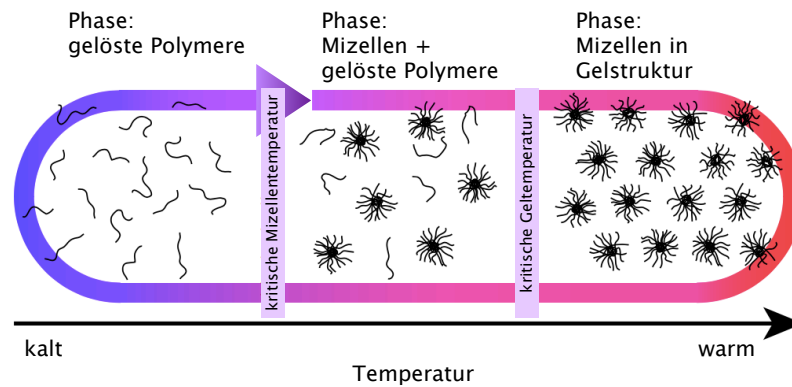


Abbildung 5.2.: Phasenübergang von Poloxamer: einzelne Polymerketten, Bildung von Mizellen, Ordnung der Mizellen und Bildung eines Gels (nach [98])

Der Übergang zum Gel ist durch das Größenwachstum der Mizellen angetrieben, d. h. die Aggregationszahl je Mizelle steigt an und sie beginnen, sich an einem kristallinen Gitter anzuordnen [89, 99, 100]. Diese Anordnung in ein kristallines Gitter ergibt sich dabei aus zwei Faktoren, zum einen nimmt der Volumenanteil der Mizellen stetig zu, durch die Bildung neuer Mizellen, aber auch durch Ostwald-Reifung der bestehenden Mizellen [101]. Des Weiteren treten Abstoßungskräfte zwischen benachbarten Mizellen auf. Die Mizellen treten von daher in einer geordneten Phase auf, um den Abstand untereinander zu maximieren, ähnlich wie Atome in einem kristallinen Gitter. Die verschiedenen Zustände werden auch als lytrope Flüssigkristalle verschiedener Phase bezeichnet. Das folgende Phasendiagramm (Abbildung 5.3 aus [89]) zeigt zunächst nur die drei Hauptphasen des Polymers in wässriger Lösung. Wobei in der isotropen Phase nur gelöste Polymerketten vorliegen und in der kubischen Phase alle Polymerketten zu Mizellen geordnet sind. Dazwischen existiert eine schmale zweiphasige Region (2Φ) in der bereits Mizellen neben noch einzelnen, gelösten Polymerketten existieren. Durch die zunehmende Konzentration müssen die einzelnen Assoziate eine gewisse Ordnung wie in einem Kristallgitter einnehmen. Ähnlich, wie bei einer Flüssigkeit, bleiben sie dabei beweglich. Es entsteht eine dichte Kugelpackung der Mizellen, welches auch als kubisch-flüssigkristalliner Zustand bezeichnet wird.

Je weniger Lösungsmittel im mizellaren System zur Verfügung steht, umso ausgeprägter ist die Ordnung der hydrophoben und hydrophilen Bereiche. Die Einteilung von Wanke et al. für Polymerkonzentrationen über 25 wt.% konnte durch weitere Strukturanalysen mittels Röntgenkleinwinkelstreuung weiter unterteilt werden [102–104]. Nach der mizellaren kubisch-flüssigkristallinen Phase, welche sich von

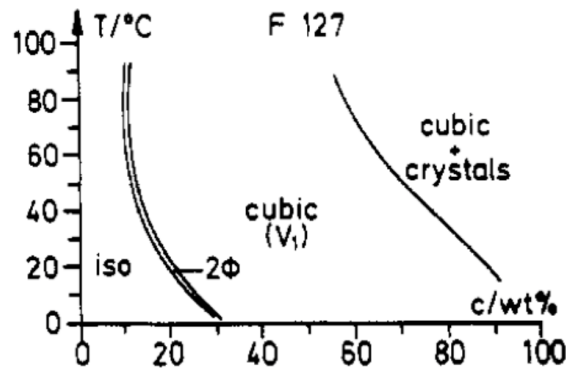


Abbildung 5.3.: Phasendiagramm von Poloxamer F127 [89]

18 wt.% - 65 wt.% erstreckt, folgt die hexagonale-flüssigkristalline Phase (H_1) von 66 wt.% bis 75 wt.%, ab 75 wt.% tritt letztendlich die lamellare-flüssigkristalline Phase auf [104]. Die verschiedenen molekularen Strukturen der unterschiedlichen Phasen lassen sich unter anderem mit Röntgenstreuexperimenten untersuchen [102, 103].

Die mizellaren Gele der Poloxamere unterscheiden sich sehr von den meisten konventionellen Hydrogelen, welche durch kovalente Bindungen (chemische Quervernetzung) oder physikalischer Vernetzung entstehen. Diese Gele sind sehr starr und mechanisch sehr stabil. Bei den Poloxamergelen entsteht die mechanische Stabilität durch die Anordnung von Mizellen in einem Gitter, welche z. B. durch eine Temperaturregelung gesteuert werden kann [105], [106]. Da zwischen den Mizellen keine kovalenten Bindungen entstehen, ist der Gelbildungsprozess reversibel und beliebig oft wiederholbar. Dieses stellt eine einzigartige physikalische Eigenschaft dieser Polymere da [94], [38]. Beispielsweise lässt sich ein 25%iges Gel bei Temperaturen unter $< 10^\circ\text{C}$ in eine flüssige Lösung überführen, welche dann bei Erwärmung wieder in ein Gel übergeht.

Ebenso wie PVP kann das Poloxamer P407 durch Gammabestrahlung neue Vernetzungen ausbilden. Al Saden et al. (1981) zeigten, dass eine Trennung der PEO Ketten ab 50 Wiederholungseinheiten auftreten kann und sich die Kettenenden der Mizellen neu verbinden können [107]. So gelang es Attwood et al. (1987) durch Gammabestrahlung Poloxamerlösungen in Gele zu überführen, welche unterhalb der kritischen Gelbildungskonzentration lagen [108]. Aufgrund der deutlich kürzeren Kettenlängen im Vergleich zum PVP sind für das Poloxamer nicht so starke Vernetzungen bzw. Quervernetzungen zu erwarten und eine Verwendung als Trägermaterial denkbar. Dennoch könnten die mechanischen und chemischen Eigenschaften so beeinflusst werden, dass sich die Handlingeigenschaften ändern. Diese möglichen Auswirkungen werden in dieser Arbeit berücksichtigt und untersucht.

Poloxamer P407 ist bei der amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) als inaktiver Wirkstoff bzw. pharmazeutischer Hilfsstoff gelistet [94], [109]. Aufgrund seiner nicht toxischen Eigenschaft und der hohen Biokompatibilität mit Zellen und Körperflüssigkeiten wurde Poloxamer 407 (P407) bereits erfolgreich in Kombination mit demineralisierter Knochenmatrix und Calciumphosphat Granulaten verwendet [6]. Die gelbildenden Eigenschaften ermöglichen ein optimiertes Handling der Knochenersatzmaterialien, bessere Formbarkeit und Beständigkeit.

Durch P407 als Trägermaterial kann eine Bindung des losen Knochenersatzmaterials erreicht werden. Arbeiten von Zhou et al. [6, 110] zeigen, dass die Zugabe von Poloxamer weder die Wirksamkeit von Biokeramiken, noch die Qualität des neu gebildeten Knochens beeinflusst. Ebenso konnten keine statistisch signifikanten Änderungen des prozentualen Anteils an neuem Knochen oder verbleibenden Biomaterial in Kombination mit Poloxamer beobachtet werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass an der Oberfläche von SiO_2 -Nanopartikeln PEO-Ketten adsorbiert werden [111–114]. Dementsprechend findet eine ähnliche Adsorption auch für die PEO haltigen Poloxamere an der Silica-Oberfläche statt. Dabei kann eine dünne Schicht von Poloxamer um die Nanopartikel herum beobachtet werden [42]. Ebenfalls kommt es zu Mizellenbildung der Polymerketten an der Oberfläche der Nanopartikel. Die kritische Mizellenbildungskonzentration an der Oberfläche der Nanopartikel ist geringer als die oben beschriebene *cmc* und wird auch als *csmc* (critical surface micelle concentration) beschrieben [42, 111, 112]. Die *csmc* nimmt mit höheren Nanopartikelkonzentrationen ab, da mehr einzelne Polymerketten an deren Oberfläche adsorbiert werden und noch vor den freien Molekülen schließlich Mizellen bilden. Sarkar et al. (2013) konnten ebenfalls eine Abnahme der Mizellenbildungsenthalpie beobachten, da die adsorbierten PEO-Ketten über Wasserstoffbrückenbindungen an die Nanopartikel gebunden sind und somit δH verringern [42].

Ähnlich wie beim PVP kann somit ein von Poloxamer umhülltes SiO_2 -Drug-Delivery-System entstehen. Neben optimierten Handlungseigenschaften könnte also eine verbesserte biologische Wirksamkeit durch das in das Trägermaterial integrierte SiO_2 erzielt werden, welches ebenfalls untersucht werden soll.

5.2. Struktur und mechanisch-thermische Eigenschaften

Wie bereits beschrieben, weist Poloxamer besondere thermoreversible Eigenschaften auf. Die Abhängigkeit der Sol-Gel-Übergangstemperatur von der Polymerkonzentration und den additiven Silicapartikeln soll im folgenden Kapitel untersucht werden. Zuvor wurde jedoch die bimodale Molmassenverteilung des verwendeten Poloxamers mittels

Gelpermeationschromatographie (GPC) analysiert. Damit kann bereits der Einfluss der Gammabestrahlung und des oxidativen Stress auf das Material untersucht werden. Die Molmassenverteilung ist nämlich weder von der Polymerkonzentration noch von den zusätzlichen Silicapartikeln abhängig. Die weiteren mechanisch-thermischen Eigenschaften wurden dann anhand ausgewählter Materialkombinationen (s. u.) bestimmt. Dabei wurde zunächst auf den vorgelagerten Prozess der Mizellenbildung eingegangen, welcher sich durch charakteristische Peaks in DSC Kurven abzeichnet. Anhand dieser Peaks soll ein möglicher Einfluss der Silicapartikel auf die Mizellenbildung untersucht werden. Des Weiteren wurde mittels einfachen Tube Inversion Tests und rheologischen Untersuchungen deren Einfluss auf die Gelbildung überprüft. Durch die Oszillationsrheologie konnten weitere mechanische Eigenschaften in Abhängigkeit von Polymer- und Silicakonzentration ermittelt werden. Die getesteten Polymerkonzentrationen waren 20 wt.%, 23,5 wt.%, 25 wt.% und 30 wt.%. Sie wurden ohne zusätzliche SiO₂ Nanopartikel, in Kombination mit 3 wt.% SiO₂ und in Kombination mit 4,5 wt.% SiO₂ (mit Ausnahme der 30 wt.% Poloxamerprobe) untersucht. Die Proben wurden nach der kalten Mischmethode von Schmolka angesetzt [94]. Das Polymer wurde mit gekühltem Wasser gemischt und über 24 h im Kühlschrank gelagert, so dass sich eine homogene Lösung ergibt. Die SiO₂-Partikel stammen aus einem SiO₂-Sol, welches aus Natriumwasserglas gewonnen wurde. Polymer und Sol ließen sich dabei nach dem gleichen Verfahren mischen.

5.2.1. Gelpermeationschromatographie

Mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) lassen sich verschiedene Stoffe in Lösung durch ein Kolonne nach ihrer Größe auftrennen. Mögliche Größenänderungen der Molekülketten des Ausgangsstoffes z. B. durch Gammabestrahlung oder durch einen beschleunigten Alterungstest können somit nachgewiesen werden. Der Versuch wurde vom Labor BASF Analytics durchgeführt. Die GPC ist bei BASF ein etabliertes Standardverfahren und wurde an vier eingereichten Proben durchgeführt. Die erste Probe ist eine unsterile, frische Putty, die zweite Probe ist eine mit Gamma bestrahlte, sterile Putty, die dritte Probe ist eine beschleunigt gealterte und ebenfalls sterile Putty und die vierte Probe ist eine real gealterte (1,5 Jahre), sterile Putty. Die beschleunigte Alterung erfolgte über 53 Tage bei 60°C um die Alterung über ein Jahr zu simulieren (bei der Synergy Health Radeberg GmbH). Das beschleunigte Alterungsverfahren stellt eine besondere thermische Belastung für das Material dar. Ebenso wurde eine Poloxamer P407 Probe von BASF als Referenz mit gemessen. Die Eluationskurven wurden mit Hilfe einer PEG/PEO Eichkurve in die eigentlichen Verteilungskurven umgerechnet und sind in der Abbildung 5.4 dargestellt. Die Auflösungsgrenze liegt bei 408 g/mol.

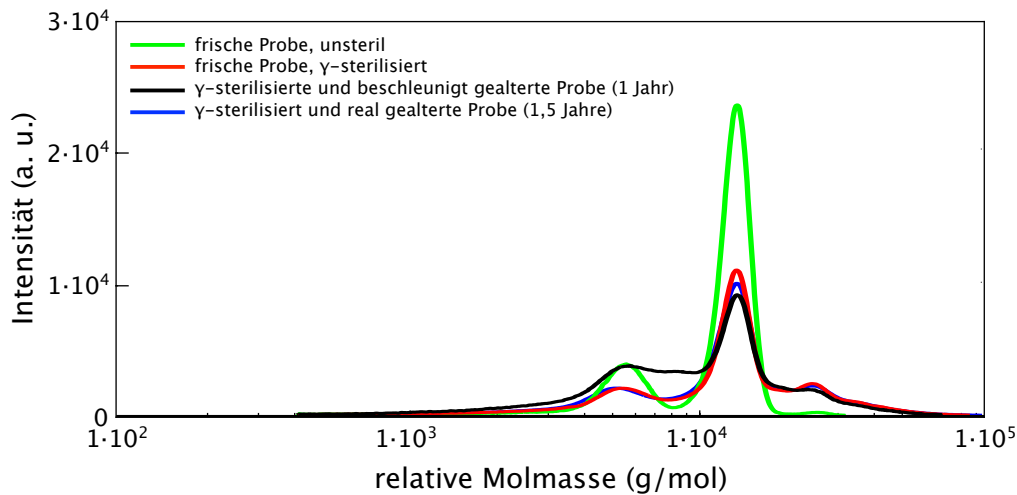


Abbildung 5.4.: Messung der relativen Molaren Masse mittels Gelpermeationschromatographie für eine frische unsterile Probe - grün, eine mit Gamma bestrahlte, frische Probe - rot, eine bestrahlte, beschleunigt gealterte Probe - schwarz (1 Jahr) und eine bestrahlte, natürlich gealterte Probe - blau (1,5 Jahre).

Die Vergleichsprobe des reinen P407 von BASF besitzt ein identisches chromatographisches Verhalten wie die unbestrahlte, frische Probe (grün). Sie zeigen typischer Weise die erwartete bimodale Verteilung der molaren Massen. Die drei anderen, mit Gammastrahlung sterilisierten Proben zeigen einen Abbau, sowie einen Aufbau der Molaren Massen (rot, schwarz und blau).

Die γ -bestrahlte, frische Probe (rot) zeigt in der Verteilung nun drei Peaks. Neben den zwei erwarteten Peaks entsteht ein weiterer Peak von größeren Molekülketten mit einer molaren Masse von etwa 25000 g/mol. Der Hauptpeak bei 15000 g/mol, sowie der kleinere Peak bei 5500 g/mol nehmen deutlich ab. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Gammabestrahlung einzelne Molekülketten getrennt werden, sich aber auch neue, größere Molekülketten vernetzen.

Für die zusätzlich beschleunigt gealterte Probe fällt auf, dass der Anteil an kürzeren Molekülketten mit niedrigerer Molarer Masse deutlich zunimmt. Durch die Bestrahlung mit Gamma hatte sich bereits eine neue Verteilung der Molaren Massen ergeben, welche durch den zusätzlichen oxidativen Stress bei der Alterung [91] noch weiter verändert wurde. Die bestrahlte, natürlich gealterte Probe weicht kaum von der frischen, bestrahlten Probe ab. Dadurch ist eindeutig der oxidative Stress bei der beschleunigten Alterung als Ursache für die veränderte Molmassenverteilung der dritten Probe auszumachen. Allgemein ist die Umwandlung der bimodalen Molmassenverteilung zu einer trimodalen Verteilung durch energetischer Bestrahlung bisher nicht beschrieben. Theoretisch und auch nach erster Begutachtung der beschleunigt gealterten Probe sollten sich die mechanischen Eigenschaften der Putty aber nicht maßgeblich verän-

dert haben. Als kritische Molekülgröße für die Mizellenbildung und den Gelübergang wurden von Hecht und Hoffmann (1995) molare Massen < 1279 g/mol bestimmt [90]. Jedoch könnten auch einzelne PEO oder auch PPO Ketten entstanden sein, die dann nicht mehr fähig wären Mizellen zu bilden. Fehlt die Kombination von hydrophilen und hydrophoben Kettenanteilen, sind die amphiphilen Eigenschaften nicht mehr gegeben.

Durch die starke Differenz zwischen der natürlich gealterten und der beschleunigt gealterten Probe lässt sich ableiten, dass das Verfahren der beschleunigten Alterung für das Material nicht ideal ist. Eine beschleunigte Alterung über einen längeren Zeitraum würde vermutlich zu einem weiteren Zerfall der Polymerketten führen. Dennoch sollen im Weiteren auch real und beschleunigt gealterte Proben bezüglich ihrer mechanischer Eigenschaften untersucht werden.

5.2.2. Dynamische Differenzkalorimetrie

Die dynamische Differenzkalorimetrie (Differential Scanning Calorimetry - DSC) ist eine sehr sensitive Technik um z. B. Phasenübergänge oder Strukturübergänge zu ermitteln. Heizt man eine Poloxamer P407 Lösung bestimmter Konzentration über ein bestimmtes Temperaturintervall, welches die kritische Mizellenbildungstemperatur (cmt) überschreitet, wird es für die Polymerketten energetisch günstiger, sich in Mizellen zu formieren. Wie bereits oben erwähnt ist der entropische Effekt die treibende Kraft in diesem Prozess. Diese große Entropiezunahme erzeugt in der DSC Messung einen relativ großen endothermen Peak. Es gilt zu beachten, dass dieser Peak nicht mit der Gelbildung des Poloxamers zusammenhängt, sondern einzig und allein zu dem vorgelagerten Prozess der Mizellenbildung gehört.

Durch diesen endothermen Peak, der sowohl beim Heizen als auch beim Kühlen des Polymers auftritt, geht hervor, dass vor dem Phasenübergang des Polymers vom Sol in ein Gel ein Aggregationsprozess zwischen den einzelnen Molekülen stattfindet, welcher reversibel ist [115, 116]. Der endotherme Peak zeigt den Phasenübergang von der isotropen Phase in 2Φ (Vgl. Abbildung 5.3). Erhöht man die Temperatur weiter, kann ein zweiter endothermer Prozess beobachtet werden, bei dem sich die Mizellen in einem quasikristallinen Gitter anordnen. Der zweite, deutlich kleinere Peak kann an der abfallenden Flanke des DSC Peaks detektiert werden, sofern es das Auflösungsvermögen des Gerätes es hergibt. Dieser Peak wäre dann dem Phasenübergang von 2Φ zu kubisch zuzuordnen und der Bildung eines viskosen Gels [116]. Cabana et al. (1997) konnten mit einem Mikro-DSC solche Peaks für Poloxamerlösungen mit 25 wt.% und 30 wt.% Feststoffgehalt zeigen, welche durch weitere rheologische Experimente dem Gelübergang von P407 zugeordnet werden konnte. Die Enthalpie der Gelbildung ist

dabei um ein 200faches geringer als die Mizellenbildungsenthalpie [116]. Ein Unterschied in der Gelbildungsenthalpie in Abhängigkeit von der Poloxamerkonzentration konnte für die beiden genannten Proben nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit war das Auflösungsvermögen des verwendeten DSC Gerätes nicht ausreichend um diesen zweiten Prozess zu detektieren. Der Gelübergang der Proben befindet sich im Temperaturbereich der jeweiligen abfallenden Peakflanke und wurde durch andere Analysen ermittelt. Die interessanten Bereiche des DSC-Peaks sind in der Abbildung 5.5 veranschaulicht.

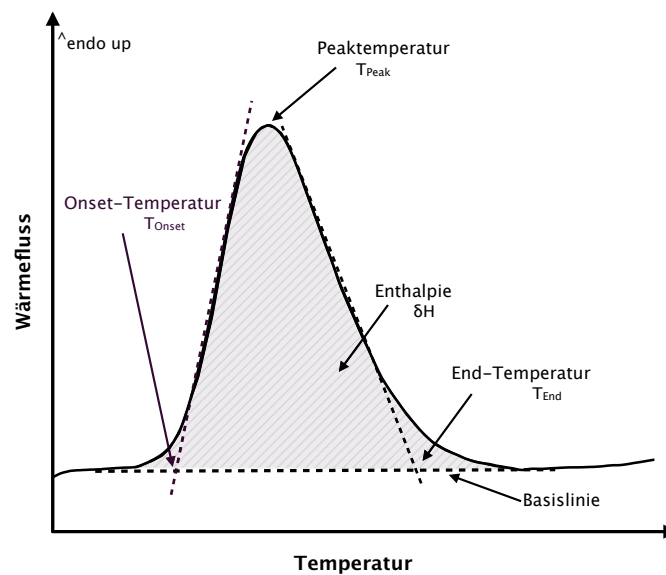


Abbildung 5.5.: Exemplarische DSC Kurve zur Bestimmung der charakteristischen Größen.

Jede Materialkombination zeigt einen charakteristischen endothermen Peak, aus dem sich typische Werte ermitteln lassen. Als erstes die Onset-Temperatur, welche sich aus dem Schnittpunkt der Basislinie und der Tangente im maximalen Anstieg der ersten Peakhälfte ergibt. Als zweites wird die Peaktemperatur bestimmt, das Maximum der Kurve im Bezug zur Basislinie. Als Endpunkt der Kurve kann T_{End} bestimmt werden, aus dem Schnittpunkt der Basislinie und der Tangente im maximalen Anstieg der zweiten Peakhälfte. Zuletzt kann die Fläche unterhalb der Kurve bestimmt werden. Das Intergral der Fläche zwischen der Basislinie und den experimentellen Daten entspricht der Enthalpie der Mizellenbildung. Die Onset-Temperatur kann der kritischen Mizellenbildungstemperatur (cmt) zugeordnet werden. Wie bereits erwähnt, war das Messverfahren nicht sensitiv genug, um einen zweiten endothermen Peak, den der Gelbildung, zu detektieren. Aus diesem Grund wurde die Endtemperatur jeder Probe bestimmt, um diese mit den Gelbildungstemperaturen aus anderen Messmethoden zu vergleichen. Dieser Annahme zufolge müsste T_{End} größer als die Gelbildungstemperatur der Proben sein.

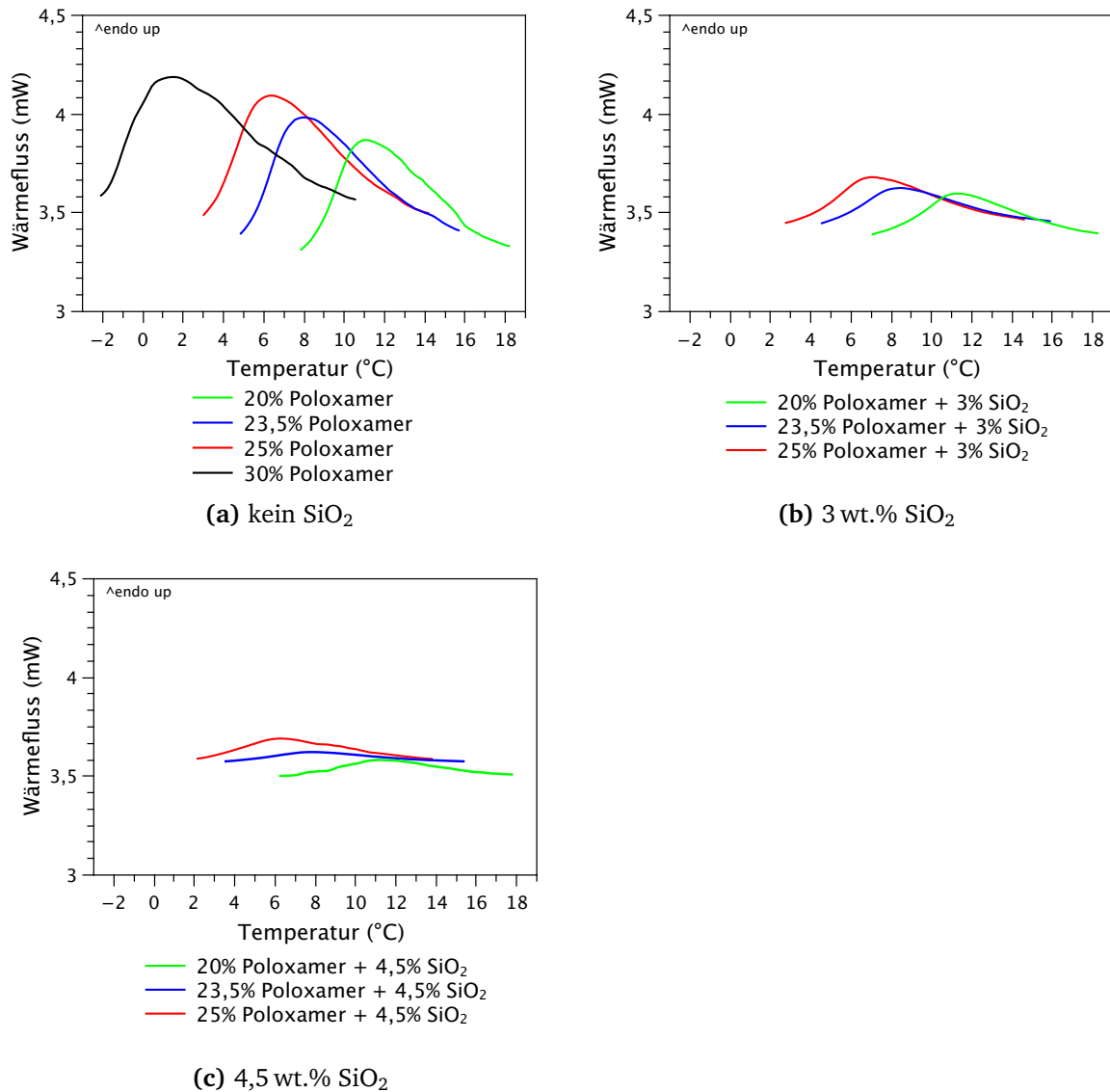


Abbildung 5.6.: DSC Kurven der verschiedenen Poloxamerproben mit unterschiedlichem SiO_2 -Gehalt. Es erfolgte eine Normierung der Kurven auf die Masse der jeweiligen Probe.

In den Abbildungen 5.6 (a-c) sind die DSC Peaks aller Proben dargestellt (alle Proben waren bei der Gammabestahlung). Sie zeigen die Korrelation zwischen der Polymerkonzentration und der kritischen Mizellentemperatur. Mit zunehmender Polymerkonzentration verschiebt sich der DSC Peak zu niedrigeren Temperaturen, die *cmt* nimmt ab. Auch durch die Zugabe von SiO_2 bleibt dieser Zusammenhang bestehen. Durch die Erhöhung der Nanopartikelkonzentration kann jedoch ein deutliches Abflachen der Kurven beobachtet werden, welches in eine Abnahme der Mizellenbildungsenthalpie resultiert. Die Verringerung der Mizellenbildungsenthalpie kann auf die Verbindung von Polymerketten mit Nanopartikeln zurückgeführt werden, welche dann nicht mehr an der Mizellenbildung teilnehmen.

In der Tabelle 5.1 sind die drei Temperaturen und die Enthalpien der Mizellenbildung dargestellt. Die cmt nimmt leicht mit zunehmender Nanopartikelkonzentration ab, die Unterschiede zwischen den Proben sind jedoch nicht signifikant. Durch die Bewertung der Enthalpie wird deutlich, dass durch die zunehmende SiO_2 -Konzentration weniger Polymerketten am Phasenübergang beteiligt sind, da sie an die SiO_2 -Partikel gebunden sind. Die Enthalpie nimmt mit steigender SiO_2 -Konzentration ab, wobei signifikante Unterschiede zwischen den SiO_2 -haltigen Proben und den SiO_2 -freien Proben auftreten. Bei einer Zugabe von 3 wt.% SiO_2 nimmt die Enthalpie durchschnittlich um 1,84 J/g ab. Bei 4,5 wt.% SiO_2 nimmt δH_{mic} um 2,32 J/g ab. Aus der Enthalpieabnahme kann der Anteil der Polymerketten bestimmt werden, die nicht mehr am normalen Mizellenbildungsprozess teilnehmen. Durch die Zugabe von 3 wt.% SiO_2 bilden durchschnittlich nur noch $64,1\% \pm 3,7\%$ der Polymerketten Mizellen. Bei der Zugabe von 4,5 wt.% SiO_2 sinkt die Anzahl der mizellenbildenden Polymerketten auf $27,7\% \pm 3,8\%$.

Tabelle 5.1.: Charakteristische Temperaturen aus den DSC Kurven

Probe	T_{onset} in °C	T_{peak} in °C	T_{end} in °C	δH_{mic} in J/g
30 wt.% P407	$-2,03 \pm 0,50$	$1,6 \pm 0,03$	$10,53 \pm 0,23$	$6,35 \pm 0,07$
25 wt.% P407	$3,11 \pm 0,43$	$6,37 \pm 0,14$	$14,76 \pm 0,42$	$5,34 \pm 0,15$
25 wt.% P407 + 3 wt.% SiO_2	$2,76 \pm 0,66$	$6,99 \pm 0,74$	$14,58 \pm 0,86$	$3,35 \pm 0,83$
25 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO_2	$2,32 \pm 0,58$	$6,16 \pm 0,42$	$13,79 \pm 0,74$	$1,36 \pm 0,59$
23,5 wt.% P407	$4,80 \pm 0,18$	$8,05 \pm 0,13$	$15,68 \pm 0,45$	$5,05 \pm 0,17$
23,5 wt.% P407 + 3 wt.% SiO_2	$4,47 \pm 0,45$	$8,43 \pm 0,49$	$15,87 \pm 0,69$	$3,23 \pm 0,30$
23,5 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO_2	$3,55 \pm 0,79$	$7,92 \pm 0,91$	$15,36 \pm 1,04$	$1,35 \pm 0,33$
20 wt.% P407	$7,79 \pm 0,25$	$11,04 \pm 0,21$	$18,18 \pm 0,37$	$4,69 \pm 0,21$
20 wt.% P407 + 3 wt.% SiO_2	$7,03 \pm 0,82$	$11,27 \pm 1,18$	$18,23 \pm 0,71$	$2,99 \pm 0,46$
20 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO_2	$6,27 \pm 1,02$	$11,28 \pm 1,63$	$17,76 \pm 0,96$	$1,40 \pm 0,54$

Durch die Zugabe von SiO_2 entsteht ein Materialkomposit, welches kaum noch von der Temperatur abhängig ist. Dieses könnte auch einen Einfluss auf die mechanische Stabilität haben, welcher in den folgenden Abschnitten noch genauer untersucht werden soll.

Die Gammabestrahlung der Proben hat keinen direkten Einfluss auf die Mizellenbildung (siehe Abbildung A.1 im Anhang).

5.2.3. Tube Inversion Test

Die einfachste Methode, um rheologische Geleigenschaften einer Probe qualitativ nachzuweisen, ist der Tube Inversion Test. Die verschiedenen Proben werden optisch begutachtet und können durch eine schrittweise Temperaturerhöhung von 0.5 K von einem Sol in ein Gel überführt werden. Die Gelübergangstemperatur wird so auf eine einfache Weise bestimmt und kann durch die thermoreversiblen Eigenschaften beliebig oft wiederholt werden ($n = 5$). Die Übergangstemperatur wird dabei üblicherweise so deklariert, dass kein Fließverhalten der Probe mehr zu erkennen ist.

Bei der optischen Begutachtung der Proben war aufgefallen, dass die Lösungen mit SiO_2 -Anteil trüb und insgesamt zähflüssiger erscheinen als die reinen Poloxamerproben, welche als transparente Lösungen vorliegen. Daher wurde erwartet, dass die Gelbildungstemperatur für SiO_2 -haltige Proben bei niedrigeren Temperaturen liegt.

Um den Einfluss der Gammabestrahlung auf das Material zu analysieren, wurden die Proben vor und nach der Bestrahlung gemessen. Des Weiteren sollte auch wieder die Auswirkung einer thermischen Belastung (beschleunigte Alterung) mit dieser Methode untersucht werden. Vergleichend zu den beschleunigt gealterten Proben (ca. 9 Monate) wurden einige Proben nach einer Rückstellzeit von ebenfalls etwa 9 Monaten nochmals gemessen. So kann der Unterschied in der Gelbildungstemperatur zwischen beschleunigt und natürlich gealterten Proben ermittelt werden. In der Tabelle 5.2 sind die Gelübergangstemperaturen aus dem Tube inversion Test für die unbestrahlten Proben (T_{Gel}), für die bestrahlten Proben (T_{Gel} nach γ) und die gealterten Proben (beschleunigt (T_{Gel} beschl.alt), natürlich (T_{Gel} nat.alt)) aufgelistet.

Die Gelbildungstemperatur sinkt mit zunehmender Polymerkonzentration, sowohl für die unbestrahlten Proben als auch für die γ -bestrahlten Proben. Wie bereits aus der optischen Beurteilung erwartet wurde, konnte eine signifikante Abnahme der Gelbildungstemperatur mit der Zugabe von SiO_2 beobachtet werden. Mittels DSC konnte bereits gezeigt werden, dass die Mizellenbildungstemperatur nicht von der Nanopartikelkonzentration beeinflusst wird, so dass auch ihre weitere Ordnung unverändert stattfindet. Hinzu kommt, dass bei den Proben mit SiO_2 die Nanopartikel selbst zu einer Erhöhung der Viskosität führen, aufgrund ihres Volumenanteils in der Lösung. Durch die Verbindung der Polymerketten mit den Silicapartikeln erhöht sich ihr Volumenanteil in der Lösung, so dass die Viskosität weiter ansteigt [42, 117]. Der Gelübergang findet früher statt.

Eine leichte Abnahme der Gelbildungstemperatur kann des Weiteren bei den bestrahlten Proben beobachtet werden. Signifikante Unterschiede sind aber nur bei den reinen Poloxamerproben zu beobachten. Die Änderung der Gelbildungstemperatur ist vermutlich auf die veränderte Molmassenverteilung des Polymers, zu länger-kettigen Molekülen, zurückzuführen.

Tabelle 5.2.: Tube inversion Gelbildungstemperaturen

Probe	T _{Gel} in °C	T _{Gel} nach γ in °C	T _{Gel} beschl.alt in °C	T _{Gel} nat.alt in °C
30 wt.% P407	6,4±1,3	4,9±0,4	5,7±0,6	4,9±0,6
25 wt.% P407	13,8±1,2	12,8±0,6	13,0±0,8	12,9±0,6
25 wt.% P407 + 3 wt.% SiO ₂	6,4±0,7	6,4±0,7	6,2±0,3	
25 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO ₂	6,3±0,6	6,7±0,4	7,0±0,2	
23,5 wt.% P407	16,9±0,4	16,3±0,6	16,2±0,5	15,9±0,7
23,5 wt.% P407 + 3 wt.% SiO ₂	9,2±0,9	8,6±0,7	8,9±0,5	
23,5 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO ₂	7,7±0,6	7,3±0,6	7,4±0,2	7,1±0,2
20 wt.% P407	20,8±0,3	19,1±1,1	20,7±0,6	19,9±0,4
20 wt.% P407 + 3 wt.% SiO ₂	16,7±0,3	16,6±0,5	16,5±1,0	
20 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO ₂	15,6±0,7	15,4±0,6	16,0±0,6	

Durch die beschleunigte Alterung der sterilen Proben, bei 60°C über 30 Tage, kann ein leichter Anstieg der Gelübergangstemperatur gegenüber den γ -sterilisierten Proben festgestellt werden. Die größten Unterschiede sind bei den reinen Poloxamerproben zu beobachten. Es gibt jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die durch die zusätzliche thermische Belastung entstandenen kürzeren Polymerketten (Kapitel 5.2.1) können dementsprechend nur einen geringen Einfluss auf die Gelbildung der Komposite haben. Für die 5 natürlich gealterten Rückstellproben sind nahezu gleiche Gelbildungstemperaturen wie bei den nicht gealterten, γ -sterilisierten Proben zu beobachten. Eine natürliche Alterung hat im Vergleich zur beschleunigten Alterung über einen Zeitraum von 7 Monaten keinen Einfluss auf die thermischen Eigenschaften der Komposite. Insgesamt lässt sich für alle Proben zusammenfassen, dass sowohl durch die Gammabestrahlung, durch den oxidativen Stress über 30 Tage oder auch durch die natürliche Alterung keine signifikanten Unterschiede in der Gelbildung zu beobachten waren. Dennoch sollte ein zu hoher oder längerer oxidativer Stress vermieden werden, um die thermische Stabilität aufrecht zu erhalten. Durch die Zugabe von SiO₂ erhält man ein Komposit mit höheren Ausgangsviskositäten, als sie bei reinen Poloxamerproben vorliegen. Die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften werden im folgenden Abschnitt weiter untersucht.

5.2.4. Rheologie

Mittels Oszillationsrheologie können mechanisch Eigenschaften strukturviskoser Proben bestimmt werden. Dazu bieten die meisten Geräte verschiedene Messmodi, mit denen unterschiedliche Parameter in Abhängigkeit von verschiedenen Variablen gemessen werden können. Als erstes wird ein Temperature Ramp Test (TRT) durchgeführt,

um die Gelübergangstemperatur zu bestimmen. Poloxamer zeigt in Abhängigkeit von der Konzentration und mit zunehmender Temperatur einen enormen, sprunghaften Anstieg des Speichermoduls G' [116, 118–121]. Inwieweit die temperaturabhängige Änderung des Speichermoduls von den Nanopartikeln beeinflusst wird, kann mit dieser Methode bestimmt werden.

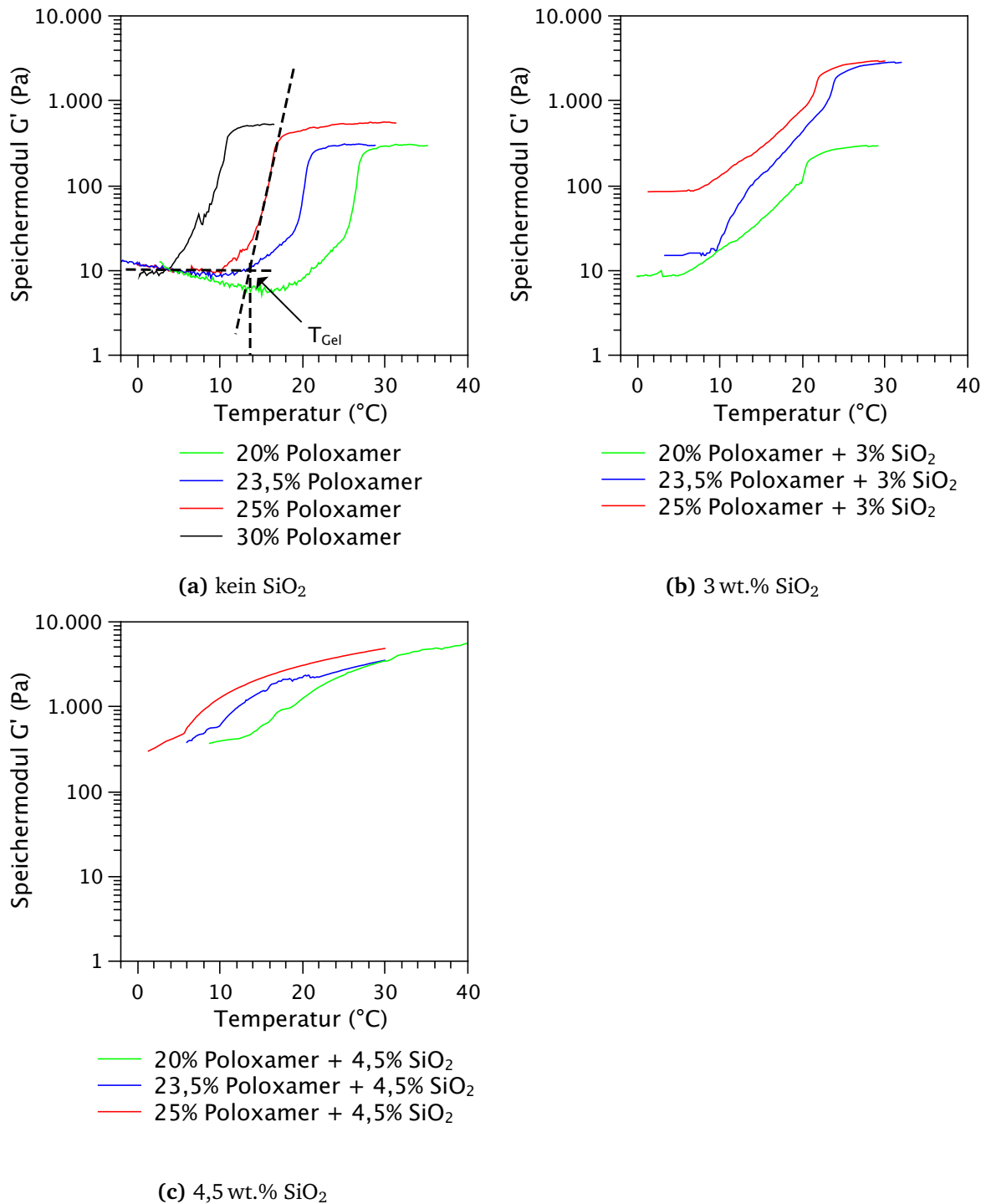


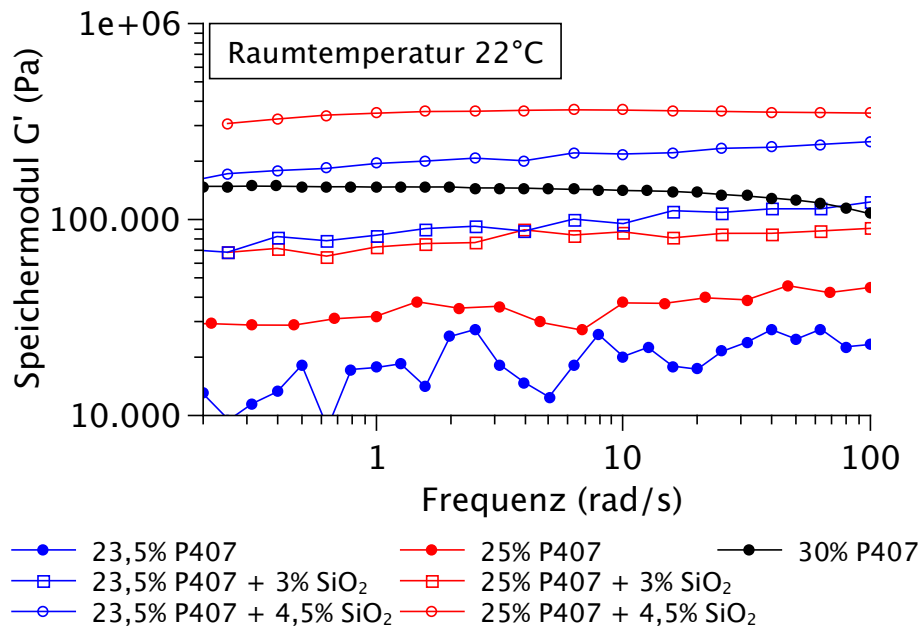
Abbildung 5.7.: Speichermodul in Abhängigkeit von der Temperatur, dargestellt ist ebenso die Auswertung der Gelübergangstemperatur T_{Gel} am Beispiel der Probe 25 wt.% Poloxamer.

Die Abbildung 5.7 zeigt den für Poloxamer P407 typischen starken Anstieg des Speichermoduls G' , wenn man die Probe über einen bestimmten Temperaturbereich erwärmt. Aus diesem Verlauf lässt sich die Gelübergangstemperatur der Lösung ermitteln, in dem man die Tangente im maximalen Anstieg bestimmt (Abbildung 5.7 (a)). Auch bei dieser Messung nimmt die Gelübergangstemperatur mit zunehmender Polymerkonzentration ab. Die Abbildung (a) zeigt die Kurvenverläufe für die reinen Poloxamerproben, in (b) und (c) sind die Daten für die Proben in Kombination mit 3 wt.% bzw. 4,5 wt.% SiO_2 dargestellt, alle Proben wurden zuvor mittels Gammabestrahlung sterilisiert. Durch die Zugabe der SiO_2 -Nanopartikel kann ein Anstieg der Ausgangs- bzw. der Endwerte des Speichermoduls beobachtet werden (mit Ausnahme der Probe 20 wt.% Poloxamer + 3 wt.% SiO_2). Für die Proben mit 3 wt.% SiO_2 sind die Speichermodule nach dem Gelübergang deutlich höher (Ausnahme 20 wt.%, grüne Kurve). Die 20 %ige Probe zeigt kein höheres Speichermodul, aber auch hier ist der Anstieg deutlich flacher als zuvor.

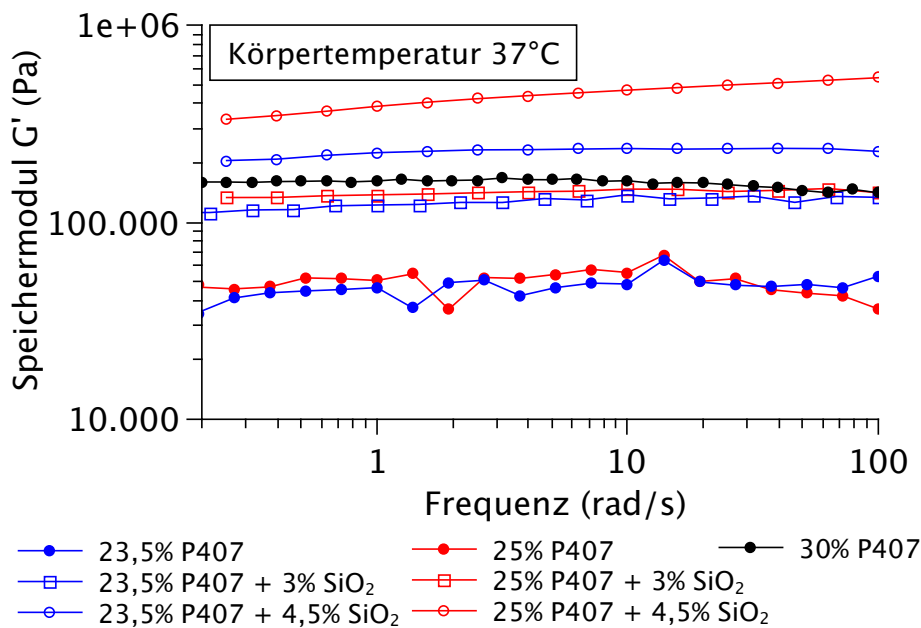
Für die Proben mit 4,5 wt.% SiO_2 im Trägermaterial sind signifikant höhere Speichermodule über den gesamten Temperaturbereich zu sehen. Der sprunghafte Anstieg, welcher dem Gelübergang zugeordnet werden kann, ist nicht mehr deutlich beobachtbar. Ähnlich wie die Mizellenbildungspeaks aus den DSC Messungen (Abschnitt 5.2.2) werden die Kurven mit zunehmender SiO_2 -Konzentration flacher. Die Gelbildung, also die Ordnung der Mizellen wird wesentlich von den Nanopartikeln beeinflusst. Dennoch sollte auch hier versucht werden, eine ungefähre Temperatur abzuschätzen, ab dem eine Phasenänderung im System auftritt. Die Daten zu den Gelübergangstemperaturen sind unter Abschnitt 5.2.6 in Tabelle 5.4 dargestellt.

Inwieweit die Strukturierung des Gelsystems von den Nanopartikeln abhängt, kann mit dem Frequency Sweep Test (FST) und dem Strain Sweep Test (SST) genauer untersucht werden. Da sich das Material so thermisch sensitiv verhält, ist der Vergleich bei Raum- und Körpertemperatur interessant. Der FST wurde daher bei 22°C (Raumtemperatur klinisches Umfeld) und bei 37°C (Körpertemperatur) durchgeführt. Mit dem SST wurde ebenfalls nochmals der Einfluss der Gammabestrahlung auf die Vernetzung des Materials untersucht, um die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften bewerten zu können. Dazu wurden unbestrahlte und bestrahlte Proben in diesem Modus gemessen.

Die Strukturierung des Gelsystems, d. h. wie stark die Partikel bzw. Mizellen an ihre Ordnung gebunden sind, ist umso größer, je größer das Speichermodul G' ist bzw. die Differenz zwischen Speicher- und Verlustmodul ($G' \gg G''$) [122]. In der folgenden Abbildung 5.8 sind die Speichermodule der verschiedenen Poloxamerlösungen ohne und mit SiO_2 bei Raum- (a) und Körpertemperatur (b) abgebildet.



(a) Frequency Sweep Test bei Raumtemperatur



(b) Frequency Sweep Test bei Körpertemperatur.

Abbildung 5.8.: Frequency Sweep Test, Speichermodul in Abhängigkeit von der Oszillationsfrequenz und der Temperatur.

Die Größe des Speichermoduls nimmt erwartungsgemäß mit steigender Polymerkonzentration zu [120]. Ebenfalls kann beobachtet werden, dass auch durch die Zugabe von SiO₂-Nanopartikeln, bei beiden Temperaturen, G' deutlich ansteigt. Die 30%ige Probe und die 23,5%ige bzw. 25%ige Probe in Kombination mit 4,5 wt.% SiO₂ zeigen keinen signifikanten Unterschied von G' zwischen Raum- und Körper-

temperatur. Bei den restlichen Proben ist der erwartete Anstieg des Speichermoduls mit der Temperatur beobachtbar. Demnach scheinen die drei erst genannten Proben bereits bei Raumtemperatur ihre maximale Ordnung der Mizellen (kubische Phase) erreicht zu haben. Das Speichermodul ist von der Polymer- und Nanopartikelkonzentration abhängig. Dieser Zusammenhang wird besonders bei den Proben deutlich, die bei Raumtemperatur gemessen wurden. Die 3 %igen SiO_2 -Proben erreichen ein durchschnittlich doppelt so großes G' wie die reinen Poloxamerproben. Bei der Zugabe von 4,5 % SiO_2 steigt G' sogar um das 10fache der Reinproben (0 % SiO_2) an. Die Stabilität dieser Systeme wird durch die Verbindung der Nanopartikel mit Polymerketten erreicht. Ihr hoher Volumenanteil trägt dazu bei, dass nur noch wenige Polymerketten bzw. Mizellen bei niedrigeren Temperaturen frei beweglich sind. Die Fließfähigkeit des Systems wird dadurch stark verringert. Möglicherweise entsteht ein Netzwerk an Nanopartikeln, welches eine zusätzliche Stabilität in das Komposit einbringt. Für 20 %igen Poloxamerproben, welche der Übersicht halber hier nicht mehr gezeigt werden, ergaben sich ähnliche Zusammenhänge.

Die zunehmende Verbindung von Polymer und SiO_2 und die daraus resultierende höhere mechanische Stabilität bei steigender SiO_2 -Konzentration kann ebenso durch den Vergleich von Speicher- (G') und Verlustmodul (G'') beobachtet werden. Die folgende Abbildung 5.9 zeigt exemplarisch für die 23,5 %igen Poloxamer-Proben (in Kombination mit 0 wt.%, 3 wt.% und 4,5 wt.% SiO_2) G' und G'' bei Raumtemperatur.

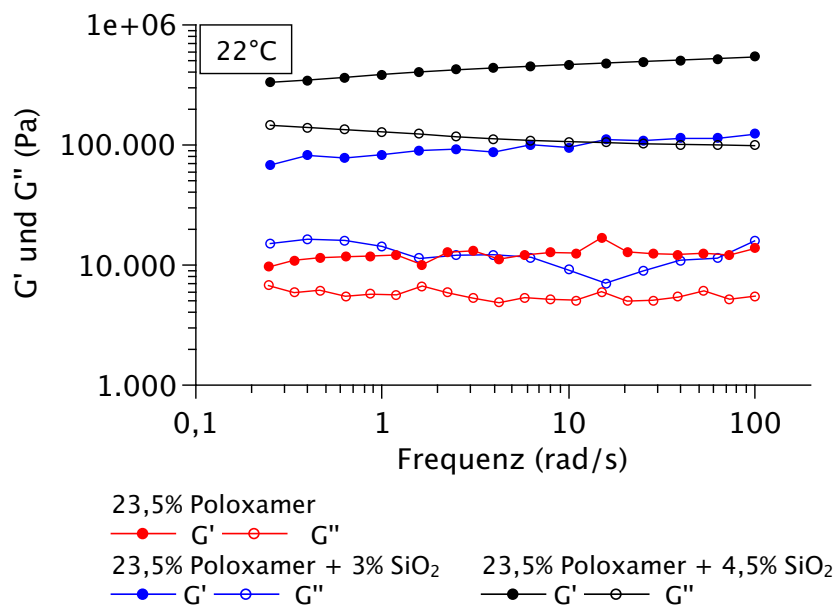


Abbildung 5.9.: Vergleich von Speicher- und Verlustmodul im FST einer 23,5 %igen Poloxamer Lösung mit unterschiedlichen SiO_2 -Konzentrationen.

Die Module stiegen mit zunehmender Nanopartikelkonzentration an und die Differenz zwischen ihnen wird größer. Durch den erhöhten Volumenanteil der Nanopartikel in Verbindung mit Polymerketten kann eine zusätzliche mechanische Stabilität erreicht werden. Die Differenz zwischen G' und G'' beträgt bei den reinen Poloxamerproben im Mittel 10.000 Pa, bei der Probe mit 3 wt.% SiO_2 in etwa 75.000 Pa und bei der Probe mit zusätzlich 4,5 wt.% SiO_2 lag die Differenz bei durchschnittlich 300.000 Pa. In einem weiteren Test, dem SST, wurde die Viskosität in Abhängigkeit von der Scherbeanspruchung gemessen. Alle Proben zeigten dabei einen scherverdünnenden Effekt, welcher typisch für diese gelartigen Systeme ist [121]. Nach der Scherbeanspruchung erholte sich das Gelsystem wieder und erreichte seine Ausgangsviskosität. Auch bei einer Vernetzung mit den Nanopartikeln wären strukturviskose Eigenschaften beobachtbar, mit anschließender Neuaggregation (Vgl. Kapitel 4.2.1). In der Abbildung 5.10 sind die Daten des SST für die 23,5 %igen Poloxamer-Proben (mit 0 wt.%, 3 wt.% und 4,5 wt.% SiO_2) abgebildet. Hier werden auch gleichzeitig die Daten vor und nach der Gammabestrahlung und nach der beschleunigten Alterung der Probe miteinander verglichen.

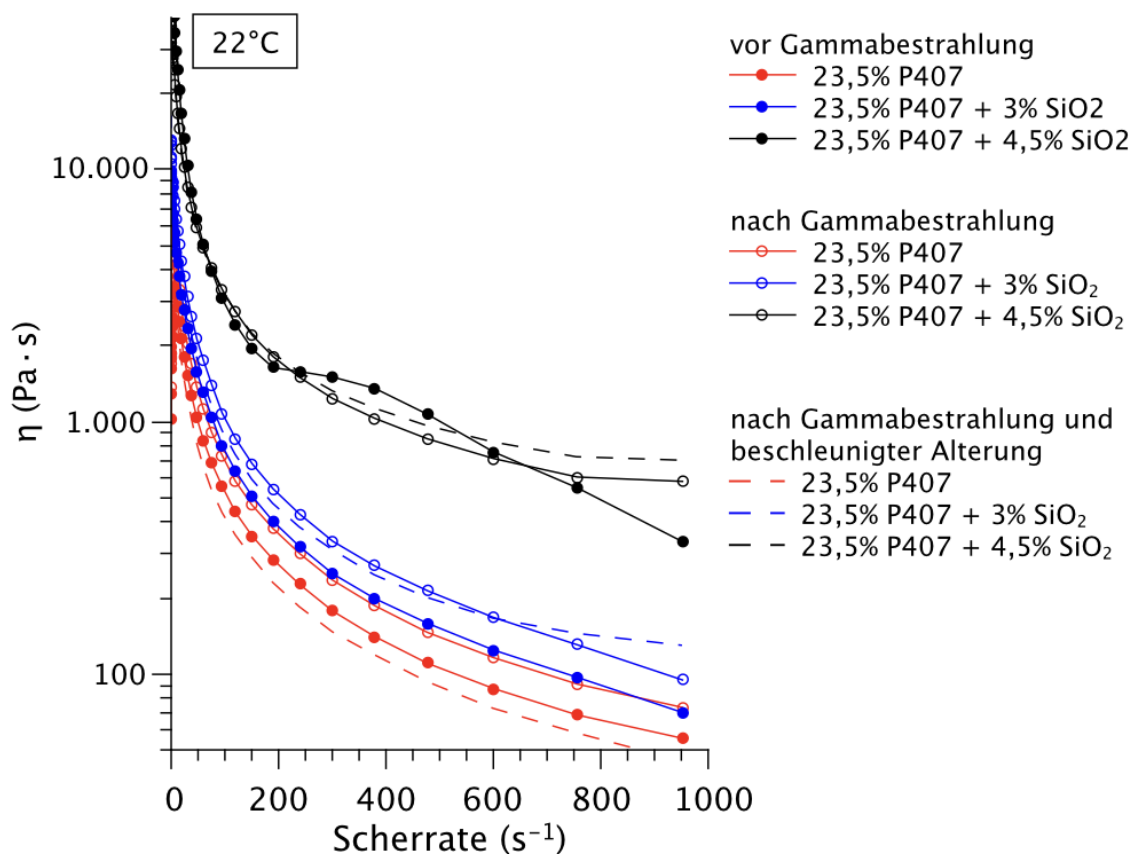


Abbildung 5.10.: Ermittlung der Viskosität in Abhängigkeit von der Scherrate, gemessen bei Raumtemperatur 22°C. Exemplarisch für die Proben mit 23,5 wt.% Polymeranteil. Es wurde der Einfluss der Nanopartikelkonzentration, der Gammabestrahlung und der beschleunigten Alterung ermittelt.

Auch hier wird noch einmal deutlich, dass die Zunahme der Viskosität ebenfalls von der SiO_2 -Konzentration abhängt. Die beschleunigte Alterung über 30 Tage bei 60°C hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Viskositäten. Ebenfalls sind die Unterschiede zwischen den unbestrahlten und mit γ bestrahlten Proben insignifikant und liegen im Fehlerbereich der Messmethode. Al Kayal et al. (2015) zeigten ebenfalls, dass bei der verwendeten Strahlungs-dosis von 25 kGy keine signifikanten Änderungen der Viskosität auftreten [121].

Ob die erhöhten Viskositäten tatsächlich nur auf den erhöhten Volumenanteil der Nanopartikel in Verbindung Polymerketten zurückzuführen ist, oder ob eine Aggregation der Nanopartikel stattfindet, kann mittel Röntgenstreuexperimenten untersucht werden.

5.2.5. Röntgenkleinwinkelstreuung

Mit den Röntgenkleinwinkelstreuungsexperimenten (SAXS) kann gezeigt werden, ob eine Aggregation der Nanopartikel zu großen vernetzten Strukturen in Kombination mit Poloxamer stattfindet oder nicht. Mit dieser Methode können Strukturen < 50 nm gut aufgelöst werden. Die Primärpartikel des SiO_2 -Sols sind $0,5$ nm groß und aggregieren schnell zu kleineren Clustern von 1 - 2 nm Größe. Durch die Zugabe von Polymeren könnten diese Agglomerate von weiteren Aggregationsprozessen abgehalten werden (vgl. Abschnitt 4.1). Dennoch haben die fraktalen Cluster und Agglomerate der SiO_2 -Partikel die ideale Größe, um in der unter Abschnitt 3.4 beschriebenen Röntgenkleinwinkelanlage Streureflexe hervorzurufen, aus denen beispielsweise Partikelgrößen und Abstände ermittelt werden können. Auch Strukturen (Ketten, Kubisch, Lamellar) lassen sich aus den Streukurven ableiten. Für SiO_2 -Sole aus Natrium-Wasserglas sind deren Strukturbildungen und Übergänge in Gelnetzwerke ausreichend in der Literatur und im Abschnitt 2.6.2 beschrieben [70, 123]. Für reine Poloxamerproben und auch für Kombinationen mit pharmazeutischen Wirkstoffen gibt es experimentelle Daten zur Strukturbildung [89, 102–104, 124]. Die mizellaren Systeme der hier verwendeten Poloxamer-Lösungen bestehen aus Aggregaten, welche nicht kleiner als 30 nm sind und bis zu 100 nm groß werden können [125, 126]. Sie sind sie vor allem an Synchrotronanlagen (Ultra-SAXS) gut messbar. Überführt man die mizellaren Lösungen z. B. durch langsames Eintrocknen in andere flüssigkristalline Phasen, so sind deren Ordnung in hexagonale oder lamellare Strukturen durch charakteristische Reflexe in SAXS-Streukurven bei $0,1 < q < 10$ gut erkennbar. Die Strukturbildung beider Kompositmaterialien sind von verschiedenen Parametern gesteuert. Stoffkonzentration, pH-Wert oder Temperatur können das Materialverhalten wesentlich beeinflussen. Für die SAXS Experimente wurden Composite aus Poloxamer, SiO_2 und H_2O verwendet, wie sie bereits zuvor untersucht wurden. Die Strukturbildung des Polymers und

der SiO₂-Nanopartikel wird in dieser Arbeit in Abhängigkeit von deren Stoffkonzentrationen ermittelt. Neben den ausgewählten Materialkombinationen wurde allen Proben das Wasser entzogen, um die Strukturänderung beim Eintrocknen zu ermitteln. Alle Proben wurden in Glaskapillaren in der unter Abschnitt 3.4 beschriebenen SAXS-Anlage gemessen. Alle Proben wurden zunächst in Lösung gemessen, wobei die Messzeit 4 h betrug. Ebenfalls wurden die Proben eingetrocknet um eine strukturelle Änderung hervorzurufen. Da diese Proben eine höhere Streuintensität besitzen, wurde diese Proben nur 2 h gemessen.

Aus den Massenverhältnissen von Polymer und SiO₂ kann ermittelt werden, dass durchschnittlich zwei Polymerketten mit einem Nanopartikel agieren können (für 0,5 nm große Partikel). Ob die Strukturänderung des Polymers dadurch wesentlich beeinflusst wird und hier ebenfalls eine Störung durch das SiO₂ hervorgerufen wird, wie es bei der Mizellenbildung und dem Gelübergang zuvor beobachtet werden konnte, soll anhand folgender Komposite ermittelt werden (Tabelle 5.3).

Tabelle 5.3.: Proben Röntgenkleinwinkelstreuung

Probe	in Lösung gemessen			eingetrocknet gemessen		
	P407	SiO ₂ [wt.%]	H ₂ O [wt.%]	P407	SiO ₂ [wt.%]	H ₂ O [wt.%]
1	20	3	77	86	13,0	<1
2	20	4,5	75,5	81	18	<1
3	23,5	3	73,5	88	11	<1
4	23,5	4,5	72	83	16	<1
5	23,5	0	76,5	99	0	<1

Da bei den eingetrockneten Proben Polymerkonzentrationen über 80 wt.% auftreten, sind hier lamellare, flüssigkristalline Strukturen zu erwarten. Nach Alexandridis et al. (1996) kann der Bragg-Reflex erster Ordnung (q - Streuvektor) der Periodizität der Lamellen zugeordnet werden. Dabei ergibt sich mit d der Abstand der lamellaren Zentren, welche von den PPO-Kernen des Polymers gebildet werden [102]. Abstand und Streuvektor stehen mit nachfolgender Gleichung im Zusammenhang.

$$q = \frac{2\pi}{d} \quad (5.1)$$

Insbesondere der Vergleich von den Proben in Lösung und eingetrocknet liefern Ergebnisse zu den Strukturbildungsprozessen des Polymers und der Nanopartikel und inwieweit sich die beiden Komponenten gegenseitig beeinflussen.

In der Abbildung 5.11 (a) sind exemplarisch die Streukurven für die Probe 4 (23,5 wt.% P407 + SiO₂) dargestellt. Die dunkelgrüne Kurve zeigt das Streuverhalten des Komposites in Lösung. Aus dessen linearem Anstieg lässt sich die fraktale Dimension der SiO₂-Cluster ermitteln. Mit der fraktalen Dimension von 1,4 liegen die streuenden Strukturen zwischen einer Kette (fraktale Dimension von 1) und einer Fläche (fraktale Dimension von 2). Man kann eine leichte und unregelmäßige Vernetzung der Ketten annehmen. Da an den Nanopartikeln einzelne Polymerketten binden, welche bis zu 50 nm lang sind, ist die Korrelation zwischen den SiO₂-Partikeln nicht detektierbar. Aus der Korrelationsfunktion der Streukurve ließ sich eine Größe der SiO₂-Partikel von 1,5 - 2 nm ermitteln. Die Größe der Partikel ist auf Aggregationsprozesse zurückzuführen, welche vor der Zugabe des Polymers stattfanden. An diesen kleinen Aggregaten binden zwei bis acht Polymerketten, welche sich unregelmäßig anordnen.

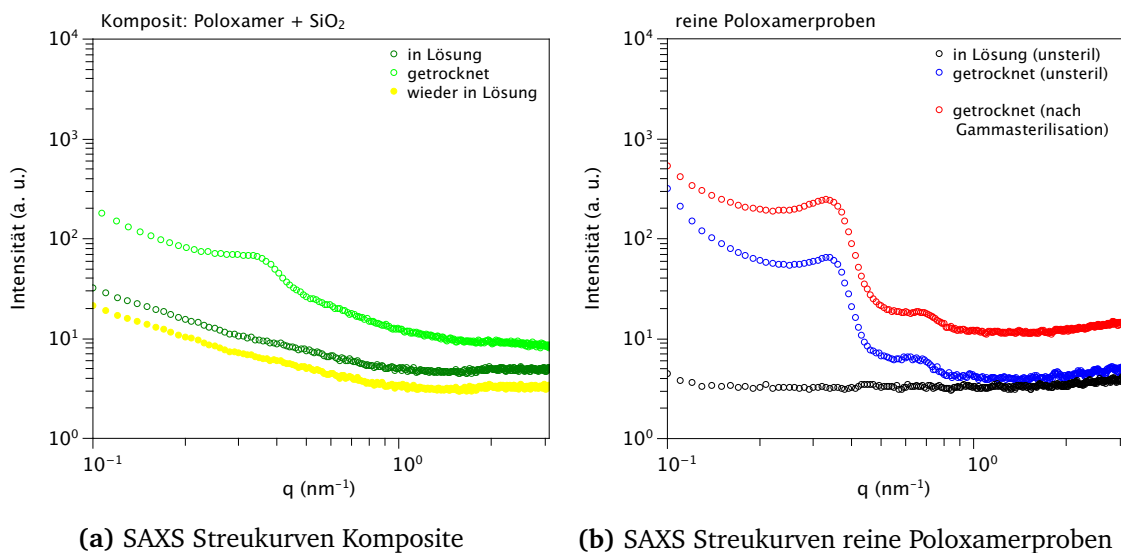


Abbildung 5.11.: SAXS Streukurven reiner Poloxamerproben (a) und eines Komposites aus Poloxamer und SiO₂ (b). Verschiedene Einflüsse auf die Strukturbildung, wie die Gammasterilisation, das Eintrocknen der Proben und das anschließende Lösen, wurden untersucht.

Um die Anordnung des SiO₂ im Komposit weiter zu untersuchen, wurde der Probe das Wasser entzogen. In der dazugehörigen Streukurve Abbildung 5.11 (a) zeigt sich ein Bragg-Reflex bei $q = 0,34 \text{ nm}^{-1}$ (hellgrüne Kurve). Beim Eintrocknen der Probe hat sich eine Struktur ausgebildet, welche in der Röntgenkleinwinkelstreuung ein Streusignal erzeugt.

Es gilt zu klären, ob dieses durch eine Aggregation der SiO₂-Partikel hervorgerufen wird. Zunächst wurde dazu die getrocknete Probe wieder in Lösung gebracht. Bei einer Aggregation des SiO₂ würden sich die entstandenen Cluster nicht einfach in Wasser lösen lassen und weiterhin einen Streureflex erzeugen. Beim Lösen der Probe

wurde so viel Wasser hinzu gegeben, dass die ursprünglichen Polymer- und SiO₂-Konzentrationen wiederhergestellt wurden. Die gelbe Streukurve in Abbildung 5.11 (a) zeigt das Ergebnis der wieder gelösten Probe. Die Kurve zeigt einen identischen Verlauf zu der ursprünglichen Probe in Lösung, der Streureflex tritt nicht auf. Somit lässt sich eine Aggregation der Nanopartikel ausschließen. Die SiO₂-Partikel müssen dementsprechend ausreichend von Polymerketten umgeben sein, so dass sie nicht miteinander agieren können.

Um den Streureflex der eingetrockneten Probe besser einzuordnen, wurde eine reine Poloxamerprobe (Probe 5) genauer untersucht. Da eine Strukturänderung des Poloxamers beim Eintrocknen zu erwarten war, wurde auch hier das in Wasser gelöste Polymer nochmals eingetrocknet gemessen.

Die Abbildung 5.11 (b) zeigt die Streukurven der reinen Poloxamerproben. Die in Lösung befindliche Probe zeigt keine Strukturen, welche in diesem Messbereich eine Streuung hervorrufen. Die Mizellaren Lösungen zeigen nur eine Fluktuationstreuung, aufgrund ihres hohen Wasseranteils. Bei der eingetrockneten Probe tritt jedoch eine Veränderung in der Streukurve auf. Es sind zwei deutliche Reflexe bei $q = 0,34 \text{ nm}^{-1}$ und bei $q = 0,7 \text{ nm}^{-1}$ erkennbar. Diese beiden Reflexe treten sowohl für die unsterile Probe (blaue Kurve) als auch für die γ -sterilisierte Probe (rote Kurve) auf. Ein Einfluss der Gammabestrahlung auf die Strukturbildung kann auch in diesem Versuch nochmals ausgeschlossen werden, trotz der leichten Veränderung in der Molmassenverteilung (Vgl. vorherige Abschnitte 5.2.1 - 5.2.4). Wie bereits oben erwähnt, lässt sich der erste Bragg-Reflex der Periodizität der Lamellen zuordnen [127].

Mit $q = 0,34 \text{ nm}^{-1}$ ergibt sich ein Lamellenabstand von 18,5 nm. Der zweite auftretende Reflex lässt sich dem Elektronendichteunterschied zwischen der PPO-Kette und der PEO-Kette zuordnen. Aus diesem Peak kann die Größe des PPO-Kerns abgeleitet werden. Für Poloxamer P407, vollständig eingetrocknet, beträgt dieser 8,98 nm. Der so ermittelte Abstand der Lamellen und die Größe des PPO-Kerns ist vergleichbar mit den von Gu et al. (2004) ermittelten Parameter für getrocknetes Poloxamer P407. Gu et al. zeigten auch, dass sich der Lamellenabstand mit zunehmendem Wasseranteil vergrößert, dieses ist auf die Hydratisierung der PEO-Ketten zurückzuführen und dessen vergrößerten Volumenanteil [127].

Die Streukurven der getrockneten Probe des reinen Poloxamers (blaue Kurve Abbildung 5.11 (b)) und der getrockneten Probe des Komposits (hellgrüne Kurve Abbildung 5.11 (a)) können nun miteinander verglichen werden. Der erste Bragg-Reflex ist in beiden Proben identisch und tritt bei $q = 0,34 \text{ nm}^{-1}$ auf. Dieser kann eindeutig der Strukturbildung des Poloxamers zugeordnet werden. Durch die Kombination mit den Nanopartikeln scheint der Phasenübergang des Poloxamers jedoch gestört zu sein,

sodass der zweite Reflex verschwindet. Es entsteht eine statistische Unordnung in der Lamellenstruktur, welche mit einer Art Temperaturordnung vergleichbar ist.

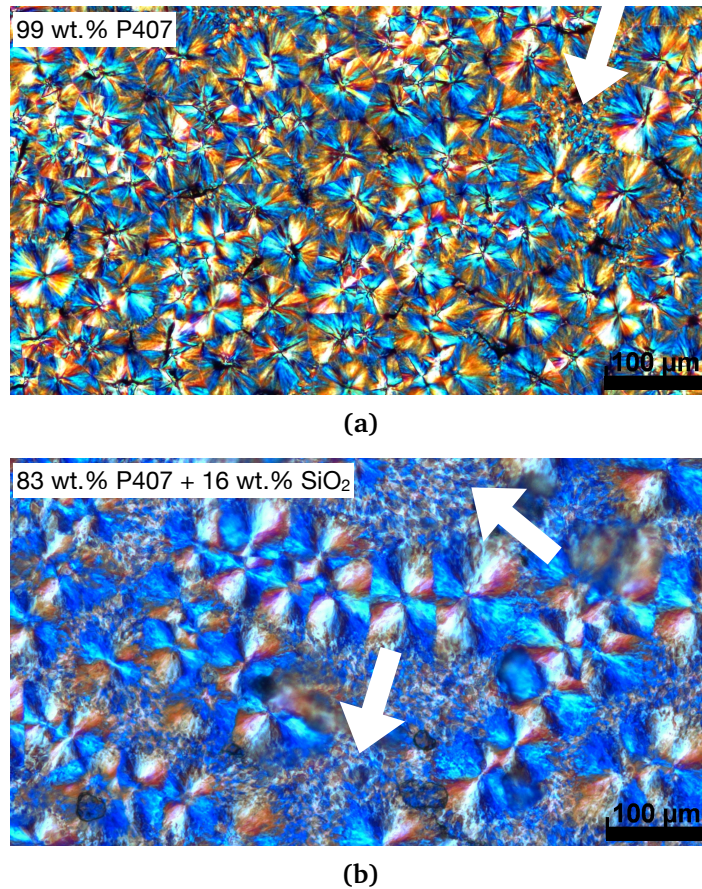


Abbildung 5.12.: Polarisationsmikroskopie der eingetrockneten Proben zur Darstellung der lamellaren Phase des Polymers und des Einflusses der Nanopartikel auf die Strukturbildung. Die reinen Poloxamerproben zeigen flächendeckend typische Malteserkreuze (a), die nur in geringem Maße von flächigen Texturen gestört werden (weiße Pfeile). Auch durch die Zugabe von SiO₂-Nanopartikeln wird diese Strukturbildung nicht verhindert (b). Jedoch kommt es zu Störungen, welche anhand der häufiger auftretenden Texturen zu erkennen sind (weiße Pfeile).

Besonders deutlich wird diese Störung auch unter dem Polarisationsmikroskop. Die flüssigkristallinen L α -Strukturen zeigen flächendeckend farbige Malteserkreuze für reine Poloxamerproben mit einem Feststoffgehalt über 80 wt.% (Abbildung 5.12 (a)). Diese regelmäßigen Strukturen zeichnen sich klar ab und sind nur selten von texturartigen Flächen umgeben, wie sie in der Abbildung (a) durch den weißen Pfeil gekennzeichnet sind. Durch die Zugabe von SiO₂ wird dieses gleichmäßige Erscheinungsbild gestört, in der Abbildung 5.12 (b) sind immer noch die Malteserkreuze erkennbar. Sie werden jedoch häufiger von flächigen Texturen durchzogen, welche auf eine Unordnung in der Lamellenbildung hindeutet (weiße Pfeile).

Allgemein wurden in den Streukurven keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von den Konzentrationen der hier verwendeten Komposite ermittelt. Die Streukurven aller Proben sind im Anhang in Abbildung A.2 abgebildet.

5.2.6. Zusammenfassung der strukturellen und mechanischen Materialeigenschaften

Mit den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass Poloxamer gute mechanische Eigenschaften aufweist, welche für eine Verwendung als Trägermaterial sprechen. Die Materialeigenschaften sind umfangreich in der Literatur beschrieben und ebenfalls die Verwendung von Poloxamer in Medizinprodukten. Diese Arbeit befasst sich vor allem mit den Eigenschaften des Materials in Kombination mit SiO₂-Nanopartikeln und dem Verhalten des Materials nach einer Sterilisation mittels Gammabestrahlung. Die Molekülgrößenverteilung ist überwiegend für unsterile Polymerlösungen beschrieben. Verschiedene Arbeiten zeigen die typische bimodale Molmassenverteilung des Poloxamers, wie sie aus dem synthetischen Herstellungsverfahren hervorgeht. Durch die Gammasterilisation wird eine trimodale Molekülgrößenverteilung hervorgerufen. Dabei entstehen sowohl mehr kürzere Ketten, durch das Aufspalten einzelner Molekülketten unter der Bestrahlung. Aber auch deutlich länger-kettige Moleküle werden erzeugt. Diese Molmassenverteilung wird durch eine längere thermische Belastung, wie sie bei der beschleunigten Alterung auftritt, nochmals verändert. Durch den oxidativen Stress zerfallen die längeren Molekülketten und es ergibt sich eine Verteilung mit vermehrt kurzen Polymerketten. Diese Änderung der Molmassenverteilung konnte bei der realen Alterung der Probe nicht beobachtet werden. Ein oxidativer Stress, z. B. bei falscher Lagerung der Proben, sollte demnach vermieden werden, um das Material nicht nachhaltig zu beeinflussen. Weiterhin konnte jedoch gezeigt werden, dass weder die Gammabestrahlung noch der oxidative Stress die strukturbildenden Eigenschaften des Poloxamers signifikant beeinflussen. Die wesentlichen Eigenschaften des Materials bleiben erhalten.

Die kritische Mizellenbildungstemperatur *cmt* und die Gelübergangstemperatur sind direkt von der Polymerkonzentration abhängig. Letzteres im gewissen Maße auch von der Nanopartikelkonzentration. Die Bestimmung der *cmt* konnte für alle Proben mittels DSC durchgeführt werden. Sie ist überwiegend von der gewählten Polymerkonzentration abhängig, wie es auch in der Literatur beschrieben ist [115, 116, 120]. Eine direkte Übereinstimmung mit Literaturdaten konnte jedoch nicht gefunden werden, da verschiedene Quellen inkonsistente Ergebnisse liefern. Eine signifikante Abhängigkeit der *cmt* von der Nanopartikelkonzentration war nicht beobachtbar. Die Silicapartikel nehmen hingegen einen signifikanten Einfluss auf die Mizellenbildungsenthalpie. Bei

höheren SiO_2 -Konzentrationen wurden deutlich geringere Enthalpien beobachtet, da vor der eigentlichen Mizellenbildung in der Gesamtlösung bereits einzelne Polymerketten an die Nanopartikel gebunden sind und nicht an dem Mizellenbildungsprozess teilnehmen.

Bei der Bestimmung der Gelübergangstemperatur ergaben sich mit den verschiedenen angewandten Messmethoden auch unterschiedliche Ergebnisse. Wobei aus dem Tube Inversion Test niedrigere Geltemperaturen hervorgingen als aus dem oszillationsrheologischen Experiment. Der Tube Inversion Test ist ein makroskopischer Test, mit viel größeren Probenmengen als sie beim Oszillationsrheometer verwendet werden. Ebenso wurde hier nur die Temperatur des Kühlmediums bestimmt und nicht direkt die Temperatur der Probe.

Das rheometrische Experiment ist durch den technisch überwachten Aufbau genauer. Die Ergebnisse der reinen Poloxamerproben lassen sich mit Daten aus der Literatur vergleichen. Eine vollkommene Übereinstimmung konnte nicht gefunden werden, allerdings weichen die herangezogenen Quellen selbst stark voneinander ab.

Sowohl Pandit et al. (1996) als auch Geng et al. (2011) ermittelten die Gelübergangstemperaturen mit einem Tube Inversion Test, wobei sich ihre ermittelten T_{Gel} durchschnittlich um 3°C unterscheiden [128, 129]. Bei Cabana et al. (1997) wurde T_{Gel} mittels Mikro-DSC und rheologischen Experimenten bestimmt. Sie konnten übereinstimmende T_{Gel} für 25 %ige und 30 %ige Poloxamer-Proben ermitteln. Das in dieser Arbeit verwendete DSC besitzt keine hinreichende Auflösung um den Gelübergang darzustellen.

Ein Vergleich von Tube Inversion Test und Rheologie wurde in der Literatur nicht gefunden. Auch für die Kombination mit SiO_2 -Nanopartikeln konnten keine relevanten Daten in der Literatur ermittelt werden.

Ähnlich wie bei der Mizellenbildung wird auch der Gelübergang durch die Nanopartikel beeinflusst. Der typische sprunghafte Anstieg des Speichermoduls und der Viskosität mit zunehmender Temperatur wurde immer geringer mit ansteigender SiO_2 -Konzentration. Der Phasenübergang der Mizellen in andere flüssigkristalline Phasen wurde maßgeblich beeinflusst. Durch das zusätzliche SiO_2 konnte eine höhere mechanische Stabilität des Komposits erreicht werden, welche sich insbesondere in den mechanischen Tests zur Bestimmung des Speicher- und Verlustmoduls wieder spiegelte. Beide Module stiegen ebenfalls mit zunehmender Nanopartikelkonzentration an. Dass es dabei nicht zu einer Aggregation der SiO_2 -Partikel, und somit zu einer Ausbildung eines internen SiO_2 -Gelnetzwerkes kam, konnte mittels Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten nachgewiesen werden. Die Größe der Nanopartikel ergibt sich aus den Konditionen des verwendeten Sols und zu welchem Zeitpunkt das Polymer hinzugegeben wurde. Im Komposit gehen die PEO-haltigen Kettenenden des

Poloxamers eine Verbindung mit den SiO_2 -Partikeln ein, welches zu einer erhöhte Volumenfraktion führte und in einer Steigerung der Viskosität und mechanischen Stabilität resultierte. Die herkömmliche Strukturbildung des Poloxamers war wesentlich von den Silicapartikeln beeinflusst.

Die Vernetzung der Komposite durch Gammabestrahlung, der oxidative Stress und auch die natürliche Alterung hatten keinen signifikanten Einfluss auf die thermischen und mechanischen Eigenschaften der Materialien. Die geringsten Abweichungen erzielten dabei die Proben mit den höchsten Polymer- und Nanopartikelkonzentrationen.

In der folgenden Tabelle 5.4 sind nochmals die Ergebnisse für die Mizellenbildungstemperatur (T_{Miz}) und der Gelbildungstemperaturen (T_{Gel}) aus Tube Inversion Test und Rheologie dargestellt.

Tabelle 5.4.: Vergleich der Gelübergangstemperaturen von Tube Inversion Test und Rheologie, sowie Mizellenbildungstemperatur aus DSC

Komposition	T_{Miz} DSC [°C]	T_{Gel} Tube inversion [°C]	T_{Gel} Rheologie [°C]
30 wt.% P407	-2,03	4,9	6
25 wt.% P407	3,11	12,8	12
25 wt.% P407 + 3 wt.% SiO_2	2,76	6,4	7,5
25 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO_2	2,32	6,7	5
23,5 wt.% P407	4,80	16,3	18
23,5 wt.% P407 + 3 wt.% SiO_2	4,47	8,6	10,5
23,5 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO_2	3,55	7,3	9,5
20 wt.% P407	7,79	19,1	22,5
20 wt.% P407 + 3 wt.% SiO_2	7,03	16,6	16,5
20 wt.% P407 + 4,5 wt.% SiO_2	6,27	15,4	12,5

5.3. Struktur des Trägermaterial-Granulat-Komposits

Drei ausgewählte Kombinationen aus Poloxamer, SiO_2 und Wasser wurden als Trägermaterial mit dem Biomaterial NanoBone[®] Granulat S39 kombiniert, um eine applizierbare Putty zu erzeugen. Die verwendeten Materialkombinationen bieten die Möglichkeit sowohl den Einfluss der Polymerkonzentration, als auch den Einfluss der SiO_2 -Konzentration zu untersuchen. Neben der Zusammensetzung des Trägermaterials unterscheiden sich die drei zu testenden Putties auch etwas in ihrer Herstellung. Die Auswahl der Trägermaterialien erfolgte so, dass bei zunehmender SiO_2 -Konzentration der Anteil des Poloxamers verringert wurde. Bei der ersten Putty auf Poloxamerbasis, welche kein SiO_2 enthält (Gruppe F), wird das Granulat mit Wasser getränkt, um die Poren des Biomaterials zu schließen. Anschließend wird eine Poloxamer-Wasser

Kombination hinzugegeben, so dass eine Konzentration von 30 wt.% Poloxamer entsteht. Biomaterial und Trägermaterial werden dabei in einem Volumenverhältnis von 45:55 vol.% gemischt.

Die zweite und die dritte Putty (Gruppe G und H) enthalten zusätzlich SiO_2 , welches aus einem Natrium-Wasserglas gewonnen wird. Das Sol besitzt einen SiO_2 -Feststoffgehalt von 6 wt.%. Das Granulat wird mit einem Anteil des verwendeten Sols getränkt, um wieder die Poren zu verschließen. Das SiO_2 -Sol beginnt zu gelieren und bildet eine Hydrogelhülle um das Granulat herum. Des Weiteren wird das restliche Sol verwendet, um das Trägermaterial vorzubereiten. Je nach gewünschter Konzentration wird das Poloxamer mit Sol bzw. mit Sol und Wasser gemischt. Es ergeben sich für die Gruppe G Konzentrationen von 25 wt.% P407 und 3 wt.% SiO_2 im Trägermaterial (Rest Wasser), und für die Gruppe H 23,5 wt.% P407 und 4,5 wt.% SiO_2 (Rest Wasser). Beide sind in einem Volumenverhältnis von 41,5:58,5 vol.% Trägermaterial:Granulat gemischt.

Die bereits erwähnte Vergleichsgruppe ABX besitzt laut Literatur einen Trägermaterial mit 25-30 wt.% Poloxamer. Das Volumenverhältnis vom Actifuse Mikrogranulat zum Trägermaterial beträgt dabei 50:50 vol.% [130].

Diese drei beschriebenen Kombinationen aus Trägermaterial und NB Granulat sollen nun genauer auf ihre Mikro- und Nanostruktur untersucht werden. Zum einen ist auch hier wieder die Stabilität des Gesamtkomposits interessant und wie es sich z. B. in stark blutenden Wunden verhalten würde. Dazu wird ein Löslichkeitstest durchgeführt, wie er auch schon mit den PVP Proben gemacht wurde. Damit kann die Klebrigkeit des Materials bestimmt werden. Ebenso kann in dem verwendeten Medium die SiO_2 -Konzentration analysiert werden, um zu ermitteln wie viel SiO_2 aus der Hydrogelhülle bzw. aus dem Granulat herausgelöst wird.

Um die Verbindung von Trägermaterial und Granulat weiter zu untersuchen, werden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der gefriergetrockneten Putties angefertigt. Die können dann mit gespülten Proben der Putties verglichen werden, um den Hydrogelmantel um das Granulat nachzuweisen. Diese gespülten Proben sollen auch wieder mittels Elementaranalyse untersucht werden, um mögliche Polymerrückstände zu bestimmen.

5.3.1. Auflöseverhalten im Medium

Wie bereits für die PVP Putty in Kapitel 4.3.1 beschrieben, wird hier das Auflöseverhalten der Putties in einer simulierten Körperflüssigkeit (SBF) analysiert. Je geringer das Lösungsverhalten der untersuchten Proben ist, umso stabiler wären die Materialien gegenüber einer starken Blutung im Defekt. Ebenso lässt sich im gleichen Versuch

untersuchen, ob ein Lösungsprozess des SiO_2 , aus der Putty heraus, stattfindet. Es wurden je $1,00 \text{ g} \pm 0,05 \text{ g}$ der Putties in 7ml simulierter Körperflüssigkeit (SBF) bei 37°C inkubiert. Nach den Zeitpunkten $t = (1, 10, 15, 30, 45, 60, 90) \text{ min}$ wurde das Material aus der SBF Lösung entnommen und das Gewicht der verbleibenden Putty bestimmt. Entscheidend war dabei der Anteil an zusammenhängendem Material. Abgelöste Fragmente wurden nicht mehr mit einbezogen und nicht mit gewogen. Alle Putties wurden in dreifacher Wiederholung bezüglich ihres Lösungsverhalten beobachtet und die verbleibende Masse des ungelösten Materials bestimmt.

In der Abbildung 5.13 sind die Ergebnisse des Lösungsversuches abgebildet. Mit zunehmender SiO_2 -Konzentration stieg die Beständigkeit der Putty, obwohl gegenläufig die Polymerkonzentration abnahm. Alle drei Proben zeigten lösliche Eigenschaften in der SBF, welche jedoch verzögert auftraten. Ein gute Resorbierbarkeit des Polymers kann also auch in Verbindung mit dem Granulat angenommen werden.

Ebenso wurde das Vergleichsprodukt Actifuse ABX in diesem Versuch mit analysiert. Da diese Putty ein schnelleres Auflösungsverhalten zeigte als die Gruppe F, scheint der Polymeranteil im Trägermaterial eher im unteren Bereich der angegebenen 25-30 wt.% zu liegen. Ebenso könnte es sein, dass das Trägermaterial mit dem NB Granulat S39 eine stärkere Verbindung eingeht und die NB Putties deshalb beständiger sind.

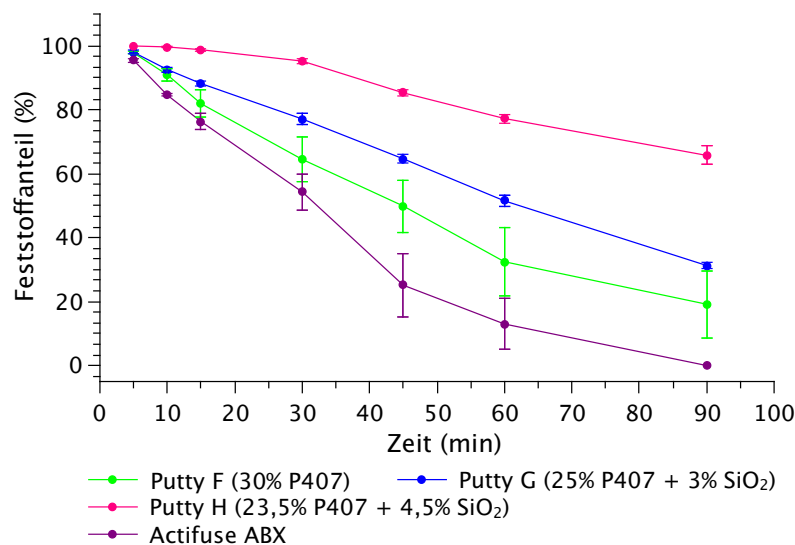


Abbildung 5.13.: Löslichkeit der verschiedenen Putties bei 37°C in simulierter Körperflüssigkeit

Nach dem das Lösungsverhalten analysiert wurde, stellte sich die Frage, ob sich aus den Proben auch SiO_2 aus dem Granulat löste. Dazu wurden im Vergleich die Putty F und die Putty H in vollständig entionisiertem Wasser bei 37°C inkubiert. Nach 24 h und nach 5 Tagen wurden die Überstände des Lösungsmedium abgenommen und auf ihren SiO_2 -Gehalt analysiert. Diese Messungen wurden von der Aqua Service Schwerin Beratungs- und Betriebsführungsgesellschaft mbH (Schwerin) durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle 5.5 dargestellt. Das verwendete Wasser wird als Kontrolle aufgeführt.

Tabelle 5.5.: Ergebnisse SiO₂-Gehalt

Zeit	Kontrolle	Putty F	Putty H
24 h		2,32 mg/l	13,6 mg/l
5 Tage	< 0,02 mg/l	15,1 mg/l	80,0 mg/l

Die Kontrollprobe zeigt, dass das entionisierte Wasser kein SiO₂ enthält. Für die Putty F und für die Putty H konnten bereits nach 24 h SiO₂-Anteile nachgewiesen werden. Nach 5 Tagen stieg der SiO₂-Gehalt im Lösungsmedium für die Putty F um etwa das 6,5 x an und für die Putty H um knapp das 6 x. Da bei der Putty F auch SiO₂ nachgewiesen werden konnte, muss dieses direkt aus dem Granulat stammen, da ihr Trägermaterial kein zusätzliches SiO₂ enthält. Der deutlich höhere SiO₂-Anteil der Putty H nach 24 h ist auf das SiO₂ im Trägermaterial der Putty zurückzuführen. Dennoch ist auch für diese Gruppe anzunehmen, dass ein Teil des SiO₂ direkt aus dem Granulat heraus gelöst sein könnte. Nach 5 Tagen wurde jedoch keine gesättigte Lösung erreicht, welche für SiO₂ in Wasser bei 100-150 ppm liegt [70].

5.3.2. Rasterelektronenmikroskopie und Elementaranalyse

Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen lässt sich der Verbund zwischen Trägermaterial und Granulat der verschiedenen Komposite genauer betrachten. Besonders interessant ist auch das Erscheinungsbild des Materials, nachdem es ausreichend gespült wurde. So lassen sich im REM mittels EDX Analyse eventuelle die Rückstände der Gelhülle auf der Granulatoberfläche nachweisen. Die gespülten Proben werden neben der EDX Analyse auch mittels Elementaranalyse auf ihren Kohlenstoffgehalt untersucht, welche dann wiederum Rückschlüsse auf eine verbleibende Hydrogelhülle liefert.

In der folgenden Abbildung 5.14 sind die REM Aufnahmen der gefriergetrockneten Putties (links) und der gespülten Putties (rechts) abgebildet. Bei den gefriergetrockneten Putties lässt sich eindeutig die Schicht des Trägermaterial identifizieren. Bei den Proben mit SiO₂ scheint das Trägermaterial das Granulat kompakter zu umschließen (c, e). Bei der gefriergetrockneten Putty F (a) sieht das Trägermaterial wie eine sehr dünne Schicht aus, welche die Oberfläche nur benetzt. Die Vergleichsgruppe Actifuse ABX wurde ebenfalls im REM untersucht, in der Abbildung 5.14 (g) sieht man auch eine Schicht aus Trägermaterial, welche das Mikrogranulat gleichmäßig umschließt. Vergleicht man nun die Proben mit den gespülten Materialien, scheint es, als seien alle vier Gruppen von dem Trägermaterial befreit zu sein (b, d, f, h). Jedoch kann

man für die Gruppe G und H vereinzelt kleine flächige und brüchige Strukturen erkennen, welche auf ein sprödes Hydrogel hindeuten. Um diese Vermutung genauer zu untersuchen, wurden alle Proben und das NB Granulat S39 mittels EDX analysiert. Reste des Trägermaterials sollten durch erhöhte Kohlenstoffpeaks nachweisbar sein. Dennoch gilt zu beachten, dass die so ermittelten Kohlenstoffwerte nicht als absolute Werte zu betrachten sind, da das System nicht sensitiv gegenüber solcher leichten Elemente ist. Dennoch können die Peaks relativ zu einander verglichen werden.

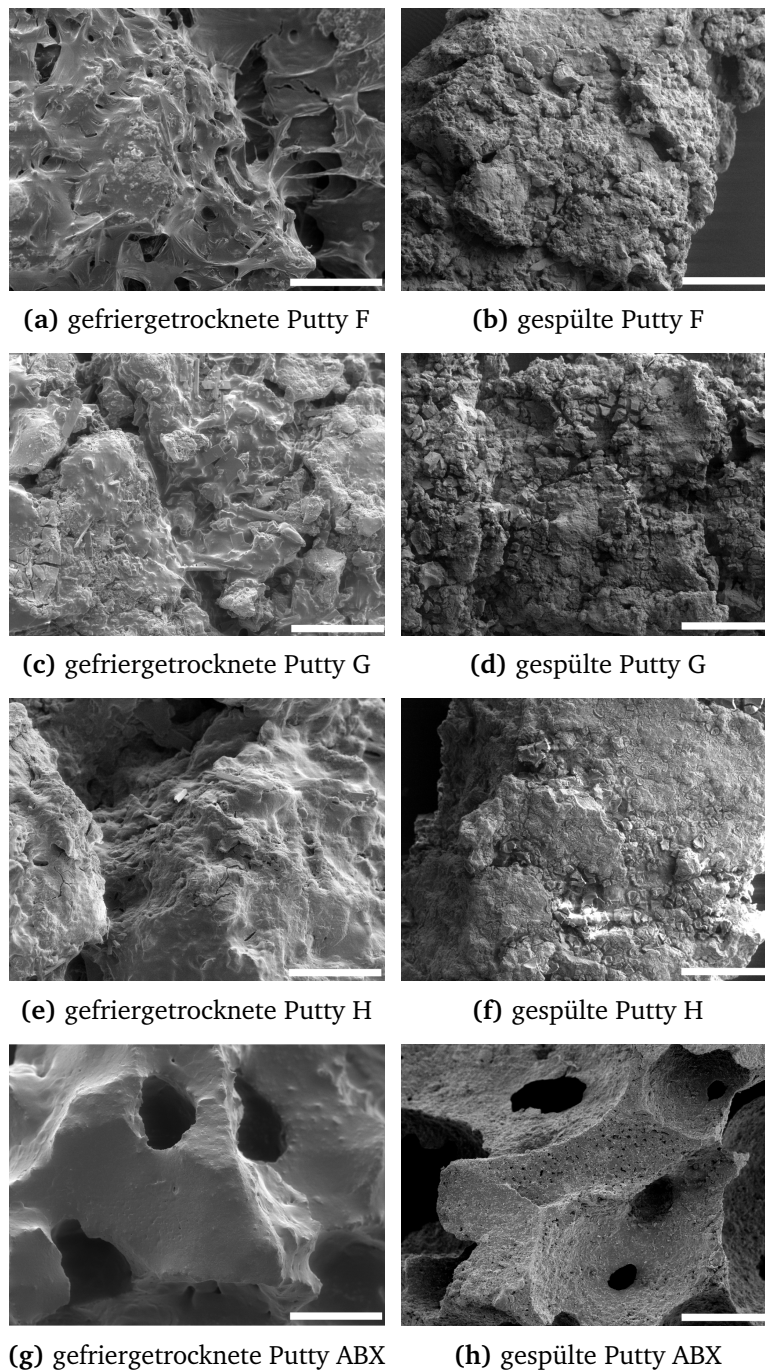


Abbildung 5.14.: REM Aufnahmen der gefriergetrockneten und gespülten Putties F, G und H, Maßstab 200 μ m

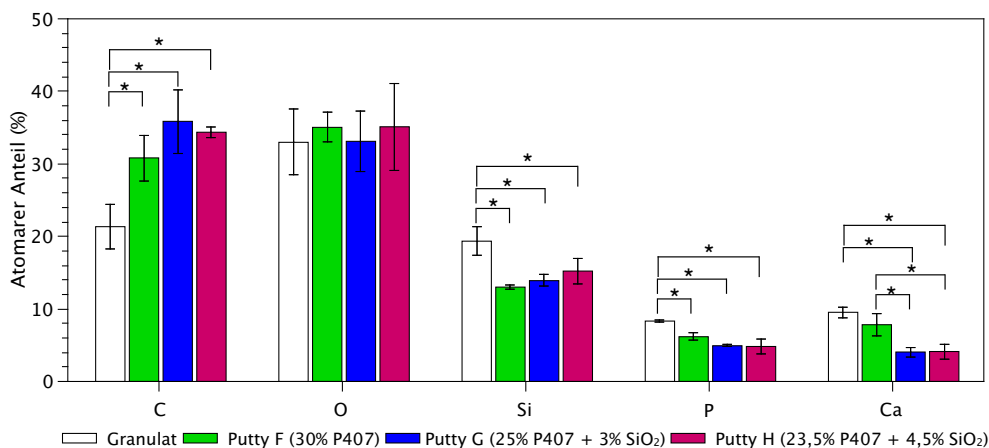


Abbildung 5.15.: EDX-Elementanalyse der gespülten Putties, signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$

Bei der Elementanalyse mittels EDX wurde an 5 verschiedenen Stellen der gespülten Probe die Zusammensetzung detektiert und mit der des Granulates ohne Trägermaterial verglichen. Die Abbildung 5.15 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Gruppen für die wesentlichen Elemente der Proben: Kohlenstoff, Sauerstoff, Silicium, Phosphor und Calcium. Die Proben, welche durch Spülen augenscheinlich von ihrem Trägermaterial befreit wurden, zeigten einen signifikant höheren Kohlenstoffgehalt als das Granulat. Ebenso sind hier die Werte für Si, P und Ca signifikant geringer (mit Ausnahme Ca-Gehalt der Gruppe F, nicht signifikant). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sich noch eine restliche Schicht Trägermaterial auf dem Granulat befindet, welche auch durch mehrfaches Spülen ($N = 3$) nicht abgetragen werden konnte. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Puttygruppen waren nicht signifikant, jedoch stieg mit zunehmender SiO_2 -Konzentration im Trägermaterial auch der Si-Gehalt in der EDX-Analyse. Ebenso nahmen der P- und Ca-Gehalt ab.

Die Putty ABX wurde ebenfalls mittels EDX-Analyse auf ihre Zusammensetzung nach dem Spülen untersucht. Als Kontrollgruppe diente hier das Actifuse Mikrogranulat, welches kommerziell erwerblich und vergleichbar mit dem NB Granulat S39, ist. Bei der Actifuse Putty gelang es, das Trägermaterial nahezu vollständig abzuspülen. Zwischen dem gespülten Material und der Kontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede in der Elementzusammensetzung (Ergebnisse im Anhang Abbildung A.3). Durch das gesinterte Mikrogranulat der Actifuse Putty und auch durch dessen geringeren SiO_2 -Anteil haftete das Trägermaterial nicht so stark an dessen Oberfläche und ließ sich leicht entfernen. Um den Anteil des verbleibenden Trägermaterials genauer zu bestimmen, wurden die gespülten Proben noch mittels Elementaranalyse im Institut für Chemie untersucht. Diese Methode kann den verbleibenden Kohlenstoffgehalt der gesamten Probe präziser bestimmen. Die Ergebnisse für die verschiedenen Gruppen und die des Granulates sind in der Tabelle 5.6 dargestellt.

Tabelle 5.6.: Ergebnisse Elementaranalyse

Gruppe	Elementarer Kohlenstoff C in %				Mittelwert \pm Standardabweichung
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	
Kontrolle	0,048	0,056	0,051	0,065	0,0528 % \pm 0,004 %
F	2,404	2,49	4,255	3,961	3,2775 % \pm 0,967 %
G	4,924	5,047	3,264	3,54	4,1938 % \pm 0,923 %
H	4,215	4,168	4,486	4,095	4,241 % \pm 0,171 %
Actifuse Putty	0,039 %	0,048 %	0,042 %	0,04 %	0,042 % \pm 0,004 %

Die NB Puttygruppen zeigen signifikant höhere Kohlenstoffanteile als das zur Kontrolle verwendete NB Granulat S39. Mit zunehmender SiO₂-Konzentration kann ein Anstieg des nachweisbaren Kohlenstoffanteils beobachtet werden. Jedoch sind die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant. Ein signifikant großer Unterschied ist im Vergleich zu der Actifuse Putty zu erkennen. Sie zeigt vernachlässigbare Kohlenstoffanteile, so dass angenommen werden kann, dass das Trägermaterial auf Poloxamerbasis vollständig abgespült werden konnte. Zum einen ist die Oberfläche des gesinterten Actifuse Mikrogranulates weniger rau, zum anderen enthält es nur einen vergleichbar sehr geringen SiO₂-Anteil von 0,8 wt.% besitzt. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass das Poloxamer eine Affinität gegenüber SiO₂ hat.

5.4. Tierexperimentelle Studie

5.4.1. *in vitro* Ergebnisse

In den toxikologischen Voruntersuchungen wurden keine Auffälligkeiten beobachtet. Die Zellaktivität auf den zu testenden Materialien aus dem XTT Test lag überhalb der festgelegten Grenze von 70 %. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden. Die Differenzen lagen innerhalb des Messfehlers. Alle Produkte sind demnach nicht toxisch und können ohne weitere Bedenken im Tier getestet werden.

5.4.2. Tiermodell A - Ratte

In einem Vorversuch wurden die Putty F mit 30 wt.% Poloxamer, ohne SiO₂ und die Putty G mit 25 wt.% Poloxamer und 3 wt.% SiO₂ im Tibiamodell der Ratte getestet. Das Tiermodell mit den männlichen Wistarratten wurde bereits genauer in Kapitel 3.8.2 beschrieben. In diesem Vorversuch kann ein erster Eindruck zur biologischen Verträglichkeit des Polymers und zum Einfluss des zusätzlichen SiO₂ im Trägermaterial erhalten werden. Ebenso wurde das Vergleichsmaterial Actifuse ABX in den Tibiadefekt

der Ratte implantiert, um das Trägermaterial unabhängig vom Knochenersatzgranulat bewerten zu können. Alle Gruppen wurden nach 12, 21 und 63 Tagen histologisch begutachtet und histomorphometrisch ausgewertet. Die histologische Evaluierung der NB Putties F und G erfolgte an entkalkten und HE gefärbten Schnitten. Für die Actifuse Proben wurden Dünschliffpräparate nach Donath angefertigt [79] und mit Toluidinblau angefärbt.

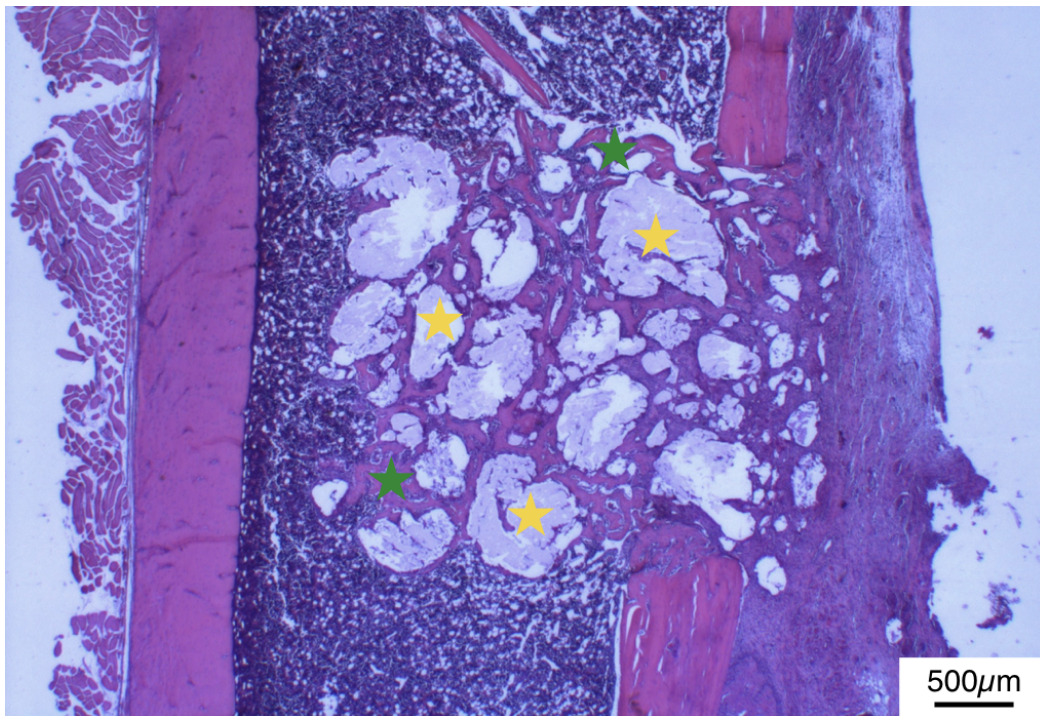
Histologische Evaluierung

Die drei in der Ratte getesteten Gruppen unterscheiden sich im wesentlichen in der Form des Knochenersatzmaterials. Die NB Putties enthalten ein hochporöse Granulat mit 39 wt% SiO₂, welches eine große innere Oberfläche von $\approx 206,8 \text{ g/m}^2$ besitzt. Diese große innere Oberfläche ermöglicht es Zellen direkt in das Material einzudringen und mit Gewebe zu durchsetzen. Der Umbau des Biomaterials wird schnell angeregt. Das Vergleichsmaterial Actifuse ABX ist ein gesintertes Mikrogranulat mit lediglich 0,8 wt% SiO₂, dessen Oberfläche sehr kompakt erscheint. Durch das Sintern lässt sich vermuten, dass ein Durchdringen des Materials von Zellen und Gewebe eher unwahrscheinlich ist.

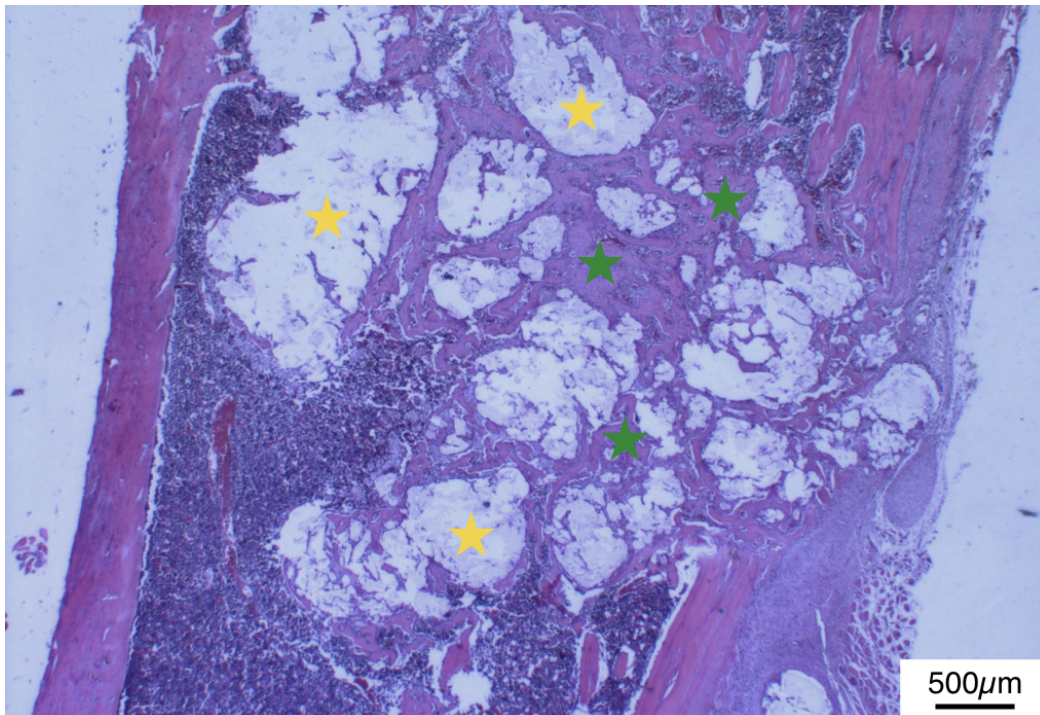
In der Abbildung 5.16 sind die HE gefärbten Präparate der NB Putties nach 12 Tagen abgebildet, (a) Gruppe F ohne SiO₂ und (b) Gruppe G mit zusätzlichen 3 wt.% SiO₂ im Trägermaterial. Für beide Gruppen fällt auf, dass das Trägermaterial unabhängig von der Polymerkonzentration nach 12 Tagen vollständig resorbiert wurde. Neben der guten Vaskularisierung lässt sich auch eine sehr gute Osteogenese nach 12 Tagen beobachten, das Biomaterial ist von Gewebe und Knochen durchsetzt. Die Kortikalis ist bei beiden Proben noch nicht geschlossen. Der Matrixwechsel des Granulates ist schon vorangeschritten, welches sich an dessen hellen rosa Färbung erkennen lässt. In dieser frühen Phase lässt sich kein gravierender Unterschied im histologischen Erscheinungsbild der Gruppen entdecken.

In der anschließenden Abbildung 5.17. sind die HE gefärbten Proben, 63 Tage nach der Implantation, abgebildet. Auch hier zeigt sich wieder ein sehr vergleichbarer Zustand beider Proben. Die Kortikalis ist weitestgehend geschlossen und nur von einigen verbleibenden Granulatkörnern durchsetzt. Der Anteil des neugebildeten Knochens im Markraum nimmt für beide Gruppen wieder ab. Bei der Putty F (a) ist etwas mehr Granulat im Defektbereich erkennbar als bei der darunter liegenden Putty G (b). Ebenso scheint der Matrixwechsel bei der Putty G mit zusätzlichem SiO₂ im Trägermaterial deutlich fortgeschrittener zu sein. Die rosa bis lila gefärbten Granulatkörner deuten auf einen hohen organischen Anteil im Biomaterial hin.

In der Abbildung 5.18 wird eine vergrößerte Darstellung der Putties gezeigt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass beide Proben auch nach 63 Tagen noch eine sehr gute Vaskularisierung zeigen, welche für den aktiven Abbau und Umbau des Biomaterials unerlässlich ist. In beiden Proben ist das Biomaterial von Gewebe und Knochen durchsetzt. Für die Probe mit zusätzlichem SiO_2 lassen sich nach 63 Tagen noch mehr Osteoklasten auf dem Biomaterial und Osteoblastensäume am Knochen beobachten. Quantitative Unterschiede werden in der histomorphometrischen Analyse ermittelt.

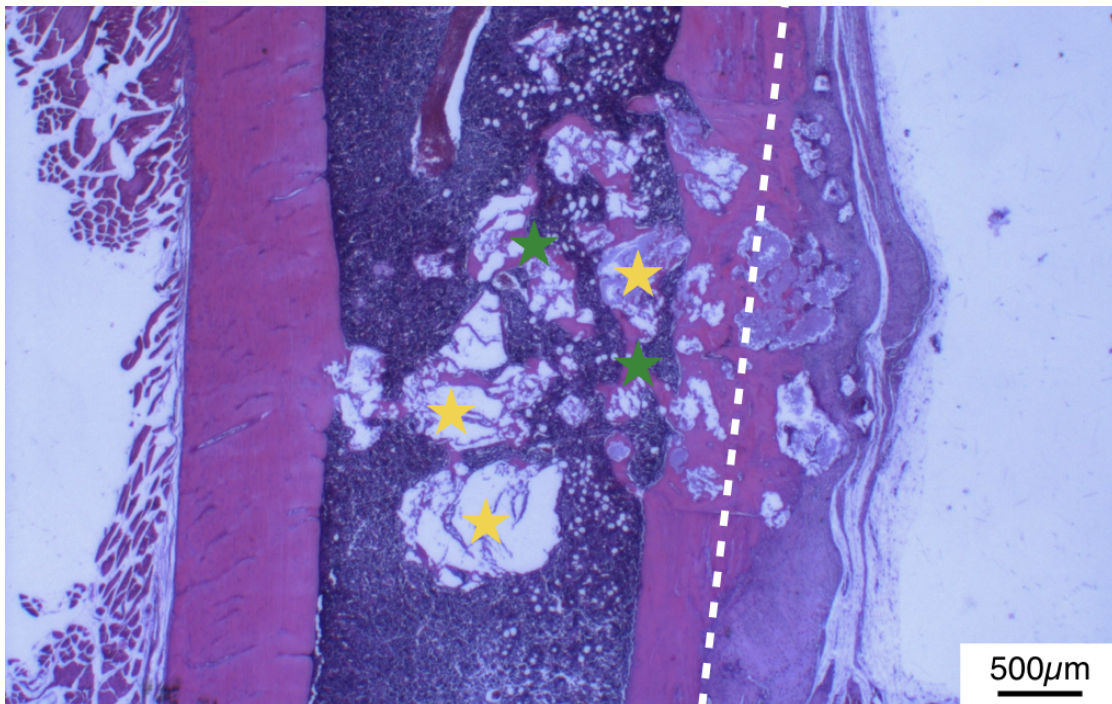


(a) 12 Tage nach der Implantation mit der Poloxamer Putty F ohne SiO_2 im Trägermaterial.

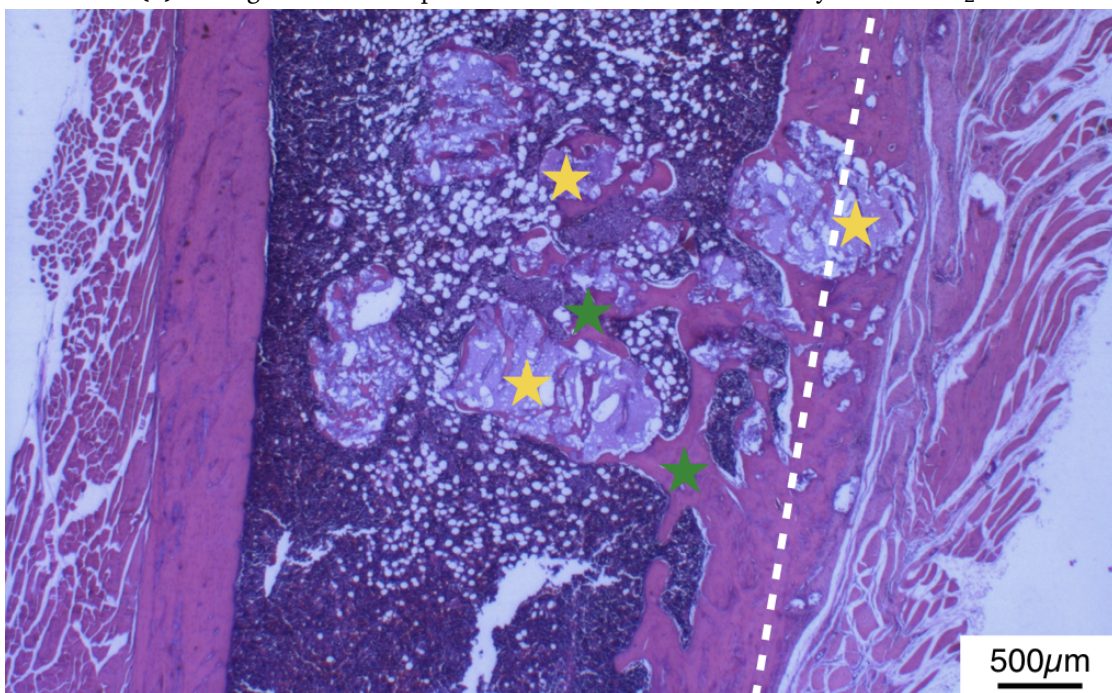


(b) 12 Tage nach der Implantation mit der Poloxamer Putty G mit 3 wt.% SiO_2 im Trägermaterial.

Abbildung 5.16.: Histologische Aufnahmen des gesamten Defektbereiches in der Tibia der Ratte 12 Tage nach der Implantation. HE gefärbte Präparate an entkalkten Schnitten. Poloxamer Putty F ohne SiO_2 (oben) und der Poloxamer Putty G mit 3 wt.% SiO_2 (unten). Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen.

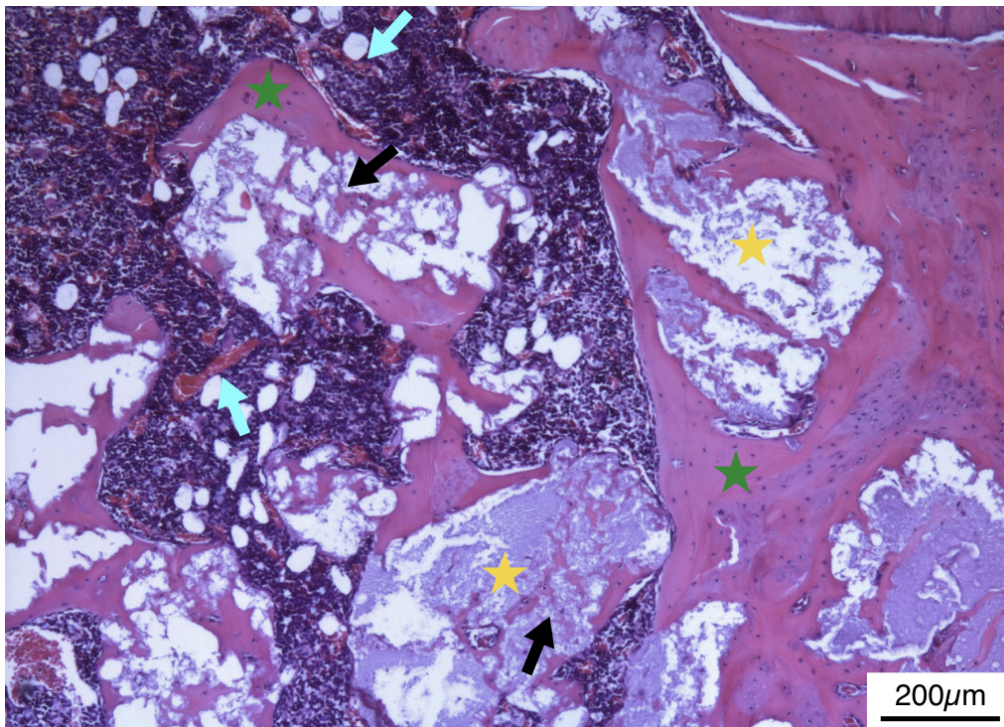


(a) 63 Tage nach der Implantation mit der Poloxamer Putty F ohne SiO_2 .

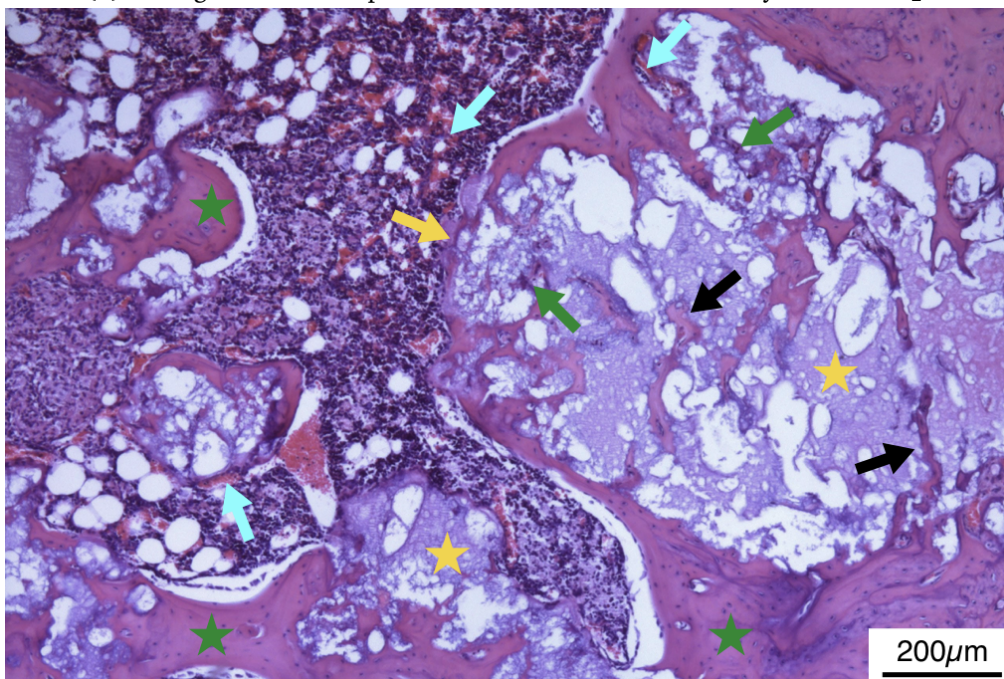


(b) 63 Tage nach der Implantation mit der Poloxamer Putty G mit 3 wt.% SiO_2 .

Abbildung 5.17.: Histologische Aufnahmen des gesamten Defektbereiches in der Tibia der Ratte 12 Tage nach der Implantation. HE gefärbte Präparate an entkalkten Schnitten. Poloxamer Putty F ohne SiO_2 (oben) und der Poloxamer Putty G mit 3 wt.% SiO_2 (unten). Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, weiße gestrichelte Linie - geschlossene Kortikalis.



(a) 63 Tage nach der Implantation mit der Poloxamer Putty F ohne SiO_2 .

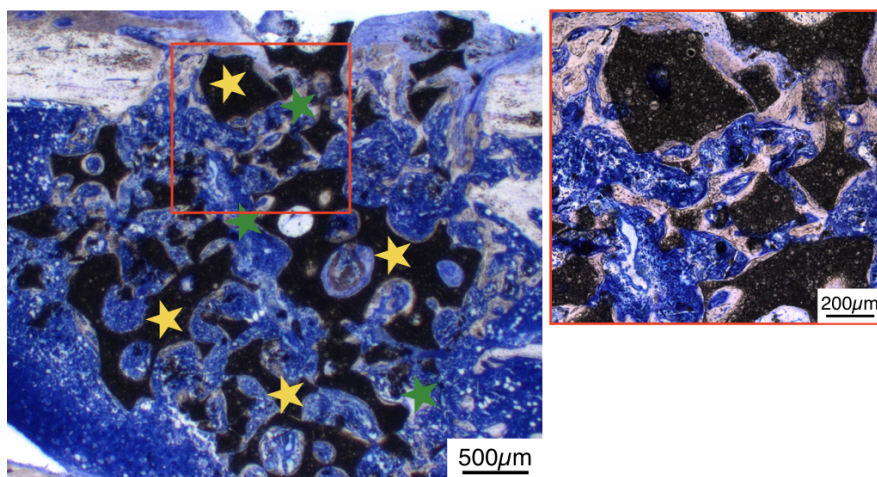


(b) 63 Tage nach der Implantation mit der Poloxamer Putty G mit 3 wt.% SiO_2 .

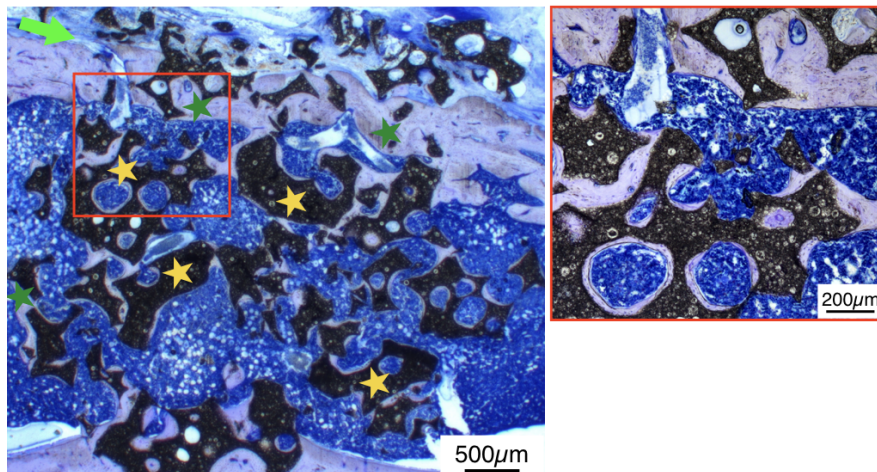
Abbildung 5.18.: Vergrößerung der HE gefärbten Schnittpräparate, 63 Tage nach der Implantation. Poloxamer Putty F ohne SiO_2 (oben) und der Poloxamer Putty G mit 3 wt.% SiO_2 (unten). Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, gelbe Pfeile - Osteoblastensäume, grüne Pfeile - Osteoklasten, schwarze Pfeile - Gewebestraßen, blaue Pfeile - Blutgefäße.

An dieser Stelle soll die histologische Bewertung der Vergleichsgruppe Actifuse ABX erfolgen. In der Abbildung 5.19 sind die Schliffpräparate der Putty ABX nach 12 (a) und 63 Tagen (b) dargestellt. Wie bereits erwartet, erscheint das gesinterte Mikrogranulat deutlich kompakter. Ein Einwachsen von organischem Material in das Biomaterial ist nicht zu beobachten. Dennoch ist zu erkennen, dass neuer Knochen, insbesondere an den Rändern des Granulates, gebildet wird (siehe dazu den vergrößerten Ausschnitt im roten Kasten).

Während nach 12 Tagen nur wenig Knochen im kortikalen Defektbereich zu erkennen ist, lässt sich nach 63 Tagen eine fast geschlossene Kortikalis beobachten. Dennoch ist der große verbleibende Anteil an Biomaterial im Defektbereich nicht besonders erwünscht.



(a) Actifuse Putty ABX nach 12 Tagen



(b) Actifuse Putty ABX nach 63 Tagen

Abbildung 5.19.: Gimsa Tuloidinblau gefärbten Schliffe der Actifuse Putty ABX. Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen. Der grüne Pfeil links oben (b) deutet auf die noch nicht geschlossene Kortikalis nach 63 Tagen. In den roten Kästen ist ein vergrößerter Ausschnitt abgebildet, um die Anlagerung des neuen Knochens am Mikrogranulat zu zeigen.

Histomorphometrie

Um die quantitativen Unterschiede in der Knochenneubildung und im Abbau des Biomaterials (Granulat und Trägermaterial) zu bestimmen, wurde eine histomorphometrische Analyse durchgeführt. Die Flächenanteile des neugebildeten Knochens und des Biomaterials wurden im Verhältnis zum ausgewählten Defektbereich, wie unter Kapitel 3.8.5 beschrieben, ermittelt und miteinander verglichen. Bei den beiden NB Putties erfolgte wieder eine Unterteilung des gesamten Defektbereiches in Markraum und kortikalen Defektbereich. Die Actifuse Vergleichsgruppe wurde nur im gesamten Defektbereich ausgewertet. Der Vergleich zwischen den drei Gruppen erfolgt am Ende dieses Abschnittes, zunächst wird nur auf die NB Putties F und G eingegangen.

Für die Defektheilung und vor allem für die Stabilität des Knochens ist eine geschlossene Kortikalis von besonderem Interesse. Der Anteil der Knochenbildung in diesem Defektbereich ist daher entscheidend und wie schnell dieses geschieht. Im Markraum kann zwar auch neu gebildeter Knochen beobachtet werden, jedoch wird dieser innerhalb des Röhrenknochens nicht benötigt. Ein Abbau des Knochens bzw. ein deutlich geringerer Anteil als im kortikalen Defektbereich wird daher erwartet. In den folgenden Abbildungen sind zunächst die Flächenanteile des neuen Knochens in der Kortikalis (Abbildung 5.20 (a)) und im Markraum (Abbildung 5.20 (b)) nach 12, 21 und 63 Tagen dargestellt. Die Poloxamer Putty ohne SiO₂ im Trägermaterial (Putty F) ist durch die grünen Balken gekennzeichnet, die Putty mit zusätzlichen 3 wt.% SiO₂ (Putty G) ist in blau dargestellt.

Im kortikalen Defektbereich (Abbildung 5.20 (a)) ist zu erkennen, dass für beide Gruppen der Flächenanteil an neu gebildeten Knochen stetig zunimmt. Im Mittel zeigt die Putty G (25 wt.% Poloxamer + 3 wt.% SiO₂) einen höheren Knochenanteil im kortikalen Defektbereich, welcher sich jedoch nicht statistisch signifikant vom Knochenanteil der Putty F unterscheidet. Nach 12 und 21 Tagen zeigt die Putty G im Mittel etwa 8 % mehr neuen Knochen als Putty F. Nach 63 Tagen erreichen beide Gruppen ein Niveau um 56 % an neu gebildeten Knochen in der Kortikalis. Wie in der histologischen Evaluierung zu erkennen war, ist die Kortikalis zu diesem Zeitpunkt geschlossen. Die verbleibenden von 44 % ergibt sich aus restlichem Granulat und Weichgewebe.

Im Markraum ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Poloxamer-Gruppen zu erkennen (Abbildung 5.20 (b)). Der Anteil an neu gebildetem Knochen ist hier deutlich geringer und schwankt zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen 17,33 % und 21,98 %. Ein Trend des Knochenabbaus im Markraum ist innerhalb der Versuchszeit für beide Putties nicht zu beobachten.

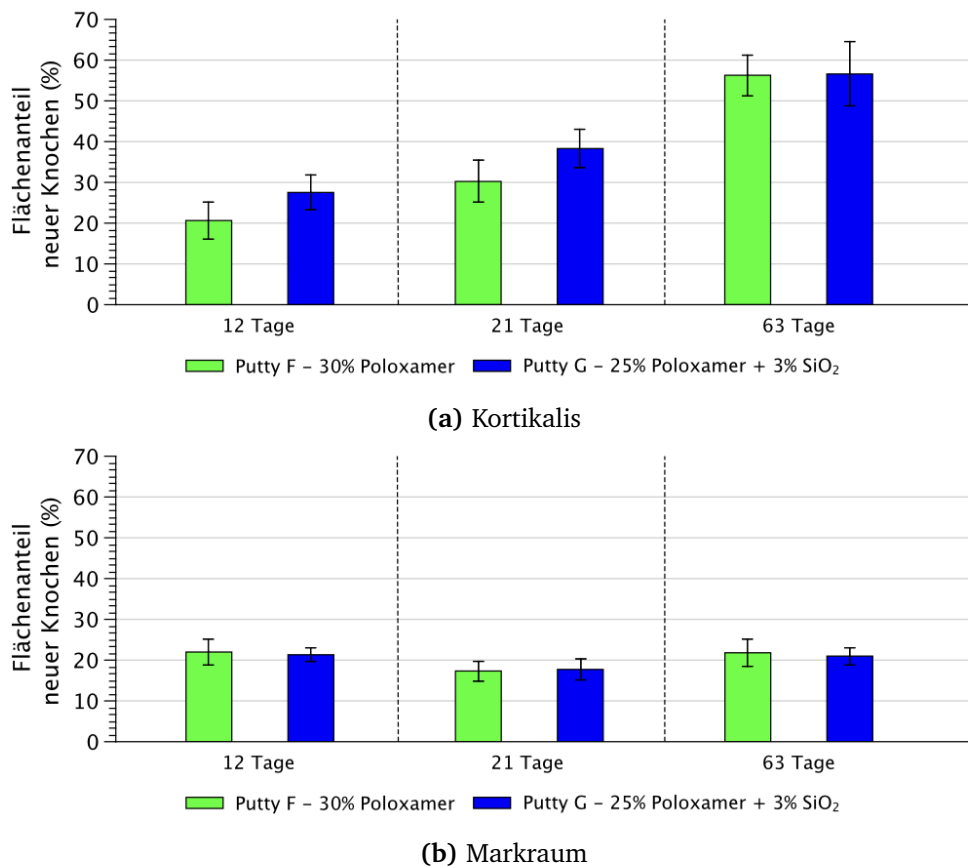
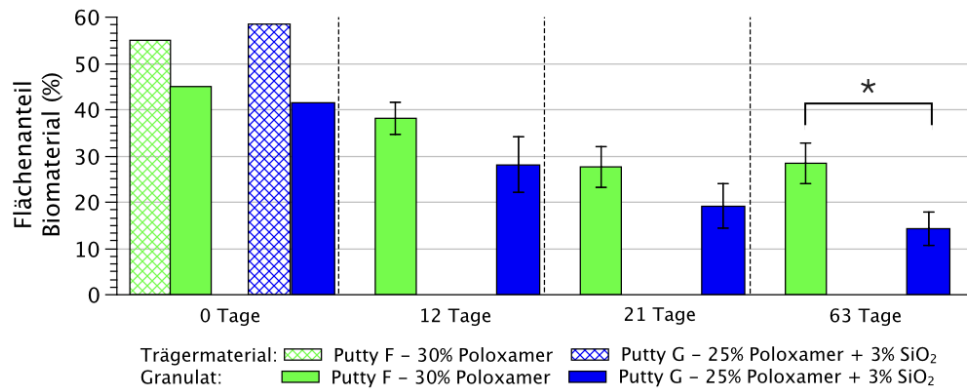


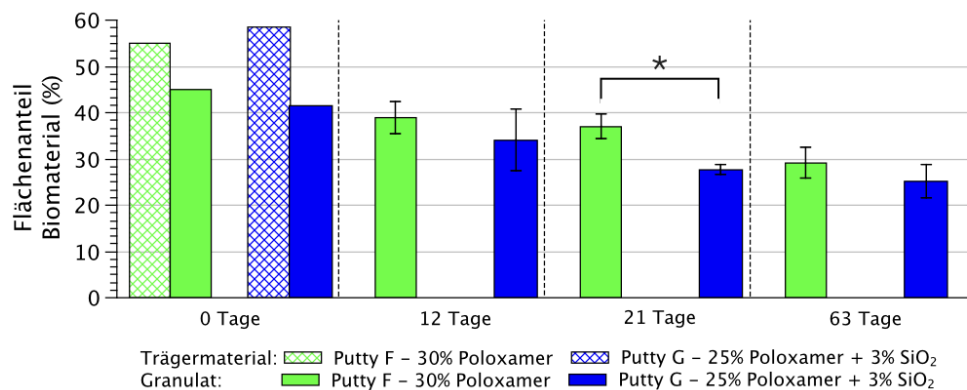
Abbildung 5.20.: Histomorphometrie: Flächenanteile des neu gebildeten Knochens in der Kortikalis und im Markraum, grün - Poloxamer Putty F ohne SiO₂, blau - Poloxamer Putty G mit SiO₂

Um die Anteile des verbleibenden Biomaterials zu bestimmen, wurden zunächst die Volumenanteile an Trägermaterial und Granulat aus der Zusammensetzung der Putties ausgerechnet. Daraus können dann Flächenanteile abgeleitet werden, wie sie sich zum Zeitpunkt 0 ergeben, wenn der Defekt komplett mit dem Knochenersatzmaterial ausgefüllt ist. Die beiden NB Putties unterscheiden sich ein wenig in den Verhältnissen von Granulat zu Trägermaterial. Die Gruppe F (30 wt.% Poloxamer, ohne SiO₂) besteht zu 45 vol.% aus Granulat und 55 vol.% Trägermaterial, bei der Gruppe G (25 wt.% Poloxamer, 3 wt.% SiO₂) ist das Verhältnis Granulat : Trägermaterial 41,5 vol.:%:58,5 vol.%. Diese Verhältnisse sind als 0 Tage Werte in den Diagrammen aufgetragen (Abbildung 5.21). Das Trägermaterial wird durch die schraffierte Fläche und das Granulat durch die gefüllte Fläche dargestellt. Der verbleibende Anteil an Biomaterial für den kortikalen Defektbereich ist in der Abbildung 5.21 (a) zu sehen, für den Markraum sind die Werte in der Abbildung 5.21 (b) aufgetragen.

Wie bereits in der histologischen Evaluierung beschrieben wurde, ist bereits nach 12 Tagen in beiden Gruppen kein Trägermaterial mehr beobachtbar. Im kortikalen Defektbereich sieht man nach 12 Tagen, dass sich der Anteil an ver-



(a) Kortikalis



(b) Markraum

Abbildung 5.21.: Histomorphometrie: Flächenanteile des neu gebildeten Knochens in der Kortikalis und im Markraum, grün - Poloxamer Putty F ohne SiO₂, blau - Poloxamer Putty G mit SiO₂

bleibendem Granulat in beiden Gruppen bereits verringert. Dabei wird in der Gruppe mit zusätzlichem SiO₂ im Trägermaterial bereits mehr Granulat abgebaut. Dieser Unterschied ist auch für die anderen Zeitpunkte zu beobachten. Nach 12 und 21 Tagen ist der Unterschied nicht signifikant. Nach 63 Tagen Standzeit beträgt der Anteil an verbleibendem Granulat in der Kortikalis bei der Putty G nur noch 14,28 % ± 3,71 % und ist damit signifikant geringer im Vergleich zur Putty F (28,42 % ± 4,45 %). Im Markraum (Abbildung 5.21 (b)) zeigt sich ein ähnliches Verhalten, auch hier ist für die Putty G zu jedem Zeitpunkt ein geringer Anteil an verbleibendem Granulat zu verzeichnen, welches jedoch nur nach 21 Tagen signifikant ist. Nach 63 Tagen sind für beide Gruppen nur noch 25 % - 29 % des Granulates im Markraum vorhanden. Für die Putty F wurde zusätzlich ein weiterer Zeitpunkt nach 126 Tagen ausgewertet, bei der ein weiterer Abbau des Biomaterials und eine Zunahme des Knochens, insbesondere im kortikalen Defektbereich, beobachtet werden konnte. Diese Daten und die Ergebnisse der Vergleichsgruppe Actifuse ABX sind in der Tabelle 5.7 dargestellt.

Tabelle 5.7.: Histomorphometrische Daten

	Gesamter Defekt					
	Knochen in %			Granulat in %		
	F	G	ABX	F	G	ABX
0 Tage	0	0	0	45	41,5	50
12 Tage	21,90 ± 3,10	24,26 ± 1,90	17,75 ± 1,91	38,21 ± 3,18	30,80 ± 4,95	34,89 ± 1,25
21 Tage	21,88 ± 2,08	27,54 ± 1,68	18,40 ± 1,41	33,77 ± 2,59	24,36 ± 1,53	31,47 ± 1,63
63 Tage	34,41 ± 3,50	34,43 ± 2,69	19,53 ± 1,01	29,10 ± 2,81	20,90 ± 1,46	35,43 ± 1,88
126 Tage	39,40 ± 1,88	-	-	23,66 ± 2,22	-	-
	Kortikaler Defekt					
	Knochen in %			Granulat in %		
	F	G	ABX	F	G	ABX
0 Tage	0	0		45	41,5	
12 Tage	20,64 ± 4,55	27,53 ± 4,19	-	38,14 ± 3,46	28,05 ± 6,03 %	-
21 Tage	30,23 ± 5,16	38,30 ± 4,66	-	27,64 ± 4,34	19,12 ± 4,83 %	-
63 Tage	56,28 ± 5,07	56,60 ± 7,94	-	28,42 ± 4,45	14,28 ± 3,71	-
126 Tage	65,64 ± 2,24	-	-	26,05 ± 2,86	-	-
	Markraum					
	Knochen in %			Granulat in %		
	F	G	ABX	F	G	ABX
0 Tage	0	0		45	41,5	
12 Tage	21,98 ± 3,06	21,31 ± 1,56	-	38,92 ± 3,46	34,02 ± 6,67	-
21 Tage	17,33 ± 2,45	17,72 ± 2,50	-	36,96 ± 2,65	27,65 ± 1,07	-
63 Tage	21,80 ± 3,43	20,99 ± 2,10	-	29,11 ± 3,35	25,16 ± 3,63	-
126 Tage	20,39 ± 2,81	-	-	21,85 ± 2,99	-	-

Aus den Daten in der Tabelle 5.7 geht hervor, dass die Knochenneubildung im gesamten Defekt für die NB Putties zu jedem Zeitpunkt deutlich besser ist, als die Actifuse Putty ABX. Insbesondere die Putty G mit zusätzlich 3 wt.% SiO₂ im Trägermaterial zeigt signifikant mehr neu gebildeten Knochen als die Putty ABX. Die Putty ABX besteht zu 50 vol.% aus einem Trägermaterial (25-30 wt.% Poloxamer) und zu 50 vol.% aus einem gesintertem Granulat (0,8 wt.% SiO₂). Auch hier wurde das Trägermaterial innerhalb der ersten 12 Tage vollständig resorbiert.

Ein deutlicher Unterschied zwischen den Putties ergibt sich aber beim Abbau des Granulates. Wie bereits erwartet, wird das gesinterte Material nur geringfügig resorbiert. Der größte Abbau scheint innerhalb der ersten 12 Tagen zu geschehen, hier sind 32,2 % weniger Granulat (im Vergleich zu t=0 Tage) messbar. In den darauf folgenden Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

5.4.3. Tiermodell B - Poloxamer im Kaninchen

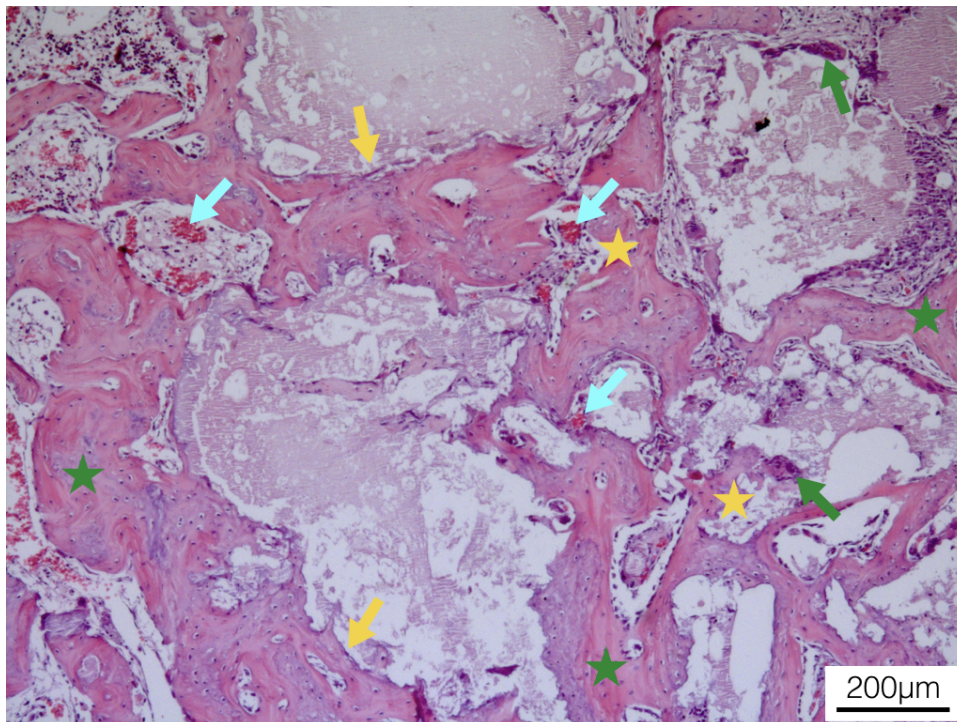
Aus den Vorversuchen in der Ratte mit der Putty F und der Putty G konnte ermittelt werden, dass das zusätzliche SiO₂ im Trägermaterial einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung und den Abbau des Biomaterials hat. Ebenfalls konnte durch das SiO₂ die Poloxamerkonzentration verringert werden, ohne die mechanischen Eigenschaften des Materials und die Handhabbarkeit des Produktes negativ zu beeinflussen. In der dritten zu testenden Putty H konnte die Poloxamerkonzentration um weitere 1,5 wt.% verringert werden, indem man die SiO₂-Konzentration auf 4,5 wt.% erhöhte. Da von dieser Zusammensetzung (23,5 wt.% Poloxamer + 4,5 wt.% SiO₂) das größte Potential erwartet wurde, sollte diese Gruppe in einem adäquaten Tiermodell getestet werden, welches nach ISO-Norm auch für eine mögliche Zulassung anerkannt wird. Auch aus ethischen Gründen wurde daher auf einen Vorversuch in der Ratte verzichtet, da durch die nur leicht modifizierte Zusammensetzung keine negativen Effekte erwartet wurden. Als geeignetes Tiermodell ergab sich die Implantation in die distale Femurkondyle des Kaninchens, wie es auch unter Kapitel 3.8.3 beschrieben ist. Als Vergleichsgruppen wurden das NB Granulat S39 und die Actifuse Putty ABX implantiert. Dadurch lässt sich der direkte Einfluss des Trägermaterials auf das Granulat beurteilen und inwieweit sich das Entwickelte Produkt von einem bereits zugelassenem Produkt unterscheidet. Um bei dem Vergleichsmaterial NB Granulat S39 keine Luft in den Defekt einzubauen, wurde das Material zuvor mit isotonischer Natrium-Chlorid-Lösung getränkt, um die Poren zu füllen. Alle Gruppen wurden nach 4, 8 und 12 Wochen histologisch begutachtet und histomorphometrisch ausgewertet. Die histologische Evaluierung des NB Granulat S39 und der Putty H erfolgte an entkalkten und HE gefärbten Schnitten. Für die Actifuse Putty ABX wurden Dünschliffpräparate nach Donath angefertigt und mit Toluidinblau angefärbt.

Histologische Evaluierung

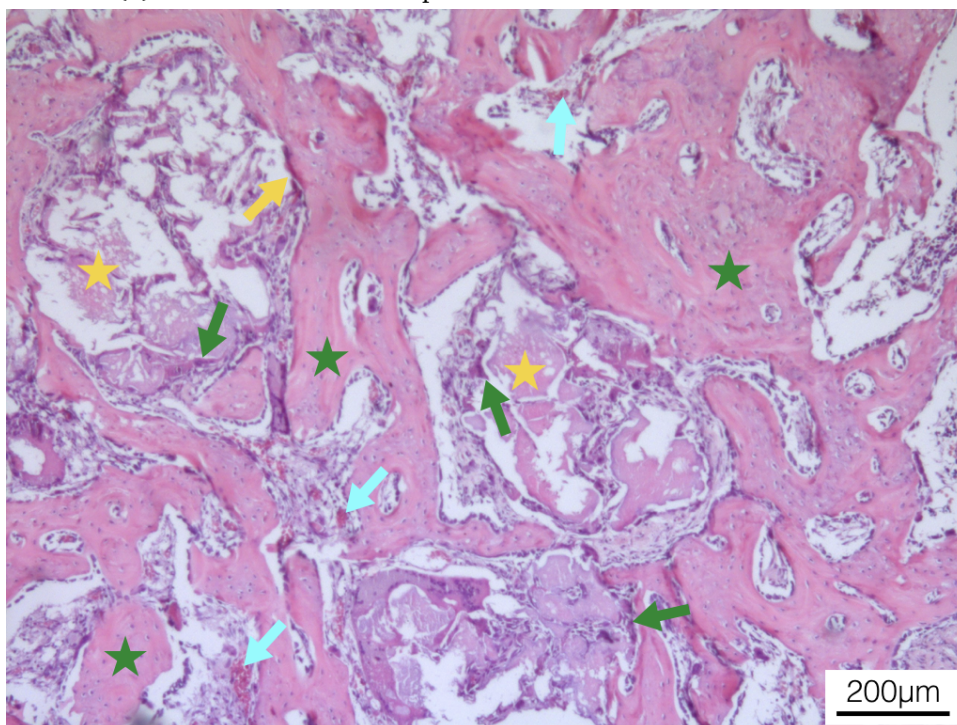
Die im Kaninchen getestete Putty H besteht zu 41,5wt. vol.% aus dem hochporösem NB Granulat S39, welches in einen Trägermaterial aus 23,5 wt.% Poloxamer, 4,5 wt.% SiO₂ und 72 wt.% Wasser eingehüllt ist. In der Abbildung 5.22 sind die HE gefärbten Präparate der Vergleichsgruppe NB Granulat S39 (a) und der Putty H nach 4 Wochen im Kaninchen dargestellt. Das Trägermaterial wurde innerhalb dieser Zeit vollständig abgebaut und ist im histologischen Bild nicht mehr zu beobachten. Beide Gruppen zeigen eine hohe Vaskularisierung des Defektbereiches und eine starke Knochenneubildung. Es waren keine Fremdkörperreaktionen auf die implantierten Materialien zu beobachten. Die Resorption des Granulates ist ebenfalls für beide Gruppen beobachtbar und zeigt bereits nach 4 Wochen einen fortgeschrittenen Matrixwechsel. Die

Putty H zeigt im Vergleich deutlich mehr Gewebestraßen und einwachsenden Knochen im Granulat. Für beide Materialien lassen sich Osteoklasten auf dessen Oberfläche beobachten. Die Osteogenese ist bereits nach 4 Wochen weit fortgeschritten.

Nach 8 und 12 Wochen schreitet die Resorption des Biomaterials und der Matrixwechsel weiter fort, histologisch ist kaum ein Unterschied zwischen den 8 und 12 Wochen Proben beobachtbar. In der Abbildung 5.23 ist der histologische Zustand nach 12 Wochen für das NB Granulat S39 (a) und die Putty H (b) dargestellt. Für beide Gruppen steigt nach dieser Zeit die Qualität des neuen Knochens, der Remodelling-Prozess zu lamellaren Knochen hat begonnen. Weiterhin lassen sich am Knochenaufbau beteiligte Osteoblasten erkennen. Auf dem Biomaterial sind ebenfalls für beide Gruppen Osteoklasten zu beobachten, welche für dessen weitere Resorption verantwortlich sind. Darin liegt aber auch der wesentliche Unterschied. In der Versuchsgruppe mit der Putty H ist die ursprüngliche Form des Granulates kaum noch zu erkennen. In der Abbildung 5.24 ist schematisch die Auswertung des verbleibenden Biomaterials dargestellt.

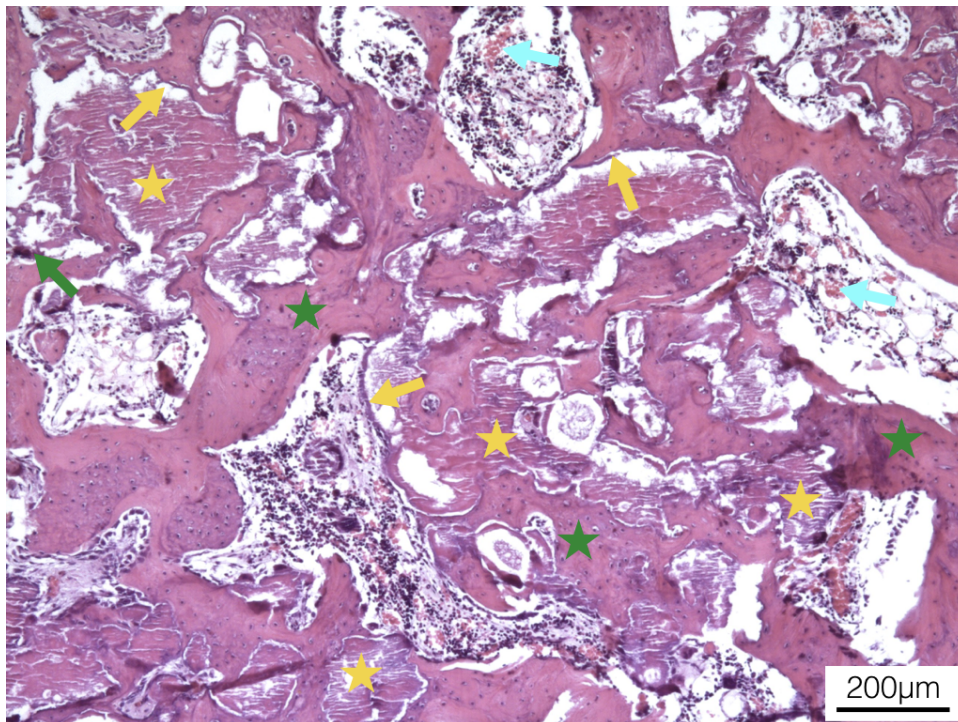


(a) 4 Wochen nach der Implantation mit dem NB S39 Granulat.

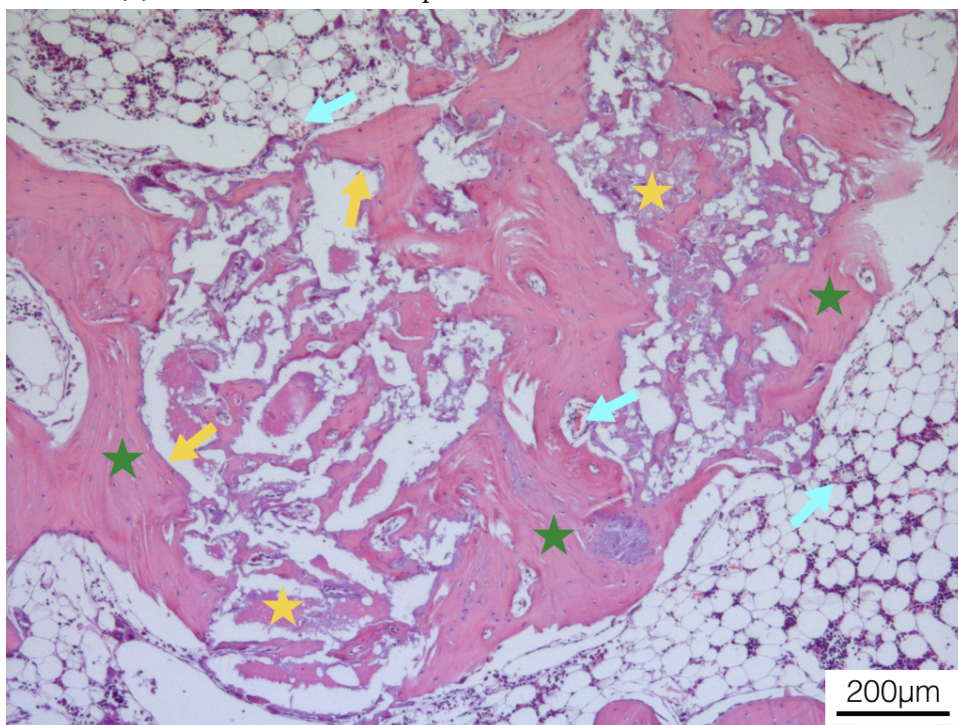


(b) 4 Wochen nach der Implantation mit der NB Putty H.

Abbildung 5.22.: Histologische Aufnahmen der entkalkten und HE gefärbten Schnittpräparate. Implantation im Femur des Kaninchens. Vergleich von NB Granulat S39 (oben) und der Putty H (unten). Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, gelbe Pfeile - Osteoblastensäume, grüne Pfeile - Osteoklasten, blaue Pfeile - Blutgefäße.



(a) 8 Wochen nach der Implantation mit dem NB S39 Granulat.



(b) 8 Wochen nach der Implantation mit der NB Putty H.

Abbildung 5.23.: Histologische Aufnahmen der entkalkten und HE gefärbten Schnittpräparate. Implantation im Femur des Kaninchens. Vergleich von NB Granulat S39 (oben) und der Putty H (unten). Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen, gelbe Pfeile - Osteoblastensäume, grüne Pfeile - Osteoklasten, blaue Pfeile - Blutgefäße.

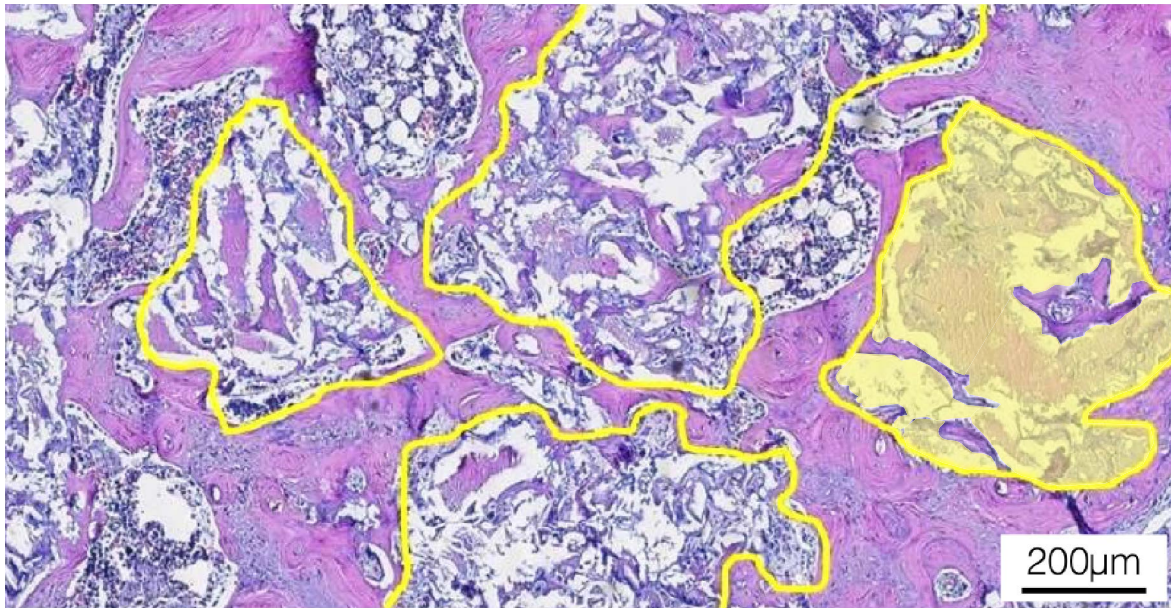
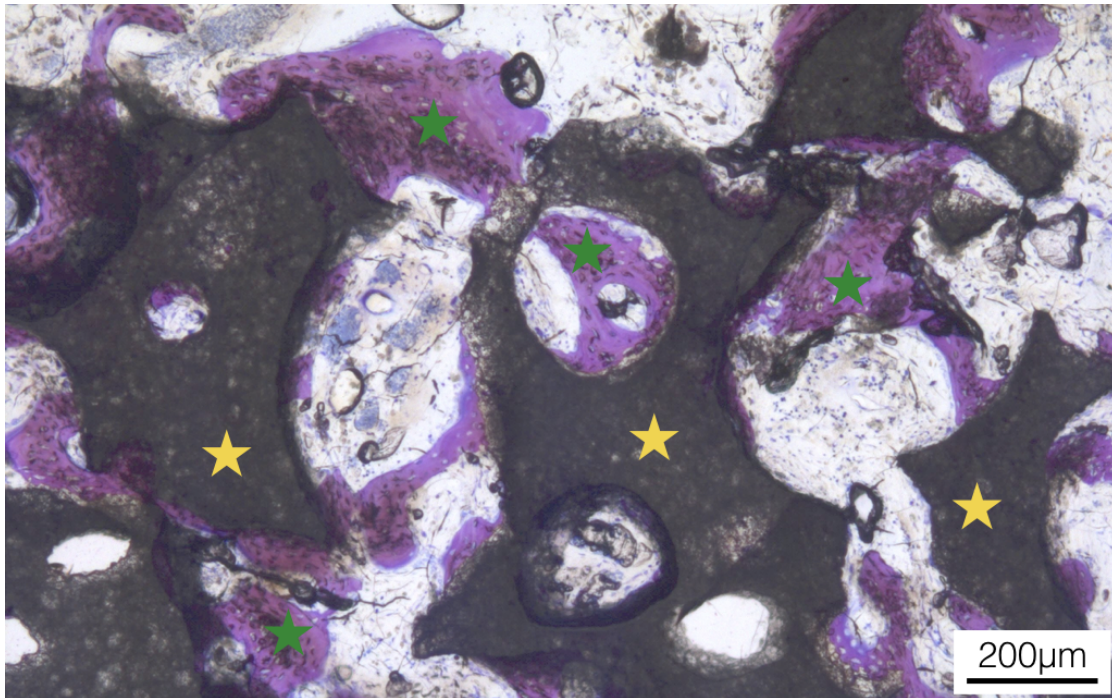


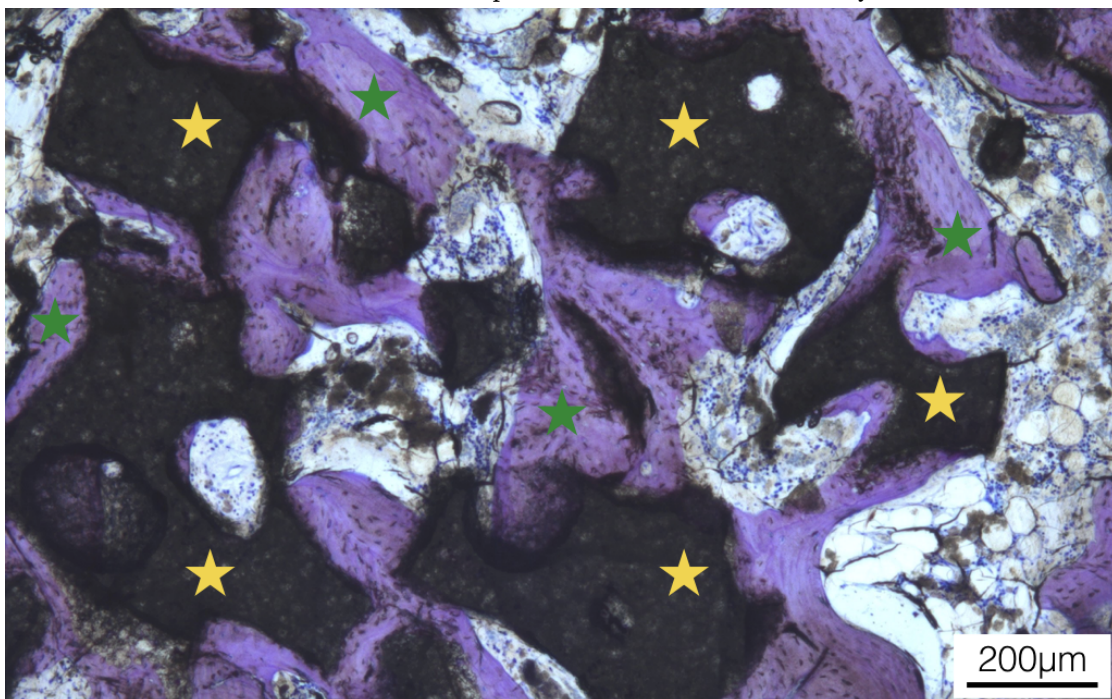
Abbildung 5.24.: Dimension des verbleibenden Granulates (gelbe Linien) und beispielhaft dessen Flächenbestimmung (gelbe Fläche rechts).

Die Dimension des Granulates lässt sich überwiegend nur noch an der Form des neu gebildeten Knochens beurteilen. Durch den Entkalkungsprozess kann es dazu kommen, dass noch nicht vollständig remodeltes Biomaterial mit herausgelöst wird bzw. es einfach herausfällt und somit weiße Flächen im histologischen Präparat entstehen. Diese wurden dementsprechend zum verbleibenden Biomaterial hinzugezählt um das Ergebnis nicht fälschlicherweise zu geringeren Werten zu beeinflussen. Die absoluten Werte der Knochenneubildung und des resorbierten Biomaterials werden in der histomorphometrischen Auswertung diskutiert.

Vergleichend zu den beiden NB Gruppen wurde ebenfalls die Actifuse Putty ABX in das Kaninchen implantiert und zu denselben Zeitpunkten histologisch und histomorphometrisch ausgewertet. In der Abbildung 5.25 sind die Tuloidinblau gefärbten Schliffe nach 4 Wochen (a) und 12 Wochen (b) dargestellt. Zwischen den beiden Zeitpunkten lassen sich nur geringfügige Unterschiede erkennen. So ist nach 12 Wochen mehr Knochen zwischen dem kompakten Biomaterial zu erkennen. Das gesinterte Granulat scheint kaum abgebaut worden zu sein. Durch dessen kompakte Form konnte auch kein Einwachsen von Gewebe oder Knochen in das Biomaterial beobachtet werden. Darin unterscheiden sich die NB Produkte wesentlich von diesem etablierten Vergleichsprodukt. Der geringere Abbau des Biomaterials, wie er auch bereits im Rattenmodell beobachtet wurde, kann Nachteile für die Stabilität des Knochendefektes mit sich bringen. Wie auch bei der Putty H konnte nach 4 Wochen der vollständige Abbau des Trägermaterials beobachtet werden.



(a) 4 Wochen nach der Implantation mit der Actifuse Putty ABX.



(b) 12 Wochen nach der Implantation mit der Actifuse Putty ABX.

Abbildung 5.25.: Histologische Aufnahmen der Toluidinblau gefärbten Schlingen der Actifuse Putty ABX. Implantation im Femur des Kaninchens nach 4 Wochen (oben) und 12 Wochen (unten). Nach 12 Wochen ist mehr Knochen zwischen dem kompakten Knochenersatzgranulat erkennbar. Markierungen: gelbe Sterne - Biomaterial, grüne Sterne - neu gebildeter Knochen.

Histomorphometrie

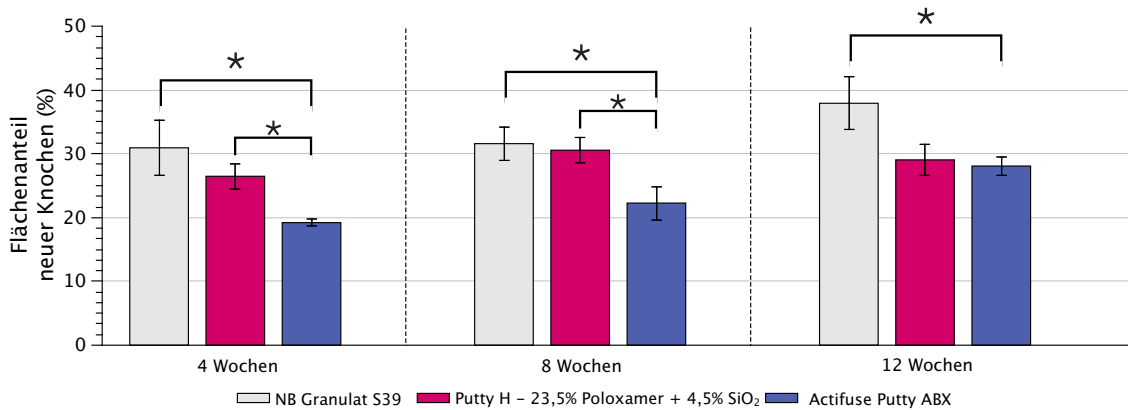
Um die quantitativen Unterschiede in der Knochenneubildung und im Abbau des Biomaterials (Granulat und Trägermaterial) zu bestimmen, wird eine histomorphometrische Analyse durchgeführt. Die Flächenanteile des neugebildeten Knochens und des Biomaterials wird im Verhältnis zum ausgewählten Defektbereich, wie unter Kapitel 3.8.5 beschrieben, ermittelt und miteinander verglichen. Anders als bei dem Tibiadefekt in der Ratte, bei der die Kortikalisbreite als Parameter zur Festlegung der Defektgröße diente, ließ sich im Kondylendefekt des Kaninchens nur ein individueller Polygonenzug um den Defektbereich herum legen.

Der maximale trabekuläre Knochenanteil in den Kondylen von Kaninchen wurde von van der Meulen et al. (2009) auf $25\% \pm 9\%$ bestimmt [131].

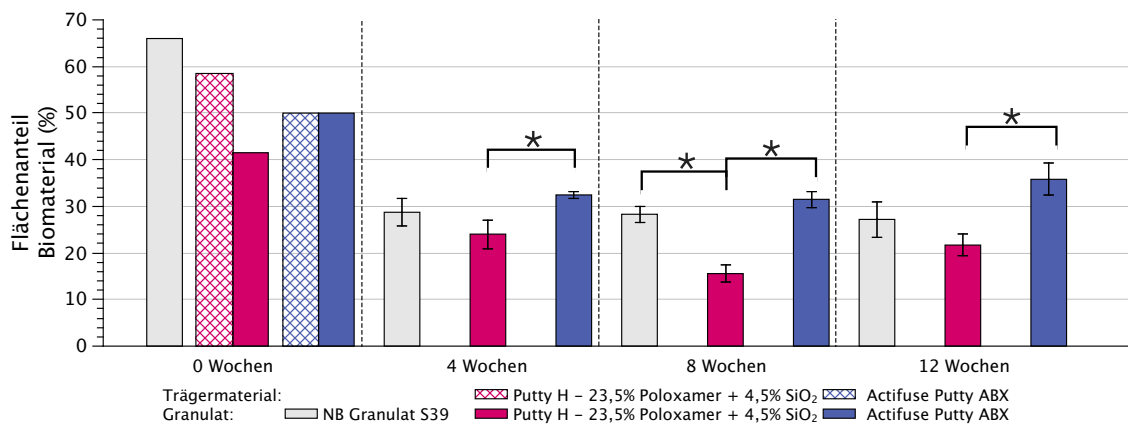
In der Abbildung 5.26 (a) sind die Anteile des neuen gebildeten Knochens im Kondylendefekt des Kaninchens nach 4, 8 und 12 Wochen dargestellt. Das reine NB Granulat S 39 (grau) wurde dabei gegen die Putty H (rot) und gegen die Actifuse Putty (blau) verglichen. Die beiden NB Gruppen zeigten nach 4 und 8 Wochen signifikant höhere Anteile in der Knochenneubildung als die Actifuse Gruppe. Sie erreichten bereits nach 4 Wochen den Bereich des maximalen Knochenanteils in der Kondyle. Die Knochenbildung des NB Granulat S39 ist mit $30,94\% \pm 4,23\%$ etwas höher als bei der Putty H mit $26,48\% \pm 2,01\%$. Nach 8 Wochen zeigten beide Gruppe in etwa gleiche Knochenanteile um durchschnittlich 31%. Nach 12 Wochen stieg der Knochenanteil bei der Actifuse Putty auf ein vergleichbares Niveau wie bei der Putty H. Bei der Putty H war keine signifikante Änderung im Vergleich zu 8 Wochen zu beobachten. Die Gruppe NB Granulat S39 zeigte von 8 auf 12 Wochen nochmals einen Anstieg in der Knochenneubildung, welcher sich jedoch nicht signifikant vom 8 Wochen Wert unterscheidet.

In der Abbildung 5.26 (b) ist der Anteil des Biomaterials im Defektbereich dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 Wochen ist der Defekt bei der Gruppe NB Granulat S39 mit etwa 66 vol.% Granulat gefüllt, da dieses der Packungsdichte des Granulates entspricht. Bei den beiden Putty Gruppen ist der gesamte Defekt zu verschiedenen Anteilen an Granulat und Trägermaterial gefüllt. Für die Putty H wurde der Granulatanteil auf 41,5 vol.% bestimmt und bei der Actifuse Putty ABX beträgt er 50 vol.% [130]. Nach 4 Wochen ist in beiden Putty-Gruppen kein Anteil an Trägermaterial mehr messbar. Für alle drei Gruppen ist eine Abnahme an verbleibenden Biomaterial zu erkennen. Am wenigsten Granulat war bei der Putty H zu allen Zeitpunkten zu beobachten, welche aber auch den geringsten Volumenanteil hat. Die Putty H zeigt insbesondere im Vergleich zur Putty ABX immer signifikant geringere Flächenanteile an verbleibenden Biomaterial. Die insgesamt größte Abbaurate nach 4 Wochen ist allerdings bei der

Gruppe NB Granulat S39 zu beobachten. Beide NB Gruppen zeigen signifikant bessere Abbauraten als die Putty ABX, wie es auch schon in der Ratte beobachtet wurde. Die prozentualen Abbauraten sind im Anhang in der Tabelle A.3 dargestellt.



(a) Histomorphometrische Auswertung des neu gebildeten Knochens im gesamten Defektbereich.



(b) Histomorphometrische Auswertung des nicht resorbierten Biomaterials im gesamten Defektbereich.

Abbildung 5.26.: Histomorphometrische Auswertung des femoralen Kondylendefektes im Kaninchenmodell.

Beide NB Gruppen zeigten ein gutes Verhältnis von Knochenneubildung und Abbau des Biomaterials. Die histomorphometrische Analyse zeigt, dass beide Gruppen mit gleich guter Wirkung in Knochendefekte implantiert werden konnten. Die Anforderung an die erleichterte Applikation durch ein modellierbares Trägermaterial konnte mit der Putty H erfüllt werden, ohne die bioaktiven Eigenschaften des Knochenersatzmaterials zu beeinflussen. Durch die bessere Handhabbarkeit ist die Putty H gegenüber dem Granulat zu bevorzugen. Das Vergleichsprodukt, die Actifuse Putty ABX, lieferte mit der zeitverzögerten Knochenbildung und dem deutlich geringeren Abbau des Biomaterials schlechtere Resultate. In der nachfolgenden Tabelle 5.8 sind nochmals die Daten der histomorphometrischen Analyse für alle Gruppen dargestellt.

Tabelle 5.8.: Histomorphometrische Daten

Knochen in %			
	NB Granulat S39	Putty H	Actifuse Putty ABX
4 Wochen	30,94 ± 4,23	26,48 ± 2,01	19,21 ± 0,58
8 Wochen	31,59 ± 2,67	30,56 ± 2,00	22,27 ± 2,62
12 Wochen	37,92 ± 4,09	29,05 ± 2,45	28,08 ± 1,42
Biomaterial in %			
	NB Granulat S39	Putty H	Actifuse Putty ABX
0 Wochen	66	41,5	50
4 Wochen	28,72 ± 2,96	24,03 ± 3,09	32,44 ± 0,70
8 Wochen	28,29 ± 1,65	15,56 ± 1,87	31,50 ± 1,75
12 Wochen	27,19 ± 3,83	21,68 ± 2,34	35,79 ± 3,40

5.5. Matrixwechsel

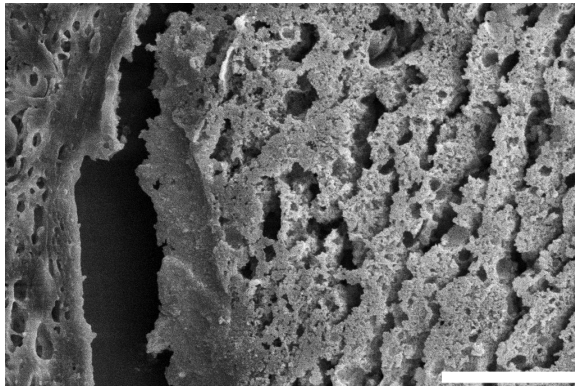
Wie bereits im PVP-Kapitel 4.5 beschrieben kann der Matrixwechsel mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht werden, in dem der SiO₂-Gehalt der Granulatkörner bei den verschiedenen Proben gemessen wird. Dazu wurden alle entkalkten Proben auf einen Kunststoffobjektträger aufgebracht und mit einer 3 nm dünnen Gold-Palladiumschicht besputtert. Nach der Aufnahme der REM-Bilder wurde die lokale Elementzusammensetzung der Probe mittels EDX-Analyse bestimmt.

An den REM-Aufnahmen ließ sich bereits eine erste Einschätzung bezüglich des Matrixwechsel treffen. Durch den anschließenden Vergleich der EDX-Spektren konnte die relative Abnahme des SiO₂-Gehalts der Proben mit der Zeit bestimmt werden. Der Matrixwechsel wurde sowohl für die in die Ratte implantierten NB Proben untersucht, als auch für die in die Kaninchen implantierten Proben. Bei den Proben F und G konnte der Einfluss des SiO₂ im Trägermaterial untersucht werden. Beim Vergleich der NB Granulat S39 Probe und der Putty H im Kaninchen konnte grundlegend die Auswirkung des Trägermaterials auf den Matrixwechsel des Knochenersatzgranulates untersucht werden.

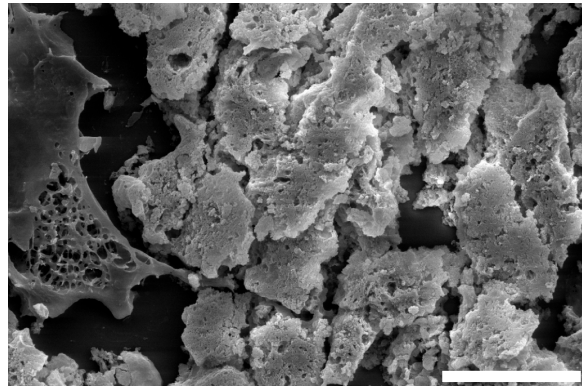
5.5.1. Matrixwechsel im Rattenmodell

Zuerst soll der Matrixwechsel in der Ratte untersucht werden. Verglichen wurden hier die Putty F, mit 30 wt.% Poloxamer und 70 wt.% Wasser im Trägermaterial, und die Putty G, mit 25 wt.% Poloxamer, 3 wt.% SiO₂ und 72 wt.% Wasser im Trägermaterial. In der Abbildung 5.27 sind die REM Aufnahmen der histologischen Präparate nach

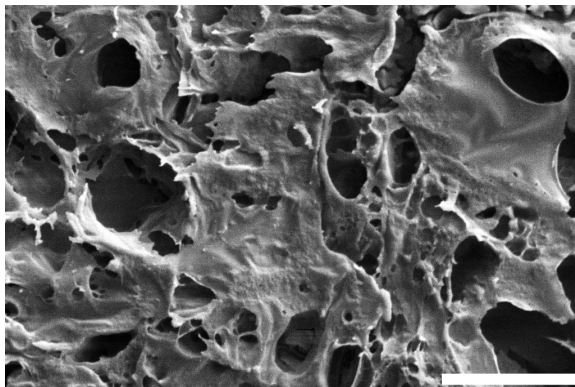
12, 21 und 63 Tagen abgebildet. Auf der linken Seite sieht man die Proben der Putty F und auf der rechten Seite die Proben der Putty G.



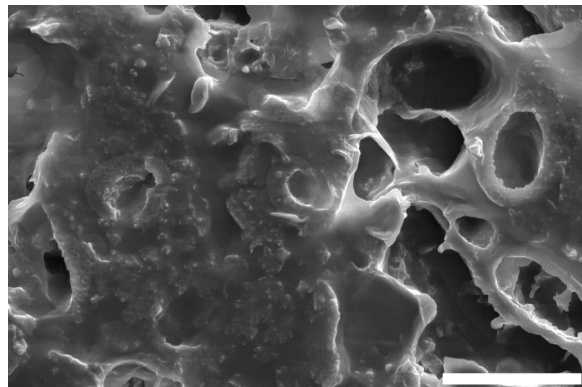
(a) Gruppe F 12 Tage



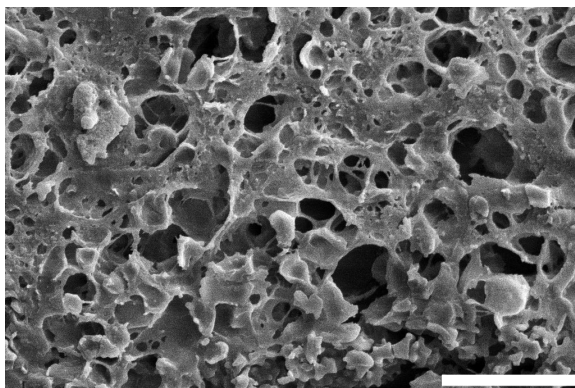
(b) Gruppe G 12 Tage



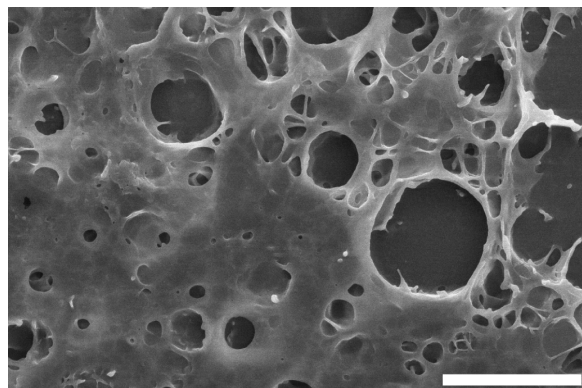
(c) Gruppe F 21 Tage



(d) Gruppe G 21 Tage



(e) Gruppe F 63 Tage



(f) Gruppe G 63 Tage

Abbildung 5.27.: REM Aufnahmen zum Matrixwechsel in der Ratte. Links die Proben der Putty F, ohne zusätzlichem SiO_2 im Trägermaterial nach 12, 21 und 63 Tagen (a, c, e). Rechts die Proben der Putty G, mit 3 wt.% SiO_2 im Trägermaterial nach 12, 21 und 63 Tagen (b, d, f). Maßstab $20\mu\text{m}$.

Für beide Gruppen ist nach 12 Tagen noch die typische schuppige Struktur des Granulates erkennbar und spricht für einen messbaren SiO_2 -Gehalt. Auch nach 21 und 63 Tagen ergibt sich ein ähnliches Bild bei beiden Gruppen. Die schuppige Struktur ist zunehmend verschwunden. Das synthetische Material wurde überwiegend

durch organisches Material ersetzt. Der SiO_2 -Gehalt scheint deutlich abgenommen zu haben. Aus den REM Aufnahmen lässt sich kein zeitlicher Unterschied im Fortschritt des Matrixwechsels erkennen, deshalb wurden EDX Spektren der einzelnen Proben aufgenommen. In der Abbildung 5.28 sind die EDX Spektren der Putty F (a) und der Putty G (b) für 12, 21 und 63 Tage dargestellt.

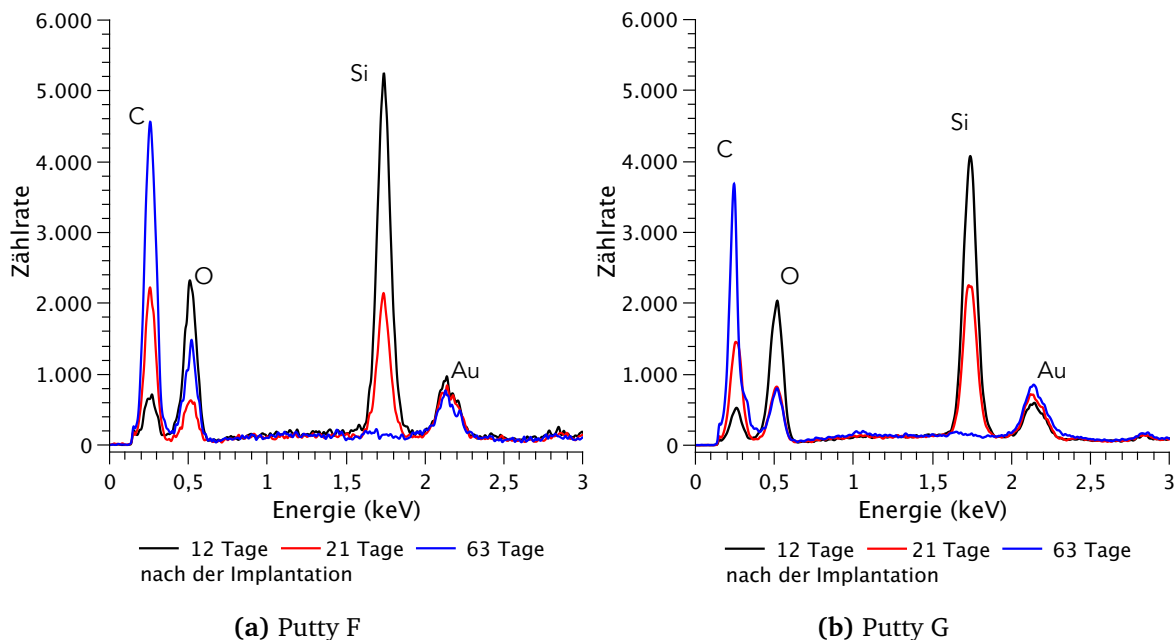
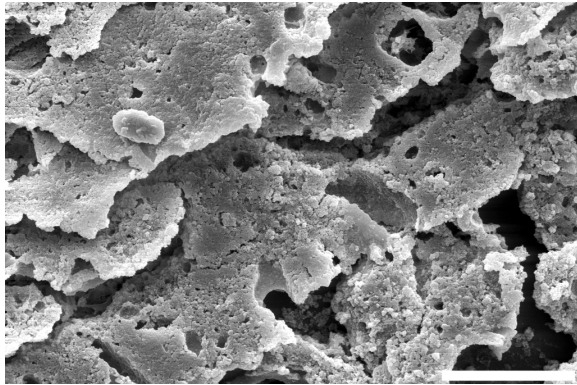


Abbildung 5.28.: EDX Spektren der Putty F und Putty G, implantiert in die Tibia der Ratte, nach 12, 21 und 63 Tagen.

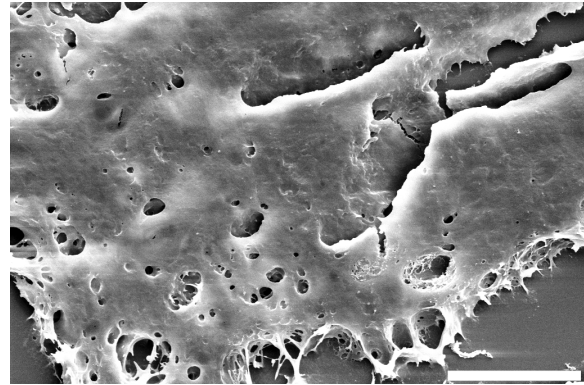
Die höchsten Si-Peaks sind für die 12 Tage Proben erkennbar (schwarze Kurven). Für die Gruppe F ist dabei der Si Peak verglichen zur Gruppe G etwas höher, welches auf einen etwas weniger fortgeschrittenen Matrixwechsel deutet. Nach 21 Tagen zeigen beide Proben einen ähnlich hohen Si-Peak. Nach 63 Tagen ist für beide Proben kein Si mehr zu sehen, so dass der Matrixwechsel als vollständig abgeschlossen betrachtet werden kann. Der exakte Zeitpunkt des abgeschlossenen Matrixwechsels konnte nicht genau bestimmt werden und liegt zwischen den 21 und 63 Tagen. Ein Einfluss des zusätzlichen SiO_2 im Trägermaterial auf den Matrixwechsel ist auch nicht erkennbar.

5.5.2. Matrixwechsel im Kaninchenmodell

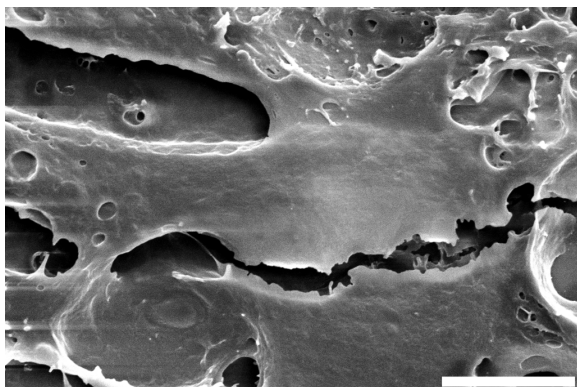
In diesem Abschnitt wird der Matrixwechsel im Kaninchen untersucht und die Gruppe NB Granulat S39 gegen die Putty H verglichen. Dadurch kann allgemein der Einfluss des Trägermaterials auf Poloxamerbasis mit zusätzlichem SiO_2 auf den Matrixwechsel untersucht werden.



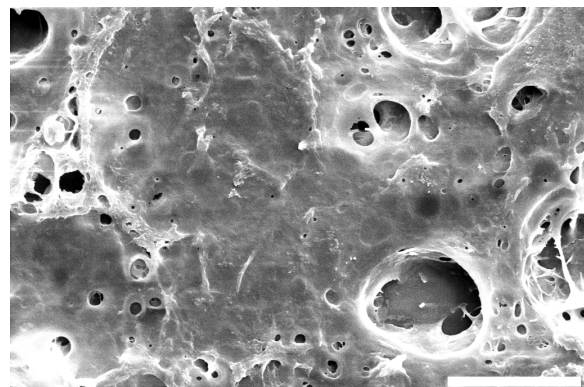
(a) Granulat 4 Wochen



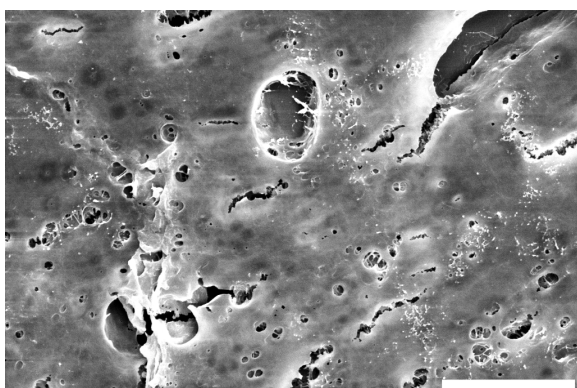
(b) Putty H 4 Wochen



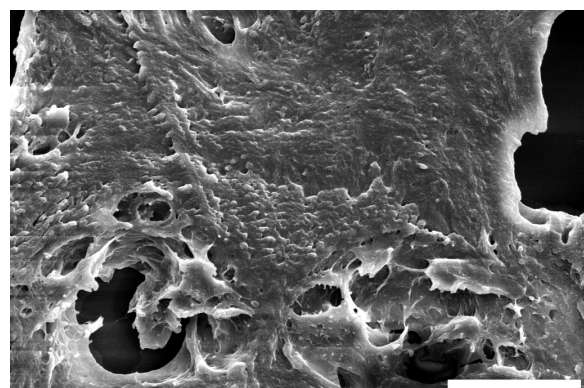
(c) Granulat 8 Wochen



(d) Putty H 8 Wochen



(e) Granulat 12 Wochen



(f) Putty H 12 Wochen

Abbildung 5.29.: REM Aufnahmen zum Matrixwechsel im Kaninchen. Links die Proben der Gruppe NB Granulat S39, ohne Trägermaterial nach 4, 8 und 12 Wochen (a, c, e). Rechts die Proben der Putty H, mit 4,5 wt.% SiO_2 im Trägermaterial nach 4, 8 und 12 Wochen (b, d, f). Maßstab $20\mu\text{m}$.

Wie bei den Proben in der Ratte wurden zunächst Aufnahmen im REM angefertigt und miteinander verglichen. In der Abbildung 5.29 sind links die Proben des NB Granulat S39 und rechts die Proben der Putty H nach 4, 8 und 12 Wochen dargestellt. Im direkten Vergleich fällt auf, dass die Putty H nach 4 Wochen eine deutlich weniger schuppige Struktur zeigt als die NB Granulat S39 Gruppe. Nach 8 und 12 Wochen sind bei der Putty H keine schuppigen Strukturen mehr erkennbar. Das ursprüngliche Granulat scheint zum größten Teil durch organisches Material ersetzt zu sein. Für die Gruppe NB Granulat S39 ist nach 8 Wochen noch eine leichte schuppige Struktur angedeutet zu erkennen, welche aber auch zunehmend aus körpereigenem Material besteht. Nach 12 Wochen ist auch für diese Probe nur noch eine ebene Fläche im REM zu beobachten. Der SiO_2 -Gehalt hat für beide Proben im zeitlichen Verlauf deutlich abgenommen. Die Putty H scheint einen etwas schnelleren Matrixwechsel zu haben, als das NB Garnulat S39. Um diese Vermutung zu unterstützen wurden die EDX Spektren der Proben aufgenommen um den lokalen SiO_2 -Gehalt zu bestimmen. In der Abbildung 5.30 Sind die EDX Spektren des NB Granulat S39 (a) und der Putty H (b) für 4, 8 und 12 Wochen dargestellt.

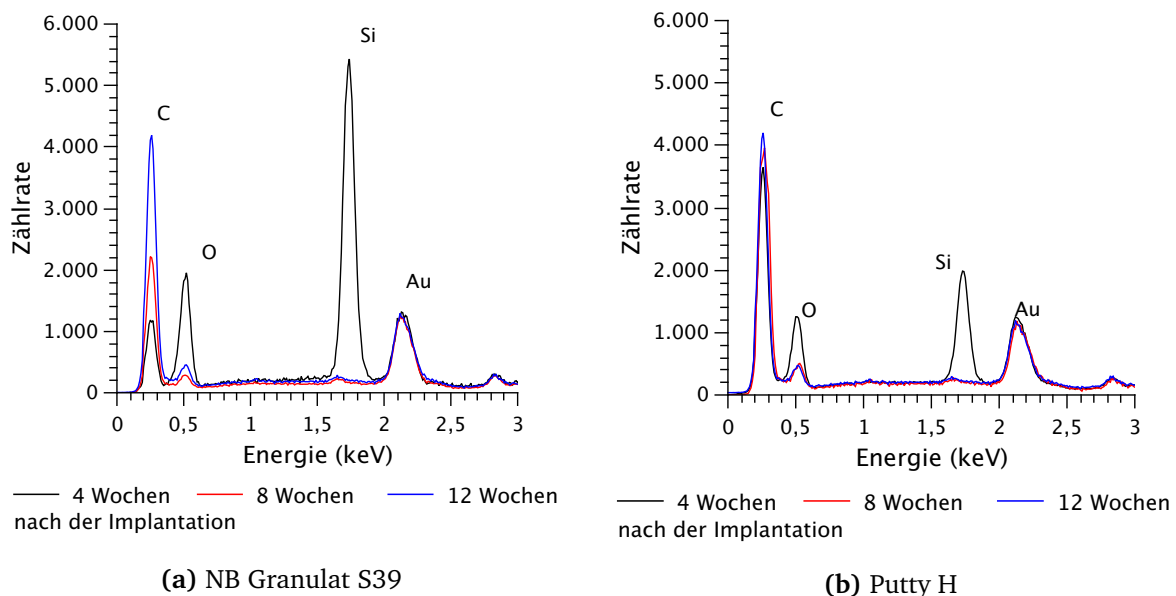


Abbildung 5.30.: EDX Spektren des NB Granulat S39 und Putty H, implantiert in den Femur des Kaninchens nach 4, 8 und 12 Wochen.

Die höchsten Si-Peaks sind für die 4 Wochen Proben zu sehen (schwarze Kurven). Bei dem NB Granulat S39 ist deutlich mehr Si detektiert worden als bei der Putty H. Der Matrixwechsel ist demnach für die Putty viel weiter fortgeschritten, wie es auch aus den rasterelektronenmikroskopischen Bildern abgeleitet wurde. Nach 8 und 12 Wochen ist in beiden Gruppen kein Si mehr messbar, so dass der Matrixwechsel als vollständig abgeschlossen betrachtet werden kann.

5.6. Zusammenfassung Trägermaterial auf Poloxamer-Basis

In diesem Kapitel wurde die Entwicklung von Trägermaterialien auf Poloxamer-Basis dokumentiert und es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses Polymers hervorragende Handling-Eigenschaften bei sehr guter Biokompatibilität erreicht werden können. Die mechanische Stabilität kann durch die Poloxamer- und SiO_2 -Konzentration reguliert werden. Dabei kann die Zugabe von Silicapartikeln die mechanischen Eigenschaften verbessern, z. B. eine erhöhte Viskosität oder geringere Löslichkeit. Grund dafür ist die Bindung der Polymerketten an der Silicapartikel, so dass große Volumenanteile im Komposit entstehen, welche die Grundviskosität erhöhen. Die Strukturbildung des Poloxamers ist maßgeblich durch die SiO_2 -Partikel beeinflusst. Die an den Partikeln gebundenen Polymerketten nehmen nicht am herkömmlich Mizellen- und Gelbildungsprozess teil. Dieses ist zum einen durch die verringerten Mizellenbildungsenthalpien als auch an den geringen Anstiegen der Speichermodule mit zunehmender Nanopartikelkonzentration zu belegen. Dennoch konnte mit den Kompositen eine erhöhte mechanische Stabilität erzielt werden, wie sie für die Verwendung als adhesives und kohäsives, formbares Trägermaterial notwendig ist. Die Vernetzung der SiO_2 -Partikel zu größeren Clustern konnte mittels Röntgenkleinwinkelstreuexperimenten ausgeschlossen werden. Die durchschnittliche Partikelgröße lag bei 1,5 -2 nm, unabhängig von Polymer- oder SiO_2 -Konzentration. Damit liegen sie in einem Größenbereich welcher gut vom Organismus resorbiert werden kann (Vgl. Abschnitt 2.6.2).

Insgesamt wurden 3 Putties verschiedener Zusammensetzungen entwickelt und nach der erfolgreichen *in vitro*-Untersuchung, bezüglich ihrer Biokompatibilität, in einem geeigneten Tiermodell auf ihre biophysiologicalen Eigenschaften untersucht (Tabelle 5.9).

Tabelle 5.9.: Zusammensetzung der entwickelten Poloxamer-basierten Putties und die verwendeten Tiermodelle

Putty Gruppe	Poloxamer	SiO_2	H_2O	Tiermodell
Gruppe F	30 wt. %	0 wt. %	70 wt. %	Tibiadefekt Ratte
Gruppe G	25 wt. %	3 wt. %	72 wt. %	Tibiadefekt Ratte
Gruppe H	23,5 wt. %	4,5 wt. %	72 wt. %	Femurdefekt Kaninchen

Um den Einfluss des SiO₂ im Trägermaterial auf die Defektheilung zu analysieren, wurden zunächst die Gruppe F (ohne Nanopartikel im Trägermaterial) und die Gruppe G (3 wt.% SiO₂ im Trägermaterial) im Tibiamodell der Ratte untersucht. Als Vergleichsgruppe wurde zusätzlich die Putty ABX von Actifuse in diesem Modell getestet. In der histopathologischen Begutachtung waren bei allen Gruppen keine Entzündungen oder Fremdkörperreaktionen beobachtbar. Das Trägermaterial war bereits nach 12 Tagen vollständig resorbiert. Eine gute Vaskularisierung und eine gute Defektheilung mit vollständig geschlossener Kortikalis war insbesondere für die NB Gruppen beobachtbar. Bei der Putty ABX wurde das Granulat nur bis zu einem bestimmten Grad resorbiert und schien dann ein konstantes Niveau zu halten, welches durch die histomorphometrische Auswertung bestätigt wurde. Die Knochenneubildung ist in der ABX Gruppe signifikant geringer als bei der Putty G. Die Putty G zeigte im Vergleich zur Putty F eine schneller Defektheilung und einen fortgeschritteneren Matrixwechsel. Eine bessere Knochenneubildung erzielte die Putty G nach 12 und 21 Tagen vor allem im kortikalen Defektbereich. Nach 63 Tagen zeigten beide Gruppen ähnliche Ergebnisse. Die Resorptionsrate des Granulates war bei der Putty G zu allen Zeitpunkten signifikant besser. Durch diesen ersten Versuch im Tiermodell der Ratte konnte gezeigt werden, dass Poloxamer als Trägermaterial durchaus geeignet ist. Ebenso kann das zusätzliche SiO₂ im Trägermaterial als positiv bezüglich der Knochenregeneration bewertet werden.

In einem weiteren Tierversuch mit New Zealand Kaninchen konnte die weiter optimierte Putty H getestet werden. Der Test von Knochenersatzmaterialien im Femurkopf des Kaninchen ist als Implantationsstudie nach ISO 10993 zulässig. Die Putty H gegen eine Kontrollgruppe, dem reinen NB Granulat S39, und ebenfalls gegen die oben genannte Vergleichsgruppe, Putty ABX, getestet. Wie im Rattenmodell zuvor wurden keine Entzündungs- oder Fremdkörperreaktionen beobachtet. Die Defektbereiche waren bereits nach dem kürzesten Zeitpunkt von 4 Wochen gut vaskularisiert und auch hier war das Trägermaterial vollständig resorbiert. Es wurde eine gute Knochenneubildung erzielt, wobei bei den NB Gruppen nach 4 und 8 Wochen signifikant mehr Knochen beobachtet wurde als bei der Putty ABX. Alle drei Gruppen erreichten jedoch nach vier Wochen die durchschnittliche trabekuläre Knochenmenge in der Kondyle von 25 % ± 9 % [131]. Bei der Resorption des Biomaterials war vor allem die NB Putty H signifikant besser als die Putty ABX. Bei der Putty ABX wurde eine vergleichbare Abbaurate wie zuvor in der Ratte beobachtet. Auch im Kaninchen änderte sich der Anteil an verbleibenden Granulat kaum zwischen den verschiedenen Zeitpunkten. Um zu beurteilen, inwieweit das gesinterte Material überhaupt noch resorbiert wird, müsste ein längerer Zeitraum untersucht werden.

Bei den beiden NB Gruppen war die Bestimmung der Flächenanteile des Granulates nicht ganz eindeutig, die Konturen und Flächen wurden überwiegend durch die Be-

gutachtung des umliegenden Gewebes festgelegt. Die Putty zeigte dabei eine bessere Resorption, welche sich jedoch nicht signifikant von der NB Granulat S39 Gruppe unterscheidet. Der Matrixwechsel war nach 4 Wochen bei der Putty H fortgeschrittener als im NB Granulat S39. Bei beiden Gruppen war nach 8 Wochen kein SiO_2 mehr detektierbar.

Die Abbaurate des Biomaterials bei der Gruppe H ist nach 4 Wochen in etwa mit der Abbaurate der Gruppe G nach 21 Tagen in der Ratte vergleichbar. Da der Stoffwechsel der Ratte schneller ist als beim Kaninchen, könnte das darauf hindeuten, dass die Erhöhung der SiO_2 -Konzentration im Trägermaterial der Putty H die Defektheilung nochmals beschleunigt hat. Quantitativ könnte sich das allerdings nur bewerten lassen, wenn man die Polxamer-basierten Putties im selben Tiermodell testen würde. Denn auch durch die unterschiedliche Defektlage können signifikante Unterschiede in der Knochenneubildung und der Resorption des Biomaterials entstehen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der Behandlung von Knochendefekten mit synthetischen Knochenersatzmaterialien ist die Handhabbarkeit des verwendeten Materials ebenso ein wichtiger Faktor für den Erfolg eines Produktes wie dessen Wirksamkeit. Um die Applikation eines erfolgreich angewandten Knochengranulates wie das NanoBone[®] Granulat S39 zu verbessern, wurden formbare Trägermaterialien aus verschiedenen Polymer-Nanopartikel-Kombinationen untersucht. Durch die Wahl des verwendeten Polymers, dessen Konzentration, die Variation der SiO₂-Konzentration sowie weitere angewandte Verfahren, wie z. B. die Quervernetzung mittels Gammabestahlung, können unterschiedliche Anforderungen an das Produkt erfüllt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein möglichst kohäsives und formbares Trägermaterial zu entwickeln, welches auch seine Stabilität in stark blutenden Defekten behält und dennoch gut resorbierbar bleibt, um die Defektheilung nicht zu verzögern.

Als Grundlage zur Entwicklung solcher Trägermaterialien dienten die Polymere Polyvinylpyrrolidon und Poloxamer, die in Kombination mit Silicapartikeln im Nanometerbereich ein Komposit bilden können, welches einen positiven Effekt auf die Defektheilung des Knochens haben kann. Für beide Materialien konnte gezeigt werden, dass verschiedene Anforderungen bezüglich des Handlings, wie z. B. vereinfachte Applikation in den Defekt oder die Modellierbarkeit von der Zusammensetzung der Komposite geprägt war.

PVP und Poloxamer unterscheiden sich grundlegend in ihren mechanischen Eigenschaften. Während Poloxamer in wässriger Lösung gelbildende Eigenschaften mit hohen Viskositäten besitzt, muss das PVP hingegen durch äußere Anregung wie z. B. Gammastrahlung zu einem Gel quervernetzt werden (siehe Kapitel 4.1 und 5.1). Die Gammabestahlung bietet dazu den Vorteil einer gleichzeitigen Sterilisation des Produktes. Sie wurde daher nicht nur zur Quervernetzung der PVP-Proben genutzt, sondern auch, um die Additive auf Poloxamer-Basis zu sterilisieren. Der genaue Einfluss der Gammabestahlung auf die mechanischen und thermodynamischen Eigenschaften der Materialien wurde im Rahmen der Arbeit untersucht. Bei PVP-basierten Trägermaterialien war eine signifikante Änderung der Materialeigenschaften nach der Quervernetzung beobachtbar. Parameter wie die Viskosität oder das Speichermodul

stiegen signifikant an. Die Löslichkeit der Produkte verringerte sich und die Formbeständigkeit nahm zu. Bei den Poloxamer-basierten Kompositen wurde kein Einfluss der Gammabestrahlung auf diese Parameter festgestellt. Nach der Gammasterilisation konnte jedoch eine Änderung der molaren Massenverteilung beobachtet werden, welche jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die thermoreversiblen Eigenschaften des Poloxamers hatte.

Insgesamt ergaben sich vier verschiedene Komposite, welche in Kombination mit dem NB Granulat den Anforderungen einer modellierbaren und einer leicht applizierbaren Putty entsprachen. Um deren biologische Wirksamkeit zu beurteilen, wurden die entwickelten Materialien *in vivo* getestet.

In zwei verschiedenen Tiermodellen konnten die verschiedenen Komposite erfolgreich auf ihre biokompatiblen Eigenschaften und Wirkungsweise untersucht werden. In den Tibiadefekt der Ratte wurden sowohl die quervernetzte PVP Putty und zwei Poloxamer-basierte Putties implantiert, eine ohne zusätzlichem SiO₂ und eine mit 3 % SiO₂ im Trägermaterial. Zwei bereits zugelassene Produkte wurden als Vergleichsgruppe in den gleichen Defekt implantiert (siehe Abschnitte 4.4 und 5.4.2). Zum einen konnten so die Einflüsse der Quervernetzung auf die Defektheilung untersucht werden und zum anderen, ob bei den Poloxamer-basierten Putties das zusätzliche SiO₂ einen positiven Effekt ausübt. Im Tibiamodell konnten für alle Produkte gute biokompatible Eigenschaften festgestellt werden, so dass von den Trägermaterialien keine grundlegenden Risiken anzunehmen sind. Fremdkörper und Entzündungsreaktionen wurden nicht beobachtet. Alle Gruppen zeigten eine gute Knochenneubildung und Resorption des Biomaterials. Bei den Poloxamer-basierten Trägermaterialien wurde das Additiv innerhalb der ersten 12 Tage abgebaut. Das quervernetzte PVP Additiv konnte über alle Versuchszeiträume im Defekt beobachtet werden, während bei der nicht quervernetzten Vergleichsgruppe ebenfalls eine vollständige Resorption des Trägermaterials nach 12 Tagen beobachtbar war. Ebenfalls war der Austausch der synthetischen Matrix in eine organische Matrix (Matrixwechsel) bei der quervernetzten Gruppe deutlich verzögerter im Vergleich zur Kontrollgruppe, welches ebenfalls auf die langsamere Resorption des Trägermaterials zurückzuführen ist. Durch den Verbleib des quervernetzten Trägermaterials im Defekt kam es vereinzelt zu unerwünschten Frakturen. Eine nicht ausreichende Stabilität der Kortikalis beeinflusste den Heilungsprozess maßgeblich und führte letzten Endes dazu, dass die quervernetzte PVP Putty als Produkt nicht geeignet ist, um eine sichere Defektheilung zu erzielen.

Bei den Poloxamer-basierten Putties konnte ein positiver Effekt des zusätzlichen SiO₂ auf die Defektheilung festgestellt werden. Zum einen brachten die Nanopartikel in den Handlingeigenschaften bereits eine Unterstützung, so dass weniger Polymer im Additiv verwendet werden musste, zum anderen konnte ein schnellerer Matrixwechsel

bei dieser Gruppe beobachtet werden. Dieses resultierte in eine schnellere Knochenneubildung und in höheren Abbauraten des Granulates. Anhand dieser Ergebnisse war die Weiterentwicklung zu einer Poloxamerputty mit einem noch höheren SiO₂-Gehalt naheliegend. Die dritte Poloxamer-basierte Putty mit 4,5 % SiO₂ im Trägermaterial wurde gegen zwei zugelassene Vergleichsprodukte im femoralen Kondylendefekt des Kaninchens getestet (Abschnitt 5.4.2). Der Wechsel des Tiermodells wurde aus Zulassungszwecken gewählt, da er nach ISO 10993 als Implantationsstudie für Medizinprodukte geeignet ist. Auch hier erwies sich das Trägermaterial als biokompatibel und gleich gut resorbierbar wie in den Vorversuchen im Rattenmodell, trotz der leicht veränderten Zusammensetzung. Das Poloxamer-basierte Additiv mit zusätzlichem SiO₂ hat keinen nachteiligen Einfluss auf die Defektheilung. In den beiden NB Gruppen traten keinen signifikanten Unterschiede im Knochenaufbau und auch den Anteilen des verbleibenden Biomaterials auf. Für die NB Putty wurde nach 4 Wochen jedoch ein fortgeschrittenerer Matrixwechsel beobachtet. Damit kann der Einfluss des Trägermaterials auf die Defektheilung positiv bewertet werden.

Mit dieser Arbeit konnten erfolgreich polymerbasierte Additive zur verbesserten Applikation des Knochenersatzmaterials NB Granulat S39 untersucht werden. Die Zugabe von Silica-Nanopartikeln erwies sich als positiv für die Defektheilung. Die Poloxamer-basierte Putty mit 4,5 % SiO₂ im Trägermaterial zeigte ein vielversprechendes Potenzial in Handlingeigenschaften und biophysilogischer Wirksamkeit, so dass die CE Zertifizierung und FDA Zulassung erreicht wurde. Diese Putty kann nun im klinischen Umfeld angewandt werden. Die Nachverfolgung der klinischen Anwendung ist zum einen Voraussetzung für den Erhalt der Zulassung, zum anderen ist sie auch wissenschaftlich interessant, inwieweit das Produkt zum erfolgreichen Knochenaufbau im Patienten führt.

A Anhang

DSC Poloxamer Gammastrahlung

Einfluss der Gammabestrahlung auf die Mizellenbildung von Poloxamer

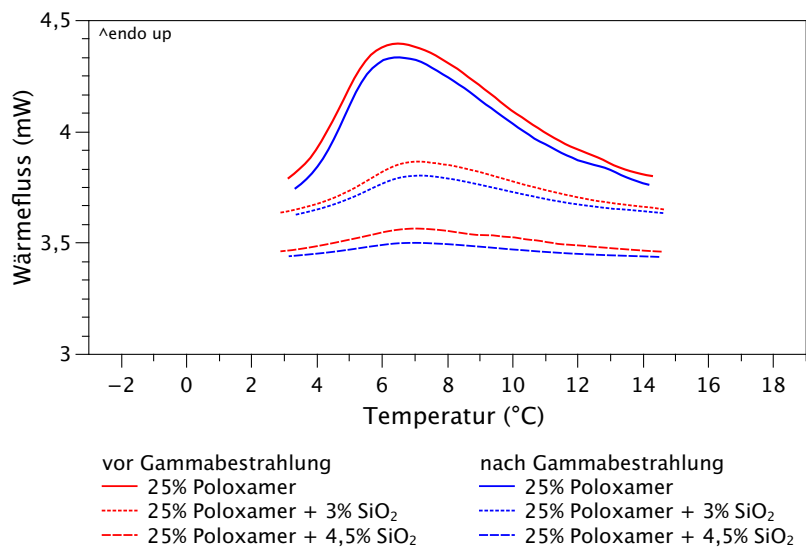
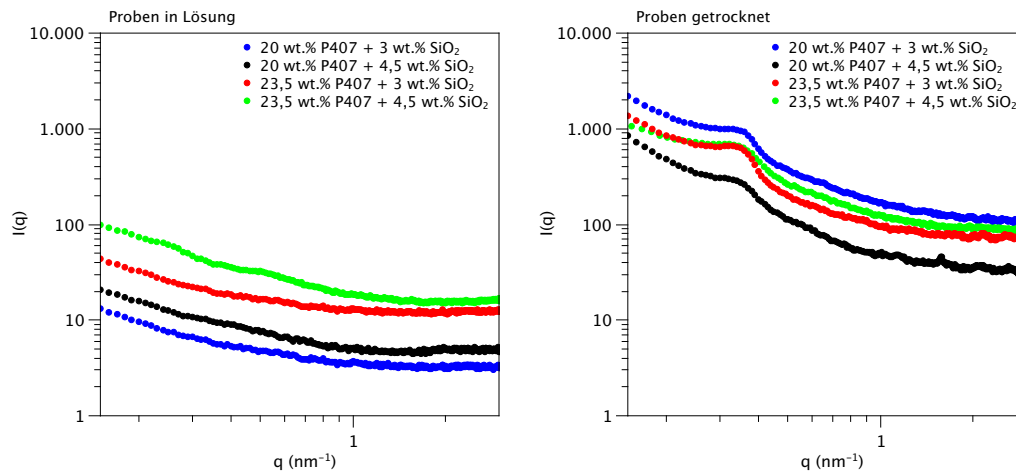


Abbildung A.1.: DSC Kurven der 23,5%igen Poloxamerproben mit verschiedenen SiO₂-Konzentrationen vor und nach der Gammabestrahlung. Es ist keine signifikante Änderung des endothermen Mizellenbildungspeak durch Gammabestrahlung zu erkennen. Ebenfalls wird die Mizellenbildungstemperatur nicht beeinflusst.

Röntgenkleinwinkelstreuung



(a) SAXS Streukurven aller Komposite in Lösung gemessen. (b) SAXS Streukurven aller Komposite getrocknet gemessen.

Abbildung A.2.: SAXS Streukurven

Elementzusammensetzung Actifuse Mikrogranulat und gespülte Putty ABX

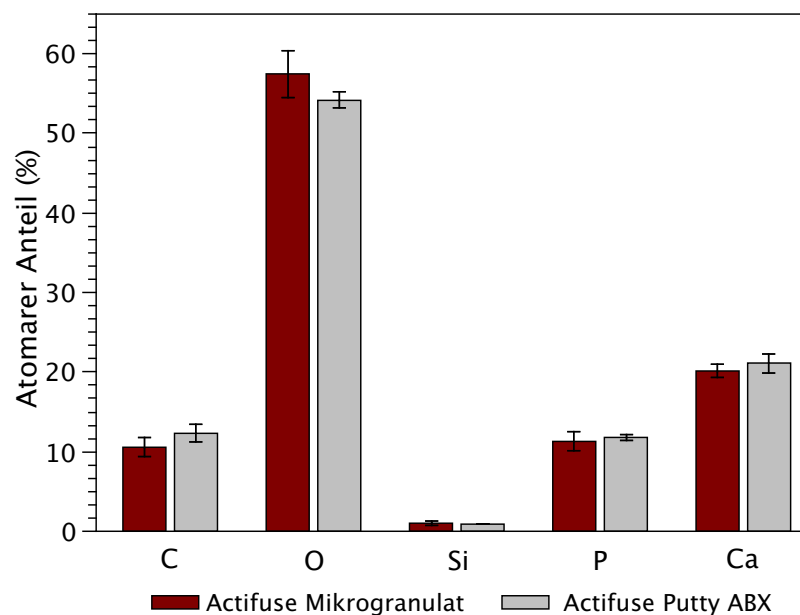


Abbildung A.3.: Vergleich der Elementzusammensetzung des Actifusemikrogranulates und der gespülten Putty ABX. Beide Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, dementsprechend konnte das gesamte Trägermaterial von der Putty ABX ab gespült werden.

Abbauraten Biomaterial im Tiermodell

Mit der Abbaurrate des Trägermaterials wird die prozentuale Resorptionsmenge vom Granulat bzw. Trägermaterial angegeben. Die folgenden Tabellen sind unterteilt in den getesteten Materialien PVP (Tabelle A.1) und Poloxamer (Tabelle A.2 und Tabelle A.3). Bei den Poloxamer-basierten Gruppen wurde auf die Angabe der Abbaurrate vom Trägermaterial verzichtet, da dieses nach keinem Versuchszeitraum gemessen werden konnte. Ebenfalls sind die Abbauraten der Poloxamergruppen noch in das jeweilige Tiermodell unterteilt, Ratte (Tabelle A.2) und Kaninchen (Tabelle A.3).

Tabelle A.1.: Abbaurrate Biomaterial im Tibiadefekt der Ratte, PVP-basierte Putties

Zeit	nicht quervernetzte Putty A		quervernetzte Putty B	
	Granulat in %	Trägermaterial in %	Granulat in %	Trägermaterial in %
12 Tage	37,73	100	40,45	41,50
21 Tage	42,74	100	59,92	36,02
63 Tage	56,66	100	60,47	50,44

Tabelle A.2.: Abbaurrate Biomaterial im Tibiadefekt der Ratte, Poloxamer-basierte Putties

Zeit	Abbaurrate Granulat in %		
	Putty F (30 % P407 + 0 % SiO ₂)	Putty G (25 % P407 + 3 % SiO ₂)	Putty ABX (25-30 % P407)
12 Tage	15,09	25,78	30,22
21 Tage	24,96	41,30	37,06
63 Tage	35,33	49,64	29,14
126 Tage	47,42	-	-

Tabelle A.3.: Abbaurrate Biomaterial im Femurdefekt des Kaninchens, NB Granulat S39 und Poloxamer-basierte Putties

Zeit	Abbaurrate Granulat in %		
	NB Granulat S39	Putty H (23,5 % P407 + 4,5 % SiO ₂)	Putty ABX (25-30 % P407)
4 Wochen	56,48	42,10	35,12
8 Wochen	57,14	62,51	37
12 Wochen	58,80	47,76	28,42

Literaturverzeichnis

- [1] V. Campana, G. Milano, E. Pagano, M Barba, C. Cicione, G. Salonna, W. Lattanzi, and G. Logroscino. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 25(10):2445–2461, 2014.
- [2] M. O. Klein, H. Götz, H. Duschner, and W. Wagner. Anforderungen an moderne Knochenersatzmaterialien. *Der MKG-Chirurg*, 3(4):274–281, Nov 2010.
- [3] K.-U. Lewandrowski, J. D. Gresser, D. L. Wise, and D. J. Trantolo. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *Biomaterials*, 21(8):757 – 764, 2000.
- [4] C. M. L. Clokie, H. Moghadam, M. T. Jackson, and G. K. B. Sandor. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *Journal of Craniofacial Surgery*, 13(1):111–121, 2002.
- [5] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis. Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(3):S20 – S27, 2005. Proceedings from the 1st European Clinical Symposium on Bone and Tissue Regeneration 27-28 November 2004.
- [6] A. J.-J. Zhou, C. M. L. Clokie, and S. A. F. Peel. Bone formation in algae-derived and synthetic calcium phosphates with or without poloxamer. *Journal of Craniofacial Surgery*, 24(2):354–359, 2013.
- [7] B. Ahmad, S. Abbas, Z. Iqbal, S. Bashir, and J. Ali. Synthesis of cross linked PVP hydrogels and its use for the control release of anti-asthmatic drugs. *Middle East Journal of Scientific Research*, 14(3):273, April 2013.
- [8] E. A. Kamoun, X. Chen, M. S. Mohy Eldin, and E.-R. S. Kenawy. Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels for wound dressing applications: A review of remarkably blended polymers. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1):1 – 14, 2015.
- [9] M. Kawata, K. Azuma, H. Izawa, M. Morimoto, H. Saimoto, and S. Ifuku.

- Biom mineralization of calcium phosphate crystals on chitin nanofiber hydrogel for bone regeneration material. *Carbohydrate Polymers*, 136:964 – 969, 2016.
- [10] L. Mi, H. Liu, Y. Gao, H. Miao, and J. Ruan. Injectable nanoparticles/hydrogels composite as sustained release system with stromal cell-derived factor-1 for calvarial bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 101:341 – 347, 2017.
- [11] Q. Li, C. Liu, J. Wen, Y. Wu, Y. Shan, and J. Liao. The design, mechanism and biomedical application of self-healing hydrogels. *Chinese Chemical Letters*, 2017.
- [12] Y. Zheng, K. Huang, X. You, B. Huang, J. Wu, and Z. Gu. Hybrid hydrogels with high strength and biocompatibility for bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017.
- [13] W. Götz, T. Gerber, B. Michel, S. Lossdörfer, K.-O. Henkel, and F. Heinemann. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (nanobone[®]) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clinical Oral Implants Research*, 19(10):1016–1026, 2008.
- [14] J. Meier, V. Bienengräber, and E. Wolf. Einsatz des synthetischen nanostrukturierten knochen aufbaumaterials nanobone[®] bei sinusbodenelevation. *Implantologie*, 16(3):301–314, 2008.
- [15] W. Götz, S. Lenz, C. Reichert, K.-O. Henkel, V. Bienengräber, L. Pernicka, K. K. H. Gundlach, T. Gredes, T. Gerber, T. Gedrange, and F. Heinemann. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 48(4):589–596, 2010.
- [16] F. von Bruchhausen, G. Dannhardt, S. Ebel, A-W. Frahm, E. Hackenthal, and U. Holzgrabe. *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, volume 5. Auflage. Springer-Verlag, 1994.
- [17] B. Ahmad, N. Ahmad, A. Saeed, and N. Ul Islam. Rheology of poly(vinyl pyrrolidone) in aqueous and organic media. *Jour. Chem. Soc. Pak.*, 17(1):7–10, 1995.
- [18] D. D. Chiras. *Human Body Systems*. Jones and Bartlett Publ. Inc., 2012.
- [19] E. Wintermantel and S.-W. Ha. *Medizintechnik - Life Science Engineering.*, volume 5. Springer, 2009.
- [20] F. Geneser. *Histologie*. Deutscher Ärzte Verlag, 1990.

- [21] A. Cumano and I. Godin. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual Review of Immunology*, 25:745–785, 1984.
- [22] S. H. Ralston. What determines peak bone mass and bone loss? *Baillière's Clinical Rheumatology*, 11(3):479 – 494, 1997.
- [23] J. Jerosch, A. Bader, and G. Uhr. *Knochen curasan Taschenatlas spezial*. Thieme, 2002.
- [24] H. Rössler and W. Rütger. *Orthopädie*. München-Wien-Baltimore. Urban und Schwarzenberg, 1997.
- [25] F. van den Berg. *Angewandte Physiologie: Band 1: Das Bindegewebe des Bewegungsapparates verstehen und beeinflussen*, volume 3. 2010.
- [26] M. Amling, A. F. Schilling, P. Pogoda, M. Priemel, and J. M. Rueger. Biomaterials and bone remodeling: The physiologic process required for biologization of bone substitutes. *European Journal of Trauma*, 32(2):102–106, 2006.
- [27] K. Sano, G. ans Matsuo. Assessment of bone quality. Bone remodeling and bone quality. *Clinical calcium*, 18(3):315–20, 2008.
- [28] M. Aaboe, E.M. Pinholt, and E. Hjorting-Hansen. Healing of experimentally created defects: a review. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 33(5):312 – 318, 1995.
- [29] M. Kheirallah and H. Almeshaly. Bone graft substitutes for bone defect regeneration. a collective review. *Int J Dentistry Oral Sci.*, 03(5):247–255, 2016.
- [30] Universitätsmedizin Leipzig. Tissue Engineering (TE) von Knochengewebe, 2016.
- [31] A. Stavropoulos. *Deproteinized Bovine Bone Xenograft*, pages 119–151. Humana Press, Totowa, NJ, 2008.
- [32] Th. Gerber, G. Holzhüter, B. Knoblich, P. Dörfling, V. Bienengräber, and K.-O. Henkel. Development of bioactive sol-gel material template for in vitro and in vivo synthesis of bone material. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 19(1):441–445, Dec 2000.
- [33] Th. Gerber, G. Holzhüter, W. Götz, V. Bienengräber, K.-O. Henkel, and E. Rumpel. Nanostructuring of biomaterials - a pathway to bone grafting substitute. *European Journal of Trauma*, 32(2):132–140, Apr 2006.
- [34] K. Y. Lee and D. J. Mooney. Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101(7):1869–1879, 2001.

- [35] R. H. Schmedlen, K. S. Masters, and J. L. West. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials*, 23(22):4325 – 4332, 2002. Injectable Polymeric Biomaterials.
- [36] L. C Lopérgolo, A. B. Lug ao, and L. H. Catalani. Direct UV photocrosslinking of poly(n-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels. *Polymer*, 44(20):6217–6222, 2003.
- [37] K. R. Park and Y. C. Nho. Preparation and characterization by radiation of hydrogels of PVA and PVP containing aloe vera. *Journal of Applied Polymer Science*, 91(3):1612–1618, 2004.
- [38] J. J. Escobar-Chávez, M. López-Cervantes, A. Naik, Y. N. Kalia, D. Quintanar-Guerrero, and A. Ganem-Quintanar. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci.*, (3):339–58, 2006.
- [39] A. Sargsyan, A. Tonoyan, S. Davtyan, and C. Schick. Rigid amorphous fraction in polymer nano-composites. Symposium on thermophysical properties, 2007.
- [40] A. Sargsyan, A. Tonoyan, S. Davtyan, and C. Schick. The amount of immobilized polymer in PMMA SiO₂ nanocomposites determined from calorimetric data. *European Polymer Journal*, 43(8):3113 – 3127, 2007.
- [41] Y. Xu, D. Wu, Y. Sun, W. Chen, H. Yuan, F. Deng, and Z. Wu. Effect of polyvinylpyrrolidone on the ammonia-catalyzed sol–gel process of teos: Study by in situ ²⁹Si NMR, scattering, and rheology. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 305(1–3):97 – 104, 2007.
- [42] B. Sarkar, V. Venugopal, M. Tsianou, and P. Alexandridis. Adsorption of pluronic block copolymers on silica nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 422:155 – 164, 2013.
- [43] R. Joksimovic, S. Prévost, R. Schweins, M.-S. Appavou, and M. Gradzielski. Interactions of silica nanoparticles with poly(ethylene oxide) and poly(acrylic acid): Effect of the polymer molecular weight and of the surface charge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 394:85 – 93, 2013.
- [44] R. Jugdaohsingh. Silicon and bone health. *The journal of nutrition, health & aging*, 11(2):99–110, Mar-Apr 2007.
- [45] F. Auilar, U. R. Charrondiere, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D. M. Gott, S. Grilli, R. Guertler, G. E. N. Kass, J. Koenig, et al. Scientific opinion: monome-

- thylsilanetriol added for nutritional purpose to food supplements. *Eur Food Saf Authority J*, 950:1–12, 2009.
- [46] H. J. Gitelman, F. R. Alderman, and S. J. Perry. Silicon accumulation in dialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, 19(2):140 – 143, 1992.
- [47] Y. Fujino, Y. Inoue, M. Onodera, H. Isono, S. Endo, T. Yanbe, and Y. Fujita. Case of concrete hardener poisoning complicated with acute renal failure treated by hemodialysis. *The Japanese journal of toxicology*, 20(3):263—268, July 2007.
- [48] E. M. Carlisle. Silicon: A possible factor in bone calcification. *Science*, 167(3916):279–280, 1970.
- [49] E. M. Carlisle. Silicon: A requirement in bone formation independent of vitamin D1. *Calcified Tissue International*, 33(1):27–34, 1981.
- [50] F. H. Nielsen and H. H. Sandstead. Are nickel, vanadium, silicon, fluorine, and tin essential for man? A review. *The American journal of clinical nutrition*, 27(5):515–520, 1974.
- [51] K. Schwarz and D. B. Milne. Growth-promoting effects of silicon in rats. *Nature*, 239(5371):333–334, 10 1972.
- [52] E. M. Carlisle. In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick. *The Journal of nutrition*, 106(4):478–484, 1976.
- [53] K. Schwarz. A bound form of silicon in glycosaminoglycans and polyuronides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(5):1608–1612, 1973.
- [54] C. T. Price, K. J. Koval, and J. R. Langford. Silicon: A review of its potential role in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *International Journal of Endocrinology*, 2013:6, 2013.
- [55] T. Miclau, K. J. Bozic, B. Tay, H. G. Kim, C. Colnot, C. Puttlitz, T. Einhorn, R. J. O’Keefe, and J. A. Buckwalter. Bone injury, regeneration, and repair. *Orthopedic basic science: foundations of clinical practice*. Rosemont, IL: American Adacemy of Orthopedic Surgeons, pages 331–48, 2007.
- [56] M. Hott, C. de Pollak, D. Modrowski, and P. J. Marie. Short-term effects of organic silicon on trabecular bone in mature ovariectomized rats. *Calcified Tissue International*, 53(3):174–179, 1993.
- [57] C. D. Seaborn and F. H. Nielsen. Dietary silicon and arginine affect mineral element composition of rat femur and vertebra. *Biological Trace Element*

- Research*, 89(3):239–250, 2002.
- [58] K. Sahin, M. Onderci, N. Sahin, T. A. Balci, M. F. Gursu, V. Juturu, and O. Kucuk. Dietary arginine silicate inositol complex improves bone mineralization in quail. *Poultry Science*, 85(3):486–492, 2006.
- [59] F. Z. Küçükbay, H. Yazlak, N. Sahin, F. Akdemir, C. Orhan, V. Juturu, and K. Sahin. Effects of dietary arginine silicate inositol complex on mineral status in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 14(3):257–262, 2008.
- [60] J. W. Merkle and E. R. Miller. The effect of sodium fluoride and sodium silicate on growth and bone strength of broilers. *Poultry Science*, 62(5):798–804, 1983.
- [61] B. D. Nielsen, G. D. Potter, E. L. Morris, T. W. Odom, D. M. Senior, J. A. Reynolds, W. B. Smith, M. T. Martin, and E. H. Bird. Training distance to failure in young racing quarter horses fed sodium zeolite a. *Journal of Equine Veterinary Science*, 13(10):562 – 567, 1993.
- [62] H. Rico, J. L. Gallego-Lago, E. R. Hernández, L. F. Villa, A. Sanchez-Atrio, C. Seco, and J. J. Gervas. Effect of silicon supplement on osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Calcified Tissue International*, 66(1):53–55, 2000.
- [63] Y.-J. Bae, J.-Y. Kim, M.-K. Choi, Y.-S. Chung, and M.-H. Kim. Short-term administration of water-soluble silicon improves mineral density of the femur and tibia in ovariectomized rats. *Biological Trace Element Research*, 124(2):157–163, 2008.
- [64] M.-H. Kim, Y.-J. Bae, M.-K. Choi, and Y.-S. Chung. Silicon supplementation improves the bone mineral density of calcium-deficient ovariectomized rats by reducing bone resorption. *Biological Trace Element Research*, 128(3):239, 2008.
- [65] A. M. Pietak, J. W. Reid, M. J. Stott, and M. Sayer. Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics. *Biomaterials*, 28(28):4023 – 4032, 2007.
- [66] W. Waked and J. Grauer. Silicates and bone fusion. *Orthopedics*, (31), 2008.
- [67] M. Bohner. Silicon-substituted calcium phosphates – a critical view. *Biomaterials*, 30(32):6403 – 6406, 2009.
- [68] U. Weber. *Calciumorthophosphate mit kontrollierter Kristallmorphologie und ein injizierbares, poröses Biomaterial: Materialentwicklung und Charakterisierung*. PhD thesis, Universität Rostock, 2013.
- [69] C. J. Brinker and G. W. Scherer. *Sol-Gel Science - The Physics and chemistry of*

- Sol-Gel Processing*. Academic Press Elsevier Science, San Diego, 1990.
- [70] R. K. Iler. *The Chemistry of Silica*. John Wiley Sons, Inc., 1979.
- [71] J. Meier. Experiences with the nanostructured bone substitute NanoBoneS in particular and block form: Prospective histological and clinical trial with 3 years follow-up. In *EAO 18th International Meeting*, volume Poster 245, Monaco, 2009.
- [72] A. Kramer and O. Assadian. *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. Thieme, Stuttgart, 2008.
- [73] Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz. *Bundesgesundheitsblatt: Anforderungen an die Hygiene bei der Aufbereitung von Medizinprodukten.*, 10 2012.
- [74] <http://www.sterixpert.de/de/kompetenzen/gammasterilisation.php>. Gammasterilisation – wir gewährleisten produktschonende Arbeitsabläufe.
- [75] H. Li, G.-E. Yu, C. Price, C. Booth, E. Hecht, and H. Hoffmann. Concentrated aqueous micellar solutions of diblock copoly(oxyethylene/oxybutylene) e41b8: a study of phase behavior. *Macromolecules*, 30(5):1347–1354, 1997.
- [76] A. Kelarakis, W. Mingvanish, C. Daniel, H. Li, V. Havredaki, C. Booth, I. W. Hamley, and A. J. Ryan. Rheology and structures of aqueous gels of diblock(oxyethylene-oxybutylene) copolymers with lengthy oxyethylene blocks. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2:2755–2763, 2000.
- [77] O. Glatter and O. Kratky. Small angle x-ray scattering. *Academic Press*, 1982.
- [78] A. Guinier and G. Fournet. Small angle scattering of x-rays. *John Willey Sons*, 1955.
- [79] K. Donath and G. Breuner. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. *Journal of Oral Pathology Medicine*, 11(4):318–326, 1982.
- [80] M. L. Hallensleben, R. Fuss, and F. Mummy. *Polyvinyl Compounds, Others*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000.
- [81] F. Fischer and S. Bauer. Polyvinylpyrrolidon. Ein Tausendsassa in der Chemie. *Chemie in unserer Zeit*, 43(6):376–383, 2009.
- [82] V. Bühler. *Excipients for Pharmaceuticals - Povidone, Crospovidone and Copovidone*. Springer, 2005.

- [83] A. Henglein. Crosslinking of polymers in solution under the influence of γ -radiation. *Journal of Physical Chemistry (U.S.)*, Vol: 63, Nov 1959.
- [84] E. Kiran and F. Rodriguez. Effects of gamma radiation on aqueous polymer solutions-a comparative study. *Journal of Macromolecular Science, Part B*, 7(2):209–224, 1973.
- [85] I. A. Alsarra, A. Y. Hamed, F. K. Alanazi, and S. H. Neau. Rheological and mucoadhesive characterization of poly(vinylpyrrolidone) hydrogels designed for nasal mucosal drug delivery. *Archives of Pharmacal Research*, 34(4):573, 2011.
- [86] R. Dietrich. *Nanostrukturierte Silicaaggregate für die Weichgewebsregeneration*. PhD thesis, Universität Rostock, 2016.
- [87] F. Haaf, A. Sanner, and F. Straub. Polymers of n-vinylpyrrolidone: Synthesis, characterization and uses. *Polym J*, 17(1):143–152, 01 1985.
- [88] I. R. Schmolka. Physical basis for poloxamer interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 720(1):92–97, 1994.
- [89] G. Wanka, H. Hoffmann, and W. Ulbricht. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene)-poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solutions. *Macromolecules*, 27(15):4145–4159, 07 1994.
- [90] E. Hecht and H. Hoffmann. Kinetic and calorimetric investigations on micelle formation of block copolymers of the poloxamer type. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96(1):181 – 197, 1995.
- [91] G. Gallet, S. Carroccio, P. Rizzarelli, and S. Karlsson. Thermal degradation of poly(ethylene oxide–propylene oxide–ethylene oxide) triblock copolymer: comparative study by sec/nmr, sec/maldi-tof-ms and spme/gc-ms. *Polymer*, 43(4):1081 – 1094, 2002.
- [92] C. J. H. Porter, S. M. Moghimi, M. C. Davies, S. S. Davis, and L. Illum. Differences in the molecular weight profile of poloxamer 407 affect its ability to redirect intravenously administered colloids to the bone marrow. *International Journal of Pharmaceutics*, 83(1):273 – 276, 1992.
- [93] A. Quadir. Characterization of newly developed micronized poloxamers for poorly soluble drugs. In *Releasing Technology Workshops Controlled Release Society Meeting*, Juni 2005.
- [94] I. R. Schmolka. Artificial skin i. preparation and properties of pluronic f-127 gels for treatment of burns. *Journal of Biomedical Materials Research*, 6(6):571–582,

- 1972.
- [95] D. M. Simons and J. J. Verbanc. The polymerization of propylene oxide. *Journal of Polymer Science*, 44(144):303–311, 1960.
- [96] E. C. Steiner, R. R. Pelletier, and R. O. Trucks. A study of the polymerization of propylene oxide catalyzed by anhydrous potassium hydroxide. *Journal of the American Chemical Society*, 86(21):4678–4686, 1964.
- [97] A. E. Beezer, N. Mitchard, J. Mitchell, J. K. Armstrong, B. Z. Chowdhry, S. Leharne, and G. Buckton. High-sensitivity differential scanning microcalorimetry of phase transitions in dilute solutions of poly(oxyethylene)+poly(oxypropylene)+poly(oxyethylene) block copolymers. *Journal of Chemical Research*, (7):236–237, 1992.
- [98] N. A. K. Meznarich. *Effect of Ternary Solutes on the Evolution of Structure and Gel Formation in Amphiphilic Copolymer Solutions*. PhD thesis, University of Michigan, 2012.
- [99] G. Wanka, H. Hoffmann, and W. Ulbricht. The aggregation behavior of poly(oxyethylene)-poly-(oxypropylene)-poly-(oxyethylene)-block-copolymers in aqueous solution. *Colloid and Polymer Science*, 268(2):101–117, 1990.
- [100] P. Alexandridis and B. Lindman. *Amphiphilic Block Copolymers: Self-Assembly and Applications*. Elsevier Science B.V., 2000.
- [101] Y.-M. Lam and G. Goldbeck-Wood. Mesoscale simulation of block copolymers in aqueous solution: parameterisation, micelle growth kinetics and the effect of temperature and concentration morphology. *Polymer*, 44(12):3593 – 3605, 2003.
- [102] P. Alexandridis, D. Zhou, and A. Khan. Lyotropic liquid crystallinity in amphiphilic block copolymers: temperature effects on phase behavior and structure for poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) copolymers of different composition. *Langmuir*, 12(11):2690–2700, 1996.
- [103] P. Alexandridis. Structural polymorphism of poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide) block copolymers in nonaqueous polar solvents. *Macromolecules*, 31(20):6935–6942, 1998.
- [104] R. Ivanova, B. Lindman, and P. Alexandridis. Effect of pharmaceutically acceptable glycols on the stability of the liquid crystalline gels formed by poloxamer 407 in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 252(1):226 – 235, 2002.
- [105] S. Callister, A. Keller, and R. M. Hikmet. On thermoreversible gels: Their

- classification, relation to phase transitions and vitrification, their morphology and properties. *Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia*, 39(1):19–54, 1990.
- [106] I. W. Hamley, J. A. Pople, J. P. A. Fairclough, N. J. Terrill, A. J. Ryan, C. Booth, G.-E. Yu, O. Diat, K. Almdal, K. Mortensen, and M. Vigild. Effect of shear on cubic phases in gels of a diblock copolymer. *The Journal of Chemical Physics*, 108(16):6929–6936, 1998.
- [107] A. A. R. Al-Saden, A. T. Florence, and T. L. Whateley. Poly(oxyethylene) chain scission following γ -irradiation of triton x-100 and other commercial non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces*, 2(1):49 – 58, 1981.
- [108] D. Attwood, C. J. Tait, and J. H. Collett. *Thermally Reversible Gelation Characteristics - Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene) Block Copolymer in Aqueous Solution After Exposure to High-Energy Irradiation*, volume 348, pages 128–138. ACS Symposium Series, 1987.
- [109] H. G. Moghadam. *Bone Healing of Critical Size Defects in Rabbit Calvarium Using Bone Substitutes [microform]*. Canadian theses. Thesis (M.Sc.)–University of Toronto, 2002.
- [110] A. J.-J. Zhou, S. A. F. Peel, and C. M. L. Clokie. An evaluation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate in combination with pluronic F127 and BMP on bone repair. *Journal of Craniofacial Surgery*, 18(6):1264–1275, 2007.
- [111] K. Char, C. W. Frank, and A. P. Gast. Fluorescence studies of polymer adsorption. 4. ph effect on the adsorption of pyrene-end-taggedpoly(ethylene glycol) on colloidal silica. *Langmuir American Chemical Society*, 6:767–770, 1990.
- [112] G. P. Van der Beek, M. A. Cohen. Stuart, and T. Cosgrove. Polymer adsorption and desorption studies via proton nmr relaxation of the solvent. *Langmuir*, 7(2):327–334, 1991.
- [113] P.G. Cummins, J. Penfold, and E. Staples. Nature of the adsorption of the nonionic surfactant pentaethylene glycol monododecyl ether on a ludox silica sol. *Journal Physical Chemistry*, 96:8092–8094, 1992.
- [114] F. Tiberg, B. Joensson, J. Tang, and B. Lindman. Ellipsometry studies of the self-assembly of nonionic surfactants at the silica-water interface: Equilibrium aspects. *Langmuir*, 10(7):2294–2300, 1994.
- [115] F. Artzner, S. Geiger, A. Olivier, C. Allais, S. Finet, and F. Agnely. Interactions between poloxamers in aqueous solutions: micellization and gelation studied

- by differential scanning calorimetry, small angle x-ray scattering, and rheology. *Langmuir*, 23(9):5085–5092, 2007. PMID: 17375940.
- [116] A. Cabana, A. Ait-Kadi, and J. Juhasz. Study of the gelation process of polyethylene oxide_a-polypropylene oxide_b-polyethylene oxide_a copolymer (poloxamer 407) aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 190(2):307 – 312, 1997.
- [117] A. M. Bodratti, B. Sarkar, D. Song, M. Tsianou, and P. Alexandridis. Competitive adsorption between peo-containing block copolymers and homopolymers at silica. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 36(1):1–9, 2015.
- [118] C.-W. Cho, S.-C. Shin, and I.-J. Oh. Thermorheologic properties of aqueous solutions and gels of poloxamer 407. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23(12):1227–1232, 1997.
- [119] M. L. Veyries, G. Couarraze, S. Geiger, F. Agnely, L. Massias, B. Kunzli, F. Faurisson, and B. Rouveix. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 192(2):183 – 193, 1999.
- [120] G. Bonacucina, M. Spina, M. Misici-Falzi, M. Cespi, S. Pucciarelli, M. Angeletti, and G. F. Palmieri. Effect of hydroxypropyl -cyclodextrin on the self-assembling and thermogelation properties of poloxamer 407. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 32(2):115 – 122, 2007.
- [121] T. Al Kayal, D. Panetta, B. Canciani, P. Losi, M. Tripodi, S. Burchielli, P. Ottoni, P. Antonio Salvadori, and G. Soldani. Evaluation of the effect of a gamma irradiated dbm-pluronic f127 composite on bone regeneration in wistar rat. *PLoS ONE*, 10(4):e0125110, 2015.
- [122] <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=2884>. Rheological analysis of dispersions by frequency sweep testing using equipment from malvern instruments, 2005.
- [123] Th. Gerber, B. Himmel, and C. Hübert. Waxes and saxs investigation of structure formation of gels from sodium water glass. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 175(2):160 – 168, 1994.
- [124] Z. Gu and P. Alexandridis. Drying of films formed by ordered poly(ethylene oxide)poly(propylene oxide) block copolymer gels. *Langmuir*, 21(5):1806–1817, 2005. PMID: 15723476.
- [125] D. Attwood, J.H. Collett, and C.J. Tait. The micellar properties of the poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) copolymer pluronic f127 in water and

- electrolyte solution. *International Journal of Pharmaceutics*, 26(1):25 – 33, 1985.
- [126] R. Basak and R. Bandyopadhyay. Encapsulation of hydrophobic drugs in pluronic F127 micelles: Effects of drug hydrophobicity, solution temperature, and pH. *Langmuir*, 29(13):4350–4356, 2013. PMID: 23472840.
- [127] Z. Gu and P. Alexandridis. Osmotic stress measurements of intermolecular forces in ordered assemblies formed by solvated block copolymers. *Macromolecules*, 37(3):912–924, 2004.
- [128] N. K. Pandit and J. Kisaka. Loss of gelation ability of pluronic[®] F127 in the presence of some salts. *International Journal of Pharmaceutics*, 145(1):129 – 136, 1996.
- [129] H. Geng, H. Song, J. Qi, and D. Cui. Sustained release of vegf from plga nanoparticles embedded thermo-sensitive hydrogel in full-thickness porcine bladder acellular matrix. *Nanoscale Research Letters*, 6(1):312, Apr 2011.
- [130] S. Baroth, P. Borget, G. Daculsi, E. Goyenvalle, E. Aguado, and T. Miramond. In vivo comparative study of two injectable/moldable calcium phosphate bioceramics. 529:291–295, 1 2013.
- [131] M. C. H. van der Meulen, X. Yang, T. G. Morgan, and M. P. G. Bostrom. The effects of loading on cancellous bone in the rabbit. *Clinical Orthopaedics and Related Research[®]*, 467(8):2000–2006, 2009.