

**Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kiefergesundheit
der Universität Würzburg**

Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. Jürgen Groll

**Charakterisierung der Freisetzung verschiedener Antibiotika
aus resorbierbaren anorganischen Knochenersatzmaterialien
sowie die Untersuchung des Einflusses auf
materialcharakteristische Eigenschaften**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Sandra Hinderer
aus Schwäbisch Gmünd**

Würzburg 2021

Referent: Prof. Dr. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2021

Die Promovendin ist Zahnärztin

Für Tanja und Julia

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III	
Tabellenverzeichnis	IV	
Abkürzungsverzeichnis	V	
1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Kenntnisstand	3
2.1	Knocheninfektionen	3
2.1.1	Klassifikation und Ätiologie der Osteomyelitis	4
2.1.2	Therapie der Osteomyelitis	6
2.2	Knochenersatzmaterialien und -transplantate	7
2.2.1	Synthetische resorbierbare Knochenersatzmaterialien	10
2.2.2	Knochenersatzmaterialien als lokale Wirkstoffträger für Antibiotika	16
2.3	Antiinfektiva	20
2.3.1	Auswahl geeigneter Antibiotika	22
3	Material und Methoden	29
3.1	Verwendete Knochenersatzmaterialien und Antibiotika	29
3.1.1	Calciumphosphat-Knochenersatzmaterial	29
3.1.2	Magnesiumphosphat-Knochenzement	30
3.1.3	Verwendete Antibiotika	31
3.2	Allgemeiner Versuchsaufbau und Messmethode	32
3.2.1	Antibiotikabeladung der Hydroxylapatit-Scaffolds	32
3.2.2	Antibiotikabeladung von Calciumphosphat-Zement	32
3.2.3	Antibiotikabeladung von Struvit-Zement	34
3.2.4	Auslagerung der Probekörper	34
3.2.5	Messung der Antibiotikafreisetzung	35
3.3	Antibiotikafreisetzungsversuche	42
3.3.1	Freisetzungsuntersuchungen mit Calciumphosphat-Scaffolds	42
3.3.2	Freisetzungsuntersuchungen mit Calciumphosphat-Zement	43
3.3.3	Freisetzungsuntersuchungen mit Struvit-Zement	44
3.4	Agardiffusionstest	45
3.4.1	Herstellung der Agarplatten und der Übernachtskultur	45
3.5	Charakterisierung der Zemente	47
3.5.1	Druckfestigkeitsuntersuchungen	47
3.5.2	Röntgendiffraktometrie	48
3.5.3	Quecksilberporosimetrie	49
3.5.4	Rasterelektronenmikroskopie	49

4	Ergebnisse.....	51
4.1	Freisetzungsuntersuchungen an Calciumphosphat-Scaffolds ..	51
4.1.1	Einfluss der Beladungsdauer auf die Antibiotikafreisetzung	51
4.1.2	Antibiotikafreisetzung nach 24 h Beladungsdauer	53
4.1.3	1 h Beladungsdauer Gentamicin.....	57
4.1.4	Behandelte und unbehandelte Scaffolds.....	58
4.1.5	Orientierender Versuch: Vancomycinfreisetzung nach Behandlung mit Natriumcarbonat-Lösung.....	59
4.2	Freisetzungsuntersuchungen an Zementen	60
4.2.1	Calciumphosphat-Zemente.....	60
4.2.2	Struvit-Zement	62
4.3	Agardiffusionstest.....	65
4.4	Charakterisierung von Calciumphosphat-Zementen	67
4.4.1	Druckfestigkeitsuntersuchungen	67
4.4.2	XRD-Messungen	68
4.4.3	Porosität	69
4.4.4	Rasterelektronenmikroskopie	70
4.5	Charakterisierung der Struvit-Zemente.....	72
4.5.1	Druckfestigkeitsuntersuchungen	72
4.5.2	XRD-Messungen	73
5	Diskussion	75
5.1	Diskussion der Methode	75
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	82
5.2.1	Freisetzungsuntersuchungen.....	82
5.2.2	Materialcharakterisierung.....	99
5.3	Klinische Relevanz	103
6	Zusammenfassung	107
7	Literaturverzeichnis	111
8	Anhang.....	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematischer Knochenaufbau	4
Abbildung 2:	Freisetzungsscharakteristika resorbierbarer Wirkstoffträger	18
Abbildung 3:	CaP-Probekörper.....	30
Abbildung 4:	CaP-Zement mit unterschiedlicher Mischzyklenanzahl	33
Abbildung 5:	Bestimmung des Konzentrationsintervalls der Kalibriergeraden	37
Abbildung 6:	Zeitabhängigkeit der Gentamicin-Derivatisierung.....	40
Abbildung 7:	Reaktionsmechanismus der Gentamicin-Derivatisierung	41
Abbildung 8:	Vancomycinfreisetzung.....	52
Abbildung 9:	Antibiotikafreisetzung Cefuroxim.....	53
Abbildung 10:	Antibiotikafreisetzung Ciprofloxacin	54
Abbildung 11:	Antibiotikafreisetzung Clindamycin	55
Abbildung 12:	Antibiotikafreisetzung Gentamicin.....	56
Abbildung 13:	Gentamicinfreisetzung bei 1 h Beladungsdauer.....	57
Abbildung 14:	Vancomycinfreisetzung von behandelten und unbehandelten Scaffolds.....	58
Abbildung 15:	Vancomycinfreisetzung nach Behandlung mit Na ₂ CO ₃ -Lösung	59
Abbildung 16:	Vancomycinfreisetzung aus CaP-Zementen	61
Abbildung 17:	Gentamicinfreisetzung aus CaP-Zement	62
Abbildung 18:	Vancomycinfreisetzung aus Struvit-Zement.....	63
Abbildung 19:	Übersicht der Vancomycinmenge nach Ende der Freisetzungsuntersuchung.....	64
Abbildung 20:	Ergebnisse des Agardiffusionstests	65
Abbildung 21:	Freigesetzte Antibiotikamenge vor dem Agardiffusionstest.....	66
Abbildung 22:	Druckfestigkeit antibiotikahaltiger CaP-Zement-Probekörper	67
Abbildung 23:	XRD-Messung CaP-Zemente	68
Abbildung 24:	Ergebnisse der Quecksilberporosimetrie für CaP-Zemente	69
Abbildung 25:	REM-Aufnahmen der CaP-Zemente	71
Abbildung 26:	Druckfestigkeit Vancomycin-haltiger Struvit-Zemente	72
Abbildung 27:	XRD von Struvit mit verschiedenen Vancomycin-Konzentrationen ..	73
Abbildung 28:	Aufbau Mischvorrichtung CaP-Zement	129
Abbildung 29:	Darstellung der Kalibriergeraden	130
Abbildung 30:	Ciprofloxacin-Beladungslösung nach Ende der Beladungsdauer ...	131
Abbildung 31:	Exemplarische Ergebnisse des Hemmhoftests	132

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung von KEMs nach der Herkunft.....	8
Tabelle 2:	Übersicht einiger synthetischer KEMs	15
Tabelle 3:	Übersicht der verwendeten Antibiotika.....	26
Tabelle 4:	Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika	31
Tabelle 5:	Konzentration und absolute Antibiotikamenge der verwendeten Antibiotikallösungen.....	32
Tabelle 6:	Hergestellte Konzentrationen der jeweiligen Antibiotikallösungen für die Erstellung einer Kalibriergeraden	38
Tabelle 7:	Wellenlängenbereich des Absorbanzmaximums der Antibiotika und Geradengleichung	38
Tabelle 8:	Übersicht der Versuchsdesigns ausgewählter Freisetzungsuntersuchungen.....	76
Tabelle 9:	Vergleich zytotoxischer Antibiotikakonzentrationen für Osteoblasten mit den von Scaffolds während eines Zeitintervalls freigesetzten Konzentrationen	89

Abkürzungsverzeichnis

CaP(-Zement)	Calciumphosphat(-Zement)
cdHA	Calcium-defizitärer Hydroxylapatit
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
DCPA	wasserfreies Calciumhydrogenphosphat, Monetit (engl. Dicalcium phosphate anhydrous)
DCPD	Calciumhydrogenphosphat-Dihydrat, Brushit (engl. Dicalcium phosphate dihydrate)
HA	Hydroxylapatit
Hg-Porosimetrie	Quecksilberporosimetrie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
KEM	Knochenersatzmaterial
LB-Medium	Nähmedium für Bakterien (engl. lysogeny broth)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Phosphate-buffered saline)
PLR	Pulver/Flüssigkeits-Verhältnis (engl. powder-liquid ratio)
PMMA	Polymethylmetacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop(ie)
UAW	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
UV/VIS	engl. ultraviolet/visible
XRD	Röntgendiffraktometer (engl. X-ray diffraction)
α -TCP	alpha-Tricalciumphosphat
β -TCP	beta-Tricalciumphosphat

1 Einleitung und Problemstellung

Erregerinduzierte Entzündungen des Knochens sind aufgrund der geringen Durchblutung und dem damit einhergehenden schlechten Ansprechen auf systemisch verabreichte Antibiotika auch heute noch schwierig zu therapieren. So sieht das Vorgehen bei ausgedehnten Knochenentzündungen die chirurgische Herdsanierung, die systemische und gegebenenfalls die lokale Antibiose vor [1]. Für die lokale Antibiose haben sich Gentamicin-haltige Polymethylmetacrylat-Ketten (PMMA) bewährt. Der Vorteil von PMMA als lokaler Wirkstoffträger ist vor allem die gleichmäßige Freisetzung des Antibiotikums über einen relativ langen Zeitraum. Der operativ notwendige Zweiteingriff zur Entfernung der Ketten und die Kompromittierung körpereigener Reparaturprozesse durch den Zement sind als Nachteile anzusehen. Im Unterschied dazu wäre ein resorbierbares Trägermaterial mit steuerbarer Freisetzungskinetik ideal in der lokalen Therapie von Osteomyelitiden. Bei ausgedehnten knöchernen Defekten können Knochenersatzmaterialien osteokonduktiv oder osteoinduktiv wirken. Allgemein wird die Verwendung von Knochenersatzmaterial ab einer Defektgröße von 2 cm im Durchmesser bzw. ab Defektgrößen von mehr als 50 % in der Zirkumferenz, als sinnvoll erachtet. Diese Angaben sind jedoch abhängig von verschiedenen Faktoren wie dem Alter des Patienten, dem Zustand des Weichgewebes und dem betroffenen Knochen [2-4].

Die Auswahl an synthetischen, resorbierbaren Knochenersatzmaterialien zeigt hierbei ein nahezu unüberschaubares Angebot von unterschiedlichen Materialsystemen verschiedener Hersteller. Bei der Suche nach resorbierbaren, antibiotikahaltigen Knochenersatzmaterialien für die Prävention oder Therapie von Osteomyelitiden sind jedoch nur wenige derartige Produkte zu finden (z.B. Herafill® [5], Osteoset® T, Cerament® G und Cerament® V). Durch resistenzgerechten Zusatz von Antibiotika mit dem Knochenersatzmaterial wird die Spezifität erhöht, was einige Hersteller in den Gebrauchsanweisungen beschreiben, bspw. PerOs-sal® [6] oder STIMULAN® [7]. Allerdings übernimmt der Arzt für diesen „Off-Label“ Gebrauch jegliche Haftungsrisiken für das Produkt [8].

Als Ursache für diese geringe Produktvielfalt können die der Zulassung und Genehmigung zu Grunde liegenden Rechtsvorschriften in Deutschland und Europa

angesehen werden. So sind, nach MPG § 13 (1) und daraus resultierend aus Anhang IX der Richtlinie 93/42/EWG, sämtliche resorbierbaren Knochenersatzmaterialien als Medizinprodukt der Risikoklasse III (sehr hohes Risiko) eingestuft, wodurch diese bereits umfangreichen Prüfungen vor ihrer Markteinführung unterzogen werden müssen. Versetzt man Knochenersatzmaterialien jedoch mit Arzneimitteln, so gelten diese nach der Definition der European Medicines Agency (EMA) als Kombinationsprodukt („Drug-device combinations“). Hieraus resultieren noch komplexere Zulassungsverfahren für die Markteinführung [8, 9]. Ein bestehendes Medizinprodukt, welches unter Verantwortung des therapierenden Arztes mit einem etablierten Medikament versetzt wird, könnte diese Zulassungsverfahren umgehen. Der Arzt wird dadurch aber Hersteller im Sinne des Gesetzes und übernimmt sämtliche Haftungsrisiken. Der rechtlich schwierigen Situation steht aber der klinische Vorteil entgegen Knochenersatzmaterialien in Kombination mit Antibiotika dosis- und resistenzgerecht optimal auf bakterielle Entzündungsprozesse abzustimmen.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, unter besonderer Berücksichtigung der klinischen Umsetzbarkeit, verschiedene Knochenersatzmaterialien mit Antibiotika zu versetzen. Dabei konnten Knochenzemente und 3D-gedruckte Calciumphosphat-Scaffolds auf unterschiedliche Weise mit verschiedenen Antibiotika kombiniert und nachfolgend deren Freisetzungverhalten untersucht werden. Für die Knochenzemente wurden zudem weitere Materialcharakterisierungen durchgeführt, um veränderte Eigenschaften durch die Antibiotikazusetzung darzustellen. Zu den Messverfahren zählten die Untersuchung der Druckfestigkeit, die Röntgendiffraktometrie, die Quecksilber-Porosimetrie und die Rasterelektronenmikroskopie. Weiterhin wurde für ausgewählte Kombinationen von Antibiotika und Wirkstoffträgern die antibakterielle Wirkung überprüft.

2 Kennntnisstand

2.1 Knocheninfektionen

Knocheninfektionen sind meist bakterieller, seltener mykotischer Genese [10, 11]. Im Folgenden soll nur auf die Infektion bakteriellen Ursprungs näher eingegangen werden. Durch die bakterielle Infektion wird im Knochen eine Entzündungskaskade ausgelöst, die zum Krankheitsbild der Osteomyelitis führt. Das Krankheitsbild der Osteomyelitis versteht sich als eine Entzündung des Knochenmarks und wurde erstmals im Jahr 1852 von Édouard Chassaignac unter diesem Begriff beschrieben [12, 13]. Hingegen wird bei der sog. Osteitis (auch Ostitis) die kortikale Struktur mit einbezogen und gilt allgemein als Knochenentzündung. Häufig werden jedoch beide Begriffe synonym verwendet [14-16].

Unbehandelt kann eine Osteomyelitis zur Knochennekrose führen. Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten des Knochens, insbesondere seiner schlechten Gefäßversorgung, ist die Osteomyelitis ein schwierig und zeitintensiv zu therapierendes Krankheitsbild. Für die Häufigkeit von Infektionen des Knochens liegen keine aktuellen, fundierten Daten vor. Lediglich vom statistischen Bundesamt werden absolute Zahlen der Hauptdiagnosen bei stationärer Behandlung in Deutschland veröffentlicht. Diese Angaben stammen aus dem Jahr 2016 und betragen bei der Diagnose „Osteomyelitis“ etwa 14.000 Patienten, bei der „Knochennekrose“ etwa 11.500 Patienten. Weiterhin beschrieben Trampuz und Zimmerli [17], dass für Implantat-assoziierte Infektionen nicht ausreichend Studien mit langen Beobachtungszeiträumen der Patienten vorliegen, sodass zur Epidemiologie von derart entstandenen Knochenentzündungen keine aussagekräftigen Angaben gemacht werden können.

Es sollen hier zunächst die anatomischen Grundlagen des Knochens skizziert werden. Abbildung 1 stellt den Aufbau des Knochens schematisch dar. Hierbei ist zu erkennen, dass sich der Knochen aus zellulären sowie azellulären Bestandteilen zusammensetzt. Diese lassen sich nochmals in organische und anorganische Komponenten unterteilen. Grundsätzlich finden sich im Knochen neben Zellen des Blutsystems, vier charakteristische Zelltypen: Saumzellen (engl. „bone lining cells“), Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die anorganischen

Bestandteile haben einen Anteil von etwa 50 – 60 % und setzen sich wesentlich aus nanokristallinem Hydroxylapatit (ca. 45 % des Feuchtgewichts) und anorganischen Ionen (Magnesium, Fluorid, u.a.) zusammen. Die organischen Bestandteile haben einen Anteil von 30 – 40 % und bestehen vornehmlich aus Kollagen (Typ I) sowie geringen Bestandteilen von Proteoglykanen und unterschiedlichen Glykoproteinen. Weitere 10 % bestehen aus Wasser [18-20]. Eine wichtige Kenngröße für Freisetzungsuntersuchungen sind Blutflussgeschwindigkeiten innerhalb des Knochens. Als Richtwerte für die Blutflussgeschwindigkeit wird von McCarthy [21] für die Spongiosa 20 mL/min/100g und für die Kompakta 5 mL/min/100g angegeben.

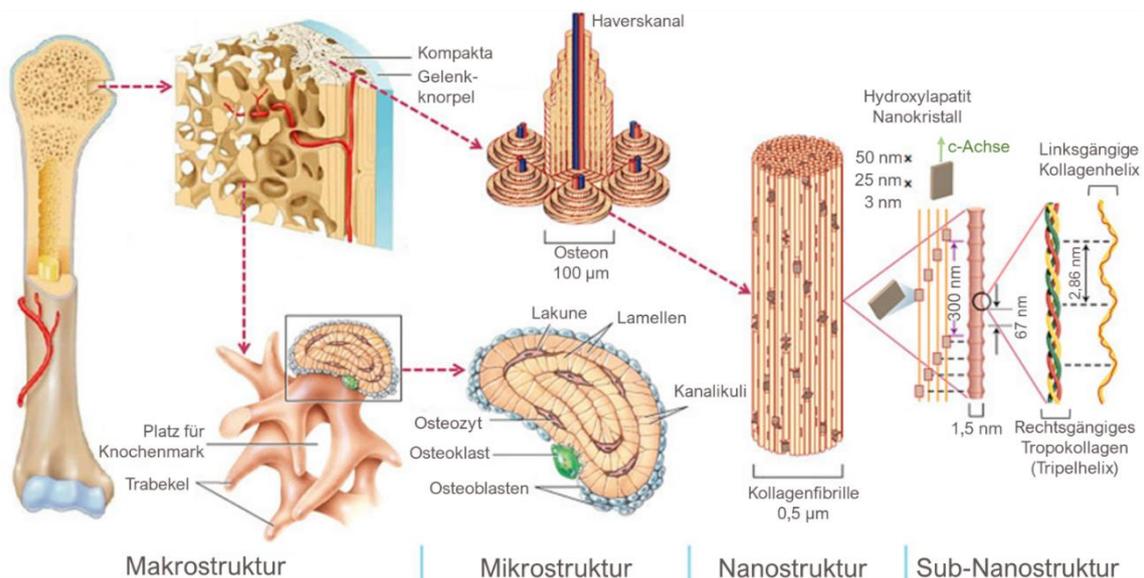


Abbildung 1: Schematischer Knochenaufbau

Dargestellt ist die Makrostruktur eines langen Röhrenknochens mit vergrößerter Darstellung der Kompakta-Spongiosa-Grenzfläche und der Spongiosa-Trabekel. In der Mikrostruktur sind Osteone der Kompakta sowie die Mikrostruktur der Trabekel mit eingemauerten Osteozyten und aufgelagerten Osteoblasten erkennbar. Die Nanostruktur zeigt eine Kollagenfibrille, bestehend aus mehreren Tropokollagenhelices mit daran angelagerten nanokristallinem Hydroxylapatit, was genauer in der Sub-Nanostruktur dargestellt wird. Diese Abbildung wurde modifiziert übernommen aus [22] mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

2.1.1 Klassifikation und Ätiologie der Osteomyelitis

Die Einteilung der Knocheninfektionen erfolgt unter Betrachtung verschiedener Qualitäten, wobei eine einheitliche interdisziplinäre Klassifikation derzeit nicht existiert. Nach der aktuellen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie erfolgt die Einteilung in Stadien (früh oder spät), nach dem

Infektionsweg (endogen oder exogen) und nach dem Verlauf (akut oder chronisch) [1]. Bei endogenem (bzw. hämatogenem) Infektionsweg gelangen die Mikroorganismen von einem Infektionsherd andernorts über den Vektor Blut in den betroffenen Knochen [23]. Der exogene Infektionsweg steht meist in direktem Zusammenhang mit einer traumatischen Verletzung, seltener mit einer Operation, oder wird an den Knochen weitergeleitet durch sich ausbreitende Weichteilinfektionen (Diabetischer Fuß, Hautabszess, etc.) [24]. In diesem Fall gelangen die Bakterien von der Umwelt oder der Haut direkt in den Knochen. Die zeitliche Grenze zwischen frühen und späten Infektionen (nach traumatischem Ereignis) wird mit vier Wochen angegeben. Davon abzugrenzen sind die akute und die chronische Osteomyelitis. Die akute Form zeigt sich vor allem mit radiologischer Unauffälligkeit innerhalb der ersten zwei Wochen einer Infektion, wohingegen bei chronischen Formen die Sequesterbildung (Knochennekrose) radiologisch erkennbar ist [25]. Außerdem geht die akute Osteomyelitis mit klassischen klinischen Entzündungszeichen wie Fieber, Rötung und Schmerzhaftigkeit einher. Die chronische Form hingegen kann klinisch völlig symptomlos bleiben oder nur unspezifische Schmerzsymptome hervorrufen, aber jederzeit in eine akute und somit symptomatische Phase übergehen [26]. Hier sei als Sonderform der Osteomyelitis noch die Implantat-assoziierte Form genannt, wobei die Entzündung durch den bakteriellen Biofilm auf der Implantatoberfläche bedingt ist. Die Entstehung des Biofilms kann durch perioperative Kontamination der Implantatoberfläche oder durch hämatogene Streuung wenige Tage postoperativ herbeigeführt werden [27].

Speziell unter klinischen Gesichtspunkten spielt das Alter des betroffenen Patienten für die Therapie und den Verlauf der Knochenentzündung eine entscheidende Rolle. Man unterscheidet die Osteomyelitis bei Säuglingen, Kindern und Erwachsenen. Auch der singuläre oder multiple Befall von Knochen hat für die Therapie entscheidende Folgen. Zudem kann eine Einteilung bezüglich betroffener Knochen erfolgen. Als besonders prädestiniert für die exogene Form der Osteomyelitis gelten Patienten hohen Alters, wobei die endogene Form häufiger bei Kindern zu finden ist [28, 29]. Insbesondere die exogene Osteomyelitis steht in Zusammenhang mit verschiedenen Komorbiditäten, die lokal eine schlechte

Durchblutung bedingen (z.B. langjährige Raucher, Diabetes mellitus, periphere arterielle Verschlusskrankheit, therapeutische Bestrahlung). Allgemeine Risikofaktoren sind Erkrankungen, die mit einem geschwächten Immunsystem einhergehen (z.B. Drogenabusus, Mangelernährung, Diabetes mellitus) [30, 31]. Betrachtet man die Knochenentzündung unter mikrobiologischen Aspekten, so ergibt sich eine zusätzliche Perspektive dieses Krankheitsbildes. Die endogene Osteomyelitis wird meist durch *S. aureus* ausgelöst, außerdem durch *Streptococci*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae Typ b* (Hib) sowie *S. pneumoniae* [28]. Bei der exogenen Osteomyelitis ist ebenfalls in den meisten Fällen *S. aureus* alleiniger Auslöser oder in einer Mischinfektion beteiligt. Zudem können *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Proteus*, *Streptococci*, *Serratia* und *E. coli* ursächlich für eine Inflammation des Knochens über einen derartigen Infektionsweg sein [32-35]. Die hier aufgeführten Erreger, insbesondere der exogenen Form, sind zudem für ihre Biofilmbildung bekannt [36], was die Therapie der Osteomyelitis zusätzlich erschwert. Abschließend lässt sich sagen, dass das komplexe Krankheitsbild der Osteomyelitis eine adäquate allgemeingültige und eindeutige Klassifizierung erschwert [37].

2.1.2 Therapie der Osteomyelitis

Angesichts des zuvor dargestellten komplexen Krankheitsbildes der Osteomyelitis, soll in dieser Arbeit der Fokus auf die akute und die chronische exogene Form bei Erwachsenen gelegt werden. Die Therapie der Osteomyelitis sieht bei Erwachsenen bei akuten Infektionen zunächst die alleinige systemische Antibiotikagabe über einen Zeitraum von 4 – 6 Wochen vor. Dieser kann sich bei Ausbleiben eines Therapieerfolgs auf mehrere Monate erhöhen [38]. Ob diese lange Therapiedauer zielführend ist, lässt sich aufgrund der unzureichenden Studienlage nicht eindeutig bestimmen. Beachtet werden muss hierbei, dass die lange Antibiotikagabe mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Auftretens unerwünschter Arzneimittelwirkungen einhergeht [34, 39]. Allgemein erfolgt die Auswahl des Antibiotikums initial kalkuliert mit einem Breitspektrum-Antibiotikum, bei Vorlage des Antibiotogramms wird dann auf die gezielte Therapie umgestellt. Bei Therapieresistenz innerhalb von etwa 72 h durch die alleinige Antibiotikagabe

wird das chirurgische Débridement, mit Entfernung aller entzündlich veränderten Strukturen, unumgänglich. Bei chronischen Osteomyelitiden erfolgt chirurgisches Débridement und systemische Antibiotikatherapie unmittelbar nach der Diagnosestellung [40]. Das invasive Vorgehen sieht die Entfernung allen nekrotischen Knochens, sowie entzündlich veränderten Weichgewebes, die adäquate Rekonstruktion der Weichgewebe und die Stabilisierung der mechanisch beeinträchtigten Knochenstruktur vor. Bei der chirurgischen Herdsanierung sollte zudem individuell evaluiert werden, ob zusätzlich zur systemischen Antibiose auch eine lokale Antibiose als sinnvoll erachtet wird [1, 41]. Unbehandelt kann sich die Osteomyelitis zur Osteonekrose mit weiterführender Knochenzerstörung entwickeln. Hierbei besteht auch die Gefahr der Entstehung einer septischen Arthritis. Außerdem ist mehrfach das Auftreten pathologischer Frakturen durch ausgedehnte Knochendestruktion beschrieben worden [42-44].

2.2 Knochenersatzmaterialien und -transplantate

In einem historischen Review zur Geschichte der Calciumphosphate beschreibt Dorozkhin [45], dass Knochenersatzmaterialien (KEMs) und diverse Implantate schon während der antiken Hochkulturen verwendet wurden. Die synthetischen Calciumphosphate wurden jedoch erstmals 1920 von dem Chirurgen Fred H. Albee als KEM im Tierversuch erprobt. Seitdem unterliegen sie einer stetigen Weiterentwicklung [45, 46]. Heute nehmen KEMs eine nicht wegzudenkende Rolle in der Knochenchirurgie ein. Mittlerweile gibt es unzählige unterschiedliche Materialien, die sich als Knochenersatz eignen, zudem kommen stetig neue Materialsysteme hinzu. Zentrale Herausforderungen sind hierbei neben der Biokompatibilität, der Einheilung und dem Abbauverhalten, auch die Vermeidung von Implantat-assoziierten Infektionen.

Knochenersatzmaterialien und -transplantate können nach verschiedenen Eigenschaften eingeteilt werden, so beispielsweise nach der Art ihrer Herkunft, wie in Tabelle 1 dargestellt [47]. Vom Patienten selbst entnommene Knochentransplantate werden als autogen bezeichnet. Der Vorteil hiervon ist die besonders gute Heilungseigenschaft, als Nachteil sind die begrenzte Verfügbarkeit, der operative Mehraufwand und die zusätzliche Wundsetzung am Entnahmeort des

Transplantates zu nennen [48, 49]. Als Sonderform der autogenen sind an dieser Stelle die syngenen Transplantate zu nennen. Diese können nur von eineiigen Geschwistern gegenseitig gespendet werden. Allogene KEMs sind von genetisch unterschiedlichen Individuen, die derselben Spezies angehören. Als xenogene KEMs werden solche bezeichnet, die von Individuen einer anderen Spezies stammen, häufig sind diese vom Schwein, Rind oder Pferd. Bei allogener und xenogener Knochentransplantatherkunft muss das jeweilige KEM durch verschiedene chemische und/oder physikalische Prozesse aufbereitet werden, um Immunreaktionen im Empfängerorganismus möglichst zu minimieren. Dies kann durch die Behandlung mit hohen Temperaturen oder hohem pH-Wert erfolgen [50]. Die Möglichkeit Krankheiten zu übertragen oder Entzündungsreaktionen auszulösen, gilt als Nachteil dieser Transplantate. Gleiches gilt für KEMs pflanzlichen Ursprungs, hierbei spricht man von phykogenen Transplantaten. Es kann hierfür bspw. das anorganische Gerüst von Algen verwendet werden [51]. Vollsynthetisches KEM wird als alloplastisch bzw. synthetisch bezeichnet, wobei diese Materialien verschiedene Zusammensetzungen aufweisen können. So kann synthetischer Knochenersatz bspw. aus Hydroxylapatit (HA), anderen Calciumphosphaten (z.B. Tricalciumphosphat (TCP), biphasische Calciumphosphate), Calciumsulfat, bioaktiven Gläsern (enthalten Siliziumverbindungen) oder polymerbasierten Materialien (z.B. Polymilchsäure, Polycaprolacton, Poly-p-dioxanon) bestehen [18, 52].

Tabelle 1: Einteilung von KEMs nach der Herkunft [47]

Herkunft	Erklärung
autogen/autolog	vom Patienten
syngen/isogen	von genetisch identischen Individuen
allogen/homogen	von genetisch unterschiedlichem Individuum der gleichen Spezies
xenogen/heterogen	von einer anderen Spezies (z.B. Rind, Schwein)
phykogen	pflanzlichen Ursprungs (z.B. Rotalgen)
alloplastisch	synthetisch / künstlich hergestellt

Daneben lässt sich KEM nach seinen Heilungseigenschaften einteilen. Man unterscheidet osteogene, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften. Hierbei führt osteogenes KEM zur Knochenneubildung durch darin enthaltene vitale Zellen. Diese Form der Knochenheilung tritt nur bei autogenen Transplantaten und bei der Kombination von Knochenmarkstransplantaten oder plättchenreichem Plasma mit einem anorganischen KEM auf [53]. Die osteoinduktive Knochenheilung ist davon abzugrenzen. Hierbei regen Wachstumsfaktoren innerhalb des Transplantates die körpereigenen mesenchymalen Stammzellen zur Differenzierung zu Osteoblasten an, welche dann zur Knochenneubildung und -heilung beitragen. Diese Form der Knochenheilung tritt bei autogenen Transplantaten auf sowie bei der Kombination von „Bone morphogenic proteins“ oder anderen Wachstumsfaktoren mit KEMs. Bei der osteokonduktiven Knochenheilung wirkt das KEM stabilisierend als Leitschiene für die körpereigene Knochenbildung. So können Blutgefäße und Zellen in die Hohlräume des KEM einwachsen. Diese Form der Knochenheilung findet sich bei allen KEMs unabhängig ihrer Herkunft [49, 54].

Weiterhin lässt sich KEM nach seiner Abbaubarkeit einteilen. Man unterscheidet hierbei unterschiedliche Abbaumechanismen. Einerseits kann der Abbau passiv über chemische Dissolution erfolgen (z.B. Calciumsulfat-hemihydrat) [55]. Dies ist möglich sofern das Löslichkeitsprodukt des KEM höher ist als die Konzentration der gelösten Ionen innerhalb der extrazellulären Flüssigkeit. Andererseits kann der Abbau aktiv durch Osteoklasten vermittelt sein. Diese bilden dann ein lokal abgeschirmtes Kompartiment, um hohe Salzsäure-Konzentrationen zu erzeugen und dadurch den pH-Wert zu erniedrigen, was wiederum lokal die Löslichkeit des KEM erhöht [56]. Weiterhin besteht die Möglichkeit des Abbaus durch Makrophagen oder Riesenzellen, die kleinere Partikel von KEM endozytotisch aufnehmen und diese abbauen [57]. Die Abbaubarkeit ist insbesondere bei der Entwicklung synthetischer KEMs von großer Bedeutung. So gibt es KEMs, welche nach wenigen Wochen resorbiert werden (z.B. α -TCP, Calciumsulfat) und andere, die erst nach mehreren Jahren (z.B. HA) vollständig resorbiert werden. Weiterhin muss beachtet werden, dass die Abbaurate von KEMs auch durch körpereigenen Faktoren beeinflusst wird [58]. Darüber hinaus gibt es nicht

resorbierbare KEMs, welche besonders bei endoprothetischen Operationen zur Befestigung angewandt werden (z.B. PMMA).

Bei relativ schnell abbaubaren KEMs (wenige Monate) besteht das Risiko einer bindegewebigen Defektheilung, sofern der Abbau des KEM schneller erfolgt als die Knochenneubildung. Daraus resultieren geringere mechanische Eigenschaften und somit eine verminderte Belastbarkeit des Knochens [52]. Demgegenüber hat auch sehr langsam bzw. nicht resorbierbares KEM Nachteile. So kann sich der vitale Knochen durch lebenslange Umbauvorgänge an geänderte Belastungsvektoren anpassen. Ist das KEM nicht resorbierbar bzw. nur über Jahre abbaubar, ist diese biologisch sinnvolle Adaptation nicht möglich. Es handelt sich hierbei um einen funktionell toten Bereich innerhalb des Knochens, der die Gefahr birgt, dass bei sehr langer Verweildauer die Wahrscheinlichkeit der bakteriellen Besiedelung zunimmt [59]. Der Abbauperioden sollte den funktionellen Anforderungen angepasst werden. So sind bspw. nach einer Zahnextraktion und angestrebter Implantatversorgung der Erhalt des Alveolarkamms durch KEMs, sowie eine schnelle Defektheilung erwünscht. Hierdurch wird der Zeitraum bis zur angestrebten Implantation nicht unnötig verlängert. Ein zu langsam bzw. unvollständig abgebautes KEM kann hierbei die erfolgreiche Osseointegration des Implantats gefährden. Optimal wäre eine möglichst vollständige Resorption des KEM bei zeitgleichem Umbau zu vitalem Knochen bevor eine Implantation durchgeführt wird [60, 61]. Eine andere Anforderung an KEMs stellt die langfristige Befestigung einer zementierten Endoprothese im Bereich der Orthopädie dar. Hier wird direkt nach Einbringen der Endoprothese eine sehr hohe Festigkeit zwischen KEM und verbleibendem Knochen benötigt. Das KEM sollte nicht um- oder abgebaut werden, es dominiert die Klebefunktion zwischen Prothese und Knochen.

2.2.1 Synthetische resorbierbare Knochenersatzmaterialien

Die synthetischen KEMs können, wie zuvor geschildert, unterschiedliche Zusammensetzungen aufweisen und verschiedenen Fertigungsprozessen unterliegen. Dies beeinflusst die mechanischen Eigenschaften wie bspw. die Druckfestigkeit, aber auch strukturelle Eigenschaften wie die Porosität oder Charakteristika wie

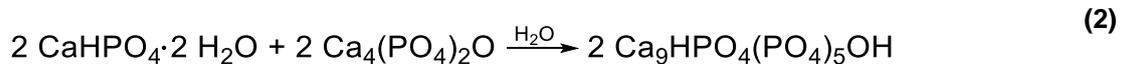
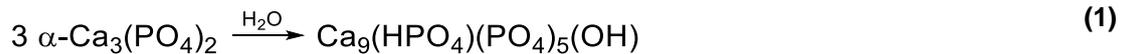
die Löslichkeit [62]. Bezüglich der Porosität muss beachtet werden, dass innerhalb der Biomaterialien keine einheitliche Definition der unterschiedlichen Porengrößenbezeichnungen (Nano-, Mikro-, Meso-, Makroporen) vorliegt. So werden bspw. Mikroporen mit $< 2 \mu\text{m}$ [63, 64], sowie mit $40 - 200 \text{ nm}$ [65] und $2 - 5 \mu\text{m}$ [66] definiert, weshalb diese Begriffe nur mit den entsprechenden Definitionen des jeweiligen Autors aufgeführt werden. Im Folgenden wird ein Überblick über die in dieser Arbeit relevanten synthetischen resorbierbaren KEMs, bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung und weiterer Eigenschaften, gegeben. Eine Zusammenstellung verschiedener Eigenschaften aller in dieser Arbeit relevanten anorganischen KEMs findet sich am Ende dieses Kapitels (Tabelle 2).

Calciumphosphate

Die Calciumphosphate (CaPs) gehören der Mineralklasse der Phosphate an und sind Salze, die elementare P^{5-} -Ionen enthalten. Als KEM sind besonders die Orthophosphate, die Salze der Phosphorsäure (H_3PO_4) von sehr großer Bedeutung. Neben den Orthophosphaten gibt es die Pyrophosphate ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) und die Polyphosphate ($(\text{PO}_3)_n^{n-}$), diese finden jedoch als KEM keine Verwendung [67]. Die Herstellung synthetischer Calciumorthophosphate kann prinzipiell über zwei Mechanismen erfolgen, zum einen über eine Lösungs-Fällungs-Reaktion in wässriger Lösung (Niedertemperatur-CaPs), zum anderen über thermische Energiezufuhr (Hochtemperatur-CaPs). Niedertemperatur-CaPs sind bspw. der Calcium-defizitäre Hydroxylapatit und Dicalciumphosphate wie z.B. Brushit ($\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) und Monetit (CaHPO_4). Zu den Hochtemperatur-CaPs werden der stöchiometrische HA und die Tricalciumphosphate (TCPs) gezählt [68]. Bei den Niedertemperatur-CaPs kann auch der pH-Wert, unter dem die Reaktion abläuft, die entstehenden Produkte beeinflussen, bei der thermischen Methode entscheidet die Temperatur über bevorzugt gebildete CaP-Produkte [69, 70]. Weiterhin lassen sich die Eigenschaften durch zusätzliche Dotierung mit anderen Ionen beeinflussen [71]. Eine wichtige Kenngröße der CaPs ist das Verhältnis zwischen Calcium und Phosphat (Ca/P-Verhältnis). Es lässt erste Rückschlüsse auf die Löslichkeit und die Azidität zu. Allgemein kann davon ausgegangen werden, dass mit steigendem Ca/P-Verhältnis die Löslichkeit und die Azidität abnehmen [72]. Den CaPs wird generell eine sehr gute Biokompatibilität

zugeschrieben, woraus resultiert, dass diese ihren medizinischen Anforderungen gerecht werden und eine angemessene Immunreaktion auslösen [20, 73, 74].

Der Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$) stellt den mineralischen Hauptbestandteil des Knochens und der Zähne dar. Man unterscheidet bei HA zwei verschiedene Formen, die sich stöchiometrisch unterscheiden; zum einen den Calcium-defizitären HA ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$; $0 \leq x \leq 1$) mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,50 – 1,67, zum anderen den stöchiometrischen HA ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{OH}$) mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,67 [75, 76]. Einige Autoren definieren als Calcium-defizitären HA nur denjenigen mit einem Ca/P-Verhältnis von 1,5. Davon abgegrenzt wird HA mit einem CaP-Verhältnis von 1,5 – 1,67 als präzipitierter HA bezeichnet. Die Bildung von Calcium-defizitärem HA erfolgt bspw. bei neutralem pH-Wert durch Hydrolyse von α -TCP (Formel 1) oder durch eine Reaktion zwischen Tetra-calciumphosphat und Calciumhydrogenphosphat-Dihydrat (Formel 2) [77-79]. Der Calcium-defizitäre HA weist stets eine monokline Kristallsymmetrie auf.



Den stöchiometrischen HA erhält man durch Sinterung innerhalb eines Temperaturintervalls von 1100 – 1250 °C [71]. Als Ausgangsstoffe können hierfür Calciumcarbonat (CaCO_3) und Calciumhydrogenphosphat (CaHPO_4) eingesetzt werden [80]. Es bildet sich dabei ein hexagonales Kristallgefüge [62, 81]. Die Löslichkeit des HA ist mit $9,6 \cdot 10^{-5}$ mg/L bei 37 °C sehr gering, woraus sich seine vergleichsweise langsame Resorptionsgeschwindigkeit (>24 Monate) ergibt, die hauptsächlich auf den Abbau durch Osteoklasten zurückzuführen ist [70, 82, 83]. Jedoch wird dem HA allgemein eine bioaktive Wirkung zugesprochen, darunter versteht man das Ausbilden einer chemischen Bindung bei der Interaktion zwischen HA und Knochengewebe [84, 85]. Diese Eigenschaft wird auch als Verbundosteogenese bezeichnet [86].

Daneben finden auch die Tricalciumphosphate häufig Verwendung als KEM. Diese besitzen auf molekularer Ebene ein Ca/P-Verhältnis von 1,5 [76]. Zur Herstellung von TCPs müssen die Ausgangsstoffe in diesem Ca/P-Verhältnis

vorliegen. Hier wird zwischen zwei Kristallsymmetrien unterschieden: die Niedertemperatur-Form β -TCP (β -Ca₃(PO₄)₂), die rhomboedrisch vorliegt und bei Temperaturen von 800 – 1225 °C entsteht, und der Hochtemperatur-Form α -TCP (α -Ca₃(PO₄)₂), die sich monoklin zeigt und bei Temperaturen von 1225 – 1430 °C aus β -TCP entsteht [70, 87]. Die TCPs zeichnen sich durch eine bessere Resorbierbarkeit im Vergleich zu HA aus [84], was auf das größere Löslichkeitsprodukt zurückzuführen ist. Bei 37 °C beträgt die Löslichkeit für α -TCP 0,24 mg/L und für β -TCP 0,15 mg/L [70].

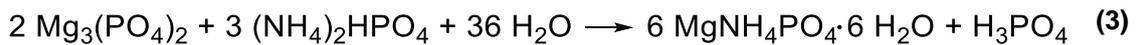
Daneben sind die Calciumphosphat-Zemente (CaP-Zemente) ein wichtiger Bestandteil der synthetischen KEMs. Die Endprodukte dieser Zemente werden über eine Lösungs-Fällungs-Reaktion generiert. Es bilden sich hierbei Niedertemperatur-CaPs, meist Calcium-defizitärer HA oder Brushit [88]. Die Vorteile der Verwendung von Zementen als KEM sind die Kombination der zuvor genannten Eigenschaften der CaPs (Biokompatibilität, Degradation und Osteokonduktivität) mit der Injizierbarkeit und Formbarkeit der Zemente. Daraus ergeben sich neue Möglichkeiten bei der Applikation, die deutlich minimalinvasiver ausfallen können. Nachteilig müssen die im Vergleich zu gesinterten CaPs relativ geringen mechanischen Eigenschaften betrachtet werden, was ihre Indikation auf nicht lasttragende Knochendefekte beschränkt [62, 89]. Die Druckfestigkeit der Hydroxylapatit-bildenden CaP-Zementen wird in der Literatur mit ca. 30 – 50 MPa angegeben [90, 91].

Magnesiumphosphate

Auch die Magnesiumphosphate werden innerhalb der Mineralogie den Phosphaten zugeordnet. Die Magnesiumphosphat-Zemente nehmen als KEM in der Medizin eine (noch) relativ geringe Rolle ein, sind jedoch Gegenstand aktueller Forschung und zeigen als Zemente einige Vorteile gegenüber den etablierten CaP-Zementen. So weisen sie im Vergleich zu HA-bildenden CaP-Zementen bessere mechanische Eigenschaften auf und sind schneller degradierbar. Die Biokompatibilität wird ebenso als sehr gut angesehen, zudem zeigen sie knochenadhäsive Eigenschaften [92, 93]. Weiterhin setzen die Zemente Mg²⁺-Ionen frei, welche die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten stimulieren und

diejenige zu Osteoklasten hemmen kann [94]. Außerdem können auch die Magnesiumphosphate mit weiteren Ionen dotiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an dem Magnesiumammoniumphosphat-Zement Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) durchgeführt. Als Ausgangsstoffe wurden in dieser Arbeit Farringtonit ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) und Diammoniumhydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) verwendet, die dazugehörige Reaktionsgleichung zeigt Formel 3.



Den Struvit-Zementen wird eine gute bzw. schnelle Abbaubarkeit zugeschrieben, da sie sowohl durch chemische Dissolution als auch durch Osteoklasten abgebaut werden können [95]. Besonders die im Vergleich zu den CaPs größere Löslichkeit ist hierfür ursächlich. Die Angaben zur Löslichkeit für Struvit unterliegen in der Literatur jedoch relativ großen Schwankungen. Einerseits wird diese bei 35 °C deutlich oberhalb von 200 mg/L eingeordnet, so beschreiben dies Bhuiyan *et al.* [96] mit ca. 213 mg/L oder Ariyanto *et al.* [97] mit ca. 250 mg/L. Daneben existieren Angaben zur Löslichkeit von ca. 10 mg/L [98, 99]. In der Kristallstruktur stellt sich Struvit orthorombisch dar [100]. Außerdem hat sich gezeigt, dass Struvit-Zemente, im Vergleich zu CaP-Zementen, höhere Druckfestigkeiten in kürzerer Zeit erreichen, da die Umwandlung in Struvit sehr schnell erfolgt (1 – 2 h) [101]. Die Angaben der Druckfestigkeit für Struvit-bildende Zemente wird abhängig von unterschiedlichen Einflussfaktoren (z.B. Mahldauer, Pulver/Flüssigkeits-Verhältnis, Abbindezeit) mit >50 MPa angegeben [102, 103]. Besonders hervorzuheben ist hierbei, dass die endgültige Druckfestigkeit bereits wenige Stunden nach dem Anmischprocedere erreicht wird [101].

Tabelle 2: Übersicht einiger synthetischer KEMs

Name (Mineral)	Summenformel	Ca/P-Verhältnis	Kristallsymmetrie	Löslichkeit [mg/L]
Calciumphosphate	[68]	Ca/P-Verhältnis	[70]	[70, 104]
α -TCP	α -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	monoklin	~0,24 (37 °C)
β -TCP	β -Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	rhomboedrisch	~0,15 (37 °C)
Hydroxylapatit	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	1,67	hexagonal oder monoklin	9,6·10 ⁻⁵ (37 °C) 0,3 (25 °C) [62]
Calcium-defizitärer Hydroxylapatit	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} 0 ≤ x ≤ 1	1,5 – 1,67		9,4 (25 °C) [62]
Magnesiumphosphate	[94]	Mg/P-Verhältnis		[mg/L]
Magnesiumammonium-phosphathexahydrat (Struvit)	MgNH ₄ PO ₄ ·6H ₂ O	1	orthorhombisch [100]	> 200 (35 °C) [96, 97] 11,9 (38 °C) [99] 4,24 – 14,61 [98]
Trimagnesiumphosphat (Farringtonit)	Mg ₃ (PO ₄) ₂	1,5	monoklin [106]	2,81 (25 °C) [98, 105]

2.2.2 Knochenersatzmaterialien als lokale Wirkstoffträger für Antibiotika

Im Gegensatz zu den gut vaskularisierten Organen ist die Durchblutung des Knochens verhältnismäßig gering, was die Behandlung entzündlicher Knochenkrankungen, wie der Osteomyelitis, ausschließlich durch eine systemische Antibiose erheblich erschwert. Insbesondere bei der chronischen Osteomyelitis, die sich durch die Sequesterbildung auszeichnet, können systemische Antibiotika den Wirkungsort schlecht erreichen. Die Vorteile lokaler Wirkstoffträger gegenüber der systemischen Applikation sind besonders die großen lokalen Wirkstoffkonzentrationen bei gleichzeitig geringen systemischen Nebenwirkungen. Durch die systemische Gabe lassen sich derart hohe Konzentrationen, aufgrund des Überwiegens der systemischen Toxizität, nicht erreichen. Bei lokaler Antibiotikagabe werden hingegen nur vereinzelt systemische unerwünschte Arzneimittelwirkungen beobachtet. Zudem ergibt sich bezüglich der Wirkstoffkonzentration eine verlängerte Halbwertszeit (HWZ), da die Medikamente langsamer die Abbaorgane (Niere und/oder Leber) erreichen. So wird die lokale Wirkstoffkonzentration weniger von der Abbaugeschwindigkeit der Leber/Niere bestimmt, sondern speziell im relativ gering durchbluteten Knochen von der Freisetzungsgeschwindigkeit des jeweiligen Wirkstoffträgers. Die idealen Eigenschaften eines lokalen Wirkstoffträgers zeichnen sich durch die vollständige Freisetzung am Wirkungsort aus, wobei es zu keiner Beeinträchtigung der Medikamentenwirkung kommen sollte. Neben Antibiotika ist auch die Inkorporation zahlreicher anderer Medikamente und Wirkstoffe in KEMs Gegenstand aktueller Forschung [107].

Außerdem wirken lokale Antibiotika präventiv der Kontamination des KEM selbst entgegen, um so der Entstehung Implantat-assoziiertes Osteomyelitiden vorzubeugen. Dies kann komplexe Implantatsysteme bei endoprothetischen Eingriffen betreffen, aber auch bei alleiniger Verwendung von KEM kann es zu dessen bakterieller Besiedelung kommen. Durch das Einbringen von KEM kann es bei vorhandener bakterieller Kontamination des Operationsgebietes zu einem Wettstreit um die primäre Besiedelung der Transplantat- bzw. Implantat-Oberfläche zwischen Bakterien und körpereigenen Zellen kommen. Sollten Bakterien den Zellen hierbei zuvorkommen, schreitet die Kaskade der Biofilmbildung voran und eine

Einheilung des KEM ist ausgeschlossen [108]. Die Oberflächenstruktur von KEM ist so beschaffen, dass sie ideale Voraussetzungen für die Adhäsion von Körperzellen bietet, jedoch begünstigt diese Struktur auch die bakterielle Besiedelung. Durch die Biofilmbildung der Bakterien erhöht sich ihre Antibiotikaresistenz um den Faktor 100 – 1000 [109]. Somit ist die gezielte Bekämpfung der Erreger durch lokale Freisetzung von Antibiotika, neben intensiver Einhaltung hygienischer Standards, ein zielführender Lösungsansatz, um der Implantat-assoziierten Osteomyelitis präventiv entgegenzuwirken.

Die wohl bekanntesten lokalen Wirkstoffträger für Antibiotika innerhalb der Knochenchirurgie sind die Gentamicin-haltigen Polymethylmetacrylat (PMMA) Produkte. Es haben sich insbesondere antibiotikahaltige PMMA-Ketten für die Therapie von Osteomyelitiden bewährt. Nachteilig ist jedoch, dass PMMA nicht resorbierbar ist und somit in einem chirurgischen Zweiteingriff wieder entfernt werden muss [110]. Besonders bei antibiotikahaltigen PMMA-Zementen, die zur Befestigung von Endoprothesen verwendet werden, ist die über Jahre andauernde Freisetzung der Antibiotika unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) kritisch zu betrachten. Als Folge dessen konnte für einige Bakterienspezies sogar die Anregung zur Biofilmbildung beobachtet werden und zudem auch das vermehrte Auftreten resistenter Stämme [111]. Die Kombination von resorbierbaren KEMs mit Antibiotika ermöglicht somit eine Wirkstofffreisetzung, die spätestens nach vollständiger Resorption beendet ist und eine Entfernung überflüssig macht. Allgemein sollen resorbierbare Wirkstoffträger über einen gewissen Zeitraum eine bestimmte Wirkstoffmenge lokal freisetzen. Für einige Präparate aus Calciumsulfat wird die Zugabe von Antibiotika durch den behandelnden Arzt beschrieben (z.B. PerOssal®) [112, 113] oder diese sind als zugelassene Kombinationsprodukte erhältlich (z.B. Osteoset® T, Herafill® G, Cerament® G/V) [114-118]. Die erfolgreiche Kombination von CaP-Zementen mit Antibiotika wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben [6, 119-121].

Die Freisetzungskinetik der Antibiotika von lokalen Wirkstoffträgern hängt von verschiedenen Faktoren wie dem Medikament selbst, der Trägersubstanz und dem Elutionsmedium ab. Eigenschaften des verwendeten Medikaments wie dessen Ladung und Löslichkeit nehmen Einfluss auf die Freisetzungskarakteristik.

So kann die Interaktion zwischen dem Antibiotikum und dem KEM über kovalente Bindung oder supramolekulare Wechselwirkungen erfolgen [122]. Daneben beeinflusst die Oberflächenbeschaffenheit des KEM, genauer die Gesamtporosität, die Porengröße und die Tortuosität, die Freisetzungskinetik [107]. Weiterhin nehmen neben der Löslichkeit und der Hydrophilie des Antibiotikums auch die Abbaurate des KEM, Veränderungen des pH-Wertes und der osmotische Druck Einfluss auf das Freisetzungsverhalten [123]. Für abbaubare KEMs zeigen sich nach Kluin *et al.* [124] drei verschiedene Freisetzungskarakteristika wie in Abbildung 2 dargestellt. Die Unterschiede resultieren demnach aus den Degradationseigenschaften. Für langsam resorbierbare KEMs, was meist für die CaP-Zemente zutrifft, ergibt sich eine diffusionsgesteuerte Freisetzung, die initial stark ansteigt und i.d.R. noch vor vollständiger Resorption beendet ist. Weiterhin wird zwischen Massen- und Oberflächenerosion unterschieden. Bei den massenerodierenden KEMs (z.B. Calciumsulfate, Kollagen) zeigt die Freisetzungskinetik initial einen schnellen Anstieg, nimmt dann in ihrer Steigung ab und erreicht erst verspätet ein Maximum, nachdem dann die Freisetzung stetig abnimmt. Die oberflächlich erodierenden KEMs (z.B. Polycarbonate) ergeben sich durch enzymatischen Abbau *in vivo*. Hierbei zeigt sich ebenfalls initial ein starker Anstieg der Antibiotikafreisetzung und erreicht direkt ein Maximum, dann erfolgt stetig eine geringe Abnahme der freigesetzten Wirkstoffmenge, bis diese bei fortgeschrittener Resorption abrupt abnimmt [124].

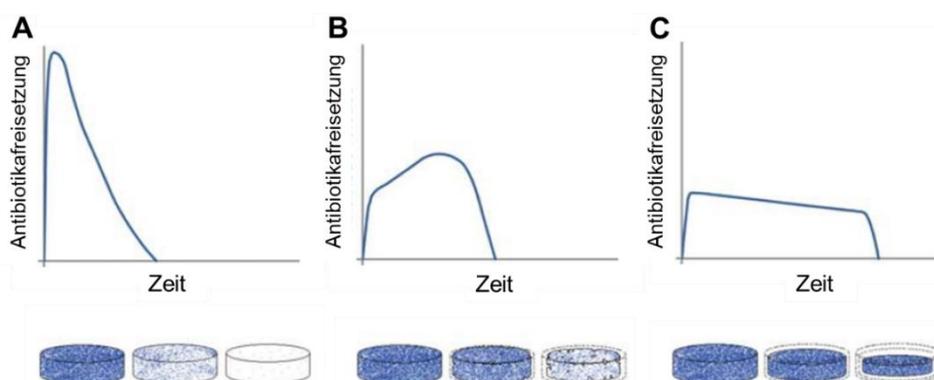


Abbildung 2: Freisetzungskarakteristika resorbierbarer Wirkstoffträger

Die Freisetzungskarakteristika sind schematisch für resorbierbare Wirkstoffträger abhängig von ihrem Resorptionsverhalten dargestellt: A zeigt dies schematisch für langsam resorbierbare Wirkstoffträger, B für massenerodierende und C für oberflächlich erodierende. Mit freundlicher Genehmigung von Taylor & Francis modifiziert übernommen aus [124].

Modelle der Wirkstofffreisetzung

Um die Freisetzungskinetik beschreiben zu können existieren viele empirische und semi-empirische Modelle. Diese lassen, durch die Anwendung auf die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen, Rückschlüsse auf das zugrunde liegenden mechanistische Freisetzungsverhalten zu. Je nach Determinationskoeffizient und Voraussetzungen der verschiedenen Modelle erfolgt die Auswahl eines geeigneten Modells. Diese Modelle wurden meist für polymere Trägersubstanzen entwickelt und sind somit nur mit beschränkter Aussagekraft auf anorganische KEMs übertragbar. Für das Freisetzungsverhalten bei KEMs als Medikamententräger hat sich in vielen Arbeiten das Korsmeyer-Peppas Modell etabliert [119, 125-127]. Dieses wurde ursprünglich für polymere Trägersubstanzen mit der Fähigkeit zur Quellung entwickelt. Es wurden drei grundlegende Freisetzungsmechanismen beschrieben: die rein diffusionsgetriebene Freisetzung, die quellungsbedingte Freisetzung und die Kombination aus beiden [128]. Von Ritger und Peppas [129] wurde dieses Modell auf nicht quellungsfähige Materialien erweitert, wobei sich die zugrundeliegenden Freisetzungsmechanismen (nach Fick'scher Diffusion, nicht Fick'sche Diffusion und Freisetzung nach 0. Ordnung) teilweise veränderten.

Bei dem Korsmeyer-Peppas Modell wird die prozentuale kumulative bzw. absolute Freisetzung der Medikamente aufgetragen gegen die Zeit betrachtet. Als Voraussetzung sollte eine gleichmäßige Verteilung des Medikaments innerhalb der Trägermatrix angenommen werden. Die Anpassung erfolgt nach der Formel 4.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (4)$$

Hierbei ist M_t die freigesetzte Konzentration zum Zeitpunkt t , M_∞ die initiale beladene Antibiotikamenge und k ($\% \cdot s^{-1}$) die Freisetzungskonstante. Mit dem Exponenten n erfolgt schließlich die mechanistische Zuordnung der Freisetzung. Da die untersuchten Zemente nicht zur Quellung fähig sind, erfolgt die Zuordnung des Exponenten n gemäß dem Modell von Ritger und Peppas [129]. Es gilt an zylindrischen Körpern hierfür: $n < 0,45$ quasi Fick'sche Diffusion, $n = 0,45$ Fick'sche Diffusion, $0,45 < n < 1$ anormaler (= nicht Fick'scher) Transport, $n = 1$

Freisetzung nach 0. Ordnung [129, 130]. Für die hier untersuchten KEMs verläuft die Degradation um ein Vielfaches langsamer als das gesamte Freisetzungintervall lang ist, demnach wird eine der Diffusion zugrundeliegende Freisetzung angenommen ($n \leq 0,45$).

Die mathematische Darstellung der Fick'schen Diffusion wird in Formel 5 dargestellt (1. Fick'sches Diffusionsgesetz). Demnach zeigt sich der Massefluss j (mol/s · m²) in einer proportionalen Beziehung zum Diffusionskoeffizienten D (m²/s) und dem Konzentrationsgradienten $\frac{\partial c}{\partial x}$ (mol/m⁴).

$$j = - D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (5)$$

Weiterhin existiert ein zweites Fick'sches Diffusionsgesetz, welches in Formel 6 dargestellt ist. Dieses beruht auf der in Formel 7 gezeigten Kontinuitätsgleichung. Diese stellt den Zusammenhang zwischen der Konzentrationsänderung ∂c zum Zeitpunkt ∂t , mit dem Massefluss ∂j der entsprechenden Richtung ∂x . Bei Kombination der Kontinuitätsgleichung mit dem 1. Fick'schen Diffusionsgesetz ergibt sich das 2. Fick'sche Diffusionsgesetz, welches die zeitliche Konzentrationsänderung mitberücksichtigt.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \cdot \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (6)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial j}{\partial x} \quad (7)$$

2.3 Antiinfektiva

Die ursprüngliche Begriffsdefinition der Antibiotika wurde von Selman A. Waxman geprägt. So sind demnach Antibiotika Substanzen, die antimikrobielle Eigenschaften (wachstumshemmend/bakteriostatisch oder abtötend/bakterizid) aufzeigen und von Mikroorganismen selbst produziert werden [131]. Synthetische Substanzen, die antimikrobielle Wirkungen zeigen, werden davon abgegrenzt als Chemotherapeutika bezeichnet. Im heutigen Sprachgebrauch wird diese Unterscheidung nur noch selten beachtet [132, 133]. Wichtige Kenngrößen

für Antibiotika sind ihr Wirkspektrum, die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die minimale bakterizide Konzentration (MBK). Das Wirkspektrum ist, sofern keine Resistenzmechanismen greifen, durch die Pharmakokinetik des jeweiligen Antibiotikums bedingt. Als MHK wird die geringste Konzentration eines Antibiotikums bezeichnet, welche die Vermehrung einer bestimmten Bakterienspezies *in vitro* verhindert. Hingegen bezeichnet die MBK die geringste Antibiotikakonzentration, die nach einer Einwirkzeit von 6 h (DIN) 99,9 % einer festgelegten Anzahl von Bakterien abtötet [134]. Wichtig ist hierbei, dass es sich um *in vitro* bestimmte Laborwerte handelt, die nicht direkt auf die klinische Anwendung übertragen werden können. Ursächlich ist hierfür unter anderem, dass *in vivo* auch die Präsenz von lokalen Faktoren (Serumproteine, pH-Wert, bivalente Ionen, die Art der bakteriellen Lebensform (planktonisch o. sessil)) Einfluss auf MHK und MBK nehmen [135-138]. So kann durch die Biofilmbildung die Sensibilität einer Bakterienspezies gegenüber Antibiotika um den Faktor 100 – 1000 erniedrigt sein [109, 139]. Für die Effektivität der antimikrobiellen Therapie ist entscheidend, dass die lokalen Antibiotikakonzentrationen ein Vielfaches der MHK überschreiten, um Resistenzen vorzubeugen und die Variabilität des Wertes auszugleichen [140]. Für Antibiotika in KEMs hat sich die initial häufig beobachtete erhöhte Freisetzung (sog. „burst release“) als positive Eigenschaft gezeigt. Auf diese Weise ist initial eine Abtötung aller lokal ansässigen Bakterien anzunehmen. Die hohen Wirkstoffspiegel der Antibiotika sind, besonders bei erhöhter Antibiotikaresistenz der Bakterien, z.B. innerhalb eines Biofilms oder bei nur partiell vorhandener Sensibilität, wesentlich von Vorteil.

Vielfach diskutiert wurde die Gefahr der Resistenzentwicklung bei lokal applizierten Antibiotika durch die prolongierte Freisetzung von relativ geringen Wirkstoffmengen (nahe der minimalen Hemmkonzentration). Dies ermöglicht es Bakterien unterschiedliche Resistenzmechanismen gegenüber dem verwendeten Antibiotikum zu entwickeln. Jedoch konnte auch durch systemische Antibiotikaapplikation die Entstehung von erworbenen bakteriellen Resistenzmechanismen nachgewiesen werden. Die antibiotikaresistenten Stämme können demnach durch subtherapeutische Serumspiegel im Verdauungstrakt oder im jeweiligen Infektionsfokus entstehen [141]. Besonders in Bereichen mit hoher Bakteriendichte ist die

Möglichkeit des Genaustauschs wahrscheinlicher (horizontaler Gentransfer), was die Entstehung von erworbenen Resistenzen begünstigt [142]. So sollte allgemein eine antibiotische Therapie nur mit vorausgegangener Prüfung der Notwendigkeit erfolgen, dies schließt jedoch die präventive Gabe bei entsprechendem Risikoprofil nicht aus. Demnach kann die Kombination von Antibiotika mit KEMs, insbesondere als adjuvante Maßnahme zum chirurgischen Débridement, weiterhin eine zielführende Therapie bakterieller Infektionen darstellen [143].

2.3.1 Auswahl geeigneter Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika wurden nach verschiedenen Kriterien ausgewählt. Zum einen wurden bereits in PMMA-Knochenzementen etablierte Wirkstoffe, insbesondere Gentamicin (z.B. in PALACOS®, SmartSet®) und Vancomycin (z.B. neben Gentamicin in Copal® G+V enthalten) als sinnvolle Präparate angesehen, zum anderen wurde in der Literatur nach weiteren, in der Orthopädie häufig verwendeten Antibiotika gesucht [144]. Außerdem sollten die ausgewählten Wirkstoffe in den Herstellerangaben als Indikation die Knochen- und Weichteilinfektion aufgeführt haben. Weiterhin mussten die Antibiotika eine ausreichende Löslichkeit im wässrigen Milieu aufzeigen, weshalb nur intravenös zu verabreichende Präparate für die Versuche dieser Arbeit infrage kamen. Für die klinische Anwendung der adjuvanten lokalen Antibiotikatherapie sollte außerdem berücksichtigt werden, dass sich unterschiedliche systemisch und lokal verabreichte Antibiotika in ihrer Wirkung nicht antagonistisch beeinflussen [145]. Schließlich wurden folgende Antibiotika für erste orientierende Untersuchungen herangezogen: Gentamicin, Vancomycin, Cefuroxim, Ciprofloxacin und Clindamycin. Die Strukturformeln dieser Antibiotika sind am Ende dieses Kapitels in Tabelle 3 dargestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden insbesondere Gentamicin und Vancomycin verwendet.

Gentamicin

Gentamicin zählt zur Gruppe der Aminoglykoside. Es wurde 1963 erstmals aus Mikromonospora extrahiert und seine antibakterielle Wirkung vorgestellt [146]. Die Aminoglykoside wirken bakterizid, indem sie die Proteinsynthese durch irreversible Bindung an die 30S-Untereinheit der bakteriellen 70S-Ribosomen

hemmen [147]. Der bakterizide Effekt durch die Hemmung der Proteinsynthese wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So könnte zum einen der Einbau fehlerhafter Proteine in die Zellmembran dafür ursächlich sein. Weiterhin wird eine starke Inhibition der Ribosomen erwähnt, sodass kaum Proteine hergestellt werden können. Außerdem könnte auch die überschießende Produktion fehlerhafter Proteine zu oxidativem Stress innerhalb des Bakteriums führen [148]. Das Wirkungsspektrum von Gentamicin ist nur schwach im grampositiven Bereich, hingegen stärker im gramnegativen Bereich ausgeprägt. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAWs) sind besonders die irreversible Vestibulo- und Ototoxizität zu nennen [149]. Weiterhin werden allergische Reaktionen [150] und die Nephrotoxizität (meist reversible Einschränkung der glomerulären Filtration) [151] beschrieben. Untersuchungen von Philp *et al.* [152] zur Zytotoxizität von Gentamicin gegenüber Osteoblasten ergaben bei einer lokalen Konzentration von 1,7 mg/mL eine geringgradig verringerte Vermehrungsrate, die sich nach 3 d reversibel zeigte. Jedoch beschrieben Isefuku *et al.* [153], dass bereits Konzentrationen ab 0,1 mg/mL die Aktivität der alkalischen Phosphatase etwas herabsetzen.

Cefuroxim

Cefuroxim wird als Cephalosporin der großen Gruppe der β -Lactam-Antibiotika zugeordnet. Nach der wirksspektrumbezogenen Einteilung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft zählt es zur Gruppe 2 der Cephalosporine. Es ergibt sich ein bakterizider Wirkmechanismus durch den β -Lactamring. Dieser reagiert mit Enzymen, die an der Quervernetzung der bakteriellen Zellwand beteiligt sind (sog. Penicillin-bindenden-Proteinen), wodurch diese inhibiert werden. Folglich kommt es zu irreversiblen Zellwandschäden, welche die Lyse des Bakteriums bedingt. Cefuroxim wirkt gut im grampositiven Bereich (Streptokokken und Staphylokokken, nicht MRSA) und zusätzlich auch im gramnegativen Bereich (z.B. *E. coli*, *H. influenzae*), jedoch besteht eine Wirkungslücke gegen Enterokokken und Pseudomonaden [154, 155]. Als UAWs werden bei Cefuroxim Übelkeit, Erbrechen und gastrointestinale Beschwerden genannt. Seltener kommt es zum Stevens-Johnson-Syndrom, zur pseudomembranösen Kolitis, zu Kopfschmerzen, zur toxischen epidermalen Nekrolyse oder zu Hypersensibilitäten [156]. Von Salzmann *et al.* [157] konnten für Cefuroxim zytotoxische Effekte auf Osteoblasten ab einer

Serumlevel-Konzentration von 1 mg/mL festgestellt werden. Unterhalb dieser Konzentration zeigten sich geringe reversible Beeinträchtigungen des Zellmetabolismus.

Ciprofloxacin

Ciprofloxacin wird zur Gruppe der Fluorchinolone gezählt. Diese Gruppe leitet sich von den vollsynthetisch hergestellten Chinolonen ab, wobei durch Substitution eines Fluor-Atom an C-6 die Untergruppe der Fluorchinolone entstand [158]. Der Wirkmechanismus von Ciprofloxacin ist auf die Hemmung der bakteriellen Topoisomerase II und in geringerem Ausmaß auch auf Hemmung der Topoisomerase IV zurückzuführen. Die Topoisomerasen sorgen während der Replikation für die ideale Verpackung der DNA im Bakterium. Die Topoisomerase II ist für die Bildung von geordneten Schleifenstrukturen zuständig, um die DNA möglichst eng und doch gut ablesbar innerhalb des Bakteriums zu lagern. Die Topoisomerase IV trennt nach der Replikation, bedingt durch die ringförmige bakterielle DNA, die ineinander verschlossenen DNA-Duplikate. Die Hemmung dieser Enzyme zeigt eine bakterizide Wirkung [159, 160]. Als UAWs sind für Ciprofloxacin Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Kopfschmerzen, Unruhe und Abgeschlagenheit bekannt [160, 161]. Als schwerwiegende Nebenwirkung von Ciprofloxacin ist die Tendinopathie mit oftmals einhergehender Sehnenruptur bekannt [162, 163]. Cytotoxische Effekte auf Osteoblasten werden für Ciprofloxacin von Holtom *et al.* [164] ab Konzentrationen von 0,04 mg/mL (IC50) angegeben.

Clindamycin

Clindamycin gehört zur Gruppe der Lincosamide und leitet sich von dem heute nicht mehr gebräuchlichen Lincomycin, welches aus *Streptomyces lincolnensis* isoliert wird, ab. Clindamycin wird halbsynthetisch hergestellt, indem eine Hydroxylgruppe des Lincomycins durch ein Chloratom ausgetauscht wird. Clindamycin wirkt bakteriostatisch, indem es an die 50S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen bindet. Hierbei wird die Aminoacyl-t-RNA im Peptidyltransferase-Zentrum der Ribosomen blockiert, was schließlich die Proteinsynthese unterbindet. Das Wirkspektrum schließt alle grampositiven Bakterien und aerobe gramnegative Stäbchen ein [165-167]. Als UAWs sind neben Übelkeit, Erbrechen, Schmerzen an der Einstichstelle und metallischem

Geschmack, besonders die Gefahr der Entstehung einer pseudomembranösen Kolitis durch Überwuchern von *Clostridium difficile* zu nennen. Daneben kann es zum Auftreten eines akut generalisierenden pustulösen Exanthems kommen [168, 169]. Zytotoxische Konzentrationen auf Osteoblasten werden nach Naal *et al.* [170] ab lokalen Konzentrationen von 0,5 mg/mL beobachtet. Für geringere Konzentrationen wird ein zytostatischer Effekt angenommen.

Vancomycin

Vancomycin wurde 1957 erstmals von E.C. Kornfeld und Eli Lilly aus *Streptomyces orientalis* isoliert und zählt zur Gruppe der Glykopeptide [171]. Es handelt sich um ein relativ großes Molekül (1,45 kDa) welches durch die Verbindungen seiner phenolischen Seitenketten eine relativ starre Raumstruktur aufweist. Der antibakterielle Wirkmechanismus beruht auf der Komplexierung einer C-terminalen Seitenkette (D-Alanyl-D-Alanin) an einer Peptidoglykan-Vorstufe [172]. Dadurch ist das Substrat der bakteriellen Transpeptidase blockiert und eine Quervernetzung des Peptidoglykans während der Zellwandsynthese bleibt aus [173]. Daneben beeinträchtigt Vancomycin die Permeabilität der bakteriellen Zellmembran und die RNA-Synthese [174]. Daraus ergibt sich besonders im grampositiven Bereich eine bakterizide Wirkung für sich teilende Prokaryonten [175]. Bekannte UAWs von Vancomycin sind die vermehrte Histaminfreisetzung, was sich als sog. „Red Man Syndrome“ zeigt. Dieses geht mit einer Rötung des Oberkörpers in Kombination mit Juckreiz einher. Weiterhin sind Muskelkrämpfe, Bauchschmerzen, Fieber und Hypotonie beschrieben. Schwerwiegende Nebenwirkungen sind die Ototoxizität (bei Serumlevel zwischen 80 – 100 µg/mL), die Neutropenie, die Thrombozytopenie, die Phlebitis, die Nephrotoxizität und seltener das Stevens-Johnson-Syndrom [174, 176-178]. In Untersuchungen zur Toxizität gegenüber Osteoblasten wird von Edin *et al.* [179] eine zytotoxische Konzentration von 10 mg/mL und unbedenkliche Konzentration mit 1 mg/mL angegeben. Weiterhin zeigten Philp *et al.* [152], dass Konzentrationen von ca. 5 mg/mL keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Osteoblasten nehmen.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antibiotika
 MHK-Werte wurden den aktuellen EUCAST-Angaben entnommen [180]

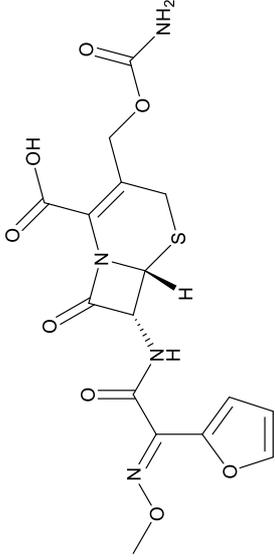
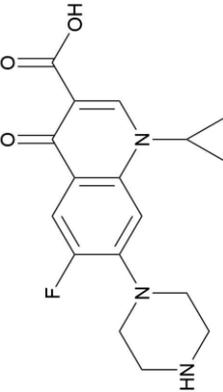
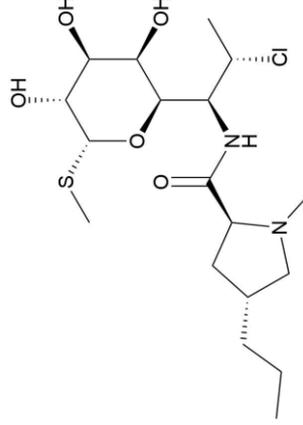
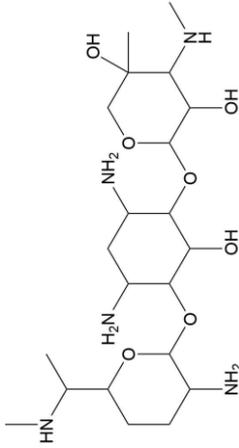
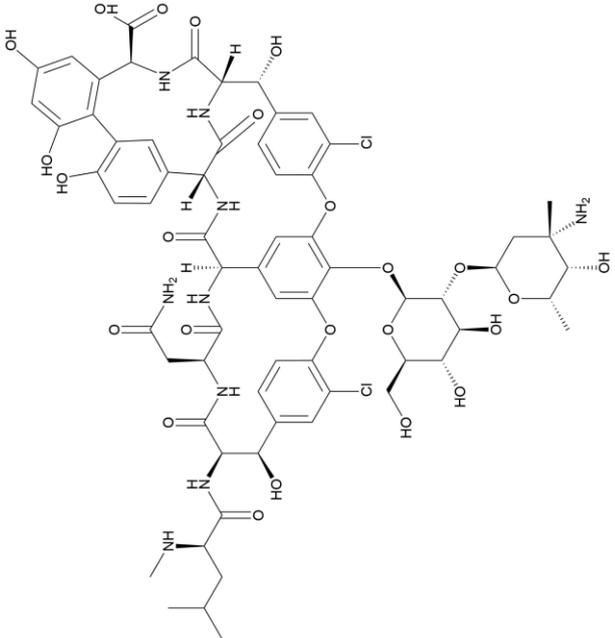
Antibiotikum	Strukturformel	MHK R> [mg/mL] [180]	Löslichkeit in Wasser [mg/mL]
Cefuroxim		<i>S. aureus</i> 0,004	≥100 [181] (Cefuroxim Natrium)
Ciprofloxacin		<i>S. aureus</i> 0,001	0,001 [182]
Clindamycin		<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i> 0,0005	pH 7: 200 – 300 pH 4: 25 [183]

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antibiotika
 MHK-Werte wurden den aktuellen EUCAST-Angaben entnommen

Antibiotikum	Strukturformel	MHK R> [mg/mL] [180]	Löslichkeit in Wasser [mg/mL]
Gentamicin		<p><i>S. aureus</i> 0,001</p>	<p>100 [182]</p>
Vancomycin		<p><i>S. aureus</i> 0,002</p>	<p>>100 [182]</p>

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Knochenersatzmaterialien und Antibiotika

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene synthetische Knochenersatzmaterialien mit ausgewählten, klinisch relevanten Antibiotika beladen und anschließend ihr Freisetzungsverhalten untersucht. Die antibiotikabeladenen Zemente wurden weiteren materialcharakterisierenden Untersuchungen, wie Messungen der Druckfestigkeit, der Porosität und der Phasenzusammensetzung, unterzogen.

3.1.1 Calciumphosphat-Knochenersatzmaterial

Calciumphosphat-Zement

Für Untersuchungen an Knochenzement wurde der ready-to-use Calciumphosphat-Knochenzement „INNOTERE Paste-CPC“ (INNOTERE GmbH, Radebeul, Deutschland) verwendet. Die Zusammensetzung dieser Paste geht auf den von Khairoun *et al.* [184] beschriebenen Biocement D zurück. Die exakte Zusammensetzung wurde von Heinemann *et al.* [185] beschrieben. Demnach enthält der Zement die folgenden Bestandteile: 60 Gew.-% α -TCP, 26 Gew.-% DCPA (= Monetit; CaHPO_4), 10 Gew.-% Calciumcarbonat (= Calcit; CaCO_3) sowie 4 Gew.-% ausgefällten HA. Diese Paste wurde dann zusätzlich mit 2,5 % K_2HPO_4 innerhalb einer öligen Suspension versetzt. Das Öl bestand aus Miglyol 812 mit 8-12 C gesättigten Fettsäuren. Darüber hinaus enthielt die ölige Komponente zwei Tenside (14,7 % (w/w) Rizinusöl-Ethoxylate und 4,9 % (w/w) Hexadecylphosphat). Der Zement ist in Spritzen mit unterschiedlichen Füllmengen erhältlich. Die Dichte des Zements beträgt nach Angaben des Herstellers ca. 2 g/mL. Für die Versuche dieser Arbeit wurden aus dem Zement quaderförmige Probekörper (Abbildung 3) mit Abmessungen von etwa 12 x 6 x 6 mm hergestellt.

Hydroxylapatit-Scaffolds

Es wurden 3D-gedruckte Hydroxylapatit-Scaffolds „INNOTERE 3D Scaffold“ (INNOTERE GmbH, Radebeul, Deutschland) untersucht. Abbildung 3 zeigt die verwendeten quaderförmigen Scaffolds mit den Maßen von 10 x 10 x 5 mm. Nach den Herstellerangaben wurden die Scaffolds aus der „INNOTERE Paste-CPC“ gedruckt und bei 50 °C unter gesättigter Wasserdampf-atmosphäre über mehrere Tage ausgehärtet [186]. Im Anschluss daran wurden die Scaffolds für 2 d in isotoner NaCl-Lösung ausgelagert und abschließend getrocknet. Die im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich verwendeten „unbehandelten“ Scaffolds wurden nach der Aushärtung lediglich getrocknet, woraus nach den Herstellerangaben eine hydrophobere Oberfläche resultiert.

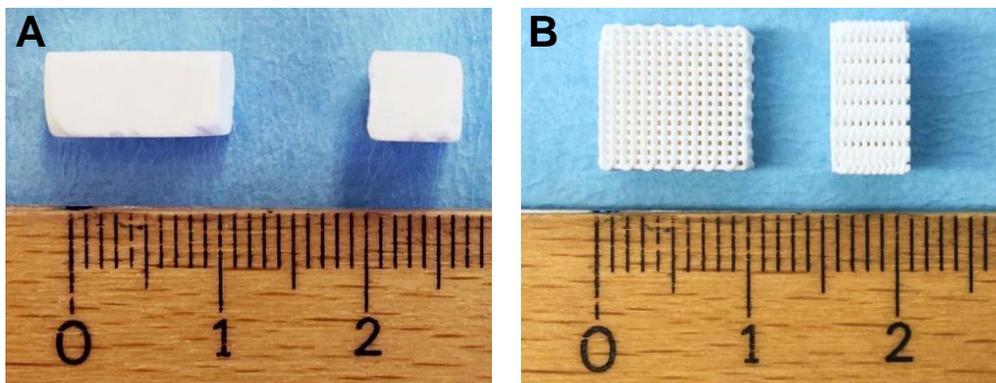


Abbildung 3: CaP-Probekörper
A zeigt CaP-Zement-Probekörper. **B** zeigt CaP-Scaffolds.

3.1.2 Magnesiumphosphat-Knochenzement

Außerdem wurden verschiedene Eigenschaften eines Struvit-bildenden Zements, aus eigener Herstellung, auf die Zugabe von Antibiotika untersucht. Die Ausgangspulver $\text{MgPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und $\text{Mg}(\text{OH})_2$ wurden von der Firma Alfa Aesar bezogen. Am Lehrstuhl wurde dann durch einen Sinterprozess das Farringtonit-Ausgangspulver ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) generiert und Mahlprozessen unterzogen. Das so erzeugte Magnesiumphosphat-Pulver wurde dann mit 3,5 M Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) vermischt, wodurch die Bildung von Struvit ausgelöst wurde. Der Struvit-Zement wurde in den Versuchen dieser Arbeit stets in einem Pulver-Flüssigkeitsverhältnis von 3:1 angemischt. Zur Erstellung von Probekörpern wurden das Pulver und die flüssige Phase auf einer Glasplatte

mithilfe eines Zementspatels vermischt, bis eine homogene Masse entstand. Anschließend konnte die Zementpaste in Silikonformen überführt werden. Für die Freisetzungsuntersuchungen hatten die Probekörper die Form eines Zylinders mit einem Radius von ca. 13 mm und einer Höhe von ca. 7 mm (ca. 2 g), für Untersuchungen der Druckfestigkeit die Form eines Quaders mit den Kantenlängen von 12 x 6 x 6 mm (ca. 0,85 g).

3.1.3 Verwendete Antibiotika

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 eingeführt, wurden Antibiotika verwendet, die sich bisher bei Infektionen des Knochens bewährt haben. In Tabelle 4 sind die eingesetzten Antibiotika aufgeführt. Die Rekonstitution, der als Pulver vorliegenden Antibiotika, erfolgte mit Reinstwasser nach den Angaben der Hersteller.

Tabelle 4: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika

Wirkstoff	Konzentration/Menge	Darreichungsform	Hersteller
Gentamicin Sulfat	40 mg / 1 mL	Ampulle	MerckSerono, Darmstadt, Deutschland
Cefuroxim-Natrium	250 mg	Pulver in Durchstechflasche	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ciprofloxacin	200 mg / 100 mL	Infusionslösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Clindamycin Phosphat	300 mg / 2 mL	Ampulle	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Vancomycin Hydrochlorid	500 mg	Pulver in Durchstechflasche	Demo GmbH, Hallbergmoos, Deutschland

3.2 Allgemeiner Versuchsaufbau und Messmethode

3.2.1 Antibiotikabeladung der Hydroxylapatit-Scaffolds

Die Antibiotikabeladung erfolgte bei den Hydroxylapatit-Scaffolds durch Eintauchen in die jeweilige Antibiotikallösung. Dabei wurden die Probekörper einzeln in Rollrandgläser (10 mL, A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland) gelegt und 2 mL der Antibiotikallösung dazugegeben. Auf diese Weise wurden die Probekörper vollständig von der Antibiotikallösung bedeckt. Lediglich für Ciprofloxacin wurden die Scaffolds aufgrund der geringeren Ausgangskonzentration der Infusionslösung in einem Volumen von 20 mL beladen. Die Konzentration der jeweiligen Antibiotikallösung und die aus den verwendeten Volumina resultierende absolute Antibiotikamenge, sind nachfolgend in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Konzentration und absolute Antibiotikamenge der verwendeten Antibiotikallösungen

Antibiotikum	Konzentration [mg/mL]	Absolute Antibiotikamenge [mg]
Gentamicin	40	80
Cefuroxim	25	50
Ciprofloxacin	2	40
Clindamycin	150	300
Vancomycin	50	100

3.2.2 Antibiotikabeladung von Calciumphosphat-Zement

Freisetzungsuntersuchungen des Calciumphosphat-Knochenzements (INNOTERE Paste-CPC) wurden mit den Antibiotika Vancomycin und Gentamicin durchgeführt. Die Masse der Zementpaste in einer Spritze betrug ca. 7,4 g. Bei einer Dichte von 2 g/mL ergibt dies 3,7 mL Zementpaste. Die Hälfte des Zementes wurde in eine zweite, leere Spritze mithilfe eines Luer-Lock-Adapters (Combifix®, B. Braun Medical AG, Sempach, Deutschland) überführt. Die 1,85 mL Zementpaste wurden mit einer weiteren Spritze mit jeweils 0,6 mL Antibiotikallösung

vermischt, dies entspricht etwa einem Verhältnis Zement zu Flüssigkeit von 3:1. Der Aufbau dieser Mischvorrichtung ist im Anhang in Abbildung 28 gezeigt. Für den Mischvorgang wurden 5 bzw. 10 Mischzyklen durchlaufen, wobei zuerst stets die Zementpaste in die Spritze mit der Antibiotikallösung gedrückt wurde und sich letztlich, nach Abschluss des Mischzyklus, die Zementpaste wieder in der Ausgangsspritze befand. Es war festzustellen, dass der nur 5 Mischzyklen unterzogene Zement optisch Inhomogenitäten aufzeigte, während sich der 10x gemischte Zement augenscheinlich homogen darstellte. Dies wird in Abbildung 4 gezeigt. Um geeignete Probekörper herzustellen wurde die antibiotikabeladene Zementpaste in Silikonformen mit den Maßen 12 x 6 x 6 mm (entspricht 0,432 mL) gefüllt. Man erhielt aus einer Spritze (ca. 1,85 mL Zementpaste) fünf quaderförmige Probekörper, da sowohl in den Luer-Lock-Adaptoren als auch in der Spritze ein Restvolumen an Zementpaste zurückblieb. Die Silikonform wurde dann bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C gelagert (über 24 h bei Proben für die Druckfestigkeitsuntersuchung und 1 h bei Proben für die Freisetzungsuntersuchungen).

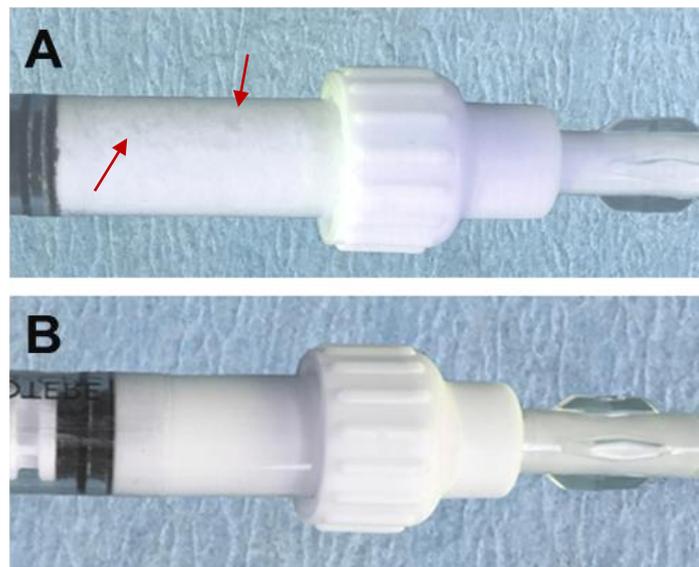


Abbildung 4: CaP-Zement mit unterschiedlicher Mischzyklenanzahl

Die Aufnahme erfolgte nach Durchmischung der Zementpasten mit der Antibiotikallösung vor Abfüllung in Silikonformen zur Probekörperherstellung. Es sollen die Unterschiede der Homogenität bezüglich der Anzahl von Mischzyklen gezeigt werden. **A** zeigt den 5x gemischten CaP-Zement. Die roten Pfeile deuten auf Inhomogenitäten. **B** zeigt den 10x gemischten CaP-Zement.

3.2.3 Antibiotikabeladung von Struvit-Zement

Die Freisetzungsuntersuchungen des Struvit-Zements wurden mit Vancomycin durchgeführt. Das Antibiotikum wurde dem Zement auf zwei unterschiedliche Weisen beigemischt. Zum einen wurde die Antibiotikallösung der 3,5 M Diammoniumhydrogenphosphat-Lösung (DAHP-Lösung) zugegeben, zum anderen das Antibiotikum als Pulver mit dem Magnesiumphosphat vermischt. Es wurde immer ein PLR von 3:1 gewählt.

Bei Zugabe des Antibiotikums als Lösung wurden zunächst 4 mL 3,5 M DAHP-Lösung ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) mit 1 mL Vancomycin-Lösung (50 mg/mL) vermischt. Von dieser Lösung wurden 3 mL auf einer Glasplatte mit 9 mg Magnesiumphosphat ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) unter Zuhilfenahme eines Zementspatels zu einer homogenen Paste vermischt.

Wurde Vancomycin als Pulver dem Farringtonit-Pulver zugeführt, so wurde zuerst 1 g Vancomycin abgewogen und zusammen mit 9 g $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ in einer Kaffeemühle (KSW 3306, Clatronic, Deutschland) für ca. 30 s vermischt. Ein Anteil von 9 g des derart generierten Pulvers konnte dann auf eine Glasplatte überführt und mit 3 mL DAHP-Lösung ebenfalls zu einer homogenen Paste vermischt werden. Anschließend erfolgte das Einbringen der Pasten zur Probekörperherstellung in Silikonformen.

Für die Freisetzungsuntersuchungen hatten die Probekörper die Form eines Zylinders mit einem Radius 13 mm und einer Höhe 7 mm (~2 g), für Untersuchungen der Druckfestigkeit die Form eines Quaders mit den Kantenlängen von 12 x 6 x 6 mm (~0,85 g).

3.2.4 Auslagerung der Probekörper

Die Auslagerung der Probekörper erfolgte in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS; engl. Phosphate buffered saline). Die Herstellung der dafür verwendeten einfach konzentrierten PBS erfolgte durch Verdünnung einer zehnfach konzentrierten Stammlösung, diese setzte sich zusammen aus 160 g Natriumchlorid, 22,2 g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 4 g Kaliumchlorid, 4 g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck KGaA, Darmstadt,

Deutschland) und 2 L Reinstwasser. Die Stammlösung konnte verwendet werden, sobald alle Feststoffe gelöst waren.

Die Probekörper wurden nach Ablauf der Beladungszeit in Rollrandgläser mit 10 mL Fassungsvermögen (A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland) in jeweils 5 mL PBS ausgelagert. Die Gefäße wurden verschlossen und auf einem Laborschüttler, der in einem Wärmeschrank (Jouan IG 150, Jouan SA, Saint Herblain, Frankreich) montiert war, bei 37 °C gelagert. Am ersten Tag erfolgte der Wechsel des Auslagerungsmediums aufgrund eines zu erwartenden „burst release“ in kürzeren zeitlichen Intervallen. Hierbei erfolgte die Überführung der Probekörper in neue Gefäße mit je 5 mL PBS. Danach wurde ein Wechsel des Auslagerungsmediums in 24 h-Intervallen durchgeführt. Die vorbereiteten Gläser mit 5 mL PBS wurden während des Mediumwechsels am ersten Tag auf 37 °C vorgewärmt. Für die Messungen im 24-Stunden-Intervall wurde, aufgrund der großen Zeitspanne, der Einfluss der Temperatur auf die freigesetzte Antibiotikamenge als vernachlässigbar angesehen, sodass dies ab der 48-Stunden-Messung nicht mehr durchgeführt wurde.

3.2.5 Messung der Antibiotikafreisetzung

Quantitative Aussagen über die Antibiotikafreisetzung wurden mittels UV/VIS-Spektrophotometrie (Genesys 10S UV-Vis, Evolution 60S, ThermoFischer Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Die Steuerung des Spektrophotometers erfolgte mit der VISIONlite™ 5 Software (ThermoFischer Scientific, Waltham, USA).

Es wurden Einmal-UV-Küvetten makro (2,5 – 4,5 mL) oder halbmikro (1,5 – 3 mL), (Brand, Wertheim, Deutschland) verwendet. Die Küvetten sind nach Herstellerangaben in einem Wellenlängenbereich von 230-900 nm anwendbar und ihre Standardabweichung beträgt für ≥ 240 nm $\pm 0,007$ und für ≥ 300 nm $\pm 0,005$ Extinktionseinheiten. Wobei stets darauf geachtet werden musste, dass sowohl für die „Basisline“-Registrierung als auch für die zu messende Probe dieselbe Größe der Küvette verwendet wurde.

Allgemein lässt sich zur Absorbanz eines Stoffes sagen, dass diese stoffabhängig ein Maximum oder mehrere Maxima bei einer bestimmten Wellenlänge bildet.

Zudem kann eine Zunahme des Wertes der Absorbanz mit steigender Konzentration des untersuchten Stoffes vermerkt werden. Bei zu hoch konzentrierten Lösungen kann die Messung überladen sein, was bedeutet, dass kein eindeutiges Absorbanzmaximum erkennbar war. In diesem Fall musste die untersuchte Lösung verdünnt werden und anschließend der erhaltene Wert der Absorbanz um den Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Um die gemessenen Werte der Absorbanzmaxima in Konzentrationen umrechnen zu können, mussten zunächst Kalibriergeraden erstellt werden.

Erstellung der Kalibriergeraden

Die Kalibriergerade stellt über eine einfache Geradengleichung (Formel 8) die Beziehung zwischen der gemessenen Absorbanz und der dabei vorliegenden Antibiotikakonzentration dar. Dabei entspricht a dem y-Achsenabschnitt und sollte möglichst gegen 0 streben. Die Steigung der Geraden ist mit b definiert. Für x wird die Konzentration in mg/mL angegeben und y beschreibt die gemessene Absorbanz.

$$y = a + b \cdot x \quad (8)$$

Für die Erstellung von Kalibriergeraden mussten zunächst Antibiotikallösungen unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt werden, um diese anschließend bei einem relativ breiten Wellenlängenintervall (im Bereich des Absorbanzmaximums ± 25 nm) zu vermessen. Für das jeweilige Antibiotikum wurde ein Konzentrationsbereich ausgewählt, in dem sich das gemessene Absorbanzmaximum zur verwendeten Konzentration der Antibiotikallösung linear verhielt. Abbildung 5 zeigt beispielhaft für Clindamycin die Ergebnisse der ersten Messung von Kalibrierlösungen verschiedener Konzentrationen. Hierbei ist zu erkennen, dass sich Konzentrationen oberhalb von 0,1 mg/mL zur Absorbanz nicht linear verhielten und somit für die Erstellung der Kalibriergeraden ungeeignet erschienen.

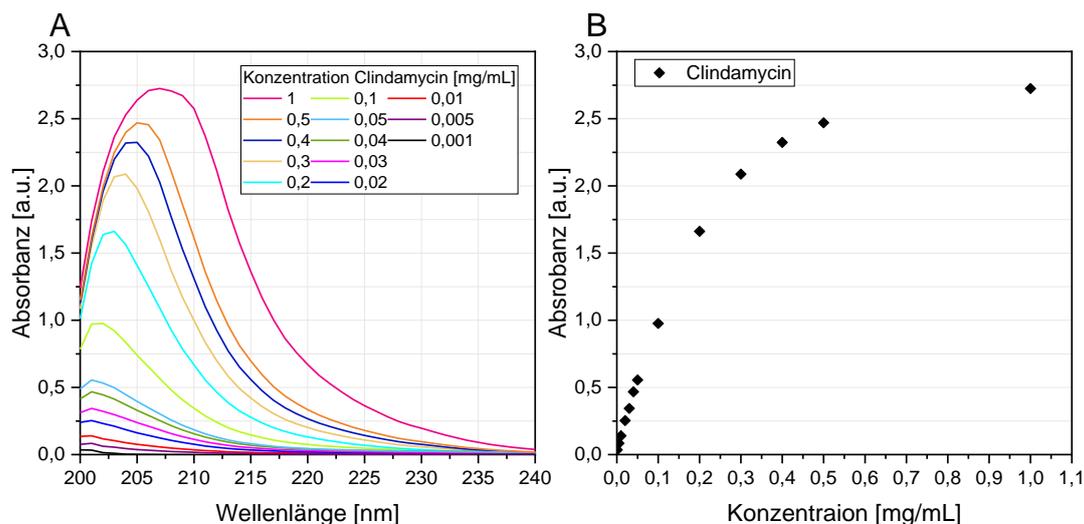


Abbildung 5: Bestimmung des Konzentrationsintervalls der Kalibriergeraden

A Absorbanzspektrum von Clindamycin für die Erstellung einer Kalibriergeraden. Initiale Messung, um den linearen Bereich der Konzentration der Antibiotikallösungen zu bestimmen. **B** Darstellung der Absorbanzmaxima von A aufgetragen gegen die jeweilige Konzentration. Linear zeigt sich dieses Verhältnis bei Konzentrationen der Kalibrierlösung $\leq 0,1$ mg/mL.

Nach Ermittlung eines geeigneten Konzentrationsintervalls wurden für jedes Antibiotikum Kalibrierlösungen von mindestens sechs verschiedenen Konzentrationen erstellt. Zur Herstellung der Kalibrierlösungen musste zunächst, sofern das Antibiotikum als Pulver vorlag (gilt für Vancomycin und Cefuroxim), eine Antibiotikallösung entsprechend der Herstellerangaben mit Reinstwasser zubereitet werden. Die vermessenen Konzentrationen der Kalibrierlösungen sind für die verschiedenen Antibiotika in Tabelle 6 aufgezeigt. Die Herstellung der Lösungen erfolgte durch Verdünnung der Ausgangslösung mit einfach konzentrierter PBS, wobei jede Konzentration fünfmal angefertigt wurde. Um Schwankungen in der Zusammensetzung der Lösungen auszugleichen, wurden die Kalibrierlösungen an drei unterschiedlichen Tagen hergestellt. Das Maximum der Absorbanz der Kalibrierlösungen wurde mit dem UV/VIS-Spektrophotometer gemessen, dabei diente einfach konzentrierte PBS als Referenzlösung. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Absorbanzmaxima wurden mit der OriginPro®-Software (OriginLab Corporation, Northampton, USA) bestimmt und als Punktdiagramm gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Durch diese Punkte wurde mit derselben Software eine lineare Regression durchgeführt.

Tabelle 6: Hergestellte Konzentrationen der jeweiligen Antibiotikallösungen für die Erstellung einer Kalibriergeraden

Antibiotikum	Konzentrationen [mg/mL]
Gentamicin	0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1
Cefuroxim	0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05
Ciprofloxacin	0,001; 0,004; 0,005; 0,008; 0,01; 0,02
Clindamycin	0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1
Vancomycin	0,001; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5

Das so erhaltene messbare, lineare Konzentrationsintervall variierte in seiner Größe/Ausdehnung zwischen den unterschiedlichen Antibiotika. Für die folgenden Messungen der Analyselösungen war es entscheidend, dass die gemessene Absorbanz innerhalb des Absorbanzintervalls der jeweiligen Kalibriergerade lag. Ansonsten bestand die Gefahr, dass keine lineare Beziehung mehr zwischen Absorbanz und der Konzentration bestand, was zu falschen Konzentrationsbestimmungen führen würde. Hieraus resultierte, dass einige Analyselösungen verdünnt werden mussten. In Tabelle 7 sind die antibiotikaspezifischen Wellenlängen des Absorbanzmaximums, sowie die ermittelte Gleichung der Kalibriergeraden gezeigt. Für alle gebildeten Regressionsgeraden ergab sich ein Determinationskoeffizient von $R^2 \geq 0,99$. Die graphische Darstellung der Kalibriergeraden ist in Abbildung 29 (Anhang) gezeigt.

Tabelle 7: Wellenlängenbereich des Absorbanzmaximums der Antibiotika und Geradengleichung

Antibiotikum	Wellenlänge des Absorbanzmaximums [nm]	Geradengleichung der Kalibriergeraden
Gentamicin	333 ±1	$y = 0,0039 + 15,858 \cdot x$
Cefuroxim	280 ±4	$y = 0,0016 + 41,281 \cdot x$
Ciprofloxacin	277 ±1	$y = 0,0213 + 110,972 \cdot x$
Clindamycin	202 ±2	$y = 0,0027 + 11,541 \cdot x$
Vancomycin	280 ±2	$y = 0,0015 + 4,721 \cdot x$

Messung der Analyselösungen

Die Messung der freigesetzten Antibiotikallösung erfolgte für Cefuroxim, Ciprofloxacin und Vancomycin bei den entsprechenden Wellenlängen in Einmalküvetten mit einfach konzentriertem PBS als Referenz. Sollte die gemessene Absorbanz oberhalb des Absorbanzintervalls der jeweiligen Kalibriergeraden liegen, so mussten die Lösungen verdünnt werden. Anschließend wurde der Wert der Absorbanz wieder um den Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Wellenlänge des Absorbanzmaximums für Clindamycin lag unterhalb des durchlässigen UV-Wellenlängenbereichs der Einmalküvetten, darum mussten diese Messungen mit Quarzküvetten durchgeführt werden. Diese wurden nach jeder Messung mit destilliertem Wasser gereinigt und mit Druckluft getrocknet.

Um den Antibiotikarestgehalt nach Beendigung der Freisetzungsuntersuchungen zu messen, wurden die CaP-Probekörper in 30 mL 5,05 M HCl-Lösung aufgelöst. Die Struvit-Probekörper wurden in 35 mL 5,9 M HCl-Lösung aufgelöst. Als „Basislinie“ für die Messungen am Spektrophotometer diente ein Scaffold bzw. ein Zement-Probekörper ohne Antibiotikum, der auf dieselbe Weise aufgelöst wurde. Bei der Bestimmung des Antibiotikarestgehaltes musste die ermittelte Absorbanz um den angewandten Verdünnungsfaktor (6 bzw. 7) wieder multipliziert werden.

Messung der freigesetzten Gentamicinmenge

Um Gentamicin im UV/VIS-Spektrophotometer messen zu können, wurde zunächst eine Derivatisierungslösung bestehend aus folgenden Chemikalien hergestellt: 0,1 g *o*-Phthaldialdehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 2 g Dinatriumtetraborat (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), 1 mL Methanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 0,2 mL Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 100 mL Reinstwasser (pH \approx 9,5). Die Mengenangaben wurden hierfür von Vorndran *et al.* [119] übernommen. Zunächst wurde in einer verdunkelten Glasflasche *o*-Phthaldialdehyd (OPA) in Methanol gelöst, danach das Dinatriumtetraborat dazugegeben und zuletzt Wasser sowie Mercaptoethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde geschüttelt bis die Feststoffe vollständig gelöst vorlagen. Diese Lösung wurde vor der Benutzung für 24 h lichtgeschützt im Kühlschrank bei 8 °C gelagert und war dann über einen Zeitraum von maximal 48 h verwendbar. Um die freigesetzte Gentamicinmenge mit dem

UV/VIS-Spektrophotometer quantifizieren zu können, wurde zunächst 1 mL der Derivatisierungslösung mit 1 mL Isopropanol (VWR, Darmstadt, Deutschland) sowie 1 mL der jeweiligen Gentamicinlösung in eine makro UV-Küvette gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Die Küvetten wurden mit Deckeln verschlossen und idealerweise nach 45 min am Spektrophotometer die Absorbanz der Proben gemessen. Nach dieser Zeit erhält man, wie Abbildung 6 zeigt, die maximale Absorbanz. Eine Messung im Zeitintervall von 30 – 60 min wird bei Betrachtung der um maximal 0,5 % vermindert gemessenen Gentamicinmenge als tolerabel angesehen.

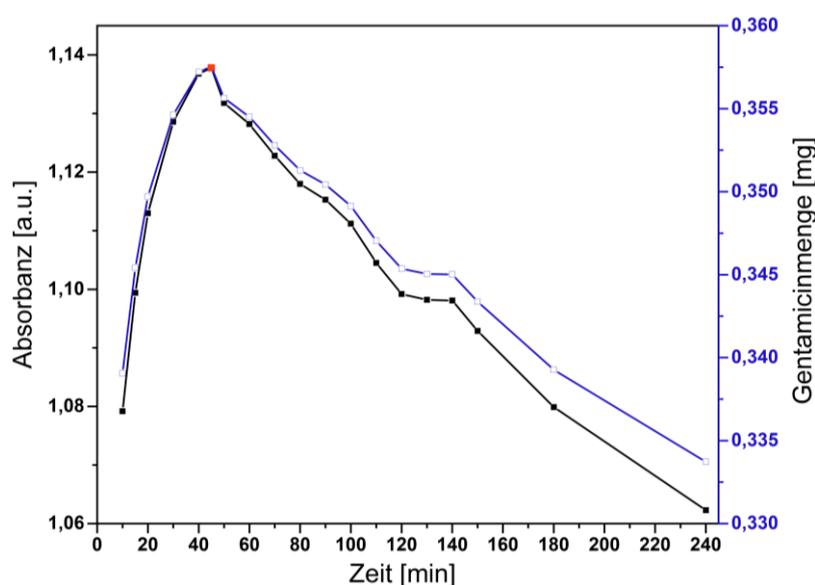


Abbildung 6: Zeitabhängigkeit der Gentamicin-Derivatisierung

Beispielhaft sind die Ergebnisse der zeitabhängigen Absorbanz-Messung einer 24 h-Gentamicin-Analyselösung gezeigt. Die Probe wurde wie bereits beschrieben mit der Derivatisierungslösung vermischt und zu folgenden Zeitpunkten nach dem Mischvorgang gemessen [min]: 10, 15, 20, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 130, 140, 150, 180, 240. Das Maximum der Absorbanz nach 45 min ist rot gekennzeichnet. Bei der blauen Grafik wurde die Absorbanz mit der ermittelten Kalibriergeraden-Gleichung in die entsprechende Menge in mg umgerechnet.

Die Referenz enthielt anstelle der PBS-Gentamicinlösung einfach konzentrierten PBS, 1 mL Isopropanol und die Derivatisierungslösung. Diese Methode wurde erstmals für Messungen von Aminoglykosiden am Spektrophotometer von Sampath und Robinson [187] beschrieben, wobei die Derivatisierung von primären Aminen mittels OPA schon nahezu zwei Jahrzehnte zuvor für Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Messungen (HPLC) von Roth *et al.* [188] vorgestellt wurde. Der hierbei ablaufende Reaktionsmechanismus wird nachfolgend in Abbildung 7 dargestellt.

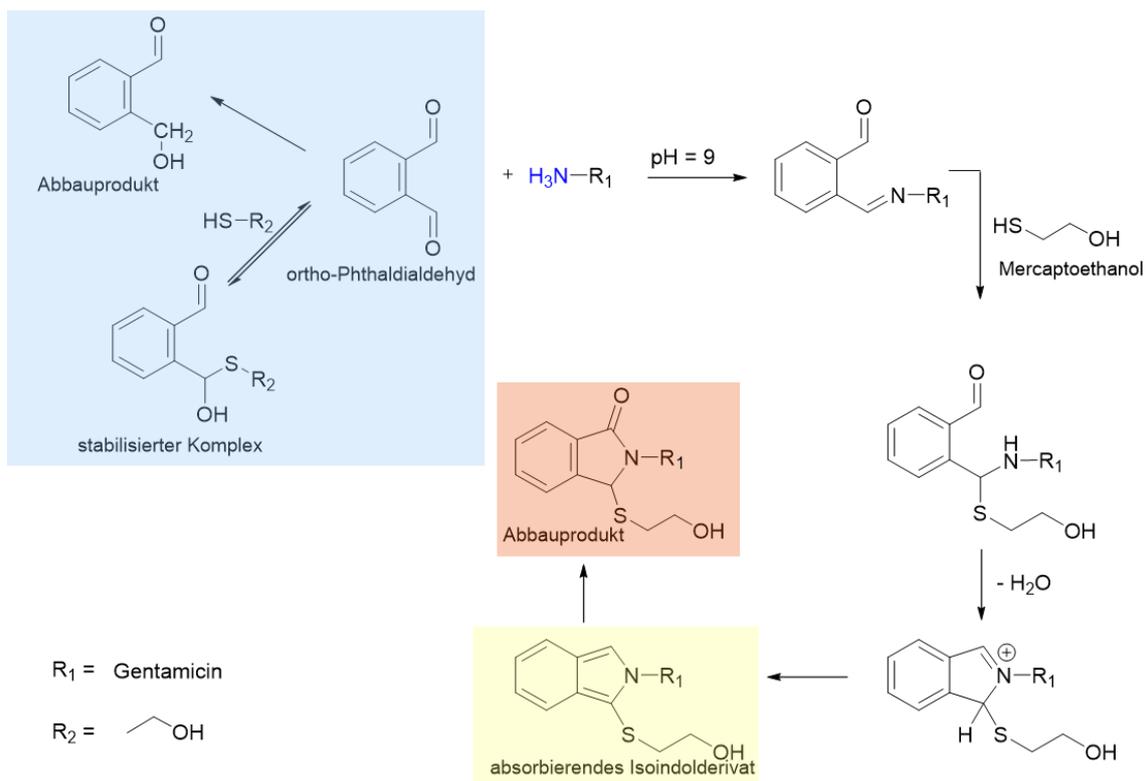


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Gentamicin-Derivatisierung

Blau hinterlegt zeigt sich die stabilisierende Wirkung des Mercaptoethanols auf OPA. Bei Zugabe von primären Aminen laufen unter basischem pH-Wert die hier gezeigten Reaktionsschritte ab. Wie in Tabelle 3 gezeigt, enthält Gentamicin drei primäre Amino-Gruppen, an welchen die hier dargestellte Reaktion ablaufen kann. Nach 45 Minuten wird das Maximum der Umsetzung von OPA zu einem UV-Licht absorbierenden Isoindolderivat (gelb hinterlegt) erreicht. In dieser Arbeit lag das Maximum der Absorbanz für das Reaktionsprodukt bei 333 nm. Zeitabhängig erfolgt dann die Umwandlung zu einem nicht mehr absorbierenden Abbauprodukt. Der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus wurde aus [189-191] zusammengeführt und auf die Versuche dieser Arbeit angepasst.

3.3 Antibiotikafreisetzungsversuche

3.3.1 Freisetzungsuntersuchungen mit Calciumphosphat-Scaffolds

Einfluss der Beladungsdauer auf die Antibiotikafreisetzung am Beispiel von Vancomycin

Bei diesem Versuch wurde der Einfluss der Beladungsdauer der Scaffolds in der Antibiotikalösung auf die freigesetzte Antibiotikamenge untersucht. Es wurden jeweils drei Probekörper für 1 h, 24 h und 3 d in der Vancomycinlösung gelagert. Nach Ablauf der jeweiligen Beladungsdauer erfolgte unmittelbar die Überführung in das Auslagerungsmedium, wobei dessen Wechsel während des ersten Tages nach 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 und 8 Stunden durch Überführung der Scaffolds in neue Gefäße mit 5 mL PBS stattfand. An allen weiteren Tagen wurde das Auslagerungsmedium in 24-Stunden-Schritten gewechselt. Der Medienwechsel erfolgte bis kein eindeutiges Absorbanzmaximum mehr messbar war. Dies trat in diesem Versuchsansatz für alle Beladungszeiten nach 72 h ein.

Untersuchungen zur Antibiotikafreisetzung bei 24 Stunden Beladungsdauer

Für die Antibiotika Gentamicin, Cefuroxim, Ciprofloxacin und Clindamycin wurden die Freisetzungsuntersuchungen für 24 h Beladungsdauer an je drei Scaffolds durchgeführt. Der Medienwechsel erfolgte am ersten Tag nach 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Stunden, danach jeweils nach 24 h. Insgesamt wurden diese Versuche über einen Zeitraum von 10 d dokumentiert.

1 h Beladungsdauer bei Gentamicin

Für Gentamicin wurden, analog zu den Versuchen mit 24 h Beladungsdauer, auch Versuche mit nur 1 h Beladungsdauer für drei Scaffolds durchgeführt. Der Medienwechsel erfolgte nach dem Ende der Beladungszeit am ersten Tag zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 2; 3; 4; 6 und 8 Stunden, weiterhin in 24 Stunden-Schritten.

Vergleich der Antibiotikafreisetzung zwischen behandelten und unbehandelten Scaffolds (1h Beladungsdauer)

Es sollte am Beispiel von Vancomycin untersucht werden, in welchem Maße sich die Antibiotikafreisetzung zwischen unbehandelten (nicht in NaCl-Lösung nachbehandelt) und behandelten Scaffolds unterscheidet. Die Beladungsdauer betrug hierfür 1 h, wobei jeweils drei Scaffolds untersucht wurden. Der Medienwechsel des Auslagerungsmediums erfolgte am ersten Tag nach 0,5, 1, 2, 3, 4, 6 und 8 Stunden und anschließend stets nach 24 h. Insgesamt lag der Beobachtungszeitraum für unbehandelte Scaffolds bei 48 h, bei den behandelten bei 120 h.

Orientierender Versuch: Vancomycinfreisetzung nach Behandlung mit Natriumcarbonat-Lösung

Wie schon für Gentamicin in der Literatur beschrieben (geringere Löslichkeit = langsamere Freisetzung), sollte in diesem Versuchsansatz mit einem Scaffold die Beeinflussung der Antibiotikalöslichkeit und deren Einfluss auf das Freisetzungsverhalten gezeigt werden. Hierfür wurde zunächst ein Scaffold (behandelt) für 1 h in 2 mL Vancomycinlösung (50 mg/mL) gelagert und so mit dem Antibiotikum beladen. Vor Beginn der Auslagerung in PBS wurde der Scaffold einmalig in eine 1%ige Natriumcarbonatlösung getaucht und anschließend die Freisetzungsuntersuchungen wie für vorausgegangene Untersuchungen durchgeführt.

3.3.2 Freisetzungsuntersuchungen mit Calciumphosphat-Zement

Die Freisetzungsuntersuchungen wurden für CaP-Probekörper mit den Antibiotika Gentamicin und Vancomycin durchgeführt. Zum einen sollte das Freisetzungsverhalten der beiden Antibiotika verglichen, zum anderen auch der Einfluss des Anmischprozederes untersucht werden. Die Zemente wurden hierfür 5x und 10x zwischen den Spritzen mit der Antibiotikalösung hin- und hergemischt. Wobei sich nach einem Mischzyklus der Zement wieder in seiner Ausgangsspritze befand (Zementpaste wurde stets zuerst in Antibiotikalösung gespritzt).

Nach 24 h Lagerung bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C wurden die Zemente aus den Silikonformen genommen und in jeweils ein Glasgefäß mit 5 mL PBS

gegeben. Diese wurden dann auf einem Laborschüttler bei 37 °C bis zum nächsten Mediumwechsel gelagert. Am ersten Tag wurden die Probekörper stündlich (bis 8 h) in neue Glasgefäße mit auf 37 °C vorgewärmter PBS überführt. Nach 24 h erfolgte der Mediumwechsel täglich, nach 14 d erfolgte er im 48 h-Intervall. Die Freisetzungsuntersuchung wurde nach insgesamt 34 d Laufzeit beendet.

3.3.3 Freisetzungsuntersuchungen mit Struvit-Zement

Die Untersuchungen des Antibiotikafreisetzungsverhaltens von Struvit-Zement sollten exemplarisch mit Vancomycin durchgeführt werden. Dabei wurden verschiedene Beladungsmethoden angewandt, wodurch sich unterschiedlich große Beladungsmengen ergaben. Einerseits erfolgte die Zugabe des Antibiotikums in wässriger Lösung zur DAHP-Lösung, andererseits als Pulver zu dem Farringtonit-Ausgangspulver. Bei Zugabe des Antibiotikums als Pulver war ein Prüfkörper mit etwa 150 mg Vancomycin beladen, bei Zugabe als Lösung (50 mg/mL) mit etwa 5 mg. Um zylinderförmige Probekörper mit einem Radius von ~13 mm und einer Höhe von ~7 mm (~2 g/Probekörper) zu generieren, wurde die Zementpaste in entsprechende Silikonformen überführt und über den Zeitraum von 1 h bei 100% Luftfeuchtigkeit ausgehärtet. Dies erfolgte für jeweils vier Probekörper. Der Mediumwechsel fand am ersten Tag nach 1, 2 und 4 h statt, danach in 24 h-Schritten. Insgesamt vollzog sich der Beobachtungszeitraum über 10 d. Nachfolgend wurden die Probekörper in Salzsäure aufgelöst, um die Validität des Messverfahrens zu überprüfen. Hierbei konnten die Probekörper mit Vancomycin in der Flüssigkeit in 15 mL 3,6 M HCl-Lösung aufgelöst werden (generiert aus 10 mL 0,5 M und 5 mL 10 M HCl). Die Probekörper, denen Vancomycin in Pulverform zugesetzt wurde, zeigten sich bei dieser Stoffmengenkonzentration noch nicht vollständig aufgelöst. Hierfür wurden 35 mL einer 5,9 M Salzsäure verwendet (hergestellt aus 20 mL 10 M und 15 mL 0,5 M HCl).

3.4 Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest sollte die antibakterielle Wirksamkeit der Antibiotika, nach der Inkorporation in die CaP-Zemente oder der Adhäsion auf der CaP-Scaffold-Oberfläche, überprüfen. Der Test wurde exemplarisch mit Vancomycin- und Gentamicin-beladenen Proben an *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) durchgeführt. Die Sensibilität des verwendeten Bakterienstammes betrug gemäß Antibiogramm gegenüber Gentamicin $\leq 0,0005$ mg/mL und gegenüber Vancomycin 0,001 mg/mL. Die verwendeten Scaffolds wurden für 1 h beladen und anschließend der Mediumwechsel entsprechend zuvor abgeschlossener Freisetzungsuntersuchungen durchgeführt ($n = 5$). Auch die CaP-Zemente wurden nach demselben Procedere wie bereits für die Freisetzungsuntersuchungen mit dem jeweiligen Antibiotikum (stets 10x gemischt, $n = 7$) beladen. Zusätzlich wurde ein Scaffold mit Vancomycin beladen und anschließend einer Na_2CO_3 -Behandlung unterzogen (siehe Kapitel 3.3.1), um die Wirksamkeit des Vancomycins nach dieser Behandlung zu bestätigen.

3.4.1 Herstellung der Agarplatten und der Übernachtskultur

Um die Agarplatten herzustellen wurde zunächst ein sog. LB-Medium (engl. lysogeny broth) hergestellt. Dieses bestand aus 2 g Hefeextrakt (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), 4 g Trypton (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 2 g NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), was mit 400 mL Reinstwasser vermischt wurde. Um daraus den LB-Agar zu erhalten, gab man 6 g Bacto Agar (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) hinzu und autoklavierte die Glasflasche mit der darin enthaltenen Lösung für 20 min bei 121 °C. Anschließend kühlte der LB-Agar etwa 3 Stunden ab, danach wurde der noch flüssige LB-Agar in die Petrischalen gegossen. Die Petrischalen kühlten bei Raumtemperatur bis zur Gelierung ab. Danach wurden diese unter sterilen Bedingungen verpackt und im Kühlschrank gelagert.

Um eine Bakterienkultur mit *S. aureus* herzustellen, mussten die in Glycerin tiefgekühlten Bakterien bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Anschließend kam es zur Überführung von 0,2 μL der Bakterien und 10 mL LB-Medium in ein

Zentrifugenröhrchen. Zusätzlich wurde eine Kolonie von einer Agarplatte mittels Öse in ein weiteres Zentrifugenröhrchen mit 10 mL LB-Medium überführt. Die Röhrchen lagerten verschlossen bei 37 °C unter stetigen Schüttelbewegungen für ca. 18 h. Am nächsten Tag konnte lediglich in dem LB-Medium, in welches die Bakterien mit der Öse übertragen wurden, eine Trübung und folglich Bakterienwachstum festgestellt werden. Deshalb eignete sich dieser Ansatz für eine Beimpfung der Agarplatten. Hierfür wurden 100 µL der Bakterienkolonie auf die Agarplatte gegeben und mittels Glaskugeln verteilt. Anschließend kamen die Probekörper auf die vorbereiteten Agarplatten. Zur Untersuchung einer eventuell vorhandenen antibakteriellen Wirkung von Zementinhaltsstoffen wurden drei Zement-Probekörper ohne Antibiotikazusatz in 2 mL PBS gelagert. Hiervon wurden 40 µL dieser konzentrierten Referenzlösung auf Filterpapier (Durchmesser: 1 cm) gegeben. Die Agarplatten lagerten dann im Inkubator bei 37 °C. Nach Lagerung der Agarplatten im Inkubator bei 37 °C konnten nach 24 h erste Ergebnisse festgestellt werden, wobei nach 48 h eine wiederholte Messung der Hemmhöhe erfolgte.

3.5 Charakterisierung der Zemente

3.5.1 Druckfestigkeitsuntersuchungen

In diesem Kapitel werden Untersuchungen zum Einfluss der Antibiotikabeladung auf die Druckfestigkeit vorgestellt. Dafür wurde die Prüfmaschine Z010 (Zwick-Roell GmbH, Ulm, Deutschland) mit einer 10 kN Messdose verwendet. Die Probekörper hatten hierfür die Form eines Quaders (Kantenlänge ca. 12 x 6 x 6 mm). Die Geschwindigkeit der Kraftübertragung betrug 1 mm/min. Vor der Messung wurden die Flächen der Probekörper mit Schleifpapier (Körnung P500) möglichst plan geschliffen. Von den Ergebnissen der Druckfestigkeitsprüfung wurden Mittelwerte sowie deren Standardabweichung bestimmt. Zudem erfolgte die Untersuchung der Mittelwerte auf signifikante Unterschiede. Hierfür wurde der Mittelwert-Vergleich mit dem Tukey-Test (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$) in OriginPro® (OriginLab Corporation, Northampton, USA) durchgeführt.

Calciumphosphat-Zement

Für Druckfestigkeitsuntersuchungen wurde der Zement, wie bereits für die Freisetzungsuntersuchungen (Abbildung 28), über zwei Spritzen mit dem Antibiotikum (Gentamicin oder Vancomycin) vermischt. Zunächst musste auch hierfür die Zementpaste in zwei Spritzen aufgeteilt werden. Als Referenz diente Zementpaste, die nach erfolgter Aufteilung mit jeweils 0,6 mL Reinstwasser vermischt wurde. Auch hier sollte der Unterschied zwischen 5 und 10 Mischzyklen gezeigt werden. Die Antibiotikallösungen hatten für diese Versuche ebenfalls die handelsüblichen Konzentrationen von 40 mg/mL Gentamicin und 50 mg/mL Vancomycin. Der Zement wurde nach dem Mischvorgang in die Silikonform überführt und diese bis zur Messung mit der Druckprüfmaschine bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C für ca. 24 h gelagert. Bei einer durchschnittlichen Masse von 7,4 g Zement in einer Spritze ergaben sich für den Antibiotikagehalt der Probekörper bei Gentamicin etwa 0,65 Gew.-% und bei Vancomycin etwa 0,8 Gew.-%.

Struvit-Zement

Für Druckfestigkeitsmessungen wurde der Struvit-Zement mit Zusatz des Antibiotikums Vancomycin nach denselben Mengenverhältnissen wie zuvor in Kapitel 3.3.3 hergestellt, jedoch wurden stets nur 4,5 g Pulver mit 1,5 mL Flüssigkeit angemischt, da sich auf diese Weise das Befüllen der Silikonformen einfacher darstellte und sich folglich homogenere Probekörper produzieren ließen. Die Struvit-Probekörper entsprachen in ihren Maßen den zuvor beschriebenen CaP-Probekörpern. Als Referenz wurde Struvit-Zement ohne Antibiotikazusatz hergestellt. Es ergab sich somit für die Zugabe von Vancomycin in Pulverform ein Anteil des Vancomycins von 7,5 Gew.-%, in Lösung 0,5 Gew.-%, sowie eine antibiotikafreie Referenz. Es erfolgte die Herstellung von jeweils 8 Probekörpern an drei verschiedenen Tagen, sodass insgesamt 24 Proben für jede Antibiotikakonzentration gemessen wurden. Die Probekörper wurden nach etwa 15 min aus den Silikonformen genommen, in ein Glasgefäß mit 10 mL PBS überführt und darin für 24 h bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 37 °C gelagert.

3.5.2 Röntgendiffraktometrie

XRD-Messungen wurden herangezogen, um die qualitative Zusammensetzung der beschriebenen Knochenzemente zu untersuchen und eventuell vorhandene Phasenunterschiede der Kristallstruktur durch Beimengung von Antibiotika aufzuzeigen. In dieser Arbeit wurden die verwendeten Struvit-Knochenzemente mit dem Röntgendiffraktometer D005 (Siemens, München, Deutschland) untersucht. Bei den Messungen dieser Arbeit wurde stets in einem Bereich von $2\theta = 10 - 60^\circ$ gemessen. Die Schrittgröße („step size“) betrug $0,02^\circ$ bei einer Scangeschwindigkeit von 1,5 Sekunden/Schritt.

Die Kristallstruktur der CaP-Knochenzemente wurde mit dem Röntgendiffraktometer D8 Advance Davinci (Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, Deutschland) untersucht. Der Messbereich war stets mit $2\theta = 7^\circ - 70^\circ$ angegeben. Die Schrittgröße belief sich ebenfalls auf $0,02^\circ$ bei einer Scangeschwindigkeit von 0,05 Sekunden/Schritt. Die qualitative Auswertung dieser Daten erfolgte mit der Software DIFFRAC.EVA V5.

Untersucht wurden die Zement-Proben aus der Druckfestigkeitsuntersuchung sowie die wasserfreie Zementpaste. Die Zement-Proben wurden mit Isopropanol bedeckt und für min. 48 h im Trockenschrank gelagert. Für die Messung mit dem XRD mussten die Proben mit einem Mörser zu Pulver vermahlen werden, um dies anschließend auf einem Objektträger aufbringen zu können. Die wasserfreie CaP-Zementpaste wurde direkt auf den Objektträger aufgebracht.

3.5.3 Quecksilberporosimetrie

Über die Quecksilberporosimetrie wurde die offene Porosität der verwendeten Knochenzemente bestimmt. Die Methode ist auf Washburn zurückzuführen. Über die von ihm ermittelte Gleichung (Formel 9) kann durch den angelegten Druck die Porengröße berechnet werden [192]. Hierbei wird mit r der Porenradius, ρ der angelegte Druck, γ die Oberflächenspannung des Quecksilbers und θ der Benetzungswinkel angegeben. Die detektierbare Porengröße liegt bei dieser Methode in einem Bereich von etwa 4 nm – 0,4 mm [193].

$$\rho = \frac{-2\gamma \cos \theta}{r} \quad (9)$$

Die Messungen erfolgten mit dem Quecksilberporosimeter PASCAL 140/440 (Porotec GmbH, Hofheim, Deutschland) und der dazugehörigen Auswertungssoftware SOLID. Für Standardeinstellungen wurde der Kontaktwinkel des Quecksilbers mit $141,3^\circ$ sowie eine Oberflächenspannung von 480 mN/mm angenommen. Als Proben dienten die Fragmente der Druckfestigkeitsmessung. Diese wurden mit Isopropanol abgedeckt und bis zur vollständigen Verdunstung (für min. 48 h) im Trockenschrank gelagert.

3.5.4 Rasterelektronenmikroskopie

Von den CaP-Zementen wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um den Einfluss der Antibiotikabeladung auf die Mikrostruktur darzustellen. Hierfür wurde das Rasterelektronenmikroskop Crossbeam CB 340 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer Spannung von 2,0 – 5,0 kV verwendet. Als Proben dienten kleine Fragmente, welche von den

Druckfestigkeitsuntersuchungen übrig waren. Die Proben wurden mit doppelseitig-klebendem Carbon/Kohlenstoff-Klebeband oder, um stärkere Vergrößerungen erzielen zu können, mit Carbon/Kohlenstoff-Zement (Leit-C, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) auf die REM-Probenteller aufgeklebt. Anschließend lagerten diese für 10 Tage in einem Exsikkator. Die Proben wurden vor der Aufnahme mit einer 4 nm dicken Platinschicht beschichtet. Dies erfolgte mit dem Hochvakuum-Beschichter Leica EM ACE 600 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland).

4 Ergebnisse

4.1 Freisetzungsuntersuchungen an Calciumphosphat-Scaffolds

4.1.1 Einfluss der Beladungsdauer auf die Antibiotikafreisetzung

Die Variation der Beladungsdauer der Scaffolds erfolgte mit dem Antibiotikum Vancomycin. Hierbei betragen die Beladungszeiten 1 h, 24 h und 3 d, wobei für jede Zeit drei Scaffolds beladen wurden. Der Mediumwechsel konnte für alle Ansätze nach 96 h eingestellt werden, da nach diesem Zeitpunkt kein Antibiotikum mehr detektierbar war. Die gemessenen Absorbanzmaxima wurden mit der zuvor ermittelten Kalibriergleichung in Konzentrationen und durch Multiplikation mit dem Volumen der Elutionslösung (5 mL) schließlich in die jeweilige Masse umgerechnet. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Vancomycinfreisetzung dargestellt. Es wurden nach 72 h durchschnittlich für die Beladungszeit von 1 h ~20 mg, für 24 h ~41 mg und für 3 d ~46 mg Vancomycin freigesetzt. Bei einer Menge von 100 mg in der Beladungslösung und keinem Nachweis des Antibiotikums nach Auflösung der Scaffolds, kann von einer Antibiotika-Aufnahme von 20 % (1 h), 40 % (24 h) und 46 % (3 d), sowie von einer 100%igen Freisetzung ausgegangen werden. Bei der hier verwendeten Methode kann durch die unmittelbare Überführung der Scaffolds ein oberflächlich anhaftender Flüssigkeitsfilm der Beladungslösung in das Auslagerungsmedium überführt werden. Diese zusätzliche Antibiotikamenge hat Einfluss auf die Gesamtbeladung, sowie die initial freigesetzte Antibiotikamenge. Nach 1 h wurden für die 1 h beladenen Scaffolds 83 % freigesetzt, nach 24 h 99 %, die 24 h beladenen Scaffolds setzten durchschnittlich nach 1 h 56 %, nach 24 h 99 % frei. Die über 3 d beladenen Scaffolds konnten nach 1 h 46% und nach 24 h 99 % freisetzen.

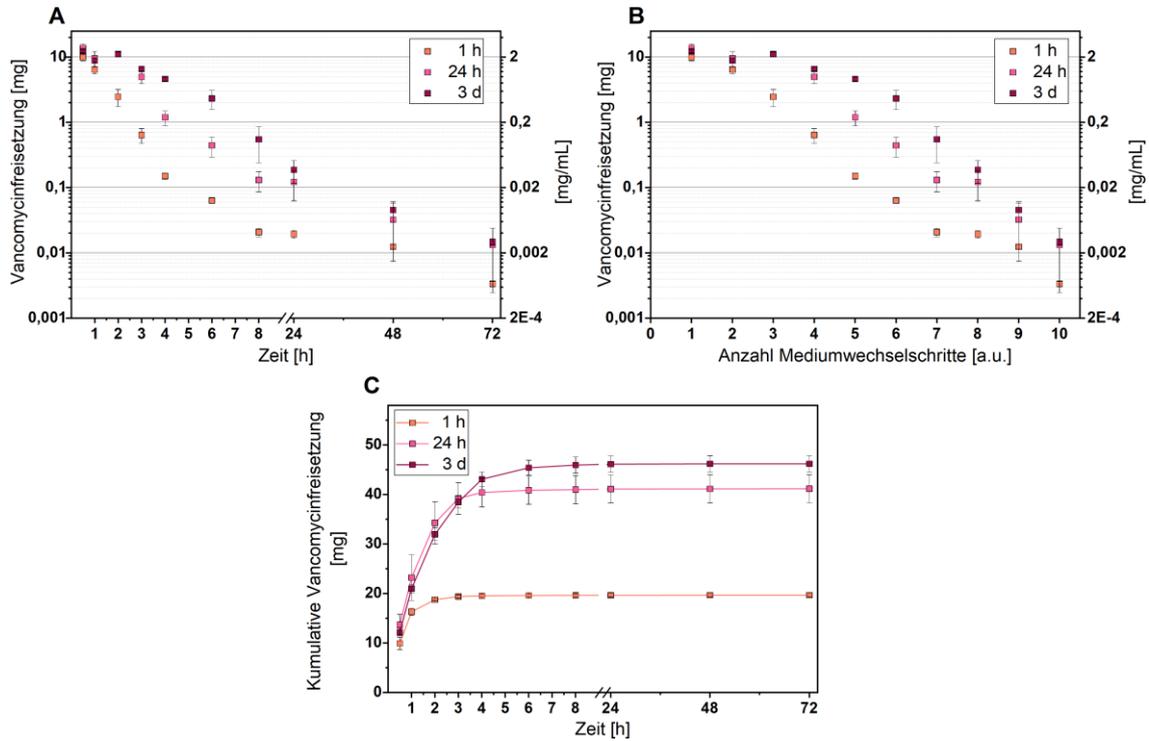


Abbildung 8: Vancomycinfreisetzung

Gezeigt ist die Vancomycinfreisetzung von CaP-Scaffolds bei unterschiedlicher Beladungsdauer. **A** zeigt die Vancomycinfreisetzung zu den Zeitpunkten der Wechselschritte bei Darstellung der Abszisse in h. **B** zeigt ebenso die Vancomycinfreisetzung zu den Zeitpunkten der Wechselschritte (wie in A). Woraus sich eine äquidistante Darstellung der Abszisse ergibt. **C** zeigt die kumulative Freisetzung von Vancomycin. (n = 3)

4.1.2 Antibiotikafreisetzung nach 24 h Beladungsdauer

Bei einer Beladungsdauer von 24 h konnte an den Scaffolds für die Antibiotika Cefuroxim, Ciprofloxacin, Clindamycin und Gentamicin über einen Zeitraum von 10 d eine Freisetzung beobachtet werden. Allgemein war für alle hier untersuchten Antibiotika initial stets eine relativ hohe Freisetzung („burst release“) festzustellen.

Cefuroxim

Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen von Cefuroxim werden in Abbildung 9 dargestellt. Nach Ende des Beobachtungszeitraumes wurden durchschnittlich 6,8 mg Cefuroxim freigesetzt. Wird eine Freisetzung von 100 % angenommen, entspricht dies der durchschnittlich beladenen Antibiotikamasse je Scaffold. Die absolute Antibiotikamasse der Ausgangslösung betrug 50 mg, so wurden davon 13 % während der Beladung aufgenommen. Die Freisetzungsuntersuchungen ergaben während der ersten 0,5 h 89 %, nach 24 h 99 %.

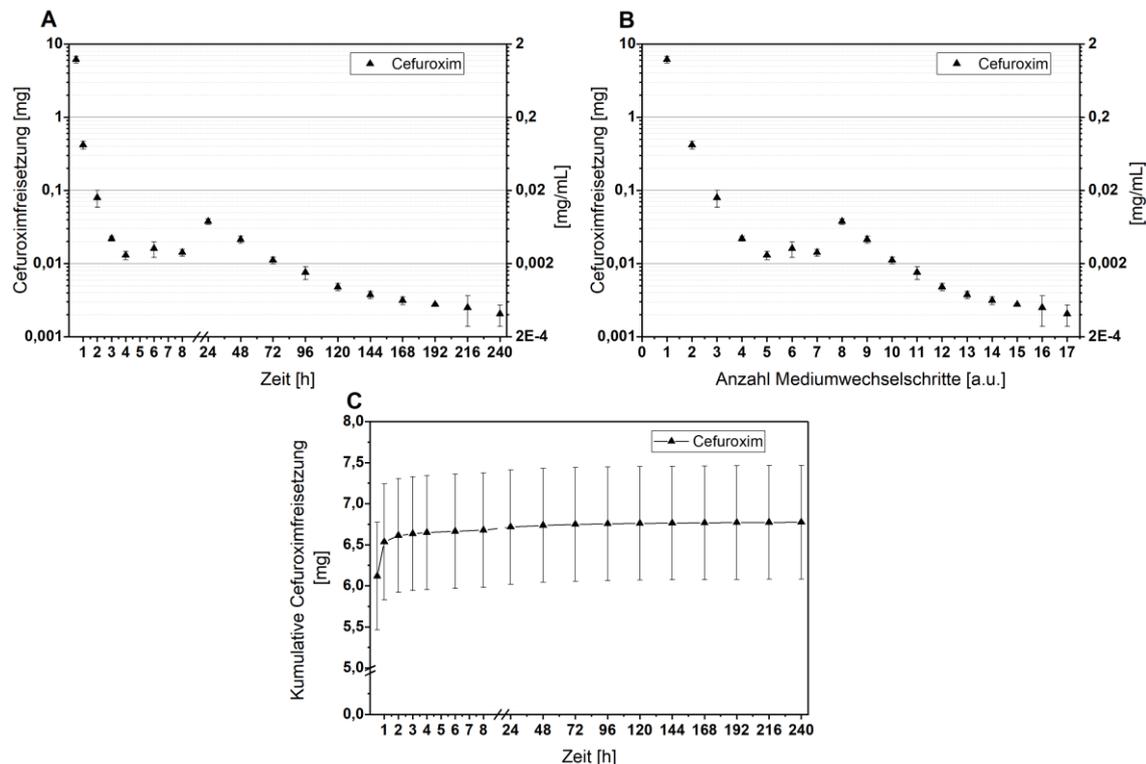


Abbildung 9: Antibiotikafreisetzung Cefuroxim

A zeigt die Freisetzung von Cefuroxim bei logarithmischer Darstellung der Ordinate und Wechselschritten in Stunden aufgetragen auf der Abszisse. **B** zeigt die Freisetzung von Cefuroxim bei Darstellung der Abszisse in Wechselschritten, hierdurch ergibt sich im Gegensatz zu **A** ein äquidistanter Abstand der Messergebnisse. **C** zeigt die kumulative Freisetzung über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen. (n = 3)

Ciprofloxacin

Für Ciprofloxacin sind die Ergebnisse in Abbildung 10 gezeigt. Insgesamt wurden 6,7 mg freigesetzt, was nicht exakt der aufgenommenen Antibiotikamenge entspricht. Nach Auflösung in 5,05 M HCl konnte an zwei Scaffolds noch durchschnittlich 0,01 mg Ciprofloxacin nachgewiesen werden. Angesichts der um den Faktor 670 größeren Gesamtbeladung ist dieser Antibiotikarestgehalt zu vernachlässigen. Folglich wurden aus der Beladungslösung ca. 17 % des Antibiotikums von den Scaffolds aufgenommen. Die initiale Freisetzung war bei Ciprofloxacin geringer ausgeprägt als bei den anderen untersuchten Antibiotika, nach 0,5 h wurden 14 % und nach 24 h 76 % freigesetzt.

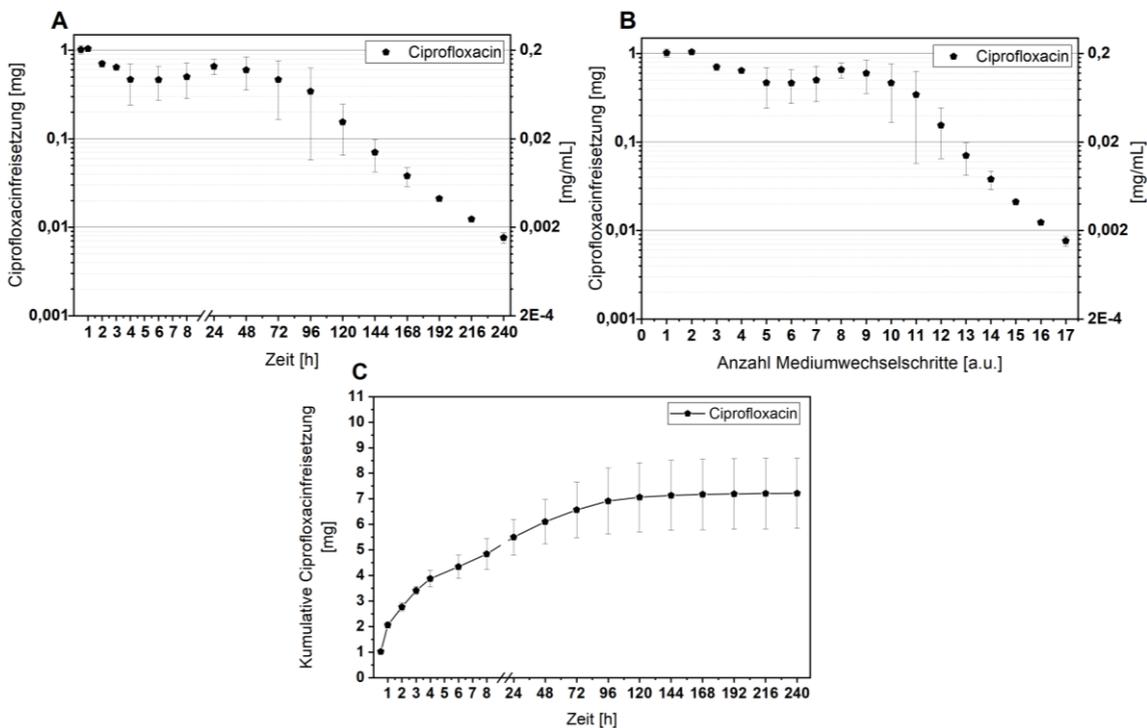


Abbildung 10: Antibiotikafreisetzung Ciprofloxacin

A zeigt die Freisetzung von Ciprofloxacin bei logarithmischer Darstellung der Ordinate und Wechselschritten in Stunden aufgetragen auf der Abszisse. **B** zeigt die Freisetzung von Ciprofloxacin bei Darstellung der Abszisse in Wechselschritten, hierdurch ergibt sich im Gegensatz zu **A** ein äquidistanter Abstand der Messergebnisse. **C** zeigt die kumulative Freisetzung über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen. (n = 3)

Clindamycin

Die Ergebnisse der Freisetzungsbefreiungen von mit Clindamycin beladenen Scaffolds sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Gesamtbeladung der Scaffolds betrug durchschnittlich 46 mg Clindamycin, was bei 300 mg innerhalb der Beladungslösung, einer Aufnahme von etwa 15 % entspricht. Nach 0,5 h erfolgte eine Freisetzung von 24,5 mg, was ca. 53 % entspricht. Nach 24 h wurden bereits 84 % des Clindamycins freigesetzt.

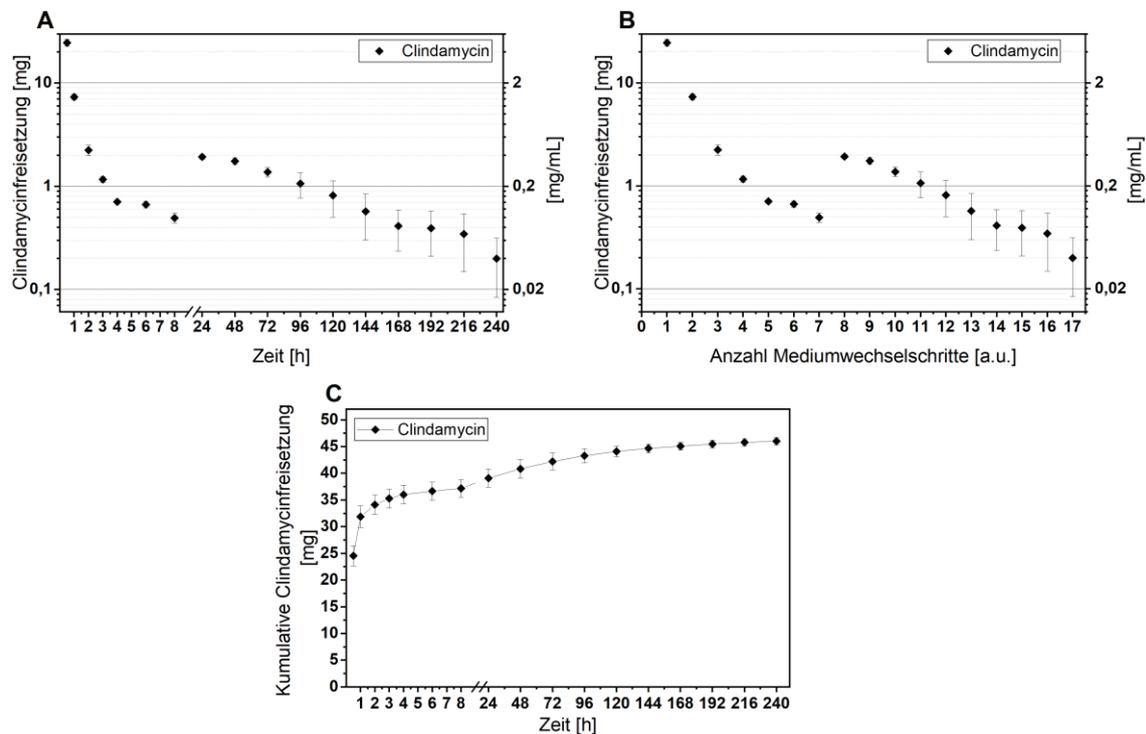


Abbildung 11: Antibiotikafreisetzung Clindamycin

A: Freisetzung von Clindamycin bei logarithmischer Darstellung der Ordinate und Wechselschritten in Stunden aufgetragen auf der Abszisse. **B** zeigt die Freisetzung von Clindamycin bei Darstellung der Abszisse in Wechselschritten, hierdurch ergibt sich im Gegensatz zu A ein äquidistanter Abstand der Messergebnisse. **C** zeigt die kumulative Freisetzung über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen. (n = 3)

Gentamicin

Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen von Gentamicin werden in Abbildung 12 dargestellt. Insgesamt wurden die Scaffolds durchschnittlich mit 15 mg beladen, was ca. 19 % der absoluten Antibiotikamenge der Beladungslösung entspricht. Die Freisetzungsuntersuchungen ergaben während der ersten 0,5 h 70%, nach 24 h 98 %.

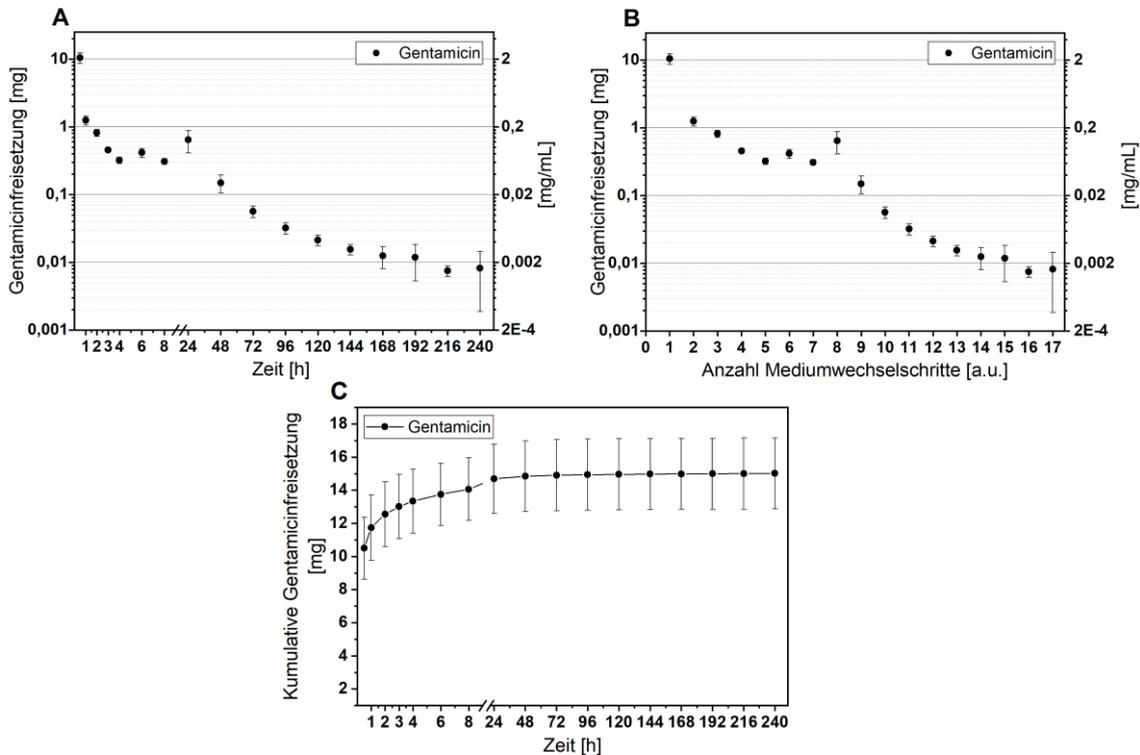


Abbildung 12: Antibiotikafreisetzung Gentamicin

A zeigt die Freisetzung von Gentamicin bei logarithmischer Darstellung der Ordinate und Wechselschritten in Stunden aufgetragen auf der Abszisse. **B** zeigt die Freisetzung von Gentamicin bei Darstellung der Abszisse in Wechselschritten, hierdurch ergibt sich im Gegensatz zu **A** ein äquidistanter Abstand der Messergebnisse. **C** zeigt die kumulative Freisetzung über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen. (n = 3)

4.1.3 1 h Beladungsdauer Gentamicin

Die Beladungsdauer von 1 h sollte auch für Gentamicin an drei Scaffolds untersucht werden. Die messbare Freisetzungsdauer betrug für einen Scaffold nur 24 h, für einen weiteren 48 h und für den letzten 96 h. Dieses Ergebnis lässt auf eine gewisse methodenabhängige Schwankung schließen, was im Kapitel 5.2.1 nochmals aufgegriffen wird. Bei einer absoluten Masse von 80 mg in der Beladungslösung beträgt die prozentuale Antibiotikaaufnahme ca. 11 %. Die Summe der freigesetzten Gentamicinmenge erhöhte sich bei verlängerter Freisetzungsdauer und lag bei 8,5 mg, 8,7 mg und 9,3 mg Gentamicin. Durchschnittlich wurden nach 0,5 h 62 %, sowie nach 24 h 98 % freigesetzt.

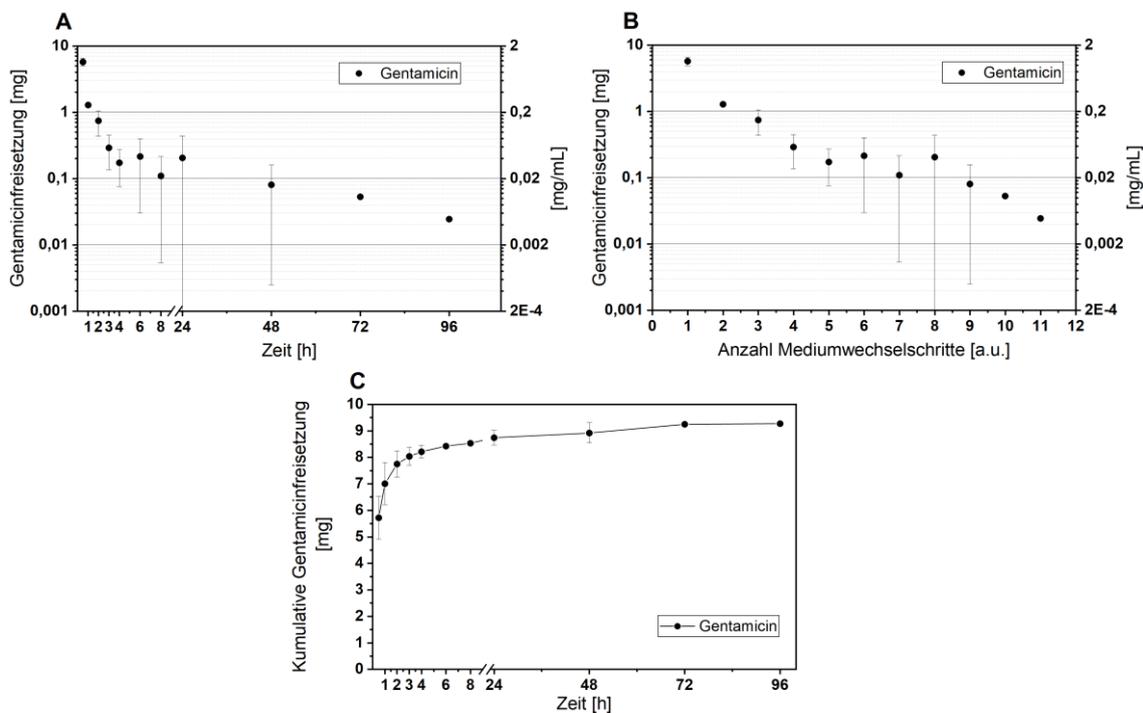


Abbildung 13: Gentamicinfreisetzung bei 1 h Beladungsdauer

Gezeigt sind die durchschnittlichen Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen von CaP-Scaffolds bei einer Beladungsdauer von 1 h in 2 mL einer 40 mg/mL konzentrierten Gentamicinlösung. Für diese Versuchsreihe war nur bei einem Probekörper eine Freisetzung über 96 h nachweisbar, je ein weiterer über 48 h und über 24 h. Demzufolge kann für die Messergebnisse von 72 und 96 h keine Standardabweichung angegeben werden. **A** zeigt die Ergebnisse bei logarithmischer Darstellung der freigesetzten Gentamicinmenge auf der Ordinate in mg und der Abszisse zu den Zeitpunkten der Wechselschritte. **B** zeigt ebenfalls die freigesetzte Gentamicinmenge jedoch bei äquidistanter Darstellung der Abszisse in Anzahl des jeweiligen Wechselschrittes. **C** zeigt die kumulativ freigesetzte Gentamicinmenge auf. (n = 3)

4.1.4 Behandelte und unbehandelte Scaffolds

Die behandelten und unbehandelten Scaffolds wurden für 1 h in der Vancomycinlösung mit dem Antibiotikum beladen. Es zeigte sich, dass die unbehandelten Scaffolds nur über einen Zeitraum von 48 h nachweislich Vancomycin freisetzen, wohingegen die behandelten Scaffolds noch nach 120 h eine Antibiotikafreisetzung zeigten. Die behandelten Scaffolds setzten insgesamt durchschnittlich 13,6 mg Vancomycin frei, die unbehandelten 9,8 mg. Daraus folgt eine Vancomycinaufnahme von 13,6 % bzw. 9,8 % aus der Beladungslösung. Das durchschnittliche Freisetzungsverhalten ist in Abbildung 14 gezeigt. Nach 0,5 h wurden insgesamt, bezogen auf die beladene Antibiotikamenge, 37 % (behandelt) bzw. 58 % (unbehandelt) freigesetzt, nach 24 h 98 % (behandelt) bzw. 99 % (unbehandelt).

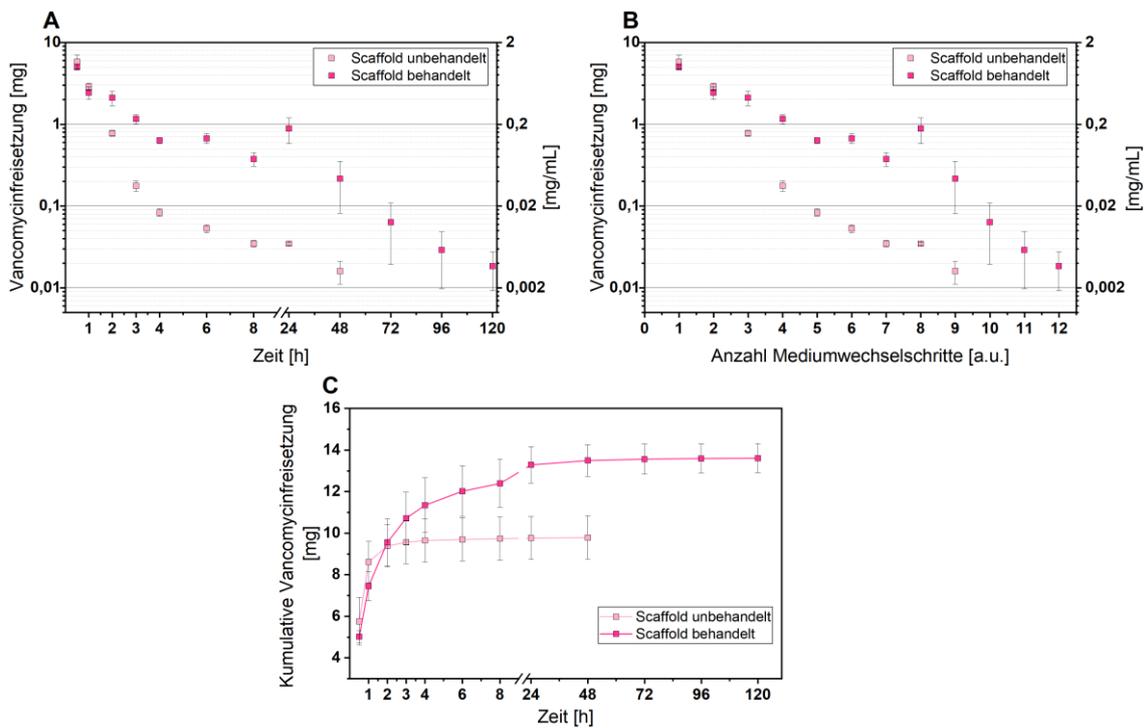


Abbildung 14: Vancomycinfreisetzung von behandelten und unbehandelten Scaffolds
 Die Freisetzungsuntersuchungen wurden für die Beladungsdauer von 1 h in 2 mL einer 50 mg/mL konzentrierten Vancomycinlösung durchgeführt. **A** zeigt die Freisetzung in mg zu den Zeitpunkten der Wechselschritte bei Darstellung der Abszisse in h. Bei **B** erfolgt die Darstellung der Abszisse in äquidistanten Abständen als Anzahl der Mediumwechselschritte. **C** zeigt die kumulative Vancomycinfreisetzung. (n = 3)

4.1.5 Orientierender Versuch: Vancomycinfreisetzung nach Behandlung mit Natriumcarbonat-Lösung

Für den orientierenden Versuch konnte an einem Scaffold gezeigt werden, dass die Behandlung mit 1%iger Natriumcarbonatlösung nach Ende der Beladungszeit (1 h) die Freisetzung des Vancomycins verzögerte. Die Vancomycinfreisetzung konnte über einen Zeitraum von bis zu 16 Tagen gemessen werden. Bei vorausgegangenen Versuchen mit 1 h Beladungsdauer war lediglich bis zu 120 h die Antibiotikafreisetzung messbar. Insgesamt wurden ca. 12 mg Vancomycin freigesetzt. Die Freisetzung während der ersten 24 h lag bei 78 % der Gesamtfreisetzung. Vergleicht man dies mit vorausgegangenen Messungen der Vancomycinfreisetzung an Scaffolds mit 1 h Beladungsdauer, so ist eine Verminderung der Anfangsfreisetzung erkennbar (nach 24 h 97 % freigesetzt bei behandeltem Scaffold, 99% freigesetzt bei Versuch mit Variation der Beladungsdauer der Scaffolds). Die Wirksamkeit des Vancomycins wurde an einem Probekörper im Agar-Diffusionstest mit *S. aureus* nachgewiesen (siehe Anhang Abbildung 31).

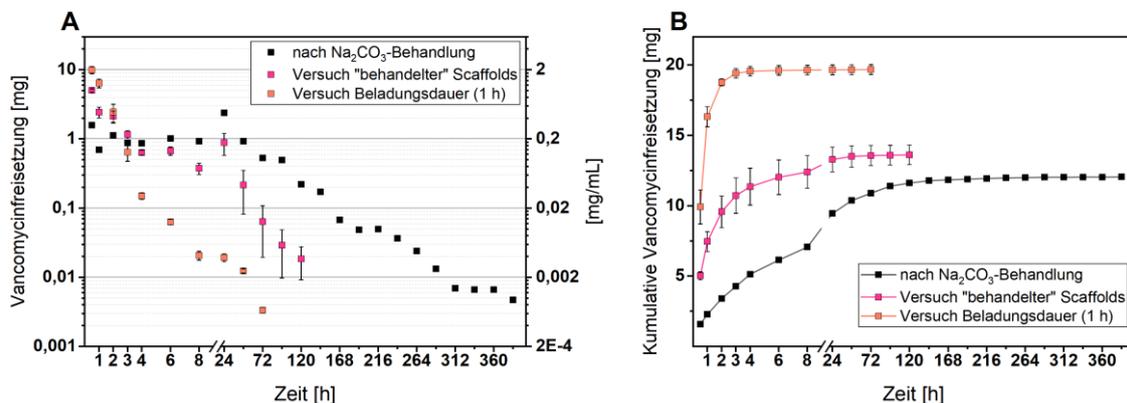


Abbildung 15: Vancomycinfreisetzung nach Behandlung mit Na₂CO₃-Lösung

Gezeigt wird die Freisetzung von Vancomycin von einem CaP-Scaffold nach 1 h Beladungsdauer in 2 mL einer 50 mg/mL konzentrierten Lösung und anschließender Behandlung (kurzes Eintauchen) mit einer 1%igen Natriumcarbonatlösung (schwarz; n = 1). Zudem werden die damit vergleichbaren Ergebnisse aus vorausgegangenen Untersuchungen der Scaffolds mit 1 h Beladungsdauer (n = 3) dargestellt. **A** zeigt hierbei die Freisetzung von Vancomycin zum Zeitpunkt der jeweiligen Wechselschritte. **B** zeigt die kumulative Freisetzung der Ergebnisse aus A.

4.2 Freisetzungsuntersuchungen an Zementen

4.2.1 Calciumphosphat-Zemente

Die Freisetzungsuntersuchungen erfolgten über einen Beobachtungszeitraum von 34 d mit den Antibiotika Vancomycin und Gentamicin. Der Vancomycingehalt je Zementcharge betrug 30 mg (0,6 mL bei 50 mg/mL Vancomycin). Die zuvor in zwei Spritzen aufgeteilte Zementpaste hatte eine Masse von ca. 3,7 g. Es ergab sich somit für Vancomycin ein Gehalt von ca. 8 mg/g Zementpaste. Bei einer durchschnittlichen Masse von 0,74 g je Probekörper (idealisiert 0,86 g, bei 0,432 mL Probekörpergröße und Zementpastendichte von ca. 2 g/mL; jedoch geringer aufgrund von Poren, geringerer Dichte der Antibiotikallösung und inkompletter Formkongruenz der Quader) erhielt man für die absolute Vancomycinmasse je Probekörper etwa 6 mg Vancomycin. Insgesamt wurden nach 34 d durchschnittlich 6 mg Vancomycin freigesetzt. Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchung mit Vancomycin sind nachfolgend in Abbildung 16 dargestellt. Nach Auflösung der Probekörper in 5,05 M HCl konnte kein Vancomycin mehr nachgewiesen werden, was die vollständige Freisetzung bewies. Somit wurden nach 1 h für die 5x gemischten Proben durchschnittlich 5 % (0,31 mg) freigesetzt, nach 24 h 25 % (1,48 mg); für die 10x gemischten Zemente wurden durchschnittlich nach 1 h 6 % (0,33 mg), sowie nach 24 h 23 % (1,39 mg) freigesetzt.

Für Gentamicin-haltige CaP-Zemente ergab sich durch Zugabe von 0,6 mL einer 40 mg/mL konzentrierten Lösung ein Gehalt von 24 mg pro Spritze. Bezogen auf die aufgeteilte Zementpaste ergab sich eine Antibiotikakonzentration von 6,5 mg/g. Bei einer durchschnittlichen Masse von 0,74 g erhielt man einen Gesamtgehalt an Gentamicin je Probekörper von durchschnittlich 4,8 mg. Das Freisetzungsverhalten der Versuchsansätze wird in Abbildung 17 gezeigt. Die Messung der aufgelösten Probekörper in HCl war aufgrund der unter alkalischen Bedingungen ablaufenden Derivatisierungsreaktion nicht möglich. Bei dem Versuch durch die Zugabe von Phosphatpufferlösungen oder 10fach konzentrierter PBS einen neutralen pH-Wert der Probekörper-HCl-Lösung einzustellen, und dies dann mit der Derivatisierungslösung zu vermischen,

zeigten sich keine sinnvollen Messergebnisse am UV/VIS-Spektrophotometer. Es muss daher angenommen werden, dass die 5x gemischten Probekörper noch ca. 30 % (entspricht 1,44 mg) und die 10x gemischten Probekörper noch ca. 50 % (entspricht 2,4 mg) des zugesetzten Gentamicins enthielten. Nach 1 h wurden für die 5x gemischten Probekörper durchschnittlich 9 % (entspricht 0,44 mg) freigesetzt, nach 24 h 31 % (entspricht 1,51 mg). Die 10x gemischten Probekörper zeigten nach 1 h eine durchschnittliche Freisetzung von 6 % (entspricht 0,30 mg) und nach 24 h von 18 % (0,88 mg).

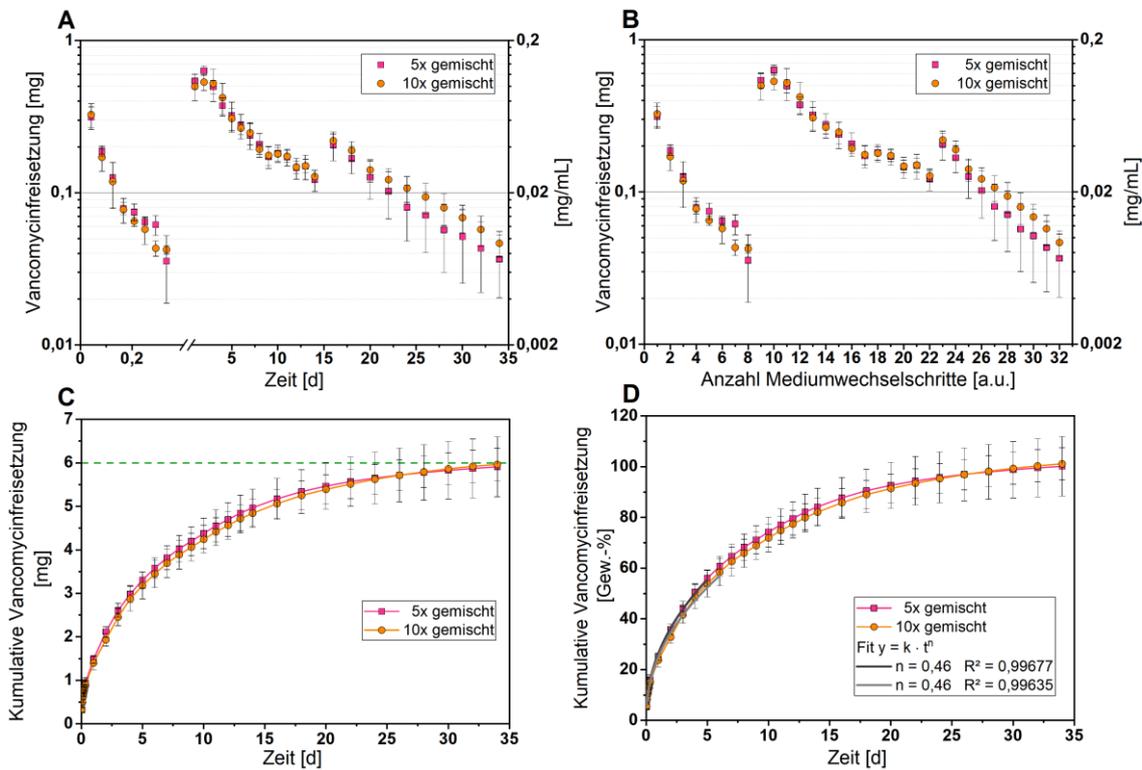


Abbildung 16: Vancomycinfreisetzung aus CaP-Zementen

A zeigt die Vancomycinfreisetzung nach den Zeitpunkten der Mediumwechselschritte. Die Abszisse wird in Stunden nach den Wechselschritten und die Ordinate in mg bei logarithmischer Darstellung gezeigt. **B** zeigt die freigesetzte Vancomycinmenge zu den Zeitpunkten der Wechselschritte bei äquidistanter Darstellung der Abszisse in Wechselschritten. **C** zeigt die kumulativ freigesetzte Vancomycinmasse in mg. Die gestrichelte grüne Linie zeigt die errechnete absolute Vancomycinmasse der Probekörper (6 mg). **D** zeigt die kumulativ freigesetzte Vancomycinmenge in Gew.-% mit der Anpassung nach dem Korsmeyer-Peppas Modell (bis 60 % der freigesetzten Vancomycinmenge). (n = 5)

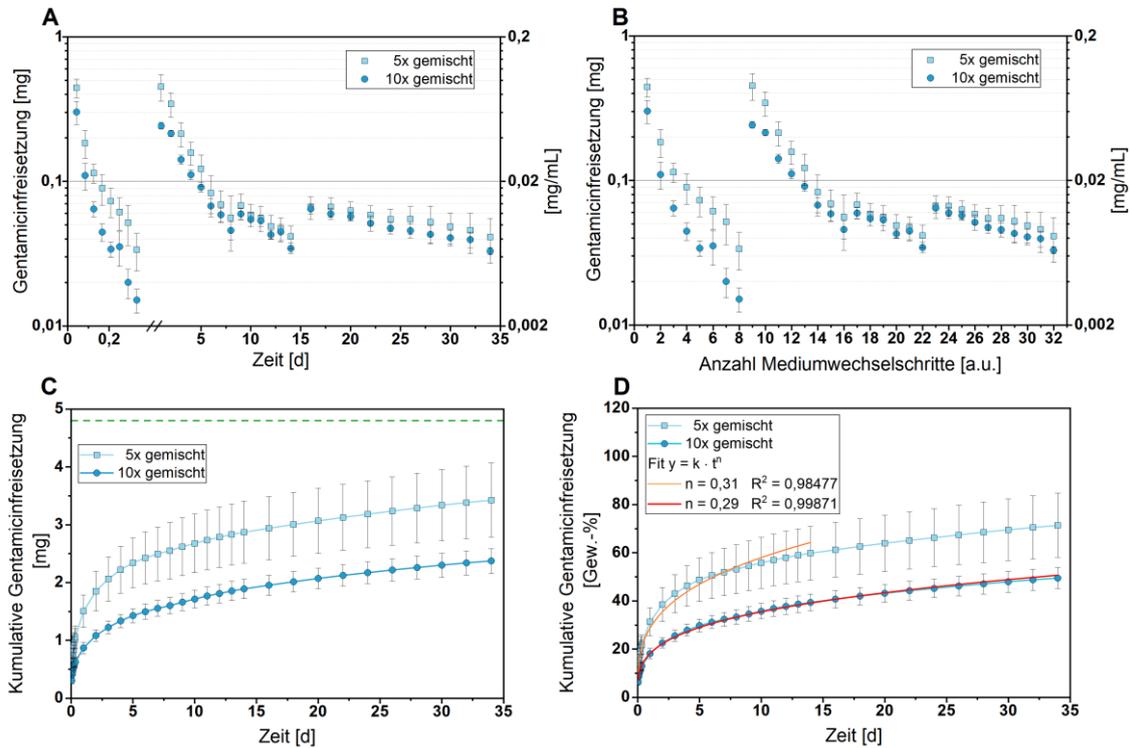


Abbildung 17: Gentamicinfreisetzung aus CaP-Zement

A zeigt die Gentamicinfreisetzung nach den Zeitpunkten der Mediumwechselschritte. Die Abszisse wird in Stunden nach den Wechselschritten und die Ordinate in mg bei logarithmischer Darstellung gezeigt. **B** zeigt die freigesetzte Gentamicinmenge zu den Zeitpunkten der Wechselschritte bei äquidistanter Darstellung der Abszisse in Wechselschritten. **C** zeigt die kumulativ freigesetzte Gentamicinmasse in mg. Als grün gestrichelte Linie ist die errechnete absolute Gentamicinmasse je Probekörper mit 4,8 mg dargestellt. **D** zeigt die kumulativ freigesetzte Gentamicinmenge in Gew.-% mit der Anpassung nach dem Korsmeyer-Peppas Modell (bis 60 % der freigesetzten Gentamicinmenge). (n = 5)

4.2.2 Struvit-Zement

Die Freisetzungsversuche wurden für Struvit-Zement mit unterschiedlich hohen Antibiotikabeladungen an je vier Probekörpern untersucht. Es konnte durch Zugabe des Vancomycins in der flüssigen Phase des Zements je Probekörper ein Gesamtgehalt von ca. 5 mg Vancomycin erreicht werden (V1, n = 4). Entscheidend war hierbei, dass das Antibiotikum bereits als Lösung zur DAHP-Lösung hinzugegeben wurde. Ein direktes Auflösen des Vancomycin-Pulvers innerhalb der 3,5 M DAHP-Lösung war nicht möglich. Durch das Vermischen von Vancomycinpulver mit Magnesiumphosphatpulver konnte je Probekörper mit einem Antibiotikagehalt von etwa 150 mg erhalten werden (V2, n = 4). Das Freisetzungsverhalten der beiden Versuchsansätze ist in Abbildung 18 gezeigt. Bei Zugabe

des Antibiotikums in Pulverform war die Freisetzung über 11 d (264 h) messbar, bei Beladung der DAHP-Lösung lediglich über 4 d. Nach 1 h haben mit 150 mg beladene Probekörper 8,7 % freigesetzt, nach 24 h 16 %. Die mit 5 mg beladenen Proben setzten nach 1 h 8 % und nach 24 h 25 % frei.

Unabhängig von der absoluten Beladungsmenge zeigte sich, dass vergleichbare Anteile der zugeführten Antibiotikamenge innerhalb des Beobachtungszeitraumes freigesetzt wurden (für V1 ca. 28 %, für V2 ca. 27 %). Dieser Zusammenhang wird in der nachfolgenden Abbildung 19 gezeigt. Diese bestätigt zudem die Validität der Messmethode, da die Summe des nach Auflösung der Proben bestimmten Antibiotikarestgehaltes und die freigesetzten Antibiotikamengen dem errechneten Antibiotikagehalt entsprechen.

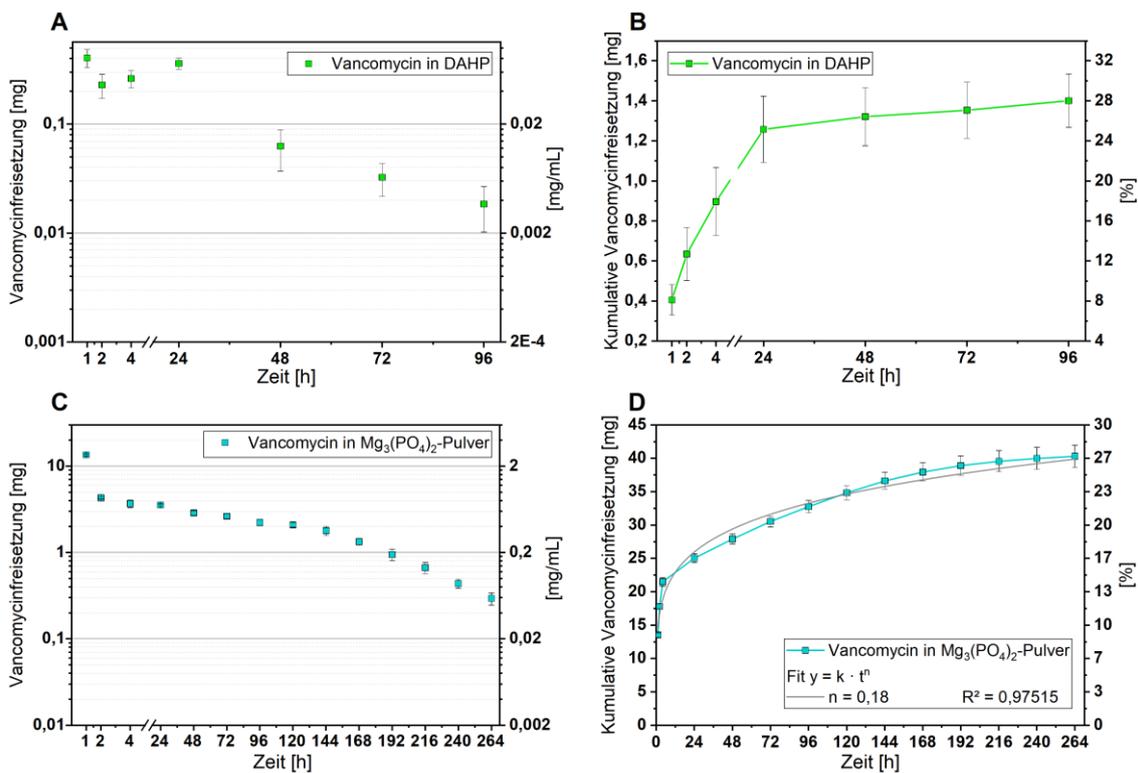


Abbildung 18: Vancomycinfreisetzung aus Struvit-Zement

A zeigt die zu den Zeitpunkten der Mediumwechselschritte freigesetzte Vancomycinmenge für die Versuchsreihe 1 (V1), bei welcher Vancomycin der DAHP-Lösung zugefügt wurde, wobei ein Probekörper durchschnittlich 5 mg Vancomycin enthielt ($n = 4$). **B** zeigt die kumulativ freigesetzte Vancomycinmenge für V1. **C** zeigt die zu den Zeitpunkten der Mediumwechselschritte freigesetzte Vancomycinmenge für die Versuchsreihe 2 (V2), wobei hier das Vancomycin in Pulverform dem Farringtonit-Pulver zugeführt wurde, dabei enthielt ein Probekörper durchschnittlich 150 mg Vancomycin ($n = 4$). **D** zeigt die kumulativ freigesetzte Vancomycinmenge für V2.

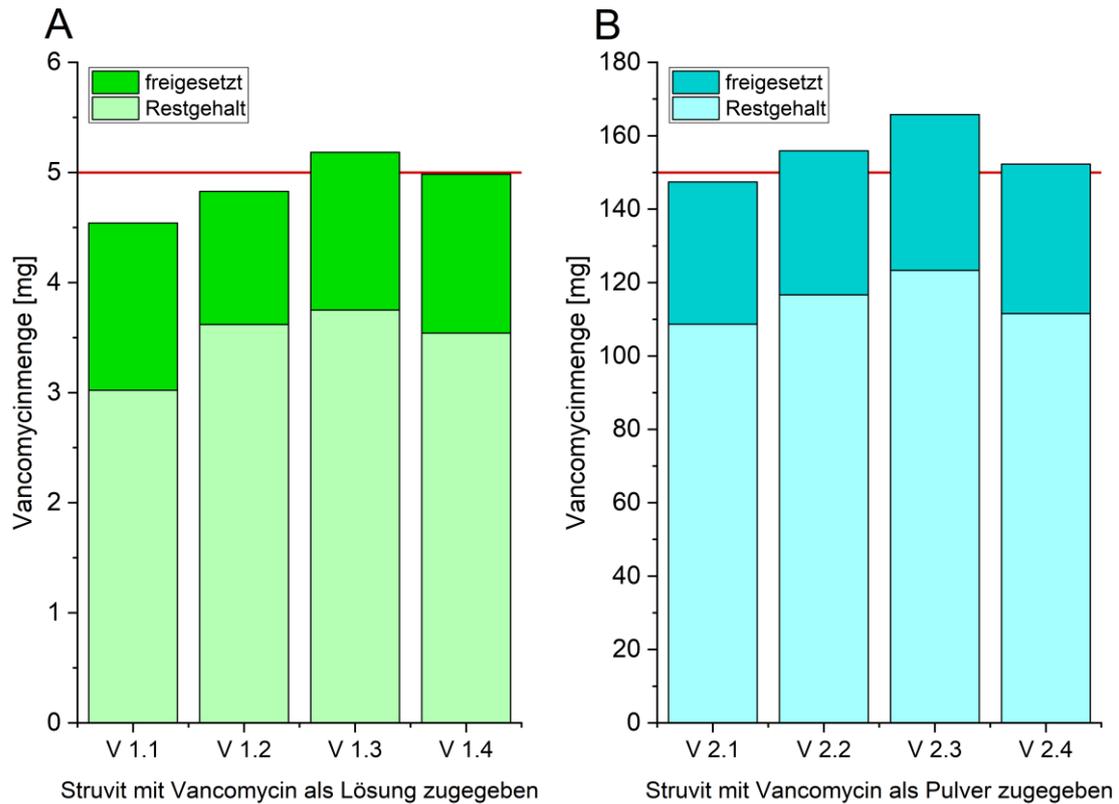


Abbildung 19: Übersicht der Vancomycinmenge nach Ende der Freisetzungsbefragung

A zeigt die Versuchsreihe 1 (V1, n = 4), bei welcher jeweils vier Probekörper aus Struvit mit Vancomycin in Lösung und zur DAHP-Lösung hinzugegeben wurden; aus der eingegebenen Menge an Vancomycin ergibt sich für jeden Scaffold ca. 5 mg Gehalt (rote Linie). **B** zeigt die Versuchsreihe 2 (V2, n = 4), bei welcher analog zu V1 vier Probekörper aus Struvit mit Vancomycin beladen wurden, jedoch wurde Vancomycin als Pulver dem Magnesiumphosphat beigegeben. Die hierfür errechnete Gesamtmenge Antibiotikum je Probekörper beläuft sich auf etwa 150 mg Vancomycin (rote Linie).

4.3 Agardiffusionstest

Die Ergebnisse des Agardiffusionstests, der mit Vancoymcin- oder Gentamicin-beladenen Scaffolds und CaP-Zement-Probekörpern, sind in Abbildung 20 dargestellt. Die Messung des Hemmhofes erfolgte nach 24 h sowie nach 48 h im Inkubator, wobei hier kein Unterschied feststellbar war. Zudem verursachten die antibiotikafreien Elutionslösungen keine Hemmhöfe, woraus geschlossen werden kann, dass die Bestandteile der Zementpaste keine antibakterielle Wirkung haben. Es zeigte sich für Vancomycin bei den CaP-Zementen ein durchschnittlicher Hemmhof von 4,3 mm, bei den CaP-Scaffolds von 3,3 mm. Für Gentamicin zeigte sich bei den CaP-Zementen ein durchschnittlicher Hemmhof von 5,6 mm, bei den Scaffolds von 2,2 mm. Die jeweiligen Referenzproben ohne Antibiotikum wiesen stets zirkuläres Bakterienwachstum auf. Ebenso zeigten die Elutionsmedien der konzentrierten antibiotikafreien Referenzproben vollständiges Bakterienwachstum. Die Sensibilität des hier verwendeten *S. aureus* wird für Gentamicin mit $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ und für Vancomycin mit $1 \mu\text{g/mL}$ angegeben. Im Anhang zeigt Abbildung 31 exemplarische Ergebnisse (Fotos) dieses Versuches.

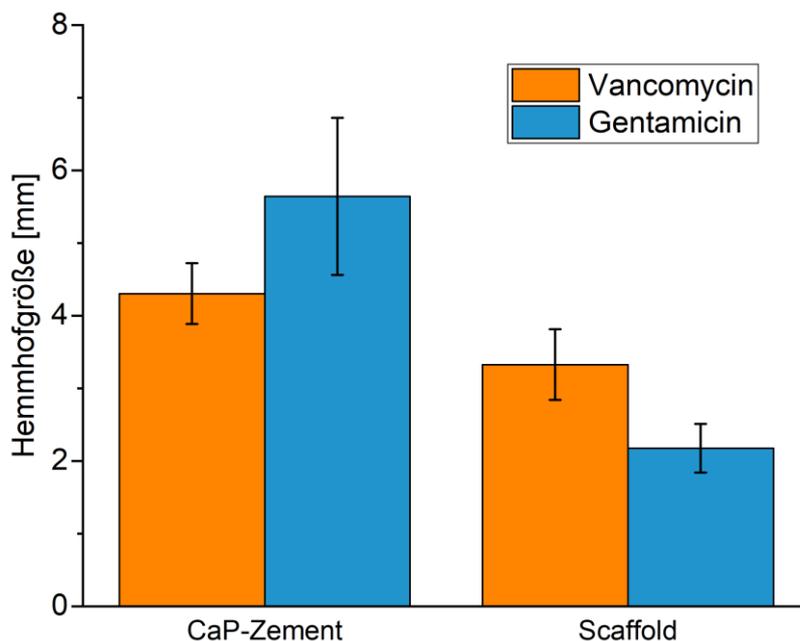


Abbildung 20: Ergebnisse des Agardiffusionstests

Gezeigt sind die durchschnittlichen Hemmhofgrößen für *S. aureus*. Es wurden sowohl die Scaffolds ($n = 5$) als auch CaP-Zement Probekörper ($n = 7$) mit Vancomycin sowie mit Gentamicin beladen. Die Beladungsdauer der Scaffolds betrug 1 h. Bei den Zementen lag die Mischzyklenanzahl bei 10. Die Hemmhöfe wurden nach 24 h und 48 h gemessen. Aufgrund von nur unwesentlichen Unterschieden beider Messungen wurden die Ergebnisse zusammengefasst.

Die Elutionslösungen, die aus der Auslagerung der Probekörper für den Agardiffusionstest resultierten, wurden ebenfalls auf ihre Antibiotikamenge untersucht. Das Ergebnis zeigt Abbildung 21. Interessant ist hierbei insbesondere der Wert nach 24 h, also bevor die Formkörper auf die Agarplatten übertragen wurden. Die Werte nach 24 h ergeben durchschnittlich für CaP-Zemente mit Vancomycinzusatz 0,318 mg, mit Gentamicinzusatz 0,296 mg. Bei den CaP-Scaffolds betrug die freigesetzte Antibiotikamenge nach 24 h für Vancomycin durchschnittlich 0,908 mg und für Gentamicin durchschnittlich 0,085 mg. Der bei mit Vancomycin beladenen Scaffolds etwas größere Hemmhof kann demnach durch den deutlich höheren Vancomycingehalt nach 24 h beschrieben werden bzw. durch die nach 1 h deutlich größere Gesamtbeladung von Vancomycin im Vergleich zu Gentamicin.

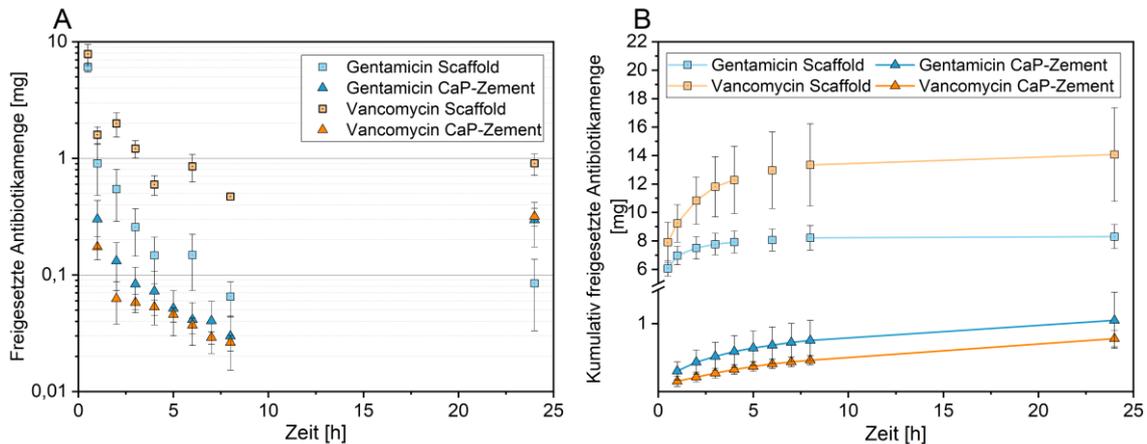


Abbildung 21: Freigesetzte Antibiotikamenge vor dem Agardiffusionstest

Die dargestellten Antibiotikamengen wurden aus den Freisetzungsforschungen vor dem Agardiffusionstest gewonnen. Die Freisetzungsforschung erfolgte für die untersuchten Scaffolds (n = 5) sowie CaP-Zemente (n = 7) nach denselben Schemata wie bei entsprechenden vorausgegangenen Untersuchungen. So erfolgte die Freisetzung stets in 5 mL PBS, der Mediumwechsel erfolgte bei Scaffolds nach 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 24 h nach Ende der Beladungsdauer in der Antibiotikallösung, bei Zementen erfolgte der Mediumwechsel nach 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 und 24 h. **A** zeigt die jeweiligen Antibiotikamengen zu den entsprechenden Wechselschritten. **B** zeigt die aus A resultierende kumulativ freigesetzte Antibiotikamenge in mg.

4.4 Charakterisierung von Calciumphosphat-Zementen

4.4.1 Druckfestigkeitsuntersuchungen

Die Ergebnisse der Druckfestigkeitsuntersuchungen von CaP-Zement sind in Abbildung 22 dargestellt. Es zeigte sich bei den Referenzproben für 5 Mischzyklen eine durchschnittliche Druckfestigkeit von 4,0 MPa und für 10 Mischzyklen 5,7 MPa. Für Vancomycin-Probekörper lag die Druckfestigkeit bei 5,2 MPa. Bei den mit Gentamicin-beladenen CaP-Zementen ergaben sich mit durchschnittlich 6,7 MPa die höchsten Werte der Druckfestigkeit. Signifikant unterscheidet sich Druckfestigkeit (bei $p \leq 0,05$) lediglich zwischen 10x gemischten Gentamicin-Probekörpern und der 5x gemischten antibiotikafreien Referenz. Innerhalb der 10x gemischten Gruppe zeigte sich demnach kein signifikanter Unterschied.

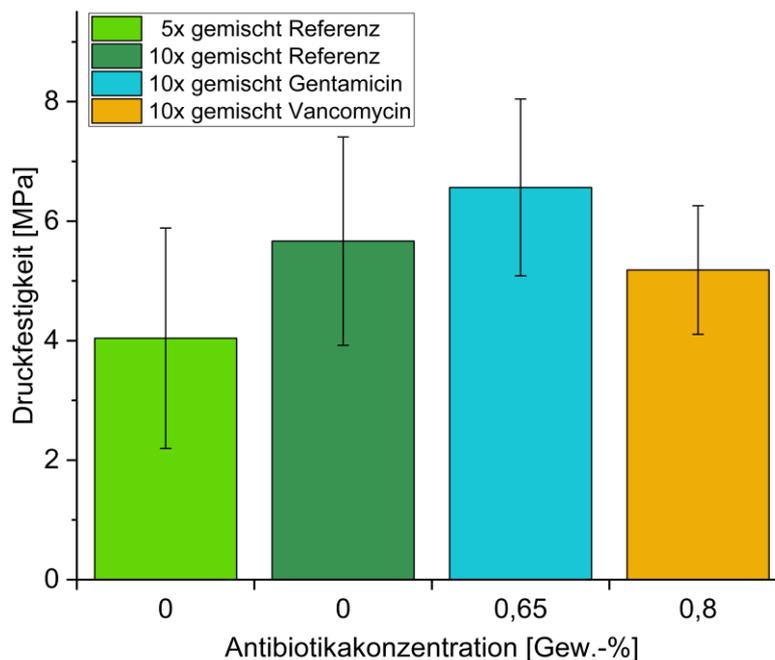


Abbildung 22: Druckfestigkeit antibiotikahaltiger CaP-Zement-Probekörper

Die durchschnittlichen Ergebnisse der Druckfestigkeitsprüfung werden mit ihrer Standardabweichung dargestellt ($n \geq 8$). Es wurden Referenzproben mit Wasser gemischt, wobei innerhalb der Referenz noch der Einfluss des Mischvorgangs (5x und 10x gemischt) gezeigt werden sollte. Die Probekörper mit Antibiotikazusatz wurden 10x vermisch. Der unterschiedliche Antibiotikagehalt zwischen Vancomycin und Gentamicin ergibt sich aus den unterschiedlichen konzentrierten Ausgangslösungen. Nach dem Mischvorgang wurden alle Proben für 24 h bei 100 % Luftfeuchtigkeit ausgehärtet. Signifikant ($p \leq 0,05$) ist der Unterschied des Mittelwertes der Druckfestigkeit nur zwischen den 10x gemischten Gentamicinproben und den 5x gemischten Referenzproben.

4.4.2 XRD-Messungen

Die XRD-Messungen wurden durchgeführt, um eventuell auftretende Unterschiede in der kristallinen Zusammensetzung darzustellen. Wie Abbildung 23 zeigt, sind keine Unterschiede der gebildeten Phasen nachweisbar. Der ausgehärtete Zement besteht stets aus Hydroxylapatit, α -TCP, Monetit und Calcit. Diese Bestandteile, mit Ausnahme des Hydroxylapatits, befinden sich auch in der ölbasieren Ausgangspaste.

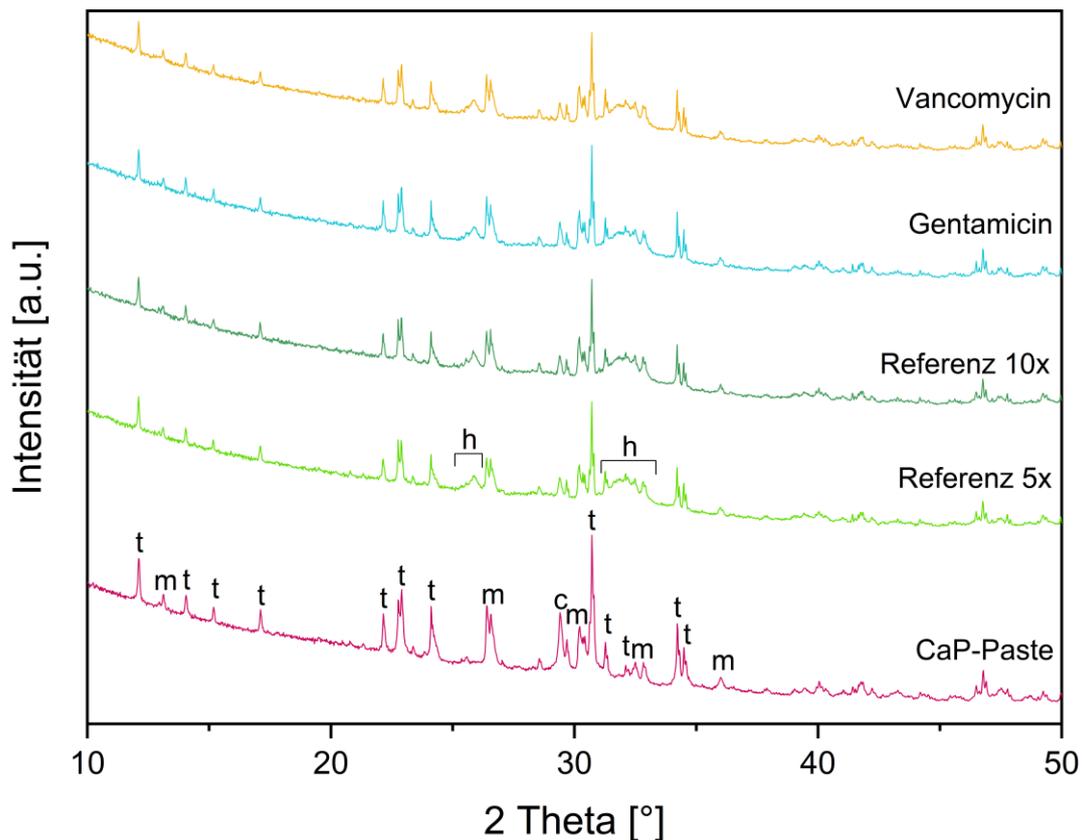


Abbildung 23: XRD-Messung CaP-Zemente

Die XRD-Messung der CaP-Zemente zeigt für den relevanten Bereich zwischen 7 – 70° keine Unterschiede hinsichtlich der kristallinen Zusammensetzung (aus Übersichtsgründen ist hier nur der Bereich von 10 – 50° gezeigt). Die Zementproben wurden wie bei den Druckfestigkeitsmessungen nach 24 h bei 100 % Luftfeuchtigkeit ausgehärtet und anschließend für min. 48 h im Trockenschrank gelagert. Die CaP-Paste entspricht der vom Hersteller gelieferten wasserfreien Paste. Die CaP-Ausgangspaste zeigt Bestandteile von α -TCP, Monetit und Calcit. Hingegen findet sich in den abgebundenen Zementen zusätzlich Hydroxylapatit. **t** = α -TCP, **m** = Monetit, **c** = Calcit, **h** = Hydroxylapatit.

4.4.3 Porosität

Für CaP-Zemente wurde einerseits der Einfluss der Mischzyklen (5x bzw. 10x gemischt) andererseits die Zugabe der Antibiotika Vancomycin und Gentamicin auf die Porosität der Probekörper untersucht (siehe Abbildung 24). Es zeigte sich für den CaP-Zement mit 5 Mischzyklen eine durchschnittliche Gesamtporosität von ca. 29 %, bei 10 Mischzyklen ca. 32 %. Bei Zugabe von Gentamicin erhöhte sich die durchschnittliche Porosität auf ca. 37 %, bei Zugabe von Vancomycin auf ca. 35 %. Die Unterschiede der durchschnittlichen Gesamtporosität waren für $p \leq 0,05$ nicht signifikant. Die Porengrößenverteilung zeigte für Probekörper der CaP-Referenz, welche mit 10 Mischzyklen hergestellt wurden, eine unimodale Häufigkeitsverteilungen mit Maximum bei Porengrößen um 0,5 μm . Bei Zusatz von Antibiotika ergab sich eine angedeutete bimodale Porengrößenverteilung mit zusätzlichem Maximum um 0,01 μm . Für die 10x gemischten Proben zeigte sich stets eine schiefe Verteilung der Porengrößen. Die Porengrößenverteilung zeigte bei mit 5 Mischzyklen hergestelltem CaP-Zement eine multimodale Verteilung.

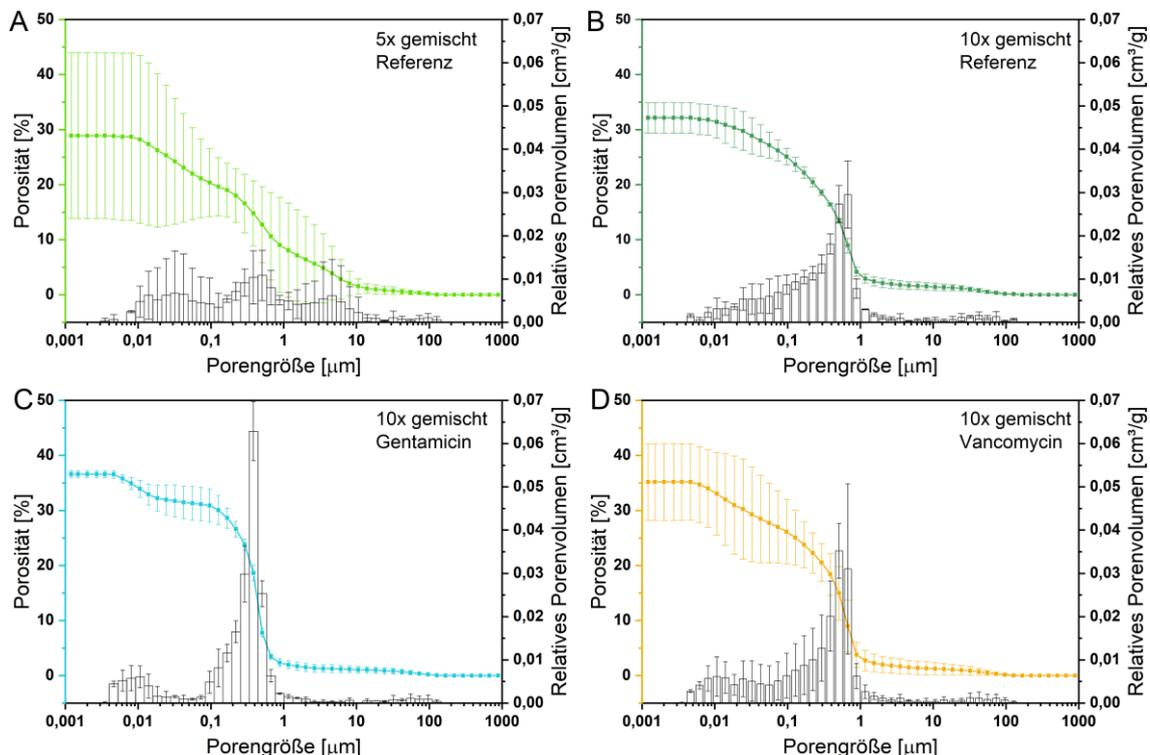
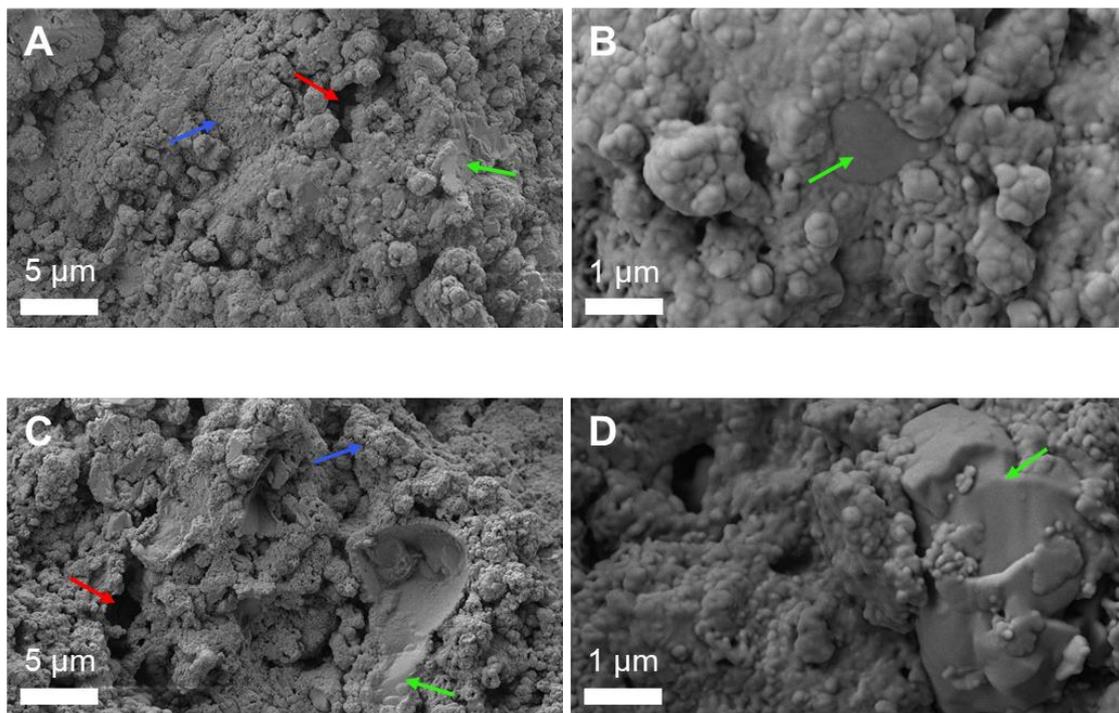


Abbildung 24: Ergebnisse der Quecksilberporosimetrie für CaP-Zemente

Dargestellt sind Mittelwerte der Quecksilberporositätsmessungen ($n = 3$). **A** zeigt die Ergebnisse für die 5x gemischte Referenz (mit Wasser gemischt). **B** zeigt die 10x gemischte Referenz. **C** zeigt den CaP-Zement gemischt mit Gentamicin und **D** zeigt die Ergebnisse für CaP-Zement gemischt mit Vancomycin. Die Proben wurden über 24 h bei 100 % Luftfeuchtigkeit ausgehärtet.

4.4.4 Rasterelektronenmikroskopie

Die nachfolgende Abbildung 25 zeigt repräsentative Ausschnitte der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen von CaP-Zement Bruchflächen für jeweils zwei unterschiedliche Vergrößerungen. Es konnten in REM-Aufnahmen keine erkennbaren Unterschiede zwischen den Proben mit und ohne Antibiotikazusatz dargestellt werden. Allgemein zeigt sich eine feinkörnige Zementmatrix mit unregelmäßig geformten Poren, sowie Kristallagglomeraten, die dem Calcium-defizitären HA zuzuordnen sind. Zudem sind Areale mit nicht reagiertem α -TCP als markante glatt erscheinende Bereiche erkennbar. Lediglich die Probe mit Vancomycin-Zusatz zeigt bei stärkerer Vergrößerung (H) etwas feinkristallinere, dem HA zuzuordnende, Strukturen auf.



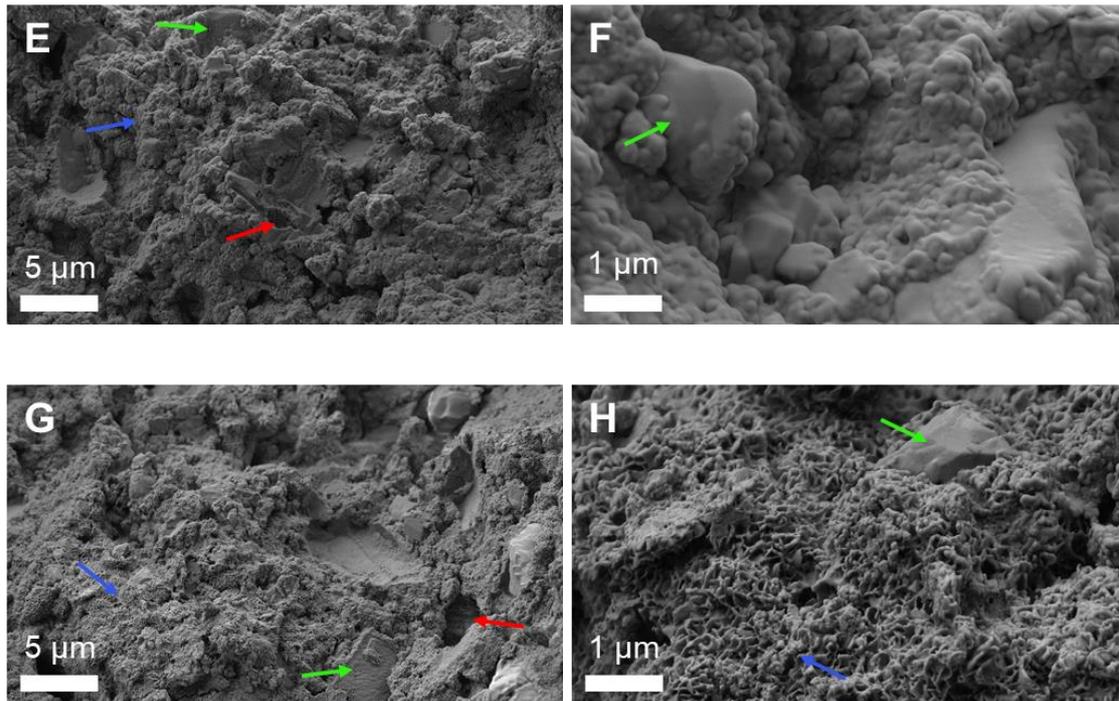


Abbildung 25: REM-Aufnahmen der CaP-Zemente

Die REM-Bilder wurden von Bruchstücken der jeweiligen Zemente aus Druckfestigkeitsuntersuchungen aufgenommen. In allen Aufnahmen zeigen sich Bereiche calciumdefizitären Hydroxylapatits sowie nicht reagierte Bereiche. **A** und **B** zeigen die 5x gemischte CaP-Referenz. **C** und **D** zeigen die 10x gemischte CaP-Referenz. **E** und **F** zeigen den CaP-Zement mit Gentamicin-Zusatz. **G** und **H** zeigen den CaP-Zement mit Vancomycin-Zusatz. Die grünen Pfeile deuten auf glatt erscheinende Areale, die (nicht reagiertem) α -TCP zuzuordnen sind. Die blauen Pfeile deuten auf Calcium-defizitären Hydroxylapatit, welcher sich als nanokristallines Agglomerat darstellt. Die roten Pfeile zeigen Poren innerhalb der Zementmatrix.

4.5 Charakterisierung der Struvit-Zemente

4.5.1 Druckfestigkeitsuntersuchungen

Bei Druckfestigkeitsuntersuchungen an Struvit-Zement mit Vancomycin-Zusatz konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Vancomycingehalt die durchschnittliche Druckfestigkeit abnimmt. Für antibiotikafreien Struvit-Zement betrug die durchschnittliche Druckfestigkeit 88 MPa, mit Vancomycinzusatz innerhalb der flüssigen Phase 45 MPa und für Struvit mit Vancomycinzusatz im Farringtonit-Pulver 30 MPa. In Abbildung 26 werden die Ergebnisse der Druckfestigkeitsmessungen dargestellt. Für jede Gruppe wurden 22 Probekörper untersucht.

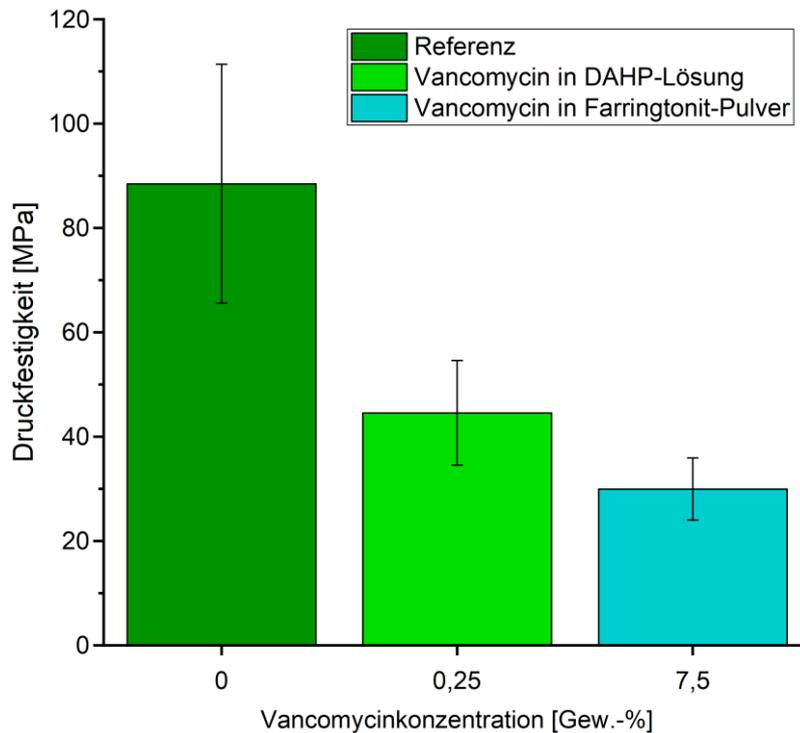


Abbildung 26: Druckfestigkeit Vancomycin-haltiger Struvit-Zemente

Gezeigt sind die durchschnittlichen Druckfestigkeitswerte und deren Standardabweichung von Vancomycin-haltigen Struvit-Zementen. Die Probekörper mit Vancomycin-Zusatz in der Flüssigkeit enthalten ca. 2,5 mg Vancomycin pro 1 g Struvit. Diejenigen Probekörper mit Antibiotikazusatz in Pulver enthalten ca. 75 mg pro 1 g Struvit. Die Masse der Probekörper belief sich auf ca. 0,85 g. Alle Mittelwerte unterscheiden sich bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ signifikant. Die Druckfestigkeiten wurden nach 24 h Aushärtezeit in PBS bei 37 °C gemessen. (n = 22)

4.5.2 XRD-Messungen

Zunächst musste die Phasenreinheit des Ausgangspulvers (Farringtonit) überprüft werden, es wurde hierbei ein zu vernachlässigender Anteil von MgO festgestellt. Weiterhin sollten die gebildeten Hydratationsprodukte aus Farringtonit und DAHP auf den Einfluss der Zugabe von Vancomycin untersucht werden. Dies erfolgte mit denselben drei Ansätzen, die bereits für Druckfestigkeitsuntersuchungen verwendet wurden (antibiotikafreie Struvit-Referenz, Struvit-Zement mit Vancomycin-Zusatz zur DAHP-Lösung, Vancomycin in Pulverform dem Farringtonit zugegeben; nach 24 h Aushärtezeit). Die Struvit-Zemente zeigten charakteristische Peaks für Struvit, Newberyit, Farringtonit und Periklas. Es konnte kein Unterschied der Phasenzusammensetzung der Struvit-Zemente bei Zugabe von Vancomycin gezeigt werden. In Abbildung 27 sind repräsentative XRD-Messergebnisse der verwendeten Struvit-bildenden Zemente, sowie das Farringtonit-Ausgangspulver gezeigt.

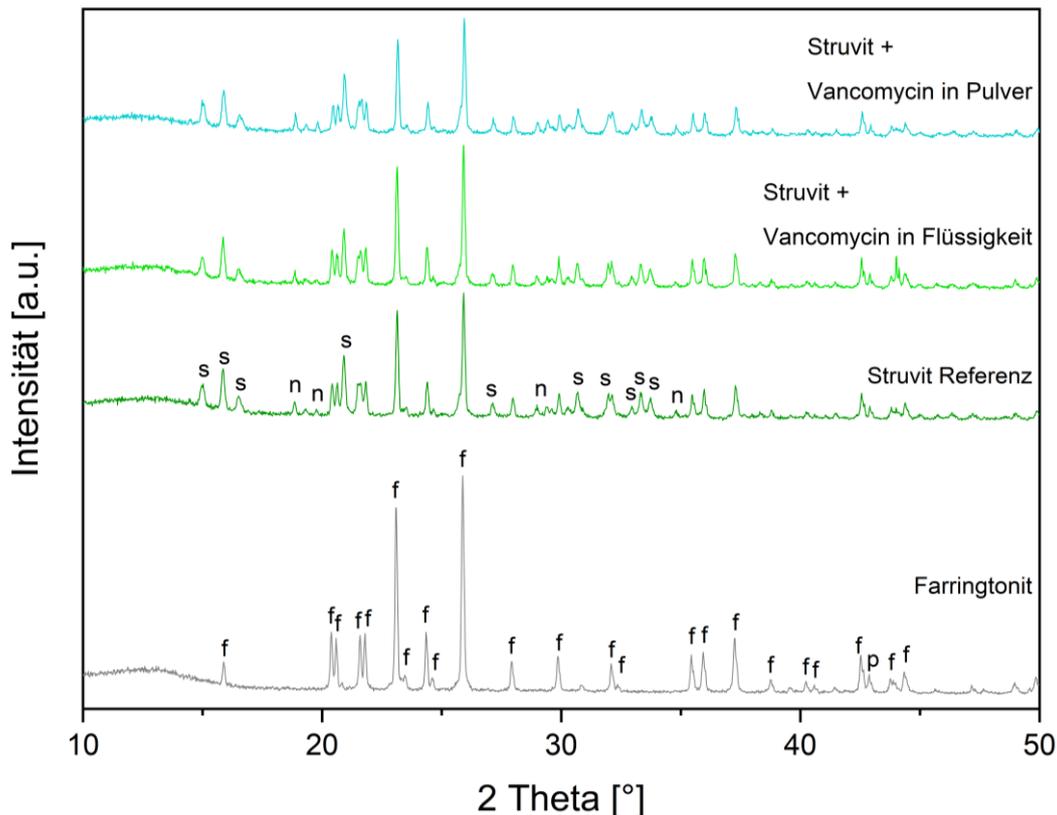


Abbildung 27: XRD von Struvit mit verschiedenen Vancomycin-Konzentrationen

Die qualitative Analyse zeigt phasenreines Ausgangspulver ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$), sowie die Bildung von Struvit und Newberyit in den Struvit-Zement-Probekörper unabhängig des Vancomycinzusatzes. **f** = Farringtonit ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$), **p** = Periklas (MgO), **s** = Struvit ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), **n** = Newberyit ($\text{Mg}(\text{PO}_3\text{OH}) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Freisetzungsverhaltens unterschiedlicher Antibiotika von synthetischen resorbierbaren KEMs, sowie die Charakterisierung des Einflusses der zugesetzten Antibiotika auf verschiedene Materialeigenschaften. Für die verwendeten CaP-KEMs sollte speziell eine Möglichkeit entwickelt werden, die es dem therapierenden Arzt ermöglicht dem KEM eigenständig Antibiotika bei erhöhter Infektionsgefahr oder bereits bestehender Infektion zuzusetzen. Für die Struvit-Zemente lag der Fokus dieser Arbeit auf der Charakterisierung des Freisetzungsverhaltens und der Beeinflussung mechanischer Eigenschaften, da es sich hierbei um relativ neue noch nicht etablierte KEMs handelt und derartige Versuche noch nicht durchgeführt wurden.

5.1 Diskussion der Methode

Die angewandte Methode zur Messung des Freisetzungsverhaltens von Antibiotika von lokalen Wirkstoffträgern wurde in der Literatur in ähnlicher Weise bereits mehrfach beschrieben. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass sich aufgrund unterschiedlicher Versuchsanordnungen ein direkter Vergleich mit anderen Ergebnissen häufig schwierig darstellt. Diese Unterschiede können das Elutionsmedium sowie dessen Volumen, die gewählten Freisetzungintervalle (Zeiträume zwischen Mediumaustausch), den vollständigen oder partiellen Austausch des Elutionsmediums oder die Geometrie der Probekörper betreffen. Die nachfolgende Tabelle 8 zeigt verschiedene Versuchsdesigns ausgewählter Freisetzungsuntersuchungen. In dieser Arbeit erfolgten die Freisetzungsuntersuchungen der KEMs in 5 mL PBS bei 37 °C unter stetiger Bewegung, mit vollständigem Austausch des Elutionsmediums zu festgelegten Zeitpunkten. Der Mediumwechsel wurde am ersten Tag vermehrt durchgeführt, dann erfolgte dieser im 24 h-Intervall und bei den CaP-Zementen nach 14 d im 48 h-Intervall.

Tabelle 8: Übersicht der Versuchsdesigns ausgewählter Freisetzungsuntersuchungen

Quelle	Material des Wirkstoffträgers	Medikament	Freisetzungsbedingungen Elutionsmedium und Volumen	Mediumwechsel	Dauer
Chen <i>et al.</i> [194]	CaP-Zemente	Vancomycin	5 mL PBS bei 37,3 °C	24 h-Intervall; vollständiger Austausch	56 d
Hasegawa <i>et al.</i> [195]	HA porös (gesintert)	Vancomycin Hydrochlorid, Flomoxef Natrium, Isepamicin Sulfat	3 mL PBS bei 37 °C	48 h-Intervall; vollständiger Austausch	42 d
Cabanillas <i>et al.</i> [196]	PMMA-Zement	Gentamicin-Sulfat	250 mL PBS bei 37 °C	partieller Austausch von 3 mL (Zeitpunkte nicht näher genannt)	56 d
Hernandez-Soria <i>et al.</i> [197]	BoneSource™ (HA-bildender Knochenzement)	Tobramycin Vancomycin	5 mL Isotone Kochsalzlösung bei 37 °C	erster Tag vermehrt, dann unregelmäßig in größeren Intervallen; vollständiger Austausch	28 d
Su <i>et al.</i> [198]	biphasisches HA/ α -TCP-Ausgangspulver	Gentamicin-Sulfat	10 mL PBS bei 37 °C	Erster Tag vermehrt, dann 24 h-Intervall; vollständiger Austausch	7 d
Chevalier <i>et al.</i> [199]	CaP-Granulate	Ibuprofen	250 mL PBS bei 37 °C	kontinuierlicher Fluss	45 h

Bezüglich des Versuchsdesigns jeglicher Freisetzungsuntersuchungen muss beachtet werden, dass einzelne Unterschiede durchaus Einfluss auf die gewonnenen Ergebnisse haben. So zeigten Boelch *et al.* [200], dass die freigesetzte Wirkstoffmenge vom Volumen der Elutionslösung abhängt, sowie auch die freigesetzte Gesamtmenge mit dem Volumen der Elutionslösung variieren kann. Zudem ist davon auszugehen, dass auch die Anzahl der Mediumwechselschritte wesentlich Einfluss auf die Geschwindigkeit der Antibiotikafreisetzung nimmt, da nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz die treibende Kraft, die Konzentrationsdifferenz, mit jedem Mediumwechsel vergrößert wird. Der gesteigerte Mediumwechsel zu Beginn der Freisetzungsuntersuchungen zeigt demnach keine physiologische Annäherung, da die Blutflussgeschwindigkeit als relativ konstant angesehen werden muss. Weiterhin können auch Modelle des partiellen Mediumwechsels lediglich als Annäherung angesehen werden. Diese entsprechen zwar rein mechanistisch eher den physiologischen Gegebenheiten des durchbluteten Knochens durch den nachgeahmten Zu- und Abfluss des Blutes, jedoch entspricht dies keinesfalls der physiologischen Situation eines kontinuierlichen Blutflusses. Von McCarthy [21] wurde der Blutfluss innerhalb der Spongiosa mit 20 mL/min/100g Knochen beziffert. Inwiefern dies für den Blutfluss an in situ befindlichem KEM auch zutrifft, bleibt jedoch fraglich.

Der Vorteil der in dieser Arbeit angewandten Methode ist, dass durch den vermehrten Mediumwechsel am ersten Tag der Freisetzungsuntersuchung eine nahezu maximal mögliche freigesetzte Antibiotikamenge angestrebt wurde. Durch den häufigen Mediumwechsel konnte sich kein Gleichgewicht zwischen Desorption und Adsorption einstellen, so sollten mögliche anfängliche Überschreitungen potenziell zytotoxischer Konzentrationen nachgewiesen werden.

Neben dem allgemeinen Versuchsaufbau kann die Detektion der freigesetzten Antibiotikamenge auf unterschiedliche Weise erfolgen. Außer der UV/VIS-Spektrophotometrie sind zur quantitativen Analyse freigesetzter Antibiotika weitere Methoden bekannt. So beschreiben einige Autoren die Möglichkeit mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Fluorometrie, Fluoreszenz-Polarisations Assays (FPIA), antikörperbasierte enzymgekoppelte Nachweisverfahren

(ELISA), Polarografie, Titration, Bioassays und die Kapillarelektrophorese [195, 196, 201]. Einen Vergleich zwischen HPLC und Spektrophotometrie zum Nachweis von Cefuroxim wurde von Vieira und Salgado [201] durchgeführt. Sie konnten nachweisen, dass beide Messmethoden reliable Ergebnisse lieferten. Auch die bei spektrophotometrischen Verfahren unumgängliche Derivatisierung für Gentamicin und dessen Reliabilität wurde in der Literatur vielfach bestätigt. So zeigten Cabanillas *et al.* [196], dass die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen mittels ortho-Phthaldialdehyd (OPA)-Derivatisierung die erwarteten Ergebnisse für die Gentamicinfreisetzung von PMMA-Zementen lieferte. Das Maximum der Absorbanz der Elutionslösungen nach Reaktion mit der Derivatisierungslösung trat in deren Untersuchung, bedingt durch eine andere Zusammensetzung, nach 30 min auf. In der hier vorliegenden Untersuchung wurde die Reaktionszeit von 45 min zwischen Elutionslösung und Derivatisierungslösung in einem eigenen Versuchsansatz bestätigt (Ergebnis siehe Abbildung 6). Hierbei konnte zudem festgestellt werden, dass eine Unter- oder Überschreitung der Reaktionszeit von 15 min in einer Verminderung der ermittelten Gentamicinmenge von lediglich 0,5 % resultiert und somit als noch tolerabel angesehen werden konnte.

Die wesentlichen Vorteile der UV/VIS-Spektroskopie zur Messung von Konzentrationen sind die einfache Handhabung und die Tatsache, dass es eine relativ kostengünstige sowie schnelle Möglichkeit für quantitative Messungen ist. Außerdem kann die minimal detektierbare Konzentration als ausreichend gering angesehen werden. Diese lag für nahezu alle untersuchten Antibiotika bei 0,001 mg/mL, lediglich für Gentamicin lag diese mit 0,005 mg/mL höher. Diese Konzentrationen entsprechen meist der MHK der Antibiotika gegenüber einiger Bakterienspezies. Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei Detektion des Antibiotikums auch eine antibakterielle Wirkung zu erwarten ist. Die zunächst für das Spektrophotometer zu stark konzentrierten Lösungen waren erst nach einer Verdünnung detektierbar.

Grundsätzlich muss zunächst für jegliche Konzentrationsmessung eine Kalibriergleichung ermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Erstellung

dieser mindesten sechs verschiedene Konzentrationen, mit jeweils fünf Wiederholungen gemessen. Die Mindestanzahl der unterschiedlichen Konzentrationen ist in Einklang mit der DIN 38402 – A51. Jedoch wurde der Abstand der unterschiedlichen Konzentrationen nicht immer äquidistant gewählt, sondern teilweise mit unterschiedlichen geometrischen Reihen kombiniert. Die anschließende lineare Anpassung zeigte stets einen Determinationskoeffizienten von $R^2 \geq 0,99$, was für die Versuche dieser Arbeit als ausreichend erachtet wurde.

Weiterhin wurden unterschiedliche Antibiotika-Beladungsmethoden angewandt. Den Zementen kann prinzipiell vor dem Mischvorgang das Antibiotikum der flüssigen oder der festen Phase zugeführt werden. Beide Methoden werden in der Literatur beschrieben: So wurde von Hernandez-Soria *et al.* [197] die Beladung des CaP-Knochenzements BoneSource™ mit den Antibiotika Vancomycin und Tobramycin über Vermischung der Pulver und das Abbinden durch Zugabe von Kochsalzlösung durchgeführt. Die andere Methode wurde bspw. von Su *et al.* [198] an Gentamicin-haltigen CaP-Zementen beschrieben. Die Gentamicin-Lösungen wurden zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen angefertigt und anschließend mit dem Zement-Ausgangspulver vermischt.

Während der hier durchgeführten Versuche konnte bei CaP-Zementen das Antibiotikum nur als Lösung zugeführt werden, da ohne eine wässrige Phase die Abbindereaktion und somit die Probekörperherstellung nicht möglich gewesen wäre. Hinzu kommt, dass durch die Darreichungsform des CaP-Zements als Paste in einer Spritze ein reproduzierbarer Mischvorgang mit Antibiotika in Pulverform nicht umsetzbar war. Jedoch wurden bei dem untersuchten Struvit-bildenden Zement beide Antibiotika-Beladungsmethoden untersucht. So wurde Vancomycin einerseits in Pulverform dem Farringtonit-Ausgangspulver, andererseits als Lösung der DAHP-Lösung zugegeben.

Für die Zemente im Speziellen gibt es weitere Einflussfaktoren des jeweiligen Freisetzungsverhaltens. So spielt bspw. die Abbindezeit nach dem Anmischen eine entscheidende Rolle, da bei noch nicht abgeschlossenem Abbindeprozess davon auszugehen ist, dass sich die Porengröße noch verkleinert. Demnach würde auch die Gesamtoberfläche des Probekörpers kleiner werden, was die

Diffusion herabsetzt und die Freisetzung verlangsamt [202]. Weiterhin nimmt auch der Gesamtgehalt des zugesetzten Antibiotikums je Probekörper Einfluss auf das Freisetzungsverhalten, da auch nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz die Ausgangskonzentration vergrößert wird und demnach die treibende Kraft der Diffusion vergrößert wird.

Bei bereits abgebundenen bzw. vorgefertigten Probekörpern (hier CaP-Scaffolds) werden für die Antibiotikabeladung ebenfalls unterschiedliche Methoden beschrieben. Häufig ist dies durch einfaches Eintauchen in eine Antibiotikallösung oder über zusätzliche Anwendung eines Unterdrucks beschrieben.

Beide Methoden wurden von Faigle *et al.* [203] an unterschiedlichen keramischen Granulaten (u.a. bestehend aus β -TCP o. HA) miteinander verglichen. Ein Unterdruck von 50 mbar wurde über 5 min aufrechterhalten, wobei die Granulate anschließend noch über 10 min bei Normaldruck belassen wurden. Die Methode der Beladung durch einfaches Eintauchen erfolgte in 2 mL einer Vancomycinlösung mit einer Konzentration von 50 mg/mL bzw. 5 mg/mL über einen Zeitraum von 10 min. Im Gegensatz zu der hier durchgeführten Untersuchung wurden die Granulate nach der Antibiotikabeladung für 96 h im Trockenschrank bei 50 °C getrocknet. Es zeigte sich, dass durch die Vakuum-Beladung eine größere Gesamtbeladung aller untersuchter Granulate festzustellen war, gleiches gilt für die höhere Konzentration der Beladungslösung. Weiterhin zeigten sie, dass auch der pH-Wert des Elutionsmediums Einfluss auf das Freisetzungsverhalten nehmen kann. Es wurde dabei eine schnellere Freisetzung von Vancomycin bei pH = 5 (im Vergleich mit pH = 7,4) festgestellt.

Die Antibiotikabeladung über eine Unterdruckmethode wurde auch von Hasegawa *et al.* [195] beschrieben. Die Beladung erfolgte an porösen, gesinterten HA-Probekörpern u.a. mit Vancomycin durch Erzeugen eines Unterdrucks von 500 mmHg (ca. 666 mbar) über 10 min.

Hingegen wurde von Che Nor Zarida *et al.* [204] die Beladung der hergestellten CaP-Probekörper durch Eintauchen in die Antibiotikallösung, über einen Zeitraum von 24 h, durchgeführt. Ein wesentlicher Unterschied zu den hier durchgeführten Untersuchungen ist die Tatsache, dass die Antibiotikallösungen (Tobramycin und

Gentamicin), mit 0,12 und 0,05 mg/mL, bedeutend geringer konzentriert vorlagen (hier Gentamicin 40 mg/mL).

Bei Parent *et al.* [65] erfolgte die Beladung von mikroporösen (40 – 200 nm) HA-Probekörpern in 10 mL einer 50 mg/mL konzentrierten Vancomycinlösung. Wobei über den Zeitraum von 1 min eine Vakuumpumpe angeschlossen wurde.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit hat sich jedoch, vor dem Hintergrund der Etablierung einer unmittelbar prä- bis intraoperativen, situationsabhängigen Antibiotikabeladung von KEMs, die Beladungsdauer von 1 h als klinisch umsetzbar erwiesen. Die Scaffolds wurden direkt nach dem Ende der Beladungsdauer in das Elutionsmedium überführt, was der klinischen Situation (Einbringen eines KEM in das OP-Gebiet) entspricht. Auf diese Weise haftete stets etwas Antibiotikallösung der dreidimensionalen Gitterstruktur an, was die Messergebnisse geringfügig verändern konnte. Allerdings ist die hier angewandte Methode der klinischen Praxis nachgeahmt. Die zuvor beschriebenen relativ techniksensitiven Beladungsmethoden, wie die Anwendung eines Vakuums während, oder die Trocknung der Probekörper nach der eigentlichen Antibiotikabeladung, ließen sich vor dem genannten Hintergrund der Zielsetzung nicht umsetzen.

Die hier aufgeführten, teils großen methodischen Unterschiede der Freisetzungsforschungen, machen den quantitativen Vergleich der Ergebnisse schwierig. Dennoch lassen sich für die unterschiedlichen Antibiotika allgemeine Freisetzungseigenschaften ableiten.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Kombination antibakterieller Wirkstoffe mit Knochenersatzmaterialien, sollte die Eigenschaften der alleinigen Trägersubstanz nicht wesentlich beeinflussen. Demnach sollten insbesondere die mechanischen Eigenschaften den klinischen Anforderungen der KEMs entsprechen. Zudem musste gewährleistet sein, dass die Handhabung des KEM durch den Antibiotikazusatz nicht nachteilig beeinflusst wurde. Genauer sollte die Verarbeitungszeit ausreichend dimensioniert sein. Detaillierte Untersuchungen hierzu wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, jedoch konnte während der Probekörperherstellung keine wesentliche Beeinträchtigung der Verarbeitungszeit festgestellt werden. Ebenso musste die Wirkung des Medikaments durch die Inkorporation in eine Trägersubstanz, nach deren Freisetzung, fortbestehen. Dies wurde für die Antibiotika Gentamicin und Vancomycin durch den Agardiffusionstest überprüft. Die Freisetzungskinetik sollte für lokal eingesetzte Antibiotika zunächst bakterizide Wirkung, später zumindest bakteriostatische zeigen, jedoch nie eine für Osteoblasten und andere Zellen toxische Schwelle überschreiten.

5.2.1 Freisetzungsuntersuchungen

Mit den Freisetzungsuntersuchungen dieser Arbeit konnte zunächst für alle untersuchten Materialien und Antibiotika gezeigt werden, dass eine Beladung sowie die anschließende Wirkstofffreisetzung grundsätzlich möglich und mit der hier vorgestellten Methode quantitativ erfassbar war. Zwischen den verschiedenen Knochenersatzmaterialien und Antibiotika ließen sich jedoch auch einige Unterschiede feststellen. Allgemein wurde initial stets eine erhöhte Freisetzungsrate („burst release“) beobachtet. Dies kann auf die Fick'schen Diffusionsgesetze zurückgeführt werden. Demnach ist der Konzentrationsunterschied zwischen Träger- und Elutionsmedium die treibende Kraft der Freisetzung [205]. Bei den Freisetzungsuntersuchungen der CaP-Scaffolds im Speziellen wird das Ausmaß des „burst release“ auch durch die oberflächlich anhaftende Antibiotikallösung an der Scaffold-Struktur beeinflusst. Auf diese Weise wird sich diese zusätzliche Antibiotikamenge im ersten Freisetzungsschritt unmittelbar in der Elutionslösung

verteilen. Ein Trocknungsprozess nach der Beladung würde diese schnelle Freisetzung verringern, darauf wurde jedoch aufgrund der Zielsetzung einer möglichst einfachen klinischen Umsetzbarkeit verzichtet. Daneben beeinflussen die Freisetzungskinetik u.a. die Bindungsmodalität zwischen der Trägersubstanz und dem Antibiotikum, die Löslichkeit und Hydrophilie des Antibiotikums, das Elutionsmedium und die Porosität der verwendeten Trägersubstanz.

CaP-Scaffolds

Die Adsorption von Antibiotika an Scaffold-Oberflächen konnte durch den Versuchsaufbau so variiert werden, dass sich die maximal freigesetzte Antibiotikamenge sowie die Dauer des Freisetzungsintervalls beeinflussen lies. So konnte am Beispiel von Vancomycin gezeigt werden, dass durch eine verlängerte Beladungsdauer der Scaffolds die Gesamtbeladung mit dem Antibiotikum zunimmt. Die absolute Beladung verhielt sich jedoch nicht proportional zur Dauer der Beladung, sondern näherte sich einem Maximum an. So war bei einer um den Faktor 3 verlängerten Beladungsdauer (von 24 h auf 3 d) die absolute Beladung nur um durchschnittlich 6 % erhöht. Genauer wurden nach 24 h ca. 40 % und nach 3 d ca. 46 % der Vancomycin-Beladungslösung vom Scaffold aufgenommen. Diese Annäherung an ein Maximum kann damit begründet werden, dass sich bei Beladung an der Oberfläche ein Gleichgewicht zwischen Adsorption und Desorption einstellt. Dies entspricht allgemein einer Sättigungskinetik, da mit zunehmender Antibiotikabeladung der Scaffold-Oberfläche die Adsorption zunehmend unwahrscheinlicher erscheint und im Gegenzug die Desorption wahrscheinlicher wird [206].

Auch Parent *et al.* [65] zeigten an gesinterten HA-Scaffolds den Einfluss der Beladungsdauer auf die gesamte Vancomycin-Adsorption. Daneben wurde in deren Untersuchung der Einfluss der Konzentration der Beladungslösung auf die absolute Vancomycin-Adsorption dargestellt. Es zeigte sich einerseits mit zunehmender Beladungsdauer, andererseits mit zunehmender Konzentration der Beladungslösung, eine vergrößerte Gesamtbeladung. In der Veröffentlichung wurden hiervon REM-Aufnahmen gezeigt, die zudem verdeutlichen, dass Vancomycin keinen Monolayer auf den Scaffolds bildet, sondern bei entsprechender Konzentration und Beladungsdauer an der Oberfläche akkumuliert. Weiterhin erwähnen

diese, dass Vancomycin durch die Abnahme der Porosität nach erfolgter Antibiotikabeladung auch innerhalb der Poren verbleibt und diese verkleinert.

Auch Chai *et al.* [66] konnten in ihren Untersuchungen feststellen, dass bei Vergleich der Beladung von mikroporösen (2 – 5 μm) und dichten HA-Probekörpern, durch die vielfach höhere Beladungsmenge der mikroporösen Proben eine Adsorption der Antibiotika innerhalb der Poren erfolgte und dies wesentlich zur absoluten Beladung beitrug.

In der hier vorliegenden Untersuchung wurde für die Scaffolds lediglich die Abhängigkeit der Beladungsdauer von der maximal freigesetzten und demnach maximal adsorbierten Antibiotikamenge von Vancomycin (1 h, 24 h und 72 h) und Gentamicin (1 h und 24 h) untersucht.

Die freigesetzten Antibiotikamengen der Vancomycin-Untersuchung ergaben für die initiale Freisetzung (nach jeweils 30 min) des Vancomycins bei 1 h Beladungsdauer ca. 50 %, bei 24 h ca. 33 % und bei 3 d ca. 26 % der absoluten Beladung. Jedoch war nach 24 h für alle drei Ansätze das Verhältnis der zeitlich freigesetzten Antibiotikamenge zur beladenen Vancomycinmasse mit ca. 99,9 % identisch. Somit verlief die initiale prozentuale Freisetzung bei geringerer Gesamtbeladung mit Vancomycin schneller. Jedoch war festzustellen, dass die absolute Freisetzung nach 30 min für alle drei Ansätze mit unterschiedlicher Beladungsdauer eine ähnliche Größenordnung (9,9 – 13,6 mg) annahm. Lediglich der Anteil an der Gesamtbeladung ist unterschiedlich, was die großen prozentualen Unterschiede initial bedingt. Das trotz unterschiedlich großer Beladung gleichbleibende Freisetzungsintervall der drei Versuchsansätze lässt sich damit erklären, dass bei erhöhter Beladung nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz der Massenfluss zunimmt, da der Konzentrationsgradient langsamer abnimmt. Innerhalb der einzelnen Wechselschritte wurde bei den stärker beladenen Scaffolds auch mehr Antibiotikum freigesetzt. Die nach 30 min in allen drei Versuchsansätzen nahezu identische Menge an freigesetztem Antibiotikum könnte damit erklärt werden, dass initial die treibende Kraft durch den Konzentrationsgradienten bei allen Ansätzen maximal und somit identisch war, da von einer Akkumulation des Antibiotikums an der Oberfläche ausgegangen wird. Die verschieden große treibende Kraft der Diffusion würde demnach erst im weiteren Verlauf der

Freisetzungsuntersuchung bei längeren Freisetzungsintervallen bzw. nach mehreren Wechselschritten, zu tragen kommen. Außerdem könnte zu anfangs ähnlich freigesetzten Vancomycinmengen auch die stets zurückbleibende Beladungslösung innerhalb der Gitterstruktur der Scaffolds beitragen.

Für Gentamicin betrug die Gesamtbeladung nach 24 h Beladungsdauer 15 mg, nach 1 h lediglich 8,5 – 9,3 mg. Bei Betrachtung der prozentualen Freisetzung dieser zwei Ansätze lag diese nach 30 min bei 70 % (24 h) sowie 62 % (1 h); nach 24 h bei 98 % (24 h) bzw. bei 94 % (1 h). Die absoluten Werte der Freisetzung betragen nach 30 min 10,5 mg (24 h) und 5,7 mg (1 h). Hier zeigten sich Unterschiede im Freisetzungsverhalten der untersuchten Antibiotika Vancomycin und Gentamicin. So war bei Gentamicinbeladung ebenso eine erhöhte Gesamtbeladung der Scaffolds sowie eine prolongierte Freisetzung mit längerer Beladungsdauer (1 h: 2 – 4 d, 24 h: 10 d) festzustellen. Jedoch wurden bei 1 h Beladungsdauer initial etwa 50 % der Gentamicinmenge (absolute Werte) der 24 h-Beladung freigesetzt, während bei Vancomycin im initialen Freisetzungsschritt nahezu identische Mengen freigesetzt wurden. Dieser Unterschied der beiden Antibiotika könnte durch die unterschiedliche Molekülgröße, bzw. auch durch die höher konzentrierte Beladungslösung des Vancomycins (Vancomycin 100 mg; Gentamicin 80 mg), bedingt sein. So kann angenommen werden, dass die Beladung der äußeren Oberfläche mit Gentamicin bei einer Beladungsdauer von 1 h geringer ist als nach 24 h und Gentamicin (noch) nicht an der Oberfläche akkumuliert. Dies könnte die geringere initiale treibende Kraft der Diffusion nach nur 1 h Beladungsdauer erklären.

Weiterhin sollten Unterschiede im Freisetzungsverhalten von noch „unbehandelten“ und „behandelten“ (oberflächlich hydrophileren) Scaffolds untersucht werden, wobei letztere den handelsüblichen Scaffolds entsprechen. Hierfür wurden die Scaffolds für 1 h mit Vancomycin beladen. Es konnte gezeigt werden, dass unbehandelte Scaffolds eine geringere absolute Antibiotikamenge aufnehmen und das Freisetzungsintervall (noch) kürzer ist, als bei den behandelten Scaffolds. Ursächlich kann hierfür die fehlende Auslagerung der unbehandelten Scaffolds in isotoner NaCl-Lösung sein, wodurch sich die Scaffold-Oberfläche etwas hydrophober darstellt. Hierdurch reduzierte sich die Adsorption der Antibiotika an

den Scaffolds. So wurde von unbehandelten Scaffolds durchschnittlich 9,8 mg Vancomycin aufgenommen, von den behandelten hingegen durchschnittlich 13,6 mg. Auch in diesem Versuchsansatz setzten sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Scaffolds über den ersten Auslagerungszeitraum eine vergleichbare Größenordnung der Vancomycinmenge frei. Jedoch liegen diese bei Betrachtung der absoluten Freisetzungsmenge bei etwa der Hälfte von vorausgegangenen Untersuchungen (Einfluss Beladungsdauer). Dies zeigt, dass trotz identischer Versuchsdurchführung, geringe Schwankungen der absolut freigesetzten Antibiotikamengen zwischen einzelnen Versuchsreihen zu verzeichnen sind, was für die klinische Anwendung eine durchaus interessante Erkenntnis sein kann.

Interessant ist auch, dass das gesamte Freisetzungsintervall der behandelten Scaffolds bei 120 h (5 d) liegt, wohingegen bei vorausgehenden Untersuchungen mit 1 h Beladungsdauer die Vancomycinfreisetzung lediglich über 72 h bzw. 3 d messbar war. Als Ursache kann hierfür die um durchschnittlich 6,5 mg ($\pm 6,5\%$) geringere maximale Antibiotikabeladung im Versuch der behandelten/unbehandelten Scaffolds angenommen werden. Durch die geringere treibende Diffusionskraft nach dem Fick'schen Diffusionsgesetz wäre somit ein verlängertes Freisetzungsintervall erklärbar. Bezüglich der maximal aufgenommenen Antibiotikamenge sollte eine methodenabhängige Variabilität berücksichtigt werden. So musste bei Freisetzungsversuchen mit Vancomycin die Beladungslösung stets eigens konstituiert werden, wobei geringgradige Abweichungen durch das Pipettieren denkbar wären. Ebenso ist anzunehmen, dass die Menge der Antibiotikafreisetzung innerhalb der Gitterstruktur gewissen Schwankungen unterliegt.

Auch die Beobachtungen bei der 24 h-Beladung von Scaffolds mit Gentamicin, Cefuroxim, Clindamycin und Ciprofloxacin zeigten durchaus Unterschiede bei der prozentual aufgenommenen Antibiotikamenge und der allgemeinen Freisetzungsscharakteristik. Die untersuchten Antibiotika Gentamicin, Cefuroxim und Clindamycin zeigten ähnliche Freisetzungsscharakteristika. Ihr Freisetzungsintervall erstreckte sich über 10 d, danach war kein Antibiotikum mehr messbar. Die prozentual aus der Beladungslösung aufgenommene Antibiotikamenge betrug

für Gentamicin 19 %, für Cefuroxim 13 % und für Clindamycin 15 % und war demnach für diese Antibiotika innerhalb derselben Größenordnung einzuordnen.

Betrachtet man die prozentuale Freisetzung so ergaben sich durchaus Unterschiede zwischen den untersuchten Antibiotika. Nach 30 min wurden von Scaffolds mit Gentamicin ca. 70 %, mit Cefuroxim ca. 89 % und mit Clindamycin ca. 53 % freigesetzt. Nach 24 h wurde bei Gentamicin 98 %, bei Cefuroxim 99 %, bei Clindamycin 84 % der beladenen Wirkstoffmenge freigesetzt.

Obwohl die Löslichkeit von Clindamycin mit 200 – 300 mg/mL größer ist als diejenige von Gentamicin und Cefuroxim, ist das Ergebnis überraschend, da die Freisetzung bei Vergleich mit den anderen Antibiotika verlangsamt abläuft. Hier kann von einer verstärkten Wechselwirkung zwischen dem als Prodrug vorliegenden Clindamycin-Phosphat und dem Hydroxylapatit ausgegangen werden. Eine derartige Wechselwirkung konnte auch von Vukomanović *et al.* [207] an Poly-lactid-co-glycolid (PLGA)/Hydroxylapatit-Nanopartikeln festgestellt werden. Hierbei wurden sowohl Clindamycin als auch Clindamycin-Phosphat den Nanopartikeln zugefügt, wobei sie zeigten, dass sich Clindamycin-Phosphat auf der HA-Oberfläche ablagert und das Clindamycin in PLGA dispergiert vorliegt.

Eine Erklärung für den stark ausgeprägten „burst release“ des Cefuroxims kann die etwas bessere Löslichkeit im Vergleich mit Gentamicin sein [181, 182]. Eine weitere mögliche Erklärung der schneller ablaufenden Freisetzung kann auch die negative Ladung des Cefuroxims sein. Für HA wird eine geringe negative Ladung (Zeta-Potential) angenommen [208], demnach kann dies zu Abstoßungsreaktionen führen, die eine schnellere Desorption bedingen. Hinzu kommt, dass Gentamicin im wässrigen Milieu positiv geladen vorliegt, was auch die etwas verlangsamte Desorption begründen könnte.

Die Beladung der Scaffolds mit dem schwerlöslichen Ciprofloxacin (Löslichkeit in Wasser bei pH = 7: 0,001 mg/mL [182]) zeigte eine stark verlangsamt ablaufende Freisetzung, was auf die geringe Löslichkeit zurückzuführen war. Die Freisetzung betrug hierbei nach 1 h etwa 29 % und nach 24 h etwa 76 % der erfassten kumulativ freigesetzten Ciprofloxacinmenge. Die absolute Beladung unterlag jedoch relativ starken Schwankungen (5,8 – 8,6 mg bzw. 14,5 – 21,5 %), da es während des Beladungsprozesses zur Überschreitung des Löslichkeitsproduktes

kam und eine Ausfällung von Ciprofloxacin-Kristallen auf der Scaffold-Oberfläche beobachtet wurde. Diese Ausfällung innerhalb der Beladungslösung nach Entnahme des Scaffolds ist im Anhang in Abbildung 30 gezeigt. Trotz der im Vergleich zu den anderen untersuchten Antibiotika, relativ langsamen Freisetzung erwies sich Ciprofloxacin bei der hier beschriebenen Beladungsform als ungeeignet, da es während des Beladungsprozesses zu der beschriebenen makroskopischen Ausfällung kam.

Allgemein ist festzustellen, dass die Freisetzungsuntersuchungen von CaP-Scaffolds für alle untersuchten Antibiotika eine besonders ausgeprägte initiale Freisetzung zeigten. Diese Eigenschaft ist für die Freisetzung von Medikamenten aus Scaffolds (bzw. vorgefertigten Probekörpern) bekannt [107]. Es kann einerseits durch die relativ große Oberfläche sowie durch die Beladungsmethode, die lediglich in einer Adsorption an der Oberfläche resultiert und demnach eine relativ kurze Diffusionsstrecke nach sich zieht, bedingt sein. Zudem verbleibt durch die hier angewandte Methode etwas Beladungslösung innerhalb der Scaffold-Makrostruktur, wodurch stets etwas Antibiotikallösung direkt in die erste Auslagerungslösung bzw. stets etwas Auslagerungslösung in die jeweils Nächste überführt wird.

Die Freisetzung des Vancomycins konnte unabhängig von der Beladungsdauer nur über 3 – 5 d gemessen werden. Auch bei Untersuchungen von Chai *et al.* [66] wurde die Freisetzungsdauer von 3 d an porösen HA-Probekörpern nicht überschritten.

Unter diesem Aspekt sind Gentamicin, Clindamycin und Cefuroxim (bei 24 h Beladungsdauer) dem Vancomycin überlegen. Jedoch ist bei diesen Antibiotika die Gefahr des Überschreitens von zytotoxischen Antibiotikakonzentrationen gegeben. Die Gegenüberstellung der maximal in einem Freisetzungsintervall abgegebenen Antibiotikakonzentration (nach 30 min bzw. 1. Mediumwechselschritt und 2 h bzw. 3. Mediumwechselschritt) mit aus der Literatur bekannten zytotoxischen Konzentrationen für Osteoblasten wird nachfolgend in Tabelle 9 dargestellt. Es zeigte sich, dass die zytotoxischen Konzentrationen im ersten Freisetzungsintervall nach 30 min von allen (bei 24 h Beladungsdauer) untersuchten Antibiotika außer Vancomycin überschritten wurden. Jedoch erwies

sich Vancomycin wie bereits erwähnt aufgrund des sehr kurzen Freisetzungintervalls für eine effiziente antimikrobielle Therapie als unvorteilhaft. Für Gentamicin und Cefuroxim zeigte sich die Überschreitung der toxischen Konzentrationen nur im ersten Freisetzungintervall, für Clindamycin bis zum 3. Mediumwechselschritt. Die toxische Konzentration für Ciprofloxacin wurden erst nach 12 Mediumwechselschritten (120 h) unterschritten, weshalb sich das Antibiotikum auch unter diesem Gesichtspunkt als eher ungeeignet erweist.

Tabelle 9: Vergleich zytotoxischer Antibiotikakonzentrationen für Osteoblasten mit den von Scaffolds während eines Zeitintervalls freigesetzten Konzentrationen

Antibiotikum	Freigesetzte Antibiotikakonzentration		Zytotoxische Konzentration (Osteoblasten)
	nach 0,5 h	nach 2 h	
Gentamicin	2,10 mg/mL	0,16 mg/mL	1,7 mg/mL [152]
Cefuroxim	1,22 mg/mL	0,02 mg/mL	1,0 mg/mL [157]
Ciprofloxacin	0,20 mg/mL	0,14 mg/mL	0,04 mg/mL [164]
Clindamycin	4,91 mg/mL	0,45 mg/mL	0,5 mg/mL [170]
Vancomycin	2,73 mg/mL	2,21 mg/mL	>5 mg/mL [152, 179]

Es kann jedoch angenommen werden, dass durch die relativ kurze Überschreitung potenziell zytotoxischer Antibiotikakonzentrationen in vivo keinerlei weitreichende Knochenheilungsbeeinträchtigungen provoziert werden, da durch den stetigen Blutfluss, sowie Wundflüssigkeiten eine raschere Verteilung der Antibiotika anzunehmen ist. Die Übertragung der hier erhaltenen in vitro Ergebnisse sollte daher unter Vorbehalt auf die in vivo Situation erfolgen. Bei den über 1 h beladenen Scaffolds wurden die zytotoxischen Grenzwerte generell nicht überschritten, jedoch erstreckten sich die Freisetzungintervalle in diesem Ansatz über maximal 4 d (Gentamicin) bzw. maximal 5 d (Vancomycin).

Prolongierte Freisetzungintervalle werden in der Literatur häufig durch Beschichtungen der antibiotikabeladenen KEMs mit Biopolymeren erzeugt. Auf diese Weise ist häufig auch eine Verringerung des „burst release“ zu beobachten. So beschrieben Hornyák *et al.* [209] die verlängerte Antibiotikafreisetzung von

lyophilisiertem allogenen Knochen durch Beschichtung mit Alginat. Eine derartige Beschichtung wäre zwar für die hier beschriebenen Scaffolds durchaus denkbar, jedoch würde sich diese Methode im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit als zu zeitintensiv darstellen.

Hingegen war es im Rahmen dieser Arbeit möglich durch Beeinflussung der Löslichkeit des Vancomycins selbst das Freisetzungsintervall zu verlängern und den „burst release“ etwas zu vermindern. Dies erfolgte als orientierender Versuch an einem einzigen Scaffold durch die Umwandlung des an der Zementoberfläche adsorbierten Vancomycins in seine schwerlösliche Base. Die Umsetzung erfolgte durch kurzes Eintauchen des Scaffolds nach Ende der Beladungsdauer (1 h) in eine 1%ige Natriumcarbonatlösung (pH-Wert ~11). Hierbei konnte der „burst release“ verringert und die gesamte Freisetzungsdauer um ein Vielfaches (ca. 2 – 3x) verlängert werden.

Die Gesamtbeladung von 12 mg Vancomycin nach 1 h lag in diesem Experiment im Bereich der zuvor beobachteten Beladungsmenge der behandelten Scaffolds (ca. 14 mg). Jedoch lag der Wert deutlich unterhalb der Beladungsmenge im Vergleich zu dem Versuch mit der Variation der Beladungsdauer (ca. 20 mg). Der Unterschied der Gesamtbeladung kann wie bereits beschrieben durch die anhaftende Antibiotikallösung methodisch bedingten Schwankungen unterliegen. Zudem könnte das zusätzliche Eintauchen in die Na_2CO_3 -Lösung die anhaftende Beladungslösung „abwaschen“ und so zusätzlich zu einem verringerten „burst release“ beitragen. Das verlängerte Freisetzungsintervall kann demnach auch durch die geringere Anfangsbeladung des mit Na_2CO_3 behandelten Probekörpers erklärt werden. Durch den geringer ausgeprägten Konzentrationsgradienten resultiert ein verminderter Massenfluss, was eine langsamer ablaufende Freisetzung nach sich zieht. Bei den zuvor durchgeführten Untersuchungen unterschied sich die durchschnittliche Beladung mit 20 mg (1 h Beladungsdauer, Versuch Variation der Beladungsdauer) und 14 mg (behandelter Scaffold bei Vergleich behandelte und unbehandelte Scaffolds) um eine Differenz von 6 mg. Dies resultierte in einer verlängerten Freisetzungsdauer von 48 h bzw. 2 Wechselschritten bei den mit 14 mg beladenen Scaffolds. Aber auch diese Beobachtung kann teilweise vernachlässigt werden, da sich bspw. bei den 1 h beladenen Gentamicin-

Scaffolds eine Variation der Freisetzungsdauer von 2 Wechselschritten innerhalb einer Versuchsreihe zeigte. So kann neben dem Einfluss der geringeren Gesamtbeladung, das um 12 Wechselschritte verlängerte Freisetzungsintervall hauptsächlich auf eine verminderte Vancomycinlöslichkeit zurückzuführen sein. Zur Streuung der Beladungsmenge, wie sie bei vorausgehenden Versuchen der Scaffolds festzustellen war, kann hier keine Angabe gemacht werden, da die Untersuchung an nur einem Probekörper erfolgte und dies lediglich erste Rückschlüsse auf die Beeinflussung des Freisetzungsverhaltens geben sollte. Weiterhin wurde im Rahmen des Agardiffusionstests gezeigt, dass die antibakterielle Wirksamkeit von Vancomycin durch Behandlung mit Na_2CO_3 -Lösung gegeben ist. Ähnliche Untersuchungen zu Vancomycin wurden nach eigenen Recherchen in der Literatur nicht beschrieben.

Allgemein ist jedoch das Prinzip der Modifikation der Löslichkeit für die verzögerte Freisetzung von Antibiotika insbesondere für Gentamicin vielfach beschrieben worden. Für Freisetzungsuntersuchungen an unterschiedlichen lokalen Wirkstoffträgern wurde anstelle von Gentamicin-Sulfat das schwerlöslichere Gentamicin-Crobofat verwendet und so eine verzögerte Freisetzung des Antibiotikums beobachtet [210, 211]. Ebenso kombinierten Obermeier *et al.* [212] Gentamicin mit unterschiedlichen Fettsäuren, wodurch die Hydrophilie herabgesetzt wurde und somit eine prolongierte Freisetzungskinetik im wässrigen Milieu beobachtet wurde.

CaP-Zement

An CaP-Zement-Probekörpern wurden Freisetzungsuntersuchungen mit den Antibiotika Vancomycin und Gentamicin durchgeführt. Im Vergleich mit den Scaffolds wurde ein verlängertes Freisetzungsintervall sowie eine verminderte initiale Freisetzung erwartet, da die Wirkstoffe in der Zement-Matrix eingebettet vorliegen. Daraus resultiert im Vergleich mit den oberflächlich beladenen Scaffolds eine längere Diffusionsstrecke. Jedoch wird auch bei den CaP-Zementen eine Adsorption angenommen und keine Interkalation zwischen Antibiotikum und Zementbestandteilen [127]. Die Freisetzung wird allgemein von der Interaktion zwischen Antibiotikum, Zementoberfläche und Elutionsmedium beeinflusst.

Die durchschnittliche Gesamtbeladung eines CaP-Probekörpers belief sich bei Vancomycin auf 6 mg und bei Gentamicin auf 4,8 mg. Dies ist auf die unterschiedlich konzentrierten Ausgangslösungen zurückzuführen. Insgesamt konnten die Freisetzungsuntersuchungen über einen Zeitraum von 34 d beobachtet werden. Über den gesamten Zeitraum zeigte die Freisetzung aus antibiotikahaltigen CaP-Zement-Probekörpern keine Überschreitung der aus der Literatur bekannten toxischen Konzentrationen für Osteoblasten (vgl. Tabelle 9). So lag die freigesetzte Antibiotikakonzentration je Wechselschritt stets unter 0,1 mg/mL für Gentamicin-Probekörper und unterhalb von 0,16 mg/mL für Vancomycin-Probekörper. Die prozentual freigesetzte Antibiotikamenge von Vancomycin lag nach 1 h bei 5 – 6 % sowie nach 24 h bei 23 – 24 %, von Gentamicin nach 1 h bei 6 – 9 % und nach 24 h bei 18 – 31 %.

Während die Vancomycin-Probekörper nach 34 d (5x und 10x gemischt) die gesamte aufgenommene Antibiotikamenge freisetzten, wurden von den mit Gentamicin beladenen 5x gemischten Probekörpern durchschnittlich ca. 70 % des zugegebenen Gentamicins und von 10x gemischten Proben lediglich ca. 50 % freigesetzt. Allerdings war die Bestimmung des Restgehalts an Gentamicin durch die alkalische pH-Abhängigkeit der Derivatisierungsreaktion nicht möglich, was die zusätzliche Bestätigung dieser Daten verhinderte. Nach 34 d lag die Freisetzungsrate von Gentamicin (in 48 h-Intervall) bei 0,04 mg/mL (5x) bzw. 0,007 mg/mL (10x) und trug demnach nur unwesentlich zur Gesamtfreisetzung bei. Aufgrund dieser Tatsache war keine relevante Gentamicinfreisetzung mehr zu erwarten.

Durch Anpassung der Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen mit dem Korsmeyer-Peppas Modell kann das mechanistische Freisetzungsverhalten relativ gut beschrieben werden. In diesem Modell erfolgt die Zuordnung des Freisetzungsmechanismus nach dem Exponenten „n“ in Abhängigkeit der Probekörpergeometrie. Diese wird lediglich für zylinderförmige, sphärische und scheibenförmige Geometrien beschrieben. In der eigenen Arbeit wurden für die Freisetzungsuntersuchungen, wie für Druckfestigkeitsuntersuchungen quaderförmige Probekörper verwendet. Die Zuordnung erfolgte nach den Angaben der zylinderförmigen Geometrie, da dies als der beste Kompromiss angesehen wurde.

Für CaP-Zemente wird eine Freisetzung über Diffusion angenommen, da die Degradation um ein Vielfaches langsamer abläuft als das beobachtete Freisetzungintervall. Nach Anwendung des Modells auf die Freisetzungsergebnisse der CaP-Probekörper ergab sich für Vancomycin $n = 0,46$ (für 10x und 5x gemischte Ansätze). Dies legte die Freisetzung nach der Fick'schen Diffusion nahe. Für Gentamicin ergab sich $n = 0,31$ (5x) und $n = 0,29$ (10x), sodass die Freisetzung ebenso über Diffusion erfolgte.

Bei Betrachtung der Gentamicin-Ergebnisse ist deutlich erkennbar, dass ein wesentlicher Unterschied zwischen den 5x und 10x gemischten Probekörpern besteht. Ursächlich hierfür könnten die Unterschiede der Porosität zwischen 5x und 10x gemischten Probekörpern sein.

Die offene Porosität der CaP-Zemente wurde eigens mittels Hg-Porosimetrie (vor erfolgter Freisetzung) bestimmt und lag durchschnittlich zwischen 29 und 37 %. Wobei bei der 5x gemischten Referenz die Porengrößenverteilung von den 10x gemischten Proben erkennbar abwich. Bei den 5x gemischten Proben zeigte sich der Anteil der Poren im Bereich von 1 – 10 μm im Vergleich zu allen 10x gemischten Proben vergrößert, wobei bei 10x gemischten Proben der Bereich zwischen 0,1 – 1 μm dominierte. Dieser Unterschied zwischen 5x und 10x gemischten Probekörpern, könnte die verlangsamte Freisetzung der 10x gemischten Gentamicin-Probekörper erklären, da hier mehr Poren von geringerem Durchmesser vorlagen. Auch Canal *et al.* [202] führten Freisetzungsuntersuchungen mit CaP-Zementen durch, wobei sie den Zusammenhang verkleinerter Porengröße mit einer verlangsamten Freisetzung begründeten. Die Ergebnisse von Chai *et al.* [66] an vorgefertigten CaP-Probekörpern könnten ebenso auf diese Ergebnisse übertragen werden. Sie stellten dar, dass sich das Freisetzungintervall mikroporöser Probekörper prolongierter zeigte als das makroporöser.

Des Weiteren zeigte sich bei Vergleich der unterschiedlichen Mischzyklenanzahl unabhängig des Antibiotikums für 10x gemischte Probekörper eine geringere Standardabweichung bei der Antibiotikafreisetzung als dies bei 5x gemischten Proben der Fall war. Dies könnte auf eine homogenere Durchmischung zurückzuführen sein.

Die allgemein langsamere und unvollständige Freisetzung des Gentamicins im Vergleich mit Vancomycin-Proben kann durch eine relativ starke Bindung des Gentamicins mit Bestandteilen des CaP-Zements erklärt werden. Gentamicin liegt ebenso wie Vancomycin im wässrigen Milieu positiv geladen vor. Durch die deutlich geringere molare Masse von Gentamicin (0,478 kg/mol) im Vergleich zu Vancomycin (1,449 kg/mol), kann sich die positive Ladung über ein kleineres Molekül verteilen und demnach eine stärkere elektrostatische Bindung zum Wirkstoffträger verursachen. Auch Singh *et al.* [213] konnten an unterschiedlich geladenen Kollagenmembranen die prolongierte Freisetzung des Gentamicins bei zunehmender negativer Ladung der Kollagenseitenketten feststellen, was die Abhängigkeit von der Ladung des Trägermaterials verdeutlicht. Im Falle des hier verwendeten CaP-Zements wäre eine Interaktion mit dem in der Zementpaste enthaltenen Tensid Hexadecylphosphat denkbar. Zu dieser Annahme kamen auch Vorndran *et al.* [119] bei Freisetzungsuntersuchungen mit identisch zusammengesetzter Zementpaste, da auch in ihren Untersuchungen die Freisetzung des Gentamicins deutlich langsamer ablief als die des Vancomycins.

Die Tatsache, dass nach Angaben der Literatur Gentamicin mit $\log P = -4,22$ [214] etwas hydrophiler ist als Vancomycin ($\log P = -3,1$ [127]) und demnach erwartungsgemäß die Kraft des wässrigen Elutionsmediums (PBS) auf die Gentamicinfreisetzung verstärkt wirken sollte, würde letztlich dazu führen, dass Gentamicin schneller und/oder vermehrt freigesetzt wird. Denkbar wäre jedoch im Hinblick auf die Solvatationstendenz der Antibiotika auch, dass durch die verminderte Hydrophilie des Vancomycin sich dieses bevorzugt an das Miglyol (= Ölphase) anlagert und durch den allmählichen Austausch von Öl und Wasser während der Auslagerung sich zunehmend im Elutionsmedium anreichert.

Neben der Möglichkeit einer starken elektrostatischen Interaktion des Gentamicins mit Komponenten innerhalb der Zementmatrix, könnte aufgrund der geringen Molekülgröße auch ein Teil des Gentamicins ohne jeglichen Lösungsmittelkontakt (hier PBS) von der Zementmatrix vollständig eingeschlossen vorliegen. Möglicherweise trägt auch die größere Molekülgröße des Vancomycins durch stetiges Herausdiffundieren des Antibiotikums zur allmählichen Zunahme der Permeabilität des Zements bei. So könnte das Elutionsmedium stetig tiefer in den

Probekörper eindringen und vermehrt Vancomycin desorbieren. Dieser Effekt wäre bei der geringeren Molekülgröße des Gentamicins deutlich schwächer ausgeprägt. Folglich scheint der Herstellungsprozesses bei Vancomycin-Probekörpern (5x vs. 10x) weniger Einfluss auf die Freisetzungskinetik zu nehmen, da sich die anfängliche Porengrößenverteilung und die Gesamtporosität mit zunehmender Freisetzung allmählich verändert. Für Gentamicin muss dagegen angenommen werden, dass der Antibiotika-Restgehalt erst mit dem Abbau der Trägersubstanz freigesetzt wird. Um diesen Zusammenhang zu verifizieren, wäre rückblickend die Porositätsmessung nach Abschluss der Freisetzungsuntersuchung interessant gewesen.

Agardiffusionstest

Der mit den Freisetzungsuntersuchungen von Gentamicin und Vancomycin kombinierte Hemmhofstest zeigte, dass die freigesetzte Antibiotikamenge nach dem 24 h Auslagerungsschritt (in PBS) noch antibakteriell gegenüber *S. aureus* wirkte. Durch Ausbleiben eines Hemmhofes bei der Elutionslösung von antibiotikafreien Zement-Probekörper konnte keine durch Bestandteile der Zementpaste ausgelöste antibakterielle Wirkung nachgewiesen werden. Allgemein wiesen die Scaffolds unabhängig des Antibiotikums geringere Hemmhofgrößen auf als die Zement-Probekörper. Aus vorausgegangenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Scaffolds bereits innerhalb des ersten Tages ca. 99 % der aufgenommenen Antibiotikamenge (Vancomycin und Gentamicin) freisetzen. So lag die im 48 h-Intervall freigesetzte Antibiotikamenge stets unterhalb derjenigen des 24 h-Intervalls. Hingegen zeigte sich bei den Zement-Probekörpern nach 24 h lediglich eine Freisetzung von ca. 25 % des Antibiotikagesamtgehaltes. Im darauffolgenden 48 h-Intervall war aufgrund der verlängerten Freisetzungsdauer (von 16 h auf 24 h) bei den Vancomycin-haltigen Probekörpern ein Anstieg der freigesetzten Antibiotikamenge, bei Gentamicin-haltigen Probekörpern ein geringer Abfall (nahezu gleichbleibend) zu beobachten.

Der etwas größere Hemmhof bei den Gentamicin-beladenen Zement-Probekörpern lässt sich wahrscheinlich auf die erhöhte Sensibilität des verwendeten Bakteriums gegenüber dem Antibiotikum zurückführen (Gentamicin $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ und Vancomycin $1 \mu\text{g/mL}$), da beide Probekörper 24 h nach der Auslagerung

ähnliche Werte der freigesetzten Antibiotikakonzentration aufwiesen. Der Größenunterschied des Hemmhofes spiegelt jedoch nicht exakt die Unterschiede der Sensibilität wider (gegenüber Gentamicin um Faktor 2 sensibler). Dies könnte damit begründet werden, dass die Gentamicinfreisetzung aus den CaP-Zementen langsamer abläuft als für Vancomycin. Zudem ließ sich in den Freisetzungsdigrammen der CaP-Zemente (Abbildung 16 und Abbildung 17) für Gentamicin zwischen dem 24 h- und 48 h-Intervall eine Verringerung der freigesetzten Antibiotikamenge beobachten, wohingegen in demselben Intervall für Vancomycin ein Anstieg der freigesetzten Antibiotikamenge festzustellen war.

Der relativ größere Hemmhof bei Vancomycin-Scaffolds im Vergleich mit den Gentamicin-Scaffolds könnte mit dem prolongierten Freisetzungszeitraum des Vancomycins von Scaffolds erklärt werden. Dies wurde bereits bei vorausgegangenen Freisetzungsuntersuchungen festgestellt, demnach wird angenommen, dass Vancomycin durch die verminderte Löslichkeit weniger schnell desorbiert. Weiterhin kann auch die größere Gesamtbeladung der Vancomycin-Scaffolds nach 1 h Beladungsdauer für die noch relativ hohen Antibiotikakonzentrationen nach 24 h ursächlich sein. Bei Betrachtung des 24 h-Wertes bei der Versuchsreihe des Agar-Diffusionstests zeigte sich für die Scaffolds mit Gentamicin-Beladung eine durchschnittliche Freisetzung von ca. 0,08 mg, bei Vancomycin hingegen ca. 0,9 mg. Zusätzlich könnte bei der Übertragung der Scaffolds auf die Agar-Platten die oberflächlich anhaftende PBS-Antibiotikallösung einen gewissen Beitrag zur Hemmhofgröße haben (da nach 24 h um Faktor 10 mehr Vancomycin in PBS gelöst als Gentamicin). In diesem Fall wäre auch die um den Faktor 2 größere Sensibilität gegenüber Gentamicin zu vernachlässigen.

Struvit-Zement

Während der Freisetzungsuntersuchungen konnte bei Struvit-Zementen insgesamt eine schnellere Abnahme der Freisetzungsrates im Vergleich zu den untersuchten CaP-Zementen beobachtet werden. Prinzipiell wurden zwei unterschiedliche Beladungsmethoden angewandt: der Zusatz von Vancomycin zu dem Farringtonit-Ausgangspulver in Pulverform oder in Lösung zu der DAHP-Lösung. Durch die Zugabe des Vancomycins zu dem Ausgangspulver war generell eine größere absolute Antibiotikabeladung möglich (150 mg Vancomycin in Pulver

versus 5 mg Vancomycin in Lösung). In diesem Zusammenhang konnte zudem festgestellt werden, dass die Auflösung des Vancomycins innerhalb der 3,5 M DAHP-Lösung sogar bei Erhitzung nicht möglich war. Es musste zunächst die Vancomycin-Lösung, wie vom Hersteller beschrieben, mit Wasser als 50 mg/mL konzentrierte Lösung hergestellt werden, um diese dann mit der DAHP-Lösung zu vermischen. So war bei Freisetzungsuntersuchungen bei Proben mit 5 mg Vancomycin nach einem Beobachtungszeitraum von 4 d, bei Proben mit 150 mg nach 11 d die Antibiotikafreisetzung mittels UV/VIS-Spektrophotometrie nicht mehr detektierbar. Die initiale Freisetzung (nach 1 h) lag bei den mit 5 mg Vancomycin beladenen Struvit-Zement-Probekörpern bei ca. 8 %, bei den mit 150 mg beladenen Probekörpern bei ca. 8,7 %. Über den gesamten Beobachtungszeitraum wurde von Struvit-Probekörpern, unabhängig der Beladungsmenge, lediglich ca. 28 % der zugegebenen Antibiotikamenge freigesetzt.

Es sollte zunächst beachtet werden, dass die Geometrie der Struvit-Probekörper bei den Freisetzungsuntersuchungen im Gegensatz zu den CaP-Zementen eine andere war. Die äußere Oberfläche kann für die zylinderförmigen Probekörper (Struvit) mit ca. 683 mm² angenommen werden, wobei die äußere Oberfläche der Quader (CaP-Zement Probekörpern) ca. 360 mm² beträgt. Demnach wäre aufgrund der größeren äußeren Oberfläche des Zylinders eine schnellere Freisetzungsrates und/oder größere Gesamtfreisetzung zu erwarten. Die schnellere Freisetzungsrates konnte initial ansatzweise beobachtet werden (nach 1 h ca. 8 % freigesetzt vs. 5 – 6 % bei CaP-Zement). Jedoch zeigte sich auch nach Anwendung des Korsmeyer-Peppas Modells auf die Ergebnisse (bei 150 mg Vancomygingehalt) ein Exponent von $n = 0,18$. Es kann auch hier von einer diffusionsgesteuerten Freisetzung ausgegangen werden. Diese läuft jedoch wesentlich langsamer ab als bei den CaP-Zementen dieser Untersuchung. In vivo könnte jedoch eine schnellere Degradationsrate der Struvit-Zemente die Freisetzungsrates beeinflussen [94, 103]. Zudem kann auch durch die bessere Löslichkeit davon ausgegangen werden. Für die geringere Freisetzungsrates könnte die relativ große Kristallit-Größe ursächlich sein (HA < 50 nm; Struvit > 250 nm [103, 215]). Diese könnten die relativ großen Vancomycin-Moleküle bei

der Diffusion einschränken oder sogar vollständig einschließen und so zur inkompletten Freisetzung beitragen.

Zudem konnte in der Literatur gezeigt werden, dass die Gesamtporosität von Struvit-bildenden Zementen deutlich unterhalb derjenigen von CaP-Zementen einzuordnen ist. Von Kanter *et al.* [103] wird demnach eine durchschnittliche Porosität von 5 – 7 % für Struvit-Zemente (mit PLR 2,0 – 3,0 g/mL) beschrieben. Eine ähnliche Größenordnung der Gesamtporosität (ca. 15 %) zeigten Gelli *et al.* [216] für Struvit-bildende Zemente bei Verwendung von 3,5 M DAHP-Lösung und einem PLR von 2,0. Es deutete sich in deren Untersuchung allgemein auch der Trend zur abnehmenden Porosität bei zunehmendem PLR an. Die geringe Porosität kann ebenso einen Einschluss des Vancomycin hervorrufen. Weiterhin ist festzustellen, dass für Struvit sogar bei den mit 150 mg beladenen Probekörpern lokal toxische Konzentrationen für Osteoblasten nicht überschritten wurden (für Vancomycin mit > 5 mg/mL angegeben [152, 179]).

5.2.2 Materialcharakterisierung

CaP-Zement

Bei den untersuchten CaP-Zementen lassen sich bezüglich der Druckfestigkeit zwischen den 10x gemischten Probekörpern bei unterschiedlichem Antibiotikazusatz keine signifikanten Unterschiede feststellen. Jedoch zeigte sich für Gentamicin-haltige Zemente eine angedeutet erhöhte Druckfestigkeit, sowie für Vancomycin eine etwas geringere Druckfestigkeit im Vergleich mit der antibiotikafreien Referenz. Auch die durchschnittliche Druckfestigkeit der 5x gemischten Referenz lag unterhalb der 10x gemischten CaP-Proben. Die durchschnittlichen Druckfestigkeiten der CaP-Zemente dieser Arbeit lagen in einem Bereich von 4 – 6,7 MPa. Dies ist allgemein für CaP-Zemente relativ gering.

So beschrieben Ginebra *et al.* [91] bei HA-bildenden CaP-Zementen Druckfestigkeiten von ca. 38 MPa nach 15 d Auslagerung in Ringer-Lösung, nach 8 h lag die Druckfestigkeit in deren Untersuchungen bei ca. 20 MPa.

Yamamoto *et al.* [217] beschrieben für HA-bildende zylinderförmige Probekörper nach 7 d Auslagerung in pseudo-extrazellulärer Flüssigkeit Druckfestigkeitswerte von ca. 60 MPa je nach Zusammensetzung der Ausgangspulver.

Jedoch muss beachtet werden, dass es sich bei dem verwendeten CaP-Zement der hier vorliegenden Untersuchung um eine ölbasierte CaP-Paste handelt. Die Aushärtung dieses Zements erfolgt dabei durch den allmählichen Austausch des Öles mit Wasser. Untersuchungen derselben CaP-Paste wurden von Heinemann *et al.* [185] durchgeführt. Die Herstellung dieser Probekörper für Druckfestigkeitsuntersuchungen erfolgte durch Einfüllen der Zementpaste in Metallformen (12 x 6 x 6 mm), diese wurden zur primären Aushärtung für 24 h in 0,9% NaCl-Lösung gelagert. Danach erfolgte die Auslagerung der einzelnen Formkörper ebenfalls in 0,9%iger NaCl-Lösung (5 mL/1g CaP-Zement). Die erste Messung der Druckfestigkeit erfolgte bereits nach 7 h Auslagerung. Dabei lag die Druckfestigkeit bei durchschnittlich 3,67 MPa. Nach 96 h der Inkubation konnte die maximale Druckfestigkeit von 44,78 MPa erreicht werden. So kann angenommen werden, dass auch ein Anstieg der Druckfestigkeit der Probekörper der hier vorliegenden Arbeit nach Auslagerung in wässrigem Medium zu beobachten ist.

Die hier erhaltenen Druckfestigkeitswerte sollten etwaige Unterschiede durch den Mischvorgang sowie den Antibiotikazusatz aufzeigen. Eine angedeutet erhöhte Druckfestigkeit ist bei Gentamicin-Zusatz erkennbar. Dies ist konsistent mit Beobachtungen in der Literatur, die auf die Sulfat-Ionen des als Gentamicin-Sulfat vorliegenden Antibiotikums zurückzuführen sind.

So beschrieben Bohner *et al.* [218] in Untersuchungen an Dicalciumphosphat-Dihydrat-bildenden (DCPD) Zementen eine erhöhte Druckfestigkeit bei Zugabe von Gentamicin. Als Ursache wird die durch Sulfat-Ionen beeinflusste Mikrostruktur des DCPD diskutiert. Demnach sollen Calciumsulfat-Kristalle als Keimbildner dienen und dichtere DCPD-Kristalle hervorbringen. Dies resultiert folglich in einer geringeren Porosität.

Ähnliches zeigten Su *et al.* [198] für den Zusatz von Gentamicin-Sulfat in biphasischen CaP-Zement (HA und α -TCP). Sie konnten in REM-Aufnahmen kleinere HA-Kristalle beobachten. Als Ursache kommen demnach zwei Möglichkeiten in Betracht, zum einen, dass Gentamicin als Fremdstoff im Kristallisationsprozess das Kristallwachstum sterisch inhibiert, zum anderen, dass die Sulfat-Ionen als Keimbildner fungieren, während α -TCP hydratisiert vorliegt.

Hingegen zeigten Joosten *et al.* [219] an HA bildenden Zementen durch die Zugabe verschiedener Gentamicin-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede der Druckfestigkeit bei Vergleich mit antibiotikafreiem Zement.

Für Vancomycin-Zusatz beschrieben Sugo *et al.* [220], dass die Antibiotikazugabe in CaP-Zement-Prüfkörper in einer deutlichen Abnahme der Druckfestigkeit resultiert. Ebenso erhielten sie bei Zusatz von Gentamicin-Sulfat ähnliche Werte für die Druckfestigkeit wie ohne Antibiotikazusatz.

Eine Abnahme der Druckfestigkeit von CaP-Zementen mit zunehmendem Zusatz von Vancomycin wurde von Chen *et al.* [194] beschrieben. Sie begründeten dies mit Veränderungen der Mikrostruktur, was sich in REM-Bildern als Lücken zwischen den Kristallen darstellte (erhöhte Porosität).

Unterschiede in der Mikrostruktur sind in den REM-Aufnahmen dieser Arbeit nur bedingt erkennbar. Insbesondere eine offensichtlich erhöhte Porosität konnte nicht festgestellt werden. Lediglich die Zemente mit Vancomycin-Zusatz stellten

sich bei vergrößerter Darstellung etwas feinkristalliner dar. Es ist jedoch anzunehmen, dass es sich aufnahmebedingt um ein Artefakt handelt. Mögliche Ursachen hierfür könnten ein geringfügig besseres Vakuum während der Aufnahme, Variationen der Sputterschicht oder eine makellose Bruchfläche des Probekörpers sein.

Die allgemeine Zusammensetzung der Reaktionsprodukte aus „INNOTERE Paste-CPC“ zeigt in den hier durchgeführten Untersuchungen keinen Unterschied bei XRD-Messungen. Für die Zugabe von Gentamicin könnte aufgrund der Sulfat-Ionen des als Gentamicin-Sulfat vorliegenden Antibiotikums die Entstehung von Calciumsulfat erwartet werden. Jedoch war dies in den durchgeführten XRD-Messungen nicht zu bestätigen. Auch Bohner *et al.* [121] beschrieben, dass an Untersuchungen von DCPD-bildendem Zement mit Zusatz von Gentamicin, keine Calciumsulfat-Phase in XRD-Messungen nachgewiesen werden konnte.

Auch die durch Hg-Porosimetrie ermittelte offene Porosität zeigte in der hier vorliegenden Arbeit bei Zusatz von Antibiotika keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit antibiotikafreien Probekörpern. Geringfügige Differenzen der Gesamtporosität sind jedoch erkennbar, so zeigten die CaP-Zemente mit Antibiotikazusatz eine etwas erhöhte Gesamtporosität auf: bei Gentamicin-Zusatz durchschnittlich $36,6 \pm 0,7$ %, bei Vancomycin-Zusatz $35,2 \pm 7,0$ %, ohne Antibiotikum $32,1 \pm 2,7$ % (10x gemischt) und $28,9 \pm 15,1$ % (5x gemischt).

Allgemein wurde die Porosität für CaP-Zemente von Ginebra *et al.* [6] mit 30 – 50 % angegeben. Bei Ishikawa und Asaoka [221] betrug die Porosität abhängig des Pulver-Flüssigkeitsverhältnisses und der Druckausübung während des Aushärtprozesses etwa 30 – 57 %. Somit zeigen sich hinsichtlich der Druckfestigkeit keine wesentlichen Abweichungen zu den aus der Literatur bekannten Werten für CaP-Zemente.

Auch ein Zusammenhang zwischen der Porengrößenverteilung und dem Freisetzungsverhalten war erkennbar, da innerhalb der Gentamicin-haltigen CaP-Zemente ein Unterschied zwischen 5x und 10x gemischten Probekörpern bestand. Hinzu kommt, dass für die Gesamtporosität der 5x gemischten Proben eine

deutlich größere Standardabweichung vorlag, als dies bei den 10x gemischten Proben der Fall war. Dies lässt darauf schließen, dass die 5x gemischten Probekörper größeren strukturellen Schwankungen unterliegen.

Weiterhin sollte beachtet werden, dass die Porosität und die Druckfestigkeit miteinander korrelieren [89]. Bei der Gesamtporosität zeigte keine Probekörper-Gruppe signifikante Unterschiede auf, bei der Druckfestigkeit gab es jedoch Unterschiede zwischen der 5x gemischten Referenz und derjenigen mit Zusatz von Gentamicin. Dies lässt darauf schließen, dass die tendenziell erhöhte Druckfestigkeit der Gentamicin-Probe nicht auf eine verringerte offene Porosität, sondern vielmehr auf eine veränderte Mikrostruktur (auch geschlossene Porosität), wie zuvor bereits beschrieben, zurückzuführen ist.

Von Takechi *et al.* [222] wird eine Zunahme der Gesamtporosität für CaP-Zemente (Tetracalciumphosphat und Dicalciumphosphat) mit zunehmendem Antibiotikagehalt (Flomoxef-Natrium) angegeben. Zudem konnte von ihnen auch ein Zusammenhang zwischen abnehmender Druckfestigkeit und zunehmendem Antibiotikagehalt angegeben werden. Derartige Zusammenhänge sind mit den Ergebnissen dieser Arbeit nur ansatzweise für den Zusatz von Vancomycin erkennbar. Die absolute Antibiotikabeladung wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit nicht verändert, wodurch derartige Folgerungen aus den Ergebnissen nicht geschlossen werden können.

Struvit-Zement

Für Struvit-Zemente konnten durch die Beladung mit Vancomycin bei XRD-Untersuchungen keine Unterschiede innerhalb der kristallinen Struktur nachgewiesen werden. Bei Untersuchung des Einflusses der Vancomycinbeladung auf die Druckfestigkeit wurden jedoch signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt. Die antibiotikafreie Referenz erreichte durchschnittlich 88 MPa, diejenige Gruppe mit geringerem Anteil an Vancomycin als Zusatz innerhalb einer Lösung zur DAHP-Lösung 45 MPa und bei noch größerem Vancomycinzusatz in Pulverform wurden 30 MPa erreicht.

Die verminderte Druckfestigkeit der Struvit-Probekörper mit Antibiotikazusatz innerhalb der DAHP-Lösung kann auf den um 20 % verminderten DAHP-Gehalt der Lösung zurückgeführt werden. Daraus lässt sich schließen, dass der

gebildete Zement weniger Struvit-Phasen enthält und demnach eine geringere Druckfestigkeit aufweist. Der Zusatz von Vancomycin als Zugabe zum MgP-Pulver kann ebenso auf den um 10 % verminderten Anteil des Farringtonit-Ausgangspulvers zurückgeführt werden, was folglich das eigentliche Pulver-Flüssigkeitsverhältnis herabsetzt. Die signifikant geringere Druckfestigkeit könnte allerdings auch durch eine vergrößerte Porosität bzw. veränderte Mikrostruktur aufgrund des Antibiotikazusatzes erklärt werden.

Gelli *et al.* [223] beschrieben die Abnahme der Struvit-Phasen bei geringer konzentrierten DAHP-Lösungen. Weiterhin konnte eine Abnahme der Porosität mit zunehmendem PLR festgestellt werden. In welchem Ausmaß nun eine erhöhte Porosität oder ein geringerer Anteil von gebildeten Struvit-Phasen die Druckfestigkeit negativ beeinflusst, lässt sich durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht feststellen. Die Abnahme der Druckfestigkeiten kann jedoch bei Vergleich mit anderer Knochenersatzmaterialien etwas relativiert werden, da mittlere Werte von 30 – 45 MPa mit Antibiotikazusatz als relativ hoch angesehen werden. So werden für CaP-Zemente ohne Antibiotikazusatz durchschnittlich 30 – 50 MPa angegeben [6].

5.3 Klinische Relevanz

Die Kombination von Antibiotika und Knochenersatzmaterialien findet seine Anwendung als adjuvante Maßnahme zur systemischen Antibiose in der septischen Knochenchirurgie. Die in dieser Arbeit untersuchten Kombinationen können sich unter den hier betrachteten Aspekten in der klinischen Anwendung als erfolgversprechend erweisen.

Gemäß der Zielsetzung dieser Arbeit zeigte sich für CaP-Scaffolds bei einfachem Eintauchen in verschiedene Antibiotikallösungen die Adsorption einer ausreichend große Antibiotikamenge. Lediglich Ciprofloxacin erwies sich aufgrund der Überschreitung der Löslichkeit durch den Beladungsvorgang für diese Form der lokalen Antibiotikatherapie als klinisch ungeeignet. Für die Freisetzungsuntersuchungen nach 24 h Beladungsdauer musste jedoch berücksichtigt werden, dass die Antibiotika Ciprofloxacin, Cefuroxim, Clindamycin und Gentamicin initial sehr hohe, für Osteoblasten potenziell toxische Konzentrationen freisetzen. Hier

sollte allgemein beachtet werden, dass in vivo durch den stetigen Blutfluss eine größere Verteilung des freigesetzten Antibiotikums anzunehmen ist, was diesen Aspekt relativiert und demnach die Knochenheilung kaum beeinflussen sollte. So besteht in vivo jedoch auch die Möglichkeit der Entstehung systemischer Nebenwirkungen bei lokaler Antibiotikatherapie [224]. Bei entsprechender Anamnese konnte dies bei älteren Patienten besonders an dafür sensiblen Organen beobachtet werden [225]. Lediglich für Vancomycin wurden keine toxischen Konzentrationen während der Freisetzung beobachtet, weshalb es sich unter diesem Gesichtspunkt als besonders geeignet erwies.

Generell ist eine Beladungsdauer von 24 h klinisch relativ schwierig umzusetzen, weshalb Untersuchungen mit nur 1 h Beladungsdauer für Gentamicin und Vancomycin durchgeführt wurden. Hierbei lag auch die Gentamicinfreisetzung stets unterhalb der angegebenen zytotoxischen Konzentration. Jedoch konnte bei beiden Antibiotika eine für therapeutische Zwecke zu kurze Freisetzungsdauer beobachtet werden. Allerdings relativiert sich dieser Aspekt, da bei septischer Knochenchirurgie die lokale Antibiotikatherapie stets als adjuvanter Ansatz zur systemischen Gabe erfolgen sollte. Zudem wurde für Vancomycin und Gentamicin (1 h Beladungsdauer) sogar nach 24 h Freisetzungsdauer eine antibakterielle Wirkung im Agardiffusionstest gegenüber *S. aureus* nachgewiesen. Diese Beobachtung lässt die lokale Antibiose mit CaP-Scaffolds als adjuvante Therapie sinnvoll erscheinen.

Ein erster Erfolg zur Problemlösung des relativ kurzen Freisetzungintervalls bei nur 1 h Beladungsdauer zeigte sich mit der Vancomycinbeladung und anschließender Na₂CO₃-Tauchbad-Behandlung. Hierbei lag die zu beobachtende Freisetzungsdauer bei 16 d, was auch für therapeutische Ansätze ausreichend sein sollte. Die Beeinflussung der Löslichkeit von Vancomycin ist zudem ein klinisch umsetzbarer Ansatz. Jedoch müssten bis zur endgültigen klinischen Umsetzbarkeit noch Folgeuntersuchungen mit größerer Stichprobenanzahl durchgeführt werden.

An CaP-Zementen konnte für Vancomycin eine vollständige Freisetzung der zugegebenen Antibiotikamenge festgestellt werden, was unabhängig von der Mischzyklenanzahl zu beobachten war. Die vollständige Freisetzung erfolgte

über einen Zeitraum von 34 d. Auch die Druckfestigkeit zeigte sich im Vergleich zur antibiotikafreien Referenz nicht signifikant vermindert. Bei Zusatz mit Gentamicin war zum einen eine unvollständige Freisetzung zu erkennen, zum anderen deutete sich eine Abhängigkeit des Freisetzungsverhaltens vom Herstellungsprozess an. Die unvollständige Freisetzung des Gentamicinzusatzes während des Beobachtungszeitraums kann aus mikrobiologischer Sicht für die klinische Anwendung eher nachteilig sein, da die prolongierte Freisetzung geringer Antibiotikakonzentrationen zur bakteriellen Resistenzbildung beitragen kann. Diese Beobachtung wurde bereits für PMMA-Zemente beschrieben. Jedoch sollte auch hierbei berücksichtigt werden, dass über einen relativ langen Zeitraum Konzentrationen oberhalb der MHK (sensibler Bakterienspezies) abgegeben werden. Dadurch kann angenommen werden, dass derart alle lokal ansässigen Bakterien abgetötet werden. Ebenso ist auch durch die Abbaubarkeit der CaP-Zemente die Antibiotikafreisetzung, anders als bei PMMA-Zementen, einer gewissen Limitation unterzogen.

Zudem zeigen sich für Gentamicin die angedeuteten verbesserten Ergebnisse der Druckfestigkeitsuntersuchung als vorteilhaft. Abschließend ist festzustellen, dass eine Mischzyklenanzahl von 10 zu präferieren ist, da hieraus bessere mechanische Eigenschaften resultierten und bei der Porositätsmessung die Standardabweichung geringer ausgeprägt war. Bezüglich der unterschiedlichen Antibiotika zeigt sich der Vancomycinzusatz aufgrund der vollständigen Freisetzung vorteilhafter, wobei auch die Resistenzen-provozierende Wirkung des Gentamicinzusatzes innerhalb eines degradierbaren KEM als gering einzustufen ist und die freigesetzten Konzentrationen während des gesamten Freisetzungsintervalls oberhalb der MHK für *S. aureus* lagen.

Die Untersuchungen an Stuvit-Zementen sollten erste Hinweise auf deren Freisetzungverhalten geben. Es zeigte sich eine schnellere Abnahme der Freisetzungsrates im Vergleich mit den CaP-Zementen, was mit der unvollständigen Freisetzung von nahezu 30 % der absoluten Antibiotikamenge erklärt werden kann. Die vergleichsweise geringe Porosität und größeren Kristallite der Struvit-Zemente haben vergrößerte Diffusionsstrecken bzw. vollständige physikalische Einschlüsse der Medikamente ohne Kontakt zum Elutionsmedium zur Folge. Somit

wäre eine fortschreitende Freisetzung erst mit allmählicher Resorption der Trägersubstanz zu erwarten. Die im Vergleich zu CaP-Zementen hohe Druckfestigkeit und die aus der Literatur bekannte schnellere Abbaurate lassen Struvit-Zemente als KEM sowie als Wirkstoffträger für Antibiotika vielversprechend erscheinen. Die inkomplette Freisetzung verlängert in vivo durch allmähliche Degradation des Trägermaterials die Gesamtfreisetzungsdauer. Jedoch ist diese durch die gute Abbaubarkeit zeitlich begrenzt. Auch die Freisetzung des Antibiotikums oberhalb der MHK in einem umschriebenen Kompartiment sollte eigentlich zu einer vollständigen Bakterienelimination führen, sodass die vielfach diskutierte Resistenzen-provozierende Wirkung prolongierter Antibiotikafreisetzung vernachlässigt werden kann.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin verschiedene anorganische KEMs (CaP-Scaffolds, CaP-Zement, Struvit-Zement) mit Antibiotika zu versetzen und deren Freisetungsverhalten zu charakterisieren. Zudem sollte für Knochenzemente der Einfluss des Antibiotikazusatzes auf materialcharakteristische Eigenschaften untersucht werden. Speziell für die CaP-KEMs sollte eine klinisch praktikable und demnach möglichst einfache Methode etabliert werden, um dem Zement/Scaffold ein Antibiotikum zuzuführen. Aus diesem Grund wurden für die Versuche Antibiotika in handelsüblichen Dosierungen aus der Apotheke verwendet. Die Auslagerung der Proben erfolgte in PBS, die Detektion der Antibiotika mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrophotometers. Zudem wurde für einige ausgewählte Kombinationen aus Antibiotikum und KEM mit einem Agardiffusionstest die antibakterielle Wirkung durch ihre Freisetzung aus dem jeweiligen Trägermaterial bestätigt.

Die Antibiotikabeladung der 3D-gedruckten CaP-Scaffolds erfolgte durch Eintauchen in klinisch übliche Antibiotikallösungen, sodass die Antibiotika an der Oberfläche adsorbierten. Einerseits wurde der Einfluss der Beladungszeiträume auf die Freisetzungskarakteristik andererseits das Freisetzungverhalten unterschiedlicher Antibiotika untersucht. Bei den Untersuchungen mit dem Antibiotikum Ciprofloxacin kam es während der Beladung zu Überschreitungen des Löslichkeitsproduktes, was eine klinische Anwendung einschränkt. Weiterhin wurden für die Beladungsdauer von 24 h während der Freisetzung initial potenziell zytotoxische Antibiotikakonzentrationen (außer bei Vancomycin) überschritten. Inwiefern dies die Wund- und Knochenheilung beeinträchtigt, lässt sich anhand dieser Arbeit nicht abschätzen. Zudem zeigten Untersuchungen mit nur 1 h Beladungsdauer mit den Antibiotika Gentamicin und Vancomycin wesentliche Unterschiede. Zum einen wurde insgesamt weniger Antibiotikum an die Scaffolds adsorbiert, weiterhin war die messbare Gesamtfreisetzungsdauer für eine adäquate alleinige lokale Antibiotikatherapie zu kurz. Jedoch könnte diese Form der Antibiotikabeladung als adjuvante Maßnahme zu einer systemischen Therapie durchaus Anwendung finden. Für Vancomycin konnte diese Freisetzungsdauer in einem orientierenden Versuch durch die zusätzliche Behandlung mit einer

Natriumcarbonat-Lösung (pH \approx 11) wesentlich verlängert werden, da derart die Löslichkeit des Antibiotikums herabgesetzt wurde.

Die Untersuchungen an CaP-Zement mit Antibiotikazusatz erfolgten mit einer klinisch bereits etablierten ölbasierten CaP-Zement-Paste. Hierbei wurde einerseits der Einfluss auf das Freisetzungsverhalten durch Zusatz unterschiedlicher Antibiotika (Vancomycin, Gentamicin) sowie einer unterschiedlichen Mischzyklenanzahl (5x, 10x) dargestellt. Mit Vancomycin beladene Zemente zeigten über den Beobachtungszeitraum von 34 d unabhängig der Mischzyklenanzahl eine vollständige Freisetzung der zugegebenen Antibiotikamenge, was auf eine relativ schnelle Freisetzungsrateschließen ließ. Zudem wiesen die untersuchten Materialeigenschaften von 10x gemischten Probekörpern (Porosität, Druckfestigkeit) mit Vancomycin-Zusatz nur unwesentliche Veränderungen im Vergleich zu antibiotikafreien Probekörpern auf. Die 5x gemischten Probekörper zeigten allgemein geringere Werte der Druckfestigkeit auf, weshalb unter diesem Aspekt die 10x gemischten Probekörper zu präferieren sind. Die CaP-Probekörper mit Gentamicin-Zusatz erwiesen sich als abhängig von der angewandten Mischzyklenanzahl, die sich in unterschiedlichen absolut freigesetzten Antibiotikamengen zeigte. Hier wurden von den 5x gemischten Probekörpern mehr Gentamicin freigesetzt als von 10x gemischten. Jedoch wurde auch von 5x gemischten Probekörpern nicht die gesamte zugegebene Gentamicinmenge freigesetzt. Eine vollständige Freisetzung wäre folglich nur durch die Degradation des Trägermaterials zu erwarten. Weiterhin wurde die antibakterielle Wirksamkeit von CaP-Zementen sowie CaP-Scaffolds (bei 1 h Beladungsdauer) mit dem Antibiotikazusatz Vancomycin und Gentamicin in einem Hemmhofstest gegenüber *S. aureus* gezeigt.

Die Freisetzungsuntersuchungen an Struvit-Zementen wurden mit dem Antibiotikum Vancomycin durchgeführt und sollten erste Rückschlüsse auf dessen Eigenschaften als Trägermaterial geben. Es wurden zwei verschiedene Beladungsmöglichkeiten angewandt. Einerseits konnte das gelöste Antibiotikum der DAHP-Lösung zugegeben werden, in einem weiteren Ansatz wurde es als Pulver dem Farringtonit-Ausgangspulver beigemischt. Außerdem zeigte sich, dass alleiniges Auflösen des Vancomycin-Pulvers in der 3,5 M DAHP-Lösung, auch unter

Erhitzen, nicht möglich war. Durch die Zugabe des Vancomycins in Pulverform konnte ein Vielfaches der Antibiotikamasse im Vergleich zur Zugabe der Vancomycin-Lösung dem Struvit-Zement zugegeben werden. Dies zeigte jedoch auch eine erhöhte Abnahme der Druckfestigkeit. In den Freisetzungsforschungen wurden 30 % der zugegebenen Antibiotikamasse freigesetzt. Es ist anzunehmen, dass die verbleibenden 70 % erst mit der Degradation der Trägersubstanz abgegeben werden.

Die Freisetzung der Antibiotika erreichte für alle untersuchten Kombinationen in vitro ausreichend hohe, antibakteriell wirksame Antibiotikakonzentrationen. Der bedarfsgerechte und dem jeweiligen Keimspektrum anpassbare Zusatz von Antibiotika in KEMs könnte somit die bestehenden klinischen Therapiemöglichkeiten von infizierten Knochendefekten zukünftig sinnvoll ergänzen.

7 Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, S2k-Leitlinie: *Akute und chronische exogene Osteomyelitis langer Röhrenknochen des Erwachsenen*. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/012-033l_S2k_Osteomyelitis_2018-01_1.pdf, Stand: 25.01.2018. [20.12.2019]
2. A. Nauth, M.D. McKee, T.A. Einhorn, J.T. Watson, R. Li, E.H. Schemitsch, *Managing Bone Defects*. Journal of Orthopaedic Trauma, 2011. 25(8): S. 462-466.
3. D. Sanders, M. Bhandari, G. Guyatt, D. Heels-Ansdell, E. Schemitsch, M. Swiontkowski, P. Tornetta, S. Walter, *Critical-sized defect in the Tibia: Is it critical? Results from the SPRINT trial*. Journal of Orthopaedic Trauma, 2014. 28(11): S. 632-635.
4. A. Nauth, E. Schemitsch, B. Norris, Z. Nollin, J.T. Watson, *Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment?* Journal of Orthopaedic Trauma, 2018. 32(Suppl. 1): S. 7-11.
5. *Rote Liste 2019*. 2019: Rote Liste Service GmbH.
6. M.P. Ginebra, T. Traykova, J.A. Planell, *Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review*. Journal of Controlled Release, 2006. 113(2): S. 102-110.
7. M.D. McPherson, B.A. Dipane, M.D. Sherif, *Dissolvable Antibiotic Beads in Treatment of Periprosthetic Joint Infection and Revision Arthroplasty - The Use of Synthetic Pure Calcium Sulfate (Stimulan®) Impregnated with Vancomycin & Tobramycin*. Reconstructive Review, 2013. 3(1): S. 32-43.
8. K.D. Kühn, C. Berberich, H. Bösebeck, *Knochenersatzwerkstoffe als lokale Wirkstoffträger*. Der Orthopäde, 2018. 47(1): S. 10-23.
9. *Prüfung von Kombiantionsprodukten*. Verfügbar unter: <https://www.tuvsud.com/de-de/branchen/gesundheit-und-medizintechnik/innovative-medizinprodukte/pruefung-von-kombinationsprodukten>. [07.03.2020]
10. J.T. Bariteau, G.R. Waryasz, M. McDonnell, S.A. Fischer, R.A. Hayda, C.T. Born, *Fungal osteomyelitis and septic arthritis*. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2014. 22(6): S. 390-401.
11. J. Freyschmidt, *Entzündliche (infektiöse und nichtinfektiöse) Skeletterkrankungen*, in *Skeletterkrankungen*, J. Freyschmidt, Hrsg. 2016: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S. 409-499.
12. C. Weißer, C, in *Chirurgenlexikon: 2000 Persönlichkeiten aus der Geschichte der Chirurgie*. 2019: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S. 50-64.
13. L.F. Peltier, *Osteomyelitis*, in *Orthopedics: a history and iconography*, L.F. Peltier, Hrsg. 1993, San Francisco: Norman Publishing. S. 102-121.

14. A.H. Tiemann und G.O. Hofmann, *Principles of the therapy of bone infections in adult extremities : Are there any new developments?* Strategies in Trauma and Limb Reconstruction 2009. 4(2): S. 57-64.
15. U. Illgner, V. Krenn, N. Osada, L. Bause, *Histopathologie und Mikrobiologie bei Gelenkinfekten*. Zeitschrift für Rheumatologie, 2013. 72(7): S. 709-713.
16. W. Pschyrembel, *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Aufl. 267. 2017, Berlin, Boston: de Gruyter.
17. A. Trampuz und W. Zimmerli, *Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices*. Injury, 2006. 37(2): S. 59-66.
18. J. Will, A. Boccaccini, U. Gbureck, *Knochenersatzmaterialien*, in *Werkstoffkunde in der Zahnmedizin Moderne Materialien und Technologien*, M. Rosentritt, N. Ilie, U. Lohbauer, Hrsgg. 2018, Stuttgart: Thieme. S. 386-399.
19. R. Lüllmann-Rauch und E. Asan, *Binde- und Stützgewebe*, in *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019, Stuttgart: Thieme. S. 147-210.
20. S.V. Dorozhkin und M. Epple, *Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten*. Angewandte Chemie, 2002. 114(17): S. 3260-3277.
21. I. McCarthy, *The Physiology of Bone Blood Flow: A Review*. The Journal of Bone and Joint Surgery, 2006. 88(Suppl. 3): S. 4-9.
22. X. Wang, S. Xu, S. Zhou, W. Xu, M. Leary, P. Choong, M. Qian, M. Brandt, Y.M. Xie, *Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review*. Biomaterials, 2016. 83: S. 127-141.
23. A.E. Rosenberg, S.V. Kattapuram, G.P. Nielsen, *Bone Infections*, in *Diagnostic Pathology of Infectious Disease*, R.L. Kradin, Hrsgg. 2010, New York: Elsevier. S. 341-375.
24. R. Schnettler und V. Alt, *Pathophysiologie und Klassifikation der Osteitis*, in *Septische Knochenchirurgie*, R. Schnettler und H.-U. Steinau, Hrsgg. 2004, Stuttgart: Thieme. S. 5-14.
25. S. Chihara und J. Segreti, *Osteomyelitis*. Disease-a-Month, 2010. 56(1): S. 5-31.
26. G. Mouzopoulos, N.K. Kanakaris, G. Kontakis, O. Obakponovwe, R. Townsend, P.V. Giannoudis, *Management of bone infections in adults: the surgeon's and microbiologist's perspectives*. Injury, 2011. 42(Suppl. 5): S. 18-23.
27. A. Trampuz und W. Zimmerli, *Diagnosis and treatment of implant-associated septic arthritis and osteomyelitis*. Current Infectious Disease Reports, 2008. 10(5): S. 394-403.
28. A.C. Steer und J.R. Carapetis, *Acute Hematogenous Osteomyelitis in Children*. Pediatric Drugs, 2004. 6(6): S. 333-346.
29. H.M. Kremers, M.E. Nwojo, J.E. Ransom, C.M. Wood-Wentz, L.J. Melton, P.M. Huddleston, *Trends in the epidemiology of osteomyelitis: a*

- population-based study, 1969 to 2009*. The Journal of Bone & Joint Surgery, 2015. 97(10): S. 837-845.
30. C.M. Hannan und C.E. Attinger, *Special considerations in the management of osteomyelitis defects (diabetes, the ischemic or dysvascular bed, and irradiation)*. Seminars in plastic surgery, 2009. 23(2): S. 132-140.
 31. J.T. Mader, M.W. Cripps, J.H. Calhoun, *Adult posttraumatic osteomyelitis of the tibia*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1999. (360): S. 14-21.
 32. D.P. Lew und F.A. Waldvogel, *Osteomyelitis*. The Lancet, 2004. 364(9431): S. 369-379.
 33. J. Hatzenbuehler und T.J. Pulling, *Diagnosis and management of osteomyelitis*. American Family Physician, 2011. 84(9): S. 1027-1033.
 34. M. Panteli und P.V. Giannoudis, *Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know*. EFORT Open Reviews, 2017. 1(5): S. 128-135.
 35. *Teil B: Allgemeine Orthopädie und Unfallchirurgie: 7 Infektionen von Knochen und Gelenken*, in *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*, F.U. Niethard, J. Pfeil, P. Biberthaler, Hrsgg. 2009, Stuttgart: Thieme. S. 246-260.
 36. Z. Khatoun, C.D. McTiernan, E.J. Suuronen, T.-F. Mah, E.I. Alarcon: *Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention*. Heliyon, 2018. 4(12). DOI: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067. [24.11.2019]
 37. A.J. Hotchen, M.A. McNally, P. Sendi, *The Classification of Long Bone Osteomyelitis: A Systemic Review of the Literature*. Journal of bone and joint infection, 2017. 2(4): S. 167-174.
 38. H.S. Fraimow, *Systemic antimicrobial therapy in osteomyelitis*. Seminars in plastic surgery, 2009. 23(2): S. 90-99.
 39. L.O. Conterno und M.D. Turchi, *Antibiotics for treating chronic osteomyelitis in adults*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2013(9).
 40. J.S. Davis, *Management of bone and joint infections due to Staphylococcus aureus*. Internal Medicine Journal, 2005. 35 (Suppl. 2): S. 79-96.
 41. F. Kutscha-Lissberg, U. Hebler, T. Kälicke, S. Arens, *Prinzipien chirurgischer Therapiekonzepte der postoperativen und chronischen Osteomyelitis*. Der Orthopäde, 2004. 33(4): S. 439-454.
 42. M.S. Gelfand, K.O. Cleveland, R.K. Heck, R. Goswami, *Pathological fracture in acute osteomyelitis of long bones secondary to community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: two cases and review of the literature*. The American Journal of the Medical Sciences, 2006. 332(6): S. 357-360.
 43. C.K. Lee, H.T. Hansen, A.B. Weiss, *Pathological fracture in chronic osteomyelitis*. Orthopedics, 1979. 2(1): S. 46-49.

44. L.M. Museru und C.N. Mcharo, *Chronic osteomyelitis: a continuing orthopaedic challenge in developing countries*. International Orthopaedics, 2001. 25(2): S. 127-131.
45. S.V. Dorozhkin, *A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950*. Materials Science and Engineering: C, 2013. 33(6): S. 3085-3110.
46. F.H. Albee, *Studies in bone growth: Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis*. Annals of surgery, 1920. 71(1): S. 32-39.
47. *Knochenersatzmaterial*, in *DAS DENTAL VADEMEKUM*, Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung, Hrsgg. 2009, Köln: Deutscher Zahnärzterverlag. S. 522-529.
48. J.S. Silber, D.G. Anderson, S.D. Daffner, B.T. Brislin, J.M. Leland, A.S. Hilibrand, A.R. Vaccaro, T.J. Albert, *Donor site morbidity after anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion*. Spine, 2003. 28(2): S. 134-139.
49. T.T. Roberts und A.J. Rosenbaum, *Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing*. Organogenesis, 2012. 8(4): S. 114-124.
50. B. Wenz, B. Oesch, M. Horst, *Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone*. Biomaterials, 2001. 22(12): S. 1599-1606.
51. A. Scarano, M. Degidi, V. Perrotti, A. Piattelli, G. Iezzi, *Sinus augmentation with phycogene hydroxyapatite: histological and histomorphometrical results after 6 months in humans. A case series*. Oral and Maxillofacial Surgery, 2012. 16(1): S. 41-45.
52. G. Fernandez de Grado, L. Keller, Y. Idoux-Gillet, Q. Wagner, A.M. Musset, N. Benkirane-Jessel, F. Bornert, D. Offner: *Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management*. Journal of Tissue Engineering, 2018. 9. DOI: 10.1177/2041731418776819. [24.11.2019]
53. C.C. Bray, C.M. Walker, D.D. Spence, *Orthobiologics in Pediatric Sports Medicine*. Orthopedic Clinics of North America, 2017. 48(3): S. 333-342.
54. J.G. Calcei und S.A. Rodeo, *Orthobiologics for Bone Healing*. Clinics in Sports Medicine, 2019. 38(1): S. 79-95.
55. M. Bohner, *Resorbable biomaterials as bone graft substitutes*. Materials Today, 2010. 13(1): S. 24-30.
56. S. Yamada, D. Heymann, J.M. Bouler, G. Daculsi, *Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios*. Biomaterials, 1997. 18(15): S. 1037-1041.
57. Z. Sheikh, M.-N. Abdallah, A.A. Hanafi, S. Misbahuddin, H. Rashid, M. Glogauer, *Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials*. Materials 2015. 8(11): S. 7913-7925.

58. S. Schaefer, R. Detsch, F. Uhl, U. Deisinger, G. Ziegler, *How Degradation of Calcium Phosphate Bone Substitute Materials is influenced by Phase Composition and Porosity*. *Advanced Engineering Materials*, 2011. 13(4): S. 342-350.
59. R.K. Wong, B.M. Gandolfi, H. St-Hilaire, M.W. Wise, M. Moses, *Complications of hydroxyapatite bone cement in secondary pediatric craniofacial reconstruction*. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2011. 22(1): S. 247-251.
60. A.S. Kalsi, J.S. Kalsi, S. Bassi, *Alveolar ridge preservation: why, when and how*. *British Dental Journal*, 2019. 227(4): S. 264-274.
61. G. Avila-Ortiz, S. Elangovan, K.W.O. Kramer, D. Blanchette, D.V. Dawson, *Effect of alveolar ridge preservation after tooth extraction: a systematic review and meta-analysis*. *Journal of Dental Research*, 2014. 93(10): S. 950-958.
62. M.-P. Ginebra, M. Espanol, Y. Maazouz, V. Bergez, D. Pastorino, *Bioceramics and bone healing*. *EFORT Open Reviews*, 2018. 3(5): S. 173-183.
63. L.B. McCusker, F. Liebau, G. Engelhardt, *Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts (IUPAC Recommendations 2001)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2001. 73(2): S. 381-394.
64. J. Rouquerol, D. Avnir, C.W. Fairbridge, D.H. Everett, J.M. Haynes, N. Pernicone, J.D.F. Ramsay, K.S.W. Sing, K.K. Unger, *Recommendations for the characterization of porous solids (Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*, 1994. 66(8): S. 1739-1758.
65. M. Parent, A. Magnaudeix, S. Delebasse, E. Sarre, E. Champion, M. Viana Trecant, C. Damia, *Hydroxyapatite microporous bioceramics as vancomycin reservoir: Antibacterial efficiency and biocompatibility investigation*. *Journal of Biomaterials Applications*, 2016. 31(4): S. 488-498.
66. F. Chai, J.C. Hornez, N. Blanchemain, C. Neut, M. Descamps, H.F. Hildebrand, *Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics*. *Biomolecular Engineering*, 2007. 24(5): S. 510-514.
67. *Chapter 1 - General Chemistry of the Calcium Orthophosphates*, in *Studies in Inorganic Chemistry*, J.C. Elliott, Hrsg. 1994, Amsterdam: Elsevier. S. 1-62.
68. M. Bohner, S. Tadier, N. van Garderen, A. de Gasparo, N. Döbelin, G. Baroud: *Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications*. *Biomatter*, 2013. 3(2). DOI: 10.4161/biom.25103. [22.12.2019]
69. M.S. Johnsson und G.H. Nancollas, *The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1992. 3(1-2): S. 61-82.

70. R.G. Carrodegua und S. De Aza, *α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications*. Acta Biomaterialia, 2011. 7(10): S. 3536-3546.
71. E. Champion, *Sintering of calcium phosphate bioceramics*. Acta Biomaterialia, 2013. 9(4): S. 5855-5875.
72. M. Vallet-Regí, *Ceramics for Medical Applications*. Journal of the Chemical Society Dalton Transactions 2001. 2(2): S. 97-108.
73. *IV - Biocompatibility and immune responses to biomaterials*, in *Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century*, D. Williams und X. Zhang, Hrsgg. 2019, Amsterdam: Elsevier. S. 55-101.
74. E. Wintermantel, B. Shah-Derler, A. Briuinink, M. Petitmermet, J. Blum, S.-W. Ha, *Biokompatibilität*, in *Medizintechnik*, E. Wintermantel und S.-W. Ha, Hrsgg. 2009, Berlin, Heidelberg: Springer. S. 67-104.
75. P.W. Brown, *Phase Relationships in the Ternary System CaO–P₂O₅–H₂O at 25°C*. Journal of the American Ceramic Society, 1992. 75(1): S. 17-22.
76. M. Canillas, P. Pena, A.H. de Aza, M.A. Rodríguez, *Calcium phosphates for biomedical applications*. Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio, 2017. 56(3): S. 91-112.
77. S. Takagi, L.C. Chow, K. Ishikawa, *Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements*. Biomaterials, 1998. 19(17): S. 1593-1599.
78. C. Durucan und P. Brown, *Alpha-tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. 11(6): S. 365-371.
79. Y.E. Greish und P.W. Brown, *Phase evolution during the formation of stoichiometric hydroxyapatite at 37.4 °C*. Journal of Biomedical Materials Research Part B Applied Biomaterials, 2003. 67(1): S. 632-637.
80. I.H. Arita, V.M. Castano, D.S. Wilkinson, *Synthesis and processing of hydroxyapatite ceramic tapes with controlled porosity*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995. 6(1): S. 19-23.
81. J.F. Osborn und H. Newesely, *The material science of calcium phosphate ceramics*. Biomaterials, 1980. 1(2): S. 108-111.
82. W. Renooij, H.A. Hoogendoorn, W.J. Visser, R.H. Lentferink, M.G. Schmitz, H. Van Ieperen, S.J. Oldenburg, W.M. Janssen, L.M. Akkermans, P. Wittebol, *Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1985(197): S. 272-285.
83. Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, M. Glogauer, *Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications*. Materials 2015. 8(9): S. 5744-5794.
84. L.L. Hench, *Bioceramics: From Concept to Clinic*. Journal of the American Ceramic Society, 1991. 74(7): S. 1487-1510.

85. B.M. Tracy und R.H. Doremus, *Direct electron microscopy studies of the bone-hydroxylapatite interface*. Journal of Biomedical Materials Research, 1984. 18(7): S. 719-726.
86. J.-F. Osborn, *Physiologische Verankerung von belasteten Endoprothesen durch Verbundosteogenese - Ergebnisse humanhistologischer Auswertungen hydroxylapatitkeramikbeschichteter Titanschäfte*, in *Neuere Ergebnisse in der Osteologie*, H.-G. Willert und F.H.W. Heuck, Hrsgg. 1989, Berlin, Heidelberg: Springer. S. 358-364.
87. S.V. Dorozhkin, *Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine*. Materials, 2009. 2(2): S. 399-498.
88. M. Bohner, *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, 2000. 31 (Suppl. 4): S. 37-47.
89. A.J. Ambard und L. Mueninghoff, *Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties*. Journal of Prosthodontics, 2006. 15(5): S. 321-328.
90. Y. Fukase, E.D. Eanes, S. Takagp, L.C. Chow, W.E. Brown, *Setting Reactions and Compressive Strengths of Calcium Phosphate Cements*. Journal of Dental Research, 1990. 69(12): S. 1852-1856.
91. M.P. Ginebra, E. Fernandez, E.A. De Maeyer, R.M. Verbeeck, M.G. Boltong, J. Ginebra, F.C. Driessens, J.A. Planell, *Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement*. Journal of Dental Research, 1997. 76(4): S. 905-912.
92. M. Waselau, V.F. Samii, S.E. Weisbrode, A.S. Litsky, A.L. Bertone, *Effects of a magnesium adhesive cement on bone stability and healing following a metatarsal osteotomy in horses*. American Journal of Veterinary Research, 2007. 68(4): S. 370-378.
93. Y. Yu, J. Wang, C. Liu, B. Zhang, H. Chen, H. Guo, G. Zhong, W. Qu, S. Jiang, H. Huang, *Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010. 76(2): S. 496-504.
94. M. Nabyouni, T. Brückner, H. Zhou, U. Gbureck, S.B. Bhaduri, *Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications*. Acta Biomaterialia, 2018. 66: S. 23-43.
95. C. Grossardt, A. Ewald, L.M. Grover, J.E. Barralet, U. Gbureck, *Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells*. Tissue Engineering Part A, 2010. 16(12): S. 3687-3695.
96. M.I. Bhuiyan, D.S. Mavinic, R.D. Beckie, *A solubility and thermodynamic study of struvite*. Environmental Technology, 2007. 28(9): S. 1015-1026.
97. E. Ariyanto, H. Ang, T. Sen, *Effect of initial solution pH on solubility and morphology of struvite crystals*, in *Chemeca 2011: Engineering a Better World*, A.C.T. Barton, Hrsg. 2011, Sydney: Engineers Australia. S. 1706-1714.
98. U. Klammert, A. Ignatius, U. Wolfram, T. Reuther, U. Gbureck, *In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate*

- ceramics in a heterotopic model*. Acta Biomaterialia, 2011. 7(9): S. 3469-3475.
99. J.R. Burns und B. Finlayson, *Solubility Product of Magnesium Ammonium Phosphate Hexahydrate at Various Temperatures*. The Journal of Urology, 1982. 128(2): S. 426-428.
 100. A. Whitaker und J.W. Jeffery, *The crystal structure of struvite, MgNH₄PO₄·6H₂O*. Acta Crystallographica Section B, 1970. 26(10): S. 1429-1440.
 101. G. Mestres und M.P. Ginebra, *Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties*. Acta Biomaterialia, 2011. 7(4): S. 1853-1861.
 102. E. Vorndran, A. Ewald, F.A. Müller, K. Zorn, A. Kufner, U. Gbureck, *Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2011. 22(3): S. 429-436.
 103. B. Kanter, M. Geffers, A. Ignatius, U. Gbureck, *Control of in vivo mineral bone cement degradation*. Acta Biomaterialia, 2014. 10(7): S. 3279-3287.
 104. L. Wang und G.H. Nancollas, *Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution*. Chemical Reviews, 2008. 108(11): S. 4628-4669.
 105. A.W. Taylor, A.W. Frazier, E.L. Gurney, *Solubility products of magnesium ammonium and magnesium potassium phosphates*. Transactions of the Faraday Society, 1963. 59(0): S. 1580-1584.
 106. L.H. Fuchs, E. Olsen, E. Gebert, *New X-Ray and Compositional Data for Farringtonite, Mg₃(PO₄)₂·H₂O*. American Mineralogist, 1973. 58(9-10): S. 949-951.
 107. S. Bose und S. Tarafder, *Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review*. Acta Biomaterialia, 2012. 8(4): S. 1401-1421.
 108. A.G. Gristina, *Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration*. Science, 1987. 237(4822): S. 1588-1595.
 109. N. Hoiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. International Journal of Antimicrobial Agents, 2010. 35(4): S. 322-332.
 110. J.S. Gogia, J.P. Meehan, P.E. Di Cesare, A.A. Jamali, *Local antibiotic therapy in osteomyelitis*. Seminars in plastic surgery, 2009. 23(2): S. 100-107.
 111. K. Anagnostakos, P. Hitzler, D. Pape, D. Kohn, J. Kelm, *Persistence of bacterial growth on antibiotic-loaded beads: Is it actually a problem?* Acta Orthopaedica, 2008. 79(2): S. 302-307.
 112. D. von Stechow und M.A. Rauschmann, *Effectiveness of combination use of antibiotic-loaded PerOssal with spinal surgery in patients with spondylodiscitis*. European Surgical Research, 2009. 43(3): S. 298-305.

113. M.A. Rauschmann, T.A. Wichelhaus, V. Stirnal, E. Dingeldein, L. Zichner, R. Schnettler, V. Alt, *Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections*. *Biomaterials*, 2005. 26(15): S. 2677-2684.
114. G. Humm, S. Noor, P. Bridgeman, M. David, D. Bose, *Adjuvant treatment of chronic osteomyelitis of the tibia following exogenous trauma using OSTEASET®-T: a review of 21 patients in a regional trauma centre*. *Strategies in Trauma and Limb Reconstruction*, 2014. 9(3): S. 157-161.
115. W. Chang, M. Colangeli, S. Colangeli, C. Di Bella, E. Gozzi, D. Donati, *Adult osteomyelitis: debridement versus debridement plus Osteoset T pellets*. *Acta Orthopaedica Belgica*, 2007. 73(2): S. 238-243.
116. D. Pfüringer, N. Harrasser, H. Mühlhofer, M. Kiokekli, A. Stemberger, M. van Griensven, M. Lucke, R. Burgkart, A. Obermeier, *Osteoinduction and -conduction through absorbable bone substitute materials based on calcium sulfate: in vivo biological behavior in a rabbit model*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2018. 29(2): S. 17.
117. M. Stravinskas, P. Horstmann, J. Ferguson, W. Hettwer, M. Nilsson, S. Tarasevicius, M.M. Petersen, M.A. McNally, L. Lidgren, *Pharmacokinetics of gentamicin eluted from a regenerating bone graft substitute: In vitro and clinical release studies*. *Bone & Joint Research*, 2016. 5(9): S. 427-435.
118. M. Stravinskas, M. Nilsson, A. Vitkauskiene, S. Tarasevicius, L. Lidgren, *Vancomycin elution from a biphasic ceramic bone substitute*. *Bone & Joint Research*, 2019. 8(2): S. 49-54.
119. E. Vorndran, M. Geffers, A. Ewald, M. Lemm, B. Nies, U. Gbureck, *Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier*. *Acta Biomaterialia*, 2013. 9(12): S. 9558-9567.
120. A. Ratier, I.R. Gibson, S.M. Best, M. Freche, J.L. Lacout, F. Rodriguez, *Setting characteristics and mechanical behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline*. *Biomaterials*, 2001. 22(9): S. 897-901.
121. M. Bohner, J. Lemaitre, P. Van Landuyt, P.Y. Zambelli, H.P. Merkle, B. Gander, *Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997. 86(5): S. 565-572.
122. Y. Fu und W.J. Kao, *Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010. 7(4): S. 429-444.
123. J. Siepmann und F. Siepmann, *Mathematical modeling of drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. 364(2): S. 328-343.
124. O.S. Kluin, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, D. Neut, *Biodegradable vs non-biodegradable antibiotic delivery devices in the treatment of osteomyelitis*. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2013. 10(3): S. 341-351.
125. W.N. Ayre, J.C. Birchall, S.L. Evans, S.P. Denyer, *A novel liposomal drug delivery system for PMMA bone cements*. *Journal of Biomedical*

- Materials Research Part B: Applied biomaterials, 2016. 104(8): S. 1510-1524.
126. S. Hesaraki und R. Nemati, *Cephalexin-loaded injectable macroporous calcium phosphate bone cement*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2009. 89(2): S. 342-352.
 127. V. Uskoković, *Mechanism of formation governs the mechanism of release of antibiotics from calcium phosphate nanopowders and cements in a drug-dependent manner*. Journal of Materials Chemistry B, 2019. 7(25): S. 3982-3992.
 128. P.L. Ritger und N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices*. Journal of Controlled Release, 1987. 5(1): S. 37-42.
 129. P.L. Ritger und N.A. Peppas, *A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs*. Journal of Controlled Release, 1987. 5(1): S. 23-36.
 130. M. Montazerolghaem, H. Engqvist, M. Karlsson Ott, *Sustained release of simvastatin from premixed injectable calcium phosphate cement*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2014. 102(2): S. 340-347.
 131. S.A. Waksman, *Antagonistic relations of microorganisms*. Bacteriological Reviews, 1941. 5(3): S. 231-291.
 132. T. Karow und R. Lang-Roth, *Antimikrobielle Pharmaka und Infektionskrankheiten*, in *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2018, Pulheim: Thomas Karow. S. 775.
 133. G. Habermehl, P.E. Hammann, H.C. Krebs, W. Ternes, *Antibiotika und Chemotherapeutika*, in *Naturstoffchemie*. 2008, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. S. 551-605.
 134. M. Fille und S. Ziesing, *Antibakterielle Wirkung*, in *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, S. Suerbaum, H. Hahn, G.-D. Burchard, S.H.E. Kaufmann, T.F. Schulz, Hrsgg. 2012, Berlin, Heidelberg: Springer S. 696-698.
 135. W.A. Craig und P.G. Welling, *Protein Binding of Antimicrobials: Clinical Pharmacokinetic and Therapeutic Implications*. Clinical Pharmacokinetics, 1977. 2(4): S. 252-268.
 136. P. Baudoux, N. Bles, S. Lemaire, M.-P. Mingeot-Leclercq, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke, *Combined effect of pH and concentration on the activities of gentamicin and oxacillin against Staphylococcus aureus in pharmacodynamic models of extracellular and intracellular infections*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007. 59(2): S. 246-253.
 137. S.C. Ersoy, D.M. Heithoff, L.t. Barnes, G.K. Tripp, J.K. House, J.D. Marth, J.W. Smith, M.J. Mahan, *Correcting a Fundamental Flaw in the*

- Paradigm for Antimicrobial Susceptibility Testing*. EBioMedicine, 2017. 20: S. 173-181.
138. B. Wiedemann, *Microbiological basis of antibiotic therapy*. Infection, 1980. 8(1): S. 6-13.
139. H. Ceri, M.E. Olson, C. Stremick, R.R. Read, D. Morck, A. Buret, *The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms*. Journal of Clinical Microbiology, 1999. 37(6): S. 1771-1776.
140. J.W. Mouton, A.E. Muller, R. Canton, C.G. Giske, G. Kahlmeter, J. Turnidge, *MIC-based dose adjustment: facts and fables*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017. 73(3): S. 564-568.
141. J. Carlet, *The gut is the epicentre of antibiotic resistance*. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2012. 1(1): S. 39-39.
142. A.P. Roberts und P. Mullany, *Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance*. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2010. 8(12): S. 1441-1450.
143. L. Frommelt, 4.2. *Lokale Antibiotikatherapie*, in *Septische Knochenchirurgie*, R. Schnettler und H.-U. Steinau, Hrsgg. 2004, Stuttgart: Thieme. DOI: 10.1055/b-0034-56755. [01.10.2019]
144. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, S2k-Leitlinie: *Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen - Update 2018*. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/082-006l_S2k_Parenterale_Antibiotika_2019-08.pdf, Stand: 25.07.2019. [01.10.2019]
145. T. Bollenbach, *Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution*. Current Opinion in Microbiology, 2015. 27: S. 1-9.
146. M.J. Weinstein, G.M. Luedemann, E.M. Oden, G.H. Wagman, J.P. Rosselet, J.A. Marquez, C.T. Coniglio, W. Charney, H.L. Herzog, J. Black, *Gentamicin, 1 a New Antibiotic Complex from Micromonospora*. Journal of Medicinal Chemistry, 1963. 6(4): S. 463-464.
147. L.P. Kotra, J. Haddad, S. Mobashery, *Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2000. 44(12): S. 3249-3256.
148. B. Becker und M.A. Cooper, *Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century*. ACS Chemical Biology, 2013. 8(1): S. 105-115.
149. J.A. Waterston und G.M. Halmagyi, *Unilateral Vestibulotoxicity Due to Systemic Gentamicin Therapy*. Acta Oto-Laryngologica, 1998. 118(4): S. 474-478.
150. L.M. Childs-Kean, K.M. Shaeer, S. Varghese Gupta, J.C. Cho, *Aminoglycoside Allergic Reactions*. Pharmacy 2019. 7(3): S. 124.
151. J.M. Lopez-Novoa, Y. Quiros, L. Vicente, A.I. Morales, F.J. Lopez-Hernandez, *New insights into the mechanism of aminoglycoside*

- nephrotoxicity: an integrative point of view.* *Kidney International*, 2011. 79(1): S. 33-45.
152. A.M. Philp, S. Raja, A. Philp, M.P. Newton Ede, S.W. Jones, *The Effect of Vancomycin and Gentamicin Antibiotics on Human Osteoblast Proliferation, Metabolic Function, and Bone Mineralization.* *Spine* 2017. 42(3): S. 202-207.
 153. S. Isefuku, C.J. Joyner, A.H.R.W. Simpson, *Gentamicin May Have an Adverse Effect on Osteogenesis.* *Journal of Orthopaedic Trauma*, 2003. 17(3): S. 212-216.
 154. R.N. Brogden, R.C. Heel, T.M. Speight, G.S. Avery, *Cefuroxime: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacological Properties and Therapeutic Use.* *Drugs*, 1979. 17(4): S. 233-266.
 155. M.H. Richmond, *β -Lactamase Resistant Cephalosporins with Particular Reference to Cefuroxime.* *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 1977. 70(Suppl 9): S. 77-81.
 156. C.M. Perry und R.N. Brogden, *Cefuroxime Axetil.* *Drugs*, 1996. 52(1): S. 125-158.
 157. G.M. Salzmann, F.D. Naal, F. von Knoch, J. Tuebel, R. Gradinger, A.B. Imhoff, J. Schauwecker, *Effects of cefuroxime on human osteoblasts in vitro.* *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007. 82A(2): S. 462-468.
 158. D.M. Campoli-Richards, J.P. Monk, A. Price, P. Benfield, P.A. Todd, A. Ward, *Ciprofloxacin.* *Drugs*, 1988. 35(4): S. 373-447.
 159. C.-R. Chen, M. Malik, M. Snyder, K. Drlica, *DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage.* *Journal of molecular biology*, 1996. 258(4): S. 627-637.
 160. M. LeBel, *Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions.* *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 1988. 8(1): S. 3-30.
 161. C.C. Sanders, *Ciprofloxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance.* *Reviews of Infectious Diseases*, 1988. 10(3): S. 516-527.
 162. K. Shimatsu, S. Subramaniam, H. Sim, P. Aronowitz, *Ciprofloxacin-induced tendinopathy of the gluteal tendons.* *Journal of General Internal Medicine*, 2014. 29(11): S. 1559-1562.
 163. A.L. Godoy-Santos, H. Bruschini, J. Cury, M. Srougi, C. de Cesar-Netto, L.F. Fonseca, N. Maffulli, *Fluoroquinolones and the Risk of Achilles Tendon Disorders: Update on a Neglected Complication.* *Urology*, 2018. 113: S. 20-25.
 164. P. Holtom, S. Pavkovic, P. Bravos, M. Patzakis, L. Shepherd, *Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafloxacin, ciprofloxacin, and levofloxacin on osteoblastic cells in vitro.* *Journal of Orthopaedic Research*, 2000. 18: S. 721-727.
 165. M.J. Kasten, *Clindamycin, metronidazole, and chloramphenicol.* *Mayo Clinic Proceedings*, 1999. 74(8): S. 825-833.

166. L. Addy und M. Martin, *Clindamycin and dentistry*. British dental journal, 2005. 199(1): S. 23-26.
167. R.S. Vardanyan und V.J. Hruby, 32 - *Antibiotics*, in *Synthesis of Essential Drugs*, R.S. Vardanyan und V.J. Hruby, Hrsgg. 2006, Amsterdam: Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044452166-8/50032-7>. [01.11.2019]
168. R.G. Finch und I. Phillips, *A clinical, microbiological and toxicological assessment of clindamycin phosphate*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1975. 1(3): S. 297-303.
169. K.D. Vinod und T. Haragopal, *Clindamycin: A Review of Fifteen Years of Experience*. Reviews of Infectious Diseases, 1982. 4(6): S. 1133-1153.
170. F.D. Naal, G.M. Salzmann, F. von Knoch, J. Tuebel, P. Diehl, R. Gradinger, J. Schauwecker, *The effects of clindamycin on human osteoblasts in vitro*. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery, 2008. 128(3): S. 317-323.
171. E. Rubinstein und Y. Keynan: *Vancomycin revisited - 60 years later*. Frontiers in Public Health, 2014. 2(217). DOI: 10.3389/fpubh.2014.00217. [22.12.2019]
172. R. Nagarajan, *Antibacterial activities and modes of action of vancomycin and related glycopeptides*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991. 35(4): S. 605-609.
173. P.E. Reynolds, *Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 1989. 8(11): S. 943-950.
174. R.P.F. Cheung und J.T. DiPiro, *Vancomycin: An Update*. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 1986. 6(4): S. 153-169.
175. D. Zeng, D. Debabov, T.L. Hartsell, R.J. Cano, S. Adams, J.A. Schuyler, R. McMillan, J.L. Pace: *Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2016. 6(12). DOI: 10.1101/cshperspect.a026989. [20.01.2020]
176. A.P.R. Wilson, *Comparative safety of teicoplanin and vancomycin*. International Journal of Antimicrobial Agents, 1998. 10(2): S. 143-152.
177. B.F. Farber und R.C. Moellering, Jr., *Retrospective study of the toxicity of preparations of vancomycin from 1974 to 1981*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1983. 23(1): S. 138-141.
178. J.L. Rocha, W. Kondo, M.I. Baptista, C.A. Da Cunha, L.T. Martins, *Uncommon vancomycin-induced side effects*. The Brazilian Journal of Infectious Disease, 2002. 6(4): S. 196-200.
179. M.L. Edin, T. Miclau, G.E. Lester, R.W. Lindsey, L.E. Dahners, *Effect of cefazolin and vancomycin on osteoblasts in vitro*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1996(333): S. 245-251.

180. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 9.0, 2019.* Dokument verfügbar unter:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf. [01.09.2019]
181. T.J. Wozniak und J.R. Hicks, *Analytical Profile of Cefuroxime Sodium*, in *Analytical Profiles of Drug Substances*, K. Florey, Hrsg. 1991: Academic Press. S. 209-236.
182. M. Zilberman und J.J. Elsner, *Antibiotic-eluting medical devices for various applications*. *Journal of Controlled Release*, 2008. 130(3): S. 202-215.
183. J.H. Kwon, *141 - Macrolides, Ketolides, Lincosamides and Streptogramins*, in *Infectious Diseases* J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal, Hrsgg. 2017: Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00141-6>. [20.01.2020]
184. I. Khairoun, M.G. Boltong, F.C. Driessens, J.A. Planell, *Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997. 38(4): S. 356-360.
185. S. Heinemann, S. Roessler, M. Lemm, M. Ruhnnow, B. Nies, *Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid*. *Acta Biomaterialia*, 2012. 9(4): S. 6199-6207.
186. S. Reitmaier, A. Kovtun, J. Schuelke, B. Kanter, M. Lemm, A. Hoess, S. Heinemann, B. Nies, A. Ignatius, *Strontium(II) and mechanical loading additively augment bone formation in calcium phosphate scaffolds*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2018. 36(1): S. 106-117.
187. S.S. Sampath und D.H. Robinson, *Comparison of new and existing spectrophotometric methods for the analysis of tobramycin and other aminoglycosides*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1990. 79(5): S. 428-431.
188. M. Roth, *Fluorescence reaction for amino acids*. *Analytical Chemistry*, 1971. 43(7): S. 880-882.
189. S.S. Simons und D.F. Johnson, *Reaction of o-phthalaldehyde and thiols with primary amines: formation of 1-alkyl(and aryl)thio-2-alkylisoindoles*. *The Journal of Organic Chemistry*, 1978. 43(14): S. 2886-2891.
190. R. Kühnreich und U. Holzgrabe, *High-performance liquid chromatography evaluation of the enantiomeric purity of amino acids by means of automated precolumn derivatization with ortho -phthalaldehyde and chiral thiols: High Performance Liquid Chromatography Evaluation of the Enantiomeric Purity of Amino Acids by Means of Automated Precolumn Derivatization with Ortho*. *Chirality*, 2016. 28: S. 795-804.
191. R.C. Dorresteyn, L.G. Berwald, G. Zomer, C.D. de Gooijer, G. Wieten, E.C. Beuvery, *Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization effect of reaction conditions*. *Journal of Chromatography A*, 1996. 724(1): S. 159-167.

192. E.W. Washburn, *Note on a Method of Determining the Distribution of Pore Sizes in a Porous Material*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1921. 7(4): S. 115-116.
193. H. Giesche, *Mercury Porosimetry: A General (Practical) Overview*. Particle & Particle Systems Characterization, 2006. 23(1): S. 9-19.
194. G. Chen, B. Liu, H. Liu, H. Zhang, K. Yang, Q. Wang, J. Ding, F. Chang, *Calcium Phosphate Cement loaded with 10% vancomycin delivering high early and late local antibiotic concentration in vitro*. Orthopaedics & Traumatologie: Surgery & Research, 2018. 104(8): S. 1271-1275.
195. M. Hasegawa, A. Sudo, V.S. Komlev, S.M. Barinov, A. Uchida, *High release of antibiotic from a novel hydroxyapatite with bimodal pore size distribution*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2004. 70(2): S. 332-339.
196. P. Frutos Cabanillas, E. Diez Pena, J.M. Barrales-Rienda, G. Frutos, *Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. 209(1-2): S. 15-26.
197. A. Hernandez-Soria, X. Yang, M.J. Grosso, J. Reinhart, B.F. Ricciardi, M. Bostrom, *In vitro elution characteristics of antibiotic laden BoneSource, hydroxyapatite bone cement*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2013. 24(7): S. 797-806.
198. W.Y. Su, Y.C. Chen, F.H. Lin: *A new type of biphasic calcium phosphate cement as a gentamicin carrier for osteomyelitis*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2013. 2013. DOI: 10.1155/2013/801374. [24.01.2020]
199. E. Chevalier, M. Viana, A. Artaud, S. Haddouchi, D. Chulia, *A novel application of the T-cell for flow-through dissolution: The case of bioceramics used as ibuprofen carrier*. Talanta, 2009. 77(4): S. 1545-1548.
200. S.P. Boelch, M.C. Jordan, J. Arnholdt, A.F. Steinert, M. Rudert, M. Luedemann: *Antibiotic elution and compressive strength of gentamicin/vancomycin loaded bone cements are considerably influenced by immersion fluid volume*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2019. 30(2). DOI: 10.1007/s10856-019-6229-7. [24.01.2020]
201. D. Vieira und H. Salgado, *Comparison of HPLC and UV Spectrophotometric Methods for the Determination of Cefuroxime Sodium in Pharmaceutical Products*. Journal of Chromatographic Science, 2011. 49: S. 508-511.
202. C. Canal, D. Pastorino, G. Mestres, P. Schuler, M.-P. Ginebra, *Relevance of microstructure for the early antibiotic release of fresh and pre-set calcium phosphate cements*. Acta Biomaterialia, 2013. 9(9): S. 8403-8412.
203. G. Faigle, A. Bernstein, N.P. Suedkamp, H.O. Mayr, F. Peters, W.D. Huebner, M. Seidenstuecker: *Release behavior of VAN from four types*

- of CaP-ceramic granules using various loading methods at two different degrees of acidity. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2017. 29(1). DOI: 10.1007/s10856-017-6006-4. [24.01.2020]
204. C.S. Che Nor Zarida, *In vitro elution and dissolution of tobramycin and gentamicin from calcium phosphate*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011. 5(20): S. 2283-2291.
205. J. Siepmann und N.A. Peppas, *Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2011. 418(1): S. 6-12.
206. A. Mersmann, M. Kind, J. Stichlmair, *Adsorption*, in *Thermische Verfahrenstechnik: Grundlagen und Methoden*. 2005, Berlin, Heidelberg: Springer S. 483-531.
207. M. Vukomanović, S.D. Škapin, B. Jančar, T. Maksin, N. Ignjatović, V. Uskoković, D. Uskoković, *Poly(d,l-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres. Part 1: A multifunctional system for controlled drug delivery*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2011. 82(2): S. 404-413.
208. U. Gbureck, J. Probst, R. Thull, *Surface properties of calcium phosphate particles for self setting bone cements*. *Biomolecular Engineering*, 2002. 19(2): S. 51-55.
209. I. Hornyák, E. Madácsi, P. Kalugyer, G. Vác, D.B. Horváthy, M. Szendrői, W. Han, Z. Lacza: *Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating*. *BioMed Research International*, 2014. 2014. DOI: 10.1155/2014/459867. [18.12.2019]
210. C.N. Cornell, D. Tyndall, S. Waller, J.M. Lane, B.D. Brause, *Treatment of experimental osteomyelitis with antibiotic-impregnated bone graft substitute*. *Journal of Orthopaedic Research*, 1993. 11(5): S. 619-626.
211. J. Schnieders, U. Gbureck, R. Thull, T. Kissel, *Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement*. *Biomaterials*, 2006. 27(23): S. 4239-4249.
212. A. Obermeier, F.D. Matl, J. Schwabe, A. Zimmermann, K.D. Kühn, S. Lakemeier, R. v. Eisenhart-Rothe, A. Stemberger, R. Burgkart, *Novel fatty acid gentamicin salts as slow-release drug carrier systems for anti-infective protection of vascular biomaterials*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012. 23(7): S. 1675-1683.
213. M.P. Singh, J. Stefko, J.A. Lumpkin, J. Rosenblatt, *The effect of electrostatic charge interactions on release rates of gentamicin from collagen matrices*. *Pharmaceutical Research*, 1995. 12(8): S. 1205-1210.
214. M. DiCicco, T. Duong, A. Chu, S.A. Jansen, *Tobramycin and Gentamicin elution analysis between two in situ polymerizable orthopedic composites*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2003. 65B(1): S. 137-149.
215. J.E. Barralet, K.J. Lilley, L.M. Grover, D.F. Farrar, C. Ansell, U. Gbureck, *Cements from nanocrystalline hydroxyapatite*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2004. 15(4): S. 407-411.

216. A. Dion, M. Langman, G. Hall, M. Filiaggi, *Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment*. Biomaterials, 2005. 26(35): S. 7276-7285.
217. H. Yamamoto, S. Niwa, M. Hori, T. Hattori, K. Sawai, S. Aoki, M. Hirano, H. Takeuchi, *Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro*. Biomaterials, 1998. 19(17): S. 1587-1591.
218. M. Bohner, J. Lemaitre, T.A. Ring, *Effects of Sulfate, Pyrophosphate, and Citrate Ions on the Physicochemical Properties of Cements Made of β -Tricalcium Phosphate-Phosphoric Acid-Water Mixtures*. Journal of the American Ceramic Society, 1996. 79(6): S. 1427-1434.
219. U. Joosten, A. Joist, T. Frebel, B. Brandt, S. Diederichs, C. von Eiff, *Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: studies in vitro and in vivo*. Biomaterials, 2004. 25(18): S. 4287-4295.
220. K. Sugo, R. Kawashima, M. Nakasu, T. Nakajima, *Antibiotic elution profile and physical properties of a novel calcium phosphate cement material*. Journal of the Ceramic Society of Japan, 2016. 124(9): S. 954-958.
221. K. Ishikawa und K. Asaoka, *Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement*. Journal of Biomedical Materials Research, 1995. 29(12): S. 1537-1543.
222. M. Takechi, Y. Miyamoto, K. Ishikawa, M. Nagayama, M. Kon, K. Asaoka, K. Suzuki, *Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate cement*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. 39(2): S. 308-316.
223. R. Gelli, L. Mati, F. Ridi, P. Baglioni, *Tuning the properties of magnesium phosphate-based bone cements: Effect of powder to liquid ratio and aqueous solution concentration*. Materials Science and Engineering: C - Materials for Biological Applications, 2019. 95: S. 248-255.
224. K. Anagnostakos, *Therapeutic Use of Antibiotic-loaded Bone Cement in the Treatment of Hip and Knee Joint Infections*. Journal of Bone and Joint Infection, 2017. 2(1): S. 29-37.
225. D. Campoccia, L. Montanaro, P. Speziale, C.R. Arciola, *Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their prophylactic and therapeutic clinical use*. Biomaterials, 2010. 31(25): S. 6363-6377.

8 Anhang



Abbildung 28: Aufbau Mischvorrichtung CaP-Zement

Exemplarisch dargestellt ist die Mischvorrichtung zur Herstellung der CaP-Probekörper. Links zeigt sich die Spritze mit der Zementpaste, die über einen Adapter mit einer Spritze mit der Antibiotikallösung/Wasser (rechts) verbunden ist.

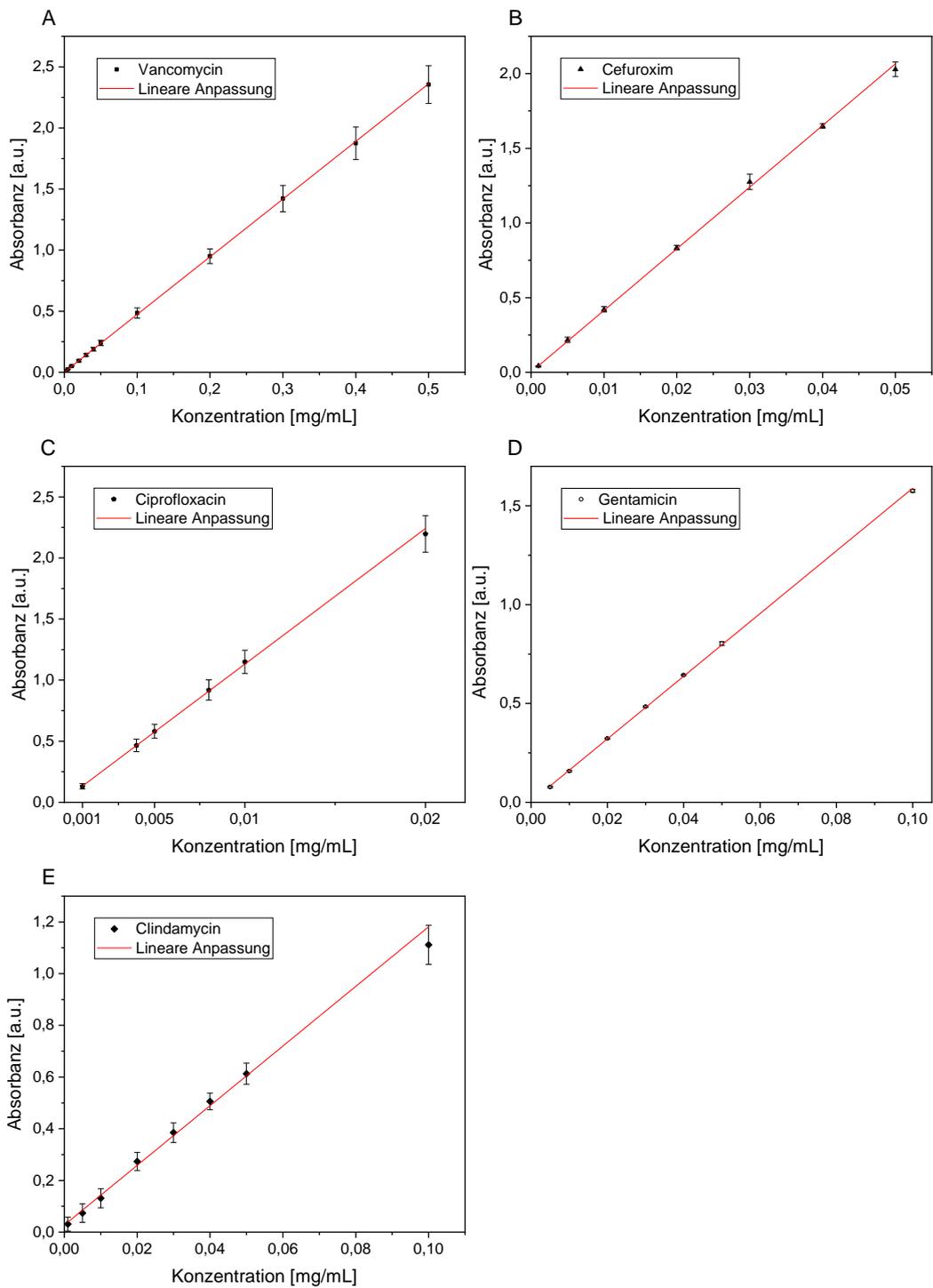


Abbildung 29: Darstellung der Kalibriergeraden

Gezeigt ist die graphische Darstellung der Kalibriergeraden der jeweiligen Antibiotika. Es wurden für alle Antibiotika jeweils fünf Kalibrierlösungen einer Konzentration hergestellt und daraus der Mittelwert der Absorbanz mit der jeweiligen Standardabweichung gebildet. Die lineare Anpassung erfolgte mit der OriginPro-Software.

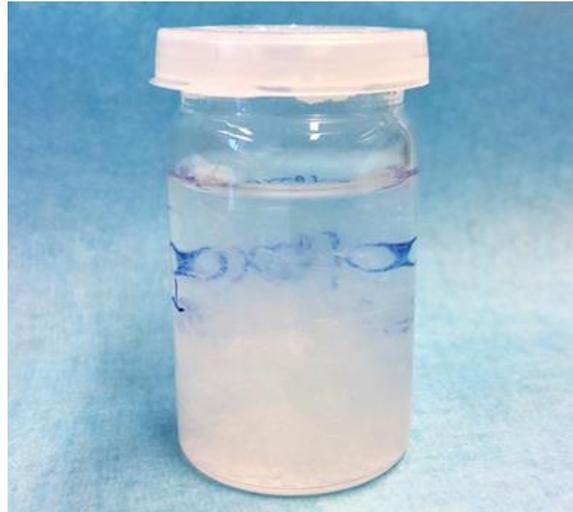


Abbildung 30: Ciprofloxacin-Beladungslösung nach Ende der Beladungsdauer

Gezeigt ist das Gefäß mit 20 mL der 2 mg/mL konzentrierten Ciprofloxacin-Lösung, nachdem die Beladung eines HA-Scaffolds beendet war und dieser entfernt wurde. Die kristalline Ausfällung durch Überschreitung des Löslichkeitsproduktes innerhalb der unteren Hälfte des Gefäßes sind erkennbar.

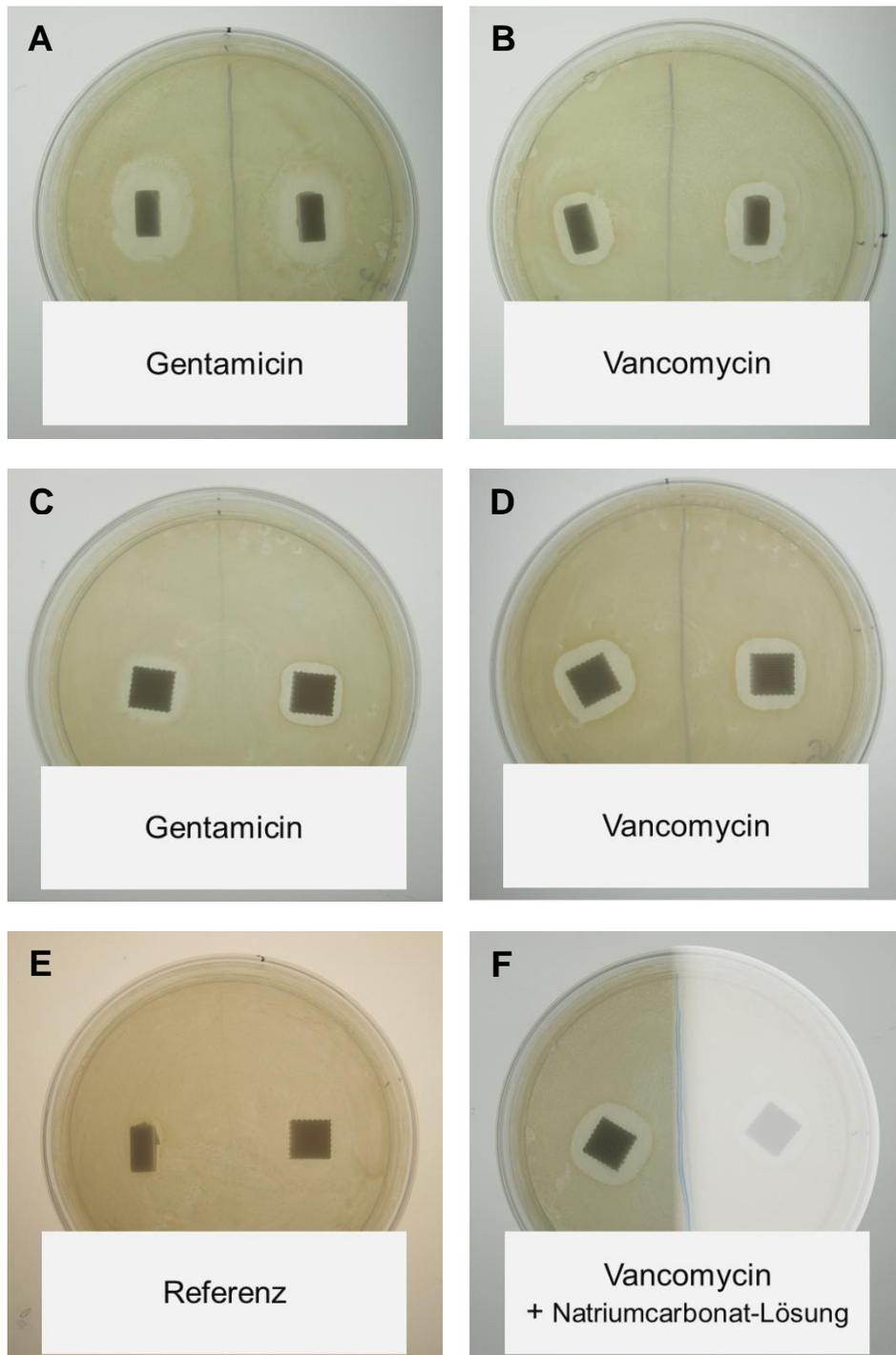


Abbildung 31: Exemplarische Ergebnisse des Hemmhoftests

Es sind exemplarische Ergebnisse des Hemmhoftests mit *S. aureus* dargestellt. Die CaP-Probe-körper wurden mit den Antibiotika Vancomycin oder Gentamicin versetzt. Die CaP-Zement-Probe-körper (A,B) wurden stets 10x mit der Antibiotikallösung vermischt; die Scaffolds (C,D) wurden für 1 h mit dem jeweiligen Antibiotikum beladen. Es erfolgte an allen Probekörpern eine voraus-gegangene Freisetzungsuntersuchung nach zuvor beschriebenen Mediumwechselschritten; die Probekörper wurden nach 24 h auf die Agar-Platten überführt. Bei allen mit Antibiotikum versetz-ten Probekörpern lässt sich ein Hemmhof erkennen (A-D), wobei die antibiotikafreie Referenz (E) keinen Hemmhof zeigt. Zudem wird der Hemmhof eines mit Vancomycin-beladenen Scaffolds und Na_2CO_3 -Behandlung gezeigt (F, linke Hälfte der Petrischale)

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Uwe Gbureck für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, die ausführliche Einführung in wissenschaftliche Arbeitsweisen und die zuverlässige Betreuung auch nach Abschluss der experimentellen Phase.

Zudem danke ich der Firma INNOTERE, für die Bereitstellung der CaP-Proben und besonders Herrn Dr. Andreas Höß für richtungsweisende Rückmeldung zu den Ergebnissen.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler für die Übernahme des Korreferates.

Bei Herrn Dr. Jörg Teßmar möchte ich mich für viele fachliche Anmerkungen und Hinweise während der Versuchsdurchführung bedanken.

Zudem danke ich:

- Ib Holzmeister, Jan Weichhold, Friederike Kaiser, Melissa Jung, Manuel Brückner und Christian Schaufler, die alle durch unzählige fachspezifische und weitere interessante Gespräche zum Gelingen dieser Arbeit beitragen.
- Isabell Biermann, für jegliche Hilfe im Physik-Labor; Dr. Elke Vorndran, für die Beantwortung jeglicher Fragen bezüglich der Wirkstofffreisetzung; Philipp Stahlhut, für die gelungenen REM-Aufnahmen; Alevtina Rosenthal, für die immer freundliche Betreuung im Biologielabor.
- Allen weiteren Mitarbeitern des FMZ, für die stets großartige Arbeitsatmosphäre, jegliche Unterstützung und die unvergessliche Zeit. Namentlich möchte ich mich an dieser Stelle besonders bei Manuel Roesner, Florian Pinzner, Ilona Paulus, Viktoria Sokolowski, Leonard Forster, Annika Seifert, Johanna Lutz, Franziska Weigl, Junwen Shan, Christoph Böhm und Dr. Berat Taşkin bedanken.
- Priv.-Doz. Dr. Stefan Fickert und Dr. Steffen Thier für die Expertise im Bereich der angewandten Orthopädie
- Dr. Ingeborg Mehringer und Dr. Arno Mehringer für das fleißige Gegenlesen
- Papa, Tanja und Julia für die permanente Unterstützung und Motivation
- Christian, für Kritik, Lob und motivierende Worte

Lebenslauf