

Rapid-Prototyping hydraulisch härtender Calcium- und Magnesiumphosphatzemente mit lokaler Wirkstoffmodifikation

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Dipl.- Ing. Elke Vorndran
geboren in Würzburg

Würzburg, 2011

Eingereicht am: 11.08.2011

bei der Fakultät für Physik und Astronomie

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Dyakonov
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. U. Gbureck

Prüfer des Promotionskolloquiums

1. Prüfer : Prof. Dr. V. Dyakonov
2. Prüfer : PD Dr. rer. nat. U. Gbureck
3. Prüfer : Prof. Dr. W. Kinzel

*Live as if you were to die tomorrow.
Learn as if you were to live forever.*

Mahatma Gandhi

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war die Herstellung individuell formbarer Strukturen mittels des 3D-Pulverdrucks auf Basis von bei Raumtemperatur hydraulisch abbindenden Knochenzementpulvern. Neben der Entwicklung neuartiger Zementformulierung auf Basis von Magnesiumphosphaten war vor allem die gleichzeitige Ausstattung der Werkstoffe mit temperaturlabilen und bioaktiven Verbindungen ein wichtiger Entwicklungsschritt. Die Lokalisation der Wirkstoffe korreliert dabei mit entsprechenden Farbinformationen im Design der Konstrukte, die durch einen Mehrfarbendrucker physikalisch abgebildet werden.

Das für den Pulverdruck bereits etablierte Calciumphosphatsystem hat den Nachteil, dass die Abbindereaktion bei stark sauren pH-Werten abläuft, was negative Auswirkungen auf die gleichzeitige Ausstattung mit sensitiven Wirkstoffen hat. Zur Lösung dieser Problematik wurde ein neues Knochenzementpulver auf Magnesiumphosphatbasis entwickelt, welches unter neutralen pH-Bedingungen mit ammoniumhaltigem Binder innerhalb von Sekunden zu dem Mineral Struvit abbindet. Das Zementpulver aus Trimagnesiumphosphat wurde durch einen Sintervorgang hergestellt und nach Aufmahlung bezüglich der pulvertechnologischen Eigenschaften, wie Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Glättungseigenschaften und Schüttdichte sowie hinsichtlich des Abbindeverhaltens charakterisiert und für den Druckprozess optimiert. Um den Anforderungen des Pulverdrucks zu genügen müssen sich die Zemententpulver zu dünnen und glatten Oberflächen abstreichen lassen. Entscheidender Faktor war hierbei der Mahlungsgrad der Pulver, wobei sich monomodale Korngrößenverteilungen mit geringer Spanne und einem d_{50} -Wert von 20 – 30 μm als zweckmäßig erwiesen. Voraussetzung für die Druckbarkeit maßhaltiger Strukturen war eine schnelle Abbindereaktion, die eine hohe Ortsständigkeit des Binders gewährleistete. Eine Verfestigung der Strukturen innerhalb von Sekunden konnte durch die Modifikation des Magnesiumphosphatpulvers mit hochreaktivem Magnesiumoxid erreicht werden. Die dadurch erzielte hohe Strukturgenauigkeit ermöglichte die Darstellung von makroporösen Strukturen mit einem minimalen Porendurchmesser von ca. 200 μm . Gute mechanische Kennwerte der gedruckten Strukturen, sowie eine hohe Umsetzungsrate zur gewünschten Phase Struvit wurden durch eine Nachhärtung in Ammoniumphosphatlösung erhalten. Dabei konnte die Druckfestigkeit um das 40-fache auf > 20 MPa und der Phasenanteil von Struvit um weitere 40 % auf einen Maximalwert von insgesamt 54 % gesteigert werden. Die simultane und unidirektionale Verstärkung der Matrix mit Glasfasern während des Drucks wurde demonstriert. Die in dieser Arbeit verwendeten Bioglasfasern stellten sich aufgrund der Löslichkeit im basischen pH-Bereich für dieses Materialsystem zwar als ungeeignet heraus, zeigten jedoch die Umsetzbarkeit einer anisotropen Faserverstärkung durch den Druckprozess. Die Darstellung von wirkstoffmodifizierten Calciumphosphat- und Magnesiumphosphatstrukturen durch Verwendung eines Mehrfarbendruckers wurde beginnend vom Design der Strukturen bis hin zur

experimentellen Bestimmung der Korrelation von Farbinformation und Binderapplikation etabliert. Zur Sicherstellung einer hohen Druckqualität und der Ortsständigkeit gedruckter Wirkstoffe erwies sich eine zusätzliche Modifikation des Tricalciumphosphatpulvers mit quellfähigen Polymeren (Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) bzw. Chitosan) als erfolgreich. Die Polymermodifikation der Strukturen erfolgte in zwei unterschiedlichen Ansätzen. Zum Einen wurde das Zementpulver mit Polymerpulver (HPMC) vermischt, so dass eine homogene Polymerverteilung innerhalb der Struktur erzeugt werden konnte. Zum Anderen wurde eine Polymermodifikation mittels lokaler Applikation von Polymerlösungen über die Druckköpfe durchgeführt. Eine maximale Auflösung von ca. 400 μm konnte für eine HPMC/Chitosan/Calciumphosphat-Variante erreicht werden, während das hochreaktive Magnesiumphosphat/Magnesiumoxid-System auch ohne Polymermodifikation eine Auflösung von 480 μm aufwies. Die Ortsständigkeit eingebrachter Lösungen war Voraussetzung für die Steuerung der Freisetzungskinetik. Das Freisetzungsverhalten *in vitro* wurde in Abhängigkeit von der Wirkstofflokalisierung (homogen, Depot, Gradient) innerhalb der Matrix und unter Einbringung zusätzlicher polymerer Diffusionsbarrieren für den Wirkstoff Vancomycin untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Modifikation der Matrices mit Polymeren zu einer verzögerten Freisetzung führte. Die lokale Wirkstoffmodifikation der Matrices in Form eines Depots oder Gradienten hatte Einfluss auf die Freisetzungskinetik, wobei eine lineare Freisetzung mit der Zeit (Kinetik 0. Ordnung) erreicht werden konnte. Die applizierten Wirkstoffe umfassten sowohl niedermolekulare Verbindungen, wie etwa das Antibiotikum Vancomycin oder das Polysaccharid Heparin, als auch proteinbasierte Faktoren wie den Knochenwachstumsfaktor rhBMP-2. Beurteilt wurde die pharmakologische Wirksamkeit der Verbindungen nach dem Druck, sowie nach der Freisetzung aus einer Calciumphosphatmatrix für den Wirkstoff Vancomycin. Es konnte belegt werden, dass die biologische Aktivität nach dem Druckprozess zu über 80 % erhalten blieb. Limitierend war der stark saure pH-Wert bei bruschitbasierten Systemen, der zu einer Inaktivierung des Proteins führte. Diesem Problem könnte durch die Nutzung des neutral abbindenden Magnesiumphosphatsystems entgegengewirkt werden. Zum Anderen konnte in dieser Arbeit die Druckbarkeit von mikropartikulären Suspensionen nachgewiesen werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit sensitive Wirkstoffe in degradierbare Polymerpartikel zu verkapseln, um diese während des Druckprozesses vor äußeren Einflüssen zu schützen.

Abschließend erfolgte eine mikrostrukturelle Charakterisierung der Calciumphosphat- und Magnesiumphosphatmatrices mittels $\mu\text{-CT}$ -Analyse und Heliumpyknometrie, sowie eine quantitative Phasenanalyse nach Rietveld. Hierbei sollte geklärt werden, inwieweit die Nachbehandlungsparameter sich auf die innere Struktur (Porosität, Porengrößenverteilung, spezifische und aktive Oberfläche, geometrische Abmessungen) und die Phasenzusammensetzung auswirkten. Es zeigte sich, dass der Nachhärtungsprozess für beide Materialsysteme, unabhängig von der Nachhärtungsdauer zu einer Reduktion der Porosität und der spezifischen und aktiven Oberfläche führte. Während sich die äußeren Abmessungen vergrößerten

und die Makroporen von Struvitstrukturen durch mineralische Abscheidungen aus dem Nachhärtnungsmedium verkleinerten, zeigten geätzte Brushitstrukturen eine deutliche Vergrößerung der Porendurchmessers, sowie eine Abnahme der äußeren Probenabmessungen. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass mit Hilfe des 3D-Pulverdruck die Darstellung von Makroporen $> 200 \mu\text{m}$ möglich ist. Die Analyse der Phasenzusammensetzung ergab, dass die Umsetzungsrate von Tricalciumphosphat und Trimagnesiumphosphat zu den gewünschten Phasen Brushit und Struvit infolge des Nachhärtnungsprozesses signifikant gesteigert werden konnte. Im Zuge dessen nahm die Porosität der gedruckten Matrices der Phase Struvit von 58 % auf 26 % und der Phase Brushit von 47 % auf 38 % ab.

SUMMARY

Aim of this study was the room temperature fabrication of individually formed structures via 3D-powder printing based on hydraulic bone cements. In addition to the development of a novel cement formulation composed of magnesium phosphate, the simultaneous modification of matrices during the printing process with temperature sensitive and bioactive drugs was an important part of the work. The drug localization within the matrices is hereby correlated with an analogous colour design of the structures, which is physically reproduced by the multi-colour-printer.

The established calcium phosphate system already used for 3D-powder printing has the disadvantage of a strongly acidic setting reaction, which has negative effects on the simultaneous modification with sensitive bioactive agents. To solve this problem a novel bone cement formulation based on magnesium phosphate was established. This cement reacts with ammonium based binder solution within seconds to form the mineral struvite at neutral pH. The raw powder consisting of trimagnesium phosphate was produced by sintering and subsequent dry grinding. The technological properties of the cement powder, including particle size, particle size distribution, spreadability, powder density, and the setting behaviour, were characterized and optimized for the printing process. To meet the technical demands of powder printing it is necessary that the cement powders can be spread into thin and smooth powder layers. Here a crucial parameter was the grinding degree of the powder, whereby monomodal particle size distributions with a narrow range and a d_{50} -value of 20 – 30 μm turned out to be most suitable. One precondition for the printability of dimensionally stable structures was a fast setting reaction ensuring a high localization of the binder. A solidification of the structures within seconds could be achieved by modification of the magnesium phosphate powder with highly reactive magnesium oxide. The thereby obtained high structural accuracy enabled the production of macroporous structures with a minimal pore diameter of approximately 200 μm . Proper mechanical characteristics of the printed structures as well as a high degree of conversion to the struvite phase were achieved by post-hardening in ammonium phosphate solution. The compressive strength could be increased by a factor of 40 to more than 20 MPa and the phase fraction of struvite could be increased by additional 40 % to a maximum value of a total of 54 %. The simultaneous and unidirectional enforcement of the matrix by glass fibres during the printing process was demonstrated. The bioglass fibres used in this work turned out to be unsuitable for this material system due to their high solubility in basic environment; however the principal feasibility of anisotropic fibre enforcement by the printing process was proven.

The fabrication of drug loaded calcium phosphate and magnesium phosphate scaffolds using a multi-colour-printer was established, beginning with the structure design and following the experimental verification of the correlation between the colour information and the applied binder. To guarantee a high accuracy of printing and the localization of the printed drugs, a supplemental modification of the tricalcium

phosphate powder with swellable polymers (hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) or chitosan) was successful. The modification of the scaffolds with polymer was done by two different methods. On one hand the cement powder was blended with the polymer powder (HPMC), which resulted in a homogeneous polymer distribution within the structure. On the other hand the polymer modification was accomplished by a local application of a polymer solution via print heads. A maximum resolution of about 400 μm was achieved by an HPMC/chitosan/calcium phosphate composition, whereas the highly reactive magnesium phosphate/magnesium oxide system showed a resolution of about 480 μm even without polymer modification. The localization of the applied solutions was a prerequisite to control the release kinetics of the drugs. The release kinetic of vancomycin was investigated *in vitro* depending on the drug localization (homogeneous, depot, gradient-like) within the matrix and by adding additional polymeric diffusion barriers. It could be shown that the polymeric modification of the matrices resulted in a delayed drug release. By discrete and depot-like or graded drug distributions within the matrices the release kinetic could be controlled, achieving a linear release with time (zero order release). The administered agents involved both low molecular compounds like the antibiotic vancomycin or the polysaccharide heparin and protein based factors like bone morphogenic factor rhBMP-2. Evaluation of pharmacological activity of the agents after printing as well as after release of vancomycin from a calcium phosphate matrix was determined, indicating that the bulk biological activity of more than 80 % was retained during the printing process. The limiting factor of the brushite based system was the strong acidic pH, which resulted in an inactivation of protein-based bioactives. This problem may be solved by using neutrally setting magnesium phosphate systems. In addition, the printability of microparticle suspensions could be demonstrated in this study. The encapsulation of sensitive agents in degradable polymeric microparticles will protect them from environmental influences during the printing process.

Finally a microstructural characterization of calcium phosphate and magnesium phosphate matrices by $\mu\text{-CT}$ analysis and helium pycnometry as well as a quantitative phase analysis by Rietveld was performed. It should be clarified, in which extent the post hardening procedure influences the internal structure (porosity, pore size distribution, specific and active surface, physical dimensions) and the phase composition of the scaffolds. The post hardening of both material systems resulted in a decrease of porosity, specific area and active surface. While physical dimensions increased and macro pores of struvite samples decreased due to mineral precipitation by immersion in the post hardening solution, brushite structures showed a considerable increase of pore diameter and a decrease of the physical dimensions. It was demonstrated, that 3D-printing allows the manufacturing of macro pores > 200 μm . The analysis of phase composition showed a significant increase of the degree of conversion from tricalcium phosphate or trimagnesium phosphate to the phases brushite or struvite due to the post hardening process. Hence the porosity of the printed matrices decreased from 58 % to 26 % for struvite and from 47 % to 38 % for brushite.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	KENNTNISSTAND	5
2.1	Rapid-Prototyping keramischer Implantate und Scaffolds	7
2.2	3D-Pulverdruckverfahren	7
2.2.1	DOD-System: Bubble-Jet oder thermische Druckköpfe	9
2.2.2	DOD-System: Piezodruckköpfe	9
2.2.3	Materialsysteme für das 3D-Pulverdruckverfahren	10
2.2.4	Anwendung des 3D-Pulverdrucks zur Fertigung von Implantaten und Scaffolds für die Knochenregeneration	13
2.3	Keramische Drug-Release-Systeme für die Knochenregeneration	15
2.3.1	Keramische Materialsysteme für Drug-Delivery-Anwendungen.....	16
2.3.2	Proteinbasierte Wachstumsfaktoren für die Knochenregeneration	17
2.3.3	Metallionen zur Stimulation biologischer Reaktionen.....	18
2.4	Pharmazeutische Modelle der Wirkstofffreisetzung	20
2.4.1	Das Modell von Higuchi	22
2.4.2	Das Korsmeyer-Peppas-Modell	25
2.4.3	Die Weibull-Gleichung	27
3	MATERIAL UND METHODE	28
3.1	Pulversynthesen	28
3.1.1	Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)	28
3.1.2	Calciummagnesiumphosphate ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$).....	28
3.1.3	Verarbeitung der Matrices als Zement	29
3.2	Herstellung von Formkörpern durch 3D-Pulverdruck	29
3.2.1	Funktionsweise des Druckers	29
3.2.2	3D-Druck von Bruschitmatrices mit TCP-Pulver	32
3.2.3	3D-Druck von Struvitmatrices mit MgP-Pulver	33
3.3	Wirkstoffmodifikation	33
3.3.1	Design und Druck von wirkstoffbeladenen Strukturen	33
3.3.2	Visualisierung der Wirkstoffmodifikation gedruckter Strukturen	34
3.3.3	Bestimmung von Wirkstofffreisetzung und biologischer Aktivität	36
3.3.3.1	Wirkstofffreisetzung	36
3.3.3.2	Biologische Aktivitäten.....	36

3.4	Weitere Charakterisierungsmethoden	38
3.4.1	Mechanische Eigenschaften	38
3.4.2	Phasenanalyse durch Röntgendiffraktometrie	40
3.4.3	Porosität und Gefüge	41
3.4.4	Partikelgrößenanalyse durch Laserdiffraktometrie	41
3.4.5	Abbindezeiten	44
3.4.6	Streichtest	45
3.4.7	Schüttdichte	45
3.4.8	Bestimmung des pH-Werts <i>in vitro</i>	45
3.4.9	ICP-Analyse	45
3.4.10	Strukturuntersuchung mittels μ -CT	46
4	PULVERDRUCK VON MAGNESIUMPHOSPHATMATRICES	47
4.1	Synthese von Magnesiumphosphatzementpulvern	48
4.1.1	Partikelgrößenverteilungen und Glättungseigenschaften	48
4.1.2	Abbindezeiten	51
4.1.3	Phasenzusammensetzung der Ausgangspulver und nach Zement- reaktion	55
4.1.4	Mechanische Eigenschaften bei der Verarbeitung als Zement	57
4.2	Drucken von Struvitformkörpern	60
4.2.1	Makroporöse Strukturen	61
4.2.2	Mechanische Eigenschaften und Zusammensetzung der Strukturen ..	63
4.3	Diskussion	66
5	LOKALE WIRKSTOFFMODIFIKATION	72
5.1	Design von wirkstoffbeladenen Strukturen	72
5.2	Steuerung der Freisetzungskinetik am Beispiel Vancomycin	83
5.3	Biologische Wirksamkeit der gedruckten Wirkstoffe	88
5.4	Diskussion	91
6	STRUKTURUNTERSUCHUNGEN AN BRUSCHIT- UND STRUVITMATRICES	100
6.1	Quantitative Phasenanalyse nach Rietveld	100
6.2	Porosität der Matrices	101
6.3	Strukturuntersuchungen mittels μ-CT	103
6.4	Diskussion	108
7	AUSBLICK	112

8	LITERATURVERZEICHNIS	114
9	ANHANG	131
	Abkürzungsverzeichnis	131
	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	134
	Lebenslauf	137
	Eidesstattliche Erklärung	138
	Danksagung.....	139

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die steigende Lebenserwartung, sowie die heutige Lebensweise führen dazu, dass immer mehr Menschen unter Krankheiten oder Schädigungen des Bewegungsapparates (Knochen, Gelenke) leiden. Für den geeigneten Gewebersatz im Bereich des Knochens werden Materialien benötigt, die in ausreichenden Mengen bei gleichbleibender Qualität erhältlich und in der Lage sind Knochendefekte schnell zu regenerieren. Knochengewebe als Stützgewebe des menschlichen Skeletts besteht aus der außen liegenden Knochenhaut (Periost), gefolgt von einer äußeren kompakten Gewebsschicht (Substantia compacta, Corticalis) und der innen liegenden, porösen Spongiosa. In langen Röhrenknochen ist zusätzlich eine Markhöhle (Cavum medullare) ausgebildet. Die Knochenzellen (Osteoblasten, Osteozyten) sind in der Knochenmatrix eingelagert. Diese besteht zu etwa 70 % aus mineralischen Verbindungen, vornehmlich nanokristallinem Hydroxylapatit (HA, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), sowie zu 20 % aus organischen Bestandteilen (Kollagen, Proteoglycane, Osteocalcin) und zu 10 % aus Wasser ^[1]. Das Knochengewebe ist ein selbstheilendes Gewebe, wobei die Regeneration auf kleine Defekte im mm-Bereich limitiert ist. Knochendefekte, die eine kritische Größe von etwa 5 cm^2 überschreiten, müssen mit porösen Platzhaltern gefüllt werden, welche das Einsprossen von Blutgefäßen und Knochengewebe erlauben, aber das Einwachsen von Bindegewebe verhindern ^[2,3].

Goldstandard bei der Versorgung von Knochendefekten ist die Transplantation körpereigenen Knochengewebes (autologes Material) aus Bereichen, in denen ausreichend Substanz vorliegt, beispielsweise dem Beckenkamm ^[4]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Defekte mit allogenen Spendermaterial humanen Ursprungs oder xenogenem Material zu füllen. Nachteilig hierbei ist die Gefahr des Pathogentransfers oder des Auftretens von Immunreaktionen. Um diesen Nachteilen zu begegnen wird vorzugsweise auf synthetische Werkstoffe zurückgegriffen. Diese haben den Vorteil einer unbegrenzten Verfügbarkeit bei gleichbleibender Qualität. Synthetische Knochersatzwerkstoffe entstammen den drei großen Werkstoffgruppen Keramiken, Polymere und Metalle oder deren kompositären Mischungen und sind als Granulate, Formkörper, Gele, Pasten oder Zemente erhältlich. Neben den chemischen und physikalischen Eigenschaften ist es vor allem die Festigkeit der Werkstoffe, die über deren Einsatz im funktionell kraftbelasteten oder unbelasteten Bereich des Skelettsystems entscheidet. Während für kraftbelastete Defekte, z.B. im Bereich der langen Röhrenknochen, hochfeste Materialien wie Metalle (Titanlegierungen, Kobalt/Chromlegierungen, Edelstähle, Aluminium oder Zirkonoxidkeramik) Anwendung finden ^[5], sind für den Einsatz in funktionell nicht kraftbelasteten Defekten, wie etwa im craniomaxillofacialen Bereich, vor allem die bioaktiven Eigenschaften der Werkstoffe von Bedeutung. Neben den prinzipiellen Anforderungen nach Biokompatibilität und dem bindegewebsfreien Anwachsen von Knochen an den Werkstoff wird hier oftmals klinisch eine Resorption des Implantats gefordert. Dabei gelangen vor allem Werkstoffe mit chemischer Ähnlichkeit zum

Knochen zur Anwendung, beispielsweise mineralische Werkstoffe aus Calciumorthophosphaten ^[6,7], Biopolymere wie natives oder denaturiertes Kollagen ^[8], aber auch vollsynthetische Polymere aus degradierbaren Polymilchsäure/Polyglycolsäure-Blends ^[9].

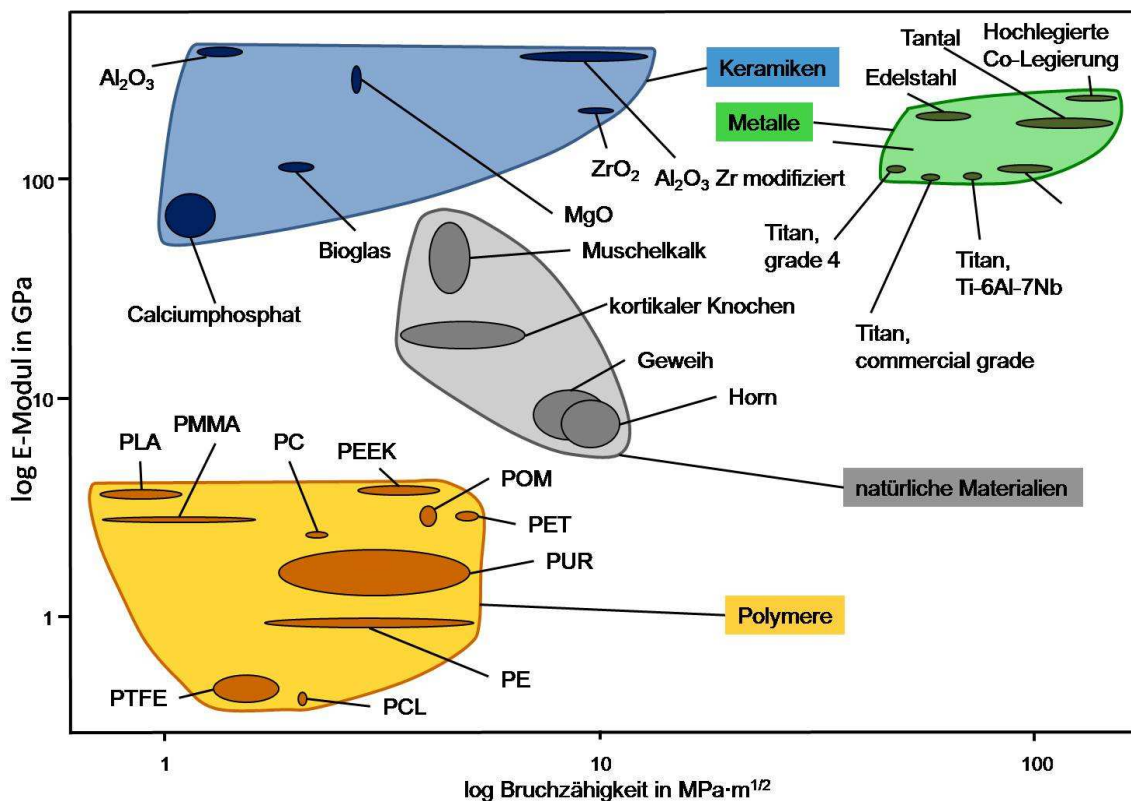


Abbildung 1.1: Mechanische Eigenschaften natürlicher Materialien im Vergleich mit synthetischen Materialien der Medizintechnik. Abbildung umgezeichnet nach ^[10].

Die genannten Werkstoffe sind für geometrisch anspruchvolle und große Defekte - etwa im Bereich der Orbitaregion - nur bedingt geeignet, da eine präzise intraoperative Formgebung durch den Herstellungsprozess der synthetischen Materialien in Form von einfachen geometrischen Körpern (Zylinder, Quader oder Granulat) oder *in situ* härtenden Zementen nur schwer erreichbar ist. Abhilfe würden individuell gefertigte Implantate schaffen, die durch Freiformverfahren zugänglich sind. Hierzu wurde in der Vergangenheit eine Reihe von technischen Verfahren in experimentellen Arbeiten adaptiert. So ist etwa die Fertigung von Calciumphosphatstrukturen über generative Rapid-Prototyping-Technologien ^[11] wie Stereolithographie, CAD-gesteuerte Schmelzextrusion, selektives Lasersintern ^[12] oder 3D-Pulverdruckverfahren ^[13] bekannt. Als vorteilhaft und leistungsfähig hat sich dabei letzteres Verfahren erwiesen, da in kurzer Zeit auch größere Strukturen dargestellt werden können. Das Verfahrensprinzip umfasst dabei die Präparation dünner (100 – 200 μ m) Pulverschichten mit der selektiven Applikation einer Binderflüssigkeit über den Tintenstrahldruck. Durch Überschichtung mit weiteren Pulverlagen und deren Verbindung durch kapillare Diffusion des Binders zwischen den Schichten entsteht ein dreidimensionales Bauteil, das vorteilhaft von nicht abreagiertem Pulver gestützt wird. Die Verfestigung des Bauteils kann durch zwei

unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Beinhaltet die Pulverkomponente ein quellbares Polymer, dann wird durch Aufnahme der Binderflüssigkeit ein Verkleben der einzelnen Partikel erreicht. Gleichzeitig verhindert die Polymerquellung eine zu starke kapillare Verbreitung der Binderflüssigkeit und stellt hierdurch eine laterale Auflösung des Druckverfahrens von etwa 200 µm sicher. Durch nachträgliche Sinterung wird der so gewonnene Grünkörper in eine feste Keramik umgewandelt. Alternativ kann eine hydraulische Abbindereaktion des Pulvers mit der Binderflüssigkeit erfolgen. So führt die Verwendung von Tetracalciumphosphatpulver und einer 25 %igen Citronensäurelösung als Binder zur Ausbildung von Calciumcitrat, die zur Verfestigung der Struktur führen^[14]. Wichtig hierbei ist eine schnelle Abbindereaktion, um ein Verlaufen des Binders durch Kapillarkräfte im Pulverbett zu vermeiden. Alternativ kann auch Phosphorsäure als Binder eingesetzt werden, die mit Tricalciumphosphat- oder Tetracalciumphosphatpulver zu Brushit als Abbindeprodukt reagiert^[15,16], was eine anschließende Temperaturbehandlung unnötig macht.

Allen bisher beschriebenen Verfahren gemein ist die Tatsache, dass zwar die Geometrie des generierten Bauteils kontrolliert werden kann, es aber bisher keine Möglichkeit zur orts aufgelösten Kontrolle der Zusammensetzung gibt. Entscheidend für eine zielgerichtete zelluläre Reaktion auf das Implantat, verbunden mit einer Autoregeneration des Defekts, wäre beispielsweise eine gezielte Ausstattung mit Makroporen und angiogenesefördernden Substanzen zur Bildung von Blutgefäßen in der Struktur. Demgegenüber wäre für diejenigen Strukturbestandteile mit direktem Knochenkontakt die Modifikation mit einem das Knochenwachstum fördernden Protein (z.B. rhBMP-2) wünschenswert (Abbildung 1.2). Bisherige Arbeiten zu diesem Thema folgten prozessbedingt einer nachträglichen Imprägnierung poröser Keramiken mit den genannten Faktoren^[15]. Dieses Vorgehen hat aber den gravierenden Nachteil, dass in der Regel nur das gesamte Implantat mit Wirkstoff modifiziert wird.

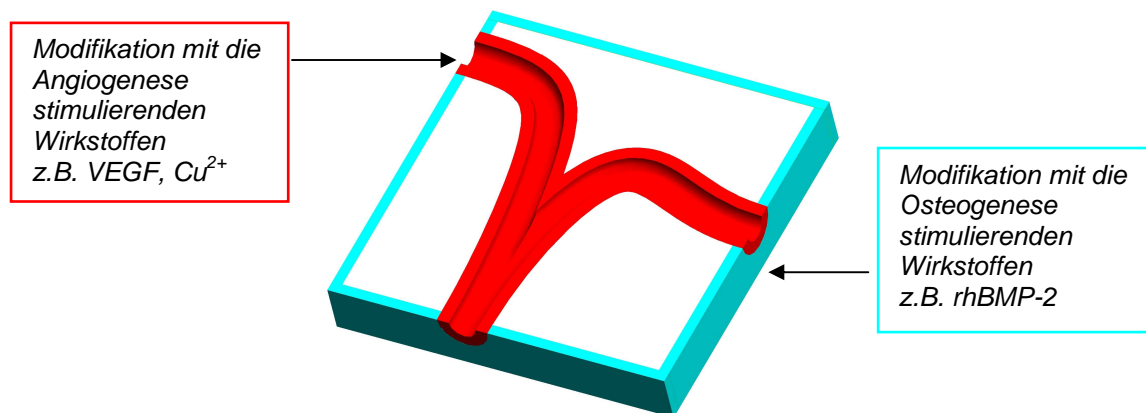


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung einer lokal mit Wirkstoffen modifizierten Porenstruktur zur Steuerung biologischer Reaktionen.

Hierin lag der Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit. Durch die Verwendung von bei Raumtemperatur aushärtenden Knochenzementpulvern sollte die gleichzeitige Ausstattung der Werkstoffe mit temperaturlabilen Verbindungen ermöglicht werden. Die Lokalisation der Wirkstoffe korrelierte dabei mit entsprechenden Farbinformationen im Design der Konstrukte, die durch einen Mehrfarbendrucker entsprechend abgebildet wurden. Die Arbeit gliedert sich dabei in drei Teile:

- 1) Die Entwicklung neuer Knochenzementpulver auf Basis von Magnesiumphosphat (MgP). Diese bilden unter neutralen pH-Bedingungen das Mineral Struvit, das in Vorversuchen als biokompatibel und sehr gut biodegradierbar erachtet wurde. Hierzu wurden Zementpulver aus Trimagnesiumphosphat (Farringtonit) durch Sinterung hergestellt und durch Mahlung auf für den Druckvorgang geeignete Korngrößen angepasst. Zusätzlich wurde hierbei die Möglichkeit erprobt, die Matrix simultan während des Drucks unidirektional mit Fasern zu verstärken.
- 2) Die Darstellung von wirkstoffmodifizierten Strukturen durch Verwendung eines Mehrfarbendruckers, beginnend vom Design bis hin zur experimentellen Bestimmung der Korrelation von Farbinformation und Binderapplikation. Die applizierten Wirkstoffe umfassten dabei sowohl niedermolekulare Verbindungen, wie etwa das Antibiotikum Vancomycin, als auch proteinbasierte Faktoren wie den Knochenwachstumsfaktor rhBMP-2. Beurteilt wurde dabei sowohl die pharmakologische Wirksamkeit der Verbindungen nach dem Druck und der Freisetzung aus der Matrix, als auch die Freisetzungskinetik in Abhängigkeit von der Wirkstofflokalisierung (homogen, Depot, Gradient) und zusätzlichen polymeren Diffusionsbarrieren.
- 3) Abschließend erfolgte eine tiefgreifende mikrostrukturelle Charakterisierung verschiedener Matrices; geklärt werden sollte hier, inwieweit Nachbehandlungsparameter sich auf die innere Struktur (Porosität, Porengrößenverteilung, spezifische und aktive Oberfläche, geometrische Abmessungen) auswirken. Diese Informationen sind wichtig, um die gesamte Prozesskette der Herstellung präfabrizierter Implantate für eine weiterführende klinische Anwendung zu validieren, um letztendlich eine Implantation im Patienten erreichen zu können.

2 KENNTNISSTAND

Rapid-Prototyping-Techniken ermöglichen die Herstellung dreidimensionaler Objekte in einem Schichtverfahren. Hierzu wird ein computergeneriertes dreidimensionales Modell mit mathematischen Methoden (z.B. VRWL/STL-Datensätze) in einzelne Schichten zerlegt, die anschließend durch den Prototyper physikalisch abgebildet werden. Dabei werden die einzelnen Schichten in der xy-Ebene gefertigt und in z-Richtung zusammengefügt bis das gewünschte dreidimensionale Objekt erstellt ist. Unterschiedliche Verfahren arbeiten nach diesem Schichtprinzip:

- Polymerisationsverfahren (Verfestigung flüssiger Ausgangsstoffe); Beispiel: Stereolithographie (SL): Das Prinzip beruht auf dem selektiven Aushärten eines Photopolymers mittels Laserstrahl. Die Prozessierung erfolgt in einem Bad aus Basismonomeren auf einer absenkbaren Bauplattform. Hierfür wird nach jedem Aushärtungsschritt die Plattform um eine Schichtdicke ($> 1 \mu\text{m}$ ^[17,18]) herabgesenkt. Durch sukzessives Wiederholen von Aushärtung und Absenken der Plattform entsteht ein lagenweise aufgearbeitetes dreidimensionales Objekt. Durch die geringe Schichtdicke wird eine hohe Auflösung von bis zu $1 \mu\text{m}$ erreicht ^[19].
- Laminatverfahren (Ausschneiden von Schichten aus Bändern, Platten usw.); Beispiel: Lamine-Object-Manufacturing (LOM): Bei dem LOM wird durch das Ausschneiden und Laminieren einzelner Folien ein dreidimensionales Objekt generiert. In Frage kommen Materialien, die mit Laser, Heißdraht oder Skalpell verarbeitbar sind. Dies können beispielsweise Papier, Kunststoffe, Aluminium oder Keramiken sein. Das Verkleben der einzelnen Schichten wird durch die Aktivierung eines auf jeder einzelnen Schicht aufgetragenen Binders mittels Druck oder Temperatur initiiert. Hierfür wird jeweils eine weitere Schicht einer Endlosfolie mittels beheizbaren Rollen über die Trägerplattform geführt und mit dem darunter liegenden Schichtobjekt verbunden. Mit einem Laser bzw. Skalpell wird die oberste Schicht entsprechend der jeweiligen Kontur zugeschnitten. Die Herstellung von Hohlräumen ist mit diesem Verfahren allerdings nur begrenzt möglich ^[20].
- Sinterverfahren (An- bzw. Aufschmelzen von vorverdichteten Pulvern); Beispiel: Selektives Lasersintern (SLS): Als Ausgangsstoffe dienen Polymer-, Polymer/Keramik- oder Metallpulver ^[21]. Diese werden mit Hilfe einer Walze in dünnen Schichten ($76 - 100 \mu\text{m}$) ^[22] aus einem Vorratsraum in einen Bauraum übertragen. Durch lokal begrenzte Laserbestrahlung wird das Pulver gesintert oder aufgeschmolzen und es kommt zu einem Verschmelzen der Pulverpartikel unter Schrumpfung des Grünkörpers. Anschließend wird der Bauraum um eine Schichtdicke abgesenkt und der Vorratsraum angehoben, so dass die Walze eine weitere Schicht in den Bauraum übertragen kann. Durch mehrmaliges Wiederholen des Sinterprozesses und des Pulverübertrags entsteht ein dreidimensionales Objekt, welches nach der Fertigung von nichtprozessiertem

Pulver befreit werden muss. Um die Festigkeit des Grünkörpers zu steigern erfolgt nach der Herstellung im Schichtverfahren meistens ein weiterer Sinterschritt, womit Festigkeitswerte von ca. 15 MPa erreicht werden. Die über SLS hergestellten Strukturen weisen eine hohe Porosität mit interkonnektierender Porenstruktur auf. Die Porengröße ist durch die Partikelgröße auf kleine Poren im Größenbereich von 45 – 100 μm ^[22] beschränkt und kann über den Energieeintrag des Lasers gesteuert werden. Als problematisch und als der die Auflösung limitierende Faktor ist das Herauslösen unreaktierter Pulverpartikel aus den Porenstrukturen zu betrachten. Die hohen Prozesstemperaturen begrenzen die Ausgangsmaterialien vor allem im Bereich der Polymere auf thermisch stabile Pulver.

- Extrusionsverfahren (Plastifizierung schmelzbarer Ausgangsstoffe); Beispiel: Fused-Deposition-Modeling (FDM): Ausgangsstoffe für das FDM sind thermoplastische Kunststoffe wie beispielsweise Poly- ϵ -caprolacton (PCL) ^[23], Polyethylen, Komposite aus Polymeren und Keramiken wie PCL/HA, PCL/TCP oder Polypropylen/TCP ^[24,25] oder Keramiken mit polymeren Bindern wie HA sowie Polymethylmethacrylat (PMMA). Diese werden in einem Heizelement aufgeschmolzen und über eine in xy-Richtung freibewegliche Düse extrudiert. Der Aufbau einer Materialschicht erfolgt durch das Aneinanderlagern dünner Materialschnüre ($\varnothing = 260 - 700 \mu\text{m}$) ^[23], welche sich durch Abkühlen verfestigen. Das dreidimensionale Konstrukt entsteht durch sukzessives Aufschichten einzelner Lagen (Schichtdicke 250 – 370 μm) ^[26,27] in z-Richtung mit alternierender Auftragungsrichtung. Großer Vorteil dieser Methode ist das Fehlen einer Stützstruktur, so dass auch kein Überschussmaterial aus den Porenstrukturen entfernt werden muss. Das Auflösungsvermögen von etwa 250 μm wird somit vornehmlich durch den Fadendurchmesser begrenzt. Dies erlaubt die Herstellung interkonnektierender Porenstrukturen mit Porendurchmessern von etwa 160 μm und Porositäten von bis zu 77 % ^[23]. Die von Zein et al. nach dieser Methode hergestellten PCL-Strukturen erreichen Festigkeiten von bis zu 77 MPa, wobei diese herstellungsbedingt eine Anisotropie aufwiesen. Nachteilig sind die Beschränkung der Materialien auf Thermoplaste und die hohen Prozesstemperaturen, sowie das Fehlen eines natürlichen mikroporösen Gefüges, wie es bei Keramiken zu finden ist.
- Pulverdruckverfahren (Verkleben von Pulvern oder Granulaten mit einem Binder); Beispiel: 3D-Drucken (3DP): Das Verfahren des 3DP beruht auf der Technologie des Tintenstrahldrucks und bedient sich einer breiten Palette an Ausgangsmaterialien. Hierbei handelt es sich um Materialsysteme bestehend aus einem wässrigen oder organischen, reaktiven Binder und einem Pulver oder Granulat aus Polymeren, Keramiken, Metallen oder deren kompositären Mischungen, welche mit dem Bindemittel aushärten. Die Herstellung der Strukturen erfolgt durch lokale Applikation des Binders über einen Druckkopf auf dünne Pulverschichten. Durch wiederholtes Überschichten und Bedrucken der einzelnen Pulverschichten wird ein dreidimensionales Objekt generiert (Kap. 2.2).

2.1 Rapid-Prototyping keramischer Implantate und Scaffolds

Rapid-Prototyping-Verfahren gewinnen zunehmend an Bedeutung ^[28-31], um geometrisch anspruchsvolle Individualimplantate mit komplexen Strukturen für den Knochenersatz oder Scaffolds für das Tissue-Engineering (TE) zu fertigen, ohne auf organische, z.B. xenogene Ausgangsstoffe zurückgreifen zu müssen. Die Herstellung von Implantatstrukturen kann entweder direkt oder indirekt erfolgen. Zu den indirekten Verfahren gehört beispielsweise die Stereolithographie. Chu et al. ^[32] produzierten auf diese Weise Epoxidharzformen mit Kanälen, in die eine fließfähige Hydroxylapatitacrylatsuspension eingegossen wurde. Durch thermische Behandlung bei 85 °C verfestigte sich die Suspension. Anschließend wurden Acrylatbinder und Epoxidharzform durch Pyrolyse entfernt und der HA-Grünling gesintert. Es konnten Knochenersatzwerkstoffe aus HA mit zusammenhängenden Kanälen und Durchmessern von 0,4 – 1,0 mm und Porositäten von 26 – 52 % hergestellt werden. Aussagen über Festigkeitswerte wurden in dieser Arbeit nicht gemacht; im Vordergrund stand die Gestaltung von Kanälen für das Einwachsen der Zellen. Xiang et al. erstellten mit diesem Verfahren Negativformen aus Epoxidharz; in diese wurde ein selbsthärtender Calciumphosphatzement eingegossen und das Harz anschließend pyrolysiert ^[33]. Wird die Gerüststruktur aus einem löslichen Werkstoff gefertigt, kann auf die anschließende Temperaturbehandlung verzichtet werden ^[34].

Zu den literaturbekannten direkten Verfahren zur Herstellung von Calciumphosphatstrukturen gehört das selektive Lasersintern lagenweise aufgetragener Hydroxylapatitsuspensionen, ohne allerdings den direkten Nachweis zu erbringen, dass die Methode zu klinisch verwendbaren Implantatstrukturen führt ^[35]. Weitere Verfahren sind etwa das FDM ^[23,24] oder der 3D-Pulverdruck ^[13,36-38]. Daneben kann auch die Stereolithographie als direktes Verfahren zur Herstellung dreidimensionaler Strukturen genutzt werden, was beispielsweise für die Herstellung von Aluminiumoxidformkörpern gezeigt werden konnte ^[39] und auf das Materialsystem HA/CaP übertragbar sein sollte.

2.2 3D-Pulverdruckverfahren

Mit Hilfe des 3D-Pulverdruckverfahren wird ein dreidimensionales Modell ausgehend von einem Pulver oder Pulvergemisch und einem Binder, der durch eine Druckerpatrone auf die Partikel gesprüht wird, geformt (Abbildung 2.1). Das Ausgangsmaterial liegt als Pulver oder Granulat vor und bildet ein Pulverbett. In dieses wird der flüssige Binder mittels eines oder mehrerer Ink-Jet-Düsenköpfe eingespritzt, wodurch die Pulverkörner miteinander verkleben. Hierbei werden sowohl die Elemente einer Schicht generiert, als auch die aktuelle Schicht mit den darunterliegenden Schichten verbunden. Anschließend senkt sich die Bauplattform um eine Schichtdicke (100 - 200 µm), und eine neue Pulverschicht wird mittels einer Walze aufgetragen. Das nicht benetzte Pulver verbleibt im Bauraum, stützt das Bauteil und wird nach Beendigung des Bauprozesses abgeblasen.

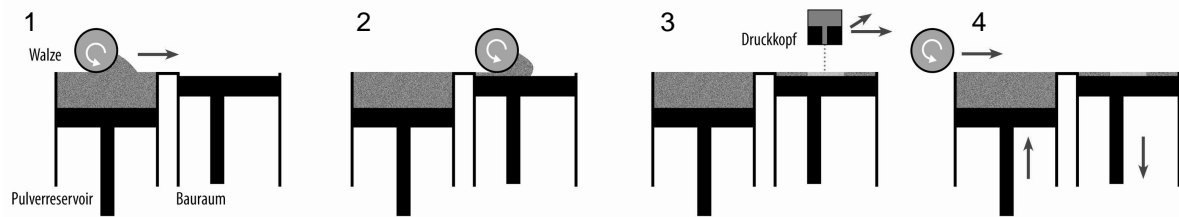


Abbildung 2.1: Einzelschritte bei der generativen Fertigung im 3D-Pulverdruck. Eine Walze überträgt eine dünne Pulverschicht aus dem Pulverreservoir in den Bauraum (1- 2). Über einen Druckkopf wird lokal Binderflüssigkeit auf das Pulver aufgebracht, so dass es zur lokal begrenzten Aushärtung des Pulvers kommt (3). Durch Wiederholung der Teilschritte 1-3 kommt es zur Verbindung und Aushärtung übereinander liegender Schichten und letztendlich zur generativen Fertigung eines dreidimensionalen Objekts (4). Abbildung umgezeichnet nach ^[10].

Die geringe Festigkeit der Bauteile macht entweder eine Infiltration mit Epoxidharz oder Wachs oder eine Sinterung des Grünkörpers notwendig. Pulver, das außerhalb der Struktur liegt, klebt infolge von Kapillarwirkung an den gedruckten Konturen. Dadurch werden die Bauteile ungenau und weisen eine raue Oberfläche auf. Auch die hohe Ausfallrate der Düsen und damit ein großes Ausfallrisiko für den Druckkopf zählen zu den Nachteilen dieser Methode. Zu den Vorteilen des 3DP gehört die hohe Spannbreite an Materialvariationen von Pulvern und Bindern. Des Weiteren ist es möglich, über den Druckkopf unterschiedliche Binder in einem Bauprozess zu verwenden, und somit lokal unterschiedliche chemische oder physikalische Bauteileigenschaften zu realisieren. Neben wasserbasierten Systemen können auch Polymere ^[40,41] oder komplexe Makromoleküle wie Proteine oder lebende Zellen ^[42,43] in Trägerflüssigkeiten als Binder verwendet werden. Untersuchungen von Boland et al. zeigten, dass die Temperaturen der über Druckköpfe applizierten Flüssigkeiten auch im Bubble-Jet-Verfahren nur etwa um 4 - 10 °C gegenüber der Umgebungstemperatur ansteigen, was die Applikation von Zellsuspensionen ermöglicht ^[44]. Hierfür wurden primäre Neuronen, Endothelzellen ^[45] und mesodermale Stammzellen QCE-6 über einen HP-Druckkopf in Hydrogele (Kollagen, Alginate/Gelatine) eingedruckt und die Scaffolds anschließend kultiviert. Alle Zelltypen behielten ihre Vitalität und die Fähigkeit zur Differenzierung.

In generativen Fertigungsanlagen werden Druckköpfe verwendet, die für die professionelle 2D-Drucktechnik, insbesondere für das Großformatdrucken auf Papier und Folie entwickelt wurden. Hierbei kommen vor allem Ink-Jet-Systeme, die nach dem Drop-On-Demand-Prinzip (DOD), aber auch solche, die nach dem Continuous-Ink-Jet-Verfahren (CIJ) arbeiten, zum Einsatz. Durch Zufuhr von äußeren Impulsen wird beim DOD-System jeweils ein Tropfen Tinte auf das Druckziel geschleudert. Bei dem CIJ-System wird hingegen ein Tintenstrahl, bestehend aus vielen Einzeltropfen erzeugt. An Stellen, die nicht bedruckt werden sollen, wird der Tintenstrahl durch Anlegen einer elektrischen Spannung abgelenkt. Anwendung finden vor allem zwei unterschiedliche DOD-Systeme, die thermischen oder Bubble-Jet-Druckköpfe und die Piezodruckköpfe ^[46].

2.2.1 DOD-System: Bubble-Jet oder thermische Druckköpfe

Der Druckkopf besteht aus einem Tintenreservoir, welches durch eine Kapillare mit den Druckkanälen verbunden ist. Auf einem Druckkopf sind mehrere hundert Druckkanäle mit einem Durchmesser von ca. 20 – 100 μm untergebracht ^[47,48]. Das Tintenreservoir wird über ein Heizelement (Temperatur ca. 300 $^{\circ}\text{C}$) elektrisch beheizt ^[49], was zur Bildung von Dampfblasen (Bubble) und damit zu einer Verdrängung eines definierten Volumens Tinte führt (Abbildung 2.2A), wodurch die Tinte aus den Druckkanälen herausgepresst wird. Dabei wird die Tinte mit einer Geschwindigkeit von bis zu 10 m/s und einer Tropfenfrequenz von ca. 1 cm^3/min ^[41] auf das Pulverbett gespritzt ^[43]. Das Volumen eines Tintentropfens beträgt etwa 4 – 30 pl und kann über die Beheizung variiert werden.

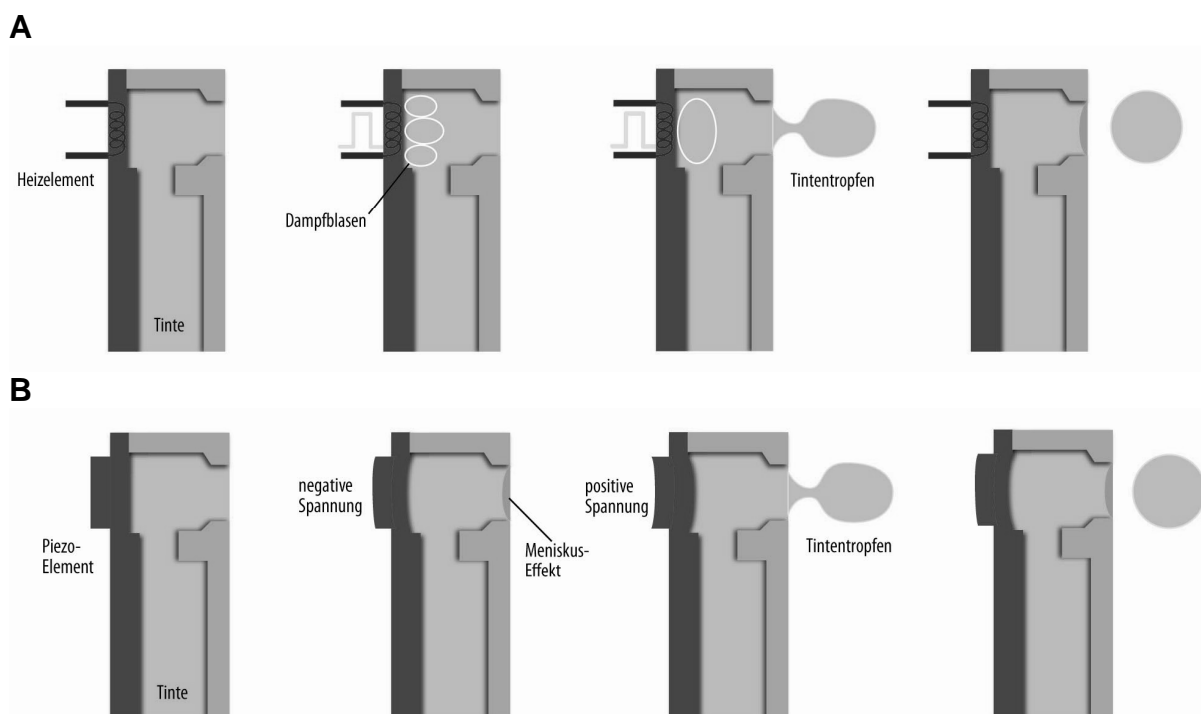


Abbildung 2.2: thermischer Tintendruck (A): Ein Heizelement verdampft die Tinte, die dadurch aus der Düse geschleudert wird. Piezodruck (B): Der Piezokristall drückt auf eine Membran, die einen Tintentropfen aus der Düse schleudert. Abbildung umgezeichnet nach ^[50].

2.2.2 DOD-System: Piezodruckköpfe

Die Piezotechnik basiert auf dem Prinzip der mechanischen Volumenverdrängung mittels eines Piezoelements (Abbildung 2.2B). Dieses ist hinter jeder Druckdüse angebracht und liegt im spannungslosen Zustand als ebenes Plättchen vor. Bei negativer Spannung nimmt es eine zum Tintenkanal konkave, bei positiver Spannung eine konvexe Stellung ein. Der hierdurch ausgeübte Druck auf die Flüssigkeit führt zum Austritt von einer dem verdrängten Flüssigkeitsvolumen entsprechenden Menge an Tinte. Über die angelegte Spannung kann die Tropfengröße reguliert und schnell variiert werden. Die Tintenkanäle weisen einen

Durchmesser von 20 – 50 μm auf, woraus ein Tropfenvolumen im Bereich einiger 100 pl resultiert, wobei die Tropfgeschwindigkeit bei 1 – 5 m/s liegt ^[47,51]. Zudem ist ein unabhängiges Vorheizen des Fluids möglich. Durch das Anlegen einer negativen Spannung an den Piezoquarz wird im Tintenkanal ein Unterdruck erzeugt, wodurch die Tinte an der Düse leicht zurückgezogen wird. Dieser sogenannte Meniskus-Effekt bewirkt eine Vorspannung der Tropfenoberfläche, die den Austritt des nächsten Tropfens begünstigt und zugleich die Bildung von Sekundärtropfen unterdrückt. Ein typischer Piezodruckkopf besitzt aufgrund des Platzanspruches der Piezoelemente und deren Steuerungseinheit weniger Düsen (50 - 200) als ein thermischer Druckkopf. Piezodruckköpfe sind robuster aber auch teurer als thermische Druckköpfe, so dass sie in der Regel nicht ausgetauscht werden, sondern bei optimaler Justage im Drucksystem fest installiert vorliegen ^[52]. Des Weiteren ermöglicht die Piezotechnik die Verarbeitung von thermisch empfindlichen sowie hochviskosen Flüssigkeiten und Bindern.

2.2.3 Materialsysteme für das 3D-Pulverdruckverfahren

Für die Scaffoldherstellung mit Hilfe des pulverbasierten 3DP müssen sowohl das Pulver und die Binderflüssigkeit als auch deren Interaktion grundsätzlichen Anforderungen genügen. Das Abstreichen dünner Pulverschichten mit einer Walze setzt eine gute Streichfähigkeit des Pulvers voraus. Diese ist abhängig von der Partikelgröße und der Partikelform. Die minimale Auflösung entspricht nach Cima für ein auf Polymeren basierendes System in etwa der doppelten Partikelgröße ^[53]. Die minimal einsetzbare Partikelgröße ist aufgrund der Tendenz kleiner Partikel Agglomerate zu bilden begrenzt, so dass ein Kompromiss zwischen Streichfähigkeit und Auflösungsvermögen gefunden werden muss. Die Partikelgröße ist auch für das spätere Entstauben der Strukturen entscheidend. Die minimale noch zu entstaubende Porengröße entspricht in etwa dem 5-fachen der Partikelgröße, wobei dieser Wert mit der Komplexität der Kavitäten steigt ^[54].

Die Eigenschaften des Binders müssen so abgestimmt werden, dass die Binderlösung zum Einen kompatibel mit dem Druckkopf ist und zum Anderen eine gute chemische Reaktivität mit dem Pulver aufweist. Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung, Oberflächenspannung und Viskosität stellen die kritischen Parameter der Binderlösung dar ^[40]. Kommerzielle Tinten bestehen aus polymeren Mikroemulsionen oder Pigmentdispersionen. Zu den Inhaltsstoffen zählen des Weiteren wasserlösliche Bestandteile wie Glycerin oder Glykol, Tenside wie etwa Natriumdodecylbenzolsulfonat, deionisiertes Wasser, Konservierungsstoffe und Puffersysteme zur pH-Wert-Regulierung ^[41]. Die Oberflächenspannung kommerzieller HP-Tinten liegt für Farbtinten bei ca. 30 mN/m und für schwarze Tinte bei 46,2 mN/m. Die Viskosität befindet sich mit Werten von 2 – 9 cP über der Viskosität von Wasser (0,935 cP bei 23 °C), während die Dichte mit Werten von 1007 – 1089 kg/m^3 der Dichte von Wasser (997 – 1000 kg/m^3) nahekommt ^[55]. Die Applikation von Lösungen über die feinen Kanäle eines Druckkopfs erlaubt ausschließlich die Anwendung geringviskoser Binderflüssigkeiten. Deshalb ist es von

Vorteil Binderlösungen zu verwenden, die erst durch den Kontakt mit dem Pulver aushärten. Dies kann durch einfaches Trocknen der Flüssigkeit auf dem Pulver geschehen, durch eine chemische Reaktion oder durch eine Vernetzung, wobei es zur Aushärtung des Binders durch Lichteinwirkung, Temperatur-, pH-Wert- oder Konzentrationsänderungen kommt ^[56-60].

Eine optimale Interaktion zwischen Pulver und Binder ist durch eine schnelle Abbindereaktion, eine gute Benetzbarkeit des Pulvers und durch die Ortsständigkeit des Binders gegeben. Die Benetzbarkeit ist von der Viskosität des Binders, der Topographie der Pulveroberfläche und dem Kontaktwinkel zwischen Binder und Pulver abhängig. Laut Stamm et al. ^[61] spricht man von Benetzbarkeit bei einem Kontaktwinkel $< 90^\circ$, wobei eine perfekte Benetzbarkeit mit einem Kontaktwinkel um 0° entspricht. Der Zusatz von Ethanol reduziert den Kontaktwinkel und die Oberflächenspannung zwischen Tinte und Pulver ^[62]. Außerdem führt Ethanol zur Reduktion der Hitzekapazität des Binders. Zuviel Alkohol im Binder beeinflusst jedoch die Blasenformation, was den Druckprozess behindert. Der optimale Alkoholgehalt einer Tinte liegt im Bereich von 20 – 40 % ^[62]. Die Lokalisation des Binders wird durch eine hohe Schüttdichte des Pulvers begünstigt, die durch Verringerung der Porosität zur Reduktion der Kapillarkräfte führt. Ein Zerfließen des Binders wird beispielsweise durch Modifikation des Pulvers mit Polymeren verhindert, wobei es durch die Quellung des Polymers zu einer schnellen Aufnahme der Binderflüssigkeit kommt.

Eine Übersicht über die in der Literatur beschriebenen Materialsysteme für den 3D-Pulverdruck ist Tabelle 2.1 zu entnehmen. Kommerziell werden für das 3DP polymermodifizierte Gipspulver oder Cellulosepulver verwendet, die nach Besprühen mit der Binderlösung anquellen und die Struktur verfestigen ^[63,64]. Alternativ kann die Aushärtung des Bauteils während des Druckvorgangs auch hydraulisch durch eine chemische Reaktion zwischen Binderflüssigkeit und Pulver stattfinden, wie etwa für das Materialsystem Zinkoxid/Magnesiumoxid und Polyacrylsäurebinder beschrieben ^[65]. Experimentell wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Materialsystemen für den 3D-Pulverdruck entwickelt. Zur Anwendung kommen Polymere (synthetisch oder natürlich), Keramiken oder deren kompositäre Mischungen. Natürliche Polymere wie Stärke, Dextrose, Cellulose, Kollagen oder Hyaluronsäure sind hydrophil und werden mit wasserbasierten Bindern kombiniert. Hydraulisch abbindende Keramiken wie beispielsweise Calciumsulfat-Hemihydrat (Gips), α -TCP oder TTCP werden in Kombination mit säurehaltigen Bindern (Phosphorsäure oder Citronensäure) eingesetzt. Die Verfestigung von Calciumphosphatstrukturen kann während des Druckvorgangs durch eine Zementabbindereaktion erfolgen. Beispielsweise führt die Verwendung von TTCP-Pulver und einer 25 %igen Citronensäurelösung als Binder zur Ausbildung von Calciumcitrat, die zur Verfestigung der Struktur führen ^[14]. Wichtig hierbei ist eine schnelle Abbindereaktion, um ein Verlaufen des Binders durch Kapillarkräfte im Pulverbett zu vermeiden. Alternativ kann auch Phosphorsäure als Binder eingesetzt werden, die mit TCP- oder TTCP-Pulver zu Brushit als

Abbindeprodukt reagiert, was eine anschließende Temperaturbehandlung unnötig macht ^[15,16,38]. Die Verwendung von bei Raumtemperatur aushärtenden Zementen ermöglicht die gleichzeitige Ausstattung der Werkstoffe mit temperaturlabilen Verbindungen, etwa knochenwachstumsfördernden Proteinen ^[34]. Allerdings ist hierbei der niedrige pH-Wert der Binderlösung (pH < 2) bei Bruschtzementen als problematisch anzusehen. Eine Alternative stellen Magnesiumphosphatzemente dar, die mit ammoniumhaltigen Bindern unter neutralen Bedingungen zu Magnesiumammoniumphosphat-Hexahydrat (Struvit) aushärten (siehe Kap. 4).

Tabelle 2.1: Übersicht über experimentelle Materialssysteme für den 3D-Pulverdruck.

Pulver (Partikelgröße)	Binder	Abbindereaktion	Nachbehandlung Festigkeiten Auflösung
Natürliche Polymere			
Stärke (10 µm), Dextran (> 100 µm), Gelatine (> 100 µm) ^[63]	H ₂ O	Polymerquellung/ Sinterung	100 °C 1 h; Polymerinfiltration 75 % PLA, 25 % PCL; CS < 2 MPa k. A.
60 % Stärke, 15 % Maltodextrin, 5 % Cellulose, 20 % Gelatine (20 – 200 µm) ^[66]	H ₂ O	Polymerquellung	Infiltration mit TEGDMA/Bis- GMA/UDMA; CS = 1,7 – 14,0 MPa k. A.
Synthetische Polymere			
5,5 – 8,5 % Polyacrylsäure, ZnO bzw. ZnO/MgO (25 – 125 µm) ^[65]	85 % H ₂ O 10 % 2-Propanol 5 % Glycerin 1 % Na-dodecylsulfat	hydraulische Abbindereaktion von Zn ²⁺ mit Polyacrylsäure	Keine Nachbehandlung notwendig CS = 20,3 MPa k. A.
PMMA (80 – 100 µm) ^[67]	Maltodextrin, Polyvinylalkohol	Polymerquellung	Infiltration mit TEGDMA /Bis- GMA/UDMA bei 105 °C 30 min, anschließend Aushärtung bei 120°C, 30 min; CS = 6 – 32 MPa k. A.
PLA (75 – 150 µm) ^[68]	100 % Chloroform	Polymerquellung	k. A.
UHMWPE, Maltodextrin (100 – 150 µm) ^[69]	H ₂ O	Polymerquellung/ Sinterung	180 °C, 15 min; CS = 0,2 – 4,3 MPa k. A.
PCL/PEO (45 – 150 µm) ^[70]	5/20 % PCL in CHCl ₃	k.A.	k.A.
Metalle			
Ti, Al, Fe, Zr (< 270 µm) ^[71]	auf Wasserbasis	Sinterung	400 °C 90 min, Sinterung: 1250 °C, 150 min unter Argon-Atmosphäre CS = 11,3 – 15,3 MPa E-Modul = 2,4 – 3,3 GPa k. A.
TiNiHf (5,5 – 150 µm) ^[72]	17 wt% Polyacrylsäure	Polymeraushärtung/ Sinterung	170 °C, 1 h; CS = 0,035 – 0,315 MPa; Auflösung: 300 µm
Ti (60 µm) ^[73]	5,8 M AgNO ₃	Sinterung	450 °C, 1 h unter Argon-Atmosphäre zur Ausbildung von Silberbindungen, anschließende Sinterung bei 1150 – 1300 °C k. A. k. A.
Komposite			
β-TCP, Bioactives Glas (SiO ₂ , Na ₂ CO ₃ , CaCO ₃ , CAHPO ₄), (d ₅₀ = 41 µm) ^[74]	1 M H ₃ PO ₄ , 1 M H ₄ P ₂ O ₇ , 20 % Isopropanol	hydraulische Abbindereaktion	Sinterung bei 1000 °C; CS = 14,9 MPa; Auflösung: 50 µm
HA (3 – 5 µm), Maltodextrin (90 – 100 µm) ^[75]	94,5 % H ₂ O 2,5 % Glycerin 3 % Rest	Polymerquellung, Sinterung	1300 °C, 1h/5 h; CS = 0,7 – 1,5 MPa k. A.

Pulver (Partikelgröße)	Binder	Abbindereaktion	Nachbehandlung Festigkeiten Auflösung
Keramiken			
β -TCP (30 – 60 μm) ^[76]	5 – 30 % H_3PO_4	hydraulische Abbindereaktion	Nachhärtung 3 x 30 sec in 20 % H_3PO_4 , Sinterung: 1100 – 1300 °C 5 h; CS = 25 – 45 MPa k. A.
β -TCP (d_{50} = 16 μm) ^[77]	25 % Oxalsäure und Weinsäure	k.A.	k.A.
HA Granulat, 5 % PEG (69 – 106 μm) ^[78]	5 % PVA	Polymerquellung/ Härtung	k.A.
TTCP, β -TCP, Calciumsulfat < 100 μm ^[14]	25 % Citronensäure	hydraulische Abbindereaktion/ Sinterung/ Polymerinfiltration	1000 – 1400 °C, 6/24 h bzw. Polymerinfiltration mit DLM-1 und 2- Hydroxyethylmethacrylat und Aushärtung bei 110 °C, 1 h; CS = 0,1 – 4,3 MPa; Auflösung: 500 μm
α -TCP (d_{50} = 10 μm) ^[79]	5 % Na- Chondroitinsulfat 12 % Dinatrium- succinat 83 % H_2O	k.A.	k.A.
CaP-Granulate (HA, TCP) (32 – 57 μm) ^[80]	20 % Dextrin 2,5 % Saccharose	k.A.	1250 °C, 2 h; CS = 0,6 – 2,2 MPa Auflösung: 150 – 770 μm
Al_2O_3 (2,5 – 30 μm) ^[81]	20,8 wt% Siliciumoxid in Ethylenglykol 1:1 mit H_2O	Sinterung	1000 °C k. A. k. A.

2.2.4 Anwendung des 3D-Pulverdrucks zur Fertigung von Implantaten und Scaffolds für die Knochenregeneration

Scaffolds dienen Zellen als temporäre extrazelluläre Matrix und stimulieren die Geweberegeneration durch die Darstellung einer spezifischen biomimetischen Umgebung. Die biologische Aktivierung von Knochenmaterialien ist deshalb eines der wichtigsten Anliegen auf dem Gebiet der Knochensubstitution. Als Knochenersatzmaterial stehen drei Hauptkategorien von Werkstoffen zur Verfügung: Keramiken, Polymere und Komposite. Die Tabelle 2.2 zeigt die Vor- und Nachteile der verschiedenen Materialssysteme auf.

Der optimale Scaffold für das Knochen-Tissue-Engineering bietet nicht nur ein strukturelles Fundament für das Gewebewachstum, sondern wirkt osteokonduktiv und fördert die Angiogenese. Entscheidend für eine erfolgreiche Zellbesiedelung, Gewebseinsprossung und Vaskularisierung ist die mikroporöse Struktur der Scaffolds^[82], gemäß dem Prinzip: „Die Kunst des Scaffolding liegt in der Platzierung von Poren, Biofaktoren und Zellen“^[83]. Das Scaffolddesign als Schlüsselfaktor im Knochen-Tissue-Engineering stellt mehr als nur eine passive Komponente dar. Durch das Zusammenspiel von mechanischen Eigenschaften und Wirkstofffreisetzung, sowie durch die Degradation des Scaffolds lässt sich das Zell- und Gewebewachstum steuern. Optimal ist eine mesoporöse Gestaltung der Scaffolds. Nach Karageorgiou et al.^[84] sind Makroporen > 50 μm entscheidend für die Osteogenese, während Mikroporen < 10 μm zu einer hohen spezifischen Oberfläche

und somit zu einer gesteigerten Aufnahmekapazität von Knochenmorphogenen führen und den Ionenaustausch für die Ausbildung einer knochenähnlichen Apatitschicht ermöglichen.

Tabelle 2.2: Eigenschaften verschiedener Werkstoffe für den Knochenersatz.

Material	Vorteile	Nachteile
anorganisch		
Calciumphosphat (HA, TCP)	biokompatibel, osteokonduktiv, ausreichende mechanische Stabilität	geringe Degradationsrate, spröde und brüchig
Biogläser und Glaskeramiken	biokompatibel, osteokonduktiv, einstellbare Resorption, Angiogenese fördernd, ausreichende mechanische Festigkeiten	geringe Degradationsrate, spröde und brüchig
organisch		
volumendegradierbare Polymere: PLA, PGA, PLGA, Polypropylen	biokompatibel, einstellbare Degradationsrate, bioresorbierbar	Entzündungsreaktionen aufgrund saurer Degradationsprodukte möglich, geringe Festigkeiten
Oberflächendegradierbare Polymere: Polyorthoester, Polyanhydride, Polyphosphazene	biokompatibel, Aufrechterhaltung mechanischer Eigenschaften möglich	kein vollständiges Remodelling
Komposite		
organisch-anorganisch (siehe oben)	biokompatibel, osteokonduktiv, einstellbare Degradationsrate, verbesserte mechanische Eigenschaften	komplexe Herstellung

Die Einheilung von Langzeitimplantaten hängt entscheidend von der Zusammensetzung und den physikalischen und chemischen Eigenschaften der eingebrachten Biomaterialien ab ^[85]. Neben der grundsätzlichen Forderung nach Biokompatibilität sollen Knochenimplantate der neuen Generation aufgrund ihres chemischen und strukturellen Designs bioaktive Eigenschaften besitzen, die denen des natürlichen Knochens nachempfunden sind, so dass anwendungsortspezifische Implantat-Gewebe-Interaktionen induziert werden können. Die Anwendungsgebiete bioaktiver Materialien im Bereich des Hartgewebersatzes reichen hierbei von der kraftschlüssigen Einbindung von Dauerimplantaten, etwa Hüftimplantaten mit Hydroxylapatitbeschichtungen ^[86,87], bis hin zu resorbierbaren Knochenimplantaten aus osteokonduktiven Calciumphosphaten ^[88]. Dabei ist es nicht nur erforderlich eine Immunreaktion zu vermeiden, sondern auch das Zellwachstum und eine Geweberegeneration zu stimulieren. Gemäß Hutmacher ^[89] sollten Scaffolds für die Knochenregeneration folgende Hauptcharakteristika erfüllen:

- biokompatibel und bioresorbierbar mit kontrollierbarer Degradationsrate.
- geeignete Oberflächenchemie, die eine Anlagerung, Proliferation und Differenzierung von Zellen ermöglicht.

- dreidimensionales, interkonnektierendes Porengerüst für Zellwachstum und Flüssigkeitstransport zur Nährstoffversorgung und zum Abtransport von Abbauprodukten.
- identische mechanische Eigenschaften wie das zu ersetzende Gewebe. Die relative Dichte des Knochens beträgt $1,3 - 2,1 \text{ g/cm}^3$ [90]. Das Zusammenspiel aus harter Knochensubstanz und dessen Aufbau als Porenstruktur verleiht Knochen seine einzigartigen mechanischen Eigenschaften als hochfestes und zugleich dehnbare Material bei minimalem Gewicht. Die Kombination aus Kollagen (E-Modul: $1 - 2 \text{ GPa}$, Biegefestigkeit: $50 - 1000 \text{ MPa}$) und keramischer Calciumphosphatmatrix (70 % des Knochens, E-Modul: 130 GPa , Biegefestigkeit: 100 MPa) machen Knochen zu einem äußerst belastbaren Gewebe. Druckfestigkeit und E-Modul von kortikalem Knochen liegen bei $100 - 230 \text{ MPa}$ bzw. $3 - 30 \text{ GPa}$, bei spongiösem Knochen liegen die Werte bei $2 - 12 \text{ MPa}$ bzw. $50 - 100 \text{ MPa}$ [90,91].
- hohe Porosität von $35 - 60 \%$ um einen ausreichenden Flüssigkeitsaustausch für Nährstofftransport und Zellmigration zu gewährleisten [75,90]. Optimale Porengrößen zur Knochenregeneration *in vivo* liegen bei $50 - 1000 \mu\text{m}$ [84,92,93], wobei für die Osteogenese *in vitro* eine um eine Größenordnung geringere Porengrößenverteilung als *in vivo* nötig ist.
- nicht toxische Degradationsprodukte
- Sterilisierbarkeit
- Freisetzung bioaktiver Moleküle oder Wirkstoffe zur besseren Einheilung.

2.3 Keramische Drug-Release-Systeme für die Knochenregeneration

Bei Hartsubstanzdefekten, die eine kritische Größe nicht übersteigen, ist Knochen in der Lage sich selbst zu regenerieren. Die Neubildung von Knochengewebe ist ein komplexer Prozess, an dem Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren beteiligt sind [94]. Um die Einheilung von Knochenersatzmaterialien zu induzieren, werden im Knochen-Tissue-Engineering verschiedene Ansätze wie die Transplantation von Zellen oder die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Trägerstrukturen verfolgt [95-97]. In mehreren Studien konnte belegt werden, dass Transplantationen von zellbesiedelten Scaffolds eine höhere Osteointegration aufwiesen und somit ein schnelleres Anwachsen von Knochengewebe im Vergleich zu nicht zellbesiedelten Scaffolds zeigten [98-100]. Nachteilig erwies sich hierbei die längere Wartezeit des Patienten auf das Transplantat während der Zellkultivierung. Eine vielversprechende und schnelle Möglichkeit transplantierbare Scaffolds herzustellen besteht darin, mesenchymale Stammzellen (MSC) oder Osteoblasten *in vivo* über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus den Scaffolds zur Anlagerung, Proliferation und Differenzierung anzuregen. Die Kombination aus physikalischen Stimuli wie z.B. Porosität und Drug Delivery bietet neue synergetische Effekte im Knochen-Tissue-Engineering.

Die Modifikation von Implantaten mit Additiven ermöglicht eine direkte und somit optimale Applikation von Wirkstoffen im zu behandelnden Gewebe. So genannte Drug-Delivery-Systeme haben gegenüber der systemischen Gabe des Wirkstoffs den Vorteil der signifikant geringeren benötigten Substanzmenge, so dass sie weniger toxisch auf den Empfängerorganismus wirken. Dies führt zu einer Reduktion von Nebenwirkungen und gewährleistet die Sicherheit der medikamentösen Behandlung [101]. Des Weiteren ist die lokale Freisetzung der Wirkstoffe durch eine höhere Wirkstoffkonzentration im betroffenen Gewebe effizienter, wodurch die Behandlungsdauer verkürzt werden kann. Besonders im Bereich des Knochens ist der Einsatz von kontrolliert wirkstoffabgebenden Systemen vorteilhaft. Die lokale Therapie von Knocheninfektionen ist aufgrund der unzureichenden Erreichbarkeit des Anwendungsortes bei systemischer Wirkstoffgabe indiziert. Da Knochen ein sehr kompaktes und schlecht durchblutetes Gewebe ist, ist die Diffusion von Wirkstoffen in das Skelettsystem stark eingeschränkt. Während die Blut-Knochen-Barriere kontraproduktiv für die systemische Therapie ist, gewährt sie bei lokaler Behandlung einen Schutz des Körpers gegen hohe lokale Wirkstoffkonzentrationen, wodurch unerwünschte Nebeneffekte reduziert werden. Im klinischen Einsatz befinden sich Drug-Delivery-Systeme aus Polymeren wie PMMA, Polymilchsäure (PLA) und Polyglycolsäure (PGA) sowie aus keramischen Werkstoffen wie Calciumphosphat (CaP), Aluminiumoxid und Siliciumcarbid. Sowohl die Trägerwerkstoffe als auch im Falle von biodegradierbaren Systemen deren Degradationsprodukte müssen einen hohen Grad an Biokompatibilität besitzen. Des Weiteren müssen die Materialien Möglichkeiten der Inkorporation und der Freisetzung von Wirksubstanzen aufweisen, ohne deren biologische Wirksamkeit zu beeinflussen. Die Einbindung der Wirkstoffe kann in porösen Netzwerken oder über eine chemische Bindung erfolgen. Im Falle von porösen Trägersystemen erfolgt die Freisetzung reversibel gebundener Wirkstoffe diffusionskontrolliert, während irreversibel gebundene Wirkstoffe durch Degradation der Werkstoffe freigesetzt werden.

2.3.1 Keramische Materialsysteme für Drug-Delivery-Anwendungen

Keramische Knochenersatzmaterialien auf Basis von Calciumphosphaten wirken aufgrund ihrer dem Knochen ähnlichen chemischen und strukturellen Eigenschaften osteokonduktiv und bioaktiv. Bekannt sind HA, β -TCP, biphasische Calciumphosphate in Form von Pasten, Zementen, Granulaten oder Formkörpern. Eine Auswahl bisheriger Arbeiten zu keramischen Drug-Delivery-Systemen ist in Tabelle 2.3 zusammengefasst.

Tabelle 2.3: Wirkstoffbeladene keramische Drug-Release-Systeme.

Matrix	Typ	Wirkstoff	Eigenschaften	Ref.
α -TCP/DCPA/ CaCO ₃ /HA α -TCP/TTCP/ DCPA HA	Zement	TGF- β 1, rhBMP-2	Wachstumsfaktoren für die Stimulation des Knochenwachstums am Anwendungsort	[102-107]

Matrix	Typ	Wirkstoff	Eigenschaften	Ref.
α -TCP β -TCP/ MCPM	Zement	Antibiotika (Vancomycin, Gentamicin, Tetracyclin)	antimikrobielle Eigenschaften zur Vermeidung postoperativer Infektion bzw. zur Behandlung von Osteomyelitis	[108,109]
TTCP/DCPA/ CaO	Zement	Indomethacin	entzündungshemmender Wirkstoff	[110,111]
TTCP/ DCPA	Zement	6-Mercaptopurin	Chemotherapeutikum	[112]
TCP	Granulat	Insulin, TGF- β , rhBMP-2	Hormon, Wachstumsfaktoren	[113-115]
HA HA/Glas	Keramik	Pentoxifyllin, Vancomycin, Ampicillin	antimikrobielle Eigenschaften	[116-119]
amorphe CaP	Keramik	Vancomycin	antimikrobielle Eigenschaften	[120]
HA	Keramik	Ibuprofen Hydrocortison Na- Succinat	entzündungshemmender Wirkstoff	[121]
HA	Granulat	Ampicillin Gentamycin	antimikrobielle Eigenschaften	[122]
β -TCP	Keramik	Gentamycin	antimikrobielle Eigenschaften	[123]
HA	Keramik	cis-Platin	Chemotherapeutikum	[124]
HA	Nanopartikel	rhBMP-2	Wachstumsfaktor	[125]
α -TCP	Zement	rhBMP-2, rh-bFGF, VEGF	Wachstumsfaktoren	[126,127]
SiO ₂ /CaP	Nanoartikel	5-Fluorouracil	Chemotherapeutikum	[128]

2.3.2 Proteinbasierte Wachstumsfaktoren für die Knochenregeneration

Als problematisch ist die im Allgemeinen sehr geringe Halbwertszeit (1 – 4 h) und Instabilität der biologischen Moleküle zu betrachten ^[129], wodurch eine systemische Applikation grundsätzlich auszuschließen ist. Eine Steigerung der Osteoinduktivität wird durch Inkorporation von Wachstumsfaktoren ^[130-132] wie BMP ^[133], bioaktiven Proteinen wie Fibronectin ^[134], Vitronectin ^[135] oder Thrombin ^[136] oder Biopolymeren wie Kollagen Typ-I ^[137] erreicht. Calciumphosphatzemente in Form von stabilen Körpern oder injizierbaren Pasten stellen ein effektives Freisetzungssystem für Wachstumsfaktoren dar. Hierfür werden die Proteine entweder durch Adsorption ^[138,139] oder in Form von Polymilchsäure/Polyglykolsäure- (PLGA) ^[140] oder Gelatinemikrokapseln ^[141] in die Zementformulierung eingebracht. Zur erfolgreichen Regeneration von Knochen ist die Versorgung des Gewebes bzw. des Implantats mit essentiellen Nährstoffen notwendig. Dies geschieht zum Einen durch laminaren Flüssigkeitsaustausch mit der biologischen Umgebung über das poröse Gefüge des Materials, zum Anderen über eine Neovaskularisierung des Werkstoffs. Angiogenese fördernde Eigenschaften erhält ein Biomaterial durch die Wahl einer offenen, interkonnektierenden Porosität, durch die Besiedelung mit Endothelzellen (Zellen, die für die Auskleidung von Blutgefäßen zuständig sind) oder durch die Angiogenese stimulierende Wachstumsfaktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ^[127,142]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von VEGF aus CaP-Formulierungen zur Vaskularisierung und somit zum Knochenwachstum führt ^[135]. Da Heparin in der Lage ist Knochenwachstumsfaktoren zu binden, brachten

einige Gruppen Heparin in PLGA-Scaffolds ein, um zugesetzte Wachstumsfaktoren zu immobilisieren und deren Freisetzung zu verzögern ^[143,144]. Nachfolgende Tabelle gibt eine Auswahl an osteogen wirkenden Wachstumsfaktoren wieder:

Tabelle 2.4: Eine Auswahl an Wachstumsfaktoren, die an der Knochenneubildung beteiligt sind.

Wachstumsfaktor	Funktion
Wachstumshormone (z.B. Parathyroid ^[145])	Knochenneubildung, Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten, Stimulation der Osteoklastenaktivität ^[146]
Bone morphogenetic protein (BMP)	Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) und Knochenvorläuferzellen, ektopische Knochenbildung ^[147]
Transforming growth factor- β (TGF- β)	Induktion, Proliferation und Differenzierung von MSC und Knochenvorläuferzellen, Produktion extrazellulärer Matrix, Angiogenese und entzündungshemmende Eigenschaften ^[148]
Insulin growth factor (IGF)	Proliferation und Migration von MSC und Knochenvorläuferzellen, Knochenneubildung und Mineralisation ^[149]

2.3.3 Metallionen zur Stimulation biologischer Reaktionen

Nachteilige Aspekte finden sich im Fall der Proteinmodifikation von Biomaterialien neben dem hohen Kostenfaktor sowohl in der aufwändigen Handhabung der Proteine als auch in den schwierigen Sterilisations- und Lagerbedingungen solcher biologisch modifizierter Materialien. Eine alternative Möglichkeit zur Verbesserung der Implantatintegration und der Steuerung der Gewebereaktionen bietet das Einbringen geringer Mengen bioaktiver, anorganischer Ionen, etwa Magnesium oder Zink, in das Implantat ^[135,150]. Aktuelle Studien beschäftigten sich mit dem Mechanismus der biologischen Wirksamkeit von Metallionen und deren Einsatz in Biomaterialien ^[151-158]. In sehr geringen Konzentrationen kommen Metallionen als Spurenelemente im menschlichen Körper vor und sind meist essentiell für viele biologische Funktionen, wie beispielsweise für die Aufrechterhaltung und Regulation der Zellfunktion oder für die Aktivierung oder Hemmung enzymatischer Prozesse ^[159]. Tabelle 2.5 zeigt die biologische Wirksamkeit verschiedener Metallionen im Bereich des Knochens. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Metallionen in der Lage sind, unterschiedliche Zelltypen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen oder Mastzellen in Abhängigkeit von ihrer Konzentration zu beeinflussen und eine spezifische Proteinausschüttung in den Zellen zu induzieren ^[160-162]. Die Metallionen wirken hierbei als katalytische Co-Faktoren. Über die Phagozytose durch Makrophagen bzw. mononukleare Phagozyten aktivieren die Ionen verschiedene Zytokine, wie beispielsweise Interleukine und Wachstumsfaktoren, was ein lokales Zellwachstum bzw. eine Zellmigration auslöst ^[163]. Beispiele für metallioneninduzierte, biologische Reaktionen sind etwa die Stimulation der Osteoklastenaktivität (Co), eine Verbesserung der Osteoblastenadhäsion (Mg, Si, V) oder die Angiogenese in porösen Strukturen (Cu, Co, Ni). Des Weiteren konnte eine antimikrobielle Wirkung verschiedener

Metallionen, z. B. von Silber, Kupfer und Zink festgestellt werden ^[164,165]. Durch den Einsatz sehr geringer Ionenkonzentrationen unterhalb der toxischen Dosis können zellschädigende, mutagene oder kanzerogene Wirkungen ausgeschlossen werden ^[166]. Metallionen haben gegenüber organischen Molekülen den Vorteil einer praktisch unbeschränkten Haltbarkeit und einer problemlosen Sterilisierbarkeit. Sie sind zudem kostengünstig und einfach zu handhaben. Der überwiegende Teil der bisher durchgeführten Studien bezieht sich auf polymere Biomaterialien; keramische Werkstoffe aus Calciumphosphaten wurden bislang fast ausschließlich mit Silicium-, Magnesium-, Strontium- oder Zinkionen modifiziert ^[151-153,157,167].

Tabelle 2.5: Übersicht zur biologischen Wirksamkeit von Metallionen.

Metall(ion)	Biologische Wirksamkeit	Signalübertragung
Vanadium	Osteogenese, mitogene Wirkung auf Osteoblasten und Hemmung der Osteoklastenbildung ^[168,169] , antitumorale Eigenschaften ^[170]	Aktivierung von Extracellular Signal Regulated Kinase ^[169,170]
Zink	Osteoblastendifferenzierung ^[153] , entzündungshemmend ^[171] , Hemmung der Osteoklastenbildung ^[171]	Erhöhung phänotypischer Marker von Knochenvorläuferzellen, beeinflusst die ALP Aktivität, Proteinsynthese über Class I Aminoacyl-tRNA-Synthetase- Aktivität und den Kollagengehalt, stimuliert Wachstumsfaktoren ^[156] und Zytokine ^[154]
Mangan	Osteogenese ^[158]	k.A.
Calcium	Osteogenese ^[151,156] , Hemmung oder Aktivierung der Osteoklastenaktivität, Osteoblastenproliferation, Osteoblastendifferenzierung ^[159]	erhöht die extrazelluläre Calciumkonzentration und hemmt somit die Osteoklastenaktivität ^[151]
Magnesium	Osteoblastenadhäsion ^[151,157]	Stimulation der Apatitbildung durch pH-Wert-Erhöhung und Erhöhung der Ca-Konzentration ^[157]
Silicium	Kollagensynthese, Osteogenese, Vaskularisierung ^[155]	pH-Wert-Senkung, stimuliert Osteoklasten ^[154]
Eisen	Osteoklastenstimulation ^[163]	Aktivierung von Osteoklasten stimulierenden Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IL-6) ^[163]
Kupfer	Angiogenese ^[172,173] , antimikrobiell im μ M-Bereich	Aktivierung von proangiogenen Zytokinen (IL-8, VEGF, FGF, Angiogenin)
Cobalt	Angiogenese ^[174-176] , Osteoklastenstimulation ^[163]	VEGF-Stimulation durch HIF-Aktivierung ^[174-176] , Aktivierung von Osteoklasten - stimulierenden Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IL-6) ^[163]
Chrom	Osteogenese; steigert die Osteoklastenaktivität ^[163]	Aktivierung von knochenresorbierenden Zytokinen (IL-1 β , TNF- α , IL-6) ^[163]
Nickel	Angiogenese ^[177] , Osteoklastenstimulation ^[163]	Stimulation der VEGF-Synthese ^[177] , Aktivierung von knochenresorbierenden Zytokinen (NF- κ B, IL-1, IL-6, TNF- α) ^[163]
Strontium	Hemmung der Osteoklastenaktivität, Anregung von Knochenvorläuferzellen mit Beschleunigung der Zelldifferenzierung; fördert die Ausbildung neuer extrazellulärer Matrix ^[167]	Stimulation von Osteoblastenvorläuferzellen, Hemmung der Osteoklastenaktivität, Steigerung der ALP- und Osteopontin-Aktivität ^[167]

2.4 Pharmazeutische Modelle der Wirkstofffreisetzung

In der Pharmazie wird die Freisetzungskinetik mit Hilfe einfacher Modelle beschrieben. Es gibt jedoch kein mathematisches Modell, welches alle an der Freisetzung beteiligten chemischen und physikalischen Prozesse einbezieht. Ausgangspunkt dieser Modelle ist das 1. und 2. Ficksche Diffusionsgesetz, worüber sich grundsätzlich diffusionskontrollierte Transportprozesse beschreiben lassen. Auch die Freisetzung aus Drug-Delivery-Systemen (DDS) lässt sich mit den Fickschen Gesetzen beschreiben. Das 1. Ficksche Gesetz (2.1) beschreibt einen Stofftransport aufgrund eines Konzentrationsgradienten. Die Diffusion des gelösten Wirkstoffs erfolgt über das Porennetzwerk des Matrixbildners. Treibende Kraft ist der zwischen Wirkstoffdepot und Lösungsmittel bestehende Konzentrationsunterschied des Wirkstoffs. Der Massenfluss j ist proportional zum Konzentrationsgradienten $\partial c / \partial x$ und dem Diffusionskoeffizienten D .

$$j = -D \frac{\partial c}{\partial x} \quad (2.1)$$

j = Massenfluss (in $\text{mol/s} \cdot \text{m}^2$)

D = Diffusionskoeffizient (in m^2/s)

$\partial c / \partial x$ = Konzentrationsgradient (in mol/m^4)

Unter Annahme kugelförmiger Moleküle in einem Lösungsmittel der Viskosität η gilt nach der Stokes-Einstein-Beziehung :

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (2.2)$$

k_B = Boltzmann-Konstante (in J/K)

T = Temperatur (in K)

η = Viskosität des Lösungsmittels (in N s/m^2)

r = hydrodynamischer Radius des diffundierenden Teilchens (in m)

Aus der Definition des Diffusionskoeffizienten (2.2) wird ersichtlich, dass durch Variation der Lösungsmittelviskosität und der Molekülgröße des Wirkstoffs die Freisetzungsrates beeinflusst werden kann. Bei der Diffusion aus DDS können durch Einsetzen des effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} die Matriceigenschaften wie die Porosität ε und die Tortuosität τ (Krümmung der Poren) berücksichtigt werden.

$$D_{\text{eff}} = D \frac{\varepsilon}{\tau} \quad (2.3)$$

Das 2. Ficksche Gesetz (2.5) ergibt sich mit Hilfe der Kontinuitätsgleichung (2.4) aus Gleichung (2.1) und beschreibt die zeitliche Änderung der Anfangskonzentration des Wirkstoffs, welcher sich im umgebenden Medium durch Diffusion verteilt.

$$\frac{\partial c}{\partial t} = - \frac{\partial j}{\partial x} \quad (2.4)$$

$$\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial c}{\partial x} \right) \quad (2.5)$$

Die Freisetzung von Wirkstoffen aus Trägersystemen ist durch das Zusammenspiel verschiedener Faktoren sehr komplex. Neben den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Matrix wie spezifischer Oberfläche, Porosität, Tortuosität (Porenwindung), Hydrophilie, Löslichkeit, Molekulargewicht, Geometrie und Degradationsrate ^[178] bestimmen maßgeblich Größe, Molekulargewicht, Löslichkeit und Menge der Arzneistoffe, die Wechselwirkung zwischen Wirkstoff und Trägersubstanz sowie Viskosität und Temperatur des Lösungsmittels den Mechanismus der Wirkstofffreisetzung (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6: Auswirkung verschiedener physikalischer Parameter auf die Freisetzungsgeschwindigkeit aus porösen Matrices.

Freisetzungskinetik bestimmende Parameter	Auswirkung auf die Freisetzung
Sättigungskonzentration des Wirkstoffs c_s	Die Erhöhung der Sättigungskonzentration führt zu einer Erhöhung des Konzentrationsgradienten. Infolge dessen wird Freisetzungsgeschwindigkeit erhöht (1. Ficksches Gesetz).
initiale Wirkstoffkonzentration c_0	Eine Erhöhung der Wirkstoffbeladung verlangsamt die Abnahme des Konzentrationsgradienten. Je größer der Konzentrationsgradient desto schneller erfolgt die Freisetzung eines Wirkstoffs.
Porosität ε Porengröße	Eine Erhöhung der Porosität oder der Porengröße erhöht die Penetration des Lösungsmittels bzw. verringert den Diffusionswiderstand und erhöht somit die Freisetzung.
Tortuosität τ	Eine Erhöhung der Tortuosität führt zu einer Verlängerung des Diffusionsweges und verlangsamt dadurch die Freisetzung.
spezifische Oberfläche der Matrix A	Eine Vergrößerung der mit dem Lösungsmittel in Wechselwirkung tretenden Matrixoberfläche erhöht die Freisetzungsrage.
geometrische Abmessung der Struktur	Je größer die äußere Oberfläche der Struktur ist, desto höher ist der Anteil an leicht löslichen oberflächennahen Wirkstoffmolekülen, was zu einer Steigerung der Freisetzungsrage führt.
Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs D	Eine Erhöhung des Diffusionskoeffizienten bewirkt eine Beschleunigung der Wirkstofffreisetzung. Dabei ist der Diffusionskoeffizient umso größer, je kleiner die Wirkstoffmoleküle sind und je geringer die Viskosität des Lösungsmittels ist.

Zu den die Adsorption und Freisetzung regulierenden Mechanismen zählen Diffusion, Abbauprozesse, Osmose aber auch externe Stimuli wie pH-Wert, Temperatur, Magnetismus, Elektrizität oder Ultraschall ^[130]. Anhand dieser Prozesse ist eine Einteilung der Freisetzungssysteme möglich (Tabelle 2.7). Die Porengröße ist dabei ein Schlüsselfaktor der Adsorption; diese sollte größer als der hydratisierte Wirkstoff sein, um die ungehinderte Diffusion innerhalb der Poren zu erlauben. Des Weiteren ist die spezifische Oberfläche ein entscheidender Faktor für die Beladungskapazität der Werkstoffe. Die Freisetzungskinetik hängt hingegen stark

von der Wirt-Gast-Interaktion ab. Sollen große Biomoleküle adsorbiert werden, müssen die Materialien bestimmte Eigenschaften aufweisen:

- Die Porengröße muss groß genug sein, um die Moleküle durch Diffusion aufzunehmen.
- Die spezifische Oberfläche sollte so groß wie möglich sein, um eine hohe Beladung zu erzielen.
- Ein großes Porenvolumen entspricht einer hohen Beladungskapazität.

Tabelle 2.7: Einteilung von Drug-Delivery-Systemen anhand der Freisetzungskontrolle ^[179].

Freisetzungsmechanismus	System
diffusionskontrollierte Freisetzung	Reservoirsysteme mit Membran Matrixsysteme
chemisch kontrollierte Freisetzung	biodegradierbare Systeme Systeme mit kovalenter Wirkstoffanbindung
lösungsmittelkontrollierte Freisetzung	quellende Systeme osmotisch kontrollierte Systeme

Cauda et al. ^[180] untersuchten in ihrer Studie die Auswirkung der Porenform (zirkular bzw. tubular) und des Porendurchmessers auf die Freisetzung von Ibuprofen aus mesoporösen silikatischen Systemen. Die Studie ergab eine steigende Beladungskapazität und Freisetzung mit ansteigender Porengröße und Porenvolumen. Untersuchungen zur Porenmorphologie zeigten eine wachsende Freisetzung für tubulare Poren mit steigendem Porendurchmesser und eine quantitative Freisetzung des Wirkstoffs innerhalb der ersten 20 min für große Poren. Zirkulare Poren wiesen eine Freisetzungskinetik 1. Ordnung auf, wobei 30 % des Wirkstoffs dauerhaft in der Matrix verblieben.

2.4.1 Das Modell von Higuchi

Ausgehend von den Fickschen Diffusionsgesetzen entwickelte Higuchi 1961 ^[181] ein Modell, welches die Wirkstofffreisetzung aus Suspensionssalben oder planaren Matrices beschreibt, in denen der Wirkstoff homogen dispergiert vorliegt. Das Higuchi-Modell basiert auf folgenden Annahmen:

- Der Wirkstoff ist homogen in der Matrix dispergiert. Dies bedeutet, dass die Wirkstoffkonzentration in der Matrix deutlich größer sein muss als die Sättigungslöslichkeit der Wirksubstanz im Lösungsmittel.
- Die Wirkstoffpartikel sind kleiner als die Dicke der Matrix.
- Es liegt eine inerte Matrix vor. Das heißt, während der Freigabe kommt es zu keiner Veränderung der Matrixstruktur (Porosität, geometrische Abmessungen) durch Quellung, Degradation oder durch Abgabe des Wirkstoffs. Dies entspricht der Annahme eines konstanten Diffusionskoeffizienten innerhalb der Matrix.
- Die Freigabe der Wirksubstanz erfolgt diffusionskontrolliert.

- Im Lösungsmittel herrschen ideale Sinkbedingungen (unbegrenzte Aufnahmekapazität des Freisetzungsmediums).

Der in der Matrix dispergiert vorliegende Arzneistoff geht durch Penetration des Freisetzungsmediums in Lösung. Hierbei kommt es zur Ausbildung einer Wirkstofffront, die den Bereich mit ausschließlich gelöstem Wirkstoff von dem Bereich mit dispergiert und gelöst vorliegendem Wirkstoff trennt. Unmittelbar an der Wirkstofffront wird die Sättigungskonzentration durch den gelösten Wirkstoff aufrechterhalten. Mit fortschreitender Freisetzungsdauer wird die Wirkstofffront von der Oberfläche in das Matrixinnere zurückgedrängt. Die Diffusionsstrecke h , die von den Wirkstoffmolekülen zurückgelegt werden muss, verbreitert sich somit im Laufe der Freisetzungsdauer. Unter Annahme idealer Sinkbedingungen im Lösungsmittel bleibt die Differenz der Wirkstoffkonzentrationen zwischen Wirkstofffront und Matrixoberfläche konstant. Der Konzentrationsgradient nimmt demzufolge ab. Da nach dem 1. Fickschen Gesetz der Konzentrationsgradient direkt proportional zum Wirkstofffluss ist, nimmt die Freisetzungsrate mit zunehmender Freisetzungsdauer ab.

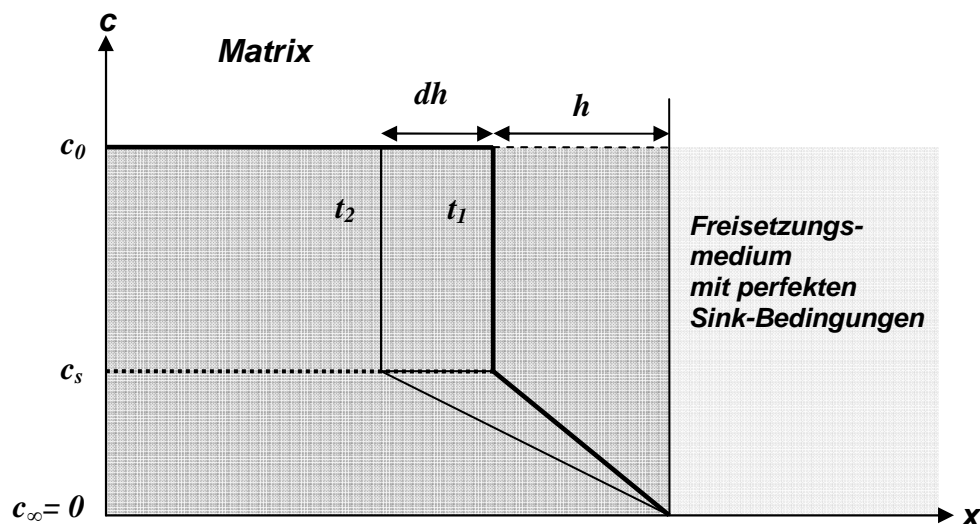


Abbildung 2.3: Konzentrationsgradient des Wirkstoffs in der Matrix in Abhängigkeit des Abstands x zum Freisetzungsmedium. c_s = Sättigungskonzentration des Wirkstoffs im Lösungsmittel innerhalb der Matrix, c_0 = Anfangskonzentration des Wirkstoffs im Lösungsmittel innerhalb der Matrix, c_∞ = Konzentration des Wirkstoffs in der Matrix für $t \rightarrow \infty$, h = Diffusionsstrecke, dh = Verschiebung der Wirkstofffront^[181].

Abbildung 2.3 veranschaulicht die zeitliche Änderung des Konzentrationsprofils eines Matrixsystems unter oben genannten Bedingungen. Aus dem Diagramm wird ersichtlich, dass sich bei einer Verschiebung dh der Wirkstofffront die dabei aufgelöste Wirkstoffmenge dm durch Gleichung (2.6) berechnen lässt. Nach dem 1. Fickschen Gesetz (2.1) gilt:

$$dm = c_0 dh - \frac{1}{2} c_s dh \quad (2.6)$$

$$\frac{dm}{dt} = D \frac{c_s}{h} \quad (2.7)$$

m = Masse des Wirkstoffs pro Fläche (in mol/m²)

c_0 = Anfangskonzentration des Wirkstoffs in der Matrix (in mol/m³)

c_s = Sättigungskonzentration des Wirkstoffs im Lösungsmittel (in mol/m³)

D = Diffusionskoeffizient (in m²/s)

h = Diffusionsstrecke (in m)

Somit ergibt sich:

$$c_0 \frac{dh}{dt} - \frac{1}{2} c_s \frac{dh}{dt} = D \frac{c_s}{h} \quad (2.8)$$

$$dt = \frac{(2c_0 - c_s) \cdot h}{2D \cdot c_s} dh \quad (2.9)$$

Beidseitige Integration ergibt:

$$t = \frac{h^2}{4Dc_s} (2c_0 - c_s) + k \quad (2.10)$$

$$h = 2 \sqrt{\frac{D \cdot t \cdot c_s}{2c_0 - c_s}} \quad (2.11)$$

k = Integrationskonstante (o.E.)

$k = 0$ für Messungen ab $t=0$

Für die zur Zeit t aufgelöste Wirkstoffmenge m_t ergibt sich aus Gleichung (2.12) und Gleichung (2.11) die fundamentale Gleichung des Higuchi-Modells (2.13):

$$m_t = h \cdot c_0 - \frac{h \cdot c_s}{2} \quad (2.12)$$

$$m_t = (2c_0 - c_s) \cdot \sqrt{\frac{D \cdot t \cdot c_s}{2c_0 - c_s}} = \sqrt{D \cdot t \cdot (2c_0 - c_s) \cdot c_s} \quad (2.13)$$

Durch Einsetzen des effektiven Diffusionskoeffizienten D_{eff} (2.3) kann mit Hilfe der Higuchi- Gleichung die Wirkstofffreisetzung aus porösen Matrices beschrieben werden. Aus Gleichung (2.13) ergibt sich somit:

$$M_t = A \cdot \sqrt{\frac{D \cdot \varepsilon}{\tau} (2c_0 - \varepsilon c_s) \cdot c_s \cdot t} = k_H \cdot \sqrt{t} \quad (2.14)$$

$$\tau = \left(\frac{l_{eff}}{l} \right)^2 \quad (2.15)$$

M_t = kumulativ freigesetzte Wirkstoffmenge zum Zeitpunkt t (in mol)

A = Oberfläche der Matrix (in m^2)

ε = Porosität (o.E.)

τ = Tortuosität (Krümmung der Poren) (o.E.)

l_{eff} = effektive Länge des Diffusionswegs durch poröse Schicht (in m)

l = Dicke der Diffusionsschicht (in m)

c_0 = Anfangskonzentration des Wirkstoffes in der Matrix (in mol/m^3)

c_s = Sättigungslöslichkeit des Wirkstoffes (in mol/m^3)

t = Zeit (in s)

k_H = rezepturabhängige Proportionalitätskonstante (in mol/s)

Ausgehend von einem inerten Wirkstoffträger lassen sich die Parameter zu einer rezepturabhängigen Konstante k_H zusammenfassen. Nach Gleichung (2.14) besteht eine Abhängigkeit zwischen Freisetzungsrates und den physikalischen Eigenschaften der Matrix und des Wirkstoffs.

Das Higuchi-Modell verliert seine Gültigkeit sobald die momentane Beladung c_t der Matrix kleiner oder gleich der Sättigungskonzentration c_s des Wirkstoffs ist. Die Wirksubstanz liegt dann nicht mehr dispergiert sondern gelöst vor. Aufgrund der stark idealisierten Voraussetzungen ist die Anwendbarkeit der Higuchi-Gleichung auf 60 % der freigesetzten Wirkstoffmenge begrenzt. So bleibt durch die Annahme idealer Sinkbedingungen im Freisetzungsmedium die Diffusionsschicht zwischen Matrixoberfläche und Lösungsmittel unberücksichtigt. Ebenso wird eine Porositätsänderung durch Herauslösen von Wirkstoffpartikeln vernachlässigt. Des Weiteren ist die Beschreibung der Freisetzungskinetik aus biodegradierbaren oder quellfähigen Systemen mit Hilfe des Higuchi-Modells nur bedingt möglich, da es in diesen Systemen durch Quellung zu einer Änderung des Diffusionskoeffizienten kommt und neben der Diffusion auch Prozesse wie die Degradation die Wirkstoffabgabe steuern. Eine gute Übereinstimmung mit dem Higuchi-Modell ergibt sich für die Wirkstofffreisetzung aus inerten polymeren Matrixsystemen (z.B. PMMA).

2.4.2 Das Korsmeyer-Peppas-Modell

Ausgehend vom 2. Fickschen Diffusionsgesetz (2.5) entwickelten Korsmeyer et al. (1983) und Peppas et al. (1985) ein semiempirisches Modell, welches die Freisetzungskinetik für quellfähige, polymere DDS beschreibt. Im Gegensatz zum Higuchi-Modell berücksichtigen Korsmeyer und Peppas den Einfluss der Polymerquellung und der Polymerdegradation auf die Freisetzung von Wirkstoffen. Das Modell zieht folgende den Stofftransport beeinflussende Prozesse in Betracht:

- Die Existenz eines Konzentrationsgradienten für das Lösungsmittel an der Polymer/Lösungsmittel-Grenzfläche, welcher zu einer Infiltration der Matrix mit Lösungsmittel und somit zur Quellung des Polymers in Abhängigkeit von der Einlagerungsdauer führt. Hierbei muss die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten vom Quellungsgrad des Polymers berücksichtigt werden, da der Diffusionskoeffizient mit steigendem Quellgrad zunimmt.

- Die Quellung der Matrix führt zu einer Vergrößerung der Systemdimension und somit zum Anstieg der Diffusionsstrecke und zu einer Steigerung der Molekülbeweglichkeit.
- Eine hohe initiale Wirkstoffbeladung bewirkt eine Änderung der Matrixstruktur mit zeitlich fortschreitender Freisetzungsdauer (Steigerung der Porosität), so dass der Diffusionswiderstand für das Lösungsmittel in die Matrix und für Wirkstoffpartikel aus der Matrix sinkt.
- Der Konzentrationsgradient des Wirkstoffs gilt als Ursache für die Diffusion.

Das Modell geht außerdem von perfekten Sinkbedingungen, einer homogenen initialen Wirkstoffbeladung und einer im Vergleich zur Wirkstoffdiffusion schnellen Wirkstoffauflösung aus.

Grundlage des Korsmeyer-Peppas-Modells ^[182] ist die Lösung des 2. Fickschen Gesetzes für einen dünnen Film der Dicke δ . Nach Crank gilt ^[183]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \cdot \left(\frac{Dt}{\delta^2} \right)^{1/2} \left[\pi^{1/2} + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (-1)^n \operatorname{ierfc} \frac{n\delta}{2\sqrt{Dt}} \right] \quad (2.16)$$

M_t = kumulative freigesetzte Masse zur Zeit t (in mol)
 M_∞ = kumulativ freigesetzte Masse zur Zeit $t \rightarrow \infty$ (in mol)
 D = Diffusionskoeffizient des Wirkstoffs im Polymer (in m^2/s)
 δ = Dicke des Polymerfilms (in m)

Die Reihe in Gleichung (2.16) konvergiert für kleine t gegen 0, so dass im Fall $M_t/M_\infty < 0,60$ folgende Näherung gilt:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 4 \cdot \left(\frac{D\pi t}{\delta^2} \right)^{1/2} = k' \cdot \sqrt{t} \quad (2.17)$$

k' = Konstante (in $\text{s}^{-1/2}$)

Grundlage dieser Gleichung ist der diffusive Stofftransport aufgrund eines Konzentrationsgradienten (Ficksches Gesetz). Die Korsmeyer-Peppas-Gleichung (2.18) stellt den verallgemeinerten Fall dar und schließt anomale und nicht-Ficksche Diffusion in die Freisetzungskinetik mit ein.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (2.18)$$

k = Kinetikkonstante (in s^{-n})
 n = Freisetzungsexponent (o.E.)

Das Einsetzen des effektiven Diffusionskoeffizienten (2.3) zeigt, dass k von physikalischen Eigenschaften der Matrix und des Wirkstoffs abhängig ist:

$$k \propto \left(\frac{D_{\text{eff}} \pi}{\delta^2} \right) = \left(\frac{k_B T \varepsilon}{\eta r \delta^2 \tau} \right) \quad (2.19)$$

Der Freisetzungsexponent n charakterisiert die verschiedenen Freisetzungsmechanismen, wobei zwischen Fickscher Diffusion (Case I-Transport, diffusionskontrolliert), nicht Fickscher Diffusion (Case II-Transport, quellungs/degradationskontrolliert) und anomalem Transport (Überlagerung von Case I und Case II) unterschieden werden kann (Tabelle 2.8).

Tabelle 2.8: Einteilung der Transportmechanismen in Abhängigkeit vom Freisetzungsexponenten für verschiedene Geometrien des Polymerträgers ^[182].

Freisetzungsexponent n			Freisetzungsmechanismus
dünner Film	Zylinder	Kugel	
$0,50 \leq n$	$0,45 \leq n$	$0,43 \leq n$	Ficksche Diffusion
$0,50 < n < 1,00$	$0,45 < n < 0,89$	$0,43 < n < 0,85$	anomaler Transport
$1,00 \geq n$	$0,89 \geq n$	$0,85 \geq n$	Case II-Transport

2.4.3 Die Weibull-Gleichung

Eine weitere Gleichung die eine Beschreibung der Wirkstofffreisetzung aus DDS ermöglicht, ist durch die Weibull-Funktion (2.20) gegeben ^[184]:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp(-\alpha \cdot t^d) \quad (2.20)$$

M_t = kumulativ freigesetzte Masse zur Zeit t (in mol)

M_∞ = kumulativ freigesetzte Masse für $t \rightarrow \infty$ (in mol)

α = Konstante (o.E.)

d = Konstante (o.E.)

Die Konstante d gibt Auskunft über den Transportmechanismus der Freisetzung (Tabelle 2.9) ^[185]. Das Weibull-Modell eignet sich im Vergleich zum Higuchi- oder Korsmeyer-Peppas-Gesetz zur Beschreibung des gesamten Freisetzungsprozesses und berücksichtigt zudem komplexe sowie kombinierte Freisetzungsmechanismen. Des Weiteren ist die Anwendung dieses Modells unabhängig von der Geometrie der DDS, so dass auch fraktale DDS betrachtet werden können.

Tabelle 2.9: Abhängigkeit der Konstante d in der Weibull-Beziehung vom Freisetzungsmechanismus des Wirkstoffs aus der Matrix.

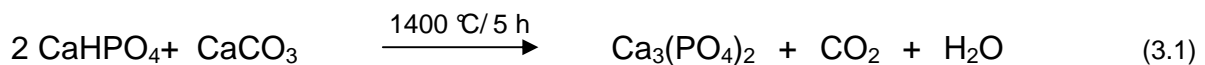
Konstante d	Freisetzungsmechanismus
$d \leq 0,75$	Ficksche Diffusion
$0,75 < d < 1,00$	Kombination aus Fickscher Diffusion Case I und Case II
$d = 1,00$	Freisetzungskinetik 1. Ordnung nach 1. Fickschen Gesetz
$d > 1,00$	komplexer Freisetzungsmechanismus

3 MATERIAL UND METHODE

3.1 Pulversynthesen

3.1.1 Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Die Herstellung von Tricalciumphosphat (α -TCP bzw. α/β -TCP) erfolgte durch Sinterung von Pulvermischungen aus Calciumhydrogenphosphat (DCPA, Baker, Griesheim) für phasenreines α -TCP bzw. DCPA (Merck, Darmstadt) für α/β -TCP und Calciumcarbonat (Merck, Darmstadt) nach Gleichung (3.1).

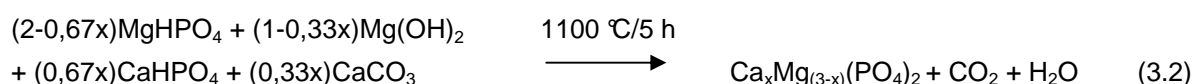


Zur Herstellung von TCP wurden 2,15 mol Calciumhydrogenphosphat und 1,00 mol Calciumcarbonat im Pflugscharmischer (M5R, Gebrüder Lödige, Paderborn) für 1 h vermengt und anschließend bei 1400 °C für 5 h gesintert. Der Sinterkuchen wurde nach Ablauf der Sinterdauer an Luft abgeschreckt, um eine thermische Zersetzung der metastabilen α -TCP Phase im Temperaturbereich von 800 – 1200 °C zu verhindern. Der abgekühlte Sinterkuchen wurde mit dem Mörser manuell zerkleinert, auf eine Korngröße < 355 μm gesiebt und anschließend mit Achatmahlwerkzeugen (Becher 500 ml mit jeweils 4 Kugeln á $\varnothing = 30 \text{ mm}$) in einer Kugelmühle (PM400, Retsch, Haan) aufgemahlen. Feste Mahlparameter waren dabei eine Befüllung der Becher mit je 125 g Pulver und eine Mahlggeschwindigkeit von 200 U/min bei minütlichem Wechsel der Drehrichtung sowie eine Mahldauer von 10 min. Das Pulver wurde abschließend in 1 l-Duranglasflaschen gefüllt und bei 200 °C für 2 h durch trockene Hitze sterilisiert.

Neben dem reinen TCP-Pulver wurde für wirkstoffmodifizierte CaP-Prüfkörper eine mit Hydroxypropylmethylcellulose modifizierte Variante verdruckt. Hierfür wurde das TCP-Pulver mit 10 wt% Cellulose für 10 min im Pflugscharmischer vermischt. Zur Erhöhung der Reaktivität erfolgte anschließend eine Modifikation des HPMC/TCP-Pulvers mit α -TCP im Verhältnis 3:1 im Pflugscharmischer (10 min Mischungsdauer).

3.1.2 Calciummagnesiumphosphate ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$)

Calciummagnesiumphosphate der allgemeinen Zusammensetzung $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ mit $0 < x < 1,5$ wurden durch Sinterung von Pulvermischungen aus Calciumhydrogenphosphat, Calciumcarbonat, Magnesiumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim) und Magnesiumhydroxid (Sigma-Aldrich, Steinheim) in entsprechenden Anteilen (Tabelle 3.1) nach Gleichung (3.2) erhalten.



Die Vermischung der Ausgangspulver erfolgte in einer Kugelmühle (PM400, Retsch, Haan). Hierzu wurden 125 g der stöchiometrischen Mischung für 1 h (Becher 500 ml, 4 Kugeln $\varnothing = 30$ mm) aufgemahlen und anschließend bei 1100 °C für 5 h im Ofen gesintert. Die Zerkleinerung erfolgte zunächst mit Mörser und Pistill, gefolgt von einer Klassifizierung durch Siebung < 160 μm und anschließender Mahlung von jeweils 125 g Pulver bei 200 U/min für einen Zeitraum von 10 min – 4 h. Zur Steigerung der Abbindezeit und Festigkeit der Strukturen wurden die Pulver teilweise mit 25 wt% MgO-Pulver (hochreaktiv, Typ: 2933, Magnesia GmbH, Lüneburg) für 10 min im Pflugscharmischer vermengt.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Pulvermischungen für die Herstellung der Verbindungen der allgemeinen Zusammensetzung $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$.

$\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$	CaHPO ₄ in mol	CaCO ₃ in mol	MgHPO ₄ • 3 H ₂ O in mol	Mg(OH) ₂ in mol
Ca _{1,5} Mg _{1,5} (PO ₄) ₂	1,000	0,500	1,000	0,500
Ca _{0,75} Mg _{2,25} (PO ₄) ₂	0,500	0,250	1,500	0,750
Ca _{0,5} Mg _{2,5} (PO ₄) ₂	0,330	0,170	1,670	0,830
Ca _{0,25} Mg _{2,75} (PO ₄) ₂	0,167	0,083	1,830	0,920
Mg ₃ (PO ₄) ₂	-	-	2,000	1,000

3.1.3 Verarbeitung der Matrices als Zement

Für die Herstellung von $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ -Prüfkörpern als Zementformulierung wurden Zementpasten aus einer pulverförmigen und flüssigen Phase (wässrige Lösung aus 0,75 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,75 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) in einem bestimmten Pulver/Flüssigkeitsverhältnis (PLR) mit einem Spatel angemischt und in die Aussparungen (6 mm x 6mm x 12 mm) einer Silikonform gegossen. Die Gießmasse wurde mit einem Objektträger glattgestrichen und abgedeckt und anschließend für 2 h im Wasserbad (37 °C) zum Abbinden inkubiert. Überstehende Grate der entformten Strukturen wurden durch Abschleifen mit SiC-Schleifpapier entfernt. Zur Steigerung der Festigkeit wurden die Strukturen für 24 h bei 37 °C in einer 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung ausgelagert.

3.2 Herstellung von Formkörpern durch 3D-Pulverdruck

3.2.1 Funktionsweise des Druckers

Die Formgebung der Prüfkörper erfolgte durch den 3D-Drucker Z-Printer 510 der Firma Z-Corporation (Burlington, USA). Das Design der Prüfkörper wurde mit dem Programm Think3 Design® (think3 Inc., Dallas, Texas, USA) erstellt. Die 3D-Daten wurden von der Software des Druckers in ein Schichtmodell zerlegt. Die Schichten wurden nacheinander gedruckt und hatten eine Stärke von 125 μm . Im Nachfolgend soll das Funktionsprinzip des Druckers dargestellt werden:

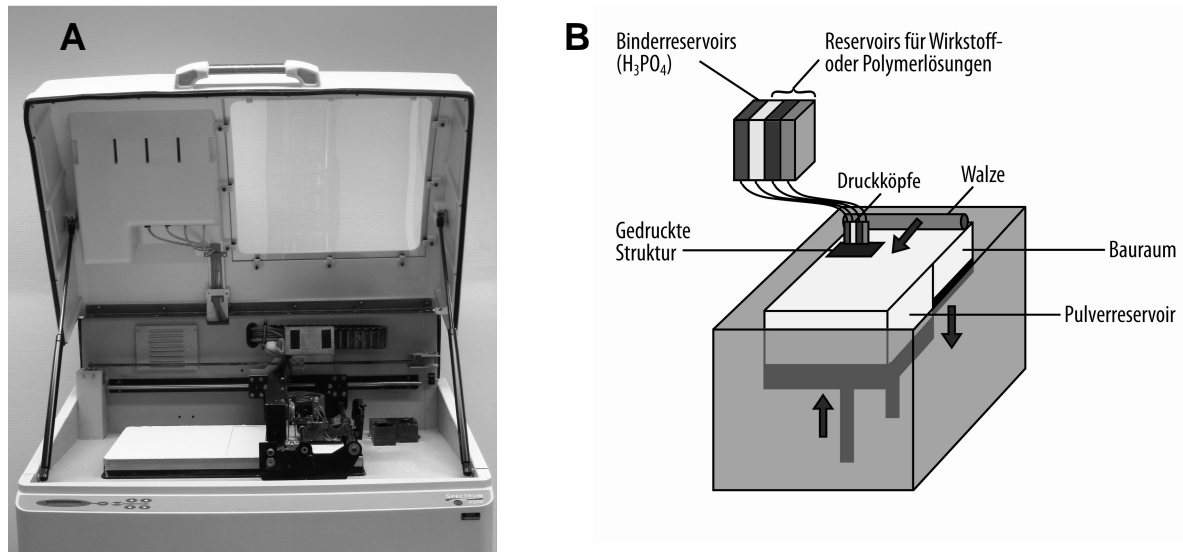


Abbildung 3.1: Drucker ZP-510 (A) und schematische Darstellung des Druckers (B). Der Drucker verfügt über vier Binderreservoirs, die die vier Druckköpfe mit den entsprechenden Lösungen versorgen. Mit einer Walze wird das Pulver in dünnen Schichten vom Pulverreservoir in den Bauraum übertragen, dabei wird das Pulverreservoir um eine Schichtdicke hoch und der Bauraum wird um die gleiche Strecke herunter gefahren. Anschließend fährt der Schlitten mit den Druckköpfen über das Pulverbett und appliziert lokal Binderflüssigkeit, wodurch es zur Aushärtung des Pulvers kommt. Diese Verfahrenskette wird solange wiederholt bis ein dreidimensionales Objekt entstanden ist.

Der Drucker verfügt über zwei Behälter (Zufuhrbehälter und Bauraum, Abbildung 3.1), die mit Pulver befüllt und manuell mit einer Metallplatte verdichtet werden. Der sogenannte Schlitten besteht aus einer Walze und vier Druckerpatronen, und dient dem Übertrag dünner Pulverschichten (100 – 200 µm) aus dem Pulverreservoir in den Bauraum sowie der Glättung der Pulveroberfläche. Zu Beginn des Druckvorgangs wird mit der Walze eine Schicht aus dem Pulverreservoir in den Bauraum übertragen. Beim Zurückfahren über den Bauraum wird mit dem Druckkopf eine Binderlösung auf das Pulver appliziert, wobei umgehend eine Lösungs-/Präziationsreaktion eintritt, die lokal zur Aushärtung der Schicht führt. Anschließend wird das Pulverreservoir automatisch um eine Schichtdicke angehoben und der Bauraum wird um denselben Wert abgesenkt, so dass beim Zurückfahren des Schlittens eine zweite Schicht in den Bauraum übertragen wird. Die Aushärtung der ersten Schicht muss so langsam erfolgen, dass Partikel aus der zweiten Schicht bei der Abbindereaktion der ersten Schicht beteiligt sind und so ein guter Verbund zwischen den Schichten entsteht. Diese Verfahrensschritte (Schichtübertrag und Binderapplikation) werden solange wiederholt bis das gewünschte dreidimensionale Objekt generiert ist. Die Abbindereaktion zwischen Zement und Binderflüssigkeit ist abhängig von den Pulvereigenschaften (u. a. Partikelgröße, Partikelgrößenverteilung) und von der Zusammensetzung sowie der Dosierung des Binders ^[186].

Die verschiedenen Drucklösungen (reaktive Binder, Standardbinder, Wirkstofflösungen, Polymerlösungen) wurden über kommerziell erhältliche HP11-Druckköpfe appliziert. Aufgrund der Inkompatibilität der Druckerfarbe mit dem sauren pH-Wert des säurehaltigen Binders des CaP-System oder der hohen Ionenstärke des

Binders des MgP-Systems konnte der Austausch der Druckflüssigkeiten nicht über die Spülfunktion des Druckers erfolgen. Hierfür wurde ein manuelles Säuberungsverfahren etabliert. Dabei wurde der Deckel der Patrone entfernt, die Tinte verworfen und die Einzelteile des Druckkopfes mit destilliertem Wasser gründlich gespült. Zur vollständigen Entfernung der Tintenrückstände aus dem mit einem Sieb abgedeckten Reservoir im Boden der Patrone, wurde die Patrone mit Wasser gefüllt und auf ein Papiertuch platziert, so dass die Tinte und das Wasser durch die Kanäle abgesogen wurden. Dies wurde solange wiederholt, bis keine sichtbaren Tintenrückstände auf dem Papiertuch erkennbar waren. Anschließend wurde der Druckkopf vollständig mit der jeweiligen Binderlösung gefüllt und mit dem Deckel verschlossen. Des Weiteren war darauf zu achten, dass die Wirkstoff- und speziell die Polymerlösungen mit dem Druckkopf kompatibel waren. Diese mussten zum Einen in Anlehnung an kommerzielle Druckerpatronentinte eine geringe Viskosität aufweisen ($< 5 \text{ mPas}$) und zum Anderen hitzebeständig (bis ca. $80 \text{ }^\circ\text{C}$) sein.

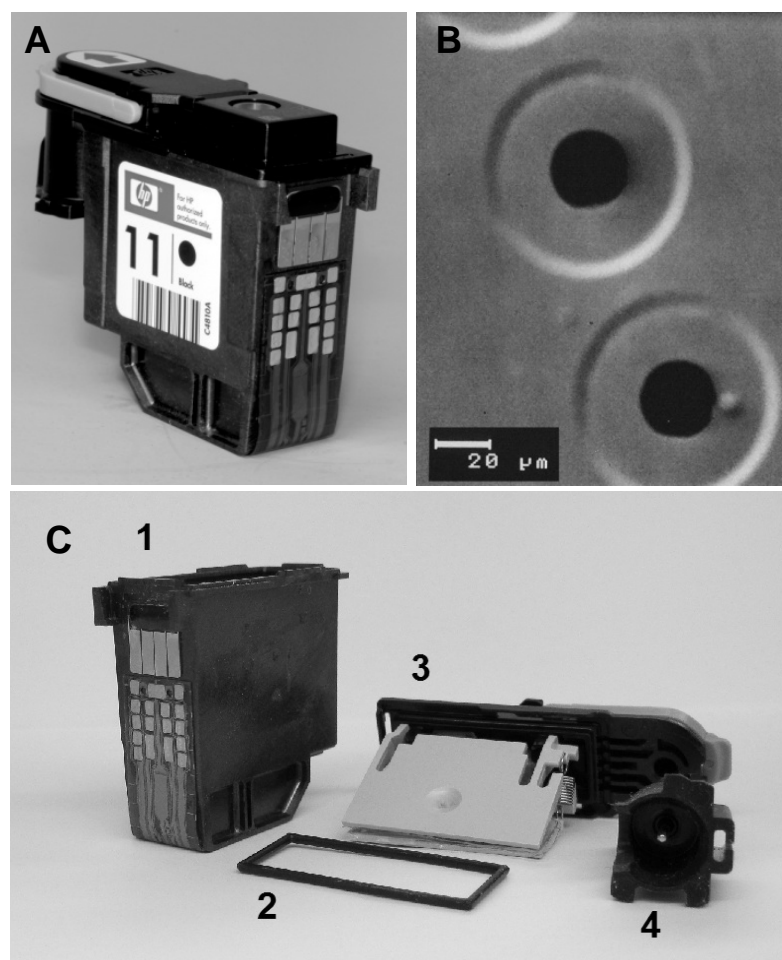


Abbildung 3.2: Druckkopf (A), REM-Aufnahme der Druckkopfdüsen (B) und Einzelteile des Druckkopfes (C): Druckkopfgehäuse (1), Gummidichtung (2), Gehäusedeckel mit Regelmechanismus (3) bestehend aus Belüftungsventil, zwei Steuerhebeln und zwei Luftbeuteln und Gegendruckfeder, Ansaugdüse (4).

Für die Arbeit unter sterilen Bedingungen (Druck von BMPs, Scaffolds für Zellversuche) wurde die Patrone nach der Reinigung für 10 min in eine 70 %ige Ethanollösung eingelegt und anschließend mit der jeweiligen Binderlösung befüllt. In zyklischen Abständen wurde während des Druckprozesses automatisch ein Reinigungsprozess der Druckköpfe durchlaufen. Hierbei wurde eine Reinigungslösung auf die Unterseite der Druckköpfe gespritzt und einige μl Binder aus den Patronen gespült. Die Zusammensetzung der verschiedenen Binder- und Reinigungslösungen sind der nachstehenden Tabelle 3.2 zu entnehmen:

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Lösungen für den 3D-Pulverdruck.

Lösung	Zusammensetzung
Reinigungslösung zum Spülen der Patronen in der automatischen Reinigungsprozedur des Druckers	69 % H_2O , 30 % Isopropanol, 1 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Standardbinder in Anlehnung an ^[65] für das Durchspülen der Patronen (Purging) im Drucker	84,3 % H_2O , 5,7 % Glycerin (89 %ig), 10 % Isopropanol, 10 ml Tween 20 auf 1 L Binder, pH-Wert = 4,3
Phosphorsäurebinder für CaP-Pulver	20 % H_3PO_4 , pH-Wert = 0,5
Ammoniumdihydrogenphosphatbinder für Magnesiumphosphatpulver (MgP)	1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Merck, Darmstadt) gelöst in dest. H_2O , pH-Wert = 4,1
Diammoniumhydrogenphosphat für MgP-Pulver	3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Merck, Darmstadt) gelöst in dest. H_2O , pH-Wert = 8,2
Ammoniumdi-/Diammoniumhydrogenphosphatbinder für MgP-Pulver	0,75 mol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,75 mol $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ in 1 l dest. H_2O , pH-Wert = 6,2
Vancomycinlösung	5 wt% Vancomycin Hydrochlorid (Abbott, Wiesbaden) gelöst in Standardbinder, pH-Wert = 3,2
rhBMP-2-Lösung	5 μM rhBMP-2 (Lehrstuhl für physiologische Chemie II, Biozentrum Universität Würzburg ^[187]) in dest. H_2O
Heparinlösung	10 IE/ml Heparin (Meduna GmbH, Isernhagen) in dest. H_2O
Chitosanlösung	1,5 wt% Chitosan Hydrochlorid (Kräber GmbH, Ellerbek), 1 % Tween 20, 20 % 0,1 M Natronlauge
Tripolyphosphat (TPP)-Vernetzerlösung	0,5 wt% Natriumtriphosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim) in dest. H_2O
Farbstofflösung zum selektiven Anfärben der Strukturen	0,1 wt% Toluidinblau (Fluka Chemie GmbH, Steinheim) in Standardbinder
CuSO_4 -Lösung	0,1 M CuSO_4 (Merck, Darmstadt) in dest. H_2O
MRT-Kontrastmittel	0,05 mM Magnograf® (0,5 mmol/ml Gadopentetat-Dimeglumin, Marotrast GmbH, Jena) in dest. H_2O
Suspension aus fluoreszierenden PLA-Mikropartikeln	0,1 mg/ml, Green F bzw. Red F (\varnothing = 250 nm, Micromod Partikeltechnologie GmbH, Rostock Warnemünde, Deutschland) in dest. H_2O

3.2.2 3D-Druck von Bruschitmatrices mit TCP-Pulver

Das präparierte TCP-Pulver wurde in den 3D-Drucker gefüllt und manuell leicht verdichtet. Das TCP-Pulver reagierte mit einer 20 %igen Phosphorsäure als Binderflüssigkeit zu einer Matrix aus Bruschit. Die Druckparameter waren: 125 μm Schichtdicke und die Bindersättigung (applizierte Bindervolumen vs. dem

Porenvolumen der Pulverschüttung) 0,261 bzw. 0,371. Für die Ermittlung der diametralen Zugfestigkeit wurden zylindrische Prüflinge (5 x 10 mm) angefertigt. Die Freisetzungsstudien erfolgten an sphärischen Prüfkörpern ($d = 5$ mm). Die gedruckten Proben bestanden aus Bruschit und überwiegend noch nicht reagiertem TCP. Durch Einlegen der Proben in Phosphorsäure (20 %) für 3 x 60 sec wurde der Umsetzungsgrad von TCP zu Bruschit gesteigert (Nachhärtung). Anschließend wurden die Prüfkörper für mindestens 24 h auf einer saugfähigen Unterlage bei Raumtemperatur (RT) getrocknet.

3.2.3 3D-Druck von Struvitmatrices mit MgP-Pulver

Das präparierte MgP-Pulver bzw. MgO/MgP-Pulver wurde analog dem TCP-Pulver in den Drucker gefüllt. Das Drucken von Proben erfolgte mit einer Bindersättigung von 0,371. Als flüssige Phase kam eine 1,5 M Ammoniumdihydrogenphosphatlösung ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, Merck, Darmstadt) zum Einsatz. Während des Druckvorgangs wurde vornehmlich MgO und zu einem geringen Teil MgP zu Struvit umgesetzt. Um die Phasenumwandlung zu steigern wurden die Prüflinge für 1 – 24 h in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung ausgelagert, was die Phasenumwandlung von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ zu Struvit und damit einhergehend die mechanische Stabilität der Prüfkörper steigerte. Anschließend wurden die Prüflinge auf einer saugfähigen Unterlage für 24 h bei RT getrocknet.

3.3 Wirkstoffmodifikation

3.3.1 Design und Druck von wirkstoffbeladenen Strukturen

Die Strukturen wurden mittels des CAD-Programms Think3 Design® konstruiert. Die Ansteuerung der vier zur Verfügung stehenden Druckköpfe (white (w), yellow (y), magenta (m), cyan (c)) erfolgte über Farbcodierung der Strukturen. Während der weiße Druckkopf den Zementbinder (20 % H_3PO_4 bzw. 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) applizierte und immer zu einem gewissen Prozentsatz am Druckprozess beteiligt war, konnten die Druckköpfe y, m und c für die Applikation von Wirkstoff- oder Polymerlösungen genutzt werden. Über die Farbcodierung konnten alle Druckköpfe einzeln angesteuert werden, wobei die prozentuale Beteiligung der verschiedenen Druckköpfe am Druckprozess durch bestimmte Farbcodes herstellerbedingt festgelegt war. Die Gesamtmenge aller am Druckprozess beteiligten Druckköpfe war durch die Bindersättigung festgelegt, welche zwischen 0,065 – 0,371 variiert werden konnte. Bei dem Design der Strukturen war zu beachten, dass die Farbinformation des Designs softwarebedingt nur in eine Schichtdicke von 0,88 mm auf die gedruckte Struktur übertragen wurde. Daher mussten die Strukturen in einem Zwiebschalenmodell (Abbildung 3.3) mit Schichtdicken $< 0,88$ mm konstruiert werden, um so eine durchgängige Färbung der Strukturen in den gewünschten Bereichen durch Erzeugung innerer Oberflächen zu erhalten. Hierbei war darauf zu achten, dass durch eine Überschneidung der Schalen keine Farbinformation des

Designs auf den Druckprozess übertragen wurde, so dass die Schalen einen Abstand von 0,1 mm zueinander aufweisen mussten. Die so erstellten Strukturdesigns wurden als VWRL-Files in das Programm des 3D-Pulverdruckers übertragen.

Um das Freisetzungsverhalten aus wirkstoffmodifizierten Zementstrukturen zu studieren wurden sphärische Prüfkörper aus HPMC/CaP, CaP, MgP oder 25 wt% MgO + MgP mit homogener, depotförmiger bzw. gradientenartiger Wirkstofflokalisierung entworfen (Abbildung 3.3). Als Druckeinstellungen wurden eine Bindersättigung von 0,371 und eine Schichtdicke von 125 µm gewählt. Als Modellwirkstoff diente Vancomycin Hydrochlorid, das in gelöster Form (5 wt%) über die Patrone y in die Struktur eingedruckt wurde. Als lokal begrenzter Diffusionsinhibitor wurde das ionotrop gelierende Chitosan Hydrochlorid (1,5 wt%) über die Patrone c und die den Gelierungsprozess induzierende Lösung aus Tripolyphosphat (TPP) über die Patrone m appliziert.

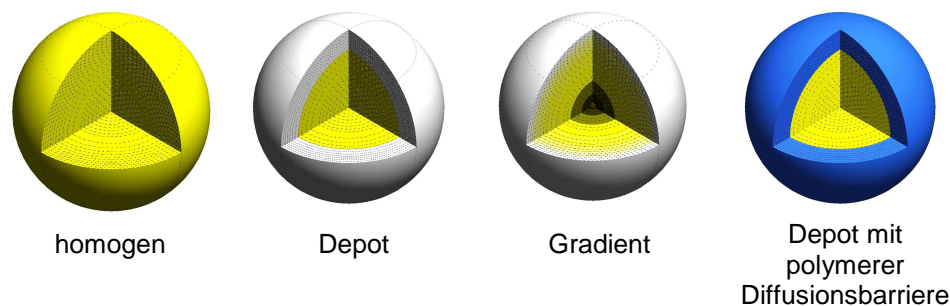


Abbildung 3.3: Design der wirkstoffbeladenen Strukturen. Über die Farbwahl werden die einzelnen Druckköpfe angewählt, so dass die Struktur homogen, lokal als Depot oder mit einem Konzentrationsgradienten mit Wirkstoff (gelb) ausgestattet werden kann. Zusätzlich können noch Polymerlösungen (blau) lokal in die Struktur eingebracht werden.

3.3.2 Visualisierung der Wirkstoffmodifikation gedruckter Strukturen

Eine Visualisierung der Wirkstoffmodifikation der Strukturen erfolgte auf zwei unterschiedliche Weisen. Zum Einen wurde auf der Oberfläche verschiedener Zementstrukturen (reines CaP, 5 % HPMC/CaP, $Mg_3(PO_4)_2$, 25 wt% MgO + $Mg_3(PO_4)_2$) Farbstofflösung in Linienbreiten von 0,1 – 1 mm über den Farbkanal y aufgedruckt (Abbildung 3.4A), die optisch nach Fotografie der Strukturen mit Hilfe des Programms Image-J (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) vermessen wurden. Des Weiteren erfolgte der Druck von Lösungen mit fluorophorbeladenen PLA-Mikropartikeln (Green F, Red F) die anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axioimager M1, Carl Zeiss, Oberkochen) visualisiert wurden.

Zum Anderen erfolgte die Darstellung der Wirkstoffmodifikation und Lokalisation innerhalb einer gedruckten Struktur zerstörungsfrei mittels MRT. Für diesen Zweck

wurden zylindrische Proben ($d = 30 \text{ mm}$, $h = 60 \text{ mm}$) mit drei sphärischen, axial liegenden Depots ausgestattet (Abbildung 3.4B). Die Strukturen wurden mit 5 wt% HPMC modifizierten CaP-Zement gemäß 3.2.2 gedruckt. Als Modellwirkstoff diente das handelsübliche MRT-Kontrastmittel Magnograf® (0,5 mmol/ml Gadopentetat-Dimeglumin, Marotrust GmbH, Jena) welches paramagnetische Gadoliniumionen in komplexierter Form als Gadopentetat-Dimeglumin enthält. Gadolinium führt zu einer schnelleren Relaxation der Protonen der Umgebung und verkürzt somit die Relaxationszeit T_1 . In T_1 -gewichteten Bildern wird der Bereich, in dem sich das Kontrastmittel befindet, deshalb heller dargestellt. Die Kontrastmittellösung wurde für die Anwendung im Pulverdruck 1:10 (0,05 mmol/ml) mit Wasser verdünnt und lokal über die Patrone y appliziert. Die Untersuchung der Strukturen mittels MRT erfolgte im wässrigen Milieu. Um eine vollständige Diffusion des Wassers in die Bulkstruktur der Probe zu gewährleisten, wurden die Strukturen 1 h vor der Messung in einen komplett mit Wasser gefüllten, verschließbaren Behälter gegeben und in diesem vermessen. Die MRT-Messungen wurden mit einem Siemens Avanto Kernspintomographen am Lehrstuhl für Experimentelle Physik V der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durchgeführt. Dieser arbeitete mit einer Feldstärke von 1,5 T. Als Spule wurde eine sogenannte 4-Kanal-Rattenspule verwendet. Von den Proben wurden jeweils 10 Schichtbilder mit Schichtdicken von 2 mm in der transversalen Ebene, d.h. senkrecht zur Längsachse der zylinderförmigen Probe aufgenommen. Bei den verwendeten SE-Sequenzen lag die Echozeit TE bei 12 ms, die Repititionszeit TR betrug 600 ms.

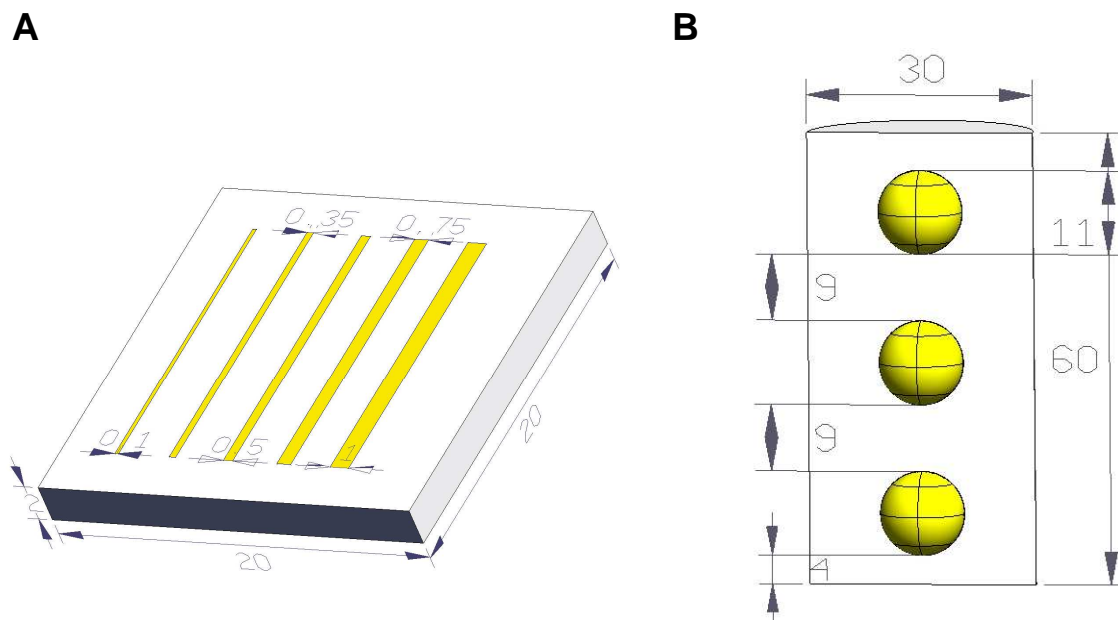


Abbildung 3.4: Design und Abmessung (in mm) einer oberflächlich mit Farbstoff (gelb) modifizierten Struktur zur Untersuchung des Auflösungsvermögen und der Farbstofflokalisierung (A). Design (sagittale Ansicht) und Abmessungen (in mm) einer zylindrischen Struktur mit drei axial liegenden sphärischen Wirkstoffdepots (gelb) zur Untersuchung gedruckter CaP-Strukturen mittels MRT (B).

3.3.3 Bestimmung von Wirkstofffreisetzung und biologischer Aktivität

3.3.3.1 Wirkstofffreisetzung

Die Wirkstofffreisetzung wurde anhand vancomycinmodifizierter Strukturen (gemäß Vorschrift 3.3.1 gedruckt aus CaP, CaP/HPMC, MgP und MgO/MgP) untersucht. Um eine Lokalisation des Wirkstoffs zu gewährleisten, wurden die Strukturen nach dem Druck nicht nachgehärtet. Die Freisetzungssysteme wurden unter regelmäßigem Wechsel des Freisetzungsmediums in jeweils 10 ml destilliertem Wasser in einem Schnappdeckelglas unter physiologischen Bedingungen (37 °C, Schütteltisch bei 1 rpm) ausgelagert. Die Quantifizierung von Vancomycin Hydrochlorid erfolgte mit Hilfe eines Zweistrahl-UV/Vis-Spektralphotometers (Cary1, Varian, Darmstadt) durch Absorptionmessung in flüssiger Phase bei einer Wellenlänge von $\lambda = 237 \text{ nm}$. Durch Absorptionmessungen von Standardlösungen mit einem Antibiotikumgehalt von 0 – 100 mg/l Vancomycin wurde eine Eichgerade erstellt, so dass über die Geradengleichung die Konzentration der Messlösung bestimmt werden konnte.

Zur Quantifizierung der Absolutmenge an Vancomycin wurden die beladenen Prüfkörper in jeweils 10 ml 2,4 M HCl aufgelöst. Als Referenzlösung diente hierbei eine ebenfalls in 10 ml 2,4 M HCl aufgelöste unbeladene Struktur entsprechender Phasenzusammensetzung. Die aus den Prüfkörpern freigesetzte Wirkstoffmenge wurde durch Messung der Wirkstoffkonzentration in den Auslagerungsmedien ermittelt. Als Referenz diente destilliertes Wasser, da die Kontamination des Freisetzungsmediums durch Degradationsprodukte der Matrix aufgrund des geringen Löslichkeitsprodukts der Zemente vernachlässigbar war. Die Prüfkörper blieben bis zur quantitativen Freisetzung des Wirkstoffs im Freisetzungsvorversuch. Zur Quantifizierung eines möglichen Restwirkstoffgehalts wurden die Prüfkörper nach der Freisetzung jeweils in 10 ml 2,4 M HCl aufgelöst und mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht.

3.3.3.2 Biologische Aktivitäten

Die biologische Wirksamkeit nach dem thermischen Druckprozess, d.h. nach der Applikation über die Patrone, wurde für Vancomycin, Heparin und rhBMP-2 analysiert. Des Weiteren wurde die biologische Wirksamkeit von Vancomycin nach der gesamten Prozesskette (Applikation über Druckkopf, Abbindereaktion, *in vitro* Freisetzung) untersucht.

Vancomycin

Vancomycin ist ein trizyklisches Glycopeptid. Das Indikationsgebiet ist eng und umfasst schwere Infektionen ausgelöst durch grampositive Kokken und Bakterien ^[188] wie beispielsweise Meningitis, Sepsis oder Osteomyelitis ^[189]. Vancomycin Hydrochlorid ist sehr gut wasserlöslich (> 100 mg/ml) und in wässrigen Lösungen bei 37 °C und bei pH-Werten von 3 – 7 stabil, denaturiert jedoch bei höheren Temperaturen ^[190]. Das Molekulargewicht beträgt 1413 g/mol. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) für *Staphylococcus aureus* liegt zwischen 1 µg/ml ^[191] und

3,12 µg/ml^[192]. Abhängig von der Art des Erregers variiert der MHK-Wert, wobei die minimale toxische Konzentration von 50 µg/ml^[191] nicht überschritten werden sollte.

Zur Untersuchung der biologischen Wirksamkeit wurden vancomycinbeladene (2,5 mg/Prüfkörper) zylindrische Scaffolds ($h = 5$ mm, $r = 4$ mm) in 1 ml destillierten Wasser für 2 h unter statischen Bedingungen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen ausgelagert, so dass der Prüfkörper vollständig ins Medium eintauchte. Das Eluat wurde im Agar-Diffusions-Test gram positiven *Staphylococcus epidermidis* (strain RP62A) ausgesetzt. Hierfür wurde 2 % Agar in LB Medium (1 %w/v Trypton, 0,5 %w/v yeast Extrakt, 0,5 %w/v NaCl) gelöst und autoklaviert (120 °C, 20 min). Die warme Agarlösung wurde in sterile Petrischalen gegossen und mit *S. epidermidis* aus einer Über-Nacht-Kultur (100 ml) beimpft. Die unterschiedlichen Vancomycinlösungen (5 wt% Vancomycin in H₂O (4 µl), 0,1 wt% Vancomycin in H₂O (50 µl), 5 wt% Vancomycin in H₂O nach Applikation durch einen Druckkopf (4 µl) und Eluat (50 µl)) wurden auf ein Filterpapier ($\varnothing = 1$ cm) gegeben und auf die Agarplatten ausgelegt. Jede Probe wurde 5-fach wiederholt. Die Agarplatten wurden bei 37 °C 48 h bebrütet. Anschließend wurde der Durchmesser des Hemmhofs mit einer Schieblehre bestimmt. Die Standardabweichung wurde bestimmt und die statistische Analyse wurde mit dem Anova t-Test durchgeführt.

Heparin

Heparine sind Polysaccharide (Glycosaminoglykane) mit einem Molekulargewicht von 4 – 50 kDa für unfraktioniertes (hochmolekulares) bzw. ca. 5 kDa für synthetisch fraktioniertes, niedermolekulares Heparin^[193], die therapeutisch zur Blutgerinnungshemmung als Prophylaxe und Therapie von Thrombosen eingesetzt werden. Die Dosis wird in Internationalen Einheiten (IE) angegeben, wobei 1 IE die Gerinnung von 1 ml citrathaltigem Plasma nach Zugabe von CaCl₂ bei 37 °C über eine Stunde inhibiert.

Die biologische Wirksamkeit gedruckter Heparinlösung wurde durch Messung der Blutgerinnungszeit (activated partial thromboplastin time, aPTT) analysiert. Für die Messung wurden 5 µl gedruckte bzw. nicht gedruckte 10 IE/ml Heparinlösung mit jeweils 250 µl Standard Human Plasma (Siemens, Marburg, Germany) vermischt und die aPTT mit einem Analyzer (Sysmex CA-540, Siemens) gemessen.

rhBMP-2

Knochenmorphogene Proteine (BMPs) zählen zu den Wachstumsfaktoren und sind neben vielen anderen Proteinen Bestandteil der TGF-β-Familie^[194-197]. Zurzeit sind mehr als 15 verschiedene Proteine in der BMP-Subfamilie bekannt^[42]. Ihr durchschnittliches molekulares Gewicht liegt bei 30 – 38 kDa^[198,199]. Ihre biologische Funktion erstreckt sich über eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie die Differenzierung, Proliferation, Morphogenese unterschiedlicher Zellgewebe^[200], wie beispielsweise dem skeletalen Gewebewachstums während der Embryonal-

entwicklung oder der Knochenheilung ^[199,201]. Die BMP-2/4-Gruppe ist vor allem für die Induktion von ektopem Knochen- und Knorpelwachstum *in vivo* bekannt ^[202].

Die biologische Aktivität der gedruckten rhBMP-2-Lösung wurde über die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) bestimmt. Hierfür wurden Mausmyoblasten (5×10^4 /well) der Zelllinie C2C12 verwendet, welche unter Einwirkung von rhBMP-2 die Fähigkeit zur Expression von ALP erlangen. Die Zellen wurden in 200 μ l Medium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), bei 37 °C unter 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Nach 48 h wurde das Wachstumsmedium entfernt und durch ein Differenzierungsmedium mit nur 5 % FCS ersetzt und gleichzeitig mit jeweils 10 % gedruckter bzw. ungedruckter rhBMP-2-Lösung versetzt. Nach 72 h wurde die ALP-Aktivität bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und ein Lysispuffer bestehend aus 0,1 mol Glycerin, 1 mmol MgCl₂, 1 mmol ZnCl₂, 1 % Nonidet P40 Substitute (96-well-Platten: 100 μ l/well) den Zellen zugefügt und bei RT auf einem Schütteltisch 1 h kultiviert. Anschließend wurde die gleiche Menge eines Lysispuffers bestehend aus 0,1 mol Glycerin, 1 mmol MgCl₂, 1 mmol ZnCl₂ und 20 mg p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP)/ml H₂O im Verhältnis 1:10 zugefügt. Die enzymatische Umwandlung von pNPP zu p-Nitrophenol wurde nach 5 min photometrisch bei 405 nm bestimmt. Der Proteingehalt der Zellkulturen wurde mit Hilfe des DC-Protein-Assay (Biorad, München) mit unterschiedlichen Konzentrationen von BSA (bovine serum albumin) als Standard nach Herstellerangaben bestimmt. Die ALP-Aktivität wurde über die Produktion von μ M p-Nitrophenol pro Minute pro well beschrieben.

3.4 Weitere Charakterisierungsmethoden

3.4.1 Mechanische Eigenschaften

Die Maßhaltigkeit der gedruckten Magnesiumphosphatstrukturen wurde mit einer digitalen Schieblehre auf $\pm 0,01$ mm ermittelt. Die mechanischen Kennwerte der Strukturen wurden an einer statischen Universalprüfmaschine Zwick 1440 (Fa. Zwick, Ulm) mit einer 5 kN Kraftmessdose bestimmt. Die Druckfestigkeit gedruckter Strukturen wurde an zylindrischen Prüfkörpern ($d \times h = 5 \times 10$ mm), die als Zement verarbeiteten Strukturen an quaderförmigen Prüfkörpern ($b \times l \times h = 6 \times 6 \times 12$ mm) durch axiale Belastung mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 1 mm/min und einer Vorlast von 1 N gemessen. Die Druckfestigkeit (CS) ergibt sich aus:

$$CS = \frac{F_{\max}}{A} \quad (3.3)$$

$CS = \text{Druckfestigkeit (in MPa)}$

$A = \text{Druckfläche (in mm}^2\text{)}$

$A_{\text{Zylinder}} = r^2 \pi$

$A_{\text{Quader}} = l \cdot b$

r = Probenradius für zylindrische Proben (in mm)
 $b = l$ = Probenbreite für Quader (in mm)
 h = Probenhöhe (in mm)
 F_{max} = Bruchkraft (in N)

Die initiale Festigkeit der Strukturen wurde nach dem Druck bzw. nach der Entformung der Zementstrukturen ohne Nachhärtung bestimmt. Zur Steigerung der Festigkeiten wurden die MgP-Strukturen für 1 – 24 h bei 37 °C in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung ausgelagert. Alle Proben wurden im nassen Zustand vermessen, hierfür wurden die nicht nachgehärteten Strukturen 24 h in dest. Wasser ausgelagert.

Die Biegefestigkeit gedruckter MgP-Strukturen wurde durch den 4-Punkt-Biegetest mit einer Prüfgeschwindigkeit von 1 mm/min und einer Vorlast von 0,1 N an stäbchenförmigen Prüfkörpern ($l \times h \times b = 100 \times 4 \times 10$ mm) durchgeführt. Der Abstand der Auflagerrollen ist der Abbildung 3.5 zu entnehmen. Die Biegefestigkeit errechnete sich nach:

$$FS = \frac{3 F_{max} \cdot L}{b \cdot h^2} \quad (3.4)$$

FS = Biegefestigkeit (in MPa)
 F_{max} = Bruchkraft (in N)
 L = Abstand zwischen den äußeren und inneren Auflagerrollen (in mm)
 b = Breite der Probe (in mm)
 h = Höhe der Probe (in mm)

Der E-Modul entspricht der Steigung des Hookschen Anteils (elastische Verformung) der Spannungs-Dehnungskurve der Messversuche und wird nach folgender Formel berechnet:

$$E = \frac{\Delta F \cdot L}{4 \cdot \Delta s \cdot b \cdot h^3} (3 \cdot l^2 - 4 \cdot L^2) \quad (3.5)$$

E = E-Modul (in GPa)
 ΔF = Kraftdifferenz im Hookschen Bereich (in N)
 Δs = Längenänderung bei ΔF (in mm)
 l = Abstand der äußeren Auflagerrollen (in mm)

Des Weiteren wurde eine mit 20 wt % Glasfasern (Zusammensetzung: 12,44 % K_2O , 12,44 % MgO , 12,44 % CaO , 4,98 % Al_2O_3 , 52,24 % P_2O_5 , 2,99 % SiO_2 , 2,49 % B_2O_3) modifizierte Variante des MgO/MgP-Pulvers gedruckt und die Strukturen auf ihre Biegefestigkeit und ihr E-Modul hin untersucht. Hierfür wurden die Glasfasern in einer elektrischen Kaffeemühle (KSW 3306 R, Clatronic, Kempten) zerkleinert und durch schrittweise Beimengung des Rohpulvers mit diesem vermischt.

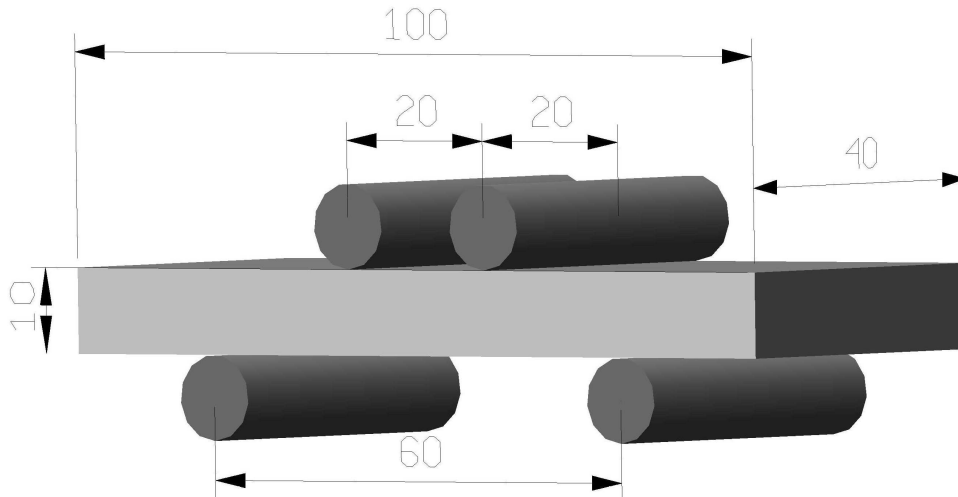


Abbildung 3.5: Versuchsanordnung des 4-Punkt- Biegetest mit Abmessungen in mm.

3.4.2 Phasenanalyse durch Röntgendiffraktometrie

Röntgendiffraktogramme der Pulver und der zermörserten Prüfkörper wurden mittels eines Röntgendiffraktometers (Siemens D5005, Fa. Siemens, Karlsruhe) in $\theta/2\theta$ -Geometrie mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV und 50 mA Emissionsstrom aufgenommen. Alle Diffraktogramme wurden im Winkelbereich zwischen 20° und 40° mit einer Schrittweite von $0,02^\circ$ und einer Schrittgeschwindigkeit von 1 s/step aufgenommen. Zur Bestimmung der qualitativen Phasenzusammensetzung der Proben wurde das erhaltene Beugungsmuster mit den Referenzmustern von α -TCP (PDF-Nr. 09-0348), β -TCP (PDF-Nr. 09-0169), Bruschat (PDF-Nr. 09-0077) und Monetit (PDF-Nr. 09-0080), Farringtonit ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, PDF-Nr. 33-0876), Struvit (PDF-Nr. 15-0762), Magnesiumoxid (PDF-Nr. 04-0829), Magnesiumpyrophosphat (PDF-Nr. 01-0866), Dittmarit (PDF-Nr. 20-0663) und Stantfieldit (PDF-Nr. 11-0231) verglichen. Die PDF-Nummern entstammen der Datenbank des ICDD¹. Die quantitativen Phasenzusammensetzungen wurden durch eine Rietveldanalyse mit der Software TOPAS (Bruker AXS, Karlsruhe) berechnet. Mit Hilfe der Scherrer-Formel (Gleichung 3.6) lässt sich die mittlere Kristallitgröße eines Pulvers bestimmen. Hierfür wurden die Reflexe $[h,k,l] = [0,2,0]$, $[2,0,0]$, $[0,0,2]$ im Diffraktogramm der unterschiedlich synthetisierten MgP-Pulver betrachtet.

$$d_k = \frac{0,89 \cdot \lambda}{\beta \cos \theta} \quad (3.6)$$

d_k = Kristallitgröße (in nm)

λ = Wellenlänge der $\text{Cu K}\alpha$ -Strahlung = 0,154 nm

β = Halbwertsbreite (in rad)

θ = Glanzwinkel (in $^\circ$)

¹ International Centre for Diffraction Data

3.4.3 Porosität und Gefüge

Das Gefüge der Prüfkörper wurde an Bruchflächen nach mechanischer Testung mit einem Rasterelektronenmikroskop DSM 940 (Fa. Zeiss, Oberkochen) untersucht. Für die Messungen wurden die Proben vorher mit dem Sputter Coater K550 (Fa. Emitech, Ashford, UK) mit Gold bedampft, um eine leitfähige Oberfläche zu erhalten. Die Aufnahmen wurden je nach Vergrößerung mit einer Beschleunigungsspannung bis zu 10 kV und variabler Vergrößerung durchgeführt. Die Porosität der gedruckten Strukturen wurde aus der Feststoffdichte und der Rohdichte berechnet:

$$P = 100 \% \cdot \left(\frac{V_P}{V} \right) = 100 \% \cdot \left(1 - \frac{\rho_R}{\rho_F} \right) \quad (3.7)$$

P = Porosität (in %)

V_P = Porenvolumen (in cm^3)

V = Volumen der Struktur (in cm^3)

ρ_F = Festkörperdichte (in g/cm^3)

ρ_R = Rohdichte (in g/cm^3)

Zur Bestimmung der Rohdichte ρ_R (Dichte eines porösen Körpers) wurden gedruckte zylindrische ($h \times d = 12 \times 6 \text{ mm}$) Strukturen aus MgP bzw. CaP mit einer digitalen Schieblehre vermessen und anschließend gewogen. Die Rohdichte berechnet sich nach folgender Gleichung:

$$\rho_R = \frac{m}{V} \quad (3.8)$$

ρ_R = Rohdichte (in g/cm^3)

m = Masse (in g)

V = Volumen (in cm^3)

Um die Abhängigkeit der Dichte von der Nachbehandlungsdauer der Strukturen zu analysieren, wurden die Dichten von 0, 60, 120 und 240 sec in 20 % H_3PO_4 ausgelagerten CaP-Strukturen bzw. 0, 1, 4 und 24 h in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ausgelagerten MgP-Strukturen bestimmt und miteinander verglichen.

Die Messung der Festkörperdichte wurde an der School of Chemical Engineering der Universität Birmingham, England mit einem Heliumpyknometer (AccuPyc II 1340; Micromeritics, Dunstable, UK) durchgeführt.

3.4.4 Partikelgrößenanalyse durch Laserdiffraktometrie

Die Partikelgrößenanalysen wurden an einem Partikelgrößenanalysator LA-300 (Fa. Horiba, Kyoto, Japan) mit einem 650 nm-5 mW-Laser durchgeführt. Das Prinzip der Laserdiffraktometrie beruht auf der winkelaufgelösten Messung der Streulichtintensität I_{scat} von an einer Partikeldispersion elastisch gestreutem, monochromatischem Licht. Die Auswertung des Streusignals erfolgt nach der Mie-

Theorie ^[203], wonach die Intensität des gestreuten Lichts unter Annahme sphärischer Partikel und $\lambda > d$ gegeben ist durch:

$$I_{scat} = \frac{\lambda^2}{8\pi^2 \cdot R^2} (i_{\perp} + i_{\parallel}) \quad (3.9)$$

Dabei ist λ = Wellenlänge des Laserlichts und R der Abstand zwischen Partikel und Beobachtungspunkt. Die Streuwelle eines Partikels n ist eine Summe aus Partialwellen. Da die Streulichtintensität I_{scat} allgemein proportional zum Betragsquadrat der Streulichtamplitude A ist, gilt für die senkrecht (i_{\perp}) und parallel (i_{\parallel}) zur Streuebene polarisierten Anteile der Streulichtintensität:

$$i_{\perp} = \left| \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} (a_n \pi_n(\cos \theta) + b_n \tau_n(\cos \theta)) \right|^2 \quad (3.10)$$

$$i_{\parallel} = \left| \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} (a_n \tau_n(\cos \theta) + b_n \pi_n(\cos \theta)) \right|^2 \quad (3.11)$$

wobei π und τ durch zugeordnete Legendre-Polynome definiert sind und θ der Streuwinkel ist. Die Streulichtamplitude jeder Partialwelle ist durch die Streulichtkoeffizienten a_n und b_n gegeben. Da diese durch den Partikelgrößenparameter $\alpha = \pi d/\lambda$ (d = Partikeldurchmesser) und den relativen Brechungsindex $m = \mu_P/\mu_m$ (Brechungsindex des Partikels = μ_P und Brechungsindex des Dispersionsmediums = μ_m) bestimmt sind, besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen Streulichtintensität und den genannten Größen. Durch die winkelaufgelöste Messung der Streulichtintensität kann somit die Partikelgrößenverteilung bestimmt werden. Eine umfassende Beschreibung der der Messmethode zu Grunde liegenden Theorie findet sich in der Literatur ^[204,205].

Der durch die Mie-Theorie (sphärische Partikel, $\lambda > d$) erhaltene Äquivalenzdurchmesser d_i , d.h. der Durchmesser einer volumengleichen Kugel, stellt für Partikel, die keine ausgeprägte Stab- oder Scheibenform aufweisen, eine sinnvolle Beschreibung der Partikelgröße dar. Die gemessenen Partikelgrößen sind volumengewichtete Größen und durch den De-Brouckere-Durchmesser $d[4,3]$ definiert ^[206].

$$d[4,3] = \frac{\sum_{i=1}^n V_i d_i}{\sum_{i=1}^n V_i} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i^4}{\sum_{i=1}^n d_i^3} \quad (3.12)$$

$$V_{ges} = \sum_{i=1}^n V_i \quad (3.13)$$

mit d_i = Äquivalenzdurchmesser des Partikels i einer Probe von n Partikeln mit Gesamtvolumen V_{ges} .

Zu beachten ist, dass bei der Partikelgrößenanalyse mittels Laserstreuung Agglomerate als Einzelpartikel detektiert werden. Für eine aussagefähige Analyse der Partikelgröße nach dem Prinzip der Laserstreuung ist eine vollständige Deagglomeration der Partikel deshalb Grundvoraussetzung. Hierfür wurden 300 mg des jeweiligen Pulvers 15 min im Ultraschallbad in 45 ml Isopropanol suspendiert und umgehend vermessen. Während der Messung im Partikelgrößenanalysator wurde die Ultraschallbehandlung weitergeführt.

Die Charakterisierung der Zementpulver erfolgte über den d_{50} -Wert und die Spanne. Die Partikelgröße d_x gibt an, welcher volumengewichtete Anteil x (in %) der Partikel unterhalb dieses Partikeldurchmessers d_x liegt. Die Beschreibung der relativen Breite einer Partikelgrößenverteilung erfolgt über die mit der mittleren Partikelgröße d_{50} gewichtete Breite, der sogenannten Spanne der Partikelgrößenverteilung:

$$Spanne = \frac{d_{90} - d_{10}}{d_{50}} \quad (3.14)$$

Die Partikeldurchmesser d_i werden anhand der gemessenen Partikelgrößenverteilungssumme Q (in %) abgelesen. Die Verteilungssumme gibt an, welcher prozentuale Anteil der Partikel unterhalb einer bestimmten Partikelgröße d_j liegt. Dabei gilt:

$$Q = \frac{\sum_{i=0}^j d_i}{\sum_{i=0}^n d_i} \quad (3.15)$$

Die Darstellung der Partikelgrößenverteilungen erfolgt über die Verteilungsdichtefunktion q (in %). Die Verteilungsdichte gibt die auf die Gesamtmenge bezogene Anzahl von Partikeln einer Fraktion innerhalb eines Intervalls $\Delta d'$ an. Die Partikelgröße wird logarithmisch dargestellt, d.h. die Verteilungsdichtefunktion wird durch die Transformation $d' = \log d$ quasinormiert^[207]. Die Streuspektren wurden mit einem Realteil des Brechungsindex von $m_{(Mg_3(PO_4)_2)} = 1,18$, $m_{(MgO)} = 1,27$ und $m_{(Ca_3(PO_4)_2)} = 1,24$ ausgewertet^[208]. Da es sich bei den vorliegenden Pulvern um weißes Pulver handelte, konnte der Imaginärteil des Brechungsindex laut Mie vernachlässigt werden^[209].

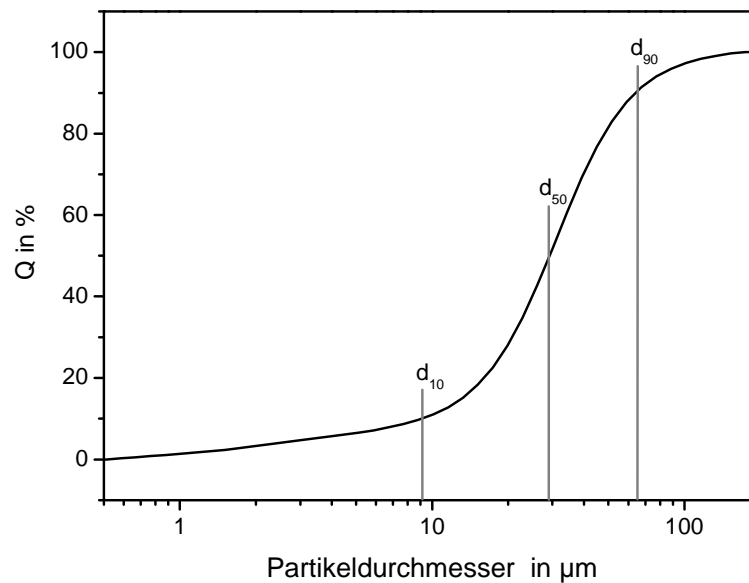


Abbildung 3.6: Beispiel für die Verteilungsdichtefunktion einer Partikelpopulation (kumulative Darstellung).

3.4.5 Abbindezeiten

Die Abbindezeiten der Zemente wurden mit dem Gilmore-Nadeltest in einer auf $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ temperierten Feuchtigkeitskammer (Eigenbau der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, Universitätsklinikum Würzburg) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von $> 90 \%$ durchgeführt. Um eine vollständige und stabile Klimatisierung der Probenkammer zu gewährleisten, erfolgte die Temperierung 1 h vor der ersten Messung. Durch kontrolliertes Absenken einer Nadel in definierten Zeitabständen wurden Abdrücke auf die Oberfläche einer Zementformulierung erzeugt. Die Abbindezeit eines Zements ist dabei definiert als die Zeitspanne zwischen dem Anmischen der pulverförmigen und flüssigen Komponente der Zementpaste und deren Aushärtung. Für die Messung wurden 0,8 g Zementpulver und 400 µl (PLR = 2) einer 0,75 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,75 mol/l $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ -Lösung mit einem Spatel homogen vermischt und in die auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ temperierte Edelstahlprobenform mit einer mittigen Bohrung von $12 \times 3 \text{ mm}$ eingebracht. Die Oberfläche der Zementpaste wurde mit einem Objektträger glattgestrichen und der Probeträger wurde in die Klimakammer montiert. Die Zementformulierungen wurden durch wiederholtes manuelles Absenken der zylindrischen Gilmore-Nadel der Größe G1 ($m = 113,298 \text{ g}$, $d = 2,117 \text{ mm}$) im Intervall von 30 sec auf die jeweilige Abbindezeit hin untersucht. Pro Messvorgang konnten durch eine externe Drehung der Probe um 60° insgesamt sechs Abdrücke erzeugt werden. Der Zement galt als abgebunden, sobald kein Abdruck der Nadel auf der Probenoberfläche mehr erkennbar war. Die Beurteilung der Abdrücke erfolgte mit Hilfe einer Lupe bei 5 – 10-facher Vergrößerung.

3.4.6 Streichtest

Zur Ermittlung der Streichfähigkeit eines Zementpulvers diente der Peel-off-Test. Hierfür wurden ca. 5 g des Zementpulvers auf einer Glasplatte aufgehäuft und manuell mit einer Spielkarte in dünnen Schichten abgestrichen. Die so entstandene Pulveroberfläche wurde hinsichtlich der makroskopischen Oberflächenrauheit und des Auftretens von Rissen innerhalb des Pulverbetts bewertet. Untersucht wurde die Streichfähigkeit verschiedener Magnesiumphosphatzemente in Abhängigkeit von der Pulversynthese (Sinter Temperatur, Mahldauer, Pulvermodifikation mit MgO).

3.4.7 Schüttdichte

Für die Bestimmung der Schüttdichte wurden jeweils 10 g der unterschiedlich synthetisierten $Mg_3(PO_4)_2$ -Pulver in einen 10 ml Messzylinder gefüllt und durch Vibration auf der Siebmaschine Vibratory Micro Mill (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein) 15 min verdichtet. Das vom Pulver eingenommene Volumen in ml bzw. in cm^3 ($\pm 0,1$ ml) wurde abgelesen. Der Quotient aus Masse (10 g) und Volumen ergab die Schüttdichte in g/cm^3 .

3.4.8 Bestimmung des pH-Werts *in vitro*

Für die Bestimmung des pH-Wert-Verlaufs *in vitro* wurde jeweils ein gedruckter zylindrischer ($h \times d = 12 \times 6$ mm) Struvitprüfkörper (4 h in 3,5 M $(NH_4)_2HPO_4$ -Lösung nachgehärtet) bzw. Bruschiprüfkörper (3 x 30 sec in 20 % H_3PO_4 -Lösung nachgehärtet und im ausgehärteten Zustand für 3 – 5 h bei stündlichem Wechsel des Auslagerungsmediums in Reinstwasser gewaschen) in 10 ml PBS (pH-Wert = 7,4) eingelegt und der pH-Wert mit einer pH-Elektrode (inoLab Level 2, WTW GmbH, Weilheim) über 24 h gemessen.

3.4.9 ICP-Analyse

Zur Quantifizierung der Binderapplikation über die Farbkanäle y, m und c wurde eine 0,1 M $CuSO_4$ -Lösung über die verschiedenen Druckköpfe in zylindrische ($d = 8$ mm, $h = 5$ mm) CaP-Prüflinge gedruckt. Die Ansteuerung der Druckköpfe (w, y, m, c) erfolgte über die Farbwahl der Prüfkörper nach einer Farbcodetabelle (siehe Kapitel 5.1, Tabelle 5.1). Diese stellt schematisch den Zusammenhang zwischen Farbwahl und Ansteuerung der Druckköpfe dar. Als Binderlösung diente eine 20 %ige H_3PO_4 -Lösung, welche als Reaktionsedukt immer am Druckprozess beteiligt sein muss und über die Patrone w appliziert wurde. Die Quantifizierung der eingedruckten Cu-Ionen erfolgte mittels ICP-Massenspektroskopie (Varian, Darmstadt). Die Eichung erfolgte dabei an drei Punkten durch die eine Regressionsgerade gelegt wurde. Für die Eichung wurden Konzentrationen von 0 ppb, 50 ppb und 100 ppb gewählt. Zur Herstellung der Messlösungen wurden die gedruckten und mit Cu-Ionen modifizierten Prüfkörper in jeweils 10 ml 2,4 M HCl aufgelöst. Nach Filtrierung der Proben wurden diese anschließend 1:10 mit Wasser verdünnt und vermessen. Die so erhaltene

Konzentration konnte dann auf die während des Drucks applizierte Bindermenge umgerechnet werden.

3.4.10 Strukturuntersuchung mittels μ -CT

Für die Untersuchung verschiedener physikalischer Parameter (Porosität, Maßhaltigkeit der Strukturen, spezifische und aktive Oberfläche) sowie deren Abhängigkeit von der Nachbehandlungszeit in Binderlösung wurden gedruckte, unbehandelte sowie nachgehärtete Strukturen aus CaP und mit 25 wt% MgO modifizierte MgP mit dem μ -CT analysiert. Mit dieser Methode ist die Erfassung von Strukturänderungen im Bereich von μm möglich. Das Design der Strukturen ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die Prüfkörper wurden gemäß 3.2.2 bzw. 3.2.3 gedruckt und die Nachbehandlungszeit in der systemspezifischen Binderlösung wurde variiert. Die Nachhärtungsdauer für CaP-Strukturen betrug 0, 60, 120 und 240 sec in 20 % H_3PO_4 bzw. für MgP-Strukturen 0, 1, 4 und 24 h in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung. Die durch den Druckprozess gegebene Auflösung sowie eine durch den Nachhärtungsprozess bedingte Änderung der Makrostruktur (geometrische Abmessungen, Makroporosität) wurde durch Ausmessung der Proben anhand der μ -CT-Aufnahmen untersucht. Die μ -CT-Untersuchungen wurden am Zentrum für muskuloskelettale Forschung der Universität Ulm durchgeführt. Die Proben wurden im trockenen Zustand bei 70 kV und 141 μA mit einer Auflösung von 5 μm in einem Computertomographen der Firma Skyscan (Skyscan 1172, Skyscan, Kontich, Belgien) analysiert. Aus jeweils drei Aufnahmen pro Projektion wurde der Durchschnitt gebildet. Es wurde eine Zufallsverschiebung um 15 Pixel zur Vermeidung von Ringartefakten sowie ein Aluminium/Kupfer-Filter zur Verringerung des Rauschens und zur Verbesserung des Kontrasts verwendet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm CTAn (Skyscan, Kontich, Belgien). Die morphologische Analyse der Proben umfasste das Probenvolumen, die aktive Oberfläche (gesamte Probenoberfläche/Probenvolumen), die spezifische Oberfläche und die Porosität. Die Makroporen der Prüfkörper (Abbildung 3.7) wurden anhand der μ -CT-Aufnahmen mit dem Programm ImageJ (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) vermessen.

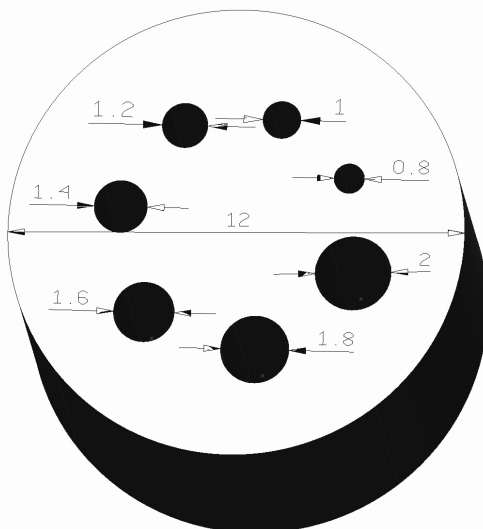


Abbildung 3.7: Design und Abmessungen (in mm) der zylindrischen Probekörper ($d = 12 \text{ mm}$, $h = 3 \text{ mm}$) für Untersuchungen im μ -CT. Zur Bestimmung der Maßhaltigkeit der Strukturen durch den Druckprozess und der Nachhärtungsdauer wurden die Strukturen mit Makroporositäten ($d = 0,8 - 2 \text{ mm}$) ausgestattet. Der kompakte Zylinderkern diente zur Untersuchung der Mikroporosität.

4 PULVERDRUCK VON MAGNESIUMPHOSPHATMATRICES

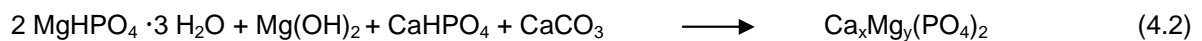
Die Verfestigung pulvergedruckter Strukturen kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Eine Modifizierung keramischer Pulver mit quellfähigen Polymeren führt dazu, dass diese bei Kontakt mit der Binderflüssigkeit die einzelnen Partikel verkleben, so dass nach Trocknung des gedruckten Bauteils ein Grünkörper entsteht, der entweder durch Temperaturbehandlung (Sinterung) oder durch Polymerinfiltration weiter verfestigt wird. Alternativ können reaktive Pulver/Binder-Systeme eingesetzt werden, für die es zu einer hydraulischen Abbindereaktion während des Drucks kommt, eventuell gefolgt von einer Nachhärtung in der Binderlösung nach Entformung des Bauteils. Solche Systeme wurden in der Vergangenheit im Bereich des Knochenersatzes beschrieben, z.B. reagiert TCP-Pulver mit einer verdünnten Phosphorsäurelösung zum sekundären Phosphat Bruschit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)^[38,210], das sich als zytokompatibel im Kontakt mit osteoblastären Zellen zeigt^[211] und sowohl im heterotopen^[16] als auch im orthotopen^[212,213] Implantatlager als resorbierbar und osteoinduktiv erwies.

Nachteilig bei dem beschriebenen System ist, dass die Abbindereaktion bei stark sauren pH-Werten abläuft. Dies hat negative Auswirkungen auf die gleichzeitige Ausstattung mit sensitiven Wirkstoffen. Eine interessante Alternative zur Lösung dieser Problematik stellen Magnesiumammoniumphosphatzemente dar, die bei neutralem pH-Wert innerhalb kurzer Zeit (< 2 min) zu Ammoniummagnesiumphosphat Hexahydrat ($(\text{NH}_4)\text{MgPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, Struvit) abbinden. Struvit stellt eine biologische Kalzifizierung dar und wird beispielsweise nach bakterieller Infektion in Nierensteinen gefunden^[214]. Zementformulierungen, die als Abbindeprodukt Struvit bilden, sind in der Literatur beschrieben^[215-219] und zeigten in eigenen Voruntersuchungen sehr gute mechanische Eigenschaften im Vergleich zu anderen Zementen. Die Abbindereaktion der Zemente erfolgt dabei im neutralen pH-Wert-Bereich, da sowohl die Pulverkomponenten (MgHPO_4 , MgO , $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) als auch die flüssige Zementphase ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ bzw. $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) nahezu pH-neutral sind. Die Löslichkeit von Struvit beträgt 14,63 mg/l (Löslichkeitsprodukt (LP) = $2,12 \times 10^{-13}$ (pK = 12,7) im pH-Bereich von 7,01 – 9,62)^[220] und lässt eine wesentlich bessere Resorbierbarkeit im Bereich des Knochenersatzes erwarten als etwa bei HA (Löslichkeit: 0,04 mg/l, pK = 58,6 bei 37 °C^[221]) oder TCP (Löslichkeit: 0,10 mg/l, pK = 29,5 bei 37 °C^[222]) basierenden Werkstoffen. Neben der passiven (chemischen) Löslichkeit sind Struvitkeramiken auch aktiv durch die von Osteoklasten erzeugte pH-Wert-Erniedrigung an der Werkstoffoberfläche resorbierbar^[223]. Ziel dieses Teils der Arbeit war, entsprechende Zementssysteme auf Basis von Magnesiumphosphaten für den Pulverdruck zu etablieren. Hierzu wurden in einem ersten Schritt Verbindungen mit der allgemeinen Formel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ durch einen Sintervorgang hergestellt und nach Aufmahlung bezüglich ihrer pulvertechnologischen Eigenschaften und ihres Abbindeverhaltens charakterisiert. Um den Anforderungen des Pulverdrucks an eine schnelle Abbindereaktion und hoher Ortsständigkeit des Binders gerecht zu werden, wurden die Pulver zusätzlich

mit hochreaktivem Magnesiumoxid modifiziert. Anhand von Druckversuchen wurden maßgebliche Eigenschaften der Systeme, z.B. die Maßhaltigkeit, die mechanischen Kennwerte oder die Phasenzusammensetzung der Strukturen nach dem Druck und nach einer anschließenden Nachhärtung bestimmt. Abschließend wurde der Einsatz von Kurzfasern aus Bioglas zur anisotropen Verstärkung der gedruckten Proben untersucht.

4.1 Synthese von Magnesiumphosphatzementpulvern

Neben reinem $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ wurden auch gemischte Verbindungen aus $\text{Ca}_x\text{Mg}_y(\text{PO}_4)_2$ ($x + y = 3$) unter analogen Bedingungen hergestellt und verarbeitet. Die Synthese erfolgte durch Sinterung von Pulvermischungen aus Magnesiumhydrogenphosphat und Magnesiumhydroxid bzw. zusätzlich Calciumcarbonat und Calciumhydrogenphosphat für die gemischten Verbindungen bei Temperaturen von 900 – 1100 °C:



Bisherige Erfahrungen auf dem Gebiet der Pulversynthesen zeigten, dass die Partikelgröße der Edukte sowie die Homogenität der Pulvermischung vor der Sinterung entscheidenden Einfluss auf die Phasenreinheit und die nach der Mahlung erreichbare Korngröße des Endprodukts haben. Die Korngrößen der kommerziell erhältlichen Rohstoffe liegen im Bereich von ca. 1 – 40 µm, ebenso wie beim hieraus nach Sinterung erhaltenen $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$. Als Parameter des Sintervorgangs wurden die Sintertemperatur und der Mischungsgrad untersucht. Die thermisch hergestellten Magnesiumphosphatwerkstoffe wurden nach Abkühlung manuell mit Mörser und Pistill zerkleinert und auf eine definierte Ausgangskorngröße (< 355 µm) vor dem Mahlvorgang gesiebt. Die Mahlung erfolgte in einer Planetenkugelmühle für einen Zeitraum bis zu 4 h.

4.1.1 Partikelgrößenverteilungen und Glättungseigenschaften

Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Zementpulver im 3D-Pulverdruck ist die Abstreichbarkeit in 100 – 200 µm dünne Schichten. Vermieden werden muss die Bildung von splitterförmigen Feinkornanteilen (< 5 µm), die durch Agglomeratbildung eine Streichfähigkeit im Drucker verhindern. Dies wurde durch manuelles Abstreichen der Pulveroberfläche mit einer Spielkarte geprüft. Hierbei zeigte sich, dass nur Pulver mit einer relativ kurzen Mahldauer ≤ 50 min und einer Sintertemperatur ≥ 1000 °C hinreichend glatte Pulveroberflächen erbrachten, während längere Mahldauern und eine Sintertemperatur von 900 °C zu inhomogenen Oberflächen mit starker Riefenbildung führten (Abbildung 4.1).

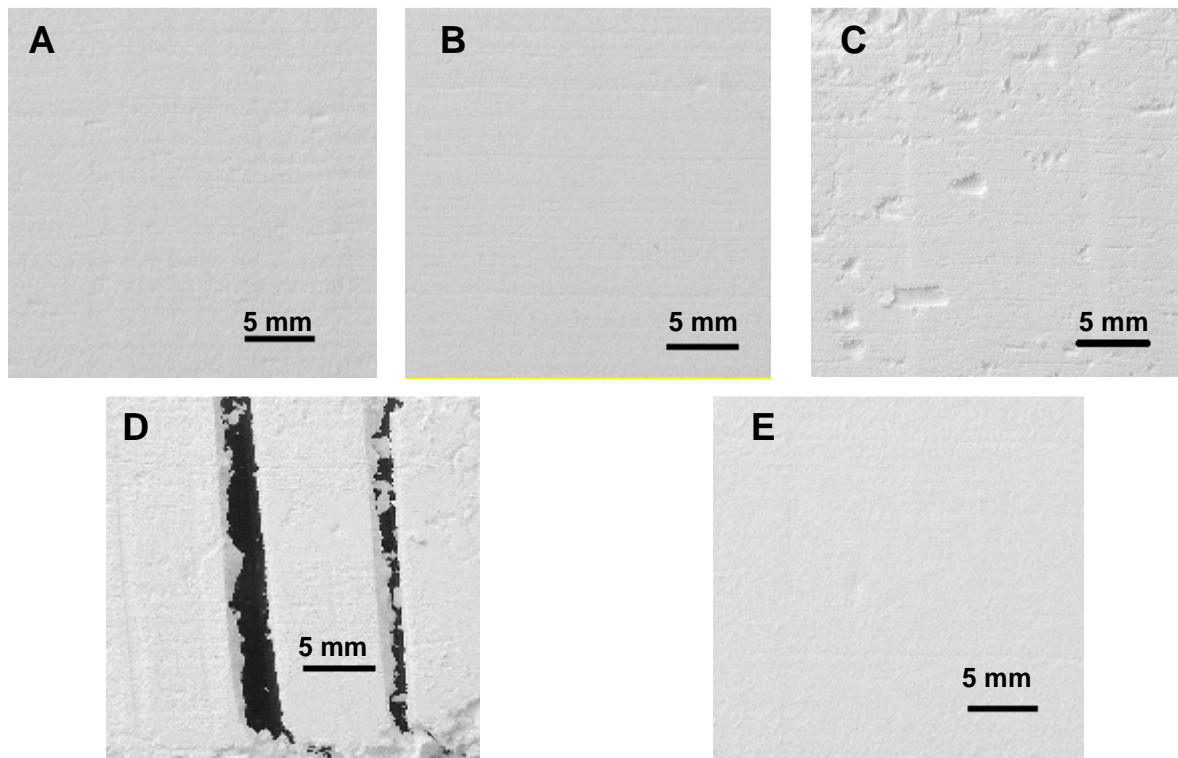


Abbildung 4.1: Streichfähigkeit von Trimagnesiumphosphatpulvern in Abhängigkeit von der Mahldauer ((A) 10 min, (B) 30 min, (C) 60 min, Sinterparameter: 1100 °C/5 h) und von der Sintertemperatur ((D) 900 °C, (E) 1000 °C, Sinterdauer: 5 h, Mahldauer: 20 min).

Als entscheidendes Charakteristikum streichfähiger Zementpulver erwies sich die relative, mit der mittleren Partikelgröße d_{50} gewichtete Breite der Partikelgrößenverteilung Q , die sogenannte Spanne (Gleichung 3.14). Eine kleine Spanne ist gleichbedeutend mit einer geringen Variabilität der Partikeldurchmesser, was eine dichte Anordnung der Partikel ermöglicht und somit zu einer gleichmäßigen Abstreichbarkeit dünner Pulverlagen während des Druckvorgangs führt. Untersuchungen der Partikelgrößenverteilungsdichte q (Abbildung 4.2A-C) unterschiedlich synthetisierter Zementpulver zeigten, dass Pulver mit d_{50} -Werten zwischen 20 – 30 μm und einer monomodalen Partikelgrößenverteilung mit kleiner Spanne $< 2,33$ und einem Feinkornanteil ($< 5 \mu\text{m}$) $< 10 \%$ eine optimale Streichfähigkeit aufwiesen. Eine Erhöhung der Mahldauer bewirkte bis zu einem Zeitraum von 50 min eine gaußförmige Verbreiterung der Korngrößenverteilung (Abbildung 4.2A) bei marginaler Erhöhung des Feinkornanteils ($< 6 \%$). Bedingt durch die Einlagerung kleiner Partikel in das interpartikuläre Volumen des grobkörnigen Pulveranteils kam es zu einer Erhöhung der Schüttdichte (Tabelle 4.1) und infolge dessen zu einer verbesserten Abstreichbarkeit zu glatten Pulveroberflächen.

Sowohl die Erhöhung der Mahldauer auf 60 min (Abbildung 4.2A), als auch die Reduktion der Sintertemperatur auf 900 °C (Abbildung 4.2B) führten zu Pulver mit einem hohen Feinkornanteil von über 14 % und d_{50} -Werten $< 17,2 \mu\text{m}$. Hierbei konnte bis zu einer Mahldauer von 60 min ein linearer Zusammenhang zwischen Partikeldurchmesser und Mahldauer festgestellt werden (Abbildung 4.2D). Der

minimale Partikeldurchmesser, der durch die Aufmahlung erreicht wurde, lag für bei 1100 °C gesintertem Material bei ca. 1 µm. Eine Erhöhung der Mahldauer > 1 h führte lediglich zu einer weiteren Steigerung des Feinkornanteils, ohne die Grenzwertpartikelgröße von 1 µm zu reduzieren.

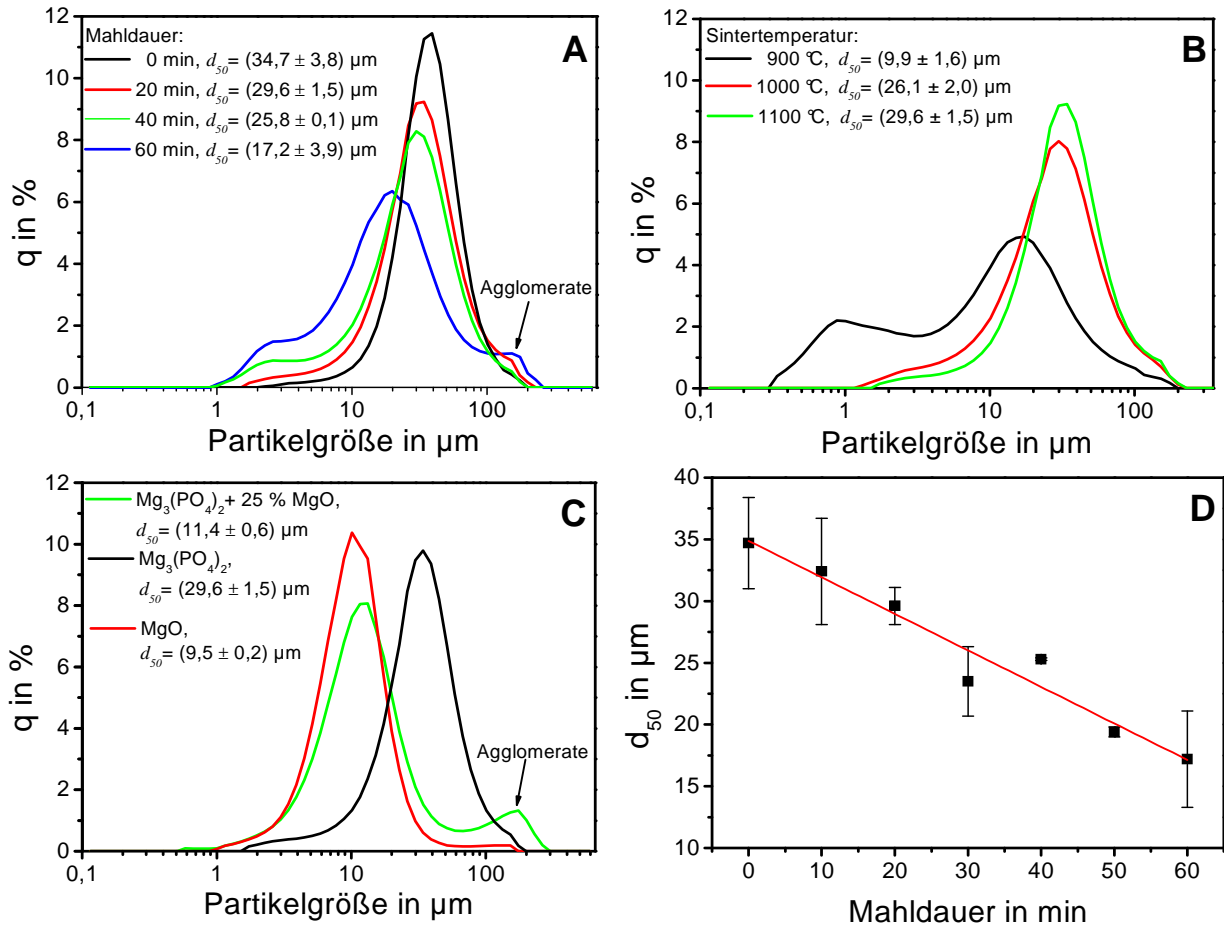


Abbildung 4.2: Partikelgröße von $Mg_3(PO_4)_2$ -Zementpulvern in Abhängigkeit von der Mahldauer (A) (Sinterung bei 1100 °C/5 h) und von der Sintertemperatur (B) (Mahlung nach der Sinterung: 20 min). Partikelgröße von Magnesiumoxidpulver, $Mg_3(PO_4)_2$ (Sinterung bei 1100 °C/5h, Mahldauer: 20 min) und dessen Modifikation mit 25 wt% MgO (C). Korrelation von Partikelgröße und Mahldauer von $Mg_3(PO_4)_2$ (D).

Tabelle 4.1: Schüttdichten und Spannen von Magnesiumphosphatzementen in Abhängigkeit von der Pulversynthese. Für bimodale Partikelgrößenverteilungen (60 min gemahlene Pulver, Sinterung bei 900 °C, MgO-modifiziertes Pulver) wurde die Spanne des Grobkornanteils berechnet.

Sintertemperatur: 1100 °C							
Mahldauer in min	0	10	20	30	40	50	60
Schüttdichte in g/cm^3	1,26 $\pm 0,01$	1,39 $\pm 0,15$	1,39 $\pm 0,06$	1,30 $\pm 0,02$	1,21 $\pm 0,01$	1,42 $\pm 0,05$	1,28 $\pm 0,08$
Spanne	1,38	2,33	1,86	2,21	2,06	1,67	2,53
Mahldauer: 20 min							
Sintertemperatur in °C	900		1000		1100, MgO modifiziert		
Schüttdichte in g/cm^3	0,88 \pm 0,04		1,29 \pm 0,01		1,17 \pm 0,03		
Spanne	3,06		2,12		2,00		

Die Entwicklung der Partikelgrößenverteilungen in Abhängigkeit von der Mahldauer lässt sich anhand der unterschiedlichen Krafteinwirkungen auf die Partikel während des Mahlvorgangs erklären. Der idealisierte Mahlvorgang in einer Planetenkugelmühle kann in zwei Phasen aufgeteilt werden ^[224]: In der 1. Phase erfolgt die Hauptzerkleinerung durch Schlagmahlung, diese ist durch die Reduktion der mittleren Partikelgröße und durch eine Zunahme der Spanne gekennzeichnet. In der 2. Phase werden dann durch Schermahlung die Partikel selektiv zerkleinert, dabei erhöht sich bei nur langsamer Abnahme der Partikelgröße der Feinkornanteil. Experimentell konnte der Beginn der Schlagmahlung für 60 min Mahlzeit identifiziert werden. Zu beachten ist, dass durch das Messprinzip Agglomerate aus kleinen Partikeln als Einzelpartikel erfasst werden, wodurch mit einem relativ hohen Fehler beim Feinkornanteil zu rechnen ist. Bedingt durch die abnehmende Partikelgröße tritt die Partikel/Partikel- und die Partikel/Wand-Haftung durch van-der-Waals-Kräfte oder elektrostatische Aufladung der Partikel gegenüber der Gewichtskraft in den Vordergrund. Sehr feinkörnige Pulver neigen somit stark zu einer Agglomeratbildung. Aufgrund der hohen Haftkräfte nimmt die gegenseitige Beweglichkeit der Partikel und damit die Rieselfähigkeit der Schüttung ab. Hieraus folgte eine Erhöhung der Porosität der Schüttung, einhergehend mit einer Erniedrigung der Schüttdichte ($< 1,22 \text{ g/cm}^3$, 60 min gemahlen) ^[225]. Neben dem hohen Anteil an Agglomeraten (Partikelfraktion $> 100 \mu\text{m}$) wiesen die untersuchten feinkörnigen Pulver eine große Spanne der Partikelgrößenverteilungen ($> 2,5$) auf (Tabelle 4.1), so dass die Erhöhung der Porosität auch eine Folge der Aneinanderlagerung von Partikeln mit hoher Variabilität bezüglich ihres Durchmessers war. Der hohe Feinkornanteil und die breite Korngrößenverteilung induzierte während des Abstreichens in dünne Pulverschichten die Bildung von Agglomeraten, wodurch es zum Einreißen des Pulverbetts kam.

Neben monomodalen Pulvern können unter bestimmten Voraussetzungen auch bimodale Pulver eingesetzt werden (Modifikation mit MgO, Abbildung 4.2C). Allgemein kann die Dichte der Schüttung und damit die Streichfähigkeit des Pulvers durch Modifikation des Zements mit einem geringen Anteil an feinkörnigen Partikeln, die dann als interpartikulärer Füllstoff dienen, optimiert werden. Entscheidend hierbei ist die Spanne der mengenmäßig größeren Partikelfraktion. Bimodale Partikelgrößenverteilungen mit einer Spanne $< 2,33$ der größeren Partikelfraktion zeigten ein gutes Streichverhalten in der Anwendung im 3DP.

4.1.2 Abbindezeiten

Neben einer guten Streichfähigkeit der Pulver ist eine optimale Interaktion zwischen Pulver und Binder, eine gute Benetzbarkeit des Pulvers und die Ortsständigkeit des Binders Voraussetzung für die Druckbarkeit maßhaltiger Strukturen. Die Benetzbarkeit ist von der Viskosität des Binders, der Topographie der Pulveroberfläche und dem Kontaktwinkel zwischen Binder und Pulver abhängig. Die Lokalisation des Binders wird durch eine hohe Schüttdichte des Pulvers begünstigt, da die Verringerung der Porosität zur Reduktion der Kapillarkräfte führt. Die

Ortsständigkeit des Binders kann durch Modifikation des Pulvers mit Polymeren verbessert werden, wobei es durch die Quellung des Polymers zu einer schnellen Aufnahme der Binderflüssigkeit kommt. Eine weitere Möglichkeit, die Diffusion des Binders zu minimieren, liegt in der Erhöhung der Reaktivität zwischen Pulver und Binder. Dies wird durch Optimierung des Pulver/Binder-Systems oder durch die Zugabe von hochreaktiven Zusatzstoffen erreicht. Angestrebte Abbindezeiten liegen im Bereich von wenigen Sekunden, wobei eine zu schnelle Abbindezeit (ms-Bereich) die Verbindung zwischen den einzelnen Pulverschichten verhindert. Mit Hilfe des Gilmore-Nadeltest wurden die Abbindezeiten der $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ -Zemente in Abhängigkeit von der Partikelgröße (Mahldauer, Sintertemperatur) und der Binderzusammensetzung untersucht.

Dabei zeigten die Abbindezeiten der Materialien eine starke und gewünschte Zunahme der Reaktivität der Verbindungen mit zunehmendem Magnesiumgehalt und steigender Mahldauer (Abbildung 4.3A). Die gesteigerte Abbindezeit in Abhängigkeit vom Magnesiumgehalt resultierte aus der besseren Löslichkeit der Verbindungen mit höherem Magnesiumgehalt, was die Reaktion zu Struvit beschleunigte. Abbildung 4.3B zeigt beispielhaft an der Verbindung $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ die Abhängigkeit zwischen Abbindezeit und PLR, wobei ein linearer Zusammenhang beobachtet werden konnte. Die inverse Proportionalität von Abbindezeit zum PLR resultierte aus der Kapazität der Pulverpartikel zum Binden von Flüssigkeit und aus der vergrößerten mittleren freien Weglänge zwischen den Partikeln im Reaktionsmedium. Durch einen höheren Flüssigkeitsanteil im Zement wurden die Partikel separiert, so dass ihre Interaktion behindert wurde ^[226].

Sowohl die Steigerung der Mahldauer als auch die Erniedrigung der Sintertemperatur hatten eine Abnahme der Partikelgröße zur Folge (Abbildung 4.2). In Konsequenz stieg die Reaktivität mit abnehmender Partikelgröße bzw. mit Erhöhung des Oberflächen/Volumenverhältnisses der Partikel an. Da die Reaktivität der Zementedukte maßgeblich durch deren Löslichkeitsprodukt und die Lösungsrate an der Partikeloberfläche bestimmt wird, ist neben der Partikelgröße auch die durch die Mahlung induzierte mechanische Aktivierung der Partikel ein entscheidender Faktor für die Reaktivität der Zementedukte. Die mechanische Aktivierung des Mahlguts beruht auf unterschiedlichen Prozessen, die während der Mahlung auftreten. Dabei kommt es neben einer Reduktion der Partikelgröße zu einer Akkumulation von Defekten in der Kristallstruktur sowie zu einer Amorphisierung oder zur Entstehung von metastabilen polymorphen Zuständen. Des Weiteren können chemische Reaktionen wie Ionenaustausch, Reduktion oder Oxidation stattfinden ^[227,228].

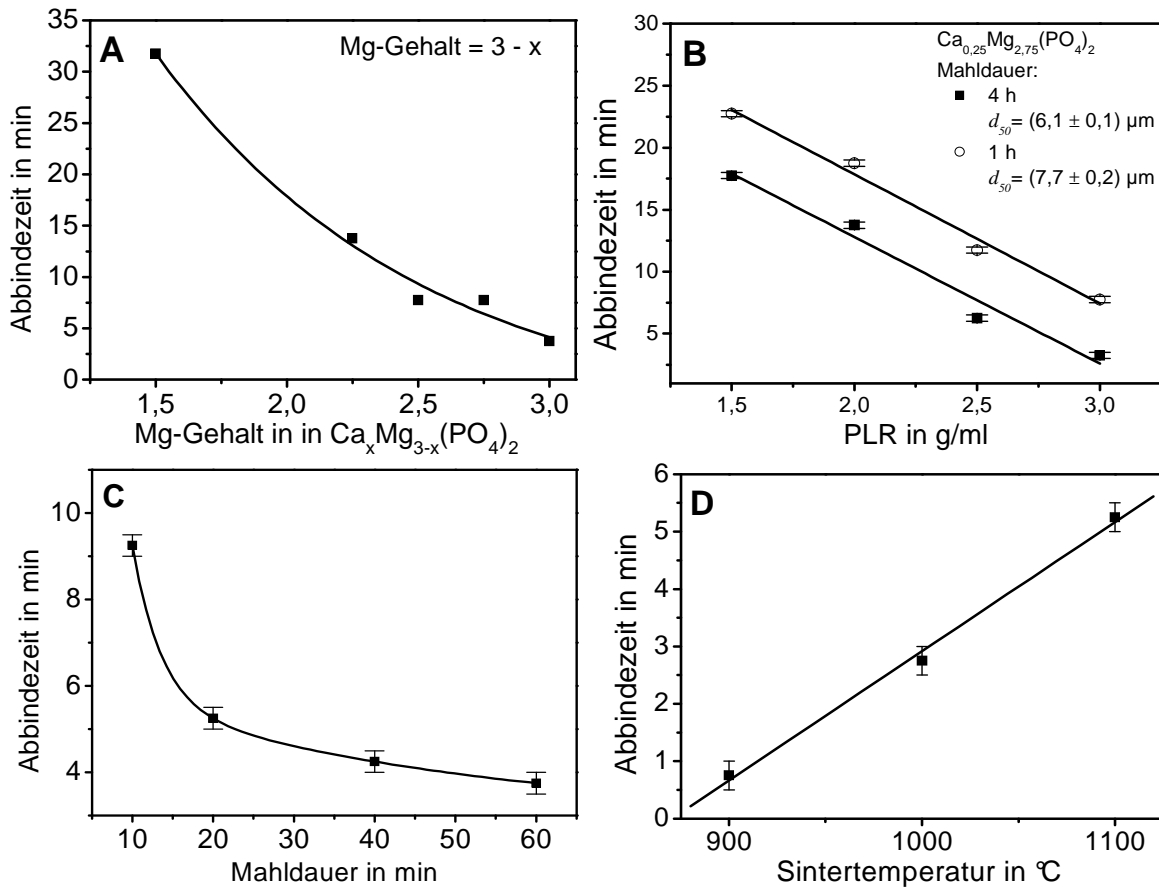


Abbildung 4.3: Initiale Abbindezeiten von $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ -Zementen nach dem Gilmore-Nadeltest bei 37 °C in Abhängigkeit vom Grad der ionischen Substitution der Verbindungen (A) (Mahldauer: 1 h, PLR = 3,0 g/ml), vom verwendeten PLR für $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ (B), der Mahldauer von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ (PLR = 2,0 g/ml) (C) und der Sintertemperatur von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ (D) (Mahldauer: 20 min); Binderflüssigkeit für A/B: 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, für C/D: 0,75 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ + 0,75 mol/l $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$.

In der initialen Phase der Mahlung kommt es durch Schlagmahlung zu einer Reduktion der Partikelgröße. Daneben kann bei kristallinen Stoffen der Mahlvorgang auch Auswirkungen auf deren Kristallinität haben. Ab einer Grenzpartikelgröße im μm -Bereich ändern sich die mechanischen Eigenschaften (E-Modul, Bruchzähigkeit) des Mahlguts derart, dass die eingebrachte Mahlenergie die Partikel nicht mehr entlang einer Netzebene spaltet, sondern es durch Scherkräfte zu einer plastischen Verformung der Partikel kommt. Die dadurch entstehenden Defekte im Gefüge, können sich bis zur Phasenumwandlung in den amorphen Zustand kumulieren, wie es beispielsweise für β -TCP^[229], α -TCP^[230], TTCP^[231] oder alkalihaltige CaP^[232] gezeigt werden konnte. Die Röntgendiffraktogramme der unterschiedlich synthetisierten Zementpulver zeigten keine Peakverbreiterung, so dass eine Amorphisierung der Pulverpartikel bis zu einer Mahldauer von 60 min ausgeschlossen werden konnte. Die Kristallitgrößen $d_{[h,k,l]}$ der Rohpulver mit monokliner Kristallstruktur lagen zwischen $d_{[0,2,0]} = (69,1 \pm 8,0)$ nm, $d_{[2,0,0]} = (60,9 \pm 4,1)$ nm, $d_{[0,2,0]} = (56,0 \pm 11,0)$ nm. Mit zunehmender Mahldauer war von der Entstehung nanoskaliger Defekte oder Risse und einer zunehmenden Oberflächenrauigkeit der Partikel auszugehen, welche zu einer Vergrößerung der spezifischen Oberfläche des Mahlguts führten. Die spezifische Oberfläche S nimmt

nach Gleichung 4.3 exponentiell mit der Mahldauer bis zum Erreichen eines Maximalwertes S_m zu ^[224].

$$S_t = S_m(1 - e^{-kt}) \quad (4.3)$$

k = Konstante (o.E.)

Dies ist mit einer Erhöhung der inneren Energie verbunden. Damit einhergehend erhöht sich die thermodynamische und kinetische Löslichkeit der Werkstoffe. Da die Partikelgröße nach Abbildung 4.2D linear mit der Mahldauer abnahm, war davon auszugehen, dass die Vergrößerung der spezifischen Oberfläche der Partikel die Ursache für den exponentiellen Abfall der Abbindezeit mit zunehmender Mahldauer war. Dies erklärt auch den linearen Zusammenhang zwischen Sintertemperatur und Abbindezeit bei identischer Mahldauer der Pulver (Abbildung 4.3D). Die prozentuale Partikelgrößenreduktion stieg mit zunehmender Mahldauer an (Abbildung 4.4).

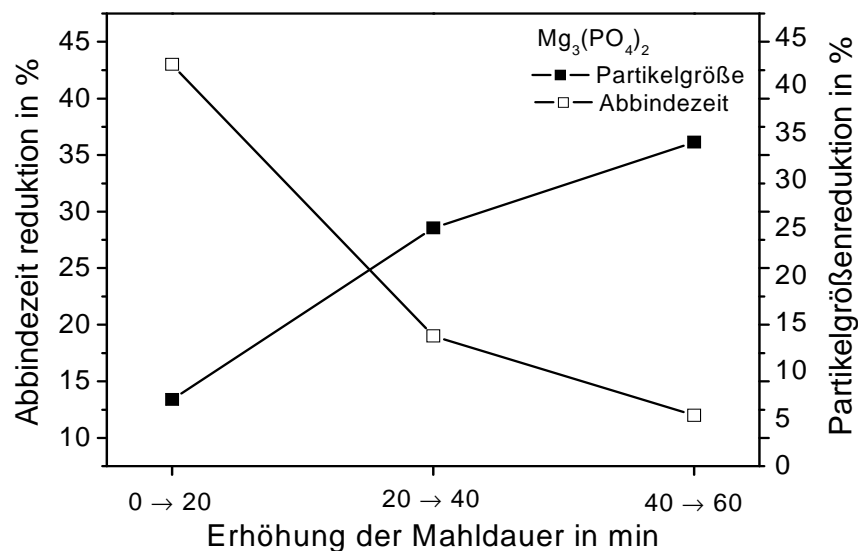


Abbildung 4.4: Reduktion der Partikelgröße und der Abbindezeit bei Erhöhung der Mahldauer von $Mg_3(PO_4)_2$.

Eine Steigerung der Mahldauer von 0 min auf 10 min reduzierte die Partikelgröße um 9 % und eine Vervielfachung der Mahldauer von 60 min auf 240 min reduzierte die Partikelgröße um insgesamt 76 %. Gerade kurzzeitig gemahlene Pulver zeigten einen starken Abfall der Abbindezeit mit steigender Mahldauer. Während sich die Abbindezeit für 20 min gemahlenem Pulver im Vergleich zu 10 min gemahlenem Pulver um etwa 40 % verkürzte, reagierte 60 min gemahlene Pulver im Vergleich zu 40 min gemahlenem Pulver nur um 12 % schneller ab. Die Erhöhung der Reaktivität für kurzzeitig gemahlene Pulver muss somit, unter Einbezug der Partikelgrößenverteilungen, eine Folge der Vergrößerung der spezifischen Oberfläche der Partikel sein. Dies erklärt auch die mit steigendem PLR um 22 % ($PLR = 1,5$) – 56 % ($PLR = 3,0$) beschleunigte Reaktivität von $Ca_{0,25}Mg_{2,75}(PO_4)_2$ (Abbildung 4.3B), bei nur 20 %iger Reduktion der Partikelgröße und Vervielfachung der Mahldauer. Entscheidender Faktor hierbei war die mit der Mahldauer

ansteigende Oberflächenrauigkeit der Partikel, die zu einer schnelleren Absorption der Binderflüssigkeit führte.

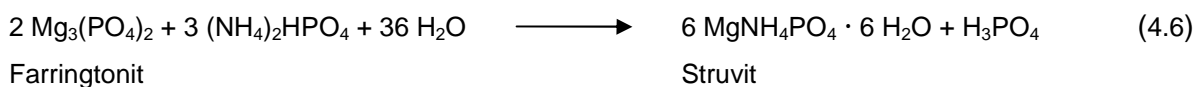
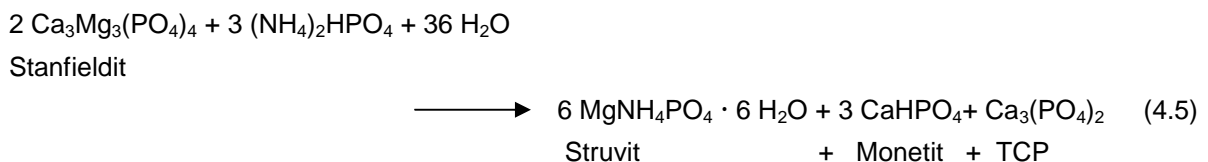
Eine Abhängigkeit der Reaktivität von der Binderzusammensetzung konnte für reine Magnesiumphosphatpulver nicht festgestellt werden. Eine Modifikation des Zementpulvers mit 25 wt% MgO führte zu einer um 46 % schnelleren Abbindegeschwindigkeit. Diese lag für 20 min gemahlenes Magnesiumphosphatpulver und einem PLR = 2 unter Verwendung eines 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -Binders bei ca. 2,5 min. Die Vorteile einer schnellen Abbinde Reaktion zeigten sich vornehmlich bei der Anwendung im Pulverdruck. Die Wahl der prozentualen Modifikation mit MgO wurde als Kompromiss zwischen hoher Reaktivität (hoher MgO-Anteil) und guter Streichfähigkeit (geringer Anteil an feinkörnigem MgO) getroffen. Der Einsatz des 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -Binders für mit MgO modifizierte Farringtonitpulver erklärt sich aus der Stöchiometrie der Reaktionsgleichung 4.4, wonach die Edukte zu gleichen Mengenanteilen zum Produkt Struvit umgesetzt werden:



Die Verfestigung der Strukturen erfolgte somit durch quantitative Umsetzung von MgO zu Struvit, wobei die schnelle Aushärtung eine hohe Maßhaltigkeit der Strukturen garantierte. Die Auslagerung in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ führte zur Umsetzung des Farringtonitanteils und des restlichen MgO zu Struvit und bestimmte die endgültige Stabilität der Strukturen.

4.1.3 Phasenzusammensetzung der Ausgangspulver und nach Zementreaktion

Das Ausgangspulver bestand nach Sinterung aus zwei unterschiedlichen Phasen (Abbildung 4.5). Während reines Trimagnesiumphosphat der Kristallstruktur von Farringtonit zugeordnet werden konnte, wurde durch partielle Substitution mit Calcium als zweite Phase Stanfieldit ($\text{Ca}_3\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_6$, Gleichung 4.5) identifiziert. Nach dem Abbindevorgang mit einer 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung bildete sich nach den folgenden Gleichungen mit allen Werkstoffen die Phase Struvit.



Allerdings erfolgte die Umsetzung nicht quantitativ, da die Menge an Ammoniumphosphat in der Zementflüssigkeit hierfür nicht ausreichend war. Durch stöchiometrische Berechnung nach Gleichung 4.6 ergab sich eine quantitative

Umsetzung von 2 mol $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ (MW ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) = 262,86 g/mol) mit 3 mol $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (3,5 M Lösung) (MW ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) = 132,06 g/mol) zu 6 mol $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ für ein PLR von 0,5 g/ml. Da die Auskristallisation von Struvit als Diffusionsinhibitor wirkt, ist auch hierbei nicht mit einer vollständigen Umsetzung von Farringtonit zu Struvit zu rechnen. Die theoretisch mögliche Umsetzungsrate für eine Zementformulierung mit $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ und 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ bei einem PLR = 3 g/ml liegt bei ca. 16 %.

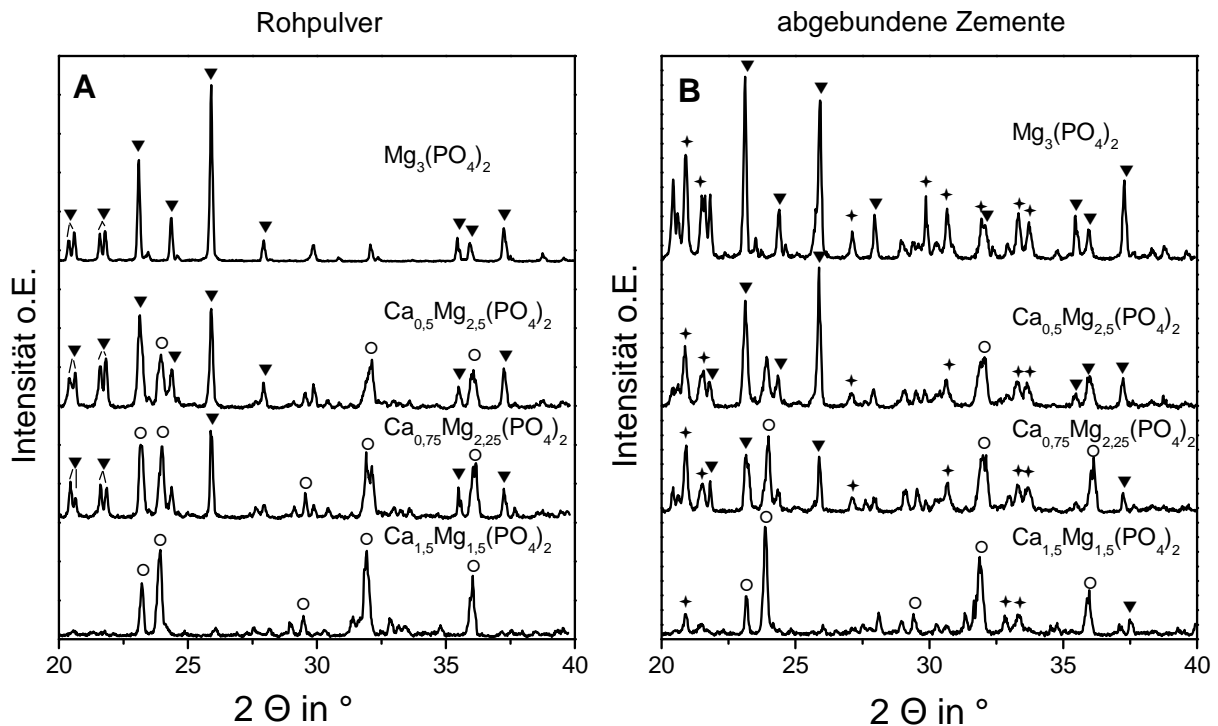


Abbildung 4.5: Röntgendiffraktogramme der Zementpulver (A) und der 24 h bei 37 °C in H_2O ausgelagerten mit 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung abgebundenen Zemente (B) (PLR = 3 g/ml). Die Beugungsmuster der Rohmaterialien entsprechen dem von reinem Farringtonit (PDF No. 33-0876; ▼) für $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ und Stanfieldit (PDF No. 11-023; ○) für $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$ oder Mischungen beider Phasen für die dazwischen liegenden Verbindungen. Die stärksten Beugungsreflexe von Struvit (PDF No. 15-0762) sind für die abgebundenen Zemente mit "+" markiert.

Zur Optimierung der physikalischen Parameter, wie Streichfähigkeit, Abbindezeit und Umsetzungsrate, wurde der Einfluss der Pulversynthese auf die Eigenschaften des Magnesiumphosphatzements untersucht. Hierzu wurden der Mischungsgrad der Rohpulver vor der Sinterung (Pflugscharmischer, Kugelmühle), die Sintertemperatur, die Anzahl der Sinterungen sowie die Mahldauer des Sinterkuchens variiert. Dabei zeigte sich, dass die Herstellungsbedingungen der Pulver einen entscheidenden Einfluss auf die Phasenreinheit der Zementpulver hatten (Abbildung 4.6). Sowohl die unzureichende Durchmischung der Ausgangspulver MgHPO_4 und $\text{Mg}(\text{OH})_2$ im Pflugscharmischer, als auch eine Sintertemperatur < 1100 °C führten zu magnesiumpyrophosphathaltigen Zementen. Der Grund hierfür war die Bildung phosphatreicher Domänen aus $\text{MgHPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in der Pulvermischung, die sich nach Gleichung 4.7 im Temperaturbereich von 300 – 400 °C zu Magnesiumpyrophosphat umwandeln:



Phasenanalysen der Rohpulvermischungen ergaben im Vergleich zu ausschließlich mit der Kugelmühle verarbeiteten Pulvern einen um bis zu $(37,5 \pm 25,2) \%$ reduzierten Farringtonitanteil für eine Herstellung der Zemente mit dem Pflugscharmischer. Das untersuchte Rohpulver entstammte jeweils einer Charge, so dass in Hinblick auf das geringe Analysenmaterial (ca. 2 g) die Untersuchung ($n = 4$) stichprobenartig die Phasenverteilung der gesamten Pulvermischung darstellt. Die hohe Standardabweichung verdeutlicht somit die Inhomogenität des Rohpulvers. Diese war das Resultat der unzureichenden Durchmischung der Zementedukte mit dem Pflugscharmischer, wodurch es während der Sinterung zur Bildung von Magnesiumpyrophosphatdomänen kam. Die unreaktive Phase Magnesiumpyrophosphat wurde durch den Abbindeprozess mit ammoniumhaltigen Binder nicht zu Struvit umgewandelt und verblieb als Verunreinigung in den Strukturen. Zudem zeigte Magnesiumpyrophosphat eine abbindeverzögernde Wirkung auf die Zementpulver. Ein phasenreines $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ -Zementpulver wurde erhalten, indem die (homogene) Vermischung der Ausgangsmaterialien in einer Kugelmühle vor der Sinterung für 5 h bei $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ stattfand.

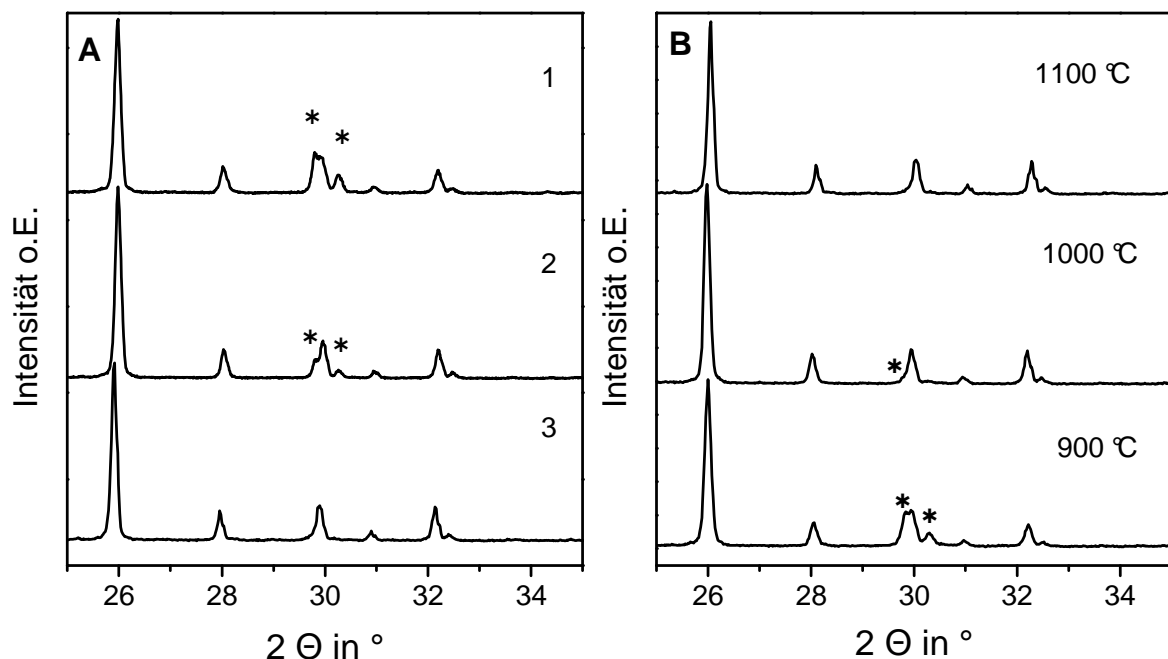


Abbildung 4.6: Phasenzusammensetzung der Rohpulver in Abhängigkeit von der Pulversynthese (A). Die Mischungsart der Rohpulver und die Mahldauer nach der Sinterung bestimmen den Gehalt an Magnesiumpyrophosphat (*). 1 h im Pflugscharmischer vermengt und 5 h bei $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ gesintert (1), nach 60 min Mahlung ein zweites Mal bei $1100 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 h gesintert (2), Vermischung des Rohpulvers in der Kugelmühle für 20 min (3). Variation der Sintertemperatur für die Mischung aus (3) (B). Nicht gekennzeichnete Peaks sind der Phase Farringtonit zugeordnet.

4.1.4 Mechanische Eigenschaften bei der Verarbeitung als Zement

Die Zementmatrices wiesen abhängig von der Stöchiometrie der Pulver stark unterschiedliche Festigkeiten auf (Abbildung 4.7). Hohe Druckfestigkeiten $> 50 \text{ MPa}$

wurden für Ca/(Ca + Mg) Verhältnisse zwischen 0 – 0,25 bei einer Mahldauer von 4 h erhalten. Mit zunehmender Menge an Zementflüssigkeit (abnehmendes PLR) wurde ein starker Abfall der Festigkeit auf ca. 20 MPa (PLR = 1,5 g/ml) beobachtet. Dies ist vermutlich auf die höhere Porosität der Werkstoffe zurückzuführen, da die wässrige Phase hierbei nicht quantitativ in die Abbindereaktion mit einght. Die Porosität bestimmt maßgeblich die Festigkeit keramischer Werkstoffe. Die Festigkeit poröser Keramiken ist dabei invers exponentiell vom Grad der Porosität P abhängig und invers proportional zur Defektgröße innerhalb der Struktur^[233]:

$$CS = \sqrt{\left(\frac{E_0 \cdot R}{\pi \cdot c}\right)} \cdot e^{-KP} \quad (4.8)$$

Dabei ist E_0 die Festigkeit des porositätsfreien Materials (in Pa), c die Defektgröße (in mm), R die Oberflächenbruchenergie (in J) und K eine materialabhängige Konstante.

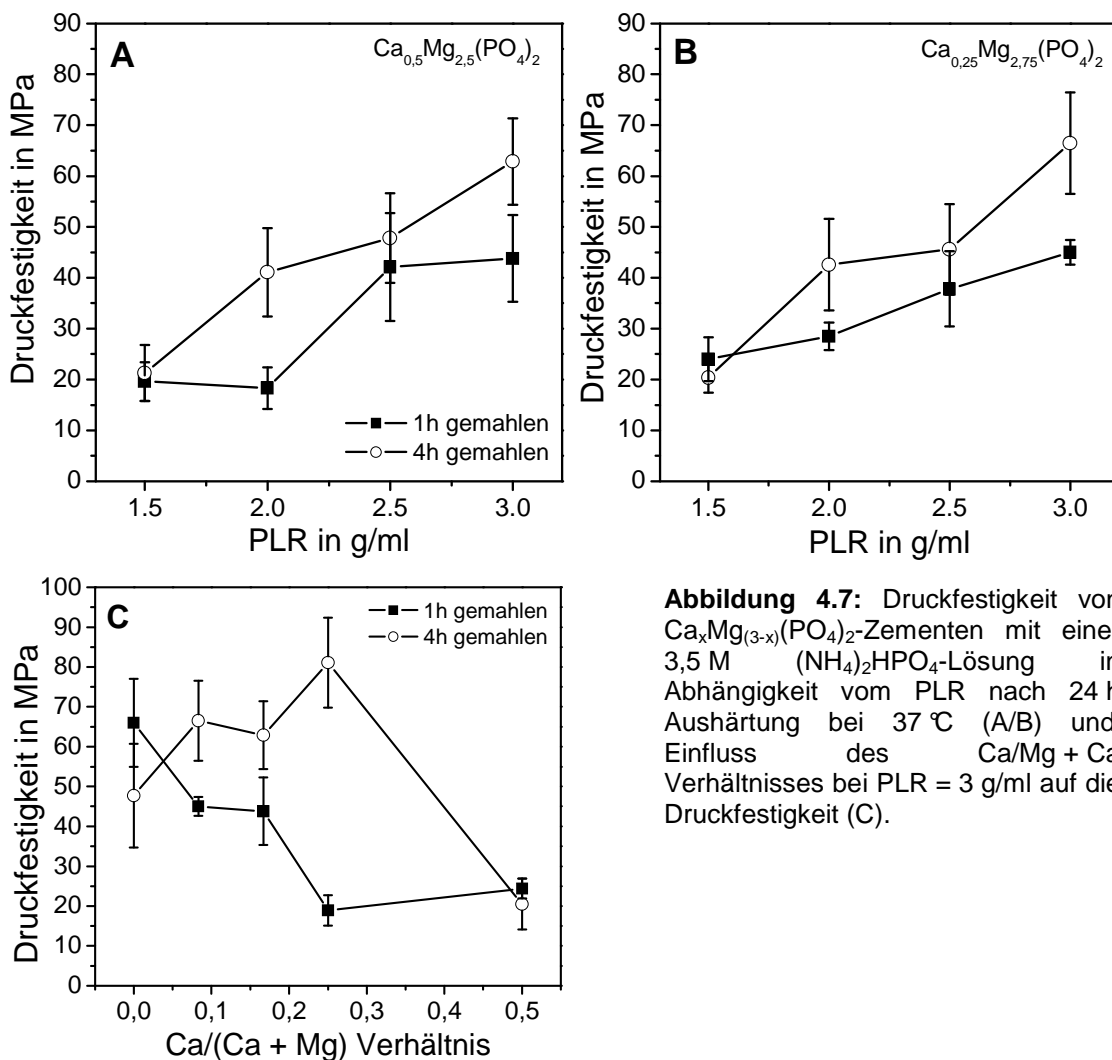


Abbildung 4.7: Druckfestigkeit von $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ -Zementen mit einer 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung in Abhängigkeit vom PLR nach 24 h Aushärtung bei 37 °C (A/B) und Einfluss des Ca/Mg + Ca Verhältnisses bei PLR = 3 g/ml auf die Druckfestigkeit (C).

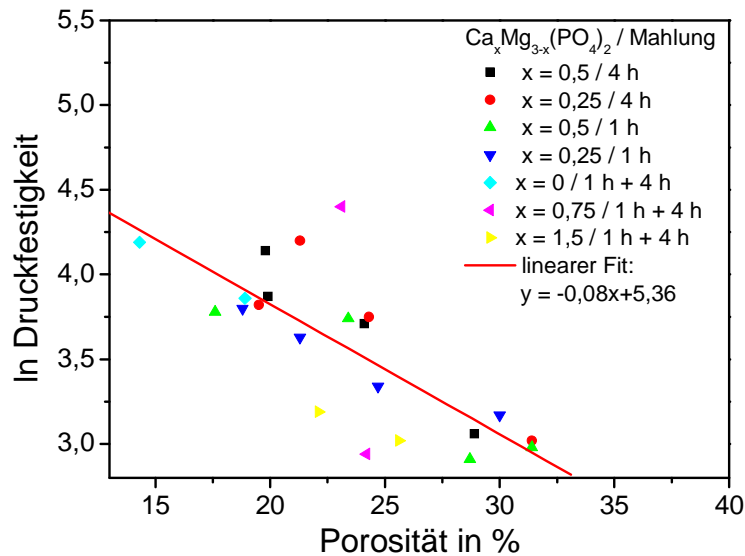


Abbildung 4.8: Korrelation zwischen der Porosität und dem Logarithmus der Druckfestigkeit struvitbildender Zemente aus den Verbindungen $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$.

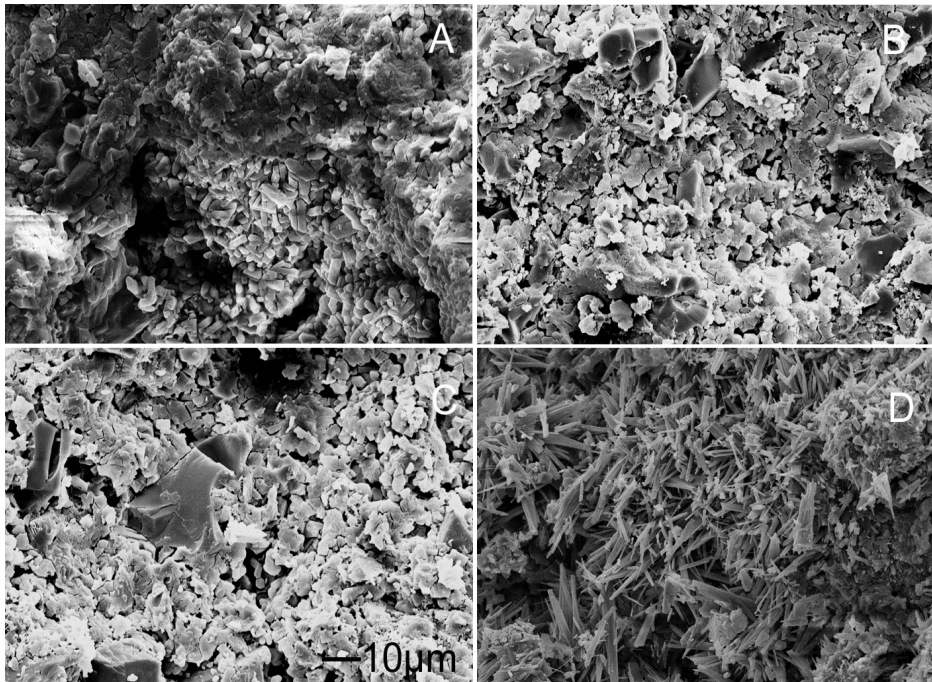


Abbildung 4.9: REM-Aufnahmen von $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ -Zementen nach 24 h Aushärtung mit einer 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung bei einem PLR = 3 g/ml (A): $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, (B): $\text{Mg}_{2,5}\text{Ca}_{0,5}(\text{PO}_4)_2$, (C): $\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$ und (D): $\text{Mg}_{1,5}\text{Ca}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$.

Eine Korrelation der erhaltenen Werte für die Porosität mit dem Logarithmus der Druckfestigkeit der Werkstoffe ist in Abbildung 4.8 wiedergegeben. Diese zeigt, dass generell ein linearer Zusammenhang bestand. Die mechanischen Eigenschaften der Zemente verbesserten sich mit geringeren PLR (niedrigere Porosität), jedoch zeigten manche Zementformulierungen eine Abweichung vom Gültigkeitsbereich. Beispielsweise war die Druckfestigkeit von $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ nach 4 h Mahlung (81 MPa) ungefähr 3–4 mal höher als die von $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$ (20–24 MPa), obwohl beide Werkstoffe eine vergleichbare Porosität besaßen. Eine mögliche

Erklärung dafür ist die Änderung der Zementmorphologie (Abbildung 4.9). Während Zemente mit einem $\text{Ca}/(\text{Mg} + \text{Ca})$ Verhältnis $\leq 0,25$ aus kleinen und kompakten Struvitkristalliten mit einer Größe im Bereich $1 - 5 \mu\text{m}$ bestanden (Abbildung 4.9A-C), zeigte die Verwendung eines äquimolaren $\text{Ca}:\text{Mg}$ Verhältnisses ($\text{Mg}_{1,5}\text{Ca}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$) die Bildung von Struvitwhiskern mit einer Länge im Bereich von $20 - 30 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von $< 2 \mu\text{m}$ (Abbildung 4.9D).

4.2 Drucken von Struvitformkörpern

Auf Basis der Ergebnisse von Kapitel 4.1 wurden für den Druckvorgang die Reinsubstanz $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ oder ein mit 25 wt% MgO-modifiziertes MgP-Pulver eingesetzt, da diese die Voraussetzungen hinsichtlich der Anwendung im Pulverdruckverfahren (schneller Abbindevorgang, Glättbarkeit) bestmöglichst erfüllten. Die flüssige Phase stellte eine konzentrierte Ammoniumphosphatlösung dar. Variiert wurden hierbei die Zusammensetzung der flüssigen Phase (Konzentration von Ammoniumphosphat, Verhältnis von primärem zu sekundärem Ammoniumphosphat) sowie die Bindersättigung. Die Verfestigung der gedruckten Geometrien erfolgte durch eine Abbindereaktion der Pulverkomponente und der flüssigen Druckphase *in situ* nach:

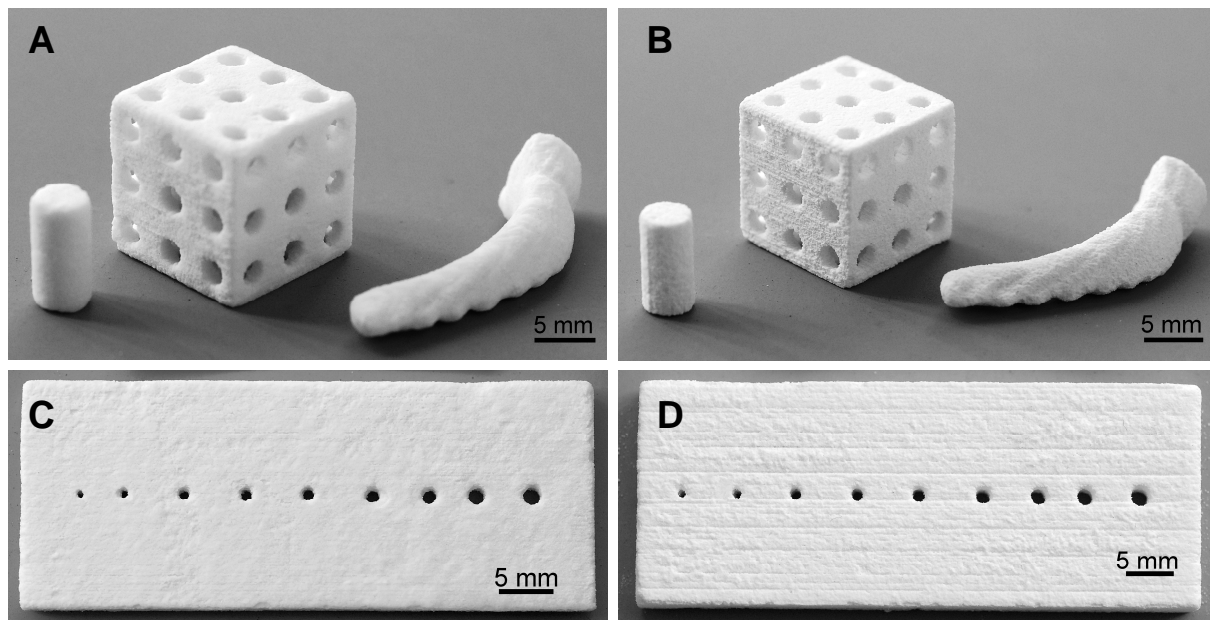


Abbildung 4.10: Auflösungsvermögen gedruckter Strukturen (Zylinder, makroporöser Würfel, Orbitaimplantat) aus $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 + 25 \text{ wt\% MgO}$ (A) und Tricalciumphosphat (B); Probestructuren mit definierten Makroporen mit Durchmessern von $1,1 - 2,0 \text{ mm}$ aus $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 + 25 \text{ wt\% MgO}$ (C) bzw. Tricalciumphosphat (D).

Zur Sicherstellung einer hohen Druckqualität wurde das Pulver zusätzlich mit hochreaktiven MgO modifiziert, um so ein Verlaufen des Binders in der Pulvermatrix durch Kapillarkräfte zu minimieren. Während des Druckprozesses erfolgte innerhalb von Sekunden die vollständige Umsetzung von MgO zu Struvit (Gleichung 4.11). Der Druckvorgang mit diesen schnellabbindenden Zementpulvern ermöglichte die Herstellung definiert makroporöser Strukturen auf Basis von CAD-Designs (Abbildung 4.10).

4.2.1 Makroporöse Strukturen

Zur Bestimmung des mit dem Drucker realisierbaren Auflösungsvermögens wurden Prüfkörper aus mit MgO modifiziertem Trimagnesiumphosphat und reinem Calciumphosphat mit Poren unterschiedlicher Durchmesser (1,1 – 2,0 mm) gedruckt (Abbildung 4.10C/D) und die Abweichung der experimentellen von den theoretischen Porendurchmessern in Abhängigkeit von der Pulverzusammensetzung und der Nachbehandlung bestimmt (Abbildung 4.11). Neben gerätespezifischen Parametern wie Druckgeschwindigkeit, Bindersättigung und Tropfengröße des applizierten Binders, war das Auflösungsvermögen vom Pulver/Binder-System abhängig. Die theoretisch erreichbare Auflösung des verwendeten Druckers lag laut Herstellerangaben für das System Papier/Druckertinte bei 600 x 540 dpi ^[234]. Materialspezifische Parameter, insbesondere die Partikelgröße des Pulvers, die Viskosität des Binders und die Reaktionsgeschwindigkeit des Zementsystems führten zu einer Verschlechterung der Auflösung gegenüber dem Referenzsystem.

Im Vergleich zu dem bereits etablierten CaP-System ^[16,76] zeigte sich unabhängig von der Nachhärtungsdauer und der Porenlänge eine verbesserte Auflösung für das Magnesiumphosphatsystem, wobei allgemein eine sinkende Strukturgenauigkeit für geringere Porengrößen festzustellen war (Abbildung 4.11A/B). Als möglicher Grund sind die unterschiedlichen Partikelgrößenverteilungen der einzelnen Matrices zu vermuten, die für die Magnesiumphosphatpulver geringer ausfielen als für entsprechende CaP-basierte Systeme. Bei der Abbindereaktion des Magnesiumphosphats wurden 6 mol Kristallwasser (CaP: 2 mol Kristallwasser) je gebildetem Molekül Struvit in das Kristallgitter eingelagert, was die Tendenz zur Diffusion des Binders durch Kapillarkräfte in der Struvitmatrix herabsetzte. Die bessere Auflösung im Bereich kleiner Porengrößen für mit geringeren Anteilen von mit MgO modifizierten MgP-Pulvern (Abbildung 4.11B) war der Tatsache zuzuschreiben, dass aufgrund des steigenden Feinkornanteils mit wachsendem Anteil an MgO das Pulver zur Agglomeration neigte und feine Poren nur schwer von Pulverresten befreit werden konnten bzw. größere Partikelagglomerate zur Zementreaktion beitrugen.

Der lineare Fit der Messergebnisse aus Abbildung 4.11D ergab eine Korrelation der designten mit dem experimentell realisierbaren Porendurchmessern. Mit Hilfe der Gleichungen 4.12 und 4.13 ist es somit möglich, den Porendurchmesser der Designvorlage (d_d) einem experimentell gewünschten Porendurchmesser (d_e) für das entsprechende Materialsystem zuzuordnen:

$$d_d (\text{Bruschit}) = 0,76 + 1,11 \cdot d_e \quad (\text{in mm}) \quad (4.12)$$

$$d_d (\text{Struvit}) = 0,56 + 0,94 \cdot d_e \quad (\text{in mm}) \quad (4.13)$$

Nach Gleichung 4.12 bzw. 4.13 ist ein Porendurchmesser d_d von 760 μm für Bruschit und von 560 μm für Struvit experimentell nicht mehr auflösbar. Die minimale noch zu entstauende Porengröße entspricht nach Angaben von Curodeau et al. [54] für ein keramisches Aluminiumoxidpulver/Siliciumoxidbinder-System in etwa dem 5-fachen der Partikelgröße, wobei diese mit der Komplexität der Kavitäten und mit sinkendem Porenradius steigt. Als auflösungslimitierend sind hierbei vor allem größere Partikel und Partikelagglomerate zu bewerten. Da im Gegensatz zur Abstreichbarkeit eines Pulvers hierbei nicht der Feinkornanteil entscheidend ist, diene anstelle des d_{50} -Werts der mittlere Partikeldurchmesser des Pulvers als Grundlage der Berechnung. Der minimale, experimentell noch darstellbare Porendurchmesser d_e ergibt sich somit zu ca. 200 μm für mit 25 wt% MgO modifiziertes Magnesiumphosphat und zu ca. 210 μm für Calciumphosphat.

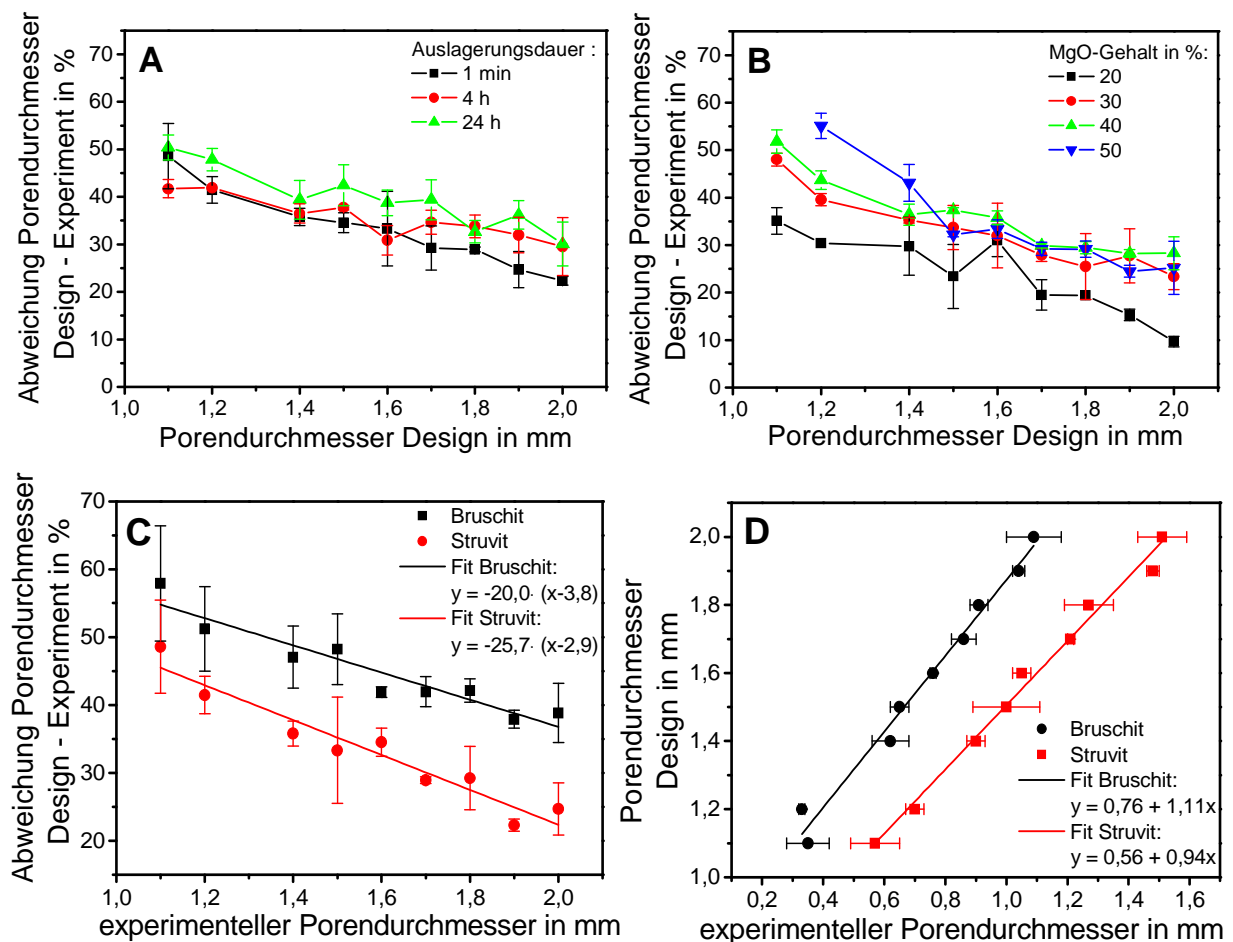


Abbildung 4.11: Bestimmung des Auflösungsvermögens für den 3D-Pulverdruck von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 + 25 \text{ wt\% MgO}$ in Abhängigkeit von der Nachhärtedauer in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (A) und in Abhängigkeit vom MgO-Gehalt (B). Prozentuale Abweichung zwischen Design und Experiment für Bruschit und Struvit (C). Vergleich der experimentellen Porendurchmesser mit dem Design für magnesiumphosphat- und calciumphosphatbasierte Systeme (D).

4.2.2 Mechanische Eigenschaften und Zusammensetzung der Strukturen

Als Parameter zur Bewertung der mechanischen Eigenschaften der pulvergedruckten Magnesiumphosphatstrukturen wurde die Druckfestigkeit in Abhängigkeit von der Pulversynthese (Abbildung 4.12B) und der Nachhärtedauer in Ammoniumphosphatlösung evaluiert. Wie in 4.1.3 diskutiert hatte die Pulversynthese einen entscheidenden Einfluss auf die Phasenreinheit der Zementpulver. Durch unzureichende Vermischung der Zementedukte im Pflugscharmischer kam es während der Sinterung zur Entstehung von Magnesiumpyrophosphat. Als unreaktive Phase verblieb Magnesiumpyrophosphat als Verunreinigung in den abgebundenen Strukturen (Abbildung 4.12A). Die geringfügig bessere Festigkeit der Zemente 1 und 2 könnte zum Einen die Folge der Entstehung einer Glasphase von Magnesiumpyrophosphat mit $Mg_3(PO_4)_2$ sein, zum Anderen entsteht durch Bildung von Pyrophosphat MgO (Gleichung 4.14, 4.15), welches den Phasenanteil des Abbindeprodukts Struvit erhöht und infolgedessen mit einer Steigerung der Festigkeit einhergeht:

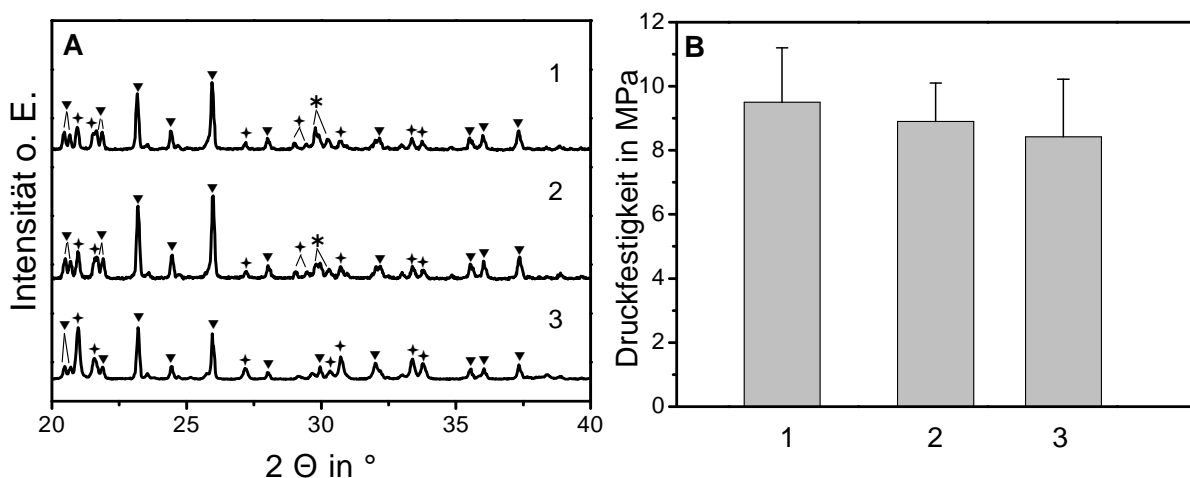


Abbildung 4.12: Phasenzusammensetzung (A) und Druckfestigkeit (B) pulvergedruckter Magnesiumphosphatstrukturen (Rohpulver: $Mg_3(PO_4)_2$, Binder: 0,75 mol/l $NH_4H_2PO_4$ + 0,75 mol/l $(NH_4)_2HPO_4$ -Lösung, 24 h Nachhärtung in 0,75 mol/l $NH_4H_2PO_4$ + 0,75 mol/l $(NH_4)_2HPO_4$) in Abhängigkeit von der Pulversynthese (Tabelle 4.2). Phasen:♣: Struvit, ▼: Farringtonit,*: Magnesiumpyrophosphat.

Tabelle 4.2: Synthese der Magnesiumphosphatpulver 1 – 3 aus Abbildung 4.12.

Pulversynthese	1	2	3
Mischung 1 h	Pflugscharmischer	Pflugscharmischer	Kugelmühle
1. Sinterung 5 h 1100 $^\circ\text{C}$	✓	✓	✓
Mahlung	60 min	10 min	20 min
2. Sinterung 5 h 1100 $^\circ\text{C}$	✓	-	-
Mahlung	10 min	-	-

Aufgrund der Inhomogenität der mittels Pflugscharmischer hergestellten Zementpulver und der abbindeverzögernden Wirkung von Magnesiumpyrophosphat wurde dieser Ansatz der Pulversynthese nicht weiter verfolgt.

Wie in 4.1.4 bereits diskutiert gilt die Porosität einer Struktur als entscheidender, die Festigkeit bestimmender Faktor. Die Porosität einer Zementstruktur ist von der Partikelgröße des Zementpulvers und dem PLR abhängig. Wie anhand der Partikelgrößenanalyse (Kapitel 4.1.1) gezeigt werden konnte, bewirkt eine Steigerung der Mahldauer eine Reduktion der Partikelgröße. Da sich die d_{50} -Werte von 10 min und 20 min gemahlene Magnesiumpulver um weniger als 10 % unterscheiden, ist der Porositätsunterschied zwischen den aus unterschiedlich synthetisiertem Pulver hergestellten Strukturen als insignifikant zu bewerten.

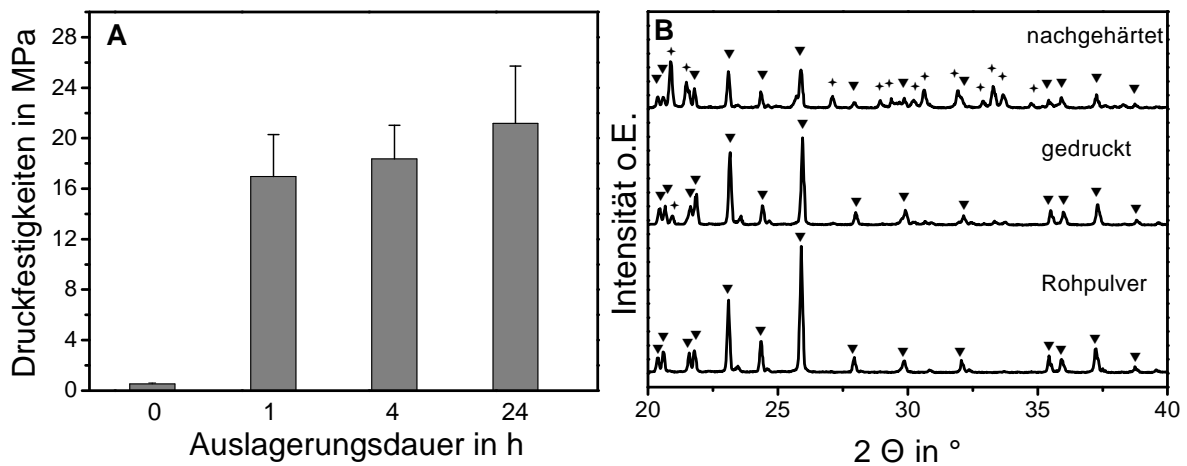
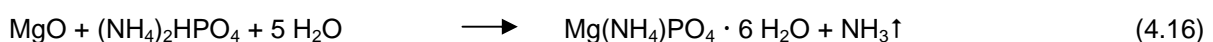


Abbildung 4.13: Druckfestigkeiten der pulvergedruckten Magnesiumphosphatstrukturen in Abhängigkeit von der Auslagerungsdauer in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung (A) (Rohpulver: $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ + 25 wt% MgO, Binder: 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Röntgendiffraktogramme pulvergedruckter Magnesiumphosphatstrukturen (B). Rohpulver $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ + 25 wt% MgO, direkt nach dem Druck, sowie nach 24 h Nachhärtung in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung. Phasen: +: Struvit, ▼: Farringtonit.

Sowohl das Auflösungsvermögen als auch die Druckfestigkeit nachgehärteter pulvergedruckter Struvitstrukturen konnte durch die Modifikation von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ mit MgO entschieden gesteigert werden (Abbildung 4.13A). Da MgO als amorphe, hochreaktive Phase die Auflösung und die initiale Festigkeit der Struktur bestimmte, wurde als Binder anstatt einer Mischung aus 0,75 mol/l $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + 0,75 mol/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ eine 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ -Lösung gewählt. Dadurch wurde die Abbindereaktion gesteigert. Zudem entsteht nach Gleichung 4.16 bei der Abbindereaktion von MgO und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ Ammoniak, welcher zu einer gesteigerten Porosität der Zementstruktur und damit zu einer geringeren Festigkeit führen würde [90].



Die äquimolare Umsetzung (Gleichung 4.11) von MgO zu phasenreinem Struvit (Abbildung 4.14) trug maßgeblich zur endgültigen Festigkeit der gedruckten

Strukturen bei. Dabei konnte die initial geringe Festigkeit nach der Entnahme aus dem Pulverbett von ca. 0,5 MPa durch die Nachhärtung auf Werte von > 20 MPa gesteigert werden (Abbildung 4.13A). Grund hierfür war die durch die Nachhärtung gesteigerte Umsetzungsrate von Trimagnesiumphosphat zu Struvit (Abbildung 4.13B) und die damit einhergehende Reduktion der Porosität. Eine Rietveldanalyse zeigte, dass durch die Nachhärtung gedruckter MgP-Strukturen in ammoniumhaltiger Lösung der Struvitanteil im Vergleich zu unbehandelten Strukturen bis zu 40 % (24 h Nachhärtungsdauer) gesteigert werden konnte. Die Analyse der Porosität ergab, dass die Nachhärtung mit einem Abfall der Porosität von bis zu 24 % (1 h Nachhärtungsdauer) einherging.

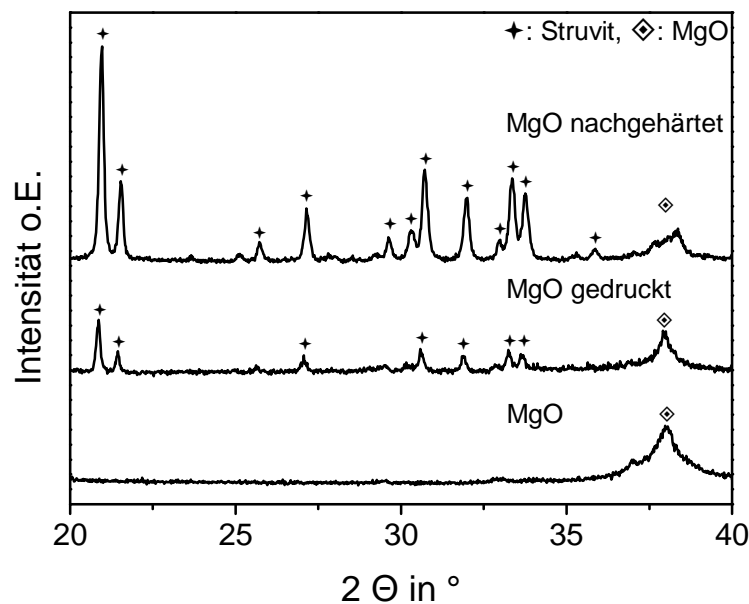


Abbildung 4.14: Röntgendiffraktogramme von Magnesiumoxid, von einer mit 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ pulvergedruckten Magnesiumoxidstruktur und einer gedruckten und in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung nachgehärteten Magnesiumoxidstruktur. Das amorphe MgO-Rohpulver wurde durch die Nachhärtung zu phasenreinem Struvit umgesetzt. Phasen: +: Struvit, ◇: MgO.

Die Biegefestigkeit der 4 h nachgehärteten Matrix lag bei $(5,8 \pm 0,7)$ MPa mit einem E-Modul von $(18,4 \pm 2,0)$ GPa (Tabelle 4.3). Im Vergleich dazu lag der E-Modul von kortikalem Knochen bei 7 – 30 GPa bzw. für spongiösen Knochen bei 50 – 100 MPa^[91]. Ein Ansatz die Festigkeiten zu steigern lag in der anisotropen Faserverstärkung der gedruckten Strukturen. Dabei sollte der Zusatz von Fasern mit einer Länge < 1 mm und einem Durchmesser um 10 μm zum Pulver zu einer anisotropen Ausrichtung der Whisker in der xy-Ebene der gedruckten Bauteile und damit zu einer signifikanten Steigerung der Bruchzähigkeit durch Rissumlenkung unter Entstehung einer nicht planaren Rissebene führen.

Durch die Zerkleinerung der Glasfasern in der Kaffemühle wurde eine Faserlänge zwischen 200 – 500 μm erreicht. Obwohl das mit 20 wt% Bioglasfasern modifizierte Magnesiumphosphatpulver zur Agglomeratbildung im 3D-Pulverdruck neigte, konnte durch den Abstreichprozess eine vornehmlich anisotrope Ausrichtung der Glasfasern (Abbildung 4.15B) und eine gute Maßhaltigkeit der Strukturen erreicht werden. Die

Bestimmung der E-Module ergab jedoch eine mit der Nachhärtungsdauer um 34 - 70 % abfallende Bruchzähigkeit für die mit Glasfasern modifizierten Struvitstrukturen (Tabelle 4.3). Die Ursache hierfür ist der Nachhärtungsprozess im basischen Binder, durch den es zu einer Auflösung der Glasfasern kam (Abbildung 4.15C). Anstelle eines Verstärkungseffekts kam es aufgrund der Erhöhung der Porosität zur Schwächung der Matrix. Die Experimente zeigten jedoch, dass bei geeigneter Faserwahl (z.B. keramische Fasern, polymere Fasern oder alkaliresistente Glasfasern) eine anisotrope Verstärkung der Matrix durch Ausrichtung der Faser in der xy-Ebene erreicht werden kann.

Tabelle 4.3: Biegefestigkeit und E-Modul von gedruckten Struvitstrukturen (Rohpulver: $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ + 25 wt% MgO mit und ohne Glasfasern, Binder: 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$).

$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ + 25 wt% MgO	E-Modul in GPa		Biegefestigkeit in MPa
	Auslagerungsdauer		
	1 min	4 h	4 h
Ohne Glasfasern	11,7 ± 3,3	18,4 ± 2,0	5,8 ± 0,7
+ 20 wt% Glasfasern	7,7 ± 2,7	5,5 ± 1,3	1,5 ± 0,2

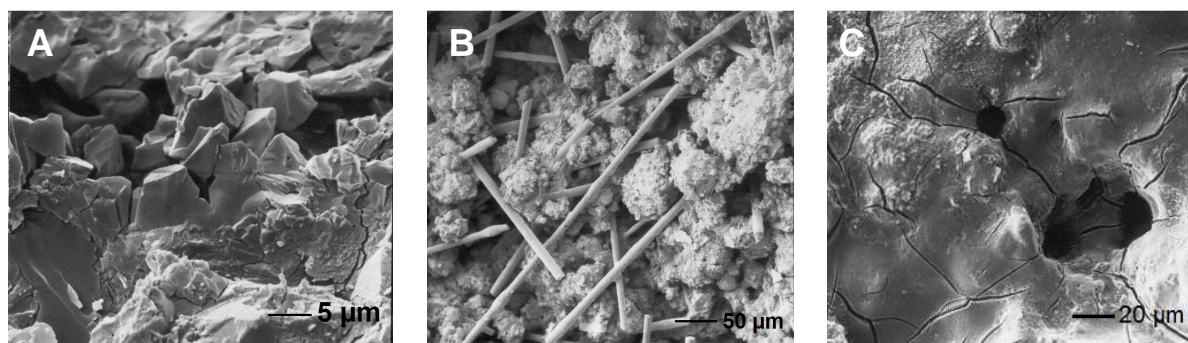


Abbildung 4.15: REM Aufnahmen von pulvergedruckten Struvitstrukturen aus $(\text{Mg}_3\text{PO}_4)_2$ + 25 wt% MgO nach 24 h Auslagerung in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung (A), dieselbe Matrix mit Zusatz von 20 wt% Bioglasfasern direkt nach dem Druck (B) und nach 4 h Auslagerung in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung (C).

4.3 Diskussion

Magnesiumphosphatbasierte Biokeramiken für die Anwendung als resorbierbare Knochenersatzmaterialien sind Gegenstand aktueller Forschung. Analog zum Bereich der Calciumphosphatzemente ist eine Reihe von Magnesiumphosphatzementen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung von fester und flüssiger Zementphase darstellbar. Als Ausgangsstoffe dienen in der Regel MgO bzw. $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$; während unter sauren Bedingungen mit Phosphorsäure oder primärem $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ das Mineral Newberyit ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) gebildet wird, erfolgt durch Reaktion mit neutralen Ammonium(Kalium)phosphaten die Bildung von Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) oder K-Struvit ($\text{MgKPO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) in einer relativ schnell ablaufenden Lösungs/Präzipitationsreaktion ^[90,235]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch ionische Substitution von Trimagnesiumphosphat mit Calciumionen Verbindungen der allgemeinen Zusammensetzung $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$

zugänglich und ebenfalls als Zementrohstoffe einsetzbar sind. Je nach Grad der Substitution bestanden die Verbindungen aus reinem Stanfieldit ($\text{Ca}_3\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_4$ für äquimolares Ca:Mg Verhältnis) bzw. aus Mischungen von Farringtonit und Stanfieldit. Alle Verbindungen zeigten beim Zusatz einer wässrigen Ammoniumphosphatlösung eine Zementabbindezeit mit der Bildung von Struvit. Bemerkenswert waren dabei die hohen Druckfestigkeiten > 70 MPa für ein Ca/(Ca + Mg) Verhältnis < 0,25, die anwendungsnah ohne Kompression der Zementpaste erhalten wurden.

**Entwicklung eines magnesiumphosphatbasierten Pulver/Binder-Systems
für den 3D-Pulverdruck**
relevante physikalische Eigenschaften

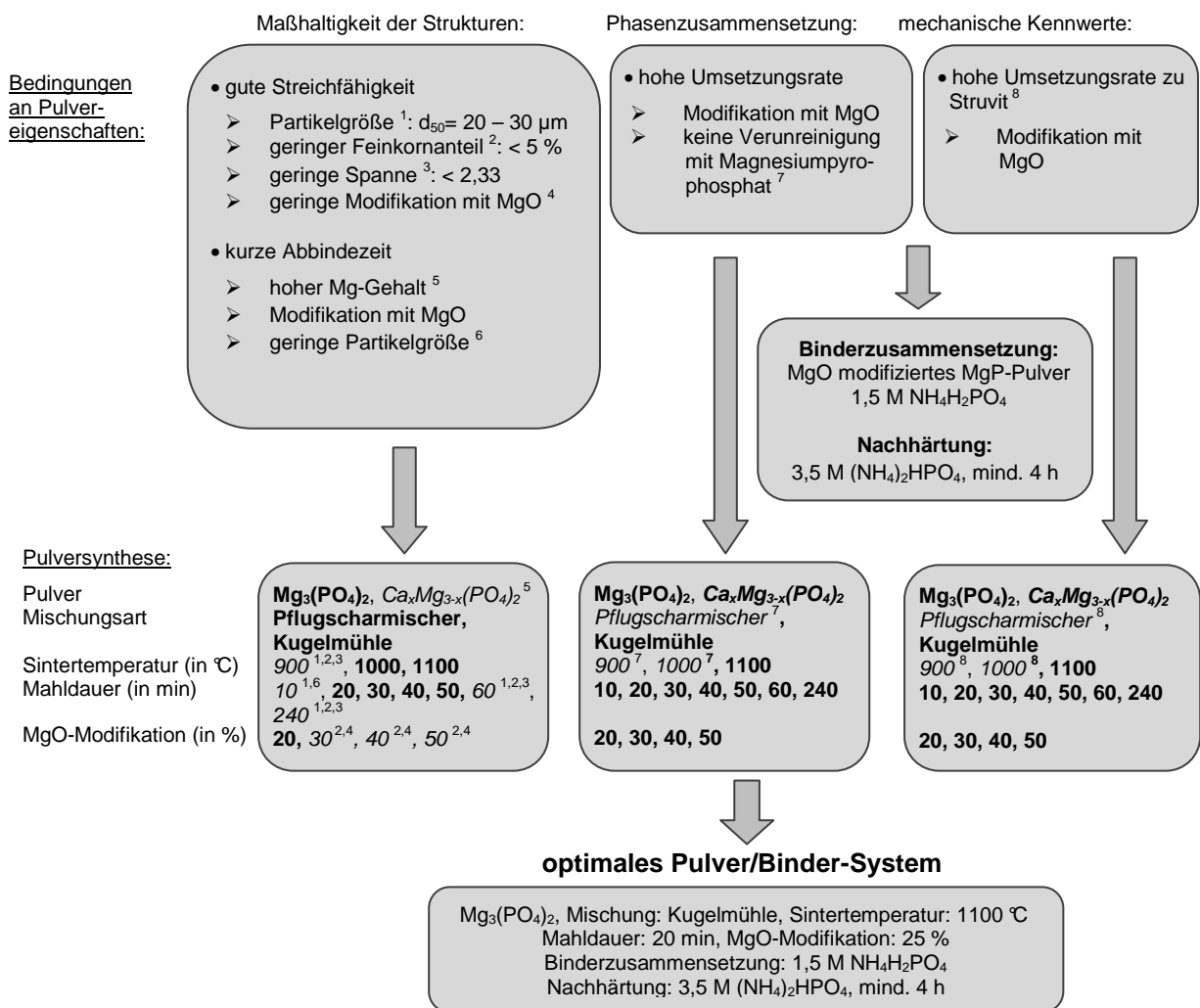


Abbildung 4.16: Entwicklung eines magnesiumphosphatbasierten Pulver/Binder-Systems für den 3D-Pulverdruck. Für die Herstellung maßhaltiger Struvitstrukturen mit hoher mechanischer Festigkeit mittels des 3DP mussten sowohl das Pulver als auch der Binder bestimmte Kriterien erfüllen. Dabei konnten die für den Druckprozess relevanten physikalischen Pulvereigenschaften über die Pulversynthese optimal eingestellt werden (fett gedruckt). Die Pulversynthesen, welche nicht zu den gewünschten Pulvereigenschaften führten sind kursiv gedruckt und mit entsprechenden Indizes gekennzeichnet. Die Indizes kennzeichnen dabei die relevanten physikalischen Pulvereigenschaften, die das entsprechende Pulver nicht erfüllte.

Da das Ziel dieses Teils der Arbeit die Entwicklung von mit dem 3DP kompatiblen Zementsystemen auf Basis von Magnesiumphosphaten war, wurden die verschiedenen Verbindungen mit der allgemeinen Formel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ bezüglich ihrer pulvertechnologischen Eigenschaften und ihres Abbindeverhaltens charakterisiert. Maßgebliche Eigenschaften, welche die Systeme für die Anwendbarkeit im 3DP aufweisen müssen, sind eine hohe Maßhaltigkeit und hohe mechanische Kennwerte der gedruckten Strukturen sowie eine hohe Umsetzungsrate zur gewünschten Phase Struvit, die über entsprechende Nachbehandlung der Strukturen erzielt werden konnte. Die für die Anwendung im Pulverdruck entscheidenden Bedingungen wurden durch das Pulversystem aus mit 25 wt% MgO modifiziertem $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ (1 h Mischung in der Kugelmühle, 5 h Sinterung bei 1100 °C, 20 min Mahlung) und einer 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ -Binderlösung bestmöglich erfüllt. Abbildung 4.16 stellt schematisch die Entwicklungskette, sowie die der Auswahl zugrundeliegenden Eigenschaften des Pulver/Binder-Systems dar. Die erreichbaren Festigkeiten von >20 MPa sind dabei mit bereits etablierten Systemen aus Tricalciumphosphat/Phosphorsäure vergleichbar. Vorteile ergaben sich aus der verbesserten Auflösung (minimaler Porendurchmesser MgP: 200 µm), sowie aus der bei neutralen pH-Werten ablaufenden Abbindereaktion der Struvit-zemente.

Für die Anwendung als Implantatwerkstoff müssen die entwickelten Magnesiumphosphatmatrices biokompatibel sein. In verschiedenen *in vivo* Studien konnte belegt werden, dass $\text{Ca}_x\text{Mg}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ -Zemente biokompatibel und osteoinduktiv sind und weder mutagen noch karzinogen auf den Organismus wirken [212,236-238]. In einer weiteren Studie konnte eine positive Auswirkung magnesiumhaltiger Zemente auf die Osteogenese belegt werden [239]. Als Ursache hierfür wird die Freisetzung von Magnesiumionen vermutet, denen eine Schlüsselrolle im Knochenmetabolismus zugeschrieben wird [240]. Des Weiteren konnten Ginebra et al. in einer Studie über Magnesiumphosphatzemente die antibakterielle Wirkung aufgrund der lokalen pH-Wert Erhöhung (> 9,5) durch Ionenfreisetzung darlegen [235]. Diese Tatsachen machen magnesiumhaltige Zemente für die Erstellung individueller Knochenimplantate mittels 3DP interessant. In einer auf Basis der in dieser Arbeit entwickelten Materialien durchgeführten Zellstudie wurde die Zytotoxizität der Strukturen mit einer humanen Osteoblastenzelllinie (MG63) bestimmt. Die Zellen wurden hierzu auf den Werkstoffoberflächen nach den üblichen Methoden der Zellkultur ausgesät. Über einen Zeitraum von 13 d wurden die Aktivität der Zellen, sowie die Änderungen des pH-Werts und der Ionenkonzentration (Mg^{2+} , PO_4^{3-} , Ca^{2+}) im Zellkulturmedium bestimmt (Abbildung 4.17). Als Referenz diente Polystyrol, als Positivkontrolle Titan und Kupfer als Negativkontrolle. Die Strukturen erwiesen sich dabei als zytokompatibel, wenn auch mit einer um etwa 50 % geringeren Zellviabilität gegenüber den Referenzen Titan und Polystyrol (Abbildung 4.17A). Dies ist vermutlich auf Änderungen der ionischen Zusammensetzung des Zellkulturmediums

zurückzuführen, die einen starken Anstieg von Magnesium und Phosphat und eine reduzierte Calciumkonzentration zeigte (Abbildung 4.17B - D).

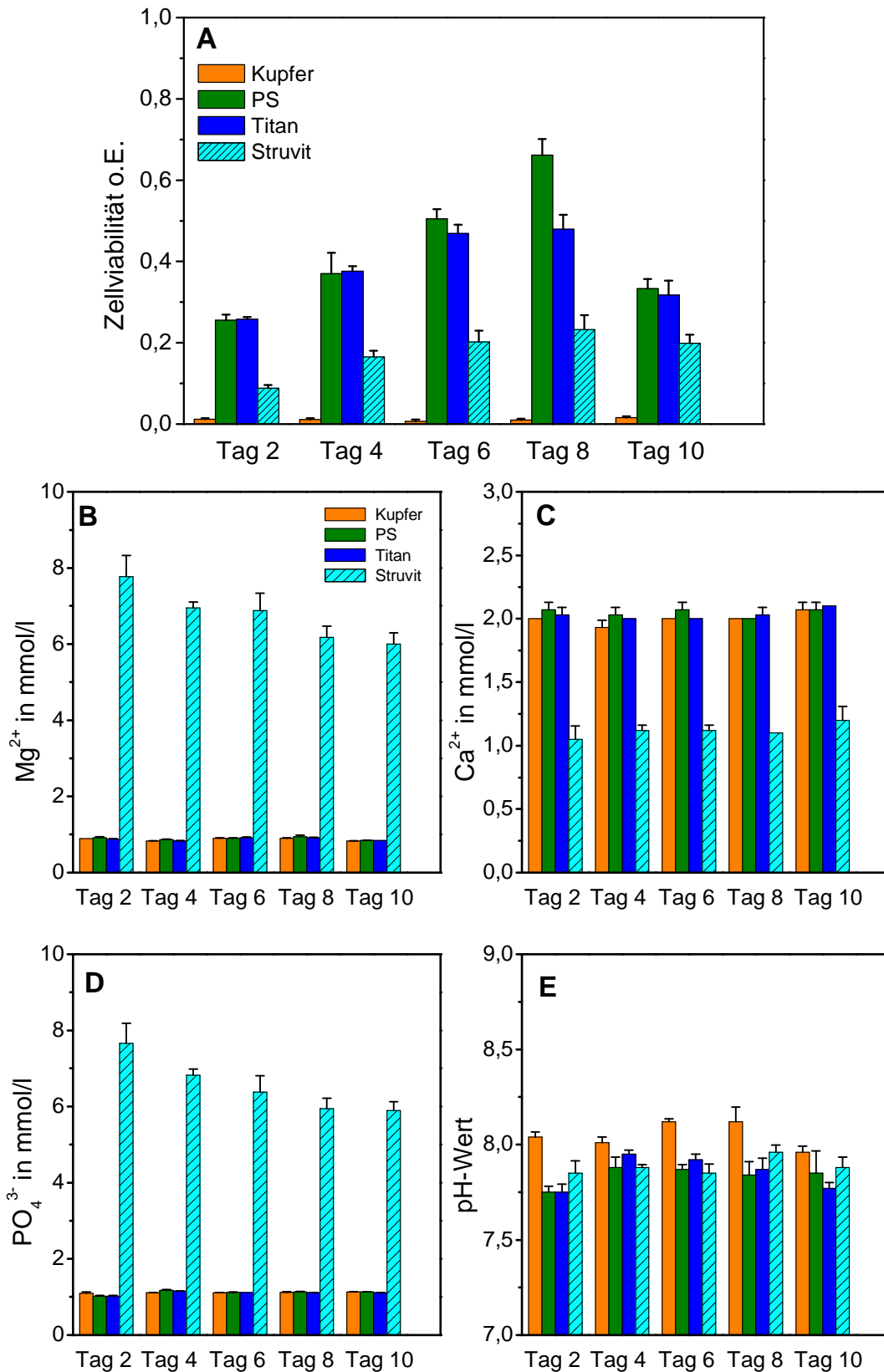


Abbildung 4.17: Zellviabilität von MG63 Zellen während der Kultivierung über einen Zeitraum von 10 d, bestimmt durch den WST-Test (A). Änderung der ionischen Zusammensetzung (B-D) sowie des pH-Werts (E) des verwendeten Zellkulturmediums während des Versuchs.

Für den medizinischen Einsatz als Implantat ist die Modifikation mit biodegradierbaren Kurzfasern zur Steigerung der Festigkeit denkbar. Hierfür geeignet wären Fasern aus Polymer, Metall, Keramik oder Glas, die je nach Einsatzgebiet entsprechende chemische (chemische Resistenzen, Abbaubarkeit) oder physikalische Eigenschaften (Festigkeiten) aufweisen sollten. Mögliche biokompatible Fasern stellen HA/TCP-Whisker oder degradierbare Polymere aus PLGA dar. In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten beschrieben, um die mechanischen Eigenschaften von Calciumphosphat- und Magnesiumphosphatzementen zu verbessern. Diese beinhalteten den Einsatz unterschiedlicher Additive ^[241,242], die Optimierung der Mischungsparameter ^[243] und den Einsatz von Polyamidfasern zur Verstärkung der Zementmatrix ^[244]. Xu et al. zeigten, dass Polyglactingewirke die Brucharbeit von CaP-Zementen um einen Faktor 100 erhöhten ^[245]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass resorbierbare Polyglactinfasern die initiale Festigkeit von CaP-Zementen steigerten, ehe ihre Auflösung zur festigkeitsmindernden Bildung von Poren führte ^[246]. Wang et al. nutzten mineralisierte Carbonnanotubes, um CaP-Zemente zu verstärken. Dabei konnte eine Erhöhung der Druckfestigkeit um 120 % erzielt werden ^[247]. Gbureck et al. konnten zeigen, dass die Biegefestigkeit und die Brucharbeit von CaP-Zementen durch den Einbau von HA-Whiskern um bis zu 122 % verbessert wurde ^[248]. Péra et al. untersuchten die festigkeitverstärkende Wirkung verschiedener Fasern (E-Glasfaser, sowie Fasern bestehend aus Metall, Polyester, Polypropylen, Polyamid) auf ein Magnesiumoxid/Sand-Gemisch ^[249]. Dabei zeigten die Metallfaser- und Polypropylenfaser/Zement-Komposite eine im Vergleich zu glasfaserverstärktem Portlandzement bessere Elastizität bei gleichem oder geringerem Faseranteil. Die prinzipielle Möglichkeit zur Verstärkung der MgP-Matrix mit Kurzfasern während des Druckvorgangs konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden. Obwohl kein verstärkender Effekt erzielt werden konnte, zeigten sich Fasern mit einer Länge von < 1 mm zur Verarbeitung im Druckvorgang als geeignet. Durch das Auftragen der Pulverschichten mit dem Roller kam es dabei zu einer anisotropen Ausrichtung der Fasern in der xy-Ebene. Diese Möglichkeit macht diese Materialien für die Verwertung in technischen Applikationen interessant. Bei den kommerziell für den 3DP verwendeten Materialien handelt es sich zumeist um polymermodifizierte Gipspulver, die nach dem Druckvorgang primär noch sehr labil sind und gerade bei größeren Bauteilen leicht zur Fragmentierung neigen. Eine Endfestigkeit wird hier erst nach Polymermodifikation erreicht. Wenn durch Zusatz von Kurzfasern zum Pulver eine signifikante Steigerung der Primärfestigkeit erreicht werden könnte, dann hätte dies ein hohes Potential, um die Prozesssicherheit des 3DP für technische Anwendungen zu erhöhen.

Neben dem Einsatz als patientenspezifisches Knochenimplantat wären magnesiumhaltige Zemente aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften für weitere alternative Anwendungen prädestiniert. Technisch werden magnesiumphosphatbasierte Einbettmassen, bestehend aus MgO, NH₄H₂PO₄ und Quarz/Cristoballit als Füller, häufig für den Hochtemperaturmetallguss (z.B. CoCr

Legierungen bei $T = 1200 - 1400 \text{ }^\circ\text{C}$) angewandt ^[250]. Hierbei wird in der Regel ein Rohling aus Kunststoff oder Wachs in die Masse eingebettet. Nach der Aushärtung wird der Rohling ausgebrannt und der Hohlraum durch die flüssige Metallschmelze aufgefüllt. Hierfür könnten alternativ individuelle und hochfeste Gussformen aus Magnesiumphosphat durch den 3DP erstellt werden, so dass die Prozesskette um den Schritt der Positiverstellung gekürzt werden könnte.

5 LOKALE WIRKSTOFFMODIFIKATION

Die Anwendung der vorgestellten Materialsysteme im 3D-Mehrfarben-Pulverdruck ermöglicht die einzeitige Herstellung einer Kombination aus biodegradierbarem Scaffold und Drug-Delivery-System. Sowohl die geringe Prozesstemperatur des Drucks, als auch die hydraulische Abbindereaktion des Zementpulvers, die eine Sinterung zur Verfestigung der Struktur überflüssig macht, ermöglicht durch die Verwendung eines Mehrfarben-Pulverdruckers das Einbringen von temperaturlabilen Wirkstoffen in den Scaffold. Von besonderem Interesse ist der Einsatz von Rapid-Prototyping-Verfahren in der Medizin und der Biotechnologie. Neben der Schaffung eines passgenauen Scaffolds erlaubt die orts aufgelöste Kontrolle der Zusammensetzung und der Struktur des Werkstoffs, ortsspezifisch zelluläre Reaktionen zu induzieren oder die Wirkstofffreisetzung über Porosität, eingebrachte Diffusionsinhibitoren oder Konzentrationsgradienten zu steuern.

5.1 Design von wirkstoffbeladenen Strukturen

Die Herstellung von Knochenzementstrukturen mittels 3D-Mehrfarben-Pulverdruck bietet durch die Nutzung von insgesamt vier Druckkanälen die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Strukturen lokal zu variieren. Das Design von wirkstoffbeladenen Modellimplantaten erfolgte mittels der CAD-Software Think3 Design®. Die Ansteuerung der vier zur Verfügung stehenden Druckköpfe (white (w), yellow (y), magenta (m), cyan (c)) konnte über eine Farbcodierung der Strukturen (Tabelle 5.1) vorgenommen werden. Da Tintenstrahldrucker mit dem CMY-Farbraum (Prinzip der subtraktiven Farbmischung: die Summe aller Farben = Weiß) arbeiten, die Strukturen aber nach dem RGB-Farbmodell (Prinzip der additiven Farbmischung: die Summe aller Farben = Schwarz) designt wurden, war eine Umwandlung von RGB- zum CMY-Code notwendig. Die Korrelation der Farbräume ist über folgende Gleichungen darstellbar:

$$cyan = \frac{1 - red}{255} \quad (5.1)$$

$$magenta = \frac{1 - green}{255} \quad (5.2)$$

$$yellow = \frac{1 - blue}{255} \quad (5.3)$$

$$white = 255 - (cyan + magenta + yellow) \quad (5.4)$$

Während der Hauptdruckkopf zur Applikation des Binders herangezogen wurde, konnten die drei anderen Druckköpfe für die Applikation von Wirkstoff- oder Polymerlösungen genutzt werden. So konnten beispielsweise biologisch aktive Wirkstoffe direkt in die Struktur eingedruckt werden; die Drucklösung wurde dabei nur

kurzzeitig einer Temperatur $> 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgesetzt und sollte zu keiner strukturellen Veränderung der Wirkstoffe führen.

Tabelle 5.1: Farbbezeichnung und Korrelation der Farbinformation für den Druckprozess (CMY-Code) und der designten Strukturen (RGB-Code).

RGB-Code			CMY-Code				Farbe
Red	Green	Blue	Cyan	Magenta	Yellow	White	
32	32	32	60	63	62	70	dark gray
255	255	255	0	0	0	255	white
255	0	0	0	77	136	42	screen red
0	255	0	20	0	59	176	screen green
0	0	255	87	30	0	138	screen blue
255	255	0	0	0	181	74	screen yellow
255	215	0	0	0	216	39	max pure yellow
255	0	255	0	38	0	217	screen magenta
246	0	170	0	46	0	209	max pure magenta
0	255	255	28	0	0	227	screen cyan / max pure cyan
							screen yellow in %
255	255	0	0	0	181	74	100
255	255	51	0	0	145	110	80
255	255	102	0	0	109	146	60
255	255	153	0	0	72	183	40
255	255	204	0	0	36	219	20

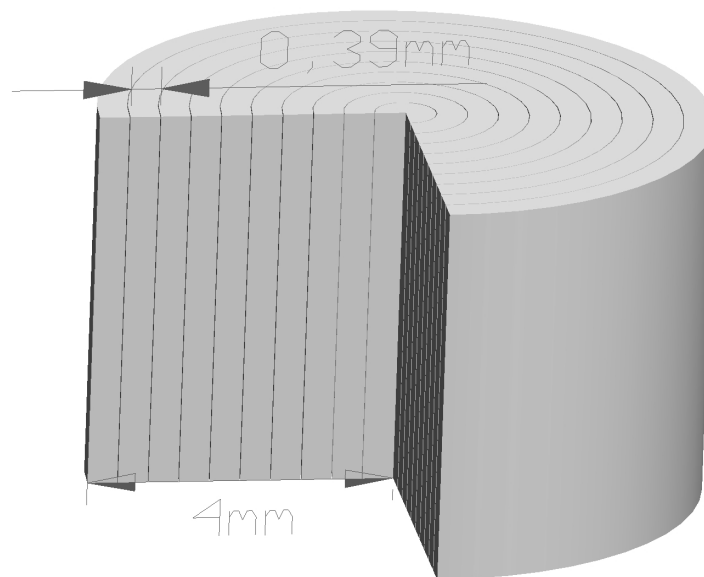


Abbildung 5.1: Design eines Zylinders ($h = 5\text{ mm}$, $r = 4\text{ mm}$) im Zwiebelschalenmodell, bestehend aus 10 Schalen von je $0,39\text{ mm}$ Dicke und Abständen von $0,1\text{ mm}$.

Eine hohe Ortsauflösung von ca. $400\text{ }\mu\text{m}$ ermöglichte dabei die Herstellung von Konzentrationsgradienten innerhalb der Strukturen, die ansonsten - etwa durch nachträgliche Adsorption - nicht zugänglich war. Bedingt durch softwaretechnische Limitationen des Druckers mussten entsprechende Implantate aus einzelnen Schichten mit einer Stärke $< 1,76\text{ mm}$ konstruiert werden (Zwiebelschalenmodell), um durch innere (virtuelle) Oberflächen eine Wirkstofflokalisierung im gesamten

Strukturvolumen zu gewährleisten. Des Weiteren war darauf zu achten, dass es durch eine Überschneidung der Schalen zu einer Auslöschung der Farbinformation kam, so dass die Schalen einen Abstand von 0,1 mm zueinander aufweisen mussten.

Für die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung wurden sphärische Strukturen mit unterschiedlicher Wirkstofflokalisierung (homogen, Depot, Gradient) und Polymermodifikation konstruiert (Abbildung 5.2). Eine synchrone Ansteuerung von mehreren Kanälen erlaubte eine gleichzeitige Wirkstoff- und Polymerlokalisierung. Hierfür wurden die Strukturen in Mischfarben (Rot, Blau, Grün, Grau) dargestellt. So waren beispielsweise an dem Druck einer roten Struktur die Farbkanäle m und y beteiligt. Die Menge des applizierten Binders wurde über die Farbsättigung bestimmt. Während für homogen und lokal begrenzte Wirkstoffmodifikationen eine einheitliche Farbsättigung gewählt wurde, wurden Gradientenstrukturen mit einer von innen nach außen abfallenden Farbsättigung, gleichbedeutend mit einer zur Kugeloberfläche hin abfallenden Wirkstoffkonzentration, konstruiert. Die Einstellung eines linearen Wirkstoffgradienten erfolgte durch die Aneinanderreihung volumengleicher Kugelschalen mit gleichmäßig zur Kugeloberfläche hin abfallender Farbsättigung (screen y 100 – 0 %).

Strukturdesign

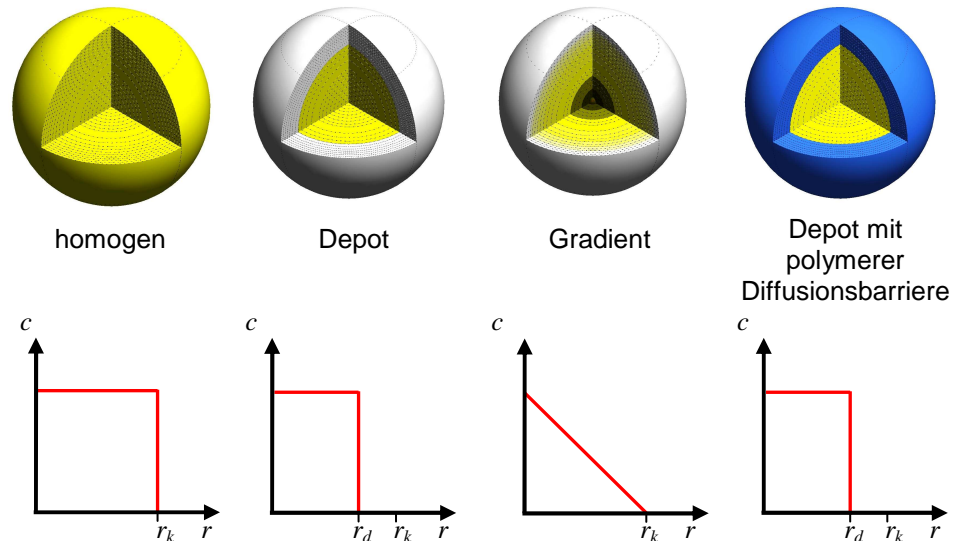


Abbildung 5.2: Design der Prüfkörper für die Untersuchung der Wirkstofffreisetzung mit unterschiedlicher Wirkstoffbeladung (homogen, Depot, Gradient). Als Zementpulver wurden reines TCP, HPMC modifiziertes TCP oder Magnesiumphosphat eingesetzt. Die Wirkstoffmodifikation erfolgte über den Farbkanal y. Für die Erzeugung einer Diffusionsbarriere wurden simultan Chitosan und TPP über die Farbkanäle m und c appliziert. Die theoretische Wirkstoffkonzentration c für eine homogen beladene Struktur war konstant bis zur Kugeloberfläche r_k , für ein Depot konstant bis zum Rand r_d des Depots und für eine Gradientenstruktur bis zur Kugeloberfläche r_k linear abfallend.

Zur Einstellung gewünschter Wirkstoffkonzentrationen war die Kenntnis über die Korrelation von Farbinformation und applizierter Bindermenge der einzelnen Druckkanäle notwendig. Die Gesamtmenge aller am Druckprozess beteiligten Kanäle war durch die Bindersättigung, welche zwischen 0,065 und 0,371 variiert werden

konnte, festgelegt. Die prozentuale Beteiligung der verschiedenen Kanäle war über Farbcodes herstellerbedingt geregelt und nur in engen Grenzen variabel.

Nach Giordano et al. [68] ist das Bindervolumen, welches pro Flächeneinheit über einen Druckkopf appliziert wird, gegeben durch:

$$V_B = \frac{n \cdot F}{v \cdot \rho_b} \quad (5.5)$$

Wobei n die Anzahl der Durchgänge pro Längeneinheit (o.E.), F die Flußrate der Binderlösung (in g/s), v die Druckgeschwindigkeit (in cm/s) und ρ_b die Binderdichte (in g/cm³) ist.

Die Bindersättigung (in %) ist definiert als das applizierte Bindervolumen pro Porenvolumen der Pulverschüttung:

$$\text{Bindersättigung} = \frac{V_B}{(1 - \rho_p) \cdot \Delta x \cdot \Delta z} \quad (5.6)$$

Hierbei ist ρ_p die Packungsdichte des Pulvers, welche das Verhältnis von Pulvervolumen (abzüglich der Porosität) zum Gesamtvolumen beschreibt, Δx die Linienbreite und Δz die Schichtdicke. Da sowohl die Sättigung als auch das Bindervolumen pro Längeneinheit über geräte- und materialspezifische Parameter definiert sind, war eine Übertragung auf die in dieser Arbeit verwendeten Pulver/Binder-Systeme nicht möglich. Um Auskunft über die bei einer bestimmten Bindersättigung applizierte Bindermenge der einzelnen Druckköpfe zu erhalten, wurden Umrechnungsfaktoren zwischen den applizierten Bindervolumina pro mm³ und den Farbcodes bestimmt. Die Korrelation erfolgte durch die Modifikation gedruckter und durchgängig gefärbter Strukturen mit einer Vancomycin- oder Cu-haltigen Lösung bekannter Konzentration und anschließender Quantifizierung mittels spektroskopischer Methoden (UV/Vis-Spektroskopie bzw. ICP-MS-Analyse). Bei bekannter Wirkstoffkonzentration der Drucklösung und bekannten Probenvolumen konnte das applizierte Bindervolumen pro mm³ Probenvolumen (Binder/Volumenverhältnis) für die jeweilige Druckpatrone bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Umrechnungsfaktoren war es möglich, über das Probendesign eine gewünschte Menge an Additiven lokal innerhalb einer Struktur zu applizieren. Die Bestimmung der Umrechnungsfaktoren aller vier Farbkanäle wurde mit einer 5 %igen Vancomycinlösung durchgeführt. Hierfür wurde jeweils nur diejenige Patrone mit der Lösung befüllt, für welche der Umrechnungsfaktor bestimmt werden sollte. Tabelle 5.2 zeigt das über einen bestimmten Druckkopf aufgebrachte Bindervolumen und die Gesamtmenge an appliziertem Binder aller beteiligten Druckköpfe für die verschiedenen Farbeinstellungen. Basierend auf diesen Messdaten ist in Tabelle 5.3 die prozentuale Beteiligung der einzelnen Druckköpfe für die jeweiligen Farbeinstellungen dargestellt. Dabei zeigte sich, dass der Hauptanteil der Bindermenge mit 66 – 94 % auf den Druckkanal w fiel, über den der reaktive Binder

zur Verfestigung der Struktur appliziert wurde. Die größtmögliche Wirkstoffmenge wurde bei der Nutzung des Kanals y aufgesprüht. Dabei konnte durch eine geeignete Wahl des Farbcodes (max pure y, screen y), der Farbsättigung sowie der Bindersättigung (0,371 bzw. 0,261) (Tabelle 5.5), das Volumen der Wirkstofflösung zwischen 10 und 87 nl/mm³ variiert werden.

Tabelle 5.2: Appliziertes Bindervolumen (5 % Vancomycinlösung) in μl für die an den einzelnen Farbeinstellungen beteiligten Farbkanäle, bei einer Bindersättigung von 0,371 und einem Strukturvolumen von 246 mm³.

Bindervolumen in μl	Farbkanal				
	w	y	m	c	w + y + m + c
max pure y	14,60 \pm 0,82	7,69 \pm 0,38	-	-	22,29 \pm 0,90
max pure m	44,70 \pm 1,22	-	7,00 \pm 0,20	-	51,70 \pm 1,24
max pure c	85,50 \pm 0,23	-	-	5,74 \pm 0,05	91,24 \pm 0,24
screen red	47,39 \pm 0,19	9,34 \pm 0,30	4,00 \pm 0,18	-	60,74 \pm 0,40
screen blue	90,53 \pm 0,34	-	4,39 \pm 0,16	5,04 \pm 0,33	99,96 \pm 1,01
screen green	71,48 \pm 0,98	6,07 \pm 0,12	-	4,66 \pm 0,21	82,21 \pm 1,01
white	61,50 \pm 0,44	-	-	-	61,50 \pm 0,44

Tabelle 5.3: Experimentell bestimmter, prozentualer Anteil des applizierten Binders (5 % Vancomycinlösung) für die an den einzelnen Farbeinstellungen beteiligten Farbkanäle, bei einer Bindersättigung von 0,371. Die Werte basieren auf den Messdaten aus Tabelle 5.2.

Bindervolumen in %	Farbkanal			
	w	y	m	c
max pure y	65,49 \pm 3,67	34,51 \pm 1,69	-	-
max pure m	86,47 \pm 2,37	-	13,53 \pm 0,39	-
max pure c	93,71 \pm 0,26	-	-	6,29 \pm 0,05
screen red	78,02 \pm 0,32	15,39 \pm 0,49	6,59 \pm 0,30	-
screen blue	90,57 \pm 0,34	-	4,39 \pm 0,16	5,04 \pm 0,33
screen green	86,95 \pm 1,19	7,38 \pm 0,14	-	5,67 \pm 0,25

Tabelle 5.4: Experimentell bestimmtes Binder/Volumenverhältnis (BVV) für die an den jeweiligen Farbeinstellungen beteiligten Farbkanäle, bei einer Bindersättigung von 0,371. Die applizierten Bindermengen sind in Tabelle 5.2 aufgeführt. Bei bekanntem Probenvolumen von 246 mm³ ließ sich das pro mm³ applizierte Bindervolumen berechnen. Die Wirkstoffmodifikation erfolgte mit einer 5 %igen Vancomycinlösung.

BVV in nl/mm ³	Farbkanal			
	w	y	m	c
max pure y	59,35 \pm 3,33	31,27 \pm 1,53	-	-
max pure m	181,71 \pm 4,98	-	28,44 \pm 0,81	-
max pure c	347,57 \pm 0,95	-	-	23,34 \pm 0,21
screen red	192,64 \pm 0,79	37,99 \pm 1,21	16,27 \pm 0,74	-
screen blue	367,99 \pm 1,37	-	17,85 \pm 0,64	20,48 \pm 1,35
screen green	290,58 \pm 3,97	24,67 \pm 0,47	-	18,94 \pm 0,84
white	250,00 \pm 1,78	-	-	-

Für die Modifikation einer Struktur mit nur einem Wirkstoff waren die Kanäle m und c aufgrund der geringen, applizierten Wirkstoffmengen von 28 nl/mm^3 bzw. 23 nl/mm^3 nicht geeignet. Sollen mehrere Wirkstoffe gleichzeitig appliziert werden, müssen die Strukturen in Mischfarben (screen red, screen blue, screen green) designt werden. Die verschiedenen Farbeinstellungen unterschieden sich sowohl in der Menge des aufgetragenen, reaktiven Binders ($193 - 291 \text{ nl/mm}^3$), als auch in der Menge der aufgetragenen Wirkstofflösungen über die Farbkanäle y (25 nl/mm^3 bzw. 38 nl/mm^3), m (16 nl/mm^3 bzw. 18 nl/mm^3) und c (19 nl/mm^3 bzw. 21 nl/mm^3). Die Farbeinstellung screen red war für die Modifikation mit zwei Wirkstofflösungen am besten geeignet, da quantitativ und prozentual betrachtet sowohl ausreichend reaktiver Binder ($w = 193 \text{ nl/mm}^3$), als auch, im Vergleich zu den anderen Mischfarben, mit $y = 38 \text{ nl/mm}^3$ und $m = 18 \text{ nl/mm}^3$ das größtmögliche Wirkstoffvolumen appliziert wurde (Tabelle 5.4). Es stellte sich heraus, dass bei der Farbwahl dark grey, welche die simultane Modifikation mit drei Wirkstofflösungen ermöglichte, das insgesamt eingebrachte hohe Flüssigkeitsvolumen zu einer unzureichenden Verfestigung der gedruckten Struktur führte. Die Applikation von drei Wirkstofflösungen war somit nicht möglich. Sollte eine bestimmte Wirkstoffmenge in einen Scaffold eingebracht werden, konnte über das bekannte Binder/Volumenverhältnis der jeweiligen Patrone die entsprechende Wirkstoffkonzentration der Lösung berechnet werden. Die Modifikation mit hochkonzentrierten Wirkstofflösungen ist hierbei von Vorteil, da so weniger Flüssigkeit in das Pulver eingebracht wird, was die Abbindezeit durch eine geringere Verdünnung des reaktiven Binders reduziert und die Diffusion des Wirkstoffs innerhalb der Struktur minimiert. Neben der Modifikation mit Wirkstoff wurde in die Strukturen eine Polymerlösung eingebracht. Hierfür konnten drei (Farbcode: screen red, screen green, screen blue) oder vier (Farbcode: dark grey) Farbkanäle genutzt werden. Die Nutzung aller Farbkanäle war hierbei möglich da das Polymer die Diffusion der Wirkstofflösungen inhibierte und durch Verklebung der Pulverpartikel zu einer ausreichenden Festigkeit der Struktur führte. Bei ionotrop gelierenden Polymerlösungen wurden die Polymerlösung und die ionenhaltige Lösung über zwei unterschiedliche Druckköpfe appliziert.

Neben der Farbwahl und der Farbsättigung hatte die vom Hersteller festgelegte Bindersättigung Auswirkungen auf das applizierte Flüssigkeitsvolumen. Bei gleicher Farbwahl und Farbsättigung ergab sich durch die Reduktion der Bindersättigung von 0,371 auf 0,261 ein um ca. 50 % geringeres Binder/Volumenverhältnis (Tabelle 5.5). Zu Beginn des Drucks wurde sowohl ein vom Hersteller vorgegebener Pulver/Bindertyp, als auch eine bestimmte Schichtdicke festgelegt. Betrachtet man Gleichung 5.5 und 5.6, so waren infolgedessen die Packungsdichte ρ_p , Binderdichte ρ_b und die Schichtdicke Δz als Konstanten anzunehmen. Die Linienbreite Δx entsprach der Auflösung des Druckers (600 x 540 dpi) und die Druckgeschwindigkeit v betrug zwei Schichten pro Minute ^[234]. Beide Parameter blieben bei Variation der Bindersättigung ebenfalls konstant. Eine Reduktion der Bindersättigung und damit des Binder/Volumenverhältnisses konnte somit nur über Erniedrigung der Anzahl der Durchgänge pro Längeneinheit n oder der Flußrate F erfolgen.

In Tabelle 5.6 sind die aus dem CMY-Code berechneten prozentualen Anteile des applizierten Bindervolumens für die einzelnen Farbkanäle bei unterschiedlicher Farbwahl dargestellt. Die Werte beziehen sich auf eine Gesamtmenge von 255 (Tabelle 5.1). Für den Farbcode max pure y bedeutete dies, dass 15 % des insgesamt versprühten Binders auf die Patrone w und 85 % auf die Patrone y entfielen. Ein Vergleich mit den experimentell bestimmten Bindervolumina ergab für keine der Farbeinstellungen eine Übereinstimmung mit den theoretisch bestimmten Bindervolumina.

Tabelle 5.5: Appliziertes Bindervolumen pro mm^3 Pulver für den Farbkanal y bei unterschiedlicher Farbsättigung und zwei verschiedenen Bindersättigungen. Die maximale herstellerbedingte Bindersättigung betrug 0,371. Die Wirkstoffmodifikation erfolgte mit einer 5 %igen Vancomycinlösung.

Farbsättigung/ Farbcode	Bindersättigung: 0,371 Binder/Volumen- verhältnis in nl/mm^3	Farbsättigung/ Farbcode	Bindersättigung: 0,261 Binder/Volumen- verhältnis in nl/mm^3
100 % screen yellow	$86,95 \pm 7,02$	100 % screen yellow	$42,13 \pm 1,70$
60 % screen yellow	$46,39 \pm 2,28$	60 % screen yellow	$24,07 \pm 0,35$
20 % screen yellow	$9,88 \pm 2,85$	20 % screen yellow	$4,17 \pm 0,28$

Tabelle 5.6: Aus dem CMY-Code (Tabelle 5.1) bestimmter, prozentualer Anteil des applizierten Binders für die an den einzelnen Farbeinstellungen beteiligten Farbkanäle bei einer Bindersättigung von 0,371.

Bindervolumen in % Farbcode	Farbkanal			
	w	y	m	c
max pure y	15,29	84,71	-	-
max pure m	81,96	-	18,04	-
max pure c	89,02	-	-	10,98
screen red	16,47	53,33	30,20	-
screen blue	54,12		11,77	34,12
screen green	69,02	23,14	-	7,84

Tabelle 5.7: Druck einer 0,1 M CuSO_4 -Lösung und anschließende Quantifizierung der Cu-Menge/Prüfkörper ($M_{\text{Cu}} = 63,54 \text{ g/mol}$, $V = 246 \text{ mm}^3$) mittels ICP-Spektroskopie.

Farbcode	Cu-Menge in $\mu\text{g}/\text{Prüfkörper}$			Binder/Volumenverhältnis in nl/mm^3		
	Farbkanal			Farbkanal		
	y	m	c	y	m	c
max pure y	$49,40 \pm 0,75$	-	-	$31,87 \pm 0,49$	-	-
max pure m	-	$37,63 \pm 1,23$	-	-	$24,31 \pm 0,79$	-
max pure c	-	-	$15,66 \pm 1,10$	-	-	$10,11 \pm 0,71$

Neben der Quantifizierung der applizierten Bindermenge mittels Vancomycinmodifikation und UV/Vis-Spektroskopie, wurden Cu-haltige Lösungen in die Strukturen eingedruckt und der Gehalt an Cu-Ionen mit Hilfe einer ICP-Analyse ermittelt. Hierfür wurden die Cu-modifizierten Prüfkörper in einer definierten Menge 2,4 M HCl aufgelöst und die Cu-Ionenkonzentration bestimmt. Über die Ionenkonzentration in der Lösung konnte die Cu-Menge pro Prüfkörper ermittelt werden und mit Hilfe des Molgewichts von Cu ($M_{\text{Cu}} = 63,54 \text{ g/mol}$) und des

Prüfkörpervolumens ließ sich das Binder/Volumenverhältnis berechnen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.7 für die Reifarben max pure y, max pure m und max pure c dargestellt; diese waren konsistent mit den Ergebnissen aus der Vancomycinquantifizierung. Dies beweist, dass die Applikation von Metallionen über die Druckköpfe möglich ist, so dass metallionenmodifizierte Strukturen zur Induktion biologischer Reaktionen herangezogen werden können.

Die Herstellung von Modellimplantaten aus Bruschit oder Struvit erfolgte unter Verwendung von TCP und reaktiver Phosphorsäurelösung bzw. aus MgO/MgP mit ammoniumhaltigem Binder. Zur Sicherstellung einer hohen Druckqualität und der Ortsständigkeit der aufgesprühten Wirkstofflösungen erwies sich eine zusätzliche Modifikation des TCP-Pulvers mit HPMC bzw. Chitosan als erfolgreich. Grundgedanke hierbei war, die Diffusion der Lösungen durch die schnelle Wasseraufnahme der Polymere zu unterbinden. Die Polymermodifikation der Strukturen erfolgte in zwei unterschiedlichen Ansätzen. Durch Mischung des Zementpulvers mit einem HPMC-Pulver wurde eine homogene Polymerverteilung innerhalb der Struktur erzeugt. Die Kriterien für die Auswahl einer geeigneten Polymerkomponente waren neben Biokompatibilität und Abbaubarkeit physikalisch relevante Eigenschaften, wie die feine Körnung des Pulvers, um die Prozessierbarkeit über den Pulverdruck zu garantieren, und eine schnelle Polymerquellung. Von Bedeutung war ausserdem eine ausreichend hohe Wasseraufnahmekapazität des Polymers, um die prozentuale Beimengung des Polymers zum Zementpulver so gering wie möglich zu halten und somit die Druckfestigkeiten und die bioaktiven Eigenschaften des Zements nur geringfügig zu beeinflussen. Eine Nachhärtung wirkstoffmodifizierter Strukturen durch Infiltration mit Binderlösung war aufgrund der Diffusion des Wirkstoffs nicht möglich, so dass eine weitere Reduktion der Druckfestigkeit durch eine Polymermodifikation minimal gehalten werden musste. Die gedruckten mit HPMC modifizierten Bruschitstrukturen wiesen eine Druckfestigkeit von $(5,32 \pm 0,8)$ MPa auf.

Eine weitere Möglichkeit der Polymermodifikation bestand in der lokalen Applikation von Polymerlösungen über die Druckköpfe. Die bei der Auswahl des Polymers zu berücksichtigenden Faktoren waren die Kompatibilität der Polymerlösungen mit dem Sprühvorgang des Druckkopfes, sowie eine schnelle Gelierung und eine ausreichend hohe Wasseraufnahmekapazität. Um durch die feinen Kanäle des Druckkopfes gespült zu werden, mussten die Lösungen eine geringe Viskosität aufweisen. Des Weiteren musste die Gelierung innerhalb weniger Sekunden stattfinden, um die Diffusion der Wirkstofflösungen effizient eindämmen zu können. Vorzugsweise wird der Gelierungsprozess ionotrop induziert. Hierbei sollte das zur Vernetzung des Polymers führende Ion entweder im Zementpulver enthalten sein (beispielsweise: ionotrope Gelierung von Alginaten mit Ca^{2+} -Ionen) oder wird als wässrige Lösung mittels eines weiteren Druckkopf simultan appliziert (Chitosan und TPP). Problematisch erwies sich die Forderung nach einer gering viskosen Polymerlösung. Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass unter einer Auswahl von Xanthan-,

Alginate-, Pektin- und Chitosanlösungen ausschließlich eine 1 wt%ige Chitosanlösung die genannten Bedingungen erfüllte. Abbildung 5.3 zeigt die ionotrope Vernetzungsreaktion zwischen dem negativ geladenen Chitosanmolekül und dem Polyanion TPP, die im wässrigen Milieu innerhalb weniger Sekunden stattfindet [251,252]. Zur Vernetzung von Chitosan können ausserdem Sulfat oder Citrat [253] herangezogen werden, wobei hier amorphe Präzipitate entstehen. Die Komplexierung zwischen gegensätzlich geladenen Makromolekülen wurde in verschiedenen Studien angewandt, um durch die Nutzung der reversiblen physikalischen Vernetzung kontrollierte Freisetzungssysteme aus Chitosan herzustellen [254,255]. Vorteil des mit TPP vernetzten Chitosans ist eine vom pH-Wert und Salzgehalt des Freisetzungsmediums unabhängig verlaufende Wirkstofffreisetzung. Weitere Vorteile, die für einen Einsatz von Chitosan sprachen, sind die Biodegradierbarkeit, sowie die gute Anbindung an die Knochenmatrix. Des Weiteren besitzt Chitosan zellaktivierende und angiogenetische Eigenschaften [256].

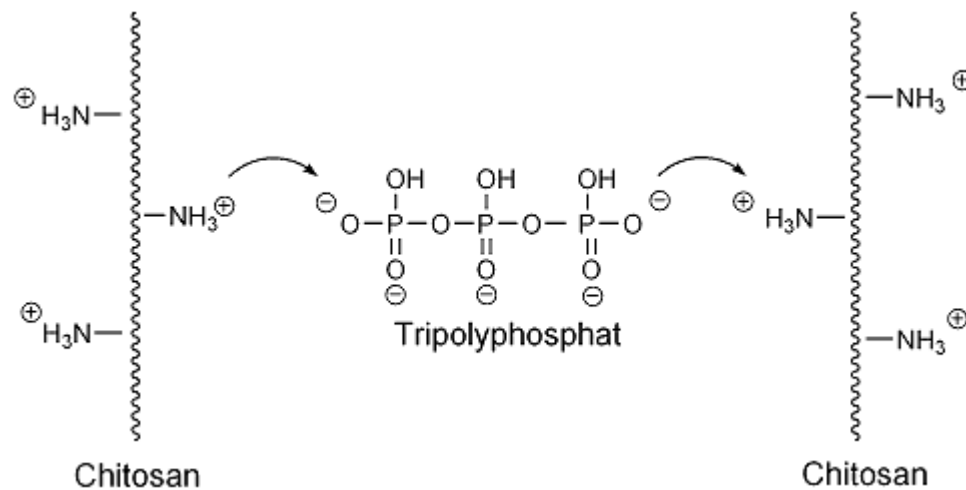


Abbildung 5.3: Ionotrope Vernetzungsreaktion zwischen dem negativ geladenen Chitosanmolekül und dem Polyanion TPP.

Die Visualisierung des Druckvorgangs und die Bestimmung der Auflösung (Ortsständigkeit des Wirkstoffs bzw. Farbstoffs) erfolgten durch den Druck unterschiedlich breiter Linien (200 – 1000 μm) auf die Pulveroberfläche und anschließender Vermessung der Linienbreiten. Abbildungen 5.4A und C zeigen, dass es aufgrund von Kapillarkräften zur Diffusion der Farbstofflösung innerhalb des porösen Pulverbetts kam. Die zusätzliche Polymermodifikation des TCP-Pulvers mit HPMC bzw. die Applikation von Chitosanlösung und TPP-Lösung über verschiedene Druckköpfe bewirkte durch die Quellung der Polymermatrix eine Eindämmung der Diffusion, so dass eine maximale Auflösungen von ca. 400 μm für die HPMC/Chitosan/TCP-Variante erreicht wurde. Abhängig von der Linienstärke konnte eine Verbreiterung der Linien um ca. 100 – 760 % festgestellt werden (Abbildung 5.4B). Reines Bruscht zeigte mit einer Linienbreite von (1523 \pm 130) μm verglichen mit der theoretischen Linienbreite von 200 μm die größte dimensionale Abweichung, gefolgt von chitosanmodifiziertem Bruscht mit einer Linienbreite von (440 \pm 46) μm und HPMC/Bruscht mit einer Linienbreite von (272 \pm 19) μm .

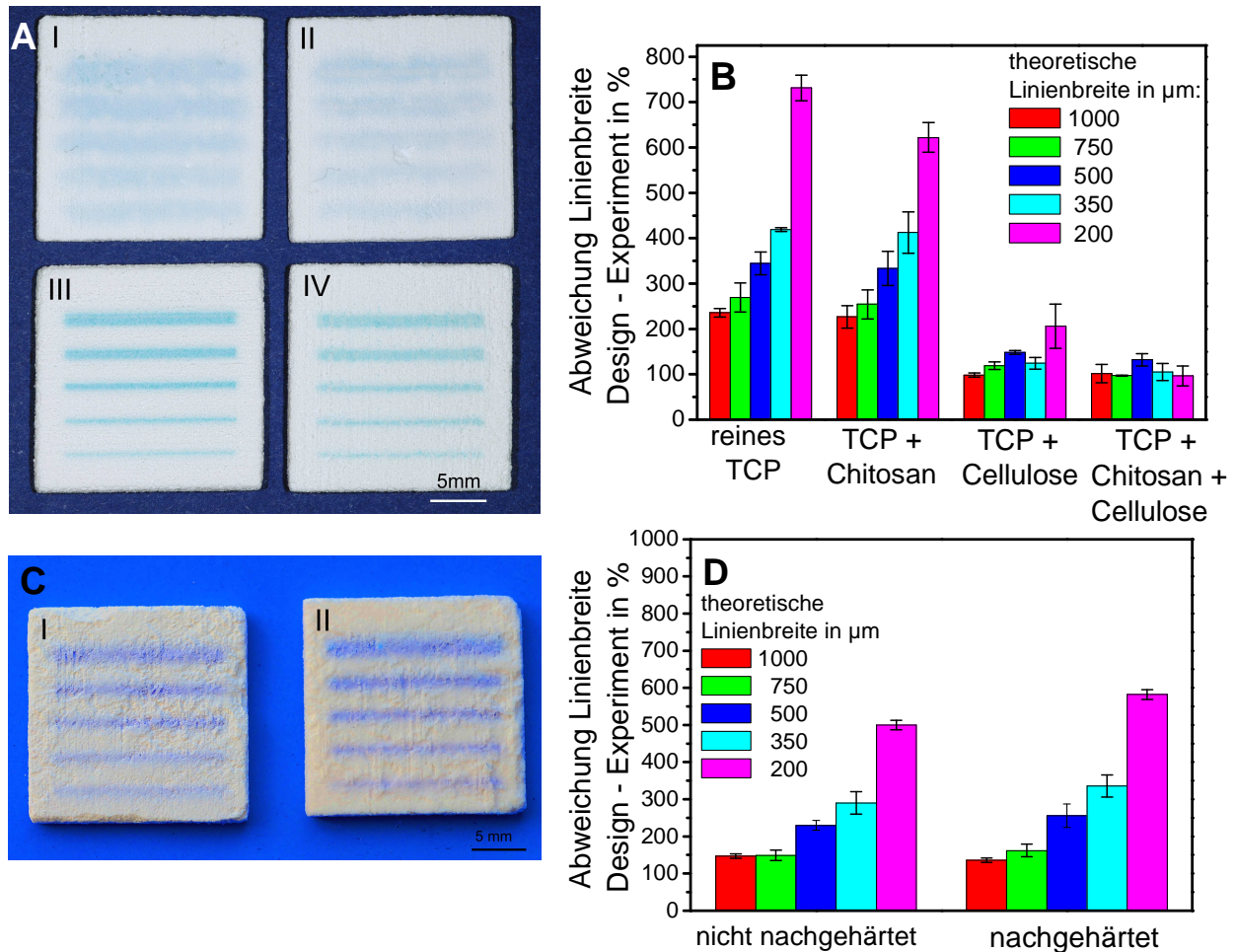


Abbildung 5.4: Gedruckte CaP-Strukturen mit farbigen Linien (A) I: unmodifiziertes TCP, II: TCP mit Chitosan, III: TCP mit HPMC, IV: TCP mit HPMC und Chitosan. Prozentuale Abweichung der Linienbreite farbig gedruckter Linien unterschiedlicher Breite innerhalb polymermodifizierter und nicht polymermodifizierter CaP-Strukturen (B). Gedruckte MgP-Strukturen mit farbigen Linien (C) I: ohne und II: mit Nachhärtung in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung (10 sec). Prozentuale Abweichung der Linienbreite farbig gedruckter Linien unterschiedlicher Breite für MgP (Rohpulver: $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 + 25 \text{ wt}\% \text{ MgO}$) direkt nach dem Druck bzw. nach einer Nachhärtung (D).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass vor allem die hohe Wasseraufnahmekapazität von HPMC zu einer besseren Lokalisation der Farbstofflösung führte, wohingegen Chitosan aufgrund der durch den Druckprozess limitierten Applikationsmenge eine geringe Quellung aufwies und somit nur geringfügig zur Verbesserung der Auflösung beitrug.

Das System aus MgO/MgP und ammoniumhaltigem Binder wies eine geringere Diffusion des Farbstoffs innerhalb der Struktur und eine maximale Abweichung der experimentellen Linienstärke von 580 % (Abbildung 5.4C/D) auf. Die Auflösung konnte durch eine zusätzliche Polymermodifikation der Struktur nicht verbessert werden und lag bei ca. 480 μm . Eine trotz Nachhärtung der Struktur beständige Lokalisation des Farbstoffs lässt vermuten, dass die geringe Porosität der Matrix die Diffusion des Binders verhinderte bzw. die Abbindereaktion zu einer dauerhaften chemischen oder physikalischen Adsorption des Farbstoffs an die Matrix führte. Da die Molekülgröße des Farbstoffes mit 0,5 kDa (1 Da = 1 g/mol) kleiner als Vancomycin (1,45 kDa), Heparin (4 – 50 kDa) oder rhBMP-2 (30 – 38 kDa) ist, kann

von einem vergleichbaren Diffusionsverhalten der Farbstofflösung und den Wirkstofflösungen ausgegangen werden. Im Falle von größeren Molekülen ist sogar von einer geringeren Diffusion und damit besseren Ortsständigkeit innerhalb der porösen Strukturen auszugehen.

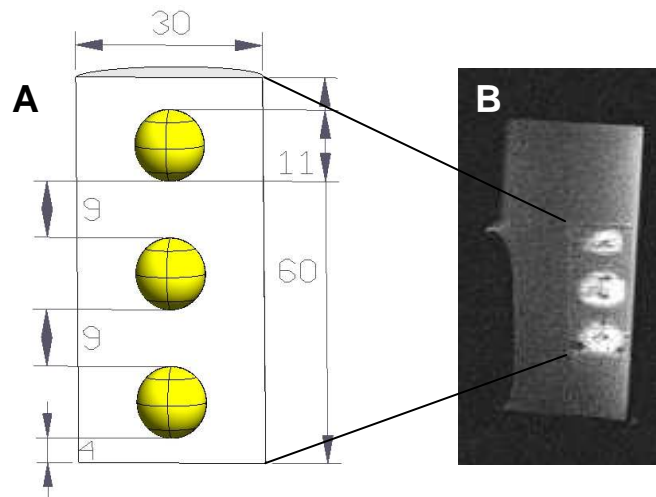


Abbildung 5.5: Design und geometrische Abmessungen (in mm) einer zylindrischen Probe mit drei Wirkstoffdepots (gelb) (A). MRT-Aufnahme der gedruckten und mit HPMC modifizierten CaP-Struktur (hell, Modellwirkstoff: Gadolinium) (B).

Die zerstörungsfreie Visualisierung der Wirkstoffmodifikation im Inneren von pulverggedruckten CaP/HPMC-Strukturen gelang durch den lokalen Druck einer Gadoliniumlösung und anschließender MRT-Aufnahme der Struktur im wässrigen Milieu. Abbildung 5.5 zeigt ein sagittales Schnittbild der Probe im Design (A) und als MRT-Aufnahme (B). Die hellen Bereiche in Abbildung 5.5B kennzeichnen die Depotbeladung der Struktur, die nach 1 h Auslagerung in H_2O durch die diffusionshemmende Wirkung der Cellulose immer noch lokalisiert vorlag. Weiterführend könnte diese Messmethode herangezogen werden, um modellhaft Diffusionsprozesse innerhalb einer Struktur zerstörungsfrei und zeitaufgelöst zu studieren.

Des Weiteren konnte die Kompatibilität des Druckprozesses mit mikropartikulären Fluoreszenzfarbstofflösungen anhand von bedruckten HPMC/Bruschitstrukturen demonstriert werden. Abbildung 5.6 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von lokal mit den mikropartikulären Suspensionen bedruckten Strukturen. Die scharfe Abgrenzung der Fluoreszenz zum Matrixmaterial zeigt, dass die Partikel ortsständig blieben. Praktische Anwendung gedruckter Mikropartikel findet sich in der Nutzung als Freisetzungssystem. Neben der Modifikation des Matrixmaterials mit diffusionsinhibierenden Polymeren kann durch die Verkapselung von Wirkstoffen und der lokalen Modifikation des Trägersystems die Freisetzungskinetik gesteuert oder der Wirkstoff selbst, beispielsweise während des Herstellungsprozesses unter stark sauren oder basischen Bedingungen, durch die Wahl einer geeigneten Polymerverkapselung geschützt werden.

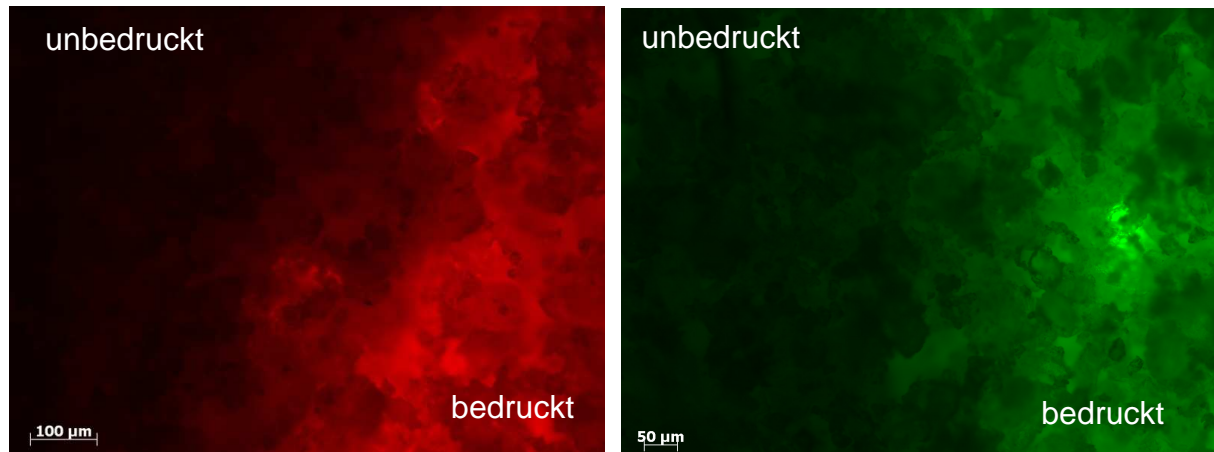


Abbildung 5.6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit fluoreszierenden Mikropartikeln bedruckten HPMC/CaP-Strukturen. Die Partikellösung wurde in unterschiedlich starken Linien (siehe Abbildung 3.4A) in die Struktur eingedruckt. Dargestellt ist jeweils der Übergang zwischen bedruckter und unbedruckter Matrix im Bereich einer Linie.

5.2 Steuerung der Freisetzungskinetik am Beispiel Vancomycin

Die Anordnung des Wirkstoffs in der Struktur (homogen, Depot, Gradient) sowie das Einbringen von Diffusionsbarrieren aus quellbaren Biopolymer (HPMC, Chitosan) bedingt gänzlich unterschiedliche Freisetzungskinetiken. Untersuchungen der Freisetzungskinetik zeigten zuvor ^[257], dass durch einen hohen Konzentrationsunterschied des Wirkstoffs zwischen Freisetzungssystem und Umgebungsmedium, gegeben durch eine homogene Wirkstoffbeladung, initial bis zu 90 % des Wirkstoffs freigesetzt wurden.

Die *in vitro*-Freisetzung des Modellwirkstoffs Vancomycin aus Bruschi- und Struvitstrukturen ist in den Abbildungen 5.7 - 5.10 dargestellt. Grundsätzlich erfolgt die Beschreibung von Freisetzungskinetiken anhand pharmakologischer Modelle (Higuchi-, Weibull-, Korsmeyer-Peppas-Modell). Die hier angewandte Auswertung der Freisetzungskinetik mit dem Korsmeyer-Peppas-Modell schloss für $n = 0,5$ das Higuchi-Modell und für $n = 1$ die lineare Freisetzung mit ein. Über den Freisetzungsexponenten n war eine Klassifizierung des Freisetzungsmechanismus in Abhängigkeit von der Systemgeometrie möglich (Tabelle 2.8). Im Fall von sphärischen Drug-Delivery-Systemen beschreibt $n \leq 0,43$ Freisetzungsprozesse aufgrund eines Konzentrationsgradienten (Ficksche Diffusion), während $0,43 < n < 0,83$ eine Kombination aus diffusions- und quellungskontrolliertem (anomal) Wirkstofftransport charakterisiert. Die Freisetzung aus homogen beladenen Bruschistrukturen (Abbildung 5.7) stimmte mit dem Korsmeyer-Peppas-Modell ^[182] gut überein ($R > 0,95$) und zeigte anfänglich eine starke Freisetzung, die dann exponentiell abnahm (Kinetik 1. Ordnung). Durch eine homogene Modifikation mit Chitosan konnte die Freisetzung von 7 d auf 9 d verzögert werden (Abbildung 5.7B). Im Vergleich zu reinem Bruschi mit homogener Wirkstoffbeladung führte die Modifikation mit HPMC zu einer Reduktion des initialen Burst (Abbildung 5.7A/C).

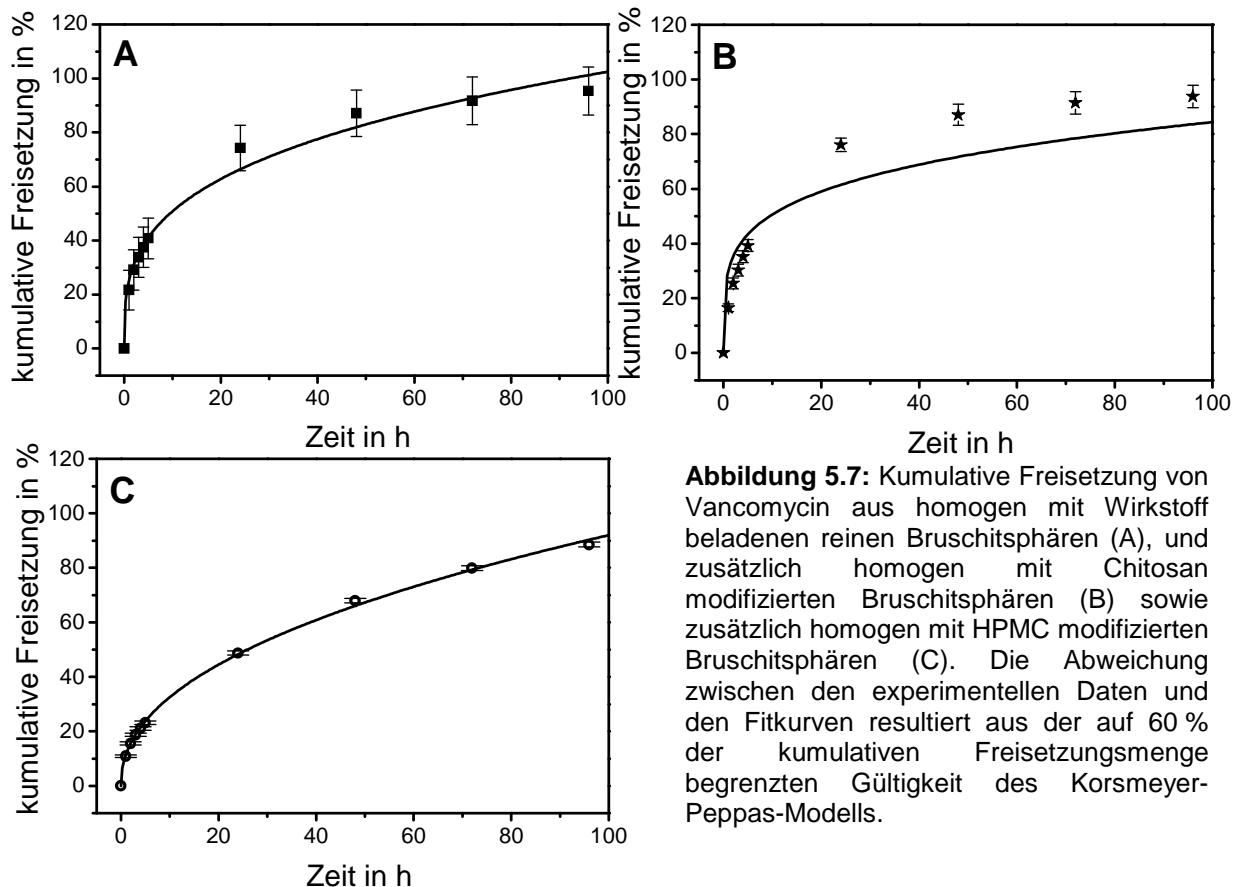


Abbildung 5.7: Kumulative Freisetzung von Vancomycin aus homogen mit Wirkstoff beladenen reinen Bruschitsphären (A), und zusätzlich homogen mit Chitosan modifizierten Bruschitsphären (B) sowie zusätzlich homogen mit HPMC modifizierten Bruschitsphären (C). Die Abweichung zwischen den experimentellen Daten und den Fitkurven resultiert aus der auf 60 % der kumulativen Freisetzungsmenge begrenzten Gültigkeit des Korsmeyer-Peppas-Modells.

Die exponentiell verlaufende Freisetzung aus gradienten- oder depotbeladenen reinen Bruschitstrukturen (Abbildung 5.8A, 5.9A) lag in der ungehinderten Diffusion der Wirkstofflösung während des Druckprozesses begründet, woraus eine homogene Beladung der Matrix resultierte. Die Werte der Freisetzungsexponenten für die exponentiell verlaufende Freisetzungskinetiken (reines Bruschit mit homogener Beladung, Depot- oder Gradientenbeladung und Chitosan/Bruschit mit homogener Wirkstoffbeladung) variierten zwischen 0,19 – 0,38 (Tabelle 5.8) und klassifizierten den Stofftransport somit als durch einen Konzentrationsgradienten gesteuerten Prozess (Ficksche Diffusion). Allgemein inhibierte die Quellung des Polymers die Diffusion des Wirkstoffs und führte, unter Beibehaltung eines hohen Konzentrationsunterschieds zwischen Freisetzungsmittel und Trägerstruktur, zu einer Freisetzungverzögerung. Bei einer homogenen Beladung wurden oberflächennahe Wirkstoffmoleküle aufgrund der geringen Diffusionsbarrierebreite ebenfalls in einem initialen Burst freigesetzt. Dabei bewirkte die höhere Wasseraufnahmekapazität von HPMC durch die Inhibierung der Diffusion des Freisetzungsmittels in das Innere der Struktur eine Reduktion der initialen Freisetzung. Die quantitative Freisetzung aus HPMC-modifizierten und homogen mit Wirkstoff beladenen Bruschitstrukturen erfolgte innerhalb von 7 d und zeigte einen anomalen, über die Polymerquellung und den Wirkstoffgradienten gesteuerten Transport ($n = 0,45$). Die homogene Modifikation mit Chitosan reduzierte den initialen Burst im Vergleich zu reinen Bruschitstrukturen um 5 %, wobei die Freisetzung nach einer Kinetik 1. Ordnung verlief.

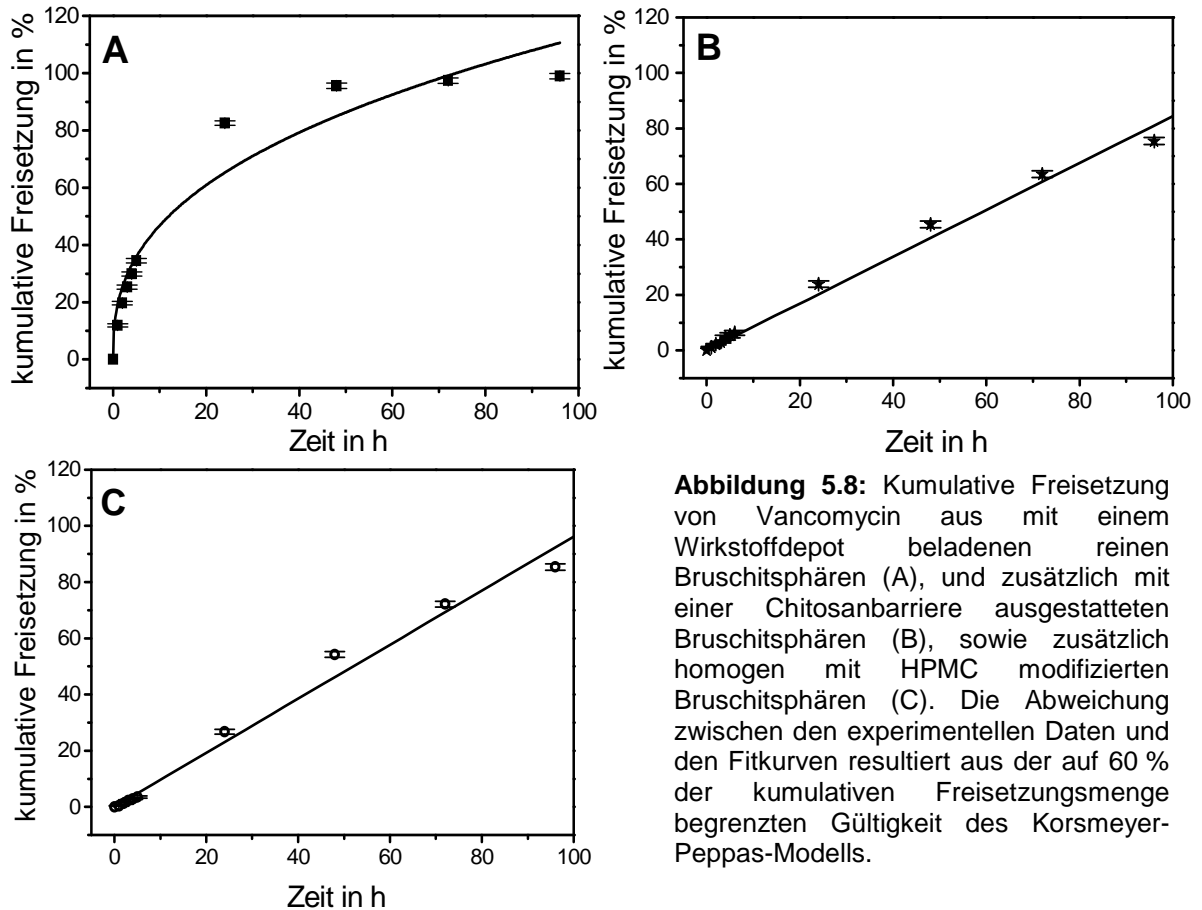


Abbildung 5.8: Kumulative Freisetzung von Vancomycin aus mit einem Wirkstoffdepot beladenen reinen Bruschitsphären (A), und zusätzlich mit einer Chitosanbarriere ausgestatteten Bruschitsphären (B), sowie zusätzlich homogen mit HPMC modifizierten Bruschitsphären (C). Die Abweichung zwischen den experimentellen Daten und den Fitkurven resultiert aus der auf 60 % der kumulativen Freisetzungsmenge begrenzten Gültigkeit des Korsmeyer-Peppas-Modells.

Tabelle 5.8: Fitparameter der experimentell bestimmten Freisetzungskinetiken (Abbildungen 5.7 - 5.10) mit dem Korsmeyer-Peppas-Modell $M_t/M_\infty = k \cdot t^n$ oder mit einem linearen Fit $M_t/M_\infty = a \cdot t$.

Freisetzungsmodell	Zement/Polymer	Wirkstoffmodifikation	n	a
Korsmeyer-Peppas-Modell (Kinetik 1. Ordnung)	Bruschit	homogen		
		100 % y	$0,33 \pm 0,03$	-
		80 % y	$0,25 \pm 0,02$	-
		40 % y	$0,26 \pm 0,03$	-
	20 % y	$0,21 \pm 0,03$	-	
	Bruschit	Depot	$0,38 \pm 0,05$	-
Bruschit	Gradient	$0,19 \pm 0,03$	-	
Linearer Fit (Kinetik 0. Ordnung)	Bruschit/HPMC	Depot	-	$0,96 \pm 0,04$
	Bruschit/HPMC	Gradient	-	$0,68 \pm 0,02$
	Bruschit/Chitosan	Depot mit Barriere	-	$0,84 \pm 0,02$

Eine starke Verzögerung (Freisetzung bis zu 11 d für HPMC/Bruschit-Gradientenstruktur) und eine Freisetzung nahezu konstanter Dosen pro Zeiteinheit (Kinetik 0. Ordnung) über 3 – 4 d konnte durch die gleichzeitige Verwendung von Wirkstoffdepot oder Wirkstoffgradient mit einer polymeren Diffusionsbarriere erreicht werden (Abbildung 5.8B/C, 5.9B). Hierbei ergaben sich über einen linearen Fit berechnete Freisetzungsraten von 0,678 %/h (Gradientenstruktur HPMC/TCP), 0,844 %/h (Depotstruktur Chitosan/TCP) bis 0,962 %/h (Depotstruktur HPMC/TCP). Limitierender Faktor der Wirkstofffreisetzung aus depotbeladenen und mit

Polymerbarrieren ausgestatteten Bruschitstrukturen war die Quellung des Polymers. Zum Einen behinderte die Diffusionsbarriere das Eindringen des Freisetzungsmediums und verzögerte somit die Auflösung des Wirkstoffs, zum Anderen stellte sich aufgrund des so geschaffenen Diffusionswiderstands im Vergleich zu einer homogen mit Wirkstoff beladenen Struktur ein kleinerer Konzentrationsgradient ein. Da der Konzentrationsgradient als treibende Kraft der Diffusion wirkte, wurde dadurch der Wirkstofftransport verzögert. Der verzögerte Stofftransport aus einer Struktur mit Wirkstoffgradienten und aus einer mit HPMC modifizierten Bruschitstruktur resultierte ebenfalls aus der Erniedrigung des Konzentrationsgradienten, sowie aus der Erzeugung eines hohen Diffusionswiderstandes durch die Polymerquellung.

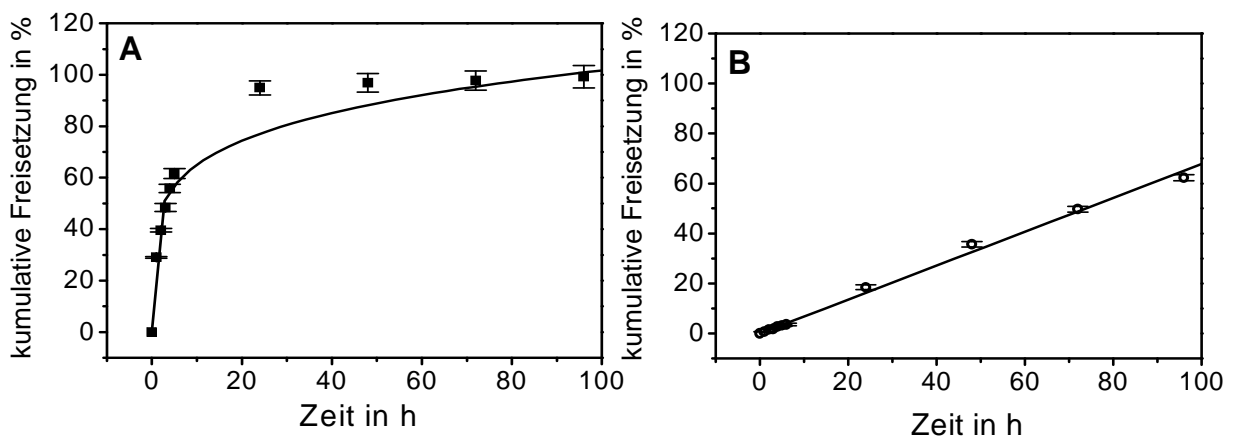


Abbildung 5.9: kumulative Freisetzung von Vancomycin aus mit einem Wirkstoffgradienten beladenen reinen Bruschitsphären (A) und zusätzlich homogen mit HPMC modifizierten Bruschitsphären (B). Die Abweichung zwischen den experimentellen Daten und den Fitkurven resultiert aus der auf 60 % der kumulativen Freisetzungsmenge begrenzten Gültigkeit des Korsmeyer-Peppas-Modells.

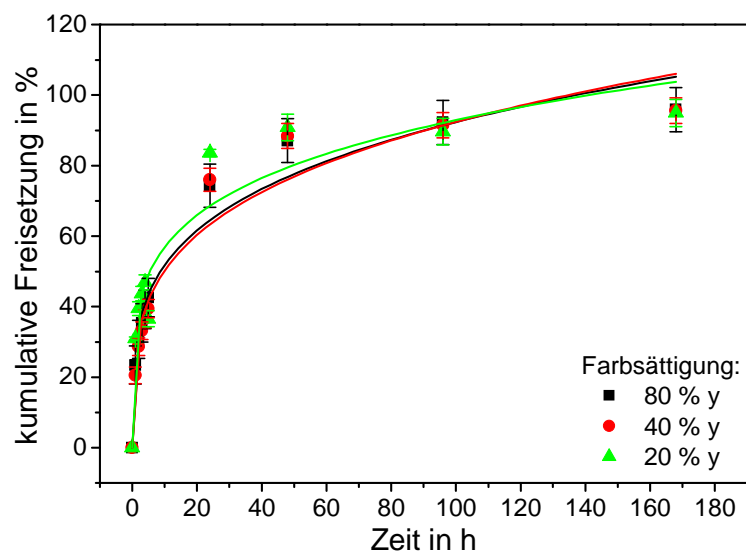


Abbildung 5.10: Freisetzung von Vancomycin aus homogen wirkstoffbeladenen reinen Bruschitsphären. Die Absolutmenge an Vancomycin wurde über die Farbsättigung (Kanal y) variiert. Die Wirkstoffmenge pro Probe betrug für 80 % $y = 2,7$ mg, 40 % $y = 0,6$ mg, 20 % $y = 0,23$ mg.

Die applizierte Wirkstoffmenge konnte über die Farbsättigung der Modellstruktur variiert werden. Die prozentuale Wirkstofffreisetzung aus homogen beladenen, reinen Bruschitstrukturen mit quantitativ unterschiedlicher Wirkstoffbeladung verlief dabei unabhängig von der Wirkstoffmenge diffusionskontrolliert ($n \leq 0,26$) nach einer Kinetik 1. Ordnung (Abbildung 5.10).

Wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, war zum Erhalt der Wirkstofflokalisierung für das Magnesiumphosphatsystem keine Polymermodifikation nötig. Die Freisetzungsstudien wurden analog zum Bruschitsystem an gedruckten, sphärischen Strukturen mit unterschiedlicher Wirkstoffbeladung (homogen, Gradient, Depot) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Freisetzung in Abhängigkeit vom Rohpulver ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ bzw. $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 + 25 \text{ wt\% MgO}$) für homogen beladene Struvitstrukturen untersucht (Abbildung 5.11). Dabei zeigte sich, dass sowohl die Gradienten- als auch die Depotstrukturen innerhalb von 46 d nur etwa 1 % der adsorbierten Wirkstoffmenge freisetzten, was für eine nahezu vollständige Inhibierung des Wirkstofftransports durch eine geringe Interkonnektivität des porösen Netzwerks sprach. Aus homogen beladenen Proben konnte in Abhängigkeit von den Zementedukten eine 49 %ige ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) bzw. 8 %ige (MgO/MgP) Wirkstofffreisetzung in einem Burst-Release festgestellt werden. Die schubartige Freisetzung des Wirkstoffs erfolgte für das $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ -System innerhalb der ersten 24 h und für das MgO/MgP -System am zweiten Tag der Auslagerung. Dies lag in der geringeren Umsetzungsrate während des Druckprozesses von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ zu Struvit begründet. Da die Proben keiner Nachhärtung unterzogen wurden, wies das mit der hochreaktiven Phase MgO modifizierte Magnesiumphosphat eine höhere Umsetzungsrate zu Struvit und damit verbunden eine kompaktere Bulkstruktur auf, welche die Diffusion des Modellwirkstoffes stark reduzierte und damit die Freisetzung verzögerte.

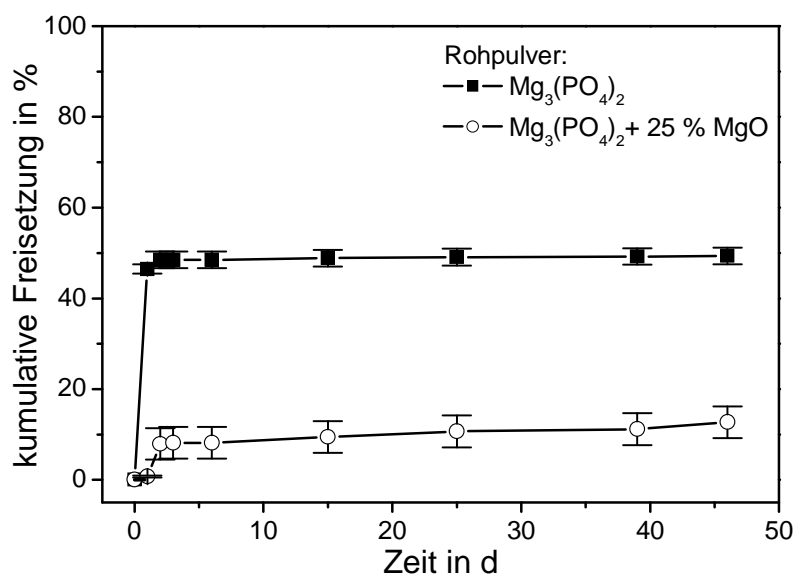


Abbildung 5.11: Freisetzung aus gedruckten, homogen mit Vancomycin modifizierten Struvitsphären in Abhängigkeit vom Rohpulver ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ bzw. $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 + 25 \text{ wt\% MgO}$).

Die Quantifizierung des Restwirkstoffgehalts in den Freisetzungssystemen nach 46 d Auslagerung zeigte, dass der Wirkstoff durch die Prozesskette (Herstellung über Pulverdruck bis zur Auslagerung) nicht inaktiviert wurde, sondern es zu einem vollständigen Einschluss der Wirkstoffmoleküle in die Bulkstruktur kam.

5.3 Biologische Wirksamkeit der gedruckten Wirkstoffe

Für eine erfolgreiche Anwendung von ortsauflöst mit Wirkstoffen (Antibiotika- oder Proteinmodifikation z.B. BMP, VEGF) dotierten Strukturen als Knochenersatzwerkstoffe oder Scaffolds ist der Erhalt der pharmakologischen Wirksamkeit von entscheidender Bedeutung. Hierfür müssen die Bioadditive resistent gegenüber den verschiedenen, während des Druck- und Freisetzungsprozesses auftretenden physikalischen und chemischen Bedingungen sein (Abbildung 5.12).

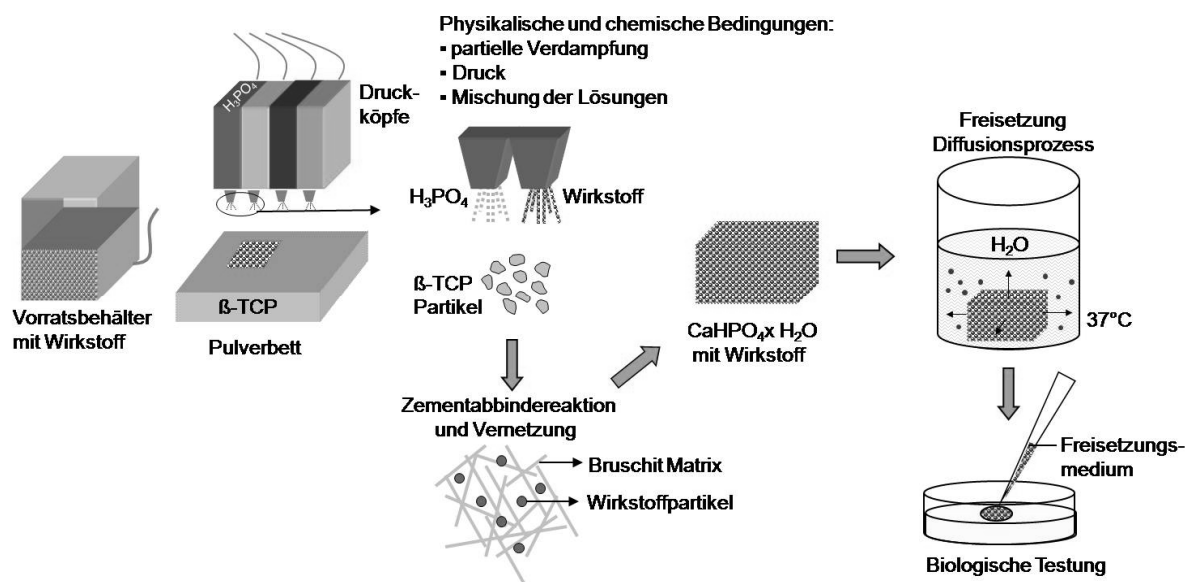


Abbildung 5.12: Prozesskette mit physikalischen und chemischen Bedingungen von der Herstellung wirkstoffmodifizierter TCP-Proben bis zur biologischen Testung der biologischen Aktivität eines Wirkstoffes.

Der thermische Ink-Jet-Prozess kann in fünf Prozessschritte unterteilt werden:

1. Druckerzeugung durch partielles Verdampfen der Binder/Wirkstofflösung
2. Austritt der Lösung durch die Düsen
3. Tropfenformation und Auftreffen auf das Pulverbett
4. Verschmelzung mit dem Substrat
5. Rückkehr des Ink-Jet-Mechanismus in den Ausgangszustand

All diese Teilschritte können zur Denaturierung von Wirkstoffen, Proteinen und Zellen führen. Als kritische Prozessparameter sind zum Einen die hohen Scherkräfte, die während Teilschritt 2 und 3 auftreten, als auch die Temperatureinwirkung in Teilschritt 1 zu betrachten. Khan et al. ^[55] zeigten, dass eine Denaturierung von

Enzymen ^[258] und Proteinen während des Druckprozesses durch Temperatureinwirkung aufgrund der kurzzeitigen Hitzeeinwirkung (3 – 10 μ s) ^[43] und der hohen Wärmekapazität von Luft vernachlässigbar ist. Ebenso konnte in verschiedenen Studien die Druckbarkeit vitaler, funktionstüchtiger Zellen ^[259,260] und DNA ^[261] mit Hilfe von Ink-Jet-Prozessen belegt werden. Der Erhalt der biologischen Wirksamkeit nach Applikation durch den Druckkopf lässt darauf schließen, dass die Wirkstoffe nur kurzfristig und im geringen Maße ungünstigen (denaturierenden) Bedingungen ausgesetzt werden.

Bei der Nutzung eines Mehrfarbendruckers kam es bei simultanem Gebrauch mehrerer Druckkanäle direkt nach dem Passieren der Düsen und nach dem Auftreffen auf das Pulverbett innerhalb der Zementmatrix zur Durchmischung der Lösungen. Kritische chemische Parameter waren hierbei der pH-Wert der Binderlösung, der für TCP-Zement im stark sauren Bereich lag, sowie die Abbindereaktion, bei der entstehende Nebenprodukte schädigend auf die Bioadditive wirken konnten. Des Weiteren kann die Einbindung der Wirkstoffmoleküle in die Zementmatrix die Freisetzung biologisch aktiver Wirkstoffe beeinträchtigen. Limitationen treten auf, wenn es durch verschlossene, stark gewundene oder die Molekülgröße des Wirkstoffs unterschreitende Poren zum irreversiblen Einschluss der Wirkstoffmoleküle kommt oder der Wirkstoff durch Chemisorption dauerhaft an die Zementmatrix gebunden wird. Bei einer Freisetzung im wässrigen Milieu und physiologischer Temperatur ist von *in vivo* analogen Denaturierungsraten der Wirkstoffe auszugehen. Kritisch hierbei könnten geringe Halbwertszeiten der Wirkstoffe sein, wenn diese durch eine stark verzögerte Freisetzung überschritten werden. Die Evaluation der biologischen Aktivität der Additive erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels wirkstoffspezifischer, etablierter biologischer Verfahren anhand des Freisetzungsmediums.

Die biologische Aktivität von Vancomycin, Heparin und rhBMP-2 wurde sowohl nach dem Druckprozess als auch für Vancomycin nach der Freisetzung aus gedruckten TCP-Strukturen evaluiert. Hierfür wurden die Wirksamkeiten der Lösungen, die mittels Spülfunktion aus den Druckköpfen gesprüht und aufgefangen wurden, bzw. das Freisetzungsmedium vancomycinmodifizierter Proben mit den Wirksamkeiten unbehandelter Wirkstofflösungen verglichen.

Wie in Abbildung 5.13B zu sehen ist, konnte die biologische Aktivität nach dem Druckprozess und nach der Freisetzung zum Großteil erhalten werden. Im Vergleich zu den Kontrolllösungen waren die Aktivitäten der gedruckten Lösungen um $(18 \pm 1) \%$ für Heparin, $(9 \pm 18) \%$ für rhBMP-2 und um $(1 \pm 7) \%$ für Vancomycin reduziert. Das freigesetzte Vancomycin wies eine Wirksamkeit von $(87 \pm 9) \%$ auf. Die Reduktion der biologischen Aktivitäten infolge der Applikation über den Druckkopf resultierte aus der Einwirkung von Scherkräften auf die Wirkstoffmoleküle und der partiellen Erhöhung der Temperatur ($> 80 \text{ }^\circ\text{C}$) des Dispersionsmediums. Der Abfall der pharmakologischen Wirksamkeit von Vancomycin nach Durchlaufen der gesamten Prozesskette war mit 12 % als gering zu bewerten.

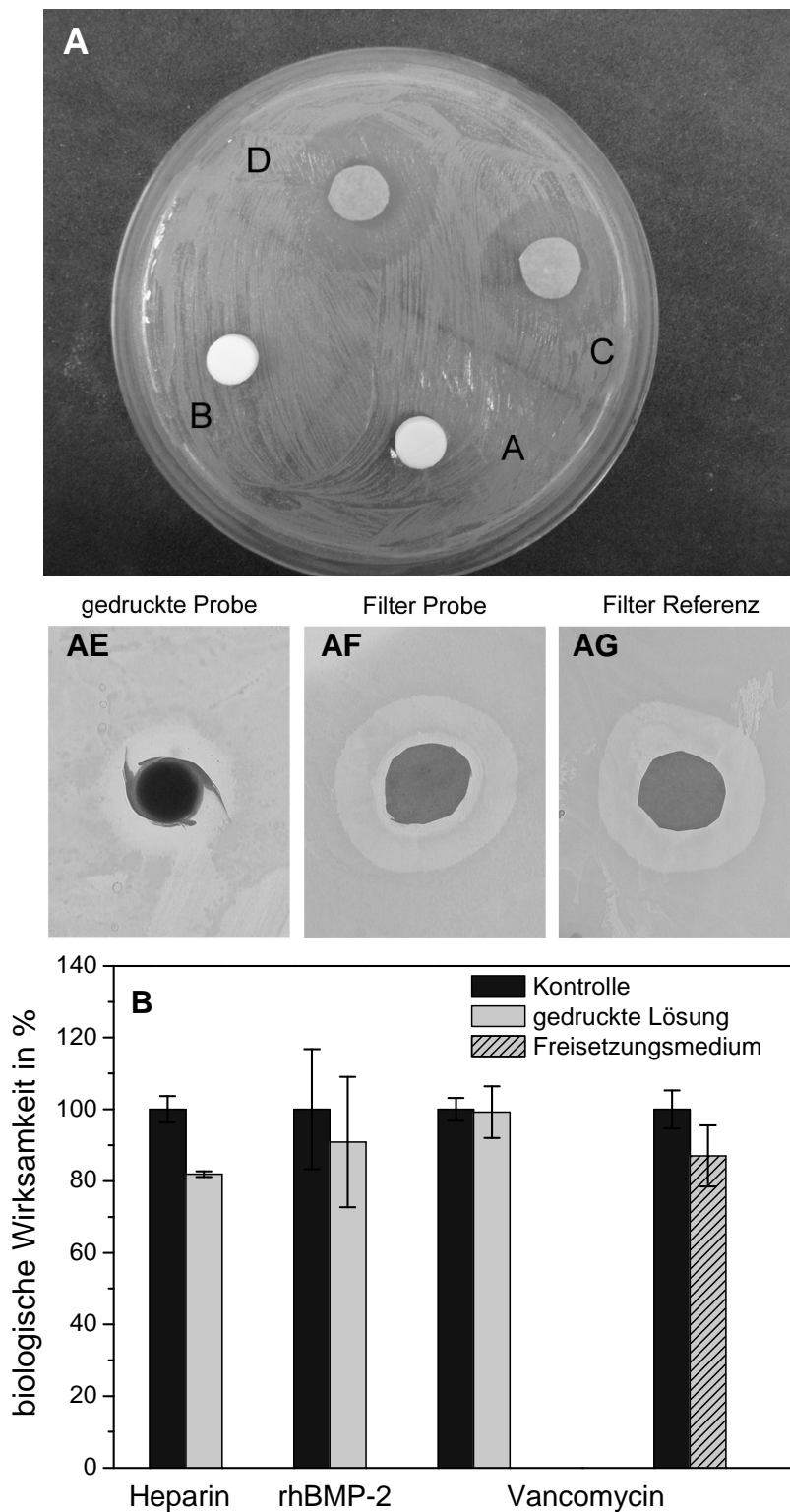


Abbildung 5.13: Biologische Aktivität gedruckter und nicht gedruckter Vancomycinlösungen. Die Validierung erfolgte anhand von gram-positivem *Staphylococcus epidermidis* mittels des Agardiffusionstest (A). Hierbei wurde der Hemmhofdurchmesser nach zwei Tagen bestimmt. (AA/AE): Bruschi gedruckt mit 5%iger Vancomycinlösung, (AB): Bruschi-Kontrolle, (AC/AG): Vancomycinlösung unbehandelt, (AD/AF): Vancomycinlösung gedruckt. Biologische Wirksamkeit gedruckter Lösungen von Heparin, rhBMP-2 und Vancomycin, sowie nach der Freisetzung von Vancomycin aus gedruckten Bruschi-Proben (B).

Die Druckbarkeit von rhBMP-2-Lösungen wurde anhand von Zellkulturmodellen evaluiert, wobei der Nachweis der biologischen Aktivität von CaP-Scaffolds, welche während des Drucks mit rhBMP-2 dotiert wurden, erbracht werden sollte. Obwohl auch proteinbasierte Wirkstoffe durch den Druckkopf unter überwiegendem Erhalt der pharmakologischen Wirksamkeit applizierbar waren, ergaben sich hier Limitationen hinsichtlich der Kompatibilität mit der Abbindeaktion der Zemente. Der stark saure pH-Wert bei bruschitbasierten Systemen führte zu einer Inaktivierung des Proteins. Ansätze zum Erhalt der pharmakologischen Aktivität proteinbasierter Additive liegen in der Anwendung des in dieser Arbeit etablierten neutral abbindenden Magnesiumphosphatsystems. Daneben könnte auch eine Einkapselung der Proteine in dispergierbare Mikropartikel (z.B. aus PLGA) erfolgen, wodurch effizient der Abbindevorgang und die Wirkstofffreisetzung entkoppelt würden.

5.4 Diskussion

Bioaktive Implantate interagieren mit dem Empfängergewebe und führen zu einer kraftschlüssigen Integration des Implantats in den Knochen ^[262], der sogenannten Osteointegration ^[263] und Osteokonduktion (Eigenschaft Knochengewebe an die Oberfläche oder in die Porenstruktur des Scaffolds zu binden) ^[264]. Die meisten bioaktiven Implantate sind zudem degradierbar oder durch Osteoklasten resorbierbar und werden innerhalb weniger Monate durch nativen Knochen ersetzt. Kommerziell erhältlicher Knochenersatz besteht aus unterschiedlichen Materialien natürlichen oder synthetischen Ursprungs. Demineralisierte Knochenmatrix wird häufig mit polymeren Zusätzen wie Gelatine (Optefil®, Opteform®) oder Kollagen (INFUSE® Bone Graft) modifiziert, um der natürlichen Knochenstruktur möglichst nahe zu kommen. Synthetischer Knochenersatz besteht vorzugsweise aus Calciumphosphaten, die entweder in Reinform (Norian®, SRS®, CELLPLEX®) oder als anorganisch-organische-Matrix (CopiOs® Bone Void Filler: dibasisches Calciumphosphat und Typ I Kollagen) erhältlich sind. Allen Materialien gemein ist, dass sie aufgrund ihrer physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften osteoinduktiv wirken. Die knochenähnliche Struktur mit vorzugsweise hoher interkonnektierender Porosität induziert die Anlagerung von Knochenzellen und begünstigt den Nährstoffaustausch, sowie die Vaskularisierung und die Resorption der Implantate.

Neueste Knochenersatzmaterialien sind biomimetisch und osteoinduktiv (Anregung des Knochenwachstums durch Beeinflussung der Differenzierung und Anlagerung von Stammzellen oder Knochenzellen) und durch Modifikation mit geeigneten Wirkstoffen wie Antibiotika, Chemotherapeutika oder Wachstumsfaktoren biologisch wirksam. Beispielsweise induzieren INFUSE® Bone Graft, Op-1® Implant und OP®-1 Putty durch die Inkorporation und Freisetzung von Knochenmorphogenen (rhBMP-2/7) aktiv die Anlagerung von Stammzellen und Knochenzellen ^[3].

Herkömmliche Methoden der biomimetischen Gestaltung von Scaffolds liegen in der Anpassung der physikalischen und chemischen Werkstoffeigenschaften an das Empfängergewebe in Bezug auf Funktion, Morphologie und physikalische Charakteristika, sowie deren homogene Beladung mit Zellen, Biomolekülen oder Wachstumsfaktoren ^[265,266]. Hierbei können mehrere bioaktive Stoffe oder Zelltypen simultan auf einen Scaffold aufgebracht werden. Die Schwierigkeit besteht jedoch in der Lokalisation verschiedener Zellen in örtlich begrenzten Bereichen des Scaffolds, insbesondere auf einer dem natürlichen Gewebe entsprechenden Skalierung von wenigen μm . Die Realisierung dieser Vision erfolgte durch den Druck von Zellen mittels verschiedener lithographischer oder Rapid-Prototyping-Verfahren. Die ersten Versuche, Zellen in spezifischen Bereichen von Scaffolds zu lokalisieren, gelangen mit lithographischen Verfahren, wie der Photolithographie ^[267,268], Softlithographie ^[269] oder der Mikrofluidik ^[270]. Hierbei wurden die Oberflächen der Scaffolds funktionalisiert, so dass es während einer Auslagerung der Scaffolds in Zellsuspensionen zu einer wirkstoffspezifischen und lokalen Anlagerung von Zellen auf der Scaffoldoberfläche kam. Mit diesen Methoden gelang jedoch nur die zweidimensionale Modifikation mit bioaktiven Stoffen.

Erst mit Hilfe verschiedener Rapid-Prototyping-Techniken konnte eine dreidimensionale Modifikation mit Biomolekülen und Zellen realisiert werden. Verschiedene Studien belegen die Druckbarkeit funktionstüchtiger Zellen und Bakterien mit laserbasierten Methoden, wie der Laser-Induced-Forward-Transfer-Technik (LIFT) oder dem Laser-Guidance-Direct-Write (LGDW) ^[271-278], ohne dass es zu einer signifikanten Schädigung der Zellen während der Herstellung der Scaffolds kam ^[276]. Dabei konnten Vitalitätsraten von bis zu 100 % erreicht werden ^[273,279]. Weitere Rapid-Prototyping-Verfahren bestehen im Druck von Zellen via Ink-Jet-Printing. Dabei kann zwischen zwei verschiedenen Applikationstechniken unterschieden werden: 1. thermische Applikation und 2. piezoelektrische Applikation. Die Zellen sind hierbei in einer sogenannten Biotinte, bestehend aus Wasser, Polymeren oder Hydrogelen, suspendiert. Boland et al. nutzten 2003 erstmals einen modifizierten thermischen Drucker zur Applikation lebender Zellen (bovine aortic endothelial cells) mit einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml auf einem Hydrogel (Matrigel®) bzw. einem Kollagen-I Gel ^[259,280]. Des Weiteren wurden erfolgreich primäre Motoneurone, primäre embryonale hippocampale Zellen und kortikale Neuronen durch thermischen Druck auf Hydrogele appliziert ^[43,280]. Der hierbei auftretende geringe Verlust an Zellvitalität von 3 – 15 % ist auf die Hitzeeinwirkung während der Applikation via Druckkopf oder auf die Zytotoxizität der Biotinte ^[43] zurückzuführen.

Piezoelektrisches Ink-Jet-Printing wurde ebenfalls zum Druck lebender Zellen, wie Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten herangezogen ^[260,281]. Die Zellkonzentrationen der Lösungen variierten zwischen 10^2 – 10^4 Zellen/ml, und mussten, um ein Verstopfen der Düsen zu verhindern, relativ gering sein (ca. 1 Zelle in 6600 Tropfen). Die niedrige Zellkonzentration konnte durch die hohe Applikationsrate von

10000 Tropfen/sec relativiert werden. Diese Studien zeigen die generelle Durchführbarkeit der Wirkstoffmodifikation von Scaffolds via Ink-Jet-Printing-Technologie.

Die Kombination aus stabilen Knochenersatzmaterialien auf Basis bioaktiver Knochenzemente und Drug-Delivery-Systeme mit lokaler Variation der chemischen Zusammensetzung wurde bislang noch nicht realisiert und war Gegenstand des vorangegangenen Kapitels. Ziel war die Herstellung von keramischen Scaffolds mit lokaler Wirkstoffmodifikation mittels eines mehrfarbigen 3D-Pulverdruckers, um zukünftig die Herstellung defektspezifischer und bioaktiver Knochenimplantate für den nicht kraftbelasteten Skelettbereich zu ermöglichen. Die Eignung dieses Verfahrens zur Herstellung von Drug-Delivery-Systemen wurde an den bereits für dieses Verfahren optimierten Materialsystemen TCP/H₃PO₄ und MgO/MgP/NH₄H₂PO₄ studiert. Einschränkungen dieses Verfahrens bezüglich einer optimalen Umsetzbarkeit von Wirkstoffbeladungen der gedruckten Strukturen ergaben sich softwarebedingt, aufgrund des auf wenige Pulverlagen limitierten Übertrags der Farbinformation und gerätespezifisch, wegen der begrenzten Menge an applizierbarer Wirkstofflösung über die Druckpatronen. Eine durchgängige Wirkstoffmodifikation war durch die Konstruktion der Strukturen in einem Zwiebelschalenmodell möglich. Die Kenntnis der Binder/Volumenverhältnisse der einzelnen Farbkanäle erlaubte durch Anpassung der Wirkstoffkonzentration der applizierten Lösung die Modifikation der Strukturen mit einer gewünschten Wirkstoffmenge. Quantifizierungen gedruckter Wirkstofflösungen ergaben Binder/Volumenverhältnisse von 4 – 87 nl/mm³ für den gelben Farbkanal, 16 - 28 nl/mm³ für den Farbkanal Magenta und 10 – 23 nl/mm³ für den Farbkanal Cyan.

Die theoretisch mögliche Auflösung des Druckers mit 600 x 540 dpi (entsprechend der „spot size“ von 42,33 x 47,04 µm) konnte mit den keramischen Materialsystemen aufgrund der Diffusion der aufgespritzten Lösungen nicht erreicht werden. Es ergab sich eine Auflösung von 480 µm für das MgP-System. Die Einbringung von polymeren Diffusionsinhibitoren (HPMC und Chitosan) in das CaP-System, erbrachte eine maximale Auflösung von ca. 400 µm. Zur Eindämmung der Flüssigkeitsdiffusion innerhalb der gedruckten Strukturen sind weitere, im wässrigen Milieu quellbare Polymere wie Alginat, Pektin, Xanthan, Gelatine oder Hyaluronsäure denkbar. Die Modifikation von mineralischen Knochenzementen mit Polymeren bietet daneben die Möglichkeit einer einstellbaren Wirkstofffreisetzung, aber auch der mechanischen und biologischen Funktionalisierung. Eine auf den Druck folgende Polymerinfiltration (degradierbar bzw. inert) der Zementstrukturen bietet die Möglichkeit einer zusätzlichen mechanischen Stabilisierung, um die Festigkeit von Implantaten zu erhöhen, sowie die Freisetzungsgeschwindigkeit von Wirkstoffen zu verlangsamen. In entsprechenden Festigkeitstudien wurden pulvergedruckte Bruschitprüfkörper zum Einen mit einer resorbierbaren Polymerlösung aus PLGA in Dichlormethan, zum Anderen mit einer nicht resorbierbaren Polymerlösung aus Bis-GMA/TEGDMA

(photochemisch polymerisierbar) infiltriert ^[282]. Die Polymermodifikation mit PLGA erbrachte eine 2,5-fache, mit dem Polymer Bis-GMA/TEGMA im Falle der Aushärtung mit einem Lichtgerät eine 14,3-fache bzw. durch temperaturinduzierte Aushärtung eine 15,8-fache Steigerung der Druckfestigkeit.

Das in dieser Studie eingesetzte Biopolymer Chitosan ist für seine multiple Biofunktionalität bekannt. Zu den typischen Eigenschaften von Chitosan zählen die Aktivierung von Makrophagen, Fibroblasten und neutrophilen Granulozyten, die zur Einleitung des Heilungsprozesses beitragen, die Induktion der Angiogenese durch den Einschluss von Wachstumsfaktoren, speziell VEGF, sowie die allgemeine Anregung der Zellanlagerung und Proliferation von Gewebs- und Stammzellen ^[256]. Chitosan ist nicht toxisch und biodegradierbar, was es in Kombination mit Knochenzementen für die kontrollierte Freisetzung von Wirkstoffen interessant macht. Das Freisetungsverhalten solcher kompositärer Materialien wurde in verschiedenen Studien untersucht ^[254,255,283-285]. Lee et al. untersuchten die Freisetzung des Platelet-Derived-Growth-Factors aus Chitosan/TCP-Scaffolds *in vivo* in calvarialen Defekten der Ratte. Die Freisetzung folgte einer Kinetik 1. Ordnung und führte zu einer gesteigerten Knochenbildung ^[285].

Aufgrund der natürlichen mikroporösen Struktur eignet sich Calciumphosphat sehr gut als Drug-Delivery-System, wobei die Freisetzungskinetik nur schwer zu steuern ist. Ein Ansatzpunkt besteht auch hier in der Kombination von keramischen Zementen und Polymeren. Polymere Systeme haben aufgrund ihrer Biodegradierbarkeit die Eigenschaft, Wirkstoffe kontrolliert abgeben zu können. Die große Bandbreite an physikalischen und chemischen Eigenschaften der Polymere ermöglicht eine Modulierung der Freisetzung aufgrund unterschiedlicher Degradations- und Freisetzungsmechanismen, die je nach Anwendungsbedingungen gewählt werden können. Die Polymermodifikation der Trägermatrix kann entweder durch homogene Vermischung von Pulvern, durch lokale Modifikation via Druckkopf oder durch das Einbringen polymerverkapselter Wirkstoffe erfolgen. Ein Anwendungsgebiet könnte etwa die Behandlung bakterieller Infektionen im Implantatlager bei der Substitution von Knochendefekten darstellen. Der Eintrag von Bakterien kann über die Luft, die Patientenhaut oder Bakterien im Organismus des Patienten erfolgen. Unter Bildung eines resistenten Biofilmes lagern sich die Bakterien auf die Implantatoberfläche an, was zu einer Abschirmung gegenüber dem Immunsystem und Antibiotika führt. Vorteilhaft ist deshalb der Einsatz lokaler Freisetzungssysteme, die eine hohe initiale Freisetzung aufweisen, um die Anlagerung von Bakterien zu vermeiden, gefolgt von einer retardierten konstanten Freisetzung, wodurch über einen längeren Zeitraum Wirkstoff oberhalb einer effektiven Wirkstoffdosis abgegeben wird ^[286-289].

Durch die lokale Einbringung von Wirkstoffen und durch die Variation der Wirkstoffkonzentration innerhalb eines keramischen Drug-Delivery-Systems konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl die Freisetzungsrates als auch die Freisetzungsdauer

gesteuert werden. Eine medizinisch gewünschte konstante Freisetzung (Kinetik 0. Ordnung) wurde erreicht, indem polymermodifizierte CaP-Strukturen mit Wirkstoffdepots oder Wirkstoffgradienten ausgestattet wurden. Die Freisetzungsraten variierten zwischen 0,68 und 0,96 %/h. Das MgO/MgP-System zeigte als Folge einer nicht reversiblen, physikalischen Inkorporation des Wirkstoffs eine marginale Freisetzung von < 10 %. Um die Vorteile der neutralen Abbindereaktion des MgP-Systems nutzen zu können und so die Freisetzung pH-sensitiver Wirkstoffe, wie beispielsweise Proteine zu ermöglichen, wäre die Modifikation des Ausgangspulvers mit löslichen Platzhaltern denkbar. Als Platzhalter könnten Salze^[290] oder Zucker^[291] verwendet werden. Durch Auflösung dieser Moleküle im wässrigen Milieu wird die Porosität der Struktur erhöht, wodurch Diffusionskanäle für die Wirkstoffmoleküle geschaffen werden. Eine Freisetzungsstudie an antibiotikabeladenen PMMA-Strukturen zeigte, dass die Liberation des Wirkstoffs durch Zusatz von 1 – 2,5 wt% CaCl₂ bzw. CaCl₂ und Na₂CO₃ zum Zement durch eine Auflösung der Salze zu einer Porositätssteigerung und infolgedessen zu einer bis zu 63 % gesteigerten quantitativen Freisetzung führte^[290].

Eine medizinisch anzustrebende Freisetzungskinetik mit initial hoher Wirkstofffreisetzung, gefolgt von einer Kinetik 0. Ordnung, könnte über eine postpräparative, oberflächliche Wirkstoffmodifikation der mit Wirkstoffdepots oder Wirkstoffgradienten beladenen Freisetzungssysteme erreicht werden. Solch eine Beschichtung könnte durch kurzzeitige Immersion der Scaffolds in einer wässrigen Wirkstofflösung oder in einer vorzugsweise schnell degradierbaren Polymer/Wirkstoff-Suspension realisiert werden. Da die Diffusion von der Wirkstoffkonzentration und den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Polymere und der keramischen Matrix abhängig ist, bietet die Variation dieser Parameter die Option, die Freisetzung der Bioadditive zu kontrollieren. Eine weitere Möglichkeit, die Freisetzung zusätzlich zu modulieren bzw. zu retardieren, stellt eine Polymerinfiltration der Matrices dar. Frühere Untersuchungen der Freisetzung von Vancomycin aus mit PLGA infiltrierten Bruschitstrukturen zeigten eine stark verzögerte Diffusion des Wirkstoffs mit einer quantitativen Freisetzung innerhalb von 10 d und einer dem Higuchi-Modell folgenden Kinetik ($M_t/M_\infty \sim t^{1/2}$)^[292]. Nach dem Infiltrieren mit PLGA verdampft das Lösungsmittel und das Polymer verbleibt in den Zwischenräumen der Matrix, so dass die Mikroporosität vermindert, die Makroporosität aber erhalten bleibt. Die Umhüllung der einzelnen Kristalle mit einer dünnen Polymerschicht wirkt somit als Diffusionsbarriere. Durch die Biodegradierbarkeit von PLGA wird diese Barriere mit der Zeit abgebaut, was eine vollständige Freisetzung des Wirkstoffs garantiert und dem Aufkommen von Resistenzen entgegenwirkt.

Neben der Ausstattung der Matrices mit antimikrobiell wirksamen Additiven ist die Modifikation mit zellulär wirksamen Bioadditiven, wie z.B. Wachstumsfaktoren von Interesse. Durch die gezielte Lokalisation der Wachstumsfaktoren in den Scaffolds besteht die Möglichkeit, örtlich begrenzt zelluläre Reaktionen zu induzieren.

Vorraussetzung hierbei ist der Erhalt der biologischen Wirksamkeit der Bioadditive über die gesamte Prozesskette, von der Herstellung des Scaffolds bis hin zur Freisetzung der Wirkstoffe. Verschiedene Studien beschäftigen sich mit der Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus keramischen Knochenersatzwerkstoffen und belegen deren biologische Aktivität. VEGF aktiviert beispielsweise die Freisetzung, Migration und Proliferation von Endothelzellen aus dem den Defekt umgebenden Gewebe und induziert somit die Vaskularisierung der Implantatstruktur [293]. Des Weiteren induziert VEGF die Migration von Osteoklasten [294], Monozyten [295], Osteoblasten [296] und mesenchymalen Vorläuferzellen [297], sowie die Differenzierung von Osteoklasten [298] und Osteoblasten [296]. In einer Studie von Lode et al. wurde die Freisetzung von VEGF (400 ng/Probe) aus α -TCP/DCPA Zement untersucht [127]. Hierbei konnte neben der hohen Bindungskapazität des Werkstoffs ein retardiertes Freisetzungsverhalten bioaktiver Wachstumsfaktoren über 7 d hinweg festgestellt werden. In einer weiteren Studie von Gelinsky et al. konnte durch zusätzliche Modifikation der Strukturen die VEGF stabilisierende Wirkung von Heparin belegt werden [299]. Die Induktion von Knochenwachstum mit TGF- β und rhBMP-2 modifizierten Scaffolds wurde in verschiedenen Studien beobachtet [103,104,300-302]. Ruhé et al. implantierten makroporöse CaP-Scaffolds mit jeweils 10 μ g rhBMP-2 in craniale Defekte und ektopisch im Kaninchen und beobachteten eine Freisetzung von 60 % der Proteine nach vier Wochen [303]. Haddad et al. zeigten, dass durch die Beladung von Apatizement mit 25 mg/ml rhBMP-2 nach zwölf Wochen Implantation in einem calvarialen Defekt im Kaninchen eine um 45,8 % höhere Knochenbildungsrate erreicht wurde [304].

Der Erhalt der biologischen Wirksamkeit verschiedener biologischer Wirkstoffe (rhBMP-2, Heparin, Vancomycin) während des Druckvorgangs konnte in dieser Arbeit mit Hilfe biochemischer Tests nachgewiesen werden. Hierbei ergab sich ein maximaler Aktivitätsverlust von 18 % als Folge von Hitze- oder Druckeinwirkung während des Herstellungsprozesses. Temperatur oder Scherkräfte gelten insbesondere für Proteine und Zellen als kritische, die Wirksamkeit vermindern Parameter. Verschiedene Studien belegen die prinzipielle Eignung des Ink-Jet-Verfahrens zur Applikation von Proteinen und Zellen. Cui et al. produzierten mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen modifizierte Fibrinscaffolds durch thermisches Ink-Jet-Printing (Drucker HP Deskjet 500). Nach 21 d Kultivierung zeigten die Zellen ein gerichtetes Wachstum entlang der Fibrinkanäle [305]. Xu et al. bewiesen durch den Druck von neuronalen Säugetierzellen (Ratte, Hamster) in Agar- und Kollagenhydrogelen die Kompatibilität mit dem thermischen Druckverfahren [44]. Die Zellkonzentration in Suspension betrug $2 - 5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in PBS. Nach 25 d Zellkultur konnte eine Proliferation und Differenzierung der Zellen festgestellt werden. 90 % Zellvitalität nach Applikation durch den Druckkopf ließen darauf schließen, dass die temperatur- und druckempfindlichen Zellen nur kurzfristig und im geringen Maße ungünstigen Bedingungen ausgesetzt wurden. Vor allem war die Denaturierung der Biomoleküle durch die kurzzeitige Hitzeeinwirkung ($< 250 \mu$ s) und die hohe Wärmekapazität von Luft vernachlässigbar. Eine Studie von Khan et al. belegt die

Anwendbarkeit des Ink-Jet-Verfahrens für die Applikation von Enzymen (horseradish peroxidase) und Proteinen (Fluorescein isothiocyanate-conjugate bovine albumin) ^[55]. Durch die Nutzung zweier Druckköpfe gelang es, zwei gegenläufige Gradienten aus Albuminlösung und Pufferlösung auf PCL-Scaffolds zu drucken, die als potentielle Wachstumskanäle für Zellen beim Tissue Engineering genutzt werden könnten. Durch die Physisorption der Proteine auf der Substratoberfläche blieben diese auch während der Einlagerung in Pufferlösung lokalisiert, was den Einsatz als Scaffold *in vitro* oder *in vivo* ermöglicht.

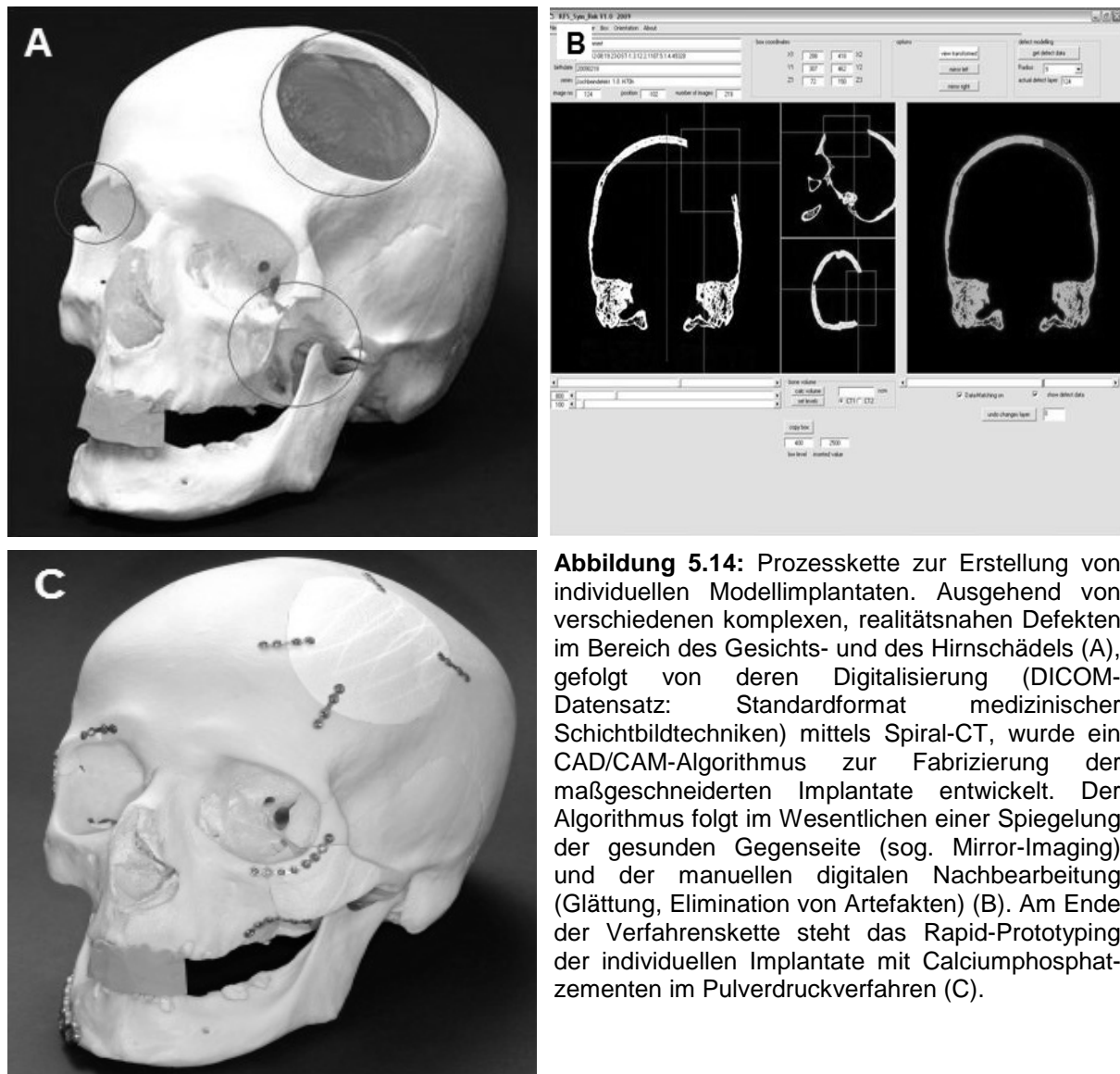
Die prinzipielle Durchführbarkeit des Ink-Jet-Verfahrens zur Wirkstoffapplikation konnte in dieser Arbeit am Beispiel des Modellwirkstoffs Vancomycin in einer Bruschitmatrix für die gesamte Prozesskette (Scaffoldherstellung bis hin zur Wirkstofffreisetzung) bewiesen werden. Problematisch zeigte sich dabei der stark saure pH-Wert der Abbindereaktion, der nur die erfolgreiche Applikation des säurestabilen Wirkstoffes Vancomycin ermöglichte, jedoch zu einer Denaturierung des Proteins führte. Die Verwendung der neutral abbindenden Magnesiumphosphatzemente sollte eine Erweiterung des Wirkungsspektrums auf proteinbasierte Faktoren (z.B. rhBMP-2 oder VEGF) ermöglichen. Des Weiteren ist die Verkapselung sensitiver Biomoleküle in biodegradierbare, polymere Mikro- bzw. Nanopartikel denkbar, um die Resistenz gegenüber prozessbedingten Einflüssen wie Temperaturerhöhung, das Wirken von Scherkräften oder Schwankungen des pH-Werts zu erhöhen. Die Druckbarkeit mikropartikulärer Suspensionen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Nachteilige Aspekte finden sich im Fall der Proteinmodifikation von Biomaterialien neben dem hohen Kostenfaktor sowohl in der aufwändigen Handhabung der Proteine als auch in den schwierigen Sterilisations- und Lagerbedingungen solcher biologisch modifizierter Materialien. Beispielsweise zeigten Ziegler et al. ^[126] durch das Studium des Freisetungsverhaltens verschiedener Wachstumsfaktoren (rhBMP-4, rh-bFGF, rh-VEGF) aus α -TCP-Keramiken, dass nach 3–5 d eine Degradation der Proteine eintrat. Eine alternative Möglichkeit zur Verbesserung der Implantatintegration und zur Steuerung von Gewebereaktionen bietet das Einbringen geringer Mengen bioaktiver, anorganischer Ionen, etwa Magnesium oder Zink, in das Implantat ^[135,150]. Mehrere Studien beschäftigten sich mit dem Mechanismus der biologischen Wirksamkeit von Metallionen und ihrem Einsatz in Biomaterialien ^[151,153-158,167]. Metallionen haben gegenüber organischen Molekülen den Vorteil einer praktisch unbeschränkten Haltbarkeit und einer problemlosen Sterilisierbarkeit. Sie sind zudem kostengünstig und einfach zu handhaben. In vorausgehenden Arbeiten konnte der Effekt von Kupferionen auf die Angiogenese in pulvergedruckten Bruschitstrukturen gezeigt werden ^[38]. Die Beladung mit Cu^{2+} erfolgte in diesen Studien durch nachträgliche Adsorption mit verschiedenen konzentrierter CuSO_4 -Lösung. Wie in der vorliegenden Arbeit anhand einer CuSO_4 -Lösung gezeigt werden konnte, sind metallionenhaltige Lösungen auch direkt in die Struktur eindruckbar. Zu klären bleibt allerdings die Frage, inwieweit sich der Kontakt der Metallionenlösung

während des Druckvorgangs und der Aushärtung mit den reaktiven Phosphatbestandteilen des Binders auswirkt. Neben der Bildung von schwerlöslichen Metallphosphaten ist auch ein direkter Einbau in das Bruschit- oder Struvitgitter denkbar; in beiden Fällen wäre nur mit einer langsamen und geringen Freisetzung der Ionen zu rechnen. Allerdings zeigten Vorversuche, dass biologische Reaktionen bereits in Konzentrationsbereichen $< 220 \text{ ng/Scaffold}$ möglich sind ^[306].

Herstellung anatomisch defektangepasster Implantate

Im Rahmen einer Pilotstudie mit der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Dr. Dr. U. Klammert) wurde eine Prozesskette zum Design und zur Fertigung größerer Modellimplantate entwickelt (Abbildung 5.14) ^[307]. Ausgehend von CT-Datensätzen eines humanen Schädels mit zuvor gesetzten realitätsnahen Knochendefekten (Abbildung 5.14A), wie sie beispielsweise nach Tumorresektion oder posttraumatisch auftreten, wurden im CAD-CAM-Verfahren individuelle, maßgeschneiderte Schädelimplantate basierend auf CaP-Zementchemie hergestellt. Als Defektregionen wurden die Schädelkalotte im Bereich des Osteporale, das Jochbein, der Orbitaring sowie der Kieferwinkel gewählt. Nach Datenakquisition mittels Spiral-CT wurden die DICOM-Daten zur Visualisierung zunächst in eine 3D-Matrix überführt. Nach Festlegung einer Symmetrie- bzw. Spiegelachse wurden die Schädeldefekte mit den analogen Strukturen der gesunden Gegenseite überlagert und somit ein virtueller Implantatkörper kreiert (Abbildung 5.14B). Derartige Verfahrensketten sind grundsätzlich in der Literatur als Mirror-Imaging-Procedure bekannt. Nach manueller Nachbearbeitung des virtuellen Implantatkörpers erfolgte die Umwandlung des Datensatzes von DICOM in das Rapid-Prototyping fähige STL/VRML-Format und schließlich der Druck der Implantate. Zur Veranschaulichung einer möglichen Wirkstoffmodifikation wurden die Implantatkörper nach entsprechender, softwaretechnischer Bearbeitung farblich ausgedruckt. Nach dem Druckvorgang und der Nachhärtung der Strukturen in Phosphorsäure wurden die Implantatkörper auf Passgenauigkeit anhand des Originalschädels überprüft. Kleinere Ungenauigkeiten im Submillimeterbereich wurden mit einer Knochenfräse korrigiert. Hierbei erwies sich das Material als sehr gut bearbeitbar. Schließlich wurden die Implantate in die Schädeldefekte eingebracht und mittels gängiger Osteosyntheseverfahren im Schädel fixiert (Abbildung 5.14C). Mit der beschriebenen Verfahrenskette ließen sich individuelle Implantate auch in komplexen knöchernen Defektregionen herstellen, welche sich durch eine hohe Passgenauigkeit und hervorragende Kontur auszeichneten. Dabei lassen sich potentiell die Vorteile einer präoperativen Herstellung (kurze OP-Zeiten, gute ästhetische Resultate) mit einer einfachen intraoperativen Nachbearbeitung (falls erforderlich) kombinieren. Sowohl die erreichte Präzision in Größe und Form der Implantate als auch physikalische Parameter (Festigkeiten und Wärmeleitfähigkeit) waren sehr vielversprechend, gerade auch im Hinblick auf die klinischen Anforderungen.

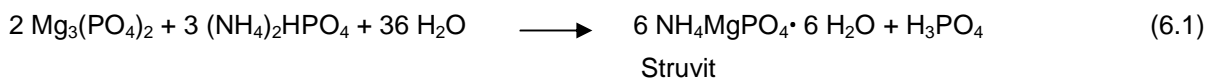


6 STRUKTURUNTERSUCHUNGEN AN BRUSCHIT- UND STRUVITMATRICES

Das biologische Verhalten von Scaffolds und ihre Eignung als Wirkstoffträger sind entscheidend von der chemischen Zusammensetzung und von verschiedenen physikalischen Parametern, wie Porosität und spezifischer oder aktiver Oberfläche, abhängig. Sowohl der Druckprozess als auch die Nachbehandlung pulvergedruckter Strukturen mit für das Materialsystem spezifischen Lösungen beeinflussen dabei die Materialeigenschaften. Die Abhängigkeiten der chemischen und physikalischen Materialeigenschaften von den verschiedenen Prozessparametern (Herstellung mittels 3DP, Nachhärtungsdauer) wurden in diesem Teil der Arbeit mit Hilfe von Rietveldanalyse, Heliumpyknometrie und μ -CT-Analyse untersucht.

6.1 Quantitative Phasenanalyse nach Rietveld

Tabelle 6.1 zeigt die Phasenzusammensetzung gedruckter MgP-Strukturen in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung. Der Druckprozess bewirkte lediglich eine 14 %ige Umsetzung von Farringtonit zu Struvit. Durch eine anschließende Nachhärtung der Strukturen konnte die Phasenumwandlung zu Struvit bereits nach 1 h um 32 % gesteigert werden (Gleichung 6.1).



Die Umsetzungsrate nahm dabei mit der Nachhärtungsdauer ab, wobei auch nach 24 h keine quantitative Phasenumwandlung erreicht werden konnte. Eine lineare Interpolation ergab für die Nachhärtungsdauer von 1 h bis 24 h eine Umsetzungsrate von ca. 0,4 % / h; so dass durch eine Extrapolation von einer 100 %igen Umsetzung zu Struvit nach 250 h auszugehen ist.

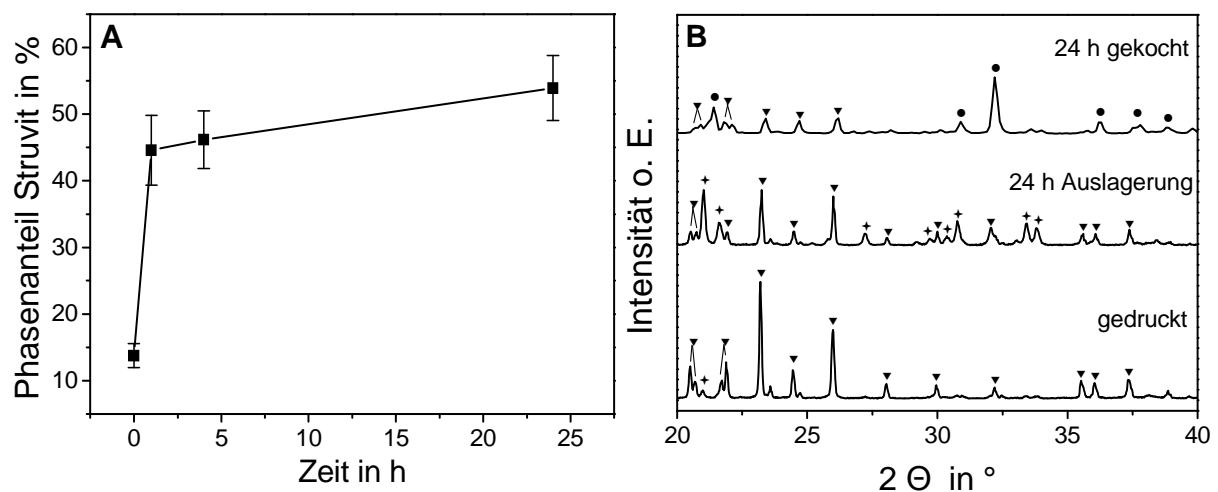
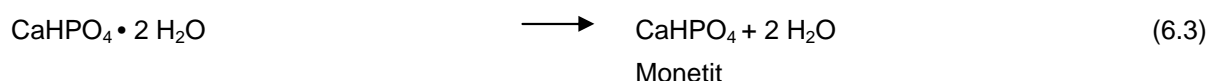
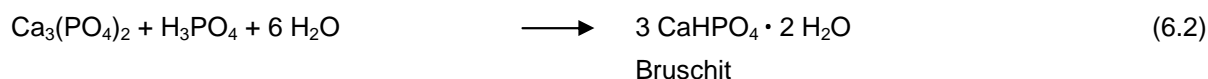


Abbildung 6.1: Phasenanteil von Struvit in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer gedruckter MgP-Strukturen (A) und Phasenzusammensetzung gedruckter MgP-Strukturen (B), direkt nach dem Druck, nach Auslagerung in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung für 24 h oder nach Kochen der Strukturen in 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung für 24 h. Phasen: \blacklozenge : Struvit, \blacktriangledown : Farringtonit und \bullet : Dittmarit.

Tabelle 6.1: Phasenzusammensetzung nach Rietveld von gedruckten Magnesiumphosphatstrukturen in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer und die hieraus berechnete Festkörperdichte.

Nachhärtungsdauer in h	0	1	4	24
Struvit in %	13,8	44,6	46,2	53,9
Farringtonit in %	86,2	55,4	53,8	46,1
rwp-Faktor in %	13,0	11,7	9,4	9,1
Festkörperdichte in g/cm ³	2,23	2,16	2,12	2,06

Das CaP-Pulver bestand zu 40,4 % aus α -TCP und zu 59,6 % aus β -TCP. Gemäß der Reaktionsgleichung 6.2 bindet TCP mit H_3PO_4 zu Bruschit ab. Unter Abspaltung des Kristallwassers entsteht aus Bruschit das Anhydrid Monetit (Gleichung 6.3).



Die gedruckten Strukturen stellten somit ein 4-Komponentensystem dar, an welchem im Zuge einer unzureichenden Anpassung der Messfiles an das Referenzdiffraktogramm keine Rietveldanalyse durchgeführt werden konnte. Stattdessen wurde eine semi-quantitative Phasenanalyse über den Vergleich ausgewählter Peakflächen durchgeführt. Hierfür wurden folgende phasenspezifische Peaks [h,k,l] ausgewählt: α -TCP: [0,2,10], $2\theta = 30,70 - 30,92^\circ$; β -TCP: [2,1,4], $2\theta = 27,66 - 28,08^\circ$; Bruschit: [1,2,-1], $2\theta = 20,74 - 21,22^\circ$; Monetit: [0,0,2], [-2,0,1], [2,0,0], $2\theta = 26,22 - 26,94^\circ$. Tabelle 6.2 gibt die Fläche der Peaks in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer wieder. Die Phasen α - und β -TCP wurden durch die Auslagerung in H_3PO_4 in Bruschit umgewandelt, weshalb sich die Peakflächen für TCP verkleinerten und für Bruschit erhöhten. Die Steigerung des Phasenanteils von Monetit resultierte aus der Dehydratisierung von Bruschit. Dies ist typischerweise mit einer Temperaturerhöhung $> 100^\circ C$ verbunden ^[308], kann aber auch durch eine Auslagerung im wässrigen Milieu ^[308] oder, wie in dieser Arbeit zu vermuten ist, durch einen niedrigen pH-Wert ^[309] induziert werden.

Tabelle 6.2: Semi-quantitative Phasenanalyse über einen Vergleich ausgewählter Peakflächen für unterschiedlich lange nachgehärtete Bruschitstrukturen.

Nachhärtungsdauer in sec	0	60	120	240
α -Tricalciumphosphat in Cps	44,5	44,8	36,3	33,8
β -Tricalciumphosphat in Cps	89,6	45,6	52,7	45,0
Bruschit in cps	64,9	153,8	149,8	146,9
Monetit in cps	102,0	161,1	190,8	206,4

6.2 Porosität der Matrices

Die Porosität der Matrices wurde durch Messung des Volumens und der Masse (Rohdichte) in Relation zur durch Pyknometrie bestimmten Feststoffdichte berechnet. Die Ergebnisse (Tabelle 6.4/6.5) zeigten eine Porosität von ca. 47 und 58 % für die

Matrices direkt nach dem Druck, die durch Nachbehandlung in Phosphorsäure bzw. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung abnahm und für Bruschitstrukturen einen Wert von 38 % nach 240 sec Ätzdauer und für Struvit einen Wert von 26 % nach 24 h Nachhärtung ergab. Die mit ansteigender Nachhärtungsdauer abnehmende Porosität der Strukturen war eine Konsequenz aus der Erhöhung der Umsetzungsrate. Unter Berücksichtigung der geringeren Dichte des Reaktionsprodukts Struvit (Tabelle 6.3) sank durch den Nachhärtungsprozess die Festkörperdichte der Scaffolds ab. Die mit steigender Nachhärtungsdauer zunehmende Festkörperdichte von CaP-Strukturen ließ sich aus dem wachsenden Phasenanteil von Monetit erklären. Die im Rahmen der Messungenauigkeit annähernd konstante Porosität der 1 – 24 h nachgehärteten MgP-Strukturen korrelierte mit der schwach linear ansteigenden Phasenumsetzung. Die Rohdichte nahm gleichzeitig aufgrund des durch die Nachhärtung steigenden Struvitanteils bzw. Bruschit- und Monetitanteils zu. Obwohl die Phasenumwandlung von TCP zu Bruschit und Monetit sowie von Farringtonit zu Struvit mit einer Abnahme der molaren Masse verbunden war, ergab sich aufgrund der molaren Umsetzung der Edukte (Gleichung 6.1-6.3, Tabelle 6.3) eine Zunahme der Masse um 40,4 % für Struvit, um 31,6 % für Monetit und um 66,4 % für Bruschit durch die Umsetzung mit Phosphat und durch die Einlagerung von Kristallwasser. Die beiden beschriebenen gegenläufigen Effekte waren für die Abnahme der Porosität verantwortlich.

Tabelle 6.3: Festkörperdichten und molare Massen der verschiedenen Calcium- und Magnesiumphosphatphasen ^[310].

Phase	Festkörperdichte in g/cm^3	Molare Masse in g/mol
Struvit	1,70	245,41
Farringtonit	2,76	262,11
Bruschit	2,26	172,09
Monetit	2,92	136,06
α -TCP	2,86	310,18
β -TCP	3,07	310,18

Tabelle 6.4: Rohdichte, pyknometrisch bestimmte Festkörperdichte und Porosität gedruckter Magnesiumphosphatstrukturen in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer. Die Standardabweichung der Festkörperdichte war vernachlässigbar; $< 0,003 \text{ g/cm}^3$.

Nachhärtungsdauer in h	0	1	4	24
Rohdichte in g/cm^3	$1,08 \pm 0,02$	$1,54 \pm 0,07$	$1,61 \pm 0,17$	$1,55 \pm 0,01$
Festkörperdichte in g/cm^3	2,58	2,18	2,20	2,08
Porosität in %	$58,14 \pm 0,78$	$29,36 \pm 3,23$	$26,82 \pm 7,72$	$25,48 \pm 0,48$

Tabelle 6.5: Rohdichte, pyknometrisch bestimmte Festkörperdichte und Porosität gedruckter Calciumphosphatstrukturen in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer. Die Standardabweichung der Festkörperdichte war vernachlässigbar; $< 0,001 \text{ g/cm}^3$.

Nachhärtungsdauer in sec	0	60	120	240
Rohdichte in g/cm^3	$1,33 \pm 0,08$	$1,49 \pm 0,18$	$1,60 \pm 0,11$	$1,71 \pm 0,08$
Festkörperdichte in g/cm^3	2,49	2,52	2,60	2,76
Porosität in %	$46,59 \pm 3,21$	$40,87 \pm 7,14$	$38,46 \pm 4,23$	$38,04 \pm 2,89$

6.3 Strukturuntersuchungen mittels μ -CT

Repräsentative μ -CT-Aufnahmen der Scaffolds aus Bruschit bzw. Struvit mit Makroporen im Größenbereich von $800\ \mu\text{m}$ – $2\ \text{mm}$ sind in Abbildung 6.2 wiedergegeben. In Abbildung 6.2E sind beispielhaft an einer in sagittaler Richtung aufgenommenen Struvitstruktur die einzelnen $125\ \mu\text{m}$ breiten Schichten zu erkennen. Während sich die Makroporen durch die Nachhärtung der Struvitstrukturen verkleinerten und die äußeren Abmessungen der Strukturen sich nur marginal unterschieden (Abbildung 6.2C/D), zeigten 4 min geätzte Bruschitstrukturen eine deutliche Vergrößerung des Porendurchmessers sowie eine Abnahme der äußeren Probenabmessungen (Abbildung 6.2A/B). Die Riefenstrukturen in der Transversalebene waren eine Folge des Binderauftrags via Druckkopf.

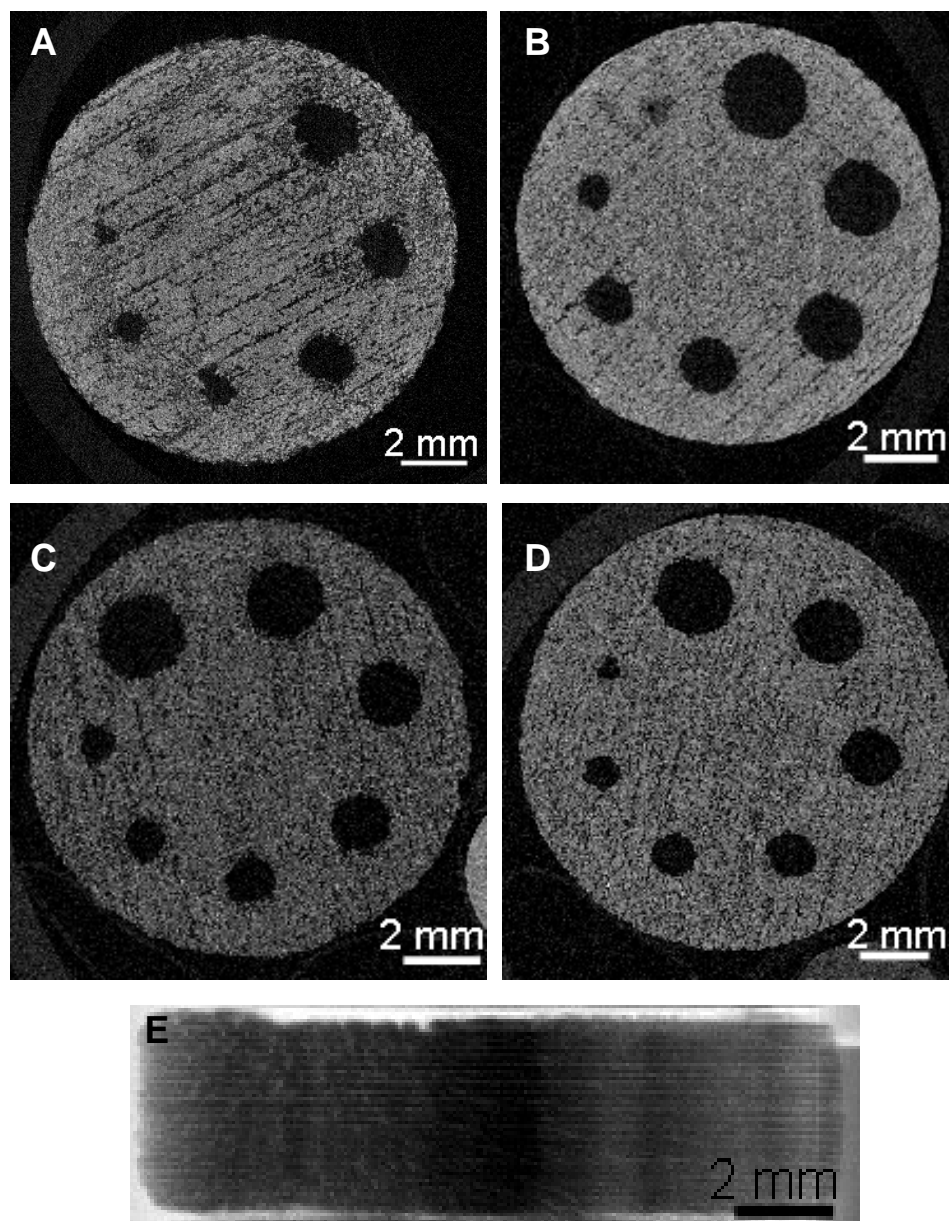


Abbildung 6.2: μ -CT-Aufnahme der gedruckten, mit Makroporen ($d = 0,8 - 2,0\ \text{mm}$) ausgestatteten Strukturen. (A): Bruschit unbehandelt, (B): Bruschit 4 min in einer 20%igen H_3PO_4 -Lösung nachgehärtet, (C): Struvit unbehandelt, (D): Struvit 24 h in einer 3,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung nachgehärtet. Aufnahme einer Struvitstruktur in sagittaler Richtung (E).

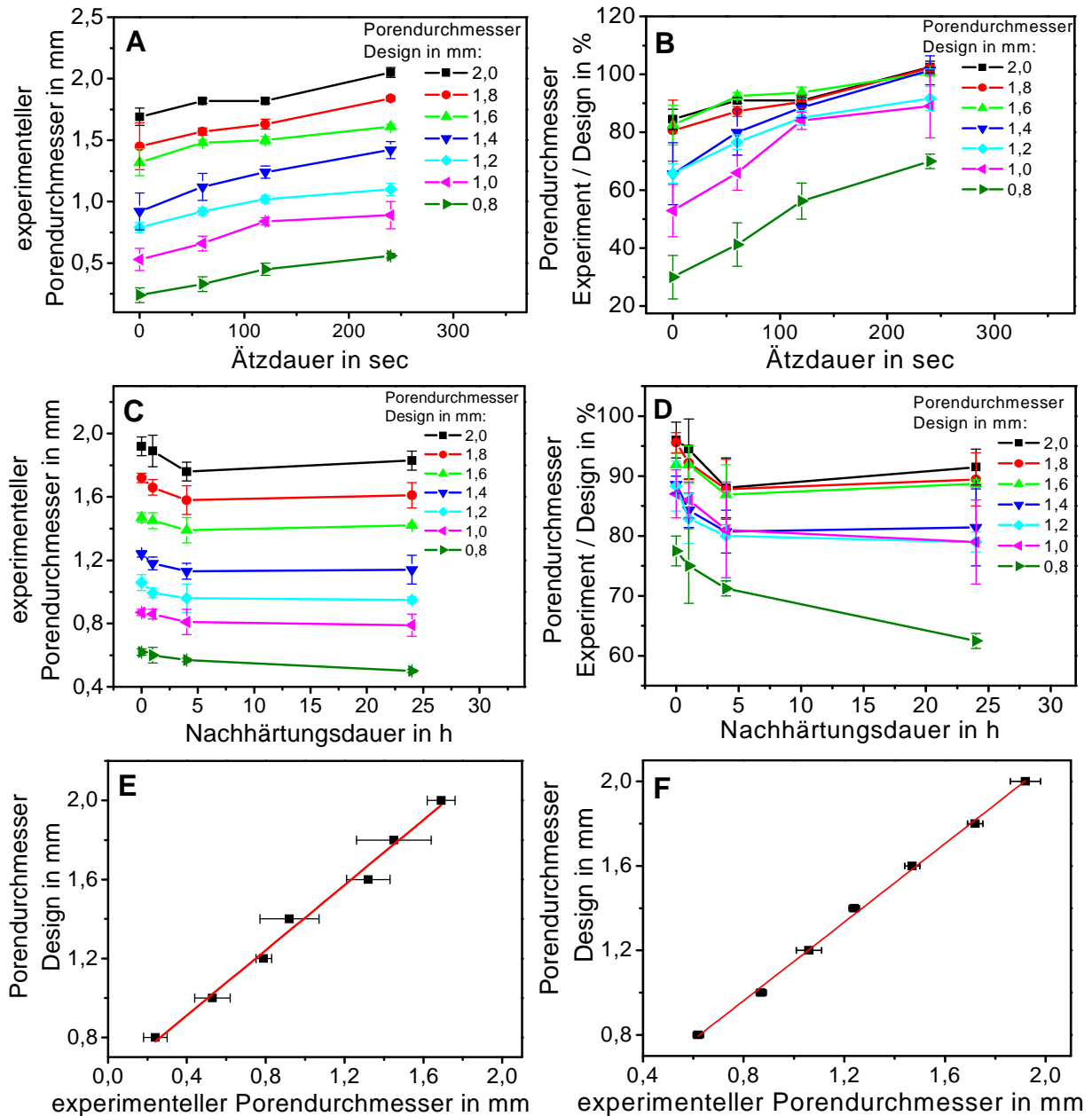


Abbildung 6.3: Zusammenhang zwischen der Nachhärtungsdauer makroporöser Strukturen und den Strukturabmessungen von Bruschit (A/B) und Struvit (C/D). Der Nachhärtungsprozess von Bruschit führte zu einer Vergrößerung der Makroporendurchmesser (A), so dass es mit steigender Ätzdauer zu einem Angleich der designten und der experimentell darstellbaren Porendurchmesser kam (B). Die Nachhärtung von Struvit führte zu einer Verkleinerung der Makroporendurchmesser aufgrund von Präzipitationsprozessen (C), infolgedessen stieg die Abweichung der experimentell darstellbaren Porendurchmesser zu den designten Porendurchmessern (D). Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen dem Porendurchmesser der Designvorlage und dem experimentell darstellbaren Porendurchmesser für Bruschit (E) und Struvit (F); hierbei wurde über die gesamte Nachhärtungsdauer gemittelt.

Der Zusammenhang zwischen Nachhärtungsdauer und der Strukturabmessung ist in Abbildung 6.3 dargestellt. Die Nachhärtung der CaP-Strukturen in Säure führte zu einem Materialabtrag von (651 ± 166) nm/sec unabhängig vom Porendurchmesser (Abbildung 6.3A). Da, wie bereits in 4.2.1. diskutiert, die prozentuale Abweichung der experimentell darstellbaren Poren mit deren Durchmesser abnahm, wurde durch die Ätzung die designte Abmessung der Poren schneller für größere Poren erreicht

(Abbildung 6.3B). Für die geometrisch exakte Umsetzung einer designten Struktur mittels des 3DP ist neben dem Herstellungsprozess und dem materialbedingten Auflösungsvermögen gegebenenfalls die Ätzrate zu berücksichtigen. In Anlehnung an Gleichung 4.12 beschreibt Gleichung 6.4 für das Materialsystem Calciumphosphat die Korrelation zwischen designtem und experimentell darstellbarem Porendurchmesser unter Einbezug der Ätzrate (Abbildung 6.3E). Für die Designvorlage einer gewünschten Porengröße gilt somit:

$$d_d (\text{Bruschit}) = (0,582 + 0,825 \cdot d_e) + 2a \cdot t_n \quad (6.4)$$

d_d = Porendurchmesser Design (in mm)
 d_e = Porendurchmesser Experiment (in mm)
 a = Ätzrate = $0,651 \cdot 10^{-3}$ (in mm/sec)
 t_n = Nachhärtungsdauer (sec)

Während die Poren einer Struktur durch die materielle Umsetzung mittels 3DP einen kleineren Durchmesser als die Designvorlage aufwiesen, kam es durch Diffusion des Binders zu einer Vergrößerung der äußeren Strukturabmessungen um ca. 4 %. Für die Herstellung eines passgenauen Implantats muss die Zunahme der Strukturabmessung entweder im Design berücksichtigt werden oder es erfolgt eine Korrektur der geometrischen Abmessungen über eine entsprechende Ätzdauer. Aus Gleichung 6.5 lässt sich unter Berücksichtigung der Ätzdauer die laterale Abmessung x_e einer gedruckten Struktur bestimmen:

$$x_e (\text{Bruschit}) = 1,04 \cdot x_d - a \cdot t_n \quad (6.5)$$

x_e = experimentelle laterale Abmessung (in mm)
 x_d = laterale Abmessung Design (in mm)
 a = Ätzrate = $0,651 \cdot 10^{-3}$ (in mm/sec)
 t_n = Nachhärtungsdauer (in sec)

Die Ätzdauer t_k , die die Abmessung einer gedruckten Struktur um 4 % korrigiert, kann mit folgender Gleichung ermittelt werden:

$$t_k = \frac{0,04 \cdot x_d}{a} \quad (6.6)$$

t_k = Nachhärtungsdauer für 4 %igen Flächenabtrag (in sec)
 x_d = laterale Abmessung Design (in mm)
 a = Ätzrate = $0,651 \cdot 10^{-3}$ (in mm/sec)

Die Nachhärtung von MgP-Strukturen in $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ bewirkte innerhalb der ersten 4 h eine Abscheidung von Struvit an die Strukturoberfläche, infolgedessen kam es zu einem Anwachsen der makroskopischen Abmessungen bzw. zu einer Verringerung der Porendurchmesser (Abbildung 6.3 C). Die Abscheidungsrate betrug für die Nachhärtungsdauer $t_n < 4$ h (12 ± 5) $\mu\text{m}/\text{h}$ und ging für $4 \text{ h} < t_n < 24$ h gegen 0. Des Weiteren bewirkte der Druckprozess für das MgP-Materialsystem eine Zunahme der lateralen Abmessung von ca. 2,6 %. Die Passgenauigkeit von Implantatstrukturen wird erreicht, indem die Abweichung der geometrischen Abmessungen durch den

Herstellungsprozess (Abbildung 6.3D) im Design berücksichtigt wird. Die Porengröße einer Designvorlage kann über folgende Gleichungen ermittelt werden:

$$d_d(\text{Struvit}) = (0,218 + 0,930 \cdot d_e) - 2b \cdot t_n \quad \text{für } t_n < 4 \text{ h} \quad (6.7)$$

$$d_d(\text{Struvit}) = (0,218 + 0,930 \cdot d_e) - 0,096 \quad \text{für } 4 \text{ h} < t_n < 24 \text{ h} \quad (6.8)$$

x_e = experimentelle laterale Abmessung (in mm)

x_d = laterale Abmessung Design (in mm)

b = Abscheidungsrate = $12 \cdot 10^{-3}$ (in mm/h)

t_n = Nachhärtungsdauer (in h)

Unter Berücksichtigung der Strukturgenauigkeit durch die Umsetzung mittels des 3DP und der Abscheidungsrate durch den Nachhärtungsprozess ergibt sich analog Abbildung 6.3F folgender Zusammenhang zwischen der lateralen Abmessung der Designvorlage x_d und der gedruckten Struktur x_e :

$$x_e(\text{Struvit}) = 1,026 \cdot x_d + b \cdot t_n \quad \text{für } t_n < 4 \text{ h} \quad (6.9)$$

$$x_e(\text{Struvit}) = 1,026 \cdot x_d + 0,048 \quad \text{für } 4 \text{ h} < t_n < 24 \text{ h} \quad (6.10)$$

Eine quantitative Auswertung der μ -CT-Aufnahmen bezüglich der Porosität und der spezifischen sowie der aktiven Oberfläche der Strukturen ist in Abbildung 6.4 wiedergegeben. Aufgrund der maximalen Auflösung der Methode von ca. 5 μm wurden Poren mit kleinerem Durchmesser nicht durch die μ -CT-Analyse erfasst. Die dargestellten Porositäten, sowie die spezifische und aktive Oberfläche gedruckter Bruschit- (Abbildung 6.4A/C/E) und Struvitstrukturen (Abbildung 6.4B/D/F) fielen deshalb geringer aus, konnten aber zu einer relativen Analyse herangezogen werden. Es zeigte sich, dass der Nachhärtungsprozess für beide Materialsysteme, im Rahmen der Messungenauigkeit, unabhängig von der Nachhärtungsdauer zu einer Reduktion der Porosität und der spezifischen und aktiven Oberfläche führte. Die Nachhärtung von Struvitstrukturen bewirkte im Vergleich zu den unbehandelten Proben eine relative Porositätsabnahme um $(46,1 \pm 6,2) \%$ und eine relative Abnahme der spezifischen Oberfläche um $(56,1 \pm 3,2) \%$ bzw. der aktiven Oberfläche um $(47,6 \pm 2,8) \%$. Die geätzten Bruschitstrukturen wiesen eine relative Porositätsabnahme um $(52,8 \pm 3,9) \%$, eine relative Abnahme der spezifischen Oberfläche um $(45,7 \pm 10,6) \%$ und der aktiven Oberfläche um $(44,4 \pm 1,6) \%$ auf. Ein Vergleich der beiden Materialsysteme ergab für ungehärtete Strukturen eine um 51,4 % geringere Porosität, eine um 50,9 % geringere spezifische Oberfläche und eine um 56,6 % geringere aktive Oberfläche für Bruschit.

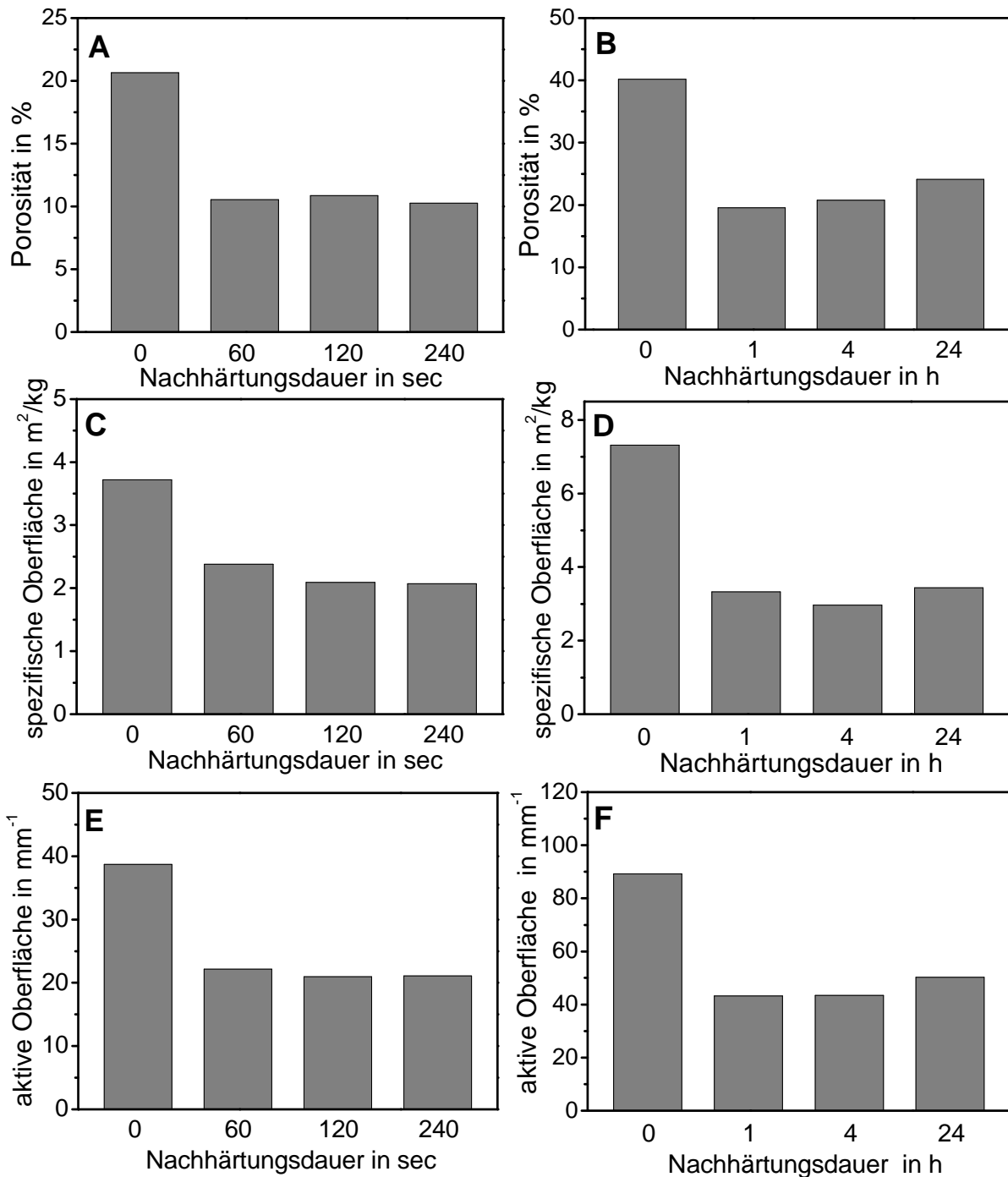


Abbildung 6.4: Bestimmung verschiedener physikalischer Parameter gedruckter Brushit- (A/C/D) und Struvitstrukturen (B/D/F) mittels μ -CT-Analyse in Abhängigkeit von der Nachhärtungsdauer in H_3PO_4 für Brushit bzw. $(NH_4)_2HPO_4$ für Struvit. A/B: Porosität, C/D: spezifische Oberfläche, E/F: aktive Oberfläche.

Die aktive Oberfläche wurde durch die Division der gesamten Probenoberfläche (inkl. Porenstruktur) durch das Probenvolumen berechnet. Sie stellt ein Maß für diejenige Oberfläche dar, welche aufgrund der offenporigen Struktur für das Umgebungsmedium zugänglich ist und somit aktiv beispielsweise mit Zellen interagieren kann. Die Abnahme der spezifischen und der aktiven Oberfläche in Folge des Nachhärtungsprozesses resultierte aus der Abnahme der Porosität. Ein Vergleich der mittels μ -CT und mittels Pycnometrie bestimmten Porositäten gab

einen groben Einblick in die Porengrößenverteilung der Strukturen. Da Poren mit einem Durchmesser $< 5 \mu\text{m}$ mittels $\mu\text{-CT}$ nicht mehr aufgelöst werden konnten, ergab die Differenz der beiden Porositäten den Anteil der Poren unterhalb der Auflösungsgrenze des $\mu\text{-CT}$. Der Anteil an Poren mit Durchmessern $< 5 \mu\text{m}$ belief sich für nicht nachbehandelte Struvitstrukturen auf 17 % und für ungeätzte CaP-Strukturen auf 26 %. Nachgehärtete Strukturen der Phase Struvit wiesen entsprechend der Nachhärtungsdauer 10 % (1 h), 6 % (2 h), 1 % (24 h) Poren im Bereich $< 5 \mu\text{m}$ auf; für Strukturen der Phase Brushit ergab sich mit 30 % (60 sec) und 28 % (120 sec bzw. 240 sec) ein höherer Anteil an Poren in diesem Bereich. Schlußfolgernd kann gesagt werden, dass es für MgP-Strukturen infolge der Phasenumwandlung zu einer Änderung der Porengrößenverteilung kam, wobei mit Erhöhung der Nachhärtungsdauer vornehmlich kleine Poren verschlossen wurden. Der Ätzprozess der Brushitstrukturen verursachte eine Zunahme der Porosität im Porengrößenbereich $< 5 \mu\text{m}$, was auch eine über die $\mu\text{-CT}$ -Analyse nicht feststellbare Vergrößerung der spezifischen und aktiven Oberfläche zur Folge haben sollte.

6.4 Diskussion

Der optimale Scaffold für das Knochen-Tissue-Engineering bietet nicht nur das strukturelle Fundament für das Wachstum neuen Gewebes, sondern wirkt osteokonduktiv und fördert die Angiogenese. Um Knochengewebe erfolgreich zu ersetzen, ist es nötig, dieses in chemischer, mechanischer und struktureller Weise nachzubilden. Die Biokompatibilität von CaP und MgP wurde dabei in verschiedenen Studien belegt ^[311,312]. Im Gegensatz zu Polymeren und Metallen binden CaP spontan an vitales Knochengewebe und wirken somit osteokonduktiv ^[75,212,213,311]. Bekannt ist, dass die Freisetzung von Magnesiumionen *in vivo* die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität erhöht ^[239,313], weshalb ebenfalls von einer osteokonduktiven Wirkung MgP-basierter Knochenersatzwerkstoffe auszugehen ist. In klinischen Studien wurden bislang lediglich kompositäre CaP/MgP-Knochenersatzwerkstoffe untersucht. Dabei erwiesen sich diese als osteogen ^[236,237].

Von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Zellbesiedelung, Gewebseinsprossung und Vaskularisierung eines Scaffolds ist dessen poröse Struktur ^[82,83]. In Anlehnung an das poröse Gefüge von natürlichem Knochen sollten Knochenersatzwerkstoffe eine hohe Porosität von 40 – 60 % und ein interkonnektierendes Porengerüst mit Porendurchmessern von 50 – 1000 μm , sowie eine bimodale Porengrößenverteilung aufweisen ^[75,92]. Dies ermöglicht den für eine Nährstoffversorgung nötigen Flüssigkeitstransport und dient dem Abtransport von Abbauprodukten, was eine Voraussetzung für das Zellwachstum und die Mineralisation der Matrix ist.

Experimentell konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass mit Hilfe des 3DP Makroporen $> 200 \mu\text{m}$ darstellbar sind, was ein gezieltes, strukturell induziertes Zellwachstum ermöglichen sollte. Die Zementmatrices wiesen ein

interkonnektierendes mikroporöses Gefüge auf. Dabei wurde für beide Materialssysteme ein durch den Nachhärtungsprozess erfolgender Abfall der Porosität und damit verbunden der aktiven und spezifischen Oberfläche von mind. 50 % festgestellt. Durch das Zusammenwirken der Strukturmorphologie und der über den Herstellungsprozess darstellbaren Makroporosität kann der gesamte osteogenetisch wirkende Porengrößenbereich abgedeckt werden. Mikroporen < 10 µm dienen vor allem der Vergrößerung der spezifischen und aktiven Oberfläche, was maßgeblich die Aufnahmekapazität von Knochenmorphogenen erhöht, und den Ionenaustausch für die Ausbildung einer knochenähnlichen Apatitschicht ermöglicht^[84]. Eine gerichtete Strukturierung in diesem Größenbereich ist somit irrelevant. Mit einer Porosität von 38 – 47 % für CaP und 26 – 58 % für MgP-Strukturen wiesen die Implantate eine ähnliche Porosität wie Knochen (35 – 60 %) auf. Die Porosität könnte über das Probedesign oder durch Modifikation des Rohpulvers mit löslichen Salzen, jedoch unter Verringerung der Strukturfestigkeit, gesteigert werden. Die osteokonduktive Wirkung von als Zement verarbeiteten keramischer Scaffolds konnte in mehreren Studien belegt werden^[314-316]. Da Zementstrukturen eine geringere Porosität als gedruckte und nachgehärtete Strukturen aufweisen^[317], kann darauf geschlossen werden, dass das poröse Gefüge gedruckter Strukturen ebenfalls die Osteointegration gewährleistet. Daneben gilt die Porengröße auch als Schlüsselfaktor der Wirkstoffadsorption in porösen Materialien. Hierbei sollte die Porengröße den Durchmesser des hydratisierten Wirkstoffs übersteigen, um die Porendiffusion zu ermöglichen. Da die Porengrößen im Bereich von 0,1 – 80 µm^[257], die Molekülgrößen möglicher Wirkstoffen aber im nm-Bereich liegen, stellen die pulvergedruckten Matrices, wie auch in vorangegangenen Freisetzungstudien an Vancomycin gezeigt werden konnte^[15,292], ein geeignetes Freisetzungssystem dar.

Die Untersuchung der Scaffoldstruktur erfolgte in dieser Arbeit – neben gängigen Methoden wie Röntgendiffraktometrie oder Heliumpyknometrie – auch durch µ-CT-Analyse. Diese wird – bedingt durch eine steigende Leistungsfähigkeit der Bildakquisition und Datenverarbeitung (höhere Auflösung) – zunehmend zur Untersuchung an Knochenstrukturen oder Scaffolds *in vitro*^[318-320] und *in vivo*^[319,321,322] herangezogen. Primäres Ziel ist hierbei die Bestimmung der Degradation des Scaffolds^[323] und seines knöchernen Umbaus ohne Sakrifizierung der Versuchstiere^[324]. Ein schnelles Knochenremodelling ergibt sich durch eine der natürlichen Knochenaufbaugeschwindigkeit entsprechende Degradationrate des Scaffolds. Dabei kann der Abbau von Knochenersatzwerkstoffen aktiv durch eine osteoklastäre Resorption^[325] und passiv aufgrund der chemischen Löslichkeit im wässrigen Milieu erfolgen. Während Hydroxylapatit nur durch Osteoklasten über einen langen Zeitraum hinweg von der Oberfläche her resorbiert wird, weisen Bruschit, Monetit und Struvit infolge ihrer hohen Löslichkeit (Bruschit: 83,33 mg/l, Monetit: 48,28 mg/l, Struvit: 14,63 mg/l) sehr gute Resorptionseigenschaften auf. Klammert et al.^[326] untersuchten in einer *in vivo* Studie das chemische Degradationsverhalten verschiedener phosphatbasierter Zementstrukturen im heterotopen Implantatlager der Ratte. Dabei zeigte sich, dass die Degradation der

Matrices entscheidend von ihrer Phasenzusammensetzung abhing und es *in vivo* zu einer Phasenumwandlung und Änderung der mikrokristallinen Struktur durch Repräzipitationsprozesse kam. Nach 15 Monaten wurde für HA-Strukturen (Abbildung 6.5A/B) auf Basis von μ -CT-Aufnahmen eine marginale Oberflächenresorption festgestellt. Die Phase Brushit wurde unter Repräzipitation von Whitlockit und Octacalciumphosphat vollständig aufgelöst (Abbildung 6.5C/D). MgP-Strukturen, die anfänglich aus einer Mischung aus Struvit und Farringtonit bestanden, zeigten eine vollständige Auflösung und eine Phasenumwandlung von Struvit zu Whitlockit unter Erhalt des Farringtonitanteils. Infolge eines Anstiegs der aktiven Oberfläche wiesen Struvitstrukturen die stärkste Resorption auf (Abbildung 6.5E/F). Diese Ergebnisse zeigen sich konsistent mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten der aktiven Oberfläche, wobei Struvitstrukturen im Vergleich zu Brushit eine doppelt so große spezifische bzw. aktive Oberfläche aufwiesen und somit einer schnelleren Degradation unterworfen waren.

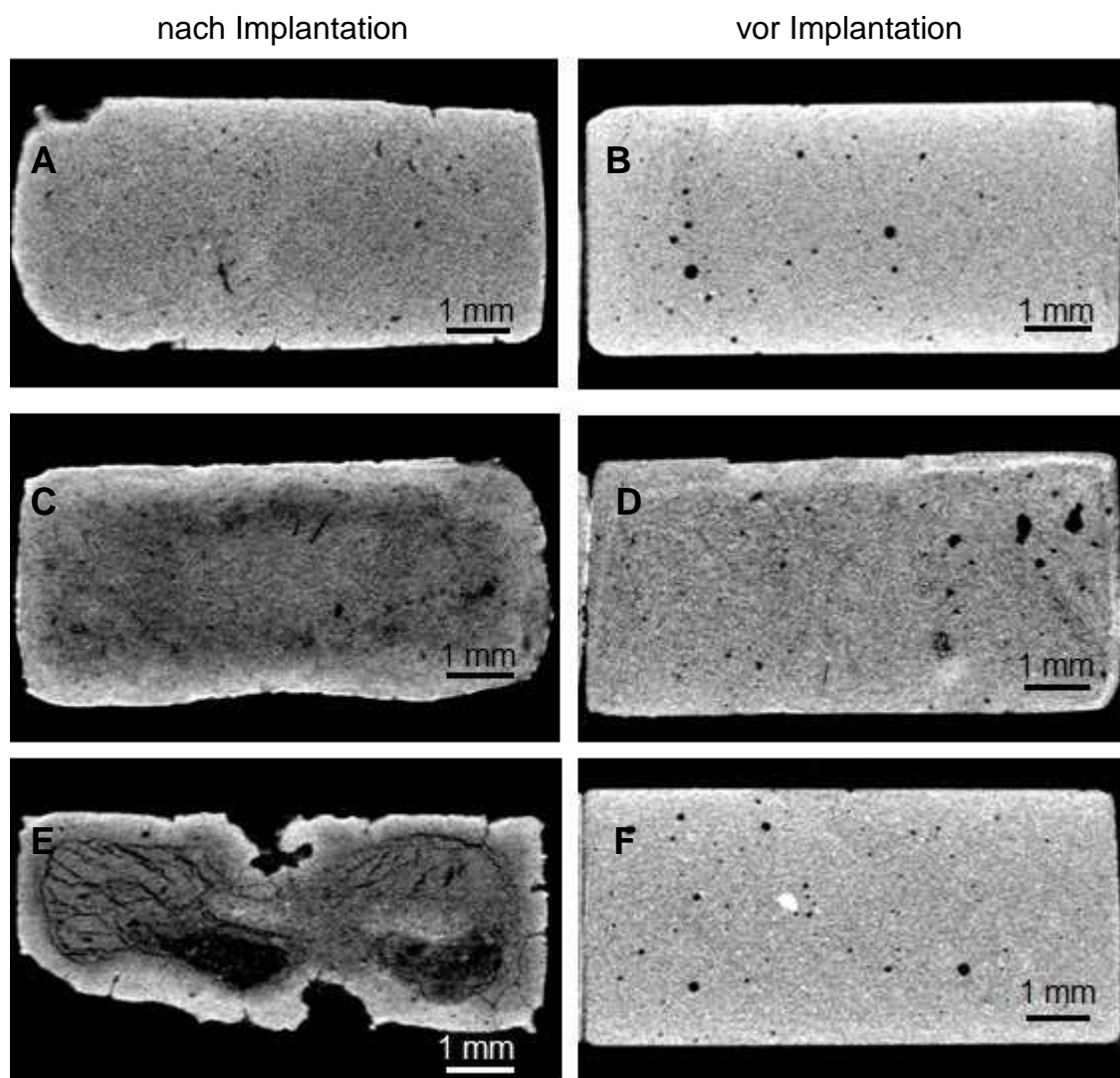


Abbildung 6.5: μ -CT-Aufnahmen von HA- (A/B), Brushit- (C/D) und Struvitstrukturen (E/F) nach 15 monatiger Liegedauer im heterotopen Implantatlager der Ratte (A/C/E) bzw. Kontrollstrukturen (B/D/F) [326].

Für den medizinischen Einsatz gedruckter Implantate ist die Sterilisierbarkeit der Strukturen von entscheidender Bedeutung. Vor der Herstellung können Mikroorganismen durch Heißluft- oder Dampfdrucksterilisation des Rohpulvers abgetötet werden. Da die Erhitzung der gedruckten Strukturen zu einer Phasenumwandlung oder einer möglichen Inaktivierung von eingebrachten Wirkstoffen führen würde, können diese nur chemisch (Nassantiseptik: beispielsweise mit Ethanol, Trockenantiseptik: beispielsweise mit Ethylenoxid, Ozon) oder mittels ionisierender Strahlung (UV-, Röntgen-, γ -Strahlung, Elektronenbeschuss) sterilisiert werden. Für unmodifizierte CaP-Strukturen wurde erfolgreich eine Sterilisation durch Auslagerung der Proben in Ethanol durchgeführt, ohne eine Änderung der Phasenzusammensetzung zu bewirken ^[16]. Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit der Sterilisation der Scaffolds mittels γ -Strahlung. Diese sollte vor allem für wirkstoffmodifizierte Strukturen geeignet sein, da es weder zur Ausschwemmung des Wirkstoffs durch Lagerung in einer Flüssigkeit, noch zur Inaktivierung der Wirkstoffe durch Hitzeeinwirkung kommt.

7 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit wurden grundlegende Prozessschritte des 3D-Pulverdrucks zur Erstellung individuell formbarer Strukturen auf Basis mineralischer Knochenzemente mit simultaner, lokaler Wirkstoffmodifikation etabliert. Mit dem Verfahren ist es möglich, individuelle Implantate auch für komplexe knöcherne Defektregionen herzustellen, welche sich durch eine hohe Passgenauigkeit und anspruchsvolle Kontur auszeichnen. Dabei lassen sich potentiell die Vorteile einer präoperativen Herstellung (kurze OP-Zeiten, gute ästhetische Resultate) mit einer einfachen intraoperativen Nachbearbeitung kombinieren. Sowohl die erreichte Präzision in Größe und Form der Implantate, als auch die physikalischen Parameter (Festigkeiten und Wärmeleitfähigkeit) waren sehr vielversprechend im Hinblick auf die klinischen Anforderungen. Der Einsatz eines Mehrfarbendruckers ermöglicht durch die während des Druckprozesses simultan erfolgende Modifikation des Implantats mit geeigneten Wirkstoffen (beispielsweise Antibiotika oder Wachstumsfaktoren) eine Nutzung des Werkstoffs als lokales Freisetzungssystem etwa zur Induktion biologischer Prozesse oder zur Prävention von Infektionen.

Nachteilige Aspekte finden sich im Fall der Proteinmodifikation von Biomaterialien, neben dem hohen Kostenfaktor, sowohl in der aufwändigen Handhabung der Proteine als auch in den schwierigen Sterilisations- und Lagerbedingungen solcher biologisch modifizierter Materialien. Eine alternative Möglichkeit zur Verbesserung der Implantatintegration und zur Steuerung von Gewebereaktionen bietet das Einbringen geringer Mengen bioaktiver, anorganischer Ionen. Metallionen haben gegenüber organischen Molekülen den Vorteil einer praktisch unbeschränkten Haltbarkeit und einer einfachen Handhabbarkeit, sowie einer problemlosen Sterilisierbarkeit. Wie in der vorliegenden Arbeit anhand einer CuSO_4 -Lösung gezeigt werden konnte, sind metallionenhaltige Lösungen auch direkt in die Struktur eindruckbar. Zu klären bleibt allerdings die Frage, inwieweit sich der Kontakt der Metallionenlösung während des Druckvorgangs mit den reaktiven Phosphatbestandteilen des Binders auf deren Freisetzungverhalten auswirkt. Ein weiteres, potentielles Anwendungsgebiet der über den 3DP hergestellten Strukturen liegt in der Biotechnologie. So könnten individuell designte und pulvergedruckte Strukturen als Trägersubstrate in Bioreaktoren dienen. Neben der nachträglichen Adsorption von Mikroorganismen könnten diese aufgrund der neutralen Abbindereaktion der Materialien eventuell auch direkt während der Abbindereaktion im mikroporösen Zementgefüge immobilisiert werden.

Weiterführend wäre für den klinischen Einsatz als Implantat die Modifikation mit biodegradierbaren Kurzfasern zur Steigerung der Festigkeit denkbar. Hierfür geeignet wären Fasern aus Polymer, Metall, Keramik oder Glas, die je nach Einsatzgebiet entsprechende chemische (chemische Resistenzen, Abbaubarkeit) oder physikalische Eigenschaften (Festigkeiten) aufweisen sollten. Mögliche biokompatible Fasern stellen etwa HA/TCP-Whisker oder degradierbare Polymere

aus PLGA dar. Des Weiteren wäre eine Faserverstärkung der Pulver im 3DP auch für die Verwertung in technischen Applikationen interessant. Bei den kommerziell für den 3DP verwendeten Materialien handelt es sich zumeist um polymermodifizierte Gipspulver, die nach dem Druckvorgang primär noch sehr labil sind und gerade bei größeren Bauteilen leicht zur Fragmentierung neigen. Eine Endfestigkeit wird hier erst nach Polymermodifikation erreicht. Wenn durch Zusatz von Kurzfasern zum Pulver eine signifikante Steigerung der Primärfestigkeit erreicht werden könnte, dann hätte dies ein hohes Potential, um die Prozesssicherheit des 3DP für technische Anwendungen zu erhöhen.

Neben dem Einsatz als patientenspezifisches Knochenimplantat mit Wirkstofffreisetzung wären magnesiumhaltige Zemente aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften für weitere alternative Anwendungen prädestiniert. Denkbar wären etwa individuelle und hochfeste Gussformen aus Magnesiumphosphat, die durch den 3DP erstellt werden könnten, so dass die Prozesskette um den sonst notwendigen Schritt der Positivherstellung des Gussobjekts verkürzt werden könnte.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Felsenberg D. Struktur und Funktion des Knochens. *Pharm. Unserer Zeit* 2001; 30 (6): 488 – 493.
- [2] Aaboe M, Pinholt EM, Hjortinghansen E. Healing of experimentally created defects - a review. *Brit. J. Oral Max. Surg.* 1995; 33 (5): 312 – 318.
- [3] Bongio M, van den Beucken JJJP, Leeuwenburgh SCG, Jansen JA. Development of bone substitute materials: from biocompatible to instructive. *J. Mater. Chem.* 2010; 20 (40), 8747 – 8759.
- [4] Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J. Bone Joint Surg. Br.* 2001; 83B (1): 3 – 8.
- [5] Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement - a materials science perspective. *Biomaterials* 1998; 19 (18): 1621 – 1639.
- [6] Rosen HM, Ackermann JL. Porous block hydroxyapatite in orthognathic surgery. *Angle Orthod.* 1991; 61 (3): 185 – 191.
- [7] Demiralp B, Keceli HG, Muhtarogullari M, Serper A, Eratalay K. Treatment of periapical inflammatory lesion with the combination of platelet-rich plasma and tricalcium phosphate: A case report. *J. Endodont.* 2004; 30 (11): 796 – 800.
- [8] Ramshaw JAM, Werkmeister JA, Peters DE. Collagen as a biomaterial, Current perspectives on implantable devices, 2. Williams DF (ed.), Jai Press Ltd., London 1990; 151 – 220.
- [9] Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 1992; 3 (6): 432 – 446.
- [10] Butcher A, Bohner M, Hoffmann S, Gauckler L., Müller R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three dimensional printing. *Acta Biomater.* 2011; 7 (3): 907 – 920.
- [11] Gebhardt A. Rapid Prototyping - Werkzeuge für die schnelle Produktentstehung. Hanser, München - Wien 2000.
- [12] Vail NK, Swain LD, Fox WC, Aufdemorte TB, Lee G, Barlow JW. Materials for biomedical applications. *Materials and Design* 1999; 20 (2 – 3): 123 – 132.
- [13] Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C. Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2005; 74 (2): 782 – 788.
- [14] Khalyfa A, Vogt S, Weisser J, Grimm G, Rechtenbach A, Meyer W, Schnabelrauch M. Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2007; 18 (5): 909 – 916.
- [15] Gbureck U, Vorndran E, Müller FA, Barralet JE. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J. Controlled Release* 2007; 122 (2): 173 – 180.
- [16] Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzler K, Müller FA, Barralet JE. Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes made by 3D powder printing. *Adv. Funct. Mater.* 2007; 17 (18): 3940 – 3945.
- [17] Yang SF, Leong KF, Du ZH, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering Part II. Rapid prototyping techniques. *Tissue Eng.* 2002; 8 (1): 1 – 11.
- [18] Choi JW, Wicker R, Lee SH, Choi KH, Ha CS, Chung I. Fabrication of 3D biocompatible /biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithographie. *J. Mater. Process. Technol.* 2009, 209 (15-16): 5494 – 503.
- [19] Heule M, Vuillemin S, Gauckler LJ. Powder-based ceramic meso- and microscale fabrication processes. *Adv. Mater.* 2003; 15 (15): 1237 – 1245.
- [20] Gebhardt A. Generative Fertigungsverfahren: Rapid Prototyping - Rapid Tooling - Rapid Manufacturing. Carl Hanser Verlag GmbH & CO. KG, 2007.

- [21] Vail NK, Beaman JJ, Bourell DL, Marcus HL, Barlow JW. Development of a poly(methyl methacrylate-co-n-butyl methacrylate) copolymer binder system. *J. Appl. Polym. Sci.* 1994; 52 (6): 789 – 812.
- [22] Leong KF, Cheah CM, Chua CK. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 2003; 24 (13): 2363 – 2378.
- [23] Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23 (4): 1169 – 1185.
- [24] Samar JK, Bose S, Hosick HL, Bandyopadhyay A. Development of controlled porosity polymerceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. *Mater. Sci. Eng., C* 2003; 23 (5): 611 – 620.
- [25] Endres M, Hutmacher DW, Salgado AJ, Kaps C, Ringe J, Reis RL, Sittinger M, Brandwood A, Schantz JT, Osteogenic induction of human bone marrow derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymerhydrogel matrices. *Tissue Eng.* 2003; 9 (4): 689 –702.
- [26] Darling AL, Sun W. 3D microtomographic characterization of precision extruded poly-epsilon-caprolactone scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2004; 70 (2): 311 – 317.
- [27] Schantz JT, Brandwood A, Hutmacher DW, Khor HL, Bittner K. Osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells in computer designed fibrin-polymer-ceramic scaffolds manufactured by fused deposition modeling. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2005; 16 (9): 807 – 819.
- [28] Woesz A, Rumpler A, Stampfl J, Varga F, Fratzl-Zelman N, Roschger P, Klaushofer K, Fratzl P. Towards bone replacement materials from calcium phosphates via rapid prototyping and ceramic gelcasting. *Mater. Sci. Eng., C* 2005; 25 (2): 181 – 186.
- [29] Quadrani P, Pasini A, Mattioli-Belmonte M, Zannoni C, Tampieri A, Landi E, Giantomassi F, Natali D, Casali F, Biagini G, Tomei-Minardi A. High-resolution 3D scaffold model for engineered tissue fabrication using a rapid prototyping technique, *Med. Biol. Eng. Comput.* 2005; 43 (2): 196 – 199.
- [30] Deisinger U, Stenzel F, Ziegler G. Hydroxyapatite ceramics with tailored pore structure. *Key Eng. Mater.* 2004; 264 – 268: 2047 – 2050.
- [31] Wilson CE, de Bruijn JD, van Blitterswijk CA, Verbout AJ, Dhert WJA. Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2004; 68 (1): 123 –132.
- [32] Chu TMG, Halloran JW, Hollister SJ, Feinberg SE. Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2001; 12 (6): 471 – 478.
- [33] Xiang L, Li DC, Lu BH, Tang YP, Wang L, Wang Z. Design and fabrication of CAP scaffolds by indirect solid free form fabrication. *Rapid Prototyping J.* 2005; 11 (5): 312 – 318.
- [34] Chen ZZ, Li DC, Lu BH, Tang YP, Sun ML, Wang Z. Fabrication of artificial bioactive bone using rapid prototyping. *Rapid Prototyping J.* 2004; 10 (5): 327 – 333.
- [35] Sadeghian Z, Heinrich JG, Moztaradeh F. Direct laser sintering of hydroxyapatite implants by layer-wise slurry deposition (LSD). *CFI-Ceram. Forum Int.* 2004; 81 (12): E 39 – E43.
- [36] Leukers B, Gülkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M, Seitz H. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2005; 16 (12): 1121 – 1124.
- [37] Leukers B, Gülkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Seitz H, Schieker M. Biocompatibility of ceramic scaffolds for bone replacement made by 3D printing. *Materialwiss. Werkstofftech.* 2005; 36 (12): 781 – 787.
- [38] Gbureck U, Hölzel T, Doillon C, Müller FA, Barralet JE. Direct printing of bioceramic implants with spatially localised angiogenic factors. *Adv. Mater.* 2007; 19 (6): 795 – 800.
- [39] Pham-Ghia K, Rossner B, Wessler B, Schäfer M, Schwarz M. Rapid Prototyping of high density alumina ceramics using stereolithography. *CFI – Ceram. Forum Int.* 2006; 13 (83): 36 – 40.

- [40] Xue CH, Shi MM, Chen HZ, Wu G, Wang M. Preparation and application of nanoscaled microemulsion as binder for fabric inkjet printing. *Colloids Surf., A* 2006; 287 (1 – 3): 147 – 152.
- [41] Moon J, Grau JE, Knezevic V, Cima MJ, Sachs E. Ink-jet printing of binders for ceramic components. *J. Am. Ceram. Soc.* 2002; 85 (4): 755 – 762.
- [42] Boland T, Wilson WC. Cell and organ printing 1: protein and cell printers. *Anat. Rec.* 2003; 272A (2): 491 – 496.
- [43] Xu T, Gregory CA, Molnar P, Cui X, Jalota S, Bhaduri SB, Boland T. Viability and electrophysiology of neural cell structures generated by inkjet printing method. *Biomaterials* 2006; 27 (19): 3580 – 3588.
- [44] Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Ink-jet printing of mammalian cells. *Biomaterials* 2005; 26 (1): 93 – 99.
- [45] Boland T, Xu T, Damon B, Cui X. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol. J.* 2006; 1 (9), 910 – 917.
- [46] Sachs E, Vezzetti E. Numerical simulation of deposition process for a new 3DP printhead design. *J. Mater. Process. Technol.* 2005; 161 (3): 509 – 515.
- [47] Le HP. Progress and trends in ink-jet printing technology. *J. Imaging Sci. Technol.* 1998; 42 (1): 49 – 62.
- [48] Tay BY, Evans JRG, Edirisinghe MJ. Solid freeform fabrication of ceramics. *Int. Mater. Rev.* 2003; 48 (6): 341 – 370.
- [49] Calvert P. Inkjet printing for materials and devices. *Chem. Mater.* 2001; 13 (10): 3299 – 3305.
- [50] Sieber G. Grundlagen Tintendrucker. www.tecchannel.de 2000.
- [51] Reis N, Ainsley C, Derby B. Ink-jet delivery of particle suspensions by piezoelectric droplet ejectors. *J. Appl. Phys.* 2005; 97 (9): 094903/1 – 094903/6
- [52] Stark K. Hydraulisch abbildende Magnesiumphosphat-Matrices für 3D-Pulverdruck-Anwendungen. Diplomarbeit. Georg-Simon-Ohm-Hochschule für angewandte Wissenschaft - Fachhochschule Nürnberg, 2008.
- [53] Vacanti JP, Cima LG, Cima MJ. Vascularized tissue regeneration matrices formed by solid free form fabrication techniques. Pat. No.: 6139574, Appl. No.: 08/915409, 2000.
- [54] Curodeau A, Sachs E, Caldarise S. Design and fabrication of cast orthopedic implants with freeform surface textures from 3-D printed ceramic shell. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 53 (5): 525 – 535.
- [55] Khan MS, Fon D, Li X, Tian J, Forsythe J, Garnier G, Shen W. Biosurface engineering through ink jet printing. *Colloids Surf., B* 2010; 75 (2): 441 – 447.
- [56] Griffith ML, Halloran JW. Freeform fabrication of ceramics via stereolithography. *J. Am. Ceram. Soc.* 1996; 79 (10): 2601 – 2608.
- [57] Chartier T, Penarroya R, Pagnoux C, Baumard JF. Tape casting using UV curable binders. *J. Eur. Ceram. Soc.* 1997; 17 (6): 765 – 771.
- [58] Janney MA, Omatete OO, Walls CA, Nunn SD, Ogle RJ, Westmoreland G. Development of low-toxicity gelcasting systems. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998; 81 (3): 581 – 591.
- [59] Bergstrom L, Sjoström E. Temperature induced gelation of concentrated ceramic suspensions: rheological properties. *J. Eur. Ceram. Soc.* 1999; 19 (12): 2117 – 2123.
- [60] Sigmund WM, Bell NS, Bergstrom L. Novel powder-processing methods for advanced ceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* 2000; 83 (7): 1557 – 1574.
- [61] Stamm D, Gissinger D, Boymond C. Quantitative evaluation of the wettability of powders. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1984; 10 (3): 381 – 408.
- [62] Ming LW, Gibson I. Experimental investigation of ink on powder used for selective laser sintering. *J. Mater. Process. Technol.* 2006; 174 (1 – 3): 91 – 101.
- [63] Lam CXF, Mo XM, Teoh SH, Hutmacher DW. Scaffold development using 3D printing with starch-based polymer. *Mater. Sci. Eng., C* 2002; 20 (1 – 2): 49 – 56.

- [64] Lowmunkong R, Sohmura T, Takahashi J, Suzuki Y, Matsuya S. Transformation of 3DP gypsum model to HA by treating in ammonium phosphate solution. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2007; 80 (2): 386 - 393.
- [65] Pfister A, Walz U, Laib A, Mülhaupt R. Polymer ionomers for rapid prototyping and rapid manufacturing by means of 3D printing. *Macromol. Mater. Eng.* 2005; 290 (2): 99 – 113.
- [66] Suwanprateeb J. Strength improvement of critical-sized three dimensional printing parts by infiltration of solvent-free visible light-cured resin. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2006; 17 (12): 1383 – 1391.
- [67] Patirupanusara P, Suwanpreuk W, Rubkumintara T, Suwanprateeb J. Properties improvement of three-dimensionally printed polymethyl methacrylate by bis-GMA-based resin infiltration. *Polym. Test.* 2007; 26 (4): 519 – 525.
- [68] Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1996; 8 (1): 63 – 75.
- [69] Suwanprateeb J, Chumnanklang R. Three-dimensional printing of porous polyethylene structure using water-based binders. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2006; 78 (1):138 – 145.
- [70] Wu BM, Borland SW, Giordano RA, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Solid free-form fabrication of drug delivery devices. *J. Controlled Release* 1996; 40 (1 – 2): 77 – 87.
- [71] Chandrasekaran M, Lim KK, Lee MW, Cheang P. Effect of process parameters on properties of titanium alloy fabricated using three-dimensional printing. *SIMTech Technical Reports* 2007; 8 (1): 1 – 4.
- [72] Lu K, Reynolds WT. 3DP process for fine mesh structure printing. *Powder Technol.* 2008; 187 (1):11 – 18.
- [73] Hong SB, Eliaz N, Leisk GG, Sachs EM, Latanision RM, Allen SM. A New Ti-5Ag Alloy for Customized Protheses by Three-dimensional printing (3DPTM). *J. Dent. Res.* 2001; 80 (3): 860 – 863.
- [74] Bergmann C, Lindner M, Zhang W, Koczur K, Kirsten A, Telle R, Fischer H. 3D printing of bone substitute implants using calcium phosphate and bioactive glasses. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2010; 30 (12): 2563 – 2567.
- [75] Will J, Melcher R, Treul C, Travitzky N, Kneser U, Polykandriotis E, Horch R, Greil P. Porous ceramic bone scaffolds for vascularized bone tissue regeneration. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2008; 19 (8): 2781 – 2790.
- [76] Gbureck U, Hölzel T, Biermann I, Barralet JE, Grover LM. Preparation of tricalcium phosphate/calcium pyrophosphate structures via rapid prototyping. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2008; 19 (4): 1559 – 1563.
- [77] Peters FTH, Bernhardt A, Lode A, Gelinsky M, Duerr H. In vitro examination of 3D printed vs. milled scaffolds from beta-tricalciumphosphate (beta-TCP) for patient individual bone regeneration. Poster 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam 2008.
- [78] Irsen ST H, Leukers B, Höckling Chr, Tille C, Seitz H. Bioceramic granulates for use in 3D printing: process engineering aspects. *Materialwiss. Werkstofftech.* 2006; 37 (6): 533 – 537.
- [79] Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K, Kawaguchi H, Nakamura K, Takato T, Nishimura R, Suzuki S, Anzai M, Chung UI, Sasaki N. Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J. Artif. Organs* 2006; 9 (4): 234 – 240.
- [80] Seitz H, Deisinger U, Leukers B, Detsch R, Ziegler G. Different calcium phosphate granules for 3-D printing of bone tissue engineering scaffolds. *Adv. Eng. Mater.* 2009, 11 (5): B41 –B46.
- [81] Lanzetta M, Sachs E. Improved surface finish in 3D printing using bimodal powder distribution. *Rapid Prototyping J.* 2003; 9 (3): 157 – 166.
- [82] Freyman M, Yannas YV, Gibson L. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. *J. Prog. Mater. Sci.* 2001; 46 (3 – 4): 273 – 282.
- [83] Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* 2005; 4 (7): 518 – 524.

- [84] Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26 (27): 5474 – 5491.
- [85] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21 (7): 667 – 681.
- [86] Landor I, Vavrik P, Sosna A. Hydroxyapatite porous coating and the osteointegration of the total hip replacement. *Arch. Orthop. Traum. Su.* 2007; 127 (2): 81 – 89.
- [87] Tisdell CL, Goldberg VM, Parr JA. The influence of hydroxyapatite and tricalcium-phosphate coating on bone-growth into titanium fiber-metal implants. *J. Bone Joint Surg., Am.* 1994; 76A (2): 159 – 171.
- [88] Gatti AM, LeGeros RZ, Monari E. Transformation of different calcium phosphates after implantation. *Key Eng. Mater.* 2000; 192 (1): 409 – 412.
- [89] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000; 21 (24): 2529 – 2543.
- [90] Wagh AS. Chemically bonded phosphate ceramics: 21st century materials with diverse applications. Elsevier, Amsterdam 2004; 97–111.
- [91] Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2007; 1 (4): 245 – 260.
- [92] Bohner M, van Lenthe GH, Grunenfelder S, Hirsiger W, Evison R, Muller R. Synthesis and characterization of porous beta-tricalcium phosphate blocks. *Biomaterials* 2005; 26 (31): 6099 – 6105.
- [93] Bohner M, Baumgart F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 2004; 25 (17): 3569 – 3582.
- [94] Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur. Cells Mater.* 2008; 15 (2): 100 – 114.
- [95] Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J. Anat.* 2008; 213 (1): 66 – 72.
- [96] Kimelman N, Pelled G, Gazit Z, Gazit D. Applications of gene therapy and adult stem cells in bone engineering. *Regen. Med.* 2006; 1 (4): 549 – 561.
- [97] Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petit H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9 (1): 72 – 84.
- [98] Van den Dolder J, Faber E, Spauwen PH, Jansen JA. Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2003; 24 (10): 1745 – 1750.
- [99] Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng.* 2005; 11 (5 – 6), 787 – 802.
- [100] Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997; 6 (2): 125 – 134.
- [101] Price JS, Jansen AF, Arm DM, Bohach GA. Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 1996; 30 (3): 281 – 286.
- [102] Blom EJ, Klein-Nulend J, Klein CPAT, Kurashina K, van Waas MAJ, Burger EH. Transforming growth factor- β 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 50 (1): 67 – 74.
- [103] Ruhé PQ, Kroeze-Deutman HC, Wolke JGC, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials* 2004; 25 (11): 2123 – 2132.
- [104] Blom EJ, Klein-Nulend J, Yin L, van Waas MAJ, Burger EH. Transforming growth factor-beta(1) incorporated in calcium phosphate cement stimulates osteotransductivity in rat calvarial bone defects. *Clin. Oral Implan. Res.* 2001; 12 (6): 609 – 616.

- [105] Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JGC, Kurashina K, van Waas MAJ, Burger EH. Transforming growth factor beta 1 incorporation in an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dihydrate/tetracalcium phosphate monoxide cement: release characteristics and physicochemical properties. *Biomaterials* 2002; 23 (4): 1261 – 1268.
- [106] Meraw SJ, Reeve CM, Lohse CM, Sioussat TM. Treatment of peri-implant defects with combination growth factor cement. *J. Periodontol.* 2000; 71 (1): 8 – 13.
- [107] Seeherman HJ, Boussein M, Kim H, Li R, Li XJ, Aiolova M, Wozney JM. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2004; 86A (9): 1961 – 1972.
- [108] Bohner M, Lemaire J, VanLanduyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B. Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86 (5): 565 – 572.
- [109] Takechi M, Miyamoto Y, Ishikawa K, Nagayama M, Kon M, Asaoka K, Suzuki K. Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast setting calcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 39 (2): 308 – 316.
- [110] Otsuka M, Matsuda Y, Wang Z, Fox JL, Higuchi WI. Effect of sodium bicarbonate amount on in vitro indomethacin release from self-setting carbonated-apatite cement. *Pharm. Res.* 1997; 14 (4): 444 – 449.
- [111] Otsuka M, Nakahigashi Y, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Sugiyama Y. Effect of geometrical cement size on in vitro and in vivo indomethacin release from self-setting apatite cement. *J. Controlled Release* 1998; 52 (3): 281 – 289.
- [112] Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox J, Higuchi W. A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. 5. Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug. *J. Pharm. Sci.* 1994; 83 (11): 1565 – 1568.
- [113] Laffargue P, Fialdes P, Frayssinet P, Raimate M, Hildebrand HF, Marchandise X. Adsorption and release of insulin-like growth factor-I on porous tricalcium phosphate implant. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 49 (3): 415 – 421.
- [114] Lee JY, Seol YJ, Kim KH, Lee YM, Park YJ, Rhyu IC, Chung CP, Lee SJ. Transforming growth factor (TGF)-beta 1 releasing tricalcium phosphate/chitosan microgranules as bone substitutes. *Pharm. Res.* 2004; 21 (10): 1790 - 1796.
- [115] Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y. Enhanced osteoinduction by controlled release of bone morphogenetic protein-2 biodegradable sponge composed of gelatin and β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2005; 26 (23): 4856 – 4865.
- [116] Slosarczyk A, Szymure-Oleksiak J, Mycek M. The kinetics of pentoxifylline release from drug-loaded hydroxyapatite implants. *Biomaterials* 2000; 21 (12): 1215 – 1221.
- [117] Queiroz AC, Santos JD, Monteiro FJ, Gibson IR, Knowles JC. Adsorption and release studies of sodium ampicillin from hydroxyapatite and glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Biomaterials* 2001; 22 (11): 1393 – 1400.
- [118] Saito T, Takeuchi R, Hirakawa K, Nagata N, Yoshida T, Koshina T, Okuda K, Takema M, Hori T. Slow-releasing potential of vancomycin-loaded porous hydroxyapatite blocks implanted into MRSA osteomyelitis. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2002; 63 (3): 245 – 251.
- [119] Krajewski Y, Ravaglioli A, Roncari E, Pinasco P. Porous ceramic bodies for drug delivery. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2000; 11 (12): 763 – 771.
- [120] Dion A, Berno B, Hall G, Filiaggi M. The effect of processing on the structural characteristics of vancomycin-loaded amorphous calcium phosphate matrices. *Biomaterials* 2005; 26 (21): 4486 – 4494.
- [121] Palazzo B, Sidoti MC, Roveri N, Tampieri A, Sandri M, Bertolazzi L, Galbusera F, Dubini G, Vena P, Contro R. Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach. *Mater. Sci. Eng., C* 2005; 25 (2): 207 – 213.
- [122] Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2004; 72 (2): 136 – 145.

- [123] Thoma K, Alex R. Biodegradable gentamicin-loaded release implants made of beta-tricalcium-phosphate ceramics. 2. Preparation and in vitro evaluation of gentamicin-loaded controlled release pellets. *Pharmazie* 1991; 46 (4): 198 – 202.
- [124] Netz DJA, Sepulveda P, Pandolfelli VC, Spadaro ACC, Alencastre JB, Bentley MVLB, Marchetti JM. Potential use of gelcasting hydroxyapatite porous ceramic as an implantable drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 2001; 213 (1 – 2): 117 – 125.
- [125] Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J. Development of a hydroxyapatite/collagen nanocomposite as a medical device. *Cell Transplant.* 2004; 13 (4): 451 – 461.
- [126] Ziegler J, Mayr-Wohlfahrt U, Kessler S, Breitig D, Günther KP. Adsorption and release properties of growth factors from biodegradable implants. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59 (3): 422 – 428.
- [127] Lode A, Wolf-Brandstetter C, Reinstorf A, Bernhardt A, König U, Pompe W, Gelinsky M. Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2007; 81 (2): 474 – 483.
- [128] El-Ghannam A, Ricci K, Malkawi A, Jahed K, Vedantham K, Wyan H, Allen LD, Dréau D. A ceramic-based anticancer drug delivery system to treat breast cancer. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2010; 21 (9): 2701 – 2710.
- [129] Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59 (4 – 5): 339 – 359.
- [130] Colilla M, Manzano M, Vallet-Regí M. Recent advances in ceramic implants as drug delivery systems for biomedical applications. *Int. J. Nanomed.* 2008; 3 (4): 403 – 414.
- [131] Adden N, Gamble LJ, Castner DG. Phosphonic acid monolayers for binding of bioactive molecules to titanium surfaces. *Langmuir* 2006; 22 (19): 8197 – 8204.
- [132] Saito N, Okada T, Horiuchi H, Ota H, Takahashi J, Murakami N, Nawata M, Kojima S, Nozaki K, Takaoka K. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenic protein-2 contained in polymer carriers. *Bone* 2003; 32 (4): 381 – 386.
- [133] Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2008; 2: 1 – 13.
- [134] Daculsi G, Hartmann DJ, Heughebaert M, Hamel L, Le Nihouannen JC. In vivo cell interactions with calcium phosphate bioceramics. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 1988; 20 (2), 379 – 384.
- [135] Ergun C, Webster TJ, Bizios R, Doremus RH. Hydroxyapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium and yttrium II Mechanisms of osteoblast adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59 (2): 312 – 317.
- [136] Bluteau G, Pilet P, Bourges X, Bilban M, Spaethe R, Daculsi G, Guicheux JR. The modulation of gene expression in osteoblasts by thrombin coated on biphasic calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 2006; 27 (15): 2934 – 2943.
- [137] Brodie JC, Merry J, Grant MH. The mechanical properties of calcium phosphate ceramics modified by collagen coating and populated by osteoblasts. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2006; 17 (1): 43-48
- [138] Ziegler J, Anger D, Krummenauer F, Breitig D, Fickert S, Guenther KP. Biological activity of recombinant human growth factors released from biocompatible bone implants. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2008; 86 (1): 89 – 97.
- [139] Tazaki J, Murata M, Akazawa T, Yamamoto M, Ito K, Arisue M, Shibata T, Tabata Y. BMP-2 release and dose-response studies in hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate. *Biomed. Mater. Eng.* 2009; 19 (2 – 3): 141 – 146.
- [140] Ruhé PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PHM, Jansen JA, Mikos AG. rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites. *J. Bone Joint Surg. - Am.* 2003; 85A (3): 75 – 81.

- [141] Bessa PC, Casal M, Reis RL. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2008; 2 (2 – 3): 81 – 96.
- [142] Patil SD, Papadimitrakopoulos F, Burgess DJ. Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis. *J. Controlled Release* 2007; 117 (1): 68 – 79.
- [143] Jeon O, Song SJ, Yang HS, Bhang SH, Kang SW, Sung MA, Lee JH, Kim BS. Long-term delivery enhances in vivo osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 369 (2): 774 – 780.
- [144] Kim SE, Jeon O, Lee JB, Bae MS, Chun HJ, Moon SH, Kwon IK. Enhancement of ectopic bone formation by bone morphogenetic protein-2 delivery using heparin-conjugated PLGA nanoparticles with transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Biomed. Sci.* 2008; 15 (6): 771 – 777.
- [145] Karaplis AC. PTHrP: novel roles in skeletal biology. *Curr. Pharm. Des.* 2001; 7 (8): 655 – 670.
- [146] Guicheux J, Heymann D, Rousselle AV, Gouin F, Pilet P, Yamada S, Daculsi G. Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factors I: an in vitro study. *Bone* 1998; 22 (1): 25 – 31.
- [147] Deckers MML, van Bezooijen RL, van der Horst G, Hoogendam J, van der Bent C, Papapoulos SE, Löwik CWGM. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* 2002; 143 (4): 1545 – 1553.
- [148] Kim IY, Kim MM, Kim SJ. Transforming growth factor-beta: biology and clinical relevance. *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005; 38 (1): 1 – 8.
- [149] Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors. *J. Periodontol.* 1992; 63 (6): 515 – 525.
- [150] Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Voegel JC, Boivin G. Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of calcifying matrix by human osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 42 (4): 626 – 633.
- [151] Paul W, Sharma CP. Effect of calcium, zinc and magnesium on the attachment and spreading of osteoblast like cells onto ceramic matrices. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2007; 18 (5): 699 – 703.
- [152] Bandyopadhyay A, Bernard S, Xue WC, Bose S. Calcium phosphate-based resorbable ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO₂ dopants. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006; 89 (9): 2675 – 2688.
- [153] Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, Onuma K, Kanzaki N, Sogo Y, Ichinose N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mater. Sci. Eng., C* 2002; 22 (1): 21 – 25.
- [154] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nadelec JM, Guenounou M, Laurent-maquin D, Phillips TM. Influence of the zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 2006; 27 (17): 3195 – 3200.
- [155] Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27 (29): 5014 – 5026.
- [156] Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005; 26 (23): 4847 – 4855.
- [157] Wan YZ, Huang Y, He F, Wang YL, Zhao ZG, Ding HF. Effect of Mg ion implantation on calcium phosphate formation on titanium. *Surf. Coat. Technol.* 2006; 201 (6): 2904 – 2909.
- [158] Pabbruwe MB, Standard OC, Sorrell CC, Howlett CR. Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants. *Biomaterials* 2004; 25 (20): 4901 – 4910.

- [159] Kaim W, Schwederski B. Bioanorganische Chemie. Zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen. Teubner, Wiesbaden, 2005.
- [160] Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J. Dent. Res.* 1995; 74 (8): 1521 – 1527.
- [161] Schedle A, Samorapompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Fureder W, Sperr WR, Sperr W, Ellinger A, Slavicek R, Boltz-Nitulescu G, Valent P. Response of L-929 fibroblast, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J. Dent. Res.* 1995; 74 (8):1513 – 1520.
- [162] Waters MD, Gardner DE, Aranyl C, Coffin DL. Metal toxicity for rabbit macrophages in vitro. *Environ. Res.* 1975; 9 (1): 32 – 47.
- [163] Niki Y, Matsumoto H, Suda Y, Otani T, Fujikawa K, Toyama Y, Hisamori N, Nozue A. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages. *Biomaterials* 2003; 24 (8): 1447 – 1457.
- [164] Singh K, Barwa MS, Tyagi P. Synthesis and characterization of cobalt(II), nickel(II) and zinc(II) complexes with Schiff base derived from 4-amino-3-mercapto-6-methyl-5-oxo-1,2,4-triazine. *Eur. J. Med. Chem.* 2007; 42 (3): 394 – 402.
- [165] Qin YM, Zhu CJ, Chen J. Adsorption and release of zinc and copper ions by chitosan fibers. *J. App. Poly. Sci.* 2007; 105 (2): 527 – 532.
- [166] Nackerdien Z, Kasprzak KS, Rao G, Halliwell B, Dizdarogul M. Nickel(II)- and cobalt(II)-dependent damage by hydrogen peroxide to DNA bases in isolated human chromatin. *Cancer Res.* 1991; 51 (21): 5837 – 5842.
- [167] Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, Cheung KMC, Luk KDK. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2006; 79 (4): 804 – 814.
- [168] Rousselle AV, Heymann D, Demais V, Charrier C, Passuti N, Baslé MF. Influence of metal ion solutions on rabbit osteoclast activities in vitro. *Histol. Histopathol.* 2002; 17 (4): 1025 – 1032.
- [169] Cortizo AM, Molinuevo MS, Barrio DA, Bruzzone L. Osteogenetic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: Evaluation of its mechanism of action. *Int. J. Biochem.* 2006; 38 (7): 1171 –1180.
- [170] Barrio DA, Etcheverry SB. Vanadium and bone development: putative signalling pathways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2007; 84 (7): 677 – 686.
- [171] Kishi S, Yamaguchi M. Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem. Pharmacol.* 1994; 48 (6): 1225 – 1230.
- [172] Barbucci R, Lamponi S, Magnani A, Peluso G, Petillo O. Metal complexes with linear and crosslinked polysaccharides as mediators of angiogenesis. *Polym. Adv. Technol.* 2001; 12(3 – 4): 271 – 278.
- [173] Harris ED. Requirement of copper in angiogenesis. *Nutrition Reviews* 2004; 62 (2): 60 – 64.
- [174] Kim HH, Lee SE, Chung WJ, Choi Y, Kwack K, Kim SW, Kim MS, Park H, Lee ZH. Stabilization of Hypoxia-inducible-Factor-1 α is involved in the hypoxic stimuli-induced expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Cytokine* 2002; 17 (1): 14 – 27.
- [175] Loboda A, Jazwa A, Wegiel B, Jozkowicz A, Dulak J. Heme oxygenase-1-dependent and – independent regulation of angiogenic genes expression: effect of cobalt protoporphyrin and cobalt chlorid on VEGF and IL-8 synthesis in human microvascular endothelial cells. *Cell. Mol. Biol.* 2005; 51 (4): 347 – 355.
- [176] Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger JR, Adler S, Fujita T, Nangaku M. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab. Invest.* 2005; 85 (10): 1292 – 1307.
- [177] Steinbrech D, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2000; 278C (4): 853 – 860.

- [178] Dash AK, Cudworth II GC. Therapeutic applications of implantable drug delivery devices. *J. Pharm. Toxicol. Method.* 1998; 40 (1): 1 – 12.
- [179] Spiegelberg S. Herstellung von Mikropartikeln aus einem abbaubaren Multiblockpolymer zur Freisetzung von proteinischen Wirkstoffen. Dissertation, TH Aachen, 2004.
- [180] Cauda V, Mühlstein L, Onida B, Bein T. Tuning drug uptake and release rates through different morphologies and pore diameters of confined mesoporous silica. *Microporous/Mesoporous Mater.* 2009; 118 (1 – 3): 435 – 442.
- [181] Higuchi T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. *J. Pharm. Sci.* 1961; 50: 874 – 875.
- [182] Siepmann J, Peppas NA. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 48 (2 – 3): 139 - 157.
- [183] Crank J. The mathematics of diffusion. Clarendon Press, Oxford 1975.
- [184] Weibull W. A statistical distribution of wide applicability. *J. Appl. Mechan.* 1951; 18: 293 - 297.
- [185] Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.* 2006; 309 (1-2): 44 – 50.
- [186] Hölzel T. Rapid-Prototyping von Calciumphosphat-Strukturen über eine Zement-Abbinde-reaktion. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2005.
- [187] Kübler NR, Reuther JF, Faller G, Kirchner T, Ruppert R, Sebald W. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1998; 27 (4): 305 – 309.
- [188] Alexander M, Estler CJ, Legler F. Antibiotika und Chemotherapeutika. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 1995.
- [189] Otten H, Plempel M, Siegenthaler W. Antibiotika-Fibel. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1975.
- [190] Gauthier H, Daculsi G, Merle C. Association of vancomycin and calcium phosphate by dynamic compaction: in vitro characterization and microbiological activity. *Biomaterials* 2001; 22 (18): 2481 – 2487.
- [191] Dion A, Langmann M, Hall G, Filiaggi M. Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment. *Biomaterials* 2005; 26 (35): 7276 – 7285.
- [192] Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, Cuckler JM. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 1997; 18 (11): 777 – 782.
- [193] Radermacher MG. Entwicklung eines DNS-Aptamers gegen das aktivierte Integrin $G_P II_B/III_A$. Dissertation, Albert-Ludwig-Universität, Freiburg 2007.
- [194] Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242 (4885): 1528 – 1534.
- [195] Wang EA, Rosen V, Cordes P, Hewick RM, Kriz MJ, Luxenberg DP, Sibley BS, Wozney JM. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85 (24): 9484 – 9488.
- [196] Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* 1992; 32 (2): 160 – 167.
- [197] Wozney JM. Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine* 2002; 27 (16): S2 – 8.
- [198] Yamashita H, Ten Dijke P; Heldin CH; Miyazono K. Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 1996; 19 (1): 569 – 574.
- [199] Hogan BL. Bone morphogenetic proteins in development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1996; 6: 432 – 438.
- [200] Ducy P and Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int.* 2000; 57 (6): 2207 – 2214.

- [201] Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1993; 289: 292 – 312.
- [202] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150 (698): 893 – 899.
- [203] Horiba, Ltd: Instruction manual laser scattering particle sizer distribution analyzer LA-300; Kyoto, 2000.
- [204] Bohren CF, Huffman DR. Absorption and scattering of light by small particles. John Wiley & Sons, New York, 1983.
- [205] Kerker M. The scattering of light and other electromagnetic radiation. Academic Press, New York, 1969.
- [206] Hofmann M. Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzementen. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2003.
- [207] Sachs L. Statistische Methoden, Planung und Auswertung. Springer, Berlin, 1988.
- [208] Schüler A. Eigenschaften der Minerale II, Akademie-Verlag, Berlin, 1954.
- [209] Mie G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* 1908; 25 (3): 377 – 445.
- [210] Lilley KJ, Gbureck U, Wright AJ, Knowles JC, Farrar DF, Barralet JE. Brushite cements from polyphosphoric acid, calcium phosphate systems. *J. Am. Ceram. Soc.* 2007; 90 (6): 1892 - 1898.
- [211] Klammert U, Reuther T, Jahn C, Kübler AC, Gbureck U: Biocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. *Acta Biomater.* 2009; 5 (2): 727 – 734.
- [212] Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, van Blitterswijk CA, Barralet JE. Osteoconduction and osteoinduction of low temperature 3D printed ceramic implants. *Biomaterials*, 2008; 29 (7): 944 – 953.
- [213] Tamimi F, Torres J, Gbureck U, Lopez- Cabarcos E, Bassett DC, Hamdan Alkhrisat M, Barralet JE. Cranio-facial vertical bone augmentation capacity of 3D printed monolithic CaHPO₄ blocks compared to autologous onlay grafts. *Biomaterials* 2009; 30 (31): 6318 – 6326.
- [214] Coe FL, Evan A, Worcester E. Kidney stone disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115 (10): 2598 – 2608.
- [215] Driessens FCM, Boltong MG, Wenz R, Meyer J. Calcium phosphates as fillers in struvite cements. *Key Eng. Mater.* 2005; 284 – 286: 161-164.
- [216] Hall DA, Stevens R, El Jazairi B. Effect of water content on the structure and mechanical properties of magnesia-phosphate cement mortar. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998; 81 (6): 1550 – 1556.
- [217] Sarkar AK. Hydration/dehydration characteristics of struvite and dittmarite pertaining to magnesium ammonium phosphate cement systems. *J. Mater. Sci.* 1991; 26 (9): 2514 – 2518.
- [218] Hipedinger NE, Scian AN, Aglietti EF. Magnesia-ammonium phosphate-bonded cordierite refractory castables: phase evolution on heating and mechanical properties. *Cem. Concr. Res.* 2004; 34 (1): 157-164.
- [219] Kowalczyk K, Palavit G. Chemical composition of mortars made from the magnesia amidoimidophosphates system. *J. Mater. Sci. Lett.* 1993; 12 (16): 1276 – 1278.
- [220] Sillen LG, Martell AE. Stability constants of metal-ion complexes. The Chemical Society London 1964.
- [221] McDowell H, Gregory TM, Brown WE. Solubility of Ca₅(PO₄)₃OH in the system Ca(OH)₂-H₃PO₄-H₂O at 5, 15, 25 and 37 °C. *J. Res. NBS (Phys. and Chem.) A* 1977; 81 (2, 3): 273-281.
- [222] Gregory TM, Moreno EC, Patel JM, Brown WE. Solubility of β-Ca₃(PO₄)₂ in the system Ca(OH)₂-H₃PO₄-H₂O at 5, 15, 25, 37 °C. *J. Res. Nat. Bur. Stand. A*, 1974; 78: 667-674.

- [223] Großardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics by osteoclastic cells. *Tissue Eng., Part A* 2010; 16 (12): 3687 – 3695.
- [224] Baláž P. *Mechanochemistry in nanoscience and minerals engineering*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2008.
- [225] Stie M: *Mechanische Verfahrenstechnik-Partikeltechnologie 1*, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg 2009.
- [226] Wu F, Su J, Wei J, Guo H, Liu C. Injectable bioactive calcium-magnesium phosphate cement for bone regeneration. *Biomed. Mater.* 2008; 3 (4):1 – 7.
- [227] Boldyrev VV, Tkáčová K. Mechanochemistry of solids: past, present and prospects. *J. Mater. Synth. Process.* 2000; 8 (3 – 4):121 – 132.
- [228] Fernández-Bertran JF, Mechanochemistry: an overview. *Pure Appl. Chem.* 1999; 71 (4): 581 – 586.
- [229] Gbureck U, Grolms O, Grover LM, Barralet JE, Thull R. Mechanical activation of β -Tricalcium phosphate and cement formation with Na_2HPO_4 solution. *Biomaterials* 2003; 24 (23): 4123 – 4131.
- [230] Gbureck U, Barralet JE, Radu L, Klinger HG, Thull R. Amorphous α -tricalcium phosphate: preparation and aqueous setting reaction. *J. Am. Ceram. Soc.* 2004; 87 (6): 1126 – 1132.
- [231] Gbureck U, Barralet JE, Hofmann M, Thull R. Mechanical activation of tetracalcium phosphate. *J. Am. Ceram. Soc.* 2004; 87 (2): 311 – 313.
- [232] Gbureck U, Thull R, Barralet JE. Alkali ion substituted calcium phosphate cement formation from mechanically activated reactants. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2005; 16 (5): 423 – 427.
- [233] Takahashi T, Yamamoto M, Ioku K, Goto S. Relationship between compressive strength and pore structure of hardened cement pastes. *Adv. Cem. Res.* 1997; 9: 25 – 30.
- [234] 4D Concepts GmbH. Spectrum ZTM5103D Drucker - Produktinformation. Groß-Gerau.
- [235] Mestres G, Ginebra MP. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta Biomater.* 2011; 7 (4): 1853 – 1861.
- [236] Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C. Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2008; 4 (6):1873 – 84.
- [237] Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, Shin JW, Liu C. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials* 2010; 31 (6):1260 – 1269.
- [238] Yu Y, Wang J, Liu C, Zhang B, Chen H, Guo H, Zhong G, Qu W, Jiang S, Hung H. Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement. *Colloids Surf. B* 2010; 76 (2): 496 –504.
- [239] Boanini E, Gazzano M, Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomater.* 2010; 6 (6):1882 – 1894.
- [240] Toba Y, Kajita Y, Masuyama R, Takada Y, Suzuki K, Aoe S. Dietary magnesium supplementation affects bone metabolism and dynamic strength of bone in ovariectomized rats. *J. Nutr.* 2000; 130: 216 – 220.
- [241] Gbureck U, Barralet JE, Spatz K, Grover LM, Thull R. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials* 2004; 25 (11): 2187 – 2195.
- [242] Barralet JE, Tremayne MJ, Lilley KJ, Gbureck U. Chemical modification of calcium phosphate cements with α -hydroxy acids and their salts. *Chem. Mater.* 2005; 17 (6): 1313 –1319.
- [243] Barralet JE, Hofmann M, Grover LM, Gbureck U. High-strength apatitic cement by modification with α -hydroxy acid salts. *Adv. Mater.* 2003; 15: 2091 – 2094.
- [244] dos Santos LA, de Oliveira LC, Rigo ECD, Carrodeguas RG, Boschi AO, de Arruda ACF. Fiber reinforced calcium phosphate cement. *Artif. Organs* 2000; 24 (3): 212 – 216.

- [245] Xu HHK, Eichmiller FC, Giuseppetti AA. Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52 (1):107 – 114.
- [246] Xu HHK, Simon CG. Self-hardening calcium phosphate cement-mesh composite: reinforcement, macropores, and cell response. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2004; 69 (2): 267 – 278.
- [247] Wang X, Ye J, Wang Y, Chen L. Reinforcement of calcium phosphate cement by bio-mineralized carbon nanotube. *J. Am. Ceram. Soc.* 2007; 90 (3): 962 – 964.
- [248] Müller FA, Gbureck U, Kasuga T, Mizutani Y, Barralet JE, Lohbauer U. Whisker reinforced calcium phosphate cements. *J. Am. Ceram. Soc.* 2007; 90 (11): 3694 – 3697.
- [249] Péra J., Ambroise J. Fiber-reinforced magnesia-phosphate cement composites for rapid repair. *Cem. Concr. Compos.* 1998; 20 (1): 31 – 39.
- [250] Neiman R, Sarma AC. Setting and thermal reactions of phosphate investments. *J. Dent. Res.* 1980; 59 (9): 1478 – 1485.
- [251] Chen S, Liu M, Jin S, Wang B. Preparation of ionic-crosslinked chitosan-based gel beads and effect of reaction conditions on drug release behaviors. *Int. J. Pharm.* 2008, 349 (1 – 2): 180 – 187.
- [252] Shu XZ, Zhu KJ. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. *Int. J. Pharm.* 2002; 233 (1 – 2): 217 – 225.
- [253] Shu XZ, Zhu KJ, Song W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for controlled drug release. *Int. J. Pharm.* 2001; 212 (1): 19 – 28.
- [254] Huguet ML, Groboillot A, Neufeld RJ, Poncelet D, Dellacherie E. 1994. Hemoglobin encapsulation in chitosan/calcium alginate beads. *J. Appl. Polym. Sci.* 1994; 51 (8):1427 – 1432.
- [255] Polk A, Amsden B, Yao KD, Peng T, Goosen MFA. 1994. Controlled release of albumin from chitosan-alginate microcapsules. *J. Pharm. Sci.* 1994; 83 (2): 178 – 185.
- [256] Muzzarelli RAA. Chitins and Chitosans fort he repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydr. Polym.* 2009; 76 (2): 167 – 182.
- [257] Vorndran E. Adsorption und Desorption von Antibiotika an Calciumphosphat-Strukturen, Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2006.
- [258] Settia L, Fraleoni-Morgerac A, Ballarinb B, Filippinia A, Frascaroa D, Piana C. An amperometric glucose biosensor prototype fabricated by thermal inkjet printing. *Anal. Lett.* 2004; 37 (8): 1559 – 1570.
- [259] Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR. Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat. Rec.* 2003; 272A (2): 497 – 502.
- [260] Saunders R, Bosworth L, Gough J, Derby B, Reis N. Selective cell delivery for 3D tissue culture and engineering. *Eur. Cells Mater.* 2004; 7 (1): 84.
- [261] Okamoto T, Suzuki T, Yamamoto N. Microarray fabrication with covalent attachment of DNA using bubble jet technology. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18 (4): 438 – 441.
- [262] Ducheyne P, Ei-Ghannam A, Shapiro I. Effect of bioadctive glass templates on osteoblast proliferation and in vitro synthesis of bone-like tissue. *J. Cell. Biochem.* 1994; 56 (2): 162 – 167.
- [263] Gerds TA, Vogeler M. Endpoints and survival analysis for successful osseointegration of dental implants. *Stat. Method. Med. Res.* 2005; 14 (6): 579 – 590.
- [264] Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration *Eur. Spine J.* 2001; 10: S96 – S101.
- [265] Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* 2004; 7 (5): 30 – 40.
- [266] Ma PX, Choi JW. Biodegradable polymer scaffolds with welldefined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* 2001; 7 (1): 23 – 33.

- [267] Spargo BJ, Testoff MA, Nielsen TB, Stenger DA, Hickmann JJ, Rudolph AS. Spatially controlled adhesion, spreading, and differentiation of endothelial cells on self-assembled molecular monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91 (23): 11070 – 11074.
- [268] Veiseh M, Wickes B, Castner D, Zhang M. Guided cell patterning on gold-silicon dioxide substrates by surface molecular engineering. *Biomaterials* 2004; 25 (16): 3315 – 3324.
- [269] Kane RS, Takayama S, Ostuni E, Ingber DE, Whitesides GM. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999; 20 (23 – 24): 2363 – 2376.
- [270] Folch A, Jo BH, Hurtado O, Beebe DJ, Toner M. Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52 (2): 346 – 353.
- [271] Odde DJ, Renn MJ. Laser-guided direct writing of living cells. *Biotechnol. Bioeng.* 2000; 67 (3): 312 – 318.
- [272] Liang H, Vu K, Krishnan P, Trang T, Shin D, Kimel S, M.W. Berns MW. Wavelength dependence of cell cloning efficiency after optical trapping. *Biophys. J.* 1996; 70 (3): 1529 – 1533.
- [273] Barron J, Young H, Dlott D, Darfler M, Krizman DB, Ringeisen BR. Printing of protein microarrays via a capillary-free fluid jetting mechanism. *Proteomics* 2005; 5 (16): 4138 – 4144.
- [274] Young D, Auyeung R, Piqué A, Chrisey D, Dlott D. Plume and jetting regimes in a laser based forward transfer process as observed by time-resolved optical microscopy. *Appl. Surf. Sci.* 2002; 197 - 198: 181–187.
- [275] Barron JA, Wu P, Ladouceur HD, Ringeisen BR. Biological laser printing: a novel technique for creating heterogeneous 3-dimensional cell patterns. *Biomed. Microdevices* 2004; 6 (2): 139 – 147.
- [276] Ringeisen BR, Kim H, Barron JA, Krizman DB, Chrisey DB, Jackman S, Auyeung RYC, Spargo BJ. Laser printing of pluripotent embryonal carcinoma cells. *Tissue Eng.* 2004; 10 (3 – 4): 483 – 491.
- [277] Barron JA, Krizman DB, Ringeisen BR. Laser printing of single cells: statistical analysis, cell viability and stress. *Ann. Biomed. Eng.* 2005; 33 (2): 121 – 130.
- [278] Ringeisen BR, Chrisey DB, Pique A, Young HD, Modi R, Bucaro M, Jones-Meehan J, Spargo BJ. Generation of mesoscopic patterns of viable *Escherichia coli* by ambient laser transfer. *Biomaterials* 2001; 23 (1): 161–166.
- [279] Ringeisen BR, Wu P, Kim H, Pique A, Auyeung RYC, Young HD, Chrisey DB, Krizman DB. Picoliter-scale protein microarrays by laser direct write. *Biotechnol. Progr.* 2002; 18 (5): 1126 – 1129.
- [280] Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2003; 21 (4): 157 – 161.
- [281] Saunders R, Gough J, Derby B. Ink jet printing of mammalian primary cells for tissue engineering applications. *Nanoscale Mater. Sci. Biol. Med.* 2005; 845: 57 – 62.
- [282] Helf C. Herstellung von Polymethacrylat/Calciumphosphat-Implantatwerkstoffen durch 3D-Pulverdruck. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2009.
- [283] Buranapanitkit B, Srinilta V, Ingvinga N, Oungbho K, Geater A, Ovatlarnporn C. The efficacy of hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotic delivery system. *Clin. Orthopaed. Rel. Res.* 2004; 424: 244 – 252.
- [284] Takechi M, Miyamoto Y, Momota Y, Yuasa T, Tatehara S, Nagayama M, Ishikawa K, Suzuki K. The in vitro antibiotic release from anti-washout apatite cement using chitosan. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2002; 13 (10): 973 – 978.
- [285] Lee YM, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Klokkevold PR, Chung CP. The boneregenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J. Periodontol.* 2000; 71 (3): 418 – 424.
- [286] Zhang Y, Zhang M. Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 62 (3): 378 – 386.

- [287] Shi X, Wang Y, Rena L, Zhao N, Gong Y, Wang D. Novel mesoporous silica-based antibiotic releasing scaffold for bone repair. *Acta Biomater.* 2009; 5 (5): 1697 – 1707.
- [288] Cabañas MV, Peña J, Román J, Vallet-Regí M. Tailoring vancomycin release from β -TCP/ agarosescaffolds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2009; 37 (3 – 4): 249 – 256.
- [289] Miyai T, Ito A, Tamazawa G, Matsuno T, Sogo T, Nakamura C, Yamazaki A, Satoh T. Antibiotic-loaded poly- ϵ -caprolactone and porous β -tricalcium phosphate composite for treating osteomyelitis. *Biomaterials* 2008; 29 (3): 350 – 358.
- [290] Vorndran E, Spohn N, Rößler S, Nies B, Gbureck U. Mechanical properties and drug release behaviour of bioactivated PMMA-cements. *J. Biomater. Appl.* 2010; DOI: 10.1177/0885328210376996
- [291] Virto MR, Frutos P, Torrado S, Frutos G. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. *Biomaterials* 2003; 24 (1): 79 – 87.
- [292] Gbureck U, Vorndran E, Barralet JE. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomater.* 2008; 4 (5): 1480 – 1486.
- [293] Soker S, Machado M, Atala A. Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World J. Urol.* 2000; 18 (1): 10 – 18.
- [294] Engsig MT, Chen QJ, Vu TH, Pedersen AC, Therkidsen B, Lund LR, Henriksen K, Lenhard T, Foged NT, Werb Z, Delaisse JM. Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. *J. Cell Biol.* 2000; 151 (4): 879 – 889.
- [295] Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996; 87 (8): 3336 – 3343.
- [296] Midy V, Plouet J. Vasculotropin vascular endothelial growth factor induces differentiation in cultured osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 199 (1): 380–386.
- [297] Fiedler J, Leucht F, Waltenberger J, Dehio C, Brenner RE. VEGF-A and PlGF-1 stimulate chemotactic migration of human mesenchymal progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 334 (2): 561 – 568.
- [298] Kaku M, Kohno S, Kawata T, Fujita I, Tokimasa C, Tsutsui K, Tanne K. Effects of vascular endothelial growth factor on osteoclast induction during tooth movement in mice. *J. Dent. Res.* 2001; 80 (10): 1880 – 1883.
- [299] Lode A, Reinstorf A, Bernhardt A, Wolf-Brandstetter C, König U, Gelinsky M. Heparin modification of calcium phosphate bone cements for VEGF functionalization. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2008; 86 (3): 749 – 759.
- [300] Seeherman H, Wozney JM. Delivery of bone morphogenic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth F. R.* 2005; 16 (3): 329 – 345.
- [301] Jansen JA, Vehof JWM, Ruhé PQ, Kroeze-Deutman H, Kuboki Y, Takita H, Hedberg EL, Mikos AG, Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J. Controlled Release* 2005; 101 (1 – 3): 127 – 136.
- [302] Seeherman H, Li R, Bouxsein M, Kim H, Li XJ, Smith-Adaline EA, Aiolo M, Wozney JM. rhBMP-2/calcium phosphate matrix accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model at multiple treatment times and concentrations. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 2006; 88 (1): 144 – 160.
- [303] Ruhé PQ, Boerman OC, Russel FGM, Mikos AG, Spauwen PHM, Jansen JA. In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2006; 17 (10): 919 – 927.
- [304] Haddad AJ, Peel S AF, Clokie CML, Sándor GKB. Closure of rabbit calvaria critical-sized defect using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. *J. Craniofac. Surg.* 2006; 17 (5): 926 – 934.
- [305] Cui X, Boland T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* 2009; 30 (31): 6221 – 6227.

- [306] Barralet JE, Gbureck U, Habibovic P, Vorndran E, Gerard C, Doillon CJ. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. *Tissue Eng., Part A* 2009; 15 (7): 1601 – 1609.
- [307] Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rödiger J, Meyer-Marcotty P, Kübbler AC. 3D powder Printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects. *J. Cranio Maxill Surg.* 2010; 38 (8): 565 – 570.
- [308] Rabatin JG, Gale RH, Newkirk AE. The mechanism and kinetics of the dehydration of calcium hydrogen phosphate dehydrate. *J. Phys. Chem.* 1960; 64 (4): 491 – 493.
- [309] da Silva MHP, Lima JHC, Soares GA, Elias CN, de Andrade MC, Best SM, Gibson IR. Transformation of monetite to hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium. *Surf. Coat. Technol.* 2001; 137 (2 – 3): 270 – 276.
- [310] Anthony JW, Bideaux RA, Bladh WK, Nichols MC, Eds., *Handbook of mineralogy*, Mineralogical Society of America, Chantilly, VA 20151-1110, USA. <http://www.handbookofmineralogy.org/>.
- [311] Becker ST, Douglas T, Acil Y, Seitz H, Sivananthan S, Wiltfang J, Warnke PH. Biocompatibility of individually designed scaffolds with human periosteum for use in tissue engineering. *J. Mater. Sci.- Mater. Med.* 2010;21 (4):1255–62.
- [312] Warnke PH, Seitz H, Warnke F, Becker ST, Sivananthan S, Sherry E, Liu Q, Wiltfang J, Douglas T. Ceramic scaffolds produced by computer-assisted 3D printing and sintering: characterization and biocompatibility investigations. *J. Biomed. Mater. Res., Part B* 2010; 93 (1): 212 – 217.
- [313] Percival M. Bone health and osteoporosis. *Appl. Nutr. Sci.* 1999; 5 (4):1 – 5.
- [314] Heliotis M, Ripamonti U, Ferretti C, Kerawala C, Mantalris A, Tsiridis E. The basic science of bone induction. *Brit J. Oral Max. Surg.* 2009; 47 (7): 511 – 514.
- [315] Schneider G, Blechs Schmidt K, Linde D, Litschko P, Korbs T, Beleites E. Bone regeneration with glass ceramic implants and calcium phosphate cements in a rabbit cranial defect model. *J Mater. Sci. – Mater Med.* 2010; 21 (10): 2853-2859.
- [316] Miño-Fariña N, Muñoz-Guzón F M, López-Peña M, González-Cantalapiedra A. Application of different calcium phosphate ceramics for bone regeneration. *Bone*, 2011; 48 (2): S168 –S168.
- [317] Mehrban N, Paxton JZ, Bowen J, Bolarinwa A, Vorndran E, Gbureck U, Grover LM. Comparing physicochemical properties of printed and hand cast bioceramics designed for ligament replacement. *Adv. Appl. Ceram.* 2011; 110 (3): 162 – 167.
- [318] Thimm BW, Wust S, Hofmann S, Hagenmuller H, Muller R. Initial cell pre-cultivation can maximize ECM mineralization by human mesenchymal stem cells on silk fibroin scaffolds. *Acta Biomater.* 2011; 7(5): 2218-2228.
- [319] Kim YH, Anirban JM, Song HY, Seo HS, Lee BT. In vitro and in vivo evaluations of 3D porous TCP-coated and non-coated alumina scaffolds. *J. Biomat. Appl.* 2011; 25(6): 539-558.
- [320] Choi SW, Zhang Y, Thomopoulos S, Xia YN. In vitro mineralization by preosteoblasts in poly(dl-lactide-co-glycolide) inverse opal scaffolds reinforced with hydroxyapatite nanoparticles. *Langmuir* 2010; 26(14): 12126-12131.
- [321] Guda T, Walker JA, Pollot BE, Appleford MR, Oh S, Ong JL, Wenke JC. In vivo performance of bilayer hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration in the rabbit radius. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 2011; 22(3): 647-656.
- [322] Sherman BP, Lindley EM, Turner AS, Seim HB, Benedict J, Burger EL, Patel VV. Evaluation of ABM/P-15 versus autogenous bone in an ovine lumbar interbody fusion model. *Euro. Spine J.* 2010; 19 (12): 2156-2163.
- [323] Yeo A, Wong WJ, Teoh SH. Surface modification of PCL-TCP scaffolds in rabbit calvaria defects: Evaluation of scaffold degradation profile, biomechanical properties and bone healing patterns. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2010; 93A(4): 1358-1367.
- [324] Roshan-Ghias A, Pioletti DP. Surgical preparation of bone-scaffold interface is critical for bone regeneration inside tissue engineering scaffold. *J. Orthop. Res.* 2011; 29(5): 767-772.

-
- [325] Detsch R, Mayr H, Ziegler G. Formation of osteoclast-like cells on HA and TCP ceramics. *Acta Biomater.* 2008; 4 (1): 139 – 148.
- [326] Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T, Gbureck U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta Biomater.* 2011; doi: 10.1016/j.actbio.2011.05.022.

9 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

ALP	alkalische Phosphatase
aPTT	activated partial thromboplastin time
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
Bis-GMA	Bisphenol A Glycidyl Methacrylat
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Computer Aided Design
CaP	Calciumphosphat(e)
CAM	Computer Aided Manufacturing
CDHA	calciumdefizitärer Hydroxylapatit
CIJ	Continuous-Ink-Jetting
CS	compressive strength
CT	Computertomographie
DCPA	Calciumhydrogenphosphat (Monetit)
DCPD	Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Bruschit)
DDS	Drug Delivery System
DICOM	digital imaging and communication in medicine
DOD	Drop-On-Demand
3DP	threedimensional Printing
FCS	fötales Kälberserum
FDM	Fused-Deposition-Modeling
FGF	Fibroblast Growth Factor
HA	Hydroxylapatit
HIF	Hypoxie induzierbarer Faktor
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IGF	Insulin Growth Factor
IL	Interleukin
LGDW	Laser-Guidance-Direct-Writing
LIFT	Laser-Induced-Forward-Transfer
LP	Löslichkeitsprodukt

LOM	Laminate-Object-Manufacturing
MCPM	Monocalciumphosphat Monohydrat
MgP	Magnesiumphosphat(e)
MgO	Magnesiumoxid
MHK	minimale Hemmkonzentration
MW	Molekulargewicht
NF- κ B	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
PBS	Phosphate buffered saline
PC	Polycarbonat
PCL	Polycaprolacton
PE	Polyethylen
PEEK	Polyetheretherketon
PET	Polyethylenterephthalat
PEO	Polyethylenoxid
PGA	Polyglycolic acid
PLA	Polylactic acid
PLGA	Polylactic/Polyglycolic acid
PLR	Pulver/Flüssigkeitsverhältnis
PMMA	Polymethylmethacrylat
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
POM	Polyoxymethylen
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen
PUR	Polyurethan
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SL	Stereolithographie
SLS	Selektives Lasersintern
STL	Surface Tessellation Language
T	Temperatur
TCP	Tricalciumphosphat
TE	Tissue Engineering
TEGMA	Triethylenglykoldimethacrylat

TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPP	Tripolyphosphat
TTCP	Tetracalciumphosphat
UHMWPE	Ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VWRL	Virtual Reality Modeling Language
XRD	X-ray diffraction (Röntgendiffraktometrie)

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen in begutachteten Zeitschriften und Buchbeiträge

1. Gbureck U, **Vorndran E**, Müller FA, Barralet JE. Low temperature direct 3D printed bioceramics and biocomposites as drug release matrices. *J. Controlled Release* 2007; 122: 173-180.
2. Gbureck U, **Vorndran E**, Barralet JE. Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions. *Acta Biomater.* 2008; 4: 1480-1486.
3. **Vorndran E**, Klarner M, Klammert U, Grover LM, Patel S, Barralet JE, Gbureck U. 3D powder printing of β -tricalcium phosphate ceramics using different strategies. *Adv. Biomater.* 2008; 10: B67-B71.
4. Barralet JE, Gbureck U, Habibovic P, **Vorndran E**, Gerard C, Doillon CJ. Angiogenesis in calcium phosphate scaffolds by inorganic copper ion release. *Tissue Eng., Part A* 2009; 15 (7): 1601 – 1609.
5. Müller B, Deyhle H, Fierz FC, Irsen SH, Yoon JY, Mushkolaj A, Boss O, **Vorndran E**, Gbureck U, Degistirici Ö, Thie M, Leukersa B, Beckmann F, Witte F. Bio-mimetic hollow scaffolds for long bone replacement. *Biomimetics and Bioinspiration, Proc. of SPIE* 2009, 7401: 74010D 1 – 13.
6. **Vorndran E**, Klammert U, Ewald A, Barralet JE, Gbureck U. Simultaneous immobilisation of bioactives during 3D powder printing of bioceramic drug-release matrices. *Adv. Funct. Mater.* 2010; 20: 1585 - 1591.
7. Klammert U, Gbureck U, **Vorndran E**, Rödiger J, Meyer-Marcotty P, Kübbler AC. 3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects. *J. Cranio Maxill. Surg.* 2010; 38 (8): 565 – 570.
8. **Vorndran E**, Spohn N, Rößler S, Nies B, Gbureck U. Mechanical properties and drug release behaviour of bioactivated PMMA-cements. *J. Biomater. Appl.* 2010; DOI: 10.1177/0885328210376996.
9. Klammert U, **Vorndran E**, Reuther T, Müller FA, Zorn K, Gbureck U. Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing. *J. Mater. Sci. - Mater. Med.* 2010;
10. Mehrban N, Paxton JZ, Bowen J, Bolarinwa A, **Vorndran E**, Gbureck U, Grover LM. Comparing physicochemical properties of printed and hand cast biocements designed for ligament replacement. *Adv. Appl. Ceram.* 2011; 110 (3): 162 – 167.
11. **Vorndran E**, Klammert U, Ewald A, Barralet JE, Gbureck U. Simultaneous immobilisation of bioactives during 3D powder printing of bioceramic drug-release matrices. In Calvert P, Narayan R. *Computer aided biomanufacturing.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 1. Auflage, 2011; 104 – 110.

12. **Vorndran E**, Ewald A, Müller FA, Zorn K, Kufner A, Gbureck U. Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system. *J. Mater. Sci. – Mater. Med.* 2011; 22 (3): 429 – 436.
13. Schnieders J, Gbureck U, **Vorndran E**, Schossig M, Kissel T. The effect of porosity on drug release kinetics from vancomycin microsphere / calcium phosphate cement composites. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2011; DOI: 10.1002/jbm.b.31910.
14. **Vorndran E**, Stark K, Moseke C, Biermann I, Müller FA, Zorn K, Gbureck U. Hydraulic setting Mg₃(PO₄)₂ powders for 3D printing technology. *Adv. Appl. Ceram.* (in press)

Tagungsbandbeiträge und Posterpräsentationen

1. **Vorndran E**, Gbureck U. Freisetzungskinetik von Vancomycin aus mikroporösen Calciumphosphat-Keramiken unter statischen und dynamischen Bedingungen. *BIOmaterialien* 2007; 8(3): 244.
2. **Vorndran E**, Barralet JE, Gbureck U. Influence of static and dynamic immersion on vancomycin release kinetics from microporous brushite ceramics. 21st European Conference on Biomaterials, Brighton, 2007.
3. Gbureck U, **Vorndran E**, Müller FA, Barralet JE. Vancomycin adsorption and desorption to 3D printed calcium phosphate ceramics. Society for Biomaterials, Chicago 2007.
4. **Vorndran E**, Barralet JE, Gbureck U. Ortsabhängige Wirkstoff-Modifikation von Calciumphosphat-Strukturen mittels 3D-Pulverdruck. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Hamburg, 2008.
5. Gbureck U, **Vorndran E**, Klarner M, Barralet JE. 3D powder printing of β -tricalcium phosphate ceramics using different strategies. 8th World Congress on Biomaterials, Amsterdam, 2008.
6. **Vorndran E**, Klammert U, Klarner M, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U. 3D printing of β -tricalcium phosphate ceramics. Academy of Dental Materials conference, Würzburg, 2008.
7. **Vorndran E**, Moseke C, Amberger M, Elter P, Gbureck U. TiO₂ Nanotubes as drug delivery system for vancomycin release, 8th World Congress on Biomaterials, Amsterdam 2008.
8. **Vorndran E**, Klammert U, Moseke C, Barralet JE, Gbureck U. Low temperature printing of spatially localized drug gradients in bioceramic implants. 22nd European Conference on Biomaterials, Lausanne, 2009.
9. Klammert U, **Vorndran E**, Barralet JE, Gbureck U. 3D-printing of protein modified calcium phosphate ceramics, 22nd European Conference on Biomaterials. Lausanne, 2009.

-
10. Stark K, **Vorndran E**, Biermann I, Müller FA, Gbureck U. Hydraulic setting $Mg_3(PO_4)_2$ powders for 3D printing technology. Cement and Concrete Science, Birmingham, 2010.
 11. Barralet JE, **Vorndran E**, Klammert U, Ewald A, Gbureck U. Simultaneous immobilisation of bioactives during 3D-powder printing of bioceramic drug release matrices. 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Portland, 2010.

Eidesstattliche Erklärung

Gemäß §5 Abs. 2 Ziffer 2 und 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Physik und Astronomie der Universität Würzburg.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde bisher weder vollständig noch teilweise an einer anderen Hochschule mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben, vorgelegt. Am 14. Februar 2007 wurde mir von der Universität Würzburg der akademische Grad „Diplom-Ingenieur (Univ.)“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich bisher weder erworben, noch versucht zu erwerben.

Würzburg, 2011

Elke Vorndran

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen und Institutionen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

- Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Uwe Gbureck danke ich für die hervorragende Betreuung während meiner Promotionsarbeit und für alles was er mir durch seine Fachkompetenz, Diskussions- und Hilfsbereitschaft über das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht hat. Seiner Motivation sowie seiner Unterstützung in fachlichen und persönlichen Belangen habe ich das Gelingen meiner Arbeit zu verdanken.
- Herrn Prof. Dr. Vladimir Dyakonov danke ich für die Betreuung und Begutachtung meiner extern angefertigten Promotionsarbeit und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.
- Herrn Prof. Dr. Jürgen Groll danke ich für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde durchzuführen.
- Herrn Dr. Claus Moseke danke ich für das intensive Korrekturlesen meiner Arbeit sowie für seine kompetente Hilfe durch Diskussionen und fachliche Ratschläge.
- Frau Dr. Andrea Ewald danke ich für die biologische Testung der Materialien, der Mithilfe bei der Bestimmung der biologischen Wirksamkeit der Wirkstoffe, der Betreuung der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, sowie für die Hilfestellung in allen Fragen auf dem Gebiet der Biologie.
- Herrn Dr. Dr. Uwe Klammert danke ich für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Wirkstoffmodifikation und der Implantationsstudien, sowie für die Hilfestellung in allen medizinischen Fragen dieser Arbeit.
- Frau Helga Diettrich und ganz besonders Frau Isabell Biermann danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, ihre Zuverlässigkeit und ihre Unterstützung bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.
- Frau Judith Friedlein danke ich für die Anfertigung der REM-Aufnahmen.
- Herrn Harald Hümpfer und Herrn Anton Hofmann danke ich für die Unterstützung in Fragestellungen zum CAD-Programm und vorallem für die Durchführung notwendiger Reparaturen und aller werkstattlichen Arbeiten.
- Frau Prof. Dr. Anita Ignatius von der Universität Ulm danke ich für die Möglichkeit, die μ -CT-Analyse am Zentrum für muskuloskelettale Forschung durchführen zu können, insbesondere Herrn Dr. Dipl.-Ing. Uwe Wolfram danke ich für die Betreuung und Unterstützung während der Messungen.
- Herrn Dr. Liam Grover danke ich für die Durchführung der Porositätsmessungen an der Universität von Birmingham, School of Chemical Engineering.
- meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft und für das hervorragende Arbeitsklima. Vor allem Claus, Kai,

Tobias und Thomasz danke ich für die vielen unterhaltsamen und lustigen Stunden, die für mich ein Ausgleich und Motivation waren.

- der DFG danke ich für die Finanzierung der Forschungsprojekte und der Bereitstellung des 3D-Pulverdruckers, was es mir ermöglichte diese interessante Arbeit durchzuführen.
- Herrn Dr. Felix Breuer und Herrn Morwan Choli vom Lehrstuhl der experimentellen Physik 5 der Universität Würzburg danke ich für die Hilfestellung und Betreuung bei der Durchführung der MRT-Messungen.
- Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Hannelore und Otmar Vorndran, meiner Schwester Birgit und meinen engen Freunden Karin und Andreas, Nicole, Nauka und Agnes die mich immerwährend unterstützen, an mich glauben und stets für die nötige Abwechslung sorgen.