

Aus der Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund-, und
Kieferkrankheiten der Universität Würzburg

Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und
Zahnheilkunde

Direktor: Professor Dr.-Ing. Roger Thull

Calciumphosphatzemente als Antibiotika- freisetzende Knochenersatzwerkstoffe

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Jörg Christian Deffner
aus Würzburg

Würzburg, Oktober 2004

Referent: Prof. Dr.-Ing. Roger Thull

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Thomas Holste

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2005

Der Promovend ist Zahnarzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Kenntnisstand	3
2.1 Antibiotika	3
2.1.1 Augmentan®	6
2.1.2 Clindamycin.....	7
2.1.3 Gentamicin.....	8
2.1.4 Vancomycin.....	10
2.2 Calciumphosphat-Zemente.....	11
2.3 Calciumphosphatzemente als Depotsysteme	14
3. Material und Methoden	17
3.1 Herstellung Calciumphosphatzement und Modifikation mit Antibiotika	17
Mahlung DCPA	17
Herstellung und Mahlung TTCP	17
Mischung des Zements	17
3.2 Bestimmung der Abbindezeit nach Gilmore.....	18
3.3 Mechanische Testung der Zemente	21
Prüfkörperherstellung.....	21
Mechanischer Test von DTS-Prüfkörpern	23
Mechanische Prüfung von CS-Prüfkörpern.....	24
3.4 Bestimmung der Freisetzungskinetik der Antibiotika	25
Prüfkörper zur Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmenge	25
3.5 Sonstige Charakterisierungsmethoden.....	28
4. Ergebnisse	29
4.1 Initiale Abbindezeit nach Gilmore	29
4.2 Mechanische Eigenschaften der Zemente.....	30
4.3 Partikelladung (Zeta-Potential) nach Wirkstoffmodifikation.....	31
4.4 Zementmorphologie und Phasenzusammensetzung nach Aushärtung.....	31
5. Diskussion	41
6. Zusammenfassung	47
7. Literaturverzeichnis	48
8. Anhang	56

1. Einleitung und Problemstellung

Calciumphosphate als gesinterte Festkörper, Granulat oder als in situ härtende Zemente [1-3] finden in der regenerativen Chirurgie Anwendung als Knochenersatzwerkstoffe in funktionell nicht kraftbelasteten Bereichen [4] des Skelettsystems. Beispielhaft seien Defekte im cranio- bzw. maxillofacialen Bereich [5], der Orbitaregion [6, 7], der Gehörknöchelchenkette [8], sowie in der regenerativen Parodontalchirurgie [9] genannt. Die hierbei in seltenen Fällen auftretende postoperative Osteomyelitis kann entweder durch eine die chirurgische Therapie begleitende parenterale oder lokale, oder durch eine alleinige Antibiose behandelt werden. Die Schwierigkeit einer parenteralen oder oralen und damit systemischen Antibiose liegt in den hohen Dosen, die zur Realisierung einer ausreichenden Konzentration des Antibiotikums am eigentlichen Wirkort, nämlich den Markräumen des erkrankten Knochens, zugeführt oder eingenommen werden müssen. Im Gegensatz zu einer akuten hämatogenen Osteomyelitis wird die antibiotische Therapie im Falle einer diffus sklerosierenden Ostitis oder einer posttraumatisch chronischen Osteomyelitis durch eine gestörte Blutzirkulation und Diffusionsbarrieren wie nekrotisches oder entzündlich verändertes Gewebe erschwert [10].

Neben der rein pharmakologischen Therapie von Knochenentzündungen besteht die Möglichkeit eines chirurgischen Eingriffs. Kommt es im Verlauf einer Osteomyelitis zur Abszedierung, Einschmelzung und Sequesterbildung einzelner Knochenabschnitte, muß chirurgisch saniert werden. Dies geschieht in Form von Inzision, Kürettage, Drainage, Spülung und im Falle von Nekrosen durch eine Sequestektomie [11]. Die durch die Kürettage und die Resektion nekrotischen Gewebes erreichte Anfrischung der Wundränder führt normalerweise zu einer verbesserten Durchblutung und der Einsprossung von Kapillargefäßen in das Wundgebiet. Damit werden günstige Bedingungen für eine begleitende systemisch-antibiotische Therapie geschaffen. Kommt es trotz chirurgischer Sanierung und Antibiose zu einer chronisch rezidivierenden Form, gibt es die Möglichkeit der hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO)

[12]. Der Patient wird in einer Druckkammer einem erhöhten Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt, die daraus resultierende erhöhte Sauerstoffsättigung von Blut und Geweben führt letztendlich auch zu einer verbesserten Gewebeoxygenierung von entzündlich verändertem und damit hypoxischem Gewebe. In Folge steigt die Zellaktivität der körpereigenen Abwehr und damit die Geschwindigkeit des Reparatursprozesses.

Eine weitere therapeutische Möglichkeit besteht in der Verwendung von Trägersystemen für die entsprechenden Antibiotika, die im Verlauf der Operation in das Exzisionsgebiet eingebracht werden und die Pharmaka anschließend kontinuierlich über einen bestimmten Zeitraum freisetzen. Beispielhaft genannt sei das Einlegen von mit Gentamicin angereicherten Poly-(methyl-metacrylat)-Ketten (PMMA) [12]. Der Nachteil dieses Trägersystems ist die nicht vorhandene Resorbierbarkeit von PMMA. Die daher obligate Operation zur Entfernung der Kunststoffkörper belastet den oftmals multimorbiden Patienten zusätzlich. Ferner kann ein in situ verbleibender, mit verschiedenen Pharmaka kombinierter, eventuell bioresorbierbarer Knochenersatzwerkstoff die hochdosierte systemische Antibiose mit ihren unerwünschten Nebenwirkungen vermeiden und als Wirkstoffdepot dienen. Als momentan zugelassenes nicht resorbierbares Produkt sei Palacoss angeführt [13]. Der PMMA-Zement enthält nach der Polymerisation noch Monomere und ist damit potentiell toxisch. Wünschenswert wäre daher eine Matrix aus einem biokompatiblen, ausreichend festen, frei modellierbaren und endo- beziehungsweise isotherm aushärtenden Knochenersatzwerkstoff. Calciumphosphatzemente (CPC) entsprechen weitgehend diesen Anforderungen. Verschiedene Ansätze der Modifikation von CPC mit Antibiotika sind literaturbekannt [14, 15]. Unter diesem Aspekt untersucht wurden in der vorliegenden Arbeit die physikalisch-chemischen und pharmakologischen Eigenschaften und deren Änderungen von verschiedenen Antibiotika-Zement-Kombinationen. Ziel war es, ein sowohl werkstoffkundlich als auch pharmakologisch funktionierendes Depotsystem auf der Basis von CPC, bestehend aus einer äquimolaren Mischung aus basischem Tetracalciumphosphat (TTCP) und saurem Calciumhydrogenphosphat (DCPA) zu entwickeln.

2. Kenntnisstand

2.1 Antibiotika

Die heute angewandten Antibiotika sind eine Untergruppe der Antiinfektiva. Sie werden verwendet, um Erreger abzutöten beziehungsweise abzuschwächen, möglichst ohne den Wirtsorganismus zu schädigen. Eingeteilt werden die verschiedenen gebräuchlichen Antibiotika nach ihrem Wirkort und Wirkungsmechanismus (Tab. 1). Bakterizid wirkende Antibiotika töten Erreger ab, indem sie deren Zellwände oder Zellmembranen beschädigen. Im Gegensatz dazu stören bakteriostatisch wirkende Substanzen die Proteinsynthese und hemmen damit das Wachstum vorhandener Keime [16]. Antibakterielle Substanzen, die hier eingreifen und die Bildung defekter Membranproteine veranlassen (Aminoglykoside, z.B. Gentamicin) oder den Erhaltungstoffwechsel beeinträchtigen (z.B. Rifampicin), können bakteriostatisch und bakterizid wirken. Bakterizid wirkende Substanzen schädigen hauptsächlich wachsende Erreger. Die Kombination mit einem bakteriostatischen Präparat kann also zu einer Wirkungsabschwächung des bakteriziden Medikaments führen. Umgekehrt können sich die Effekte von Substanzen mit gleichartigem Wirkmechanismus gegenseitig verstärken.

Um den Wirtsorganismus der Keime bei deren Bekämpfung möglichst wenig zu schädigen ist eine exakte Dosierung der Antibiotika anzustreben. Es wird daher in vitro die eben ausreichende Konzentration ermittelt, die zur Wachstumshemmung oder Abtötung des jeweiligen Erregers genügt. Diese Größe wird als minimale Hemmkonzentration bezeichnet. Sie sollte deutlich unter der toxischen Konzentration liegen, um eine möglichst große therapeutische Breite zu gewährleisten. Das ideale antibiotische Therapeutikum wirkt nur auf den zu bekämpfenden Erreger und wird nur in der minimal notwendigen Konzentration zugeführt. Berücksichtigt werden muß hierbei, daß es nur sehr wenige Antibiotika gibt, die ausschließlich einen einzigen Erreger bekämpfen (z.B. Isoniazid, wirkt nur gegen Tuberkelbakterien). Viele Substanzen wirken auf mehrere Keime und werden als Breitspektrum-Antibiotika bezeichnet. Unter der Therapie mit solchen Wirkstoffen muß die Gefahr eines Infektionswandels berücksichtigt werden, da nach Vernichtung der physiologischen Keimflora eine Besiedlung durch

2. Kenntnisstand

pathogene Keime erfolgen kann [17]. In diesem Zusammenhang kann es zur Bildung von Resistenzen kommen, wenn die Stoffwechselaktivität der Erreger durch die verwendeten Therapeutika nicht mehr beeinträchtigt wird. Dabei entwickeln sich häufig Kreuzresistenzen, die nicht nur ein einzelnes Präparat, sondern eine ganze Wirkstoffgruppe mit gleichem Wirkmechanismus nutzlos machen. Durch den unter einer antibiotischen Therapie auftretenden enormen Selektionsdruck entwickeln Bakterien verschiedene Formen von Resistenzen. Durch Adaptation können Keime ohne Veränderung ihres genetischen Materials durch eine Enzyminduktion überleben (z.B. Entwicklung einer Penicillinase). Sind in einer Population primär einige resistente Keime vorhanden, so werden sich nur diese unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums vermehren und es kommt zu einer primär erworbenen chromosomalen Resistenz. Sekundär erworbene chromosomale Resistenzen können durch Mutationen und nachfolgende Selektion entstehen. Durch den Austausch genetischen Materials, sogenannter Plasmide, zwischen verschiedenen Spezies können nichtresistente Keime Resistenzmechanismen von resistenten Keimen erwerben: es kommt zu einer extrachromosomalen Resistenzentwicklung. Die Resistenzmechanismen sind entweder in der verminderten Aufnahme oder der vermehrten Ausscheidung des Wirkstoffs aus dem Bakterium zu suchen, oder sie ergeben sich aus einer Desensibilisierung des Wirkortes oder Kompensation eines Wirkstoff-induzierten Stoffwechseldefekts und durch enzymatische Inaktivierung des Wirkstoffes innerhalb oder außerhalb des Bakteriums [18].

Die für diese Arbeit ausgewählten Antibiotika müssen folgenden Anforderungen entsprechen: Mikrobiologisch sollen sie ein möglichst breites Spektrum der üblichen, an einer Osteomyelitis beteiligten Keime abdecken. Hierzu zählen normalerweise aerobe grampositive Kokken (v.a. *Staphylococcus aureus*) und gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas*- und *Proteus*-Arten. Im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich spielt die Eintrittspforte über avitale Zähne eine Rolle, hier sind häufig grampositive und gramnegative Anaerobier beteiligt. Die Substanzen sollten bakterizide Wirkung besitzen, und das möglichst auch bei geringer Stoffwechselaktivität der Keime. Die minimale

2. Kenntnisstand

Hemmkonzentration (MHK) sollte möglichst niedrig sein, um sicherzustellen, daß auch bei schwächer werdender Wirkstofffreisetzung Bakterizidie erreicht wird.

Tabelle 1: Einteilung der Antibiotika nach Wirkort und Wirkungsmechanismus [19]

<i>Wirkort</i>	<i>Pharmakon</i>	<i>Wirkungsweise</i>	<i>Wirkungsmechanismus</i>
Zellwand gram-positiver Keime	Penicilline Cephalosporine	Bakterizid	kompetitive Hemmung der D-Alanyl-D-Alanin-Transpeptidase
	Vancomycin	Bakterizid	Interferenz mit transmembranalem Auswärtstransport der Zellwandbausteine (N-Acetyl-Muraminsäure)
	Bacitracin	Bakterizid	Hemmung des transmembranalen Phospholipidcarriers
	Fosfomycin	Bakterizid	Hemmung der Synthese von N-Acetyl-Muraminsäure
Zytoplasma-membran	Polymyxine	Bakterizid	Permeabilitätserhöhung der Zytoplasmamembran für niedermolekulare Stoffe
Hemmung der Tetrahydrofol-säuresynthese	Sulfonamide	Bakteriostatisch	kompetitive Hemmung der H ₂ -Pteridin-p-Aminobenzoesäure-Synthetase
	Diaminopyrimidine	Bakteriostatisch	kompetitive Hemmung der Dihydrofolsäure-Reduktase
Interferenz mit bakterieller DNS	Gyrasehemmstoffe	Bakterizid	Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II
	Nitroimidazole	Bakterizid	Bindung an bakterielle DNS
Hemmung der RNS-Synthese	Rifampicin	Bakterizid	Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase
Hemmung der Proteinsynthese	Makrolide Lincosamide	Bakteriostatisch	Blockade der Ribosomen an der mRNA
	Tetracycline	Bakteriostatisch	Andocken von Aminoacyl-tRNS-Komplexen an mRNA wird verhindert
	Aminoglykoside	Bakterizid	induziert die Bildung von Nonsense-Proteinen durch Anlagerung falscher tRNS-Komplexe an die mRNA
	Chloramphenicol	Bakteriostatisch	Hemmung der Peptidyltransferase

2. Kenntnisstand

Daneben muß eine gewisse physikalisch-chemische Stabilität erfüllt werden, um das fertige Depotsystem sterilisieren und über einen längeren Zeitraum lagern zu können. Die ausgewählten Antibiotika hemmen entweder die Zellwandsynthese (Augmentan und Vancomycin) oder die Proteinbiosynthese (Clindamycin und Gentamicin). Es wurde jeweils ein Standardpräparat und das entsprechende Alternativmedikament gewählt. Alle Medikamente lagen als wasserlösliche, infundierbare Salze oder Sulfate vor.

2.1.1 Augmentan®

Augmentan® ist die Kombination des Aminopenicillins Amoxicillin und des β -Laktamaseinhibitors Clavulansäure. Die Aminopenicilline sind über das Wirkspektrum der Penicilline wie Strepto- und Pneumokokken hinaus gut wirksam gegen Listerien, Enterokokken, Haemophilus influenzae, eine Reihe von Escherichia-coli-Stämmen (ca.60%) und mehr als 90% aller Proteus-mirabilis-Stämme. In Kombination mit Clavulansäure kann die Indikation für Amoxicillin auf Weichteilinfektionen durch β -Laktamase-bildende Haemophilus-influenzae-Stämme, Klebsiellen und Staphylokokken ausgeweitet werden [20]. Aminopenicilline sind nur in trockenem Zustand und bei Temperaturen unter 25°C lagerungsstabil. Bei leicht saurem pH-Wert sind sie gut wasserlöslich, aber abhängig von Temperatur, Licht- und UV-Einfluß nur noch bedingt lösungsstabil. Aminopenicilline wirken bakterizid, wobei nicht die Konzentration, sondern vielmehr die Wirkdauer die entscheidende Rolle spielt. Es werden die Transpeptidasen in der bakteriellen Zellwand gehemmt, die der Quervernetzung und damit Stabilisierung der Mureinschicht von grampositiven Bakterien dienen. Unter der Therapie mit Aminopenicillinen kann es zur Ausbildung eines Masern-ähnlichen Exanthems kommen, daneben muß das Auftreten von Allergien berücksichtigt werden [21, 22]. Clavulansäure wird durch Streptomyces clavuligerus gebildet und besitzt nur schwache intrinsische antimikrobielle Aktivität. Sie hemmt β -Laktamasen, die von vielen gramnegativen und grampositiven Keimen gebildet werden, indem der enthaltene β -Laktamring durch das Enzym geöffnet und anschließend irreversibel an das Enzym gebunden wird. Sie ist ein Suizid-Inhibitor, da das Enzym nach Bindung mit Clavulansäure für den Mikroorganismus wertlos wird und das kombinierte Aminopenicillin seine Wirkung entfalten kann [21].

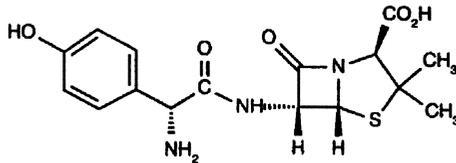


Abbildung 1: Amoxicillin

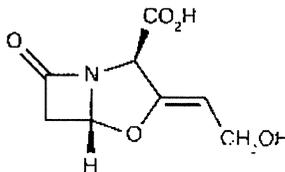


Abbildung 2: Clavulansäure

2.1.2 Clindamycin

Clindamycin ist ein Lincosamid, welches halbsynthetisch aus Lincomycin hergestellt wird. Es ist leicht basisch, bei pH 2-9 lösungsstabil und gut wasserlöslich. Das Wirkspektrum umfaßt neben grampositiven Bakterien, speziell Staphylokokken, auch obligat anaerobe gramnegative Stäbchen. Lincosamide wirken über eine Blockade der 50-S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen bakteriostatisch, bei sehr empfindlichen Spezies und entsprechend hohen Wirkstoffkonzentrationen auch bakterizid. Das Resultat ist in jedem Fall eine Störung der Proteinsynthese. Clindamycin penetriert gut in Knochen- und Weichgewebe und wirkt gut bei Osteomyelitiden, wenn als Erreger Staphylokokken nachgewiesen werden können. Die Kombination mit Knochenzementen scheint daher sinnvoll. Es wird daneben als Ausweichpräparat bei Penicillinallergien zur Endokarditisprophylaxe bei Zahn- und HNO-ärztlichen Eingriffen und bei akuten

2. Kenntnisstand

Infektionen mit Anaerobiern verwendet. Die Lincosamide können oral und parenteral verabreicht werden, wobei Clindamycin die bessere Resorption aufweist. Zu schnell infundiert kann Clindamycin zu Nausea, Herzrhythmusstörungen und Blutdruckabfall führen, daneben sind gastrointestinale sowie hämatologische Störungen und Überempfindlichkeitsreaktionen aufgetreten [23].

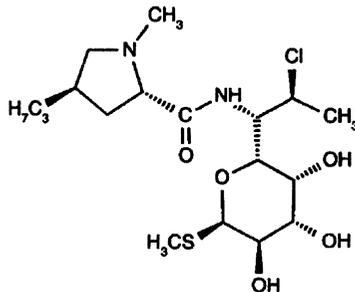


Abbildung 3: Clindamycin

2.1.3 Gentamicin

Gentamicin ist ein semisynthetisch aus *Micromonospora*-Stämmen gewonnenes Aminoglykosid. Die sehr gut wasserlöslichen und lösungsstabilen Substanzen sind sehr thermostabil und eignen sich zum Einsatz in stark exotherm polymerisierenden PMMA-Knochenzementen [12]. Allen Aminoglykosiden gemeinsam ist ein relativ breites Wirkspektrum im Bereich gramnegativer Keime, die primär bakterizide Wirkung und der rasche Wirkungseintritt. Die Wirksamkeit im grampositiven Bereich ist eingeschränkt, kann aber durch Kombination mit einem zellwandaktiven Antibiotikum gesteigert werden. Die bakterizide Wirkung ist konzentrationsabhängig, ebenso wie der für Aminoglykoside charakteristische postantibiotische Effekt. Aminoglykoside diffundieren durch von Porinproteinen in der äußeren Membran gebildete Kanäle in den periplasmatischen Raum. Der Transport durch die innere zytoplasmatische Membran erfolgt durch das hier vorhandene Membranpotential. Dieser Schritt wird durch einen Abfall des pH-Werts, Hyperosmolarität, die Anwesenheit von Ca- und Mg-Ionen und

2. Kenntnisstand

durch anaerobe Verhältnisse gehemmt. Gegen Anaerobier sind Aminoglykoside unwirksam, da deren Stoffwechsel kein ausreichend hohes Potentialgefälle zwischen periplasmatischem Raum und Cytoplasma herstellt und damit die Diffusion durch die Zytoplasmamembran unmöglich ist [24]. Daher ist die Wirkung der Aminoglykoside auf fakultative Anaerobier auch geringer, wenn diese unter vorwiegend anaeroben Bedingungen aufwachsen. In Verbindung mit β -Laktam-Antibiotika lässt sich ein positiver Synergismus feststellen, das Wirkspektrum erweitert sich in den grampositiven Bereich. Aminoglykoside wirken über eine Störung der 30S-Untereinheit der Ribosomen. Dies hat die Bildung von sog. „Nonsense-Proteinen“ zur Folge. Durch den Einbau solcher Proteine in die Zellmembran wird diese undicht, es strömen zunächst Ionen, dann

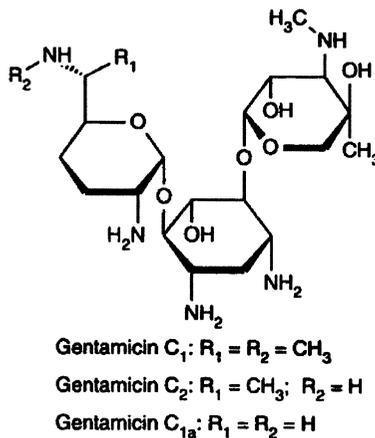


Abbildung 4: Gentamicin

größere Moleküle und schließlich Proteine aus der Bakterienzelle, was deren Untergang zur Folge hat [25]. Aminoglykoside werden nach oraler Gabe nicht resorbiert und müssen daher parenteral verabreicht werden. Aminoglykoside können in Abhängigkeit von Therapiedauer, Dosierung, Zustand des Patienten und Begleitmedikation zu oto- und nephrotoxischen Nebenwirkungen führen [26, 27]. Die vestibulären und kochlearen Schädigungen führen zu Hör- und Gleichgewichtsstörungen.

2.1.4 Vancomycin

Vancomycin ist ein Glykopeptidantibiotikum und wird aus *Streptomyces orientalis* gewonnen. Es ist zusammen mit Teicoplanin ein wichtiges Reserveantibiotikum gegen lebensbedrohliche Infektionen mit methicillinresistenten *Staphylococcus aureus*- und *Enterococcus*-Stämmen wie beispielsweise Pneumonien, Emyeme, Endokarditiden, Osteomyelitiden und Weichgewebsabszesse. Auch Staphylokokkeninfektionen eines Shunt bei dialysepflichtigen Patienten oder eine durch *Clostridium difficile* hervorgerufene Colitis werden mit Vancomycin behandelt. Die Indikation ist auf schwere Infektionen zu beschränken. Vancomycin ist als Hydrochlorid (pH=8) erhältlich. Es ist im sauren Milieu gut löslich, in alkalischer Umgebung dagegen instabil. Mischungen mit alkalischen Lösungen führen zur Ausfällung und sollten daher nicht angesetzt werden. Das Wirkspektrum liegt im grampositiven Bereich. Glykopeptidantibiotika verhindern den Zellwandaufbau grampositiver Keime, indem sie vor der enzymatischen Quervernetzung mit den Wandbausteinen reagieren und somit kein Peptidoglykangerüst in Form einer Mureinschicht zustande kommen kann [28].

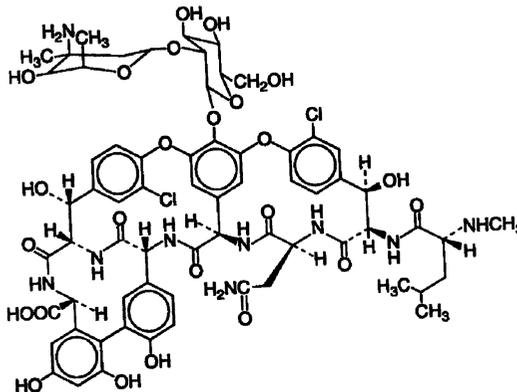


Abbildung 5: Vancomycin

2. Kenntnisstand

Das Antibiotikum wirkt bei sich teilenden Keimen schnell bakterizid. Enterokokken können Resistenzen bilden, indem sie ihre Zellwandvorstufen so modifizieren, daß Vancomycin nicht mehr daran binden und deren Aufbau behindern kann. Nach oraler Gabe werden Vancomycin und Teicoplanin nicht resorbiert, falls eine systemische Therapie erforderlich ist, müssen sie infundiert werden. Glykopeptidantibiotika sind wie Aminoglykoside überdosiert nephro- und ototoxisch, ferner kann es bei zu schneller Infusion zu Schmerzen, Phlebitis und Überempfindlichkeitsreaktionen kommen [24].

2.2 Calciumphosphat-Zemente

Der in dieser Arbeit verwendete Zement gehört zur Werkstoffklasse der Calciumphosphatzemente. CPC sind mehrkomponentige Mischungen verschiedener Calciumphosphate. Sie verbinden die Vorteile freier Modellierbarkeit und Adaption an Knochendefekte mit der sehr guten Biokompatibilität von Calciumphosphaten [29-31]. Unterschieden werden, je nach pH-Wert der Zementpaste während des Abbindevorgangs, Zemente die Hydroxylapatit, HA, im neutralen bzw. basischen Bereich bilden sowie Bruschit- (Calciumhydrogenphosphat Dihydrat, DCPD) Zemente, bei denen durch Zusatz von Phosphorsäure oder primären Calciumphosphaten ein pH < 4.2 eingestellt wurde [32, 33]. Auch eine minimalinvasive Injektion flüssiger Pastensysteme direkt in zerstörte Knochenareale ist möglich [34, 35]. Die Abbindereaktion findet unter annähernd isothermen Bedingungen statt und ermöglicht so die Einlagerung thermolabiler organischer Moleküle und lebender Zellen [36, 37]. Die nanokristalline Struktur der Zemente ermöglicht eine Resorption sowohl durch zellulären Abbau (z.B. Hydroxylapatit) als auch über Lösungsprozesse (z.B. Bruschit).

Die in Tabelle 2 aufgelisteten Calcium-Phosphat-Salze sind nach ansteigendem molaren Verhältnis Ca/P und damit nach ansteigender Basizität angeordnet. Bis auf Fluorapatit (Fap) gehören sie alle dem ternären System $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ an. Fluorapatit bildet zusammen mit verunreinigtem Hydroxylapatit die mineralische Basis vieler Hartgewebe im menschlichen Körper. Die Herstellung von Calciumphosphatzementen umfaßt normalerweise Prozesse der Sinterung, der Ausfällung amorpher Calciumphosphate aus wässrigen Lösungen [38-40] und

2. Kenntnisstand

Mahlvorgänge zur Einstellung der Partikelgröße [41, 42]. Zweck dieser Verfahren ist die Gewinnung phasenreiner Calciumphosphate mit definierten Partikelgrößen. Häufig genutzte Komponenten sind Dicalciumphosphatdihydrat (DCPD), Dicalciumphosphatanhydrid (DCPA) in Verbindung mit Tetracalciumphosphat (TTCP) [43–45] sowie einkomponentige Zemente auf Basis von Tricalciumphosphat (α -TCP/ β -TCP) [46, 47]. DCPD ist als Bestandteil des Endoskeletts und Zwischenprodukt bei der Bildung von Hydroxylapatit aus amorphem Calciumphosphat bekannt [48]. Zemente, die als Endprodukt der Abbindereaktion DCPD bilden [49–51], sind aufgrund ihrer chemischen Löslichkeit unter physiologischen Bedingungen von Interesse. DCPA ist trotz höherer thermodynamischer Stabilität gegenüber DCPD nicht im Endoskelett nachweisbar [52]. β -TCP wird in einem Sinterprozeß (1000°C/24h) aus DCPA/Calciumcarbonat-Mischungen im Verhältnis 2:1 gewonnen. Durch Erhitzen von reinem β -TCP auf 1200–1400°C kann α -TCP gewonnen werden [53]. TTCP dient als basische Komponente bei der Herstellung von CPC. Es bildet als äquimolare Mischung mit DCPD oder DCPA in wässriger Lösung bei pH 7,4 Hydroxylapatit. Synthetisiert wird TTCP durch Sintern (1300°C) einer äquimolaren Mischung aus Calciumcarbonat und einem Calciumhydrogenphosphat (DCPD oder DCPA) [54, 55].

Wasser, physiologische Flüssigkeiten und Salzlösungen dienen als Reaktionsphase der Lösung der Edukte und Präzipitation der Produkte. Die Löslichkeit der Calciumphosphate bestimmt die Richtung der in wässriger Lösung ablaufenden Reaktionen, also Fällung, Lösung und Phasentransformation. CPC müssen feuchtigkeitsfrei gelagert werden, da der Zutritt von Wasser die Abbindereaktion zu Hydroxylapatit einleitet. Hydroxylapatit findet sich als mineralische Phase des Stützgewebes in Knochen (60–70%) und zu einem noch höheren Anteil im Zahnschmelz (ca. 98%) [56]. Es liegt hier zumeist nicht in reiner Form, sondern in Mischungen mit Fap vor.

2. Kenntnisstand

Tabelle 2: Zusammensetzung und Löslichkeitsprodukte verschiedener Calciumorthophosphate; alle Verbindungen finden Einsatz als Edukte für die Herstellung von CPC

Verbindung	Summenformel	Ca/P Verhältnis	log(Ksp) bei 25 °C	log(Ksp) bei 37 °C
Calcium-bis-dihydrogenphosphat Monohydrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	Löslich	
Calcium-bis-dihydrogenphosphat (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	Löslich	
Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD, Brushite)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	6.59 [57]	6.63
Calciumhydrogenphosphat (DCPA, Monetite)	CaHPO_4	1.0	6.90 [58]	7.04 [58]
Octacalciumphosphat (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	96.6 [59]	95.9 [59]
α -Tricalciumphosphat (α -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	25.5 [60]	25.5
β -Tricalciumphosphat (β -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.50	28.9 [61]	29.5 [61]
Hydroxyapatit (OHAp)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	58.4 [62]	58.6 [62]
Tetracalciumphosphat (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	-	37.4 [63]

CPC werden der medizinischen Anforderung hinsichtlich freier Formbarkeit und mechanischer Stabilität in nicht kraftbelasteten Bereichen gerecht. Die Biokompatibilität ist durch das während des Abbindevorgangs am Implantationsort entstehende Hydroxylapatit geringer Kristallinität gewährleistet, die Reaktion verläuft ferner weitgehend im physiologischen Bereich um pH 7,5-8. Durch direktes Anmodellieren von CPC an die Knochenoberfläche wird hier die übermäßige Bildung von Bindegewebe verhindert und damit die allmähliche Resorption und Umwandlung des CPC in körpereigenes Hartgewebe begünstigt. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, daß der Werkstoff anderen Materialien wie beispielsweise Polymethylmetacrylat (PMMA) hinsichtlich Toxizität und Langzeiterfolg überlegen ist [64]. Verschiedene CPC sind als Medizinprodukt für die Anwendung als Knochenersatzwerkstoffe zugelassen (Tabelle 3). Die Indikationen der Zemente beschränkt sich auf nicht-lasttragende Defekte im Bereich des Schädels mit kritischen Defektgrößen von weniger als 25cm^2 , eine Kontraindikation besteht für alle Werkstoffe bei infizierten Knochenlagern.

2. Kenntnisstand

Tabelle 3: Kommerzielle CPC-Produkte

<i>Zement</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Komponenten</i>	<i>Endprodukt</i>
a-BSM [65, 66]	ETEX	ACP, DCPD	PHA
Biobone [67-69]	Merck GmbH	ACP, DCPD	PHA
Norian SRS Norian CRS [70-73]	Norian (Synthes-Stratec)	α -TCP, CaCO ₃ , MCPM	CAP
BoneSource [5, 74]	Stryker-Leibinger	TTCP, DCPA	PHA
Calciyon [75]	Merck GmbH	α -TCP, MCPM, TTCP	CAP
Cementek [76]	Teknimed	α -TCP, DCPA, CaCO ₃ , PHA	PHA
Biopax [77-79]	Mitsubishi Materials	α -TCP TTCP DCPD	PHA

2.3 Calciumphosphatzemente als Depotsysteme

Die Eigenschaften der Calciumphosphatzemente hinsichtlich Resorptionsverhalten, Biokompatibilität und Osteokonduktivität [80, 81] gaben Anlaß, die Werkstoffe als sogenannte drug-delivery-Systeme zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung zu verwenden. Es wurden diverse Therapeutika wie z.B. Antibiotika [82-89], Antiinflammativa [90, 91], Zytostatika [92] oder Knochenwachstumsfaktoren [93-96] mit verschiedenen Zementen kombiniert. Neben dem Ziel der Infektionsbekämpfung dient die Kombination von Antibiotika mit CPC auch der Infektionsprophylaxe. Infektionen stellen bei porösen Ersatzmaterialien ein nicht unerhebliches Problem dar [97]. Eine durch oberflächliche Kontamination ausgelöste Infektion kann durch über Körperflüssigkeit antransportierte Antibiotika bekämpft werden. Da aber das Eindringen von Körperflüssigkeit in eventuell kontaminierte Porositäten nicht gewährleistet ist, kann hier ein zuvor eingebrachtes Präparat wirksamen Infektionsschutz leisten.

Tabelle 4: Studien - Calciumphosphatzemente in Kombination mit verschiedenen Pharmaka

<i>Autor</i>	<i>Wirkstoff</i>	<i>Zement</i>
Otsuka, Nakahigashi et al. 1994 [98]	Indometacin (nichtsteroidales Antirheumatikum)	TTCP, DCPD, HaP

2. Kenntnisstand

<i>Autor</i>	<i>Wirkstoff</i>	<i>Zement</i>
A. Ratier et al. 2001 [83]	Tetracyclin (Antibiotikum)	Cementek® (Teknimed), TTCP, α -TCP
E. J. Blom, E. H. Burger et al. 2001 [94, 95]	rhTGF1 (recombinant-human-transforming- growth-factor β 1)	α -TCP, DCPA, HaP
Bohner, Lemaitre et al. 1996, 1999 [84, 85]	Gentamicinsulfat (Antibiotikum)	MCPM, β -TCP
Takechi, Miyamoto et al.1996 [86]	Flomoxef (Antibiotikum)	TTCP, DCPA aw-FSCPC (antiwashout-fast setting CPC)
Soriano, Evora 2000 [99]	Poly(d,l-laktid-co-Glykolid)-Polymere mit Gentamicin beladen	TCP, HaP
Benoit et al. 1997 [100]	Poly(d,l-laktid-co-Glykolid)-Polymere mit Vancomycin beladen	„Plaster of Paris“ (Calciumsulfat- Hemihydrat)

Die Eigenschaften von CPC beruhen unter anderem darauf, das unter physiologischen Reaktionsbedingungen Hydroxylapatit geringer Kristallinität entsteht mit gegenüber gesinteren Implantaten deutlich größerer spezifischer Oberfläche. Diese wiederum darf bezüglich des Infektionsrisikos nicht unberücksichtigt bleiben. Hydroxylapatit wird nicht nur als biokompatibler Knochenersatzwerkstoff, sondern auch als Adsorbens in der Flüssigkeitschromatographie verwendet [101]. Es wird hier speziell zur Abtrennung von Proteinen und Peptiden verwendet. Da HaP geringer Kristallinität auch Bakterien gut absorbiert, ist dieses Material für die Besiedelung und Plaquebildung durch Mikroorganismen anfälliger als gesinterter HaP. Dies kann dazu führen, daß eine einmal etablierte Infektion einen Infektionsherd bildet, der unter Umständen hämatogen streuen kann und damit den Verlust des Implantats bewirkt. Es sei hier auf die Entstehungsmechanismen einer Parodontitis verwiesen, bei denen die guten Anhaftungsmöglichkeiten des Zahnschmelzes für Bakterien eine Schlüsselrolle spielen [9]. Aus diesen Überlegungen heraus ist der Zusatz von Antibiotika durchaus sinnvoll und wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht (Tab. 4). Nachteil der bisherigen Arbeiten war, daß nur jeweils das Freisetzungsverhalten eines Antibiotikums aus einer

2. Kenntnisstand

Zementmatrix untersucht wurde. Ein Vergleich der unterschiedlichen Studien ist aufgrund der unterschiedlichen Chemie der Zemente (Bruskit, Hydroxylapatit) mit stark variablen Porengrößen, pH-Werten und spezifischen Oberflächen nur bedingt möglich. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der Arbeit eine Reihe unterschiedlicher Wirkstoffe mit einem Zement kombiniert und sowohl das Freisetzungsverhalten als auch der Einfluß auf die mechanischen Parameter und die Abbindeigenschaften des Zements untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Herstellung Calciumphosphatzement und Modifikation mit Antibiotika

Mahlung DCPA

Nach Einwiegen von 125,0 g Calciumhydrogenphosphat (DCPA, Mallinckrodt-Baker, Griesheim) in einen 500 ml Mahlbecher aus Achat wurden 100 Kugeln, 10 mm, aus Achat und 250 ml Ethanol zum Mahlgut zugegeben. Die Mahlung erfolgte über 24 h mit 250 U/min bei minütlichem Wechsel der Drehrichtung. Nach Beendigung des Mahlvorgangs erfolgte die Abtrennung des Mahlguts von den Mahlkugeln über ein Sieb mit 355 µm Maschenweite und die Trocknung des Mahlguts im Ofen an Luft bei 60°C für 6 h.

Herstellung und Mahlung TTCP

100,0 g Calciumcarbonat (CC, Merck, Darmstadt) und 136,06 g DCPA wurden in eine Duranglasflasche (1 l) mit 300 ml Isopropanol für 1 h mit einem Magnetrührer homogenisiert. Anschließend wurde über Glasfritte (Porengröße 4) abfiltriert und der Filterkuchen bei 80°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Das so getrocknete Pulver wurde in einen ALSINT Tiegel (500ml) überführt und bei 1500°C für 18 h gesintert (Oyten Thermotec). Der Sinterkuchen wurde anschließend an Luft abgeschreckt, um eine Zersetzung der metastabilen TTCP-Phase im Bereich zwischen 800-1200°C zu TCP und CaO zu vermeiden. Die Zerkleinerung des Sinterkuchens erfolgte zuerst mit Mörser und Pistill und Siebung <355 µm. Jeweils 36,6 g des gesiebten Pulvers wurden unter Zusatz von 1,0 g Natriumphosphat im 500 ml Achatmahlbecher mit 4 Kugeln (30 mm) gemahlen; Mahlparameter: 20 min, 200 U/min, 2 Richtungen.

Mischung des Zements

Beide Komponenten wurden im äquimolaren Verhältnis (13,6 g DCPA; 36,6 g TTCP) im Achatmahlbecher mit 4 Kugeln (30 mm) bei 100 U/min für 1 h gemischt. Die fertige Zementmischung wurde über ein Sieb der Maschenweite 355 µm von den Kugeln abgetrennt und feuchtigkeitsdicht im Exsiccator gelagert.

3. Material und Methoden

Der fertige Zement wurde anschließend mit jeweils 1, 2 und 5 Gewichtsprozent Antibiotikum vermischt. Die Zement-Antibiotikum-Pulvermischungen wurden auf einem Taumelmischer für jeweils 24 h homogen vermengt und anschließend feuchtigkeitsdicht im Exsiccator gelagert. Die verwendeten Antibiotika waren:

- Augmentan i.v. 2,2 g; Trockensubstanz, Infusionsflasche, SmithKline Beecham Pharma GmbH, 80791 München
- Clindamycin-Hydrochlorid, 100 mg, Nr. 27543, Sigma-Aldrich, D-89552 Steinheim
- Gentamicin sulfate from micromonospora purpurea, BioChemika, Fluka Chemie GmbH, CH-9471 Buchs, Vertrieb: Sigma-Aldrich, D-89552 Steinheim, Best.Nr.: 48760, 5 g
- Vancomycin-Hydrochlorid 500 mg, Abbott GmbH, D-65205 Wiesbaden

3.2 Bestimmung der Abbindezeit nach Gilmore

Die Abbindezeit eines Zements ist definiert durch die Zeitspanne zwischen Anmischung und Aushärtung. Die Abbindezeit wurde über die Penetrationsmethode nach Gilmore bestimmt. Die hierzu eingesetzten Gilmore-Nadeln waren durch die in Tabelle 5 aufgeführten Größen definiert: Die Durchführung der Messung erfolgte in der auf $37\pm 1^\circ\text{C}$ temperierten Feuchtigkeitskammer bei einer Luftfeuchtigkeit von mehr als 90%, um ein Verdampfen der flüssigen Phase des Zements während der Abbindereaktion zu vermeiden (Abbildung 6). Die Feuchtigkeitskammer besteht aus einer doppelwandigen Edelstahlkammer, die Innenseite ist nach oben hin offen, die Vorderseite ist durch eine PMMA-Tür verschlossen. Die doppelwandige Bodenplatte ist mit einem Zu- und Abfluß versehen. Die Gilmore-Nadel ist an einem Stempel befestigt und kann an der Oberseite der Apparatur mit einer Schraube fixiert werden. In der Mitte der Bodenplatte ist die Probenform auf einem von außen drehbaren Teller befestigt. An der Deckelplatte sind zwei Ventilatoren zur Umwälzung der Innenluft der Kammer angebracht. Um eine Luftfeuchtigkeit von mehr als 90% zu erreichen, war es teilweise notwendig, den Boden der Kammer mit einigen ml Wasser vor einer Messung zu befeuchten. Zur Vermeidung der Kondensation von Wasser an Gilmore-Nadel und Probenform wurden diese auf Temperaturen von $37\pm 1^\circ\text{C}$ beheizt. Der Zement galt als abgebunden, wenn die Nadel nicht mehr in die Oberfläche eindrang. Die Beurteilung erfolgte optisch mit dem

3. Material und Methoden

unbewaffneten Auge. Nach Beendigung der Messungen wurden die Eindrücke in die Zementoberfläche mit einem Mikroskop bei 10facher Vergrößerung nachbeurteilt.

Tabelle 5: Charakteristika Gilmore-Nadeln

<i>Nadel</i>	<i>Gewicht:</i>	<i>Durchmesser:</i>
G1	113,398 g <i>(1/4 pound)</i>	2.117 mm <i>(1/12 inch)</i>
G2	453,592 g <i>(1 pound)</i>	1.106 mm <i>(1/24 inch)</i>

Vor Beginn der Messungen wurde die Klimakammer (Abb. 6) auf eine Temperatur von $37\pm 1^\circ\text{C}$ und eine Luftfeuchtigkeit von mehr als 90% gebracht. Hierfür wurde das Thermostat mit dem Zufluß der Bodenplatte und dem Abfluß der Wand verbunden und auf eine Temperatur von ca. $38\text{--}39^\circ\text{C}$ geregelt. Der Abfluß der Bodenplatte und Zufluß der Wand wurden ebenfalls miteinander verbunden. Zur Umwälzung der Luft wurden die beiden an der Deckelplatte der Kammer angebrachten Ventilatoren an eine Gleichstromquelle ($U=12\text{V}$) angeschlossen. Die Überwachung von Temperatur und Feuchtigkeit in der Kammer erfolgte durch ein Thermohygrometer. Um eine vollständige Durchwärmung der Apparatur zu gewährleisten, erfolgten die beschriebenen Maßnahmen 1 h vor Beginn der ersten Messung. Zum Anmischen der Zementmischungen wurde als flüssige Phase aqua ad injectabilia, Fa. Delta-Pharma/Pfullingen, verwendet. Die Mischung erfolgte reproduzierbar in Latex-Fingerlingen mit ein Vibrationsmischer (Thermolyne vibratory mixer Maxi mix II, Typ 37600, Fa. Barnstead, Iowa/USA) für 15 s. Zum Auspressen der Paste wurde mit Hilfe der Klammer das geschlossene Ende des Fingerlings zwischen den Rollen der Auspressapparatur befestigt. Durch Drehen der Rollen wurde die Zementpaste zum offenen Ende des Fingerlings hin gepreßt, mit Hilfe des Spatels in die vorgewärmte Probenform überführt und mit dem zylindrischen Ende des Spatels komprimiert. Durch Abziehen mit einem Glasobjektträger wurde die Zementoberfläche geglättet. Die befüllte Form wurde in die Apparatur eingebracht und die Markierung der Apparatur mit einem Teilstrich der Form in Übereinstimmung gebracht.

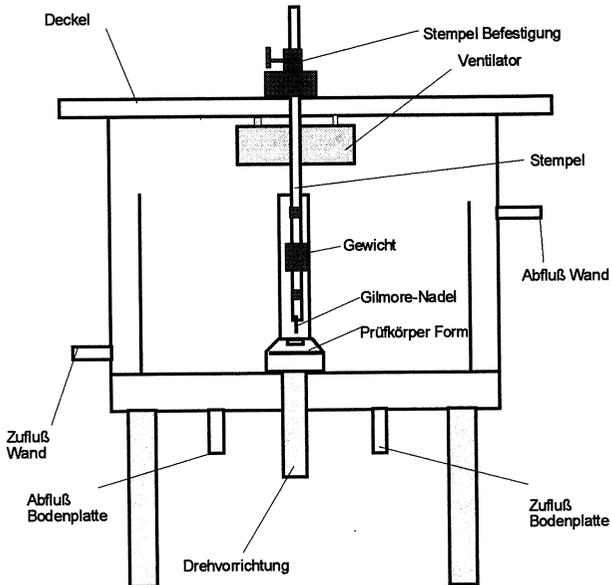


Abbildung 6: Feuchtigkeitskammer zur Bestimmung der Abbindezeiten

Die Zeit von Beginn des Anmischvorgangs bis zum Einbringen der Form in die Apparatur betrug maximal 1 min. Die Messung der Abbindezeit begann nach 4 min durch vorsichtiges Absenken der Gilmore-Nadel auf die Zementoberfläche; die Zeit und der durch die geschlossene Tür sichtbare Eindruck wurden notiert. Anschließend wurde die Form extern um 60° (nächster Teilstrich) gedreht und alle zwei Minuten eine weitere Messung vorgenommen. Die Zeit vom Beginn der Messung bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Nadel nicht mehr in die Oberfläche eindrang, wurde protokolliert. Für jede Charge wurde die Prüfung zweimal durchgeführt. Nach Beendigung der Messung wurde

3. Material und Methoden

der Prüfkörper vorsichtig aus der Form entnommen und jeder Eindruck mit Hilfe eines Auflichtmikroskops bei 10facher Vergrößerung nachbeurteilt.

3.3 Mechanische Testung der Zemente

Die Untersuchungen zu den mechanischen Eigenschaften der verschiedenen Calciumphosphatzement-Mischungen wurden statisch auf einem Materialprüfstand nach validierter Methode [102] durchgeführt. Bestimmt wurde die Druckfestigkeit (CS, compression strength) und diametrale Zugprüfung (DTS, diametral tensile strength) anhand zylindrischer Prüfkörper nach definierter Verdichtung der Zementpaste während der Herstellung und 24 h Aushärtung bei 37°C.

Prüfkörperherstellung

Die Prüfkörper für die unterschiedlichen und im folgenden beschriebenen Prüfmethoden wurden mit der gleichen Apparatur in Edelstahlprobenformen hergestellt. Der Außendurchmesser dieser Formen betrug 19 mm, die Länge 37 mm, die Bohrung hatte einen Durchmesser von 6 mm + 0.013 mm. Um die Paste verdichten zu können, wurden nach dem Befüllen Edelstahlruckstempel in die Bohrungen der Probenformen eingesetzt. Deren Durchmesser betrug 5.975 mm + 0.013 mm, die Länge 16 mm (Prüfkörper für DTS und Freisetzung) bzw. 25,4 mm (Prüfkörper für CS). Die Einwaage für eine Prüfung (jeweils 6 CS- bzw. DTS-Prüfkörper) erfolgte nacheinander; für CS-Prüfkörper wurden jeweils 800 mg, für DTS-Prüfkörper jeweils 200 mg ausgewogen.

Nach dem Positionieren der Probenform in der Hülse der Zementbefüllungsapparatur (Abb. 7) wurde ein 16 mm langer Stempel für die CS-Prüfkörper bzw. ein 25,4 mm langer Stempel für die DTS-Prüfkörper in die Form eingebracht. Anschließend wurde die jeweilige Flüssigkeitsmenge mit einer Pipette aufgenommen; ein Pulver/ Flüssigkeitsverhältnis von 3,3 : 1 erforderte bei 800 mg Zement 224 µl Flüssigkeit (aqua ad injectabilia), bei 200 mg Zement 56 µl Flüssigkeit. Die Flüssigkeit wurde dem Zement mit der Pipette bei minimaler Benetzung der Fingerling-Oberfläche zugegeben, der Fingerling mit der Klammer unter Minimierung des Luftvolumens verschlossen und für 15 s mit dem Vibrationsmischer gemischt. Anschließend wurde die Paste mit Hilfe des

3. Material und Methoden

Spatels in die Edelstahlprobenform eingebracht und mit dem zylindrischen Ende des Spatels komprimiert. Die Form wurde mit einem 16 mm Stempel verschlossen. Zur Bestückung der Zementverdichtungsapparatur wurden zunächst die Hülsen aus der Formfüllapparatur entfernt. Die Probenform wurde aus der Hülse entnommen und in die Zementverdichtungsapparatur überführt, der Hebelarm wurde mit Hilfe von Wasserwaage und Rändelschraube waagrecht ausgerichtet und das Vorgewicht von 1465 g (= 2.7 MPa Verdichtungsdruck) zum Verdichten des Zementes für 5 s an den Hebelarm angelegt. Hiernach erfolgte das Platzieren des Standardgewichts von 386 g (23 N) am Hebelarm und die waagrechte Ausrichtung des Hebels mit Hilfe der Rändelschraube; diese Arbeitsschritte sollten in 30 s abgeschlossen sein. Der gesamte Herstellungsvorgang durfte bis hier einen Zeitraum von 2 min nicht überschreiten. Die Beschickung der Apparatur wurde für jeden Prüfkörper einer Testserie wiederholt.

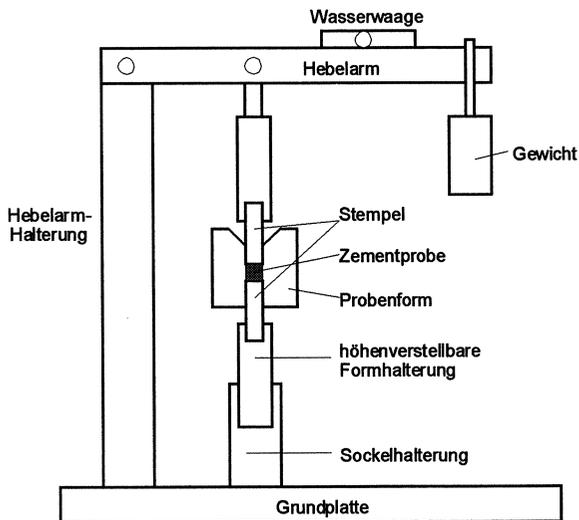


Abbildung 7: Zementbefüllungsapparatur

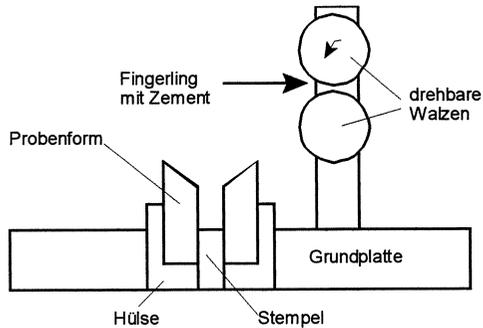


Abbildung 8: Formfüllapparatur

Die so präparierte Zementverdichtungsapparatur mit Formen, Zementprüfkörpern und Gewichten wurde für 4 h in ein Wasserbad bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit überführt. Anschließend wurden die Prüfkörper aus den Formen entfernt; hierzu wurden die Probenformen mit der konischen Öffnung nach unten in die zylindrische Vertiefung der Druckpresse positioniert; durch Drücken des Hebelarms der Druckpresse konnten die Prüfkörper aus der Form gedrückt werden. Die Prüfkörper wurden in Präparategläser überführt, gekennzeichnet und mit einer definierten Menge CPC-gesättigter Lösung überschichtet (DTS-Prüfkörper mit 0,5ml Lösung, CS-Prüfkörper mit 2,0ml Lösung überschichtet). Die Präparategläser mit den Prüfkörpern wurden für weitere 20 h bei 37°C im Wasserbad gelagert.

Mechanischer Test von DTS-Prüfkörpern

Durchmesser und Länge der Prüfkörper wurden auf ± 0.01 mm mit einer Feinschieblehre bestimmt, das Gewicht der Prüfkörper wurde auf ± 0.0001 g mit einer Laborwaage ermittelt und die Werte im Prüfprotokoll festgehalten. Die statische Material-Prüfmaschine war mit planen Edelstahlstempeln auf der oberen und unteren Seite ausgestattet, diese wurden mit feuchtem Filterpapier abgedeckt. Anschließend wurden die DTS-Prüfkörper auf der Mantelfläche zwischen den Stempeln positioniert. Die

3. Material und Methoden

Prüfung erfolgte mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 10 mm/min bis zum Bruch des Prüfkörpers. Die Bruchkraft und der Bruchverlauf jedes Prüfkörpers wurde im Prüfprotokoll festgehalten. Nur Prüfkörper mit DTS-Bruchverlauf wurden zur Berechnung der Zugfestigkeit herangezogen, fehlerhafte Prüfkörper wurden im Protokoll vermerkt. Die diametrale Zugfestigkeit jedes Prüfkörpers wurde berechnet nach:

$$\text{DTS [MPa]} = 2F_{\text{max}} / (\Delta d l) \quad (1)$$

mit F_{max} = Bruchkraft (N)
 d = Prüfkörperdurchmesser (mm)
 l = Prüfkörperlänge (mm)

Mechanische Prüfung von CS-Prüfkörpern

Die Prüfkörper wurden nach dem gleichen Prinzip wie bei der DTS-Prüfung zunächst vermessen und gewogen, die Werte wurden im Prüfprotokoll festhalten.

Die CS-Prüfkörper wurden auf der Zylindergrundfläche zwischen die mit feuchtem Filterpapier abgedeckten Stempeln positioniert, die Prüfung erfolgte mit einer Vorschubgeschwindigkeit von nur 1 mm/min bis zum Bruch des Prüfkörpers. Die Bruchkraft wurde ebenso wie Unregelmäßigkeiten im Prüfprotokoll vermerkt. Die Druckfestigkeit jedes Prüfkörpers wurde berechnet nach:

$$\text{CS [MPa]} = 4F_{\text{max}} / (\Delta d^2) \quad (2)$$

mit F_{max} = Bruchkraft (N)
 d = Prüfkörperdurchmesser (mm)

3. Material und Methoden

3.4 Bestimmung der Freisetzungskinetik der Antibiotika

Prüfkörper zur Bestimmung der freigesetzten Wirkstoffmenge

Die Herstellung der Prüfkörper zur Charakterisierung der Freisetzungskinetik der verschiedenen Wirkstoffe erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die CS- und DTS-Prüfkörperherstellung. Der Zement wurde mit jedem zu testenden Antibiotikum als Pulver/Pulvermischung versetzt. Es wurden Mischungen mit 1, 2 und 5 Gew.% Antibiotikum hergestellt. Die Prüfkörper bestanden aus 500 mg Pulvermischung und 140 µl aqua ad injectabilia. Von jeder Konzentration wurden je 3 Prüfkörper hergestellt, die allerdings nur 2 h im oben beschriebenen Wasserbad in der Zementverdichtungsapparatur belassen wurden. Nach 2 h wurden die Prüfkörper in gekennzeichnete Präparatgläser¹ eingelegt, die 10 ml PBS-Puffer enthielten. Die Gläser mit den 5%igen Prüfkörpern mit Augmentan, Clindamycin und Vancomycin mußten aus meßtechnischen Gründen mit 20 ml PBS-Puffer befüllt werden.

Die Auslagerung der zur Untersuchung der Diffusion der Antibiotika hergestellten Prüfkörper erfolgte in physiologischer, phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit pH 7,4 (PBS). Die Herstellung von PBS erfolgte nach folgender Zusammensetzung:

PBS-Pufferlösung pH 7,4:

8,0 g Natriumchlorid NaCl, Fa. Merck

0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 , Fa. Merck

2,8 g Dinatriumhydrogenphosphat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ Fa. Merck

0,2 g Kaliumchlorid KCL, Fa. Merck

ad 1000 ml Reinstwasser, ½ h bei 121°C autoklavieren (Autoklav Typ 3870 ELV, Fa. Duttnauer)

Um die Temperatur während der Auslagerung zur Diffusionsmessung konstant zu halten, wurden die in 10 und 20 ml Glasgefäßen liegenden Prüfkörper in einem Inkubationsschrank (Fa. Memmert/Schwabach) bei 37°C aufbewahrt. Um die Lösung in

¹ Bspl.: V23 bedeutet :Vancomycin 2% Prüfkörper 3, sh. auch Anhang: Ergebnisse

3. Material und Methoden

Bewegung zu halten wurde ein Rüttler (Typ L-40, GFL, Fa. Hartenstein/Würzburg) in dem Inkubationsschrank installiert, auf welchem die Glasgefäße während der Auslagerung standen.

Zur Ermittlung der freigesetzten Wirkstoffmengen wurde die PBS-Lösung aus diesen Glasgefäßen in regelmäßigen Intervallen mit einem UV-Spektrometer (CARY-1 uv-visible spectrophotometer, Fa. Varian/Australia) vermessen. Als Küvetten dienten Quarzglasküvetten (Hellma® Präzisionsküvetten Suprasil®, Typ 104-QS, Schichttiefe 10,00 mm, Ausmessung K 283). Nach 5, 30 und 60 min, 2, 4 und 8 h, 1, 2, 4, 7, 14 und 28 Tagen wurde die Extinktion der jeweiligen Lösung mit dem Spektrophotometer bestimmt. Es wurden je 3 Messungen durchgeführt, der PBS-Puffer wurde nicht ausgetauscht und nach den Messungen wieder in die entsprechenden Gläser zurückpipettiert. Aus den Mittelwerten wurde die Konzentration (C in mg/ml) des Antibiotikums in der PBS-Lösung berechnet.

$$C = E/m_x \quad (3)$$

mit E = Extinktion

m_x = Steigung der Eichgeraden des jeweiligen Antibiotikums

Auf den jeweiligen Prüfkörper und das Volumen der PBS-Lösung bezogen, konnte daraus der prozentuelle Anteil der freigesetzten Menge von der dem Prüfkörper ursprünglich zugesetzten Gesamtmenge des Wirkstoffes berechnet werden.

$$\text{Anteil [\%]} = E/m_x \times m_p/m_{\text{pges}} \times V_{\text{PBS}}/m_{\text{AB}} \times 100 \quad (4)$$

mit m_p = Masse des abgebundenen Prüfkörpers

m_{pges} = Masse des Prüfkörpers nach dem Anrühren (immer 640 mg)

V_{PBS} = Volumen des PBS-Puffers

m_{AB} = Masse des zugesetzten Antibiotikums (5, 10 und 25 mg)

3. Material und Methoden

Gemessen wurde bei den Wellenlängen mit den jeweils charakteristischen Extinktionsmaxima. Diese wurden für die vier untersuchten Antibiotika mittels einer nicht übersättigten Lösung (PBS und Antibiotikum, $C = 0,5 \text{ mg/ml}$) ermittelt.

Augmentan®:	$\lambda = 273 \text{ nm}$
Clindamycin:	$\lambda = 208 \text{ nm}$
Gentamicin:	$\lambda = 246 \text{ nm}$
Vancomycin:	$\lambda = 269 \text{ nm}$

Mit Hilfe dieser Extinktionsmaxima wurden Eichgeraden erstellt. Hierzu wurden Lösungen a 10 ml mit 0,1; 0,25; 0,75; 1; 2; 3 und 4 mg/ml des jeweiligen Antibiotikums hergestellt und vermessen. Aus den Ergebnissen konnten die Eichgeraden (Abb. 10 bis 13) und daraus wiederum die Steigungen m_x und die maximalen Konzentrationen C_{\max} abgeleitet werden, bis zu welchen die Extinktionen linear anstiegen und die damit die meßtechnisch relevanten oberen Grenzwerte bildeten.

Augmentan®:	$C_{\max} = 1,25 \text{ mg/ml}$
Clindamycin:	$C_{\max} = 0,50 \text{ mg/ml}$
Gentamicin:	$C_{\max} = 2,50 \text{ mg/ml}$
Vancomycin:	$C_{\max} = 1,00 \text{ mg/ml}$

Zusammen mit maximal 25 mg Antibiotikum/Prüfkörper (bei 500 mg Trockengewicht = 5%) ergaben sich die unterschiedlichen Volumina PBS, in denen die Prüfkörper ausgelagert wurden:

10 ml für Augmentan® 1%, 2%; Gentamicin 1%, 2%, 5%; Vancomycin 1%, 2%
20 ml für Augmentan® 5%, Vancomycin 5%

Um auch für Clindamycin 10 ml (1%, 2%) und 20 ml (5%) Gläser verwenden zu können, wurde das Trockengewicht der Prüfkörper auf 200 mg und damit die enthaltene

3. Material und Methoden

Wirkstoffmenge auf max. 10 mg reduziert, um einen linearen Anstieg der Extinktion zu gewährleisten.

3.5 Sonstige Charakterisierungsmethoden

Die Untersuchung der Morphologie der verschiedenen ausgehärteten Zementmatrices erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop DSM 940, Fa. Zeiss/Oberkochen, die Phasenzusammensetzungen wurden mit einem Röntgendiffraktometer D5005, Fa. Siemens/Karlsruhe ermittelt. Zeta-Potential Messungen an den Calciumphosphat-Partikeln erfolgte mit einem Zeta-Sizer 3000, Fa. Malvern/Herrenberg in wässriger Lösung ohne und mit Zusatz der Antibiotika.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war, die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Calciumphosphatzement in Kombination mit Antibiotika verschiedener Wirkungsweisen zu untersuchen. Bereits das Anmischverhalten der verschiedenen Kombinationen unterscheidet sich teilweise stark von dem reinen Calciumphosphatzements. Entscheidend für den chirurgischen Einsatz sind neben den rheologischen Eigenschaften auch die Abbindezeiten, die erreichbare Endfestigkeit und vor allem die Freisetzungskinetik der beigefügten Pharmaka.

4.1 Initiale Abbindezeit nach Gilmore

Der Zusatz von 1-5 Gew.% Antibiotikum zur Trockenmasse beeinträchtigt im Fall von Vancomycin und Augmentan® die Abbindezeit nur unwesentlich; bei Zusatz von Clindamycin verkürzt sich die Abbindezeit erheblich.

Tabelle 6: Initiale Abbindezeiten

<i>Antibiotikum</i> <i>Abbindezeit [min]</i>	Augmentan®	Clindamycin	Gentamicin	Vancomycin
1 Gew.%	16	9	18	16
2 Gew.%	16	7	22	16
5 Gew.%	16	5	26	18
Referenz Calciumphosphatzement ohne Antibiotikum: Abbindezeit 16 min				

Deutliche Verlängerungen ergeben sich bei Zusatz von Gentamicinsulfat. Je höher der Anteil am Trockengewicht, desto langsamer bindet der Zement ab. Gleichzeitig verändern sich die rheologischen Eigenschaften. Die mit Gentamicinsulfat versetzten Pasten verflüssigen makroskopisch bei gleichem PL-Verhältnis stark, hierunter leidet die Verarbeitbarkeit. Ein gezieltes Modellieren und Auffüllen der Probenformen war nur erschwert möglich.

4. Ergebnisse

4.2 Mechanische Eigenschaften der Zemente

Die Veränderungen in der kristallinen Struktur beeinflussen auch die anwendungsrelevanten Eigenschaften der einzelnen Mischungen. Der Zusatz von 5 Gew.% Clindamycin, Gentamicin und Vancomycin verändert die Abbindezeiten und die mechanischen Eigenschaften am deutlichsten (Tab. 6 - 8).

Tabelle 7: Druckfestigkeiten von Calciumphosphatzement mit Antibiotika

<i>Zement-Modifikation</i>	<i>Druckfestigkeit [MPa] mit</i>		
	1%	2%	5%
Calciumphosphatzement ohne Zusatz	64,9 ± 5,1		
Augmentan®	65,2 ± 5,3	57,8 ± 3,0	59,8 ± 4,7
Clindamycin	56,0 ± 9,0	47,1 ± 7,1	39,5 ± 4,0
Gentamicin	64,5 ± 5,2	51,8 ± 7,5	40,5 ± 5,1
Vancomycin	60,0 ± 5,6	64,9 ± 6,9	38,4 ± 7,5

Tabelle 8: Zugfestigkeiten von Calciumphosphatzement mit Antibiotika

<i>Zement-Modifikation</i>	<i>Zugfestigkeit [MPa] mit</i>		
	1%	2%	5%
Calciumphosphatzement ohne Zusatz	7,3 ± 0,8		
Augmentan®	6,2 ± 0,8	6,9 ± 0,9	6,3 ± 1,3
Clindamycin	7,0 ± 0,9	7,3 ± 0,8	5,5 ± 1,0
Gentamicin	6,9 ± 1,2	7,0 ± 0,7	4,5 ± 1,0
Vancomycin	7,4 ± 0,8	6,5 ± 1,5	5,0 ± 1,3

Der nicht mit Wirkstoff beladene Zement weist eine Druckfestigkeit von etwa 65 MPa und eine diametrale Zugfestigkeit von 7 MPa nach 24 h Aushärtung auf. Durch Modifikation mit jeweils einem Prozent Antibiotikum verändern sich die Festigkeitswerte nicht dramatisch. Bei Zusatz von 2-5 Gew.% verringert sich die Druckfestigkeit um bis zu 26,6 MPa (5% Vancomycin), die Zugfestigkeit geht um bis zu 2,5 MPa (5% Gentamicin) zurück. Neben der starken Verflüssigung bei 2% / 5% Gentamicinzusatz und der verzögerten Abbindereaktion kommt es bei einem Zusatz von 5% Antibiotikum generell zu einer signifikanten Verschlechterung der Festigkeitswerte, die bis auf die

4. Ergebnisse

Mischungen mit Augmentan® die Anforderungen an die gewünschte Stabilität nicht zufriedenstellend erfüllen. Der Zusatz von bereits 1% Clindamycin verringert die Druckfestigkeit um etwa 14%, 5 Gew.% Zusatz reduzieren diesen Wert um ca. 40% im Vergleich zur Antibiotikum-freien Mischung. Ähnlich verschlechtern sich die Werte für die diametrale Zugfestigkeit.

4.3 Partikelladung (Zeta-Potential) nach Wirkstoffmodifikation

Durch den Zusatz von Antibiotikum ändern sich die Zeta-Potentiale der verschiedenen Calciumphosphatpartikel. Durch die eingebrachten Sulfatgruppen bei Zusatz von Gentamicin wurde die Umkehr des Zeta-Potentials und eine positive Aufladung der Partikeloberflächen erreicht. Die drei anderen Antibiotika bewirkten keine Ladungsumkehr aber eine teilweise deutliche Verstärkung des Potentials (Tabelle 4).

Tabelle 9: Zeta-Potentiale verschiedener Calciumphosphatpartikel in wässriger Phase

Calciumphosphat	Zeta-Potential [mV]			
	Wasser	Gentamicin	Vancomycin	Augmentan®
Calciumhydrogenphosphat	-18,4	19,3	-15	-23,9
Tetracalciumphosphat	-15	10,6	-8,2	-16,6
Hydroxylapatit, gefällt	-1,5	14,9	-0,5	-13,8

4.4 Zementmorphologie und Phasenzusammensetzung nach Aushärtung

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß die nadelartigen Kristalle (0.5-1 µm Länge, 50-100 nm Durchmesser, Abb. 9) von abgebundenem Calciumphosphatzement bei Zusatz von Gentamicin clusterartig verdichtet vorliegen und große Poren bilden (Abb. 10). Ähnliche Strukturen weisen auch die abgebundenen Zemente auf, die mit je 5 Gew.% Augmentan und Vancomycin versetzt wurden (Abb.11, 12).

4. Ergebnisse

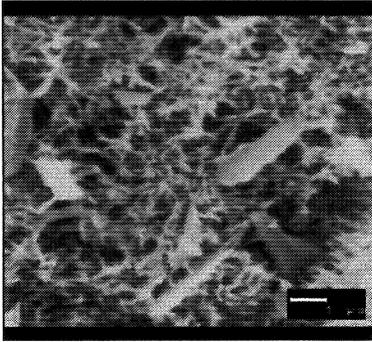


Abbildung 9: kristalline Struktur von Calciumphosphatzement

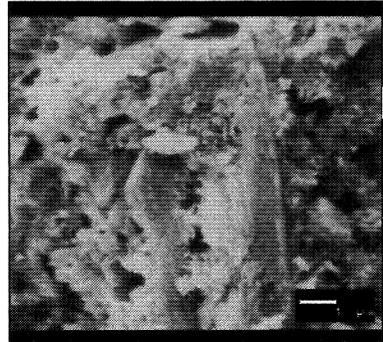


Abbildung 10: Calciumphosphatzement mit 5% Gentamicinsulfat

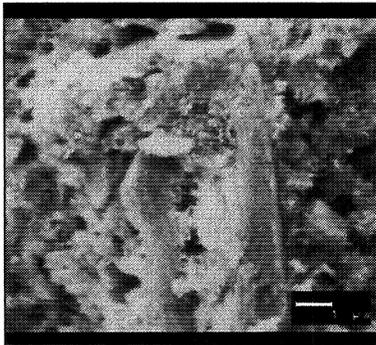


Abbildung 11: Calciumphosphatzement mit 5% Augmentan

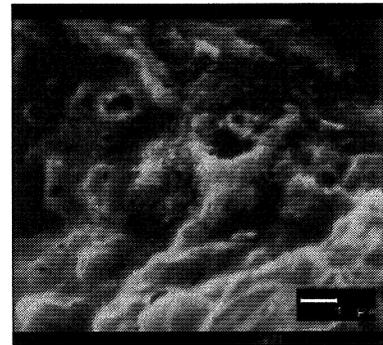


Abbildung 12: Calciumphosphatzement mit 5% Vancomycin

Anhand von Röntgendiffraktogrammen können in allen untersuchten Zementmischungen Hydroxylapatit geringer Kristallinität als Reaktionsprodukt anhand der charakteristischen Beugungsreflexe bei $2\theta = 25.9$ und $21-35^\circ$ sowie Anteile nicht reagierten Tetracalciumphosphats über die Reflexe bei ca. $2\theta = 29^\circ$ nachgewiesen werden (Abb. 16). Der Zusatz der verwendeten Antibiotika führt also

4. Ergebnisse

offensichtlich nicht zu einer Inhibition der Abbindereaktion, wohl aber zu einem geänderten Wachstumsverhalten der Hydroxylapatitkristalle. Dies kann mit den durch die beigegebenen Antibiotika unterschiedlich stark veränderten Oberflächenladungen der Zementpartikel in flüssiger Phase begründet werden. Das Zeta-Potential der Hydroxylapatitoberfläche liegt ohne Antibiotikazusatz nahe Null, es findet während des Präzipitationsvorgangs keine gegenseitige elektrostatische Abstoßung der Kristallite statt. Resultat ist eine fein vernetzte, filzähnliche Struktur von nadelartigen Kristallen mit ca. 0,5-1 μm Länge und 50-100 nm Durchmesser. Eine Aufladung führt zu elektrostatischer Abstoßung und damit letztendlich zu einem geänderten Kristallwachstum. Besonders deutlich wird das im Fall von Gentamicin, hier werden die Partikeloberflächen positiv geladen. Es bildet sich eine großporige, clusterförmige Textur, in der nurmehr verbackene Kristalle gefunden werden können. Ein ähnliches Wachstumsmuster läßt sich bei Zusatz von Augmentan und Vancomycin beobachten. Augmentan verändert die Struktur im Endergebnis dabei am geringfügigsten.

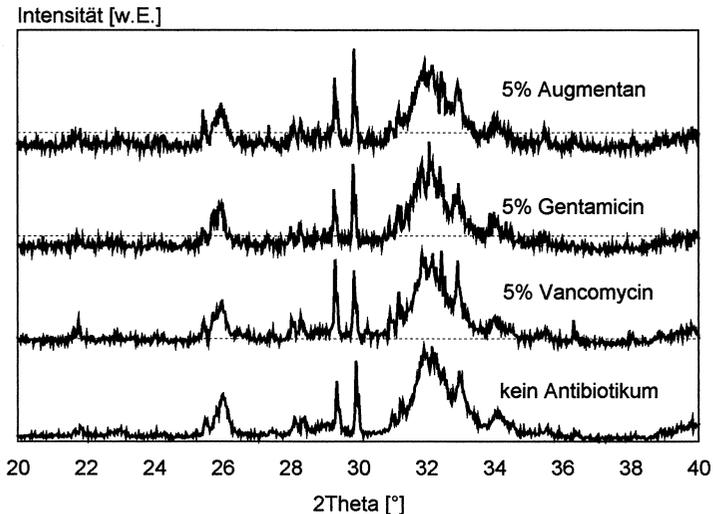


Abbildung 13: Röntgendiffraktogramme von ausgehärtetem CPC nach Zusatz verschiedener Antibiotika

4. Ergebnisse

4.5 Freisetzungsverhalten der Antibiotika

Zur Bestimmung der aus den Prüfkörpern freigesetzten Menge Antibiotikum wurde die Extinktion (E) der Auslagerungslösungen bestimmt. Um hieraus wiederum die Konzentration (C [mg/ml]) und damit die Menge Antibiotikum in mg ausrechnen zu können, waren Eichgeraden zur Bestimmung der Geradensteigung (m) nötig.

$$E=C/m \quad (5)$$

mit $m=\Delta x/\Delta y$

Die Extinktionen der vier vermessenen Antibiotika sind in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Steigung der Eichgeraden und linearer Bereich

Antibiotikum	Augmentan®	Clindamycin	Gentamicin	Vancomycin
$m=\Delta x/\Delta y$	2,7057	4,4917	0,1687	2,9738
Extinktionsmaximum λ [nm]	273	208	246	269
Bereich linearer Anstieg von E	0-1,0 mg/ml	0-0,5 mg/ml	0-2,0 mg/ml	0-1,0 mg/ml

Die stärkste Extinktion und damit den engsten Meßbereich hat Clindamycin. Es hat eine rund 26fach höhere Extinktion als Gentamicin, welches den größten Meßbereich mit der geringsten Standardabweichung (SD) aufweist. Augmentan® und Vancomycin haben ein zueinander ähnliches Absorbitionsverhalten sowie einen vergleichbaren Meßbereich. Die experimentell ermittelten Eichgeraden sind in Abbildung 13-16 dargestellt.

Neben den Veränderungen der anwendungsrelevanten Parameter wie Abbindezeit und Endfestigkeit wirken sich die strukturellen Unterschiede im Kristallaufbau auch auf die Freisetzungskinetik der einzelnen Antibiotika aus. Während des Beobachtungszeitraums von 32 Tagen wurden zwischen 12% (Vancomycin 5%) und 62% (Gentamicin 1%) des enthaltenen Antibiotikums abgegeben.

4. Ergebnisse

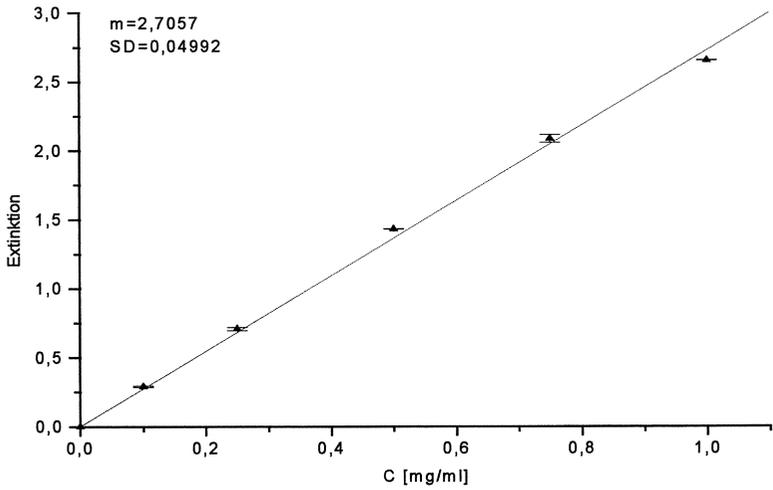


Abbildung 14: Eichgerade Augmentan®

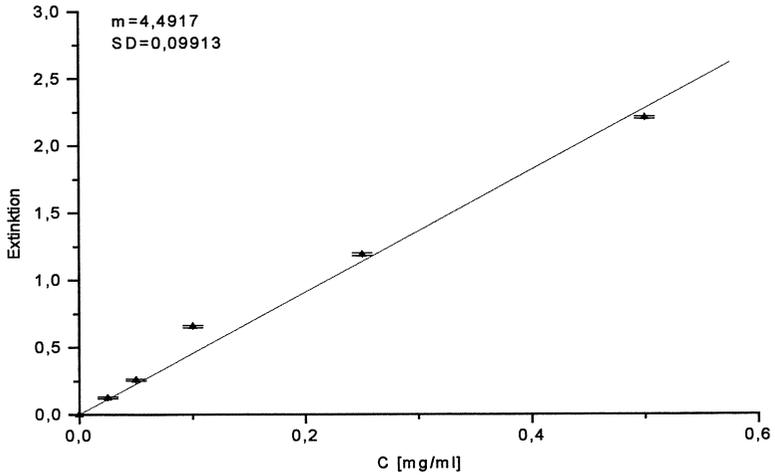


Abbildung 15: Eichgerade Clindamycin

4. Ergebnisse

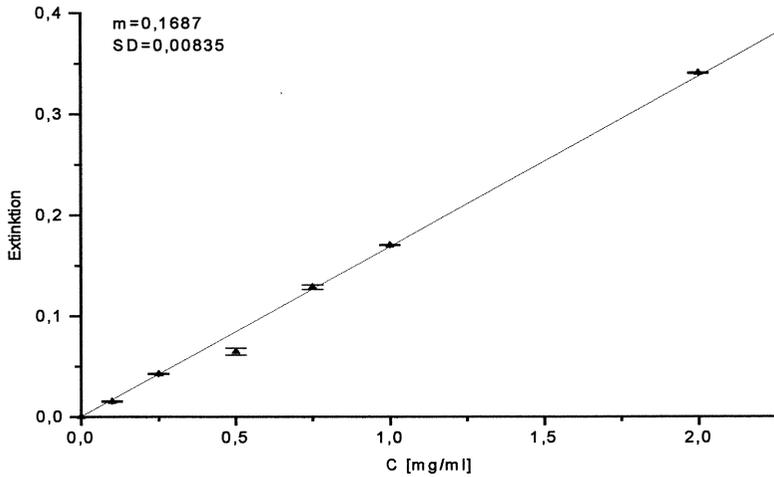


Abbildung 16: Eichgerade Gentamicin

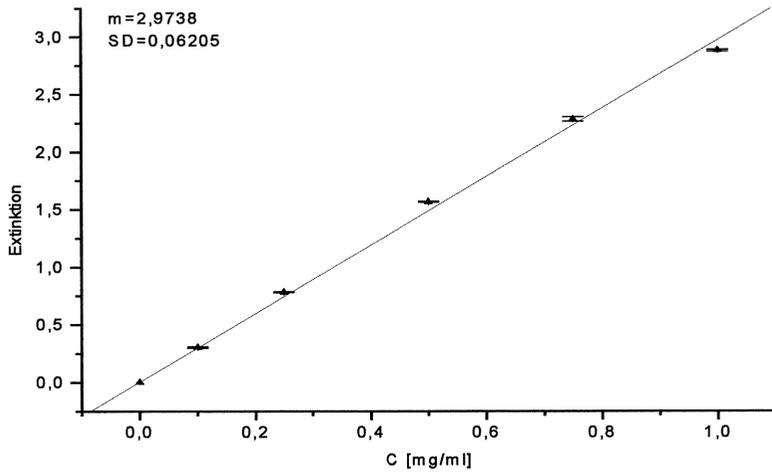


Abbildung 17: Eichgerade Vancomycin

4. Ergebnisse

Gentamicin wurde in allen Konzentrationsstufen sehr schnell und viel freigesetzt (Abb. 17). In den ersten 4 Stunden gaben die Prüfkörper durchschnittlich 18-32% der enthaltenen Menge an Gentamicin an die Pufferlösung ab. Nur die mit 1% Augmentan® beschickten Prüfkörper setzten über einen initialen Zeitraum von 10 Stunden mit 34% geringfügig mehr Wirkstoff frei.

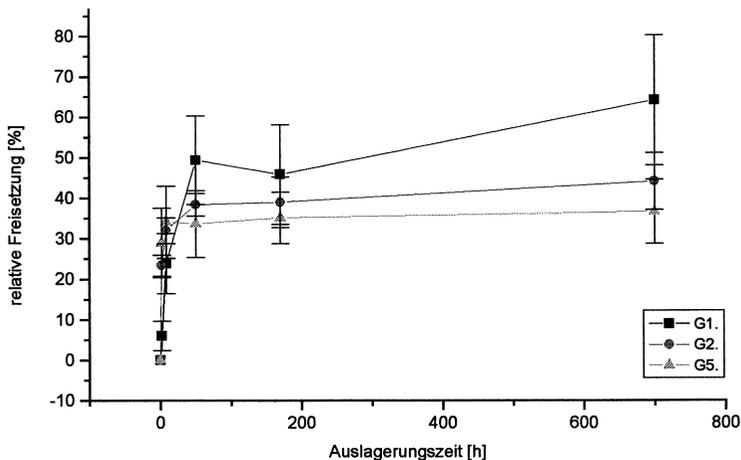


Abbildung 18: Freisetzung von Gentamicinsulfat aus Calciumphosphatzement in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung

Der bereits in anderen Studien beobachtete initiale Burst [14, 103] trat auch bei der hier verwendeten Zementmischung auf. Offensichtlich wird durch die höhere Porosität und damit größere Oberfläche der mit Gentamicin versetzten Prüfkörper die Diffusion der Wirkstoffe erleichtert. Dem gegenüber steht die vergleichsweise hohe Schwankung der Wirkstofffreisetzung bei Gentamicin. Die entstehenden Poren sind scheinbar nicht gleichmäßig über die Oberflächen der Prüfkörper verteilt. Die initial hohe Freisetzung konnte auch im Fall von Augmentan® (Abb. 18) und Clindamycin (Abb.19) beobachtet werden.

4. Ergebnisse

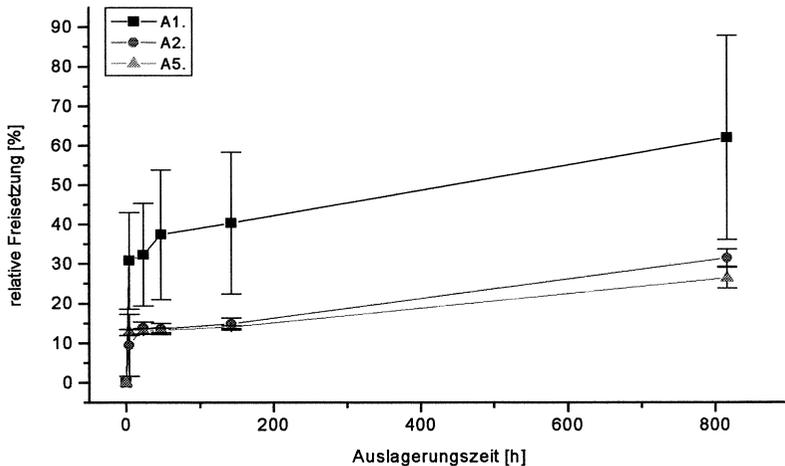


Abbildung 19: Freisetzung von Augmentan[®] aus Calciumphosphatzement in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung

Die Struktur des abgebandenen, mit Augmentan[®] versetzten Zements ähnelt der von Gentamicin-beladenem Zement. Die Porosität und auch die Verteilung der Poren bewirkt hier ähnliche Effekte hinsichtlich Burst und Freisetzungsschwankungen. Augmentan[®] wurde gegen Ende des Beobachtungszeitraums gleichmäßiger abgegeben als Gentamicin. Zwischen Tag 37 und 155 diffundierten nurmehr 3-8% Gentamicin im Gegensatz zu 4-25% Augmentan[®] in die Pufferlösung.

Die vergleichsweise niedrigste Freisetzungsrates weist Vancomycin auf. Nach 10 Tagen waren erst 5-14% und nach 150 Tagen 14-25% des Antibiotikums aus dem Zement abgegeben worden. Auch initial wird Vancomycin in deutlich geringerem Maß abgegeben als die drei anderen Antibiotika. Nach 2 Stunden waren erst 4-10% nachweisbar. Annähernd derselbe Prozentsatz (4-7%) war bei Clindamycin bereits nach 5 Minuten in der Pufferlösung meßbar. Der Zusatz von Vancomycin bewirkt ebenfalls eine clusterartige, porige Struktur im abgebandenen Zement (vgl. Abb. 19). Trotz dieser

4. Ergebnisse

Struktur wurde das Makromolekül Vancomycin (vgl. Abb. 5) deutlich schlechter freigesetzt als die übrigen untersuchten Antibiotika. Inwiefern die Größe und der Aufbau (Molekulargewicht $\approx 1500\text{Da}$, trizyklisches Glykopeptid [104]) die Freisetzung beeinflussen, ist nicht bekannt.

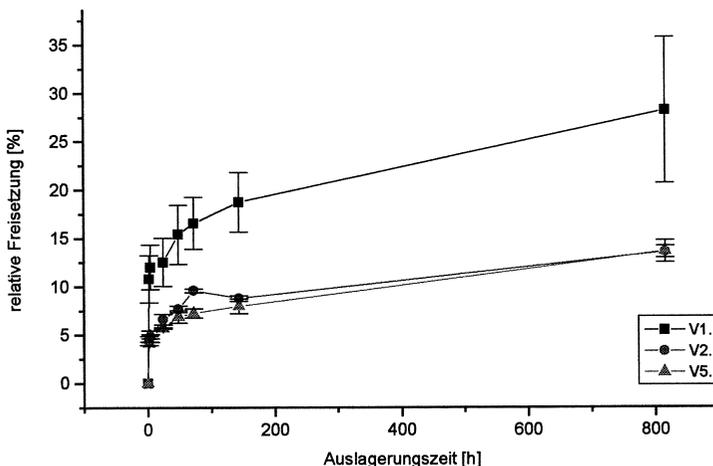


Abbildung 20: Freisetzung von Vancomycin aus Calciumphosphatzement in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung

Clindamycin wird initial am schnellsten freigesetzt (Abb.20). Nach 5 Minuten Auslagerungszeit waren bereits zwischen 4% und 7% des Gesamtgehaltes abgegeben. Wie bei Augmentan[®] und Gentamicin stagnierte die Freisetzung nach 24 Stunden. Zwischen dem 2. und 36. Tag wurde nur noch 2-5% Clindamycin freigesetzt. Zusammenfassend konnte bei Augmentan[®], Clindamycin und Gentamicin eine initial schnelle und hohe Freisetzung beobachtet werden. Gegen Ende des Beobachtungszeitraums waren zwischen 31% (Clindamycin) und 49% (Gentamicin) des Gesamtgehaltes an Antibiotikum aus den Prüfzylindern in die PBS-Lösung diffundiert. Allen drei Freisetzungsgängen gemeinsam ist ein annähernd exponentieller Verlauf mit einer nicht

4. Ergebnisse

vollständigen Abgabe der Gesamtmenge an zugesetztem Wirkstoff. Auch Vancomycin weist eine annähernd exponentielle Freisetzung auf. Es fehlt hier jedoch der ausgeprägte initiale Burst und der steile Konzentrationsanstieg innerhalb der ersten 24 Stunden.

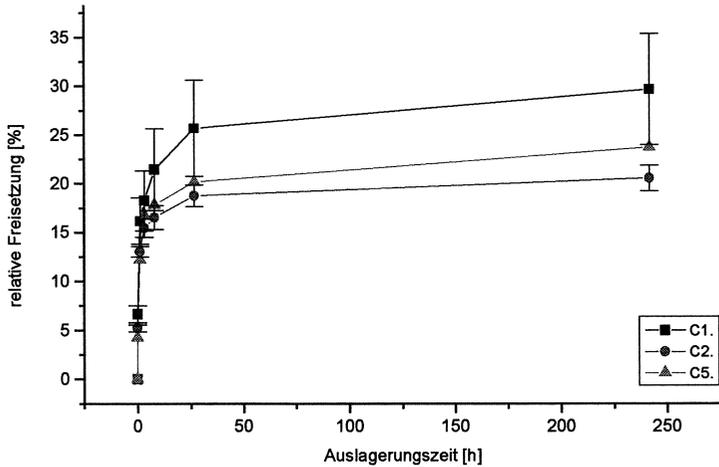


Abbildung 21: Freisetzung von Clindamycin aus Calciumphosphatzement in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung

5. Diskussion

Gegenstand der Arbeit war die Modifikation eines Apatit-bildenden Calciumphosphatzements aus basischem Tetracalciumphosphat und saurem Calciumhydrogenphosphat mit verschiedenen, klinisch für die Therapie einer Osteomyelitis relevanten Antibiotika. Der Zusatz diverser Pharmaka zu Calciumphosphatzementen verschiedenster Zusammensetzung zur Schaffung eines drug-delivery-Systems wurde bereits mehrfach untersucht [15, 82-86, 88-96, 98-100, 106-108]. Die Kombination von CPC mit Antibiotika führte, wie auch in der vorliegenden Arbeit nachweisbar, zu einer Wechselwirkung der wasserlöslichen Salze mit der Abbindereaktion der Zemente, verbunden mit Änderungen der Zementstruktur und den anwendungsrelevanten Eigenschaften.

Die Wechselwirkung von Halogenen, speziell Chlorid, auf das Abbindeverhalten von Calciumphosphatzementen und die Beeinflussung ihrer mechanischen Eigenschaften war Gegenstand einer Untersuchung von A. Ratier et al.[83]. Der in dieser Studie verwendete Zement war eine Mischung aus TTCP und α -TCP, der mit Phosphorsäure angemischt wurde (Cementek®, TEKNIMED - France). Als Antibiotikum wurde Tetracyclin zugesetzt, das von Calciumphosphaten stark adsorbiert wird. Tetracyclin wird üblicherweise als gut wasserlösliches Hydrochlorid verabreicht, es führt bei Einnahme während der Mineralisation der zweiten Dentition durch die Adsorption an Calciumphosphaten zu einer graugelblichen Verfärbung der bleibenden Zähne. Neben der üblichen Hydrochloridverbindung wurde in dieser Arbeit Tetracyclin auch als Trihydrat eingesetzt. Hierzu wurde das Tetracyclin-Hydrochlorid in einer gesättigten Calciumsulfatlösung gelöst, 15 h gerührt, das Präzipitat abgefiltert und getrocknet. Im Vergleich konnte dem verwendeten Zement die 7-fache Menge an Tetracyclin zugesetzt werden, wenn das Hydrochlorid zuvor mit Calciumsulfat in das Trihydrat umgesetzt wurde. Vergleichsparameter waren die diametrale Zugfestigkeit, Druckfestigkeit und die Bildung der HaP-Kristalle in der Zementmatrix. Die mechanischen Eigenschaften der mit Tetracyclinhydrochlorid versetzten Proben waren insgesamt schlechter als diejenigen der Chloridionen-freien Proben. Die Autoren führen dies auf die Gegenwart der

5. Diskussion

Halogen-Ionen zurück. Normalerweise bildet sich Hydroxylapatit über zwei Zwischenschritte. Zunächst entsteht Brushit (DCPD), dann Octocalciumphosphat (OCP) und schließlich Hydroxylapatit. Die Anwesenheit der Chlorid-Ionen führt zu einer direkten Bildung von Hydroxyhalogenapatit ohne OCP-Bildung. Der so entstehende Apatit besitzt nicht dieselben mechanischen Eigenschaften wie reiner HaP. Bei der Verwendung weitgehend chloridfreien Tetracyclins konnten die Autoren bis zu einem Zusatz von 7% nur geringfügige Verschlechterungen bei den CS- und DTS-Werten und ein nur geringfügig verlangsames und verändertes Kristallwachstum von HaP nachweisen. Nicht untersucht wurde in dieser Studie das Freisetzungsverhalten des veränderten Tetracyclins, ebenso wurde die für eine Freisetzung über Diffusion notwendige Wasserlöslichkeit nicht berücksichtigt oder mit der des Hydrochlorids verglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit aufgetretenen Veränderungen bei Zusatz von Vancomycin, Clindamycin und Gentamicin können ebenso auf die Anwesenheit freier Chlorid- und Sulfat-Ionen und deren Einbau in die wachsenden Kristalle während der Abbindezeit zurückgeführt werden. Beobachtet wurden für alle drei Wirkstoffe eine Verringerung der Druckfestigkeit um bis zu 40% nach Modifikation mit 5 Gew.% des Antibiotikums, teilweise verbunden mit drastischen Änderungen der rheologischen Eigenschaften der Zementpaste und einer Verlängerung der Abbindezeit (Gentamicin-Sulfat). Demgegenüber wurden bei der Verwendung von Augmentan® nur geringfügige Änderungen der anwendungsrelevanten Zementeigenschaften beobachtet. Die beiden in Augmentan® enthaltenen Pharmaka Amoxicillin und der β -Laktamase-Hemmer Clavulansäure liegen hier als Natrium- bzw. Kaliumsalz vor. Die freiwerdenden Natrium- und Kalium-Ionen beeinflussen das Kristallwachstum in der Zementmatrix offensichtlich weit weniger als Halogen- und Chalkogenionen (vgl. Abb. 9-12). Die Zeta-Potentiale der Edukte TTCP und DCPD verändern sich nur vergleichsweise geringfügig bei Zusatz von Augmentan® und die Abbindezeit bleibt in allen Konzentrationsstufen unbeeinflusst (vgl. Tab. 2, 3). Die Ionen reagieren zu NaOH und KOH und werden über die PBS-Lösung gepuffert.

5. Diskussion

Die Wechselwirkung der Antibiotika mit den im Zement enthaltenen Calciumphosphaten nimmt ebenfalls Einfluß auf das Freisetzungsverhalten der Wirkstoffe. Abbildung 21 zeigt für eine Konzentration von 2 Gew.% des Wirkstoffs die Freisetzungsprofile der einzelnen Antibiotika im Vergleich. Während Gentamicin über den Beobachtungszeitraum von 4 Wochen mit einer Gesamtmenge von nahezu 50% des eingesetzten Wirkstoffs freigesetzt wird, werden für die anderen Wirkstoffe teilweise nur Freisetzungsmengen von 12-27% gemessen. Diese verhältnismäßig geringe Absolutfreisetzung steht im Widerspruch zu Ergebnissen der Literatur, bei denen oftmals eine nahezu quantitative Freisetzung über den Beobachtungszeitraum erfolgte. Böhner et al. erzielten mit einer Mischung aus β -TCP und MCPM in Kombination mit Gentamicinsulfat und Polyacrylsäure eine Freisetzung von 58-100% innerhalb der ersten 2 Tage [84]. M. Benoit et al. fanden für die Kombination von Plaster of Paris (Calciumsulfat-Hemihydrat) mit Vancomycinhydrochlorid einen Bursteffekt mit mehr als 70% Freisetzung innerhalb des ersten Tages [100].

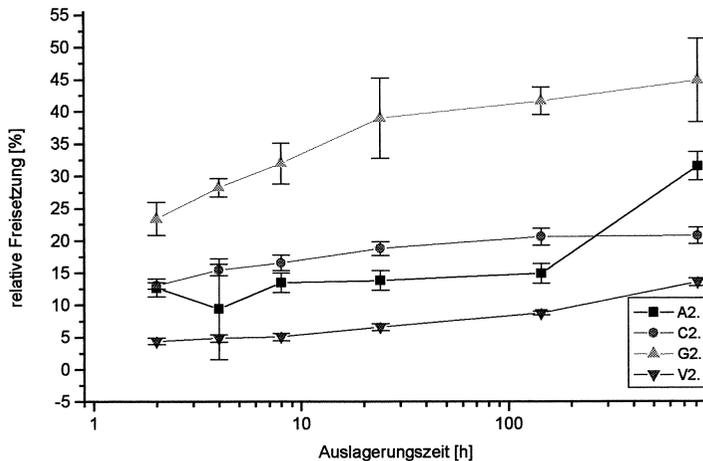
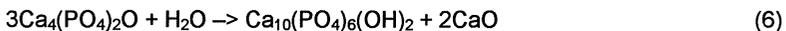


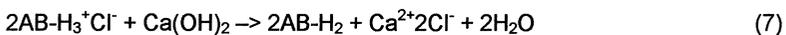
Abbildung 22: Vergleich der Freisetzung von 2% Antibiotikum aus Calciumphosphatzement

5. Diskussion

Gründe für die nicht-quantitative Freisetzung der Wirkstoffe in dieser Arbeit liegen offenbar in der Herstellung der Prüfkörper und der Wechselwirkung der Salze mit Bestandteilen der Zementmatrix begründet. Ersteres umfasste analog zur Herstellung der Prüfkörper für die mechanische Testung eine definierte Kompression der Zementpaste, um reproduzierbare Eigenschaften der ausgehärteten Zementmatrix zu erhalten. Hierbei kommt es allerdings zu einem Auspressen von Zementflüssigkeit verbunden mit einer Reduktion der Zementporosität. Aufgrund der guten Wasserlöslichkeit der Antibiotikasalze führt dieser Schritt somit zu einem nicht näher bestimmten Verlust der Gesamtwirkstoffmenge innerhalb der Zementmatrix, der bei der Berechnung der relativen Freisetzung unberücksichtigt blieb. Der zweite Effekt ist auf eine Reaktion des basischen Zementbestandteils TTCP mit den primär gut wasserlöslichen Antibiotikasalzen zurück zu führen. Das enthaltene Tetracalciumphosphat reagiert primär mit Wasser zu Hydroxylapatit und Calciumoxid.



Calciumoxid kann anschließend aus den als Salzen vorliegenden Antibiotika (AB) die jeweilige, nur bedingt wasserlösliche Base freisetzen:



Je mehr Antibiotikum während des Abbindevorgangs in den Prüfkörpern durch die Reaktion mit Calciumoxid in die freie Base umgesetzt wird, desto weniger lösliches Antibiotikum-Hydrochlorid beziehungsweise -Sulfat steht später für die Diffusion aus der Zementmatrix zur Verfügung. Je besser löslich das nicht als Salz vorliegende Antibiotikum ist, desto weniger beeinträchtigt die Reaktion mit Calciumoxid das Freisetzungsverhalten aus dem abgeundenem Zement. Vancomycin ist das größte und am schwersten lösliche Molekül der verwendeten Antibiotika und zeigt mit nur 12% die geringste Freisetzung, Clindamycin ist vergleichsweise klein, auch als freie Base besser löslich und wird deutlich besser freigesetzt (Abb. 21).

5. Diskussion

Vor diesem Hintergrund erklärt sich auch das unterschiedliche Freisetzungsverhalten bisheriger Studien, teilweise unter Verwendung derselben Wirkstoffe. Die Autoren verwendeten hierbei abweichende Zementmatrices, beispielsweise Zemente auf Grundlage des nahezu neutralen α -Tricalciumphosphats (keine CaO Bildung) oder stark saure Zementmatrices aus β -Tricalciumphosphat / Monocalciumphosphat, die bei einem pH-Wert < 4.2 Brushit als Abbindeprodukt bilden [85]. Die verwendeten Edukte sind weniger stark basisch als TTCP und es erfolgt keine Reaktion mit Gentamicinsulfat, in deren Verlauf die freie Antibiotikabase gebildet werden kann. Über den Beobachtungszeitraum wurde das gesamte enthaltene Gentamicinsulfat freigesetzt. In diesem Fall waren auch die Änderungen der anwendungsrelevanten Eigenschaften des Zements anders ausgeprägt. Der zugesetzte Wirkstoff verbesserte die diametrale Zugfestigkeit des abgebundenen DCPD um das Vierfache und ließ durchschnittlich dünnere und kleinere DCPD-Kristalle entstehen. Ähnlich wie bei der Verwendung von reinem Calciumphosphatzement veränderte sich in dieser Untersuchung die Abbindezeit, sie verdoppelte sich hier bei Zusatz von 3% Gentamicinsulfat im Vergleich zu GS-freiem Zement. Der Zusatz von Antibiotika zu CPCs auf Tricalciumphosphat-Basis scheint unproblematischer und für die physikochemischen Eigenschaften dieses Werkstoffs günstiger zu sein als die Kombination mit dem auf TTCP/DCPD-basierenden Zement dieser Arbeit.

Die starken Wechselwirkungen zwischen dem basischen TTCP und den als Salzen vorliegenden Pharmaka stellen für den klinischen Einsatz somit ein Problem dar. Zum einen verschlechtern sich die anwendungsrelevanten Parameter wie Abbindezeit, Plastizität, Modellierbarkeit und Endfestigkeit, zum anderen werden die Antibiotika teilweise in die schwerer lösliche Form der freien Base überführt. Das verringert den Vorrat an potentiell freisetzbarem Wirkstoff per Diffusion und das antibakterielle Zeitfenster und erschwert damit die Dosierbarkeit. Sollte sich der Gewebe-pH-Wert infolge einer wieder aufflammenden Entzündung in den sauren Bereich verschieben, wäre allerdings mit diesem System eine erneute Freisetzung des als freie Base noch im Zement vorliegenden Antibiotikums denkbar. Genaue Untersuchungen über die Umsatzraten und die verbliebene antibiotische Aktivität der Pharmaka sowie weitere

5. Diskussion

mikrobiologische und in-vivo-Studien sind notwendig, um funktionierende Modelle eines Depotsystems für Antibiotika auf Basis von TTCP/DCPD-Zementen zu entwickeln. Eine Möglichkeit zur Vermeidung von Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen der Antibiotika und den Calciumphosphaten stellt die Verwendung von Polymersystemen auf Poly-Milchsäurebasis dar. Das Einkapseln der Antibiotika in diese biodegradierbaren Mikropartikel könnte eine Entkopplung der Abbindereaktion der Zemente und der Wirkstoff-Freisetzung bewirken, da die Hydrolyse solcher Polymere erst nach Abbinden des Zementes einsetzt. Eine Methode zur Gewinnung verkapselter Wirkstoffe wurde von N. Kofler et al. [105] beschrieben. Zunächst wird das Polymer in einem organischen Lösungsmittel, hier Dichlormethan, gelöst und mit PBS emulgiert. Diese w/o-Emulsion wird mit einer wässrigen Lösung, die das gewünschte Pharmakon enthält, erneut zu einer w/o/w-Emulsion dispergiert. Während 12-18 h Rühren verdampft das Lösungsmittel und die Mikropartikel bilden sich. Ähnliche Untersuchungen mit Poly(d,l-Laktid-co-Glykosid)-Systemen (PLGA) wurden mit unterschiedlichen Pharmaka wie Wachstumsfaktoren [106], Haloperidol (Neuroleptikum) [107] oder Heparin [108] durchgeführt. Eine Verkapselung der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika könnte eine kontrollierte Diffusion der gesamten Menge des zugesetzten Antibiotikums ermöglichen und damit ein gleichmäßiges und steuerbares Freisetzungsprofil bewirken, ohne die physikalisch-chemischen Eigenschaften von CPC zu beeinträchtigen.

6. Zusammenfassung

Calciumphosphatzemente, die aus den Edukten TTCP und DCPD hergestellt wurden, können nicht ohne weiteres mit Clindamycinhydrochlorid, Gentamicinsulfat und Vancomycinhydrochlorid kombiniert werden, ohne daß die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Zementmischungen verändert werden. Bei der Kombination mit Amoxicillinatrium und Clavulansäurekalium verändern sich die physikalisch-chemischen Eigenschaften sowohl des Zementes als auch der Antibiotika nicht gravierend. Während des Abbindevorgangs reagiert TTCP mit Wasser teilweise zu stark basischem Calciumoxid. Dies führt einerseits zu einer Freisetzung von Chlor- und Sulfat-Ionen, andererseits zur Bildung der freien Base des gelösten Antibiotikums. Die freigesetzten Ionen nehmen Einfluß auf das Zeta-Potential der Partikeloberflächen und verändern so die rheologischen Eigenschaften der Zemente. Sie werden in den präzipitierenden Hydroxylapatit eingebaut und verschlechtern hierdurch die mechanische Stabilität der abgebundenen Zemente. Die hierbei auftretenden Porositäten verhindern eine langsame Abgabe der Wirkstoffe, es kommt zu einem hohen initialen Freisetzen (Burst). Durch die Umwandlung der Salze in die freie Base aufgrund des basischen Reaktionsumfeldes steht nicht die gesamte Menge der enthaltenen Antibiotika für die Diffusion aus dem Zement zur Verfügung. Die noch im Zement enthaltene Restmenge kann bei einer pH-Wert-Änderung beispielsweise aufgrund einer Entzündung und des hierbei sauren Gewebe-pH-Werts unkontrolliert freigesetzt werden. In weiterführenden Untersuchungen muß versucht werden, die gegenseitige Beeinflussung von CPC und Pharmakon zu vermeiden. Dies kann mit Hilfe von Wirkstoff-beladenen, biodegradierbaren PLGA-Mikropartikeln erreicht werden. Ferner muß die antimikrobielle Wirksamkeit auf die Zielorganismen und die Biokompatibilität von derartigen neuen Depotsystemen in vivo untersucht werden, um die klinische Anwendbarkeit des Verfahrens zu überprüfen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Eppe M, Dorozhkin SV. Biological and medical significance of calcium phosphates, *Angew Chem Int Ed* 2002; 41: 3130-3146.
- [2] LeGeros RZ. Calcium phosphates in oral biology and medicine, Karger, Basel, 1991.
- [3] LeGeros RZ in: Hydroxyapatite and related materials (Eds. P.W. Brown, B. Constantz), CRC, Boca Raton, FL, 1994, pp.3-28.
- [4] Ravaglioli A, Krajewki A. Bioceramics - Materials, properties, applications, Chapman & Hall, London 1992.
- [5] Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC. BoneSource (TM) hydroxyapatite cement: A novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction, *J Biomed Mater Res* 1998; 43 (4): 428-432.
- [6] Eldeeb M, Holmes RE. Zygomatic and mandibular augmentation with proplast and porous hydroxyapatite in rhesus-monkeys, *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47 (5): 480-488.
- [7] Krüger E, Krumholz K. Results of bone-grafting after rigid fixation, *J Oral Maxillofac Surg* 1984; 42 (8): 491-496.
- [8] Grote JJ. Reconstruction of the ossicular chain with hydroxyapatite implants. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 1986, 123, 10-12.
- [9] Flemmig TF. Parodontologie - Ein Kompendium, Thieme, Stuttgart 1993, 91.
- [10] Rittmann WW, Schibli M. Open fractures: Long term results in 200 consecutive cases. *Clin Orthop Res*, 1979, 138: 132-140.
- [11] Hofer, Reichenbach, von Kredenstein, Wannemacher. Zahn-Mund-Kieferheilkunde, Bd. 1, Thieme, Stuttgart 1981, S. 206.
- [12] Schwenzer N, Ehrenfeld M. Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde, Lehrbuch zur Aus-und Weiterbildung, Band 1, Thieme, Stuttgart 2000, S.204-206.
- [13] Salvati EA, Callaghan JJ, Brause BD, Klein RF, Small RD. Reimplantation in infection – elution of gentamicine from cements and beads. *Clin Orthop*, 1986, 207, 83.
- [14] Torrado S, Frutos P, Frutos G. Gentamicine bone cements: characterisation and release, *Int J Pharm* 2001(217), 57-69.
- [15] Takechi M, Miyamoto Y. Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate cement, *J Biomed Res* 1998, 39, 308-316.

7. Literaturverzeichnis

- [16] Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch, de Gruyter, Berlin/New York 1994, S. 79.
- [17] Lüllman H, Mohr K. Pharmakologie und Toxikologie, Thieme 1999, S. 394.
- [18] Küttler T. Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer, München Jena, 2002, S. 445-448.
- [19] Oberdisse, Hackenthal, Kuschinsky. Pharmakologie und Toxikologie, Springer, Berlin/Heidelberg 1999, S. 606.
- [20] Forth, Henschler, Rummel. Allg. u. spez. Pharmakologie und Toxikologie, Urban u. Fischer, München/Jena 2001, S. 815.
- [21] Lüllman H, Mohr K. Pharmakologie und Toxikologie, Thieme 1999, S. 399.
- [22] Todd PA, Benfield P. Amoxicillin/clavulanic acid. An update of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*. 1990; 39: 264-307.
- [23] Lüllman H, Mohr K. Pharmakologie und Toxikologie, Thieme 1999, S. 415-416.
- [24] Forth, Henschler, Rummel. Allg. u. spez. Pharmakologie und Toxikologie, Urban u. Fischer, München/Jena 2001, S. 829.
- [25] Hardman JG, Limbird LE. Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie, McGraw-Hill, London 1998, 1126-1128.
- [26] Bennett WM. Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1989, 16: 1-6.
- [27] Ali BH. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: some recent research. *Gen Pharmacol*, 1995, 26: 1477.
- [28] Hardman JG, Limbird LE. Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie, McGraw-Hill, London 1998, 1167.
- [29] Chow LC, Markovic M, Takagi S. "Calcium Phosphate Cements" in *Cements Research Progress 1997*, ed. L. J. Struble, pp. 215-238, Westerville, OH; The Am Ceram Soc 1998.
- [30] Chow LC, Takagi S. "Calcium phosphate cements" in *Cements Research Progress 1994*, ed. L. J. Struble, pp. 189-201, Westerville, OH; The Am. Ceram Soc, 1996.
- [31] Chow, LC. Development of Self-setting Calcium Phosphate Cements. *J Ceramic Soc Japan*, 99:954-964, 1991.
- [32] Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury* 2000; 31(4): 37-47.

7. Literaturverzeichnis

- [33] Bohner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery, *Eur Spine J* 2001; 10: 114-121.
- [34] Gbureck U, Barralet JE, Spatz K, Grover LM, Thull R. Ionic Modification of Calcium Phosphate Cement Viscosity Part I: Hypodermic injection and Strength Improvement of Apatite Cement, *Biomaterials* 2004; 25 (11): 2187-2195.
- [35] Barralet JE, Gbureck U, Grover LM. Ionic Modification of Calcium Phosphate Cement Viscosity Part II: Hypodermic injection and Strength Improvement of Brushite Cement, *Biomaterials* 2004; 25 (11) 2197-2203.
- [36] Simon CG, Guthrie WF, Wang FW. Cell seeding into calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 2004; 68A: 628-639.
- [37] Lee DD, Rey C, Aiolova M. Cell seeding of ceramic compositions, US Pat 6132463, 2000.
- [38] Driessens F, DeMayer E, Fernandez E et al. Amorphous calcium phosphate cements and their transformation into calcium deficient hydroxyapatite. *Bioceramics* 1996; 9:231-234.
- [39] Lee DD, Rey C, Aiolova M, Tofighi A. Methods and products related to the physical conversion of reactive amorphous calcium phosphate. US Patent No. 6117456, 1996.
- [40] Lee DD, Rey C, Aiolova M. Synthesis of reactive amorphous calcium phosphates. US Patent No 5683461, 1995.
- [41] Sanin N, Takagi S, Chow LC, Matsuya S. Particle size effects on pH and strength of calcium phosphate cement. *IADR* 1991, Abstract No. 2411.
- [42] Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox JL, Higuchi WI. Effect of particle size of metastable calcium phosphates on mechanical strength of a novel self-setting bioactive calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1995, 29: 25-32.
- [43] Fukase Y, Eanes ED, Takagi S, Chow LC, Brown WE. Setting reactions and compressive strength of calcium phosphate cements. *J Dent Res* 1990; 69(12): 1852-56.
- [44] Lui C, Shen W, Gu Y, Hu L. Mechanism of hardening process for a hydroxyapatite cement. *J Biomed Mater Res* 1997; 35: 75-80.
- [45] Posset U, Löcklin E, Thull R, Kiefer W. Vibrational spectroscopic study of tetracalcium phosphate in pure polycrystalline form and as a constituent of a self-setting bone cement. *J Biomed Mater Res* 1998; 40: 640-645.
- [46] Driessens FCM, Boltong MG, Planell JA, Bermudez O, Ginebra MP, Fernandez E. A New Apatitic Calcium Phosphate Bone Cement: Preliminary Results; pp. 469-72 in *Bioceramics 6*, Edited by P. Ducheyne and D. Christiansen. Butterworth-Heinemann, London, U. K., 1993.
- [47] Ginebra MP, Fernandez E, Boltong MG, Driessens FCM, Planell JA. Influence of the Particle Size of the Powder Phase in the Setting and Hardening Behaviour of a Calcium Phosphate Cement; pp. 481-84 in *Bioceramics*, Vol. 10, Proceedings

7. Literaturverzeichnis

- of the 10th International Symposium on Ceramics in Medicine (Paris, France, Oct. 5-9, 1997), Edited by L. Sedel and C. Rey. Elsevier Science, New York, 1997.
- [48] Lenart G, Bidlo G, Pinter J. Some basic problems in examination of calcium hydrogenphosphates of bone. *Clin Orth Rel Res* 1972; 83: 263-272.
- [49] Mirtichi AA, Lemaitre J, Munting E. Calcium phosphate cements : action of setting regulators on the properties of the beta-tricalcium phosphate – monocalcium phosphate cements, *Biomaterials* 1989; 10(9): 634-638.
- [50] Lemaitre J, Munting E, Mirtichi AA. Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 1992; 93: 163-65.
- [51] Boudeville P, Serraj S, Leloup JM, Margerit J, Pauvert B, Terol A. Physical properties and self-setting mechanism of calcium phosphate cements from calcium bis-dihydrogenophosphate monohydrate and calcium oxide. *J Mater Sci: Mater Med* 1999; 10 (2): 99-109.
- [52] Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam – London – New York – Tokyo: Elsevier, 1994.
- [53] Lehr JR, Brown EH, Frazier AW, Smith JP, Trasher RD. *Chem Engineering Bulletin #6 Muscle Shoals, Tennessee Valley Authority* 1967.
- [54] Monma H, Goto M, Nakajima H, Hashimoto H. Preparation of Tetracalcium Phosphate, *Gypsum & Lime* 1986, 202: 17.
- [55] Brown WE, Epstein EF. Crystallography of Tetracalcium Phosphate, *J Res National Bureau of Standards – A. Physics and Chemistry* 1965; Vol. 69A (6): 547-551.
- [56] Hench LL. *Bioceramics*, *J Am Ceram Soc* 1998, 81 (7): 1705-1728.
- [57] Gregory TM, Moreno EC, Brown WE. Solubility of $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25 and 37.5 °C. *J Res Nat Bur Stand* 1968; 74(A): 773-782.
- [58] McDowell H, Brown WE, Sutter JR. Solubility Study of Calcium Hydrogen Phosphate: Ion Pair Formation. *Inorg Chem* 1971; 10: 1638-1643.
- [59] Tung MS, Eidelman N, Sieck B, Brown WE. Octacalcium Phosphate Solubility Product from 4 to 37°C. *J Res Nat Bur Stand* 1988; 93: 613-624.
- [60] Fowler BO, Kuroda S. Changes in heated and in laser-irradiated human tooth enamel and their probable effects on solubility, *Calcif Tissue Int* 1986; 38; 197-208.
- [61] Gregory TM, Moreno EC, Patel JM, Brown WE. Solubility of $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37°C. *J Res Nat Bur Stand* 1974; 78(A): 667-674.

7. Literaturverzeichnis

- [62] McDowell H., Gregory TM, Brown WE. Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the System $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25 and 37°C. *J Res of NBS (Phys and Chem)* 1977; 81A(2,3): 273-281.
- [63] Matsuya S, Takagi S, Chow L. Hydrolysis of Tetracalcium Phosphate in H_3PO_4 and KH_2PO_4 . *J Mater Sci* 1996; 31:3263-3269.
- [64] Weissman JL, Snyderman CH, Hirsch BF. *Am J Neuroradiol* 1996; 17(8): 1569-1574.
- [65] Tofighi A, Mounic S, Chakravarthy P, Rey C, Lee D. Setting reactions involved in injectable cements based on amorphous calcium phosphate, *Key Engin Mater* 2000; 192-1: 769-772.
- [66] Lee DD, Tofighi A, Aiolova M, Chakravarthy P, Catalano A, Majahad A, Knaack D. alpha-BSM (R): A biomimetic bone substitute and drug delivery vehicle, *Clin Orthop* 1999; 367: 396-405.
- [67] Saadalla ME, Ahad N, Gibson IR, Shelton JC. Comparison between commercial calcium phosphate bone cements, *Key Engin Mater* 2002; 218-2: 331-334.
- [68] Linhart W, Briem D, Schmitz ND, Priemel M, Lehmann W, Rueger JM. Treatment of metaphyseal bone defects after fractures of the distal radius. Medium-term results using a calcium-phosphate cement (BIOBON (R)), *Unfallchirurg* 2003; 106 (8): 618-624.
- [69] Sarkar MR, Wachter N, Patka P, Kinzl L. First histological observations on the incorporation of a novel calcium phosphate bone substitute material in human cancellous bone, *J Biomed Mater Res* 2001; 58 (3): 329-334.
- [70] Zimmermann R, Gabl M, Lutz M, Angermann P, Gschwentner M, Pechlaner S. Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women, *Arch Orthop Trauma Surg* 2003; 123 (1): 22-27.
- [71] Constantz B, Ison I, Fulmer M et al. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995; 267:1796-1799.
- [72] Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M, Delli-Santi M, Fennell C, Leinberry C, Husband J, Ladd A, Seitz WR, Constantz B. Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures - A randomized study, *J Bone Joint Surg Am Vol* 2003; 85A (11): 2127-2137.
- [73] Robinson CM, Page RS. Severely impacted valgus proximal humeral fractures - Results of operative treatment, *J Bone Joint Surg Am Vol* 2003; 85A (9): 1647-1655.
- [74] Babu S, Seidman TD. Ossicular reconstruction using bone cement, *otology & neurotology* 2004; 25 (2): 98-101.
- [75] del Real RP, Ooms E, Wolke JGC, Vallet-Regi M, Jansen JA. In vivo bone response to porous calcium phosphate cement, *J Biomed Mater Res* 2003; 65A (1): 30-36.

7. Literaturverzeichnis

- [76] Vanderschot P, Schepers E, Vanschoonwinkel A, Broos P. A newly designed vertebral replacement implant to reconstruct the thoracolumbar spine anteriorly, *Acta Chirurgica Belgica* 2002; 102 (1): 37-45.
- [77] Tanaka S, Kishi T, Shimogoryo R, Matsuya S, Ishikawa K. Biopex((R)) acquires anti-washout properties by adding sodium alginate into its liquid phase, *Dent Mater* 2003; 22 (3): 301-312.
- [78] Hao H, Amizuka N, Oda K, Fujii N, Ohnishi H, Okada A, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation on self-setting alpha-tricalcium phosphate applied in the rat bone cavity, *Biomaterials* 2004; 25 (3): 431-442.
- [79] Baroud G, Matsushita C, Samara M, Beckman L, Steffen T. Influence of oscillatory mixing on the injectability of three acrylic and two calcium-phosphate bone cements for vertebroplasty, *J Biomed Mater Res* 2004; 68B (1): 105-111.
- [80] Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 379-384.
- [81] Friedman CD, Costantino PD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1991; 117: 385-389.
- [82] Yu D, Wong J, Matsuda Y, Fox J, Higuchi W, Otsuka M. Self-setting hydroxyapatite cement: a novel skeletal drug delivery system for antibiotics. *J Pharm Sci* 1992; 81(6): 529-531.
- [83] Ratier A, Gibson IR, Best SM, Freche M, Lacout JL, Rodriguez F. Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline. *Biomaterials* 2001; 22 (9): 897-901.
- [84] Bohner M, Lemaitre J, Merkle HP, Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J Pharm Sci* 2000; 89 (10): 1262-1270.
- [85] Bohner M, Lemaitre J, VanLanduyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J Pharm Sci* 1997; 86 (5): 565-572.
- [86] Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Nagayama M, Kon M, Asaoka K, Suzuki K. Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast setting calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 308-316.
- [87] Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler JM. Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin. *Biomaterials* 2003; 24 (7): 1265-1270.
- [88] Takechi M, Miyamoto Y, Momota Y, Yuasa T, Tatehara S, Nagayama M, Ishikawa K, Suzuki K. The in vitro antibiotic release from anti-washout apatite cement using chitosan. *J Mater Sci: Mater Med* 2002; 13 (10): 973-978.
- [89] Hamanishi C, Kitamoto K, Tanaka S, Otsuka M, Doi Y, Kitahashi T. A self-setting TTCP-DCPD apatite cement for release of vancomycin. *J Biomed Mater Res* 1996; 33 (3): 139-143.

7. Literaturverzeichnis

- [90] Otsuka M, Nakahigashi Y, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Sugiyama Y. Effect of geometrical cement size on in vitro and in vivo indomethacin release from self-setting apatite cement. *J Control Release* 1998; 52 (3): 281-289.
- [91] Otsuka M, Matsuda Y, Wang Z, Fox JL, Higuchi WI. Effect of sodium bicarbonate amount on in vitro indomethacin release from self-setting carbonated-apatite cement. *Pharm Res* 1997; 14 (4): 444-449.
- [92] Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox J, Higuchi W. A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. 5. Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug. *J Pharm Sci* 1994; 83(11): 1565-1568.
- [93] Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, Sioussat TM. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J Periodont* 2000; 71 (1): 8-13.
- [94] Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JGC, Kurashina K, van Waas MAJ, Burger EH. Transforming growth factor beta 1 incorporation in an alpha-tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dihydrate / tetracalcium phosphate monoxide cement: release characteristics and physicochemical properties. *Biomaterials* 2002; 23(4): 1261-1268.
- [95] Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JGC, van Waas MAJ, Driessens FCM, Burger EH. Transforming growth factor beta 1 incorporation in calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics, *J Biomed Mater Res* 2002; 59(2): 265-272.
- [96] Ruhe PQ, Kroese-Deutman HC, Wolke JGC, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* 2004; 25 (11): 2123-2132.
- [97] Brook IM, Lamb DJ. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 1987, 2, 85-89.
- [98] Otsuka M, Nakahigashi Y, Matsuda Y. A novel skeletal drug delivery system using self setting calcium phosphate cement. Part 7 effect of biological factors on indomethacin release from cement loaded on bovine bone. *J Pharm Sci* 1994; 83(11): 1569-1573.
- [99] Soriano I, Evora C. Formulation of calcium phosphates/poly (d,l-lactide) blends containing gentamicin for bone implantation, *J Control Release (Netherlands)*, Jul 31 2000, 68(1) 121-34.
- [100] Benoit M, Mousset B. Antibiotic-loaded plaster of Paris implants coated with poly lactide-co-glycolide as a controlled release delivery system for the treatment of bone infections, *Int Orthopaedics* 1997, 21: 403-408.
- [101] Stanker LH, Vanderlaan M, Juarez-Salinas H. One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxylapatite chromatography, *J Immunol Methods*, 1985, 76, 157-169.

7. Literaturverzeichnis

- [102] Arbeitsanweisung AW-ChemBio002901 (Abt. Für Funktionswerkstoffe, Univ. Würzburg), gültig ab 01.08.2000: Bestimmung der Druck- und Zugfestigkeit von Calcium-Phosphat-Zementen.
- [103] Frutos Cabanillas P, Díez Pena E, Barrales-Rienda JM, Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release, *Int J Pharm*, 2000, 209, 15-26.
- [104] Hardman JG, Limbird LE. *Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie*, McGraw-Hill, London 1998, 1166.
- [105] Kofler N, Ruedl C, Klima J, Recheis H, Böck G, Wick G, Wolf H. Preparation and characterization of poly(d,l-lactide-co-glycolide) and poly(l-lactic-acid) microspheres with entrapped pneumotropic bacterial antigens, *J Immunol Methods*, 1996, 192, 25-35.
- [106] Hile DD, Amirpour ML, Akgerman A, et al. Active growth factor delivery from poly(d,l-lactide-co-glycolide) foams prepared in supercritical CO₂, *J Control Release*, 2000, 66(2-3), 177-185.
- [107] Cheng YH, Illum L, Davis SS. A poly(d,l-lactide-co-glycolide) microsphere depot system for delivery of haloperidol *J Control Release*, 1998, 55(2-3) 203-212.
- [108] Kreitz MR, Domm JA, Mathiowitz E. Controlled delivery of therapeutics from microporous membranes. II. In vitro degradation and release of heparin-loaded poly(l-lactide-co-glycolide), *Biomaterials(Eng)*, 1997, 18(24), 1645-1651.

8. Anhang

Angegeben ist die durchschnittliche Freisetzung der einzelnen Prüfkörper in % der Gesamtmenge an enthaltenem Antibiotikum

Tabelle 10: Prüfkörper mit 1 Gew.% Augmentan®

<i>Prüfkörper</i> <i>t in h</i>	A11 %	A12 %	A13 %
2	14,8	35,3	37,3
4	16,8	36,6	39,2
24	17,9	36,2	43
48	19,1	42,3	50,8
120	20,2	46,7	54,4
170	17,1	44,3	52,4
288	23,2	50,3	58,2
816	34,5	66,1	85,7
3984	28	95,2	90,9

Tabelle 11: Prüfkörper mit 2 Gew.% Augmentan®

<i>Prüfkörper</i> <i>t in h</i>	A21 %	A22 %	A23 %
2	11,1	13,6	13,4
4	11,4	14,1	13,8
6,5	11,7	14,5	14,2
24	12,1	14,9	14,5
48	12,3	15	14,7
72	12,9	15,5	15,2
140	13,2	15,9	15,7
816	29,2	33,5	32

8. Anhang

Tabelle 12: Prüfkörper mit 5 Gew.% Augmentan®

<i>Prüfkörper t in h</i>	A51 %	A52 %	A53 %
2	13,9	11,4	13
4	13,7	11,9	13,1
6,5	13,9	12,1	13,3
24	13,5	12,6	13,6
48	13,7	12,2	13,3
72	13,8	13,2	13,8
140	14,4	13,7	14,1
816	26,5	29,2	23,9
3984	30,5		24,7

Tabelle 13: Prüfkörper mit 1 Gew.% Clindamycin

<i>Prüfkörper t in h</i>	C11 %	C12 %	C13 %
0,08	7	5,7	7,3
1	13,7	16,5	18,4
3	15	18,8	21,1
8	16,7	22	24,7
24	20,5	26,4	30,2
240	23,8	30,3	35,1
674	23,3	30,8	35,8

Tabelle 14: Prüfkörper mit 2 Gew.% Clindamycin

<i>Prüfkörper t in h</i>	C21 %	C22 %	C23 %
0,08	5,2	5,6	4,9
1	13,4	13,3	12,4

8. Anhang

<i>Prüfkörper t in h</i>	C21 %	C22 %	C23 %
3	15	16,5	14,8
8	17	17,5	15,2
24	18,6	20	17,8
240	20,3	22	19,5
674	20,4	22,2	19,7

Tabelle 15: Prüfkörper mit 5 Gew.% Clindamycin

<i>Prüfkörper t in h</i>	C51 %	C52 %	C53 %
0,08	4,3	4,1	4,4
1	12	11,3	13,4
3	16,7	15,6	18,1
8	19	15,9	18,6
24	22,8	17,7	20
240	25,3	23,2	22,8
674	26,1	27,5	22,6

Tabelle 16: Prüfkörper mit 1 Gew.% Gentamicin

<i>Prüfkörper t in h</i>	G11 %	G12 %	G13 %
2	7	9,1	2
4	19,8	25,1	8,4
8	25,9	30,1	15,6
30	50,1	63,8	42,4
50	50,5	59,7	37,9
170	50,9	54,9	31,9
700	65	79,9	47,8
890	66,7	80,1	51,9
3720	88,6	83,1	48,5

8. Anhang

Tabelle 17: Prüfkörper mit 2 Gew.% Gentamicin

<i>Prüfkörper t in h</i>	G21 %	G22 %	G23 %
2	21,4	22,4	26,3
4	26,7	28,5	29,5
8	28,3	33,3	34,3
30	40,9	44,1	40
50	35,3	39,1	40,8
170	33,6	45,9	37,6
700	39,4	52	43,2
890	39,7	52,4	40,6
3720	41,2	51,8	48

Tabelle 18: Prüfkörper mit 5 Gew.% Gentamicin

<i>Prüfkörper t in h</i>	G51 %	G52 %	G53 %
2	24,6	38,8	23,4
4	27,3	40,9	27,6
8	28,7	44,3	29,3
30	31,7	47,5	33,1
50	29	43,2	28,7
170	30,4	42,4	32,7
700	30,5	45,7	34
890	31	45,6	30,8
3720	34,6	51,3	38,3

Tabelle 19: Prüfkörper mit 1 Gew.% Vancomycin

<i>Prüfkörper t in h</i>	V11 %	V12 %	V13 %
2	13,3	8,5	10,5

8. Anhang

<i>Prüfkörper t in h</i>	V11 %	V12 %	V13 %
4	14,4	9,8	11,7
24	15,2	10,3	12
48	18,9	14,3	13,8
144	19,5	13,4	15,8
170	21,8	15,8	18,4
816	36,5	21,7	26,4
3984	66,8	23,3	25,6

Tabelle 20: Prüfkörper mit 2 Gew.% Vancomycin

<i>Prüfkörper t in h</i>	V21 %	V22 %	V23 %
2	4,9	4,3	4
4	5,5	4,8	4,3
24	7	6,8	6
48	7,9	7,8	7,3
144	8,9	8,4	8,9
816	13,6	12,9	14,1
3984	16,1	13,7	17,5

Tabelle 21: Prüfkörper mit 5 Gew.% Vancomycin

<i>Prüfkörper t in h</i>	V51 %	V52 %	V53 %
2	4,3	4	4
4	5,1	4,7	4,8
24	5,8	5,7	5,7
48	7	7,8	6,9
120	6,8	7,6	6,4
144	7,8	8,8	7,3
816	12,7	14,9	13,2

8. Anhang

Prüfkörper	V51	V52	V53
<i>t</i> in h	%	%	%
3984	15,1	19,4	15,3

Freisetzungsprofile der vier Antibiotika bei jeweils gleicher Wirkstoffkonzentration

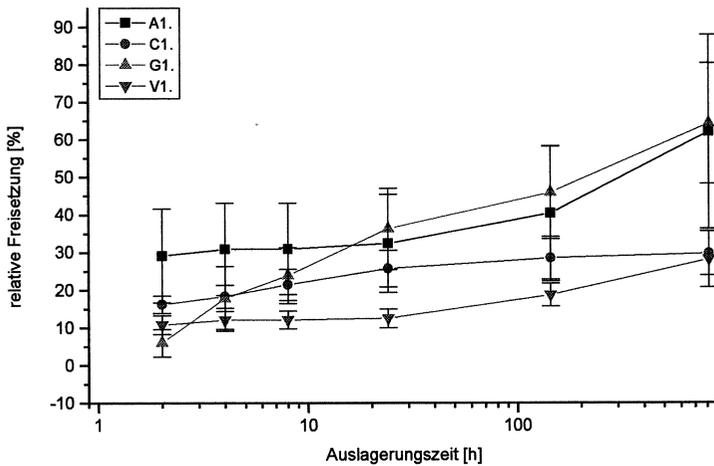


Abbildung 23: Freisetzung 1% Antibiotikum aus CPC

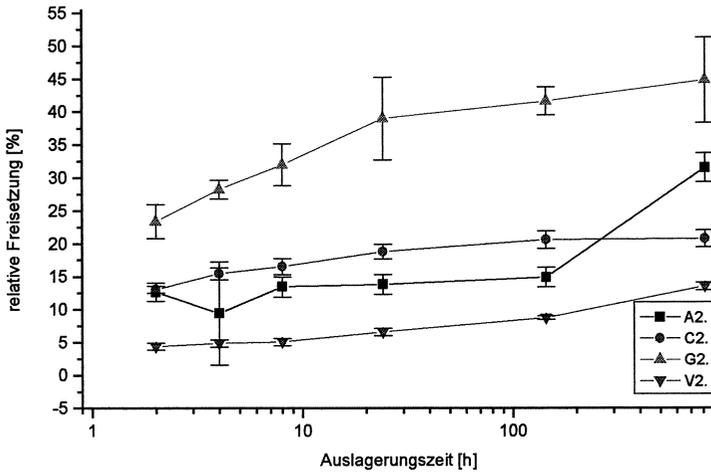


Abbildung 24: Freisetzung 2% Antibiotikum aus CPC

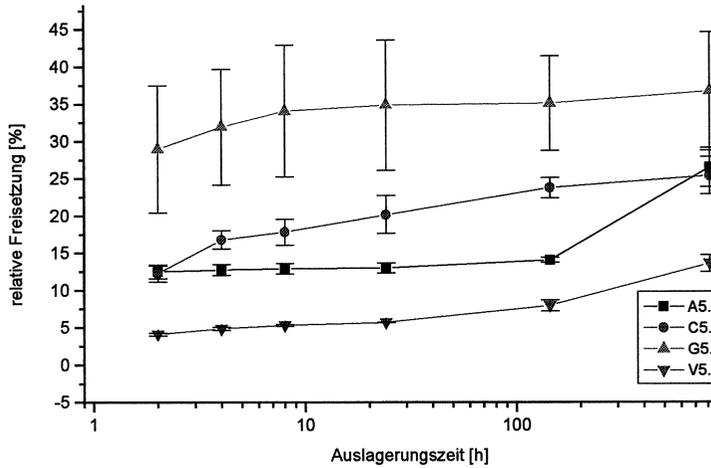


Abbildung 25: Freisetzung 5% Antibiotikum aus CPC

Lebenslauf

Jörg Christian Deffner, geb. 25. Mai 1974 in Augsburg

- 1980-1984 Besuch der Evangelischen Grundschule in St. Augustin/Siegburg
- 1984-1993 Besuch des musischen Wolfram-von Eschenbach-Gymnasiums in Schwabach, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife im Juli 1993
- 1993-1997 Ausbildung zum Zahntechniker im Labor Lamprecht+Müller GmbH, Nürnberg, Gesellenprüfung im Februar 1997
- 1997-2002 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Staatsexamen und Approbation zum Zahnarzt im Juni 2002
- 2002-2004 Beschäftigt als Assistentzzahnarzt bei Dr. med. dent. K. Abel, Königheim



Christian Deffner

Danksagung

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei allen, die mir durch Ihre Unterstützung und Ratschläge die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Namentlich waren dies

Meine Doktorväter

Herr Prof. Dr.-Ing. R. Thull

Herr Prof. Dr. med. dent. T. Holste

Mein Promotor, Korrektor und Mentor

Herr Dr. rer. nat. U. Gbureck

Meine mir im Labor unerlässlichen Stützen

Frau Isabell Biermann

Frau Dipl. Chem. Kerstin Spatz

Meine sehr geduldige und mich verpflegende Frau

Susanne Gastl

