

ENTWICKLUNG EINES IN-VITRO-KNOCHENMODELLS

ZUR CHARAKTERISIERUNG

WIRKSTOFFHALTIGER IMPLANTATE

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT

DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

VORGELEGT VON

GEREON JOHANNES RAU

KIEL, 2015

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hartwig Steckel

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Adelong

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2015

Zum Druck genehmigt: 27. März 2015

gez. Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Duschl, Dekan

“It’s all about the details!”

Lenny Cole

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

Rau, G.; Steckel, H.; Weyers, I.; Schulz A.-P.

„Drug Release from medical devices - Development of an in-vitro bone model“

Controlled Release Society Germany - Local Chapter Meeting 2014 - Kiel, Deutschland

Rau, G.; Steckel, H.; Weyers, I.; Schulz A.-P.

„Drug Release from medical devices - Development of an in-vitro bone model“

EURO BioMat 2013 - European Symposium on Biomaterials and Related Areas, Weimar, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Einleitung.....	1
1.2	Zielsetzung	4
2	KONZEPTIONELLE MODELLBILDUNG	5
2.1	Allgemeine Aspekte einer Freisetzungsanalytik.....	5
2.2	Generelle Anforderungen an eine Freisetzungsanalytik.....	6
2.3	Anwendungsbereich des in-vitro-Knochenmodells	9
2.3.1	Natürliche und alloplastische Knochenersatzmaterialien	10
2.3.2	Wirkstoffträger und Spacer zur lokalen Antibiose.....	11
2.3.3	Enossale Implantate.....	12
2.3.4	Endoprothesen.....	12
2.3.5	Implantate zur Osteosynthese.....	13
2.4	Aufbau des biologischen Knochens	14
2.4.1	Anatomie der Hartschicht	14
2.4.2	Anatomie des Knochenmarks	17
2.4.3	Vaskuläres System des Knochens.....	20
2.5	Untersuchungen am biologischen Knochen.....	23
2.5.1	Allgemeine Aspekte der Knochenpräparation und Strukturanalyse.....	23
2.5.2	Material und Methoden.....	25
2.5.2.1	Bovine Kadaverknochen	25
2.5.2.2	Humane Femora	25
2.5.2.3	Darstellung von Knochenstrukturen durch thermische Vergasung	26
2.5.2.4	Mikroskopische Strukturanalyse spongöser boviner Knochenzylinder	26
2.5.2.5	Computertomographische Strukturanalyse humaner Femora.....	27
2.5.3	Ergebnisse.....	28
2.5.3.1	Darstellung boviner Knochenstrukturen durch thermische Vergasung.....	28
2.5.3.2	Quantitative Strukturanalyse humaner Femurpräparate	32
2.6	Modellbildung.....	37
2.6.1	Allgemeiner Modellbegriff	37
2.6.2	Kompartimentmodelle.....	38

2.6.2.1	Einkompartimentmodell bei intravasaler Wirkstoffapplikation.....	38
2.6.2.2	Zweikompartimentmodell bei intravasaler Applikation.....	40
2.6.2.3	Einkompartimentmodell bei extravasaler Applikation.....	41
2.6.2.4	Multikompartimentmodell des biologischen Knochens.....	43
3	ENTWICKLUNG EINES KÜNSTLICHEN KNOCHENKOMPARTIMENTS	47
3.1	Einleitung.....	47
3.2	Konzept des strukturellen Aufbaus des Knochenkompartiments	49
3.3	Allgemeine Aspekte der Herstellung poröser Scaffolds.....	52
3.4	Material.....	54
3.4.1	Hydroxylapatit	54
3.4.2	Polyvinylalkohol.....	54
3.4.3	Mikrokristalline Cellulose.....	55
3.4.4	Magnesiumstearat.....	55
3.5	Methoden	56
3.5.1	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von HA-Bulkware mit MCC-Pellets als organischem Porenbildner.....	56
3.5.1.1	Herstellung von MCC-Pellets durch Extrusion und Spheronisation.....	56
3.5.1.2	Mischung von HA-Bulkware und MCC-Pellets.....	56
3.5.1.3	Kompaktierung der HA-MCC-Pellet-Mischung.....	57
3.5.1.4	Sinterung von Grünlingen.....	58
3.5.1.5	Ätzung von Scaffolds.....	58
3.5.2	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von bindemittelhaltigem HA- Sprühgranulat mit MCC-Pellets.....	59
3.5.2.1	Herstellung und Sprühtrocknung bindemittelhaltiger HA-Suspension.....	59
3.5.3	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von MCC-Pellets und händisch granuliertem HA-Granulat.....	60
3.5.4	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von überzogenen Pellets.....	61
3.5.4.1	Überziehen von Pellets mit bindemittelhaltiger HA-Suspension.....	61
3.5.4.2	Kompaktierung überzogener Pellets.....	61
3.5.5	Formgebung von Scaffolds durch zerspanende Strukturierung von porogenfreien, gesinterten Presslingen aus HA-Granulat.....	62
3.5.5.1	Kompaktierung und Sinterung von Presslingen aus HA-Granulat.....	62
3.5.5.2	Strukturierung von gesinterten Rohlingen zu Scaffolds durch Zerspanung	62
3.5.6	Methoden zur Charakterisierung von Scaffolds, HA-Bulkware und Granulat.....	66

3.5.6.1	Bestimmung des Böschungswinkels von Pulvern und HA-Granulat.....	66
3.5.6.2	Bestimmung der Kompressibilität von HA-Bulkware und HA-Granulat.....	66
3.5.6.3	Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.....	67
3.5.6.4	Mikroskopische Aufnahmen.....	67
3.5.6.5	Partikelgrößenbestimmung - Prinzip der Laserbeugung.....	67
3.5.6.6	Partikelgrößenbestimmung - Prinzip der dynamischen Lichtstreuung.....	68
3.5.6.7	Bestimmung von Längenmaßen.....	68
3.5.6.8	Bestimmung der diametralen Bruchkraft.....	68
3.5.6.9	Bestimmung der Porosität von Scaffolds über hydrostatische Wägung.....	68
3.5.6.10	Pulverrheologie von HA-Bulkware und sprühgetrocknetem HA-Granulat.....	70
3.5.6.11	Bestimmung der spezifischen Oberfläche durch Stickstoffadsorption nach dem BET-Verfahren.....	70
3.5.6.12	Bestimmung der Kristallinität mittels Röntgendiffraktometrie.....	71
3.5.6.13	Feuchtebestimmung.....	71
3.5.6.14	Dichtemessung.....	71
3.5.6.15	Thermogravimetrische Analyse.....	71
3.5.7	Methoden zur statistischen Auswertung.....	72
3.5.7.1	Statistische Versuchsplanung.....	72
3.5.7.2	Allgemeine statistische Methoden.....	72
3.6	Ergebnisse.....	73
3.6.1	Entwicklung eines Fertigungsverfahrens für mikroporöse Scaffolds.....	73
3.6.2	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von HA-Bulkware mit MCC-Pellets als organischem Porenbildner.....	74
3.6.3	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von HA-Granulat mit MCC-Pellets.....	78
3.6.3.1	Schlickerformulierung und Sprühtrocknungsprozess.....	78
3.6.3.2	Bruchkraftbestimmung von Presslingen aus HA-Granulat.....	80
3.6.3.3	Kompaktierung von HA-Granulat und MCC-Pellets.....	81
3.6.4	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von MCC-Pellets und händisch granuliertem HA-Granulat.....	82
3.6.5	Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von überzogenen Pellets.....	83
3.6.6	Formgebung von Scaffolds durch zerspanende Strukturierung von porogenfreien, gesinterten Presslingen aus HA-Granulat.....	86
3.6.6.1	Fließverhalten und Kompressibilität von Bulkware und Sprühgranulat.....	86
3.6.6.2	Einfluss der Sintertemperatur auf Partikelhabitus und Presslinggefüge.....	88
3.6.7	Prozessoptimierung zur Einstellung der Mikroporosität in Rohlingen.....	94
3.6.7.1	Evaluierung signifikanter Prozessfaktoren - Vollfaktorieller Versuchsplan.....	95
3.6.7.2	Zentral zusammengesetzter Versuchsplan.....	99
3.6.8	Strukturierung von Rohlingen durch Zerspanung.....	106

3.6.9	Finales Konzept des modularen Knochenkompartimentes.....	109
3.7	Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	122
4	DESIGN, FERTIGUNG UND FUNKTIONSPRÜFUNG EINER DURCHFLUSSZELLE	124
4.1	Einleitung.....	124
4.2	Fertigungsverfahren.....	124
4.3	Fertigung prototypischer Bauteile der Freisetzungszelle	126
4.4	Werkstoffe für prototypische Bauteile.....	130
4.5	Prototypenaufbau	131
4.5.1	Kammer für das künstliche Knochenkompartiment.....	131
4.5.2	Medienführende Bauteile.....	133
4.5.3	Fördereinheiten für FreisetzungsmEDIUM und künstliches Knochenmark	134
4.5.4	Temperiermantel.....	135
4.6	Funktionelles Design des Prototypen VI	136
4.6.1	Inneres Zylindersystem.....	137
4.6.2	Medienführende Bauteile.....	137
4.6.3	Äußeres Zylindersystem	139
4.6.4	Bewertung des Designs des Prototypen VI.....	141
4.6.4.1	Inneres Zylindersystem.....	141
4.6.4.2	Medienführende Bauteile.....	143
4.6.4.3	Äußeres Zylindersystem.....	145
4.7	Funktionelles Design des Prototypen XVIII	146
4.7.1	Doppelkammersystem.....	148
4.7.2	Höhenvariables Kolbensystem	151
4.7.3	Medienführende Bauteile.....	154
4.7.3.1	Kolben-Zylinder-System zur Befüllung der Knochenkompartimentes.....	154
4.7.3.2	FreisetzungsmEDIUMzuführende Bauteile - Vollflächige Zuleitung.....	156
4.7.3.3	FreisetzungsmEDIUMzuführende Bauteile - Einzelkanalzuleitung	158
4.7.3.4	FreisetzungsmEDIUMabführende Bauteile - Einzelkanalableitungssystem.....	160
4.7.4	Bewertung des Prototypen XVIII.....	162
4.7.4.1	Doppelkammersystem.....	162
4.7.4.2	Kolben- Zylinder-System zur Befüllung des Knochenkompartimentes.....	166

4.7.4.3	Variables Kolbensystem.....	169
4.7.4.4	Freisetzungsmedium zuführende Bauteile.....	170
4.8	Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	173
5	DIFFUSIONS- UND FREISETZUNGSVERSUCHE	174
5.1	Einleitung.....	174
5.2	Theoretische Grundlagen und Betrachtungen.....	175
5.3	Material.....	178
5.3.1	Methylenblau.....	178
5.3.2	Poloxamer 407.....	178
5.3.3	Ethylcellulose.....	178
5.3.4	Ethanol.....	179
5.3.5	Dichlormethan.....	179
5.3.6	Weißes Vaseline.....	179
5.4	Methoden	180
5.4.1	Quantitative Methylenblaubestimmung mittels UV/VIS-Spektroskopie.....	180
5.4.2	Präparation mikroporöser Rohlinge für isolierte Diffusionsversuche.....	181
5.4.3	Freisetzung beschichteter Modellimplantate - Statistischer Versuchsplan	183
5.4.3.1	Herstellung mikroporöser Scaffolds.....	183
5.4.3.2	Coating von Modellimplantaten mit Methylenblau	183
5.4.3.3	Gehaltsbestimmung von beschichteten Modellimplantaten.....	184
5.4.3.4	Rasterelektronische Aufnahmen der Modellimplantate.....	184
5.4.3.5	Herstellung wässriger Poloxamer 407 - Lösung.....	184
5.4.3.6	Einbringung des Modellimplantates in das in-vitro-Knochenmodells.....	184
5.4.3.7	Bestimmung der Methylenblau-Diffusionsstrecke.....	186
5.5	Ergebnisse	188
5.5.1	Isolierter Diffusionsversuch.....	188
5.5.2	Freisetzungsversuche mit methylenblauhaltigen Modellimplantaten.....	189
5.5.2.1	Coating von Modellimplantaten mit Methylenblau	189
5.5.2.2	Eignung von Poloxamer 407 - Gelen als Benetzungsmittel.....	191
5.5.2.3	Gehaltsbestimmung von beschichteten Modellimplantaten.....	192
5.5.2.4	Freisetzungsversuche - Vollfaktorieller Versuchsplan.....	193
5.6	Zusammenfassende Schlussfolgerungen.....	198

6	DISKUSSION	199
7	ZUSAMMENFASSUNG	203
8	ABSTRACT	206
9	ANHANG.....	I
9.1	μ CT-Daten humaner Femora	I
9.2	Thermogravimetrische Untersuchungen.....	II
9.3	Partikelgrößenbestimmung von HA-Bulkwar.....	III
9.4	Konstruktionszeichnungen der Bauteile des Prototypen XVIII	IV
9.5	Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge.....	XI
10	REFERENCES	XII

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Der Bedarf an sicheren und leistungsfähigen Implantaten nimmt in den Disziplinen der Osteosynthese, Endoprothetik und Implantologie stetig zu. Der Großteil dieser Implantate wird zur operativen Behandlung von Osteoporose und Arthrose assoziierten Defekten des Stütz- und Bewegungsapparates und als endossaler Träger für Zahnersatz eingesetzt [1]. Da Übergewicht und Alter wesentliche Risikofaktoren für die Defekte darstellen können [2], sind angesichts des gesellschaftlichen Wandels und des Anstieges der Lebenserwartung neue Gesundheitsleistungen erforderlich, um auch zukünftig die Vitalität und Mobilität der Patienten angemessen gewährleisten zu können [3, 4]. Speziell Implantate mit antibiotisch wirkenden und den Knochenstoffwechsel beeinflussenden Wirkstoffen gewinnen im Klinik- und Entwicklungsbereich zunehmend an Bedeutung, da Knocheninfektionen und Implantatlockerungen die Hauptursache für Komplikationen und Revisionsoperationen darstellen [2, 5, 6]. Die Entwicklung innovativer Implantate ist somit von großer Bedeutung und stellt hohe Anforderungen an den entwickelnden Hersteller, der die Vorgaben und Interessen der Patienten, zulassungsregulierenden Gesetzgebung, behandelnden Ärzte und Krankenkassen als Kostenträger, sowie eigene marktwirtschaftliche Aspekte gleichermaßen berücksichtigen muss.

Zur Gewährleistung der Qualität oben genannter Implantate werden durch europäische Harmonisierungsrichtlinien grundlegende Sicherheits- und Leistungsanforderungen definiert, die sie als Medizinprodukte im Rahmen modularer Konformitätsbewertungsverfahren nachweislich erfüllen müssen, um eine CE-Kennzeichnung zu erhalten, welche Voraussetzung für das Inverkehrbringen und Inbetriebnehmen innerhalb des europäischen Wirtschaftsraums ist. Zentrale Bestandteile der Konformitätsbewertungsverfahren sind eine Nutzen-Risiko-Analyse, eine klinische Bewertung und die Prüfung auf Leistungsfähigkeit. Das durchzuführende Verfahren orientiert sich dabei an dem jeweiligen Gefahrenpotential der Medizinprodukte, die auf Grund der hohen Diversität zweckmäßigerweise in die

Klassen I, IIa, IIb, und III unterteilt werden, wobei Klasse III den kritischsten Produkten vorbehalten ist. Für implantierbare Produkte und Produkte der Klasse III sind daher im Rahmen der klinischen Bewertung zusätzlich klinische Studien durchzuführen. Richtlinie 93/42/EWG, geändert durch 2007/47/EG, definiert die grundlegenden Anforderungen (Artikel 3) und das Klassifizierungssystem (Artikel 9) und wird innerhalb Deutschlands durch das Medizinproduktegesetz (MPG) und entsprechende Verordnungen in nationales Recht umgesetzt. Enthalten die Medizinprodukte zusätzlich einen Wirkstoff, ist ein Konsultationsverfahren vorgesehen, bei dem das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) den Wirkstoffanteil nach arzneimittelrechtlichen Kriterien bewertet.

Das Bedürfnis nach einer komplikationsfreien Verbesserung oder Wiederherstellung ihrer Lebensqualität und Mobilität definiert weitgehend die grundlegenden Anforderungen der Patienten an die verwendeten Implantate. Essentielle Voraussetzungen für adäquate Implantate sind daher eine gute biologische Verträglichkeit und hohe technische Leistungsfähigkeit. Für Totalendoprothesen sind zusätzlich lange Standzeiten wünschenswert, da so Wechselraten reduziert werden können und schon bei jüngeren Patienten frühzeitige Implantationen möglich sind [7].

Der Arzt ist stets an einer bestmöglichen und erfolgreichen Behandlung des Patienten interessiert, gleichwohl er in seinem Handeln als Leistungserbringer im Krankenhaus auch ökonomischen Regularien des Gesundheitssystems unterliegt. Da die Vergütung stationärer Krankenhausleistungen durch den Kostenträger seit 2003 auf Grundlage eines fallpauschalenbezogenen Klassifikationssystems (*German Diagnosis Related Groups, G-DRG*) erfolgt, sind kosteneffektive Implantate für den Leistungserbringer wünschenswert, da Kostenvorteile bei ihm verbleiben und somit die Wirtschaftlichkeit des Krankenhauses gewährleistet und verbessert werden kann [8]; näheres regelt § 17 b Krankenhausfinanzierungsgesetz (KHG). Eine kurzfristige Betrachtung und Beurteilung des Behandlungserfolges sollte dabei vermieden werden, da initial kostenintensivere Implantate durch reduzierte Revisionsraten und höhere Standzeiten langfristig Kosten verringern können [7].

Die Krankenversicherung als Solidargemeinschaft hat die Aufgabe, die Gesundheit der Versicherten zu erhalten, wiederherzustellen oder ihren Gesundheitszustand zu bessern (§1 SGB V). Damit die Krankenkassen trotz des gesellschaftlichen Wandels ihre gesetzliche Pflicht auch zukünftig erfüllen können, sind sie als Kostenträger von Gesundheitsleistungen allgemein an niedrigen Ausgaben interessiert. Da sie bei der Erbringung medizinischer Leistungen ein hohes Maß an Wirtschaftlichkeit fordern, ist eine positive Kosten-Nutzenbewertung eines innovativen Medizinproduktes von zentraler Bedeutung, um in die Erstattungsfähigkeit der Krankenkassen aufgenommen zu werden [9].

Aus den oben genannten Anforderungen ergeben sich drei zentrale Aspekte, die der Hersteller bei der Entwicklung neuer Implantate berücksichtigen und gewährleisten muss, nämlich adäquate Sicherheit, Leistungsfähigkeit und Kosteneffektivität der Implantate. Da für ihn sein Gewinn als betriebswirtschaftlich wichtigste Kennziffer im Vordergrund steht, ist er weiterhin an einem Wettbewerbsvorteil gegenüber anderen Implantatherstellern innerhalb der Gesundheitswirtschaft interessiert. Ein etwaiger Vorteil kann durch vorteilhafte Preisbildung oder signifikante Produktinnovation, wie die kombinierte Verwendung von sich in ihrer Funktion ergänzender Implantate und Wirkstoffe, erreicht werden.

Hohe Entwicklungskosten und zeitintensive Testzyklen können eine Hürde für die Entwicklung neuer Implantate darstellen und Investitionen in den Forschungs- und Entwicklungsbereich unattraktiv machen [7]. Um die Entwicklung wirkstoffhaltiger Implantate dennoch technisch und finanziell darstellen zu können ist der Hersteller an einer zeit- und kosteneffektiven Freisetzungsanalytik interessiert. Diese sollte eine rationelle in-vitro-Testung prototypischer Implantate bei möglichst genauer Abbildung der biologischen Gegebenheiten des Knochens ermöglichen. Durch eine umfassende Optimierung kann somit einerseits die Sicherheit und Effektivität der Implantate für nachfolgende in-vivo Tests erhöht und andererseits der Umfang von Tierstudien, die einer genauen Prüfung hinsichtlich ihres ethischen, hohen finanziellen und zeitlichen Aspektes bedürfen, reduziert werden.

1.2 Zielsetzung

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde im Rahmen der Forschungstätigkeiten des durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projektes „Muskuloskelettale Erkrankungen - Managing Infections of the Skeletal System in Germany (MISSinG)“ erstellt. Das Ziel der Dissertation ist die Erarbeitung des Konzeptes eines neuartigen in-vitro-Knochenmodells, das die analytische Charakterisierung wirkstoffhaltiger Implantate ermöglicht. Das funktionelle Design der Analytik soll dabei auf einen modularen und individuell modifizierbaren Aufbau ausgerichtet werden, um die Variabilität des biologischen Knochens und die Vielfalt eingesetzter Implantate adäquat abbilden zu können. Das Knochenmodell gliedert sich vorzugsweise in ein künstliches Knochenkompartiment, in welches das zu testende Implantat einbracht wird und eine Freisetzungsvorrichtung, die das Knochenkompartiment aufnimmt. Das Knochenkompartiment ist so zu gestalten, dass es die Anatomie des biologischen Knochens am Applikationsort des Implantates adäquat abbildet.

Zentraler Aspekt der Dissertation ist somit die Entwicklung und Optimierung geeigneter Fertigungsverfahren für die Herstellung artifiziellen Knochens. Dessen funktionelles Design soll, in Anlehnung an den biologischen Knochen, eine simultane Darstellung hydrophiler und lipophiler Kompartimente in einem Träger aus Hydroxylapatit, bei gleichzeitiger Perfundierbarkeit durch ein Freisetzungsmedium ermöglichen. Des Weiteren gilt es eine geeignete Freisetzungsvorrichtung in der Art einer temperierbaren Durchflusszelle zu entwickeln. Die Verfahrensentwicklung und Prototypenfertigung soll dabei auf reproduzierbare, zeiteffektive und kostengünstige Prozesse ausgerichtet werden, um eine rationelle Freisetzungsanalytik darstellen zu können. Das entwickelte Konzept soll final durch Freisetzungsversuche mit Modellimplantaten auf eine adäquate Funktionalität getestet werden.

2 Konzeptionelle Modellbildung

2.1 Allgemeine Aspekte einer Freisetzungsanalytik

Bei der Qualitätskontrolle stellen in-vitro-Prüfungen zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung eine Standardmethode zur Überprüfung der Gleichförmigkeit der Produktqualität dar [10, 11]. Für Arzneimittel wird die Art der Prüfung durch die jeweils gültigen Arzneibücher in Abhängigkeit von der Darreichungsform individuell festgelegt, während bei Medizinprodukten noch keine allgemeingültige normative Regelung existiert, aus der sich die zu verwendenden Methoden und Apparaturen ableiten lassen [12]. Im Bereich der Formulierungs- und Prozessentwicklung sind in-vitro-Prüfungen zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung ein essentielles Analyseverfahren, um wirkstoffhaltige Zubereitungen und Medizinprodukte hinsichtlich ihres Freisetzungsprofils und ihrer biopharmazeutischen Eigenschaften zu charakterisieren [13, 14]. Anhand von in-vitro-Freisetzungsdaten und in-vivo-Plasmaspiegelverläufen werden in-vivo-in-vitro-Korrelationen (IVIVK) erstellt, welche eine modellhafte Vorhersage der Bioverfügbarkeit eines Wirkstoffes unter in-vivo-Bedingungen ermöglichen. Die US-amerikanische Lebensmittelüberwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde (Food and Drug Administration - FDA) definiert die IVIVK als „a predictive mathematical model describing the relationship between an in vitro property of an extended release dosage form (usually the rate or extent of drug dissolution or release) and a relevant in vivo response, e.g. plasma drug concentration or amount of drug absorbed.“ [15]. Eine IVIVK ist jedoch nur dann aussagekräftig, wenn sich eine adäquate Korrelation zwischen einem pharmakologischen Effekt und dem Plasmaspiegel des applizierten Wirkstoffes beobachten lässt. Peroral, intramuskulär oder subkutan applizierte Wirkstoffe sollen zumeist in den systemischen Blutkreislauf gelangen, ihre Plasmakonzentration kann dementsprechend bestimmt werden. Wird ein Wirkstoff jedoch lokal appliziert, weil seine systemische Verteilung unerwünscht ist [14], oder die Plasmakonzentration nicht mit der am Wirkort benötigten Konzentration korreliert, wie bei chronischer oder komplizierter Osteomyelitis [16], ist seine Quantifizierung direkt im Gewebe notwendig. Oft ist dies jedoch nur begrenzt möglich, sodass die Erstellung einer adäquaten IVIVK erschwert sein kann.

2.2 Generelle Anforderungen an eine Freisetzungsanalytik

In-vitro-Prüfungen zur Untersuchung der Wirkstofffreisetzung gliedern sich in den Vorgang der Freisetzung des Wirkstoffes und seine analytische Quantifizierung. Während des Freisetzungsvorgangs erfolgt der Übergang des Wirkstoffes aus seiner Zubereitung in das verwendete Freisetzungsmedium unter definierten Testbedingungen. Die Freisetzung des Wirkstoffes wird dabei hauptsächlich durch die Formulierung und die physikochemischen Eigenschaften des Wirkstoffes und der Hilfsstoffe, das Freisetzungsmedium und den mechanischen Einfluss der verwendeten Freisetzungsvorrichtung bestimmt [17, 18]. Der im Freisetzungsmedium gelöste Wirkstoff wird mit Hilfe von geeigneten analytischen Verfahren zeitabhängig quantifiziert, sodass ein Freisetzungsprofil erstellt werden kann [19]. Gilt es aus den Freisetzungsdaten eine verlässliche in-vivo-in-vitro-Korrelation abzuleiten, sollte sich die Freisetzungsmethode möglichst nah an den physiologischen Eigenschaften des Applikationsortes des Wirkstoffes im Körper des Patienten orientieren [20]. Aufgrund technischer Limitierungen können diese jedoch meist nur vereinfacht in einer Freisetzungsanalytik abgebildet werden. Daher sind zunächst die allgemeinen Anforderungen an eine Wirkstoffanalytik und eine Freisetzungsvorrichtung zu definieren. Aus diesen Anforderungen und den physiologischen Eigenschaften des Knochens (Kapitel 2.4) gilt es, ein technisch praktikables Konzept einer Freisetzungsanalytik für wirkstoffhaltige Implantate zu entwickeln (Kapitel 2.5).

Zunächst sind die Anforderungen zu betrachten, die eine Wirkstoffanalytik adäquat erfüllen sollte [21–23]:

- **Selektivität:** Fähigkeit nebeneinander vorliegende Komponenten getrennt zu erfassen.
- **Linearität:** Proportionalität zwischen dem Messergebnis und der Stoffkonzentration, wobei die Proportionalität direkt oder durch mathematische Transformation der Messergebnisse sichtbar gemacht werden kann.
- **Präzision:** Maß für die statistische Streuung von Analysenwerten aufgrund zufälliger Fehler.

- **Richtigkeit:** Maß für die Abweichung der Analysenwerte vom wahren Wert aufgrund eines systematischen Fehlers.
- **Bestimmungsgrenze:** Geringste Analytkonzentration, die quantitativ noch erfasst werden kann.
- **Genauigkeit:** Maß für den Gesamtfehler einer Analyse.
- **Robustheit:** Relative Unempfindlichkeit gegenüber einer etwaigen Änderung von Einflussparameter.

Das europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 7) stellt für die monographierten Freisetzungsgaraturen zur Prüfung von Arzneiformen die folgenden normativen Anforderungen [24]:

- **Materialeigenschaften:** Die verwendeten Materialien müssen inert gegenüber dem zu untersuchenden wirkstoffhaltigen Produkt und dem Freisetzungsmedium sein.
- **Maßhaltigkeit apparativer Bauteile:** Die Bauteile einer Freisetzungsgaratur sind in ihrer Form eindeutig definiert und dürfen nur in einer festgelegten Toleranz variieren.
- **Testparameter:** Die Art, Menge, Position, Flussrate und/oder Umdrehungszahl apparativer Bauteile und/oder Hilfsmittel sind definiert und dürfen nur in festgelegten Toleranzen variieren.
- **Temperierung:** Die Freisetzungsgaraturen müssen auf 37 °C temperiert werden, wobei die Temperatur in festgelegten Toleranzen variieren darf

Die monographierten Freisetzungsgaraturen unterscheiden sich zwar in ihrem prinzipiellen Aufbau und ihrer Funktionsweise, jedoch weisen sie zusätzlich zu den normativen Anforderungen konstruktive Gemeinsamkeiten auf:

- **Variabilität:** Durch Änderung dynamischer Parameter (Umdrehungsgeschwindigkeit, Flussrate des Freisetzungsmediums), sowie der Temperatur

und der Zusammensetzung des Freisetzungsmediums kann die Wirkstoff-freisetzung kontrollierbar beeinflusst werden.

- **Funktionale Beschaffenheit:** Ein unkomplizierter und schlichter Aufbau ermöglicht eine einfache und montagegerechte Handhabung der Freisetzung-apparatur, bei gleichzeitiger Minimierung von technischen und anwender-bedingten Störgrößen. Bauteile mit einfachen Geometrien und glatten Oberflächen erleichtern die Reinigung.
- **Modularität:** Ein modularer Aufbau ermöglicht das Zusammenfügen von standardisierten Einzelbauteilen über genormte Schnittstellen zu einem funktionellen Gesamtsystem. Die Bauteile lassen sich somit leicht austauschen und individuell an die jeweiligen produktspezifischen Anforderungen anpassen, ohne das Gesamtsystem zu beeinflussen. Weiterhin ermöglicht ein modular gestaltetes System eine kosten- und raumeffektive Bauart einer Frei-setzungsapparatur.

Aus den aufgeführten Anforderungen ergeben sich fünf zentrale Aspekte, die bei der zu entwickelnden Freisetzungsapparatur zu berücksichtigen sind. So hat die Apparatur idealerweise einen modularen Aufbau, der die Prüfung unterschiedlicher Medizinprodukte bei verschiedenen Konditionen ermöglicht. Dabei sollte der Aufbau zusätzlich die Temperierung der Apparatur ermöglichen, sodass die humane Körpertemperatur simuliert werden kann. Die Bauteile sollten in ihrem funktionellen Design so konstruiert werden, dass sie eine montagegerechte Handhabung, leichte Reinigung und exakte Platzierung im Grundsystem erlauben. Das Material der Bauteile muss gegenüber den zu testenden wirkstoffhaltigen Medizinprodukten inert und idealerweise leicht zu reinigen sein.

2.3 Anwendungsbereich des in-vitro-Knochenmodells

Durch die fortwährende Verbesserung und Neuentwicklung von Implantaten und die hohe Innovationskraft der Medizintechnologie stehen den Operateuren und Zahnärzten heutzutage hochfunktionelle Implantate und Operationsmethoden zur Verfügung [7]. Im Rahmen dieser Arbeit sind insbesondere die Implantate von Interesse, in die ein Wirkstoff inkorporiert oder deren Oberfläche mit einem Wirkstoff beschichtet werden kann. Auf Grund der immensen Vielfalt werden sie an dieser Stelle nur allgemein nach ihrer bestimmungsgemäßen Funktion in fünf Gruppen unterteilt:

- I. Natürliche und alloplastische Knochenersatzmaterialien (Kapitel 2.3.1)
- II. Wirkstoffträger und Spacer zur lokalen Antibiose (Kapitel 2.3.2)
- III. Enossale Implantate (Kapitel 2.3.3)
- IV. Zementierte Endoprothesen und zementfreie Endoprothesen (Kapitel 2.3.4)
- V. Implantate zur Osteosynthese: Kirschnerdrähte, Nägel, Fixationsschrauben, Platten, Knochenzemente, Wirbelkörperersatz uvm. (Kapitel 2.3.5)

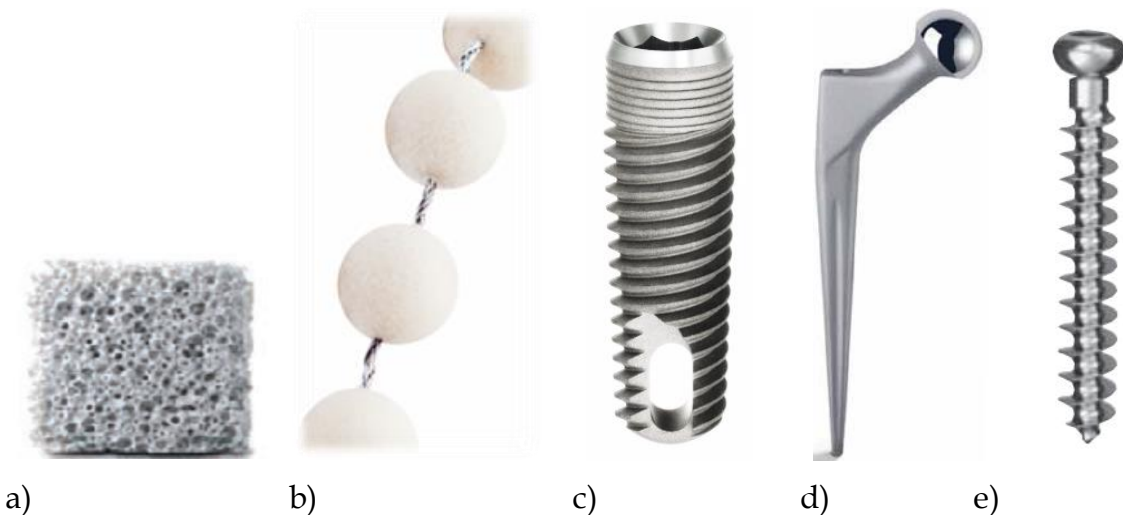


Abbildung 2-1: Exemplarische Produktauswahl aus der Implantologie, Osteosynthese und Endoprothetik

- | | |
|--|------|
| a) Biokeramisches Knochenersatzmaterial aus HA | [25] |
| b) Gentamicinhaltige PMMA-Kugeln - Septopal® | [26] |
| c) Enossales Zahnimplantat | [27] |
| e) Geradschaft Hüftprothese - CDH-Schaft | [28] |
| d) Fixationsschraube für trabekulären Knochen | [29] |

2.3.1 Natürliche und alloplastische Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien werden in der Kieferaugmentation und im operativen Bereich zur Auffüllung von fraktur-, tumor- und infektionsassoziierten Knochendefekten verwendet [30]. Als Allograft werden natürliche Knochenpräparate bezeichnet, die aus dem Knochen eines fremden humanen Spenders gewonnen und aufbereitet wurden. Stammt das Knochenpräparat aus einer anderen Spezies wird es als Xenograft bezeichnet. Alloplastische Knochenersatzmaterialien sind nicht natürlichen Ursprungs und kommerziell in unterschiedlichen Formen und aus unterschiedlichen Materialien verfügbar [31]. Ist das Knochenersatzmaterial für einen dauerhaften Verbleib im Knochen bestimmt wird eine vollständige Integration in den vorhandenen Knochen angestrebt. So werden zur Herstellung von Formkörpern bevorzugt Knochenersatzmaterialien eingesetzt, die osteoinduktive, -konduktive und osteogenetische Eigenschaften haben, bevorzugt die Calciumphosphate Hydroxylapatit und β -Tricalciumphosphat [32, 33]. Um das Einwachsen von Blutgefäßen zu fördern wird, wie in Abbildung 2-1 a) am Beispiel eines kubischen Formkörpers gezeigt, eine makroporöse Struktur der Formkörper angestrebt.

Aufgrund ihrer porösen Struktur weisen die Formkörper aus Knochenersatzmaterial ein großes Hohlraumvolumen auf, in das Wirkstoffe, Wachstumsfaktoren und sonstige Signaltransduktoren inkorporiert werden können [34]. Daher ist die Entwicklung von Formkörpern, die neben ihrer primären Funktion der räumlichen Knochendefektkompensation zusätzlich die Funktion eines Trägers erfüllen, ein zentraler Forschungsschwerpunkt im Bereich der Knochenersatzmaterialien [33]. Als Wirkstoffe sind Antibiotika, Antiphlogistika und Bisphosphonate von zentralem Interesse [35]. Um die Integration des Formkörpers in den Knochen zu verbessern und die Umwandlung in körpereigene Knochenstruktur zu erleichtern werden Signaltransduktoren, Wachstumshormone und -faktoren eingesetzt [36].

2.3.2 Wirkstoffträger und Spacer zur lokalen Antibiose

Liegt im Knochengewebe eine chronische Entzündung vor, ist die Blutversorgung oft reduziert, sodass parenteral verabreichte Antibiotika nicht in ausreichend hoher Konzentration am Ort der Entzündung verfügbar sind. Um dennoch eine hohe lokale Konzentration zu erreichen, werden neben der Exzision des erkrankten Gewebes zumeist zusätzlich antibiotikahaltige Wirkstoffträger operativ eingebracht, wie bereits 1970 durch Buchholz und Engelbrecht beschrieben [37]. Eines der am häufigsten verwendeten kommerziellen Produkte sind die zu einer Kette aufgereihten gentamicinhaltigen Polymethylmethacrylatkugeln (PMMA) (Septopal®, Abbildung 2-1 b)) [38]. Die Ketten werden lokal am Ort der Entzündung eingebracht und nach erfolgter Behandlung wieder entnommen.

Im Falle einer zweistufigen Revisionsoperation einer Endoprothese gilt es neben einer lokalen Antibiose auch die Geweberückbildung zu verhindern, indem sogenannte Spacer (beispielsweise BioFix Spacer®) als temporärer Prothesenersatz eingebracht werden. Sie entsprechen in ihrer Form näherungsweise der Endoprothese, bestehen zumeist ebenfalls aus PMMA und enthalten ein Antibiotikum, das sie retardiert freisetzen [39–42].

Zwar haben Knochenzemente primär die Funktion der Implantatfixierung oder der Stabilisierung der Hartsubstanz des Knochens, jedoch enthalten eine Vielzahl von kommerziell verfügbaren Knochenzementen (beispielsweise Palacos®, Refobacin®) Antibiotika [43], um postoperativ eine lokale, prophylaktische Antibiose sicherstellen zu können, sodass diese Zemente an dieser Stelle den Wirkstoffträgern zugeordnet werden. Den Goldstandard stellen heutzutage PMMA-haltige Knochenzemente dar [44].

2.3.3 Enossale Implantate

Die meisten enossalen Implantate sind aus Titan gefertigt und werden direkt in den Kieferknochen eingeschraubt, Abbildung 2-1 c) zeigt beispielhaft ein Implantat mit rechtssteigendem Gewinde. Die mechanischen Anforderungen an das Implantat bestimmen weitgehend ihre geometrische Form, sodass zumeist nur eine Modifizierung der Oberfläche möglich ist. Diese wird oft aufgeraut oder mit einer Schicht aus Hydroxylapatit gecoatet, damit der Knochen an das metallische Implantat gut anwachsen und es dauerhaft stabilisieren kann [45]. Ähnlich wie bei den Knochenersatzmaterialien liegen bei der Beschichtung von Implantatoberflächen sowohl Wirkstoffe mit antibiotischer und antiphlogistischer Wirkung, als auch Wachstumsfaktoren zur Promotion des Knochenwachstums im Fokus vieler Arbeitsgruppen [46, 47].

2.3.4 Endoprothesen

Teil- oder Totalendoprothesen werden im Patienten als teilweiser beziehungsweise vollständiger Ersatz von schadhafte Gelenken eingesetzt [48]. Zementfreie Prothesen werden nach operativer Entfernung der betroffenen Gelenkflächen durch Presssitz und gegebenenfalls durch zusätzliche Verschraubung im verbliebenen Knochen fixiert [49, 50]. Die Oberfläche der zementfreien Endoprothesen ist zumeist stark strukturiert, damit der Knochen an das metallische Implantat gut anwachsen und es dauerhaft stabilisieren kann [51]. Ist der verbliebene Knochen fraktur- oder krankheitsbedingt zu instabil, werden die Endoprothesen mittels Knochenzement im Knochen fixiert [52]. Abbildung 2-1 d) zeigt beispielhaft eine zu zementierende Hüftschaffprothese. Bezüglich der wirkstoffhaltigen Knochenzemente sei an dieser Stelle auf Kapitel 2.3.3 verwiesen. Ähnlich den enossalen Implantaten liegt ein Schwerpunkt bei der Optimierung von Endoprothesen auf der Beschichtung ihrer Oberflächen mit antibiotischen [53] und das Knochenwachstum fördernden Wirkstoffen [54].

2.3.5 Implantate zur Osteosynthese

Die zur Osteosynthese verwendeten Implantate stellen die größte und gleichzeitig heterogenste Gruppe im Bereich der Implantate dar. Bei einer offenen Frakturversorgung werden die Knochenfragmente über zumeist metallische Schrauben, Nägel und Drähte kraft- und formschlüssig fixiert [55-58] und über Platten, Marknägel oder ein externes Fixateur-System ausgerichtet [59-61]. Abbildung 2-1 e) zeigt beispielhaft eine Fixationsschraube mit ausgeprägter Gewindeflanke für trabekulären Knochen. Da die meisten Implantate nach erfolgreicher Knochendefektbehandlung wieder entnommen werden, fokussiert sich ihre Beschichtung vor allem auf antibiotische Wirkstoffe [62, 63].

Gilt es kleine Knochendefekte zu stabilisieren, finden zunehmend nicht dauerhafte Implantate Anwendung, wodurch der operative Eingriff zur Entfernung des Osteosynthesematerials entfallen kann. Bioabbaubare Implantate werden vorwiegend aus Polylactid-co-Glycolid-Copolymeren gefertigt [64], biodegradierbare Implantate bevorzugt aus Eisen- und Magnesiumlegierungen [65, 66]. Die Untersuchung der Implantate in einem in-vitro-Knochenmodell kann einen essentiellen Beitrag zum Verständnis ihres Degradationsverhaltens im biologischen Knochen leisten und somit ein wertvolles Werkzeug im Entwicklungsbereich sein.

2.4 Aufbau des biologischen Knochens

Der Knochen der Säugetiere hat sich zu einem komplexen Organsystem differenziert, welches nicht nur eine statische, stützende Funktion aufweist, sondern auch der Regulation des Kalziumstoffwechsels dient und Zellen des blutbildenden und immunologischen Systems beherbergt [67-69]. Die funktionelle Stabilität des Skelettsystems wird dabei erst durch den Kompositcharakter aus Hartschubstanz und Bindegewebe gewährleistet [70]. Die Hartschubstanz besteht zum überwiegenden Teil aus harten und spröden Calciumphosphaten, dessen größten Anteil Hydroxylapatit mit einem Anteil von 95-97% darstellt [71, 72]. Das elastische und zähe Bindegewebe, das bis zu 90% aus Kollagen Typ I besteht, ermöglicht die elastische Verformung des Knochens und stabilisiert die extrazelluläre Matrix [73-75]. Über ein spezialisiertes vaskuläres System erfolgt die Versorgung des Knochengewebes mit Blut [76].

2.4.1 Anatomie der Hartschubstanz

In Abhängigkeit von der statischen und dynamischen Belastung hat sich die Hartschubstanz in spongiosen oder kompakten Knochen differenziert [69]. Abbildung 2-2 a) zeigt schematisch den Aufbau der Substantia compacta (A) und Substantia spongiosa (B). Die in konzentrischen Schichten lamellar aufgebauten Osteone (Pfeil) bilden die Grundeinheit der kompakten Knochenstoff. Zentral befindet sich der Havers-Kanal (weißer Pfeilkopf), in dem Blutgefäße und Nervenfasern verlaufen. Deren Querverbindung erfolgt über Volkmann-Kanäle (schwarzer Pfeilkopf), die auch die Verbindung zum Periost herstellen [77]. Kompakte Knochenstoff findet sich vorwiegend in der Diaphyse der langen Röhrenknochen, spongiose Knochenstoff in den Kiefern, Wirbeln, platten Knochen, kurzen Röhrenknochen und Epiphysen langer Röhrenknochen [67]. Betrachtet man den spongiosen Knochen, lassen sich deutliche positions- und funktionsabhängige Unterschiede in der Anordnung der Trabekel erkennen [78]. Liegt eine vorwiegend vertikale Druckbelastung vor, wie beispielsweise in den Wirbelkörpern, ordnen sich die Trabekel orthogonal an [79]. Wirken hingegen multidirektionale Druck- und Zugbelastungen auf den Knochen ein, wie beispielsweise im Femurhals, ist eine bevorzugte Ausrichtung und Verdickung

der Trabekel entlang der Spannungstrajektorien zu erkennen [80], wie in Abbildung 2-3 a) und b) dargestellt. Die dargestellten Knochenstrukturen sind jedoch nicht statisch, sondern unterliegen einem ständigen Umbau, wobei Knochenabbau und -aufbau idealerweise ausgeglichen sind [81].

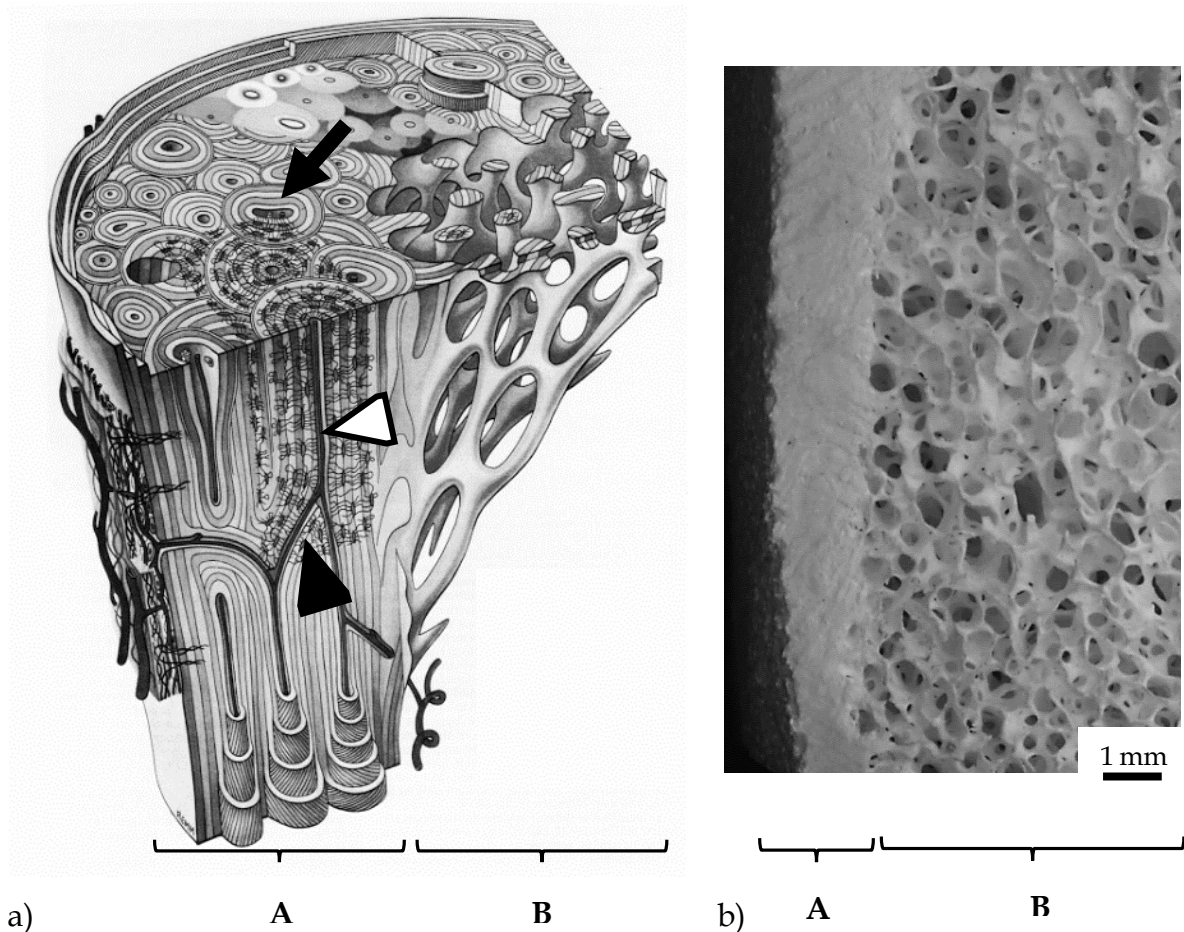


Abbildung 2-2: Kompakte (A) und trabekuläre (B) Knochenstruktur
a) Schematische Darstellung der Knochenfeinstruktur [77]
b) Ausgeglühtes bovines Knochenpräparat (siehe Kapitel 2.5.2.3)

Der Aufbau erfolgt durch Osteoblasten, die das weiche, noch unmineralisierte Osteoid ausbilden und nachfolgend mit Calciumphosphaten- und -carbonaten mineralisieren. Das Osteoid wird mehrheitlich durch Kollagenfasern (Typ I) ausgebildet, die einen Durchmesser von 3-10 nm und eine Länge von 300 μm haben [82]. Der mineralische Anteil besteht größtenteils aus nanokristallinem Hydroxylapatit, dessen Kristalle eine Länge von 30-50 nm, eine Breite von 15-30 nm und eine Dicke von 2-10 nm aufweisen.

Der Abbau erfolgt durch Osteoklasten, mehrkernige Zellen, die durch lokale pH-Werterniedrigung und proteolytische Enzyme die Hartschubstanz und die kollagene Knochenmatrix auflösen [83]. Sie sind in der Regulation des Kalziumhaushaltes von zentraler Bedeutung und werden unter anderem über die Hormone Calcitonin und Parathormon gehemmt beziehungsweise aktiviert [84]. Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) [85], Osteoklasten aus hämatopoetischen Stammzellen [86].

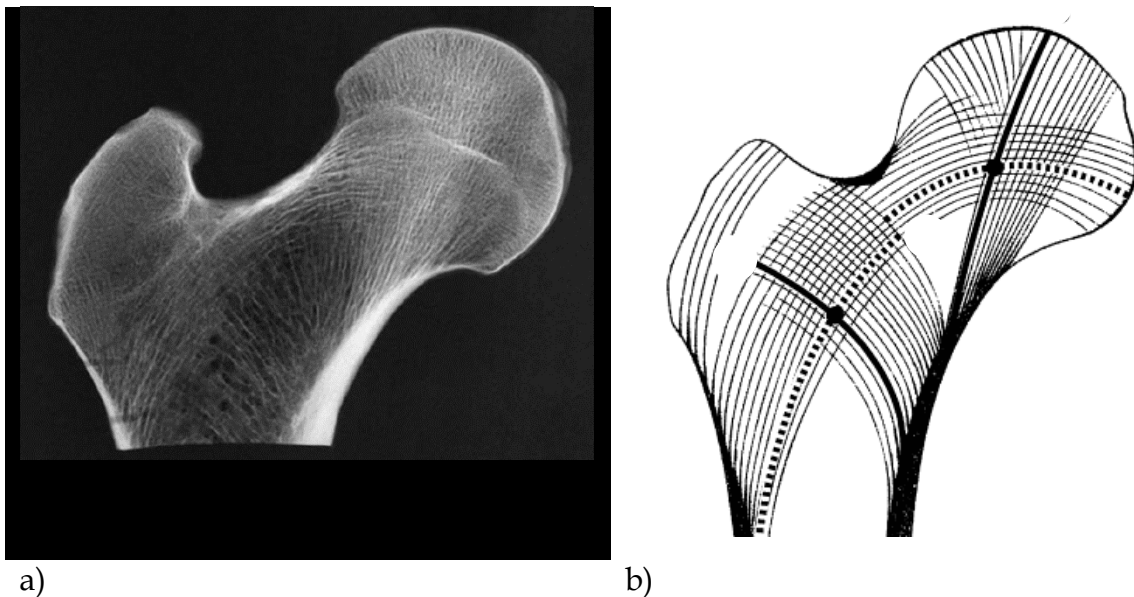


Abbildung 2-3: Spannungstrajektorien im proximalen Femur
a) Röntgenaufnahme eines humanen Schnittpräparats [80]
b) Schema der Spannungstrajektorien nach von Meyer, 1987

Clarke [87] und Koshla et al. [88] zeigen in ihren Untersuchungen eine altersabhängige Abnahme der Knochendichte, die zu einer Reduktion der Trabekelanzahl führt, wobei die statisch wichtigsten am längsten erhalten bleiben. Während sich der gesunde Knochen vorwiegend aus plattenförmigen und zusammenhängenden Trabekeln zusammensetzt, lässt sich beim osteoporotischen Knochen eine zunehmende Fenestrierung und Umwandlung zu stäbchenförmigen Trabekeln erkennen [89–91]. Eine Reduktion der Trabekel vermindert dabei die Knochenstabilität, wodurch sich das Frakturrisiko erhöht [92]. Zur Visualisierung und Quantifizierung dieser Strukturänderung eignet sich die Mikro-Computertomographie (μ CT), da sie eine

selektive Abbildung der mineralisierten Knochenanteile ermöglicht. Für das physikalische Messprinzip und die Funktionsweise wird an dieser Stelle auf die Arbeiten von Genant et al. [93] und Link [94] verwiesen. Die mittels Mikro-Computertomographie erstellte Abbildung 2-17 zeigt vergleichend die trabekuläre Struktur von gesundem e) und stark osteoporotischem f) Knochen.

2.4.2 Anatomie des Knochenmarks

In den durch die Hartschubstanz geformten Hohlräumen des Knochens befindet sich spezialisiertes Binde- und Stammzellengewebe, das Knochenmark. Es gliedert sich in rotes Knochenmark - *Medulla ossium rubra* und gelbes Knochenmark - *Medulla ossium flava*, auch als Fettmark bezeichnet [69]. Das rote Knochenmark ist der primäre Ort der Blutbildung [95]. In seiner extrazellulären Matrix bilden Fibroblasten netzartige Bindegewebsstrukturen aus, in denen die hämatopoetischen Stammzellen der myeloischen Reihe eingebettet sind [96]. Weiterhin befinden sich im Knochenmark mesenchymale Stammzellen (MSC), die sich zu Bindegewebe, Fibroblasten, Osteoblasten und Adipozyten differenzieren können [97–99]. Die Blutversorgung der Zellen und des Gewebes erfolgt über ein fein verzweigtes, vaskuläres System. Durch dessen sinusoidalen Aufbau können ausgereifte Blutzellen aus dem Knochenmark in den systemischen Blutkreislauf eintreten [100] (siehe Kapitel 2.4.3). Bei Neugeborenen findet sich in allen Knochenkavitäten ausschließlich rotes Knochenmark, das mit zunehmendem Alter partiell durch Fettmark ersetzt wird [101].

Das Fettmark wird durch Adipozyten, lipidhaltige und hämatopoetisch nicht aktive Zellen mesenchymalen Ursprungs ausgebildet [102]. Die eingelagerten Lipide setzen sich nach Fazeli et al. [101] vorwiegend aus einfach ungesättigten Fettsäuren (48-58%) und gesättigten Fettsäuren (29-33%) zusammen. Die Ermittlung der genauen physiologischen Funktion der Adipozyten im Knochenmark ist Forschungsgegenstand vieler Forschungsgruppen, derzeit jedoch noch nicht abschließend erforscht [101, 103, 104]. Es zeigt sich jedoch, dass mit zunehmendem Fettanteil die Knochendichte sinkt und das Frakturrisiko des Knochens erhöht ist [105].

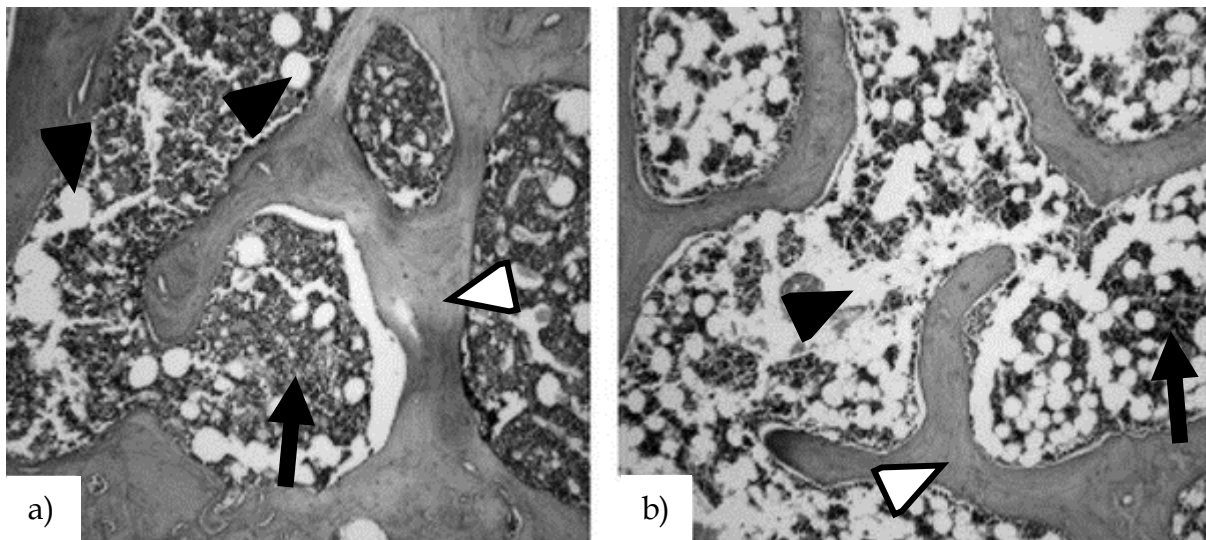


Abbildung 2-4: Histologische Präparate murinen Knochenmarks [106]

a) Ratte - 4 Monate alt

b) Ratte - 24 Monate alt

▷ Trabekel ▶ Adipozyt ➔ Rotes Knochenmark

Die altersabhängige Fetteinlagerung im Knochen ist anhand von histologischen Präparaten murinen Knochenmarks in Abbildung 2-4 a) und b) dargestellt, wobei der schwarze Pfeil hämatopoetisches Gewebe, der weiße Pfeilkopf trabekuläre Knochenstrukturen und der schwarze Pfeilkopf Adipozyten beziehungsweise Fettmark bezeichnet. Bei dem Präparat der jungen Ratte lassen sich vorwiegend rotes Knochenmark und nur vereinzelt eingebettete Adipozyten erkennen. Bei der 24 Monate alten Ratte zeigt sich hingegen eine deutliche Verdrängung des roten Knochenmarks durch die nun mehrheitlich vorliegenden Adipozyten. Im Menschen variiert die Lokalisation und das Verhältnis von rotem Knochenmark und Fettmark zwar alters- und geschlechtsabhängig [103], jedoch lässt sich ein grundlegende Verteilungsmuster erkennen. Die Umwandlung von rotem Knochenmark zu Fettmark erfolgt in den Extremitäten stets von distal nach proximal und innerhalb des Knochens von der Diaphyse ausgehend zu den epiphysären Regionen [104], wie in Abbildung 2-5 schematisch dargestellt. So findet sich in den Röhrenknochen eines Erwachsenen vorwiegend im Kopf des Femurs und Humerus rotes Knochenmark, während die Diaphyse fast ausschließlich mit Fettmark gefüllt ist.

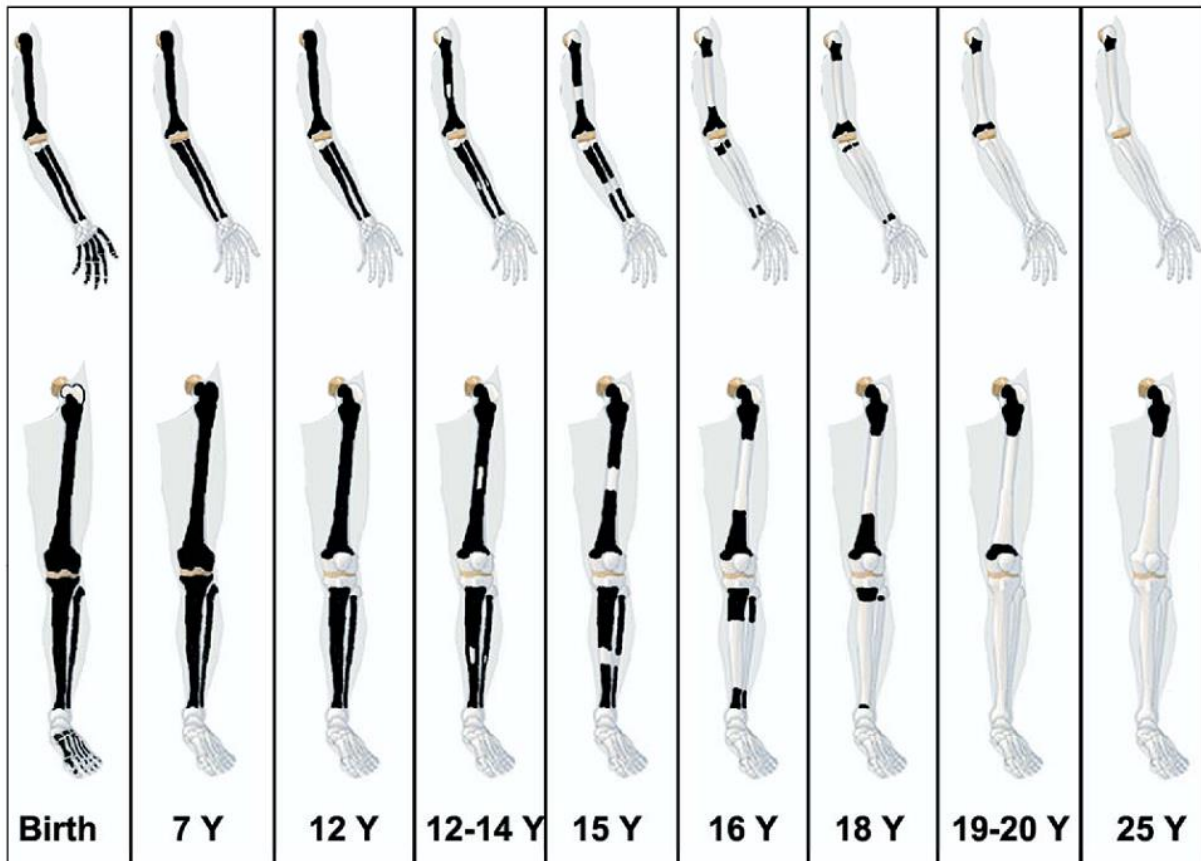


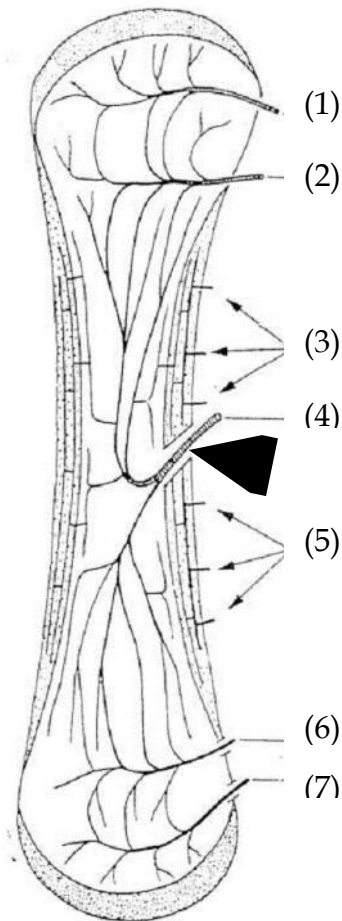
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der altersabhängigen Verteilung roten Knochenmarks [JD Blebea et al: Semin Nucl Med 2007]

Der Großteil des roten Knochenmarks befindet sich beim Erwachsenen in den Kavitäten der Knochen des axialen Skeletts, wobei sich auch hier ein altersabhängiger Anstieg des Fettgehaltes zeigt [102]. Die Untersuchungen von Patsch et al. [107] ergeben einen durchschnittlichen Gesamt fettgehalt von 69% in der Lendenwirbelsäule postmenopausaler Frauen im Alter von 50-75 Jahren. In den platten und kurzen Knochen liegt hingegen bis zu 90% Fettmark vor [104].

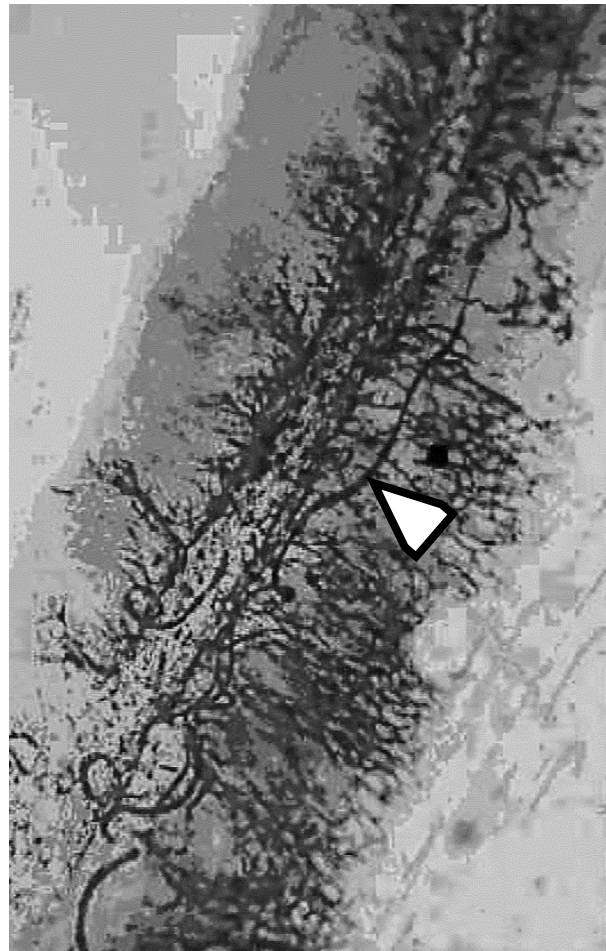
2.4.3 Vaskuläres System des Knochens

Der Knochen ist ein gut durchblutetes Organ, dessen vaskularen System eine zweifache Bedeutung zukommt: Einerseits erfolgt über das vaskuläre System die Versorgung des Knochengewebes und andererseits ermöglicht es durch seinen anatomischen Aufbau den Übertritt gereifter Blutzellen aus dem hämatopoetisch aktiven Knochenmark in den systemischen Blutkreislauf [100]. Das vaskuläre System des Knochens weist eine sehr komplexe Struktur auf, die sich in ihrem anatomischen Aufbau und ihrer Durchblutung ($5-20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ Knochen) [108] knochenstrukturabhängig unterscheidet [109]. Wie in Abbildung 2-6 a) schematisch gezeigt, erfolgt die Blutversorgung eines Knochens über die Arteria nutritia (4), die über ein kleines Loch in der Substantia compacta, das Foramen nutricium (schwarzer Pfeilkopf), in den Knochen eintritt [100]. Innerhalb des Knochens verzweigt sich die Arterie in ein feines Netzwerk von Arteriolen und Kapillaren.

Bei den Röhrenknochen treten weiterhin proximal und distal epiphysäre ((1) & (7)) und metaphysäre ((2) & (6)) Arterien in den Knochen ein, die sich in Kapillaren verzweigen und über Anastomosen miteinander verbinden [76, 110]. Abbildung 2-6 b) zeigt den Längsschnitt einer murinen Femurdiaphyse, mit der in Längsrichtung des Knochens verlaufenden Arteria nutritia (weißer Pfeilkopf). Es lassen sich deutlich die rechtwinklig abzweigenden arteriellen Blutgefäße erkennen, die das umliegende Fettmark versorgen. Ein Teil dieser arteriellen Blutgefäße tritt von endostaler Seite in den kompakten Knochen der Diaphyse ein. Von periostaler Seite treten ebenfalls Blutgefäße ein (Abbildung 2-6 (3), (5) und (6) und Abbildung 2-7 b). Nach Hawk wird der kompakte Knochen in etwa zu zwei Drittel von der endostalen und zu einem Drittel von der periostalen Vaskularisierung versorgt [111]. Abbildung 2-7 a) zeigt beispielhaft einen caninen Diaphysenquerschnitt, bei dem die endostal bevorzugte Vaskularisierung des kompakten Knochens deutlich zu erkennen ist. In den Havers- und Volkmann-Kanälen des kompakten Knochens verlaufen vorwiegend Blutgefäße mit kapillarer Struktur; lediglich in den großlumigen Kanälen verlaufen Arterien und Venen parallel zueinander [76].



a)



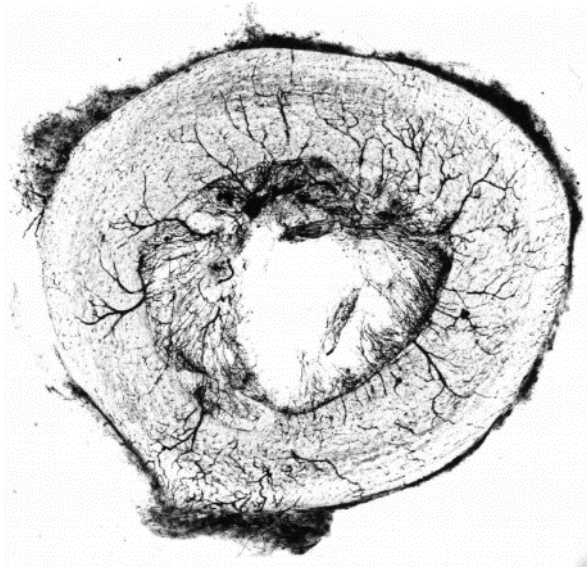
b)

Abbildung 2-6: Anatomie des vaskulären Systems

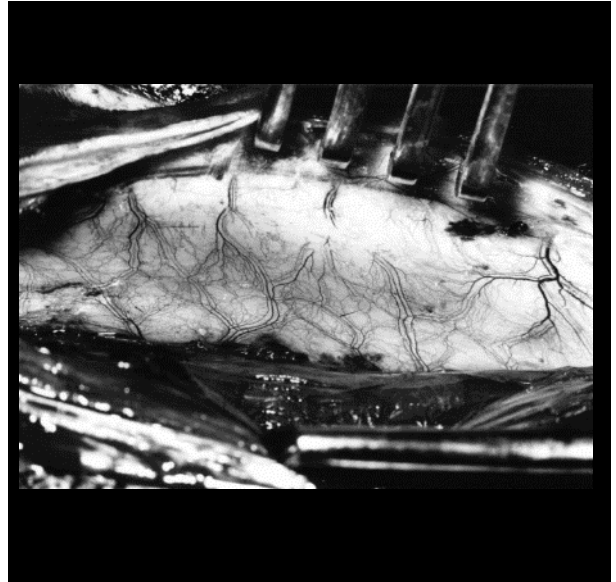
a) Schematische Darstellung eines Röhrenknochens [108]

b) Längsschnitt eines murinen Femurs, Tuschefärbung [112]

Im Bereich des hämatopoetisch aktiven Knochenmarks (Abbildung 2-8 (weißer Pfeilkopf)) finden sich neben den Arteriolen (schwarzer Pfeil) spezialisierte, dünnwandige Kapillaren, die Sinusoide (schwarzer Pfeilkopf), die über eine einlagige, fenestrierte Schicht an Endothelzellen verfügen. Ihr fenestriertes Endothel ermöglicht neben einem effektiven Gas- und Nährstoffaustausch zwischen Blut und Gewebe den Übertritt der gebildeten Blutzellen aus dem Knochenmark (weißer Pfeilkopf) in den systemischen Blutkreislauf.



a)



b)

Abbildung 2-7: Mikroaufnahmen caniner Präparate [111]
 a) Diaphysenquerschnitt eines mit Tusche perfundierten Femurs
 b) Periostale Blutversorgung einer Tibia

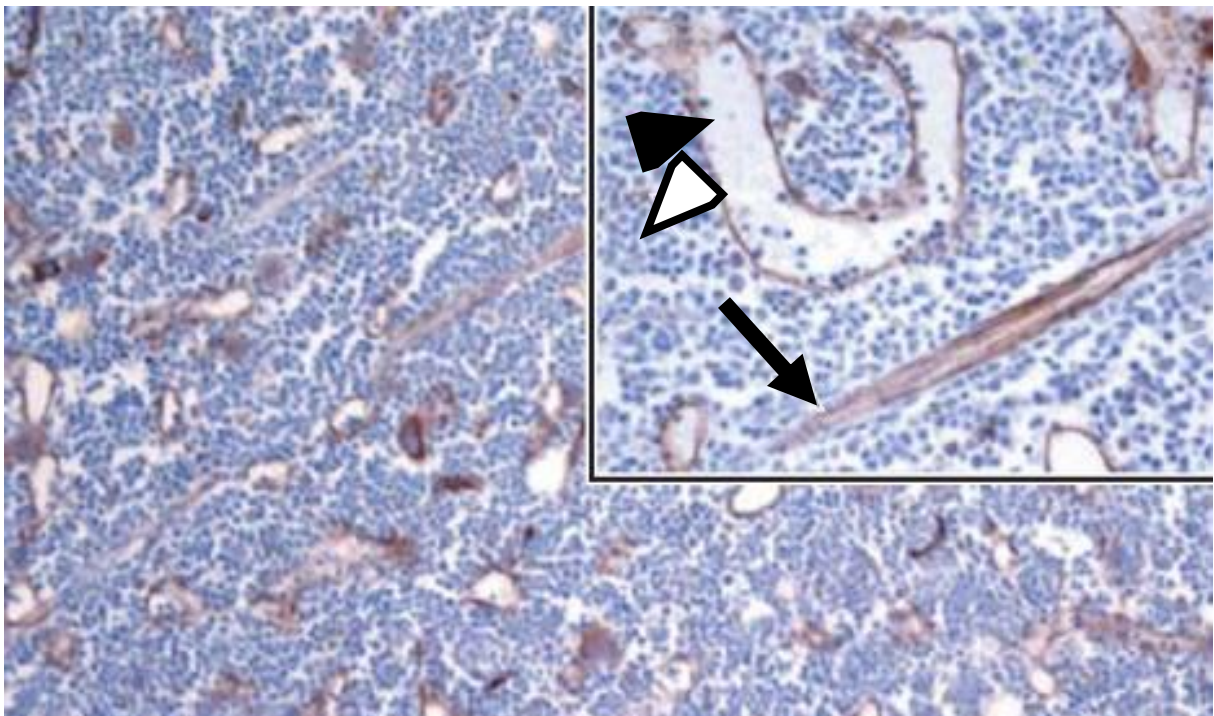


Abbildung 2-8: Histologisches Präparat murinen Knochenmarks [100]
 Diaminobenzidin-Hämatoxylin-Färbung
 200- und 400-fache Vergrößerung
 ▷ Rotes Knochenmark ▶ Sinusoid → Arteriole

2.5 Untersuchungen am biologischen Knochen

2.5.1 Allgemeine Aspekte der Knochenpräparation und Strukturanalyse

Um eingangs einen Einblick in den Habitus des biologischen Knochens zu erhalten, wurden bovine Kadaverknochen und Femora humaner Körperspender präpariert und hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus untersucht. Weiterhin wurde geprüft, ob die bovinen Knochenpräparate in totum oder isolierte Bestandteile von ihnen in das zu entwickelnde Knochenkompartiment eingebunden werden konnten.

Da sowohl kompakter als auch trabekulärer Knochen eine relativ hohe mechanische Festigkeit aufweisen, können Präparate im Allgemeinen destruktionsfrei aus dem Knochen gesägt und als formstabile Körper untersucht werden. Die gewonnenen Präparate sind dabei adäquat zu kühlen oder zu fixieren, um die Verwesung der organischen Bestandteile des Knochens zu verhindern. Um die Hartschubstanz eines Knochens oder eines Knochenpräparates isoliert darstellen und untersuchen zu können, werden die Präparate klassischerweise einer enzymatischen, chemischen oder Fäulnis-mazeration, beziehungsweise biologischen Verfahren unterzogen [113, 114]. Die isolierte Hartschubstanz kann nachfolgend mikroskopisch und mechanisch untersucht werden.

Mit dem Verfahren der Fäulnis-mazeration, lassen sich Mazerationspräparate sehr schonend gewinnen, aufgrund technischer und olfaktorischer Aspekte des langwierigen Fäulnisprozesses wurden sie jedoch am Forschungsstandort nicht näher in Betracht gezogen. Ebenso ungeeignet erschienen biologische Präparationsverfahren, bei denen die Knochen durch Kleinlebewesen (beispielsweise Speckkäfern) von ihren organischen Bestandteilen gereinigt werden [115]. Die Mazeration von bovinen, spongiosen Knochenpräparaten in einer alkalischen Mazerationsflotte (10%ige m/V Kalilauge) konnte keine vollständige Entfernung der organischen Bestandteile des Knochens erreicht werden. Vielmehr wurde auch die Hartschubstanz der Präparate beschädigt, sodass dieses Verfahren im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet werden konnte und daher nicht näher ausgeführt wird. Al-Sokane et al. (2009) [116]

beschreiben die isolierte Darstellung der Hartschubstanz durch thermische Vergasung der organischen Bestandteile des Knochens im Hochtemperaturofen. In Vorversuchen zeigte sich, dass mit dem Verfahren eine vollständige Entfernung der organischen Bestandteile und etwaiger Pathogene erreicht werden konnte. Da es einen unkomplizierten und schnellen Prozessablauf ermöglichte, wurde es im Rahmen dieser Arbeit als Standardverfahren für die Darstellung der Hartschubstanz boviner Knochenpräparate verwendet. Die isolierte Hartschubstanz ließ sich nun mikroskopisch und mechanisch untersuchen.

Als röntgenbasiertes, computergestütztes Bildgebungsverfahren ermöglicht die Computertomographie (CT) die dreidimensionale Abbildung von Körpern [117], hier im Speziellen von Knochenstrukturen. Ein großer Vorteil der CT ist, dass die zu untersuchenden Präparate destruktionsfrei untersucht und aus dem berechneten Abbild des Körpers definierte Strukturparameter berechnet werden können (siehe Kapitel 2.5.3.2). Anhand dieser Strukturparameter lassen sich Knochenstrukturen eindeutig charakterisieren und Präparate gegeneinander vergleichen. Durch die stete technische Weiterentwicklung und Verbesserung kann die Auflösung der Computertomographen kontinuierlich erhöht werden, sodass eine Auflösung im Mikrobeziehungsweise Nanometerbereich möglich ist [118]. So wurden im Rahmen dieser Arbeit humane Femora mittels eines Mikro-Computertomographen untersucht, um für das zu entwickelnde Knochenkompartiment eine beispielhafte Referenzstruktur inklusive zugehöriger Strukturparameter zu erhalten.

2.5.2 Material und Methoden

2.5.2.1 Bovine Kadaverknochen

Die langen Röhrenknochen und mittig segmentierte Wirbelsäulen zweijähriger Bullen wurden aus einem lokal ansässigen Schlachthaus bezogen, unmittelbar nach Erhalt eingefroren und bei -20 °C gelagert.

2.5.2.2 Humane Femora

Zur Erhebung parametrischer Strukturanalysedaten spongiösen Knochens wurden acht humane Femurpaare mittels Computertomographie untersucht. Die Leichname der Körperspender – bzw. die verwendeten Körperteile (in diesem Falle Femora) – wurden unter Genehmigung durch das „Gesetz über das Leichen-, Bestattungs- und Friedhofswesen (Bestattungsgesetz) des Landes Schleswig-Holstein vom 4. Februar 2005, Abschnitt II, § 9 (Leichenöffnung, anatomisch)“ untersucht. In diesem Falle ist es gestattet, die Körper von Körperspendern/innen zu wissenschaftlichen Zwecken und/oder Lehraufgaben zu sezieren. In Tabelle 2-1 sind die Präparate entsprechend des Alters und Geschlechts des jeweiligen Spenders aufgeführt.

Tabelle 2-1: Übersicht der Körperspender nach Alter und Geschlecht

Weibliche Körperspender		Männliche Körperspender	
Präparat	Alter in Jahren	Präparat	Alter in Jahren
1951	60	1921	63
1939	67	1919	74
1936	88	1917	83
1927	95	1938	86

2.5.2.3 Darstellung von Knochenstrukturen durch thermische Vergasung

Mit einer feingezahnten Metallsäge wurden die bovinen Knochen segmentiert und Knochenpräparate benötigter Größe entnommen. Im epiphysären Bereich der Röhrenknochen wurden Knochenzylinder mittels Bohrkrone entnommen. Um allgemein die Prozesszeit der thermischen Vergasung zu verkürzen, wurden die Proben auf eine Schichtdicke von 20 mm reduziert (Abbildung 2-9 a) und b)). Für die thermogravimetrische Untersuchung des Prozesses der thermischen Vergasung wurden trabekuläre Knochenpräparate aus Wirbelsäule und Epiphyse einzeln in tarierte Abdampfschalen überführt, in einem Kammerofen in 20 minütigen Intervallen um 20°C auf 700°C erhitzt und nach 2 h passiv abkühlen lassen. Die Abdampfschalen wurden alle 20 min aus dem Ofen entnommen, ausgewogen und der Massenverlust in Abhängigkeit der Temperatur ermittelt.

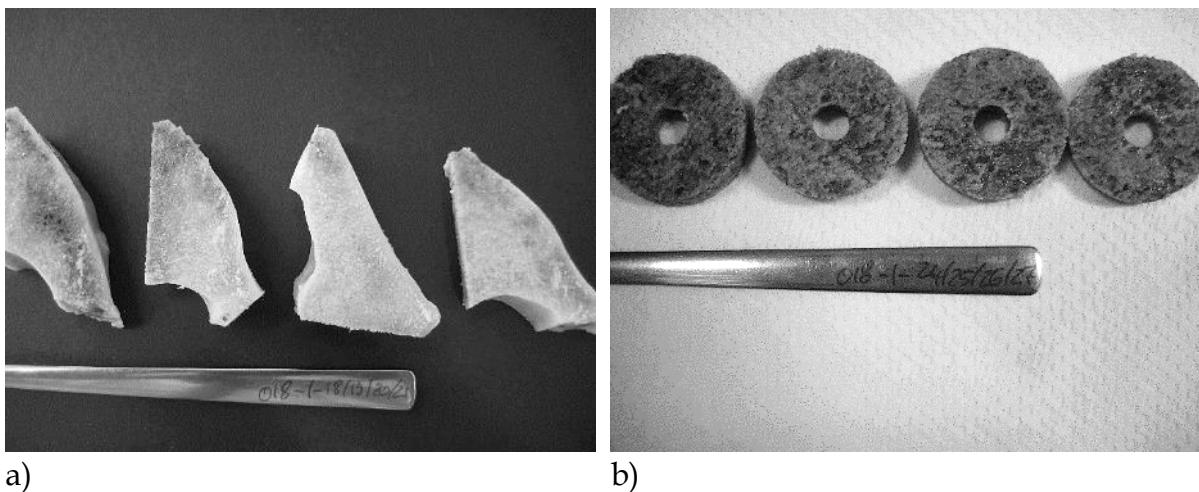


Abbildung 2-9: Präparierte bovine Knochenproben
a) Vertebrales Ursprungs
b) Epiphysäres Ursprungs

2.5.2.4 Mikroskopische Strukturanalyse spongiöser boviner Knochenzylinder

Die Proben für die mikroskopische Strukturanalyse entstammen aus bovinen Femora und Humeri. Mit einer feingezahnten Metallsäge wurden deren epiphysären, spongiösen Bereiche in Richtung der Transversalebene in 10 mm starke Scheiben segmentiert und aus diesen mittels 10 mm Trepanbohrer (Hager & Meisinger, Neuss, Deutschland), siehe Abbildung 2-10 a), zylindrische Proben der Substantia spongiosa

entnommen, siehe Abbildung 2-10 b). Dargestellt wurde die anorganische Knochenstruktur durch thermische Vergasung, wie in Kapitel 2.5.2.3 beschrieben. Mittels Auflichtmikroskop (Keyence VHX-500K, Keyence Deutschland GmbH, Deutschland) wurde die Knochenzylinder hinsichtlich ihrer Struktur untersucht. Die prozessbedingte Schrumpfung der Knochenzylinder während des Ausglühens wurde durch Differenzbildung ihrer diametralen Durchmessers in initialem und ausgeglühtem Zustand ermittelt.

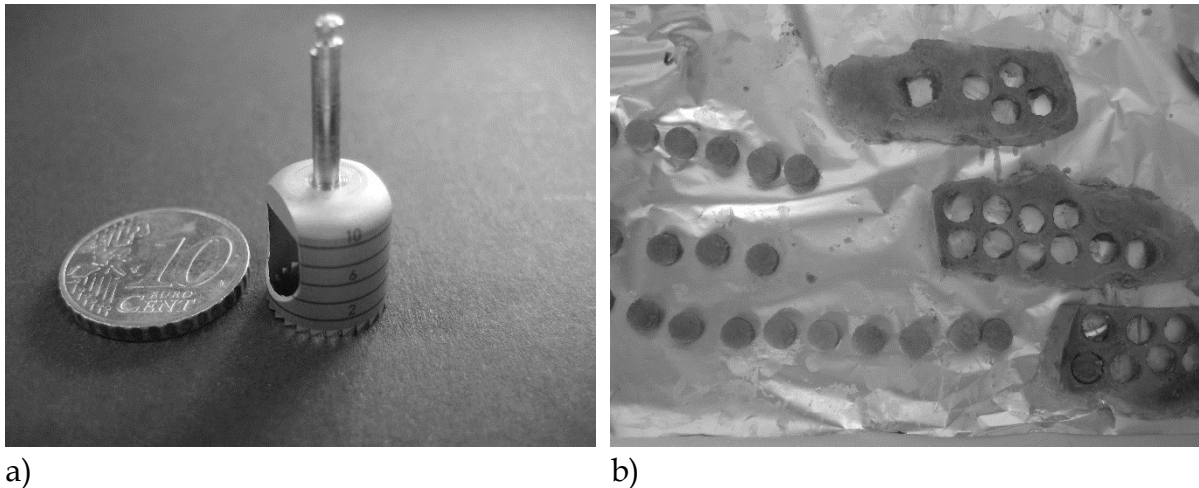
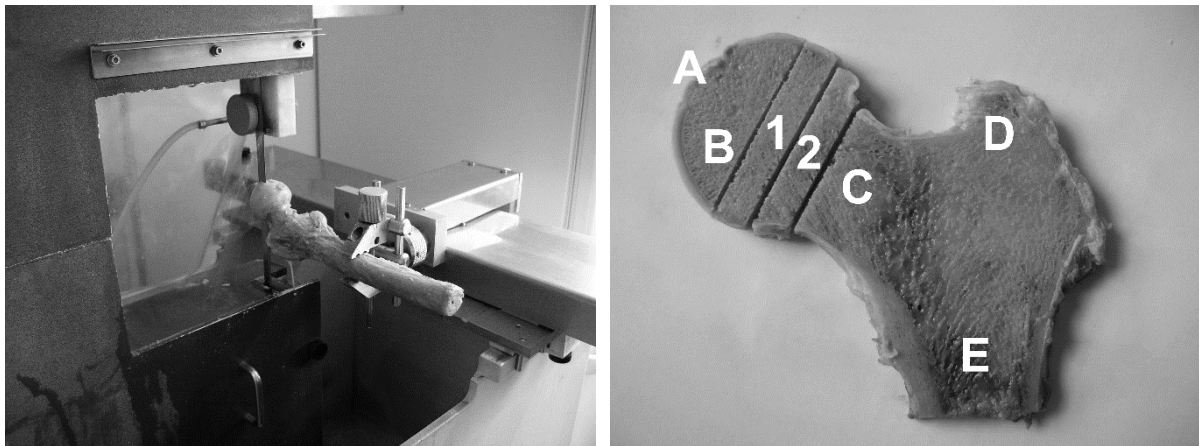


Abbildung 2-10: a) Trepanbohrer; b) Präparierte Spongiosazylinder

2.5.2.5 Computertomographische Strukturanalyse humaner Femora

Auf Grund der technischen Limitierung des verwendeten μ CTs hinsichtlich der maximal erfassbaren Schichtdicke von 10 mm wurden die Femurköpfe in gefrorenem Zustand mit einer Diamantbandsäge (Modell Exakt 300, Exakt, Deutschland) unter Wasserkühlung im Trenn-Dünnschliffverfahren segmentiert. Abbildung 2-11 a) zeigt beispielhaft einen in Koronalebene ausgerichteten Femurkopf, aus dem mittig eine 9,5 mm starke Scheibe präpariert wurde. Aus dieser erfolgte, wie in Abbildung 2-11 b) gezeigt, eine Probenentnahme (1 & 2) zentral aus dem Femurkopf (B) und aus dem Übergang des Kopfes in den Oberschenkelhals (C). Nach orthogonaler Abtrennung der zum Periost hin gelegenen Probenenden, betrug das finale Maß der Probenkörper $9,5 \times 9,5 \times 19,0$ mm. Die Probenvermessung erfolgte im mittigen Bereich der Probenkörper.



a)

b)

Abbildung 2-11: Präparation humaner Femora
 a) Femurkopfpräparation in Koronalebene
 b) Präparierter Femurkopf

Die Vermessung der entnommenen Proben erfolgte mit einem Mikro-Computertomographen (Modell Skyscan 1072, Skyscan, Belgien). Aus den Schnittbildern wurden mittels Software (NRecon-Version 1.4) dreidimensionale Volumenmodelle gerendert, aus denen die morphometrischen Parameter ermittelt wurden. Die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Parameter sind Tabelle 2-2 aufgelistet. Über Mittelwertbildung wurden die korrespondierenden Daten von linkem und rechtem Hals beziehungsweise Kopf für den jeweiligen Spender zusammengefasst.

2.5.3 Ergebnisse

2.5.3.1 Darstellung boviner Knochenstrukturen durch thermische Vergasung

Nach zweistündigem Ausglühen bei 700°C zeigten alle Knochenproben eine vollständig weiße und intakte trabekuläre Struktur. In Abhängigkeit des Entnahmortes aus dem bovinen Knochen zeigten die Präparate eine unterschiedlich ausgeprägte Stabilität, waren jedoch im Allgemeinen als stabil zu beschreiben. Abbildung 2-12 zeigt beispielhaft die trabekulären Strukturen ausgeglühter vertebraler und epiphysärer Knochenpräparate, bei denen hervorragend zwischen den trabekulären, schwammartigen Bereichen und kortikalen, dichten Bereichen (Pfeile)

unterschieden werden kann. Bei einer Heizrate von $100^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ auf 700°C konnte bei allen Proben mikroskopisch und mittels thermogravimetrischer Analyse eine vollständige Entfernung des organischen Materials gezeigt werden. In Vorversuchen erweisen sich eine Heizrate $\geq 100^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ und eine Probendicke $\geq 30 \text{ mm}$ als ungeeignet, da die Zersetzungsprodukte des organischen Materials nicht adäquat aus der Knochenstruktur entweichen konnten und diese teilweise beschädigten.

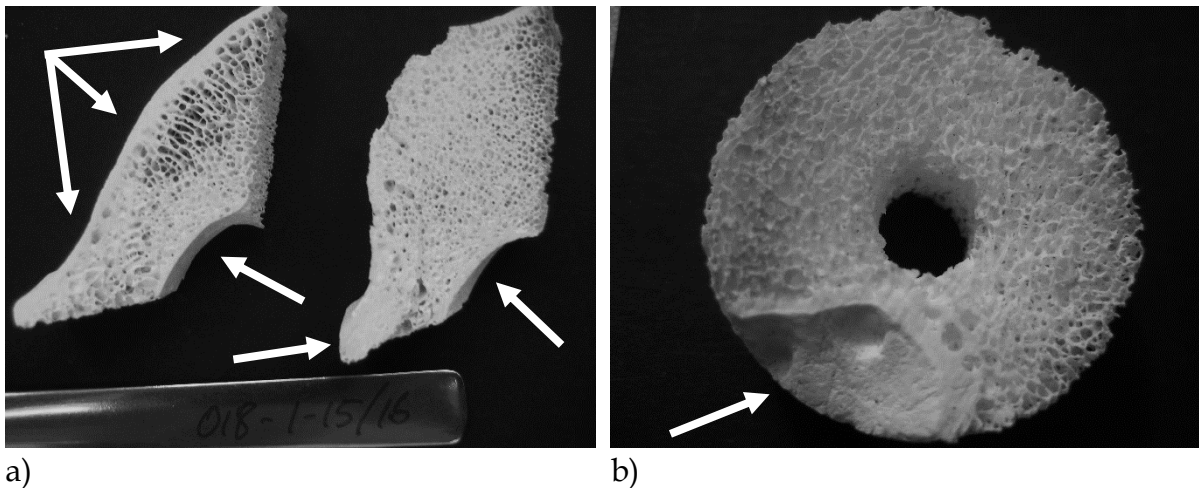


Abbildung 2-12: Thermisch vergaste Knochenpräparate; 800°C über 2 h
a) Beispielhafte Auswahl vertebraler Knochenpräparate
b) Beispielhafte Auswahl epiphysärer Knochenpräparate

Die Massenabnahme eines epiphysären Knochenpräparates in Abhängigkeit der im Kammerofen vorherrschenden Temperatur ist beispielhaft in Abbildung 2-13 dargestellt. Der initiale Massenverlust im Temperaturbereich bis 140°C resultiert aus dem Austritt und der Verdampfung des im Knochen enthaltenen Wassers. Ab einer Temperatur von 200°C erfolgte der Austritt verflüssigter lipophiler und zellulärer Bestandteile aus dem Knochen. Ein deutlicher Massenverlust ab 300°C lässt die beginnende Zersetzung organischer Bestandteile erkennen, bis sich ab 600°C eine Massenkonstanz der untersuchten Proben einstellt. So zeigten die Präparate bei einer Temperatur von 560°C noch eine deutliche Graufärbung und ab 620°C erschienen sie, frei von Zersetzungsprodukten, vollständig weiß. Al-Sokanee et. al. [116] zeigen in ihren thermogravimetrischen Untersuchungen (Abbildung 2-14) boviner Knochen eine vergleichbare thermische Zersetzung des organischen Materials.

Thermogravimetrische Analyse - Boviner Knochen

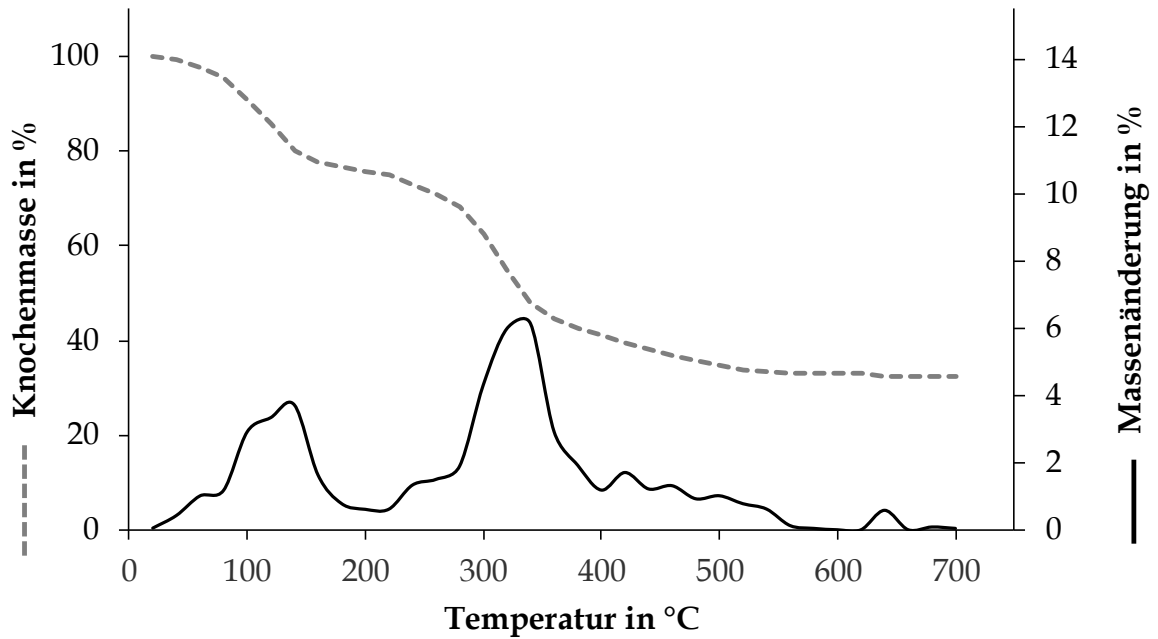


Abbildung 2-13: Thermogramm eines bovinen epiphysären Knochenpräparats

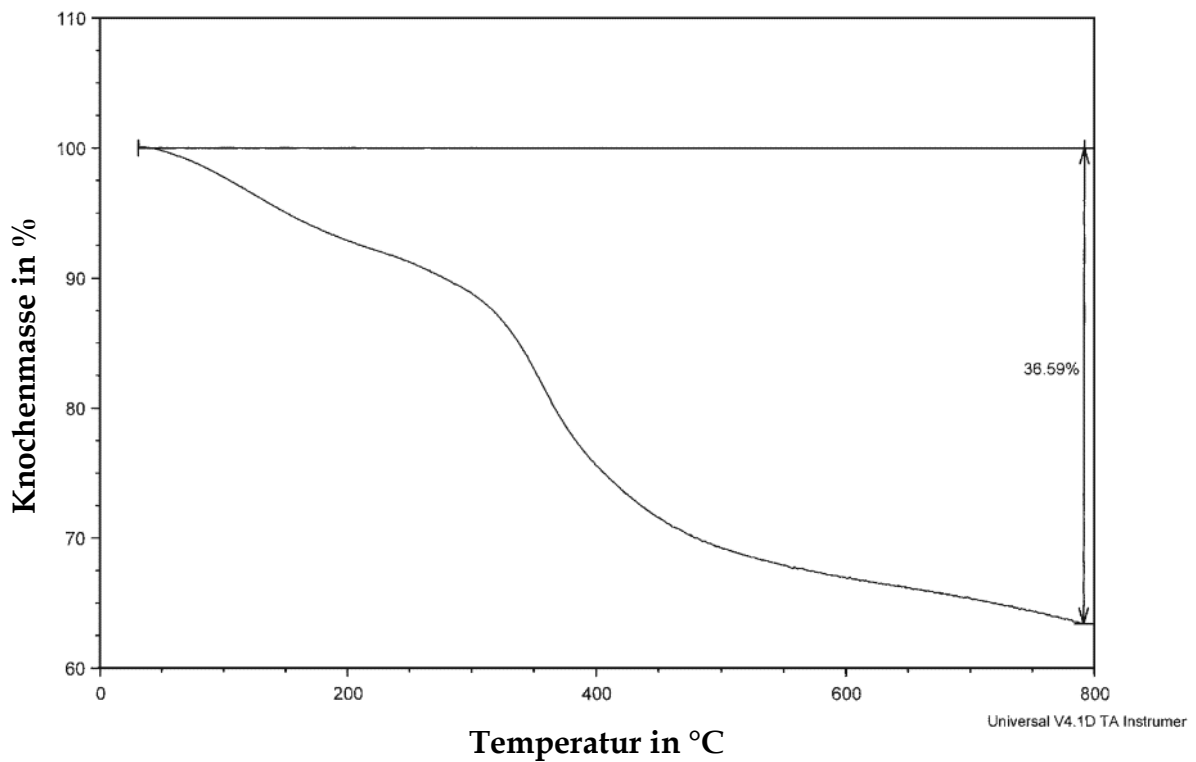


Abbildung 2-14: Thermogramm von Al-Sokanee et al. (2009) [116]

Da die Darstellung filigraner Knochenstrukturen durch Ausglühen der organischen Bestandteile des Knochens als zeiteffektive und weitgehend strukturschonende Methode zur Darstellung biologischer Knochenstrukturen beurteilt werden kann, wurden im Folgenden alle Knochenpräparate standardisiert bei einer Heizrate von $100^{\circ}\text{C min}^{-1}$ und einer maximalen Schichtdicke von 20 mm ausgeglüht. Qualitative Strukturanalyse boviner trabekulärer Knochenzylinder

In Abhängigkeit des Entnahmeortes wiesen die Knochenzylinder nach dem Ausglühprozess deutliche Unterschiede hinsichtlich ihrer Struktur und Stabilität auf. Mittig aus dem epiphysären Bereich entnommene Proben zeigten eine relativ homogene Struktur mit verwachsenen, plattenförmigen Trabekeln und eine geringe Interkonnektion der cavitas medullaris, wie in Abbildung 2-15 a & b) dargestellt. In Abbildung 2-15 c) ist die verknöcherte, gering poröse Epiphysenfuge (weiße Pfeile) zu erkennen, die den Grenzbereich zwischen Epiphyse und Metaphyse kennzeichnet.

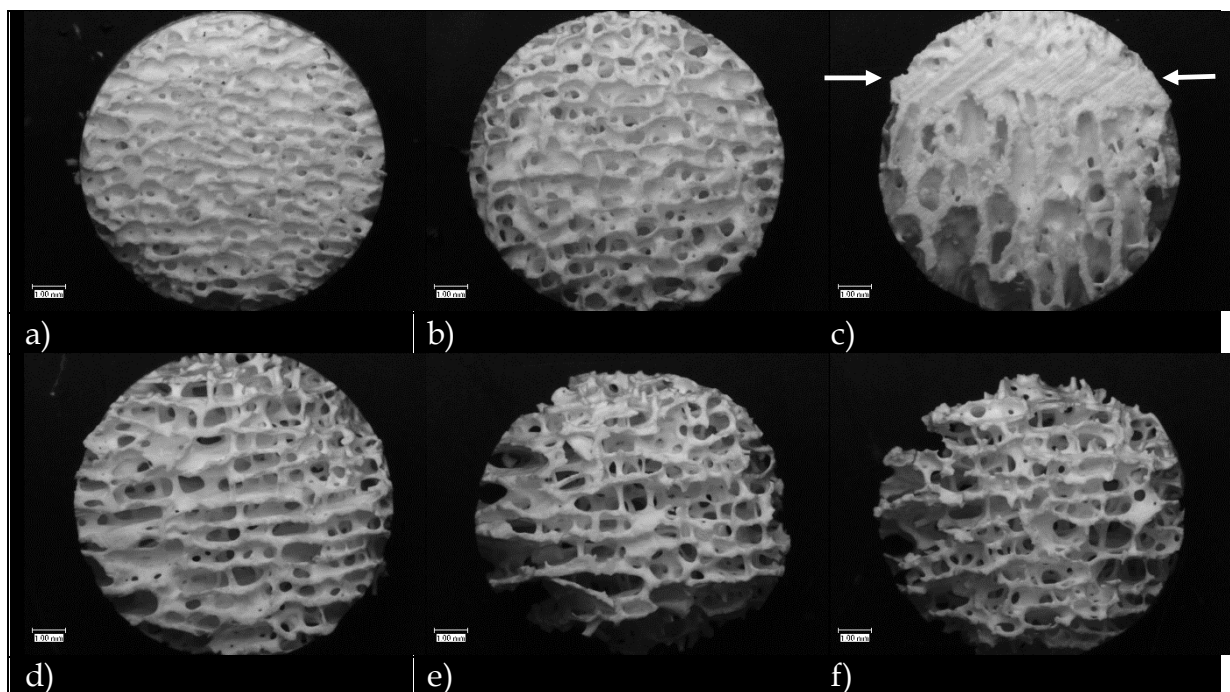


Abbildung 2-15: Ausgeglühte epiphysäre Knochenzylinder

Aus dem metaphysären Bereich entnommene Zylinder wiesen hingegen eine sehr heterogene, makroporöse Struktur auf, die sich weitgehend aus stift- und balkenartigen Trabekeln zusammensetzte, wie beispielhaft in Abbildung 2-15 d-f) gezeigt. Mit zunehmender Porosität nahm die Festigkeit der Proben deutlich ab, sodass die aus dem Übergang der Metaphyse in den diaphysären Bereich des Knochens entnommenen Zylinder bei der Entnahme aus dem Kammerofen kollabierten und im Rahmen dieser Arbeit nicht abgebildet sind. In Bezug auf die temperaturbedingte Schwindung der Proben wurde eine durchschnittliche Verringerung des Probendurchmessers von 9,45 % (n= 10, Variationskoeffizient (VK): 0,0084) gemessen. Dies lässt sich auf den beginnenden Sinterprozess zurückführen, bei dem sich zwischen den nanokristallinen Hydroxylapatitstrukturen Sinterbrücken ausbilden, wodurch sich die HA-Kristalle einander annähern (siehe auch Kapitel 3.6.6.2). Betrachtet man die ausgeglühten Knochenpräparate hinsichtlich ihrer Eignung in das künstliche Knochenkompartiment eingebunden zu werden, ist ihre Verwendung als nur begrenzt sinnvoll zu erachten. Neben der begrenzten Verfügbarkeit boviner Knochen, limitiert sowohl die ausgeprägte Strukturinhomogenität der biologischen Strukturen per se, als auch die begrenzte Stabilität ausgeglühter Präparate ihre Verwendung. Weiterhin stellte die Tortuosität und teilweise geringe Interkonnektion und Fenestrierung der durch die Trabekel gebildeten Kavitäten ein Hindernis für deren vollständige Befüllung mit künstlichem Knochenmark dar.

2.5.3.2 Quantitative Strukturanalyse humaner Femurpräparate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2-2 aufgeführten morphometrischen Parameter zur Charakterisierung der humanen Femurpräparate herangezogen. Die Parameter orientieren sich dabei an der Nomenklatur der *American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR)*, basierend auf dem Nomenklatursystem von Parfitt et al. (1987) [119]. Die optische Beurteilung der Präparate erfolgte anhand der in den gerenderten Volumengrafiken dargestellten soliden, Knochenstrukturen und wird im Folgenden an ausgewählten Beispielen erläutert. Aufgrund der inhomogenen Altersverteilung der männlichen und weiblichen Vergleichsgruppen ist eine direkte Vergleichbarkeit und statistische Auswertung der Daten zwar nur bedingt sinnvoll,

jedoch werden die Daten der Übersichtlichkeit halber in den nachfolgenden Abbildungen gemeinsam dargestellt.

Tabelle 2-2: Parameter der computertomographischen Strukturanalyse

ASBMR-Nomenklatur	Abkürzung	Einheit	
Tissue volume	TV	mm ³	Gesamtvolumen des untersuchten dreidimensionalen Bereichs
Bone volume	BV	mm ³	Gesamtvolumen binarisierter solider Objekte innerhalb des TV
Percent bone volume	BV/TV	%	Verhältnis solider Objekte zum Gesamtvolumen des TV
Bone surface/ volume ratio	BS/BV	mm ⁻¹	Verhältnis von Oberfläche zu Volumen eines soliden Objektes als Parameter der Komplexität und Dicke solider Strukturen
Trabecular bone pattern factor	Tb.Pf	mm ⁻¹	Inverser Index der Konnektivität solider Objekte ¹
Trabecular thickness	Tb.Th	mm	Mittelwertsbezogene Trabekeldicke
Structure model index	SMI	-	Index der Häufigkeit von stab- oder plattenartigen Knochenstrukturen in einem dreidimensionalen Raum ²
Open porosity	Po (op)	%	Verhältnis des Volumens offener Poren zum Gesamtvolumen des TV
Total porosity	Po (tot)	%	Verhältnis aller offenen und geschlossenen Poren zum Gesamtverhältnis des TV

¹ Der Trabecular bone pattern factor nach Hahn et al. [120] diente ursprünglich der Ermittlung der Konnektivität trabekulärer Knochenstrukturen, wobei Konkavität eine Konnektivität von Knochenstrukturen und Konvexität isolierte und unverbundene Knochenstrukturen darstellt. Die Software des μ CT NRecon kalkuliert den Tb.Pf in dreidimensionalen Volumenelementen durch Vergleich von Volumen (V) und Fläche (A) einer binarisierten soliden Struktur vor (1) und nach (2) einer Bilddilatation. Der Tb.Pf ergibt sich folglich aus: $Tb.Pf = (A_1 - A_2) \cdot (V_1 - V_2)^{-1}$. Für weiterführende Informationen sei auf die Arbeit von Hahn et al. (1987) verwiesen.

² Der SMI ergibt sich nach Dilatation eines dreidimensionalen Voxelmodells um ein Voxel über $SMI = 6 \cdot ((A' \cdot V) / A^2)$, mit V als initialen Volumen, A als Oberfläche vor und A' als Oberfläche nach der Dilatation. Ideale Platten, Zylinder und Kugeln haben somit SMI-Werte von 0, 3 und 4, wobei konkave Oberflächen eingeschlossener Kavitäten eine negative Konvexität zum SMI beitragen. Für weiterführende Informationen sei auf die Arbeit von Hildebrand et al. (1997) verwiesen [121]

Das prozentuale Knochenvolumen innerhalb des jeweiligen berechneten Volumenmodells (BS/TV) unterliegt, wie in Abbildung 2-16 a) und Abbildung 2-17 dargestellt, einer deutlichen, altersbedingten Abnahme, wie auch Agnusdei et al. [122] und Maclaughlin et al. [123] zeigen. Präparate aus Femurhals und Femurkopf sind dabei gleichermaßen betroffen, wobei der Anteil an solider, trabekulärer Knochenstruktur im Kopf per se höher ist. Einen Sonderfall stellen die Präparate von 1927 (♀, 95 a) dar, deren äußerst dichte Trabekelstruktur innerhalb des nur wachteileigroßen Femurkopfes bereits makroskopisch bei der Präparation sichtbar war. Aufgrund der inhomogenen Altersverteilung und der geringen Stichprobenzahl ist ein direkter statistischer Vergleich zwischen der weiblichen und männlichen Gruppe nur wenig sinnvoll, sodass im Folgenden beispielhaft auf die Präparate 1917, 1919 und 1921 Bezug genommen wird.

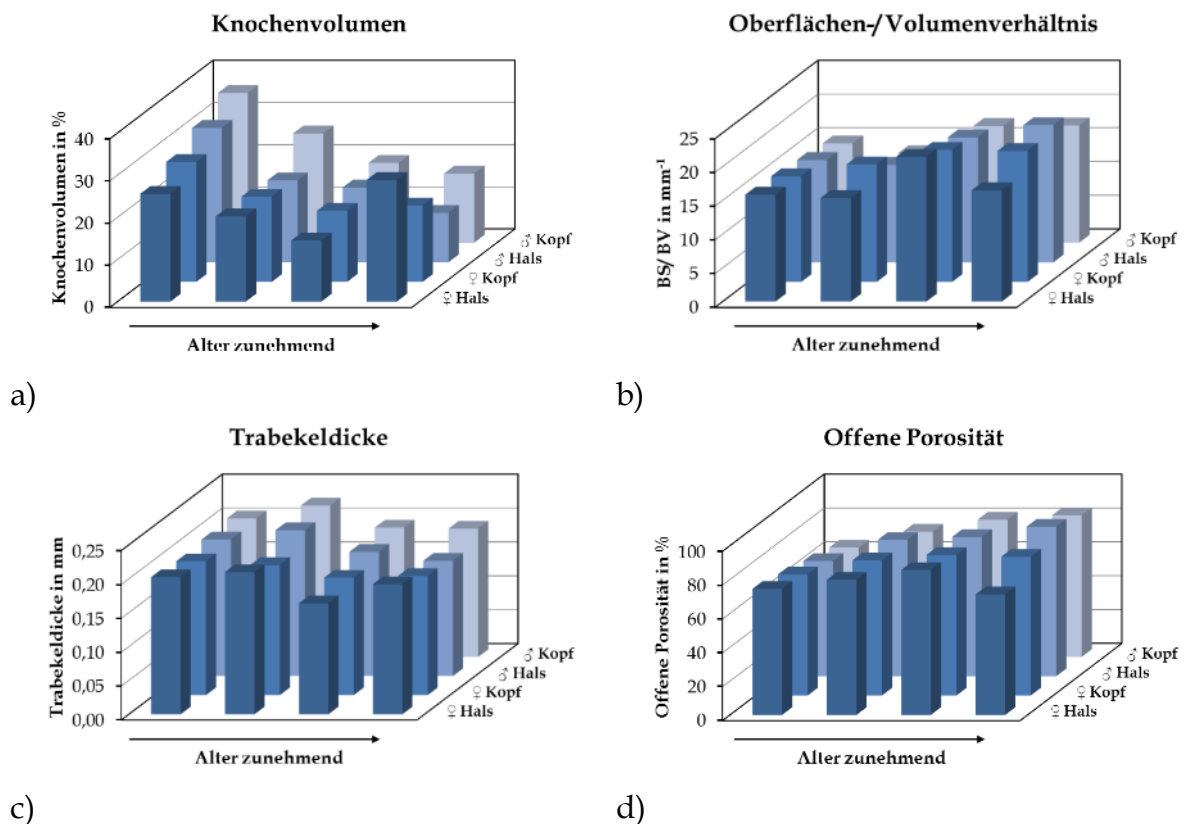


Abbildung 2-16:

μCT-Daten humaner Femurpräparate

- a) Prozentuales Volumen solider Knochenstrukturen
- b) Oberflächen-/ Volumenverhältnis solider Objekte
- c) Trabekeldicke
- d) Offene Porosität des Gesamtvolumens

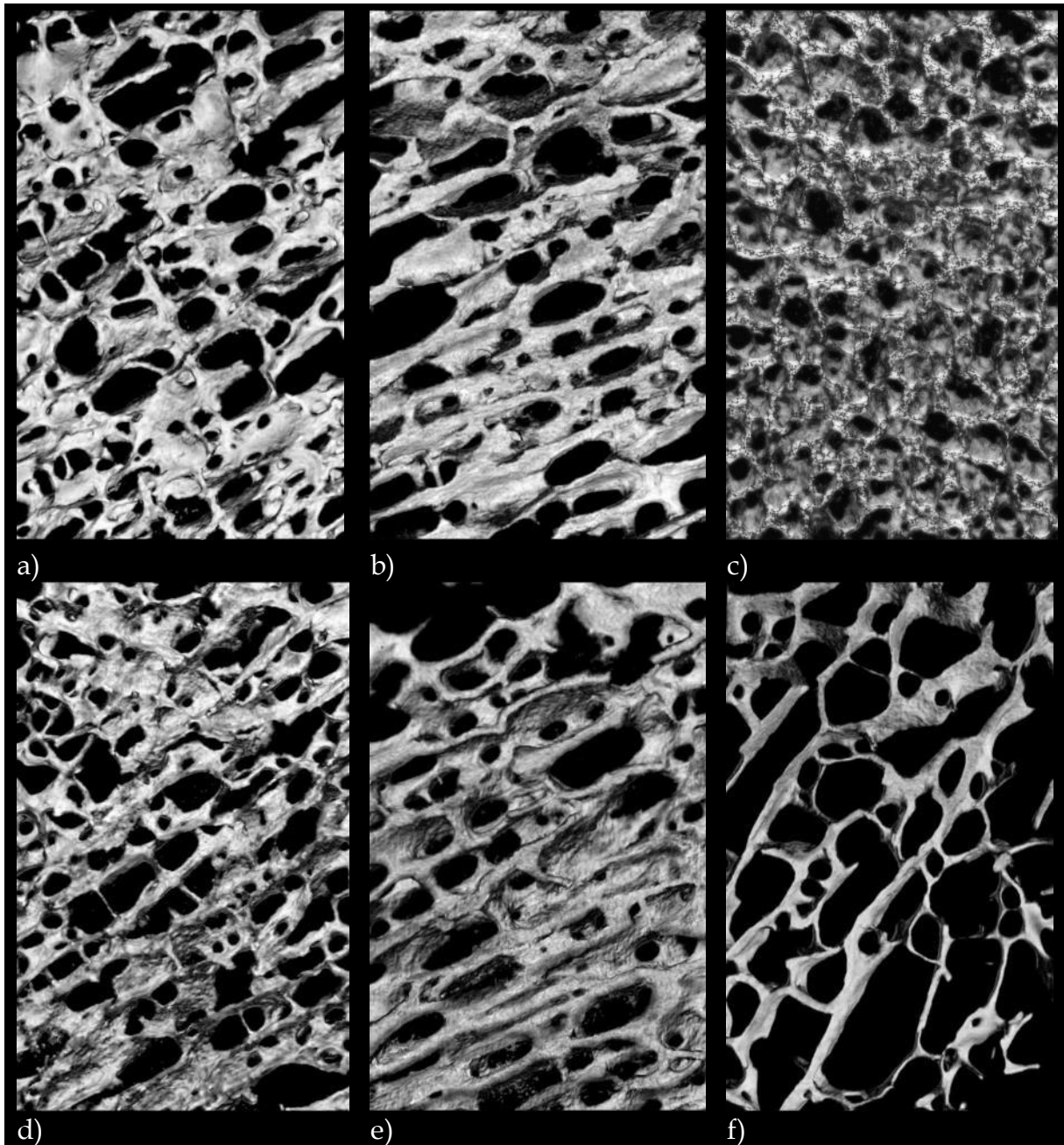


Abbildung 2-17: μ CT-Bilder humaner Femurpräparate - Femurkopf

Tabelle 2-3: Strukturparameter humaner Femurköpfe

Präparat	BV/TV	BS/BV	Tb.Pf	Tb.Th	SMI	Po(op)
	%	$1 \cdot \text{mm}^{-1}$	$1 \cdot \text{mm}^{-1}$	mm	-	%
a) 1917_KOPF_2 ♂, 83	17,8	17,6	2,37	0,19	0,86	82,1
b) 1919_KOPF_2 ♂, 74	30,5	13,0	-1,88	0,22	-0,27	69,4
c) 1921_KOPF ♂, 63	37,7	14,8	-2,48	0,20	-0,25	62,3
d) 1917_HALS ♂, 83	16,8	19,0	2,77	0,18	0,92	83,1
e) 1919_HALS ♂, 74	26,3	12,4	-1,79	0,23	-0,33	73,5
f) 1919_HALS_2 ♂, 74	12,5	16,6	2,95	0,20	1,06	87,5

Aus der Abnahme des Knochenvolumens lässt sich auch die strukturelle Veränderung der verbleibenden Knochenstrukturen ableiten. Wie in Abbildung 2-16 dargestellt, nimmt das Oberflächen/Volumen-Verhältnis (BS/BV) und die offene Porosität (Po.(op)) mit abnehmendem Knochenvolumen zu, während die Trabekeldicke (Tb.Th) abnimmt. Die Präparate wiesen somit weniger eine zusammenhängende und kompakte plattenförmige, als vielmehr eine filigranere stäbchen- und balkenförmige Struktur auf. Vergleicht man die μ CT-Bilder in Abbildung 2-17 lässt sich deutlich erkennen, dass die Knochenstruktur der Präparate b, c & e) durch propere plattenförmige, zusammenhängende Trabekel ausgebildet wird, während bei den Präparaten a, d & f) die Dicke und Interkonnektion der Trabekel deutlich reduziert ist, woraus eine erhöhte Fenestrierung zwischen den Trabekeln resultiert. In Abbildung 2-18 lässt sich anhand des Trabecular bone pattern factors und des Structure model index ebenfalls deutlich erkennen, dass die Trabekel der Präparate in Abhängigkeit des Alters einer strukturellen Umwandlung unterliegen. Während die Präparate der jüngeren, männlichen Spender einen niedrigen Tb.Pf und SMI zeigen, der auf stark konnektierte und plattenförmige Strukturen hinweist, haben speziell die Präparate der älteren, weiblicheren Spender einen höheren Tb.Pf und SMI, der auf einen stäbchen- und balkenförmigen Aufbau hinweist. Vergleicht man die Präparate e) und f) gegeneinander lässt sich eine deutliche intraspezifische Variabilität im Femurhals des Spenders 1919 aufgrund eines sehr stark reduzierten Knochenvolumens in Präparat f) erkennen.

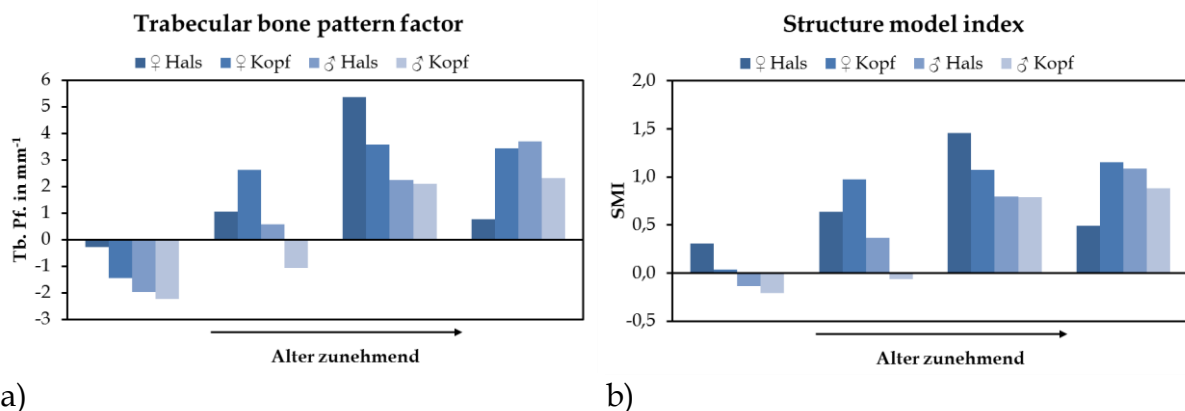


Abbildung 2-18: μ CT-Daten humaner Femurpräparate
a) Trabecular bone pattern factor
b) Structure model index

2.6 Modellbildung

2.6.1 Allgemeiner Modellbegriff

Betrachtet man die physiologischen und strukturellen Eigenschaften des biologischen Knochens (Kapitel 2.4 und Kapitel 2.5), wird ersichtlich, dass sie in ihrer Gesamtheit nicht in einem in-vitro Knochenmodell abzubilden sind. Folglich gilt es den komplexen Aufbau des Knochens zu abstrahieren und aus den im Rahmen dieser Arbeit relevanten Faktoren ein gültiges Modell abzuleiten. An dieser Stelle erscheint es daher sinnvoll, kurz auf den Begriff des Modells einzugehen, den Herbert Stachowiak in seinem Werk der allgemeinen Modelltheorie [124] durch drei Hauptmerkmale charakterisiert:

- I. **Abbildungsmerkmal:** „Modelle sind stets Modelle von etwas, nämlich Abbildungen, Repräsentationen natürlicher oder künstlicher Originale, die selbst wieder Modelle sein können.“
- II. **Verkürzungsmerkmal:** „Modelle erfassen im Allgemeinen nicht alle Attribute des durch sie repräsentierten Originals, sondern nur solche, die den jeweiligen Modellschaffern und/oder Modellnutzern relevant scheinen.“
- III. **Pragmatisches Merkmal:** „Modelle sind ihren Originalen nicht per se eindeutig zugeordnet. Sie erfüllen ihre Ersetzungsfunktion
 - a. für bestimmte - erkennende und/oder handelnde, modellbenutzende Subjekte,
 - b. innerhalb bestimmter Zeitintervalle und
 - c. unter Einschränkung auf bestimmte gedankliche oder tatsächliche Operationen.“

Aus Stachowiaks Modelltheorie lässt sich ableiten, dass ein Modell der simplifizierten Abbildung komplexer Zusammenhänge oder Objekte dient und dabei an den Ansprüchen und Anforderungen des jeweiligen Modellierers ausgerichtet wird. So hat das zu entwickelnde Knochenmodell den Zweck, die relevanten physiologischen und physikalischen Eigenschaften biologischen Knochens technisch abzubilden.

2.6.2 Kompartimentmodelle

Im Bereich der Pharmakokinetik werden vor allem physikalische Modelle verwendet, um die komplexen transportkinetischen Vorgänge der Aufnahme, Verteilung und Elimination von Wirkstoffen im Körper beschreiben und berechnen zu können. Da die Wirkstoffkonzentration am gewünschten Wirkort oft nicht direkt bestimmt werden kann, wird sie zumeist im Plasma quantifiziert und auf Grundlage des zeitabhängigen Konzentrationsprofils ein pharmakokinetisches Modell abgeleitet. Der Körper wird hierfür in Kompartimente eingeteilt, wobei diese weniger eindeutig abzugrenzende physiologische Volumen abbilden, als vielmehr fiktive, homogene Verteilungsräume für den Wirkstoff darstellen [125].

2.6.2.1 Einkompartimentmodell bei intravasaler Wirkstoffapplikation

Das Einkompartimentmodell (EKM) ist mit nur einem zentralen Kompartiment die einfachste Modellform. Es beschreibt die Verteilung und Elimination eines intravenös verabreichten Wirkstoffbolus in Blut und Gewebe, wie in Abbildung 2-19 dargestellt. Damit die Wirkstoffkonzentration $c(t)$ im Zentralkompartiment als homogen betrachtet werden kann, wird eine sehr schnelle Wirkstoffverteilung und Gleichgewichtseinstellung zwischen Blut und Gewebe angenommen. Die Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{Elimination}}$ stellt die Eliminationsrate dar, mit der der Wirkstoff aus dem Kompartiment ausgeschieden wird. Da eine stetige Wirkstoffabgabe erfolgt, wird es als offenes Kompartiment bezeichnet [14].

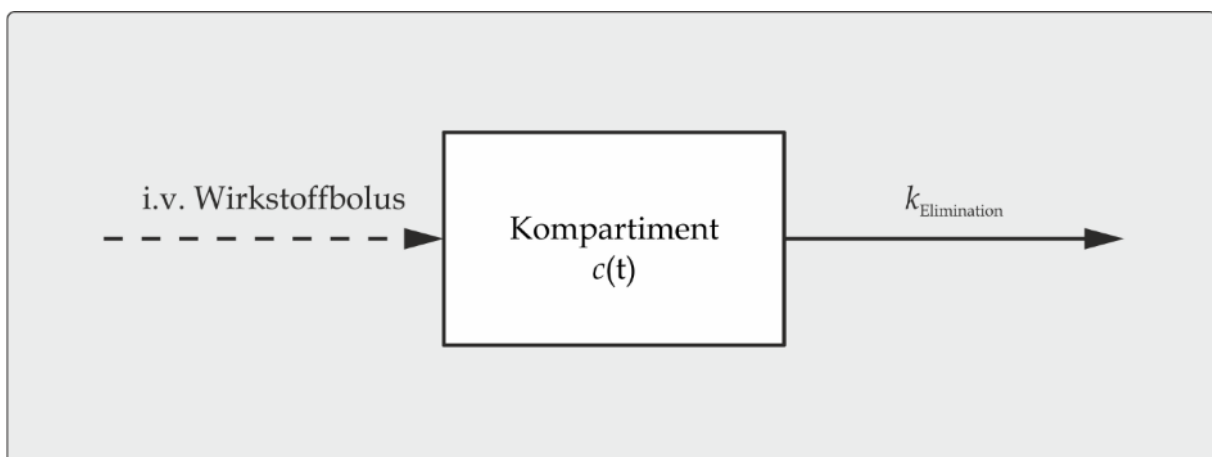


Abbildung 2-19: Schematische Darstellung eines Einkompartimentmodells, nach [14]

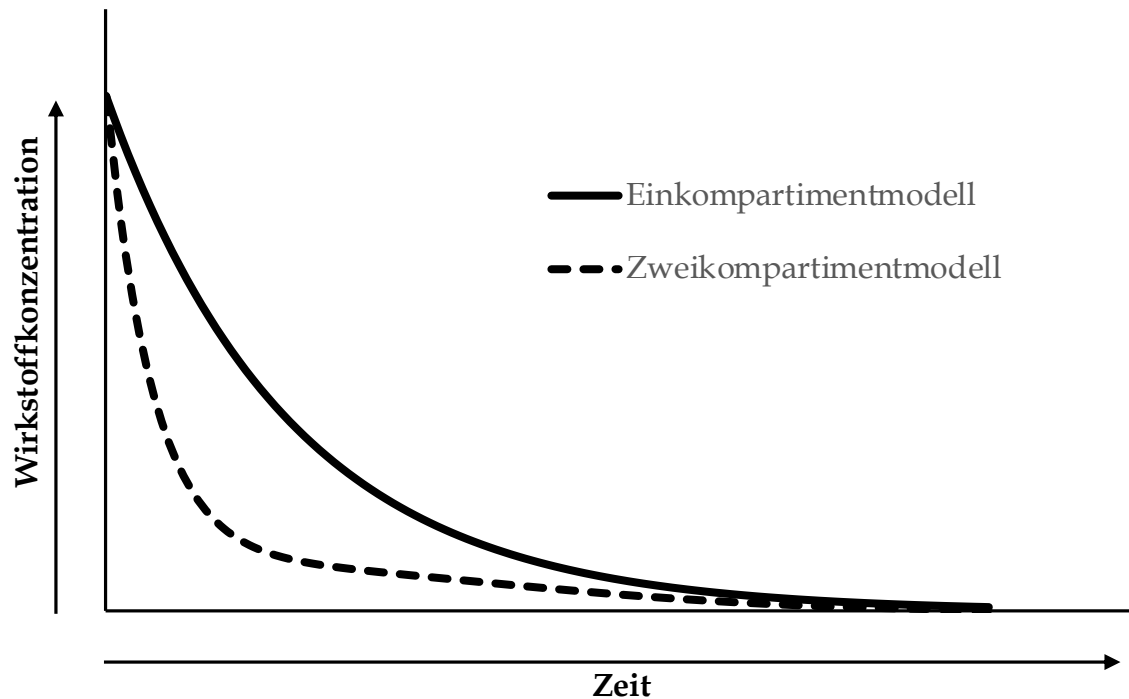


Abbildung 2-20: Plasmaspiegelverlauf im Ein- und Zweikompartimentmodell nach intravenöser Wirkstoffapplikation

In Abbildung 2-20 ist der Plasmaspiegelverlauf gezeigt, der sich durch ein solches Einkompartimentmodell beschreiben lässt. Zum Zeitpunkt der initialen, intravenösen Wirkstoffapplikation ist die höchste Wirkstoffkonzentration im Plasma zu erkennen. Die zeitabhängige Abnahme der Wirkstoffkonzentration lässt sich beim Einkompartimentmodell durch die Exponentialfunktion (1) und über die geschwindigkeitsbestimmende Eliminierungsrate hinreichend genau beschreiben und berechnen:

$$c_t = c_0 \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad (1)$$

- c_0 : Anfangskonzentration
- k_e : Geschwindigkeitskonstante der Wirkstoffeliminierung
- t : Zeit nach Applikation
- c_t : Wirkstoffkonzentration im Kompartiment zum Zeitpunkt t

2.6.2.2 Zweikompartimentmodell bei intravasaler Applikation

Da ein Einkompartimentmodell nicht in allen Fällen die Physiologie und die komplexen Verteilungsvorgänge des Körpers adäquat abbilden vermag, kann das Zentralkompartiment durch zusätzliche fiktive Verteilungsräume zu Zwei- oder Multikompartimentmodellen erweitert werden. Abbildung 2-21 zeigt beispielhaft die Skizze eines Zweikompartimentmodells, bei dem Kompartiment 1 das zentrale und Kompartiment 2 das periphere Kompartiment darstellen. Während das Blut und gut durchblutete Organe, wie Herz, Lunge, Niere und Leber durch das zentrale Kompartiment dargestellt werden, repräsentiert das periphere Kompartiment die schwächer durchbluteten Organe, wie Fettgewebe, Muskeln und Haut [126]. Die Geschwindigkeitskonstante k_1 ist größer als k_2 , sodass eine rasche Umverteilung des Wirkstoffs aus Kompartiment 1 in das periphere Kompartiment erfolgt, die Rückdiffusion jedoch nur langsam und somit über einen längeren Zeitraum stattfindet. Da aus dem Kompartiment 1 stetig Wirkstoff eliminiert wird, handelt es sich um ein offenes Zweikompartimentmodell (ZKM).

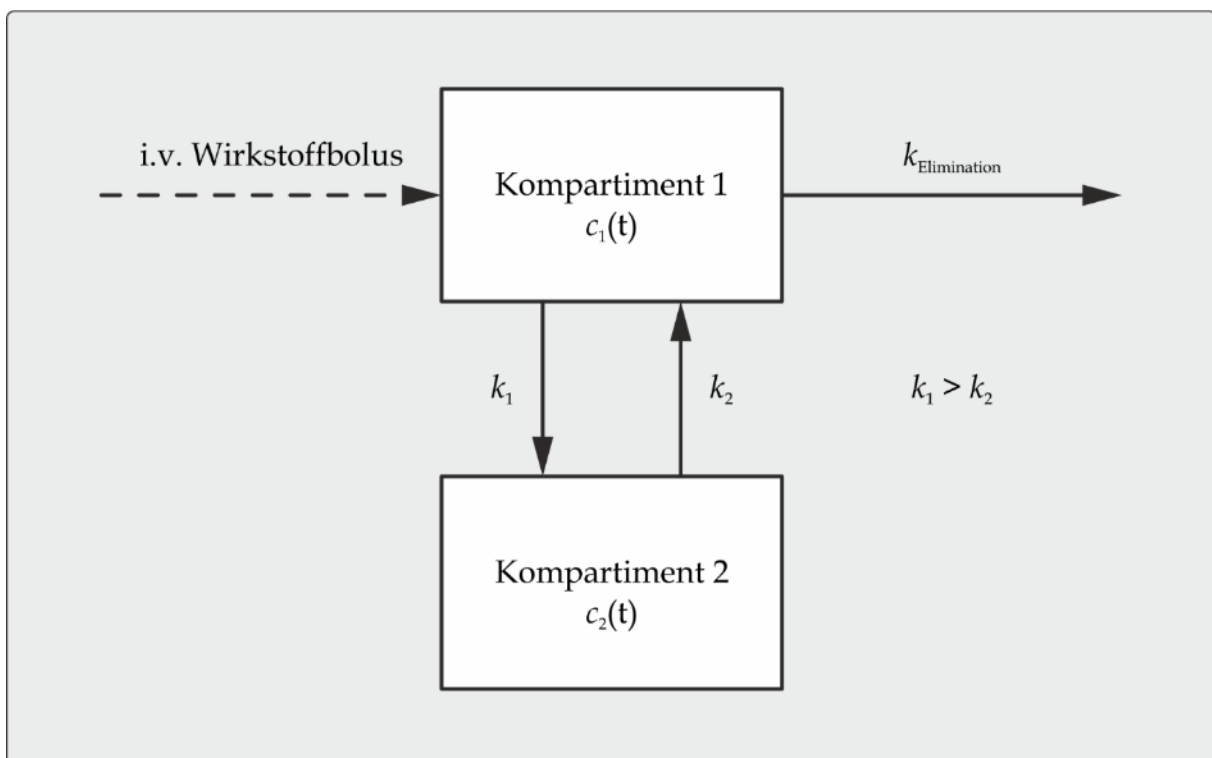


Abbildung 2-21: Schematische Darstellung eines Zweikompartimentmodells, nach [14]

In Abbildung 2-20 ist der Plasmaspiegelverlauf gezeigt, der sich durch ein solches Zweikompartmentmodell beschreiben lässt. Zum Zeitpunkt der initialen, intravenösen Wirkstoffapplikation ist die höchste Wirkstoffkonzentration im Plasma zu erkennen. Der Konzentrationsverlauf, aus dem sich das Zweikompartmentmodell ableitet, zeigt im Gegensatz zum Einkompartmentmodell einen biphasischen Verlauf, dessen erste Phase durch eine rasche Abnahme der Wirkstoffkonzentration gekennzeichnet ist, während die Konzentration in der zweiten Phase nur langsam abnimmt. Die Abnahme in der ersten Phase ist durch eine rasche Umverteilung des Wirkstoffes aus dem zentralen in das periphere Kompartiment erklärbar, während der Wirkstoff in der zweiten Phase langsam aus dem peripheren in das zentrale Kompartiment zurück diffundiert und aus diesem mit der Geschwindigkeitskonstante k_e eliminiert wird. Die entsprechende Exponentialgleichung (2) ist daher um den Term des zweiten Kompartimentes erweitert:

$$c_1(t) = c_1 \cdot e^{k_1 \cdot t} + c_2 \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (2)$$

c_0 : Anfangskonzentration

$k_{1,z}$: Geschwindigkeitskonstanten der Wirkstoffverteilung

t : Zeit nach Applikation

$c_{1,z}$: Wirkstoffkonzentration im jeweiligen Kompartiment zum Zeitpunkt t

$c_1(t)$: Wirkstoffkonzentration im Kompartiment zum Zeitpunkt t

2.6.2.3 Einkompartmentmodell bei extravasaler Applikation

Wird ein Wirkstoff hingegen extravasal verabreicht erfolgt zunächst die Resorption des Wirkstoffes am Applikationsort und in Abhängigkeit des Applikationsortes und der Wirkstoffformulierung ein Anstieg der Plasmakonzentration. Aus Resorption und Elimination des Wirkstoffes ergibt sich ein Plasmaspiegelverlauf, der mit der Bateman-Funktion (3) beschrieben werden kann. Dabei ist für dieses Modell vorauszusetzen, dass sich der Wirkstoff im Kompartiment schnell und nicht in Nebenkompartmente verteilt, dass die Resorption und Elimination als Reaktionen

1. Ordnung ablaufen und dass die Geschwindigkeitskonstanten der Resorption (k_a) und Elimination (k_e) über den Untersuchungszeitraum konstant bleiben [125]. Für den Fall, dass die Geschwindigkeitskonstante $k_a > k_e$ ist, ergibt sich ein Plasmaspiegelverlauf, wie er in Abbildung 2-22 dargestellt ist. Initial erfolgt am Applikationsort die rasche Resorption des Wirkstoffes, bis am Zeitpunkt t_{max} die höchste Wirkstoffkonzentration c_{max} im Plasma erreicht ist. Sobald der Großteil des Wirkstoffes resorbiert wurde, überwiegt die Elimination des Wirkstoffes.

$$c_t = \left(\frac{k_a}{k_a - k_e} \right) \cdot c_0 \cdot (e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad (3)$$

- c_0 : Anfangskonzentration
- t : Zeit nach Applikation
- c_t : Wirkstoffkonzentration im Kompartiment zum Zeitpunkt t
- k_e : Geschwindigkeitskonstante der Wirkstoffeliminierung
- k_a : Geschwindigkeitskonstante der Wirkstoffresorption

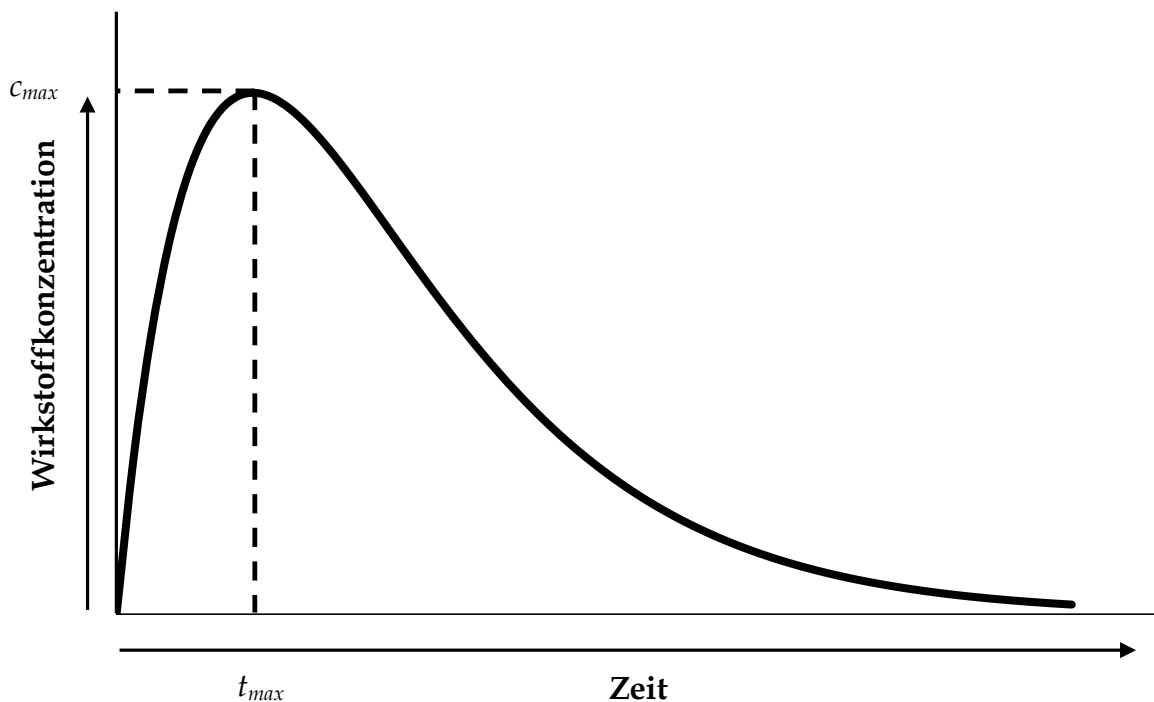


Abbildung 2-22: Plasmaspiegelverlauf im Einkompartimentmodell bei extravasaler Applikation

2.6.2.4 Multikompartimentmodell des biologischen Knochens

Während die oben aufgeführten Kompartimentmodelle auf Grundlage von Plasmaspiegelverläufen erstellt werden können, sind bei einer lokalen Wirkstoffapplikation im Knochen die Quantifizierung der Wirkstoffkonzentration im Knochengewebe und eine daraus folgende Ableitung eines Kompartimentmodells nur begrenzt möglich. Speziell in operiertem, traumatisiertem und nekrotischem Gewebe kann die Durchblutung des Knochens und somit der Wirkstoffübertritt ins Plasma stark reduziert sein [127–129], sodass die im Plasma oder Urin quantifizierbare Wirkstoffkonzentration nicht mit der lokalen Konzentration korreliert [130]. Ist im behandelten Knochengewebe eine Drainage eingebracht, um Exsudat postoperativ abzuleiten, kann in diesem die Wirkstoffkonzentration bestimmt werden [131]. Jedoch ist auch hier die Korrelation zur tatsächlichen Wirkstoffkonzentration im Knochengewebe limitiert, da keine direkte Aussage über die Wirkstoffverteilung im Gewebe getroffen werden kann. Des Weiteren wird nicht bei jeder Implantateinbringung eine Drainage gelegt. Folglich gilt es ein Kompartimentmodell aus den anatomischen und physiologischen Eigenschaften des Knochens (Kapitel 2.4) abzuleiten, die im Rahmen dieser Arbeit zu fünf Kompartimenten abstrahiert werden, wie in Abbildung 2-23 dargestellt.

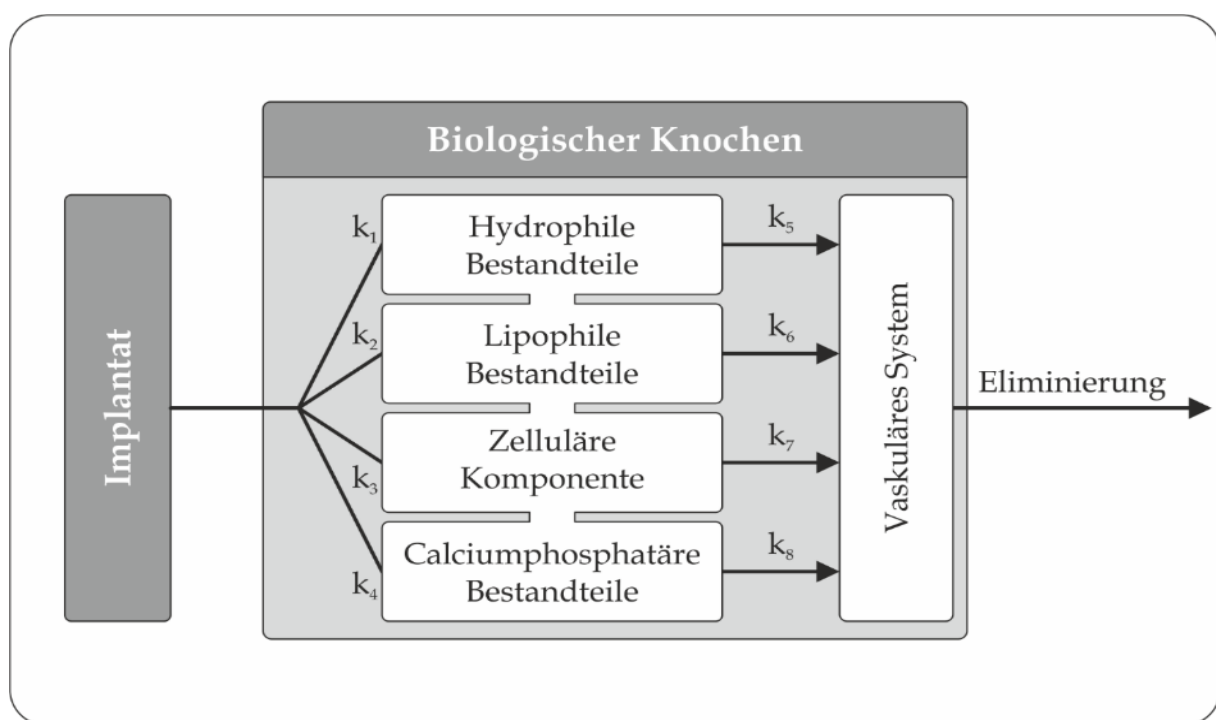


Abbildung 2-23: Kompartimentmodell des biologischen Knochens

Wie in obiger Darstellung skizziert, werden die Kompartimente als zusammenhängend und miteinander in Kontakt stehend definiert. Das Implantat steht, in Abhängigkeit seines Applikationsortes, mit den jeweiligen Kompartimenten in unmittelbarem oder mittelbarem Kontakt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_1 - k_8 beschreiben die Kinetik der Wirkstoffliberation und -distribution vom Implantat ausgehend in die jeweiligen Kompartimente und aus diesen in das vaskuläre System, über das der Wirkstoff aus dem Knochen eliminiert wird. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Umverteilung des Wirkstoffes zwischen den Kompartimenten sind aufgrund graphischer Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

- I. Als hydrophile Bestandteile werden die interstitielle Flüssigkeit, etwaiges Exsudat und Bindegewebsstrukturen zusammengefasst. Sie werden als bevorzugter Verteilungsraum für wasserlösliche Wirkstoffe, wie beispielsweise das Aminoglykosidantibiotikum Gentamicin [132] betrachtet.
- II. Adipozyten sind als lipophile Bestandteile aufgeführt und stellen den bevorzugten Verteilungsraum für lipophile Wirkstoffe [133] dar.
- III. Die Hartsubstanz des Knochens wird durch die calciumphosphatären Bestandteile dargestellt und im Knochenmodell durch Hydroxylapatit abgebildet. Speziell Bisphosphonate haben als chemisch stabile Derivate des anorganischen Pyrophosphats eine hohe Affinität zum Knochenmineral, sodass sie bevorzugt an Hydroxylapatitkristalle adsorbieren [134]. Des Weiteren haben sich makroporöse Scaffolds aus Hydroxylapatit wegen ihrer Biokompatibilität als geeigneter Träger für knochenassoziierte Zelllinien erwiesen [135, 136].
- IV. Osteoklasten, Osteoblasten, mesenchymale, hämatopoetische und endotheliale Zellen werden als zelluläre Komponente zusammengefasst. Sie sind nicht als ein Verteilungsraum definiert, sondern vielmehr als Zelllinien zu verstehen, mit denen der Einfluss von Wachstumshormonen, Wachstumsfaktoren und sonstigen Signaltransduktoren optional bestimmt werden kann. Sie werden daher nicht als fester Bestandteil ins Modell eingebunden.
- V. Das vaskuläre System stellt die Perfusion des Knochengewebes mit Blut und die Elimination von Wirkstoff aus dem Knochengewebe dar.

In Abhängigkeit von der anatomischen Struktur des Knochens sind die Kompartimente in die modellhaften Strukturen des trabekulären und kompakten Knochens eingegliedert. Die Modellstruktur trabekulären Knochens, dargestellt in Abbildung 2-24, ist isotrop und setzt sich aus den oben genannten Kompartimenten, exklusive den zellulären Bestandteilen, zusammen. Die calciumphosphatären Bestandteile sind als dreidimensionales Gitter definiert, wobei b_{Trabekel} , h_{Trabekel} und t_{Trabekel} die Gitterstruktur der Hartschubstanz beschreiben. Innerhalb des Gitters liegen kohärent und simultan sowohl die hydrophilen, als auch die lipophilen Bestandteile, als Knochenmark und Fettmark bezeichnet, vor. Das Verhältnis von hydrophilem zu lipophilem Anteil ist variabel. Die Größe der durch das Gitter ausgebildeten Kavitäten, in denen sich das Fett- und Knochenmark befindet, ist in seiner Größe durch $b_{\text{Kavität}}$, $h_{\text{Kavität}}$ und $t_{\text{Kavität}}$ definiert. Die Kapillaren des vaskulären Systems perfundieren sowohl die Hartschubstanz, als auch das Knochen- und Fettmark und sind in ihrem Durchmesser durch $d_{\text{Kapillare}}$ definiert. Die Kapillaren des Knochen- und Fettmarks und der Hartschubstanz sind als gemeinsames vaskuläres System zu verstehen, aufgrund graphischer Übersichtlichkeit sind sie jedoch getrennt dargestellt.

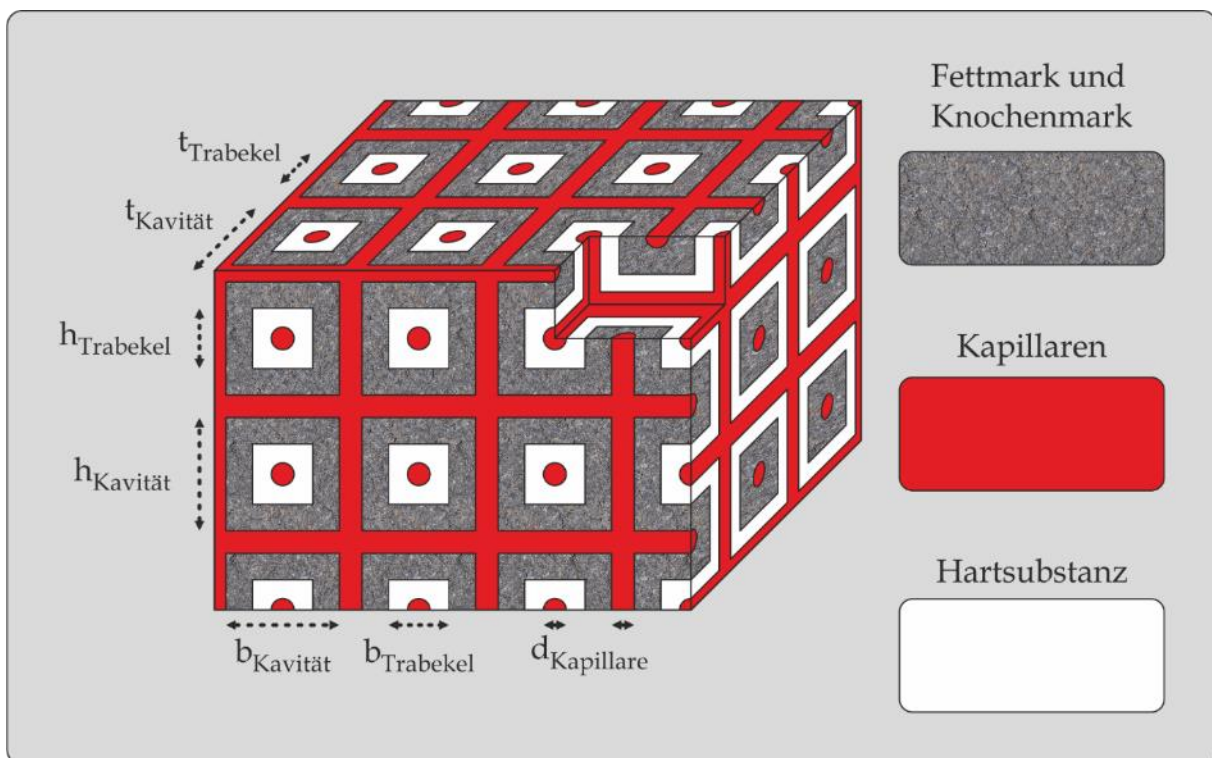


Abbildung 2-24: Modellstruktur trabekulären Knochens

In der Modellstruktur des kompakten Knochens (Abbildung 2-25) sind die calcium-phosphatären Bestandteile und das vaskuläre System dargestellt. Zur graphischen Beschreibung kompakten Knochens im diaphysären Bereich der Röhrenknochen ist vicinales Fettmark dargestellt. Die Hartschubstanz ist als homogene Phase definiert, in der sich weder Knochen- noch Fettmark befindet. Sie wird von einer kohärenten Gitterstruktur von Kapillaren durchzogen. Die Gitterstruktur der Kapillaren wird durch $b_{\text{Kapillare}}$, $h_{\text{Kapillare}}$ und $t_{\text{Kapillare}}$ (graphisch nicht dargestellt) und im Durchmesser durch $d_{\text{Kapillare}}$ definiert. Die Kapillaren perfundieren auch das angelagerte Fettmark. Die Zusammensetzung des Fettmarks ist variabel und orientiert sich am biologischen Knochen. Durch $b_{\text{Hartschubstanz}}$ und b_{Fettmark} wird die Dicke der Hartschubstanz- und Fettmarkschicht definiert

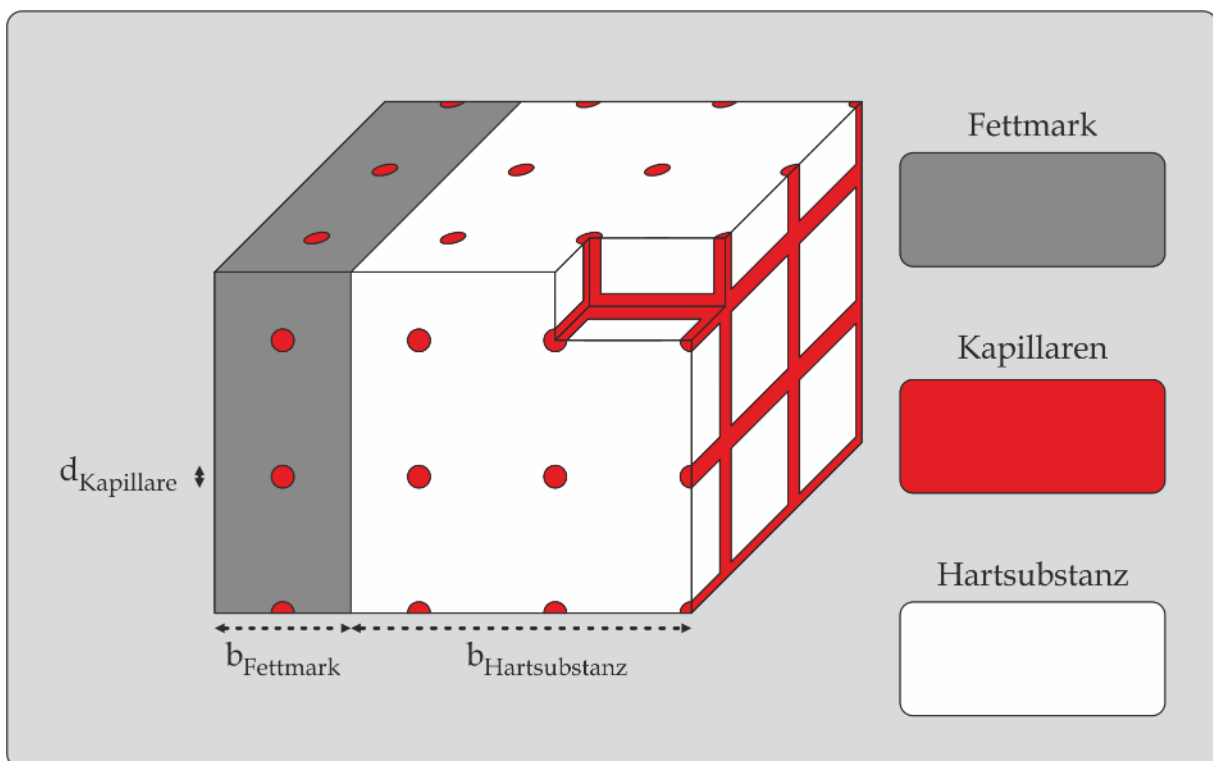


Abbildung 2-25: Modellstruktur kompakten Knochens

In Kapitel 3 gilt es für diese simplifizierte Modellstrukturen ein modulares Design für künstliche Knochenstrukturen, im Folgenden allgemein als Knochenkompartiment bezeichnet, zu entwickeln und dieses in ein technisch praktikables Konzept zu überführen. Mit wirkstoffhaltigen Implantaten soll in Kapitel 5 die kompartimentabhängige Kinetik der Wirkstoffverteilung ermittelt werden.

3 Entwicklung eines künstlichen Knochenkompartiments

3.1 Einleitung

Das künstliche Knochenkompartiment dient als in-vitro-Abbild des biologischen Knochens und stellt einen simplifizierten, technischen Verteilungsraum für den vom Implantat freigesetzten Wirkstoff dar. Es stellt somit die zentrale Komponente des in-vitro-Knochenmodells dar. Die Verteilung des Wirkstoffes innerhalb des Verteilungsraums wird dabei durch die Struktur und die Zusammensetzung des Kompartimentes, die Dauer des Freisetzungsversuches und die Freigabekinetik aus dem Implantat bestimmt. Der strukturelle Aufbau und die Zusammensetzung des Kompartimentes sollten sich daher möglichst nah an der am Applikationsort des Implantates vorliegenden biologischen Knochenstruktur orientieren (Kapitel 2.4), sodass eine adäquate in-vivo-in-vitro-Korrelation erstellt werden kann. Um die vom Implantat ausgehende Ausbreitung des Wirkstoffes in den Verteilungsraum bestimmen und optimieren zu können, sind in Freisetzungsversuchen die Verteilungsmuster und der Gehalt des Wirkstoffes innerhalb des Kompartimentes mit geeigneten Verfahren zu bestimmen (Kapitel 5).

Bei der Entwicklung des künstlichen Knochenkompartimentes galt es zunächst ein Konzept für die adäquate in-vitro-Abbildung der unter Kapitel 2.6.2.4 beschriebenen Bestandteile des Knochens zu erarbeiten, das technische Aspekte der Präparation, Herstellung und Verwendung des Kompartimentes gleichermaßen berücksichtigt. Des Weiteren war der grundsätzliche Aufbau des Knochenkompartimentes zu definieren, der allgemein auf zwei Arten erfolgen kann: Das gesamte Kompartiment wird in einem Stück gefertigt und nach dem erfolgten Freisetzungsversuch destruktiv in Segmente geteilt, die hinsichtlich der Wirkstoffverteilung untersucht werden, oder das Kompartiment wird additiv aus einzelnen Segmenten zusammengesetzt, die nach erfolgtem Freisetzungsversuch destruktionsfrei auseinandergenommen werden können. Um die Struktur und die Zusammensetzung des Kompartimentes einfach und individuell an den biologischen Knochen und das zu testende Implantat anpassen zu können, sollte das Kompartiment im Rahmen dieser Arbeit bevorzugt als ein

modulares System entwickelt werden, das aus variabel gestaltbaren Segmenten zusammengesetzt wird (Kapitel 3.2). Aus fertigungstechnischer Sicht wurde ebenfalls ein segmentaler Aufbau angestrebt, um die Herstellung der Segmente mit den am Forschungsstandort zur Verfügung stehenden Fertigungsverfahren zeit- und kosteneffektiv darstellen zu können (Kapitel 3.3). Das erdachte Konzept des segmentalen Aufbaus ist, in Verbindung mit einer Osteosynthese-Schraube als beispielhaftem Implantat, schematisch in Abbildung 3-1 dargestellt.

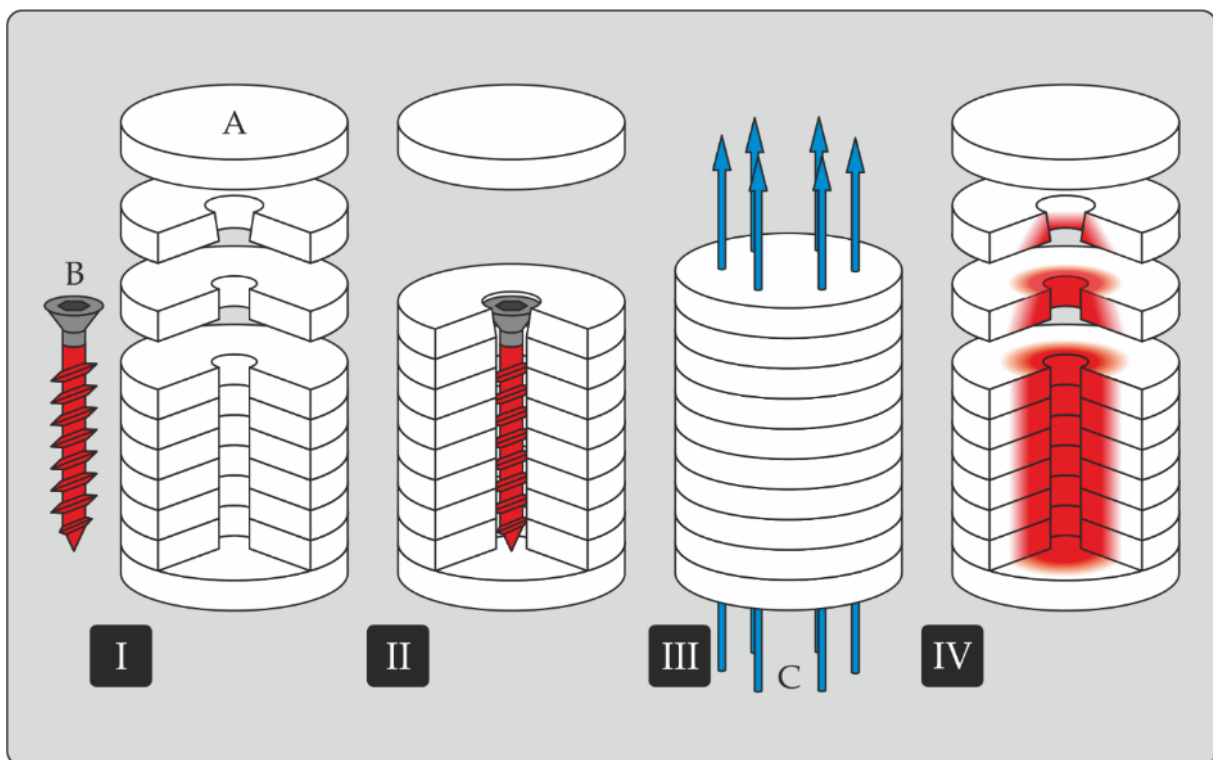


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des modularen Aufbaus des künstlichen Knochenkompartiments

- I. Die Segmente (A) des Knochenkompartimentes sollen in ihrem strukturellen Aufbau an die unter Kapitel 2.6.2.4 definierten Modellstrukturen des trabekulären oder kompakten Knochens angepasst werden. Mittig wird eine Kavität, der Geometrie des Implantates (B) entsprechend, ausgespart.
- II. Für den Freisetzungsversuch wird zunächst das Implantat in die vorgesehene Kavität eingebracht, dann werden die Segmente bestimmungsgemäß zusammengesetzt und in die unter Kapitel 4 beschriebene Freisetzungszelle eingebracht.

- III. Über die Freisetzungszelle (in Abbildung 3-1 nicht dargestellt) wird das Kompartiment während des Freisetzungsvorganges mit einer definierten Menge an Freisetzungsmittel (C), welches das Blut simuliert, perfundiert.
- IV. Nach erfolgter Freisetzung wird das Implantat entnommen. Dann lässt sich das Knochenkompartiment destruktionsfrei auseinandernehmen. Im Folgenden wird der freigesetzte Wirkstoff in jedem Segment einzeln visualisiert und quantifiziert, und somit die Freisetzung des Wirkstoffes vom Implantat und seine Verteilung in den Bestandteilen des Knochens bestimmt (siehe Kapitel 5).

3.2 Konzept des strukturellen Aufbaus des Knochenkompartiments

Damit das Knochenkompartiment, unabhängig von der jeweils dargestellten Knochenstruktur, seine bestimmungsgemäße Funktion erfüllen kann, sind von den Segmenten fünf grundlegende Voraussetzungen zu erfüllen: Die Segmente sollten eine biplane Form aufweisen, damit sie untereinander über ihre Kontaktflächen vollflächig und spaltfrei in Verbindung stehen. Ihre Kontaktflächen müssen dabei derart gestaltet sein, dass die das vaskuläre System darstellenden Strukturen und die hydrophilen und lipophilen Bestandteile des Knochens in einem additiv zusammengesetzten Kompartiment kohärent sind. Sie müssen daher in ihrem strukturellen Aufbau reproduzierbar herzustellen und zu präparieren sein (siehe Kapitel 3.3). Damit das zu testende Implantat mit den Bestandteilen des Kompartimentes unmittelbar in Kontakt stehen und sich der Wirkstoff aus dem Implantat austretende Wirkstoff im Kompartiment verteilen kann, muss dieses in der Mitte individuell an das Implantat anzupassen sein. Weiterhin müssen die Segmente eine adäquate mechanische Stabilität aufweisen, um sie im regulären Prozessablauf destruktionsfrei handhaben zu können.

Die funktionelle Grundeinheit eines Segmentes soll daher ein poröser, formstabiler und biplaner Formkörper, das sogenannte Scaffold, bilden. Es besteht vorzugsweise aus Hydroxylapatit, um die physikochemischen Eigenschaften der Hartschicht des Knochens abzubilden. Das Scaffold sollte in seinem strukturellen Aufbau derart gestaltet sein, dass innerhalb einer jeden Grundeinheit sowohl die hydrophilen und

lipophilen Bestandteile, als auch das vaskuläre System adäquat in vitro abgebildet werden können. Idealerweise sollte sich auch die dreidimensionale Struktur des Scaffolds an der Hartschubstanz des biologischen Knochens (Kapitel 2.4 und Kapitel 2.5), beziehungsweise an den Modellstrukturen des trabekulären und kompakten Knochens (Kapitel 2.6.2.4) orientieren. Aufgrund technischer Limitierungen lassen sich diese äußerst filigranen und komplexen Strukturen der Hartschubstanz in vitro jedoch nur begrenzt darstellen. Unter Berücksichtigung der am Forschungsstandort zur Verfügung stehenden Methoden wurde daher das Konzept eines mehrphasigen Diffusionsraums (Abbildung 3-2) zur simplifizierten Darstellung der oben definierten Modellstrukturen entwickelt.

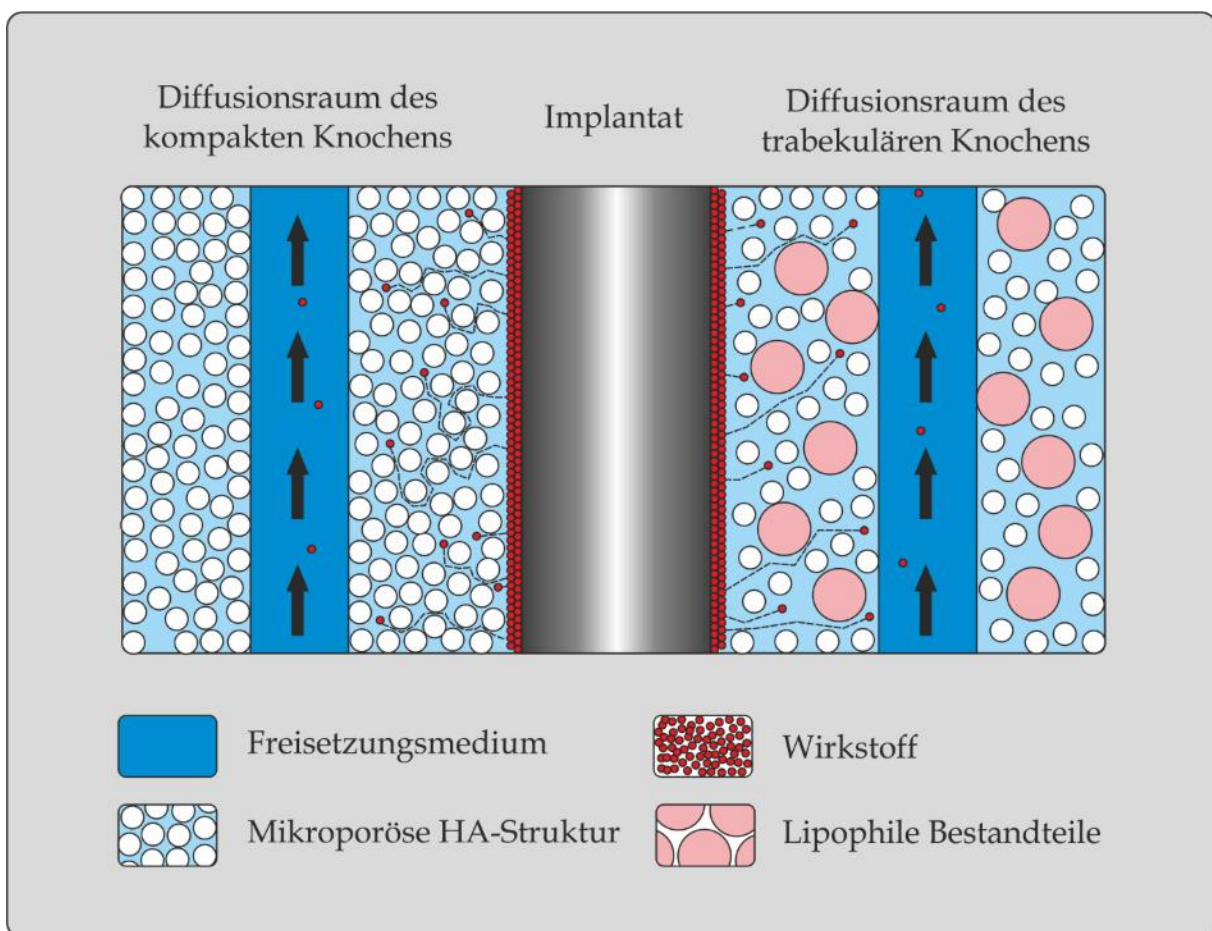


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Diffusionsräume kompakten und trabekulären Knochens

So sollen die Scaffolds, die den kompakten Knochen darstellen, eine homogene, kohärente und mikroporöse Struktur aus Hydroxylapatit besitzen, die von definiert angeordneten Perfusionskanälen durchzogen wird. Die Perfusionskanäle stellen die großlumigen Blutgefäße des vaskulären Systems dar, die den Knochen mit Blut versorgen. Es gilt sie mit einer definierten Flussrate von wässrigem, das Blut simulierenden, Freisetzungsmittel zu perfundieren, über das Wirkstoff aus dem Knochenkompartiment eliminiert werden kann. Durch Variation der Flussrate kann die Elimination des Wirkstoffes aus dem Knochenkompartiment und somit auch dessen Konzentrationsgradient im Kompartiment variiert werden. Die kapillaren Strukturen der Volkmann- und Havers-Kanäle hingegen sind aufgrund ihrer geringen Größe technisch nicht darstellbar, sodass die intra-ossäre Blutversorgung und die Verteilungsvorgänge in der kompakten Knochensubstanz im Rahmen dieser Arbeit in Form eines hydrophilen Diffusionsraums dargestellt werden (Abbildung 3-2). Als hydrophiler Diffusionsraum wird das Hohlraumvolumen im Scaffold zwischen den HA-Partikeln definiert, das vor dem Zusammensetzen des Kompartimentes mit Wasser beziehungsweise mit dem zur Perfusion des Knochenkompartimentes verwendeten Freisetzungsmittel saturiert wird. Der Wirkstoff kann in dieser wässrigen Phase jedoch nicht ungehindert in alle Raumrichtungen diffundieren, da die für die Diffusion zur Verfügung stehenden Wegstrecken durch die Größe und Tortuosität der Poren, die das Hohlraumvolumen ausbildenden, limitiert sind. Mit abnehmender Porengröße und ansteigender Tortuosität nehmen die freie Diffusionsstrecke und die Diffusionsgeschwindigkeit ab [137]. Für die Abbildung der kompakten Knochenstruktur wird daher ein Diffusionsraum mit geringer Mikroporosität und kleinem Hohlraumvolumen angestrebt. Eine reproduzierbare Diffusion setzt generell eine homogene und isotrope Verteilung und vollständige Interkonnektion der Poren voraus.

Bei der Darstellung trabekulärer Knochenstrukturen gilt es neben den ossären Bestandteilen der Hartsubstanz auch die hydrophilen und die etwaigen lipophilen Bestandteile des Knochenmarks darzustellen. Jedoch ist auch die in-vitro-Abbildung des gut durchbluteten Knochenmarks technisch nur bedingt möglich, sodass die

kapillare Blutversorgung und die Verteilungsvorgänge in der wässrigen Interstitialflüssigkeit ebenfalls durch einen wässrigen Diffusionsraum dargestellt werden sollen. Entsprechend dem höheren Volumen an Interstitialflüssigkeit im Knochenmark gegenüber dem kompakten Knochen werden jedoch Scaffolds mit einer hohen Mikroporosität angestrebt. Eine besondere Herausforderung ist es, simultan zu den wässrigen Bestandteilen des Knochens auch die lipophilen Bestandteile adäquat abzubilden. So sollen in den wässrigen Diffusionsraum Makroporen als Kavitäten für die lipophilen Bestandteile, im Folgenden allgemein als Lipide bezeichnet, eingebracht werden. Die Kavitäten sollen dabei derart gestaltet sein, dass sie in ihrer Größe und geometrischen Form variiert werden können. Eine Interkonnektion der Kavitäten ist dabei essentiell, damit alle Kavitäten vollständig mit Lipiden gefüllt werden können und ein isoliertes Totvolumen ausgeschlossen ist. Um eine Phasentrennung oder etwaiges Aufrahmen der Lipide innerhalb des Diffusionsraums zu verhindern, sind bevorzugt Lipide zu verwenden, die sich zum Einbringen in die Lipid-Kavitäten verflüssigen lassen, jedoch bei 37 °C halbfest beziehungsweise pastös vorliegen.

3.3 Allgemeine Aspekte der Herstellung poröser Scaffolds

Die Fertigung von Scaffolds aus Hydroxylapatit erfolgt zumeist in einem mehrstufigen Herstellungsprozess. Zunächst wird pulverförmiges Hydroxylapatit zu einem dreidimensionalen Formkörper, dem sogenannte Grünling, geformt [138]. Die Formgebung des Grünlings kann klassischerweise über Gieß-, Press- oder plastische Formgebungsverfahren erfolgen [139]. Neuartige Verfahren wie der 3D-Druck oder selektives Lasersintern ermöglichen eine automatisierte und rechnergestützte Fertigung komplexer Strukturen [140,141]. Das anzuwendende Formgebungsverfahren wird durch die jeweilige Geometrie des Grünlings und die zu fertigenden Stückzahlen bestimmt [142]. Um das aus einzelnen, zusammengelagerten Partikeln bestehende Gefüge des Grünlings dauerhaft zu festigen, wird der Grünling bei zumeist hohem Druck und hoher Temperatur, jedoch unterhalb der Schmelztemperatur gesintert. Beim Sintervorgang bilden sich interpartikuläre Sinterbrücken durch Oberflächen- und Korngrenzendiffusion aus. Mit dem Anstieg von Temperatur und Druck verdichten sich die Partikel zunehmend, wodurch der Grünling schwindet und die

Porosität abnimmt, jedoch die Festigkeit des Gefüges zunimmt [139]. Da Hydroxylapatit ein anorganischer und nichtmetallischer Werkstoff mit guter Biokompatibilität ist [143], werden die gesinterten Formkörper im Allgemeinen als biokeramische Scaffolds bezeichnet [144].

Aus der Vielfalt der zur Herstellung von Biokeramiken beschriebenen Verfahren galt es ein Fertigungsverfahren abzuleiten und am Forschungsstandort zu etablieren, das die folgenden Voraussetzungen adäquat erfüllen konnte: Das Verfahren sollte eine reproduzierbare und rationelle Fertigung von Scaffolds in hoher Stückzahl ermöglichen. Weiterhin sollte das Verfahren eine einfache Variation der Struktur und der Mikroporosität der Scaffolds ermöglichen, damit die alters- und geschlechtsspezifischen Unterschiede des biologischen Knochens (Kapitel 2.5.3.2) und der in Kapitel 3.2 definierte strukturelle Aufbau des Knochenkompartimentes technisch darstellbar sind. Um die bei einer Methodenentwicklung kontinuierlich erarbeiteten Verbesserungen einzelner Prozessschritte unmittelbar in den Fertigungsprozess einbinden und die Scaffolds final auch herstellen zu können, galt es, alle Prozessschritte am Forschungsstandort zu realisieren.

Neuartige Formgebungsverfahren, wie der 3D-Druck und das selektive Lasersintern ermöglichen durch den additiven Aufbau eines Grünlings beziehungsweise Scaffolds die Realisierung nahezu jeglicher geometrischer Form, jedoch resultieren aus dem schichtweise Aufbau lange Prozesszeiten [145]. Hinsichtlich der benötigten Stückzahl an Scaffolds und der technischen Umsetzbarkeit am Forschungsstandort wurden diese Verfahren nicht näher in Betracht gezogen. Ebenso schien die Anwendung der Gieß- und plastischen Formgebungsverfahren im Rahmen einer Prozessentwicklung wenig geeignet, da für jede Struktur eine individuelle, dem jeweiligen Verfahren, angepasste, Form hergestellt werden muß [146]. Weiterhin zeigten Versuchsreihen mit eigens hergestellten Formen, dass sich mit den Verfahren des Schlickergusses und Gefrier gießens ein homogenes Scaffoldgefüge und die in Kapitel 3.2 definierten strukturellen Anforderungen an ein Scaffold am Forschungsstandort nur bedingt realisieren lassen.

Die Formgebung von Grünlingen durch Verpressen eines prozessierten HA-Pulvers ermöglicht eine relativ unkomplizierte Fertigung von biplanen Grünlingen in hoher Stückzahl [138]. Wird dem prozessierten HA-Pulver temporär ein Porogen zugesetzt, ist die zur Darstellung trabekulärer Knochenstrukturen benötigte makroporöse Struktur im finalen Scaffold zu realisieren. Die Struktur kann dabei durch die Geometrie und den Anteil des Porogens variiert werden [147]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mikrokristalline Cellulose in Form von Pellets als organisches, nicht schmelzendes und kostengünstiges Porogen verwendet, das im Sinterprozesses ausgebrannt wurde. Alternativ kann die makroporöse Struktur in einem Scaffold auch durch dessen partielle Zerspanung realisiert werden. So wurden porogenfreie Grünlinge gesintert und nachfolgend mit einer CNC-Fräse definiert zerspannt. Um die Mikroporosität der Scaffolds, die vorwiegend durch die Kompaktion und den Sinterprozess beeinflusst werden, reproduzierbar und definiert einstellen zu können, galt es den faktoriellen Einfluss der Prozesse mittels statistischer Versuchsplanung zu untersuchen.

3.4 Material

3.4.1 Hydroxylapatit

Hydroxylapatit (CAS-Nr. 1306-06-5) ist ein sprödes, hexagonal kristallisierendes Mineral mit der chemischen Formel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ [148]. Es hat einen Schmelzpunkt von 1450°C [149] und wird der Mineralklasse der „Phosphonate, Arsenate und Vanadate“ zugeordnet [150]. Für die Herstellung der biokeramischen Scaffolds wurde synthetisches HA-Pulver (Hydroxylapatit für Biokeramiken, Ch-Nr. K41215696, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.4.2 Polyvinylalkohol

Polyvinylalkohol (CAS-Nr. 9002-89-5) ist ein wasserlösliches und hygroskopisches Polymer des in freier Form nicht stabilen Vinylalkohols. Polyvinylalkohol (PVA) wird

daher durch Hydrolyse von Polyvinylacetat gewonnen [151]. In der keramischen Industrie findet es vor allem bei der Herstellung von Sprühgranulat als temporäres Binde- und Plastifizierungsmittel Einsatz [152]. Es wird während des Sinterprozesses aus dem keramischen Formkörper herausgebrannt. Für die Herstellung von bindemittelhaltigem HA-Granulat wurde PVA mit einem Polymerisationsgrad von 1600 und einem Molekulargewicht von $72000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Polyvinylalkohol 72000 BioChemica, Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.4.3 Mikrokrystalline Cellulose

Mikrokrystalline Cellulose (MCC) zählt zu den Polysacchariden und ist eine aufgereinigte und teilweise depolymerisierte α -Cellulose, die durch saure Hydrolyse einen einheitlicheren Polymerisationsgrad und einen höheren Kristallinitätsanteil aufweist, als Cellulose [153]. MCC wird als pharmazeutischer Hilfsstoff vor allem bei der Tablettierung und der Pelletierung mittels Feuchtextrusion und Sphäronisation eingesetzt [154]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Avicel® PH 102 (FMC Biopolymer, Philadelphia, USA) zur Herstellung von Pellets mittels Feuchtextrusion und Sphäronisation verwendet. Die hergestellten Pellets wurden als organisches Porogen eingesetzt.

3.4.4 Magnesiumstearat

Magnesiumstearat (CAS-Nr. 557-04-0) ist eine wasserunlösliche Metallseife, die als Fließregulierungs-, Schmier- und Formentrennmittel eingesetzt wird [14]. Die guten Schmiereigenschaften des Magnesiumstearats (Mg-Stearat) resultieren aus seinem schichtartigen Aufbau, bei dem sich die Schichten unter Einwirkung von Scherkräften leicht gegeneinander verschieben lassen [155]. Magnesiumstearat wurde als Schmier- und Formentrennmittel bei der Kompaktion von Grünlingen verwendet.

3.5 Methoden

3.5.1 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von HA-Bulkware mit MCC-Pellets als organischem Porenbildner

Wird ein Grünling durch Kompaktion eines in Pulverform vorliegenden Werkstoffes geformt, können Porogene als temporäre Platzhalter zugesetzt werden, um die Porosität im finalen Scaffold zu erhöhen. Porogene aus organischem Material werden während des Sinterprozess herausgebrannt [147], Porogene aus anorganischen Salzen mit geeigneten Lösungsmitteln nach dem Sinterprozess ausgewaschen [156]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pellets aus mikrokristalliner Cellulose als organische Porogene verwendet, die während des Sinterprozesses herausgebrannt wurden.

3.5.1.1 Herstellung von MCC-Pellets durch Extrusion und Spheronisation

Mit einem Doppelschneckenextruder (Modell ZE 25, ehemals Berstorff, heute Krauss Maffei Berstorff, Hannover, Deutschland) wurde mikrokristalline Cellulose im Verfahren der Feuchtexttrusion in ein Extrudat überführt. Die Pumprate bidestillierten Wassers betrug $38 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, bei einer MCC-Förderrate von $20 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$. Das feuchte Extrudat wurde in einem Spheronizer (Modell S-320, ehemals Nica System, Mölndal, Schweden, heute GEA Process Engineering nv, Belgien) bei einer Drehzahl von $950 \cdot \text{min}^{-1}$ über 5 min zu Pellets ausgerundet. Die feuchten Pellets wurden im $85 \text{ }^\circ\text{C}$ warmen Luftstrom eines Wirbelschichters (GPCG-3, Glatt GmbH, Binzen, Deutschland) getrocknet, bis die Restfeuchte der Pellets weniger als 5 % betrug. Mittels Siebmaschine (Modell Vibro, Retsch, Haan, Deutschland) und $710 \text{ }\mu\text{m}$ Analysensieb wurden die getrockneten Pellets für 2 min gesiebt, um unerwünschten Feinanteil zu entfernen.

3.5.1.2 Mischung von HA-Bulkware und MCC-Pellets

Mittels Freifallmischer (Modell Turbula T2C, Willy A. Bachofen AG Maschinenfabrik, Muttenz, Schweiz) wurden MCC-Pellets mit HA-Bulkware bei einer Drehzahl von

42 · min⁻¹ (Standard für folgende Mischprozesse) in einem Edelstahlcontainer zwischen 3 und 6 min gemischt, mindestens aber so lange, bis das HA-Pulver vollständig auf der Oberfläche der MCC-Pellets agglomeriert war. Das Mischungsverhältnis von MCC-Pellets zu HA-Bulkware wird nachfolgend chargenspezifisch aufgeführt.

3.5.1.3 Kompaktierung der HA-MCC-Pellet-Mischung

Die jeweilige Masse an mit Hydroxylapatit überzogenen MCC-Pellets wurde, um eine Entmischung des Gemenges zu verhindern, möglichst erschütterungsfrei eingewogen und in ein edelstählernes Presswerkzeug (Ø 33,0 mm) überführt (Abbildung 3-3). Die innere Matrizenwand (A), Unterstempel (B) und Oberstempel (C) des Presswerkzeuges wurden zuvor mit Magnesiumstearat bestäubt. Mit einer manuellen Hydraulikpresse (PW 10, Paul-Otto Weber GmbH Maschinen- und Apparatebau, Remshalden, Deutschland) wurden die mit HA überzogenen Pellets (D) isoaxial zu Grünlingen (E) kompaktiert. Die jeweils aufgewendete Presskraft wird im Folgenden chargenspezifisch aufgeführt. Das Ausstoßen der Grünlinge erfolgte durch langsame und gleichmäßige Absenkung der Pressenspindel (F) auf einen auf der umgedrehten Matrize aufliegenden Distanzring (G).

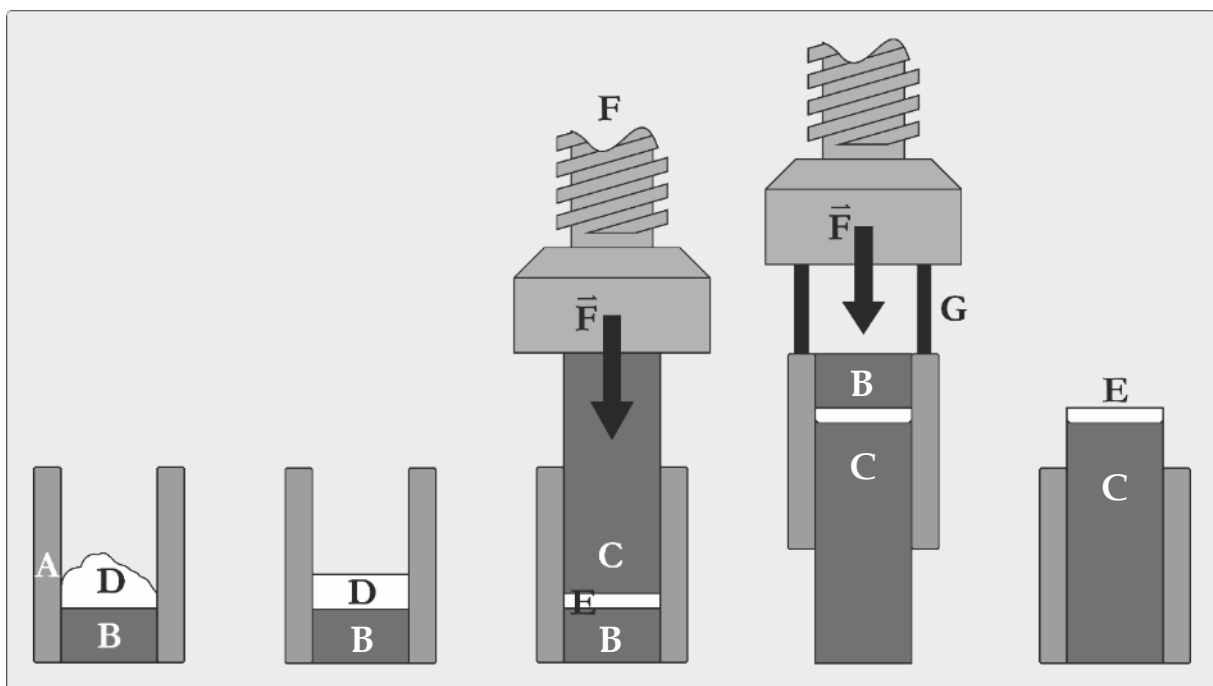


Abbildung 3-3: Schematischer Ablauf der Kompaktierung

3.5.1.4 Sinterung von Grünlingen

Die Sinterung der hergestellten Grünlinge zu Scaffolds erfolgte in einem Kammerofen (Modell KLS 05/13, Thermconcept, Bremen, Deutschland) bei Normaldruck. Die Einstellung der Prozessparameter Heizrate, Sintertemperatur und Sinterdauer wurde chargenspezifisch variiert, sodass die gewählten Parameter im weiteren Verlauf der Dissertationsschrift zusammen mit den jeweiligen Formulierungen aufgeführt werden. Die Abkühlung der Proben erfolgte stets passiv im Ofen bei einer Abkühlrate von maximal $300\text{ °C} \cdot \text{h}^{-1}$. Soweit nicht chargenspezifisch anders aufgeführt, wurden die hergestellten Grünlinge auf der Mantelfläche stehend gesintert (Abbildung 3-4).

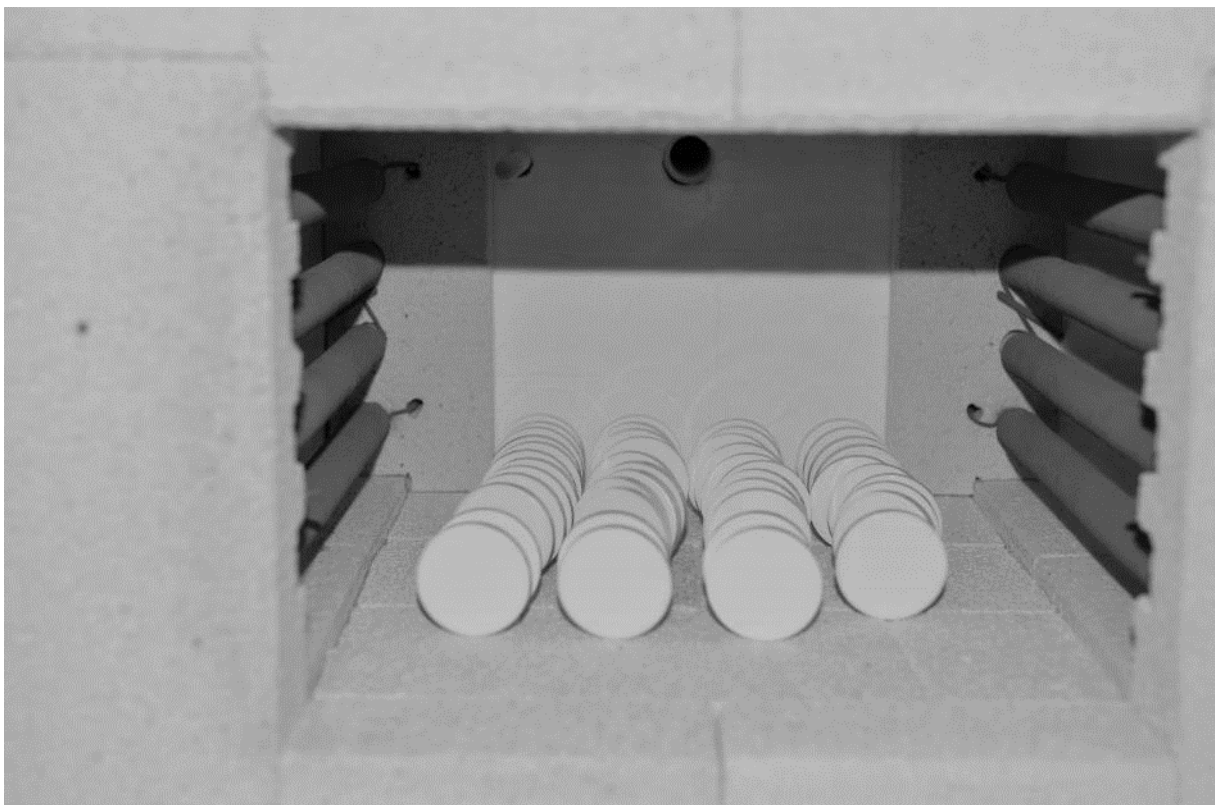


Abbildung 3-4: Biplane, auf Mantelfläche stehende Grünlinge im Sinterofen

3.5.1.5 Ätzung von Scaffolds

Zur Verbindung der Poren innerhalb der Scaffolds wurden die Scaffolds einer Ätzung unterzogen, bei der durch Zugabe verdünnter Salzsäure die feinen, zwischen den Poren verbliebenen Häutchen aufgelöst wurden. Dafür wurden die Scaffolds für 10 s in 3,6%ige Salzsäure überführt und nachfolgend mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

3.5.2 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von bindemittelhaltigem HA-Sprühgranulat mit MCC-Pellets

Um die Festigkeit von Grünlingen aus pulverförmigen Werkstoffen, die eine geringe plastische Verformbarkeit aufweisen, erhöhen zu können, werden den Werkstoffen zumeist temporäre Bindemittel zugesetzt, die während des Sinterprozesses herausgebrannt werden. Die Zugabe eines Bindemittels ermöglicht weiterhin die Überführung der oft schlecht fließfähigen, pulverförmigen Werkstoffe in ein Granulat mit guter Rieselfähigkeit und höherer Schüttdichte, wodurch sie sich während der Prozesse besser fördern, handhaben und dosieren lassen [139]. Die Granulation keramischer, pulverförmiger Werkstoffe erfolgt zumeist über Sprühtrocknung, seltener auch über aufbauende Granulationsverfahren. Bei der Herstellung eines Sprühgranulates werden der pulverförmige Werkstoff, das Bindemittel und etwaige Hilfsstoffe homogen in einer zumeist wässrigen Suspension, dem sogenannten Schlicker, dispergiert und mittels Sprühtrockner zerstäubt und getrocknet [138]. Die Kompaktion des HA-Granulates mit MCC-Pellets als temporärem Porogen erfolgte nach dem unter Kapitel 3.5.1 beschriebenen Verfahren zur Formgebung von Grünlingen.

3.5.2.1 Herstellung und Sprühtrocknung bindemittelhaltiger HA-Suspension

Hydroxylapatit-Bulkware wurde anteilsweise auf vorgelegtes bidestilliertes Wasser aufgestreut und über mindestens 12 h unter Kühlung (5 °C) stehen gelassen, bis die HA-Partikel vollständig mit Wasser benetzt waren. Die Zugabe des Bindemittels Polyvinylalkohol (PVA) erfolgte über eine 10%ige wässrige PVA-Lösung. Dafür wurde PVA anteilsweise in siedendem demineralisiertem Wasser unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die abgekühlte PVA-Lösung im Ultraschallbad über 30 min entgast und ebenfalls gekühlt. Mittels Propellerrührer wurde die Suspension homogenisiert und unmittelbar danach mittels Sprühtrockner (Modell Büchi 190, Büchi Labortechnik GmbH, Schweiz) unter Verwendung einer Zweistoffdüse zerstäubt. Die

Sprühtrocknung erfolgte im Gleichstrom mit den in Tabelle 3-1 aufgeführten Prozessparametern. Das sprühgetrocknete, PVA als Bindemittel enthaltende Granulat wird im Folgenden als HA-Granulat bezeichnet.

Tabelle 3-1: Prozessparameter der Sprühtrocknung

Verwendete Prozessparameter für die Sprühtrocknung mit einem Büchi 190		
Düsendurchmesser	0,5	mm
Aspirator	15	Skalenteile
Sprühdruck	800	Skalenteile
Einlass-Temperatur	135	°C
Förderrate der HA-Suspension	7,5	g · min ⁻¹
Auslass-Temperatur	65	°C
Düsenreiniger-Taktung	6	min ⁻¹

3.5.3 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von MCC-Pellets und händisch granuliertem HA-Granulat

Neigt eine Pulvermischung beziehungsweise ein Gemenge im Allgemeinen aufgrund der heterogenen Partikelgrößenverteilung der enthaltenen Komponenten zur Entmischung, kann durch Angleichung der Partikelgrößen der Komponenten deren Entmischungstendenz reduziert und die Mischungsgüte erhöht werden [157]. So wurde HA-Bulkware mit wässriger 10%igen PVA-Lösung als Granulierflüssigkeit händisch aggregiert, durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 2000 µm gegeben und das hergestellte Granulat im Hordentrockner getrocknet. Die Mischung und Kompaktierung des Granulates und der Pellets erfolgte nach den in Kapitel 3.5.1.2 und Kapitel 3.5.1.3 beschriebenen Methoden.

3.5.4 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von überzogenen Pellets

Neigt eine Pulvermischung beziehungsweise ein Gemenge aufgrund der heterogenen Partikelgrößenverteilung der enthaltenen Komponenten zur Entmischung [157], besteht die Möglichkeit, die größeren Bestandteile als Kern zu nutzen, um sie mit den feineren Bestandteile in einem geeigneten Verfahren zu überziehen. Zur Vermeidung einer durch Entmischung der MCC-Pellets und des HA-Granulates bedingten inhomogenen Verteilung der MCC-Pellets innerhalb Grünlinge wurden die Pellets in einem Dragierprozess direkt mit der HA-Suspension (Kapitel 3.5.2.1) überzogen, konditioniert und nachfolgend kompaktiert.

3.5.4.1 Überziehen von Pellets mit bindemittelhaltiger HA-Suspension

Das Überziehen von Pellets mit einer HA-Suspension erfolgte mittels Labordragiermaschine (Modell 7, Walter Brucks e.K., Deutschland). Im Dragierkessel wurden für jede Charge 150 g Pellets (mit 2 mm Düse extrudiert, siehe Kapitel 3.5.1.1) vorgelegt und die Überzugssuspension (Formulierung entspricht der Suspension aus Kapitel 3.5.2.1) anteilsweise in die Zone der schnellsten Gutbewegung zugegeben. Die Trocknung der überzogenen Pellets erfolgte kontinuierlich durch den auf das Fließbett gerichteten Warmluftstrom. Nach vollständigem Auftragen der berechneten Menge an Überzugssuspension wurden die überzogenen Pellets aus dem Dragierkessel ausgetragen und im Trockenschrank auf unter 5 % Restfeuchte getrocknet.

3.5.4.2 Kompaktierung überzogener Pellets

Für jeden Grünling wurden 4,00 g der überzogenen Pellets eingewogen und bei Raumtemperatur über 120 h bei 0, 12, 66 und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit konditioniert, um den Einfluss der Feuchte auf die Plastizität des Polyvinylalkohols untersuchen zu können. Die Kompaktierung der konditionierten überzogenen Pellets erfolgte wie in Kapitel 3.5.5.1 beschrieben. Zur Bestimmung der Wasseraufnahme durch den Konditionierungsprozess wurde die Masse der Presslinge direkt nach der Kompaktierung und nach Trocknung bis zur Massenkonstanz bestimmt.

3.5.5 Formgebung von Scaffolds durch zerspanende Strukturierung von porogenfreien, gesinterten Presslingen aus HA-Granulat

Zeigt das Gefüge eines Formkörpers eine ausreichend hohe Stabilität, besteht die Möglichkeit, ihn mit zerspanenden Verfahren zu strukturieren. Beim Zerspanen wird überflüssiges Material des Formkörpers definiert entfernt. In Abhängigkeit der Geometrie und den Materialeigenschaften des Formkörpers und der technischen Auflösung des Zerspanungsverfahrens können im Formkörper dreidimensionale Strukturen definiert, reproduzierbar und rationell realisiert werden. So wurde im Rahmen dieser Arbeit reines HA-Granulat zu porogenfreien Grünlingen verpresst, welche nachfolgend zu Rohlingen gesintert und mit Hilfe einer CNC-Fräse zerspanend zu Scaffolds strukturiert wurden.

3.5.5.1 Kompaktierung und Sinterung von Presslingen aus HA-Granulat

HA-Granulat wurde ohne Zusatz von Porogenen nach der unter Kapitel 3.5.1.3 beschriebenen Methode zu biplanen Grünlingen verpresst und nachfolgend gesintert. Im Folgenden werden die Begriffe Grünling und Pressling synonym verwendet, insofern der Grünling durch Kompaktierung von HA-Granulat ohne den Zusatz von Porenbildnern hergestellt wurde. Der Begriff Rohling bezeichnet im Folgenden einen gesinterten Pressling, der Begriff Scaffold ein strukturierten Rohling. Die Masse an HA-Granulat, die Presskraft und die Parameter des Sinterprozesses werden im Ergebnisteil chargenspezifisch aufgeführt.

3.5.5.2 Strukturierung von gesinterten Rohlingen zu Scaffolds durch Zerspanung

Die strukturelle Formgebung von Scaffolds erfolgte durch Zerspanung von Rohlingen mit Spiralbohrern (Abbildung 3-8 (1)) beziehungsweise mikroverzahnten Fräsern (Abbildung 3-8 (2 und 3)). Die Fixierung und Bearbeitung der Rohlinge zum zerspanenden Werkzeug erfolgte anfänglich über eine angefertigte Bohrmatrix, wie in Abbildung 3-5 dargestellt. Hierfür wurden je zwei Rohlinge (A) übereinander in den Matrizenring (B) gelegt, die Bohrmatrix (C) auf die Rohlinge abgesenkt, die Absaugungsdüse (D) für zerspanendes Material auf die zwei Sechskantschrauben (E)

aufgesteckt und mittels Muttern (F) fixiert. Zur Gewährleistung einer korrekten Ausrichtung der Bauteile zueinander wurden diese mit Fixierlöchern versehen, sodass sie nach Absenken auf die in der Bodenplatte (G) eingelassenen Sechskantschrauben verdrehungsfrei fixiert waren. Durch Verschieben der gesamten Bodenplatte wurde die Matrize für die jeweiligen 2 mm Bohrungen (H) lotrecht unter der Spindel einer Standbohrmaschine (Modell Opti B 23 Pro, Optimum Maschinen GmbH, Hallstadt Deutschland) positioniert. Durch stufenweises Absenken des Spiralbohrers ($\varnothing 2,0$ mm) (1) wurden die Presslinge vertikal durchbohrt.

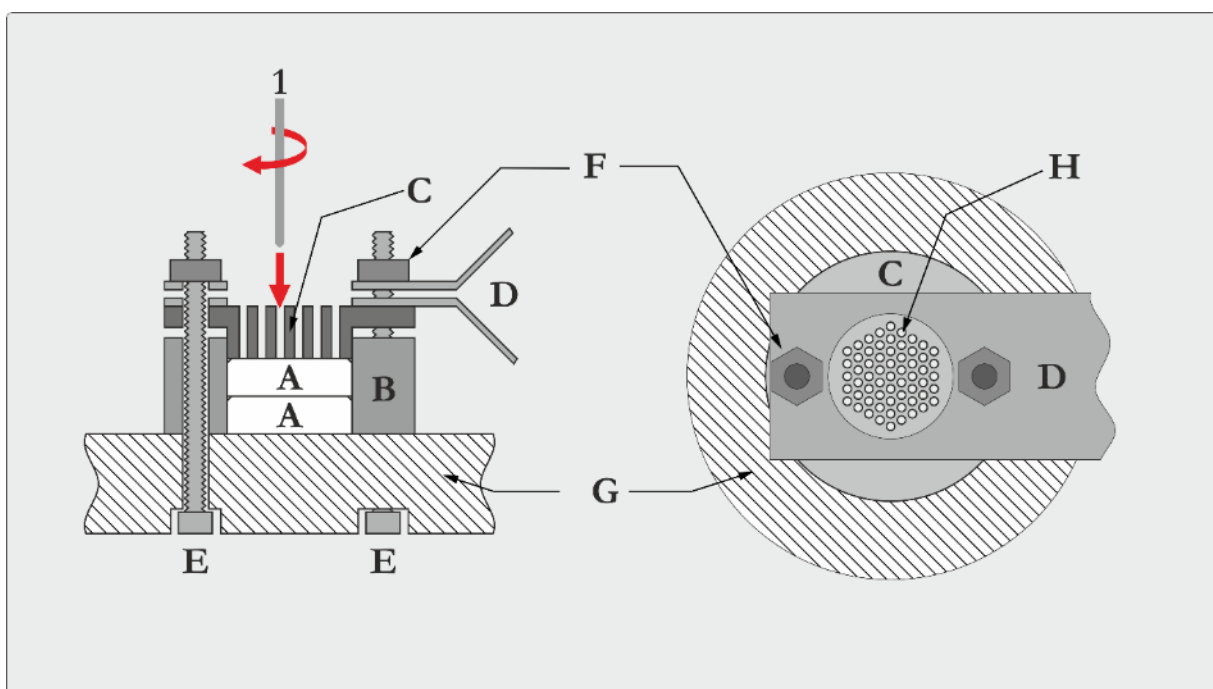


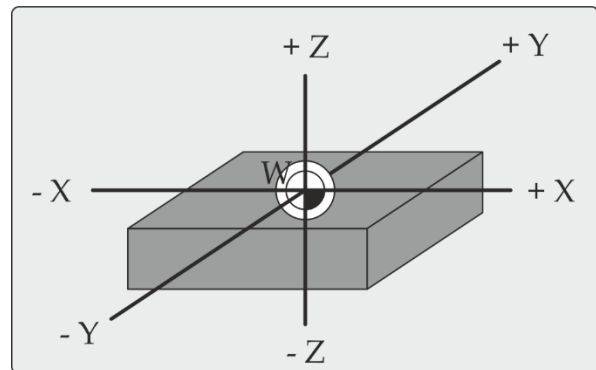
Abbildung 3-5: Schematische Darstellung der 2 mm Bohrmatrix
 Links: Querschnitt,
 Rechts: Aufsicht

Durch Einbindung einer CNC-Fräse (S-710, Hylewicz CNC-Technik, Geldern, Deutschland; Abbildung 3-6 a)) konnte die Zerspanung der Rohlinge auf eine automatisierte Bearbeitung umgestellt werden. Die Verfahrenswege der zur Zerspanung genutzten Fräser (2 ($\varnothing 1$ mm) und 3 ($\varnothing 2$ mm), Abbildung 3-8), wurden entweder in einer Grafikdatei mit der Software Corel Draw®, Version X6 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada), erstellt und als CAM-lesbare Datei exportiert, oder direkt in der zur Fräse gehörenden CAM-Software ConstruCAM-3D programmiert. Der Werkstück-

nullpunkt wurde stets mittig zentriert (siehe Abbildung 3-6 b und Konstruktionszeichnungen im Anhang). Dabei bilden die horizontalen X- und Y-Achsen die parallel zur Aufspannfläche verlaufende Bearbeitungsebene ab. Die Z-Achse stellt die vertikale Achse der Arbeitsspindel dar. Die allgemeine verwendeten Verfahrensgeschwindigkeiten zur Zerspanung sind, soweit nicht chargenspezifisch gesondert benannt, in Tabelle 3-2 aufgeführt.



Quelle:
Fa. Hylewicz



a)

b)

Abbildung 3-6: a) CNC-Portalfräse, S-720, Fa. Hylewicz CNC-Technik
b) Schematische Darstellung der Verfahrenswege einer Arbeitsspindel in einem kartesischen Koordinatensystem
W: Werkstückmittelpunkt
X- und Y-Achse: horizontale Verfahrenswege
Z-Achse: vertikale Verfahrenswege

Tabelle 3-2: Prozess- und Fräsparameter der Rohlingzerspanung

Vorschub X-Achse	2,0	mm · s ⁻¹
Vorschub Y-Achse	2,0	mm · s ⁻¹
Vorschub Z-Achse	0,5	mm · s ⁻¹
Spindeldrehzahl	20 000	min ⁻¹
Maximale Schichttiefe	1,0	mm

Zur Gewährleistung einer achsenparallelen und wiederholungsgenauen Ausrichtung der Rohlinge zum manuell definierten Nullpunkt aller Achsen wurden die Rohlinge mit Hilfe von selbst gefertigten Einspannvorrichtungen (Abbildung 3-7) für die Zerspanung fixiert. Deren Grundplatte (A) wurde mit Zylinderstiften über Bohrungen (B) auf dem zuvor abgeplanten Frästisch statisch positioniert und mit diesem durch Schrauben über die Durchgangslöcher (C) kraftschlüssig verbunden. Die Taschen (E)

der Einspannvorrichtung wurden dem Durchmesser der Rohlinge (D) entsprechend ausgefräst. In diese wurden die Rohlinge (D) eingebracht und durch Anziehen der Gewindeschrauben (G) fixiert. Nach erfolgter Zerspanung wurden gewinkelte Metallhaken durch die Quernuten (H) unter die final strukturierten Scaffolds geführt und diese nach oben aus den Taschen gehoben. Im nachfolgenden Waschgang wurde anhaftendes, zerspantes Material mit bidestilliertem Wasser entfernt.

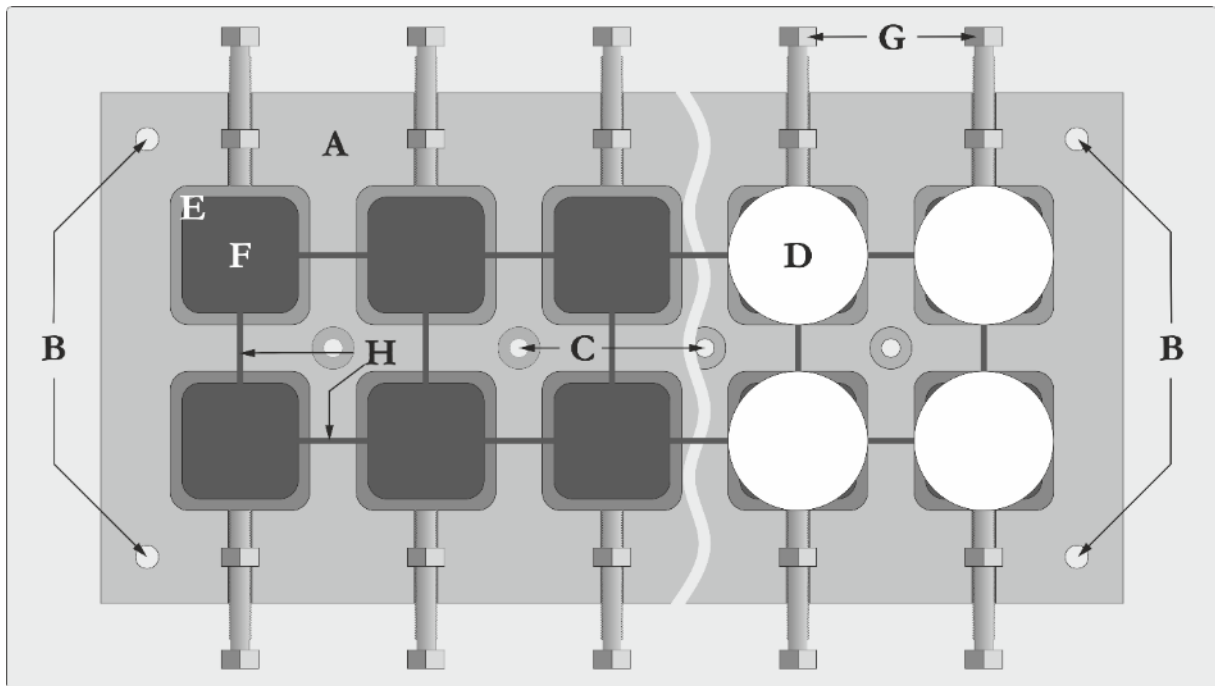


Abbildung 3-7: Einspannvorrichtung für zu zerspanende Rohlinge

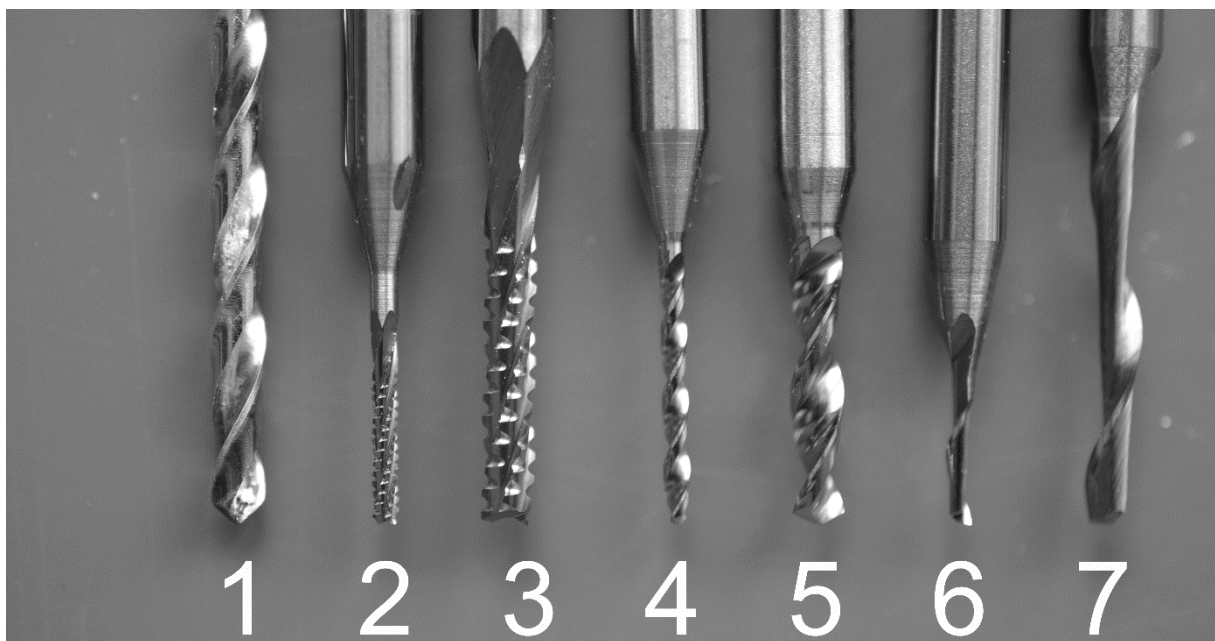


Abbildung 3-8: Übersicht der verwendeten Bohrer und Fräser

3.5.6 Methoden zur Charakterisierung von Scaffolds, HA-Bulkware und Granulat

3.5.6.1 Bestimmung des Böschungswinkels von Pulvern und HA-Granulat

Die Reibungskräfte eines losen Pulverhaufwerkes oder Granulates lassen sich mithilfe des Böschungswinkels bestimmen [125]. Zu dessen Bestimmung wurden die zu vermessenden Proben durch einen Trichter (Ph. Eur. 7, 2.9.36) auf einen Probenteller definierten Durchmessers auslaufen gelassen. Der Böschungswinkel ergibt sich nach Formel (4) aus der Höhe und dem Radius des sich bildenden Kegels. Ein Böschungswinkel $\leq 40^\circ$ deutet auf eine zufriedenstellende bis ausgezeichnete Fließfähigkeit hin (Ph. Eur. 7, Tab. 2.9.36-1).

$$\tan(\alpha) = \frac{h_{\text{Kegel}}}{r_{\text{Kegel}}} \quad (4)$$

3.5.6.2 Bestimmung der Kompressibilität von HA-Bulkware und HA-Granulat

Die Kompressibilität eines Pulvers oder Granulates korreliert theoretisch reziprok zu dessen Fließfähigkeit, die vor allem durch die Größe, Feuchte, Form, Dichte und die Oberflächenbeschaffenheit der Partikel beeinflusst wird [125]. Aus der Schüttdichte $\rho_{\text{unverdichtet}}$ und der Stampfdichte $\rho_{\text{verdichtet}}$ eines Pulvers oder Granulates lassen sich nach Formel (5) und Formel (6) der Kompressibilitätsindex und der Hausner-Faktor berechnen. Ein Kompressibilitätsindex $\leq 20\%$ und ein Hausner Faktor $\leq 1,25$ weisen zumeist auf eine zufriedenstellende bis ausgezeichnete Fließfähigkeit hin (Ph. Eur. 7, Tab. 2.9.36-2).

$$\text{Kompressibilitätsindex in \%} = \left(1 - \frac{\rho_{\text{unverdichtet}}}{\rho_{\text{verdichtet}}}\right) \cdot 100 \quad (5)$$

$$\text{Hausner - Faktor} = \frac{\rho_{\text{verdichtet}}}{\rho_{\text{unverdichtet}}} \quad (6)$$

Die Stampf- und Schüttdichte von HA-Bulkware und HA-Granulat wurden jeweils nach Monographie 2.9.34, Methode 1 des europäischen Arzneibuches, Auflage 7 in einer Dreifachmessung bestimmt. Die Verdichtung erfolgte mittels Stampfvolumeter (SVM 222, Erweka GmbH, Heusenstamm, Deutschland). Von der HA-Bulkware wurden Probenmassen von 50,00 g und vom HA-Granulat 70,00 g eingewogen.

3.5.6.3 Rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen

Die rasterelektronischen Aufnahmen wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) des Modells DSM 940 und des Modells Smart SEM™ Supra 55VP (beide Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) erstellt. Die untersuchten Objekte wurden zuvor unter Vakuum ($1 \cdot 10^{-2}$ mbar) bei einer Spannung von 65 V über 130 s mit einer elektronenleitenden Goldschicht besputtert. Als zu ionisierendes Edelgas wurde Argon verwendet, mit dem die Prozesskammer vor dem jeweiligen Sputterprozess begast wurde.

3.5.6.4 Mikroskopische Aufnahmen

Mit einem digitalem Auflichtmikroskop (VHX-500K, Keyence, Japan) wurden mikroskopische Aufnahmen von Pellets, Grünlingen und Scaffolds erstellt.

3.5.6.5 Partikelgrößenbestimmung - Prinzip der Laserbeugung

Die Bestimmung der Partikelgröße und der Partikelgrößenverteilung von HA-Bulkware und HA-Granulat über das Prinzip der Laserbeugung erfolgte mittels Laserdiffraktometer (Helos, Sympatec GmbH, Clausthal-Zellerfeld, Deutschland), unter Verwendung der Linse R3. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software Windox (Version 5.8.0.0, ebenfalls Sympatec GmbH). Die Proben wurden dem Laserdiffraktometer über eine Trockendispergiereinheit (Rodas, ebenfalls Sympatec GmbH) zugeführt, um etwaige Partikelagglomerate zu zerstören und eine vollständige Dispergierung der Probe zu erreichen. Der Dispergierdruck betrug 3 bar.

3.5.6.6 Partikelgrößenbestimmung - Prinzip der dynamischen Lichtstreuung

Zur Bestimmung der Partikelgröße von HA-Bulkware nach dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung wurde HA-Bulkware in Miglyol 812 aufgenommen und über 30 min mit Ultraschall dispergiert. Die Messung erfolgte mit einem Partikelgrößenmessgerät Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, United Kingdom).

3.5.6.7 Bestimmung von Längenmaßen

Soweit chargenspezifisch nicht gesondert aufgeführt wurden alle Längenmaße mit einem Messschieber bis auf $0,010 \pm 0,005$ mm bestimmt. Die diametralen und höhenbezogenen Maße eines jeden Presslings sind im Folgenden als Mittelwert einer Zweifachmessung, mit orthogonal zu einander stehenden Messpunkten, angegeben.

3.5.6.8 Bestimmung der diametralen Bruchkraft

Mit einem Tablettenhärte tester (Schleuniger, heute Pharmatron AG, Thun, Schweiz) wurde die diametrale Bruchfestigkeit von Grünlingen und Scaffolds ermittelt. Die Messungen einer Charge erfolgten stets in einer Dreifachbestimmung, soweit nicht chargenspezifisch gesondert aufgeführt.

3.5.6.9 Bestimmung der Porosität von Scaffolds über hydrostatische Wägung

Die Porositätsbestimmung gesinterter Scaffolds über hydrostatische Wägung erfolgte nach dem Prinzip von Archimedes. Durch Quotientenbildung des bestimmten Volumens der offenen Poren und des Gesamtvolumens der jeweiligen Scaffolds wurde die offene Porosität nach Formel (7) errechnet:

$$\text{Offene Porosität in \%} = \frac{m(\text{saturierter Pressling}) - m(\text{trockener Pressling})}{m(\text{verdrängtes Wasser})} \quad (7)$$

Die Bestimmung der Masse der trockenen Presslinge erfolgte nach Trocknung bei 105 °C bis zur Massenkonstanz. Zur nachfolgenden Saturierung des Porenvolumens

innerhalb der Presslinge wurden diese in vorgelegtes bidestilliertes Wasser überführt und unter Vakuum von $1 \cdot 10^{-2}$ mbar entgast, bis keine Luftblasen mehr austraten und die Poren mit Wasser gesättigt waren. Nachfolgend wurde mit einem kurzen Druckluftstoß die Oberfläche von anhaftendem Wasser befreit und die Masse bestimmt. Der Ablauf der Bestimmung des Volumens ist in Abbildung 3-9 schematisch dargestellt. Ein mit bidestilliertem Wasser ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gefülltes Becherglas (A) wurde auf einer Analysenwaage (B) platziert, die edelstählerne Scaffoldhaltervorrichtung (C) an einem Kunststoffoffaden soweit in das Tauchbad abgelassen, dass sie freischwebend aufgehängt war, und die Analysenwaage tariert. Nachfolgend wurde der zu vermessende Scaffold (D) in die Haltevorrichtung überführt, in das Tauchbad abgelassen und die Masse des verdrängten Wasser bestimmt.

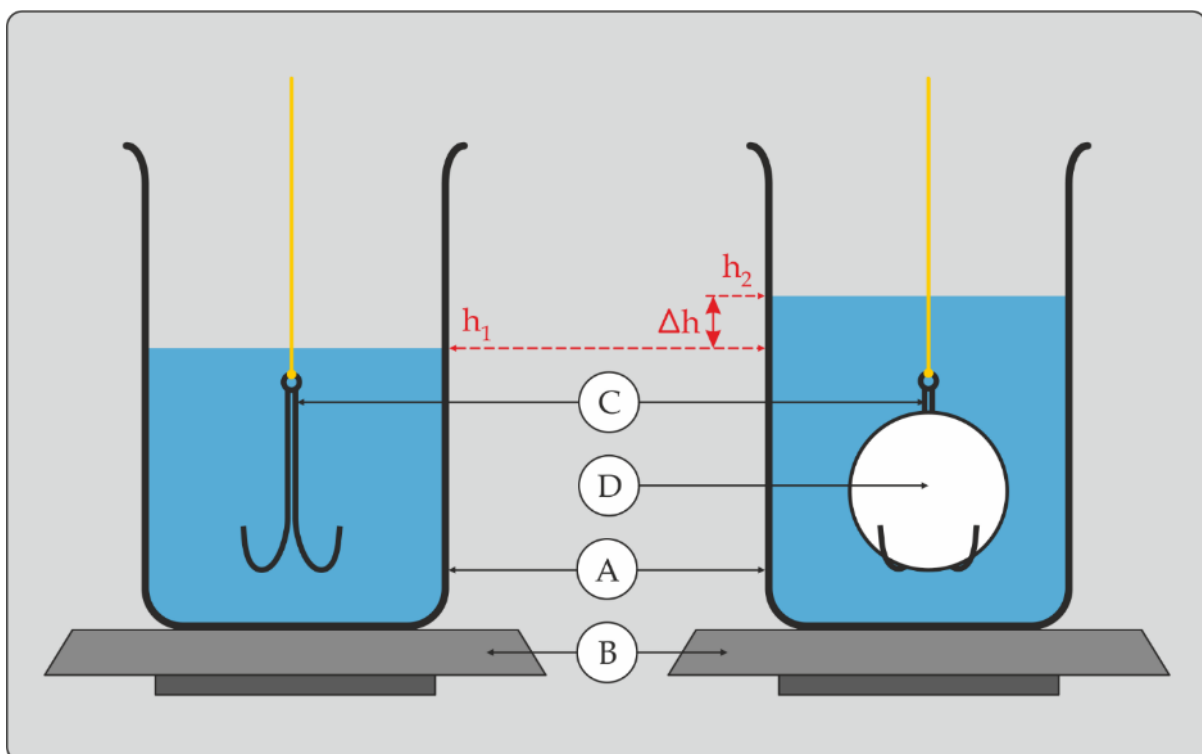


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung der Porositätsbestimmung nach dem archimedischen Prinzip

3.5.6.10 Pulverrheologie von HA-Bulkware und sprühgetrocknetem HA-Granulat

Die Fließfähigkeit beziehungsweise Basic Flowability Energy (BFE) der HA-Bulkware und des HA-Granulats wurde mit einem Pulverrheometer (FT4, Freeman Technology, Tewkesbury, United Kingdom) bestimmt. Um den etwaigen Einfluss von Lufteinschlüssen innerhalb des Pulvers oder eine einfüllbedingte Vorkompaktion des Pulvers zu minimieren wurden alle Proben vor Bestimmung der BFE konditioniert. Hierfür wurde der Flügelrührer des Pulverrheometers dreimal in einer abwärts gerichteten Drehbewegung im Uhrzeigersinn durch die vorgelegte Probe geführt. Nach der Konditionierung wurde die Oberfläche des konditionierten Pulverbettes durch Ausschwenken des Befüllungstrichters geglättet und der Flügelrührer durch eine abwärtsgerichtete Drehbewegung gegen den Uhrzeigersinn durch das Pulverbett geführt. Zur Ermittlung etwaiger Änderungen der Fließeigenschaften des Pulvers durch einwirkende Scherung umfasste jeder Messzyklus sieben Einzelmessungen. Für weiterführende Informationen zur Pulverrheologie sei auf die wissenschaftliche Arbeit von Cordts verwiesen [158].

3.5.6.11 Bestimmung der spezifischen Oberfläche durch Stickstoffadsorption nach dem BET-Verfahren

Mittels BET-Messgerät NOVA 2200 (Quantachrom Instruments, Boynton Beach, USA) wurde die spezifische Oberfläche der HA-Bulkware, des HA-Granulats und des gesinterten HAs durch Stickstoffadsorption nach dem BET-Verfahren bestimmt (Ph. Eur. 2.9.26). Zur Konditionierung der Proben wurde eine definierte Probenmasse in die Probenbehälter eingewogen, im BET-Messgerät über 3 h bei einer Temperatur von 300°C und einem Druck von $1 \cdot 10^{-2}$ mbar entgast und nachfolgend mit flüssigem Stickstoff gekühlt. Im Partialdruckbereich von 0,05 - 0,30 wurden die Proben in einer Elfpunktmessung vermessen. Die Äquilibrierzeit je Partialdruck betrug 120 s. Für weiterführende Information zur BET-Methode wird an dieser Stelle auf die wissenschaftliche Arbeit von Wittmann [159] verwiesen.

3.5.6.12 Bestimmung der Kristallinität mittels Röntgendiffraktometrie

Zur Untersuchung des Einflusses der Sintertemperatur auf eine etwaige Zersetzung des Hydroxylapatits im Hochtemperaturbereich wurden die Proben mittels Röntgendiffraktometer (Stadi P, Steo & Cie GmbH, Darmstadt, Deutschland) vermessen. Die Diffraktogramme der jeweiligen Sintertemperatur wurden hinsichtlich Peaklage und Peakintensität gegeneinander verglichen. Die Proben wurden mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung (30 kV, 40 mA) in einem Bereich von 5 bis $50^\circ 2\Theta$ vermessen. Die Schrittweite betrug $2,5^\circ 2\Theta$, bei einer Messzeit von $120 \text{ s} \cdot \text{Schritt}^{-1}$.

3.5.6.13 Feuchtebestimmung

Die Feuchte von überzogenen, unüberzogenen Pellets und HA-Granulat wurden thermogravimetrisch mittels elektronischem Feuchtemesser (MA 45, Sartorius Weighing Technology GmbH, Göttingen, Deutschland) bestimmt. Probenmassen von circa 1,0 g wurden gleichmäßig auf der Waagschale des Feuchtemessers verteilt, auf 105°C erhitzt und bis zu einer Massenänderung $< 5 \text{ mg} \cdot 24 \text{ s}^{-1}$ getrocknet.

3.5.6.14 Dichtemessung

Die Dichte von MCC-Pellets wurde mit einem Helium-Pyknometer (Pycnomatic ATC, Porotec, Hofheim am Taunus, Deutschland) bestimmt.

3.5.6.15 Thermogravimetrische Analyse

Zur Bestimmung des temperaturabhängigen Masseverlustes von organischem Material wurden die jeweiligen Proben in einem Thermogravimetrie-Messgerät (STA 6000, Perkin Elmer, Waltham, USA) einem Temperaturprogramm unterzogen. Die Proben wurden in Stickstoffatmosphäre mit einer Heizrate von $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ erhitzt.

3.5.7 Methoden zur statistischen Auswertung

3.5.7.1 Statistische Versuchsplanung

Statistische Versuchsplanung ist eine effiziente Methodik zur systematischen Planung und statistischen Auswertung von Versuchen, mit der die Abhängigkeit mehrerer Zielgrößen von mehreren Faktoren gleichzeitig erfasst und ein gemeinsames Optimum ermittelt werden kann [160]. In Abhängigkeit des Versuchsdesigns lassen sich auch Wechselwirkungen zwischen einzelnen Faktoren erkennen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Software Design-Expert® 8 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, United States) zur Erstellung und Auswertung von vollfaktoriellen und zentral zusammengesetzten Versuchsplänen verwendet. Die Zusammensetzung der Pläne wird in den entsprechenden Kapiteln näher ausgeführt.

3.5.7.2 Allgemeine statistische Methoden

Insofern nicht chargenspezifisch anders angegeben wurden alle Messungen als Dreifachbestimmung durchgeführt. In den Graphen sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung dargestellt, die Fehlerbalken zeigen die zugehörige Standardabweichung. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Messergebnissen mehrerer Gruppen wurden diese einer einfaktoriellen Varianzanalyse unterzogen, insofern sie normalverteilt, homoskedastisch und unabhängig waren. Ein Signifikanzlevel $\leq 0,05$ wurde akzeptiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Sigma Plot™ (Version 11.2.0.5., Systat Software, Inc., San Jose, United States)

3.6 Ergebnisse

3.6.1 Entwicklung eines Fertigungsverfahrens für mikroporöse Scaffolds

Damit ein Scaffold als funktionelle Grundeinheit in einem Knochenkompartiment mit den in Kapitel 3.2 dargestellten Aspekten verwendet werden kann, müssen seine mikroporöse Struktur und die darin abgebildeten Lipid-Kavitäten und Perfusionskanäle variabel zu gestalten sein. Der Fokus lag somit zunächst auf der Entwicklung eines Fertigungsverfahrens für biplane Scaffolds mit definierter mikroporöser Struktur, in der sich durch Zusatz eines organischen Porogens makroporöse Kavitäten darstellen lassen. Die Perfusionskanäle galt es durch Zerspannung der Scaffolds mit geometrisch definierter Schneide zu realisieren. Um eine vollständige Interkonnektion aller Lipid-Kavitäten für eine lückenlose Befüllung mit Lipid gewährleisten zu können, wurde eine Anordnung der Porogene im Sinne der dichtesten Kugelpackung, wie in Abbildung 3-10 dargestellt, angestrebt.

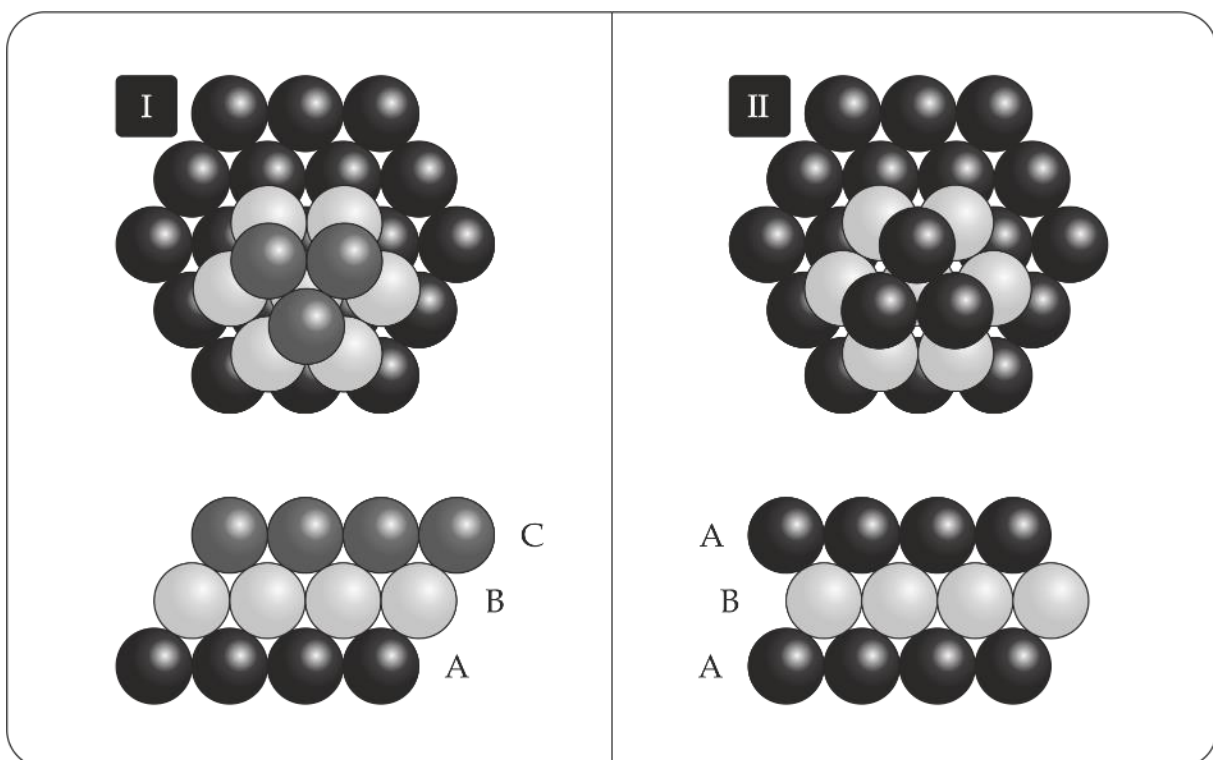


Abbildung 3-10: Schematische Darstellung dichtester Kugelpackung
I: Kubische Kugelanordnung
II: Hexagonale Kugelpackung

3.6.2 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von HA-Bulkware mit MCC-Pellets als organischem Porenbildner

In Vorversuchen wurden ausgeglühte Rinderknochen pulverisiert und zu biplanen Presslingen verpresst, die sich destruktionsfrei aus dem Presswerkzeug entnehmen ließen und nach Sinterung eine adäquate mechanische Stabilität zeigten. Zur Erzeugung einer makroporösen Scaffoldstruktur wurden verschiedene grobkristallin vorliegende Zucker, Zuckeralkohole und Pellets aus mikrokristalliner Cellulose dem Knochenpulver als Porogen zugesetzt, zu Grünlingen kompaktiert und gesintert. Die Grünlinge, die Zucker und Zuckeralkohole als Porogen enthielten, lagen nach dem Sinterprozess zerfallen vor. Die Grünlinge, die Pellets als Porogen enthielten, konnten dagegen zu makroporösen Scaffolds gesintert werden. Dies wird durch Schmelzen der Zucker und Zuckeralkohole während der Aufheizphase des Sinterprozesses erklärt, die das noch fragile Gefüge der Grünlinge beschädigen. Cellulose hingegen schmilzt nicht, sondern verkohlt und vergast nahezu vollständig direkt [161]. Da die Makroporen in den Scaffolds nach dem Sintern vollständig rückstandsfrei von Pellets waren und die mikroporöse Struktur intakt erschien, wurde von einer vollständigen Vergasung der Cellulose ausgegangen und die mikroporöse Struktur als ausreichende Austrittsfläche für die Gase betrachtet. Dementsprechend wurden Pellets aus mikrokristalliner Cellulose als geeignetes Porogen angesehen und im Folgenden, aufgrund limitierter Verfügbarkeit von Kadaverknochen, mit synthetischem Hydroxylapatitpulver (HA-Bulkware) zu Grünlingen kompaktiert.

Betrachtet man die Pellets als ideale Sphären, können sie, bei unendlicher Anzahl, einen Rauminhalt von maximal 74,04% einnehmen [162]. Bei einer Pellet-Dichte von $1,44 \text{ g} \cdot \text{cm}^3$ und einer HA-Reindichte von $3,14 \text{ g} \cdot \text{cm}^3$ entspricht das theoretisch einem Massenanteil von 56,67% an Pellets im Grünling. Da das Hydroxylapatit jedoch in mikronisierter Pulverform (X_{50} : $3,41 \text{ } \mu\text{m}$), mit einer Schüttdichte von $0,25 \text{ g} \cdot \text{cm}^3$ vorlag, galt es zu evaluieren, welchen Einfluss die Verdichtung, die die HA-Partikel bei der Kompaktion zum Grünling erfahren, und die Sintertemperatur auf die Rohdichte der mikroporösen Scaffoldstruktur haben, die auch das Volumen der Porenräume berücksichtigt. In Abhängigkeit des Verdichtungsgrades variiert auch der

Abstand der Pellets zueinander, sodass es den zu den jeweiligen Presskräften korrespondierenden Pelletanteil zu ermitteln galt, mit dem die dichteste Packung der Pellets zu erreichen war. Dementsprechend wurden Mischungen (Tabelle 3-3) aus HA-Bulkware und MCC-Pellets hergestellt, diese zu Grünlingen verpresst und gesintert. Damit auch bei Grünlingen mit hohem Anteil an MCC-Pellets die gasförmigen Zersetzungsprodukte der Pellets und des als Schmiermittel verwendeten Magnesiumstearats während des Sinterprozesses möglichst sukzessive und über eine große Fläche aus den Grünlingen austreten konnten, galt es zunächst den temperaturabhängigen Zersetzungsprozess von MCC-Pellets und Magnesiumstearat thermogravimetrisch zu untersuchen, um den Sinterprozess entsprechend anpassen zu können. Bei beiden Materialien setzte die Zersetzung oberhalb von 250 °C ein (Abbildung 9-1 und Abbildung 9-2 im Anhang). Der maximale Masseverlust war im Bereich von 320 - 330 °C, die Massenkonstanz bei 500°C zu erkennen. Die Sinterung der Grünlinge erfolgte daher in einem dreistufigen Sinterprozess (Tabelle 3-4). Für Stufe II wurde eine niedrige Heizrate gewählt, um eine sprunghafte Zersetzung des organischen Materials zu vermeiden. Um das Porogen vollständig aus dem Grünling auszubrennen, wurde die Temperatur über eine Stunde bei 500 °C gehalten.

Tabelle 3-3: Grünlinge aus MCC-Pellets und HA-Bulkware - Chargenübersicht

Presskraft in kN	Pellet-Anteil in %			
	40,0	50,0	60,0	70,0
20	018-9-1	018-9-5	018-9-9	018-9-13
40	018-9-2	018-9-6	018-9-10	018-9-14
60	018-9-3	018-9-7	018-9-11	018-9-15
80	018-9-4	018-9-8	018-9-12	018-9-16

Tabelle 3-4: Sinterprozess - Parameter

Stufe	I	II	III
Heizrate in °C · min ⁻¹	3,0	1,0	6,0
Solltemperatur in °C	250	500	1000
Haltezeit in min	-	60	120

Nach dem Mischprozess (Kapitel 3.5.1.2) war das HA-Pulver vollständig auf der Oberfläche der Pellets agglomeriert, wie in Abbildung 3-11 a) und b) dargestellt, sodass folglich beide Komponenten ohne Entmischungstendenz in das Presswerkzeug überführt werden konnten und folglich homogen verteilt in den Grünlingen vorlagen. Wie in Abbildung 3-11 exemplarisch an Scaffolds der Chargen 018-9-3 und 018-9-11 gezeigt, konnten mit steigendem Pelletgehalt und ansteigender Presskraft die Makroporosität der Scaffolds erhöht und die Poren einander angenähert werden. Ein Pellet-Anteil > 60% und eine Presskraft > 60 kN erwiesen sich als ungeeignet, da von den Grünlingen der entsprechenden Chargen bereits bei der Entnahme aus dem Presswerkzeug partiell Bereiche abplatzten.

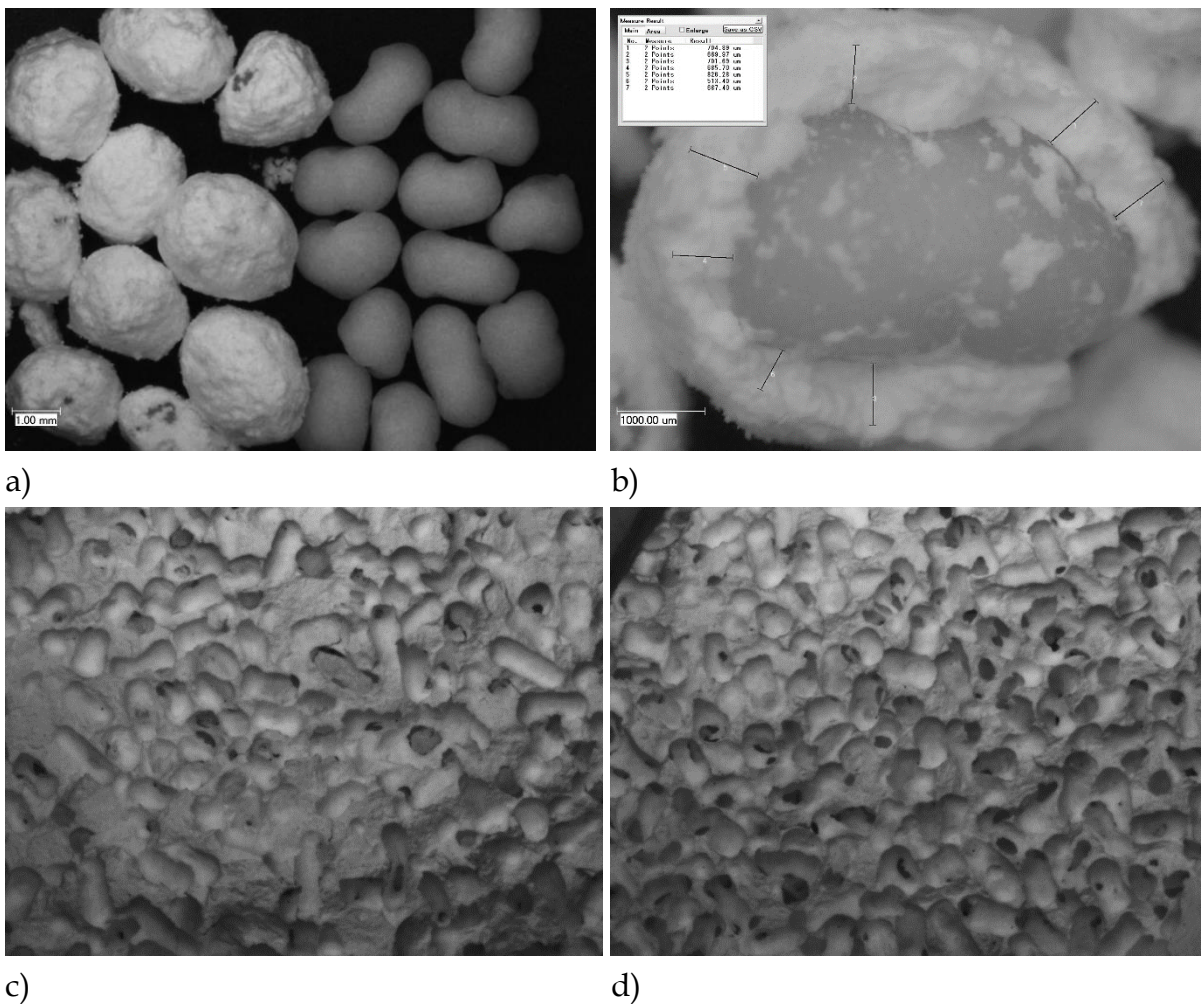


Abbildung 3-11:

Mikroskopische Aufnahmen

- a) Links: Pellets nach Mischen, rechts: Pellets vor Mischen
- b) Pellet mit aufgelagertem HA, freipräparierte Oberfläche
- c) Gesintertes Scaffold der Charge 018-9-3
- d) Gesintertes Scaffold der Charge 018-9-11

Um die Poren innerhalb der Scaffolds zu verbinden, wurden die gesinterten Scaffolds geätzt, wobei bei den Scaffolds sämtlicher Chargen ein partielles Deckeln oder eine vollständige Laminierung der Hydroxylapatitstruktur auftrat. Die Untersuchung ungeätzter Scaffolds im Querschnitt zeigte bei sämtlichen Chargen parallel zur Kreisfläche der Scaffolds verlaufende Haarrisse (Pfeile) in der HA-Struktur, wie exemplarisch in Abbildung 3-12 dargestellt. Folglich wurden Scaffolds mit minimaler und maximaler Makroporosität (Chargen 018-9-1 und 18-9-16) erneut hergestellt und direkt nach der Entnahme aus dem Presswerkzeug diametral gebrochen. Da sich auch bereits bei den Grünlingen horizontal verlaufenden Haarrisse (Abbildung 3-12, Pfeile) zeigten, waren diese nicht durch einen überhöhten Gasdruck der austretenden Zersetzungsprodukte der MCC-Pellets zu erklären. Vielmehr wurde von einem Sprödbruch der HA-Struktur ausgegangen, der bereits nach Wegnahme der Presskraft und der damit verbundenen Rückdehnung des Grünlings eintrat. Da Hydroxylapatit eine geringe plastische Verformbarkeit aufweist, wurde von einer nur geringen Festigkeit der interpartikulären Bindungen in den Grünlingen ausgegangen, sodass die HA-Struktur aufgrund ihrer geringen Duktilität beim Auftreten von mechanischen Spannungen zum unmittelbaren Bruch neigte. Dementsprechend galt es im Folgenden die Festigkeit der interpartikulären Bindungen durch Zugabe eines temporären, organischen Bindemittels zu erhöhen, um einen Sprödbruch innerhalb der HA-Struktur zu vermeiden.

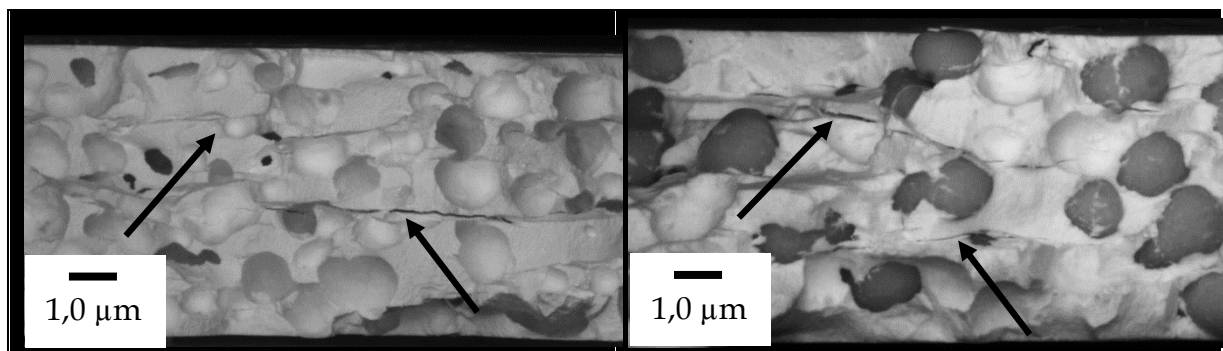


Abbildung 3-12

Mikroskopische Aufnahmen

Links: Charge 018-9-3 im Querschnitt

Rechts: Charge 018-9-16 im Querschnitt

3.6.3 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von HA-Granulat mit MCC-Pellets

3.6.3.1 Schlickerformulierung und Sprühtrocknungsprozess

Damit ein Feststoff mit einem Bindemittel durch das Verfahren der Sprühtrocknung in ein Granulat überführt werden kann, müssen der Feststoff, das Bindemittel und etwaige Hilfsstoffe zunächst in eine homogene Suspension, den sogenannten Schlicker überführt werden. Ein hoher Feststoffanteil in der Suspension kann vorteilhaft sein, da sich verkürzte Prozesszeiten und eine Reduzierung der zum Verdampfen des Dispersionsmediums notwendige Energie realisieren lassen [138]. Die Aufbereitung der Feststoffe im Sinne einer Nassmahlung, bei der die festen Komponenten der Dispersion sowohl in ihrer Partikelgröße, als auch im Dispersionsmedium homogenisiert werden, ermöglicht im Allgemeinen sehr hohe Feststoffgehalte im Schlicker. Da der Prozess der Nassmahlung jedoch sehr zeitintensiv ist und sich bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chargengrößen nicht rentiert, wurde das Hydroxylapatit mittels Flügelrührer im Schlicker dispergiert. Bei der Herstellung des Schlickers zeigte es sich als vorteilhaft, das HA-Pulver auf die Oberfläche des als Dispersionsmedium verwendeten Wassers aufzustreuen und sedimentieren zu lassen, sodass die Oberfläche der Partikel solvatisiert werden konnte. Durch Zugabe des HA-Pulvers zum Dispersionsmittel unter Rühren lag bereits bei einem Feststoffgehalt $< 15\%$ eine pastöse Masse vor. Dementsprechend konnte durch Aufstreuen des HA-Pulvers und eine Sedimentationszeit > 3 h ein Feststoffgehalt von $30,0\%$ im Schlicker realisiert werden, der dem Sprühtrockner mittels Schlauchpumpe zugeführt werden konnte.

Polyvinylalkohol wurde als klassisches Bindemittel verwendet. Da PVA sich bevorzugt in heißem Wasser löst wurde es zunächst in heißem Wasser gelöst und dem Schlicker dann aus wässriger Lösung zugegeben. Zur Evaluierung der geeigneten Bindemittelkonzentration wurden Schlicker mit einer PVA-Konzentration (bezogen auf den HA-Anteil) von 1, 2 und 5% hergestellt und sprühgetrocknet. Der Schlicker mit 1% PVA ließ sich störungsfrei sprühtrocknen, während sich die Sprühdüse beim Schlicker mit 2% PVA zum Ende des Sprühprozesses zweimal und beim Schlicker mit

5% PVA mehrfach zusetzte. Da die Zerstäuberdüse des Sprühtrockners während des Sprühtrocknungsprozesses gerätebedingt heiß wurde, wurden die Schlicker bei Wiederholung auf 5 °C gekühlt, um das Verkleben des PVA in der heißen Düse zu verhindern. Durch die Kühlung konnte der Schlicker mit 2% PVA störungsfrei sprühtrocknet werden, während beim Schlicker mit 5% PVA die Sprühdüse wiederum wiederholt zugesetzt war. Wie in Tabelle 3-5 und Abbildung 3-13 dargestellt, zeigte sich bei zunehmenden PVA-Gehalt ein Anstieg der Partikelgröße des HA-Granulates und eine Reduzierung der Ausbeute. Die verminderte Ausbeute ergab sich dabei aufgrund von Schlickerverlust bei den notwendigen Reinigungsschritten und eines vermehrten Anhaftens zerstäubten Schlickers im Sprühzylinder.

Tabelle 3-5: Kenndaten sprühtrockneter HA-Granulate

$\omega(\text{PVA})$ in %	Ausbeute in %	X_{10} in μm	X_{50} in μm	X_{90} in μm
1	93,5	$1,02 \pm 0,03$	$4,13 \pm 0,07$	$14,44 \pm 0,58$
2	87,9	$1,43 \pm 0,03$	$7,83 \pm 0,61$	$21,79 \pm 1,23$
5	80,9	$3,57 \pm 0,13$	$15,22 \pm 0,16$	$29,16 \pm 0,69$
HA-Bulkware	-	0,93	3,41	9,51

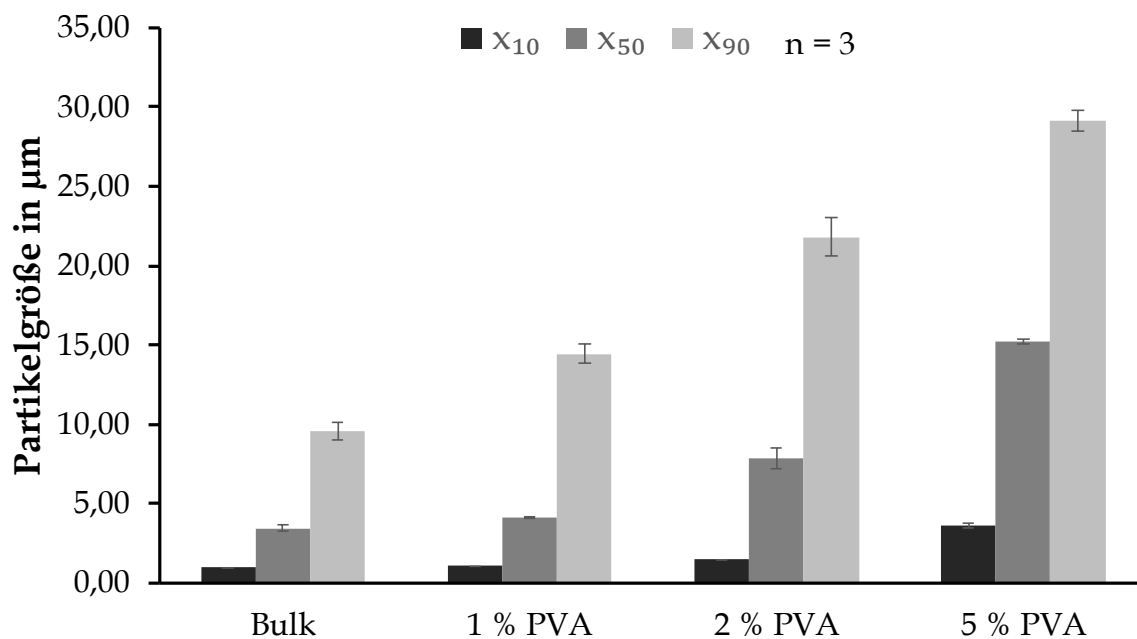


Abbildung 3-13: Partikelgrößenbestimmung von HA-Bulkware und sprühtrockneten HA-Granulaten mittels Laserbeugung

3.6.3.2 Bruchkraftbestimmung von Presslingen aus HA-Granulat

Zur Evaluierung des Einflusses der untersuchten Bindemittelkonzentrationen auf die Stabilität des HA-Gefüges wurden von jedem HA-Sprühgranulat 3 Presslinge mit einer Masse von 4,00 g und einer Presskraft von 40 kN zu Presslingen kompaktiert und deren diametrale Bruchkraft bestimmt. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine zunehmende Bruchkraft mit ansteigendem Bindemittelgehalt, wie in Abbildung 3-14 dargestellt. Bereits der Zusatz von 1% PVA führte zu einer Bruchkraftsteigerung von > 500% gegenüber Presslingen aus reiner HA-Bulkware. Da das HA-Granulat mit einem Bindemittelanteil von 5% zwar die höchste Bruchkraft aufwies, der Sprühtrocknungsprozess jedoch nicht störungsfrei durchgeführt werden konnte, wurde das HA-Granulat mit einem Bindemittelgehalt von 2% PVA im Folgenden als Standardformulierung eingesetzt.

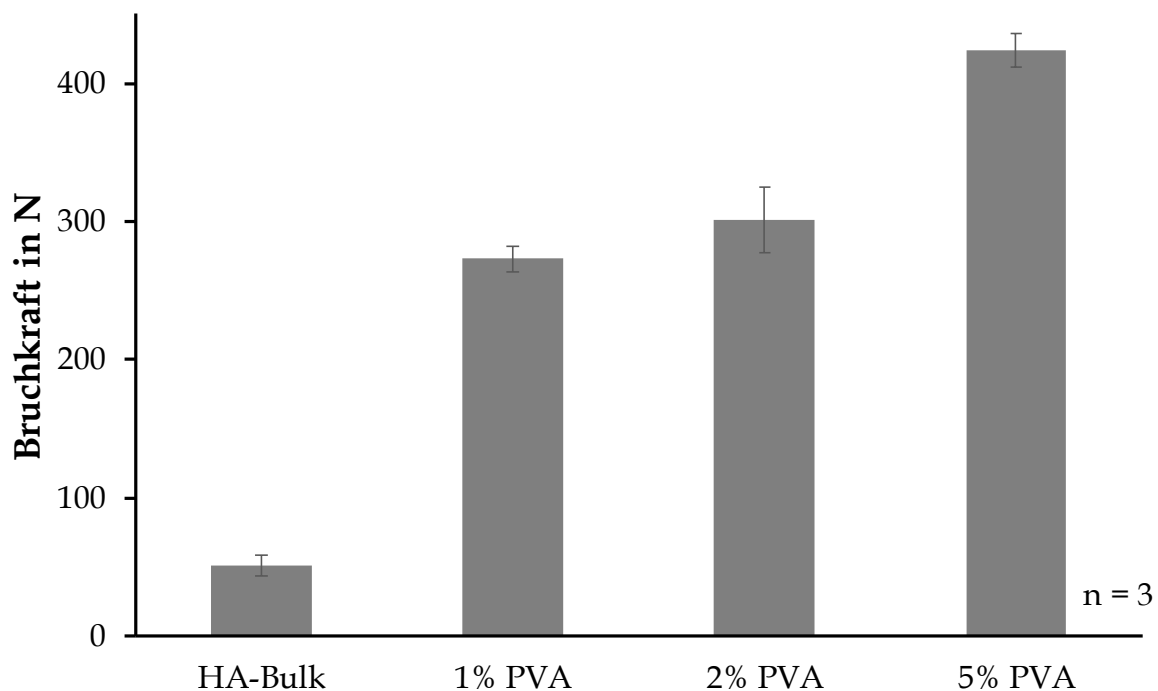


Abbildung 3-14: Diametrale Bruchkraft von Presslingen

3.6.3.3 Kompaktierung von HA-Granulat und MCC-Pellets

Die sprühgetrockneten HA-Granulate zeigten gegenüber der HA-Bulkware eine deutlich verbesserte Fließfähigkeit (Kapitel 3.6.6.1) und keine Neigung zur interpartikulärer Agglomeration aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen. Dementsprechend konnten die HA-Granulate durch Mischung mit Pellets im Freifallmischer nicht auf der Oberfläche der Pellets agglomeriert werden, sodass keine homogene Mischgüte erreicht werden konnte. Somit war auch eine homogene Verteilung von Pellets innerhalb der Grünlinge nicht realisierbar, da sich die Pellets und das HA-Granulat beim Einfüllen in das Presswerkzeug stark entmischten.

Dementsprechend galt es nachfolgend HA-Bulkware und PVA als Bindemittel so aufzubereiten, dass das gering konzentrierte Bindemittel homogen mit der HA-Bulkware gemischt war und die Entmischung der aufbereiteten HA-Bulkware und der Pellets minimiert wurde.

3.6.4 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von MCC-Pellets und händisch granuliertem HA-Granulat

Neigt ein Gemenge aufgrund von Partikelgrößenunterschieden der Komponenten zur Entmischung, kann durch Angleichung der Partikelgrößen die Entmischungstendenz reduziert werden [14]. Daher sollte HA-Bulkware zu einem Granulat aggregiert werden, dessen Granulatkörner eine den Pellets entsprechende Partikelgröße aufweisen. Dabei wurde eine Aggregation im Sinne einer Klebstoffgranulation angestrebt. Die Verfahren der Trockengranulierung und der Feuchtgranulierung mit Lösungsmitteln erschienen aufgrund der geringen plastischen Verformbarkeit, des hohen Schmelzpunktes und der geringen Löslichkeit von Hydroxylapatit in Wasser und gängigen organischen Lösungsmitteln als ungeeignet. Die händische Aggregation von HA-Bulkware zu einem Klebstoffgranulat mit einer der Pellets entsprechenden Partikelgröße erwies sich jedoch als nur bedingt möglich, da aufgrund der großen Oberfläche der HA-Bulkware ($76,96 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) so viel Granulierflüssigkeit zur Bindung der HA-Partikel vonnöten war, dass die Granulermischung letztlich als gummiartige Masse vorlag, die sich nur schwerlich zu einem Granulat ausformen ließ. Weiterhin zeigte das Granulat aufgrund seines hohen Bindemittelanteils eine so geringe plastische Verformbarkeit, dass die Granulatkörner im Grünling nahezu unverformt vorlagen, wie in Abbildung 3-15 beispielhaft dargestellt (30% Pelletanteil, 60 kN Presskraft), und somit keine kohärente und homogene HA-Struktur dargestellt werden konnte.

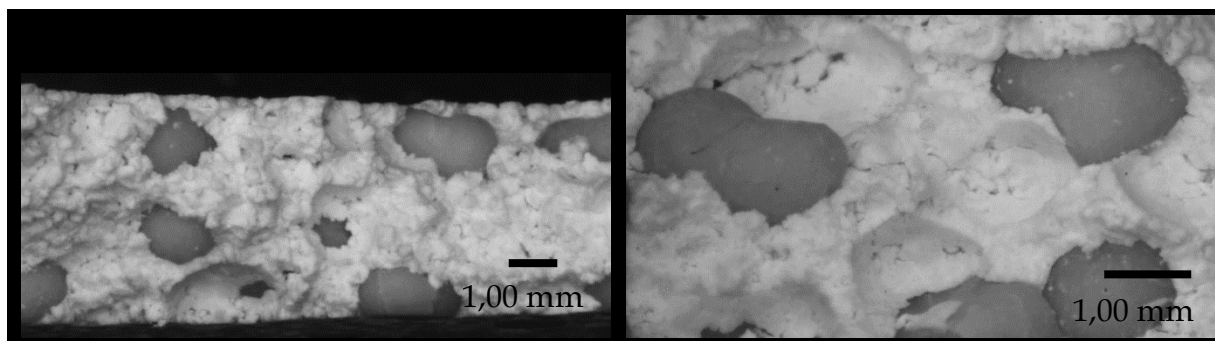


Abbildung 3-15: Grünlinge aus händisch granuliertem HA-Granulat
Links: Grünling im Querschnitt, 25fache Vergrößerung
Rechts: Grünling im Querschnitt, 50fache Vergrößerung

3.6.5 Formgebung von Scaffolds durch Kompaktierung von überzogenen Pellets

Da in Kapitel 3.6.3.2 gezeigt werden konnte, dass bereits ein geringer Zusatz von Bindemittel die Stabilität der HA-Struktur deutlich verbessern konnte, die sprühtrockneten Granulate sich jedoch nicht homogen mit den als Porogen verwendeten Pellets mischen ließen, wurden die Pellets direkt mit dem wässrigen Schlicker überzogen. So sollte einerseits eine homogene Mischung des Bindemittels und der HA-Bulkware realisiert und andererseits durch das Überziehen der Pellets mit einer definierten Menge an bindemittelhaltiger HA-Bulkware eine Entmischung verhindert werden.

So wurden Pellets mit wässrigem HA-Schlicker (30% HA (m/m), 2% PVA (m/m)) im Dragierkessel überzogen, bis der Pelletanteil im Dragiergut 35% betrug. Bei einer Masse von mindestens 150 g Pellets konnte eine freie Gutbewegung im Dragierkessel und eine homogene Verteilung des anteilsweise aufgegebenen Schlickers erreicht werden. Abbildung 3-16 zeigt links vergleichend MCC-Pellets vor und nach Überziehen mit HA-Schlicker. Rechts ist ein überzogenes Pellet nach Trocknung dargestellt, bei dem die getrocknete Schlickerhülle partiell entfernt wurde. Zwischen Hülle und Kern ist ein Spalt zu erkennen. Offenbar ist das Pellet durch Zugabe des wässrigen Schlickers gequollen und weist nach Trocknung eine entsprechende Schwindung auf. Die Schlickerhülle war nach Trocknung der überzogenen Pellets hart und brüchig.

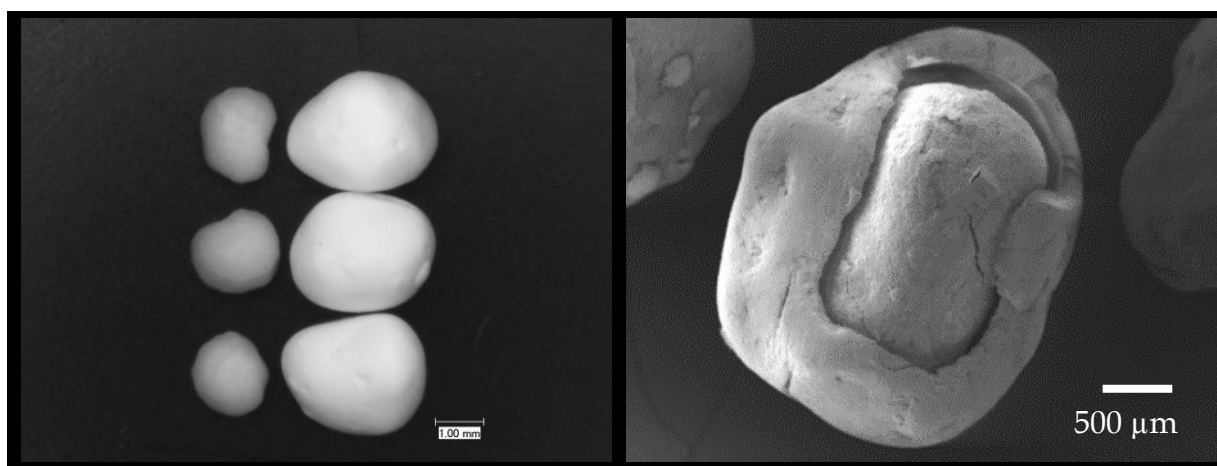


Abbildung 3-16 Dragierung von MCC-Pellets mit HA-Suspension
Links: MCC-Pellets (links), überzogene Pellets (rechts)
Rechts: Überzogenes Pellet, partiell freipräpariert

Um die Plastizität des Polyvinylalkohols und somit auch die plastische Verformbarkeit der Schlickerhülle durch Wasseraufnahme zu erhöhen, wurden überzogene Pellets zunächst bei unterschiedlichen Luftfeuchten (siehe Kapitel 3.5.4.2) konditioniert und mit einer Presskraft von 30 kN und 60 kN zu Grünlingen verpresst. Es wurde erwartet, dass ein steigender Wassergehalt die plastische Verformbarkeit der Schlickerhülle erhöht und diese sich somit bei der Kompaktion stärker deformieren lässt. Da durch eine vergrößerte Kontaktfläche zwischen den jeweiligen Hüllen die Ausbildung einer größeren Anzahl an kohäsiven Bindungen und Bindemittelbrücken möglich ist, wurde von einer ansteigenden Stabilität des HA-Gefüges ausgegangen. Zur Beurteilung des Einflusses der Feuchte auf die plastische Verformbarkeit der Schlickerhülle wurden alle Grünlinge bis zur Massenkonstanz getrocknet und ihre diametrale Bruchkraft bestimmt. Abbildung 3-17 zeigt vergleichend die entsprechenden Bruchkräfte der jeweiligen Grünlinge, wobei auf der Abszisse der Wassergehalt der jeweiligen Pellets zum Zeitpunkt ihrer Kompaktierung zu Grünlingen aufgetragen ist. Es lässt sich erwartungsgemäß erkennen, dass ein erhöhter Wasseranteil in den überzogenen Pellets mit einer Erhöhung der Bruchkraft korreliert.

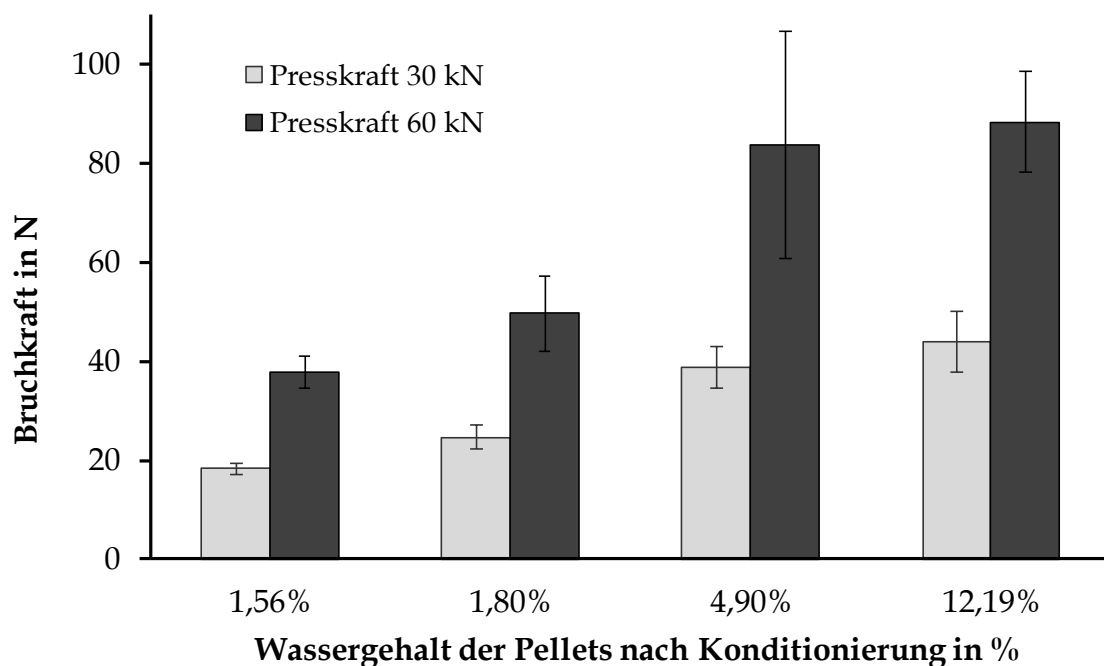


Abbildung 3-17: Bruchkraftbestimmung - Grünlinge aus überzogenen Pellets

Die bessere plastische Verformbarkeit ließ sich auch visuell beobachten. So konnte durch einen erhöhten Wassergehalt das Hohlräumvolumen zwischen den kompaktierten überzogenen Pellets deutlich reduziert werden. Weiterhin ließ sich erkennen, dass durch die Kompaktion von überzogenen Pellets eine homogene Verteilung der Pellets innerhalb des Grünlings erreicht werden konnte. Wie in Abbildung 3-18 exemplarisch gezeigt, konnten die Schlickerhüllen jedoch nicht vollständig verformt werden, sodass sie in den gesinterten Scaffoldstrukturen noch als individuelle, durch feine Fugen (Pfeile) separierte Einheiten zu erkennen waren. Somit konnte durch die Kompaktierung von überzogenen Pellets zwar eine homogene Verteilung der als Porogen verwendeten MCC-Pellets erreicht werden, die Ausbildung einer homogenen und kohärenten HA-Struktur um die Poren ließ sich jedoch nur bedingt realisieren.

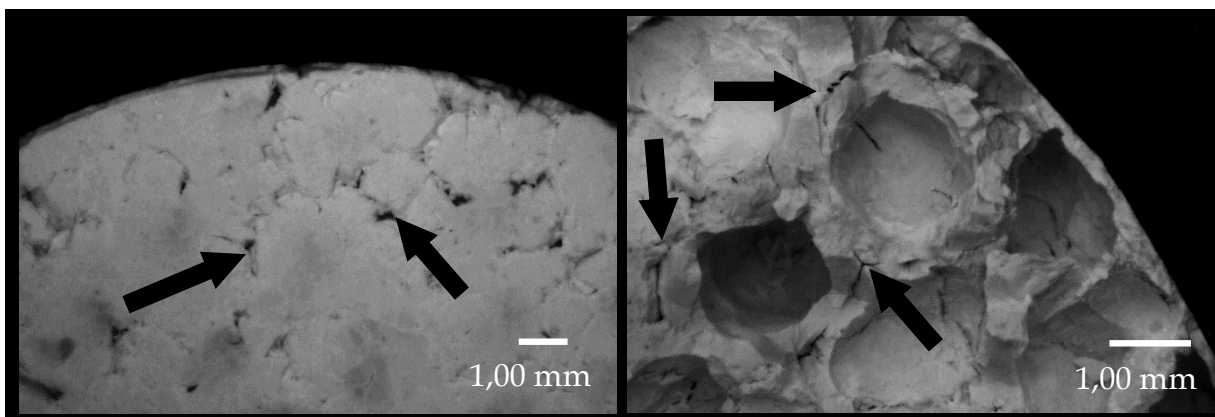


Abbildung 3-18: Kompaktierte überzogene MCC-Pellets
 Links: Grünling in Aufsicht (4,90% Feuchte, 60 kN)
 Rechts: Präparierte Scaffoldstruktur (4,90% Feuchte, 60 kN)

Da sich Porogene zur Herstellung makroporöser Strukturen zwar grundsätzlich eignen, eine vollständige Interkonnektion der Poren jedoch nur bedingt realisierbar war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Wie in Kapitel 3.6.3.2 gezeigt werden konnte, führte der Zusatz von PVA als Bindemittel zur deutlichen Erhöhung der mechanischen Festigkeit der Presslinge, die sich bereits im ungesinterten Zustand hervorragend bearbeiten ließen. So sollte die Scaffoldherstellung nun in einem zweistufigen Prozess erfolgen, bei dem zunächst biplane Rohlinge mit einer homogenen, mikroporösen HA-Struktur hergestellt werden sollten, in die es im zweiten Prozessschritt eine makroporöse Struktur mit geeigneten Verfahren einzubringen galt.

3.6.6 Formgebung von Scaffolds durch zerspannende Strukturierung von porogenfreien, gesinterten Presslingen aus HA-Granulat

Durch die Zergliederung des Herstellungsverfahrens makroporöser Scaffolds in einen zweistufigen Prozess, sollten die Einzelprozesse der Fertigung mikroporöser Rohlinge und deren nachfolgende Strukturierung unabhängig voneinander geführt werden können. Eine Rissbildung in der mikroporösen HA-Struktur und eine unvollständige Interkonnektion der makroporösen Struktur sollten somit verhindert werden. Da bei dem zweistufigen Prozess die makroporöse Struktur durch definierte Zerspannung der Rohlinge eingebracht werden sollte, entfiel die Verwendung eines Porogens, wodurch das HA-Granulat direkt zu biplanen Rohlingen verpresst werden konnte. Um die Prozesse in Hinsicht auf ein Scale-up beziehungsweise eine partielle Prozessautomatisierung optimieren zu können, galt es zunächst den Einfluss der Formulierung des Granulates, der Kompaktierung und des Sinterprozesses auf die mikroporöse Struktur der Rohlinge zu evaluieren.

3.6.6.1 Fließverhalten und Kompressibilität von Bulkware und Sprühgranulat

Im Allgemeinen sollte ein Haufwerk einerseits gut fließfähig sein, damit es während des Prozesses adäquat gefördert werden kann und andererseits eine geringe Kompressibilität aufweisen, um mit hoher Dosiergenauigkeit volumetrisch dosiert werden zu können [14,126]. Der Böschungswinkel (siehe Kapitel 3.5.6.1) eines Haufwerkes korreliert zumeist mit dessen Fließverhalten und nimmt mit zunehmender Kohäsivität des Haufwerks zu. Während der Böschungswinkel von HA-Bulkware durchschnittlich $47,5^\circ$ betrug und somit auf eine geringe Fließfähigkeit hinwies, zerstäubte das Sprühgranulat (2% PVA) bei Auftreffen auf die Grundfläche und bildete keinen messbaren Kegel aus. Hingegen zeigte die pulverrheologische Untersuchung der Proben (siehe Kapitel 3.5.6.10) sowohl für die Sprühgranulate, als auch für die HA-Bulkware eine sehr geringe Basic flow ability energy (BFE), wie in Abbildung 3-19 dargestellt, wobei die BFE die Energie ist, die aufzubringen ist, damit ein Rührflügel definierter Geometrie mit einer definierten Umdrehungszahl und vertikaler Geschwindigkeit durch ein Haufwerk geführt werden kann.

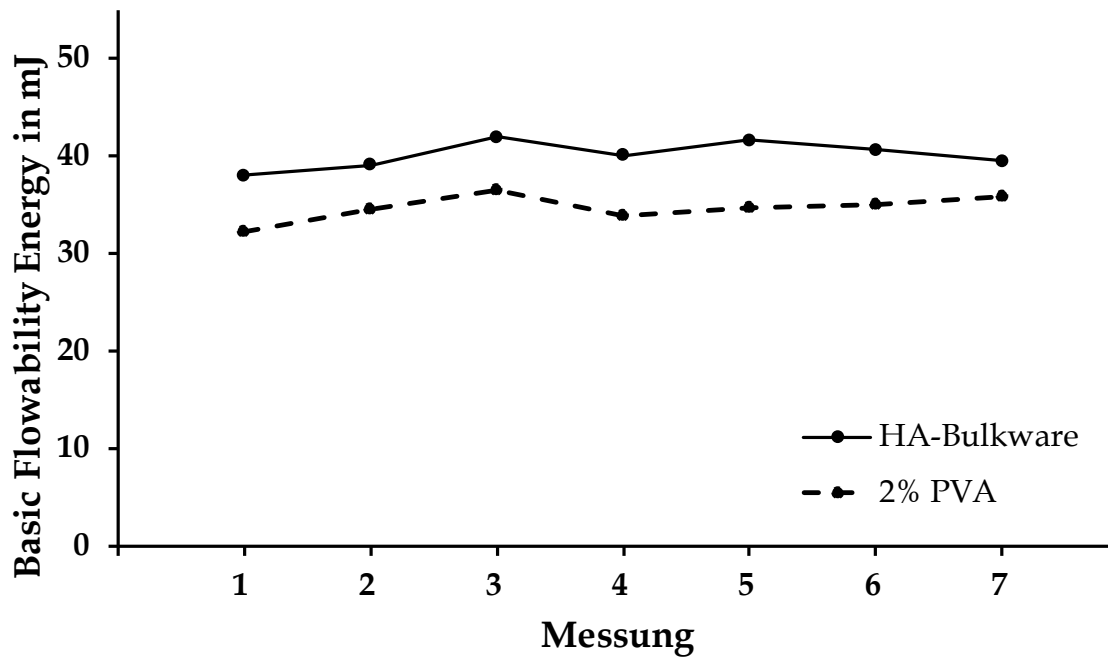


Abbildung 3-19: Basic Flowability Energy von HA-Bulkware und HA-Granulat

Die niedrige BFE der HA-Bulkware lässt sich durch eine lose Anordnung der HA-Partikel und das daraus resultierende hohe Hohlraumvolumen erklären. So können die Partikel leicht aneinander vorbeigleiten, wenn der Rührflügel durch das Pulverbett geführt wird. Das Sprühgranulat zeigt hingegen eine noch geringere BFE, die sich durch die Aggregation von Partikeln durch Klebstoffbrücken und die Reduzierung von XYZ-Wechselwirkungen erklären lässt. Durch die Aggregation der HA-Partikel konnte weiterhin die Schüttdichte erhöht und die Kompressibilität gegenüber der HA-Bulkware erniedrigt werden (Tabelle 3-6). Zwar wird einem Haufwerk mit einem Hausner-Faktor von 1,32 ein mäßiges Fließverhalten zugeschrieben (Ph. Eur. 7 - 2.9.36-2), jedoch ließ sich das Sprühgranulat hervorragend in das Presswerkzeug überführen und verteilte sich in diesem anstandslos.

Tabelle 3-6: Pulvercharakterisierung -Bulkware und Sprühgranulat (2% PVA)

	Stability Index	MW _{BFE} in mJ	Schüttdichte in g · mL ⁻¹	HF
HA-Bulkware	1,04	40,12	0,22	1,56
2% PVA	1,11	34,69	0,42	1,32

3.6.6.2 Einfluss der Sintertemperatur auf Partikelhabitus und Presslinggefüge

Zur Bestimmung des Einflusses der Sintertemperatur auf den Partikelhabitus des verwendeten HA-Sprühgranulates wurden unbehandelte HA-Bulkware sowie sprühgetrocknetes HA-Granulat und aus HA-Granulat hergestellte Grünlinge bei verschiedenen Temperaturen (siehe Tabelle 3-7) gesintert und visuell mittels Raster-elektronenmikroskop untersucht. Die spezifische Oberfläche der Pulver nach erfolgter Sinterung wurde mittels BET bestimmt. Die REM-Aufnahmen der unbehandelten HA-Bulkware und des unbehandelten HA-Granulats (Abbildung 3-20) lassen agglomerierte, aber individuelle Partikel erkennen. Bei Erhitzen der Pulver nahm die Schwindung der Partikel zu, sodass sich ihre Oberfläche verringerte und sie eine nahezu sphärische Form annahmen, wie bei Charge 018-5-3 deutlich zu erkennen ist. Wurde die Temperatur weiter erhöht, koaleszierten die Partikel und es bildeten sich Sinterbrücken aus, wie bei Charge 018-5-4 deutlich zu erkennen ist. So lagen die HA-Partikel nach Erhitzung bei 1000°C als zusammenhängender, wenn auch fragiler, Kuchen vor, während die Partikel bei 900°C noch ein weitgehend fließfähig waren. Im weiteren Temperaturverlauf bildeten sich durch die Verdichtung der Partikel zunächst Porenkanäle aus, die durch weiteres Kornwachstum verringert und final nahezu vollständig eliminiert wurden, wie bei Charge 018-5-7 eindrucksvoll zu erkennen ist.

Tabelle 3-7: Chargenspezifische Prozessparameter

	Pulver-Charge	Grünling-Charge	Sintertemperatur in °C
HA-Bulk	018-5-1	018-5-8	unbehandelt
HA-Granulat	018-5-2	018-5-9	unbehandelt
HA-Granulat	018-5-3	018-5-10	900
HA-Granulat	018-5-4	018-5-11	1000
HA-Granulat	018-5-5	018-5-12	1100
HA-Granulat	018-5-6	018-5-13	1200
HA-Granulat	018-5-7	018-5-14	1300
Sinterdauer	120	min	
Heizrate	300	°Cmin ⁻¹	

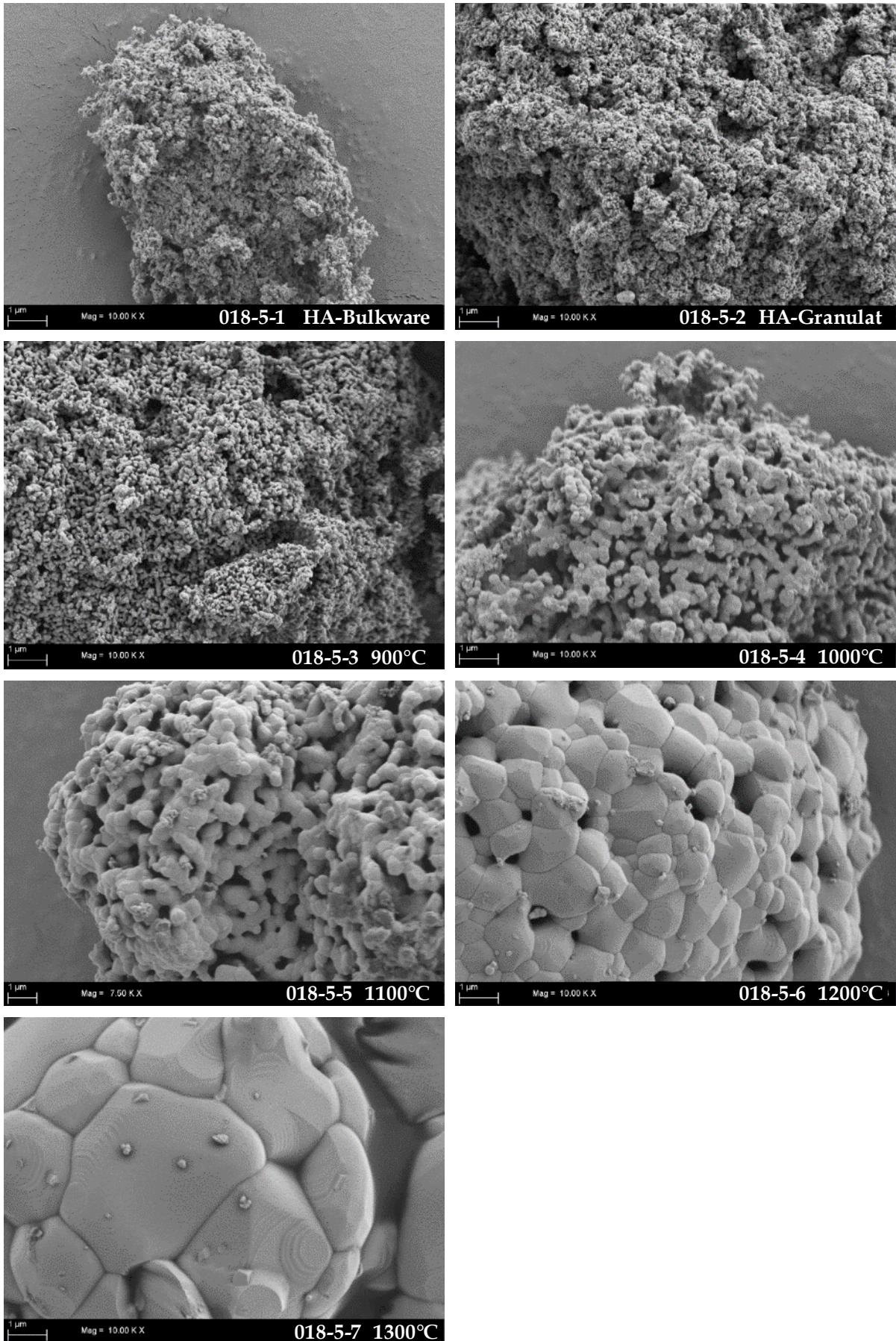


Abbildung 3-20: Unbehandelte und gesinterte HA-Partikel (REM-Aufnahmen)

Abbildung 3-21 zeigt sich mittels BET-Messung bestimmten spezifischen Oberfläche von gesinterten Proben. Die Chargen höherer Temperatur entfallen aufgrund materialbedingter Limitierung bei der Präparation der zusammengesinterten Kuchen. Die Abnahme der spezifischen Oberfläche korreliert mit der in den REM-Aufnahmen erkennbaren Koaleszenz der einzelnen Partikel und der Ausbildung von Sinterbrücken. Damit verbunden sind eine Reduktion der Porosität, eine ansteigende Schwindung und eine Zunahme der Härte der gesinterten Presslinge.

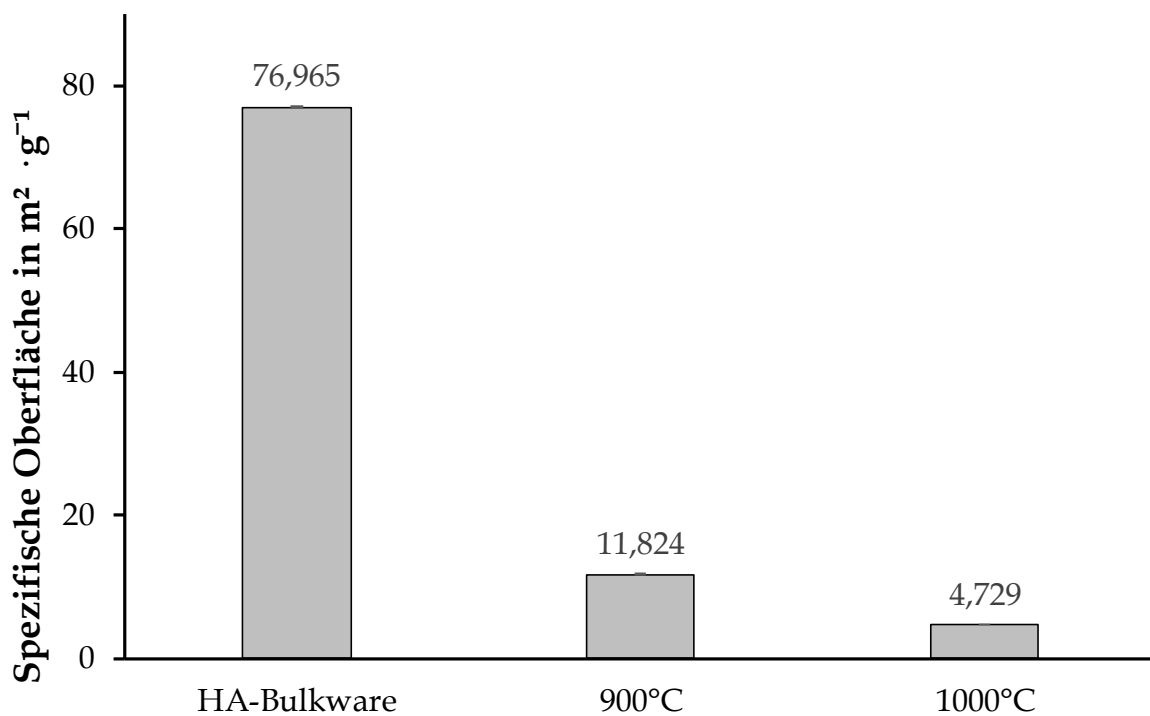
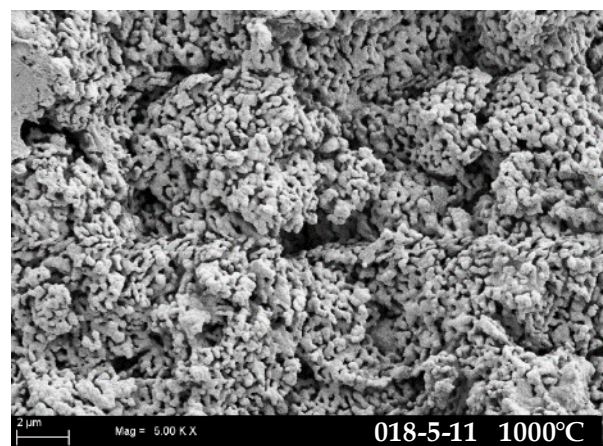
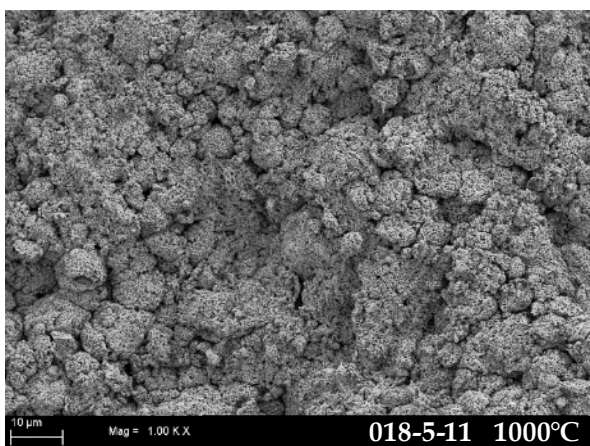
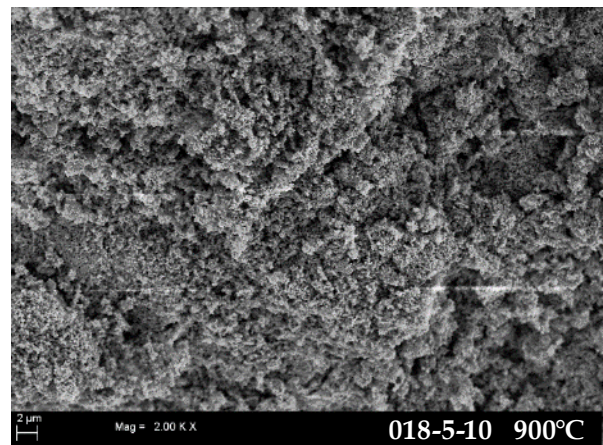
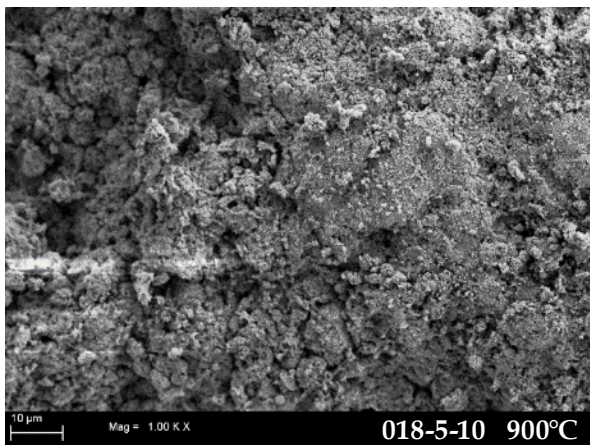
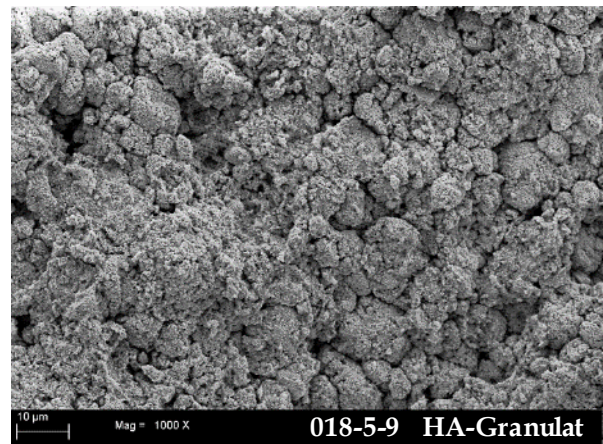
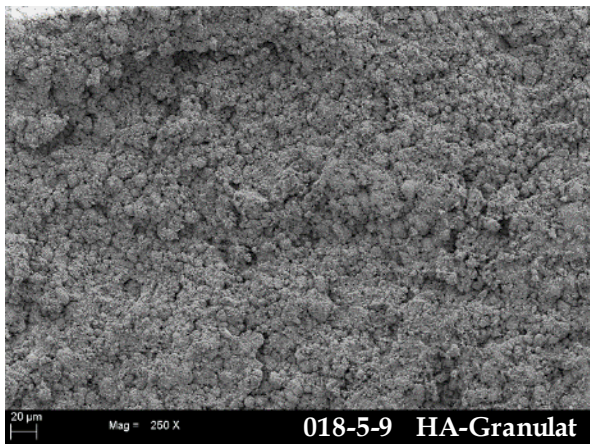
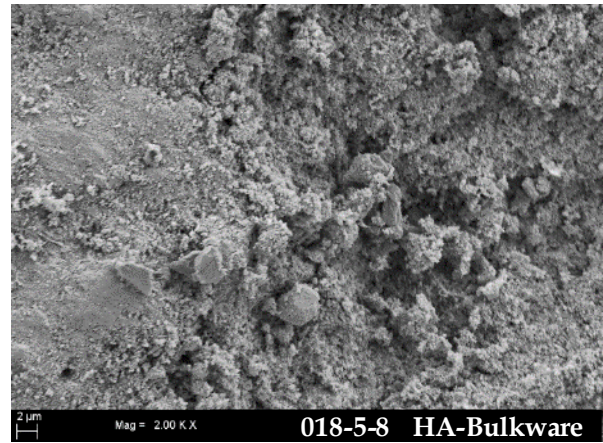
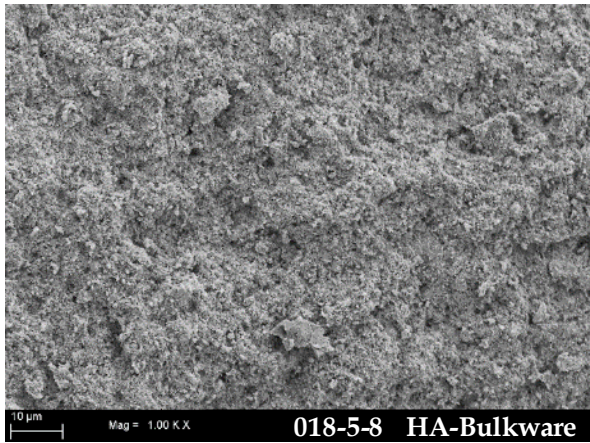


Abbildung 3-21: Bestimmung der spezifischen Oberfläche - BET-Messung

Allgemein sei bei der verwendeten HA-Bulkware darauf hingewiesen, dass sich die als HA-Partikel bezeichneten und hinsichtlich ihrer Partikelgröße vermessenen Körper aus nanometergroßen HA-Kristallen zusammensetzten. Sie waren in der Struktur der gesinterten Presslinge partiell als sphärische Einzelelemente zu erkennen (Abbildung 3-22). Da nach der Ultraschall-Dispergierung von HA-Bulkware in Miglyol 812 keine nanopartikulären Fragmente erkennbar waren und die HA-Partikel eine Partikelgröße von 1688 nm aufwiesen (bestimmt nach dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung), die der nach dem Prinzip der Laserbeugung bestimmten Partikelgröße entspricht, wurden die Partikel als mechanisch stabil erachtet.



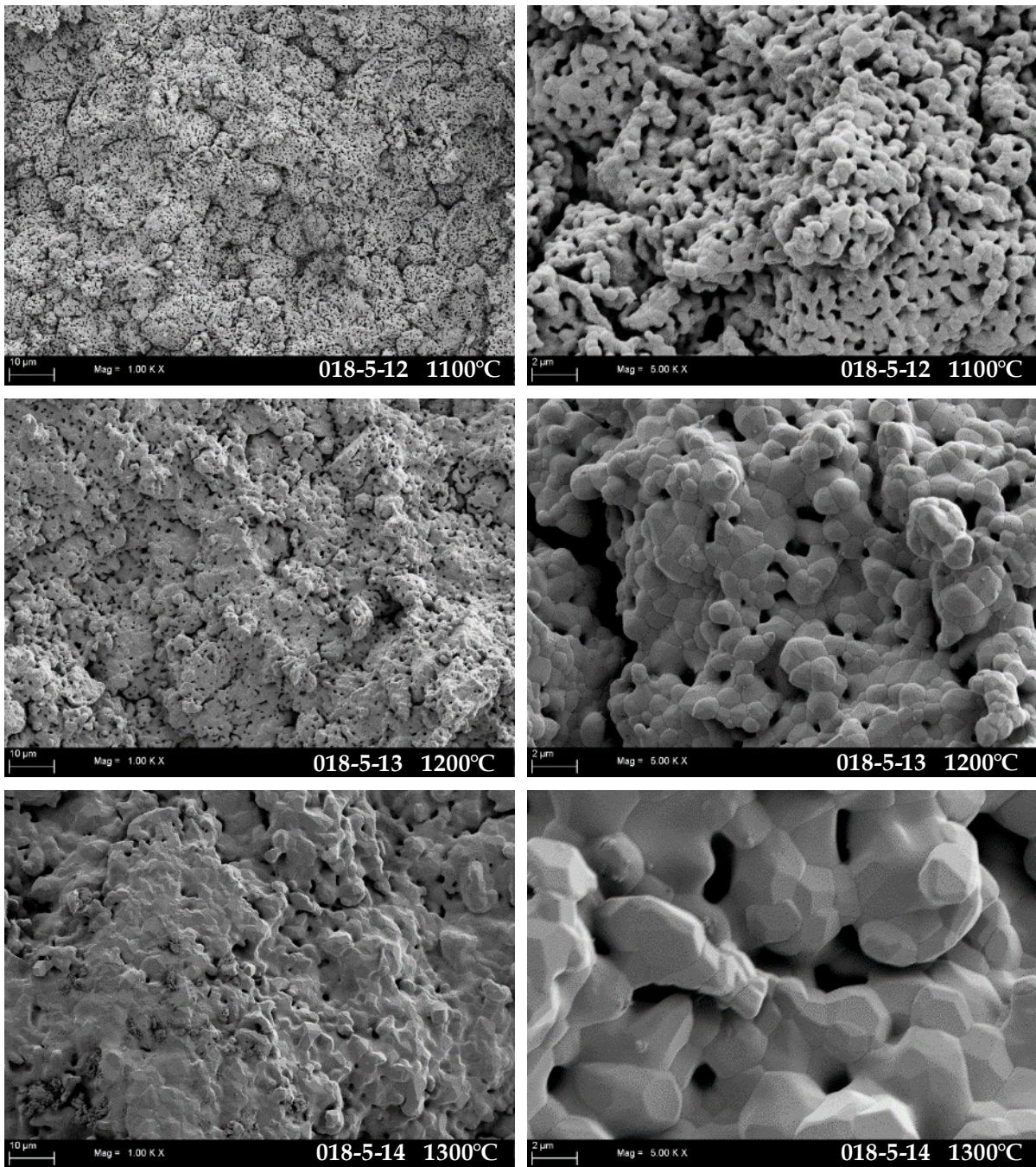


Abbildung 3-22: Unbehandelte und gesinterte Presslinge (REM-Aufnahmen)

Einhergehend mit der Temperaturerhöhung wird neben der Oberfläche auch die Kristallstruktur der HA-Partikel beeinflusst. Abbildung 3-23 zeigt vergleichend die Diffraktogramme von gesinterten HA-Granulaten. Es lässt sich erkennen, dass die Kalzinierung des HA-Granulates bei 900°C zur Reduzierung amorpher Anteile führt, wodurch die Kristallinität erhöht wird. Im Temperaturbereich bis 1300°C wurden mit zunehmender Temperatur zwar eine Intensitätsabnahme, jedoch keine Dekompo-

sition des Hydroxylapatits und keine charakteristischen Peaks der Hauptzersetzungsprodukte [163,164] β -Tricalciumphosphat CP bei circa 31° und CaO bei circa 37° detektiert.

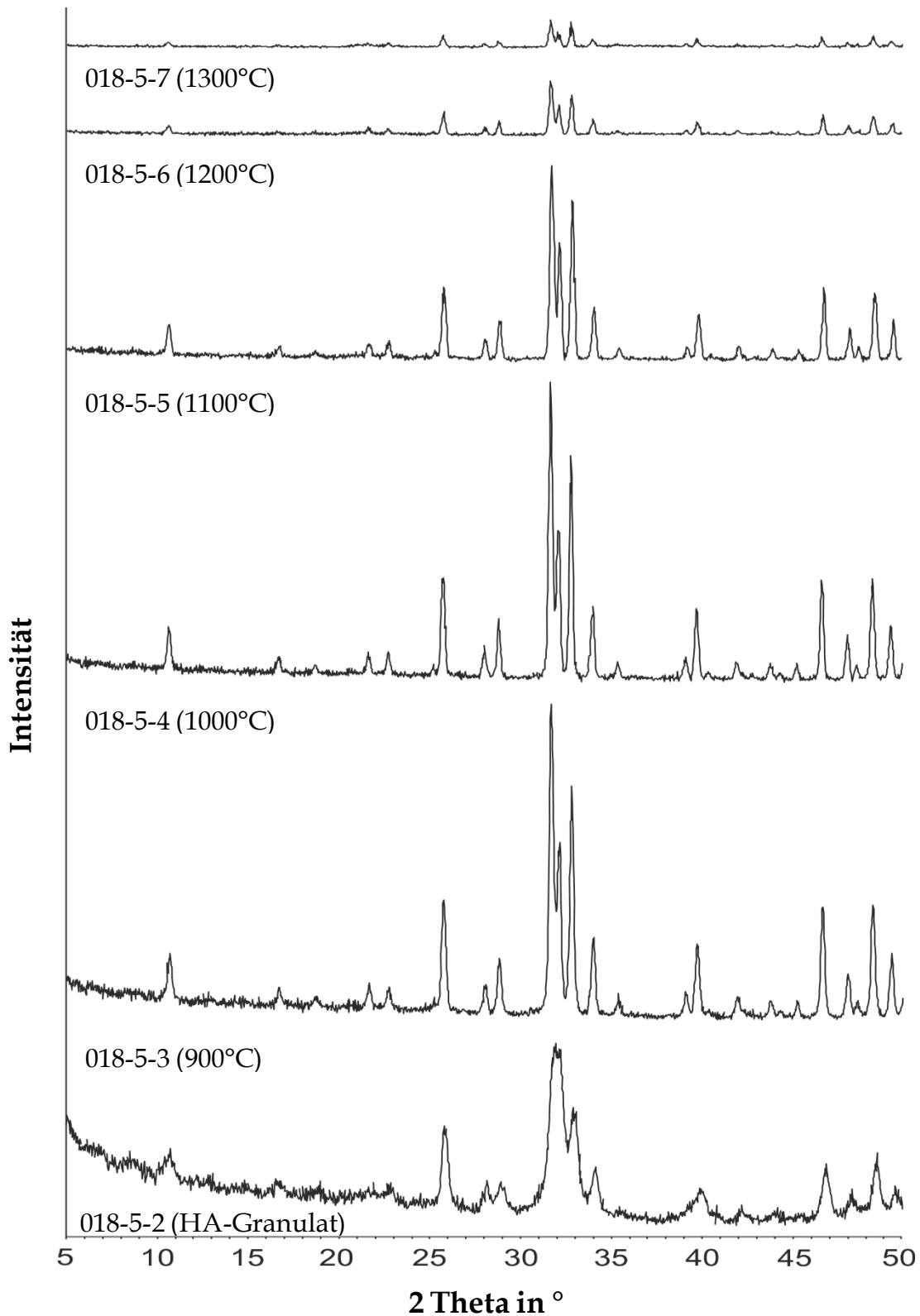


Abbildung 3-23: Röntgendiffraktogramm - gesintertes HA-Granulat

3.6.7 Prozessoptimierung zur Einstellung der Mikroporosität in Rohlingen

Die Mikroporosität eines gesinterten Werkstücks ergibt sich allgemein durch die Geometrie des genutzten Ausgangsmaterials, dessen Verdichtungsgrad im Grünling und den Sinterprozess [138]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die systematische Untersuchung des Einflusses des Sinterprozesses und der Kompaktion auf die mikroporöse Struktur der Rohlinge statistische Versuchsplanung genutzt. Dabei galt es auch den Einfluss der Faktoren auf die Schwindung der Rohlinge während des Sinterns zu untersuchen. Zunächst wurde ein vollfaktorieller Versuchsplan erstellt und ausgewertet, um die Prozessfaktoren zu ermitteln, die einen signifikanten Einfluss auf die Mikroporosität der Rohlinge haben. Nachfolgend wurde für die signifikanten Faktoren ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan erstellt, um den Effekt der jeweiligen Faktoren zu bestimmen. Auf Grundlage des zentral zusammengesetzten Versuchsplanes wurden Wirkungsflächenpläne erstellt, die eine Optimierung der Prozesse und somit die definierte Einstellung der gewünschten Mikroporosität innerhalb der Rohlinge ermöglichen. Die Beurteilung der Güte der durch Design Expert® berechneten Modelle erfolgte anhand der in Tabelle 3-8 aufgeführten Parameter.

Tabelle 3-8: Parameter zur Beurteilung berechneter Modelle

Modell - p-Wert	Ein niedriger p-Wert ($\leq 0,05$) zeigt an, dass die Effekte im Modell die Zielgröße signifikant beeinflussen
Lack of fit - p-Wert	Ein niedriger p-Wert ($\leq 0,05$) zeigt an, dass das berechnete Modell die Messdaten nicht adäquat beschreibt
Adjusted R²	Ein hoher Wert zeigt an, dass die Messdaten nur gering um die vorhergesagten Daten streuen (theoretisch maximal 1,0 möglich)
Predicted R²	Ein hoher Wert zeigt an, dass sich mit dem berechneten Modell künftige Daten gut vorhersagen lassen. Liegt eine große Differenz zu adjusted R ² vor, sind Messdaten oder das berechnete Modell eingehend zu prüfen (theoretisch maximal 1,0 möglich)
Adequate Precision	Ein hoher Wert (> 4) deutet auf ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis zwischen vorhergesagten Messdaten und Vorhersagefehler hin

3.6.7.1 Evaluierung signifikanter Prozessfaktoren - Vollfaktorieller Versuchsplan

Für die Faktoren Sintertemperatur, Sinterdauer, Heizrate und die zur Kompaktion von HA-Granulat zu Grünlingen aufgebrauchte Presskraft wurde ein vollfaktorieller Versuchsplan mit den in Tabelle 3-9 aufgeführten Faktorstufen erstellt. Die Minima (-1) und Maxima (+1) der Faktoren bildeten dabei die Eckpunkte des Versuchsraumes ab, wie in Abbildung 3-24 am Beispiel eines vollfaktoriellen Versuchsplans mit drei Faktoren dargestellt. Ein Zentralpunkt (0) (graphisch nicht dargestellt) wurde hinzugefügt, um einen etwaigen nicht-linearen Zusammenhang zwischen den Faktoren zu ermitteln und um ein Maß für die Prozessstabilität und -variabilität zu erhalten [160].

Tabelle 3-9: Vollfaktorieller Versuchsplan - Faktoren und Faktorstufen

Faktor	-1	0	+1
Sintertemperatur in °C	900	1000	1100
Sinterdauer in min	1	90,5	180
Heizrate in °C · min ⁻¹	1	3,5	6
Presskraft in kN	20	40	60

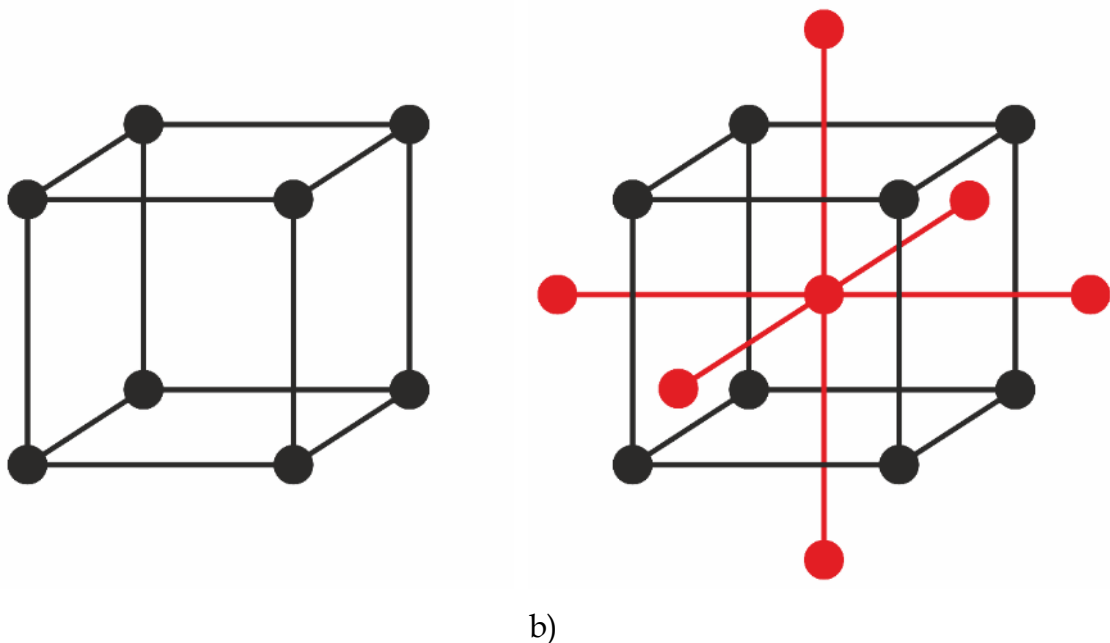


Abbildung 3-24: Schematische Darstellung der Versuchsräume statistischer Versuchspläne mit 3 Faktoren
a) Vollfaktorieller Versuchsplan
b) Zentral zusammengesetzter Versuchsplan

Der Versuchsplan umfasste somit 21 Einzelversuche, nämlich 16 an den Eckpunkten und 5 Wiederholungen am Zentralpunkt. Für jeden Einzelversuch wurden drei Scaffolds hergestellt und der Mittelwert aus der jeweils bestimmten Zielgröße in die Auswertung des Versuchsplans übernommen. Die Zielgrößen waren die prozentuale Schwindung und die Porosität der gesinterten Rohlinge. Die Bestimmung der Schwindung erfolgte durch Differenzbildung der diametralen Durchmesser der ungesinterten Grünlinge und der Rohlinge nach Sinterung (Kapitel 3.5.6.7), die der Porosität nach der in Kapitel 3.5.6.9 beschriebenen Methode. Das aus den Messdaten berechnete Modell für die Zielgröße Porosität wurde für einen besseren Fit transformiert (Power-Transformation; λ : 1,89). Aus der Auswertung der Messergebnisse ergaben sich für die beiden Zielgrößen Modelle, mit den in Tabelle 3-10 aufgelisteten statistischen Kenndaten.

Tabelle 3-10: Vollfaktorieller Versuchsplan - Statistische Kenndaten

	Porosität		Schwindung	
	p-Wert		p-Wert	
Modell	< 0,0001	signifikant	< 0,0001	signifikant
Curvature	< 0,0001	signifikant	0,7736	insignifikant
Lack of fit	0,2707	insignifikant	0,9929	insignifikant
A: Sintertemperatur	< 0,0001	signifikant	< 0,0001	signifikant
B: Heizrate	< 0,0001	signifikant	< 0,0001	signifikant
C: Sinterdauer	< 0,0001	signifikant	0,0013	signifikant
D: Presskraft	< 0,0001	signifikant		
Wechselwirkung AB	< 0,0001	signifikant	0,0005	signifikant
Wechselwirkung AC	0,0004	signifikant		
Adjusted R²	0,9747		0,9447	
Predicted R²	0,9699		0,9377	
Adequate Precision	42,2796		27,6481	

3.6.7.1.1 Vollfaktorieller Versuchsplan - Zielgröße Porosität

Aus den Kenndaten des für die Zielgröße Porosität berechneten Modells lässt sich ableiten, dass alle untersuchten Faktoren einen signifikanten Einfluss ($p < 0,0001$) auf die Porosität der Rohlinge hatten. Der insignifikante lack of fit weist darauf hin, dass sich die Messdaten mit dem berechneten Modell adäquat beschreiben lassen. Es besteht weiterhin ein nicht-linearer Zusammenhang zwischen den Faktoren. Die hohen Werte des adjusted und predicted R^2 zeigen, dass sich die Zielgröße durch die Messdaten gut beschreiben lässt und zukünftige Messdaten gut vorhersagbar sind. Des Weiteren konnte eine signifikante Wechselwirkung zwischen den Faktoren Sinter-temperatur und Heizrate ($p = <0,0001$) und zwischen den Faktoren Sinter-temperatur und Sinterdauer beobachtet werden ($p = 0,0004$). Der Effekt der einzelnen Faktoren ist in Abbildung 3-25 dargestellt, wobei darauf hingewiesen wird, dass ebendiese statische Abbildung stets nur eine Faktorkonstellation darstellen kann, in diesem Falle ist die des Zentralpunktes (O) gewählt. Allgemein gilt, dass die Erhöhung eines jeweiligen Faktors zur Abnahme der Porosität führt, wobei der Faktor Sinter-temperatur den größten Effekt und der Faktor Sinterdauer den geringsten Effekt hat.

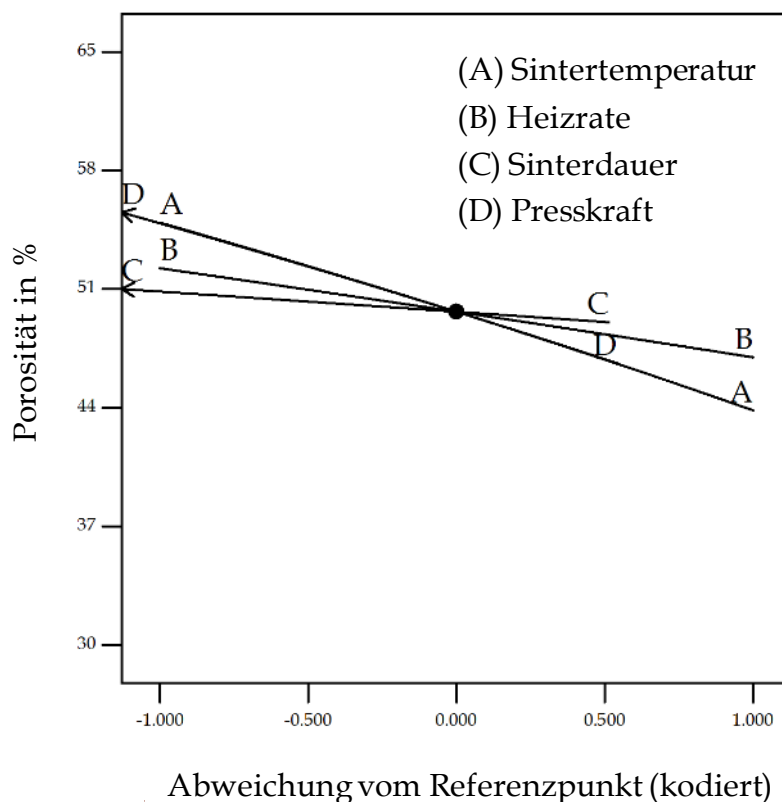


Abbildung 3-25: Einfluss der Faktoren auf die Zielgröße Porosität

3.6.7.1.2 Vollfaktorieller Versuchsplan - Zielgröße Schwindung

Die statistischen Kenndaten des Modells für die Zielgröße Schwindung (Tabelle 3-10) zeigen ein vergleichbar gutes Modell, mit dem sich der Einfluss der Faktoren und zukünftige Messdaten ebenfalls mit einer hohen Genauigkeit beschreiben und voraussagen lassen. Im Gegensatz zum Modell der Zielgröße Porosität zeigt sich jedoch ein linearer Zusammenhang zwischen den Faktoren. Hingegen zeigte sich, dass die Presskraft im untersuchten Bereich keinen signifikanten Effekt auf die Zielgröße Schwindung hatte, sodass sie nicht in die Auswertung einbezogen wurde und folglich nicht aufgeführt ist. Der Effekt der Faktoren Sintertemperatur, Heizrate und Sinterdauer sind in Abbildung 3-26 dargestellt, wobei auch hier die Faktorkonstellation des Zentralpunktes (O) gewählt ist. Es lässt sich erkennen, dass die Erhöhung der Faktoren mit einer Zunahme der diametralen Schwindung korreliert. Den größten Effekt zeigt wiederum die Sintertemperatur, während die Sinterdauer den geringsten Effekt aufweist. Weiterhin zeigt sich eine signifikante ($p = 0,0005$) Wechselwirkung für die Faktoren Sintertemperatur und Heizrate.

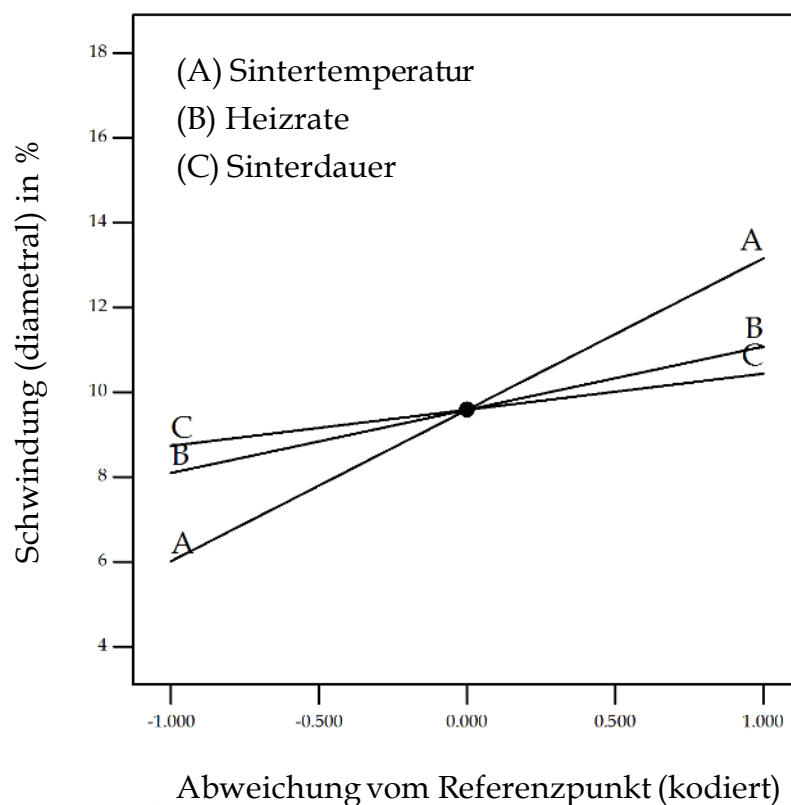


Abbildung 3-26: Einfluss der Faktoren auf die Zielgröße Schwindung

3.6.7.2 Zentral zusammengesetzter Versuchsplan

Mit dem vollfaktoriellen Versuchsplan konnte ermittelt werden, dass die Porosität durch alle untersuchten Faktoren signifikant beeinflusst wird. Die Schwindung der Presslinge hingegen wird durch die Presskraft nicht signifikant beeinflusst. Zwar hat die Sinterdauer einen signifikanten Einfluss auf beiden Zielgrößen, jedoch ist dieser gering, sodass der Faktor Sinterdauer nicht mit in den zentral zusammengesetzten Versuchsplan aufgenommen wurde, um die Anzahl der Einzelversuche sinnvoll limitieren zu können. In nachfolgenden Einzelversuchen wurde die Sinterdauer konstant bei 60 min gehalten. Nach Ermittlung der signifikanten Faktoren und ihrer Wechselwirkungen sollte das untersuchte System optimiert werden, um die jeweils optimale Parametereinstellung der Faktoren ermitteln zu können, die für die vom Anwender geforderte Porosität oder Schwindung der Presslinge einzustellen sind.

Um ein adäquates mathematisches Modell und einen Wirkungsflächenplan für die jeweilige Zielgröße erstellen zu können, wurde für die Faktoren Presskraft, Heizrate und Sintertemperatur ein Versuchsplan mit zentral zusammengesetztem Versuchsdesign erstellt (Abbildung 3-24 b). Der Plan umfasst ein 2^3 -faktorielles Versuchsdesign mit einem Zentralpunkt, dem zur Ermittlung etwaiger quadratischer Effekte Sternpunkte hinzugefügt wurden. Der Versuchsplan umfasste somit 20 Einzelversuche, nämlich 8 Eckpunkte (-1/+1), 6 Sternpunkte ($-\alpha$ / $+\alpha$) und 6 Wiederholungen am Zentralpunkt (0). Die jeweiligen Faktorstufen sind in Tabelle 3-11 aufgeführt. Um einen möglichst großen Versuchsraum abbilden zu können, wurden in Vorversuchen die minimal erforderlichen Parameter zur Herstellung mechanisch stabiler Scaffolds ermittelt und die Faktorstufen der Sternpunkte entsprechend angepasst.

Tabelle 3-11: Zentral zusammengesetzter Versuchsplan - Faktoren und Faktorstufen

Faktor	-α	-1	0	+1	+α
Sintertemperatur in °C	882	950	1050	1150	1218
Heizrate in °C · min ⁻¹	0,64	2	4	6	7,4
Presskraft in kN	13	25	42,5	60	72

Für jeden Einzelversuch wurden drei Scaffolds hergestellt und deren Mittelwert aus der jeweils bestimmten Zielgröße in die Auswertung des Versuchsplans übernommen. Das aus den Messdaten berechnete mathematische Modell für die Zielgröße Porosität wurde für einen besseren Fit transformiert (Power-Transformation; λ : 1,84). Aus der Auswertung der Messergebnisse ergaben sich für die beiden Zielgrößen mathematische Modelle mit den in Tabelle 3-12 aufgelisteten statistischen Kenndaten. Für die Zielgröße Porosität wurde ein Minimum von 16,88% und ein Maximum von 60,52% bestimmt. Die diametrale Schwindung der Scaffolds betrug zwischen 6,11% und 25,85%.

Tabelle 3-12: Zentral zusammengesetzter Versuchsplan - statistische Kenndaten

	Porosität		Schwindung	
	p-Wert		p-Wert	
Modell	< 0,0001	signifikant	< 0,0001	signifikant
Lack of fit	0.0002	signifikant	0.0016	signifikant
A: Sintertemperatur	< 0,0001	signifikant	< 0,0001	signifikant
B: Heizrate	< 0,0001	signifikant	< 0,0001	signifikant
C: Presskraft	< 0,0001	signifikant	0.0590	insignifikant
Wechselwirkung AB	0.0109	signifikant	0.0045	signifikant
A²	< 0.0001	signifikant	< 0.0001	signifikant
B²	0.0684	insignifikant	0.0075	signifikant
C²	0.0186	signifikant	0.3420	insignifikant
Adjusted R²	0,9850		0,9899	
Predicted R²	0,9412		0,9611	
Adequate Precision	46,0027		52,0549	

3.6.7.2.1 Zentral zusammengesetzter Versuchsplan - Zielgröße Porosität

Für die Zielgröße Porosität wurde auf Grundlage der Messdaten ein quadratisches Modell errechnet, das neben den bereits bestimmten signifikanten Faktoren A, B, C und AB auch die quadratischen Effekte A² ($p < 0,0001$) und C² ($p = 0,0186$) berücksichtigt. In Abbildung 3-27 ist der Effekt der Faktoren Sintertemperatur und Heizrate

auf die Zielgröße Porosität dargestellt. Mit zunehmender Sinter Temperatur sinkt die Porosität, was durch eine gesteigerte Oberflächen- und Korngrenzendiffusion [165] zu erklären ist, wodurch die Partikel verstärkt zusammensintern. Es lässt sich weiterhin erkennen, dass die Heizrate bei geringer Sinter Temperatur einen nur geringen Effekt auf die Porosität aufweist, der Effekt jedoch mit steigender Sinter Temperatur zunimmt und somit eine Wechselwirkung ($p < 0,019$) vorliegt. Der starke Abfall der Porosität bei zunehmender Sinter Temperatur ist durch den quadratischen Effekt A^2 zu erklären.

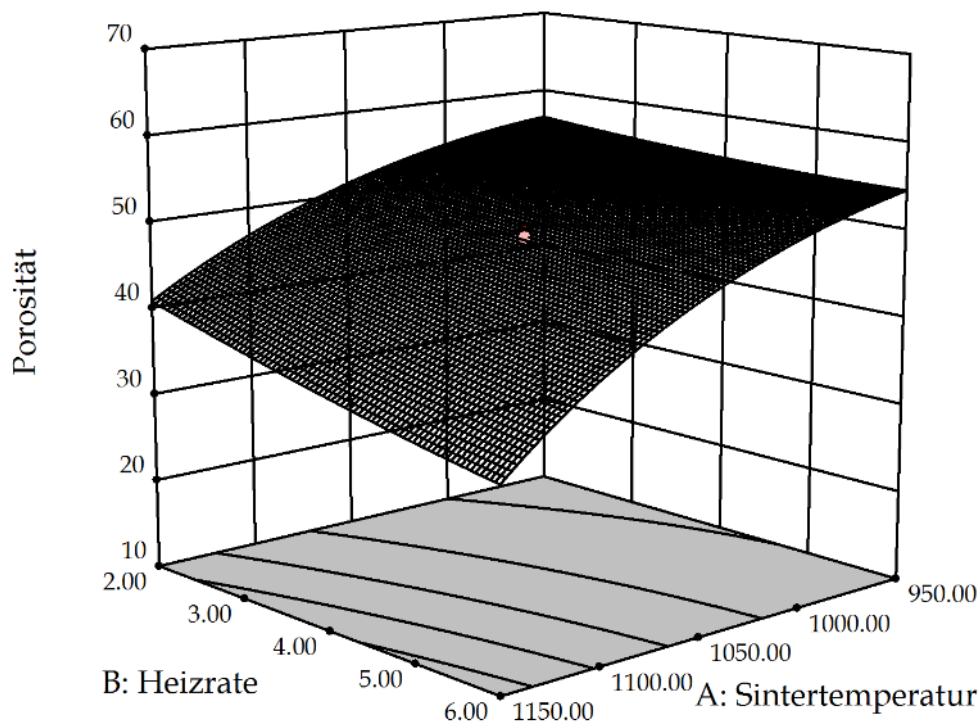


Abbildung 3-27: Einfluss von Heizrate und Sinter Temperatur auf die Porosität

Betrachtet man Abbildung 3-28 lässt sich erkennen, dass die Porosität mit ansteigender Presskraft abnimmt, was durch eine erhöhte Verdichtung der Partikel im Grünling zu erklären ist. Der Effekt der Sinter Temperatur ist jedoch wiederum stärker ausgeprägt.

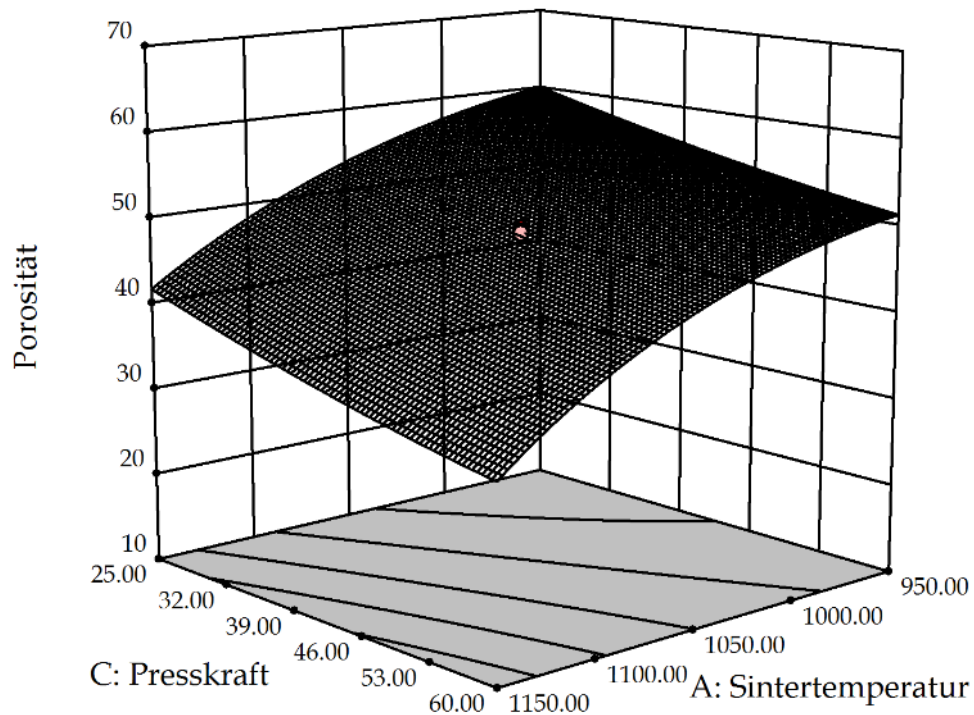


Abbildung 3-28: Einfluss von Presskraft und Sintertemperatur auf die Porosität

Betrachtet man die Faktoren Presskraft und Heizrate in Abbildung 3-29 lässt sich ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen den Faktoren erkennen. Die Presskraft zeigt einen höheren Effekt auf die Porosität als die Heizrate.

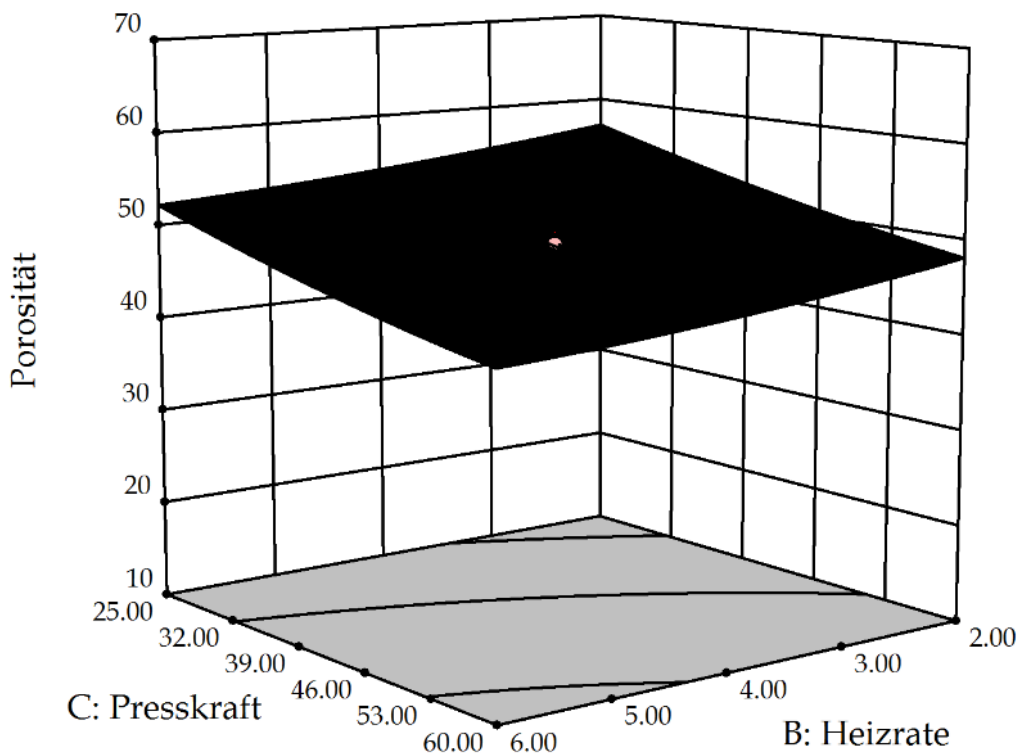


Abbildung 3-29: Einfluss von Presskraft und Heizrate auf die Porosität

3.6.7.2.2 Zentral zusammengesetzter Versuchsplan - Zielgröße Schwindung

Für die Zielgröße Schwindung wurde auf Grundlage der Messdaten ein quadratisches Modell errechnet, das neben den bereits bestimmten signifikanten Faktoren A, B und AB auch die quadratischen Effekte A^2 ($p < 0,0001$) und B^2 ($p = 0,0075$) berücksichtigt. In Abbildung 3-30 ist der Effekt der Faktoren Heizrate und Sintertemperatur auf die Zielgröße Deformation dargestellt. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Schwindung der Rohlinge mit ansteigender Sintertemperatur zunimmt. Dies korreliert, wie bei der Abnahme der Porosität auch, mit der zunehmenden Verdichtung der Partikel durch eine erhöhte Oberflächen- und Korngrenzendiffusion. Weiterhin zeigt sich, dass die Schwindung der Presslinge ausgeprägter ist, wenn die Grünlinge mit einer hohen Heizrate auf die vorgegebene Sintertemperatur erhitzt werden. Tramoslijka [166] zeigte in seinen Untersuchungen, dass die Diffusionsprozesse zwischen den Partikeln bei einer geringen Heizrate bereits bei niedrigeren Temperaturen beginnen und bei Erreichen der finalen Sintertemperatur abgeschlossen sind und das Werkstück somit keine Schwindung mehr zeigt.

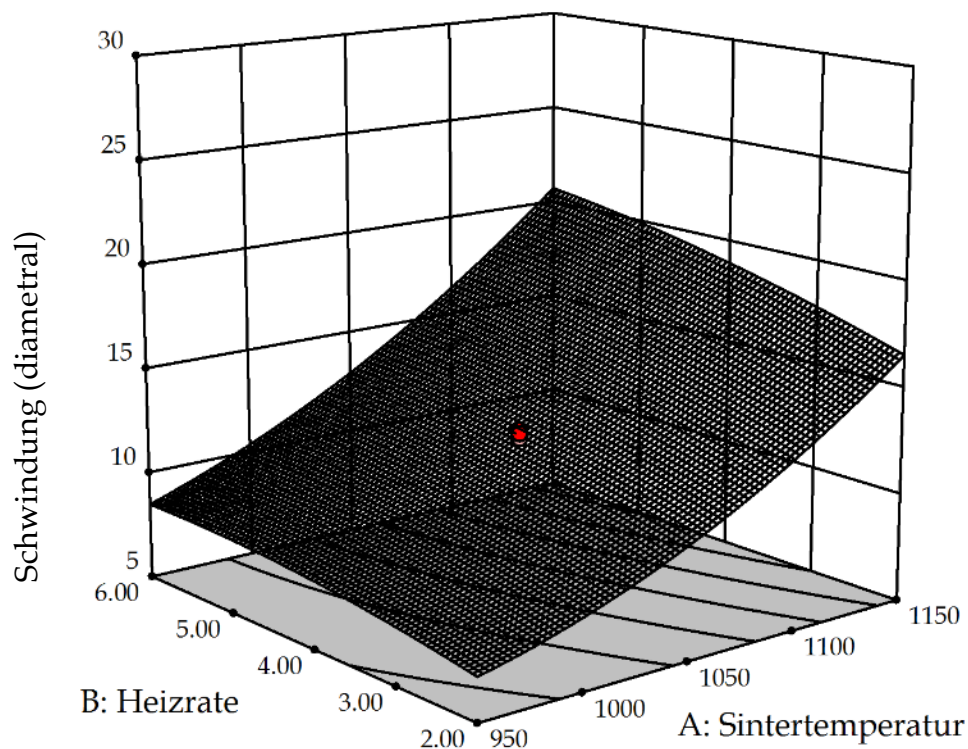


Abbildung 3-30: Einfluss von Heizrate und Sintertemperatur auf die Schwindung

3.6.7.2.3 Validierung des optimierten Fertigungsprozesses für poröse Scaffolds

Zur Prüfung, ob sich mit dem optimierten mathematischen Modell die Prozessparameter adäquat vorhersagen lassen, mit denen eine vom Anwender vorgegebene Soll-Porosität eingestellt werden kann, wurden Presslinge hergestellt (siehe Kapitel 3.5.5.1), die eine Soll-Porosität von 35,0%, 45,0% und 55,0%, aufweisen sollten. Die Soll-Porosität orientierte sich dabei an den Faktorstufen des in Kapitel 3.6.7.2.2 ausgeführten Versuchsplans. Für jede Soll-Porosität wurde eine Charge von 10 Rohlingen hergestellt. Die von der Software berechneten Prozessparameter für die jeweilige Porosität sind in Tabelle 3-13 angegeben.

Tabelle 3-13: Parameter zur Fertigung von Rohlingen mit definierter Porosität

Soll-Porosität in %	35	45	55
Sintertemperatur in °C	1132	1096	974
Heizrate in °C · min⁻¹	240	240	240
Haltezeit in min	60	60	60
Presskraft in kN	60	40	40

Abbildung 3-31 und Tabelle 3-14 zeigen vergleichend die Soll-Porosität und den Mittelwert der gemessenen Porosität der jeweils korrespondierenden Scaffold-Charge. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Porosität der Scaffolds innerhalb einer Charge gering streut und der Variationskoeffizient aller Chargen $< 0,05$ ist. Somit kann der Fertigungsprozess per se als geeignet angesehen werden, um Scaffolds mit einer definierten Porosität reproduzierbar herzustellen. Des Weiteren zeigt sich für alle Scaffold-Chargen eine nur sehr geringe prozentuale Abweichung von der jeweils definierten Soll-Porosität, wobei die 45%-Charge die höchste Abweichung von lediglich 1,733% zeigt. Da diese Abweichung $< 5,0\%$ ist, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit als akzeptabel bewertet.

Die Optimierungsfunktion des zentral zusammengesetzten Versuchsplans wurde dementsprechend als geeignet angesehen, um die erforderlichen Prozessparameter für eine definierte Soll-Porosität präzise vorhersagen zu können. Eine der grundlegenden Anforderungen an ein Scaffold als funktionelle Grundeinheit des Knochenkompartimentes (siehe Kapitel 3.2), nämlich die Mikroporosität in einem Scaffold variabel einstellen zu können, um den Diffusionsraum individuell anpassen zu können, wurde somit adäquat erfüllt. So wurden die Prozessparameter für jede folgende Soll-Porosität mithilfe der Optimierungsfunktion des zentral zusammengesetzten Versuchsplans ermittelt.

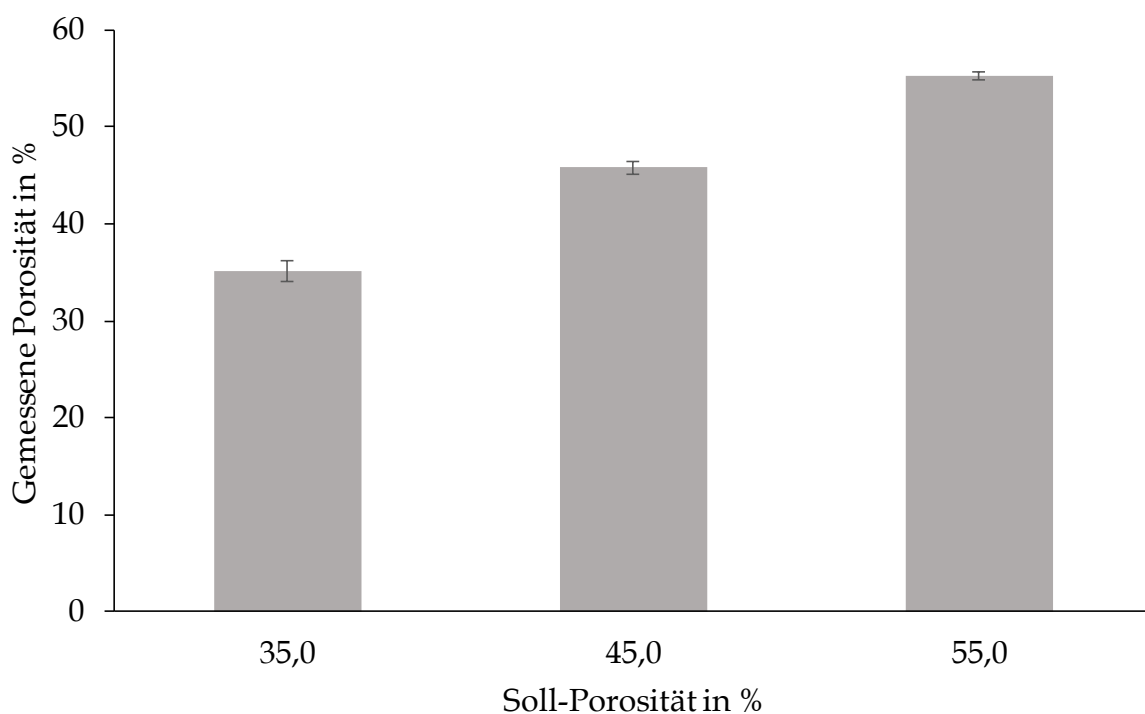


Abbildung 3-31: Validierung des Fertigungsprozesses für poröse Scaffolds

Tabelle 3-14: Validierung des Fertigungsprozesses für poröse Scaffolds - Statistische Kenndaten

Soll-Porosität in %	35	45	55
Mittelwert der Porosität in %	35,150	45,794	55,316
Variationskoeffizient	0,030	0,015	0,008
Abweichung von der Soll-Porosität in %	0,427	1,733	0,572

3.6.8 Strukturierung von Rohlingen durch Zerspanung

Im Allgemeinen wird das zur Zerspanung eines Werkstoffes genutzte Verfahren nach dessen Materialeigenschaften, der angestrebten Geometrie und der zu bearbeitenden Stückzahl ausgewählt. Im Falle der gesinterten Rohlinge liegt eine poröse und spröde Struktur vor, wobei die Härte der Rohlinge in einem reziproken Verhältnis zu deren Porosität steht. Liegt der Werkstoff als Formkörper vor, ist dieser während des Zerspanungsprozesses durch geeignete Spannwerkzeuge zu fixieren. Nur so können eine versatz- und fehlerfreie Bearbeitung eines jeden einzelnen Formkörpers und die reproduzierbare Bearbeitung einer Serie von Formkörpern ermöglicht werden. Dementsprechend galt es zunächst geeignete Spannvorrichtungen zu entwickeln, mit denen die Rohlinge adäquat fixiert werden konnten.

In Abbildung 3-5 ist der Aufbau der entwickelten Bohrmatrix dargestellt. Zwar ließen sich mit der Bohrmatrix und einem genügend langen Bohrer (Abbildung 3-8 (1)) Rohlinge zerspanen, jedoch limitierten Aufbau und Handhabbarkeit der Matrix die reproduzierbare Zerspanung von Rohlingen, sodass der Prozess der Zerspanung einer umfassenden Verbesserung bedurfte. Im Folgenden gilt es diese Schwachstellen kurz darzustellen, um ein verbessertes Design ableiten zu können:

- I. Der Matrizenring (B) dient der horizontalen Fixierung der Rohlinge, um einen horizontalen Versatz der Presslinge zu vermeiden, sodass die Rohlinge zwingend formschlüssig im Ring gefasst werden müssen. Der Matrizenring wäre im Durchmesser somit stets individuell an den Durchmesser der Rohlinge anzupassen. Des Weiteren ließ sich mit dem Matrizenring, der Bohrmatrix (C) und den Sechskantschrauben (E) eine nur bedingt verwindungsfreie Ausrichtung der Rohlinge untereinander und im Bezug zur Bohrmatrix erreichen.
- II. Die Matrix ermöglichte die Zerspanung der Rohlinge nur nach der vorgegebenen Anordnung der Bohrungen (H), sodass jede abweichende Anordnung die Anfertigung einer individuellen Matrix erfordert hätte.
- III. Zerspanbares Material ließ sich, auch unter Verwendung der Absaugungsdüse (D) nur bedingt im ausreichenden Maße aus der Matrix austragen. Folglich

nahm der durch den Bohrer ausgeübte Druck beim Eintauchen in den Rohling zu, was zum Bruch der Rohlinge führte.

- IV. Jede einzelne Bohrung musste manuell erfolgen, was hinsichtlich der im Rahmen dieser Arbeit benötigten Stückzahlen zeitlich und ressourcentechnisch nicht zu realisieren gewesen wäre. Das Verschieben der Bodenplatte (G) war stets mit einem Fehler behaftet, sodass der Bohrer nur bedingt lotrecht durch die Bohrungen (H) in der Matrize abzusenken war. Folglich war teilweise ein Versatz der Bohrungen erkennbar.
- V. Die Verwendung der Matrize und des Bohrers ermöglichte nur die Realisierung von vertikal-zylindrischen Bohrungen aber keine dreidimensionale Strukturierung.

Unter Berücksichtigung der oben aufgeführten Schwachstellen der Bohrmatrize galt es, den Zerspanungsprozess zur Herstellung größerer Stückzahlen möglichst weitgehend zu automatisieren und die Zerspanung dreidimensional und präziser zu gestalten. So wurde eine 3-Achsen-CNC-Fräse in den Zerspanungsprozess eingebunden, die sowohl eine dreidimensionale, präzisere und automatisierbare Steuerung der zur Zerspanung genutzten Werkzeuge, als auch die Fertigung der Haltevorrichtung selbst ermöglichte. Mit der Option der rechnergestützten Zerspanung konnte die in Abbildung 3-7 dargestellte Haltevorrichtung für Rohlinge entwickelt werden. Sie unterscheidet sich grundlegend von der Bohrmatrize, da zwei Rohlinge nicht mehr übereinander gestapelt werden, sondern 10 Rohlinge flächig in einem definierten Abstand ausgerichtet werden können. Das Spanwerkzeug fährt rechnergestützt die vom Anwender programmierten Verfahrenswege ab und muss nicht mehr über eine Matrize zwangsgeführt werden. Dementsprechend kann die Oberfläche der Rohlinge unverdeckt gehalten und zerspantes Material unmittelbar von der Oberfläche abgesaugt werden. Ein Bruch der Rohlinge während der Zerspanung konnte somit verhindert werden. Weiterhin ist die Haltevorrichtung in ihrem Aufbau derart gestaltet, dass sie um weitere Taschen (E) erweitert werden kann, sodass die Anzahl der Rohlinge je Prozesszyklus erhöht und Umrüstzeiten reduziert werden können. Da die Haltevorrichtung die Rohlinge ebenfalls horizontal formschlüssig fixieren muss,

ist die Tasche (E) dem Durchmesser der jeweiligen Rohlinge anzupassen. Da die grundlegende Struktur der Haltevorrichtung jedoch konstant ist, muss in den programmierten Fräsdaten lediglich der Verfahrensweg für die Tasche geändert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Haltevorrichtungen für Rohlinge mit 35, 45 und 55% gefertigt, mit der alle Rohlinge während der Zerspanung sicher fixiert und nachfolgend destruktionsfrei über die durch die Quernuten (H) geführte Metallhaken entnommen werden konnten. Somit konnten Rohlinge bis zu einer verbleibenden Strukturstärke von 0,5 mm reproduzierbar und destruktionsfrei zerspannt werden, wie beispielhaft in Abbildung 3-32 gezeigt. Folglich konnten alle Scaffolds durch zerspannende Strukturierung von Rohlingen definierter Porosität reproduzierbar und aufgrund der gesteigerten Automatisierung zeiteffektiv hergestellt werden.

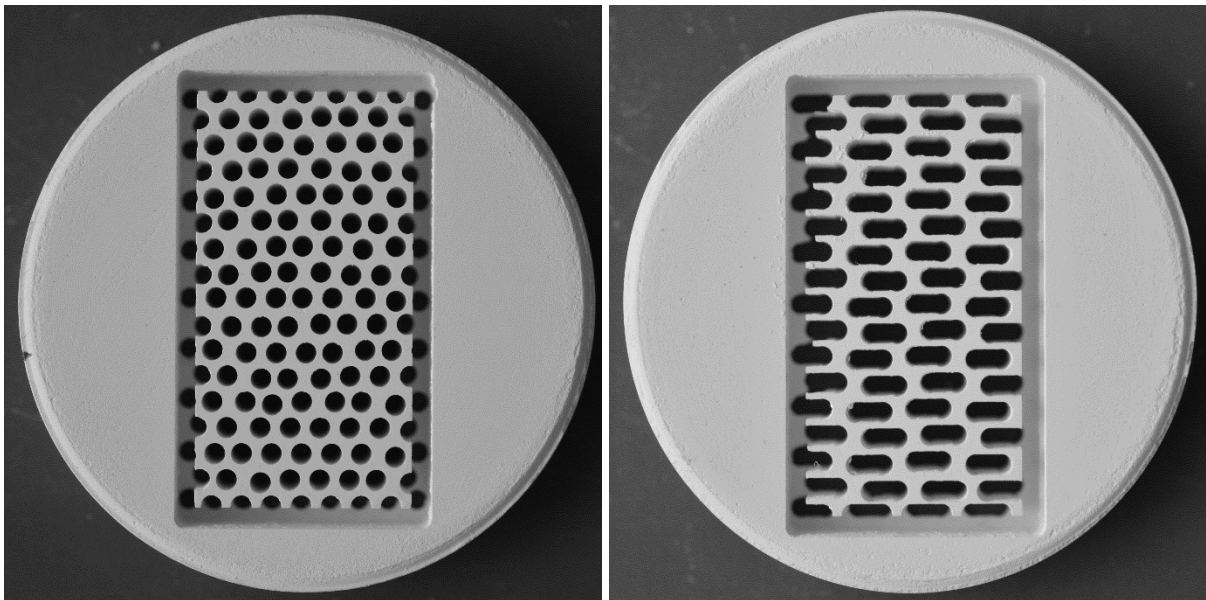


Abbildung 3-32: Beispielhafte Referenzstrukturen zerspanter Scaffolds
Links: 1 mm Bohrpunkte maximal verteilt
Rechts: elongierte Kavitäten mit einer programmierten
Wandstärke von 0,5 mm an der Längsseite

3.6.9 Finales Konzept des modularen Knochenkompartimentes

Auf Grundlage des optimierten zentral zusammengesetzten Versuchsplans und des entwickelten Zerspanungsprozesses konnte das in Kapitel 3.2 erarbeitete theoretische Konzept des aus additiv zusammengesetzten Scaffolds gebildeten Diffusionsraums technisch umgesetzt werden. Der Aufbau der Scaffolds wurde dabei in zwei Bereiche gegliedert, nämlich die funktionelle Grundstruktur, die unabhängig davon, ob kompakter oder trabekulärer Knochen dargestellt werden soll, für alle Scaffolds identisch ist und die sogenannte Individualstruktur, die nach Vorgabe des Nutzers in ihrer Porosität und Struktur variiert werden kann. Zunächst sei die allgemeingültige Grundstruktur der Scaffolds in Abbildung 3-33 dargestellt.

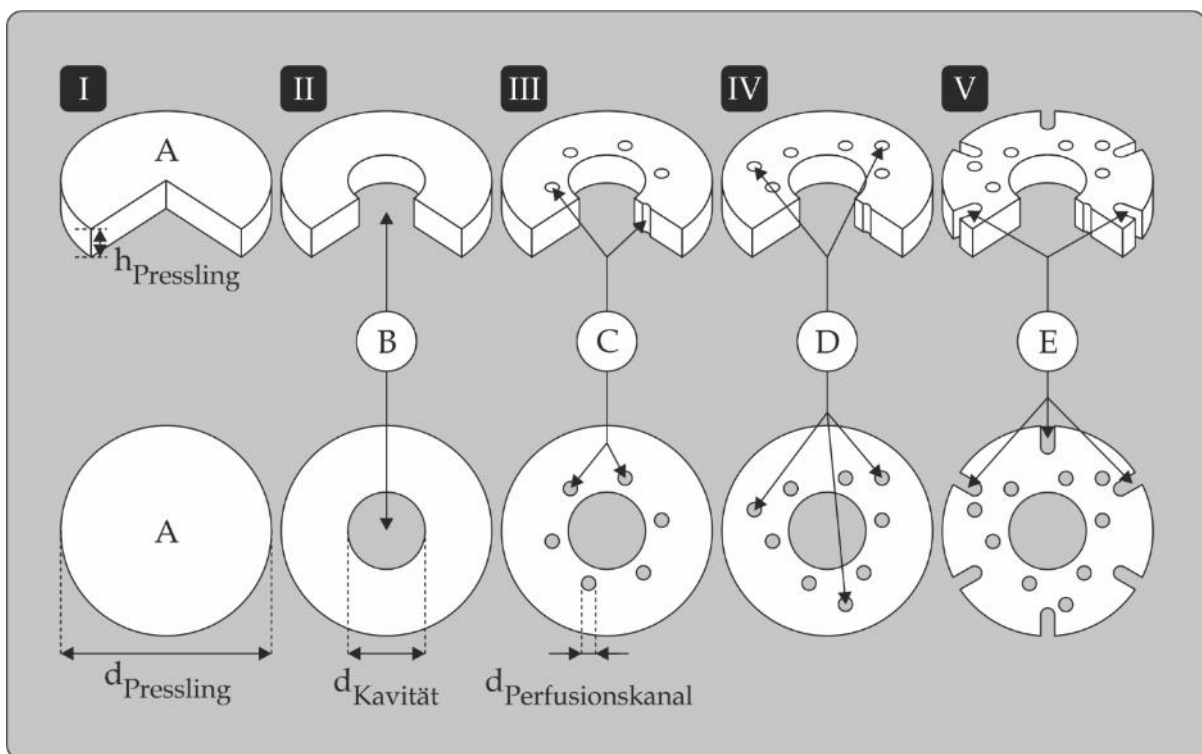


Abbildung 3-33: Grundlegender Aufbau der Scaffolds

- I. Die Basis aller Scaffolds ist der Rohling (A), ein flacher Zylinder mit dem Durchmesser d_{Rohling} und der Höhe h_{Rohling} . Der Durchmesser und die Höhe variieren in Abhängigkeit des Herstellungsprozesses und der verwendeten Masse an HA-Granulat. Über die Höhe des Implantates und die Höhe h_{Rohling} ergibt sich die für ein Knochenkompartiment benötigte Anzahl an Scaffolds.

- II.** In den Rohling wird mittig eine Kavität (B) eingebracht, die in Form und Größe an das zu testende Implantat angepasst ist. Idealerweise liegen für ein Implantat 3D-Geometriedaten vor, die in horizontaler Schnittebene softwarebasiert in Teilbereiche segmentiert werden, die in ihrer Höhe der Höhe h_{Rohling} des Rohlings entsprechen. Mittels CNC-Fräse werden die Rohlinge, entsprechend der segmentierten Geometriedaten, zerspannt. Additiv zusammengesetzt bildet die mittige Kavität somit das Implantat als Negativ ab. In Abhängigkeit des getesteten Implantates ist der Einfluss des zum Einsatz des Implantates verwendeten Operationsverfahrens auf die Knochenstruktur zu berücksichtigen und die Geometriedaten entsprechend anzupassen. In Abbildung 3-33 ist die Kavität als zylindrische Aussparung mit Durchmesser $d_{\text{Kavität}}$ dargestellt.
- III.** Damit die Scaffolds mit Freisetzungsmitteln perfundiert werden können, werden senkrechte Perfusionskanäle (C) mit dem Durchmesser $d_{\text{Perfusionskanal}}$ eingebracht. Abbildung 3-33 zeigt beispielhaft ein Scaffold mit 6 Perfusionskanälen, wobei die Anzahl, die Anordnung und der Durchmesser der Perfusionskanäle als der Individualstruktur zugehörig betrachtet werden.
- IV.** Um eine lotrechte Ausrichtung der Scaffolds und somit der Perfusionskanäle sicherzustellen, sind in die Scaffolds Durchgangsbohrungen (D) als Aufnahmen für Fixationspins eingebracht (siehe auch Abbildung 3-38).
- V.** Des Weiteren sind die Scaffolds mit Nuten (F) versehen, um den Spalt zwischen dem Knochenkompartiment und dem inneren Zylinder der Durchflusszelle abdichten zu können. Die detaillierte Funktion der Nuten ist in Abbildung 3-34 am Beispiel eines Knochenkompartimentes mit sechs Perfusionskanälen und ohne Kavitäten für Lipide dargestellt. Diese Abbildung bildet nur partiell den inneren Zylinder (H) und den Boden (I) der finalen Durchflusszelle ab. Für die Betrachtung der Durchflusszelle in toto wird auf Kapitel 4.7 verwiesen. Über die Durchgangsbohrung (N) im Boden der Durchflusszelle wird das verflüssigte Lipid (F) in die Nuten (G) des Kompartimentes (E) geführt. Über die Nut (D & M) im obersten Scaffold (L) tritt das Lipid aus dem vollständig gefüllten Spalt (III) in das Kolben-Zylinder-System (Kapitel 4.7.3.1) über. Die Fixationspins (B & J) gewährleisten eine rotationsfreie Fixierung der Scaffolds,

während die Platzhalterpins (A) ein Eindringen der Lipide in die Perfusionskanäle (C & K) verhindern.

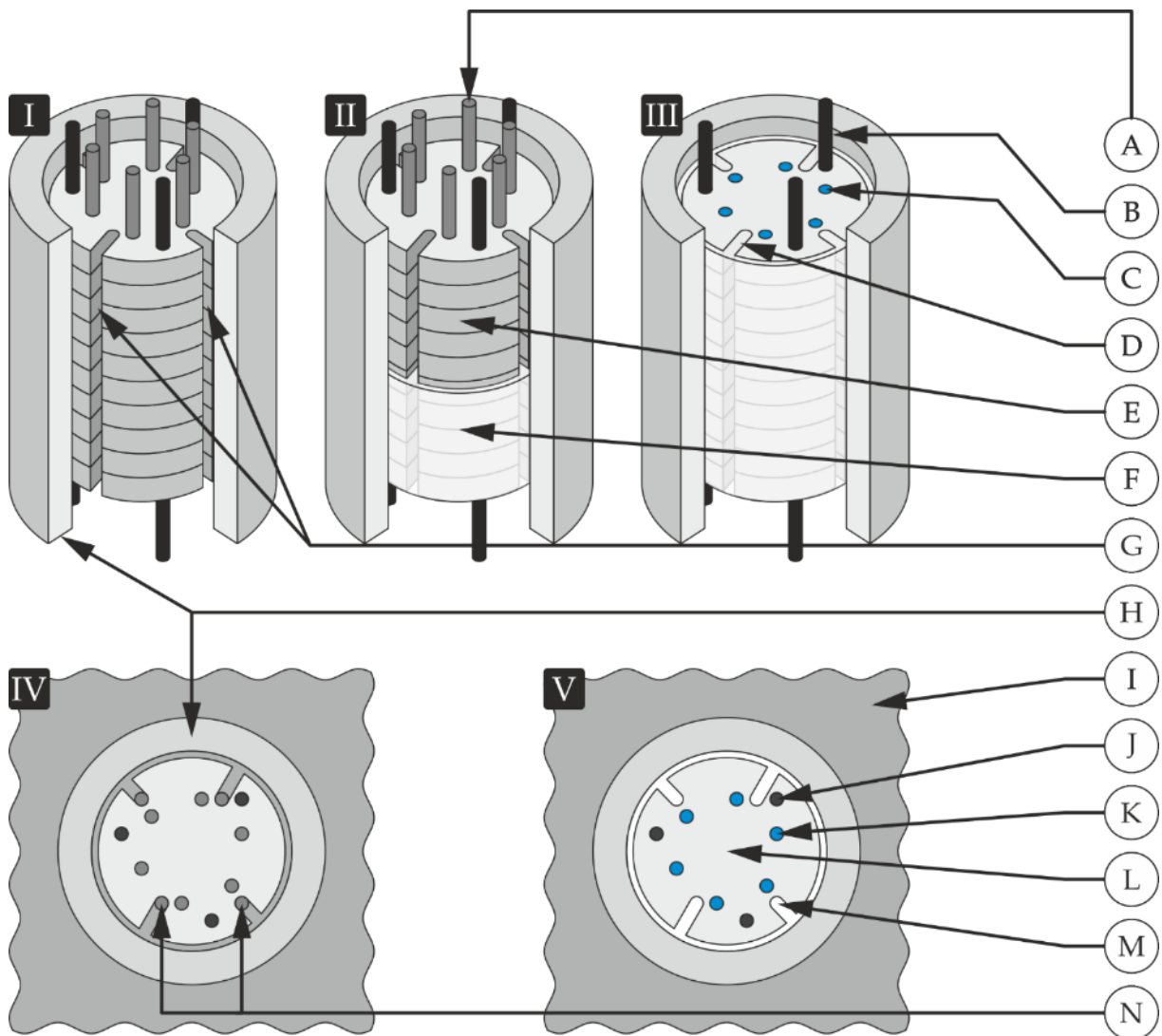


Abbildung 3-34: Schematische Darstellung der Präparation des künstlichen Knochenkompartiments mit Nutensystem

Tabelle 3-15: Bauteilzuordnung - Nutensystem des Knochenkompartiments

A	Platzhalterpin	H	Innerer Zylinder
B	Fixationspins	I	Boden
C	Kapillarkanal	J	Fixationspin
D	Nut (ausgefüllt)	K	Kapillarkanal
E	Knochenkompartiment	L	Scaffold
F	Nuten (ungefüllt)	M	Nut (ausgefüllt)
G	Lipid	N	Durchgangsbohrung im Boden

Die Individualstruktur umfasst hingegen die Bereiche der Scaffolds, die vom Anwender variabel zu gestalten sind, nämlich die Porosität und die individuelle Struktur der Scaffolds. Die Porosität der Scaffolds wird auf Grundlage des optimierten zentral zusammengesetzten Versuchsplans (Kapitel 3.6.7.2) eingestellt. Die Struktur der Scaffolds ergibt sich aus der Anzahl, Anordnung und Geometrie der Perfusionskanäle und der Kavitäten für die Lipide. Die der Strukturierung zugrunde liegenden Aspekte gilt es im Folgenden näher zu betrachten, wobei die Scaffoldstrukturen im Folgenden der Übersichtlichkeit halber ohne Grundstruktur und in Aufsicht dargestellt sind, um die Bereiche der Perfusionskanäle und Kavitäten als zweidimensionale Flächen berechnen und deren Flächeninhalt strukturabhängig vergleichen zu können.

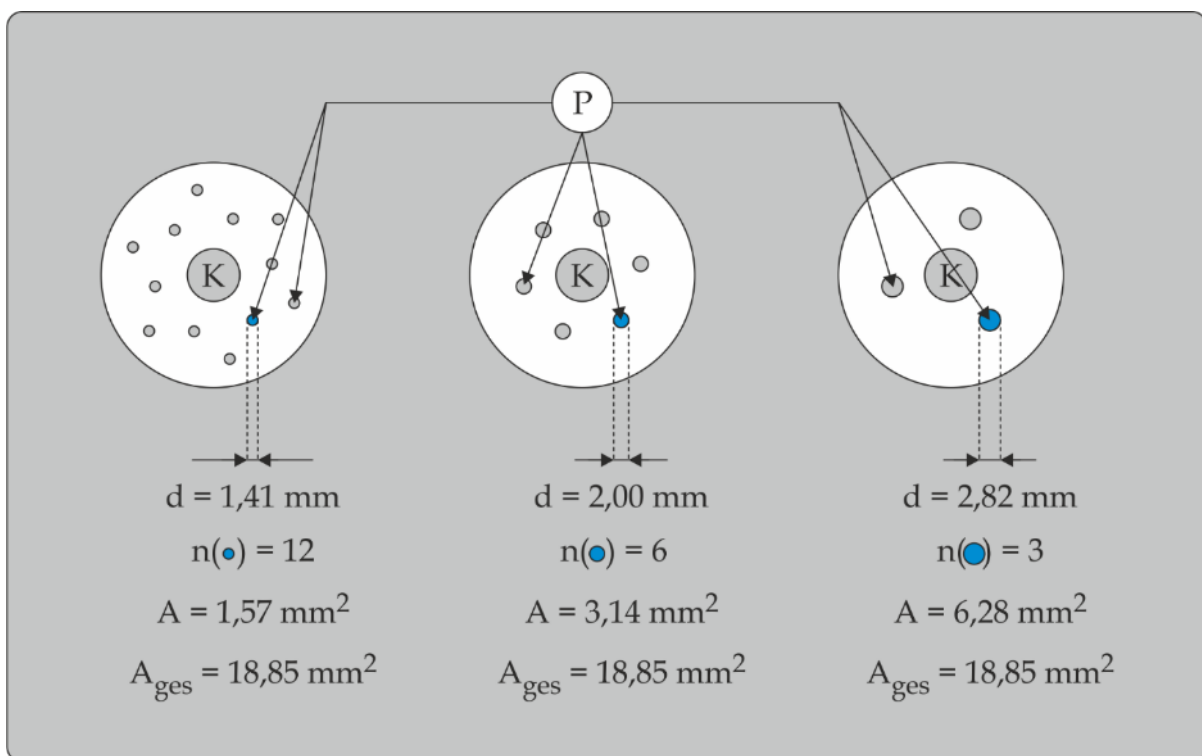


Abbildung 3-35: Schematische Darstellung der Perfusionskanalvariabilität

Abbildung 3-35 zeigt vergleichend drei beispielhafte Scaffoldstrukturen, deren Perfusionskanäle (P) derart gestaltet sind, dass sie sich in Anzahl (n), Durchmesser (d) und Anordnung unterscheiden, jedoch einen identischen Gesamtflächeninhalt aufweisen. Da die Perfusionskanäle idealerweise gleichmäßig um die Kavität (K) für das zu testende Implantat verteilt sein sollten, um eine heterogene Wirkstoffelimination im Diffusionsraum zu vermeiden, sind im Folgenden sämtliche Perfusionskanäle

radial konzentrisch um die Kavität des Implantates ausgerichtet. Grundlegend wurde eine runde Geometrie der Perfusionskanäle als sinnvoll erachtet, da sie unkompliziert zu programmieren ist und durch Bohren mit einem Spanwerkzeug definierten Durchmessers fertigungstechnisch rationell darzustellen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Scaffoldstruktur mit sechs, radial konzentrisch angeordneten Perfusionskanälen (\varnothing : 2,00 mm) für alle folgenden Scaffolds genutzt. Der Gesamtflächeninhalt und Gesamtumfang der runden Perfusionskanäle errechnet sich dabei nach Formel (8) und (9) mit der Anzahl (n) und dem Radius (r) der Kanäle. Aus dem Quotienten des Gesamtflächeninhalts und der Anzahl der Kanäle ergibt sich somit der Radius der Kanäle, wobei die Kanalanzahl zwingend eine ganze positive Zahl ist.

$$\text{Gesamtflächeninhalt in mm}^2 = n \cdot (\pi \cdot r^2) \quad (8)$$

$$\text{Gesamtumfang in mm} = n \cdot (2 \cdot \pi \cdot r) \quad (9)$$

Es lässt sich ableiten, dass der Radius der Perfusionskanäle bei ansteigender Anzahl zwar abnimmt, jedoch ihr Gesamtumfang zunimmt, wenn ihr Gesamtflächeninhalt als konstant angesehen wird. Somit kann der Anwender durch Erhöhung des Umfangs die Grenzfläche zwischen Scaffold und Freisetzungsmedium erhöhen, wodurch der Wirkstoff über eine vergrößerte Fläche in das Freisetzungsmedium übertreten kann. Folglich kann eine Grenzflächenvergrößerung zur Erhöhung des Konzentrationsgradienten innerhalb des Knochenkompartimentes und somit zur Erhöhung der Eliminationskonstante beitragen. Die Geometrie, Anordnung und Anzahl der Perfusionskanäle innerhalb des Knochenkompartimentes orientiert sich dabei an der Durchblutung der Knochenstruktur, die der Anwender technisch darstellen möchte. Gilt es beispielsweise einen jungen trabekulären Knochens darzustellen, sind Perfusionskanäle mit einem größerem Umfang und eine höhere Flussrate des Freisetzungsmediums anzustreben, als bei einem älteren trabekulären Knochen oder kompakten Knochen. Sollen gar nekrotische Knochenstrukturen abgebildet werden,

die äußerst gering durchblutet sein können, wird für die Perfusion ein Minimum angestrebt.

Anzahl, Geometrie und Anordnung der Kavitäten für die Lipide orientieren sich am Verhältnis der hydrophilen und lipophilen Bestandteile des biologischen Knochens. Möchte der Anwender beispielsweise einen hohen Fettanteil darstellen, gilt es den Anteil der Lipid-Kavitäten im Knochenkompartiment möglichst groß zu gestalten. Des Weiteren definiert der Anwender durch die Geometrie der Kavitäten, in welchem Ausmaß die Kavitäten interkonnectiert sind. Um eine gleichmäßige Wirkstoffdistribution im Knochenkompartiment gewährleisten zu können, sind auch die Lipid-Kavitäten idealerweise symmetrisch im Scaffold verteilt. Abbildung 3-35 zeigt schematisch eine beispielhafte Auswahl hergestellter Scaffoldstrukturen, anhand derer es die Aspekte der Lipid-Kavitäten näher darzustellen gilt. Der Übersichtlichkeit halber sind von den oben erläuterten Grundstrukturen der Scaffolds nur die mittige Kavität zur Aufnahme des Implantates und die Perfusionskanäle aufgeführt.

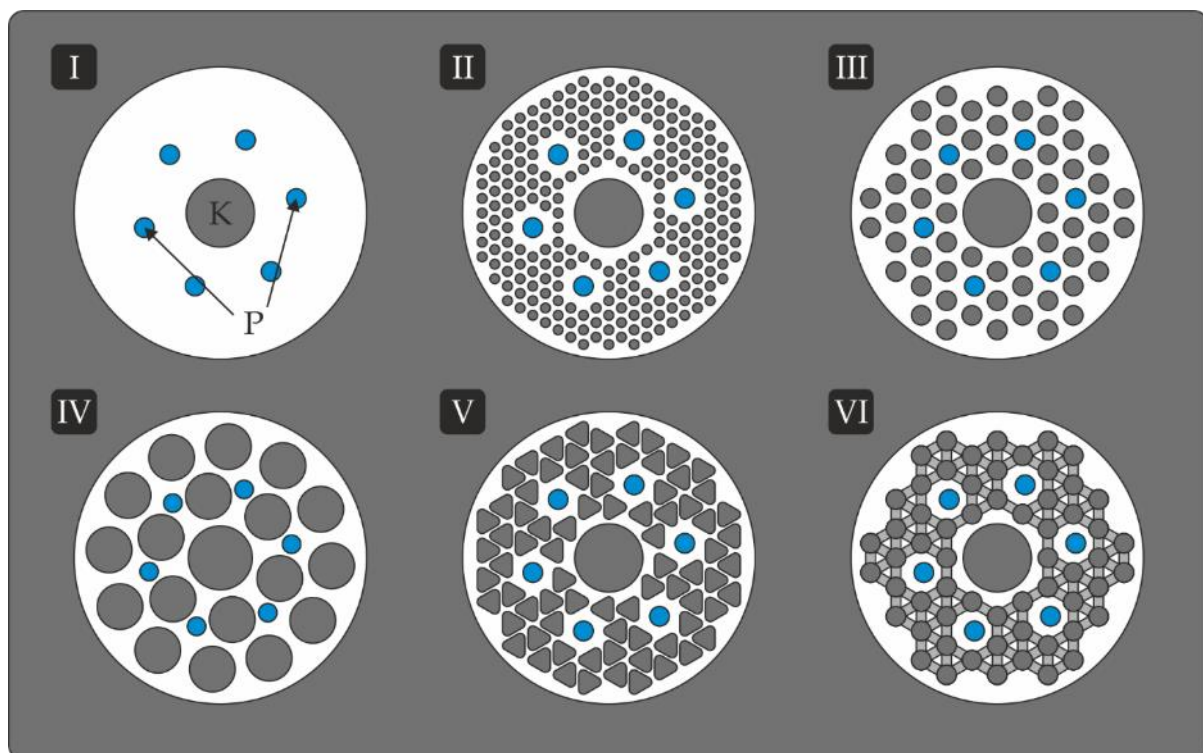


Abbildung 3-36: Schematische Darstellung der Lipid-Kavitätenvariabilität

Tabelle 3-16: Flächeninhalte der Lipid-Kavitäten aus Abbildung 3-36

Scaffoldstruktur	I	II	III	IV	V	VI
Lipid-Kavitäten						
Flächeninhalt in mm ²	-	0,79	3,14	19,63	3,99	3,14 + ~1,27
Anzahl	-	240	60	18	78	60 + 120
∑ (Flächeninhalt) in mm ²	-	183,78	188,50	353,43	311,95	264,58
∑ (Flächeninhalt) in %	-	28,30	29,02	54,41	46,67	40,73

- I. Das dargestellte Scaffold (Ø: 30,0 mm) ist frei von Lipid-Kavitäten und stellt somit die einfachste Form eines Scaffolds dar. Die Anordnung der mittigen Kavität (K) zur Aufnahme des zu testenden Implantates und die radial konzentrisch angeordneten Perfusionskanäle (P; Ø: 2 mm) ist zwecks besserer Vergleichbarkeit für alle Scaffoldstrukturen in Abbildung 3-36 identisch.
- II. Die Lipid-Kavitäten in der dargestellten Scaffoldstruktur haben einem Durchmesser von 1,0 mm und sind mit einem Mittenabstand von 1,5 mm zueinander ausgerichtet. Der Gesamtflächeninhalt der Lipid-Kavitäten beträgt 28,30% (Tabelle 3-16). Um die Lipid-Kavitäten im Sinne einer Parkettierung gleichmäßig über die Fläche des Scaffolds verteilen zu können, sind sie in hexagonaler Anordnung ausgerichtet. Zur Kalkulation der Anzahl der Lipid-Kavitäten und des Abstandes zwischen ihnen, seien die in Abbildung 3-37 links dargestellten Lipid-Kavitäten isoliert zu betrachten. In der Mitte des Konstruktionskreises befindet sich eine zentrale Kavität, die von sechs weiteren Kavitäten radial konzentrisch umgeben ist. Jede umgebende Kavität bildet wiederum die Zentralkavität der nächsten hexagonalen Anordnung. Im Falle der hexagonalen Anordnung beträgt der Winkel α 60°. Werden andere Polygone zur Parkettierung der Scaffoldoberfläche verwendet, variiert die Anzahl der Kavitäten und der Winkel entsprechend. Über die Durchmesser $d_{\text{Durchmesser}}$ und $d_{\text{Kavität}}$ der Kavitäten legt der Anwender den Mittenabstand $a_{\text{Kavität}}$ zwischen den Kavitäten fest. So kann der Anwender über den Durchmesser des Scaffolds und die

variabel gestaltbaren Durchmesser $d_{\text{Konstruktionskreis}}$ und $d_{\text{Kavität}}$, den Gesamtflächeninhalt der Lipid-Kavitäten und das optimale Verteilungsmuster kalkulieren und für die Zerspannung programmieren. Die Dicke des verbleibenden Steges zwischen den Kavitäten ergibt sich als Differenz zwischen dem Minuenden $a_{\text{Kavität}}$ und dem Subtrahenden $d_{\text{Kavität}}$. Hinsichtlich der mechanischen Stabilität der Scaffolds ist eine Stegdicke $< 0,5$ mm zu vermeiden.

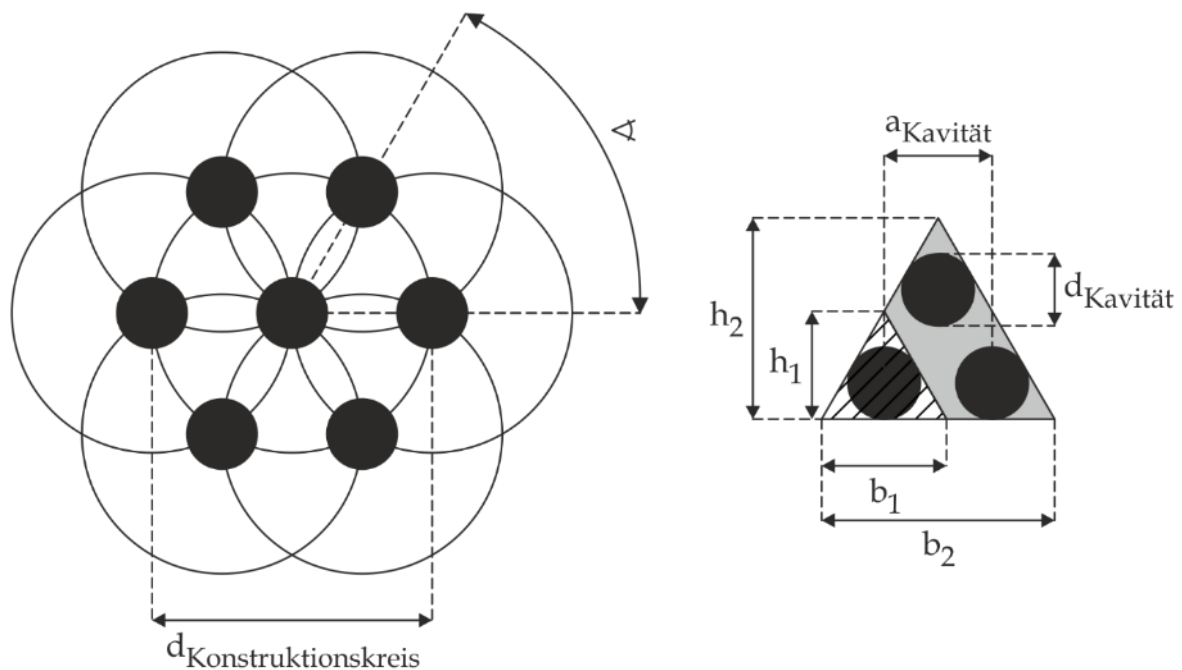


Abbildung 3-37: Geometrische Anordnungsberechnung der Lipid-Kavitäten
 Links: Hexagonale Ausrichtung von Lipid-Kavitäten
 Rechts: Gleichseitiges, Lipid-Kavitäten überspannendes Dreieck

III. Die Lipid-Kavitäten in der dargestellten Scaffoldstruktur haben einem Durchmesser von 2,0 mm und sind mit einem Mittenabstand von 3,0 mm zueinander ausgerichtet. Ihre Anordnung entspricht ebenfalls dem in Abbildung 3-37 dargestellten hexagonalen Verteilungsmuster. Da sie den gleichen Durchmesser wie die Perfusionskanäle haben, zeigt sich ein vollständig symmetrisches Verteilungsmuster. Weiterhin zeigt sich ein nahezu identischer Gesamtflächeninhalt der Lipid-Kavitäten, wie bei Scaffoldstruktur II (siehe Tabelle 3-16), da die Anzahl der Kavitäten zwar auf ein Viertel reduziert ist, sich jedoch aus der Verdoppelung des Radius eine Vervielfachung der Fläche ergibt (Formel (8)).

Jedoch ergibt sich bei Scaffoldstruktur II eine deutlich höhere Grenzfläche zwischen dem in die Lipid-Kavitäten eingebrachten Lipid und dem in der Scaffoldstruktur befindlichen wässrigen Medium. Da beide Strukturen eine symmetrische und regelmäßige Anordnung der Lipid-Kavitäten um die Kavität, die das Implantat aufnimmt, aufweisen, kann von einer weitgehend gleichmäßigen und vergleichbaren Ausbreitung der Diffusionsfront des Wirkstoffes ausgegangen werden (vergleiche Prinzip des Galton-Brettes). Aus fertigungstechnischer Sicht ist die Scaffoldstruktur III zu bevorzugen, da das entsprechende Scaffold in einer kürzeren Prozesszeit zu zerspannen ist.

- IV. Die Lipid-Kavitäten in der dargestellten Scaffoldstruktur haben einen Durchmesser von 5,0 mm und sind radial symmetrisch um die mittige Kavität angeordnet, wobei eine hexagonale Anordnung aufgrund des großen Durchmessers entfällt. Mit einem Gesamtflächeninhalt der Lipid-Kavitäten von 54,41% weist diese Scaffoldstruktur zwar das größtmögliche Verhältnis von lipophilen zu hydrophilen Bestandteilen auf. Jedoch ist zu beachten, dass die Erhöhung des Durchmessers der Lipid-Kavitäten zu einer Reduzierung der Dicke des Steges zwischen den Kavitäten und Perfusionskanälen führen kann. Wird, wie in diesem Beispiel verdeutlicht, für die Lipid-Kavitäten ein zu großer Durchmesser gewählt, kann die Stegdicke gegebenenfalls so gering sein, dass der Wirkstoff über den Perfusionskanal eliminiert wird, bevor eine weitere Diffusion in radialer Richtung erfolgen kann.
- V. Die Lipid-Kavitäten in der dargestellten Scaffoldstruktur haben die Geometrie eines gleichseitigen Dreiecks, mit dem sich, neben dem Sechseck und dem Quadrat (und Raute), eine vollständige Parkettierung einer Fläche realisieren lässt. Dabei wird das Dreieck als Fläche verstanden, die überlagernd über drei Lipid-Kavitäten aufgespannt ist. So ist auch ihre Anordnung hochvariabel und die Dicke der verbleibenden Stege individuell einzustellen. Die in der Scaffoldstruktur V dargestellten Dreiecke ergeben sich aus Überlagerung der 1 mm Lipid-Kavitäten aus der Scaffoldstruktur (II). Durch die Inklusion der Stege

zwischen den drei ursprünglichen Kavitäten wird eine deutliche Vergrößerung des Gesamtflächeninhaltes der Lipid-Kavitäten um 18,38% auf 46,67% erreicht. Während sich die Diffusionsfront eines hydrophilen Wirkstoffes bei den Scaffoldstrukturen (II) und (III) aufgrund der symmetrischen Anordnung der Lipid-Kavitäten theoretisch linear bis zur Rand des Scaffolds ungehindert ausbreiten kann, ist es möglich, durch eine versetzte Anordnung der Dreiecke die einem hydrophilen Wirkstoff in radialer Richtung des Scaffolds maximal zur Verfügung stehende lineare Diffusionsstrecke zu reduzieren. So können etwaige strukturbedingte Diffusionsbarrieren des biologischen Knochens im Scaffold partiell abgebildet werden, ohne Einfluss auf die Gesamtporosität der Scaffoldstruktur nehmen zu müssen. Da die Lipid-Kavitäten technisch nicht als ideale, gleichseitige Dreiecke zu realisieren sind, wie in Abbildung 3-37 rechts dargestellt, sondern, durch die Rundung des Fräasers bedingt, abgerundete Ecken aufweisen, ergibt sich ihr Flächeninhalt allgemein nach Formel (10).

$$A_{\text{ges}}(\text{Dreieck}) \text{ mm}^2 = n \cdot \left(\left(\frac{b_2 \cdot h_2}{2} \right) - \left(\left(\frac{b_1 \cdot h_1}{2} \right) - (\pi \cdot (0,5 \cdot d_{\text{Kavität}})^2) \right) \right) \quad (10)$$

- VI.** Die Lipid-Kavitäten in der dargestellten Scaffoldstruktur entsprechen denen in Scaffoldstruktur (III), wobei die Kavitäten durch horizontale Nuten verbunden sind. Im Gegensatz zu den Strukturen (II) - (V) sind die Lipid-Kavitäten somit vollständig interkonnektiert, sodass das in die Kavitäten eingebrachte Lipid als kohärente Struktur in der Scaffoldstruktur vorliegt. Die in Abbildung 3-36 dargestellten Nuten wurden bis zur halben Dicke des Scaffolds mit einem Nutfräser (\varnothing : 1,0 mm) gefräst. Für die Lipid-Kavitäten der Scaffoldstruktur VI ergibt sich somit näherungsweise ein Gesamtflächeninhalt von 40,73%.

Nach isolierter Betrachtung der Grund- und Individualstruktur der Scaffolds gilt es das finale Konzept des Knochenkompartimentes im Folgenden in toto zu betrachten. Hierfür ist in Abbildung 3-38 beispielhaft der Aufbau und die Präparation eines Kompartimentes mit einer Osteosyntheseschraube als Modellimplantat dargestellt.

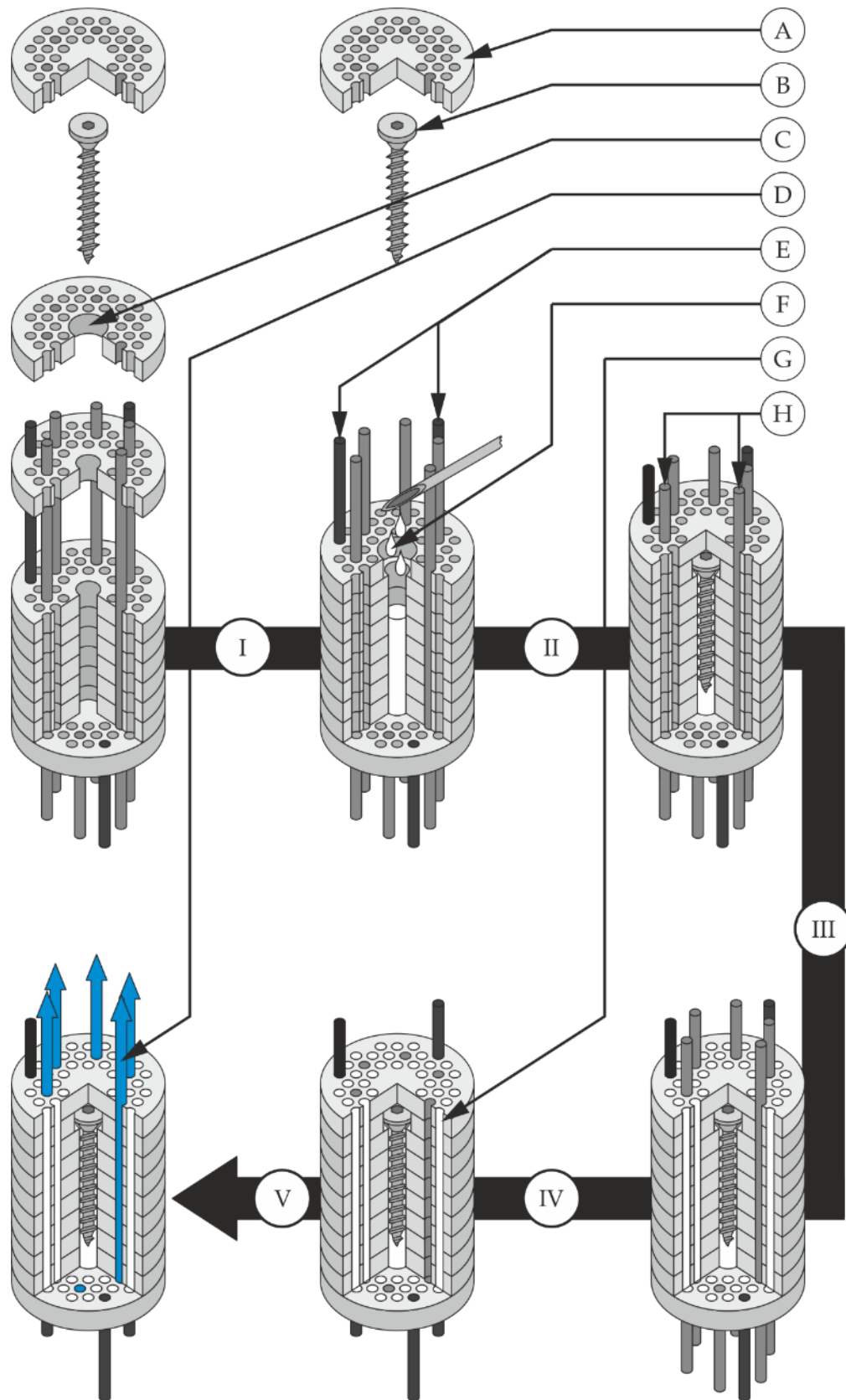


Abbildung 3-38: Schematische Darstellung der Präparation des künstlichen Knochenkompartiments

Tabelle 3-17: Bauteilzuordnung - künstliches Knochenkompartiment

A	Scaffold	E	Fixationspins
B	Implantat	F	Benetzungsmedium
C	Kavität	G	Lipid
D	Freisetzungsmedium	H	Platzhalterpins

Wie in Abbildung 3-38 dargestellt, setzt sich ein Kompartiment stets additiv aus Scaffolds zusammen. Die hier dargestellte Struktur der Scaffolds (A) entspricht dabei der Scaffoldstruktur II, wobei auch hier die Darstellung der Nuten der Übersichtlichkeit halber entfällt. Die Anzahl der Scaffolds, die mit einer mittigen Kavität (C) zur Aufnahme des Implantates (B) versehen wird, ergibt sich aus der Höhe des Implantates und der Höhe der verwendeten Scaffolds. Zur Abdichtung des durch die Kavitäten ausgebildeten Raumes ist dieser auf der Ober- und Unterseite durch je ein Scaffold ohne Kavität verschlossen. Für eine deckungsgleiche Ausrichtung der Lipid-Kavitäten und Perfusionskanäle sind die Scaffolds durch Fixationspins (E), die über die gesamte Höhe des Knochenkompartimentes durch alle Scaffolds reichen, fixiert. Die Fixationspins verbleiben über den gesamten Freisetzungsversuch im Knochenkompartiment und bestehen daher zwingend aus einem inerten Werkstoff.

Die Präparation des Knochenkompartimentes erfolgt in einem mehrstufigen Prozess. Zunächst werden die Scaffolds in das verwendete Freisetzungsmedium überführt und unter Vakuum entgast, sodass die mikroporöse Struktur der Scaffolds vollständig saturiert ist. Nachfolgend werden die Scaffolds über die Fixationspins ausgerichtet und zusammengesetzt. In die mittige Kavität wird ein Benetzungsmittel (F) eingebracht (siehe auch Kapitel 5.3). Unmittelbar in das Benetzungsmittel wird das Implantat eingeführt, sodass der Raum zwischen dem Implantat und der Wandung der Kavität vollständig ausgefüllt ist und ein Totvolumen und eine unbenetzte Oberfläche des Implantates vermieden werden. Dies ist erforderlich, damit die Benetzung der Implantatoberfläche in vivo durch einen unmittelbaren Kontakt zum Knochengewebe gewährleistet ist, da die Implantate größtenteils direkt in den Knochen eingedreht werden, oder durch Presspassung fixiert werden. Dies ist

aufgrund der Sprödigkeit des Hydroxylapatits *in vitro* jedoch nicht darstellbar und würde zur Destruktion der Scaffolds führen. Dementsprechend ist bei Implantaten mit einer stark strukturierten Oberfläche ein geeignetes Benetzungsmittel zu verwenden, um einen adäquaten Kontaktschluss zwischen dem Implantat und dem Kompartiment zu erreichen. Das einzubringende Volumen an Benetzungsmittel ergibt sich aus dem Volumen der Kavität abzüglich des Implantatvolumens.

Nach Einbringen des Implantates wird die Kavität durch Aufsetzen des obersten Scaffolds verschlossen und das zusammengesetzte Kompartiment in die Durchflusszelle (siehe Kapitel 4) eingesetzt. Über diese werden die Lipid-Kavitäten des Kompartimentes mit Lipid (G) befüllt. Um ein Eindringen des Lipides in die Perfusionskanäle zu vermeiden, sind in diese Platzhalterpins (H) eingebracht. Nach erfolgter Befüllung werden die Platzhalterpins entfernt, sodass sie mit Freisetzungsmittel (D) perfundiert werden können. Nach erfolgter Freisetzung und Entnahme des Knochenkompartimentes aus der Durchflusszelle wird das oberste Scaffold abgenommen und das Implantat aus der Kavität entfernt. In der Kavität befindliches Benetzungsmittel wird vollständig ausgeräumt. Das Knochenkompartiment wird nun in die einzelnen Scaffolds segmentiert, die hinsichtlich der Ausbreitung und des Gehaltes des Wirkstoffes untersucht werden können (siehe Kapitel 5).

3.7 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Das künstliche Knochenkompartiment bildet den biologischen Knochen in vitro in Form eines simplifizierten, technischen Verteilungsraums für den vom Implantat freigesetzten Wirkstoff ab und stellt somit die zentrale Komponente des in-vitro-Knochenmodells dar. Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Konzept eines künstlichen Knochenkompartimentes wurde in seinem Aufbau auf einen Diffusionsraum ausgerichtet, der sich aus vier Komponenten zusammensetzt. So können neben dem vaskulären System und den calciumphosphatären Bestandteilen der Hartschubstanz sowohl die hydrophilen, als auch die lipophilen Bestandteile des Knochens simultan nebeneinander abgebildet. Um der Strukturvielfalt des biologischen Knochens gerecht zu werden, wurde das Knochenkompartiment als modulares System konzipiert, das es ermöglicht, die vier Komponenten des Kompartimentes unabhängig voneinander als individuelle Einflussgrößen auf die Freisetzung des Wirkstoffes hochvariabel einstellen zu können. Das modulare System bedingt einen segmentalen Aufbau des Knochenkompartimentes, dessen funktionelle Grundeinheit das Scaffold ist. Das Scaffold besteht aus Hydroxylapatit und weist eine mikroporöse Struktur auf, die, mit Wasser gesättigt, die hydrophilen Bestandteile des Knochens abbildet. In der mikroporösen Struktur befinden sich vertikale Perfusionskanäle die die Perfusion des Knochenkompartimentes mit einem das Blut simulierenden Freisetzungsmedium ermöglichen. Des Weiteren befinden sich Kavitäten in der mikroporösen Hydroxylapatitstruktur, die, mit Lipiden gefüllt, die lipophilen Bestandteile des Knochens abbilden. Additiv zusammengesetzt bilden die Scaffolds das Kompartiment aus, in das mittig das zu testende Implantat eingebracht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Herstellung von Scaffolds, die neben ihrer mikroporösen Struktur auch eine makroporöse Struktur aufweisen sollen, prinzipiell auf vielfältige Weise erfolgen kann. So war die Herstellung von makroporösen Strukturen mit Porogenen zwar grundsätzlich möglich, jedoch konnte eine kohärente und homogene mikroporöse Struktur und die Interkonnektion der darin befindlichen Poren nur bedingt dargestellt werden. Des Weiteren wurden die Methoden, die bei der Herstellung von Scaffolds mit Porogenen angewandt wurden,

nur bedingt als aufskalierbar und automatisierbar eingeschätzt. Da ein Scale-up und eine Automatisierung der Herstellungsprozesse für eine rationelle Fertigung der Scaffolds als unabdingbar angesehen wurden, wurde die Herstellung in einen zweistufigen Herstellungsprozess zergliedert, der eine unabhängige Führung der beiden Prozessschritte ermöglichte.

Im ersten Prozessschritt wurden biplane Presslinge mit definierter Mikroporosität erstellt. Durch statistische Versuchsplanung konnten die Einflussgrößen der Prozesse der Kompaktierung und des Sinterns rational evaluiert und optimiert werden, sodass Presslinge mit definierter Soll-Porosität reproduzierbar hergestellt werden konnten. Von essentieller Bedeutung war die Überführung der HA-Bulkware in ein Sprühgranulat, wodurch sowohl dessen plastische Verformbarkeit als auch Fließfähigkeit deutlich verbessert werden konnten. Während Presslinge aus HA-Bulkware partiell zu Deckeln oder Laminierung neigten, zeigten sämtliche Presslinge aus HA-Granulat hohe Bruchkräfte und eine vollständig integre Struktur. Zur Überprüfung der Aufskalierbarkeit des Kompaktierungsprozesses wurde HA-Granulat mit einer Exzenterpresse und einem bi-facettiertem Stempelsatz (\varnothing 14 mm) verpresst. Da sämtliche Presslinge unbeschädigt vorlagen und die Abweichung der Presslingmassen $< 5\%$ war, wurde der Kompaktierungsprozess grundsätzlich als automatisierbar und aufskalierbar angesehen. Durch die Einbindung der Exzenterpresse konnte eine Steigerung der Stückzahl der Presslinge um den Faktor 500 gegenüber einer manuellen Kompaktierung erreicht werden. Aufgrund des Mangels eines in Verbindung mit der Exzenterpresse nutzbaren Presswerkzeuges mit einem Durchmesser > 33 mm, wurden im Folgenden sämtliche Presslinge manuell hergestellt.

Die Strukturierung der gesinterten Rohlinge im zweiten Prozessschritt konnte durch die Einbindung einer CNC-Fräse präzise, reproduzierbar teilautomatisiert und hochvariabel gestaltet werden. So konnten die Lipid-Kavitäten, die Perfusionskanäle und die mittige Kavität, die das zu testende Implantat aufnimmt, in ihrer Geometrie und Anordnung innerhalb des Scaffolds individuell gestaltet werden.

4 Design, Fertigung und Funktionsprüfung einer Durchflusszelle

4.1 Einleitung

Um das Freisetzungsverhalten wirkstoffhaltiger Implantate im künstlichen Knochenkompartiment bestimmen zu können, musste eine neuartige Durchflusszelle entwickelt werden, die eine bestimmungsgemäße Verwendung des Kompartimentes (Kapitel 3) ermöglicht. Für das funktionelle Design der Durchflusszelle waren sowohl die Anforderungen der Temperierbarkeit und Modularität, als auch technische Aspekte bei der Prototypenfertigung zu berücksichtigen. Idealerweise sollten die Bauteile so konstruiert werden, dass sie über einfache Fügebewegungen zusammengesteckt werden können, um eine zeitaufwendige und möglicherweise fehlerbehaftete Justierung zu vermeiden. Anhand von Funktionsprototypen wurde das Design auf seine Tauglichkeit geprüft, weiterentwickelt und optimiert. Da eine Prototypenentwicklung einer häufigen Modifizierung und Neuanfertigung von Bauteilen bedarf, galt es weiterhin geeignete Fertigungsverfahren zu evaluieren. So erarbeitete und etablierte der Autor die CNC-gesteuerte spanende Fertigungstechnik am Forschungsstandort.

Das zunächst entworfene Design der Durchflusszelle und dessen Weiterentwicklung werden im Folgenden anhand von ausgewählten Beispielen erläutert, da die Darstellung sämtlicher Prototypen aufgrund des Umfangs wenig sinnvoll erscheint. So werden auf Grundlage des ersten funktionsfähigen Prototypen VI die Details und Herausforderungen der technischen Umsetzung näher beschrieben. Das final erarbeitete und für nachfolgende Freisetzungsversuche verwendete Konzept wird anhand des Prototypen XVIII dargestellt.

4.2 Fertigungsverfahren

Die Herstellung der benötigten Prototypenbauteile kann durch formative, generative oder subtraktive Fertigungsverfahren erfolgen [167]. Formative Fertigungsverfahren, wie das Gesenkformen oder Spritzgießen ermöglichen eine schnelle und kontinuierliche Fertigung von relativ komplexen Bauteilen in hoher Stückzahl. Nachteilig

ist jedoch, dass überwiegend nur plastifizierbare Werkstoffe verarbeitet werden können und für jedes Bauteil eine individuelle Negativform anzufertigen ist [146]. Da im Rahmen der Prototypenfertigung eine schnell umsetzbare Änderung der Bauteile notwendig ist, sind die formativen Fertigungsverfahren nur bedingt sinnvoll.

Generative Fertigungsverfahren, wie 3D-Druck, Stereolithografie oder selektives Lasersintern, ermöglichen eine relativ unkomplizierte Fertigung von geometrisch hoch komplexen Bauteilen und Prototypen aus rechnergestützten Konstruktionen (computer-aided design - CAD). Im Bereich des Rapid-Manufacturing, -Prototyping und -Tooling spielen sie eine essentielle Rolle, da sich nahezu beliebige Geometrien erstellen und eine Vielzahl von Materialien verarbeiten lassen [145]. Des Weiteren zeichnen sie sich durch einen geringen Materialverlust und den nur bedingten Bedarf an Spannvorrichtungen und teuren Werkzeugen aus. Allen generativen Fertigungsverfahren ist jedoch gemein, dass die Bauteile schichtweise aufgebaut werden müssen, was zu sehr langen Durchlaufzeiten und Treppeneffekten im fertigen Bauteil führen kann [168]. Die Treppeneffekte nehmen zwar mit steigender technischer Auflösung des Verfahrens und Gerätes ab, jedoch kann trotzdem eine nachträgliche Bearbeitung erforderlich sein, um eine adäquaten Oberflächenqualität zu erhalten [145]. Damit die Prototypenbauteile durch Dichtungselemente spaltfrei gegeneinander abgedichtet werden können, muss eine hohe Oberflächengüte jedoch zwingend gewährleistet sein. Weiterhin kann sich der schichtweise Aufbau speziell bei mechanisch beanspruchten Bauteilen nachteilig auf die Stabilität und Haltbarkeit auswirken, sodass die additiven Fertigungsverfahren im Rahmen dieser Arbeit wenig sinnvoll erscheinen. Bei den subtraktiven Fertigungstechniken wird im Folgenden nur auf das für die Arbeit relevante und verwendete Verfahren des Spanens mit geometrisch bestimmter Schneide eingegangen, das zu der Hauptgruppe der trennenden Bearbeitungsverfahren gehört [146]. Den verwendeten Verfahren des Bohrens, FräSENS und Drehens ist gemein, dass die Formgebung des Werkstückes durch mechanische Entfernung von Werkstoffschichten in Form von Spänen erfolgt (DIN 8580). Sie bedürfen einer Vielzahl von unterschiedlichen Werkzeugen und geeigneten Spannvorrichtungen für das Werkstück. Ein großer Vorteil gegenüber den oben

erwähnten Verfahren ist jedoch, dass das Werkstück aus dem homogenen Gefüge nahezu jeden soliden Materials gefertigt werden kann. Dadurch können Bauteile mit höherer Stabilität und Oberflächengüte gefertigt werden, die essentiell für die einwandfreie Funktion der Durchflusszelle notwendig sind. Betrachtet man das funktionelle Design und die Geometrien der konstruierten Prototypenbauteile, lässt sich weiterhin erkennen, dass eine subtraktive Fertigung gegenüber einer additiven Fertigung zu bevorzugen ist, da sie bedeutend kürzere Durchlaufzeiten ermöglicht. Im Bereich der spanenden Fertigungstechnik ist die rechnergestützte (computerized numerical control - CNC) Fertigung von Bauteilen von großer Bedeutung. Die CNC-Steuerung der Maschinen und Werkzeuge ermöglicht eine präzise, schnelle und wiederholungsgenaue Fertigung von Werkstücken. Die Verfahrswege der Spanwerkzeuge werden der Geometrie des Werkstückes entsprechend programmiert und über eine Steuerungseinheit an die CNC-Fräse übertragen. Das geschriebene Programm kann somit jederzeit abgerufen und nach Bedarf geändert werden, was bei einer experimentellen Prototypenentwicklung einen großen arbeitstechnischen Zeitvorteil darstellt. Eine Herausforderung bei den spanenden Fertigungsverfahren ist die Gewährleistung einer absolut präzisen Ausrichtung und Fixierung des Werkstückes während der Zerspanung. Gilt es ein Werkstück in verschiedenen Positionen zu bearbeiten, muss es zwingend durch geeignete Spannvorrichtungen genauestens ausgerichtet werden, um jeglichen ungewollten Versatz, der zu einer Funktionsreduzierung oder gar einem Funktionsverlust des Werkstückes führen kann, zu verhindern.

4.3 Fertigung prototypischer Bauteile der Freisetzungszelle

Die Bauteile der Prototypen I bis VI wurden unter Verwendung einer manuellen Fräsmaschine und Drehbank gefertigt. Da alle Bauteile nachfolgender Prototypen und des finalen Prototypen XVIII unter Verwendung einer 3-Achsen-CNC-Fräse (S-710, Fa. Hylewicz CNC-Technik, Geldern, Deutschland, siehe Abbildung 3-6) gefertigt wurden, wird im Folgenden nur Bezug auf die CNC-gestützte Bauteilfertigung genommen. Die Verfahrswege, der zur Zerspanung genutzten Spiralbohrer (Abbildung 3-8, 4 ($\varnothing 1$ mm) und 5 ($\varnothing 2$ mm)) und Fräser (Einschneider mit Rechtsdrall, Abbildung

3-8, 6 ($\varnothing 1$ mm) und 7 ($\varnothing 2$ mm)), wurden in einer Grafikdatei mit der Software Corel Draw® (Version X6, Corel Corporation), erstellt und als CAM-lesbare Datei exportiert, oder direkt in der CAM-Software ConstruCAM-3D® (Fa. Hylewicz) programmiert. Abbildung 4-1 und Tabelle 4-1 zeigen beispielhaft die Konstruktionszeichnung und Verfahrswege der Oberseite eines Bodens der Freisetzungszelle mit vollflächig verteilten 2 mm Durchgangsbohrungen. Die entsprechenden Konstruktionszeichnungen und Verfahrswege der übrigen Bauteile des finalen Prototypen XVIII sind in Anhang 9.4 aufgeführt. Die Programmierung der Verfahrswege basiert auf einem zentralen Werkstücknullpunkt, wobei die Geometrien folgendermaßen bezeichnet sind: \varnothing : Durchmesser einer Kreisbahn, b*h: Fläche eines Rechteckes, r: Radius, ER: Eckradius, ES: Eckschräge und n.i. beziehungsweise n.a.: Versatz einer programmierten Fräsbahn nach innen beziehungsweise nach außen.

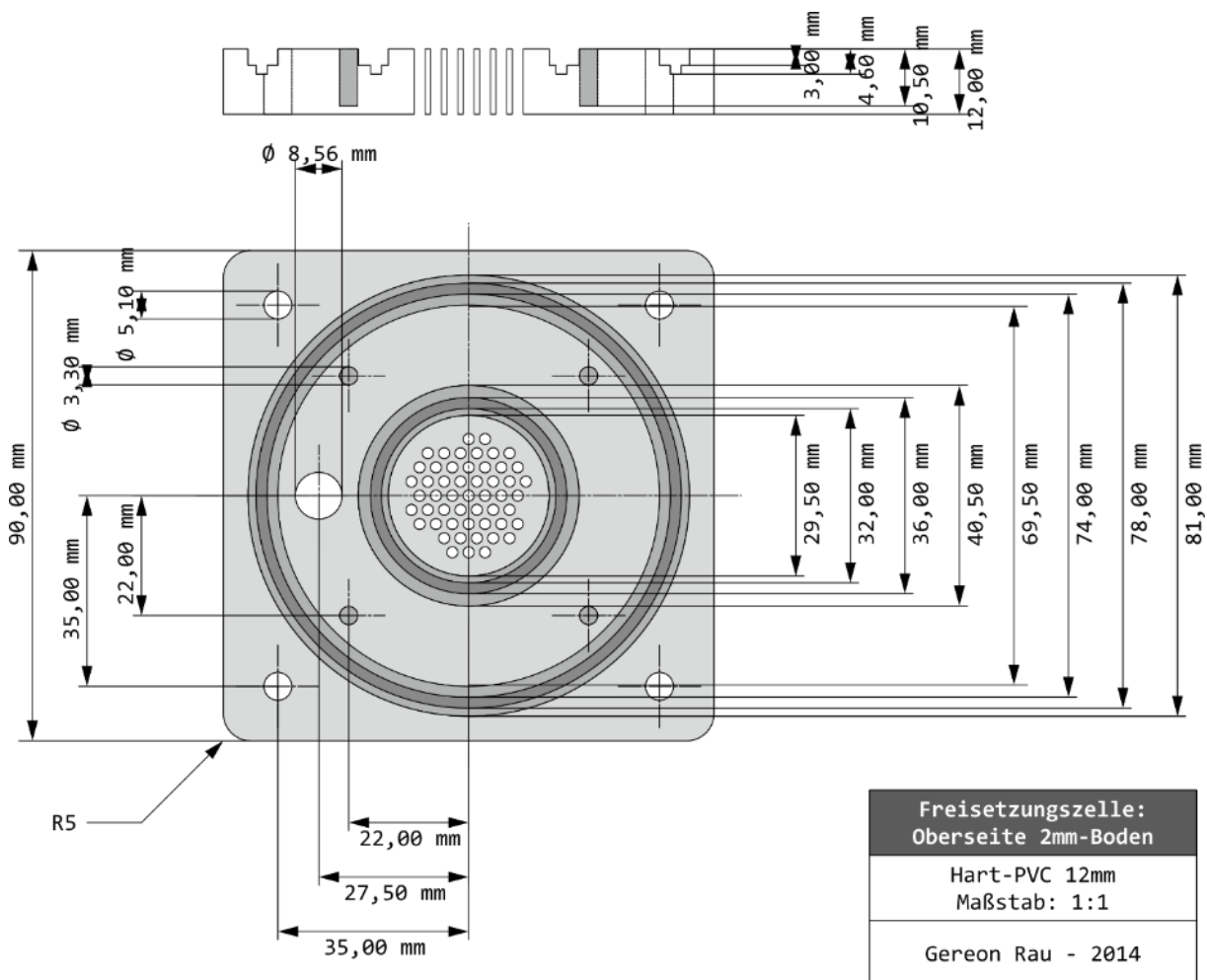


Abbildung 4-1: Konstruktionszeichnung eines Freisetzungszellenbodens mit maximal verteilten 2 mm Durchgangsbohrungen (Oberseite)

Tabelle 4-1: Verfahrwege zur Fertigung des in Abbildung 4-1 gezeigten Bauteils

Layerinhalt	Verfahren	Position		Geometrie		Tiefe _{gesamt}	Tiefe _{Bahn}
		x in mm	y in mm	Ø; b*h; r; ER, ES		in mm	in mm
Fixationslöcher 5 mm	Senkung	35	35	Ø	5,1	12,5	1,5
		35	-35				
		-35	-35				
		-35	35				
Pinlöcher	Bohrung	angepasst - v.u.		Ø	2,0	12,5	1,5
Planung des Federrings	Schraffur	0	0	r	17	0,2	0,2
					15		
Vertiefung der kombinierten Kontur	Schraffur; 1,2 mm n.i.	0	0	40	40	2,2	1,5
		0	0	10	62		
		20	20	ER	1		
		20	-20				
		-20	-20				
		-20	20				
		5	20	ES	4		
		5	-20				
		-5	-20				
		-5	20	ER	5		
		5	31				
		5	-31				
-5	-31						
-5	31						
Konturschlichtung	Fräsbahn 1 mm n.i.	siehe obige Kontur				2,2	2,2
Vertiefung des Innenkreises	Schraffur	0	0	r	13,8	2,2	1,5
Kreisschlichtung	Fräsbahn	0	0	r	14	2,2	2,2
Ø 2 mm Löcher	Bohrung	angepasst - v.u.		Ø	2,0	10,5	2,7
Kernloch R 1/8" (BSPT)	Senkung	-27,5	0	Ø	8,56	12,5	1,5
Kernlöcher M3 (DIN 13-1)	Senkung	15,5	15,5	Ø	2,5	10	1,5
		15,5	-15,5				
		-15,5	-15,5				
		-15,5	15,5				
		0	26				
		0	-26				
Außenkontur	Fräsbahn 1 mm n.a.	0	0	90	90	11,5	1,5
		45	45	ER	5		
		45	-45				
		-45	-45				
		-45	45				
Außenkontur	Fräsbahn 1 mm n.a.	0	0	90	90	1	Z: 11,5

In Abhängigkeit des zu fertigen Bauteils wurde der jeweilige Werkstoff in Plattenform (Materialstärke: 12,0 mm) auf dem Frästisch fixiert, der entsprechende Fräser beziehungsweise Bohrer in die Frässpindel gespannt und der Werkstoff, der programmierten Geometrie entsprechend, zerspant. Die verwendeten Verfahrensgeschwindigkeiten zur Zerspaltung sind, soweit nicht chargenspezifisch gesondert benannt, in Tabelle 4-2 aufgeführt. Um eine Z-Achsen-parallele Ausrichtung des Fräskopfes zum Werkstoff gewährleisten zu können, wurde der Frästisch zuvor planparallel abgeplant. Nach erfolgter Zerspaltung wurden die Werkstücke aus der Platte ausgefräst, umgedreht und auf den Frästisch aufgespannt. Dabei wurden die Werkstücke mit Zylinderstiften beziehungsweise eigens angefertigten Aufnahmen über ihre jeweiligen Fixierlöcher rotations- und versatzfrei auf dem Frästisch ausgerichtet. Etwaige Gewinde wurden manuell mittels Gewindebohrer geschnitten.

Tabelle 4-2: Prozessparameter der Bauteilfertigung

Vorschub X-Achse	mm · s ⁻¹	5,0
Vorschub Y-Achse	mm · s ⁻¹	5,0
Vorschub Z-Achse	mm · s ⁻¹	2,0
Spindeldrehzahl	min ⁻¹	25 000
Maximale Schichttiefe	mm	1,0
Kühlung/ Spanabfuhr		Druckluft

4.4 Werkstoffe für prototypische Bauteile

Eine grundlegende Anforderung an alle verwendeten Werkstoffe ist, dass sie gegenüber den im Knochenkompartiment verwendeten Materialien inert und bei der Reinigung mit geeigneten Lösungsmitteln und Tensiden beständig sind. Des Weiteren sollten die Bauteile für Zelllinienversuche mit gängigen Verfahren sterilisierbar sein. Jene Bauteile, die mit dem Knochenkompartiment in Kontakt stehen, weisen idealerweise eine hohe Wärmeleitfähigkeit auf, um eine hohe Wärmeübertragung zwischen Temperiermantel und Kompartiment zu ermöglichen, während außenliegende Bauteile bevorzugend thermisch isolierend sind (siehe Kapitel 1354.5.4). Um den Fertigungsprozess zeit- und kosteneffektiv darstellen zu können sind preiswerte Werkstoffe zu bevorzugen, die sich bei ausreichender Festigkeit leicht bearbeiten lassen. So können Durchlaufzeiten verkürzt und die Standzeiten der zur Zerspanung eingesetzten Werkzeuge verlängert werden. Für die Prototypen VI - VXIII wurden weichmacherfreies Polyvinylchlorid (PVC-U (unplasticized)), Polycarbonat (PC - Makrolon®) und Polymethylmethacrylat (PMMA - Plexiglas®) verwendet, deren relevanten Eigenschaften in Tabelle 4-3 aufgeführt sind. Auf Grund geringer Kosten, adäquater Festigkeit und guter Zerspanbarkeit wurden die Bauteile bevorzugt aus PVC-U gefertigt. Nur der Deckel, das obere Anschlußteil und die Zylinder wurden aus transparentem PC und PMMA gefertigt, um eine visuelle Kontrolle des Knochenkompartimentes zu ermöglichen. Als Dichtungselemente wurden O-Ringe aus Naturkautschuk (2 mm Schnurstärke) verwendet. Die Verbindungsschrauben bestanden aus V2A-Stahl, die Gewindetüllen aus Messing oder Polyethylen (PE).

Tabelle 4-3: Physikalische Eigenschaften verwendeter Werkstoffe [169,170]

		PC	PMMA	PVC-U
Schmelzpunkt	°C	220	150	150
E-Modul	Kp · cm ⁻²	25 000	32 000	30 000
Wärmeleitfähigkeit	W · (m · K) ⁻¹	0,17	0,16	0,15
Zugfestigkeit	Kp · cm ⁻²	650	600	0,15
Druckfestigkeit	Kp · cm ⁻²	800	1270	1100

4.5 Prototypenaufbau

Betrachtet man den Aufbau etablierter Durchflusszellen, die als Bioreaktor [171], Freisetzungsapparatur für Arzneiformen [24] oder in der Mess- und Verfahrenstechnik Anwendung finden, lassen sich, trotz der durch den Verwendungszweck bedingten Geometrieunterschiede, grundlegende Gemeinsamkeiten erkennen. Den zentralen Kern bildet stets eine perfundierbare Kammer, die über einen Zu- und Ablauf mit flüssigem Medium versorgt wird. Je nachdem ob eine laminare oder turbulente Strömung des Mediums innerhalb der Kammer angestrebt wird, sind die Kammer und die medienführenden Bauteile den Anforderungen entsprechend geometrisch modifiziert, oder werden durch statische Mischeinheiten und Strömungsschikanen ergänzt. Gilt es aufgrund temperaturabhängiger Prozesse eine definierte und konstante Temperatur in der Durchflusszelle einzustellen, ist die Kammer von einem Temperiermantel umgeben.

Da diese Bauart auch für die zu entwickelnde Durchflusszelle geeignet erscheint, beruht ihr grundlegendes Design auf einer zentralen Kammer, die das Knochenkompartiment aufnimmt und für eine konstante Temperierung partiell von einem Temperiermantel umschlossen wird. Über variabel gestaltete Bauteile wird das Knochenkompartiment mit künstlichem Knochenmark befüllt und nachfolgend mit Freisetzungsmittel perfundiert. Um die jeweiligen Geometrien der Kammer und Bauteile entwerfen zu können, gilt es im Folgenden die technischen Anforderungen zu erarbeiten, die von den Bauteilen erfüllt werden müssen, damit die bestimmungsgemäße Funktionalität der Durchflusszelle gewährleistet werden kann.

4.5.1 Kammer für das künstliche Knochenkompartiment

Die Kammer sollte derart gestaltet sein, dass sie das künstliche Knochenkompartiment vollständig aufnimmt, dieses jedoch an seinen Stirnseiten mit den medienführenden Bauteilen in Kontakt stehen kann, um mit künstlichem Knochenmark befüllt und nachfolgend mit Freisetzungsmittel perfundiert zu werden. Eine vertikale und rotationsfreie Fixierung der Scaffolds in der Kammer ist dabei zwingend notwendig,

damit die vertikalen Perfusions- und Markkanäle ausgefluchtet sind und sich das jeweilige Medium reproduzierbar und gleichmäßig in ihnen verteilen kann (siehe Kapitel 3.6.9). Da für das Einbringen des künstlichen Knochenmarks in die Kanäle eine Vakuum-Druck-Befüllung sinnvoll erscheint, sollten die Kammer und entsprechende Bauteile eine adäquate Vakuumfestigkeit aufweisen. Des Weiteren sollte die Geometrie der Kammer derart gestaltet sein, dass sie das Kompartiment gegenüber dem Temperiermedium abdichtet, den Anschluss der medienführenden Bauteile ermöglicht, leicht an die Größe des Knochenkompartimentes anzupassen ist und ein möglichst geringes Totvolumen zwischen Kompartiment und Wandung aufweist. Eine schlichte Geometrie der Kammer ermöglicht idealerweise eine montagegerechte Handhabung und einfache Reinigung nach einem erfolgten Freisetzungsversuch.

Aus den Betrachtungen ergibt sich, dass die Kammer bevorzugt als Zylindersystem zu konstruieren ist, dessen zentraler Zylinder das Knochenkompartiment aufnimmt, welches an Ober- und Unterseite durch variable Verbindungsteile abgedichtet und fixiert wird. Der Innendurchmesser und die Höhe des Zylinders orientieren sich dabei an der Geometrie des eingesetzten Knochenkompartimentes. Die Verbindungsteile sind mit vertikalen Durchgangsbohrungen zu versehen, deren Anordnung individuell an das Muster der vertikalen Mark- und Perfusionskanäle des eingesetzten Knochenkompartimentes anzupassen ist. So bleiben die Kanäle nach dem Zusammenfügen des Zylinders und der Verbindungsteile für die Befüllung und Perfusion zugänglich. Über Fixationspins (Abbildung 3-38 (E)) gilt es die Scaffolds deckungsgleich zu den Durchgangsbohrungen in den Verbindungsteilen auszurichten und durch geeignete Vorrichtungen zu fixieren. Durch statische Dichtungselemente ist sicherzustellen, dass die Verbindungsteile sowohl gegenüber dem Zylinder und als auch den medienführenden Bauteilen abgedichtet werden können.

4.5.2 Medienführende Bauteile

Die medienführenden Bauteile sollten derart konstruiert sein, dass sie montagegerecht an die Verbindungsteile anzuschließen und durch statische Dichtungselemente abzudichten sind. Um das Kompartiment vollständig und reproduzierbar befüllen und perfundieren zu können, bedarf es geeigneter Bauteilgeometrien, die eine gleichmäßige Verteilung der Medien auf die vertikalen Mark- und Perfusionskanäle ermöglichen. Die Verteilung kann dabei grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Das Medium wird entweder vollflächig auf die Verbindungsteile geleitet und strömt durch die Gesamtheit der Durchgangsbohrungen in die Kanäle oder jeder einzelne Kanal wird mit einer separaten Medienzuführung versehen. Auf die Limitierungen und fluidmechanistischen Eigenschaften der vollflächigen Anströmung wird im späteren Verlauf der Arbeit näher eingegangen.

Zur Förderung des wässrigen, niedrig viskosen Freisetzungsmediums sind beide Arten in Betracht zu ziehen. Bei einer Einzelkanalzuleitung können Bauteile mit geringen Leitungsdurchmessern verwendet werden und die Medienzuführung über einfache Schlauchverbindungen und kontinuierlichen Fördereinheiten, wie Schlauch- oder Membranpumpen erfolgen. Die Geometrie der medienführenden Bauteile muss sich dabei zwingend an der Kanalanordnung in den Scaffolds orientieren und für jede Struktur individuell entworfen werden. Der begrenzte Bauraum limitiert jedoch die mögliche Anzahl an Schlauchanschlüssen und somit die Anzahl an Kanälen, die mit Medium versorgt werden können. Für eine vollflächige Anströmung der Durchgangsbohrungen ist eine Bauteilgeometrie mit einem genügend großen Expansionsraum erforderlich, in dem sich das zugeführte Medium auf die gesamte Querschnittsfläche der Lochscheibe verteilen kann, damit die Front des Mediums nach einer genügend hohen Steighöhe laminar auf die Lochscheibe strömt.

Betrachtet man die Navier-Stokes-Gleichung (11) und das Gesetz von Hagen-Poiseuille (12), lässt sich ableiten, dass bei zunehmender Viskosität der Medien und gleichbleibendem Kanaldurchmesser der Druck ansteigt, den es aufzuwendenden gilt, um den Strömungswiderstand bei der Befüllung des Kompartimentes zu überwinden.

Daher sind zum Befüllen des Knochenkompartimentes mit künstlichem Knochenmark Bauteile mit weniger komplexen Geometrien, größeren Durchmessern und leistungsfähige Fördereinheiten vonnöten.

Navier-Stokes-Gleichung:
$$v_t - \frac{\eta \cdot \Delta v}{\rho} + v \cdot \nabla v + \nabla p = f \quad (11) [172]$$

v_t : *Geschwindigkeit des Fluids (zum Zeitpunkt t)*
 η : *Viskosität des Fluids*
 ρ : *Dichte des Fluids*
 p : *Druck*
 f : *Volumenkraft*

Hagen-Poiseuille-Gesetz:
$$\frac{dV}{dt} = \frac{\pi \cdot r^4 \cdot \Delta p}{8 \cdot \eta \cdot l} \quad (12) [125]$$

$\frac{dV}{dt}$: *Durchflussvolumen pro Zeiteinheit*
 r : *Kapillarradius*
 Δp : *Druckunterschied*
 η : *Viskosität des Fluids*
 l : *Länge des Kanals*

4.5.3 Fördereinheiten für FreisetzungsmEDIUM und künstliches Knochenmark

Die Anforderungen an die Fördereinheiten des Freisetzungsmediums und des künstlichen Knochenmarks unterschieden sich stark. Während große Volumina des niedrig viskosen Freisetzungsmediums mit handelsüblichen Pumpen über einen langen Zeitraum kontinuierlich gefördert werden können, bedarf das höher viskose künstliche Knochenmark leistungsfähigerer Fördereinheiten. Des Weiteren ist die Menge an künstlichem Knochenmark auf die initiale, nur einmalige Befüllung des Markkanalvolumens im Knochenkompartiment limitiert. Daher erscheint hier die Verwendung eines Spritzen- oder Kolbensystem sinnvoll, mit denen sich ein entsprechendes Volumen an künstlichem Knochenmark durch adäquaten Druck fördern lässt.

4.5.4 Temperiermantel

Die zylindrische Kammer, die das Knochenkompartiment aufnimmt, sollte möglichst großflächig vom Temperiermantel umschlossen werden, damit die Wärmeübertragung zwischen ihm und dem Kompartiment über eine möglichst große Fläche erfolgen kann. Die medienführenden Bauteile sollten dennoch einfach zu montieren beziehungsweise zu demontieren sein. Bei vielen gängigen Durchflusszellen wird die innere Kammer weitestgehend von einem Temperiermantel umgeben, der von einem Temperiermedium durchströmt wird. Dieser Aufbau erscheint auch im Rahmen dieser Arbeit vorteilhaft, da das Temperiermedium die Oberfläche des inneren Zylinders vollständig umgibt und nicht temperierte Totvolumina vermieden werden können. Aufgrund seiner hohen spezifischen Wärmekapazität [173] und geringen Kosten erscheint Wasser als geeignetes Temperiermedium. Sollen mehrere Durchflusszellen simultan genutzt werden, ist der Zu- und Ablauf des Temperiermantels idealerweise so zu konstruieren, dass die Zellen untereinander und mit dem Thermostaten in Reihe verbunden werden können.

4.6 Funktionelles Design des Prototypen VI

Das funktionelle Design des Prototypen VI wird im Folgenden in drei Bereiche gegliedert: das innere Zylindersystem, zur Aufnahme und Abdichtung des künstlichen Knochenkompartimentes, die variablen Bauteile zur Zuführung und Ableitung des jeweiligen Mediums und das äußere Zylindersystem, das den Temperiermantel bildet. Der Aufbau des zusammengesetzten Prototypen VI und des inneren Zylindersystems ist in Abbildung 4-2 a) und b) dargestellt, der detaillierte Aufbau in Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4.

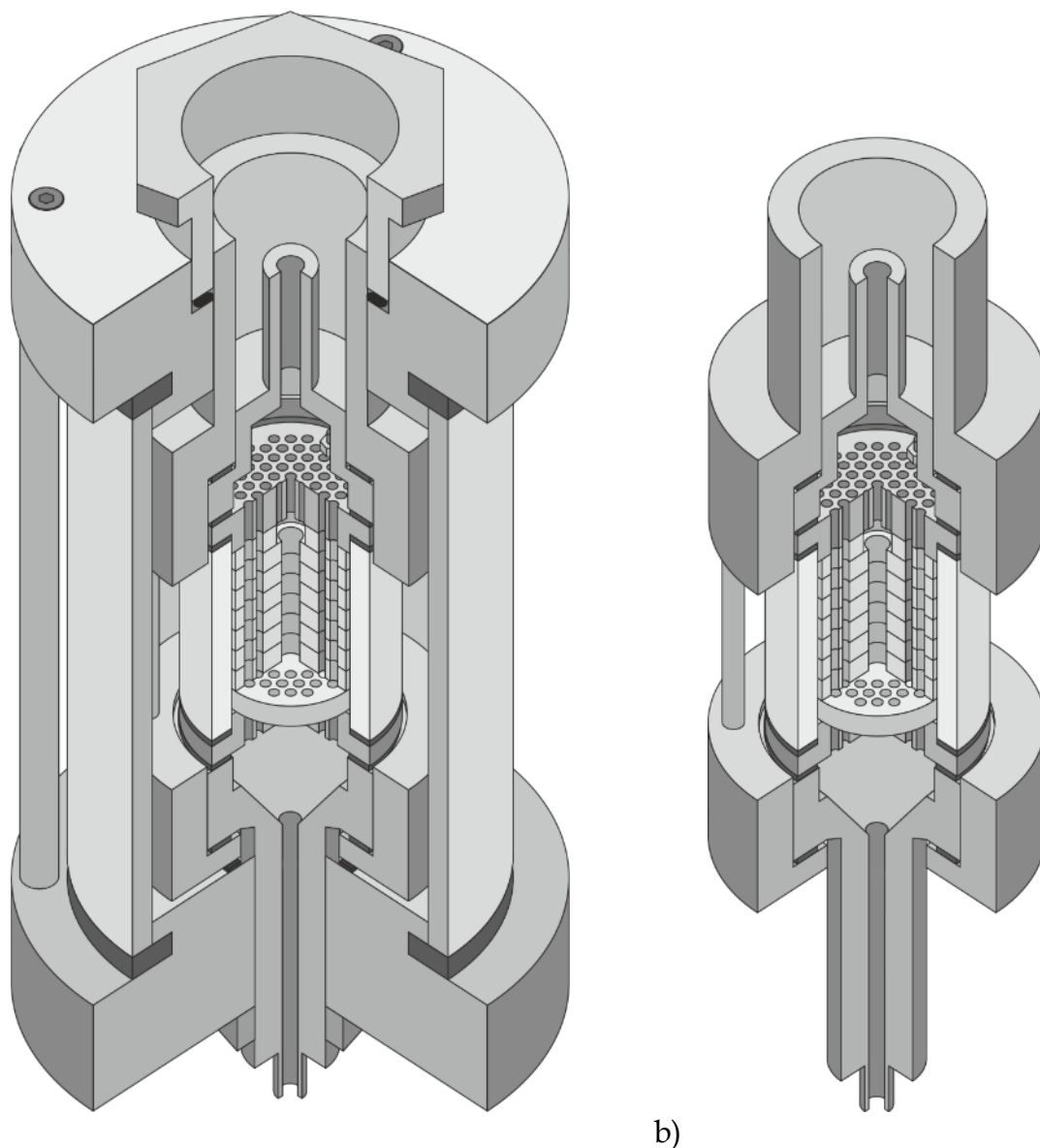


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Prototypen VI
a) Vollständig zusammengesetzte Freisetzungszelle
b) Inneres Zylindersystem mit Knochenkompartiment

4.6.1 Inneres Zylindersystem

Das innere Zylindersystem gliedert sich in einen transparenten Zylinder (Abbildung 4-3 (I)), der durch eine obere (F) und untere (L) Lochscheibe und entsprechende Flachdichtungen (G & K) abgedichtet wird. Zur Erzeugung des zum Abdichten notwendigen Anpressdruckes werden die Lochscheiben über die Fixationsmutter (D & N) und Gewindestäbe (H) zusammengezogen. Die Gewindestäbe dienen gleichzeitig als Fixationspins für das mittig eingebrachte Knochenkompartiment (J). Die Dimensionierung des Zylinders und die Höhe der Falz der Lochscheiben orientiert sich an der Größe des Kompartimentes.

4.6.2 Medienführende Bauteile

Die medienführenden Bauteile weisen alle eine rotationssymmetrische Geometrie und einen mittigen Expansionsraum (O) auf. Der Expansionsraum ist in den medienzuführenden Bauteilen (R) konisch gestaltet, um eine gleichmäßige Verteilung der Medien zu erreichen. Die zur Befüllung verwendete Bauteile (C & R) weisen indes auch größere Innendurchmesser und dickere Schlauchanschlüsse auf, als die zur Perfusion eingesetzten Bauteile (nicht dargestellt). So kann das höher viskose künstliche Knochenmark adäquat geführt werden. Des Weiteren ist der Schlauchanschluss des oberen Anschlußteils an die Dicke eines Vakuumschlauches (Innendurchmesser: 5 mm) angepasst, um eine Vakuum-Druck-Befüllung durch Evakuierung der Kammer zu ermöglichen. Der Innendurchmesser der oberen (A) und unteren (Q) Aufnahme ist derart gewählt, dass sie die medienführenden Bauteile inklusive der Lochscheiben horizontal fixierend aufnehmen können. Über Eindrehen der Verbindungsschrauben (T) in die korrespondierenden Gewindebohrungen (nicht dargestellt) in der Aufnahme (A) werden die obere und untere Aufnahme zusammengezogen und die entsprechenden Flachdichtungen zwischen den Bauteilen dichtend angepresst. Um die medienführenden Bauteile durch den Temperiermantel führen zu können, ist das untere Anschlußteil (R) derart verlängert und am Ende mit einem Gewinde versehen, dass es durch den Boden des Temperiermantels reicht und über die Fixationsmutter (S) und eine entsprechende Flachdichtung (siehe Abbildung

4-2) befestigt und abgedichtet werden kann. Die obere Aufnahme wird durch eine seitlich eingepasste Dichtung (Abbildung 4-4 c) im Deckel abgedichtet.

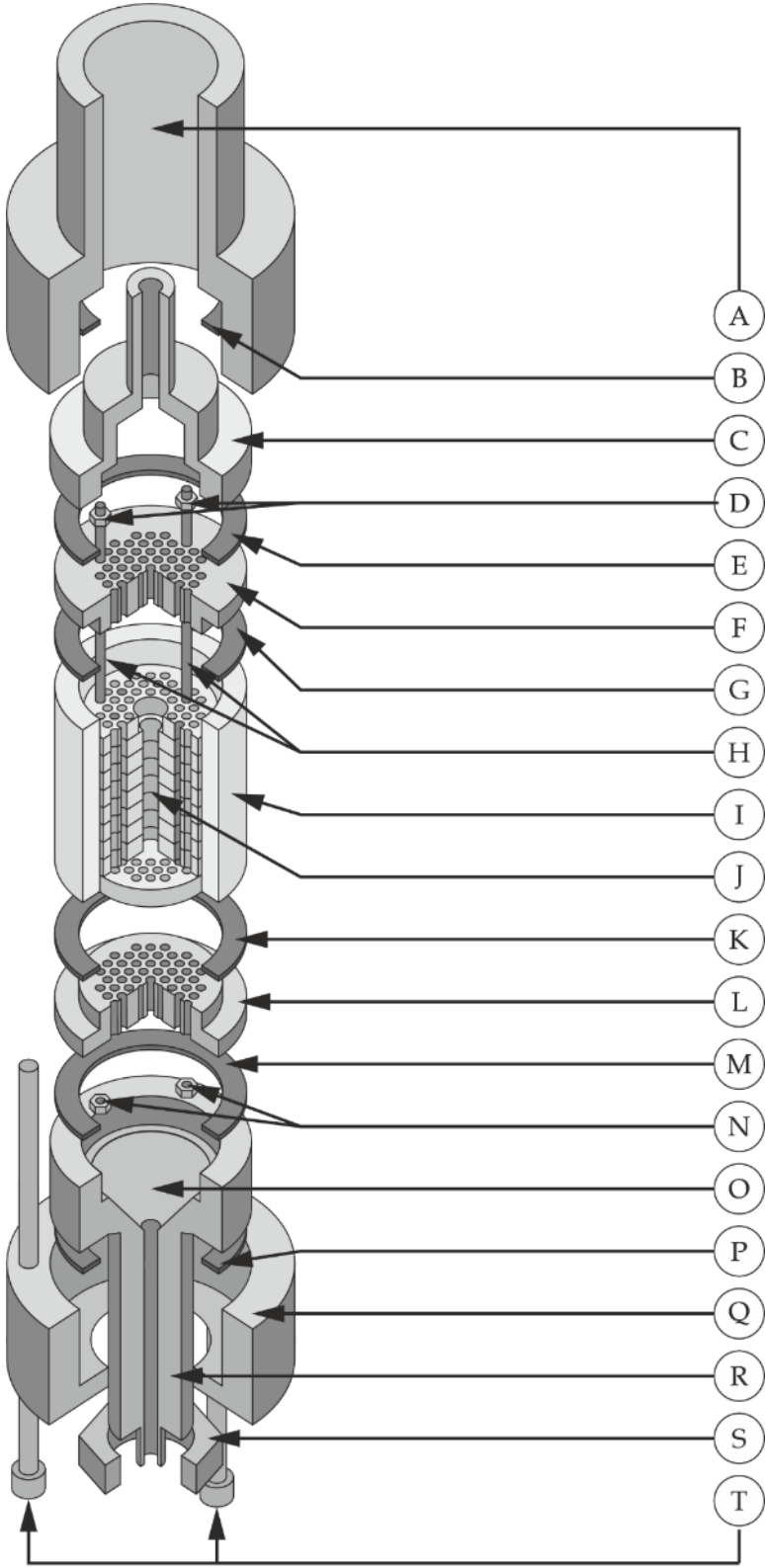


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Prototypen VI Inneres Zylindersystem und medienführende Bauteile

Tabelle 4-4: Bauteilzuordnung - Prototyp VI - Inneres Zylindersystem und medienführende Bauteile

A	Obere Aufnahme	K	Flachdichtung
B	Flachdichtung	L	Untere Lochscheibe
C	Oberes Anschlußteil	M	Flachdichtung
D	Fixationsmutter M2	N	Fixationsmutter M2
E	Flachdichtung	O	Konischer Expansionsraum
F	Obere Lochscheibe	P	Flachdichtung
G	Flachdichtung	Q	Untere Aufnahme
H	Gewindestäbe M2	R	Unteres Anschlußteil
I	Innerer Zylinder	S	Fixationsmutter (Anschlußteil)
J	Knochenkompartiment	T	Verbindungsschrauben M4

4.6.3 Äußeres Zylindersystem

Der Temperiermantel des Prototypen VI ist ebenfalls als Zylindersystem aufgebaut, das sich in einen äußeren Zylinder (Abbildung 4-4 (H)), Deckel und Boden gliedert. Durch Eindrehen der oberen Verbindungsschrauben (A) in die Gewinderohre (J), die in entsprechenden Aufnahmen (N) über die unteren Gewindeschrauben (nicht dargestellt) fixiert sind, werden der Boden und Deckel zusammengezogen und die in den Nuten (F & O) eingebrachten Flachdichtungen (G & K) dichtend zusammengepresst. Durch das Durchgangsloch (L) im Boden wird das untere Anschlußteil des inneren Zylindersystems geführt und mit einer Fixationsmutter (Abbildung 4-3 (T)) arretiert.

Das obere Anschlußteil des inneren Zylindersystems durchdringt das Durchgangsloch des Deckels und wird durch Eindrehen des Reduzierstücks (B) und dem damit verbundenen Zusammenpressen des in der Falz (E) ruhenden Dichtungsring (C) abgedichtet. Durch den radial abdichtenden Dichtungsring im Deckel und die Geometrie des oberen Anschlußteils kann die Höhe des inneren Zylindersystems in gewissen Grenzen variiert werden. Über die Temperiermediumzuführung (M) im Boden wird das Temperiermedium in die Zelle eingeleitet und über eine entsprechende Bohrung (nicht dargestellt) im Deckel abgeleitet.

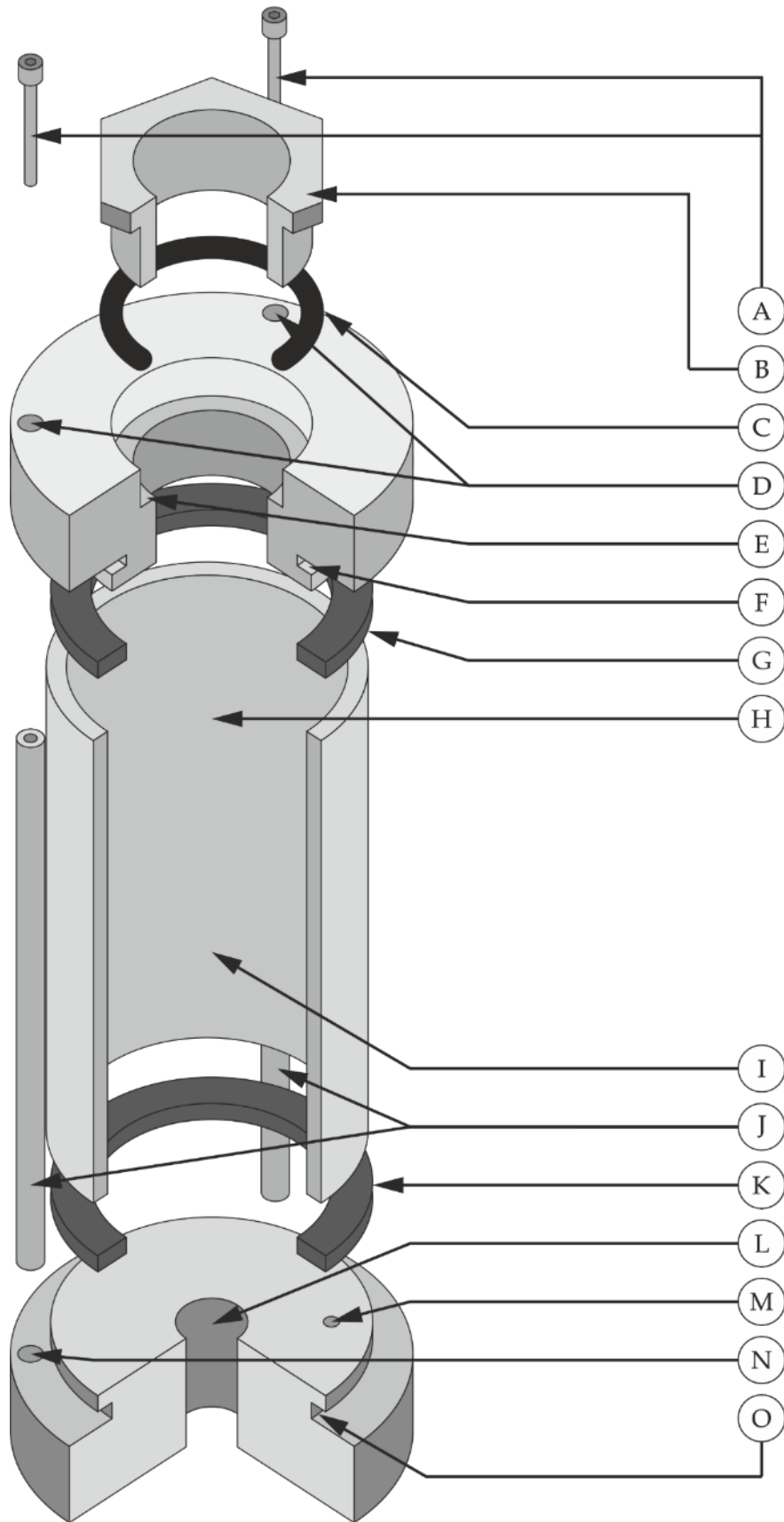


Abbildung 4-4: Schematische Darstellung des Prototypen VI
Äußeres Zylindersystem

Tabelle 4-5: Bauteilzuordnung - Prototyp VI - Äußeres Zylindersystem

A	Verbindungsschrauben M4	I	Aufnahme des Kompartiments
B	Reduzierstück	J	Gewinderohre
C	Dichtungsring	K	Flachdichtung
D	Durchgangsloch	L	Durchgangsloch
E	Falz	M	Temperiermediumzuführung
F	Nut für Flachdichtung	N	Aufnahme Gewinderohr
G	Flachdichtung	O	Nut für Flachdichtung
H	Zylinder, außen		

4.6.4 Bewertung des Designs des Prototypen VI

Nach Fertigung sämtlicher Bauteile und eingehenden Prüfungen zur Funktionalität des Prototypendesigns zeigte sich, dass das der Prototyp VI in seinem funktionellen Design den grundlegenden Anforderungen gerecht wurde. Die Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit Befüllung und Perfusion des Kompartimentes bedurften jedoch einer umfassenden Verbesserung. Im Folgenden gilt es diese Schwachstellen darzustellen und ein verbessertes Design aus ihnen abzuleiten

4.6.4.1 Inneres Zylindersystem

Die Gestaltung der Durchflusskammer als Zylindersystem, in das mittig das Knochenkompartiment eingebracht und statisch über die Lochscheiben abgedichtet wird, kann prinzipiell als sinnvoll betrachtet werden. Der Zylinder ist dabei jedoch stets individuell in Höhe und Innendurchmesser an die Geometrie des Knochenkompartiments anzupassen, die Durchgangsbohrungen in den Lochscheiben entsprechend der Form und Anordnung der vertikalen Mark- und Perfusionskanäle der Scaffolds. Nachteilig zeigt sich dabei das beidseitige Aufliegen der Lochscheiben auf dem Zylinder, da dieser somit nur für eine genau definierte Höhe verwendungsfähig ist. Ergeben sich minimale Abweichungen in der Höhe des Knochenkompartimentes, so stoßen die Lochscheiben entweder auf dessen Stirnseiten, sodass die Flachdichtungen nicht angepresst werden können (Abbildung 4-5 (II)), oder zwischen den Lochscheiben und dem Knochenkompartiment besteht ein Spalt, in den die Medien ungewollt eindringen können (Abbildung 4-5 (I)). Weiterhin konnte bei

einigen Versuchsreihen eine Torsion des Knochenkompartimentes beobachtet werden (Abbildung 4-5 (III)). Dies ist einerseits durch den unvollständigen Formschluss zwischen den Scaffolds und den Gewindestangen zu begründen, da der tatsächliche Durchmesser der Gewindestangen geringer war, als der Nenndurchmesser, an dem sich der Durchmesser der Fixationslöcher in den Scaffolds orientierte. Andererseits ist durch die rotationssymmetrische Form des Zylinders und der Lochscheiben nur bedingt eine adäquate Ausrichtung und Fixierung der Scaffolds in Richtung der Rotationsachse möglich. Betrachtet man das innere Zylindersystem hinsichtlich seiner Montagegerechtigkeit, sind vor allem die M2-Fixierungsmuttern als wenig geeignet zu betrachten. In Verbindung mit den Gewindestangen wird zwar einen ausreichenden Kraftschluss zwischen Zylinder und Lochschieben erreicht, aufgrund ihrer geringen Größe sind sie jedoch schwierig handzuhaben.

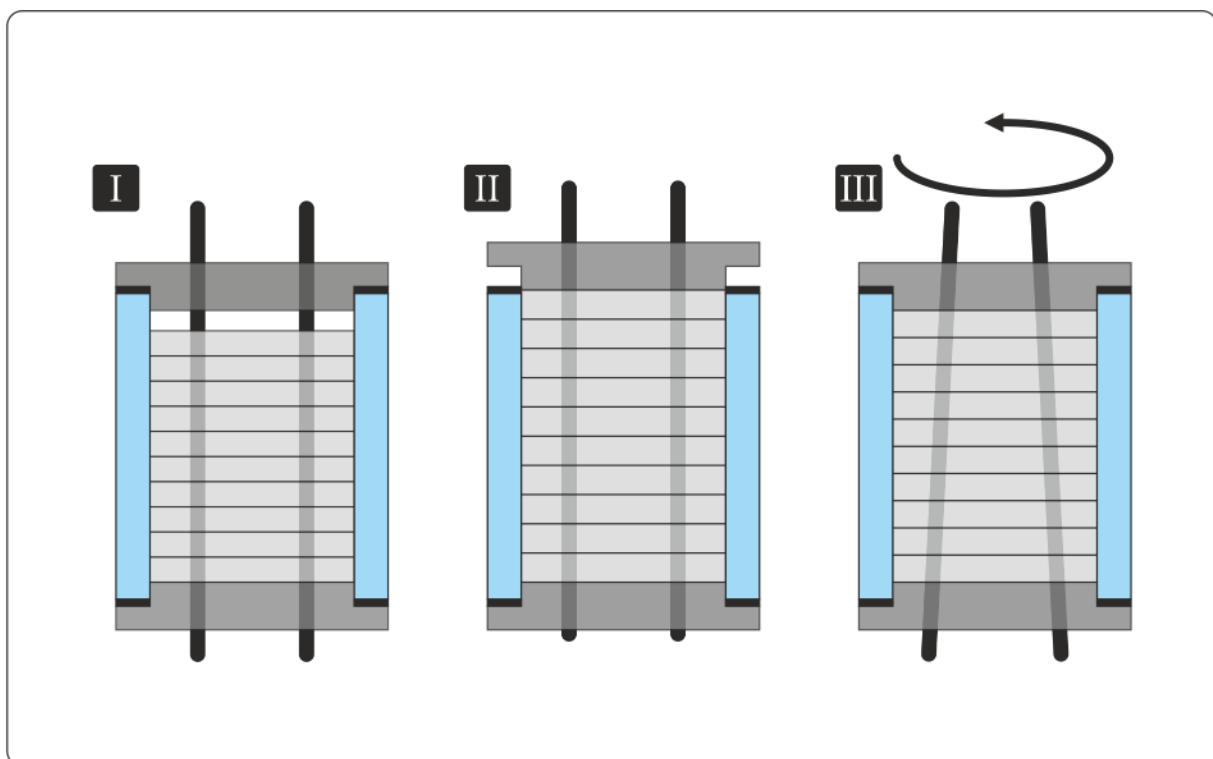


Abbildung 4-5: Schematische Darstellung des inneren Zylindersystems des Prototypen VI

Aus den aufgeführten Beobachtungen lässt sich ableiten, dass ein Kolben-Zylinder-System zweckmäßiger wäre, das es ermöglicht, eine in der Höhe variabel einstellbare

Lochscheibe auf eine der Stirnseiten des Kompartimentes abzusenken, um es abzudichten. Die formschlüssige Ausrichtung der Scaffolds sollte idealerweise über Fixationspins mit angepasstem Durchmesser erfolgen, während die kraftschlüssige Fixierung durch separate, einfach handzuhabende Bauteile erfolgt. Die Umsetzung des entsprechenden Kolben-Zylindersystem ist Kapitel 4.7.3.1 beschrieben.

4.6.4.2 Medienführende Bauteile

Die Funktionalität der medienführenden Bauteile wurde durch Dichtigkeits-, Befüllungs- und Perfusionstests mit maximal gelochten Scaffolds (2 mm Kavitäten) und ohne eingesetztes Implantat überprüft. Die Geometrie der Mark- und Perfusionskanäle entspricht Abbildung 4-17. Für die Prüfung auf Dichtigkeit wurden das innere Zylindersystem, die medienführenden Bauteile und die Aufnahmen mit den entsprechenden Flachdichtungen zusammengesetzt, evakuiert (200 mbar) und vollständig in einer Wasserbad eingebracht. Als dicht wurde das System angesehen, wenn nach 10 Minuten im Wasserbad kein Wasser in das zusammengesetzte System eingedrungen war. Dabei konnte gezeigt werden, dass das unter Kapitel 4.6.2 beschriebene Dichtungsprinzip grundsätzlich funktioniert. Jedoch zeigte sich bei den Prüfungen, dass ein gleichmäßiges und wechselseitiges Anziehen der Verbindungsschrauben (Abbildung 4-3 (T)) unabdingbar ist, um ein einseitiges Kippen der Aufnahme zu verhindern. Wird die Aufnahme einseitig zu stark angezogen, kann sie die Dichtung auf der gegenüberliegenden Seite nicht mehr vollflächig anpressen. Weiterhin kam es bei einigen Versuchen zur Verschiebung der Flachdichtungen, da diese führungsfrei zwischen den Bauteilen eingebracht waren.

Die Funktionalität der zur Befüllung des Knochenkompartimentes mit künstlichem Knochenmark genutzten Bauteile wurde anhand der Befüllungsgüte maximal gelochter Knochenkompartimente bewertet. Hierfür wurde auf 60 °C erwärmte Vaseline (siehe Kapitel 5.3.6) mit einer handelsüblichen 20 mL Spritze über das untere Anlussteil (Abbildung 4-3 (R)) in das Knochenkompartiment gedrückt. Dabei zeigte sich in Abhängigkeit der Eintragungsgeschwindigkeit eine ausgeprägt heterogene Befüllung der Kavitäten in den Scaffolds. In Abbildung 4-17 in Kapitel 4.7.4.2 ist

exemplarisch ein heterogen befülltes Kompartiment dargestellt, wobei 1 den obersten und 9 den untersten Scaffold des Knochenkompartimentes bezeichnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die unteren Scaffolds noch vollflächig mit künstlichem Knochenmark befüllt sind, während bei zunehmender Steighöhe die Befüllung nur noch partiell erfolgt. Im Expansionsraum des unteren Anschlußteils (Abbildung 4-3 (O)) zeigte sich direkt nach der Befüllung ein Viskositätsgradient im künstlichen Knochenmark, mit zum Rand hin ansteigender Viskosität. Daraus lässt sich ableiten, dass sich das Medium sich zwar vollflächig im konischen Expansionsraum verteilen kann, seine Strömungsgeschwindigkeit jedoch zum Rand hin abnimmt. Es solidiert Somit in den äußeren Bereichen schneller und strömt bevorzugt durch die mittigen Markkanäle.

Um nach erfolgter Befüllung das Anschlußteil aufsetzen und das Knochenkompartiment mit FreisetzungsmEDIUM perfundieren zu können, muss die an der Außenseite der Lochscheiben anhaftende Vaseline entfernt und müssen die Platzhalterpins entnommen werden. Bei den Befüllungsversuchen zeigte sich nachteilig, dass aufgrund der aus den Lochscheiben ragenden Platzhalterpins ein vollflächiges Abstreifen der Vaseline nur begrenzt möglich war. So konnte bei der Entnahme der Pins ein partielles Einbringen des verbliebenen Anteils der Vaseline in die Perfusionskanäle nicht vermieden werden. Somit wurden diese nicht mehr mit FreisetzungsmEDIUM perfundiert, wodurch eine manuelle und nur bedingt erfolgreiche Freilegung der Kanäle notwendig war. Eine Quantifizierung der Flussraten des FreisetzungsmEDIUMS gestaltete sich aufgrund des limitierten Bauraums schwierig, sodass an dieser Stelle lediglich auf die Perfusionsversuche des finalen Prototypen XVIII in Kapitel 4.7.4.4 verwiesen sei. Aus den aufgeführten Beobachtungen leitet sich ab, dass das Dichtungssystem und die zur Befüllung genutzten medienführenden Bauteile einer grundlegenden Verbesserung bedurften, um eine bestimmungsgemäße und montagegerechte Anwendung gewährleisten zu können. Zur Verhinderung des Verrutschens der Flachdichtungen wäre ein Nut- und Federsystem zweckmäßig, das die Dichtungen in seinen Nuten aufnimmt und gleichzeitig die Bauteile untereinander positionsintolerant fixiert. Die zur Ausübung der notwendigen Anpresskraft genutzten Fixationseinheiten sollten die Bauteile selbstjustierend zusammenziehen

und eine inhomogene, hebelnde Krafteinwirkung verhindern. Um den Eintrag von verbliebener Vaseline in die Perfusionskanäle der Lochscheiben zu verhindern, wäre eine vorgelagerte Abdeckplatte sinnvoll, auf die die Vaseline strömt und die nach erfolgter Befüllung des Kompartimentes entfernt werden kann, wodurch die Oberfläche der Lochscheibe rückstandsfrei von Vaseline verbleibt. Durch ein montagegerechtes Design soll dabei sichergestellt werden, dass die Durchgangsbohrungen in der Abdeckplatte mit den Markkanälen der korrespondierenden Lochscheiben stets deckungsgleich sind. Für eine homogene und reproduzierbare Befüllung des Knochenkompartimentes wäre ein direkt an der Loch- beziehungsweise Abdeckscheibe ansetzendes Kolbensystem zweckmäßig, durch das die Vaseline mit einem über die gesamte Fläche homogenen Druck in das Kompartiment eingebracht werden kann. Um dabei die Gesamtbauhöhe und Handhabung der Durchflusszelle trotzdem adäquat darstellen zu können, ist das Design derart weiterzuentwickeln, dass die medienführenden Bauteile leicht zugänglich und von außen an den Temperiermantel und das darin enthaltene Knochenkompartiment anzuschließen sind.

4.6.4.3 Äußeres Zylindersystem

Der in Abbildung 4-4 dargestellte Aufbau des Temperiermantels kann grundsätzlich als geeignet betrachtet werden, da die Zuleitung des Temperiermediums über die untere Zuführung (M) eine gleichmäßige und vollständige Verteilung im Temperiermantel ermöglicht und ein Leerlaufen verhindert wird. Nachteilig zeigt sich jedoch, dass zum Anpressen der Flachdichtungen (G & K) die Zusammenführung von Boden und Deckel über außenliegende Fixierungseinheiten erfolgen muss, was zu einem ungleichmäßigen Anpressdruck und damit zu Undichtigkeit führen kann, wie bereits bei den medienführenden Bauteilen dargelegt. So gilt es für den Temperiermantel ein geeignetes Fixationssystem zu entwickeln (siehe auch Kapitel 4.6.4.2) und den Boden und Deckel derart zu gestalten, dass die medienführenden Bauteile über Verbindungselemente einfach und montagegerecht von außen anzuschließen sind. Hierfür erscheint eine partielle Zusammenführung des inneren und äußeren Zylindersystems sinnvoll.

4.7 Funktionelles Design des Prototypen XVIII

Das Design des Prototypen XVIII (Abbildung 4-6) stellt die finale Optimierung des Prototypen VI dar, wobei es durch die Einbindung eines CNC-gestützten Fertigungsverfahrens in seiner Bauart bedeutend funktioneller und modularer gestaltet werden konnte. Durch den modularen Aufbau sind die Bauteile in ihrer Grundform standardisiert und können über ein Nut- und Feder-System als genormte Schnittstelle montagegerecht zusammengesetzt werden. Bei stets gleichbleibender Grundform sind nur die Durchgangslöcher in Form und Anordnung den Mark- und Perfusionskanälen des jeweilig eingesetzten Kompartimentes anzupassen. Der innere Zylinder ist im Temperiermantel integriert, wodurch ein vereinfachtes Abdichten und Anschließen der medienführenden Bauteile ermöglicht wird. Durch ein in der Höhe stufenlos einstellbares Kolbensystem kann das im inneren Zylinder eingesetzte Knochenkompartiment höhenvariabel abgedichtet und an die medienableitenden Bauteile angeschlossen werden. Im Folgenden wird das Design des Prototypen XVIII in drei Bereiche gliedert und näher erläutert:

- I. Das Doppelkammersystem, dessen innerer Zylinder das Knochenkompartiment aufnimmt und von einem äußeren Zylinder, dem Temperiermantel umschlossen wird.
- II. Das höhenvariable Kolbensystem, das der oberseitigen Abdichtung des Knochenkompartimentes und dem Anschluss der medienführenden Bauteile dient.
- III. Die medienführenden Bauteile, über die die Medien dem Knochenkompartiment bei der Befüllung oder Perfusion zu- und abgeleitet werden.

Für die Konstruktionszeichnungen der Bauteile des Prototypen XVIII sei auf Anhang 9.4 verwiesen.

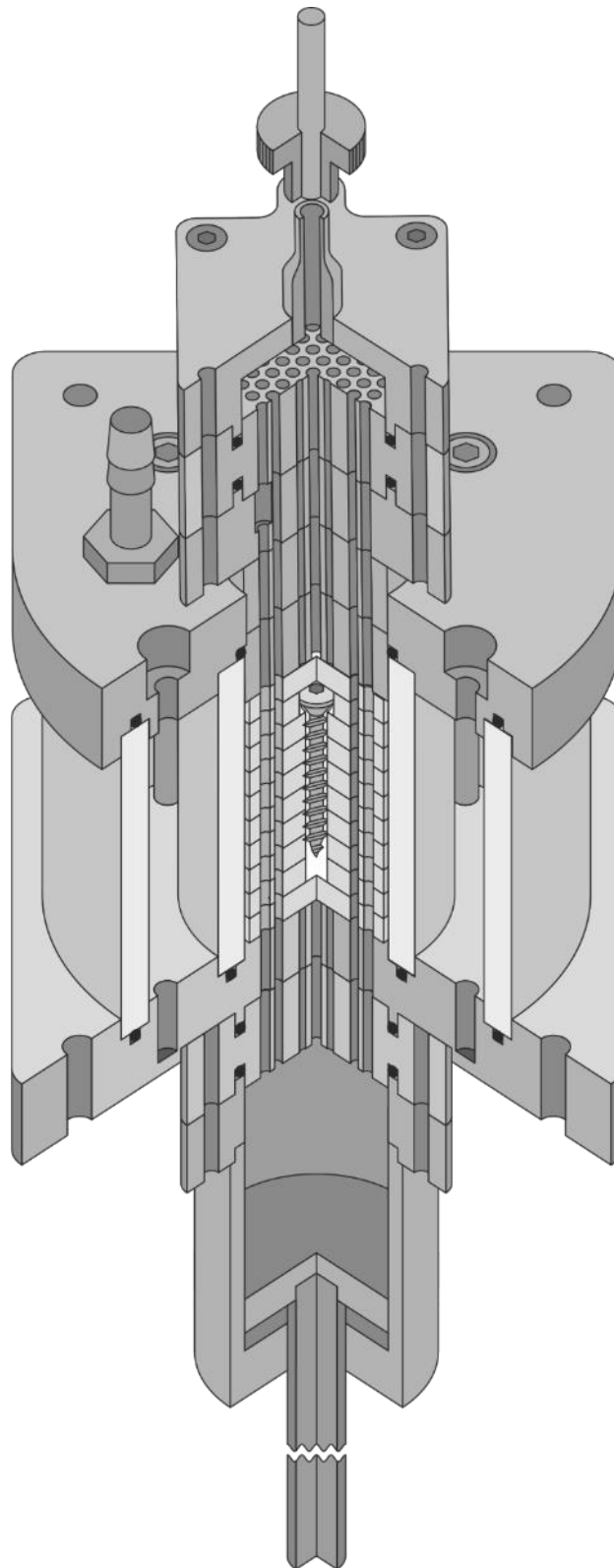


Abbildung 4-6: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII
Zusammengesetzt mit angefügtem Befüllungssystem

4.7.1 Doppelkammersystem

Das Doppelkammersystem wird durch den inneren und äußeren Zylinder (Abbildung 4-7 (P & Q)), Boden (R) und Deckel (G) gebildet. Die kreisförmigen Nuten (M & X) in Boden und Deckel dienen der Aufnahme und Ausrichtung der Zylinder, die in ihrer Höhe dem Knochenkompartiment anzupassen sind. Zur Abdichtung des Doppelkammersystems werden der Deckel und Boden über die Verbindungsschrauben (F) und korrespondierenden Gewindebohrungen (V) im Boden zusammengezogen, wodurch die inneren (N) und äußeren (O) Dichtungsringe zwischen den Bauteilen dichtend zusammengepresst werden. Die Nuten (L & Z) dienen als Einbauraum für die Dichtungsringe (\varnothing 2 mm) und verhindern ihr Verrutschen während des Zusammenbaus. Eine Nuttiefe von 1,60 mm entspricht 80% der Schnurstärke der Dichtungsringe, die unter Druckbelastung adäquat elastisch verformt werden und somit den Dichtspalt zwischen Zylinderfläche und Nutgrund durch Flächenpressung abdichten. Der innere Dichtungsring wird im Deckel von einem Falz aufgenommen, sodass sich erst durch das Einführen des Zylindersystems der entsprechende Einbauraum bildet. Das Durchgangsloch (I) und die Senkung (H) für die Verbindungsschrauben sind derart gestaltet, dass beim Anziehen der Schrauben die Dichtungsringe (K) durch die Unterlegscheiben (J) an den Grund der Senkung gepresst werden und die Schrauben radial abgedichtet werden.

Die Durchgangslöcher (U) im Boden entsprechen in Form und Anordnung den vertikalen Mark- und Perfusionskanälen des Knochenkompartimentes. Die schematische Darstellung des Doppelkammersystems des Prototypen XVIII in Abbildung 4-7 zeigt die symmetrische Maximalverteilung von 2 mm Bohrungen mit einem Abstand von 3 mm zwischen den Bohrungsmittelpunkten. Die Aufnahmen (S) dienen der Aufnahme der Fixationspins (Abbildung 3-38 (E)), entsprechen ihnen dabei im Durchmesser und gewährleisten somit ihre formschlüssige Ausrichtung. Über den Anschluss (T) im Boden wird zwischen dem inneren und äußeren Zylinder das Temperiermedium zugeleitet und im Deckel über die gegenüberliegende Gewinde-tülle (D) abgeleitet.

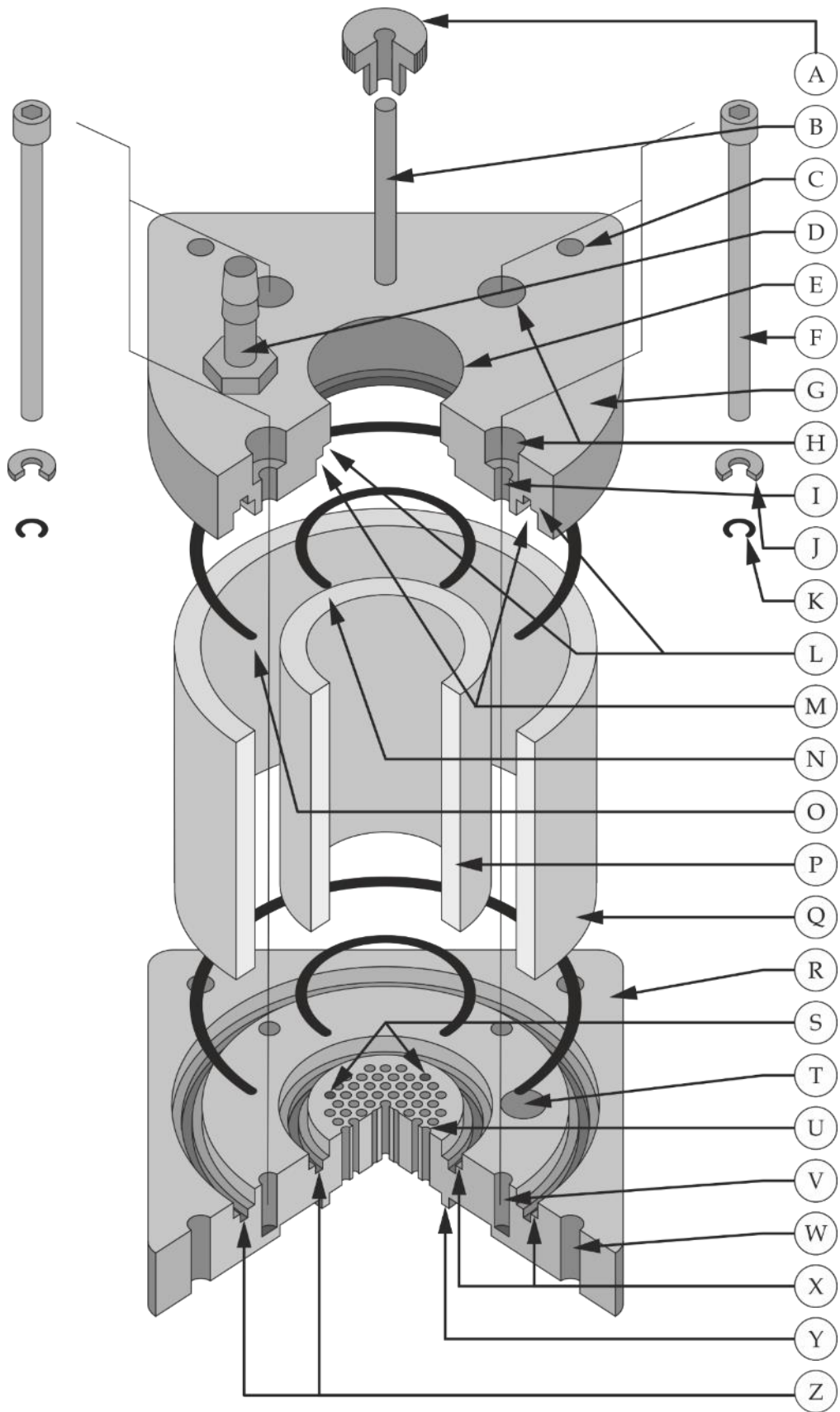


Abbildung 4-7: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII Doppelkammersystem

Tabelle 4-6: Bauteilzuordnung - Statisches Zylindersystems

A	Rändelmutter M4	N	Dichtungsring (innen)
B	Gewindestange M4	O	Dichtungsring (außen)
C	Zylinderstiftaufnahme	P	Innenzylinder
D	Gewindetülle	Q	Außenzylinder
E	Durchgangsloch für Kolben	R	Boden
F	Verbindungsschraube M4	S	Aufnahme für Fixationspins
G	Deckel	T	Temperiermediumzuleitung
H	Senkung für Schraube M4	U	Durchgangsbohrung (Ø: 2 mm)
I	Durchgangsloch für Schraube M4	V	Gewindebohrung M4
J	Unterlegscheibe M4	W	Zylinderstiftaufnahme
K	Dichtungsring	X	Nut für Zylinder
L	Nut für Dichtungsring	Y	Feder
M	Nut für Zylinder	Z	Nut für Dichtungsring

Die Bohrungen (\varnothing 5 mm) (C & W) dienen als Aufnahme für die im Frästisch eingelassenen Zylinderstifte, über die sie für die wechselseitige Bearbeitung ausgerichtet und aufgespannt werden. Über positions- und baugleiche Stifte in der Durchflusszellenhalterung (Abbildung 4-15) werden die Durchflusszellen während der Freisetzungsversuche fixiert. Die Feder (Y) und die Aussparung an der Unterseite des Bodens dienen der Abdichtung und Ausrichtung der Medium führenden Bauteile. Die Geometrie der Aussparung (nicht dargestellt) entspricht in ihrer Geometrie den Verbindungsplatten der Medium führenden Bauteile, sodass an dieser Stelle auf Abbildung 4-10 und Abbildung 9-6 verwiesen sei. Die Bauteile des durch das Durchgangsloch (E) ragenden Kolbensystems (Abbildung 4-9) werden über die im Deckel eingelassenen Gewindestangen (B) ausgerichtet und über die Rändelmutter (A) fixiert.

4.7.2 Höhenvariables Kolbensystem

Das höhenvariable Kolbensystem ist aus drei Elementen zusammengesetzt: dem Kolbenoberteil (Abbildung 4-9 (N)) und den beiden Unterteilen (S), die den eigentlichen rotationssymmetrischen Kolben bilden. Ein einteiliger Kolben wäre zu bevorzugen, jedoch ergeben sich beim Tiefbohren der Durchgangslöcher fertigungstechnische Limitierungen. Aufgrund der zum vollständigen Durchbohren benötigten Länge und des geringen Durchmessers des Bohrers kann dieser eine unzureichende Biegesteifigkeit aufweisen und im Werkstoff verlaufen. So wurden die Kolbenunterteile einzeln durchbohrt, mit Übermaß aus der Werkstoffplatte gefräst, nachfolgend zusammengesetzt und plan abgedreht, um eine glatte und stufenfreie Oberfläche zu erhalten, die radial spaltfrei abdichten ist.

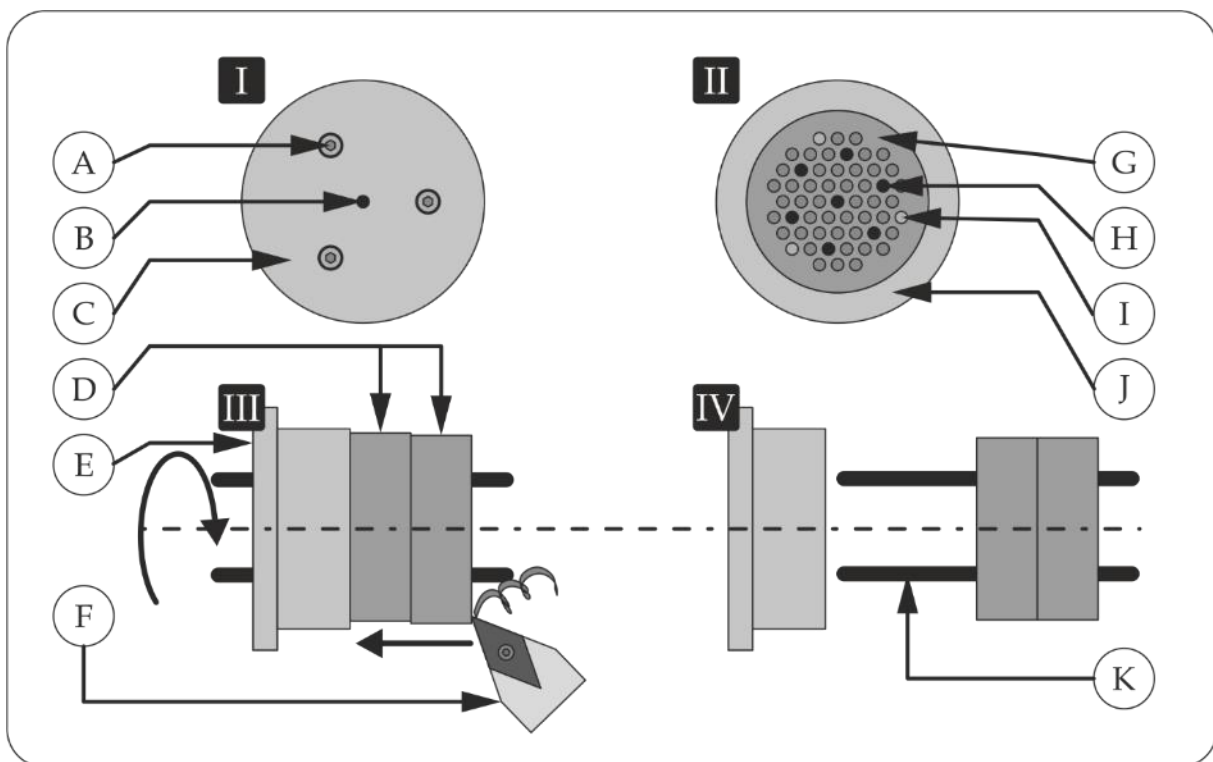


Abbildung 4-8: Schematische Darstellung der Aufnahme zur Planung der unteren Zylinderteile

Die Kolbenunterteile (Abbildung 4-8 (D)) wurden dafür mit Fixationspins (K) über die Bohrungen (H) in der Aufnahme (E) ausgerichtet und über die Verbindungsschrauben (A) kraftschlüssig verbunden. In das untere Kolbenteil wurden hierfür M2-Gewinde

(I) geschnitten. Über den Stutzen (C) wurde die Aufnahme in die Drehbank eingespannt und mittels Drehstahl (F) auf den gewünschten Durchmesser plan abgedreht. Nachfolgend wurden die Durchgangsbohrungen der Kolbenunterteile über die Fixationspins deckungsgleich zu denen des Kolbenoberteils ausgerichtet und die Bauteile mit den Verbindungsschrauben (Abbildung 4-9 (I)) kraftschlüssig miteinander verbunden.

Das Kolbensystem wird an den rotationssymmetrischen Zylinderunterteilen (Abbildung 4-9 (S)) über den inneren Dichtungsring (Abbildung 4-7 (N)) - in Form einer Stangendichtung - gegenüber dem inneren Zylinder abgedichtet, wie in der schematischen Darstellung des zusammengebauten Prototypen (Abbildung 4-6) gezeigt. Über die Feder (P) des Kolbenoberteils wird die Verbindungsplatte (H) ausgerichtet und der Dichtungsring (M) in die korrespondierende Nut (L) geführt. In Abbildung 4-9 ist eine Verbindungsplatte mit symmetrischer Maximalverteilung von 2 mm Bohrungen abgebildet, wie sie zur Ableitung des künstlichen Knochenmarks beim Beladungsprozess verwendet wird. Über die Nut (K) wird wiederum das obere Anschlußteil (C) ausgerichtet, dessen Feder (D) den Dichtungsring (E) dichtend anpresst. Durch Eindrehen der Verbindungsschrauben (A) in die in das Kolbenoberteil geschnittene Gewinde (R) werden die Bauteile zusammengezogen und der Dichtspalt zwischen Nut und Feder durch die Dichtungsringe abgedichtet. Die Fixation und Ausrichtung der zusammengebauten Bauteile gegenüber dem Doppelkammersystem erfolgt über die in die Stirnseiten der Bauteile eingebrachten Durchgangslöcher (G), die im Durchmesser den im Deckel eingelassenen Gewindestäben (Abbildung 4-7 (B)) entsprechen. Über die Rändelmutter wird das zusammengesetzte Kolbensystem während der Befüllung und Perfusion fixiert. Über die Gewindetülle (B) können das Kolbensystem und der innere Zylinder des Doppelkammersystems während der Befüllung evakuiert werden. Nach erfolgter Befüllung werden die Bauteile demontiert, sodass nach Entnahme des Anschlußteils und der Verbindungsplatte eine von künstlichem Knochenmark rückstandsfreie Oberfläche des Kolbenoberteils verbleibt und die Bauteile zur Ableitung des Freisetzungsmittels angeschlossen werden können.

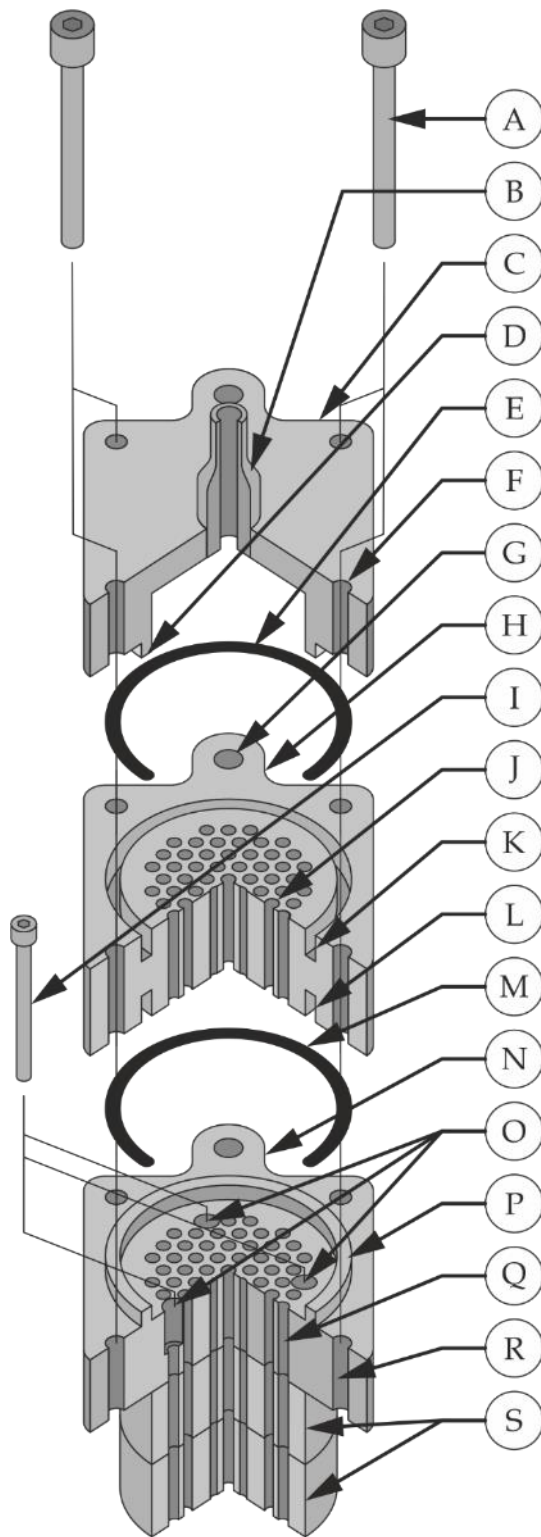


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII
Höhenvariables Kolbensystem mit Bauteilen zur Befüllung

Tabelle 4-7: Bauteilzuordnung - Höhenvariables Kolbensystem mit Bauteilen zur Befüllung

A	Verbindungsschraube M3	K	Nut (oben)
B	Gewindetülle	L	Nut (unten)
C	Oberes Anschlußteil	M	Dichtungsring
D	Feder	N	Kolbenoberteil
E	Dichtungsring	O	Senkung für Schraube M2
F	Durchgangsloch für Schraube M3	P	Feder
G	Führung M4-Gewindestange	Q	Durchgangsbohrung (Ø: 2 mm)
H	Verbindungsplatte	R	Gewindebohrung M3
I	Verbindungsschraube M2	S	Zylinderunterteil
J	Durchgangsbohrung (Ø: 2 mm)		

4.7.3 Medienführende Bauteile

4.7.3.1 Kolben-Zylinder-System zur Befüllung der Knochenkompartimentes

Das Kolben-Zylinder-System (Abbildung 4-10) dient der Befüllung der Markkanäle im Knochenkompartiment mit künstlichem Knochenmark. Es gliedert sich in einen Zylinder, in den das Knochenmark vorgelegt wird, einen Kolben (K), mit dem das Knochenmark aus dem Zylinder in die Kanäle gedrückt wird, und ein Zylinderoberteil (H), mit dem das System an der Unterseite des Bodens des Doppelkammersystems über die Verbindungsplatte (B) mit den Verbindungsschrauben (N) montiert wird. Die Verbindungsplatte entspricht in ihrer Kontur der Aussparung an der Unterseite des Bodens, wodurch ihre Durchgangslöcher zu denen im Boden deckungsgleich ausgerichtet werden. Die Nuten (D) dienen der Aufnahme der Dichtungsringe (A & F), die durch die Federn des Bodens und Zylinderoberteils (G) bei Anziehen der Verbindungsschrauben dichtend angepresst werden. Zum Zusammenfügen des Zylinderoberteils mit dem Zylinder wird dieser über 2 mm auf den Durchmesser der Verbindungsfalz (J) abgedreht und in das Zylinderoberteil eingeklebt. Nachfolgend werden die Innenseiten des Zylinders und des Zylinderoberteils sauber auf das Nennmaß des Kolbens abgedreht. Die Kolbendichtung erfolgt über den radialen Dichtungsring (L). Durch Rotation des Kolbenantriebs wird der Kolben angehoben und das darin enthaltene Medium durch die Durchgangsbohrungen (C) der

Verbindungsplatte und den Boden des Doppelkammersystems in die Markkanäle des Knochenkompartiments eingebracht.

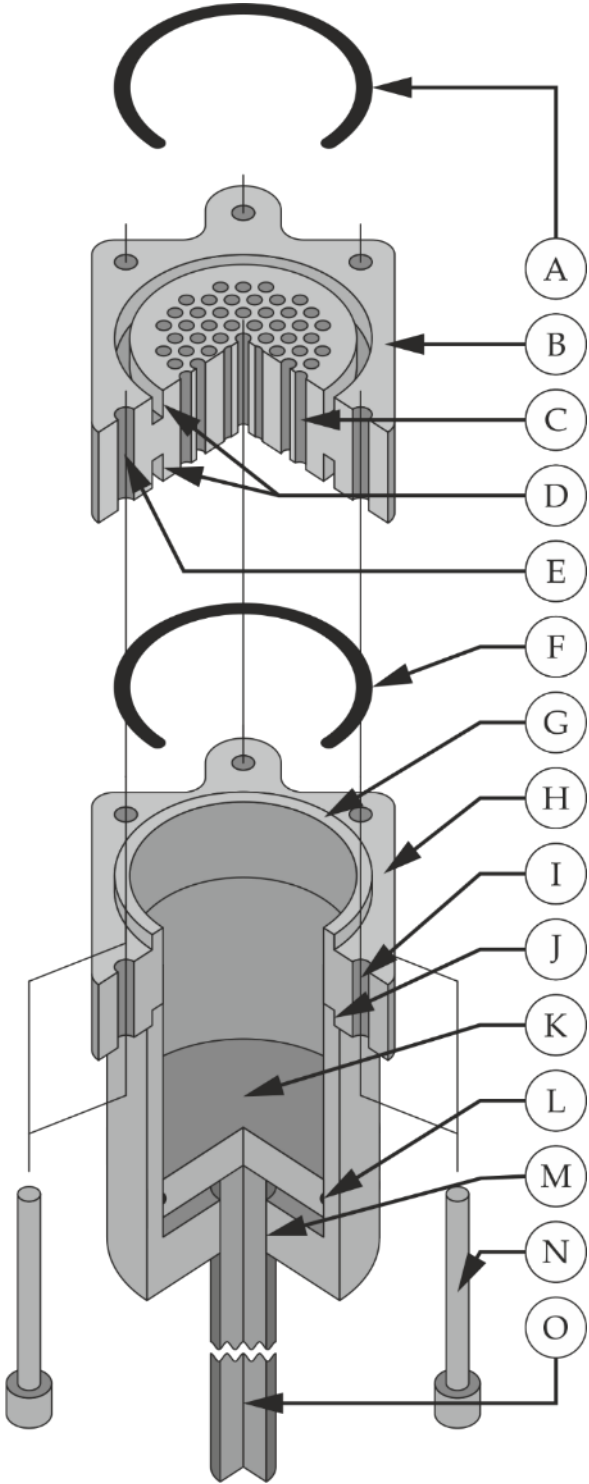


Abbildung 4-10: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII Kolben-Zylinder-Systems zur Knochenkompartimentbefüllung

Tabelle 4-8: Bauteilzuordnung - Kolben-Zylinder-System

A	Dichtungsring	I	Durchgangsloch Schraube M3
B	Verbindungsplatte (multi)	J	Verbindungsfalz
C	Durchgangsbohrung (Ø: 2 mm)	K	Kolben
D	Nut	L	Dichtungsring
E	Durchgangsloch für Schraube M3	M	Gewindebohrung M10
F	Dichtungsring	N	Verbindungsschraube M3
G	Feder	O	Kolbenantrieb M10
H	Zylinderoberteil		

4.7.3.2 Freisetzungsmittelzuführende Bauteile - Vollflächige Zuleitung

Das vollflächige Zuleitungssystem, dargestellt in Abbildung 4-12, dient der Zuführung und Verteilung von Freisetzungsmittel auf die Perfusionskanäle im Knochenkompartiment. Ähnlich dem Kolben-Zylinder-System gliedert es sich in einen Zylinder (L), der als Verteilungskammer (I) für das zugeführte Freisetzungsmittel dient, und ein Zylinderoberteil, mit dem das System an der Unterseite des Bodens des Doppelkammersystems über die Verbindungsplatte (C) mit den Verbindungsschrauben (N) montiert wird. Abbildung 4-11 a) zeigt das an den Boden montierte Zuleitungssystem mit Schlauchanschluss für das Freisetzungsmittel. Der Anschluss und die Abdichtung der Verbindungsplatte und des Zuleitungssystems zum Boden erfolgt wiederum über das modulare Nut und Federsystem.

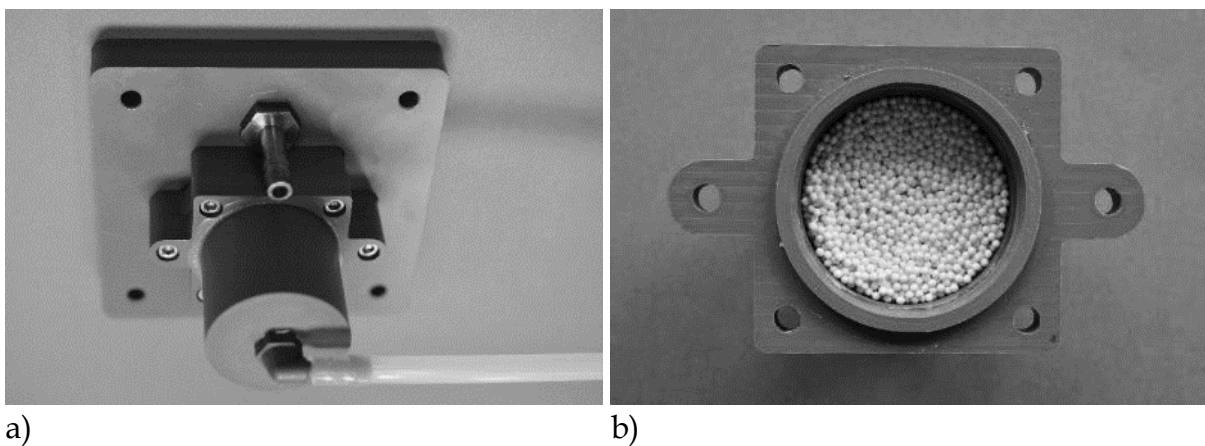


Abbildung 4-11: Vollflächiges Zuleitungssystem
a) Zusammengebautes und an den Boden angeschlossenes Zuleitungssystem
b) Mit Keramikperlen gefüllter Zylinder

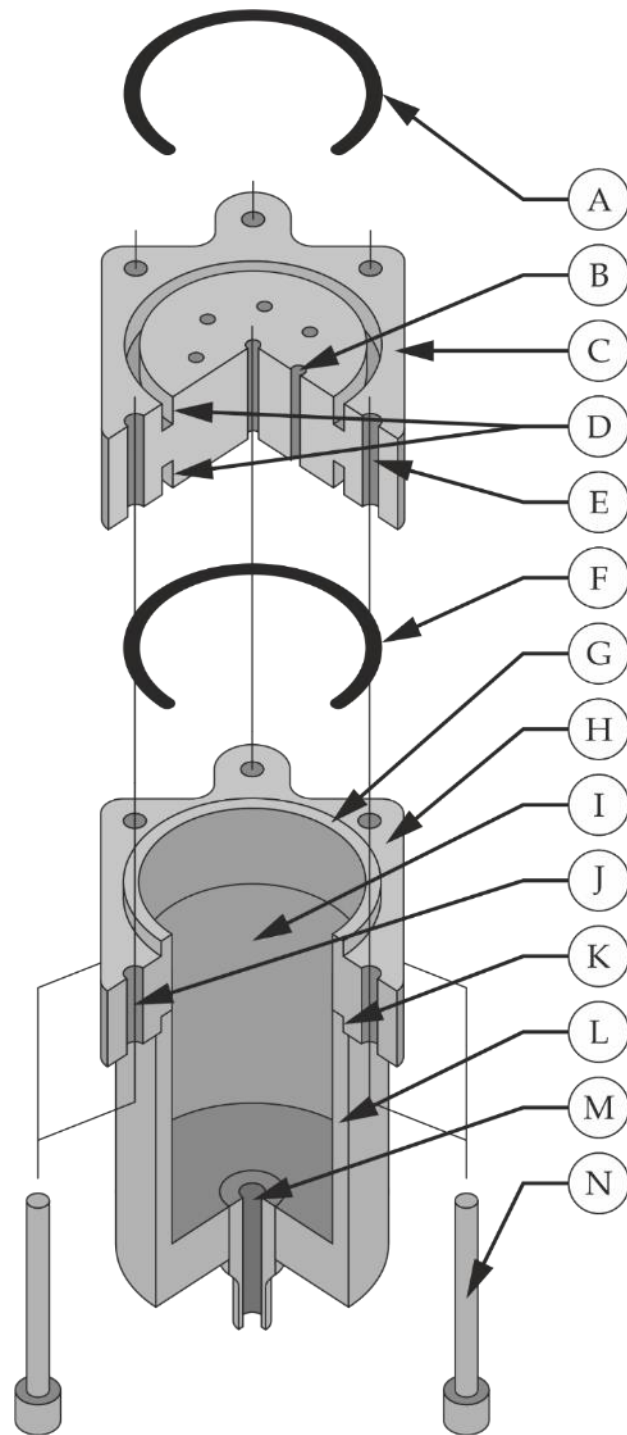


Abbildung 4-12: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII
Vollflächiges Zuleitungssystem

Tabelle 4-9: Bauteilzuordnung - vollflächiges Zuleitungssystem

A	Dichtungsring	H	Zylinderoberteil
B	Durchgangsbohrung (Ø: 2 mm)	I	Verteilungskammer
C	Verbindungsplatte	J	Durchgangsloch Schraube M3
D	Nut	K	Verbindungsfalz
E	Durchgangsloch Schraube M3	L	Zylinder
F	Dichtungsring	M	Gewindetülle
G	Feder	N	Befestigungsschraube M3

Beim vollflächigen Zuleitungssystem, wird das FreisetzungsmEDIUM über die Gewindetülle (M) in die Verteilungskammer (I) des Zylinders gefördert. Von dort strömt es gegen die Verbindungsplatte (C), die es über die Durchgangslöcher (B) auf die Perfusionskanäle des Knochenkompartimentes aufteilt. Die Anordnung und Form der Durchgangslöcher muss dabei stets den Perfusionskanälen des Knochenkompartimentes angepasst werden. Um das einströmende FreisetzungsmEDIUM über den gesamten Querschnitt der Verbindungsplatte zu verteilen ist der Zylinder 3 cm hoch mit keramischen Kugeln (Ø 1 mm) gefüllt, die als Strömungsschikane (Abbildung 4-11 b)) dienen. Zum Zusammenfügen des Zylinderoberteils (H) mit dem Zylinder wird dieser über 2 mm auf den Durchmesser der Verbindungsfalz (K) abgedreht und in das Zylinderoberteil eingeklebt. Nachfolgend werden die Innenseiten des Zylinders und des Zylinderoberteils sauber auf das gewünschte Nennmaß des Zylinders abgedreht. Das Zylinderoberteil (Bemaßung ist aus Abbildung 9-11 zu entnehmen) dient somit als Adapterbauteil, das individuell durch Zylinder gewünschter Höhe und definierten Innendurchmessers ergänzt werden kann.

4.7.3.3 FreisetzungsmEDIUMzuführende Bauteile - Einzelkanalzuleitung

Bei der Einzelkanalzuleitung, dargestellt in Abbildung 4-13, werden die vertikalen Perfusionskanäle des Knochenkompartimentes direkt über separate Zuleitungsschläuche (Innendurchmesser 1,52 mm) mit FreisetzungsmEDIUM versorgt. Somit ist die Einzelkanalzuleitung in Abhängigkeit der Form und Anordnung der Perfusionskanäle des Knochenkompartimentes individuell anzufertigen. Durch die

Stutzen (A) werden die Schläuche (B) geweitet, klemmend in der konischen Schlauchaufnahme (D) fixiert und wechselseitig an eine Fördereinheit (Mehrkanalschlauchpumpe) angeschlossen. Die Ausrichtung und der abdichtende Anschluss der Einzelkanalzuleitung an der Unterseite des Bodens des Doppelkammersystems erfolgt über das bereits erläuterte Nut-Feder-Dichtungssystem.

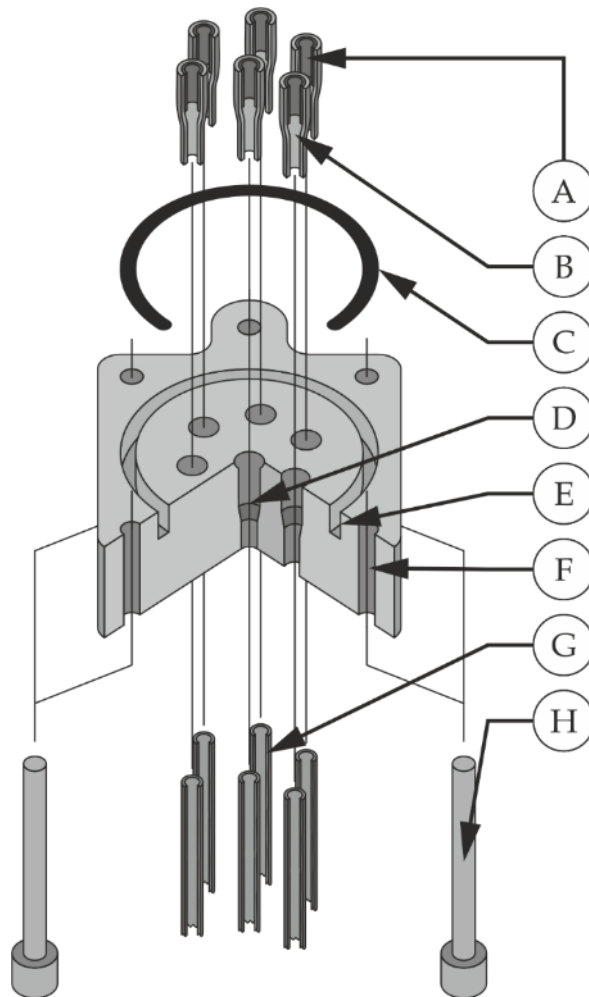


Abbildung 4-13: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII Einzelkanalzuleitung

Tabelle 4-10: Bauteilzuordnung - Einzelkanalzuleitung

A	Stutzen	E	Nut
B	Zuleitungsschlauch	F	Durchgangsloch für Schraube M3
C	Dichtungsring	G	Zuleitungsschlauch
D	Konische Schlauchaufnahme	H	Verbindungsschraube M3

4.7.3.4 Freisetzungsmittelführende Bauteile - Einzelkanalableitungssystem

Das Einzelkanalableitungssystem, dargestellt in Abbildung 4-14, dient der Ableitung des Freisetzungsmittels, das durch das Knochenkompartiment geströmt ist. Das aus den Perfusionskanälen austretende Freisetzungsmittel steigt durch die Perfusionskanäle (P) des höhenvariablen Kolbensystems in die Ableitungsschläuche (H) des oberen Anschlußteils (D). Die Schläuche werden durch Stutzen (I) dilatiert und klemmend in den konischen Schlauchaufnahmen (E) fixiert. Über die Ableitungsschläuche (B) kann das Freisetzungsmittel fraktioniert oder kollektiv aufgefangen und der quantitativen Analytik zugeführt werden. Die Ausrichtung und Abdichtung des Anschlußteils erfolgt über das Nut- und Federsystem durch Anziehen der Verbindungsschrauben (A) und der damit verbundenen dichtenden Pressung des Dichtungsringes (K). Zur Vermeidung des Auftretens eines Saugheber-Effektes ist sicherzustellen, dass der Austritt des Freisetzungsmittels aus den Schlauchenden oberhalb des Kolbensystems erfolgt. Die Verwendung des vollflächigen Zuleitungssystems erfordert weiterhin, dass die Schlauchenden horizontal exakt auszurichten sind, um eine inhomogene Kanalperfusion zu vermeiden. An dieser Stelle sei auf gängige Abhandlungen des Prinzips der kommunizierenden Röhren und des Saugheber-Effektes verweisen [174].

Tabelle 4-11: Bauteilzuordnung - Einzelkanalableitungssystem

A	Verbindungsschraube M3	J	Verbindungsschraube M2
B	Ableitungsschlauch (außerhalb)	K	Dichtungsring
C	Führung der M4-Gewindestange	L	Senkung für Schraube M2
D	Oberes Anschlußteil	M	Feder
E	Konische Schlauchaufnahme	N	Kolbenoberteil
F	Durchgangsloch für Schraube M3	O	Gewindebohrung M3
G	Nut	P	Durchgangsbohrung (Ø: 2 mm)
H	Ableitungsschlauch (innerhalb)	Q	Kolbenunterteil
I	Stutzen	R	Gewindebohrung M2

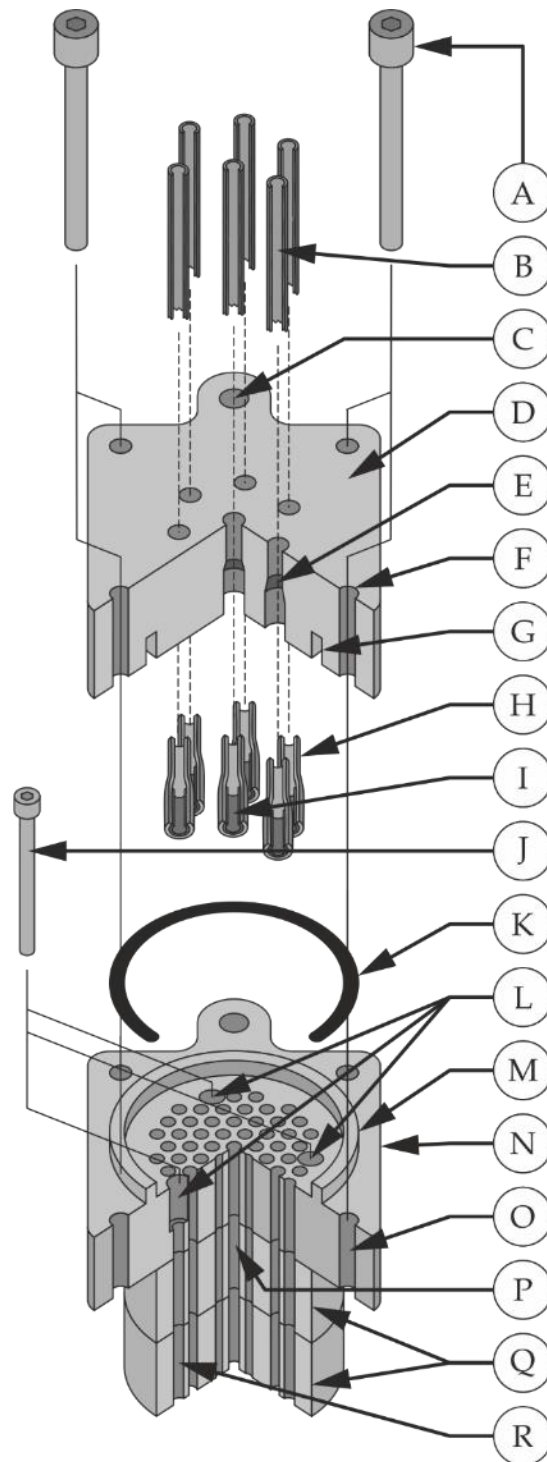


Abbildung 4-14: Schematische Darstellung des Prototypen XVIII Einzelkanalableitungssystem

4.7.4 Bewertung des Prototypen XVIII

4.7.4.1 Doppelkammersystem

Die Integration des inneren Zylindersystems in den Temperiermantel stellt eine der wichtigsten Optimierungen in der Prototypenentwicklung dar. Gegenüber den separaten Bauteilgruppen des Prototypen VI ermöglicht das Doppelkammersystem ein montagegerechtes Design der Durchflusszelle mit reduzierter Bauteilanzahl, bei gleichzeitiger Erhöhung der Funktionalität. So lassen sich die Zylinder über die Nuten (Abbildung 4-7 (M & X)) in Deckel und Boden die Zylinder durch einfache Fügebewegungen zusammenstecken und positionieren. Durch die Nuten (L & Z) wird erreicht, dass die Dichtungsringe gegenüber den Zylindern zentriert ausgerichtet und gegen Verrutschen gesichert werden. Durch Verlagerung der Verbindungsschrauben (F) zwischen den inneren und äußeren Zylinder wird das beim Prototyp VI beschriebene Kippen des Deckels verhindert. So zeigten alle Prototypen, die nach dem funktionellen Prototypendesign XVIII gefertigt und unter der in Kapitel 4.6.4.2 beschriebenen Prüfung auf Dichtigkeit getestet wurden, weder das Eintreten von Wasser bei Unterdruck, noch ein Austreten von Temperiermedium.

Ein weiterer zentraler Aspekt des Doppelkammersystems ist, dass direkt an der Unterseite des Bodens die medienführenden Bauteile angeschlossen werden können. Somit entfällt eine zeitaufwendige Demontage der Durchflusszelle, die beim Prototypen VI vonnöten war, um die zur Befüllung verwendeten Bauteile zu entfernen und die das Freisetzungsmedium führenden Bauteile nachfolgend anzuschließen. Weiterhin wird erst durch die Zugänglichkeit der gesamten Querschnittsfläche des Knochenkompartimentes die vollflächige Befüllung und Perfusion über die entsprechenden Bauteile ermöglicht. Während beim Prototypen VI die Lochscheiben und Fixationspins nur unzureichend deckungsgleich zu positionieren waren, werden durch die definierte Bauteilausrichtung beim Prototypen XVIII die Aufnahmen der Fixationspins in Boden und Kolbensystem deckungsgleich positioniert und fixiert, sodass eine Torsion der Scaffolds im Knochenkompartiment verhindert werden kann.

Zur Überprüfung der Funktionalität des durch das Doppelkammersystem gebildeten Temperiermantels wurden die Durchgangsbohrungen des Bodens mit Blindstutzen abgedichtet, die inneren Zylinder der Durchflusszellen mit 25,0 mL entgasen Wassers gefüllt und das Kolbensystem durch Dichtungsstopfen mit zentraler Bohrung ersetzt. Abbildung 4-15 zeigt den entsprechenden Versuchsaufbau, bei dem das auf 39 °C erwärmte Temperiermedium vom Thermostaten über die Tülle (B) in den Temperiermantel der linken Durchflusszelle geleitet wurde. Nach Perfusion des Temperiermantels wurde das Medium über die Tülle (C) auf der Rückseite der Durchflusszellenhalterung zur zweiten und nachfolgend zur dritten Durchflusszelle geleitet. Über die Tülle (D) wurde das Medium zum Thermostaten zurück geleitet. Die zur Temperaturmessung verwendeten Thermometer wurden durch die Bohrung in den Dichtungsstopfen in das vorgelegte Flüssigkeitsvolumen eingebracht und so positioniert, dass die Messfühler (A) mittig im inneren Zylinder ausgerichtet waren.

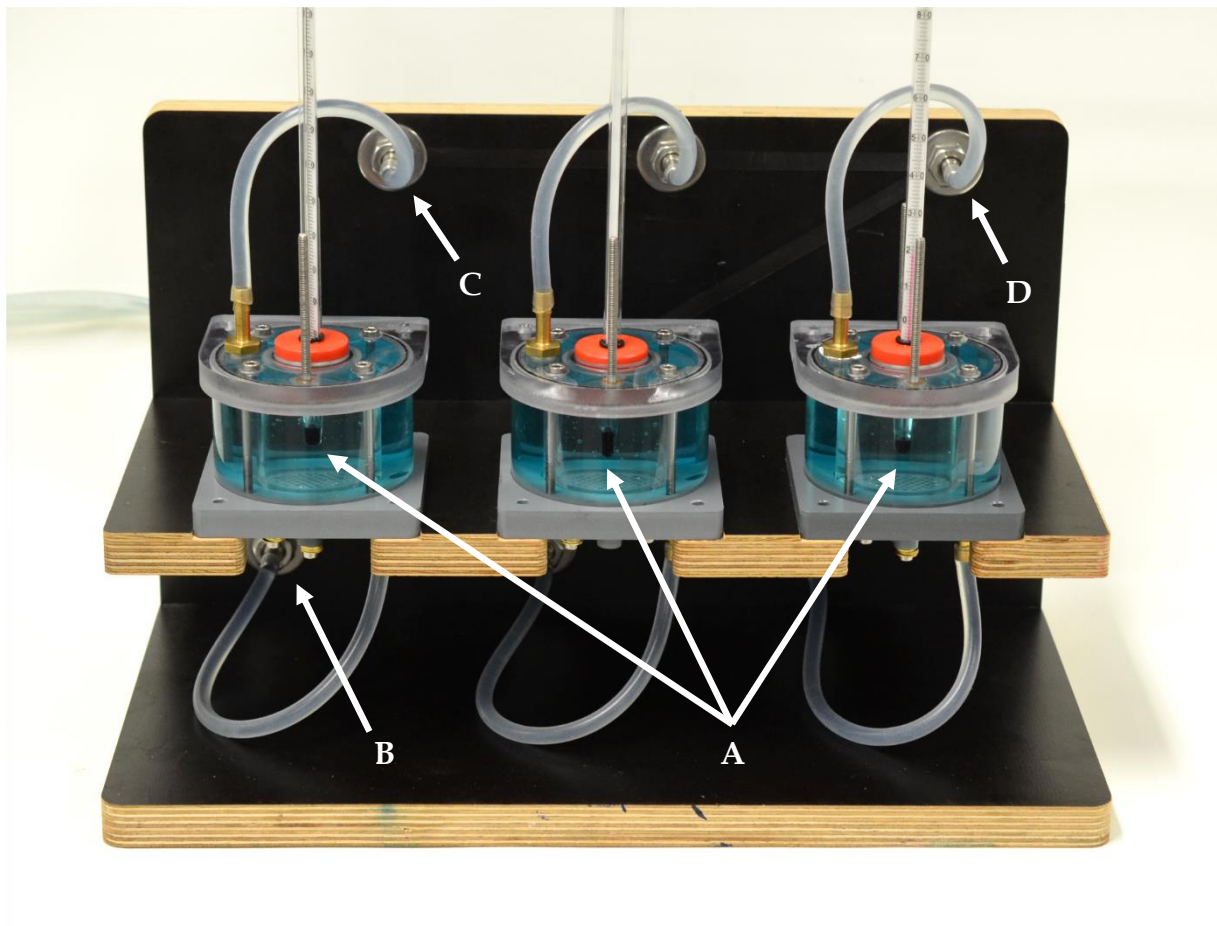


Abbildung 4-15: Versuchsaufbau zur Funktionsprüfung des Temperiermantels

Abbildung 4-16 zeigt den zeitabhängigen Temperaturanstieg, der in den inneren Zylindern vorgelegten Wasservolumina, ausgehend von einer initialen Temperatur von 20,0°C. In Vorversuchen zeigte sich, dass eine um zwei Grad höhere Temperatur im Thermostaten vonnöten ist, um den transportbedingten Temperaturverlust des Mediums zu kompensieren. Es lässt sich erkennen, dass die Zieltemperatur von 39 °C im Thermostaten bereits nach 10 Minuten erreicht wird, während die vorgelegten Volumina erst nach 70 Minuten die angestrebte Zieltemperatur von 37 °C erreichen. Vergleicht man die Graphen der Zellen untereinander, ist zu beobachten, dass das in der dritten Durchflusszelle vorgelegte Wasser einen weniger schnellen Temperaturanstieg erfährt und 10 Minuten länger benötigt, um die Zieltemperatur von 37 °C zu erreichen. Dies lässt sich durch den Wärmeverlust des Temperiermediums über die Oberflächen der vorherigen Durchflusszellen und der Medium führenden Schläuche erklären.

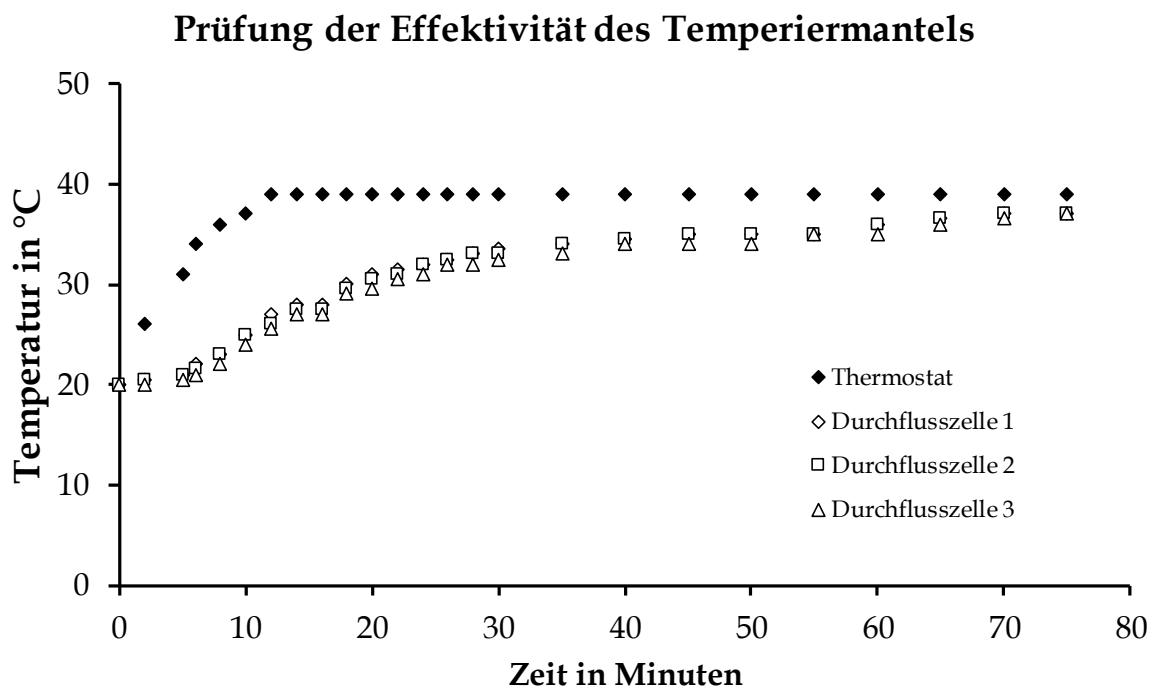


Abbildung 4-16: Prüfung der Effektivität des Temperiermantels

Aus den Beobachtungen lässt sich ableiten, dass die Verbindungsschläuche idealerweise thermisch isoliert sein sollten, um den unerwünschten Wärmeverlust des Temperiermediums zu reduzieren. Weiterhin sollte der innere Zylinder aus einem Werkstoff mit einer höheren Wärmeleitfähigkeit, wie beispielsweise Kupfer, Aluminium oder Messing, zumindest aber aus einem nichtrostenden Stahl oder Titan, bestehen, um eine bessere Wärmeübertragung zwischen Temperiermedium und dem darin bestimmungsgemäß enthaltenen Knochenkompartiment zu gewährleisten. Da sich die Bauart jedoch ansonsten als grundlegend geeignet und zweckmäßig erwiesen hat, wurde das beschriebene Doppelkammersystem in der beschriebenen Ausführung für die nachfolgenden Freisetzungsversuchen (Kapitel 5) verwendet, wobei die eingesetzten Knochenkompartimente auf 37 °C vortemperiert wurden, um die verzögerte Temperierung zu kompensieren.

Aus fertigungstechnischer Sicht ist das funktionelle Design des Doppelkammersystems ebenfalls als geeignet zu betrachten, da die Durchlaufzeiten optimiert und die Fertigungsprozesse weitgehend automatisiert werden konnten. Lediglich die Zylinder sind in der notwendigen Länge manuell abzdrehen und die gefrästen Bauteile einmalig umzuspannen. Eine essentielle Voraussetzung bei der Herstellung der Bauteile ist, dass sie nach einseitiger Zerspannung auf das Genaueste ausgerichtet und wechselseitig aufgespannt werden können. Das entwickelte Design zeigt sich daher vorteilhaft, weil Boden und Deckel des Doppelkammersystems präzise und reproduzierbar über die die jeweiligen Zylinderstiftaufnahmen (Abbildung 4-7 (C & W)) auf dem Frästisch ausgerichtet werden können. Die Aufnahmen dienen gleichzeitig der Positionierung des Bodens in der Dreifachhalterung der Durchflusszellen (siehe Abbildung 4-15).

4.7.4.2 Kolben- Zylinder-System zur Befüllung des Knochenkompartimentes

Zur Überprüfung der Effektivität der zur Befüllung verwendeten Bauteile wurden Scaffolds mit maximal verteilten Kanälen (\varnothing 2 mm) hergestellt, zu einem Kompartiment zusammengefügt, in die Prototypen VI und XVIII eingesetzt und über das jeweilige Befüllungssystem mit Vaseline befüllt. Abbildung 4-17 zeigt die Scaffolds zweier Kompartimente nach Befüllung mit Vaseline über das Kolben-Zylinder-System des Prototypen XVIII (links) und das unter Kapitel 4.6.2 beschriebene Anschlußteil (Abbildung 4-3 (R)) (rechts), in dessen konischen Expansionsraum lediglich mittig Vaseline eingebracht werden kann. Die Scaffolds sind entsprechend ihrer Anordnung im Kompartiment nummeriert, wobei 1 den obersten und 9 den untersten Scaffold bezeichnet. Es lässt sich erkennen, dass das optimierte Kolben-Zylinder-System eine vollständige Befüllung der Markkanäle ermöglicht. Die ausgesparten Kavitäten ergeben sich durch die Platzhalterpins (Kreise) und den Fixationspin (Pfeil). Die größeren Kavitäten (links (6), rechts (5)) ergeben sich aus Vorversuchen und sind hier irrelevant. Betrachtet man die Scaffolds, die mit dem Anschlussteil des Prototypen VI befüllt wurden, ist die inhomogene und unvollständige Befüllung der Scaffolds deutlich zu erkennen. Während das unterste Scaffolds noch vollständig mit Vaseline befüllt werden konnten, nimmt die Beladungseffektivität mit zunehmender Höhe ab.

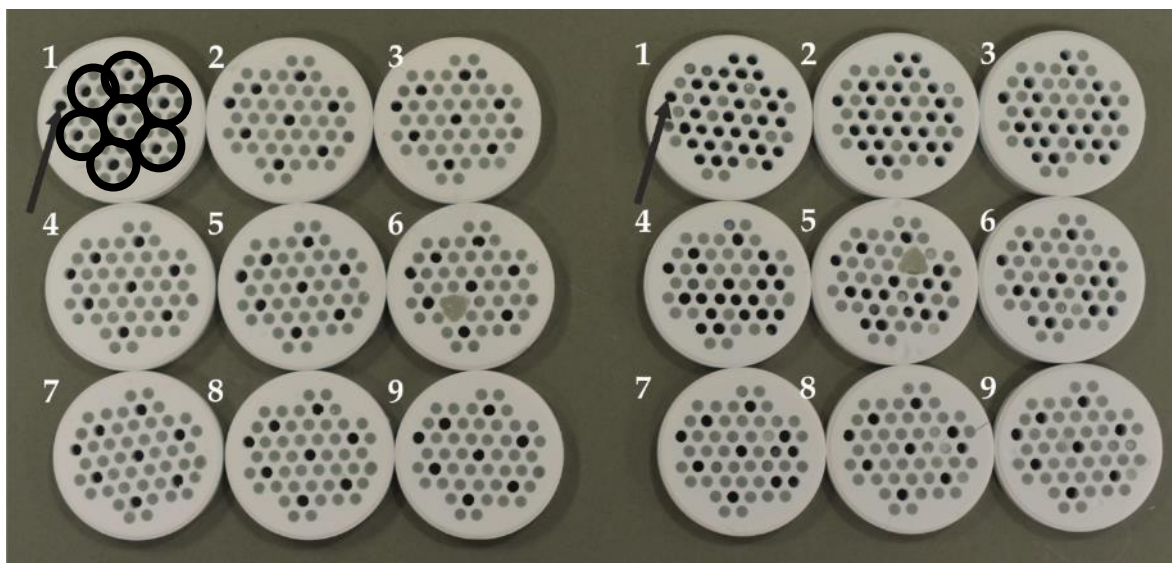


Abbildung 4-17: Vergleich der Befüllungseffektivität von Scaffolds
Links: Kolben-Zylinder-System
Rechts: konisches Anschlußteil mit mittiger Mediumzuführung

Die Bauart des optimierten Kolben-Zylinder-Systems kann somit als zweckmäßig und funktionell für die Befüllung des Knochenkompartimentes angesehen werden. Da der Kolben die gleiche Querschnittsfläche wie das Knochenkompartiment aufweist, kann das Medium mit einem über die gesamte Fläche homogenen Druck in die Markkanäle und -kavitäten eingebracht werden. Eine unvollständige und mittenbetonte Befüllung, die bei Bauteilen mit einer mittigen, punktuellen Zuleitung auftritt, wird dadurch vermieden. Weiterhin ist bei dem modularen Kolben-Zylinder-System vorteilhaft, dass das künstliche Knochenmark vollständig im Zylinder vorgelegt und mit diesem zur Viskositätserniedrigung temperiert werden kann. So kann es unmittelbar an den Boden angeschlossen werden, ohne dass zusätzliche Prozessschritte, die mit dem Abkühlen des Mediums einhergehen, vonnöten sind. Durch das Gewinde des Kolbenantriebs wird sichergestellt, dass der Kolbenhub kontinuierlich erfolgt und ein Hochschnellen des Kolbens bei einer Vakuum-Druck-Befüllung ausbleibt.

Ein weitere essentielle Optimierung stellt die Verbindungsplatte (Abbildung 4-10 (B)) dar, die als Adapterscheibe fungiert und anstelle des Bodens mit Medium angeströmt wird. Durch den modularen Aufbau kann sie individuell an die Form und Anordnung der Markkanäle angepasst werden, sodass die Platzhalterpins des Kompartimentes durch den Boden und die Verbindungsplatte hindurchragen können und das Medium in die Markkanäle eingebracht werden kann. Nach erfolgter Befüllung werden die Platzhalterpins durch den Boden und die Verbindungsplatte hindurch aus dem Kompartiment gezogen und die Platte vom Boden abgenommen. So verbleibt dieser rückstandsfrei von künstlichem Knochenmark, das bei der Reinigung der Bodenoberfläche, wie in Kapitel 4.6.4.2 beschrieben, ungewollt in die Perfusionskanäle eingebracht werden könnte.

Um die Verbindungsplatten beidseitig bearbeiten zu können, wurde die in Abbildung 4-18 dargestellte Fixationseinheit (E) entwickelt. Sie ermöglicht das wechselseitige Ausrichten und Fixieren der Verbindungsplatte (A) über die Feder (C) und die Gewindebohrungen (B). Die Fixationseinheit wird über im Frästisch eingelassene Zylinderstift und korrespondierenden Aufnahmen (D) ausgerichtet und über mittig über die Schraubenaufnahme (F) kraftschlüssig mit dem Frästisch verbunden.

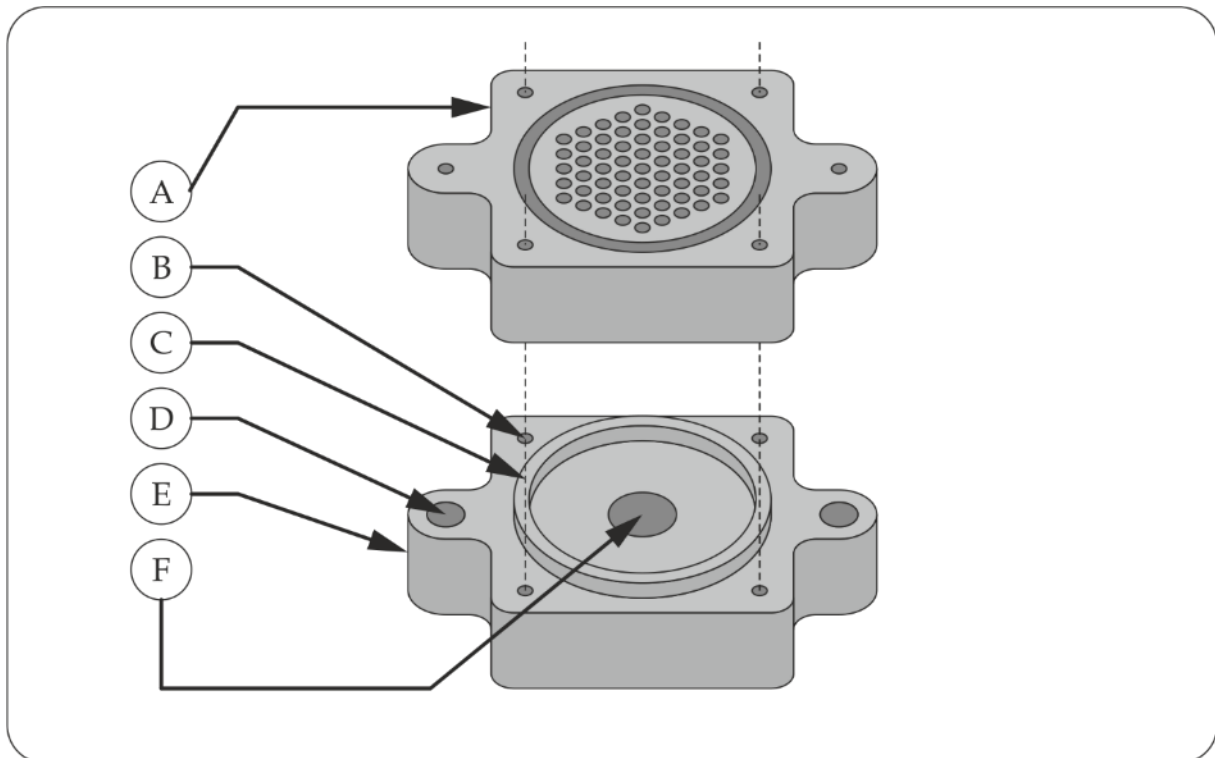


Abbildung 4-18: Schematische Darstellung der Fixationseinheit für die wechselseitige Bearbeitung der Verbindungsplatten

Tabelle 4-12: Bauteilzuordnung - Fixationseinheit für Verbindungsplatte

A	Verbindungsplatte	D	Zylinderstiftaufnahme
B	Gewindebohrung M3	E	Fixationseinheit
C	Feder	F	Schraubenaufnahme

4.7.4.3 Variables Kolbensystem

Das variable Kolbensystem stellt einen weiteren Meilenstein in der Prototypenentwicklung dar, zumal es erst das funktionelle Design des Doppelkammersystems ermöglicht und daher obligatorisch kollektiv mit ihm zu verwenden ist. Die Bauart ergibt sich aus zwei Aspekten, der Notwendigkeit einer in der Höhe variablen Kompartimentabdichtung einerseits und einer adäquaten Medienableitung andererseits. So wurde das System derart gestaltet, dass der Kolben in den inneren Zylinder eingeführt werden kann, um auf die Oberfläche des Kompartimentes abgesenkt zu werden und dieses über ein geeignetes Dichtungssystem abzudichten. Durch den modularen Aufbau des Kolbensystems wird eine einfache Änderung der Durchgangsbohrungen in Form und Anordnung ermöglicht. Der Dichtungsring (Abbildung 4-7 (N)) übernimmt eine doppelte Funktion, da er als Stangendichtung den Kolben abdichtet und als Flanschdichtung den Deckel zum inneren Zylinder hin abdichtet. Durch das aufgesetzte Kolbenoberteil können die medienführenden Bauteile montagegerecht über das bereits beschriebene Nut- und Feder-System angeschlossen werden. Über die Durchgangslöcher (Abbildung 4-9 (G)) und die Gewindestange (Abbildung 4-7 (B)) wird die adäquate Ausrichtung des Kolbensystems und entsprechender Bauteile und Fixierung mittels Rändelmutter (A) ermöglicht.

Die Bauart des transparenten Anschlußteils (C) mit eingeschraubter Gewindetülle (B) zeigt sich für eine Vakuum-Druck-Befüllung zweckmäßig, da der Vakuumschlauch zur Evakuierung klemmend an die Tülle angeschlossen werden kann und das transparente Anschlußteil eine visuelle Kontrolle der Befüllung ermöglicht. So wird der Kolbenantrieb (O) (Abbildung 4-10) bei der Befüllung des Kompartimentes solange gedreht, bis das künstliche Knochenmark zur Oberkante der Durchgangsbohrungen der Verbindungsplatte (Abbildung 4-9 (H)) gefördert wurde.

4.7.4.4 Freisetzungsmedium zuführende Bauteile

Zur Überprüfung der Funktionalität der Einzelkanalzuleitung, Kapitel 4.7.3.3, und der vollflächigen Zuleitung, Kapitel 4.7.3.2, wurde ein Knochenkompartiment mit der in Abbildung 3-33 (V) beschriebenen Geometrie an Perfusionskanälen in die Durchflusszelle eingesetzt, mit künstlichem Knochenmark befüllt und über das jeweilige Zuleitungssystem mit Freisetzungsmedium perfundiert. Es wurde mit Flussraten von 1,5, 3,0 und 4,5 mL/Kanal/Minute bei der Einzelkanalzuleitung beziehungsweise einem Gesamtvolumen von 9,0, 18,0 und 27,0 mL/Minute über das vollflächige Zuleitungssystem gefördert. Über die Ableitungsschläuche (Abbildung 4-14 (B)) der Einzelkanalableitung wurde das Freisetzungsmedium abgeleitet, für jeden Kanal über 60 s gesammelt und die Fraktionen ausgewogen. Die Messungen erfolgten in einer Fünffachbestimmung; die Mittelwerte der Fraktionsmassen sind flussratenabhängig in Abbildung 4-19 - Abbildung 4-21 dargestellt. Initial wurde das vollflächige Zuleitungssystem ohne Strömungsschikanen verwendet, sodass das Freisetzungsmedium ungleichmäßig auf die Perfusionskanäle verteilt wurde, wie in Abbildung 4-19 ersichtlich ist.

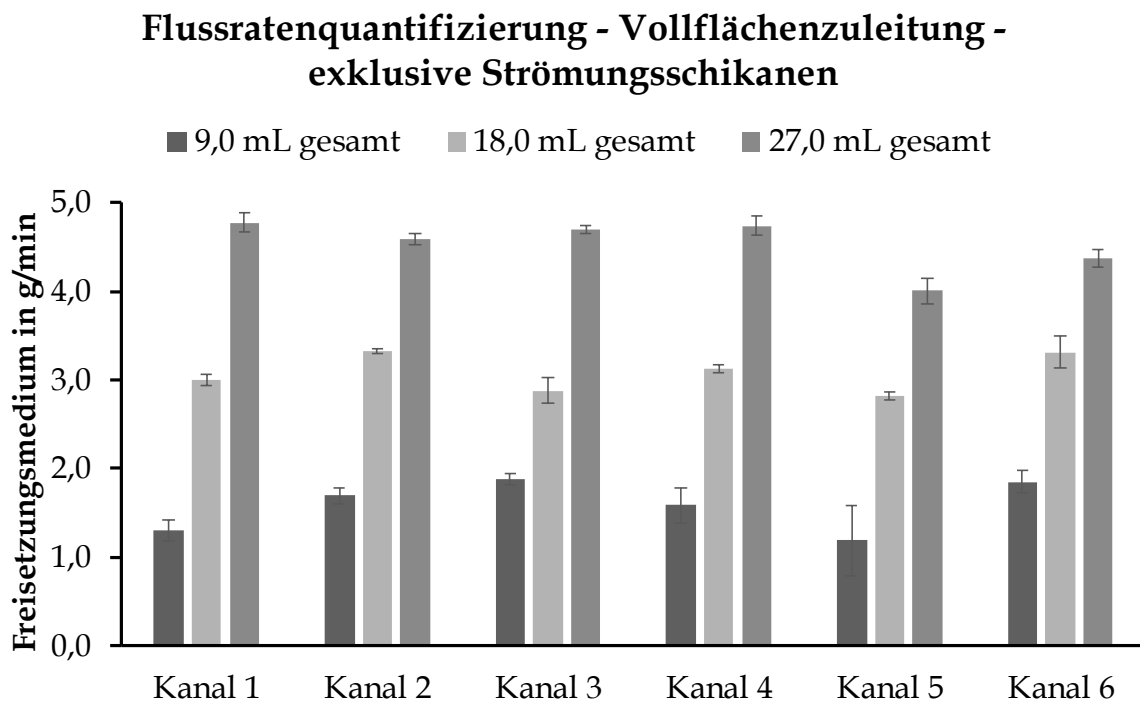


Abbildung 4-19: Flussratenquantifizierung - Vollflächiges Zuleitungssystem ohne Strömungsschikanen

Um eine homogenere Verteilung des Freisetzungsmediums zu erreichen, wurde der Zylinder für nachfolgende Messungen mit Strömungsschikanen aufgefüllt, wodurch eine wesentlich gleichmäßigere und reproduzierbare Perfusion der Kanäle erreicht werden konnte. Am zweckmäßigsten zeigten sich Strömungsschikanen mit einem Durchmesser von 1 mm und eine Einfüllhöhe von 3 cm; die entsprechende Quantifizierung ist in Abbildung 4-20 dargestellt. Die verbleibende Streuung der Flussraten zwischen den Kanälen lässt auf geringfügige Strömungsbevorzugungen im Knochenkompartiment oder den medienführenden Bauteilen schließen. Vorteilhaft bei der vollflächigen Zuleitung ist, dass stets der gleiche Zylinder verwendet werden kann und lediglich die Verbindungsplatte an die Form und Anordnung der Perfusionskanäle anzupassen ist. Bei sehr geringen Durchmessern der Perfusionskanäle besteht jedoch die Gefahr, dass im Falle eines Lufteinschlusses in einer Durchgangsbohrung der Verbindungsplatte das Freisetzungsmedium durch die verbleibenden Bohrungen strömt und der entsprechende Kanal nicht perfundiert wird.

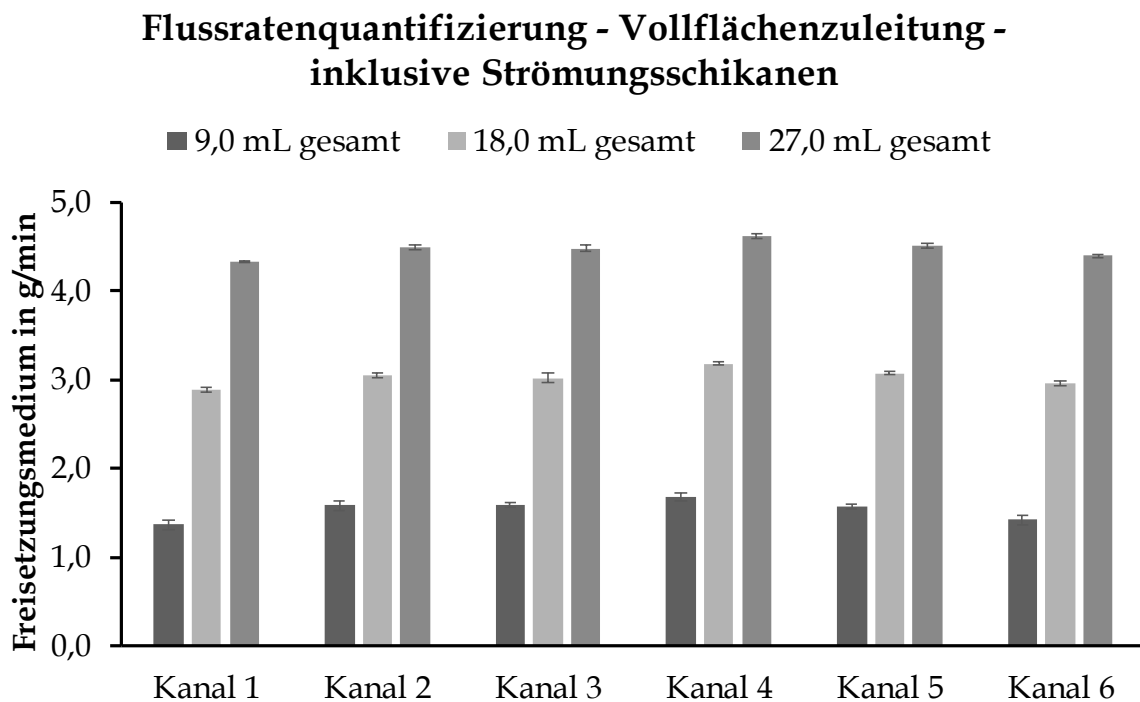


Abbildung 4-20: Flussratenquantifizierung - Vollflächiges Zuleitungssystem mit Strömungsschikanen

Die Flussratenquantifizierung der Einzelkanalzuleitung (Abbildung 4-21) lässt eine homogene Perfusion der Kanäle mit Freisetzungsmedium erkennen. Die sehr geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Kanälen lassen sich auf die Variabilität der genutzten Pumpschläuche zurückführen, da sich bereits bei der Kalibrierung der Schlauchpumpe geringfügige Unterschiede zwischen den Pumpenkanälen zeigten, wobei stets Schläuche mit gleicher Laufzeit verwendet wurden.

Während beide Zuleitungssysteme die Anforderung einer gleichmäßigen und reproduzierbaren Förderung und Verteilung des Freisetzungsmediums erfüllen, ist die Zwangszuführung des Freisetzungsmedium über einen für jeden Kanal separaten Schlauch zu bevorzugen, da so eine gleichmäßige und robuste Verteilung gewährleistet wird. Lediglich bei komplexen Geometrien und einer hohen Anzahl an einzeln anzusteuern den Kanälen kann die Verwendbarkeit des Einzelkanalsystems aufgrund bautechnischer Aspekte limitiert sein.

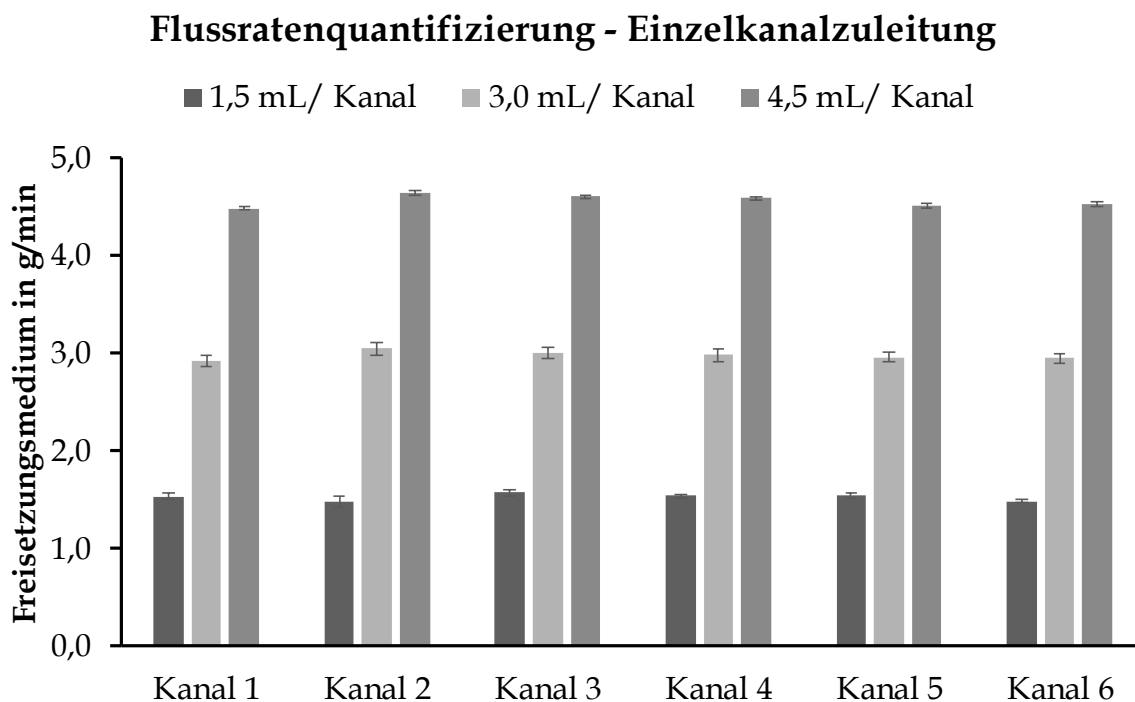


Abbildung 4-21: Flussratenquantifizierung - Einzelkanalzuleitung

4.8 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Design einer Freisetzungsvorrichtung erfolgreich entwickelt und auf die Bauart einer temperierbaren Durchflusszelle ausgerichtet werden. Durch den modularen Aufbau des finalen Prototypen XVIII sind die Bauteile in ihrer Grundform standardisiert und können über das Nut- und Feder-System als genormte Schnittstelle montagegerecht zusammengesetzt werden. Das Design der Bauteile konnte dabei derart entwickelt werden, dass bei gleichbleibender Grundform lediglich die Durchgangsbohrungen in Form und Anordnung den Kanälen im Knochenkompartiment anzupassen sind, damit das unter Kapitel 3.6.9 beschriebene Knochenkompartiment bestimmungsgemäß zu verwenden ist. Neben der Anforderung einer montagegerechten Handhabbarkeit wurden bei der Optimierung des Designs gleichermaßen fertigungstechnische Aspekte einer CNC-gestützten Bauteilfertigung berücksichtigt, sodass die Bauteile unkompliziert zu ändern und zeiteffektiv herzustellen sind.

Durch die dargestellten Prüfungen konnte gezeigt werden, dass die unter Kapitel 4.5 erarbeiteten Anforderungen durch den Prototypen XVIII vollständig erfüllt sind und er somit eine adäquate Funktionalität aufweist, auf deren Grundlage Freisetzungstests durchgeführt werden können. An dieser Stelle sei auf ergänzende Modifikationen hingewiesen, die nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit sind, jedoch im Rahmen einer etwaigen Fortführung zu berücksichtigen sind. So wäre der innere Zylinder idealerweise aus einem Werkstoff mit hoher Wärmeleitfähigkeit zu fertigen, um eine gute Wärmeübertragung zwischen Temperiermedium und Knochenkompartiment zu erreichen. Des Weiteren wäre eine thermische Abschirmung der temperiermediumführenden Schläuche zweckmäßig, um einen ungewollten Wärmeverlust zu vermeiden. Um eine hohe Lebensdauer und eine gute mechanische, als auch chemische Beständigkeit der Durchflusszelle zu erhalten, wären die Bauteile, soweit möglich, vorzugsweise aus einer geeigneten Stahllegierung zu fertigen.

5 Diffusions- und Freisetzungsversuche

5.1 Einleitung

Um das Konzept des entwickelten in-vitro-Knochenmodells zu validieren, das sich kombinatorisch aus einem künstlichen Knochenkompartiment und einer Durchflusszelle zusammensetzt, wurden Freisetzungsversuche mit beschichteten Modellimplantaten durchgeführt. Der Einfluss der Porosität auf die zeitabhängige Verteilung des Wirkstoffes innerhalb der mikroporösen HA-Struktur und der Effekt der Flussrate auf die Elimination des Wirkstoffes aus dem Knochenkompartiment wurden in einem statistischen Versuchsplan für die Einflussgrößen Freisetzungszeit, Porosität und Flussrate untersucht. Da die Diffusion eines Wirkstoffes im lipophilen Diffusionsraum vorwiegend durch die physikochemischen Eigenschaften des in die Lipid-Kavitäten eingebrachten Lipids beeinflusst wird, ist der jeweilige Effekt für das verwendete Lipid individuell zu bestimmen. Die grundsätzliche Prüfung des in-vitro-Knochenmodells wurde daher mit einem lipidfreien Knochenkompartiment durchgeführt.

Als modellhafte Implantate wurden Schrauben in den Freisetzungsversuchen verwendet, um zu testen ob auch stark strukturierte Oberflächen, wie sie beispielsweise bei aufgerauten Endoprothesen, enossalen Implantaten und den Flanken von Osteosyntheseschrauben vorkommen, vollständig benetzt werden können und vollflächig mit dem Knochenkompartiment in Kontakt stehen. Die Freigabe des Wirkstoffes sollte idealerweise unmittelbar und vollständig nach Einbringen des Implantates in das Knochenkompartiment erfolgen, um bei der Bestimmung der Diffusionskoeffizienten von einer initial maximalen Wirkstoffkonzentration in der Kavität ausgehen zu können. Daher wurde eine oberflächliche Beschichtung der Schrauben entwickelt. Als Modellwirkstoff wurde Methylenblau verwendet, da es, wie viele Glykopeptid-Antibiotika und Aminoglykosid-Antibiotika, gut wasserlöslich ist, sich aufgrund seiner Farbintensivität visuell gut detektieren lässt und mittels UV/VIS - Spektroskopie unkompliziert zu quantifizieren ist.

5.2 Theoretische Grundlagen und Betrachtungen

Die Verteilung eines Stoffes beruht im Allgemeinen auf Diffusions- oder Konvektionsprozessen. Bei der Konvektion werden Molekülverbände des Stoffes durch ein strömendes Fluid mitgeführt. Bei der Diffusion beruhen die Bewegungsvorgänge einzelner Moleküle auf deren Eigenbeweglichkeit unter Triebkraft eines Konzentrationsgradienten [125]. Während die Konvektion auf Fluide, also Gase und Flüssigkeiten beschränkt ist, kann Diffusion auch in Festkörpern stattfinden [137]. Adolf Eugen Fick (1829 - 1901) definierte auf Grundlage seiner Untersuchungen und den Arbeiten von Thomas Graham (1805 - 1869) für den eindimensionalen Massenstrom J eines Stoffes durch eine Querschnittsfläche A die Gesetzmäßigkeit

$$\text{Massenstrom } J = - A \cdot D \cdot \frac{\partial c}{\partial x} \quad (13)$$

wobei D der Diffusionskoeffizient des Stoffes und $\frac{\partial c}{\partial x}$ der vorliegende Konzentrationsgradient ist. Aus diesem fundamentalen ersten Diffusionsgesetz von Fick (Formel (13)) lässt sich einerseits ableiten, dass der Massenstrom eines Stoffes umso größer ist, je größer die Querschnittsfläche A ist, durch die der Stoff diffundieren kann. Des Weiteren führt eine Erhöhung des Konzentrationsgefälles zur Steigerung des Massenstroms, da der Konzentrationsgradient proportional zum Massenstrom J ist. Während das erste Diffusionsgesetz von Fick einen zeitlich konstanten Diffusionsfluss beschreibt, ist bei einer instationären Diffusion von zeit- und ortsabhängigen Konzentrationsunterschieden auszugehen. So beschreibt das zweite Diffusionsgesetz von Fick als eindimensionale Differenzialgleichung der Diffusion in Formel (14) die Ortsabhängigkeit $c(x,t)$ der Konzentration c und wie sich diese am Ort x mit der Zeit t ändert.

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x)}{\partial x^2} \quad (14)$$

Der Diffusionskoeffizient D eines Stoffes ist nicht zwingend konstant. Insbesondere bei höheren Konzentrationen kann er seinen Wert ändern [125]. Nach Formel (15) ist der Diffusionskoeffizient proportional zur Temperatur und umgekehrt proportional zur Viskosität des umgebenden Mediums und dem Radius der Partikel des Stoffes.

$$\text{Diffusionskoeffizient } D \text{ in } \text{m}^2\text{s}^{-1} = \frac{R \cdot T}{N_A \cdot 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (15)$$

- R: Allgemeine Gastkonstante
- T: Absolute Temperatur
- N_A : Avogadro-Konstante
- η : Viskosität des umgebenden Mediums
- r: Radius der Partikel

Betrachtet man einen porösen Körper, dessen Struktur impermeabel für einen Stoff ist, kann die Diffusion dieses Stoffes nur innerhalb der Poren stattfinden. Da der Stoff durch verengte und gewundene Poren diffundieren muss, erfolgt die Diffusion über eine längere Strecke, als wenn der Stoff in einem homogenen Material diffundieren würde. Auch die gesinterte Hydroxylapatitstruktur ist impermeabel, sodass der Wirkstoff im wässrigen Verteilungsraum nur durch die mit wässrigen Medium gefüllten Poren diffundieren kann. Die Diffusion des Wirkstoffes hängt somit nicht nur von seinem Diffusionskoeffizienten im wässrigen Medium ab, sondern auch von dem Hohlraumvolumen und der Tortuosität des Porensystems. Der effektive Diffusionskoeffizient (Formel (16)) berücksichtigt daher zusätzlich das Hohlraumvolumen ε und die Tortuosität τ der Poren. Auch wenn die messbare Tortuosität nicht immer mit der tatsächlich vorliegende Geometrie der Poren zu korrelieren ist, hat die Tortuosität als einfacher Kennzahl den Vorteil, dass mit ihr das Maß der Hinderung der Diffusion innerhalb eines porösen Körpers numerisch beschrieben werden kann [137].

$$\text{Effektiver Diffusionskoeffizient } D_{\text{eff}} = \varepsilon \frac{D}{\tau} \quad (16)$$

Die Methode, die zur experimentellen Bestimmung eines Diffusionskoeffizienten verwendet wird, richtet sich nach den Eigenschaften des Stoffes und des Mediums, in dem der Stoff diffundiert. Liegen transparente Lösungen oder Gase vor, kann die Bestimmung von Diffusionskoeffizienten relativ unkompliziert mittels Diaphragmazelle, nach dem Prinzip der dynamischen Lichtstreuung, mit der Taylor-Dispersion-Methode oder mit der Kapillarmethode nach Andersen erfolgen [125, 175–177].

Hingegen ist die experimentelle Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in porösen Körpern und biologischen Geweben nicht trivial und bedarf zumeist eines hohen apparativen Aufwandes. Mittels Autoradiographie kann zwar die zeitabhängige Verteilung von radioaktiv markierten Markern in einem Gewebe untersucht und graphisch abgebildet werden, jedoch ist der Einsatz in der Praxis aufgrund der radioaktiven Marker limitiert [178, 179]. Methoden, wie das FRAP-Verfahren (Fluorescence Recovery after Photobleaching) oder die Einzelpartikelverfolgung ermöglichen zumeist eine direkte Bestimmung von Diffusionskoeffizienten in biologischen Geweben, sie sind jedoch auf eine geringe Schichtdicke limitiert [180–182]. Mit dem Verfahren der Feldgradienten-Kernspinresonanzspektroskopie lässt sich generell auch die Selbstdiffusion von Teilchen in einer porösen Struktur destruktionsfrei bestimmen, insofern diese ein magnetisches Moment aufweisen [182].

5.3 Material

5.3.1 Methylenblau

Methylenblau (CAS-Nr. 61-73-4) gehört zur Gruppe der Phenothiazinfarbstoffe und zeichnet sich durch eine intensive Blaufärbung aus. Methylenblau ist in Wasser mit $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ und in Ethanol mit $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ löslich [183]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Methylenblau (Methylenblau, Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland) zur Beschichtung von Modellimplantaten verwendet.

5.3.2 Poloxamer 407

Poloxamer 407 (CAS-Nr. 9003-11-6) ist ein Triblock-Copolymer mit einem mittigen Propylenoxid-Block und zwei endständigen Ethylenoxid-Blöcken. Poloxamer 407 zeigt amphiphilen Charakter, da die Ethylenoxid-Blöcke wasserlöslich sind, der Propylenoxid-Block hingegen nicht. Wässrige Poloxamer 407-Lösungen zeigen thermoreversible Eigenschaften; so gelieren sie ab einer Konzentration von 15% bei Raumtemperatur und verflüssigen sich wieder bei Abkühlung [184]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Poloxamer 407 (Poloxamer 407, Caesar & Loretz GmbH, Hilden, Deutschland) in wässriger Lösung als Benetzungsmittel für beschichtete Modellimplantate verwendet.

5.3.3 Ethylcellulose

Ethylcellulose (CAS-Nr. 9005-57-3) ist ein nichtionischer, in Wasser unlöslicher Celluloseether mit Substitutionsgraden von 2-3 und durchschnittlichen Molekulmassen zwischen 150 000 und 300 000 [185]. Ethylcellulose (EC) ist in einer Vielzahl von organischen Lösungsmitteln und einwertigen Alkoholen löslich und zeigt gute filmbildende Eigenschaften [186]. EC (Ethocel™ Standard 100 FP Premium, The Dow Chemical Company, Midland, Michigan, USA) wurde als Grundierung für mit Methylenblau zu beschichtende Modellimplantate verwendet.

5.3.4 Ethanol

Ethanol (CAS-Nr. 64-17-5) ist ein aliphatischer Alkohol mit einem Dampfdruck von 58 mbar (20°C) [187]. Ethanol (Ethanol für Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv®, MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland) wurde als Lösungsmittel für Methylenblau verwendet.

5.3.5 Dichlormethan

Dichlormethan (CAS-Nr. 75-09-2) ist leichtflüchtiger Chlorkohlenwasserstoff mit einem Dampfdruck von 470 mbar (20°C) [187]. Dichlormethan (Dichlormethan für die Flüssigkeitschromatographie LiChrosolv®, MerckMillipore, Darmstadt, Deutschland) wurde als Lösungsmittel für die Grundierungslösung verwendet.

5.3.6 Weißes Vaseline

Weißes Vaseline (CAS-Nr. 8009-03-8) ist ein Gemisch aus gereinigten, gebleichten und gesättigten flüssigen und festen Paraffinkohlenwasserstoffen. Vaseline liegt als plastisches Gel mit netzartigem Gerüst vor und hat einen Schmelzpunkt zwischen 50-55°C [185,188]. Vaseline ist zwar nicht der Gruppe der hydrophoben Naturstoffe zuzordnen, und somit per se kein Lipid, jedoch wurde es modellhaft als hydrophober Stoff in die Lipid-Kavitäten eingebracht, da es nahezu vollständig inert ist und keinerlei Amphiphilie zeigt.

5.4 Methoden

5.4.1 Quantitative Methylenblaubestimmung mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Absorption wässriger Methylenblaulösungen wurden bei einer Wellenlänge von 662 nm (bestimmtes Absorptionsmaximum) unter Verwendung eines UV/VIS-Spektrophotometers Lambda 40 (Perkin Elmer, Waltham/ Massachusetts, USA) gemessen und über eine Kalibriergerade der korrespondierende Methylenblaugehalt berechnet. Wie in Abbildung 5-1 dargestellt, zeigte sich bis zu einer Absorption von 0,1 ein linearer Messbereich und somit ein minimal detektierbarer Methylenblaugehalt von $4 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

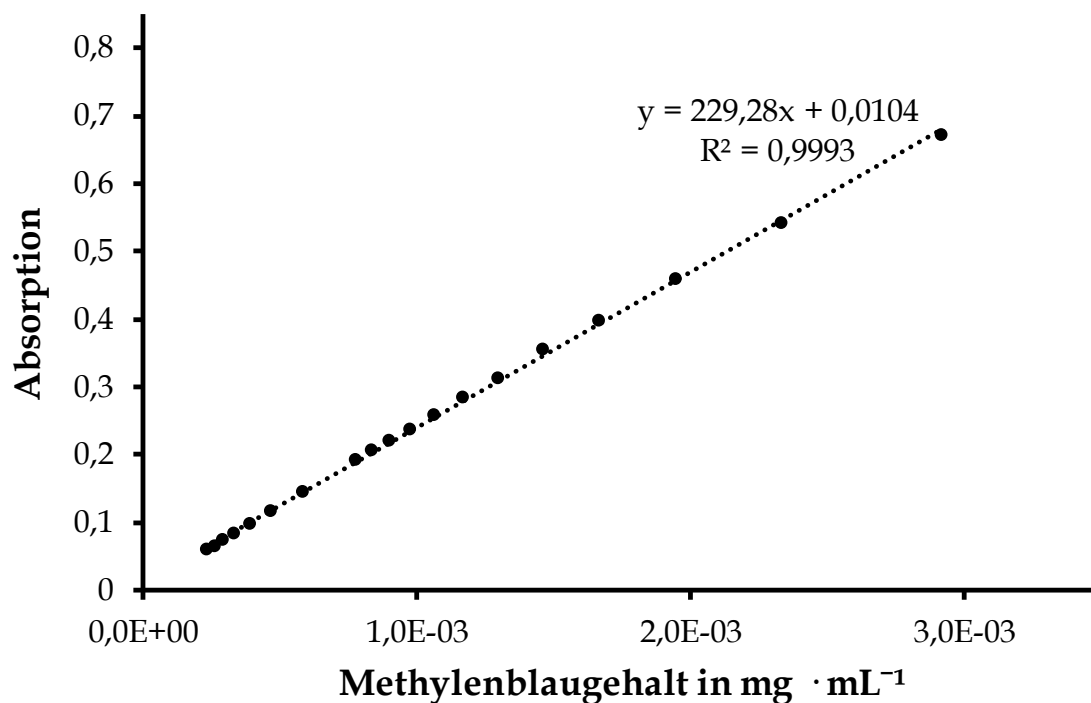


Abbildung 5-1: Kalibriergerade - wässrige Methylenblaulösung

5.4.2 Präparation mikroporöser Rohlinge für isolierte Diffusionsversuche

Zur Überprüfung des postulierten Einflusses der Porosität auf das Diffusionsverhalten eines Wirkstoffes in der mikroporösen HA-Struktur wurden zunächst Rohlinge mit Soll-Porositäten von 20, 40 und 60% hergestellt. Nach Saturierung der mikroporösen Struktur mit Wasser wurden die Rohlinge über eine definierte Zeitspanne mit Methylenblaulösung überschichtet und nachfolgend der Gehalt des in die mikroporöse Struktur diffundierten Methylenblaus quantitativ bestimmt. Der Herstellungsprozess der mikroporösen Rohlinge erfolgte nach der in Kapitel 3.5.5.1 beschriebenen Methode, die entsprechenden Prozessparameter für die jeweils angestrebte Porosität von 20, 40 und 60 % ergeben sich aus Kapitel 3.6.7 und sind in Tabelle 5-1 aufgeführt.

Tabelle 5-1: Prozessparameter zur Herstellung mikroporöser HA-Rohlinge

Zielporosität in %	Presskraft in kN	Sintertemp. in °C	Heizrate in °C min ⁻¹
20,0	60,0	1194,0	4,0
40,0	60,0	1099,0	4,0
60,0	25,0	957,0	4,0

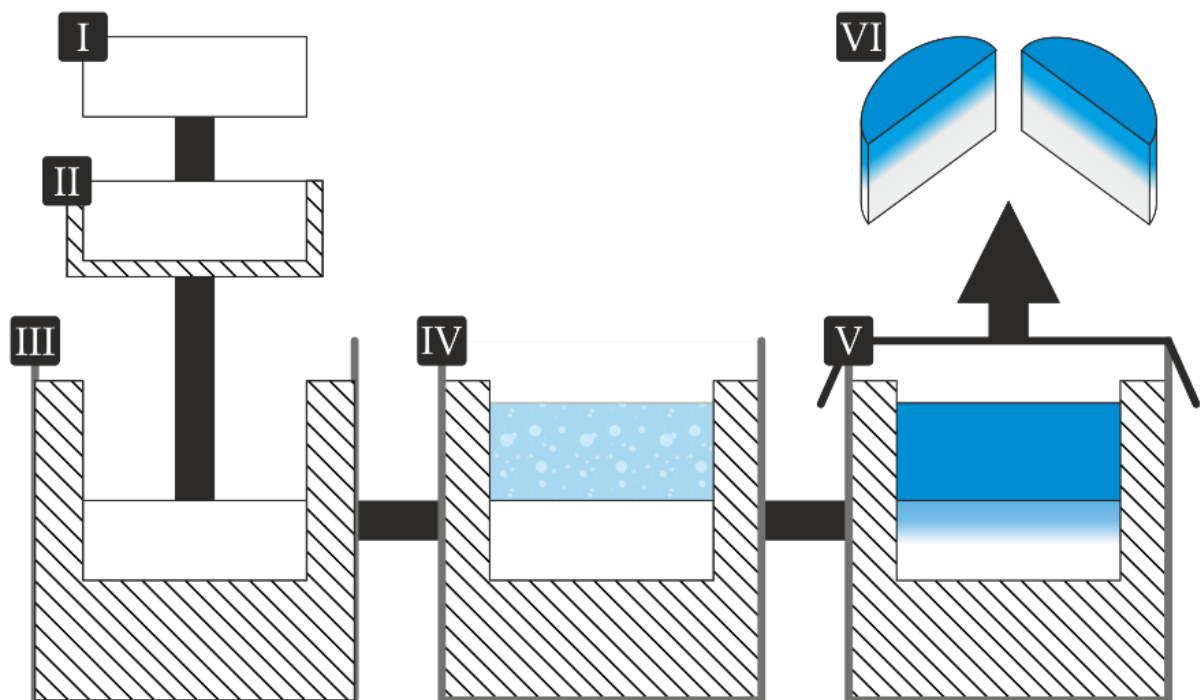


Abbildung 5-2: Schematische Darstellung isolierter Diffusionsversuche

Als grundlegende Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Soll-Porositäten, musste sichergestellt werden, dass die Methylenblaulösung über eine definierte Fläche mit den Rohlingen in Verbindung steht und nur über eben diese Fläche Methylenblau in die mikroporöse Struktur diffundieren kann. Dementsprechend wurden die gesinterten Rohlinge (I) an ihrer Mantelfläche und unteren Kreisfläche lückenlos mit Silikon benetzt (II) und nachfolgend vollständig in Silikon eingebettet (III), wie in Abbildung 5-2 schematisch dargestellt. Nach Aushärtung des Silikons wurden die Rohlinge mit bidestilliertem Wasser überschichtet (IV), unter Vakuum von 200 mbar über 2 h entgast und nachfolgend über 24 h auf 37,0°C temperiert. Für die Diffusionsversuche wurden das Wasser verworfen, 3 mL einer wässrigen Methylenblaulösung (0,98 mg · ml⁻¹) auf die Rohlingoberfläche gegeben, der Container gegen Verdunstung mit Parafilm[®] (V) versiegelt und bei 37°C temperiert. Nach 240 min wurde die Methylenblaulösung verworfen, die Oberfläche der Silikonkavität und der Rohlinge zweifach mit 3 mL bidestilliertem Wasser gewaschen und die Rohlinge nachfolgend aus der Silikoneinbettung entnommen. Nach diametraler Ritzung auf ihrer Unterseite wurden die Rohlinge gebrochen (VI), im Querschnitt fotografiert, nachfolgend zerkleinert in einem Volumen von 10 mL bidestillierten Wassers aufgenommen und über 24 h bei 100 · min⁻¹ geschüttelt. Zur Abtrennung disperser HA-Partikel wurden Aliquote der jeweiligen Probelösung bei 23 800 · s⁻¹ über 30 min zentrifugiert und der Methylenblaugehalt im Überstand mittels Photometrie vermessen. Aufgrund der prozessbedingten Schwindung der Rohlinge unterschieden sich die Durchmesser der Rohlinge, sodass die statistische Auswertung auf dem nach Formel (17) normierten Methylenblaugehalt pro Flächeneinheit erfolgte. Die Diffusionsversuche erfolgten in einer Dreifachbestimmung.

$$\frac{m(\text{MB}) \text{ in g}}{\text{mm}^2} = \frac{m(\text{MB}) \text{ in g}}{\pi \cdot r(\text{Scaffold})^2 \text{ in mm}} \quad (17)$$

5.4.3 Freisetzung beschichteter Modelleimplantate - Statistischer Versuchsplan

5.4.3.1 Herstellung mikroporöser Scaffolds

Die Herstellung der Rohlinge erfolgte nach der unter Kapitel 3.5.5.1 mit den in Tabelle 5-2 aufgeführten Parametern. Die zerspannende Strukturierung erfolgte mittels CNC-Fräse. Die Anordnung der Perfusionskanäle und Nuten entsprach der in Abbildung 3-34 dargestellten Scaffoldstruktur. Um eine vollständige planparallele und spaltfreie Anordnung der Scaffolds im Knochenkompartiment realisieren zu können, wurden die Scaffolds nachfolgend manuell im Nassschleifverfahren über plan aufgespanntes Schleifpapier (Körnung 120, 600 und 1200, PS 11A, Kingspor, Haiger, Deutschland) plan abgerichtet.

Tabelle 5-2: Prozessparameter zur Herstellung mikroporöser Scaffolds

Zielporosität in %	Presskraft in kN	Sintertemp. in °C	Heizrate in °C min ⁻¹
35,0	60,0	1132,0	4,0
45,0	40,0	1096,0	4,0
55,0	40,0	974,0	4,0

5.4.3.2 Coating von Modellimplantaten mit Methylenblau

Die Beschichtung von V2A-Schrauben (25 mm, Ø 3,5 mm) mit Methylenblau erfolgte in einem dreistufigen Prozess. Zunächst wurden die Schrauben mit Dichlormethan entfettet und nach Trocknung am Schraubenkopf fixiert. Nachfolgend wurden die Schrauben mit einer Grundierung aus Ethylcellulose überzogen. Dafür wurden sie in eine dichlormethanolische Ethylcelluloselösung (1,0 g Ethocel™ Standard 100 FP Premium in 30,0 mL Dichlormethan gelöst) getaucht und getrocknet. Der Auftrag der Grundierung erfolgte in insgesamt fünf Tauchzyklen. Nachfolgend fand das Auftragen von Methylenblau über die gesamte Länge des Gewindes der grundierten Schrauben statt. In fünffacher Wiederholung wurden je 50 µL einer ethanolischen Methylenblaulösung (10 mg · mL⁻¹) gleichmäßig auf die Schrauben pipettiert, wobei die Schrauben nach jedem Beschichtungsvorgang vollständig getrocknet wurden.

5.4.3.3 Gehaltsbestimmung von beschichteten Modellimplantaten

Aus dem unter Kapitel 5.4.3.1 beschriebenen Beschichtungsprozess wurde jede zehnte Schraube entnommen, in 20,0 mL bidestilliertem Wasser aufgenommen, über 1 h geschüttelt und der Methylenblaugehalt in der Probelösung mittels UV/VIS-Spektrophotometer bestimmt. Für den Methylenblaugehalt der Stichproben wurde eine prozentuale Abweichung $\leq 5\%$ als Akzeptanzwert für Chargenhomogenität definiert.

5.4.3.4 Rasterelektronische Aufnahmen der Modellimplantate

Siehe Kapitel 3.5.6.3.

5.4.3.5 Herstellung wässriger Poloxamer 407 - Lösung

Pulverförmiges Poloxamer 407 ist bevorzugt in kaltem Wasser löslich und wurde daher anteilsweise auf eisgekühltes bidestilliertes Wasser gestreut und unter starkem Rühren in diesem dispergiert. Nach Lagerung bei 5 °C über 12 Stunden, lag das dispergierte Poloxamer 407 gelöst vor.

5.4.3.6 Einbringung des Modellimplantates in das in-vitro-Knochenmodells

Die für die Diffusionsversuche hergestellten Scaffolds wurden mit Fixationspins zusammengesetzt, über 2 h im Vakuum bei 200 mbar mit bidestilliertem Wasser gesättigt und in diesem nachfolgend auf 37 °C temperiert. Nach Verschraubung der unteren Verbindungsplatte (Abbildung 4-10 (B)) mit dem Boden (Abbildung 4-7 (R)) der Durchflusszelle, wurde das saturierte Knochenkompartiment über die Fixationspins und deren korrespondierenden Bohrungen in der Bodenplatte passgenau ausgerichtet, sodass die Platzhalterpins in die Perfusionskanäle eingeführt werden konnten. Mittels Kanüle wurde die benötigte Menge an Benetzungsmittel in die mittige Kavität injiziert und unmittelbar danach das mit Methylenblau beschichtete Modellimplantat eingebracht, die Zeitnahme gestartet und das oberste Scaffold aufgesetzt. Nach Einsetzen des inneren und äußeren Zylinders in die Nuten des Bodens der Durchflusszelle wurde der Deckel mit dem Kolbensystem passgenau

aufgesetzt und über Rändelmuttern fixiert. Abgedichtet wurden die Kammern durch Anziehen der Verbindungsschrauben. Über die untere Verbindungsplatte wurde das Kolben-Zylinder-System zum Boden ausgerichtet und durch die Verbindungsschrauben mit diesem verschraubt. Das im Kolben-Zylinder-System befindliche, auf 60°C temperierte, verflüssigte Vaseline wurde durch gleichmäßige, kontinuierliche Drehbewegung des Kolbens über die Nuten der Scaffolds in den Spalt zwischen Knochenkompartiment und innerem Zylinder gefördert, bis dieser vollständig gefüllt war. Das Vaseline war nach 3 min verfestigt, danach wurden das Kolben-Zylinder-System, die Platzhalterpins und die untere und die obere Verbindungsplatte entfernt. An ihrer statt wurden die untere Verbindungsplatte und das untere und obere Anschlußteil befestigt, um das Knochenkompartiment über eine Präzisionsschlauchpumpe (IPC-12, Ismatec, Glattbrugg, Schweiz) mit Freisetzungsmittel zu perfundieren. Die jeweilige Freisetzungsdauer und Flussrate an Freisetzungsmittel sind dem statistischen Versuchsplan (Kapitel 5.5.2.4) zu entnehmen. Der Temperiermantel wurde über einen Thermostaten mit 37°C warmen Wasser perfundiert.

Nach Beendigung des jeweiligen Freisetzungversuches wurden Deckel, Kolben und die Zylinder entfernt, das oberste Scaffold abgehoben, das Implantat achtsam entnommen und das in der Kavität befindliche Benetzungsmittel abgesaugt. Nachfolgend wurde die Kavität zweifach mit bidestilliertem Wasser gespült um verbleibende Anhaftungen von Füllmittel und Wirkstoff zu entfernen. Jedes Scaffold wurde in einer vertikalen, nicht scherenden Bewegung vom benachbarten Scaffold gelöst, nach der in Kapitel 5.4.3.7 beschriebenen Methode fotografiert, danach einzeln in ein 10 mL bidestilliertes Wasser enthaltendes verschließbares Probengefäß überführt und über 24 h unter Lichtausschluss geschüttelt. Die Bestimmung des Methylenblaugehaltes in der Probelösung erfolgte mittels UV/VIS-Spektrophotometer.

5.4.3.7 Bestimmung der Methylenblau-Diffusionsstrecke

Zur Bestimmung der Diffusionsstrecke von Methylenblau in mikroporösen HA-Strukturen wurden die zu untersuchenden Scaffolds nach Beendigung des Versuches mittels Digitalkamera (Nikon D5100; Makro-Objektiv: AF-S DX Micro-Nikkor 40 mm) in Aufsicht abfotografiert (Abbildung 5-3 a). Die relative Diffusionsstrecke wurde als Abstand zwischen der mittigen Kavität des Scaffolds und der Diffusionsfront des Methylenblaus graphisch bestimmt (Corel Draw und Corel Photopaint, Version X6). Über den Gesamtdurchmesser der Scaffolds wurde die absolute Diffusionsstrecke bestimmt. Um die ausklingende Diffusionsfront standardisiert lokalisieren zu können, wurde der Farbraum der Fotografien in Graustufen konvertiert und zehnfach abgestuft. Die niedrigste Graustufe wurde als Grenzwert für die Diffusionsfront definiert (Abbildung 5-3 b). Zur Gewährleistung einer reproduzierbaren und gleichmäßigen Ausleuchtung, wurden die Scaffolds in eine eigens entwickelte Beleuchtungseinheit (Abbildung 5-4) eingebracht. Diese besteht aus einer zweigeteilten Scheibe mit radial angeordneten Halterungen mit denen die LEDs, gleichmäßig ausgerichtet werden. Mittig ist ein matter, höhenvariabler Zylinder eingesetzt, der das Licht der LEDs diffus auf die Oberfläche der Scaffolds streut.

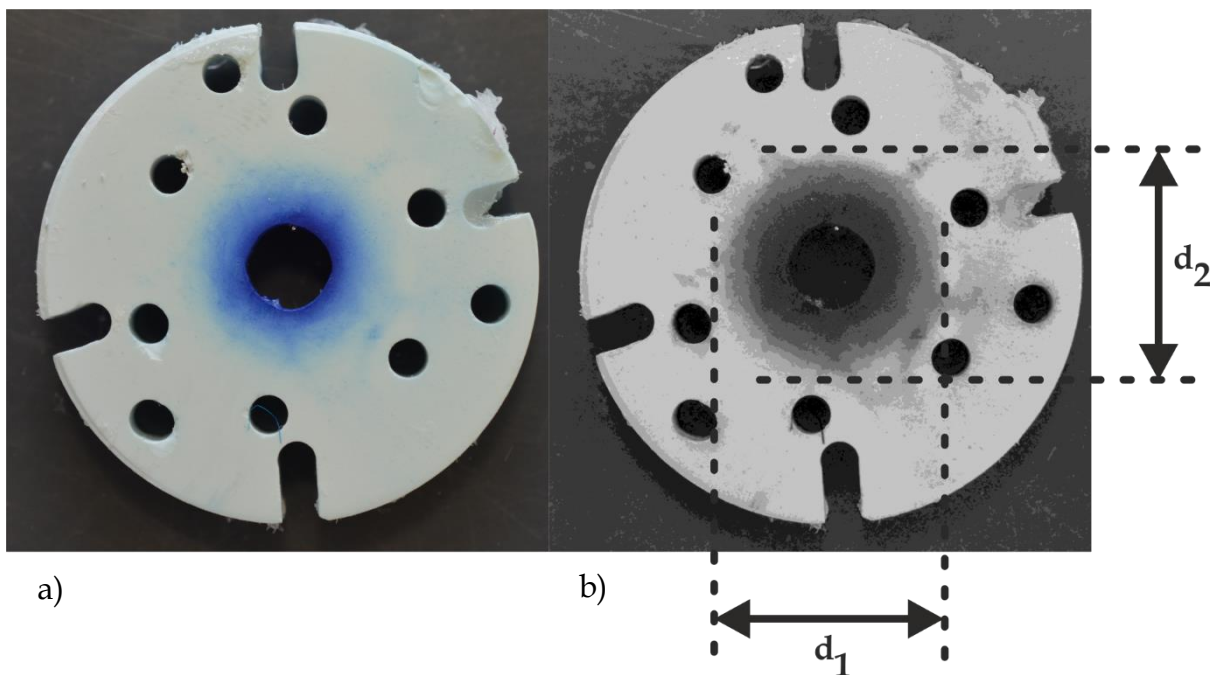


Abbildung 5-3: Bestimmung der Diffusionsstrecke von Methylenblau

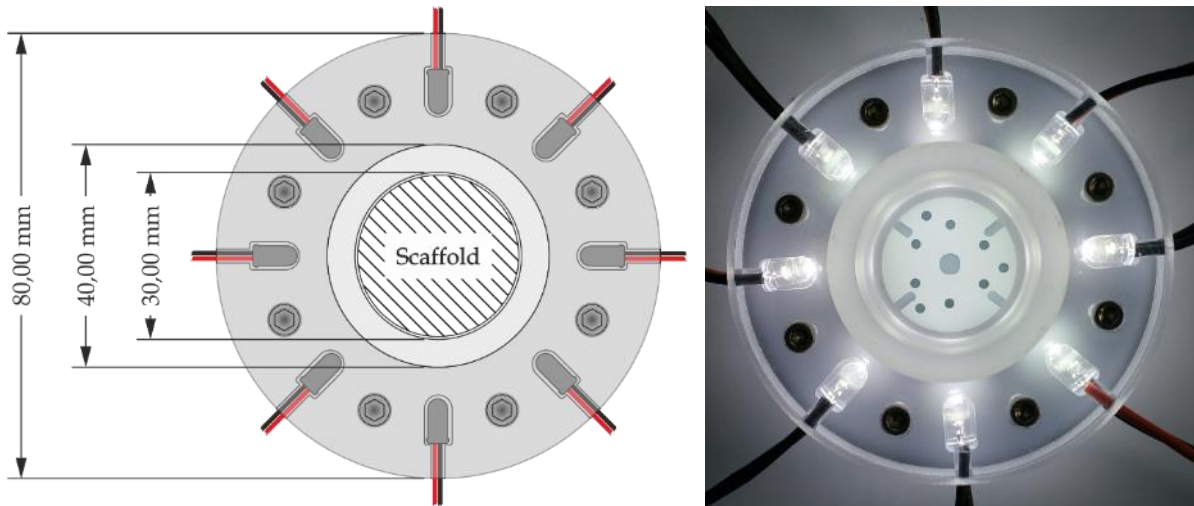


Abbildung 5-4: Beleuchtungseinheit für makroskopische Aufnahmen
Links: Konstruktionszeichnung
Rechts: Beleuchtungseinheit

5.5 Ergebnisse

5.5.1 Isolierter Diffusionsversuch

Abbildung 5-5 zeigt die auf einen Flächeninhalt von 1 mm² bezogene Konzentration von Metylenblau in Abhängigkeit der Porosität der gesinterten Rohlinge. Da die Masse der Presslinge auf 8,00 g verdoppelt wurde, um dickere Rohlinge zu erhalten, die sich bei der Einbettung in Silikon leichter handhaben lassen, ergab sich eine Abweichung von den Soll-Porositäten, da der optimierte Versuchsplan auf Grundlage einer Rohlingmasse von 4,00 g erstellt wurde. Wie zu erkennen ist, nahm der flächenbezogene Metylenblaugehalt mit ansteigender Porosität der Presslinge zu. Zwischen den flächenbezogenen Metylenblaugehalten der untersuchten Porositäten zeigte sich jeweils ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$. Der postulierte Einfluss der mikroporösen Struktur auf das Diffusionsverhalten eines Wirkstoffes innerhalb des wässrigen Diffusionsraumes konnte somit nachgewiesen werden.

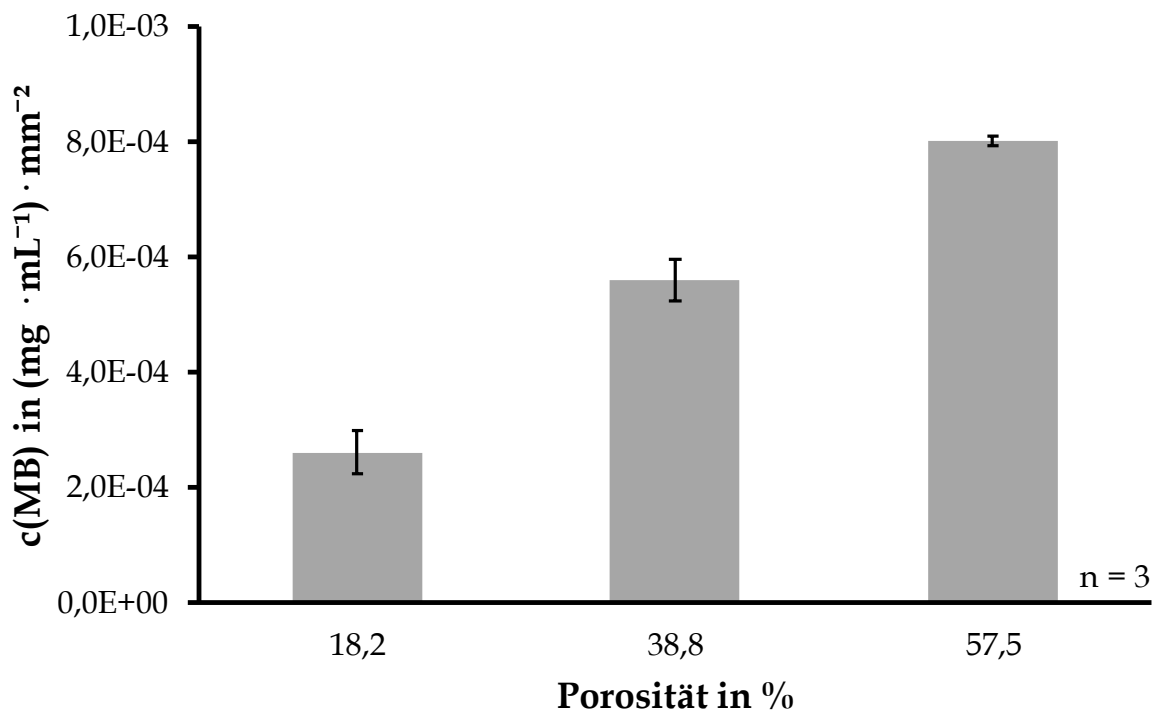


Abbildung 5-5: Metylenblaugehalt in mikroporösen Rohlingen

5.5.2 Freisetzungsversuche mit methylenblauhaltigen Modellimplantaten

5.5.2.1 Coating von Modellimplantaten mit Methylenblau

Eine direkte Beschichtung von Schrauben durch sukzessives Auftragen einer wässrigen oder ethanolischen Methylenblaulösung war nur bedingt möglich, da die Metalloberfläche der Schrauben nicht adäquat zu benetzen war. Die aufgetragenen MB-Lösungen neigten zur Ausbildung von Tropfen, sodass nach Verdunstung des jeweiligen Lösungsmittels nur partiell höchst instabile Kristallagglomerate vorlagen. Dementsprechend galt es die Oberfläche der Schrauben zuvor zu grundieren, um eine gleichmäßige Verteilung der MB-Lösung und somit eine gleichmäßige Methylenblauschicht auf den Schrauben realisieren zu können. So sollte die Grundierungsschicht möglichst einfach auf die Schrauben aufzutragen sein und deren Oberfläche dabei vollständig benetzen. Das Lösungsmittel der Grundierung sollte idealerweise einen hohen Dampfdruck aufweisen, damit die Trocknungsintervalle zwischen den Grundierungsschritten möglichst kurz gehalten werden konnten. Weiterhin sollte die Grundierung in Wasser nur gering löslich sein, um bei Wasserkontakt im Knochenkompartiment beständig zu sein.

Da Ethylcellulose (EC) einerseits in Dichlormethan (DCM) als leicht flüchtigem Lösungsmittel löslich ist und andererseits bei Zugabe von Ethanol quillt, wodurch eine verbesserte Anhaftung von Methylenblau (bei Zugabe aus ethanolischer Lösung) erreicht werden kann, wurde Ethylcellulose als Grundierung für die Schrauben gewählt. Wie in Abbildung 5-6 b) am Schraubenwinde gezeigt, konnte eine nahezu vollständige Grundierung der Schraubenoberfläche erreicht werden. Die an der Gewindeflanke erkennbaren Kanäle in der Grundierung sind durch den Austritt von DCM durch die oberflächlich bereits solidierte EC-Schicht zu erklären. Beim nachfolgenden Auftragen ethanolischer MB-Lösung zeigte sich eine gleichmäßige Verteilung und bei einem Volumen von 250 μL keine Tropfenbildung. Abbildung 5-6 c) lässt erkennen, dass die nadelförmigen Methylenblaukristalle gleichmäßig auf der Schraubenoberfläche verteilt vorlagen. Zwar führte die Zugabe der ethanolischen MB-Lösung zu einer partiellen Destruktion der Grundierung, jedoch konnten die

Methylenblaukristalle derart in der gequollenen Grundierung fixiert werden, dass die beschichteten Implantate während ihrer weiteren mechanischen Handhabung keinerlei Ablösung von Methylenblau zeigten und somit unbedenklich zu handhaben waren.

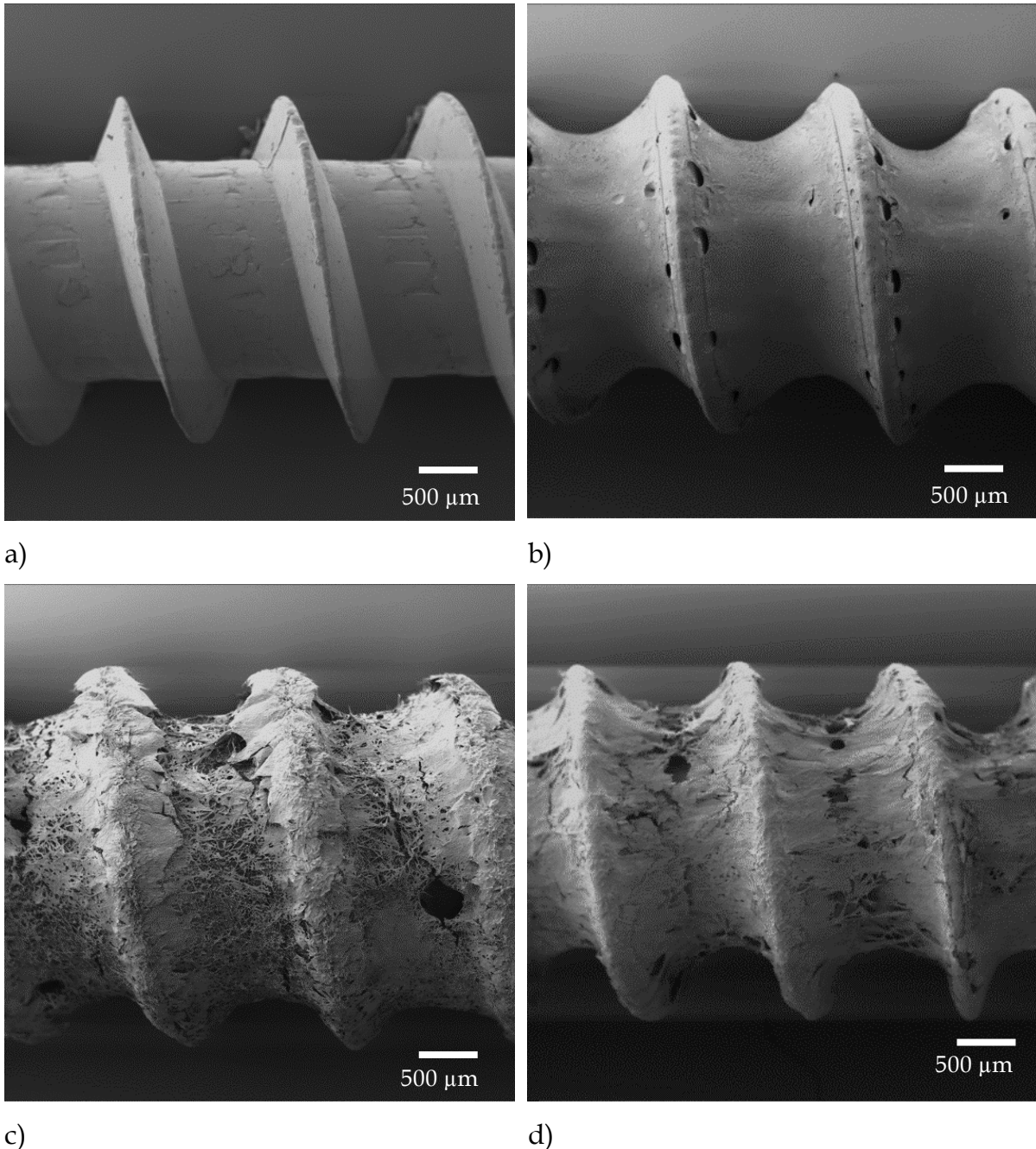


Abbildung 5-6: Modellimplantat-Coating- REM, 20-fache Vergrößerung
a) Gereinigtes Modellimplantat
b) Implantat nach Ethylcellulose-Coating
c) Implantat nach Methylenblau-Coating
d) Gewaschenes Implantat

5.5.2.2 Eignung von Poloxamer 407 - Gelen als Benetzungsmittel

Zweck des Benetzungsmittels ist es, den Spalt zwischen Implantat und der Wandung der Kavität des Knochenkompartimentes vollständig auszufüllen, sodass kein Totvolumen vorliegt. In Abhängigkeit der Knochenzusammensetzung am Applikationsort des Implantates ist ein hydrophiles oder lipophiles Benetzungsmittel zu verwenden. Um zu verhindern, dass bereits in das Benetzungsmittel übergetretener Wirkstoff durch die Handhabung der Zelle unkontrolliert in der Kavität verteilt wird, sollte das Benetzungsmittel eine Viskosität aufweisen, die sowohl eine vollständige Benetzung der Implantatoberfläche als auch eine Fixierung der Wirkstoffe ermöglicht.

Als lipophile Benetzungsmittelleigenen sich Lipide und Wachse, die durch Erwärmen in geringviskose Schmelzen überführt werden können und nach Benetzung der Implantate bei 37°C erstarren. Da wässrige Poloxamergele aufgrund des amphiphilen Charakters des Triblock-Copolymers eine thermoreversible Sol-Gel-Umwandlung zeigen [184], wurden Poloxamergele im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Eignung als hydrophiles Benetzungsmittel untersucht. Die Temperatur der Sol-Gel-Umwandlung ist konzentrationsabhängig und nimmt mit ansteigender Poloxamerkonzentration ab [189]. Zur Ermittlung der optimalen Poloxamerkonzentration wurden Gele mit Poloxamerkonzentration von 20,0, 25,0, 30,0 und 35,0% (m/m) hergestellt und auf 5°C gekühlt, um ein Sol zu erhalten. Da das Benetzungsmittel in die Kavität des Knochenkompartimentes gegeben werden sollte, das auf 37°C konditioniert war, wurden das jeweilige Sol in eine auf 37°C temperierte Küvette gegeben und direkt nachfolgend eine unbeschichtete Schraube eingebracht. Beschichtete Implantate zeigten unmittelbar nach Einbringen in das Sol eine diffuse Diffusionsfront aus Methylenblau, sodass die Benetzung der Implantate nicht zu beurteilen war.

Wie in Abbildung 5-7 vergleichend dargestellt, ließen sich die Schrauben bis zu einer Poloxamerkonzentration von 30% vollständig benetzen, bevor das jeweilige Sol gelierte. Das 35%ige (m/m) Poloxamergel hingegen gelierte unmittelbar nach Überführung in die Küvette. Dementsprechend zeigten sich eine unvollständige Benetzung und ein Einschluss von Luftblasen zwischen den Flanken der Schraube. So wurde das

30%ige (m/m) Poloxamergel im Folgenden als hydrophiles Benetzungsmittel verwendet.

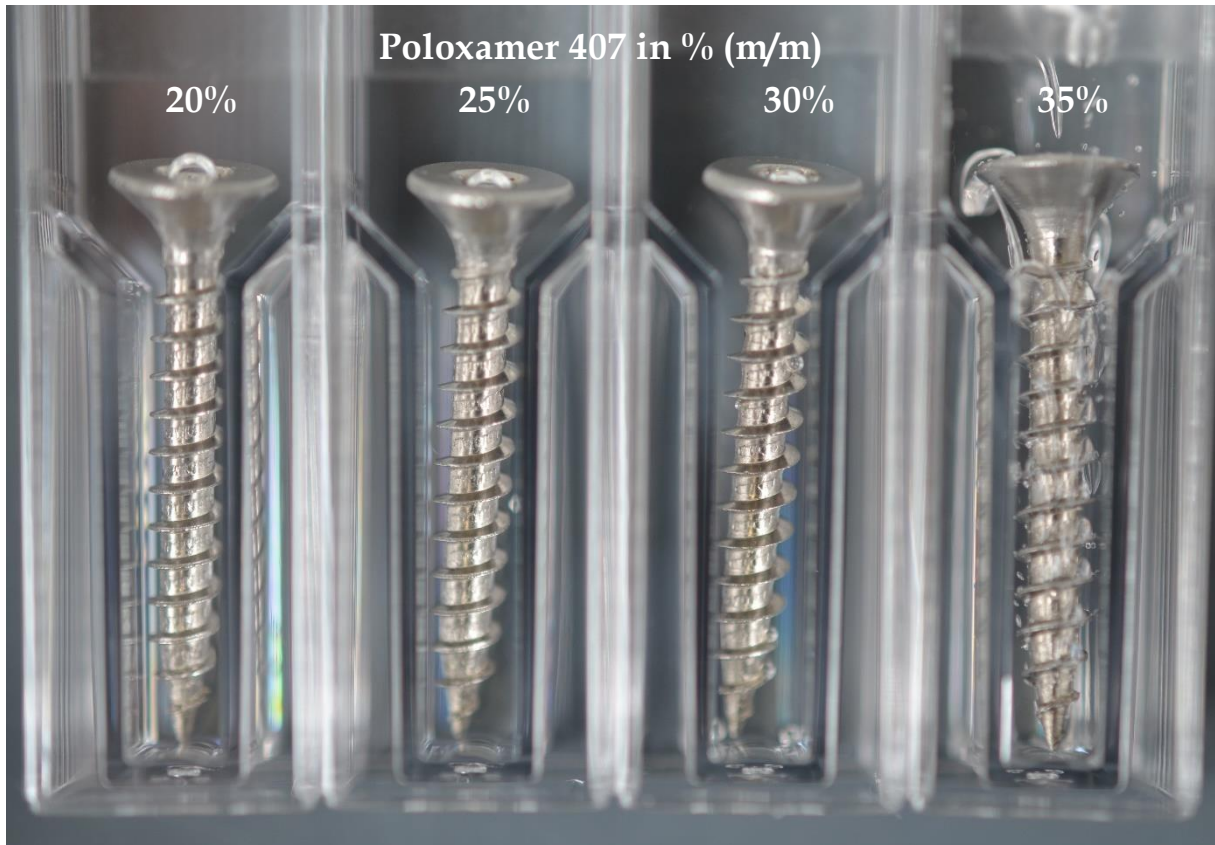


Abbildung 5-7: Eingebettet Implantatgrundkörper in Poloxamer 407

5.5.2.3 Gehaltsbestimmung von beschichteten Modellimplantaten

Die Implantate zeigten bereits nach 60 s eine vollständige Freisetzung des Methylenblaus. Der durchschnittliche Methylenblaugehalt der Implantate betrug 2,56 mg bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,019. Vergleichend zum Methylenblaugehalt von 2,60 mg in 250 μ L der Methylenblaulösung ergab sich zu dieser eine prozentuale Abweichung von 1,55%. So wurde der zweistufige Coatingprozess als geeignet angesehen, um reproduzierbar eine schnellfreisetzende MB-Beschichtung auf die Implantate aufzubringen. Für die Freisetzungsversuche des statischen Versuchsplans wurden alle Modellimplantate nach dem in Kapitel 5.4.3.1 beschriebenen Verfahren beschichtet.

5.5.2.4 Freisetzungsversuche - Vollfaktorieller Versuchsplan

Tabelle 5-3 zeigt die Faktorstufenkombinationen der Faktoren Freisetzungsdauer, Flussrate und Porosität. Die Eckpunkte des vollfaktoriellen Versuchsplans wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, die Zentralpunkte umfassten jeweils nur die Freisetzung eines Implantates in einem präparierten Knochenkompartiment. Die Masse des in die Scaffolds diffundierten Methylenblaus wurde photometrisch für jedes Scaffold einzeln bestimmt und zur Methylenblau-Gesamtmasse m_{ges} des jeweiligen Knochenkompartimentes aufsummiert.

Tabelle 5-3: Kenndaten des statistischen Versuchsplans

	Freisetzungsdauer in h	Flussrate in mL · min ⁻¹	Porosität in %	
-α	2	1,5	35	
0	13	3,0	45	
+α	24	4,5	55	

Run				$m_{\text{ges}}(\text{MB})$ in mg
1	+	+	-	0,363 ± 0,136
2	-	-	+	0,849 ± 0,028
3	0	0	0	0,256
4	+	-	-	0,559 ± 0,01
5	-	-	-	0,638 ± 0,033
6	0	0	0	0,051
7	-	+	+	0,090 ± 0,004
8	0	0	0	1,137
9	+	-	+	0,279 ± 0,363
10	0	0	0	0,162
11	-	+	-	0,121 ± 0,018
12	+	+	+	0,390 ± 0,407

Es zeigt sich, dass die Gesamtmassen der Zentralpunkte und auch einiger Eckpunkte stark streuen, wodurch eine statistische Auswertung des Versuchsplans in diesem Falle sinnwidrig ist. Nach Beendigung der Freisetzungsversuche und der Zergliederung des Knochenkompartiments war bei einigen Scaffolds eine ungleichmäßige Verteilung von Methylenblau zu beobachten. Bei einigen Scaffolds war eine erhöhte

Methylenblaufärbung sichtbar, während bei anderen Scaffolds das Methylenblau ausgewaschen war. Beide Beobachtungen sind auf einen nicht vollflächigen Kontakt der Scaffolds zurückzuführen, durch den sich ein minimaler Spaltraum zwischen den Scaffolds ergab. Stand der Spaltraum unmittelbar mit der Kavität in Kontakt, konnte Methylenblau direkt in den Spaltraum übertreten und sich ohne den diffusionsretardierenden Effekt der mikroporösen Struktur zwischen den Scaffolds verteilen. War der Spaltraum in der Nähe eines Perfusionskanals lokalisiert, drang Freisetzungsmedium ein, und wusch das Methylenblau aus. Der Spaltraum zwischen den Scaffolds ist dadurch zu erklären, dass mit der manuellen Abrichtung der Scaffolds im Nassschleifverfahren keine vollständige Planarität und Planparallelität der Scaffoldoberflächen erreicht werden konnte. Bei retrospektiver Betrachtung zeigt sich, dass bereits ein genügend großer Spaltraum zwischen nur zwei Scaffolds ausreichte, damit das Freisetzungsmedium bis in die Kavität gelangen und folglich das Methylenblau nahezu gänzlich aus dem Knochenkompartiment auswaschen konnte. Um diesen sporadische Fehler zu beheben, ist das manuelle Planschleifen durch ein genaueres, reproduzierbares und automatisiertes Verfahren, wie das Läppen zu ersetzen. Des Weiteren würde es sich vorteilhaft zeigen, wenn die Verdichtung des HA-Granulates durch Ober- und Unterstempel gleichzeitig erfolgt. Ein Verzug der Scaffolds beim Sintern aufgrund von Spannungen und Dichteunterschieden könnte somit reduziert werden.

Die ungleichmäßige Methylenblauverteilung in einem Knochenkompartiment sei im Folgenden beispielhaft an Run II A) in Abbildung 5-8 zu betrachten. Erwartungsgemäß lässt sich bei Scaffold 1 und 2 kein Methylenblau erkennen, da der Schraubenkopf des Modellimplantates nicht mit Methylenblau gecoatet war und nach einer Freisetzungsdauer von 2 h kein Methylenblau bis dorthin diffundiert war. Bei den Scaffolds 3 bis 9 lässt sich eine in radialer Richtung eine gleichmäßig ausgebreitete Diffusionsfront von Methylenblau erkennen. Bei Scaffold 10 bis 12 ist eine Diffusionsfront nicht eindeutig zu erkennen. Die oberflächliche Methylenblaufärbung bei Scaffold 10 fiel sehr gering aus, auch wenn sie in der Fotografie als deutliche Schattierung zu erkennen ist. Hingegen zeigte sich auf der Oberfläche von Scaffold 12

und der Unterseite von Scaffold 11 (nicht dargestellt) eine deutliche Methylenblaufärbung, die auf das unkontrollierte Eindringen von Methylenblau in einen Spaltraum zurückzuführen ist. Da bei einer diffusionsunabhängigen Verteilung von Methylenblau die Bestimmung einer Diffusionsstrecke hinfällig ist, wurde aufgrund der heterogenen Versuchsergebnisse eine quantitative Bestimmung der Diffusionsstrecke nicht weiter verfolgt.

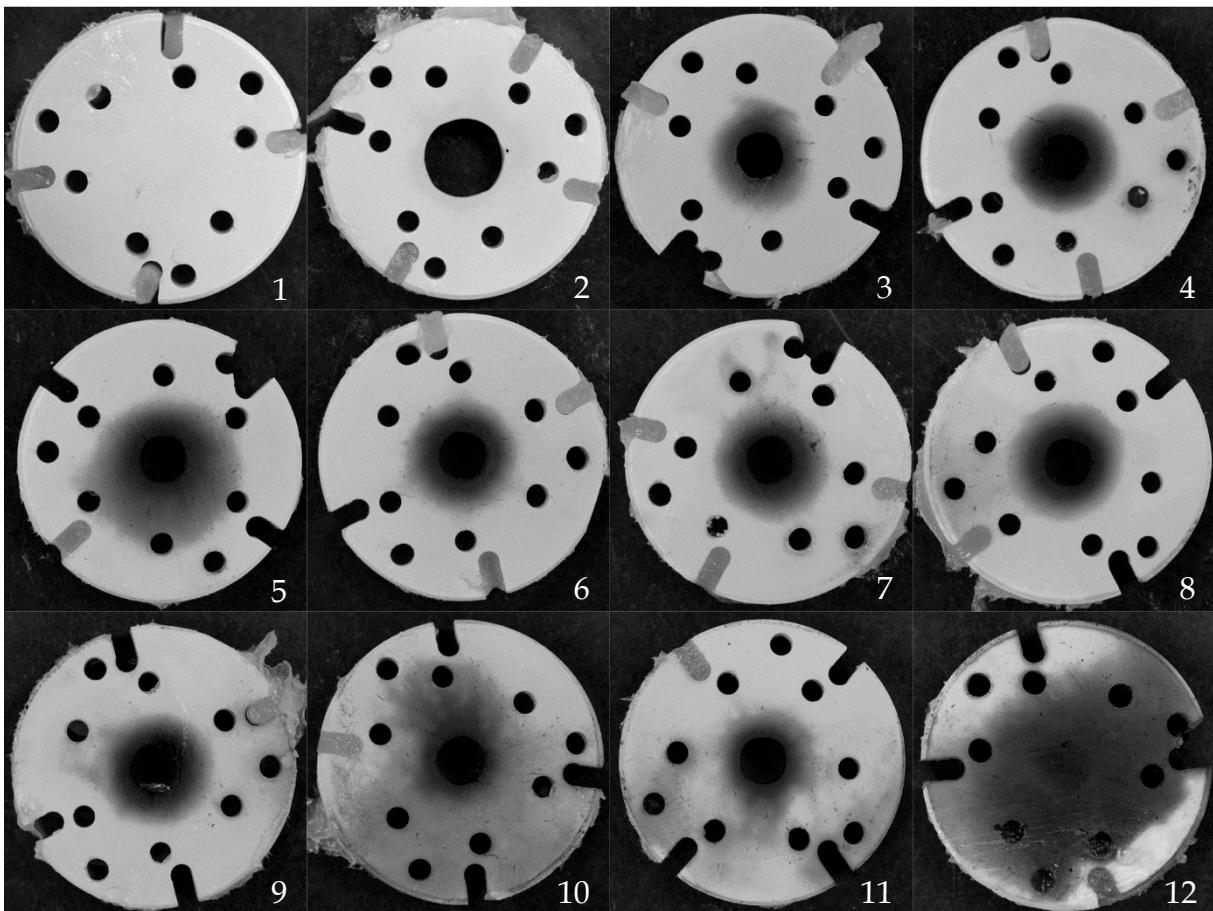


Abbildung 5-8: Scaffolds in Aufsicht - Freisetzungsversuch II A

Abbildung 5-9 zeigt die bestimmten Methylenblau Massen der Scaffold von Run II. Während die Methylenblauverteilung in den Scaffolds im Knochenkompartiment des Runs II b) nahezu einer idealen Normalverteilung folgt und auf eine gleichmäßige Diffusion des Methylenblaus im Knochenkompartiment zurückzuführen ist, ist bei Run II A) eine deutlich erhöhte Methylenblau Masse in Scaffolds 11 und 12 zu erkennen. Diese ist auf die oben aufgeführte diffusionsunabhängige Verteilung von Methylenblau im Spaltraum zwischen den beiden Scaffolds zurückzuführen.

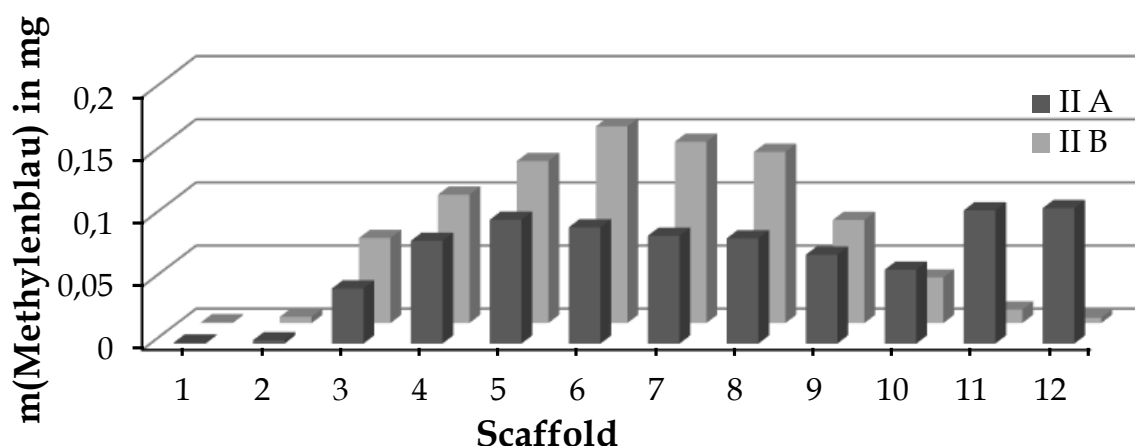


Abbildung 5-9: Run II - Scaffold-bezogene Methylenblau Massen

Grundsätzlich konnte jedoch eine gleichmäßige Verteilung des Methylenblaus im Knochenkompartiment beobachtet werden, wenn eine vollständige Planarität und Planparallelität der Scaffolds gegeben war. In Abbildung 5-10 sind beispielhaft die Methylenblau Massen der Einzelversuche von Run IV aufgeführt. Es eine nahezu vollständig identische Verteilung des Methylenblaus in den Scaffolds des jeweiligen Knochenkompartimentes zu erkennen. Der Variationskoeffizient der Gesamtmassen beträgt nur 0,001. Eine quantitative Aussage über den Einfluss der Porosität auf die Diffusion kann wegen der hohen Streuung der Einzelversuche nicht getroffen werden.

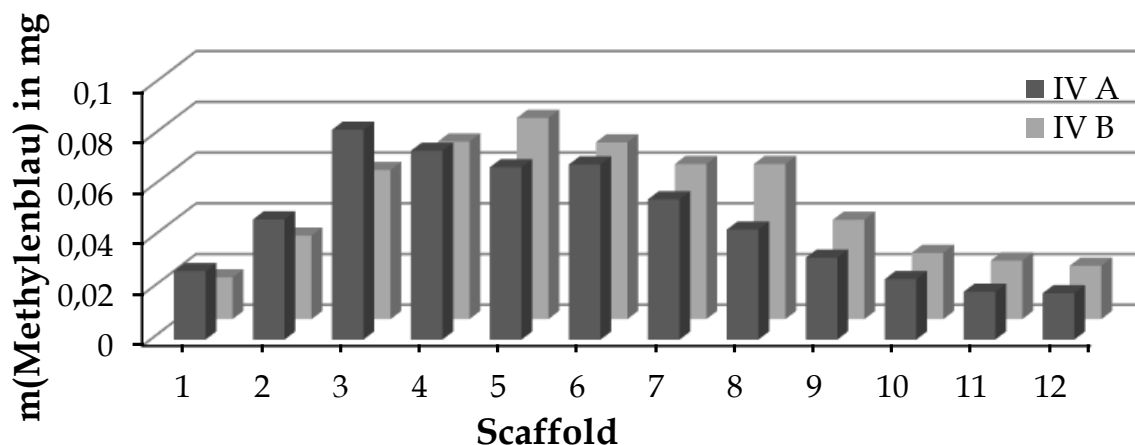


Abbildung 5-10: Run IV - Scaffold-bezogene Methylenblau Massen

Grundsätzlich konnte auch die postulierte Elimination von Methylenblau über die Perfusionskanäle gezeigt werden. Abbildung 5-11 zeigt hierfür beispielhaft einen Scaffold von Run VIII. Um die Perfusionskanäle ist eine kreisförmige Minderung des Methylenblaus zu erkennen (weißer Pfeil), die durch Auswaschen des Methylenblaus über das FreisetzungsmEDIUM, das durch die Perfusionskanäle strömte, zu erklären ist. Weiterhin zeigt sich der Perfusionskanal als Diffusionsbarriere, sodass der Bereich hinter dem Perfusionskanal (schwarzer Pfeil) zunächst frei von Methylenblau ist und erst mit zunehmender Diffusionsdauer Methylenblau dort hinein diffundiert. Eine quantitative Aussage über den Einfluss der Flussrate auf das Ausmaß der Elimination konnte aufgrund der Streuung der Einzelversuche nicht getroffen werden. Des Weiteren konnte keine Aussage über eine etwaige Interaktion zwischen den Einflussgrößen Porosität und Flussrate erfolgen.

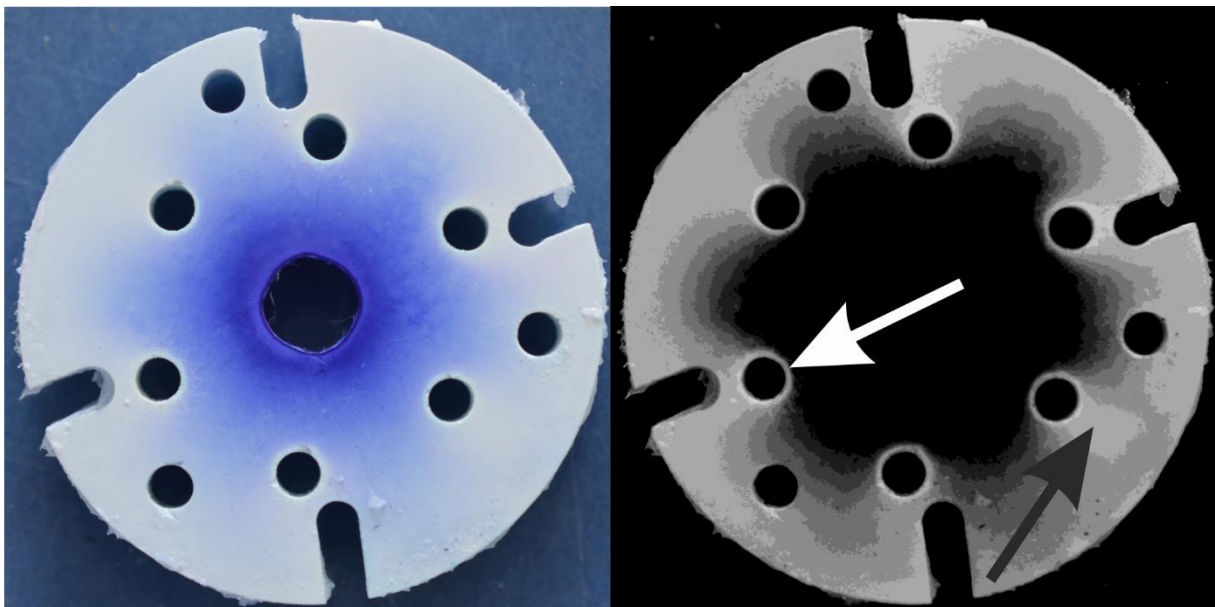


Abbildung 5-11: Elimination von Methylenblau über Perfusionskanäle

5.6 Zusammenfassende Schlussfolgerungen

Anhand von isolierten Diffusionsversuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Diffusion von Methylenblau innerhalb der porösen Struktur der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Scaffolds signifikant durch die Porosität der Scaffolds beeinflusst wird. Mit Hilfe von Freisetzungsversuchen mit Modellimplantaten konnte die Funktionalität des gesamten in-vitro-Knochenmodells grundsätzlich nachgewiesen werden. Zur systematischen Untersuchung der Einflussgrößen Porosität, Flussrate und Freisetzungsdauer wurde ein statistischer Versuchsplan erstellt, der aufgrund der Streuung einiger Einzelversuche nicht plausibel auszuwerten war. Die Streuung dieser Einzelversuche war durch einen nicht vollflächigen Kontakt der Scaffolds untereinander bedingt, wodurch ein Spaltraum zwischen den Scaffolds bestand. In diesen Spaltraum konnten Methylenblau oder Freisetzungsmedium ungehindert eindringen und sich verteilen. Folglich ist das manuelle plane Abrichten der Scaffolds durch ein präzises und automatisiertes Verfahren, wie das Läppen, zu ersetzen, um diesen sporadischen, jedoch eklatanten Fehler zu beheben.

In den Versuchen, bei denen die Scaffolds vollflächig aufeinander auflagen, konnte grundsätzlich gezeigt werden, dass Methylenblau über die Perfusionskanäle aus dem Kompartiment eliminiert wird. Der Effekt der Einflussgröße Flussrate und eine etwaige Interaktion mit der Einflussgröße Porosität ist in künftigen Untersuchungen zu bestimmen. Weiterhin konnte in diesen Einzelversuchen gezeigt werden, dass das Verteilungsmuster von Methylenblau in den Knochenkompartimenten zwischen den Einzelversuchen der jeweiligen Runs vergleichbar ist und das in-vitro-Knochenmodell seiner Bestimmung gemäß zu verwenden ist.

6 Diskussion

Schon lange besteht das wissenschaftliche und klinische Bestreben, die Aufnahme und Verteilung von Wirkstoffen im biologischen Knochen zu untersuchen und zu beschreiben. Es wurde daher eine Vielzahl von Methoden entwickelt, um die Blutversorgung und die Transportprozesse im Knochen ermitteln zu können. Allen Verfahren ist gemein, dass sie die vielen Faktoren der Transportprozesse stets nur partiell abbilden können. Grund dafür sind vor allem die Komplexität und die Variabilität des Knochens. So untersuchten McElfresh und Kelly (1974) den Blutfluss in kortikalem Knochen, Knochenmark und Muskeln anhand von Messungen an den Tibiae lebender Hunde. Sie applizierten den Hunden ^{125}I od als radioaktiven Tracer und bestimmten über das Auswaschverhalten des Tracers die Durchblutung der Knochen [190]. Jones et al. und Kane et al. nutzten ebenfalls radioaktive Tracer zur Untersuchung des Blutflusses und postulierten die Eignung der Methode, um die Hämodynamik im Knochen bestimmen zu können [191, 192]. Stracke und Swiontkowski berichten über die Anwendung der Laser-Doppler-Flowmetrie, um die Mikrozirkulation des Knochens untersuchen zu können [193, 194]. Jedoch ist das Verfahren auf oberflächliche oder sogar subperiostale Gefäße beschränkt. Insgesamt sind diese Ergebnisse auch nur für die untersuchten Knochen dieser Tierspezies gültig und nur bedingt auf den menschlichen Knochen zu übertragen. Des Weiteren ist die Nutzung von radioaktiven Tracern beim Menschen limitiert, sodass auch die Verteilungsvorgänge von Wirkstoffen im menschlichen Knochen nur näherungsweise mittels Diffusions-Tensor-Bildung oder Feldgradienten-Kernspinresonanz-Spektroskopie untersucht werden können [195–197].

Um dennoch die Freisetzung, die Verteilung und den physiologischen Effekt von Wirkstoffen und Wachstumsfaktoren (im Folgenden mit Wirkstoffen zusammengefasst) unter physiologischen Bedingungen testen zu können, werden die wirkstoffhaltigen Implantate in Tierstudien untersucht. Getestet wird ihre Toxizität auf das Knochengewebe, ihre Wirksamkeit gegen eine künstliche induzierte Infektion des Knochengewebes oder auf das Einwachsen der Implantate in den Knochen [198–201]. Die Tierstudien können wichtige Informationen hinsichtlich Toxizität und

Wirksamkeit von Wirkstoffen und Wachstumsfaktoren liefern, jedoch bedürfen sie einer genauen Prüfung hinsichtlich der ethischen Vertretbarkeit. Weiterhing können die Tierstudien mit einem hohen personellen, apparativen und finanziellen Aufwand verbunden sein, der in der Entwicklung von Implantaten ein Hindernis darstellen kann. Aufgrund des Bedarfs einer kosteneffektiven in-vitro-Analytik, wurde eine Vielzahl von Methoden entwickelt, die eine isolierte Betrachtung der physiologischen Vorgänge ermöglicht. Bei allen entwickelten Methoden ist jedoch zu beachten, dass die in-vitro-Bestimmung der Wirkstofffreisetzung und -verteilung nur als modellhafte Annäherung an die Bedingungen im biologischen Knochen zu verstehen sein kann.

Mittels Zellkultur-Linien können die Toxizität und der physiologische Effekt auf das Knochenwachstum untersucht werden [202, 203]. Die Testung von Implantaten mittels monographierter Freisetzungsapparaturen (Eintopf- oder Durchflussmethode) stellt eine unkomplizierte und preiswerte Möglichkeit dar [13]. Speziell die Eintopfmethode ermöglicht aufgrund des großen Volumens ihres Testgefäßes auch die Prüfung von großen Implantaten. Jedoch lassen sich die physiologischen und physikochemischen Eigenschaften des biologischen Knochens mit einer solchen Freisetzungsapparatur nicht annähernd abbilden. Aw et al. verfolgten einen sehr interessanten Ansatz [204]: Sie untersuchten mit Hilfe eines dreidimensionalen Knochen-Bioreaktors das Freisetzungsverhalten und die Verteilung von Wirkstoffen in trabekulärem Knochen ex vivo. Als Modellimplantat verwendeten sie Titandrähte mit Titannanoröhren, die mit Rhodamin B als Modellarzneistoff beladen wurden. Mittels hochauflösender Biolumineszenz-Tomographie konnten sie das dreidimensionale Verteilungsmuster des Rhodamin B in den Knochenproben bestimmen und als Diffusionssteckenabhängige Konzentrationsprofile darstellen. Die Autoren führen jedoch an, dass das Verteilungsmuster aufgrund der inhomogenen Struktur der verwendeten Knochenproben nicht einheitlich ist. Des Weiteren unterliegen die verwendeten Knochenproben einem Verwesungsprozess.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte in-vitro-Knochenmodell ist als geeignet anzusehen, einen großen Teil der aufgeführten Einschränkungen zu überwinden, da

der Anwender individuell definieren kann, welche Struktur und Zusammensetzung das künstliche Knochenkompartiment haben soll. So kann für jede Testreihe ein standardisierter Modellknochen reproduzierbar gefertigt werden. Des Weiteren unterliegt der künstliche Knochen keinem Verwesungsprozess, sodass auch lange Testzyklen realisiert werden können. Somit wären auch biodegradierbare oder bioabbaubare Implantate, hinsichtlich ihres Auflösungsverhaltens über einen langen Zeitraum zu testen. Da Hydroxylapatit eine gute Biokompatibilität aufweist [205], ist auch eine Besiedlung mit knochenspezifischen Zellen denkbar, sodass das Freisetzungsverhalten von Implantaten mit Wachstumsfaktoren getestet werden kann. Die dreidimensionale Bildgebung mittels hochauflösender Biolumineszenz-Tomographie stellt eine vielversprechende Analysenmethode dar, um die einzelnen Scaffolds des Knochenkompartimentes hinsichtlich des Verteilungsmusters des Wirkstoffes zu untersuchen. Eine entsprechende Markierung der zu testenden Wirkstoffe ist dabei zu beachten.

Hinsichtlich des Fertigungsprozesses der Scaffolds ist künftig zu beachten, dass sich die Kompaktion des HA-Granulates mit einer manuellen Hydraulikpresse sich zeitaufwendig gestaltete, und eine nur geringe Stückzahl von 16-18 Grünlingen in einer Stunde ermöglichte. Des Weiteren war die Masse an HA-Granulat für jeden Pressling händisch einzeln einzuwiegen. Daher erscheint eine automatisierte Kompaktierung sinnvoll. Durch die Überführung der HA-Bulkware in ein bindemittelhaltiges Granulat und die damit verbundene Verbesserung der Fließfähigkeit kann die Dosierung des HA-Granulates volumetrisch erfolgen. Um eine möglichst gleichmäßige Dichteverteilung innerhalb der Grünlinge erreichen zu können ist eine Rundläuferpresse zu bevorzugen, bei der die Presskraft über Ober- und Unterstempel auf das HA-Granulat einwirkt.

Durch die Einbindung einer CNC-gesteuerten Fräse konnte die Strukturierung der Scaffolds einerseits hochvariabel gestaltet und andererseits weitgehend automatisiert werden. Weiterhin sind dreidimensionale Geometriedaten einlesbar und in der Scaffoldstruktur zu realisieren. Bei Scaffolds mit hoher Porosität, die bei mit geringer

Presskraft und geringer Sintertemperatur gefertigt wurden, zeigten sich an der Kante vertikaler Bohrungen sporadisch minimale Ausbrüche. Diese sind auf die Sprödigkeit des Hydroxylapatits zurückzuführen und konnten auch bei geringer Vorschubgeschwindigkeit des Fräasers nicht verhindert werden.

Um diese Schwierigkeiten auszugleichen ist ein Lappen der Scaffolds sinnvoll, vor allem aber um die Oberfläche der Scaffolds soweit abzuplanen, bis eine vollständig rechtwinklige Kante an den Bohrungen vorliegt und ein Spaltraum vermieden werden kann.

Zusammenfassend ist festzustellen: das in dieser Arbeit entwickelte in-vitro-Knochenmodell ermöglicht die Simulation auch komplexer Strukturen, kann neben hydrophilen auch lipophile Bestandteile des Knochenmarks berücksichtigen, erfasst den Einfluss der Perfusion und ist in hohem Maße variabel, um die Anforderungen des Anwenders zu realisieren.

7 Zusammenfassung

Knochen- und Gelenkerkrankungen indizieren in einer alternden Bevölkerung vermehrt operative Eingriffe, bei denen Implantate eingesetzt werden. In Deutschland stieg allein die Zahl der implantierten Hüft- und Knie-Endoprothesen von 344 425 im Jahr 2005 auf 400 806 im Jahr 2011 (DRG-dokumentierte Fälle). Auch wenn die Zahl der postoperativen Komplikationen durch verbesserte Implantate und Operationsverfahren verringert werden konnte, stellen vor allem Infektion und Lockerung schwerwiegende Probleme dar. Ein innovativer Ansatz zur Prophylaxe dieser Komplikationen ist der Einsatz wirkstoffbeschichteter Implantate. Ziel dieser Arbeit ist es, ein neuartiges in-vitro-Knochenmodell zu entwickeln mit dem sich die Wirkstofffreisetzung der Implantate und die Wirkstoffverteilung im Knochen standardisiert, kosten- und zeiteffektiv simulieren lässt.

Um der hochvariablen Struktur des Knochens und der Vielfältigkeit der Implantate Rechnung zu tragen, wurde ein modulares Design entwickelt, mit dem sich simultan die Hartschubstanz, die lipophilen und hydrophilen Bestandteile und die Perfusion des Knochens modellhaft abbilden lassen. So wird der künstliche Knochen aus einzelnen biplanen Scheiben, den Scaffolds zusammengesetzt. Die Scaffolds bestehen aus gesintertem Hydroxylapatitpulver und weisen eine mikroporöse Struktur auf, die mit wässrigem Medium gesättigt wird. In die mikroporöse Struktur ist ein dreidimensionales Kanalsystem gefräst, das mit lipophilem Medium gefüllt wird. Zur Simulation des Blutflusses wird der künstliche Knochen über zusätzliche vertikale Kanäle mit Freisetzungsmitteln perfundiert. Da die gesinterte Hydroxylapatitstruktur impermeabel ist, kann der Wirkstoff im wässrigen Verteilungsraum nur durch die mit dem Medium gefüllten Poren diffundieren. Die Diffusion des Wirkstoffes hängt somit nicht nur von seinem Diffusionskoeffizienten im wässrigen Medium ab, sondern auch von dem Hohlraumvolumen und der Tortuosität des Porensystems (effektiver Diffusionskoeffizient). Somit kann der effektive Diffusionskoeffizient eines Wirkstoffes durch die Modifikation der mikroporösen Struktur variiert und an den Diffusionskoeffizienten im biologischen Knochen angeglichen werden. Die Diffusion des Wirkstoffes im lipophilen Verteilungsraum wird durch die Geometrie des

dreidimensionalen Kanalsystems und die physikochemischen Eigenschaften des eingebrachten Lipids beeinflusst. Das verwendete Lipid orientiert sich daher idealerweise an der Zusammensetzung des Fettmarks des biologischen Knochens. Die Elimination des Wirkstoffes aus dem künstlichen Knochen kann über die Flussrate des Freisetzungsmediums und die Gesamtoberfläche der Perfusionskanäle variiert werden. Um die zusammengesetzten Scaffolds während des Freisetzungversuches temperieren und mit Freisetzungsmedium perfundieren zu können, wurden sie in eine eigens entwickelte Durchflusszelle eingebracht. Auch die Durchflusszelle ist modular aufgebaut, sodass sie individuell an den künstlichen Knochen und die Geometrie des zu testenden Implantates angepasst werden kann. Sie ermöglicht die freie Variabilität von Temperatur und Perfusion.

Für die Herstellung der Scaffolds wurde ein fünfstufiger Prozess erarbeitet. Da Hydroxylapatit nur gering plastisch verformbar ist und sich nicht direkt zu mechanisch stabilen biplanen Grünlingen verpressen lässt, wurde zunächst Hydroxylapatitpulver mit Polyvinylalkohol als temporärem Bindemittel über Sprühtrocknung in ein Granulat überführt. Eine Bindemittelkonzentration von 2% Polyvinylalkohol erwies sich am geeignetsten, um ein Granulat mit guter Fließfähigkeit herzustellen, das sich im zweiten Prozessschritt zu Grünlingen (\varnothing 33,0 mm) mit hoher mechanischer Festigkeit verpressen ließ. Im dritten Schritt wurden die Grünlinge zu mikroporösen, biokeramischen Rohlingen gesintert, um das Gefüge dauerhaft zu festigen. Nachfolgend wurden die Scaffolds manuell plan geschliffen, um einen etwaigen, durch den Sinterprozess bedingten Verzug zu beheben. Zur Untersuchung des Einflusses der Grünlingherstellung und des Sinterprozesses auf die Porosität der Rohlinge wurde für die signifikanten Einflussgrößen Presskraft, Sintertemperatur und Heizrate ein zentral zusammengesetzter Versuchsplan erstellt. Auf Grundlage der zuvor gemessenen Effekte der Einflussgrößen konnte ein mathematisches Modell abgeleitet werden, mit dem sich die Prozessparameter für eine vom Anwender vorgegebene Soll-Porosität adäquat vorhersagen lassen. Im letzten Prozessschritt erfolgte die zerspanende Strukturierung der mikroporösen Scaffolds. Durch die Einbindung einer CNC-Fräse konnte die Struktur der Scaffolds hochvariabel

programmiert und präzise, reproduzierbar und teilautomatisiert gefertigt werden. Zur Aufnahme des zu testenden Implantates wurde mittig in die Scaffolds eine der Geometrie des Implantates entsprechende Kavität ausgefräst. Außerdem wurden die vertikalen Perfusionskanäle und das Kanalsystem zur Aufnahme des Lipids eingefräst. Die Geometrie des Kanalsystems wurde in Abhängigkeit des Soll-Verhältnisses von wässrigem zu lipophilem Verteilungsraum programmiert.

Zur Validierung des hier entwickelten in-vitro-Knochenmodells wurden beschichtete Modellimplantate hergestellt. Methylenblau wurde als hydrophiler Modellarzneistoff verwendet. Zur systematischen Untersuchung der Effekte der Einflussgrößen Porosität, Flussrate und Freisetzungsdauer wurde ein vollfaktorieller Versuchsplan mit 20 Einzelversuchen erstellt. Dazu wurde jeweils ein beschichtetes Implantat in einen aus 12 Scaffolds zusammengesetzten Knochen eingebracht und dieser in die Durchflusszelle eingesetzt. Bei einigen Freisetzungsversuchen zeigte sich ein Übertritt des Methylenblaus in einen Spaltraum zwischen den Scaffolds, der durch einen nicht vollflächigen Kontakt der Scaffolds untereinander bedingt war. Zur Behebung dieses sporadischen Fehlers bei zukünftigen Versuchen ist das manuelle Planschleifen durch ein präzises automatisiertes Verfahren (Läppen) zu ersetzen. Insgesamt zeigten die Freisetzungsversuche erwartungsgemäß eine zeitabhängige Verteilung des Methylenblaus im wässrigen Verteilungsraum und eine Elimination über die Perfusionskanäle. Grundlegend konnte nachgewiesen werden, dass die Porosität einen signifikanten Einfluss auf die Diffusion des Methylenblaus hatte.

Durch den modularen Aufbau des künstlichen Knochens und der Durchflusszelle kann das in-vitro-Knochenmodell durch den Anwender individuell an das zu testende Implantat und die Knochenstruktur am Applikationsort angepasst werden. Dem Anwender steht somit ein neuartiges Analyseverfahren zur Verfügung, mit dem er beschichtete Implantate standardisiert und kosteneffektiv prüfen kann.

8 Abstract

In an aging population bone and joint diseases indicate an increasing number of surgical interventions associated with implantation. From 2005 to 2011 only the number of hip and knee replacement surgeries increased from 344 425 to 400 806 in Germany (DRG-documented cases). Although, postoperative complications could be reduced by improved implants and surgical methods, especially infection and loosening are still fatal problems. The use of drug coated implants is an innovative approach, to overcome these complications prophylactically. The aim of this work is to develop a novel in-vitro bone model, with which the drug release of implants and the drug distribution within the bone can be standardised, cost- and time-effectively simulated.

With respect to the high structural variability of bone and the diversity of implants, a modular design was developed, which allows an exemplary depiction of the bone tissues, the hydrophilic and lipophilic components and the perfusion of bone simultaneously. Thus, this artificial bone is assembled of biplane discs, the so-called scaffolds. The scaffolds consist of sintered hydroxyapatite powder. They have a microporous structure, which will be saturated with an aqueous medium. A three-dimensional channel system is milled into the microporous structure, which will be filled with lipophilic medium. The artificial bone is perfused with dissolution medium over additional vertical channels, in order to simulate the perfusion of bone. Since the hydroxyapatite structure is impermeable, diffusion of the drug within the aqueous compartment takes place only through the medium-filled pores. Thus, the drug diffusion is based on the drug's diffusion coefficient in the media solely, as well as on the void fraction and the tortuosity of the porous system (effective diffusion coefficient). By modifying the microporous structure the effective diffusion coefficient of a drug can be adjusted to its diffusion coefficient within biological bone. The diffusion of the drug within the lipophilic compartment is affected by the structure of the channel system and the physicochemical properties of the used lipid. Thus, the used lipid should ideally match the composition of the fatty bone marrow. The elimination of the drug can be controlled by the dissolution medium flow rate and the

total surface area of the perfusion channels. A novel flow cell was specially designed and built, in order to enable perfusion and tempering of the artificial bone, whereas temperature and perfusion are variable. The flow cell has also a modular design, so that it can be individually adjusted to the biological bone and the implant geometry.

For the manufacturing of the scaffolds, a five-stage process was developed. Since hydroxyapatite is brittle, it cannot directly be compacted to mechanical stable greens. Thus, hydroxyapatite powder was initially granulated with polyvinyl alcohol as temporary binder via spray drying. A binder concentration of 2% polyvinyl alcohol was most suitable for a granulate with adequate flow properties, which in the second process stage could be compacted to greens (\varnothing 33,0 mm) with a high mechanical stability. In the third stage, greens were sintered to microporous, bioceramic blanks to solidate their structure. Afterwards, the scaffolds were manually sanded to remedy any sintering-induced warpage. Design of experiment was used to determine the influence of the green manufacturing process and the sinter process on the microporosity of the blanks. A central composite design was designed for the significant variables pressing force, sintering temperature and heating rate. Based on the measured effects a mathematical model could be derived, which allowed an adequate prediction of the required process parameter for a target-porosity, demanded by the user. The patterning of the microporous scaffolds was conducted in the last process stage. By implementing a CNC-router, the structure of the scaffolds could be highly variable programmed and precisely, reproducibly and partially automated manufactured. To be able to insert the implant into the artificial bone, a cavity was milled into the centre of the scaffolds considering the geometry of the implant. Furthermore, the vertical perfusion channels and the channel system for the lipid uptake were milled into the scaffolds. The geometry of the channel system was programmed with regard to the target-ratio of aqueous to lipophilic compartment.

In order to validate the developed in-vitro bone model model implants were coated with methylenblue as hydrophilic model drug. A full factorial design with 20 tests were performed in order to determine their effect of the variables porosity, perfusion

rate and dissolution time. For each test a coated model implant was inserted into an artificial bone, consisting of 12 scaffolds, which was subsequently transferred into the flow cell. In some tests methylenblue penetrated into a gap between scaffolds, which resulted from an incomplete contact of the involved scaffolds among themselves. For the rectification of this infrequent defect, the manual sanding has to be replaced by a precise automated process (lapping). Taken as whole, the dissolution tests showed a time-dependent distribution of methylenblue in the aqueous compartment and its elimination over the perfusion channels, as expected. It could be principally shown, that the variable porosity had a significant influence on the diffusion of methylenblue.

Due to the modular design of the artificial bone and the flow cell the user can individually adjust the in-vitro bone model to the implant to be tested and the bone structure at the application site. Hence, an innovative analysis method is available, which allows the user a standardised and cost-effective characterisation drug-coated implants.

9 Anhang

9.1 μ CT-Daten humaner Femora

Präparat	TV	BV	BV/TV	BS/BV	Tb.Pf	Tb.Th	SMI	Po(op)	Po(tot)
	mm ³	mm ³	%	1 · mm ⁻¹	1 · mm ⁻¹	mm	-	%	%
1917_HALS	806	135,8	16,8	19,0	2,77	0,18	0,92	83,1	83,2
1917_HALS_2	806	150,3	18,6	18,1	1,73	0,19	0,67	81,3	81,4
1917_KOPF	806	161,4	20,0	17,0	1,82	0,19	0,72	80,0	80,0
1917_KOPF_2	806	143,8	17,8	17,6	2,37	0,19	0,86	82,1	82,2
1919_HALS	802	211,1	26,3	12,4	-1,79	0,23	-0,33	73,5	73,7
1919_HALS_2	804	100,6	12,5	16,6	2,95	0,20	1,06	87,5	87,5
1919_KOPF	806	172,1	21,4	13,5	-0,27	0,22	0,15	78,6	78,6
1919_KOPF_2	806	245,5	30,5	13,0	-1,88	0,22	-0,27	69,4	69,5
1921_HALS	806	264,6	32,8	15,3	-2,32	0,20	-0,25	67,1	67,2
1921_HALS_2	806	248,8	30,9	15,0	-1,62	0,20	-0,02	69,1	69,1
1921_KOPF	806	303,5	37,7	14,8	-2,48	0,20	-0,25	62,3	62,3
1921_KOPF_2	806	268,5	33,3	14,6	-2,00	0,21	-0,17	66,6	66,7
1927_HALS	806	205,6	25,5	15,6	-0,17	0,20	0,34	74,4	74,5
1927_HALS_2	806	206,6	25,6	16,1	-0,39	0,20	0,28	74,3	74,4
1927_KOPF	806	241,6	30,0	16,0	-1,74	0,19	0,06	70,0	70,0
1927_KOPF_2	806	216,9	26,9	15,3	-1,16	0,20	0,02	73,0	73,1
1936_HALS	806	164,5	20,4	15,3	0,75	0,21	0,61	79,5	79,6
1936_HALS_2	806	161,3	20,0	15,4	1,36	0,21	0,67	80,0	80,0
1936_KOPF	806	172,3	21,4	16,7	2,14	0,20	0,88	78,6	78,6
1936_KOPF_2	806	153,6	19,1	18,1	3,08	0,19	1,07	80,9	80,9
1938_HALS	806	104,8	13,0	19,3	3,09	0,18	0,99	87,0	87,0
1938_HALS_2	806	84,1	10,4	21,3	4,29	0,16	1,18	89,6	89,6
1938_KOPF	806	122,1	15,1	17,5	2,92	0,19	1,01	84,8	84,9
1938_KOPF_2	806	142,2	17,6	17,2	1,73	0,19	0,76	82,3	82,4
1939_HALS	806	130,2	16,2	20,1	5,63	0,18	1,63	83,8	83,8
1939_HALS_2	806	103,2	12,8	22,8	5,08	0,15	1,28	87,2	87,2
1939_KOPF	806	142,1	17,6	18,4	3,06	0,18	0,99	82,4	82,4
1939_KOPF_2	806	130,0	16,1	20,8	4,09	0,17	1,16	83,9	83,9
1951_HALS	806	212,4	26,3	17,0	1,41	0,19	0,67	73,6	73,7
1951_HALS_2	806	252,7	31,4	16,0	0,15	0,19	0,31	68,6	68,6
1951_KOPF	806	149,0	18,5	19,1	3,71	0,18	1,22	81,5	81,5
1951_KOPF_2	806	143,2	17,8	19,8	3,14	0,17	1,09	82,2	82,2

9.2 Thermogravimetrische Untersuchungen

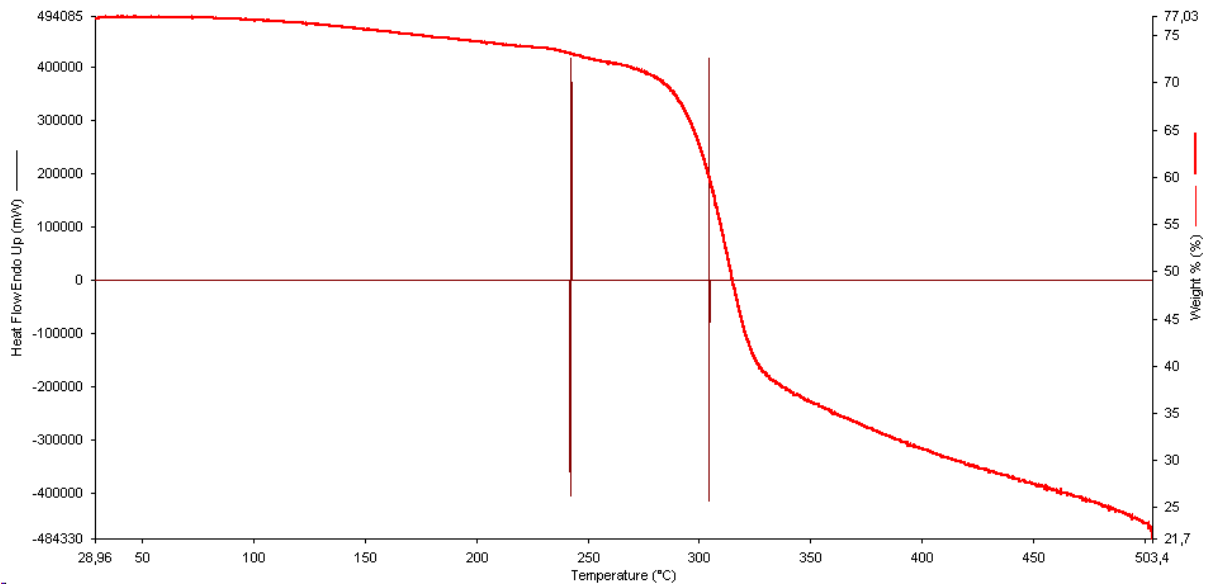


Abbildung 9-1: Thermogramm von MCC-Pellets

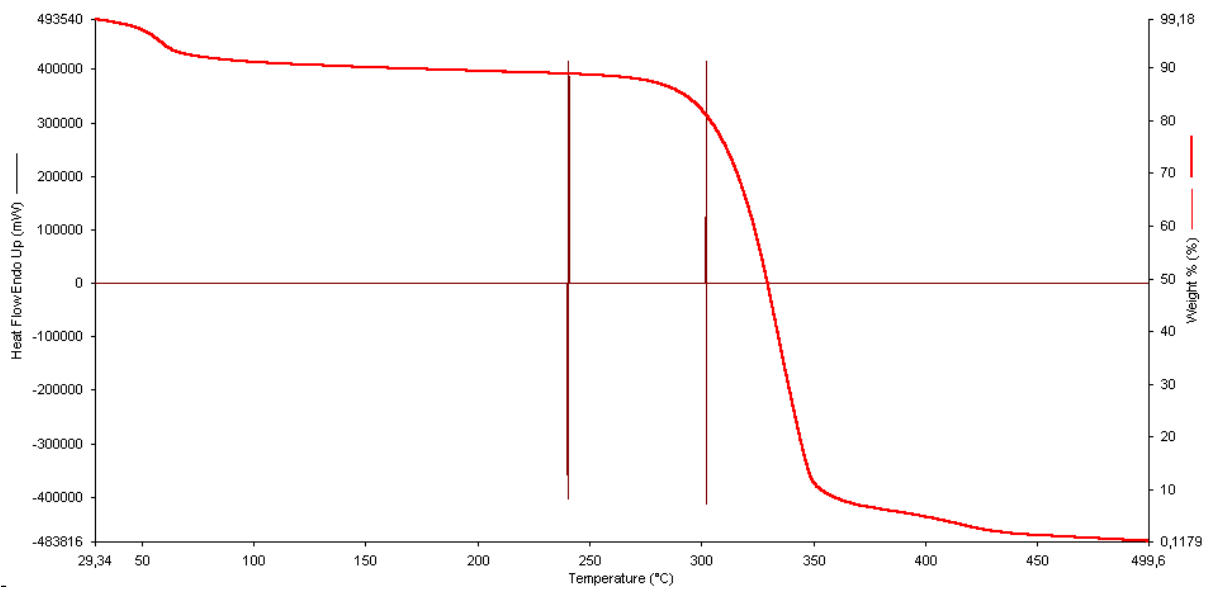


Abbildung 9-2: Thermogramm von Magnesiumstearat

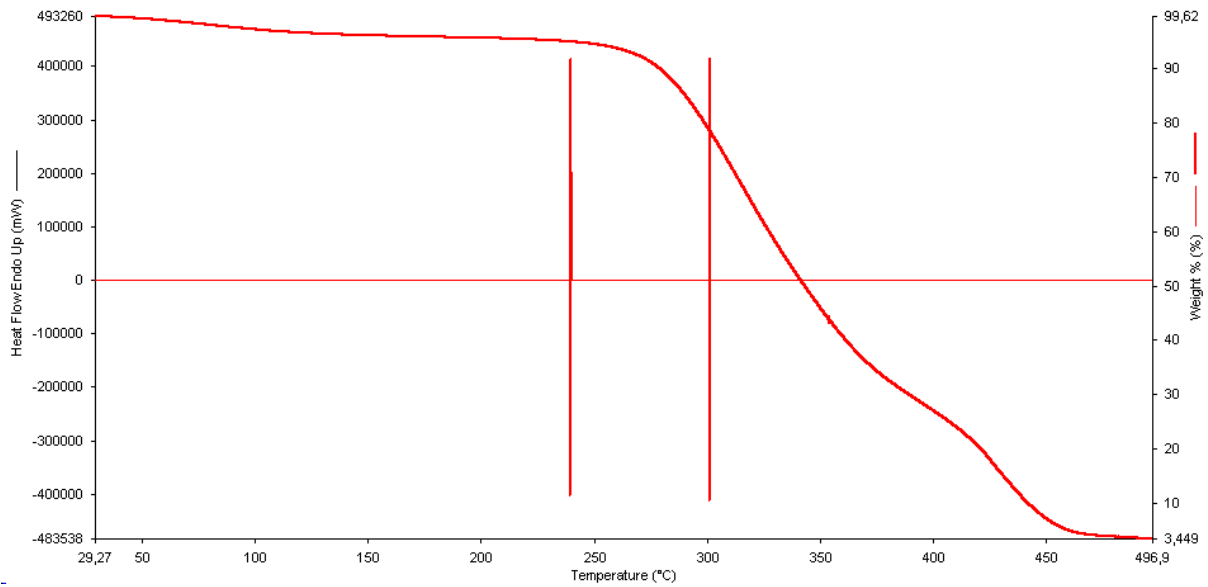


Abbildung 9-3: Thermogramm von Polyvinylalkohol

9.3 Partikelgrößenbestimmung von HA-Bulkwar

HA-Bulkware in Miglyol 812 dispergiert

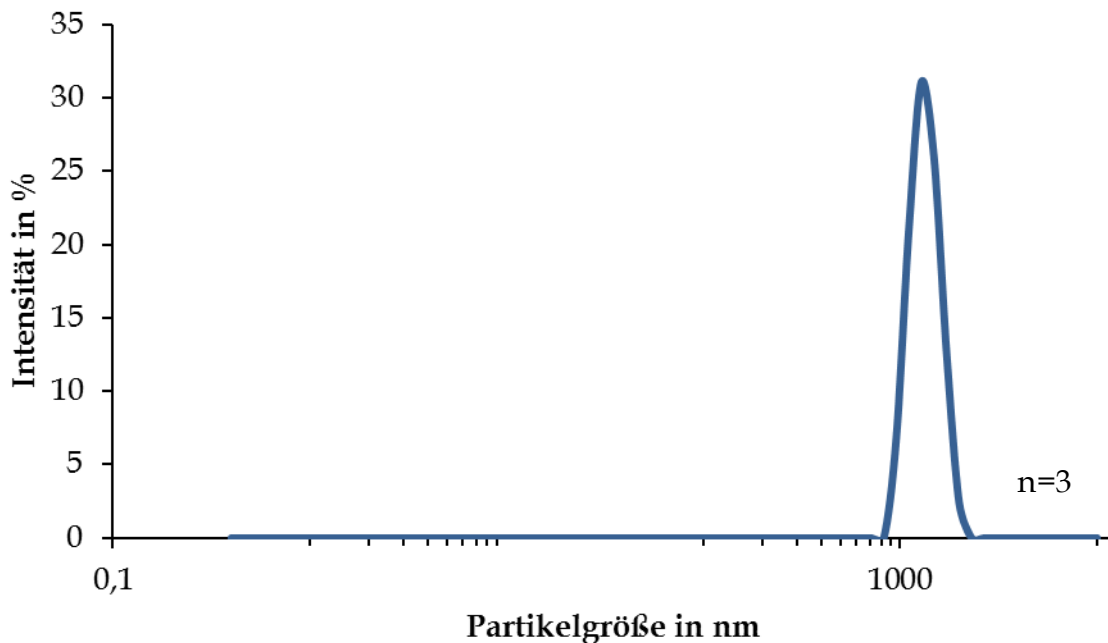


Abbildung 9-4: Partikelgrößenbestimmung von HA-Bulkware - Prinzip der dynamischen Lichtstreuung (Z-Average: 1688,6 nm)

9.4 Konstruktionszeichnungen der Bauteile des Prototypen XVIII

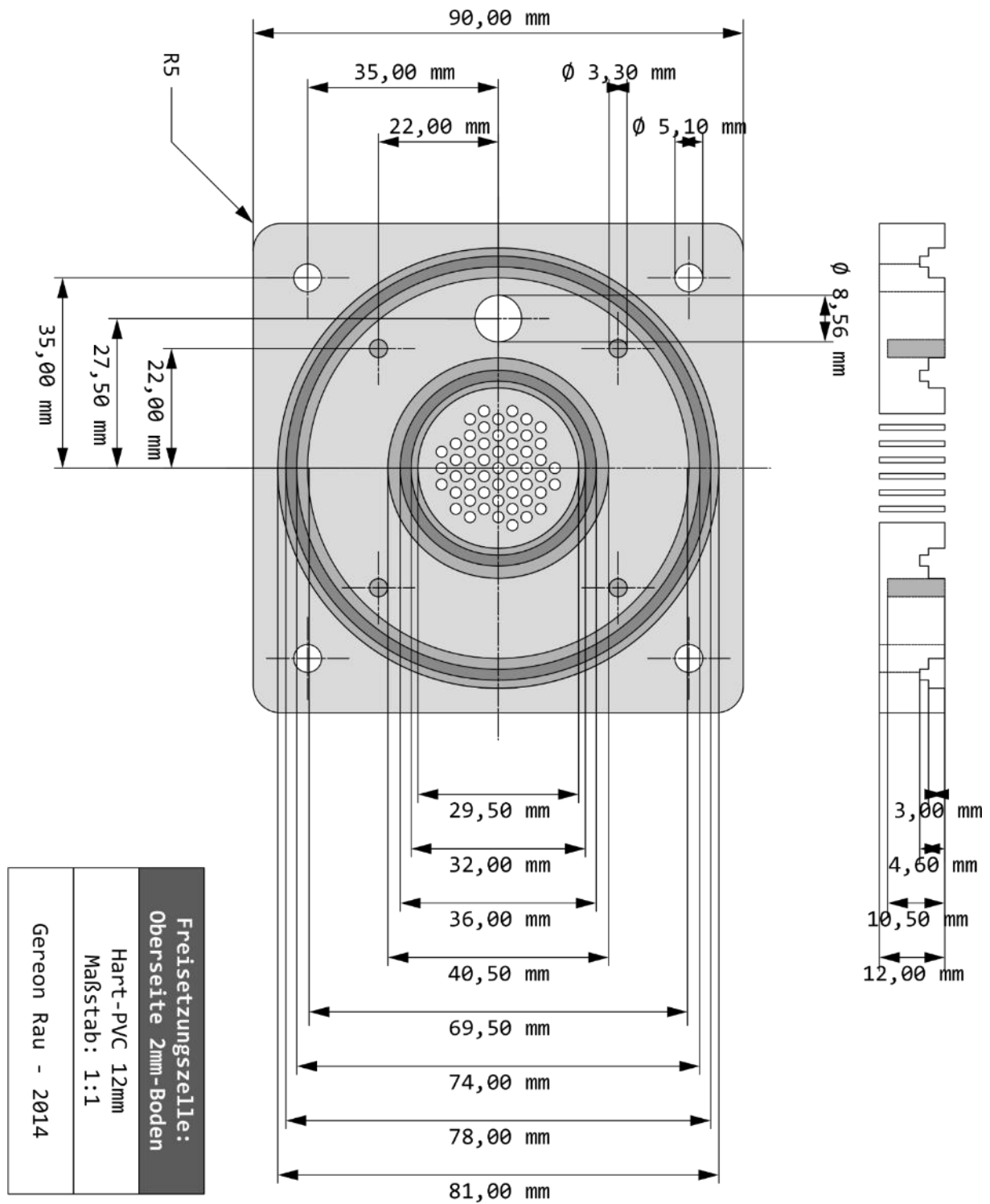


Abbildung 9-5: Konstruktionszeichnung - Boden (2 mm) - Oberseite

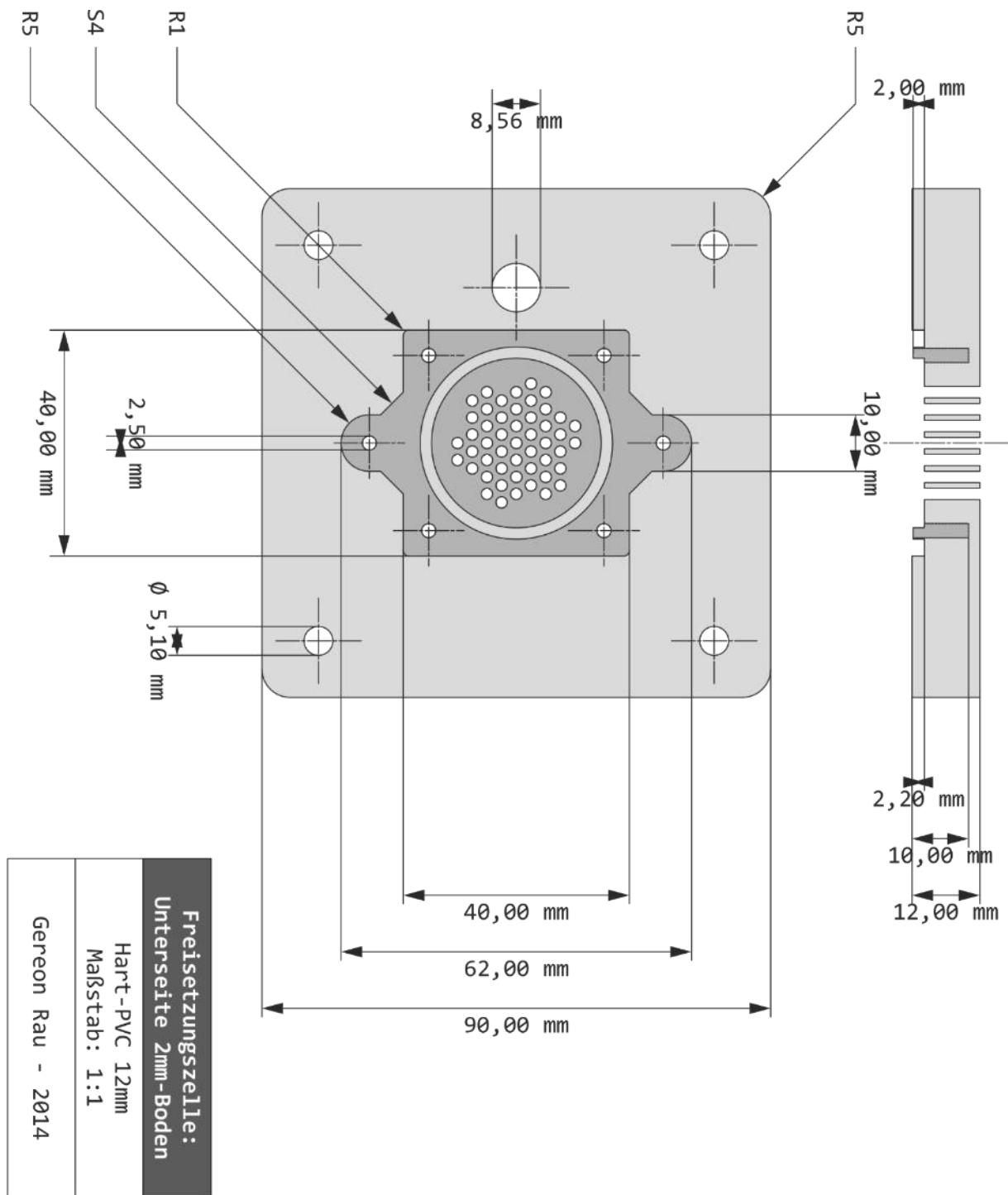


Abbildung 9-6: Konstruktionszeichnung - Boden (2 mm) - Unterseite

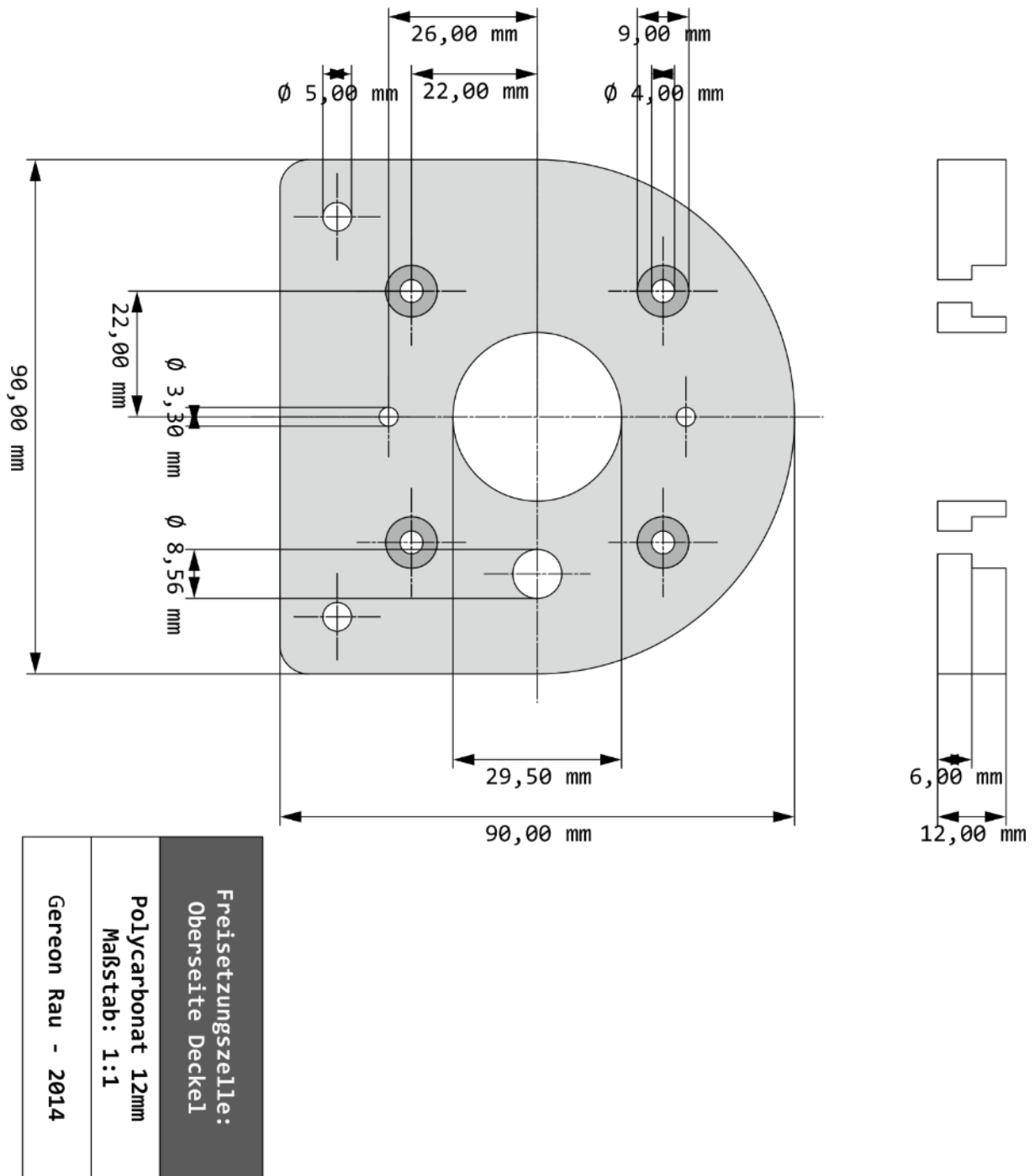


Abbildung 9-7: Konstruktionszeichnung - Deckel - Oberseite

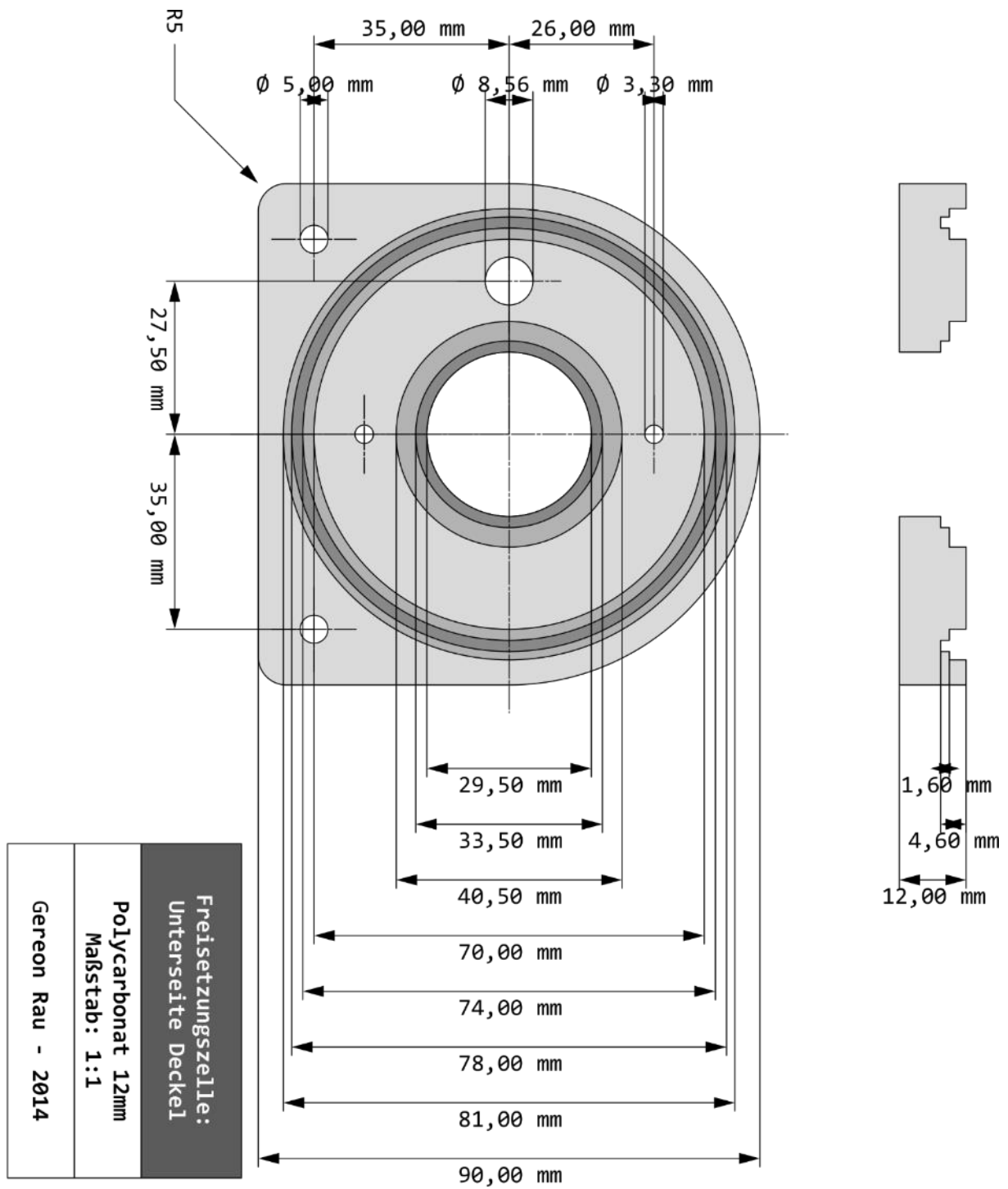
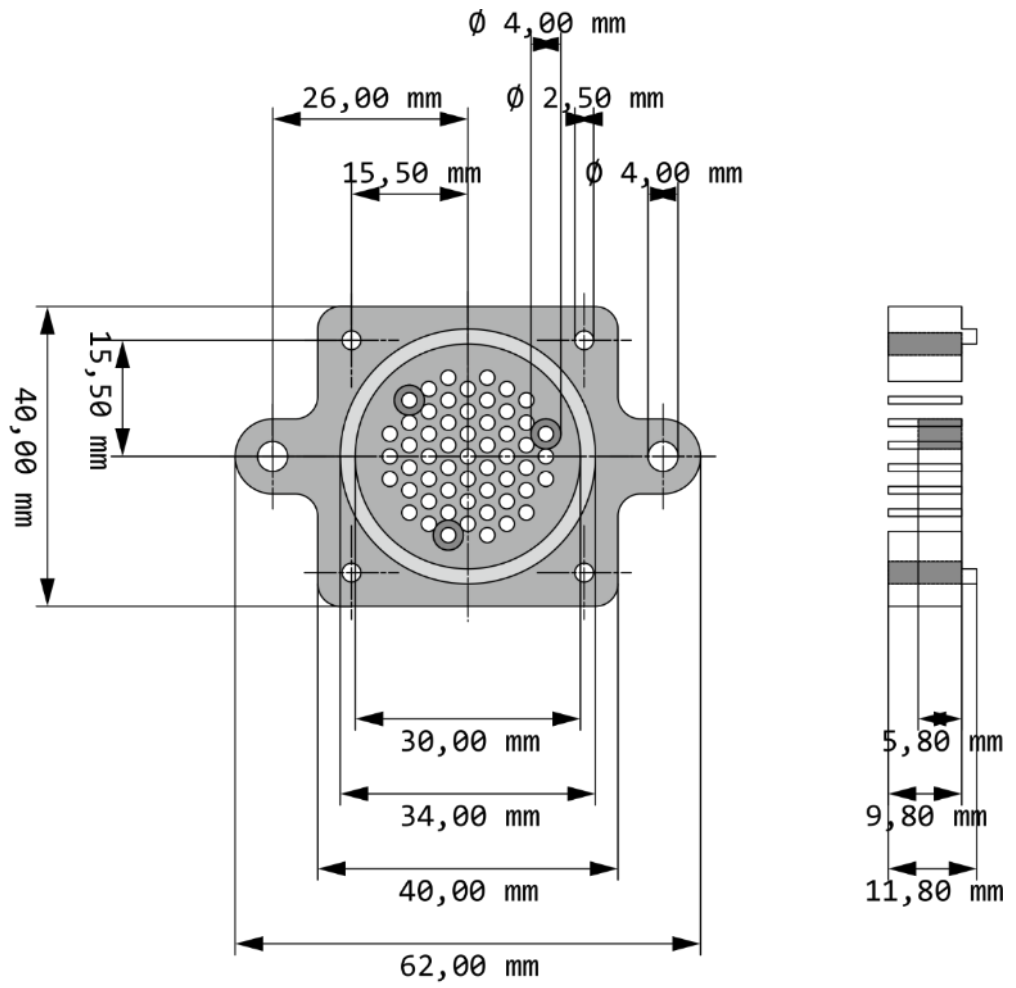
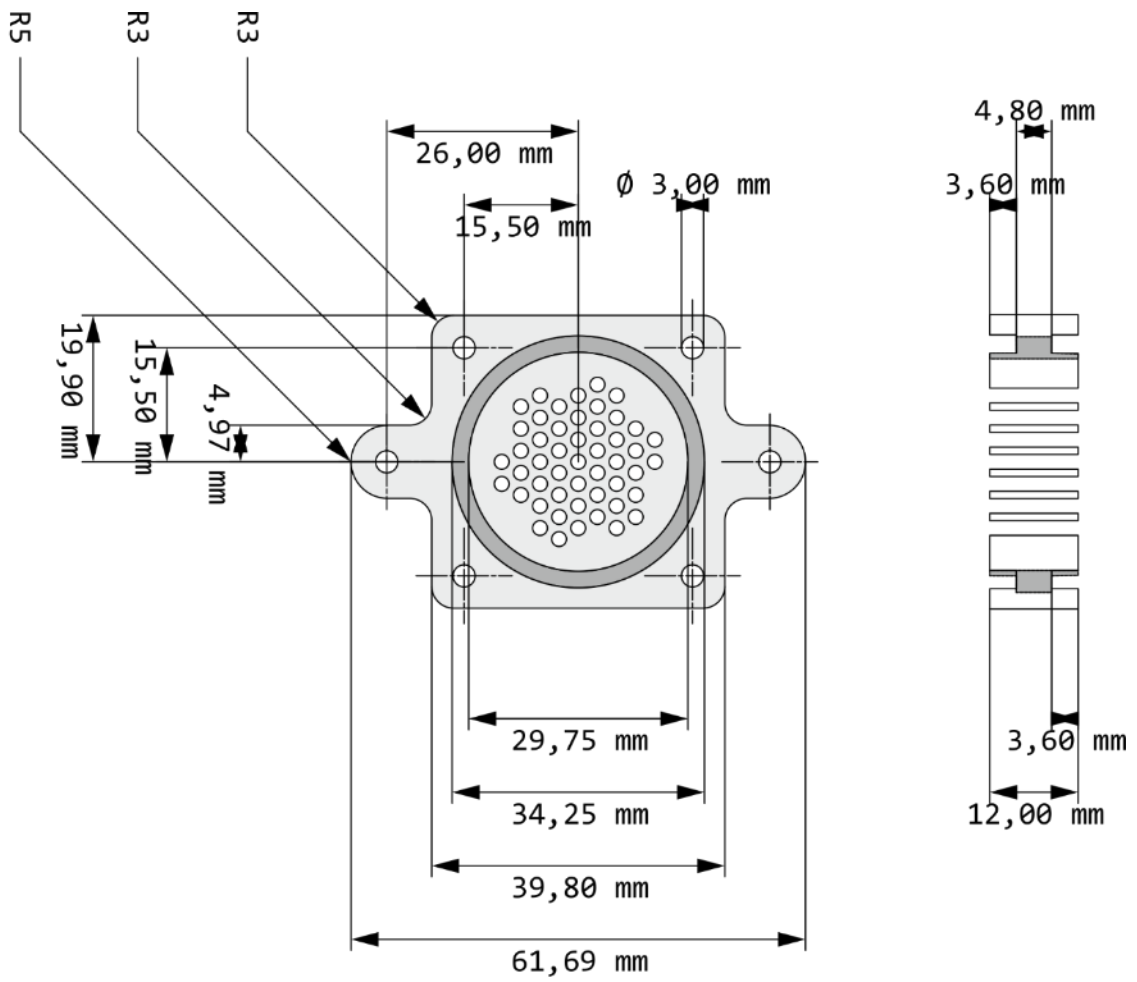


Abbildung 9-8: Konstruktionszeichnung - Deckel - Oberseite



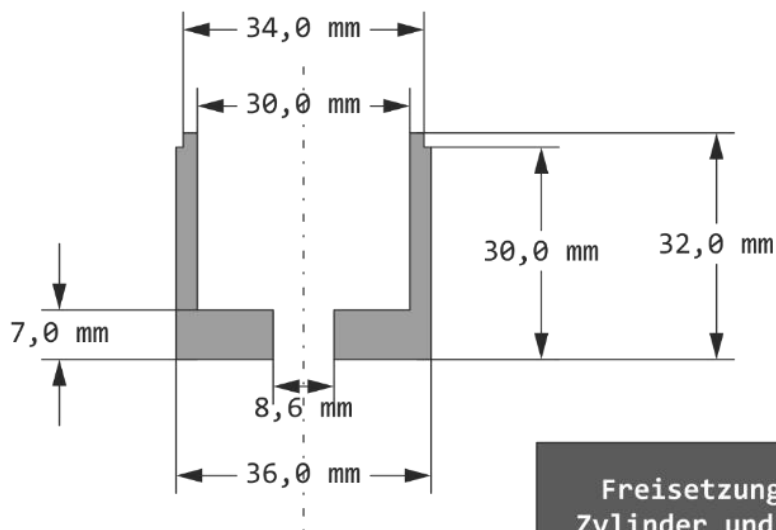
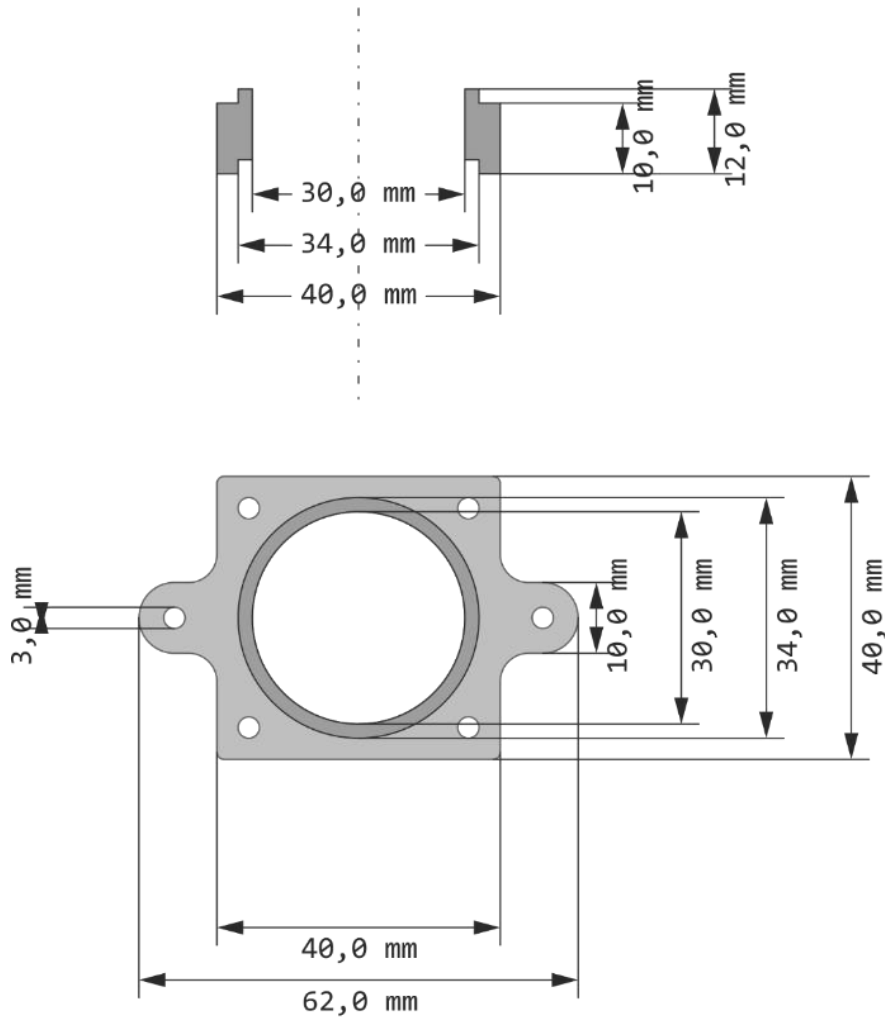
Freisetzungszelle: Oberseite 2mm-Kolben	Hart-PVC 12mm Maßstab: 1:1	Gereon Rau - 2014
--	-------------------------------	-------------------

Abbildung 9-9: Konstruktionszeichnung - Kolben (2 mm) - Oberseite



Freisetzungszelle:	
Unterseite 2mm	
Bodenverbindungsplatte	
Hart-PVC	12mm
Maßstab: 1:1	
Gereon Rau - 2014	

Abbildung 9-10: Konstruktionszeichnung - Verbindungsplatte (2 mm)



Freisetzungszelle: Zylinder und -adapter
Hart-PVC 12mm Maßstab: 1:1
Gereon Rau - 2014

Abbildung 9-11: Konstruktionszeichnung - Zylinderadapter & Zylinder (23 mm)

9.5 Abkürzungsverzeichnis in alphabetischer Reihenfolge

AM	Arzneimittel
AMG	Arzneimittelgesetz
API	Active pharmaceutical ingredient
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BSPT	British standard pipe thread Withworth-Gewinde
CAD	Computer aided design
CE	„CE-Kennzeichnung“ - s.a. Art. 17 und Anhang XII der Richtlinie 93/42/EWG
CT	Computertomographie
DCM	Dichlormethan
EC	Ehtylcellulose
EG	Europäische Gemeinschaft
EU	Europäische Union
EKM	Einkompartimentmodell
EWG	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft
EWR	Europäischer Wirtschaftsraum
FDA	Food and Drug Administration - US-amerikanische Lebensmittel- überwachungs- und Arzneimittelzulassungsbehörde
HA	Hydroxylapatit
IVIVK	In-vitro-in-vivo-Korrelation
KHG	Krankehausfinanzierungsgesetz
KOH	Kaliumhydroxid
LED	Light-emitting diode
MgSt	Magnesiumstearat
MB	Methylenblau
MCC	Mikrokristalline Cellulose
MP	Medizinprodukt
MPG	Medizinproduktegesetz
MPKPV	Verordnung über klinische Prüfungen von Medizinprodukten
MPSV	Medizinprodukte-Sicherheitsplanverordnung
MSC	Mesenchymal stem cells - mesenchymale Stammzellen
μCT	Mikro - Computertomograph
nCT	Nano - Computertomograph
Ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea - Europäisches Arzneibuch
PE	Polyethylen
PMMA	Polymethylmethacrylat
PU	Polyurethan
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
TEP	Totalendoprothese
TÜV	Technischer Überwachungsverein
USP	United States Pharmacopeia - US-amerikanisches Arzneibuch
VK	Variationskoeffizient
WP	Wirkstoffhaltiges Medizinprodukt
ZKM	Zweikompartimentmodell

10 References

- [1] Statistisches Bundesamt (Destatis). Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern - Fachserie 12 Reihe 6.4 - 2012; 2013.
- [2] Robert-Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Heft 54 Arthrose 2013.
- [3] N.N. BVMed-Jahresbericht 2013/2014; 2014.
- [4] WHO. The European Health Report 2012, FULL REPORT;2013.
- [5] Dominique P. Pioletti et. al. Orthopedic Implant Used as Drug Delivery System: Clinical Situation and State of the Research. *Current Drug Delivery*;2008:59–63.
- [6] Peter B, Pioletti DP, Laïb S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J et al. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. *Bone* 2005;36:52–60.
- [7] Bundesverband Medizintechnologie. Nutzen durch Innovation: Eine Studie zum Beitrag der medizintechnologischen Industrie zur Verbesserung der Gesundheitsverordnung in Deutschland; 2007.
- [8] Gesetz der wirtschaftliche Sicherung der Krankenhäuser und zur Regelung der Krankenhauspflegesätze: KHG.
- [9] Kirsten van der Linde et. al. Internationaler Überblick über Methoden und Studien zur Kosten- und Nutzenbewertung von Medizinprodukten: im Rahmen des Nationalen Strategieprozesses "Innovation in der Medizintechnik";2012.
- [10] Graffner C. Regulatory aspects of drug dissolution from a European perspective. *European journal of pharmaceutical sciences official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 2006;29:288–93.
- [11] U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry - Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms 1997.
- [12] Chevalier E, Viana M, Artaud A, Chomette L, Haddouchi S, Devidts G, Chulia D. Comparison of three dissolution apparatuses for testing calcium phosphate pellets used as ibuprofen delivery systems. *AAPS PharmSciTech* 2009;10:597–605.

- [13] C. Sree Lakshmi, A.V. Badarinath. An Updated Review of Dissolution Apparatus for Conventional and Novel Dosage forms. *International Journal of Pharma Research & Review* 2013;42–53.
- [14] Bauer KH, Frömming K, Führer C. *Lehrbuch der Pharmazeutische Technologie*. 8th ed. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; op. 2006.
- [15] U.S. Department of Health and Human Services - Food and Drug Administration (FDA). *Guidance for Industry - Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of In Vitro/ In Vivo Correlations*;1997.
- [16] Fang RC, Galiano RD. Adjunctive therapies in the treatment of osteomyelitis. *Seminars in plastic surgery* 2009;23:141–7.
- [17] Van Buskirk, Glenn A, Asotra S, Balducci C, Basu P, DiDonato G, Dorantes A, Eickhoff WM et al. Best practices for the development, scale-up, and post-approval change control of IR and MR dosage forms in the current quality-by-design paradigm. *AAPS PharmSciTech* 2014;15:665–93.
- [18] Levy G. Effect of certain tablet formulation factors on dissolution rate of the active ingredient I. Importance of using appropriate agitation intensities for In vitro dissolution rate measurements to reflect In vivo conditions. *J. Pharm. Sci.* 1963;52:1039–46.
- [19] Medina JR, Salazar DK, Hurtado M, Cortés AR, Domínguez-Ramírez AM. Comparative in vitro dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system. *Saudi pharmaceutical journal SPJ the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* 2014;22:141–7.
- [20] Martin Siewert, Jennifer Dressma, Cynthia Brown, Vinod Shah. *FIP/ AAPS Guidelines for Dissolution/ In Vitro Release Testing of Novel/ Special Dosage Forms*. Positionspapier - International Pharmaceutical Federation (FIP) & American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS);2-2003.
- [21] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). *ICH-Guideline Q2(R1): Validation of analytical procedures - text and methodology* 2005.

- [22] Wellnitz J, Gluschke M. Leitlinie zur Methodenvvalidierung. Textsammlung Umweltbundesamt;01-2005.
- [23] Rücker G, Neugebauer M, Willems GG. Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden ; mit 81 Tabellen. 4th ed. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2008.
- [24] Europäisches Arzneibuch 7. Ausgabe 2011 inkl. Nachtrag 7.8: Amtliche deutsche Ausgabe. 1st ed. Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag; 2013.
- [25] jri - Orthopaedics. Orthobiologics - Bone Substitute Portfolio; 2010.
- [26] Biomet. Septopal - Fallbeispiel - Calcaneus; 2010.
- [27] Zimmer Dental Inc. - Carlsbad, CA, USA. Tapered Screw-Vent® Implant System - Product Catalog; 2012.
- [28] Zimmer GmbH. Original M.E. Müller Geradschaft - Broschüre; 2006.
- [29] Synthes. Catalog-Trauma; 2011.
- [30] Van Lieshout, Esther M M, Van Kralingen, Gerdine H, El-Massoudi Y, Weinans H, Patka P. Microstructure and biomechanical characteristics of bone substitutes for trauma and orthopaedic surgery. BMC musculoskeletal disorders 2011;12:34.
- [31] Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. The Journal of bone and joint surgery. British volume 2007;89:574–9.
- [32] Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. Journal of orthopaedic surgery and research 2014;9:18.
- [33] Bose S, Vahabzadeh S, Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. Materials Today 2013;16:496–504.
- [34] Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. Trends in biotechnology 2012;30:546–54.
- [35] Mouriño V, Boccaccini AR. Bone tissue engineering therapeutics: controlled drug delivery in three-dimensional scaffolds. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society 2010;7:209–27.

- [36] Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta biomaterialia* 2012;8:1401-21.
- [37] Rasyid HN, van der Mei, Henny C, Frijlink HW, Soegijoko S, van Horn, Jim R, Busscher HJ, Neut D. Concepts for increasing gentamicin release from handmade bone cement beads. *Acta orthopaedica* 2009;80:508-13.
- [38] Moojen, Dirk Jan F, Hentenaar B, Charles Vogely H, Verbout AJ, Castelein RM, Dhert, Wouter J A. In vitro release of antibiotics from commercial PMMA beads and articulating hip spacers. *The Journal of arthroplasty* 2008;23:1152-6.
- [39] Fink B, Vogt S, Reinsch M, Büchner H. Sufficient release of antibiotic by a spacer 6 weeks after implantation in two-stage revision of infected hip prostheses. *Clinical orthopaedics and related research* 2011;469:3141-7.
- [40] Fleck EE, Spangehl MJ, Rapuri VR, Beauchamp CP. An articulating antibiotic spacer controls infection and improves pain and function in a degenerative septic hip. *Clinical orthopaedics and related research* 2011;469:3055-64.
- [41] Shi M, Kretlow JD, Nguyen A, Young S, Scott Baggett L, Wong ME, Kasper FK et al. Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control. *Biomaterials* 2010;31:4146-56.
- [42] Bertazzoni Minelli E, Benini A, Magnan B, Bartolozzi P. Release of gentamicin and vancomycin from temporary human hip spacers in two-stage revision of infected arthroplasty. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004;53:329-34.
- [43] Bistolfi A, Massazza G, Verné E, Massè A, Deledda D, Ferraris S, Miola M et al. Antibiotic-loaded cement in orthopedic surgery: a review. *ISRN orthopedics* 2011;2011:290851.
- [44] Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare, Paul E, Jamali AA. Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Seminars in plastic surgery* 2009;23:100-7.
- [45] Oshida Y, Tuna EB, Aktören O, Gençay K. Dental implant systems. *Int J Mol Sci* 2010;11:1580-678.
- [46] Clark PA, Moioli EK, Sumner DR, Mao JJ. Porous implants as drug delivery vehicles to augment host tissue integration. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008;22:1684-93.

- [47] Wolf J, Sternberg K, Behrend D, Schmitz K, Schwanewede H von. Pharmakafreisetzende biodegradierbare Polymerbeschichtung von dentalen Titanimplantaten zur Verbesserung der Weichgewebsintegration. Biomedizinische Technik. Biomedical engineering 2009;54:219–27.
- [48] Piao C, Wu D, Luo M, Ma H. Stress shielding effects of two prosthetic groups after total hip joint simulation replacement. Journal of orthopaedic surgery and research 2014;9:71.
- [49] Daugaard H, Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K. Bone growth enhancement in vivo on press-fit titanium alloy implants with acid etched microtexture. Journal of biomedical materials research. Part A 2008;87:434–40.
- [50] Wood GC, Naudie, Douglas D R, MacDonald SJ, McCalden RW, Bourne RB. Results of press-fit stems in revision knee arthroplasties. Clinical orthopaedics and related research 2009;467:810–7.
- [51] Zhang, Bill G X, Myers DE, Wallace GG, Brandt M, Choong, Peter F M. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. International journal of molecular sciences 2014;15:11878–921.
- [52] Vaishya R, Chauhan M, Vaish A. Bone cement. Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma 2013;4:157–63.
- [53] Hickok NJ, Shapiro IM. Immobilized antibiotics to prevent orthopaedic implant infections. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012;64:1165–76.
- [54] Toksvig-Larsen S, Aspenberg P. Bisphosphonate-coated external fixation pins appear similar to hydroxyapatite-coated pins in the tibial metaphysis and to uncoated pins in the shaft. Acta orthopaedica 2013;84:314–8.
- [55] Kirmani SJ, Bhuva S, Lo W, Kumar A. Extensor tendon injury to the index and middle finger secondary to Kirschner wire insertion for a distal radial fracture. Annals of the Royal College of Surgeons of England 2008;90:W14–6.
- [56] Cheng W, Li Y, Manyi W. Comparison study of two surgical options for distal tibia fracture-minimally invasive plate osteosynthesis vs. open reduction and internal fixation. International Orthopaedics 2011;35:737–42.
- [57] Singh RK, Pal US, Agrawal A, Singh G. Single miniplate osteosynthesis in angle fracture. National journal of maxillofacial surgery 2011;2:47–50.

- [58] Sen RK, Tripathy SK, Goyal T, Aggarwal S, Tahasildar N, Singh D, Singh AK. Osteosynthesis of femoral-neck nonunion with angle blade plate and autogenous fibular graft. *International Orthopaedics* 2012;36:827–32.
- [59] Rixen D, Steinhausen E, Sauerland S, Lefering R, Meier M, Maegele MG, Bouillon B et al. Protocol for a randomized controlled trial on risk adapted damage control orthopedic surgery of femur shaft fractures in multiple trauma patients. *Trials* 2009;10:72.
- [60] Geiger F, Schneider U, Lukoschek M, Ewerbeck V. External fixation in proximal tibial osteotomy: a comparison of three methods. *International Orthopaedics* 1999;23:160–3.
- [61] Sonderegger J, Grob KR, Kuster MS. Dynamic plate osteosynthesis for fracture stabilization: how to do it. *Orthopedic reviews* 2010;2:e4.
- [62] Källicke T, Schierholz J, Schlegel U, Frangen TM, Köller M, Printzen G, Seybold D et al. Effect on infection resistance of a local antiseptic and antibiotic coating on osteosynthesis implants: an in vitro and in vivo study. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society* 2006;24:1622–40.
- [63] Williams DL, Lerdahl JM, Haymond BS, Bloebaum RD. In vitro efficacy of a novel active-release antimicrobial coating to eradicate biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014;58:2400–4.
- [64] Mäkinen TJ, Veiranto M, Knuuti J, Jalava J, Törmälä P, Aro HT. Efficacy of bioabsorbable antibiotic containing bone screw in the prevention of biomaterial-related infection due to *Staphylococcus aureus*. *Bone* 2005;36:292–9.
- [65] Ulum MF, Arafat A, Noviana D, Yusop AH, Nasution AK, Abdul Kadir, M R, Hermawan H. In vitro and in vivo degradation evaluation of novel iron-bioceramic composites for bone implant applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 2014;36:336–44.
- [66] Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta biomaterialia* 2010;6:1680–92.
- [67] Drake RL, Vogl W, Mitchell, Adam W. M. *Gray's Anatomie für Studenten*. 1st ed. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer; 2007.

- [68] Christ B. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 17th ed. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008.
- [69] Moll K, Moll M. Anatomie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. 18th ed. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer; 2006.
- [70] Olszta MJ, Cheng X, Jee SS, Kumar R, Kim Y, Kaufman MJ, Douglas EP et al. Bone structure and formation: A new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2007;58:77–116.
- [71] Rey C, Combes C, Drouet C, Glimcher MJ. Bone mineral: update on chemical composition and structure. *Osteoporosis international a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2009;20:1013–21.
- [72] Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic systems for hydroxyapatite mineralization inspired by bone and enamel. *Chemical reviews* 2008;108:4754–83.
- [73] N. Fratzl-Zelman, B. M. Misof, P. Roschger. Das Knochenmaterial: Ein Nano-Komposit aus Mineral und Kollagen. *Journal für Mineralstoffwechsel* 2011.
- [74] Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy reports* 2013;2:447.
- [75] Piekarski K. Analysis of bone as a composite material. *International Journal of Engineering Science* 1973;11:557–65.
- [76] Mortillaro NA. *The Physiology and pharmacology of the microcirculation*. New York: Academic Press; 1983-1984.
- [77] Gray H, Goss CM. *Anatomy of the human body*. 29th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1973.
- [78] Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA. The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *Journal of Biomechanics* 1994;27:375–89.
- [79] Roux J, Wegrzyn J, Arlot ME, Guyen O, Delmas PD, Chapurlat R, Bouxsein ML. Contribution of trabecular and cortical components to biomechanical behavior of human vertebrae: an ex vivo study. *Journal of bone and mineral research the*

official journal of the American Society for Bone and Mineral Research
2010;25:356–61.

- [80] Skedros JG, Baucom SL. Mathematical analysis of trabecular 'trajectories' in apparent trajectorial structures: the unfortunate historical emphasis on the human proximal femur. *Journal of Theoretical Biology* 2007;244:15–45.
- [81] Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annual review of pathology* 2011;6:121–45.
- [82] Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology progress* 2009;25:1539–60.
- [83] Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *Journal of dental research* 2010;89:1333–48.
- [84] Pondel M. Calcitonin and calcitonin receptors: bone and beyond. *International Journal of Experimental Pathology* 2000;81:405–22.
- [85] George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnology and bioengineering* 2006;95:404–11.
- [86] Ash P, Loutit JF, Townsend, K. M. S. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature* 1980;283:669–70.
- [87] Clarke BL, Khosla S. Physiology of bone loss. *Radiologic clinics of North America* 2010;48:483–95.
- [88] Khosla S, Amin S, Orwoll E. Osteoporosis in men. *Endocrine reviews* 2008;29:441–64.
- [89] Parfitt AM. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: Cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int* 1984;36:S123.
- [90] Stauber M, Müller R. Age-related changes in trabecular bone microstructures: global and local morphometry. *Osteoporosis international a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2006;17:616–26.

- [91] Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo K. Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *International journal of endocrinology* 2013;2013:213234.
- [92] Appelman-Dijkstra NM, Papapoulos SE. Novel approaches to the treatment of osteoporosis. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* 2014;28:843–57.
- [93] Genant HK, Engelke K, Prevrhal S. Advanced CT bone imaging in osteoporosis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2008;47 Suppl 4:iv9-16.
- [94] Link TM. Osteoporosis imaging: state of the art and advanced imaging. *Radiology* 2012;263:3–17.
- [95] Zhao E, Xu H, Wang L, Kryczek I, Wu K, Hu Y, Wang G et al. Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & molecular immunology* 2012;9:11–9.
- [96] Gurkan UA, Akkus O. The mechanical environment of bone marrow: a review. *Annals of biomedical engineering* 2008;36:1978–91.
- [97] Sison, Edward Allan R, Brown P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert review of hematology* 2011;4:271–83.
- [98] Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *Journal of cellular physiology* 2010;225:631–7.
- [99] Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999;284:143–7.
- [100] Kopp H, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda, Md.)* 2005;20:349–56.
- [101] Fazeli PK, Horowitz MC, MacDougald OA, Scheller EL, Rodeheffer MS, Rosen CJ, Klibanski A. Marrow fat and bone--new perspectives. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013;98:935–45.
- [102] Gurevitch O, Slavin S, Feldman AG. Conversion of red bone marrow into yellow - Cause and mechanisms. *Medical hypotheses* 2007;69:531–6.

- [103] Rosen CJ, Ackert-Bicknell C, Rodriguez JP, Pino AM. Marrow Fat and the Bone Microenvironment: Developmental, Functional, and Pathological Implications. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 2009;19:109–24.
- [104] Lecka-Czernik B. Marrow fat metabolism is linked to the systemic energy metabolism. *Bone* 2012;50:534–9.
- [105] Yeung, David K W, Griffith JF, Antonio GE, Lee, Francis K H, Woo J, Leung PC. Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. *Journal of magnetic resonance imaging JMRI* 2005;22:279–85.
- [106] Duque G. As a matter of fat: New perspectives on the understanding of age-related bone loss. *IBMS BoneKEy* 2007;4:129–40.
- [107] Patsch JM, Li X, Baum T, Yap SP, Karampinos DC, Schwartz AV, Link TM. Bone marrow fat composition as a novel imaging biomarker in postmenopausal women with prevalent fragility fractures. *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2013;28:1721–8.
- [108] Laroche M. Intraosseous circulation from physiology to disease. *Joint Bone Spine* 2002;69:262–9.
- [109] Anetzberger H, Thein E, Walli AK, Messmer K. Determination of Regional Bone Blood Flow by Means of Fluorescent Microspheres Using an Automated Sample-Processing Procedure. *Eur Surg Res* 2003;35:337–45.
- [110] Pape H, Giannoudis P. The biological and physiological effects of intramedullary reaming. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 2007;89:1421–6.
- [111] Hawk HE. Thesis - The relationship between the blood flow and the marrow cavity pressure of bone; 1971.
- [112] Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals* 2002;17:405–26.
- [113] Altner H, Händel J, Piechocki R. Makroskopische Präparationstechnik: Leitfaden für das Sammeln, Präparieren und Konservieren. 5th ed. Stuttgart: Schweizerbart; 1998.

- [114] Niederklopper P, Troxler M. Knochenpräparation: Handbuch für Praktiker. 1st ed. Rothenbrunnen: Romei; 2001.
- [115] Hefti E, Trechsel U, Rüfenacht H, Fleisch H. Use of dermestid beetles for cleaning bones. *Calcif Tissue Int* 1980;31:45–7.
- [116] Al-Sokanee ZN, Toabi, Abedl Amer H, Al-Assadi MJ, Alassadi, Erfan A S. The drug release study of ceftriaxone from porous hydroxyapatite scaffolds. *AAPS PharmSciTech* 2009;10:772–9.
- [117] Bossa N, Chaurand P, Vicente J, Borschneck D, Levard C, Aguerre-Chariol O, Rose J. Micro- and nano-X-ray computed-tomography: A step forward in the characterization of the pore network of a leached cement paste. *Cement and Concrete Research* 2015;67:138–47.
- [118] Sleutel S, Cnudde V, Masschaele B, Vlassenbroek J, Dierick M, van Hoorebeke L, Jacobs P et al. Comparison of different nano- and micro-focus X-ray computed tomography set-ups for the visualization of the soil microstructure and soil organic matter. *Computers & Geosciences* 2008;34:931–8.
- [119] Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1987;2:595–610.
- [120] Hahn M, Vogel M, Pompesius-Kempa M, Delling G. Trabecular bone pattern factor – a new parameter for simple quantification of bone microarchitecture. *Bone* 1992;13:327–30.
- [121] HILDEBRAND TO, RÜEGSEGG P. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* 1997;1:15–23.
- [122] Agnusdei D, Civitelli R, Camporeale A, Parisi G, Gennari L, Nardi P, Gennari C. Age-Related Decline of Bone Mass and Intestinal Calcium Absorption in Normal Males. *Calcif Tissue Int* 1998;63:197–201.

- [123] Maclaughlin EJ, Sleeper RB, McNatty D, Raehl CL. Management of age-related osteoporosis and prevention of associated fractures. *Ther Clin Risk Manag* 2006;2:281-95.
- [124] Stachowiak H. *Allgemeine Modelltheorie*. Wien, New York: Springer-Verlag; ©1973.
- [125] Martin AN, Leuenberger H, Eichhorst O, Lanz M. *Martin Physikalische Pharmazie: Pharmazeutisch angewandte physikalisch-chemische Grundlagen*. 4th ed. Stuttgart: WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2002.
- [126] Voigt R, Fahr A. *Pharmazeutische Technologie für Studium und Beruf: Mit 110 Tabellen*. 11th ed. Stuttgart: Dt. Apotheker-Verl; 2010.
- [127] Kaushik AP, Das A, Cui Q. Osteonecrosis of the femoral head: An update in year 2012. *World journal of orthopedics* 2012;3:49-57.
- [128] Field JR, Sumner-Smith G. Bone blood flow response to surgical trauma. *Injury* 2002;33:447-51.
- [129] Desborough JP. The stress response to trauma and surgery. *British Journal of Anaesthesia* 2000;85:109-17.
- [130] Regis D, Sandri A, Samaila E, Benini A, Bondi M, Magnan B. Release of gentamicin and vancomycin from preformed spacers in infected total hip arthroplasties: measurement of concentrations and inhibitory activity in patients' drainage fluids and serum. *TheScientificWorldJournal* 2013;2013:752184.
- [131] Anagnostakos K, Wilmes P, Schmitt E, Kelm J. Elution of gentamicin and vancomycin from polymethylmethacrylate beads and hip spacers in vivo. *Acta orthopaedica* 2009;80:193-7.
- [132] Webb JC, Gbejuade H, Lovering A, Spencer R. Characterisation of in vivo release of gentamicin from polymethyl methacrylate cement using a novel method. *International Orthopaedics* 2013;37:2031-6.
- [133] Roberts JA, Lipman J. Pharmacokinetic issues for antibiotics in the critically ill patient. *Critical care medicine* 2009;37:840-51; quiz 859.
- [134] Russell, R Graham G. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone* 2011;49:2-19.
- [135] Koç A, Finkenzeller G, Elçin AE, Stark GB, Elçin YM. Evaluation of adenoviral vascular endothelial growth factor-activated chitosan/hydroxyapatite scaffold for

- engineering vascularized bone tissue using human osteoblasts: In vitro and in vivo studies. *Journal of biomaterials applications* 2014;29:748–60.
- [136] Ning L, Malmström H, Ren Y. Porous Collagen-Hydroxyapatite Scaffolds With Mesenchymal Stem Cells for Bone Regeneration. *The Journal of oral implantology* 2015;41:45–9.
- [137] Cussler EL. *Diffusion: Mass transfer in fluid systems*. 3rd ed. Cambridge, New York: Cambridge University Press; 2009.
- [138] Kollenberg W (ed.). *Technische Keramik: Grundlagen, Werkstoffe, Verfahrenstechnik*. 2nd ed. Essen: Vulkan-Verl; 2009.
- [139] Salmang H, Scholze H, Telle R. *Keramik*. 7th ed. Berlin, New York: Springer; 2007.
- [140] Cox SC, Thornby JA, Gibbons GJ, Williams MA, Mallick KK. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 2015;47:237–47.
- [141] Shuai C, Feng P, Cao C, Peng S. Processing and characterization of laser sintered hydroxyapatite scaffold for tissue engineering. *Biotechnol Bioproc E* 2013;18:520–7.
- [142] Heinrich J. *Einführung in die Grundlagen der keramischen Formgebung*; 2010.
- [143] Jang D, Franco RA, Sarkar SK, Lee B. Fabrication of porous hydroxyapatite scaffolds as artificial bone preform and its biocompatibility evaluation. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs 1992)* 2014;60:216–23.
- [144] Zhi W, Zhang C, Duan K, Li X, Qu S, Wang J, Zhu Z et al. A novel porous bioceramics scaffold by accumulating hydroxyapatite spherulites for large bone tissue engineering in vivo. II. Construct large volume of bone grafts. *Journal of biomedical materials research. Part A* 2014;102:2491–501.
- [145] Gebhardt A. *Generative Fertigungsverfahren: Rapid prototyping - rapid tooling - rapid manufacturing*. 3rd ed. München: Hanser; 2007.
- [146] Fritz, Schultze. *Fertigungstechnik*. 10th ed. Berlin: Springer Berlin; 2012.
- [147] Yao X, Tan S, Jiang D. Fabrication of hydroxyapatite ceramics with controlled pore characteristics by slip casting. *J Mater Sci Mater Med* 2005;16:161–5.

- [148] Noro T, Itoh K. Biomechanical behavior of hydroxyapatite as bone substitute material in a loaded implant model. On the surface strain measurement and the maximum compression strength determination of material crash. *Biomed Mater Eng* 1999;9:319-24.
- [149] Chen Y, Gan C, Zhang T, Yu G, Bai P, Kaplan A. Laser-surface-alloyed carbon nanotubes reinforced hydroxyapatite composite coatings. *Appl. Phys. Lett.* 2005;86:251905.
- [150] Strunz H, Nickel EH. *Strunz mineralogical tables: Chemical-structural mineral classification system*. 9th ed. Stuttgart: Schweizerbart; 2001.
- [151] Smolinski R. *Thermoanalytische und Infrarotspektroskopische Untersuchungen am System Polyvinylalkohol / Borsäure*. Dissertation; 2003.
- [152] Zschimmer und Schwarz GmbH & Co KG - Chemische Fabriken, Lahnstein, Deutschland. *Fachinformation - Polyvinylalkoholzubereitungen*.
- [153] Storz EI. *Untersuchung funktioneller Parameter pharmazeutischer Hilfsstoffe mittels Nahinfrarot-Spektroskopie (NIRS)*. Dissertation; 2003.
- [154] Krüger C. *Mikrokristalline Cellulose II - Eignung als Pelletierhilfsstoff bei der Feuchtextusion/Sphäronisation zur Herstellung zerfallender Pellets*. Dissertation; 2011.
- [155] Li J, Wu Y. *Lubricants in Pharmaceutical Solid Dosage Forms*. *Lubricants* 2014;2:21-43.
- [156] Tran RT, Naseri E, Kolasnikov A, Bai X, Yang J. A new generation of sodium chloride porogen for tissue engineering. *Biotechnology and applied biochemistry* 2011;58:335-44.
- [157] Ritschel WA, Bauer-Brandl A. *Die Tablette: Handbuch der Entwicklung, Herstellung und Qualitätssicherung*. 2nd ed. Aulendorf: ECV - Editio Cantor Verlag; 2002.
- [158] Cordts E. *Advanced powder characterization techniques for inhalation powder mixtures*. Dissertation. Kiel; 2014.
- [159] Wittmann R. *Amorphe Laktose - Untersuchungen zur Quantifizierung und zum Einfluss auf die Stabilität von Pulvermischungen zur Inhalation*. Kiel; 2014.

- [160] Kleppmann W. Taschenbuch Versuchsplanung: Produkte und Prozesse optimieren. 6th ed. München [u.a.]: Hanser; 2009.
- [161] Kadla J (ed.). Cellulose - Biomass Conversion: InTech; 2013.
- [162] Conway JH, Sloane, N. J. A. Sphere Packings, Lattices and Groups. New York, NY: Springer New York; 1988.
- [163] Liao C, Lin F, Chen K, Sun J. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials* 1999;20:1807–13.
- [164] Mirhadi B, Mehdikhani B, Askari N. Synthesis of nano-sized β -tricalcium phosphate via wet precipitation. *PAC* 2011;5:193–8.
- [165] German RM. Sintering theory and practice. New York: Wiley; 1996.
- [166] Tramosljika D. Sinterverhalten einer bei niedrigen Temperaturen sinternden Keramik und der Einfluss von Silber auf deren Sinterverhalten. Dissertation. Stuttgart; 2007.
- [167] Zäh M, Hagemann F. Wirtschaftliche Fertigung mit Rapid-Technologien: Anwender-Leitfaden zur Auswahl geeigneter Verfahren. München: Hanser; 2006.
- [168] Berger U, Hartmann A, Schmid D. Additive Fertigungsverfahren: Rapid Prototyping, Rapid Tooling, Rapid Manufacturing. 1st ed. Haan-Gruiten: Verl. Europa-Lehrmittel; 2013.
- [169] Adolf Richter - Stahl-Metalle-Kunststoffe - GmbH. Kunststoffe-Datenblattsammlung.
- [170] Röchling Sustaplat KG. Technisches Datenblatt - Trovidur PVC-U.
- [171] Lee EJ, Niklason LE. A novel flow bioreactor for in vitro microvascularization. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16:1191–200.
- [172] Sohr H. The Navier-Stokes equations: An elementary functional analytic approach.
- [173] Atkins PW, Bär M, Paula J de. *Physikalische Chemie*. 4th ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
- [174] Greulich W, Kilian U, Weber C. *Lexikon der Physik: In sechs Bänden*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 1998-2000.

- [175] Annunziata O, Buzatu D, Albright JG. Protein diffusion coefficients determined by macroscopic-gradient Rayleigh interferometry and dynamic light scattering. *Langmuir* 2005;21:12085–9.
- [176] Singh NB, Glicksman ME, Coriell SR, Duval W, Santoro GJ, DeWitt R. Measurement of diffusion coefficient using a diaphragm cell: $\text{PbBr}_2 \cdot \text{AgBr}$ system. *Journal of Crystal Growth* 1996;167:107–10.
- [177] Leait DG. Determination of ternary diffusion coefficients by the Taylor dispersion method. *J. Phys. Chem.* 1990;94:5180–3.
- [178] Cremieux AC, Mghir AS, Bleton R, Manteau M, Belmatoug N, Massias L, Garry L et al. Efficacy of sparfloxacin and autoradiographic diffusion pattern of ^{14}C sparfloxacin in experimental *Staphylococcus aureus* joint prosthesis infection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2111–6.
- [179] Greenberg JH, LoBrutto C, Lombard KM, Chen J. Postmortem diffusion of autoradiographic blood flow tracers. *Brain Res* 1999;842:184–91.
- [180] Li W, You L, Schaffler MB, Wang L. The dependency of solute diffusion on molecular weight and shape in intact bone. *Bone* 2009;45:1017–23.
- [181] Wang L, Wang Y, Han Y, Henderson SC, Majeska RJ, Weinbaum S, Schaffler MB. In situ measurement of solute transport in the bone lacunar-canalicular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:11911–6.
- [182] Ruthardt N, Lamb DC, Bräuchle C. Single-particle tracking as a quantitative microscopy-based approach to unravel cell entry mechanisms of viruses and pharmaceutical nanoparticles. *Molecular therapy the journal of the American Society of Gene Therapy* 2011;19:1199–211.
- [183] Jonnalagadda SB, Gollapalli NR. **Speciation and stability of methylene blue-metal-thiocyanate ion-association complexes.** *Bull. Chem. Soc. Eth.* 2008;22.
- [184] Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006;23:2709–28.
- [185] Bauer KH, Frömring K, Führer C. *Pharmazeutische Technologie: 92 Tabellen.* 9th ed. Stuttgart [u.a.]: Fischer [u.a.]; 2012.

- [186] The Dow Chemical Company. Ethocel - Ethylcellulose Polymers Technical Handbook; 2005.
- [187] Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung. GESTIS-Stoffdatenbank - Stand 27.4.2015.
- [188] Caesar & Loretz GmbH, Deutschland. Sicherheitsdatenblatt - Vaselinum album; 2015.
- [189] Pereira GG, Dimer FA, Guterres SS, Kechinski CP, Granada JE, Cardozo, Nilo Sérgio Medeiros. Formulation and characterization of poloxamer 407®: thermoreversible gel containing polymeric microparticles and hyaluronic acid. *Quím. Nova* 2013;36:1121-5.
- [190] McElfresh EC, Kelly PJ. Simultaneous determination of blood flow in cortical bone, marrow, and muscle in canine hind leg by femoral artery catheterization. *Calcif Tissue Res* 1974;14:301-7.
- [191] KANE WJ, GRIM E. Blood Flow to Canine Hind-Limb Bone, Muscle, and Skin. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 1969;51:309-22.
- [192] Jones LC, Niv AI, Davis RF, Hungerford DS. Bone blood flow in the femora of anesthetized and conscious dogs in a chronic preparation, using the radioactive tracer microsphere method. *Clin Orthop Relat Res* 1982:286-95.
- [193] Stracke S. Laser-Doppler-Flowmetrie bei Osteoporose: Eine Untersuchung der Durchblutung des distalen Radius im Übergangsbereich von Periost zu Knochen mit Hilfe der Laser-Doppler-Flowmetrie zur Erfassung funktioneller Parameter der Mikrozirkulation. 1st ed. Giessen: VVB Laufersweiler; 2007.
- [194] Swiontkowski MF. Laser Doppler Flowmetry – Development and Clinical Application. *The Iowa Orthopaedic Journal* 1991;11:119-26.
- [195] Pekcevik Y, Kahya MO, Kaya A. Diffusion-weighted Magnetic Resonance Imaging in the Diagnosis of Bone Tumors: Preliminary Results. *Journal of clinical imaging science* 2013;3:63.
- [196] Ababneh ZQ, Beloeil H, Berde CB, Ababneh AM, Maier SE, Mulkern RV. In vivo lipid diffusion coefficient measurements in rat bone marrow. *Magnetic resonance imaging* 2009;27:859-64.

- [197] Cho HJ, Sigmund EE, Song Y. Magnetic Resonance Characterization of Porous Media Using Diffusion through Internal Magnetic Fields. *Materials* 2012;5:590–616.
- [198] Giardino R, Fini M, Giavaresi G, Sambri V, Romanò C, Meani E, Soffiatti R. Rationale of Nail Antibiotic Clothing and “in vivo” Animal Study. In: Meani E, Romanò C, Crosby L, Hofmann G, Calonego G, editors. *Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery*: Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 359-366.
- [199] Kwon OS, Lee JH, Oh SH. Increased Local Antibiotic Release From Bone Cement Modified by a Novel Composition to Reduce Bone and Joint Infection. *Bone & Joint Journal Orthopaedic Proceedings Supplement* 2013;95-B:113.
- [200] Welch AB. Antibiotics in acrylic bone cement. In vivo studies. *J Biomed Mater Res* 1978;12:843–55.
- [201] Gothard D, Smith EL, Kanczler JM, Rashidi H, Qutachi O, Henstock J, Rotherham M et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. *Eur Cell Mater* 2014;28:166-207; discussion 207-8.
- [202] Canalis E, McCarthy TL, Centrella M. Effects of platelet-derived growth factor on bone formation in vitro. *J Cell Physiol* 1989;140:530–7.
- [203] Santos MI, Tuzlakoglu K, Fuchs S, Gomes ME, Peters K, Unger RE, Piskin E et al. Endothelial cell colonization and angiogenic potential of combined nano- and micro-fibrous scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2008;29:4306–13.
- [204] Aw MS, Khalid KA, Gulati K, Atkins GJ, Pivonka P, Findlay DM, Losic D. Characterization of drug-release kinetics in trabecular bone from titania nanotube implants. *International journal of nanomedicine* 2012;7:4883–92.
- [205] Wang H, Li Y, Zuo Y, Li J, Ma S, Cheng L. Biocompatibility and osteogenesis of biomimetic nano-hydroxyapatite/polyamide composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28:3338–48.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Nachname	Rau
Vornamen	Gereon Johannes
Geburtsdatum:	29. Mai 1985
Geburtsort:	Freiburg im Breisgau
Staatsangehörigkeit	deutsch

BERUFSAUSBILDUNG & WEITERBILDUNG

Seit 2011/01	Doktorand - Pharmazeutisches Institut, Christian-Albrechts-Universität Kiel, Abteilung für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie
2010/05 - 2010/11	Pharmazeut im Praktikum - Kloster Apotheke, Neumarkt in der Oberpfalz
2009/11 - 2010/04	Pharmazeut im Praktikum - Sanofi Deutschland GmbH, Industriepark Höchst
2007/03	Famulatur - Bayer Healthcare AG, Leverkusen
2006/03	Pflegepraktikum - Station der Unfall- und Neurochirurgie - Universitätsklinikum Regensburg

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

2010/12	Approbation als Apotheker
2005/10 - 2009/10	Pharmaziestudium - Universität Regensburg
2005/04 - 2005/09	Chemiestudium - Justus-Liebig-Universität Gießen

SCHULISCHE AUSBILDUNG & ZIVILDIENTST

2004/07 - 2005/03	Zivildienst - Universitätsklinikum Gießen
1995/08 - 2004/06	Abitur - Weidigschule Butzbach

ERKLÄRUNG NACH § 8 DER PROMOTIONSORDNUNG

Hiermit erkläre ich gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer, selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und wurde bei keiner anderen Universität zur Begutachtung eingereicht.

Danksagung

Prof. Dr. Hartwig Steckel danke ich für die Überlassung des interessanten Promotions-themas und die Ausrichtung der jährlichen Exkursionen.

PD Dr. Arndt-Peter Schulz danke ich für die Organisation und Administration des Forschungsprojektes und eine schöne Zeit in Cala Llombards.

Andrea & Phillip, Euch ein herzliches Dankeschön für eine schöne gemeinsame Laborzeit, die ideenreichen Kreativschübe bei Laborgestaltung, Knochenmodell und Knochenschaum und die ausgiebige Versorgung von GereOff mit kulinarischen und kaffeerösen Leckereien.

Ankur, thank you very much indeed, for a marvellous time in our lab, for blessing us with delicious food and consigning your masala recipes. I hope, we keep sight of each other and meet from time to time! And as the granimal used to say, es ist nie zu spät...

Ann-Kathrin, Hanna, Maren, Regina und Simone, Euch danke ich für Eure immer freudige, helfende und aufmunternde Art und hoffe, dass Ihr in Raum 200 auch für die künftigen Doktorandengenerationen hochkalorische Naschereien und eine ebenso wohlige Nestwärme bereithaltet.

Annette und Klaus, sowohl für die immer freundliche Aufnahme in Lübeck, heißen Kaffee vor Ort, die Möglichkeit die Femora zu präparieren, als auch eine sehr schöne Zeit in Cala Llombards danke Euch ganz herzlich.

Birte, Björn Chris, Franzi, Ina, Lena und Swetlana, der Begriff Vollgas hat durch Euch wahrlich eine neue Definition erhalten - ob Poolaction, Pizzabacken im dezent geheizten Steinofen, Spieleabende oder ein Kurzausflug zum Scheunenfest, mit Euch wurde es nie langweilig! Vielen Dank dafür!

Dirk, Dir gilt ein ganz besonderer Dank, sowohl für die technische Umsetzung der ersten Prototypen, als auch Deine nahezu unendliche Geduld, wenn ich wieder und wieder mit Änderungswünschen zu Dir kam. Es war eine sehr wertvolle Zeit mit Dir, in der ich viel von Deiner Kreativität, Deinem Geschick und technischen Verständnis lernen konnte. Merci vielmals!!

Eike, Katha, Kirsten, Sabrina, Simon, Sven und Sven, gerne erinnere mich dankbar an viele schöne Momente mit Euch zurück, die wir beim Radeln, Klettern, in Istanbul, in zahlreichen Spielerunden, Park- und Strandbesuchen erlebt haben und hoffe auf baldige Fortsetzung.

Janis, Gesprächsthema Gin oder her, es waren immer super Abende mit Dir, da unsere Diskussionen die interessantesten Themen überhaupt umfassten und dabei stets eingebettet waren in der Schönheit eines guten Service und eines leckeren Garnishes.

Lars [der kleine], ach - eine Ewigkeit ist seit Uschis Chemie-LK vergangen, in dem wir gemeinsam die Laborbank drückten, um uns nun nach Jahren wieder in Kiel zu treffen. Damals wie heute ist es eine ungetrübte Freude mit Dir über die wichtigen und belanglosen Dinge des Lebens zu diskutieren, den Krampf im Fuß zu zelebrieren und im Sonnenschein Kaffee um Kaffee zu konsumieren! Danke dafür und auch für die Motivation und Unterstützung in den trüben Stunden des Forscherdaseins.

Matsen & Matsen, es war eine stets große Ehre Euch in der Nähe zu wissen, da Ihr mit dem ungebrochenen Streben nach mittäglichem kulinarischen Genuss und abendlicher Gemütlichkeit, Eurer Dekorationsbegeisterung der Klimakammer und Eurer Unkompliziertheit für eine überaus entspannte Atmosphäre gesorgt habt, Danke!

Ronja, Dir danke ich für die unzähligen Gespräche und Fahrradkilometer, die eines Tages mit der Strecke Kiel-Fehmarn komplettiert werden und das Korrekturlesen der Arbeit! Merci vielmals!

Rüdi, abgesehen von Deinen fantastischen Doktorhüten und Deiner unvergleichbaren Hilfsbereitschaft werde ich vor allem unsere Debatten nicht vergessen - Debatten über das individuelle Verständnis von Ästhetik und gutem Essen, die unerreichbare Vollkommenheit aufgrund der einem jeden eigenen Unvollkommenheit, die Faszination aphroditerer Verzauberung und vieles mehr. Herzlichsten Dank für die Vielzahl interessanter Gedankengänge und Gespräche in Deinem einmaligem „Kabuff“, in dem Kreativität und Philosophie zu Hause sind und ich jedes Mal schmunzelnd denke, dass so etwas, wie penibelste Ordnung die Kreativität der Einfältigen zu sein scheint.

Thea, es war stets ein seelisch Blumenpflücken bei Dir im Labor vorbeizuschauen, eine kurze Erfrischung aus der nicht versiegenden Steriliumquelle zu nehmen, einen Blick auf Deine englischen Abhandlungen zu werfen und das ein oder andere Mimimi loswerden zu dürfen. Alles Gute zur Fertigstellung Deiner Arbeit!

Auch allen Freunden und Kollegen, die namentlich nicht aufgeführt sind, danke ich für die Unterstützung, Motivation und gemeinsame Zeit in den letzten Jahren!

Frau Dr. med. Imke Weyers danke ich zur Bereitstellung der Knochenproben.

Frau Martels danke ich zur Vermessung der Knochenproben

Liebste Familie, Euch und Eurer Unterstützung gilt der größte Dank!