

**Entwicklung und Charakterisierung
eines hochporösen Formkörpers zum Einsatz als
Knochenaufbaumaterial**

Dissertation
zur
Erlangung des akademischen grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Sven Radefeldt

aus Rostock

Rostock, 04.06.2010

Gutachter: Prof. Dr. Katrin Sternberg
Prof. Dr. Thomas Gerber

Tag der Verteidigung: 10. Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Struktur und Funktion des Knochens	9
2.1	Hauptbestandteile des Knochens	10
2.2	Knochenzytologie	11
3	Experimentelle Untersuchungsmethoden	13
4	Knochenersatzwerkstoffe biologischen und synthetischen Ursprungs	15
4.1	Resorption	15
4.2	Moderne Knochenersatzmaterialien - ein Überblick	17
4.3	<i>Bio-Oss</i> [®]	19
5	Die Struktur von <i>NanoBone</i>[®]-Granulat	23
5.1	Strukturuntersuchungen	23
5.2	Resorptionsprozeß <i>in vivo</i>	27
6	Entwicklung des Formkörpers	31
6.1	Der Sol-Gel-Prozeß	32
6.1.1	Allgemeine Beschreibung der Strukturbildung im Sol	32
6.1.2	Viskosität	35
6.1.3	Kleinwinkelstreuung fraktaler Strukturen	37
6.1.4	Primärteilchennetzwerk und Clusterbildung	39
6.1.5	Strukturänderung während der Temperaturbehandlung	44

INHALTSVERZEICHNIS

6.2	Hydroxylapatit	47
6.2.1	Stöchiometrisches Hydroxylapatit	47
6.2.2	Kalziumdefizitäres Hydroxylapatit	54
6.3	Herstellung des Gel-Apatit-Gemischs	56
6.4	Formkörper	58
6.4.1	Festigkeit des apatithaltigen Gelkörpers	58
6.4.2	Verfahren zur Herstellung eines makroporösen Formkörpers	66
6.4.3	Fertigung des makroporösen Formkörpers	68
6.4.4	Untersuchungen zur Festigkeit des Formkörpers	71
6.4.5	Die Porenstruktur	74
6.5	Experimente <i>in vivo</i>	79
7	Zusammenfassung und Ausblick	85
	Literaturverzeichnis	87
A	Material und Methoden	95
A.1	Röntgenkleinwinkelstreuung	95
A.2	Röntgen-Diffraktometrie	97
A.3	Festigkeitsprüfung	103
A.4	Tierexperimentelle Untersuchungen	105
A.4.1	Medizinische Versorgung	105

Kapitel 1

Einleitung

Knochendefekte und -verluste können traumatische Ursachen haben oder tumorbedingt sein, auch Erkrankungen wie Osteoporose können ursächlich für einen Knochenverlust sein. Der spontane Knochenheilungsprozeß des menschlichen Körpers ist nicht immer in der Lage, den entstehenden Defekt z.B. aufgrund seiner Größe zu überbrücken, was den Einsatz geeigneter Knochenersatzmaterialien erforderlich macht.

Der intakte Knochen wird durchblutet und unterliegt einem permanenten Umbauprozess, dem *remodelling*. Knochen ist als lebendes Organ "... ein faserverstärkter mineralischer Werkstoff in mehreren Ebenen hierarchischer Organisation im Nanoformat - durch Selbstaggregation der organischen Matrix und dadurch synerg beherrschte Ordnung des Kristallisats" [1]. Aufgrund seines komplizierten Aufbaus ist es bisher nicht gelungen, Knochen synthetisch herzustellen.

Als Standardverfahren zur Überbrückung knöcherner Defekte findet noch immer die Transplantation körpereigenen (also autogenen) Knochens Anwendung (sog. "Goldstandard" [2]). Die Zellen eines intakten Knochens werden über Blutgefäße versorgt. Bei transplantiertem Knochen kann eine Blutversorgung aber nicht erfolgen. Er wird deshalb grundsätzlich nur als Platzhalter für eine Gewebe- und Knochenneubildung dienen. Folgerichtig wird die Wirksamkeit autogenen Knochens bezüglich der Einheilung und der biomechanischen Belastbarkeit trotz des Ausbleibens immunogener Abwehrreaktionen in neueren Untersuchungen bezweifelt [3]. Dies begründet sich u.a. in der Auswertung von Tierexperimenten, bei denen beobachtet wurde, daß auch nach 24

Monaten keine vollständige Einheilung autogenen Knochens erfolgte [4].

Werden Knochenersatzmaterialien knöchern durchbaut, spricht man von Osteokonduktion. Wie autogener Knochen zeigen sowohl synthetische Knochenersatzmaterialien als auch Knochenersatzmaterialien bovinen Ursprungs (vom Rind) im Rahmen der knöchernen Regeneration osteokonduktives Verhalten [5]. Außerdem wird bei Übertragung von körperfremden Strukturen menschlichen oder tierischen Ursprungs neben etwaigen immunologischen Reaktionen auch die Gefahr der Übertragung von infektiösen Erkrankungen oder von fremden Proteinstrukturen (z.B. die Übertragung von Prionen: fibrilläre Proteinstrukturen, die als Verursacher spongiformer Enzephalopathien gelten → Creutzfeld-Jakobsche Krankheit) kontrovers diskutiert [6].

Hat ein Knochenersatzmaterial die Fähigkeit, die Knochenneubildung anzuregen, spricht man von osteoinduktivem Verhalten oder auch von einem Knochenaufbaumaterial. Das Ziel dieser Arbeit ist die Weiterentwicklung eines vorhandenen Knochenaufbaumaterials. Dabei handelt es sich um ein durch die "ARTOSS GmbH" bereitgestelltes hochporöses Material (*NanoBone*[®]-Granulat), durch das im menschlichen Körper die Knochenneubildung angeregt wird. Dabei erfolgt zunächst eine knöcherne Integration mit anschließendem *remodelling* [7]. Treten an den Defektregionen während der Einheilung Bewegungen auf, ist die knöcherne Integration gefährdet. Deshalb soll die Morphologie des implantierten Materials den anatomischen Ansprüchen des zu behandelnden Knochendefekts angepasst werden können. Ein Formkörper würde dem Anspruch einer variablen Morphologie gerecht werden. Um einen Formkörper zu entwickeln, soll im Rahmen dieser Arbeit die Struktur des Granulats und seiner einzelnen Bestandteile mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sowie der Röntgenkleinwinkelstreuung und der Pulverdiffraktometrie untersucht werden.

Damit ein Formkörper im menschlichen Organismus *remodell*t werden kann, muß er ein geeignetes Porensystem besitzen. Im Allgemeinen wird in Nano-, Mikro- und Makroporen unterschieden. Nanoporen sollen der "Maskierung" des Materials *in vivo* dienen. Körpereigene Proteine benetzen solche Poren [7]. *Leukozyten* mit einem Durchmesser von 7-20 μm sind nicht in der Lage, in diese Poren einzudringen. Deshalb erkennen sie jetzt das Ersatzmaterial nicht als Fremdkörper. Nach der Benetzung des Materials sol-

len Mikro- und Makroporen der Vaskularisierung des Ersatzwerkstoffes zur Verfügung stehen, wobei Mikroporen von kollagenem Fasergeflecht und Blutgefäßen durchwachsen werden sollen, während Makroporen außerdem die Durchbauung mit körpereigenem Knochen ermöglichen. Als Mikroporen werden Poren in der Größenordnung von 0.5-10 μm bezeichnet, Makroporen haben einen Durchmesser von 50 μm und mehr [8]. Es soll also ein Formkörper entwickelt werden, der stabil in einen zu behandelnden Defekt untergebracht werden kann, vom Immunsystem nach erfolgter Implantation nicht als körperfremd eingestuft wird und zur Teilnahme am *remodelling*-Prozeß optimale poröse Eigenschaften aufweist.

Kapitel 2

Struktur und Funktion des Knochens

Jeder Knochen ist von einer Knochenhaut, dem Periost, umgeben. Das Periost ist mit zahlreichen Blutgefäßen und Nervenfasern durchsetzt und ist Anhaltungsstelle für Bänder und Sehnen. Der Knochen selbst besteht aus einer äußeren Knochenrinde (Substantia compacta), der sich je nach Art des Knochens ein inneres schwammartiges Gewebe (Substantia spongiosa) anschließen kann. Bei der Neubildung von Knochen, der primären Ossifikation, wird zunächst der sogenannte Geflechtknochen ausgebildet. Mit anschließender mechanischer Beanspruchung wird dieser Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut.

Das Grundelement des Lamellenknochens bilden die Osteone (Havers-Systeme) (Abb. 2.1). Sie entstehen dadurch, daß Osteoklasten Knochensubstanz resorbieren. Danach werden die entstandenen Einlässe (Tunnel) im Knochen durch Osteoblasten mit Knochengewebe aufgefüllt.

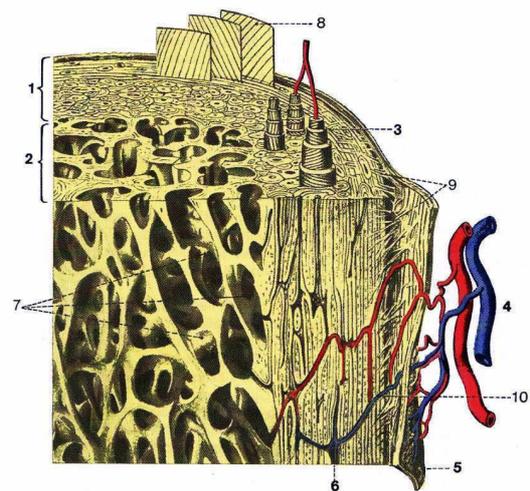


Abbildung 2.1: 1 - Substantia compacta 2 - Substantia spongiosa 3 - Osteon 4 - Blutgefäße 5 - Periosteum 6 - Zentralkanal (Havers-Kanal) 7 - erweiterte Havers-Kanäle in der Spongiosa 8 - äußere Generallamellen 9 - Fibrae perforantes (Sharpey-Fasern) 10 - vom Periost her in den "Volkmann-Kanal" eintretendes Blutgefäß (entnommen aus [9]).

In der Mitte dieser Tunnel verbleiben Blutgefäße, die für die Versorgung des umliegenden Gewebes zuständig sind.

Knochen als lebendes Organ ist ein gegen Zug, Druck, Biegung und Torsion belastbares Gewebe und unterliegt ständigen Umbauprozessen. Dadurch ist der Knochen in der Lage, kleine Schädigungen bis hin zum Bruch selbst zu heilen und sich unterschiedlichen mechanischen Belastungen anzupassen. Die Funktionen der Knochen sind neben der Stütz- und Schutzfunktion vielfältig. So dient der Knochen als Reservoir für 99% des Kalzium und 90% des im Körper gespeicherten Phosphors. Dadurch wird die Funktionsfähigkeit der Muskeln und Nerven gesichert.

2.1 Hauptbestandteile des Knochens

Neben einigen anderen Proteinen (Osteokinetin, Osteokalzin und Osteopontin) bildet Kollagen vom Typ I den Hauptbestandteil (90 – 95%wt.) der organischen Knochenmatrix (für Wirbeltiere sind zehn verschiedene Kollagentypen klassifiziert). Die Kollagenfasern setzen sich aus einzelnen Mikrofibrillen zusammen, die über eine extrem verformbare Klebeschicht miteinander verbunden sind [10]. Die Fibrillen sind in einer Tripel-Helix angeordnet und bestehen ihrerseits aus Tropokollagenmolekülen, deren Größe und Polypeptidzusammensetzung charakteristisch für den jeweiligen Kollagentyp ist. Im Fall des Kollagen Typ I besitzen sie eine Länge von etwa 300 nm und einen Durchmesser von etwa 1.5 nm [13]. Neugebildetes Kollagen nimmt nicht am Stoffwechsel teil, sondern unterliegt einem Alterungsprozeß, bei dem die Querverbindungen zwischen den Tropokollagenmolekülen stetig zunehmen.

In die beschriebene organische Matrix des Knochens sind verschiedene anorganische Bestandteile eingelagert. Hierzu zählen in großem Maße Kalzium und Phosphor. In weitaus geringeren Konzentrationen finden sich Carbonat, Natrium, Kalium, Magnesium, Fluor und Chlor. Das Hauptmineral des Knochens ist Hydroxylapatit ($Ca_5(PO_4)_3(OH)$). Chemisch reiner Hydroxylapatit kristallisiert monoklin mit der Raumgruppe $P2_1/b$ [14], biologischer Apatit kristallisiert hexagonal. Die hexagonale Struktur (Raumgruppe $P6_3/m$) wird bei Raumtemperatur durch Fremdionen im Kri-

stallgitter stabilisiert (Natrium und Magnesium [14]). Die Apatitplättchen sind etwa 50 nm lang und etwa 25 nm breit bei einer Dicke von etwa 5 nm [15]. Die Plättchen sind parallel (in Richtung der c-Achse) innerhalb der Kollagenfibrillen angeordnet (Abb. 2.2). Die geringe Größe der Apatitkristalle und ihre durch die Kollagenfibrillen vorgegebene Anordnung ist dabei für die hohe Belastbarkeit und Elastizität des Knochens von entscheidender Bedeutung ([10]).

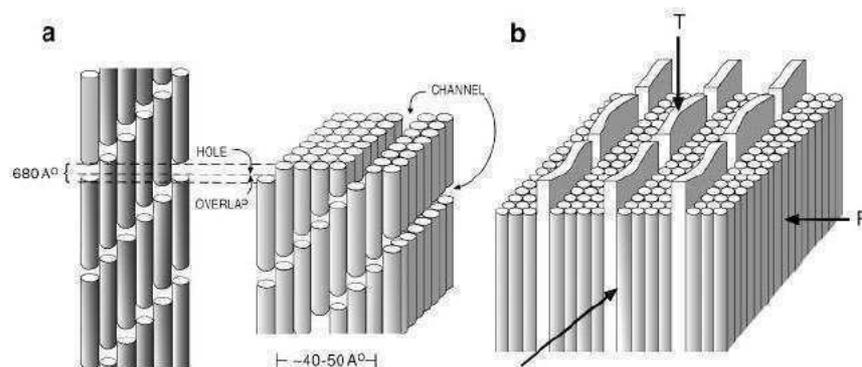


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Tripel-Helix-Moleküle der Kollagenmatrix des Knochens (Kollagen-Typ I). a) (linke Seite) Schnitt durch eine Fibrille von 1.5 nm Durchmesser; (rechte Seite) dreidimensionales Modell, das die Ausrichtung der Löcher zur Bildung eines Kanals zeigt, b) Modell, das die Einbettung der flachen Kristallite in die Kanäle zeigt. Die Pfeile zeigen die drei prinzipiellen Symmetrien. T ist vertikal zur Knochen-Längs-Achse ausgerichtet, P planparallel zur äußeren Oberfläche des Knochens (entnommen aus [16]).

2.2 Knochenzytologie

Osteoblasten sind der für den Aufbau des Knochens entscheidende Zelltyp. Sie entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (bindegewebige Vorläuferzellen) und befinden sich in der obersten Zellschicht auf der Oberfläche der Knochenbälkchen. Mit einer Größe von 20 - 25 μm produzieren sie einen Großteil der Proteine (u.a. Kollagen), die am Aufbau der extrazellulären Knochenmatrix (noch nicht mineralisierte Grundsubstanz des Knochengewebes, Osteoid) beteiligt sind. Außerdem regulieren Osteoblasten die Mineralisierung des Knochens durch die Absonderung kalziumphosphathaltiger Matrixvesikel. Dabei fungieren die zuvor synthetisierten Kollagenfibrillen als Keimbildner für die Minerale. Auf diese Weise bauen sich die Osteoblasten mit der Zeit in die Knochen-

matrix ein. Schließlich beenden sie ihre Aktivität und differenzieren sich zu Osteozyten, die über lange Fortsätze miteinander in Verbindung stehen. Nun besteht ihre Funktion in der Messung der mechanischen Belastung des Knochens und der Regulation des Gleichgewichts zwischen mineralisiertem und organischem Anteil des Knochens. Außer den genannten Funktionen beeinflussen die Osteoblasten die Aktivität der Osteoklasten. Man geht davon aus, daß über die Sekretion von Faktoren wie dem so genannten RANK-Liganden und Osteoprotegerin (beides sind Regulatorproteine) das Wachstum und die Differenzierung der Osteoklasten gesteuert werden (Abb. 2.3) [18].

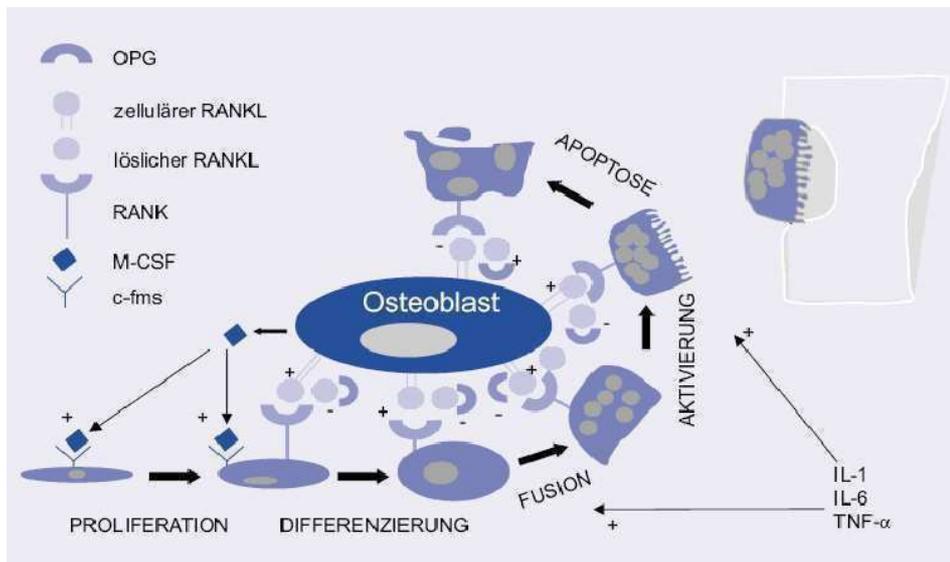


Abbildung 2.3: Regulation der Osteoklasten durch RANK-Ligand und Osteoprotegerin [18].

Bei den Osteoklasten handelt es sich um große (Durchmesser $D \approx 50 - 100 \mu m$), mehrkernige Zellen, die wahrscheinlich aus der Fusion mehrerer Blutmonozyten (im Blut zirkulierende Zellen des Immunsystems) hervorgehen [19]. Ein Osteoklast enthält zwei bis zehn Zellkerne und hat eine Größe von 50 bis 100 μm . Die Funktion besteht in der Resorption des Knochens. Dabei entstehen muldenförmige Resorptionshöhlen an der Knochenoberfläche, in denen meist mehrere Osteoklasten aktiv sind. Durch die Abgabe von Säuren (u.a. Salzsäure) werden die Apatitkristalle aus der Knochenmatrix herausgelöst. Die verbleibenden Strukturen werden dann mit Hilfe von Enzymen abgebaut. Die Aktivität der Osteoklasten wird neben dem Einfluss, den die Osteoblasten ausüben, durch verschiedene Hormone bestimmt. Nach einer Lebensdauer von 48 Stunden durchlaufen die Osteoklastenzellen den programmierten Zelltod (Apoptose).

Kapitel 3

Experimentelle

Untersuchungsmethoden

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können direkte Abbildungen der untersuchten Materialien angefertigt werden. Aufnahmen mittels Rasterelektronenmikroskopie erfolgten an einem Gerät 'DSM 960' (Zeiss). Dazu wurden die zu untersuchenden Materialien auf Aluminium-Tabs aufgebracht und mit Au- oder Au-Pd-Schichten besputtert. Die Oberflächenstrukturen der untersuchten Materialien wurden analysiert, indem die Oberfläche mit einem Elektronenstrahl abgetastet und Sekundärelektronen in Abhängigkeit vom abgetasteten Ort detektiert wurden.

Die Transmissionselektronenmikroskopie erfolgte an einem Gerät 'EM 912' (Zeiss/LEO), um im nm -Bereich Strukturinformationen über die untersuchten Materialien zu erhalten. Dazu wurden Proben in Epoxidharz eingebettet. Anschließend sind Schnitte mit einer Dicke von etwa 80 nm angefertigt worden. Der innere Aufbau der Materialien wird analysiert, im Fall des Apatits die Morphologie der Kristallite und ihre Orientierung im Verbund.

Die Röntgenkleinwinkelstreuung (*RKWS*) wurde genutzt, um Variationen der Dichte und dadurch die Größe von Strukturen im unteren nm -Bereich zu bestimmen. Die Methode der Röntgenkleinwinkelstreuung ist in der Literatur ausführlich beschrieben (z.B. [20] und [21]). Im Anhang A.1 werden einige grundlegende Aspekte zum besseren Verständnis der Auswertung der gemessenen Daten betrachtet.

Hydroxylapatit als Hauptbestandteil des Knochens und auch als Hauptbestandteil der vorgestellten Materialien hat einen kristallinen Aufbau. Deshalb wird im Weiteren die Methode der Röntgendiffraktometrie genutzt. Zur kristallographischen Strukturanalyse wurde das Computerprogramm *GSAS* genutzt. Hierbei lieferte die sogenannte Le-Bail-Extraktion Informationen über die Kristallitgröße. Das Rietveld-Verfahren wurde genutzt, um mittels der Variation der chemischen Zusammensetzung eine bessere Anpassung des theoretischen an das experimentelle Diffraktogramm zu erhalten. Die zum Verständnis der Durchführung der Analysen erforderlichen Informationen sind im Anhang A.2 dieser Arbeit zu finden.

Um zu überprüfen, über welche Festigkeit die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Materialien verfügen, wurden an einer servohydraulischen Prüfmaschine der Fa. 'MTS Systems Corporation' und an einer Universalprüfmaschine 'Zwick Z2.5/TN1S' der Fa. 'Zwick GmbH & Co.' Untersuchungen zur Druckfestigkeit vorgenommen. Das Prüfmaterial hatte in Abhängigkeit vom Herstellungsprozeß ein Volumen von 1 - 2 cm^3 und zeichnete sich durch eine hohe Sprödigkeit aus. Deshalb wird zur Auswertung der Meßdaten eine Weibull-Analyse durchgeführt. Diese wird im Anhang A.3 beschrieben.

Um die Porenverteilung zu analysieren, wurden die Proben mittels Quecksilberporosimetrie untersucht (Gerät: "PASCAL 440"). Dazu wird Quecksilber in Abhängigkeit vom ausgeübten Druck (400 MPa) in Poren unterschiedlicher Größe gepresst, wobei die kleinsten mit diesem Gerät zu bestimmenden Poren eine Größe von 1.8 nm haben. Um eine Aussage über die Größe der inneren Oberfläche zu erhalten, wurden außerdem *BET*-Messungen durchgeführt. Bei diesem Analyseverfahren wird Stickstoff in das zu untersuchende Material geleitet (Gerät: "SORPTOMATIC 1990"). Durch anschließendes Heizen der Probe werden adsorbierte Gasmoleküle von der Oberfläche gelöst. Mittels der Brunauer-Emmet-Teller-Gleichung wird die Größe der inneren Oberfläche aus einer Adsorptions-Desorptions-Isotherme bestimmt [23].

Die tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten erst nach der Entwicklung des Formkörpers. Deshalb wird die Durchführung dieser Experimente in Kap. 6.5 beschrieben.

Kapitel 4

Knochenersatzwerkstoffe biologischen und synthetischen Ursprungs

4.1 Resorption

Ein Knochenaufbaumaterial sollte Knochendefekte temporär überbrücken, d.h. es sollte abbaubar sein und die Osteogenese unterstützen. Die Resorption von Knochenersatzmaterialien kann im Organismus auf verschiedene Weise erfolgen:

1. resorptive Entzündung
2. chemische Lösungsprozesse
3. Knochen*remodelling*

Bei einer resorptiven Entzündung infiltrieren *Granulozyten* das eingebrachte Material [30]. *Granulozyten* sind weiße Blutkörperchen, deren Funktion in der unspezifischen Abwehr von Fremdkörpern liegt. Als "Fresszellen" sind sie in der Lage, daß Material in sich aufzunehmen und abzutransportieren.

Eine weitere und für den Einsatz von Knochenaufbaumaterialien sogar die meistgenutzte Möglichkeit der Resorption ist der Abbau des Ersatzmaterials durch chemische Lösungsprozesse. Hydroxylapatit hat im menschlichen Körper bei einer Temperatur von 37°C ein Löslichkeitsprodukt (LP) von $-\log[LP] = 58.6$ [31] und ist somit im

KAPITEL 4. KNOCHENERSATZWERKSTOFFE BIOLOGISCHEN UND SYNTHETISCHEN URSPRUNGS

lebenden Organismus praktisch unlöslich. Andere Kalziumphosphate haben ein wesentlich niedrigeres Löslichkeitsprodukt, z.B. α -Trikalziumphosphat $-\log[LP] = 25.5$ und β -Trikalziumphosphat $-\log[LP] = 29.5$ [31]. Knochenersatzmaterialien auf der Basis von Trikalziumphosphaten werden immer durch chemische Lösungsprozesse abgebaut. Da mit dem Lösungsprozeß eine Erhöhung des Kalziumspiegels im Blut verbunden ist, sei an dieser Stelle bemerkt, daß ein konstanter Kalziumspiegel im Blut von physiologisch erheblicher Bedeutung ist. Viele Stoffwechselreaktionen werden durch Ca^{2+} -Ionen aktiviert, indem diese an verschiedene Proteine binden. Muskelkontraktionen, Zellteilung, Blutgerinnung, Erregungsübertragung in den Synapsen und weitere Prozesse werden durch die Beteiligung von Ca^{2+} möglich. Der Normalwert des Blutkalziumgehaltes im menschlichen Körper beträgt 10 mg auf ein Volumen von 100 ml . Die Verwendung leicht löslicher Kalziumphosphate ist nicht vorteilhaft, wenn man bedenkt, daß ein Anstieg des Blutkalziumgehaltes zu einer Störung vieler intrazellulärer Stoffwechselprozesse führt und bei einem zu starken Anstieg schließlich Kalkeinlagerungen in Blutgefäßen und Nieren zur Folge hat.

Wie beschrieben ist Hydroxylapatit im menschlichen Körper bei einer Temperatur von $37^\circ C$ und einem pH -Wert von $pH = 7$ im Gegensatz zu den genannten Trikalziumphosphaten praktisch unlöslich. Fälschlicherweise wird deshalb oft von einer schlechten Biodegradierbarkeit von Hydroxylapatit gesprochen (z.B. [33]). Hydroxylapatit kann nur über Osteoklasten abgebaut werden. Das würde zwangsläufig den Neuaufbau des Knochens über Osteoblasten bedingen, da diese beiden Vorgänge voneinander abhängig sind. Durch die Teilnahme eines Knochenersatzmaterials an diesem Knochenremodelling wäre ein bestehender Knochendefekt optimal versorgt und hätte keine Störung des physiologischen Gleichgewichts zur Folge.

4.2 Moderne Knochenersatzmaterialien - ein Überblick

In Tabelle 4.1 sind einige von verschiedenen Herstellern angebotene Knochenersatzmaterialien aufgeführt. Die allgemeinsten Eigenschaften der Vertreter jedes Tabellenabschnitts werden näher beschrieben.

Tabelle 4.1: Übersicht einiger aktuell verfügbarer Knochenersatzmaterialien und ihrer wichtigsten Eigenschaften (gemäß Herstellerangaben). 1=Bioglass[®], 2=Trikalziumphosphate, 3=biphasische Kalziumphosphate, 4=gesinterte Hydroxylapatite, 5=(nano)poröse Materialien.

	Präparat	Hersteller	Herkunft	Zusammensetzung
1	<i>Perioglas</i> [®]	NovaBone Products	synthetisch	SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5
	<i>Biogran</i> [®]	Biomet GmbH	synthetisch	SiO_2 , CaO , Na_2O , P_2O_5
2	<i>BioBase</i> [®]	Biovision GmbH	synthetisch	α -TCP
	<i>Cerasorb</i> [®]	Curasan AG	synthetisch	β -TCP
3	<i>OssFi Regenium</i> [®]	Equinox Medizintechnik Deutschland Ltd. & Co. KG	synthetisch	70% HA, 30% β -TCP,
	<i>Bi-Ostetic</i> [®]	Berkeley Advanced Biomaterials	synthetisch	60% HA, 40% β -TCP,
4	<i>Osteograf/N.</i> [®]	CeraMed Dental	bovine Spongiosa	HA
	<i>Cerabone</i> [®]	aap Implantate AG	bovine Spongiosa	HA
5	<i>BONIT</i> [®] <i>matrix</i>	DOT GmbH	synthetisch	HA, β -TCP, SiO_2
	<i>Bio-Oss</i> [®] <i>NanoBone</i> [®]	Geistlich Pharma AG Artoss GmbH	bovine Spongiosa synthetisch	HA HA, SiO_2

KAPITEL 4. KNOCHENERSATZWERKSTOFFE BIOLOGISCHEN UND SYNTHETISCHEN URSPRUNGS

Bei Biogläsern erfolgt ein Anwachsen von vitalem Gewebe an das implantierte Bioglas auf der Grundlage von Ionenaustauschreaktionen mit dem umgebenden biologischen Medium [5]. Im Fall von *Perioglas*[®] spricht der Hersteller von einer vollständigen Resorbierbarkeit des Materials. Auch *Biogran*[®] wird lt. Herstellerangaben vollständig resorbiert. Biogläser verfügen über eine hohe Stabilität und sind dem Material *45S5 Bioglass*[®] von Professor Hench nachempfunden. Die Reaktion *in vivo* wird wie folgt beschrieben [34], [35]:

Im ersten Schritt gehen Natrium-Ionen verloren, was mit dem Austritt von Wasserstoff verbunden ist (H^+ oder H_3O^+). Diese Reaktion erfolgt im Gewebe innerhalb weniger Minuten nach Benetzung mit Körperflüssigkeit. In der Folge bricht das SiO_2 -Netzwerk zusammen. Die SiO_2 -Struktureinheiten lagern sich an der Oberfläche in $Si(OH_4)$ -Gruppen an. Die gebildete Oberflächenschicht ist hochporös mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 30 bis 50 Å und einer effektiven Oberfläche von $100 \frac{m^2}{g}$. Nach Bildung der silikatreichen Schicht bildet sich eine Schicht mit amorphem Kalziumphosphat aus. Jetzt werden organische Bestandteile aus dem Blut adsorbiert (Proteine). Innerhalb von 3 bis 6 Stunden kristallisiert die Kalziumphosphatschicht zu einer Hydroxykarbonat-Apatitschicht, die im weiteren Verlauf eine Dicke von bis zu 100 µm aufweisen kann. Diese Schicht ist dem natürlichen Knochen in Struktur und chemischer Zusammensetzung sehr ähnlich und erlaubt eine mechanisch stabile Verbindung zwischen dem Bioglas-Implantat und dem Knochen.

Wie Biogläser zeichnen sich auch gesinterte Hydroxylapatite durch eine hohe Stabilität aus [5]. Die Herstellung gesintertter Hydroxylapatite erfolgt in der Regel auf Basis von boviner Spongiosa. Der bovine Knochen muß durch unterschiedliche chemische oder thermische Verfahren von seinen organischen Komponenten befreit werden. Im Anschluß daran wird er thermisch gesintert. Gesinterte Hydroxylapatite werden nur sehr langsam bzw. gar nicht abgebaut [5]. Aufgrund des nicht resorbierbaren Anteils in Hydroxylapatitkeramiken wird die Stabilität des Knochenregenerates ungünstig beeinflusst, was eine Indikation nicht empfehlenswert macht [39].

Trikalziumphosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) haben im Gegensatz zu Hydroxylapatit ein deutlich geringeres Löslichkeitsprodukt. Im Organismus, also bei $pH = 7$, unterliegen sie

chemischen Lösungsprozessen, die zum Abbau des Materials führen. Auf diese Weise erfolgt eine zügige Resorption des Ersatzwerkstoffes. Im Fall von *Cerasorb*[®] wurde neun Monate nach Implantation festgestellt, daß der verwendete Ersatz vollständig abgebaut war, während Knochenneubildung fast vollständig ausblieb [40].

Biphasische Kalziumphosphate sind aufgrund des geringen Löslichkeitsprodukts von β -TCP zumindest partiell abbaubar. Wie Biogläser und gesinterte Hydroxylapatite wirken diese Ersatzmaterialien lt. Herstellerangaben osteokonduktiv und dienen somit in jedem Fall als Leitschiene für neugebildeten Knochen.

4.3 *Bio-Oss*[®]

Bio-Oss[®] als Vertreter der nanoporösen Materialien wird aus boviner Spongiosa gewonnen und besteht deshalb aus Hydroxylapatit. Das nach Entfernen des organischen Anteils verbliebene Hydroxylapatit wird nicht gesintert. Das Material ist lt. Herstellerangaben optimal geeignet, die Bildung neuen Knochengewebes zu fördern. Die 'Geistlich Pharma AG', die dieses Material bereitstellt, ist europäischer Marktführer im Bereich der Knochenersatzmaterialien für orale Anwendungen. Deshalb wird *Bio-Oss*[®] im Folgenden vorgestellt.

Die zur Herstellung von *Bio-Oss*[®] verwendete bovine Spongiosa wird gereinigt und mechanisch zerkleinert. Das in der Spongiosa enthaltene organische Material wird durch ein chemisches Verfahren entfernt (in einer Offenlegungsschrift zu einem Patent wird ein möglicher Verfahrensweg erläutert [41]). Bei Untersuchungen mit dem Rasterelektronenmikroskop ist festzustellen, daß die resultierenden Bruchstücke in einer Größenordnung von mehr als zwei Millimetern vorliegen. Sie haben eine unregelmäßige, teils makroporige Gestalt ($> 100 \mu m$) und eine angeraute Oberfläche (Abb. 4.1 a) und b)). Bei weiterer Vergrößerung werden Poren sichtbar, deren Größe im Bereich von weniger als einem Mikrometer liegt (Abb. 4.1 c) und d)).

TEM-Aufnahmen zeigen die Nanostruktur von *Bio-Oss*[®]. Man findet Apatitkristallite, deren Anordnung Nanoporen bereitstellt (Abb. 4.2 a) und b)). Wie eine Untersuchung mittels Quecksilberporosimetrie zeigt, liegen sehr viele Poren in einer Größen-

KAPITEL 4. KNOCHENERSATZWERKSTOFFE BIOLOGISCHEN UND SYNTHETISCHEN URSPRUNGS

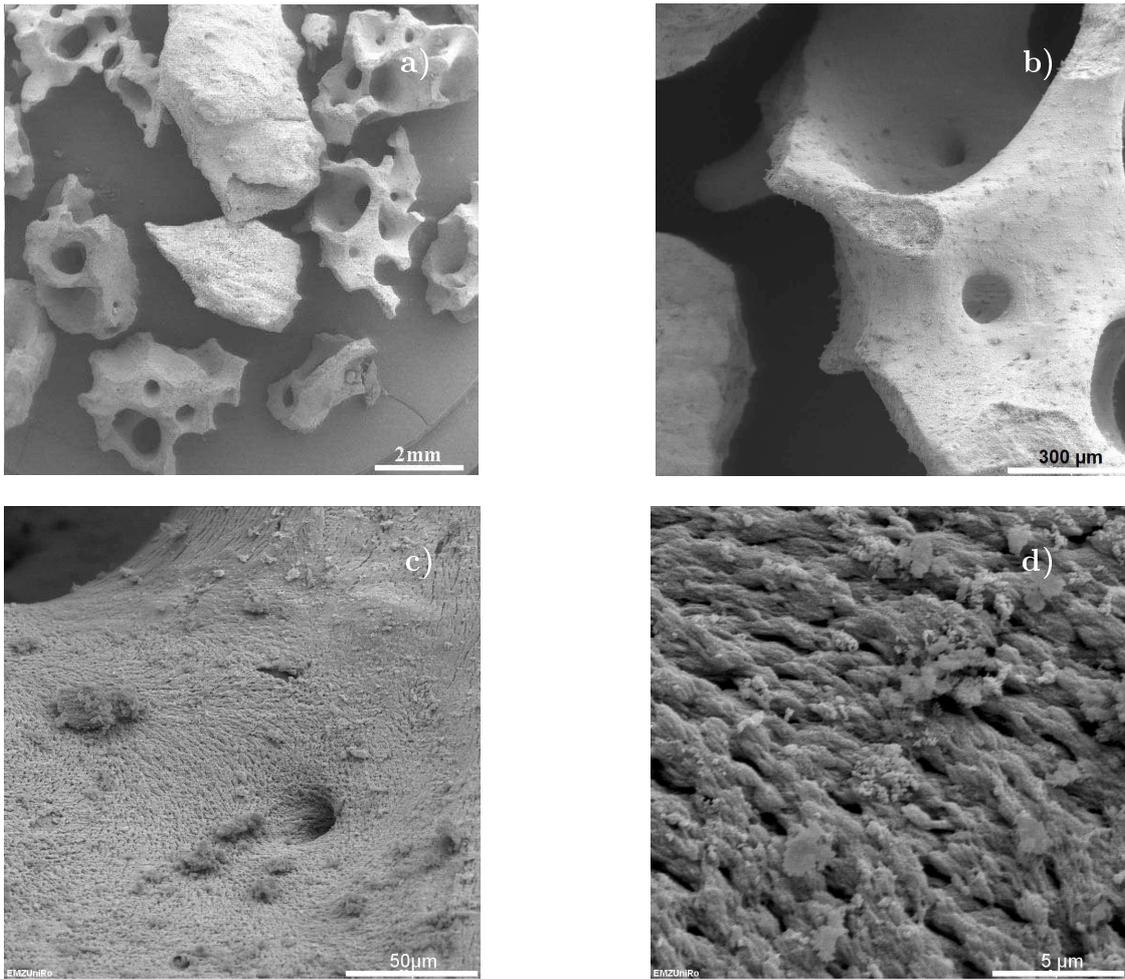


Abbildung 4.1: REM-Aufnahmen von Bio-Oss[®] in unterschiedlichen Vergrößerungen.

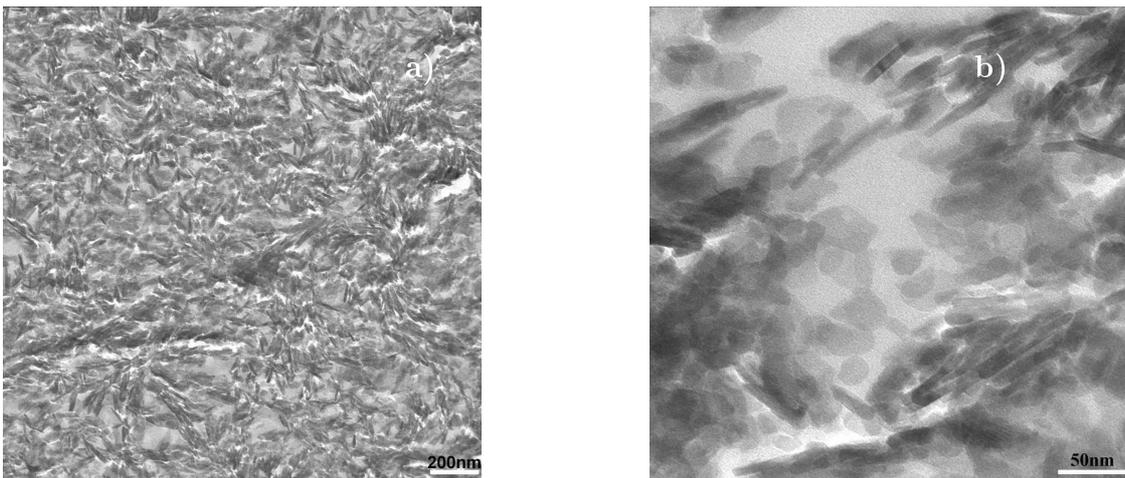


Abbildung 4.2: TEM-Aufnahmen von Bio-Oss[®] in unterschiedlichen Vergrößerungen.

ordnung von weniger als 50 nm vor (Abb. 4.3). Diese Nanoporen sind die Ursache für eine große innere Oberfläche des Materials *Bio-Oss*[®], die mittels *BET*-Messung festgestellt wurde ($64.6 \frac{m^2}{g}$). *Bio-Oss*[®] ist also ein nanoporöses Knochenersatzmaterial, das aufgrund seiner Porenstruktur nach einer Benetzung mit dem Blut des zu behandelnden Patienten vom Immunsystem nicht als körperfremd eingestuft werden kann.

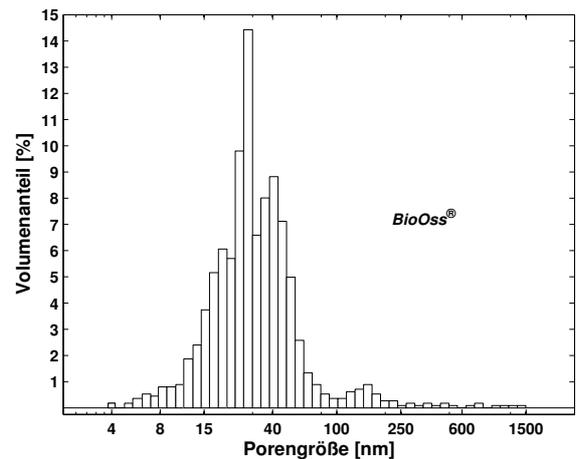


Abbildung 4.3: Porengrößenbestimmung von Bio-Oss[®] mittels Quecksilberporosimetrie.

Ein röntgenographischer Vergleich bestätigt, daß es sich bei der kristallinen Komponente von *Bio-Oss*[®] um Hydroxylapatit handelt. Die Beugungsreflexe des Ersatz-

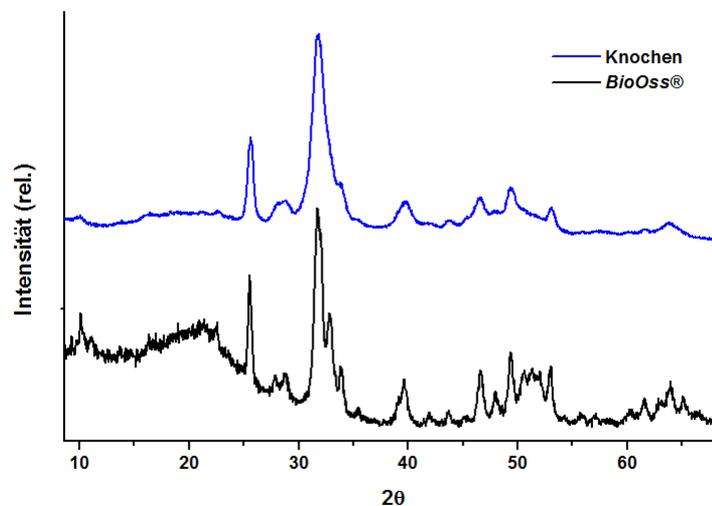


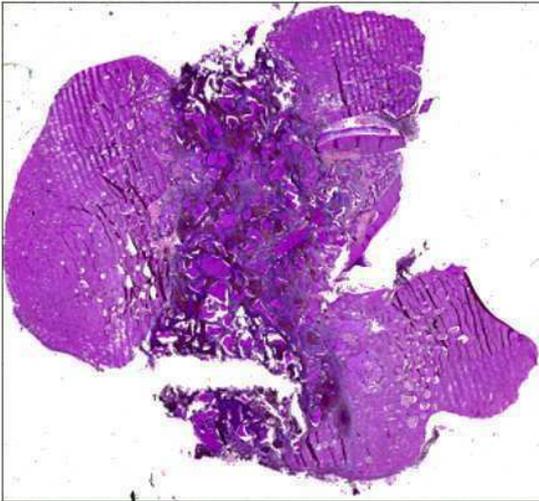
Abbildung 4.4: Röntgenographischer Vergleich von menschlichem Knochen und Bio-Oss[®].

materials sind schmäler und höher als die des Knochens, da die Apatitkristallite von *Bio-Oss*[®] größer sind als die des menschlichen Knochens.

Die Strukturbeschreibung von *Bio-Oss*[®] zeigt für das Material Eigenschaften, die es für den klinischen Einsatz optimal erscheinen lassen. Allerdings wird bei der klinischen

Anwendung von *Bio-Oss*[®] in der Regel nur ein "Leitschieneneffekt", nicht aber ein Abbau durch Knochenremodelling beobachtet [39].

Der Hauptbestandteil von *Bio-Oss*[®] ist Hydroxylapatit. Mittels EDX-Analyse konnten keine für Hydroxylapatit untypischen Elemente festgestellt werden. Eine Ana-



lyse mittels eines 'C/H/N/S-Analyzers True-spec Micro' der Fa. Leco erbrachte den Nachweis, daß *Bio-Oss*[®] einen Kohlenstoffanteil von $1.02 \pm 0.03\%$ hat. Die Herkunft des gefundenen Kohlenstoffanteils ist unklar. Es gibt verschiedene Untersuchungen, die die Präsenz von Proteinstrukturen und deren Aktivität nachgewiesen haben wollen (z.B. [42], [43]). Allerdings zeigte die Fa. "Geistlich" in einer

Abbildung 4.5: Histologischer Schnitt durch ein mit *Bio-Oss*[®] behandeltes Gewebe.

Gegendarstellung, daß es sich bei den vermeintlichen Proteinen um Missinterpretationen handelt (Pressemitteilung vom 24.06.2004, z.B. bei www.implantate.com). Außerdem bestätigte der Vorstand der DGZMK am 30.01.2006, daß die Fa. "Geistlich" den Nachweis erbracht hat, daß die zur BSE-Erreger-Inaktivierung geeigneten Bedingungen erreicht werden (Die DGZMK ist die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde).

In einem histologischen Schnitt durch einen mit *Bio-Oss*[®] behandelten Defekt (in einem 'Göttinger Minipig', angefertigt fünf Wochen nach Implantation) wurde das enthaltene Hydroxylapatit mit EDTA-Lösung entfernt. Im mittleren Bereich der Abbildung ist noch immer die granulatartige Struktur von *Bio-Oss*[®] zu erkennen. Wie in vielen Arbeiten (z.B. [39]) wurde also auch hier ein 'Leitschieneneffekt' von *Bio-Oss*[®] beobachtet. Der gefundene Kohlenstoff ist möglicherweise die Ursache dafür. Eine weitere mögliche Ursache ist die Tatsache, daß die Kristallite des in *Bio-Oss*[®] enthaltenen Apatits größer sind als die des menschlichen Knochens. Sie haben zwangsläufig eine geringere spezifische Oberfläche und Kristallite mit großer spezifischer Oberfläche werden leichter resorbiert als solche mit geringerer spezifischer Oberfläche [29].

Kapitel 5

Die Struktur von *NanoBone*[®]-Granulat

5.1 Strukturuntersuchungen

NanoBone[®]-Granulat ist ein hochporöses Material, in dem Hydroxylapatit von einer SiO_2 -Matrix umgeben ist. Die Granulatkörner liegen in einer lockeren Packung mit einer Schüttdichte von $0.35 \pm 0.1 \frac{g}{cm^3}$ vor und haben einen Durchmesser von 0.6 mm (Abb. 5.1 a-c) bzw. 1 mm (Abb. 5.1 d-f) bei einer Länge von 2 mm . Durch die tannenzapfenartige Struktur der Granulate werden bei ihrer Aneinanderlagerung Zwischenräume mit Größen von mehr als $100 \mu m$ bereitgestellt. Auf diese Weise wird eine Vaskularisierung, also das Einwachsen von körpereigenem Gewebe, insbesondere das Einwachsen von Blutgefäßen zur Versorgung neugebildeter Zellen, ermöglicht.

Die Oberfläche von *NanoBone*[®]-Granulat ist durch eine hohe Rauigkeit gekennzeichnet. Eine Mikrorauigkeit mit Strukturen und Poren in einer Größenordnung von $1 - 10 \mu m$ ermöglicht körpereigenen Zellstrukturen ein leichteres Anhaften, denn solche mikrorauen Elemente bieten eine bessere Angriffsfläche als glatte Objekte. Auf den gezeigten *REM*-Aufnahmen der *NanoBone*[®]-Granulate sind Agglomerate der SiO_2 -Matrix zu finden, durch die die Oberflächenstruktur begründet ist.

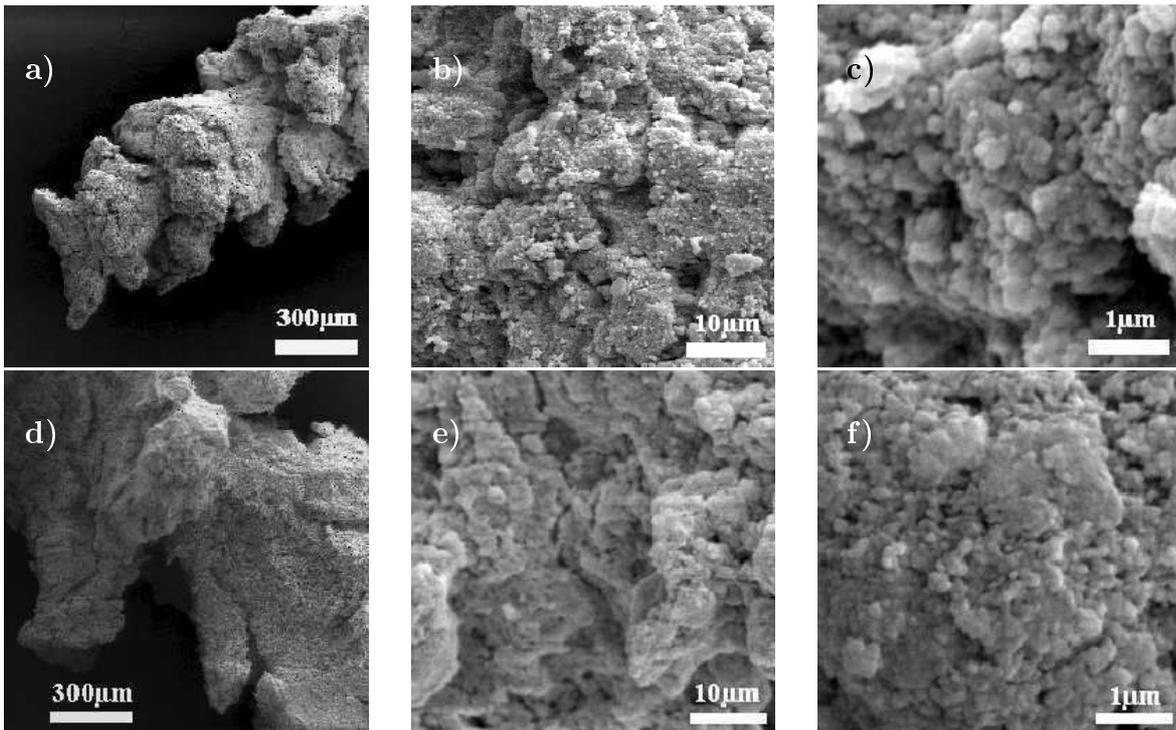


Abbildung 5.1: REM-Aufnahmen (am EMZ Universität Rostock) von NanoBone[®]-Granulat in unterschiedlichen Vergrößerungen. a),b),c) 0.6 x 2mm; d),e),f) 1 x 2mm.

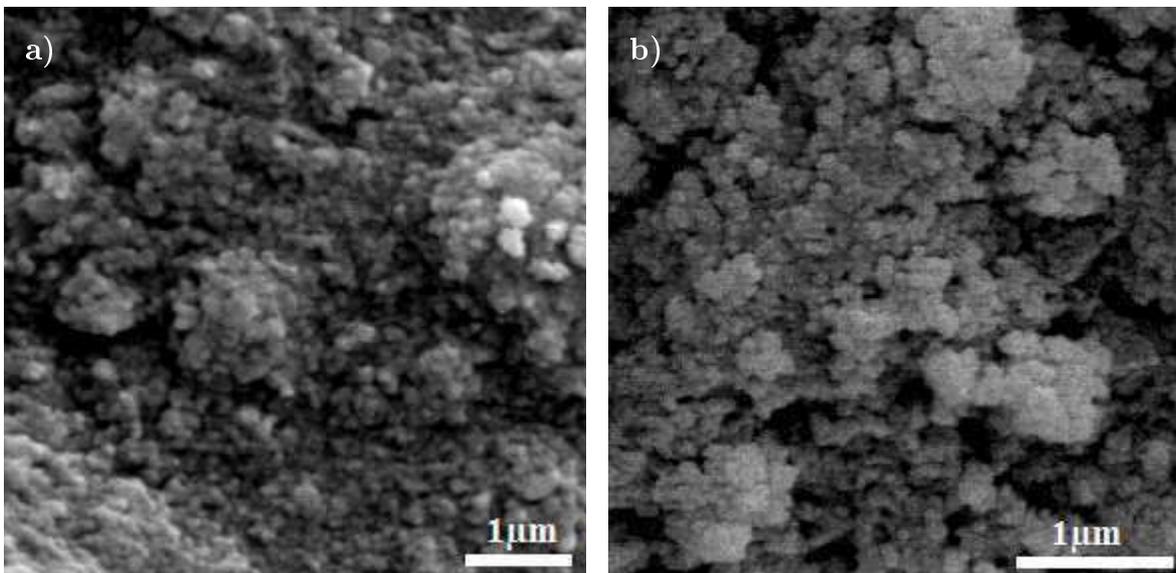


Abbildung 5.2: a) REM-Aufnahmen (am EMZ Universität Rostock) a) einer Bruchstelle von NanoBone[®]-Granulat, b) der SiO₂-Matrix nach Herauslösen des Apatits mittels EDTA-Lösung.

Zur Bestätigung dieser Annahme wurde eine Probe untersucht, aus der mit Hilfe von EDTA-Lösung das Apatit herausgelöst wurde. Die verbliebene SiO_2 -Matrix (Abb. 5.2 b)) zeigt dieselbe Struktur wie *NanoBone*[®]-Granulat (Abb. 5.2 a)). Der Vergleich einer *STEM*-Aufnahme von *NanoBone*[®]-Granulat (Abb. 5.3 a)) mit einer *TEM*-Aufnahme (Abb. 5.3 b)) des in der *STEM*-Aufnahme markierten Bereichs zeigt, daß man auch im unteren *nm*-Bereich Strukturen findet, die vom SiO_2 stammen. Von diesen SiO_2 -Strukturen ist das Apatit ummantelt. Die Rauigkeit der Oberfläche wird durch den Gelbildungsprozess dominiert.

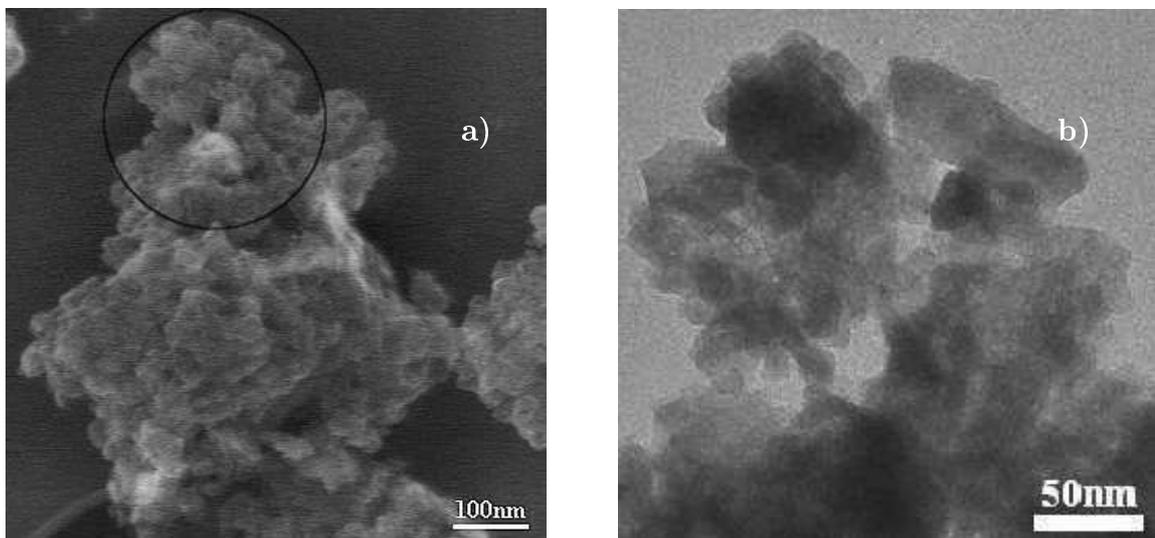


Abbildung 5.3: a) *STEM*-Aufnahme einer Bruchstelle von *NanoBone*[®]-Granulat, b) *TEM*-Aufnahme des in a) markierten Bereichs.

Um die durch die SiO_2 -Matrix gestaltete Oberfläche des Materials zu charakterisieren, wurde *NanoBone*[®]-Granulat in einem μ -CT untersucht [44]. Mit Hilfe des PC-Programms 'AMIRA' wurde eine Triangulierung durchgeführt. Dazu wurden auf der Oberfläche eines *NanoBone*[®]-Granulates Dreiecke verschiedener Größen verteilt, um anschließend die Anzahl der Dreiecke über die Größe der Dreiecke doppellogarithmisch aufzutragen (Abb. 5.4).

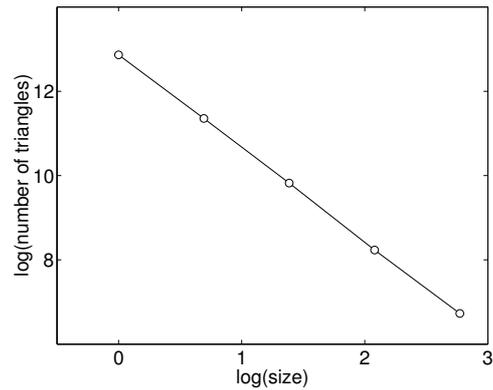
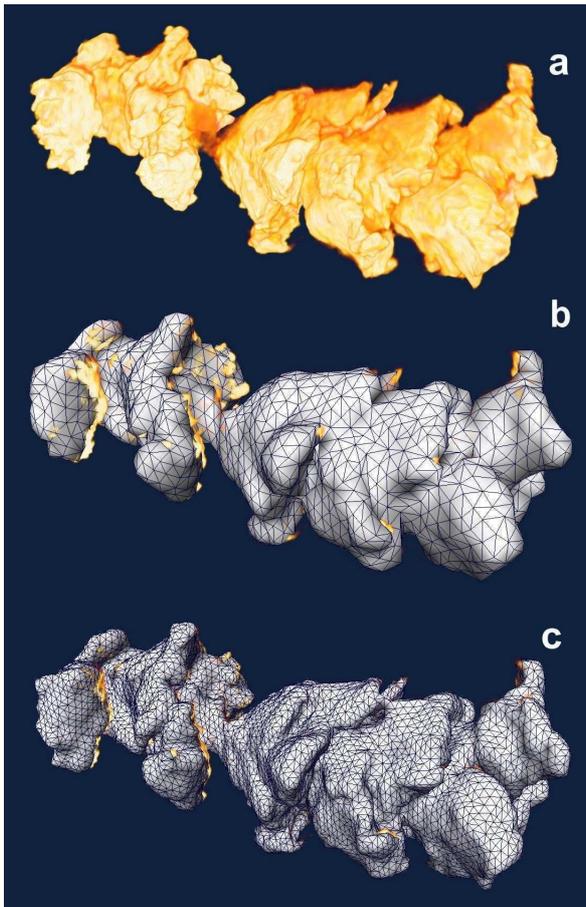


Abbildung 5.4: Links ist die Auswertung der Aufnahme der μ -Computer-Tomographie eines NanoBone[®]-Granulats mit Hilfe des PC-Programms 'AMIRA' gezeigt (a). Die Oberfläche dieses Granulats wurde mit Dreiecken verschiedener Größe ausgefüllt, (b) und (c). In der Graphik rechts oben ist der Logarithmus der Anzahl der die Oberfläche des Granulats auskleidenden Dreiecke über dem Logarithmus der Größe der Dreiecke aufgetragen [44].

Es wurde ein linearer Zusammenhang gefunden, die Oberfläche ist fraktal gestaltet. Der lineare Zusammenhang

$$D = - \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log(N(r))}{\log(r)} \quad (5.1)$$

wird Hausdorff-Dimension genannt. Für die Oberfläche wurde im μ -Meter-Bereich eine Hausdorff-Dimension von $D = 2.2$ festgestellt.

Um die Nanostruktur des Materials zu untersuchen, wurde mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung eine Messung an NanoBone[®]-Granulat durchgeführt (Abb. 5.5).

In der Streukurve liegen zwei Bereiche mit unterschiedlichem Anstieg vor. Aus dem Bereich größerer Streuvektoren, dem Porod-Bereich, erhält man Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit der streuenden Partikel. Rauhe Oberflächen können einen

fraktalen Charakter besitzen und in diesem Fall mit der fraktalen Dimension beschrieben werden. Unter der Kollimationsbedingung "unendlich langer Primärstrahl" gilt

$$\tilde{I} \sim q^{-(5-D_f)} \quad (5.2)$$

- I = Intensität
 q = Streuvektor
 D_f = fraktale Dimension der Oberfläche

Mit dem für den Porod-Bereich bestimmten Anstieg von $B = 2.82$ ergibt sich für die Oberfläche eine fraktale Dimension von $D_f = 2.2$. Der für den μ -Meter-Bereich festgestellte Zusammenhang setzt sich also bis in den Nanometer-Bereich fort. Aufgrund dieser Oberfläche wird offenbar ein guter Verbund zwischen körpereigenem Gewebe und dem Knochenaufbaumaterial gewährleistet.

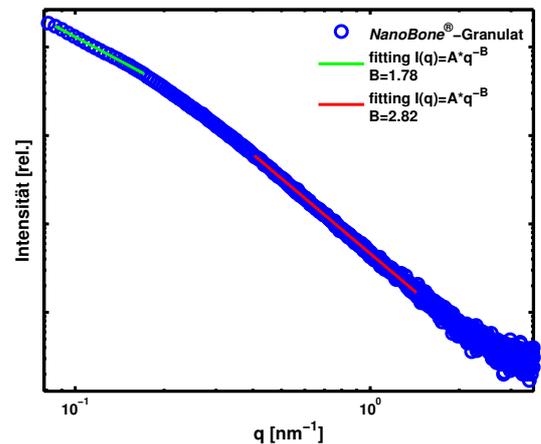


Abbildung 5.5: Kleinwinkel-Streukurve von *NanoBone*[®]-Granulat.

5.2 Resorptionsprozeß *in vivo*

Die SiO_2 -Matrix stellt ein ausgeprägtes Nanoporen-System bereit. Deshalb verfügt *NanoBone*[®]-Granulat mit $\approx 85 \frac{m^2}{g}$ über eine sehr große innere Oberfläche. Die SiO_2 -Matrix ist in einem Gelbildungsprozeß oberhalb des isoelektrischen Punktes entstanden und wurde in einer geeigneten Temperaturbehandlung vom Dispersionsmittel und von Rückständen befreit. Die Oberfläche der SiO_2 -Strukturen ist negativ geladen. Kommt das Blut des zu behandelnden Patienten mit dem Material in Kontakt, dringen im Blut enthaltene, positiv geladene Proteine in das Porensystem ein und benetzen die innere

KAPITEL 5. DIE STRUKTUR VON *NANOBONE*[®]-GRANULAT

Oberfläche. Dadurch erfolgt eine 'Maskierung' des Materials. Körperzellen sind nicht in der Lage, in das Nanoporen-System einzudringen. *Leukozyten* erkennen im Material die körpereigene Signatur der autologen Proteine und nicht den Fremdkörper.

Der Abbau von *NanoBone*[®]-Granulat erfolgt vielmehr über Osteoklasten. Diese sind jedoch nicht in der Lage, *NanoBone*[®]-Granulat in seiner Reinform zu degradieren, denn die bei der lokalen pH-Wert-Erniedrigung durch Osteoklasten bereitgestellten Protonen würden diese sofort in die SiO_2 -Matrix diffundieren. Auch deshalb wird das Granulat mit dem Blut des zu behandelnden Patienten benetzt. Auf diese Weise dringen positiv geladene Proteine in das Knochenaufbaumaterial ein. Anschließend wird die SiO_2 -Matrix durch Knochenmatrix ersetzt. In Tierversuchen an Göttinger Minischweinen (Masse $m = 20 - 25 \text{ kg}$) wurde *NanoBone*[®]-Granulat in Defekte einer kritischen Größe von $>5 \text{ cm}^3$ verbracht [7]. In einer EDX-Analyse ist fünf Wochen nach der Implantation kein Silizium nachweisbar (Abb. 5.6 a)).

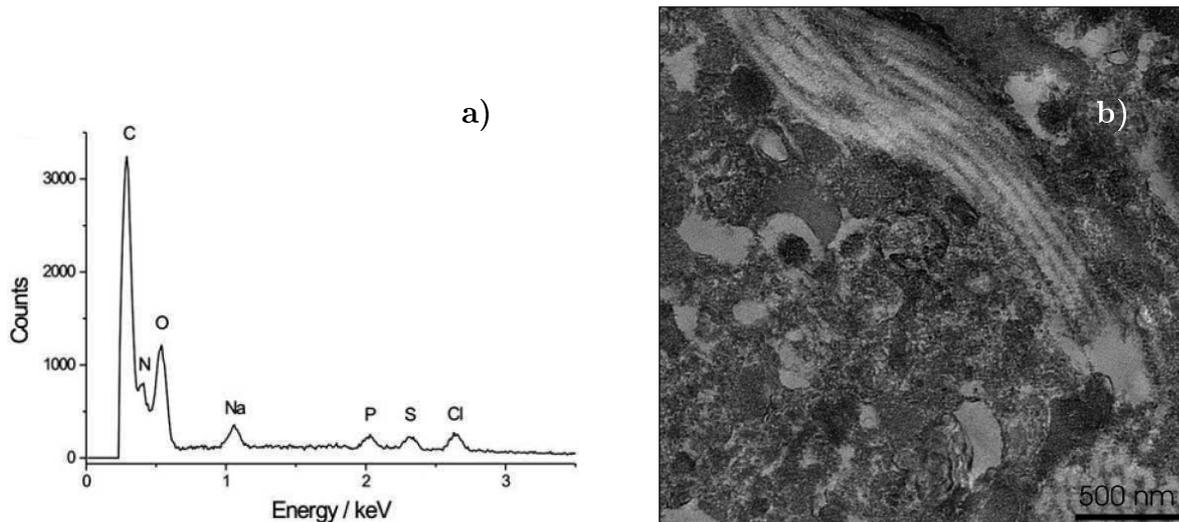


Abbildung 5.6: a) EDX-Analyse einer REM-Aufnahme von demineralisiertem Granulat und b) TEM-Aufnahme von demineralisiertem Granulat, das fünf Wochen in einem Defekt eines Göttinger Minipigs installiert war.

Bei Untersuchungen am TEM sind nur wenige kollagenartige, fibrilläre Strukturen zu finden (Abb. 5.6 b)). Deshalb wurde untersucht, welche organischen Komponenten die SiO_2 -Matrix ersetzt haben. Auf der Suche nach bestimmten Proteinen wurden

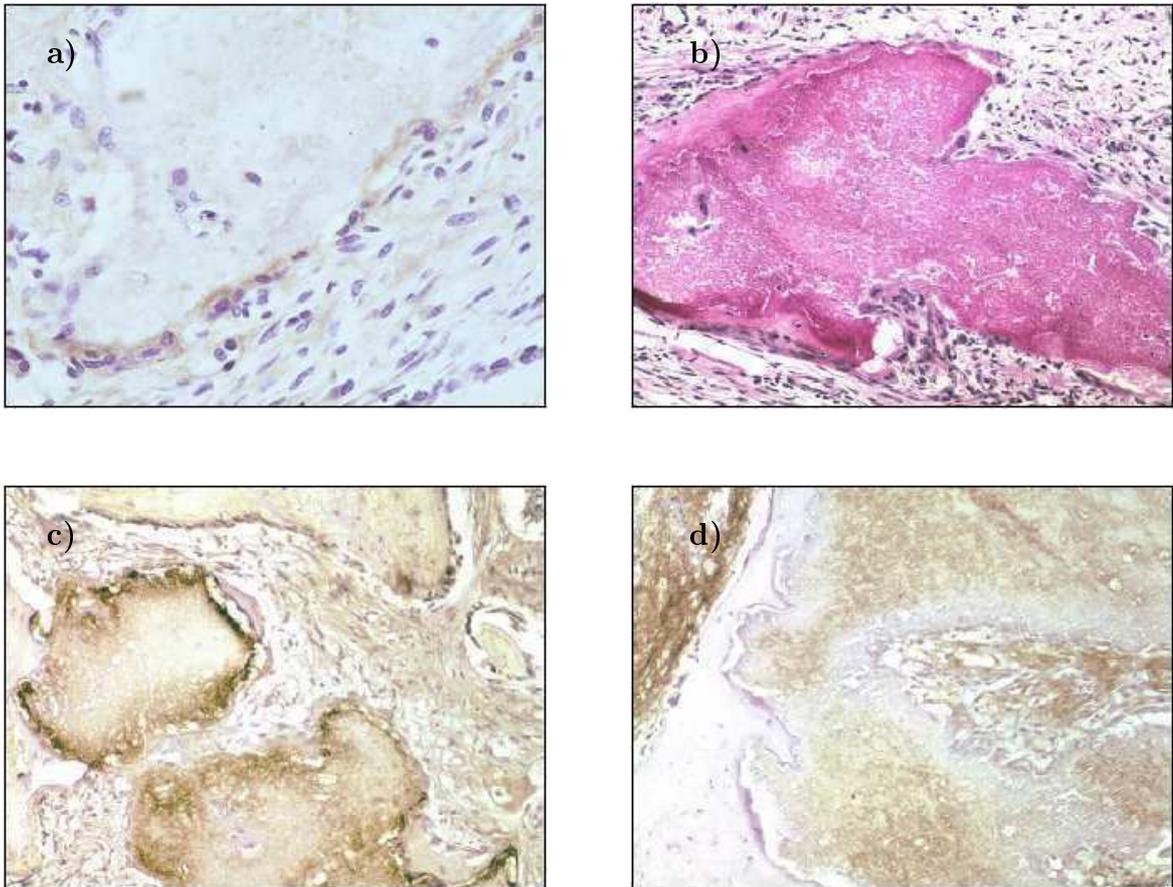


Abbildung 5.7: Histologische Schnitte von (ehemals) *Nano*Bone[®]-Granulat fünf Wochen nach Implantation [7]. a) BMP – 2-Färbung (braun). Das Protein induziert Knochen- und Knorpelbildung. b) PAS-Färbung von Glycoproteinen (Strukturproteine von Zellen, magenta-rot). c) Braun-Färbung von Osteocalcin (gebildet durch Osteoblasten). Dieser Marker für die Knochenbildung ist Bestandteil der extrazellulären, nicht kollagenen Knochenmatrix. d) Braun-Färbung von Osteopontin. Osteopontin stellt die Grundstruktur der extrazellulären Matrix von Knochen.

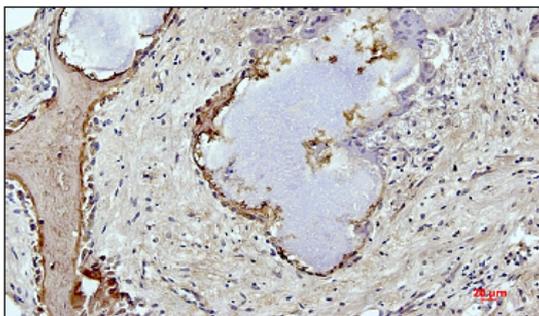


Abbildung 5.8: Histologischer Schnitt von (ehemals) *Nano*Bone[®]-Granulat fünf Wochen nach Implantation. Eingefärbt in Randgebieten des Granulats ist Kollagen Typ I [7].

histologische Schnitte des mit *NanoBone*[®]-Granulat behandelten Implantationsgewebes der Versuchstiere nach einer Entkalkung mit EDTA-Lösung immunhistochemisch gefärbt. Das Prinzip einer solchen Färbung beruht auf der Affinität bestimmter Proteine zueinander. Im Speziellen handelt es sich dabei um die spezifische Wechselwirkung zwischen dem nachzuweisenden Epitop und "seinem" Antikörper. Als Primärprotein wird letzterer mit einem Detektionssystem gekoppelt (= direkte Methode), um das Epitop *in situ* optisch sichtbar zu machen. Erfolgt die Detektion über die Zwischenstufe eines Sekundärproteins (sekundärer Antikörper), spricht man von der indirekten immunhistochemischen Methode. Auf diese Weise gelang der Nachweis von BMP-2 (**b**one **m**orphogenetic **p**rotein), Osteocalcin und Osteopontin (Abb. 5.7). Kollagen tritt nur in Randgebieten des Granulats auf (Abb. 5.8). Mit Hilfe der *PAS*-Färbung (*periodic acid shift's reaction*) wurden Glycoproteine histochemisch nachgewiesen.

Sämtliche der gefundenen Proteine und Zellstrukturen sind Bestandteile der extrazellulären Knochenmatrix, durch die die *SiO₂*-Matrix ersetzt wurde. Erst nachdem dieser Matrixwechsel stattgefunden hat, erfolgt die Resorption des Materials durch Knochen*remodelling*. Im Zuge dieses natürlichen Umbauprozesses wird *NanoBone*[®]-Granulat durch Osteoklasten abgebaut und neuer Knochen durch Osteoblasten aufgebaut. Der Matrixwechsel ist somit ein entscheidender Vorgang, denn "die organische Nanophase" eines Knochenaufbaumaterials "muß so geartet sein, daß sie die anorganische Kristallkeimbildung und das Kristallwachstum kontrolliert. Dazu muß sie in regelmäßiger Anordnung saure Gruppen tragen, die Bindungs- und Konzentrierungsort für das anorganische Kation bilden, an dem als Übersättigungsort und Keimzentrum das mineralische Material anschließt" [1]. Diesen Anforderungen kann die organische Matrix, die die *SiO₂*-Matrix ersetzt, in bester Weise entsprechen.

Kapitel 6

Entwicklung des Formkörpers

Ziel dieser Arbeit ist es, einen hochporösen Formkörper herzustellen, der in einem zu behandelnden Knochendefekt platziert wird. Er soll von körpereigenem Gewebe durchwachsen werden können. Der Formkörper soll mit einer Grundstabilität bereitgestellt werden, die im Optimalfall der des Knochens entspricht (trabekulärer Knochen hat eine Festigkeit von ca. 30 MPa [45]). Sie soll mindestens so hoch sein, daß ein Chirurg den Formkörper unbeschädigt in einen zu behandelnden Defekt einbringen kann. Als Richtwert für die Mindest-Druckfestigkeit von z.B. Knochenzementen wird in der DIN-Norm ISO 5833 ein Wert von 3 MPa angegeben. Dieser Wert stellt auch für den zu entwickelnden Formkörper den Mindestanspruch dar. Neben der Mindestfestigkeit soll die Resorbierbarkeit durch Teilnahme am Knochen*remodelling* gewährleistet werden. Ein Formkörper muß also Poren zur Verfügung stellen, die eine Vaskularisierung ermöglichen. Dadurch soll erreicht werden, daß die SiO_2 -Matrix *in vivo* durchgängig mit Proteinen besetzt und das Material als nicht körperfremd eingestuft wird. Um die Eigenschaften von *NanoBone*[®]-Granulat (Kap. 5) weitgehend auf den Formkörper zu übertragen, wird im Folgenden der Sol-Gel-Prozeß näher beleuchtet. In das Sol wird vor erfolgter Gelbildung Apatit eingebracht, daß während der Gelbildung mit amorphem SiO_2 ummantelt wird. Der Untersuchung der Strukturbildung im Sol schließt sich eine Analyse der Struktur der verwendeten Apatite an, bevor die Zusammenführung dieser beiden Komponenten untersucht wird. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen anschließend helfen, eine Schlußfolgerung für die Herstellung eines Formkörpers zu ziehen.

6.1 Der Sol-Gel-Prozeß

Sole sind kolloidale Partikel, die in einer Flüssigkeit dispergiert sind. Dabei liegt die Partikelgröße im unteren nm -Bereich [46]. Im Gegensatz zum Sol, wo sich die kolloidalen Teilchen nahezu frei bewegen, sind sie im Gel zu einem räumlichen Netzwerk verbunden. Dieses Netzwerk ist dadurch gekennzeichnet, daß die aus den Primärteilchen gebildeten fraktalen Cluster in Abhängigkeit von den Reaktionsparametern eine Packung oder ein Perkolationsnetzwerk bilden [20]. Die Herstellung eines Gels kann durch die Formation eines 3D-Netzwerkes bei gleichzeitiger Hydrolyse und Polykondensation von Alkoxysilanen erfolgen. Diese Methode der Gelbildung findet auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung, wobei *Tetraethoxysilan (TEOS)* verwendet wird.

6.1.1 Allgemeine Beschreibung der Strukturbildung im Sol

Die Hydrolyse- und Polykondensationsreaktionen von *TEOS* in alkoholischer Umgebung erfolgen gleichzeitig. Dabei wird deren Kinetik von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Folgende grundsätzliche Parameter haben Einfluß auf die Strukturbildung von SiO_2 -Gelen aus alkoholischer Lösung [47]:

r_W -Wert	→	Molverhältnis Wasser zu TEOS
r_S -Wert	→	Molverhältnis Katalysator zu TEOS
r_L -Wert	→	Molverhältnis Lösungsmittel zu TEOS (bzw. SiO_2 -Konzentration der Lösung)

Im Wesentlichen sind der pH-Wert, die Art und Konzentration des Lösungsmittels sowie die Temperatur entscheidende Parameter der Strukturbildung im Sol.

pH-Wert

Bei sauren Bedingungen führt eine positive Oberflächenladung kettenförmiger, zum Teil verzweigter Makromoleküle zu globulären Primärstrukturen, die sich ihrerseits perkolationsartig vernetzen. Basische Bedingungen fördern das Partikelwachstum, wobei hier Primärstrukturen mit einer Größe von bis zu 300 nm entstehen können [46].

Es werden drei Bereiche für den pH -Wert beschrieben [48]: pH -Wert unterhalb von 2, zwischen 2 und 7 und oberhalb von 7. Im Allgemeinen sind die Cluster bei niedrigem pH -Wert positiv, bei Höherem negativ geladen. Bei $pH = 2$ ist die Oberflächenladung 0 (isoelektrischer Punkt). Aufgrund dieser Kompensation der elektrischen Ladung der Kolloide ist die Mobilität gering. Es wird vermutet, daß unterhalb von $pH = 2$ die Alkoxygruppen protoniert werden, dadurch die Elektronendichte an den Siliziumatomen sinkt und somit die Kondensation ermöglicht wird. Oberhalb von $pH = 2$ erfolgt mit steigendem pH -Wert eine zunehmend negative Aufladung. Bei leicht sauren Bedingungen zwischen pH -Wert 2 und 7 liegen deprotonierte Silanolgruppen ($SiOH^-$) vor, deshalb ergibt sich hier ebenso wie bei $pH < 2$ eine gesteigerte Kondensationsrate.

Das führt zu stark verzweigten Partikeln und schließlich zu einem schwach verzweigten Netzwerk. Mit weiterer Erhöhung der negativen Ladung ist oberhalb von $pH = 7$ die Abstoßung schließlich so groß, daß es zu einer vermehrten Anlagerung einzelner Monomere an höher kondensierte Partikel kommt (Ostwald-Reifung). Die Partikelgröße nimmt zu, eine weitere Verzweigung erfolgt nicht. Im basischen Milieu gebildete Silikate weisen hochkondensierte, kolloidale Sol-Gel-Partikel auf. Ein saures Milieu bedingt die Bildung von kleinen, hochverzweigten Partikeln (Abb. 6.1) [48].

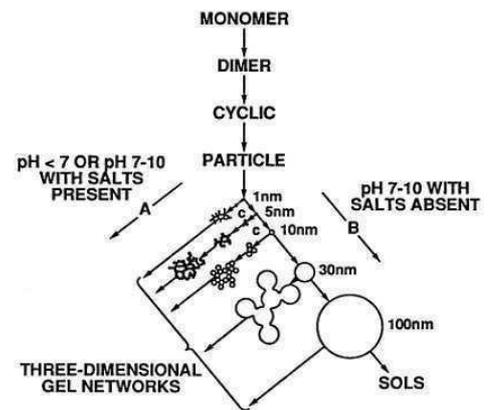


Abbildung 6.1: Strukturbildung im Sol in Abhängigkeit vom pH -Wert [48].

r_S - und r_W -Wert

Die Hydrolyse erfolgt auch ohne Zugabe von Katalysatoren, was je nach Solzusammensetzung Tage oder gar Wochen in Anspruch nehmen kann. Durch die Zugabe eines Katalysators wird die Hydrolyse deutlich beschleunigt und die anschließende Gelbildung erfolgt in wenigen Minuten bis Stunden. Je höher der r_S -Wert, desto höher ist die Anzahl der Primärteilchen. Dadurch erhält man mehr und kleinere Cluster. Allerdings läuft die Reaktion exotherm ab, und mit höherem r_S -Wert wird mehr Wärme erzeugt, was dann den Gelbildungsprozess zusätzlich beschleunigt.

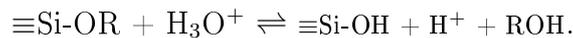
Bei einem geringen molaren Verhältnis von Wasser zu *TEOS* liegen mehr unreaktive Alkoxyliganden und deshalb eher kettenförmige Strukturen vor. Ein molares Verhältnis $Si(OR)_4$ zu H_2O von 1 : 1 bis 1 : 2 bzw. ein r_W -Wert von 1 bis 2 führt zu viskosen, verspinnbaren Solen [50]. Hier überwiegt die Kondensation unter Alkoholabspaltung, oberhalb von $r_W=2$ unter Wasserabspaltung. Ein steigendes molares Verhältnis von Wasser zu *TEOS* beschleunigt die Hydrolyse. Je höher der r_W -Wert, desto mehr *SiOH*-Gruppen werden gebildet. Das fördert die Bildung zyklischer Strukturen im Sol, führt allerdings zu längeren Gelbildungszeiten.

Hydrolyse

Die allgemeine Beschreibung der Hydrolyse nach [51] mit



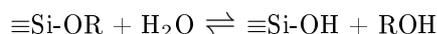
muß für säurekatalysierte Hydrolyse spezifiziert werden zu



Polykondensation

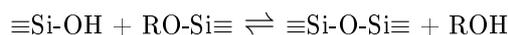
Zur vollständigen Hydrolyse eines Silanes werden vier Wassermoleküle benötigt. Da es zeitgleich zu Kondensationsreaktionen im Sol kommt, werden zwei Wassermoleküle wieder frei. Pro Silanmolekül werden demzufolge mindestens $4 - 2 = 2$ Wassermoleküle gebraucht. Trotzdem erfolgen auch bei Wasserüberschuß die Hydrolyse- und Polykondensationsreaktionen im Sol nur unvollständig, es entstehen viele Zwischenprodukte der Form $[SiO_x(OH)_y(OR)_z]_n$ (mit $2x+y+z=4$). Im Allgemeinen wird der Sol-Gel-Prozeß unter Verwendung der folgenden drei Reaktionen beschrieben [51]:

Hydroxylierung des Alkoxysilanes

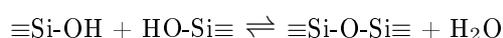


Die nachfolgenden Kondensationsreaktionen führen zu Siloxanbindungen.

Alkoholkondensation



Wasserkondensation



Entsprechend den dargestellten Reaktionsschemata erfolgt zunächst eine Polymerisation von Monomeren, was zur Bildung von Primärteilchen führt. Diese vergrößern sich und bilden fraktale Cluster. Diese wiederum lagern sich aneinander, was zu einem dreidimensionalen Netzwerk führt. Ausgehend von *TEOS* gelangt man also zu einem dreidimensionalen SiO_2 -Netzwerk, dessen Grundbaustein ein $[\text{SiO}_4]$ -Tetraeder ist.

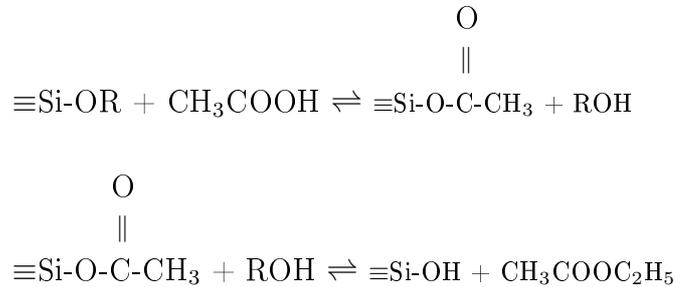
6.1.2 Viskosität

Die apatitummantelnde SiO_2 -Matrix wird im Sol-Gel-Verfahren bereitgestellt. *Tetraethylorthosilikat* (*TEOS*), Wasser und Essigsäure werden bei einem r_w -Wert von 6.65 und einem r_s -Wert von 0.25 unter starkem Rühren vermischt. Die Temperatur des Sols erreicht aufgrund der exothermen Hydrolysereaktionen ein volumenabhängiges Maximum, um mit zunehmender Reaktionsdauer wieder abzunehmen. Etwa zehn Minuten nach Erreichen des Maximums der Temperatur wird, da nunmehr zunehmend Kondensationsreaktionen und somit gelbildende Prozesse stattfinden, der pH -Wert mit Hilfe von Ammoniaklösung auf $pH = 4.2$ eingestellt. Jetzt kann die Strukturbildung im Sol bis zur Gelbildung untersucht werden.

Essigsäure gehört zu den "schwachen" Säuren, hat also eine hohe Protonenaffinität und deshalb einen deutlich niedrigeren Dissoziationsgrad als beispielsweise Salzsäure [52]. Dadurch können während der Hydroxylierung auch Acetylgruppen als temporäre

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Bindungspartner dienen, als Nebenprodukt entsteht dabei Essigsäureethylester. Es erfolgen zusätzlich zur Hydrolyse wahrscheinlich auch folgende Reaktionen [53]:



Bei der gewählten Sol-Zusammensetzung (r_w -Wert 6.65, r_s -Wert 0.25) sind die beschriebenen Reaktionsverläufe nach etwa zwei Stunden weitestgehend abgeschlossen, was eine erhebliche Verzögerung gegenüber der Hydrolyse bei Verwendung starker Säuren bedeutet. Im Fall von Salzsäure nehmen die Hydrolyse- und Polykondensationsreaktionen im Sol bei einem r_w -Wert von 4 und einem r_s -Wert von 0.1 einen Zeitraum von nur wenigen Minuten in Anspruch, weshalb der Wert $r_L = 0.22$ (Lösungsmittel Ethanol) zur Erhöhung der Gelbildungszeit gewählt wurde. Um den Zeitraum der Gelbildung des mit Essigsäure katalysierten Sols auszudehnen, wurde dieses Sol konstant bei einer Temperatur von 20°C gehalten. Auf diese Weise verblieb bis zum Erreichen des Gelpunktes beider Sole genügend Zeit, um sie in Quarz-Markröhrchen einzubringen und den Vorgang bis zur Gelbildung mittels Röntgen-Kleinwinkelstreuung zu untersuchen.

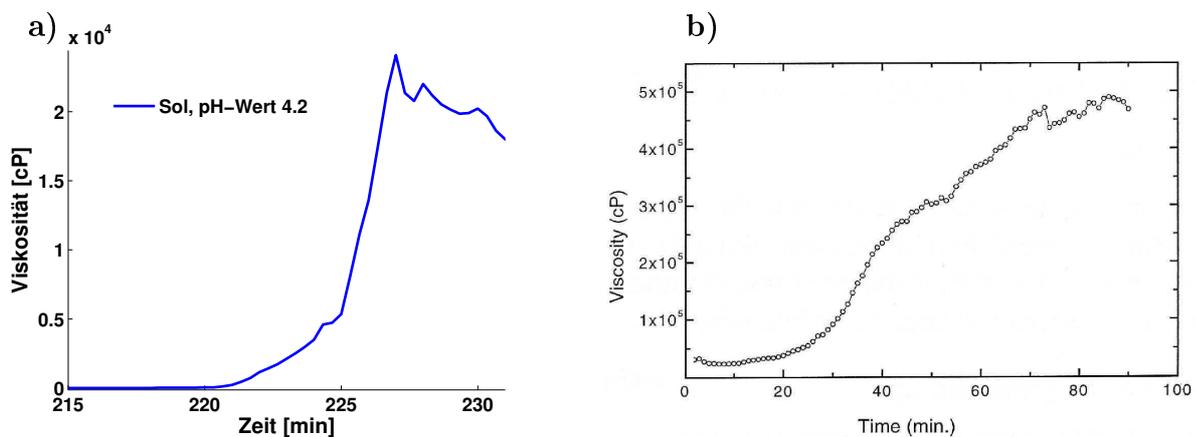


Abbildung 6.2: a) Viskositätsverlauf des vorgestellten Sols. b) Viskositätsverlauf eines ähnlichen Sols, bei dem Salzsäure als Katalysator verwendet wurde [54].

Während der Gelbildung nimmt die Viskosität des Sols zu. Der Vorgang wurde mit einem Rotationsviskosimeter ("Brookshield DV-II") verfolgt. Der Zeitpunkt, bei dem ein Maximum der Viskosität erreicht ist, wird als Gelpunkt festgelegt. Die Kondensationsreaktionen im Sol finden über einen Zeitraum von 220 Minuten statt, ohne daß eine Zunahme der Viskosität registriert wird.

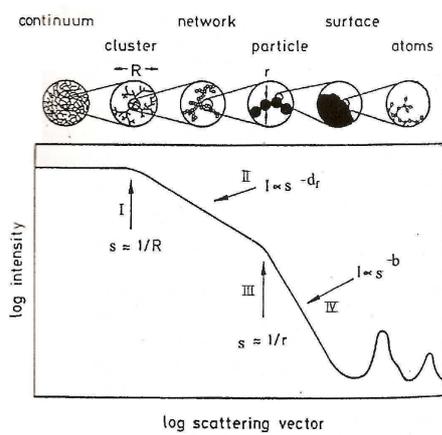
Der jetzt stattfindende Prozeß der Gelbildung erfolgt extrem schnell (Abb. 6.2a). Bei der Gelbildung des Sols, bei dem die Hydrolysereaktionen mit Salzsäure katalysiert wurden, liegt der Maximalwert der Viskosität deutlich höher (Abb. 6.2b), da hier die Viskosität kontinuierlich zunimmt und auch nach Abreißen der Spindel vom sich bildenden Gel erneute Gelbildung innerhalb eines hochviskosen Systems erfolgt. Im mit Essigsäure katalysierten Sol wird die Spindel nach dem ersten Abreißen vom Material nicht mehr von einem viskosen System umschlossen. Das ist bemerkenswert, denn der letzte gemessene Wert der Viskosität ist noch sehr gering. Das Sol wird innerhalb kürzester Zeit zum starren System. Mittels *RKWS* soll nun untersucht werden, ob der unterschiedliche zeitliche Verlauf der Viskosität unterschiedliche Strukturen zur Folge hat.

6.1.3 Kleinwinkelstreuung fraktaler Strukturen

Die theoretische Beschreibung der Aggregation in einem Sol kann mittels verschiedener Modelle erfolgen. Nach Mandelbrot stellt Selbstähnlichkeit ein übergreifendes Ordnungsprinzip für viele natürliche Phänomene dar. Sein fraktales Modell der Strukturen konnte sich auch bei der Beschreibung der Aggregationsmechanismen des Sol-Gel-Prozesses als wesentliches Hilfsmittel durchsetzen.

Für ein fraktales Gelnetzwerk ist der charakteristische Verlauf der Streuintensität über dem Streuvektor in Abb. 6.3 dargestellt. Die doppellogarithmische Darstellung zeigt einen Bereich mit konstantem Anstieg, aus dem die fraktale Dimension d_f ermittelt werden kann (Bereich II). Dieser proportionale Zusammenhang erstreckt sich über mehrere Größenordnungen und wird zu kleinen Streuvektoren durch den Guinierbereich der Cluster begrenzt.

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS



Für den in der Streukurve gezeigten proportionalen Zusammenhang (Bereich II) zwischen der Intensität I und dem Streuvektor \vec{q} gilt bei der Kollimationsbedingung "unendlich langer Primärstrahl"

$$\tilde{I} \sim q^{-(d_f-1)} \quad (6.1)$$

- I Guinier-Bereich ↔ Clustergröße
- II Linearer Abschnitt ↔ Fraktale Dimension d_f des Netzwerkes
- III Guinier-Bereich ↔ Primärteilchengröße
- IV Auslauf ↔ Oberfläche der Primärteilchen

Abbildung 6.3: Typischer Verlauf der RKWS-Streukurve eines durch ein fraktales Partikelnetzwerk gekennzeichneten Gels [55].

\tilde{I}	Streuintensität
q	Streuvektor
d_f	fraktale Dimension des Primärteilchennetzwerks.

Aus dem nun folgenden Auslauf (Bereich III) kann eine Aussage über die Beschaffenheit der Oberfläche der die Cluster zusammensetzenden Bausteine getroffen werden [20].

$$\tilde{I} \sim q^{-(5-D_f)} \quad (6.2)$$

\tilde{I}	Streuintensität
q	Streuvektor
D_f	fraktale Dimension der Oberfläche der Primärteilchen.

6.1.4 Primärteilchennetzwerk und Clusterbildung

Abb. 6.4 a) zeigt Streukurven, die im Rahmen einer Arbeit über Gelbildungsprozesse von aus Natriumwasserglaslösungen hergestellten Sols erfaßt wurden [20]. Solche

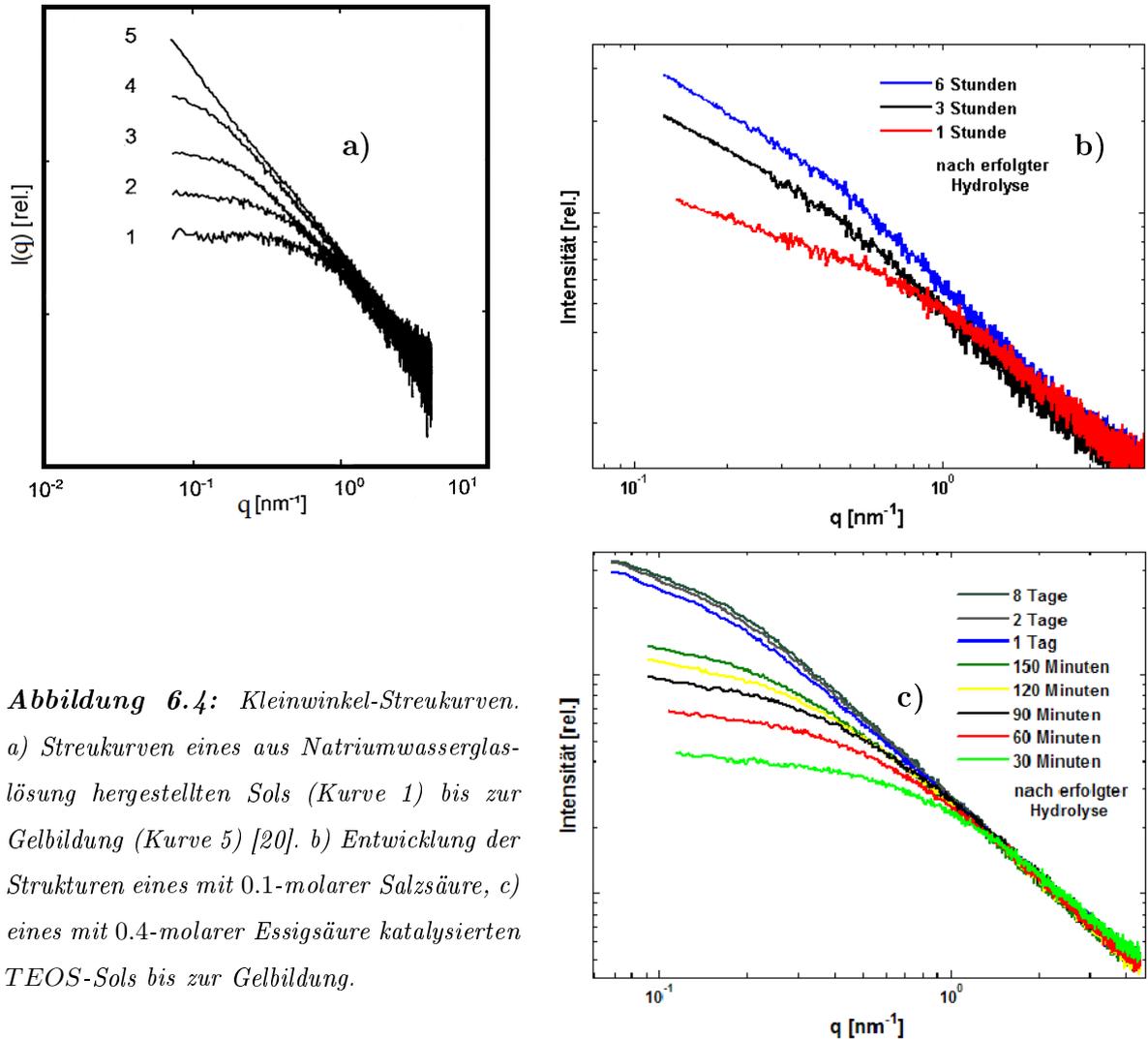


Abbildung 6.4: Kleinwinkel-Streukurven. a) Streukurven eines aus Natriumwasserglaslösung hergestellten Sols (Kurve 1) bis zur Gelbildung (Kurve 5) [20]. b) Entwicklung der Strukturen eines mit 0.1-molarer Salzsäure, c) eines mit 0.4-molarer Essigsäure katalysierten TEOS-Sols bis zur Gelbildung.

Streukurven sind für die Beobachtung eines Gelbildungsprozesses typisch. In einer Natriumwasserglaslösung sind kolloidale SiO_2 -Struktureinheiten vorhanden, deren Vernetzung aufgrund gegenseitiger Coulomb-Abstoßung verhindert wird, da sich an der Oberfläche der Kolloide Na^+ -Ionen befinden [56]. Die Ionen werden durch Fällung oder ein Ionenaustausch-Verfahren entfernt und auf diese Weise eine Vernetzung der Kolloide ermöglicht. Es sind zunächst Primärteilchen vorhanden, die zu einem fraktalen Netzwerk aggregieren (Abb. 6.4 a). Die gebildeten Cluster sind so groß, daß sie

nach erfolgter Gelbildung (Kurve 5) nicht innerhalb des Gesichtsfelds der Messung zu finden sind ($r_{max} = \frac{\pi}{q_{min}}$ [57] $\rightarrow r_{max} \approx 30nm$). Bei der Herstellung eines Sols aus einer Natriumwasserglaslösung ist mit 12%wt. ein Maximum der SiO_2 -Konzentration erreicht. Bei höheren Konzentrationen können Ionenaustauscher und Sol nicht vor der Gelbildung getrennt werden, da mit erhöhter SiO_2 -Konzentration die Gelbildungszeit sinkt [20].

In Abb. 6.4 b) ist die Entwicklung der Streukurve eines aus *TEOS* hergestellten Sols gezeigt, daß mit Salzsäure bei einem r_s -Wert von 0.1 katalysiert wurde. Bei einem r_w -Wert von 4 und einem r_L -Wert von 0.22 ist die Gelbildung nach etwa 90 Minuten abgeschlossen (vgl. Kap. 6.1.2). Als Lösungsmittel wurde Ethanol verwendet, da ohne Lösungsmittel eine zu rasche Gelbildung stattfand. Über einen Zeitraum von sechs Stunden steigt die Intensität im Bereich kleiner Streuvektoren an, was auf eine zunehmende Vernetzung der Primärteilchen hinweist, wobei die gebildeten Strukturen innerhalb des Gesichtsfeldes der Messung bleiben.

In Abb. 6.4 c) ist die Entwicklung der Streukurve eines weiteren aus *TEOS* hergestellten Sols gezeigt, daß allerdings mit Essigsäure katalysiert wurde. Bei der gewählten Sol-Zusammensetzung ($r_w = 6.65$, $r_s = 0.25$) ist die Hydrolyse mit der zusätzlichen Veresterungsreaktion (vgl. Kap. 6.1.2) nach etwa zwei Stunden weitestgehend abgeschlossen, was eine erhebliche Verzögerung gegenüber der Hydrolyse bei Verwendung starker Säuren bedeutet. Allerdings wurde kein zusätzliches Lösungsmittel benötigt. Die anschließende Gelbildung nimmt weitere 240 Minuten in Anspruch. Der Strukturbildungsprozeß wurde über einen Zeitraum von zwei Tagen beobachtet. Auch hier vernetzen sich die Primärteilchen zu fraktalen Strukturen, deren Größe ebenfalls innerhalb des Gesichtsfeldes der Messung liegt.

Aus den Streukurven wurden die Korrelationsfunktionen und Sehnenlängenverteilungen ermittelt (Abb. 6.5). Die mit dem Abstand r gewichteten Korrelationsfunktionen zeigen, daß insbesondere kleine Teilchen zur Streuung beitragen. In den Solen sind offenbar nur Primärteilchen vorhanden. Im zeitlichen Verlauf ändert sich die Größe der kleinsten Bereiche nicht. Die berechneten Sehnenlängenverteilungen haben in der Folge ein identisches Aussehen. Bei diskreten streuenden Objekten müßte die Seh-

nenlängenverteilung bei Null beginnen und ein Maximum in der Größenordnung des Guinierradius' der Primärteilchen haben [21]. Das wird allerdings nicht beobachtet, die streuenden Bereiche liegen nicht diskret vor.

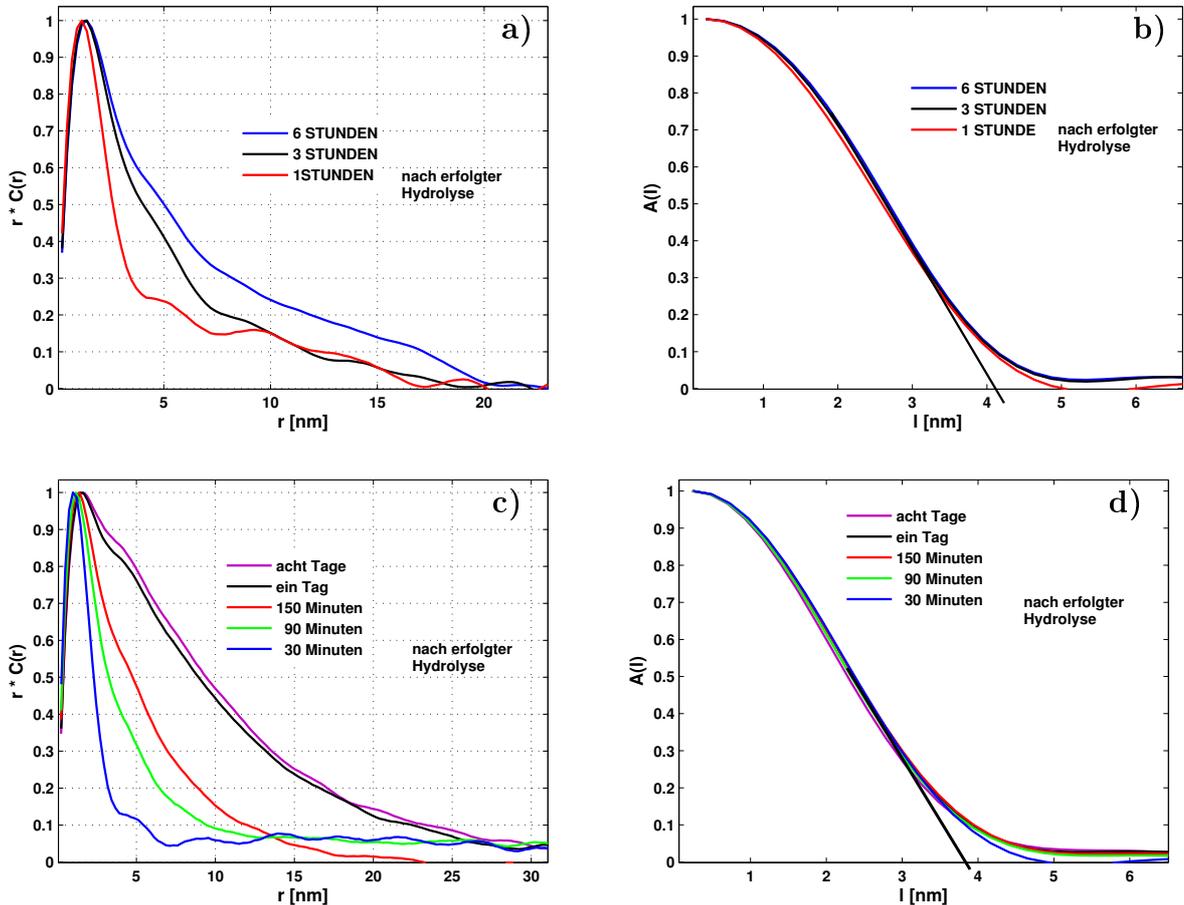


Abbildung 6.5: Mit Salzsäure katalysiertes TEOS-Sol: a) Korrelationsfunktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Hydrolyse, b) aus den Korrelationsfunktionen berechnete Sehnenlängenverteilungen. Mit Essigsäure katalysiertes TEOS-Sol: c) Korrelationsfunktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Hydrolyse, d) aus den Korrelationsfunktionen berechnete Sehnenlängenverteilungen.

Diese beiden Sole zeigen mit fortschreitender Gelbildung das Auftreten zunehmend größerer Strukturen. Dabei erfolgt der Gelbildungsprozess nahezu identisch. Aus den Streukurven ist ersichtlich, daß die Vernetzung der Primärteilchen zu fraktalen Strukturen aufgrund der hohen SiO_2 -Konzentration im Reaktionsvolumen räumlich begrenzt ist. Im Folgenden wird die Auswertung der Streukurven am Beispiel des mit Essigsäure katalysierten Sols durchgeführt.

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

In Abb. 6.6 a) ist gezeigt, wie die fraktale Dimension von Primärteilchennetzwerk und Clusternetzwerk bestimmt werden. Aus dem Kreuzungspunkt der linearen Bereiche der Streukurve in Abb. 6.6 b) wird für sphärische Teilchen mit $r = \frac{\pi}{q_r}$ der Radius definiert [58]. Clusterradius und fraktale Dimension des Clusternetzwerks sind in Abhängigkeit von der Gelbildungszeit aufgetragen (c) und d)).

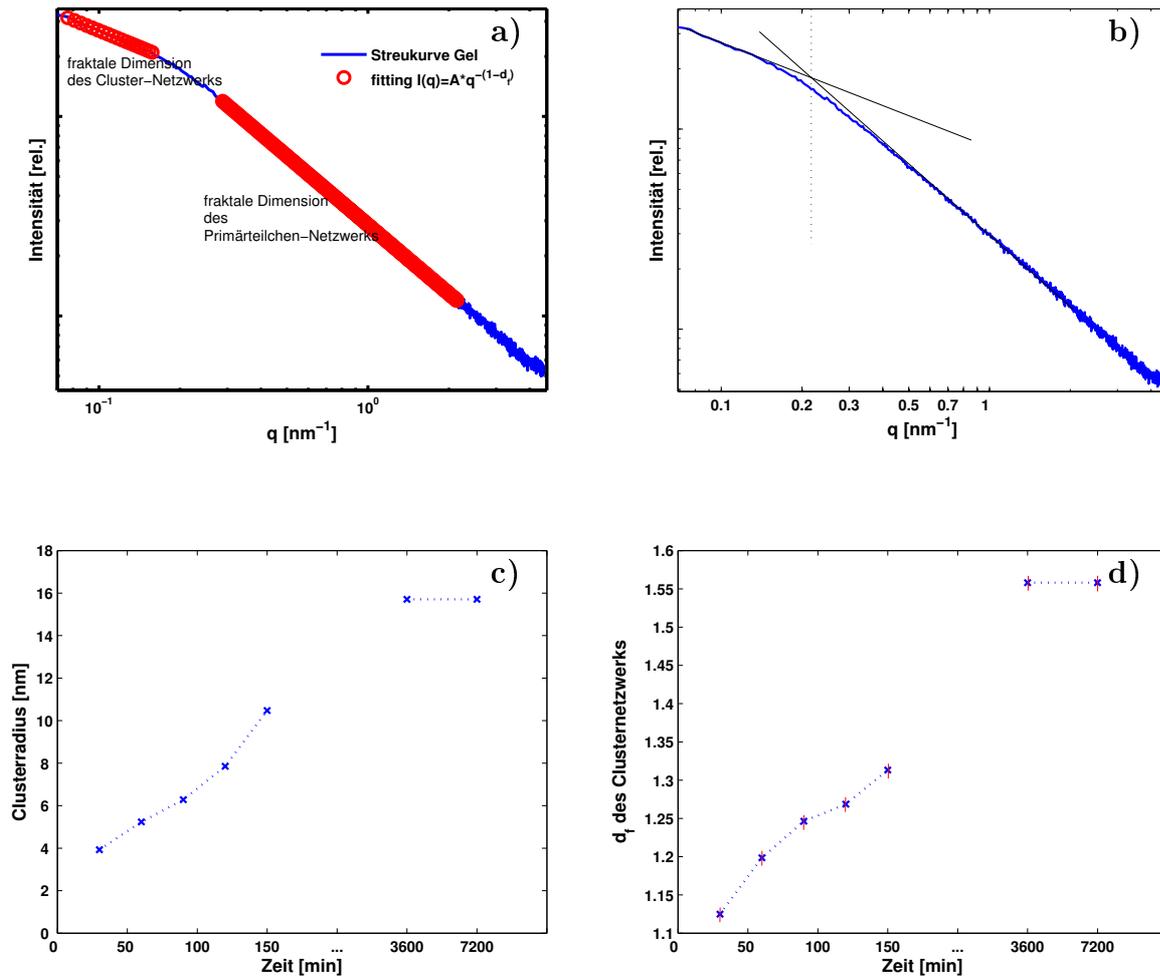


Abbildung 6.6: a) Bestimmung der fraktalen Dimension des Primärteilchen- und Clusternetzwerks des Gels (ein Tag nach erfolgter Hydrolyse), b) Bestimmung des Clusterradius, c) festgestellter Clusterradius während der Gelbildung in Abhängigkeit von der Gelbildungszeit, d) in a) festgestellte fraktale Dimension des Clusternetzwerks in Abhängigkeit von der Gelbildungszeit.

Nach 30 Minuten liegen im Sol Primärteilchen vor, die mit dem Proportionalitätsbereich von etwa $1 - 4 \text{ nm}^{-1}$ eine Vernetzung zu Clustern anzeigen. Die aus diesem Bereich ermittelte fraktale Dimension des Primärteilchennetzwerks $d_f = 2.1$ ändert

sich während der gesamten Gelbildung nicht. Der Vernetzung der Primärteilchen zu Clustern schließt sich die Vernetzung zu einem Clusternetzwerk an. Die Streuintensität nimmt für den Streuvektorbereich $< 0.8 \text{ nm}^{-1}$ zeitabhängig zu. Hier liegt ein weiterer Proportionalitätsbereich (im Sol bei $q < 0.5 \text{ nm}^{-1}$). Das Umbiegen in diesen Proportionalitätsbereich findet bei immer kleineren Streuvektoren statt, die Clusterbildung wird beobachtet. Schließlich ist nach der Dauer von einem Tag eine maximale Clustergröße erreicht, die noch immer im Gesichtsfeld der Messung liegt. Das Umbiegen bei einem Streuvektor von schließlich $\sim 0.2 \text{ nm}^{-1}$ geht in einen Proportionalitätsbereich über, der bis zum Beginn des Gesichtsfelds der Messung reicht. Die gebildeten Cluster vernetzen sich zu einem Clusternetzwerk, dessen Streueinfluß einen Tag nach der Gelbildung über das Gesichtsfeld der Messung hinaus reicht.

Die fraktale Dimension des Clusternetzwerks im Sol mit $d_f = 1.1$ entspricht der fraktalen Dimension von kettenförmig aneinandergelagerten Clustern. Mit zunehmender Vernetzung der Cluster nähert sich die fraktale Dimension mit $d_f = 1.55$ der fraktalen Dimension verzweigter Ketten an. Nach erfolgter Gelbildung ändert sich die fraktale Dimension des Clusternetzwerks nicht mehr. Das mit Salzsäure katalysierte Sol hat aufgrund des zusätzlich eingebrachten Lösungsmittels nach der Gelbildung ein etwas größeres Reaktionsvolumen als das mit Essigsäure katalysierte Sol. Infolge dessen verzweigen sich die gebildeten Strukturen etwas stärker und zeigen eine etwas größere fraktale Dimension ($d_f(HCL) = 1.7, d_f(CH_3COOH) = 1.55$).

Die Verwendung von *TEOS* bietet den Vorteil, das man Gele mit einer höheren SiO_2 -Konzentration herstellen kann als bei Verwendung von Natriumwasserglaslösungen. Beim Vergleich der untersuchten *TEOS*-Sole zeigte sich, daß die Verwendung von Essigsäure als Katalysator zwei Vorteile bietet. Zum Einen wurde weniger Dispersionsmittel zur Hydrolyse des Sols benötigt als im Fall von Salzsäure. Dadurch wurde eine SiO_2 -Konzentration von 18 %wt. erreicht. Der zweite Vorteil liegt darin, daß die enthaltenen Dispersionsmittel rückstandsfrei mittels einer Temperaturbehandlung entfernt werden können. Auf diese Weise verbleibt ausschließlich das amorphe SiO_2 . Deshalb wird mit dieser Methode der Gelbildung weiter verfahren.

Um das Clusternetzwerk in der direkten Methode der Elektronenmikroskopie zu untersuchen, wurde das Gel überkritisch getrocknet. Auf diese Weise wurde die Struktur konserviert. Auf *REM*-Aufnahmen (Abb. 6.7) ist das Clusternetzwerk des überkritisch getrockneten Gels zu sehen. Abb. 6.7 a) zeigt die Oberfläche des untersuchten Gels Strukturen in einer Größenordnung von 30 - 50 nm, die sehr dicht aneinandergelagert sind. Für die untersuchte Bruchstelle in Abb. 6.7 b) ist kein Perkolationsnetzwerk zu sehen. Stattdessen sind Aggregate zu finden, die in unterschiedlicher Größe vorliegen und ihrerseits aus kleineren Struktureinheiten aufgebaut sind. Die Ursache wurde bereits bei den Untersuchungen mittels Kleinwinkelstreuung gefunden. Aufgrund der hohen SiO_2 -Konzentration im Reaktionsvolumen ist die Größe der gebildeten fraktalen Strukturen begrenzt.

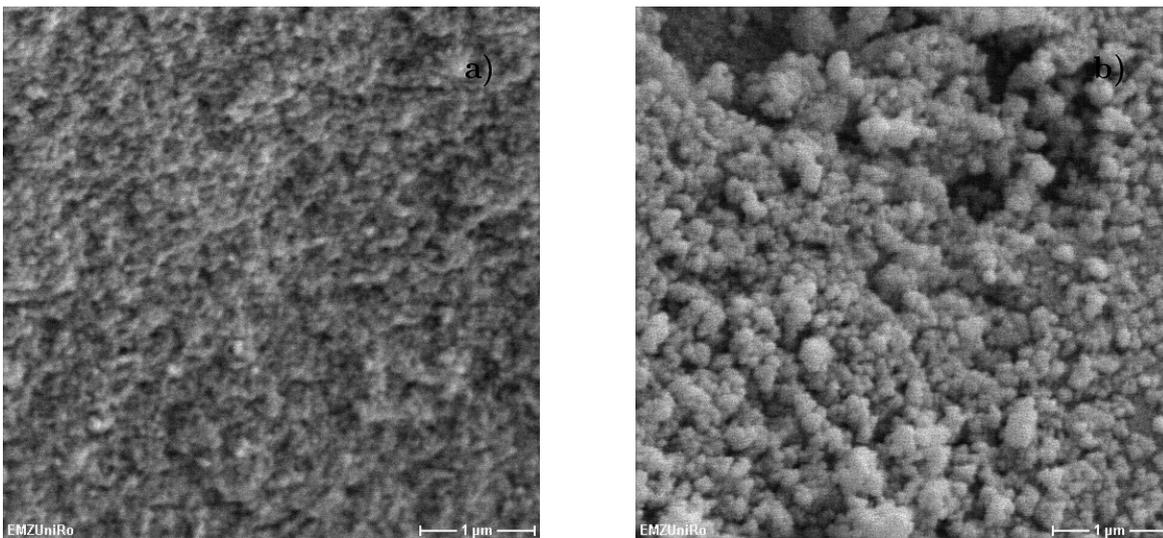


Abbildung 6.7: REM-Aufnahme der im Gel gebildeten Cluster, a) Oberfläche, b) Bruchstelle.

6.1.5 Strukturänderung während der Temperaturbehandlung

Das entstandene Gel wurde getrocknet, um das Dispersionsmittel (Ethanol und Wasser) zu extrahieren. Die Trocknung erfolgt bei einer Temperatur von 250°C in einem Vakuum-Trockenschrank. Diese einfache Trocknung genügt nicht, um sämtliche Rück-

stände (insbesondere Kohlenstoffreste des Ethanols) zu entfernen. Eine Untersuchung mittels *DSC* zeigt, daß bis zu einer Temperatur von $\sim 150^\circ\text{C}$ das Dispersionsmittel austritt (Abb. 6.8 a)). Oberhalb von 400°C entweicht gebundenes Wasser, bei einer Temperatur von etwa 580°C tritt ein endothermer Peak in Erscheinung. Dieser Peak kann durch das Entweichen gebundener Alkylgruppen erklärt werden [59] und endet bei ca. 700°C . Im weiteren Verlauf bis zum Erreichen von 800°C findet keine Veränderung mehr statt.

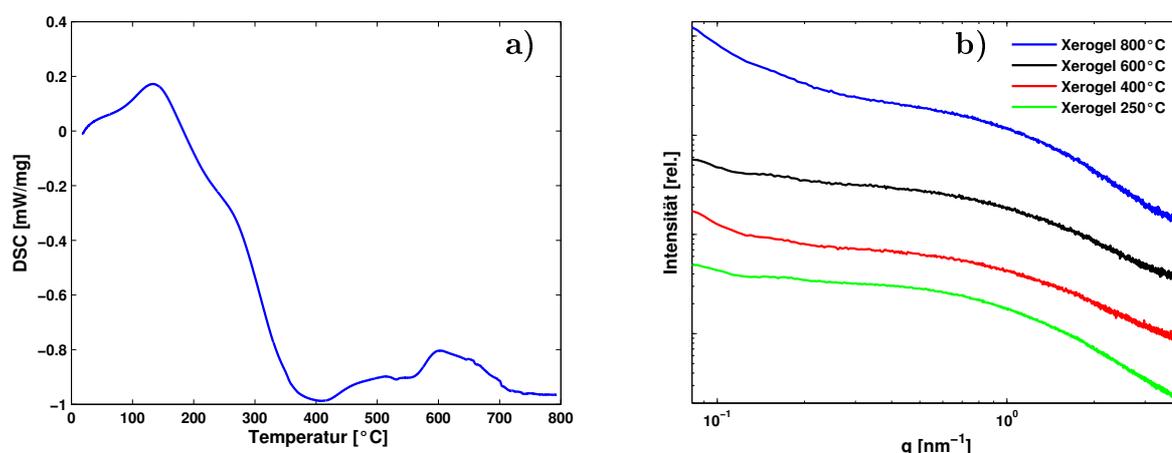


Abbildung 6.8: a) *DSC*-Graphik eines bis 800°C temperaturbehandelten Gels. b) *RKWS*-Streukurven der mit unterschiedlichen Temperaturen behandelten Gele.

Das getrocknete Gel wurde unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt, um Aussagen zu den erfolgten Veränderungen bezüglich der Strukturen zu machen. Hierzu wurden auch hier Kleinwinkel-Streuexperimente durchgeführt. Die resultierenden Streukurven sind in Abb. 6.8 b) gezeigt.

Im Bereich kleiner Streuvektoren ($q < 3 \text{ nm}^{-1}$) variiert der Anstieg der Kurven. Dieser Bereich ist durch Poren und Risse innerhalb der Gele bedingt, deren Größen außerhalb des Gesichtsfeldes der Messung liegen. Im weiteren Verlauf der Streukurven erscheinen streuende Objekte, bei denen es sich lt. Korrelationsfunktion und Sehnenlängenverteilung um die Primärteilchen des ursprünglichen Alkogels handelt. Die Sehnenlängenverteilung des Xerogels unterscheidet sich praktisch nicht von der des noch feuchten Gels (vgl. Abb. 6.5). Die mit r gewichteten Korrelationsfunktionen und die Sehnenlängenverteilungen sind in Abb. 6.9 gezeigt. Die Primärteilchen sind jetzt nicht

mehr zu Clustern vernetzt, sondern bilden eine dichte Packung.

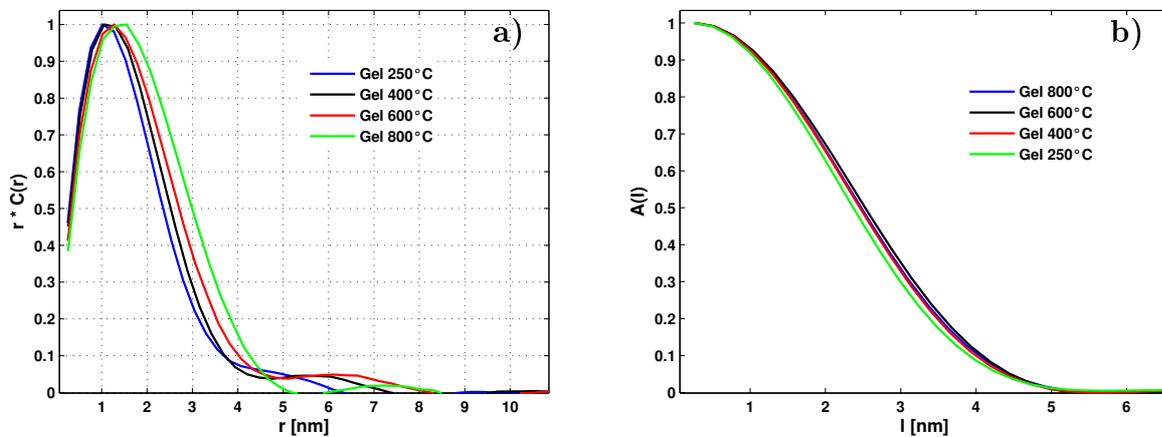


Abbildung 6.9: a) Mit r gewichtete Korrelationsfunktionen von Gelen bei unterschiedlicher Temperaturbehandlung. b) Sehnenlängenverteilungen dieser Gele.

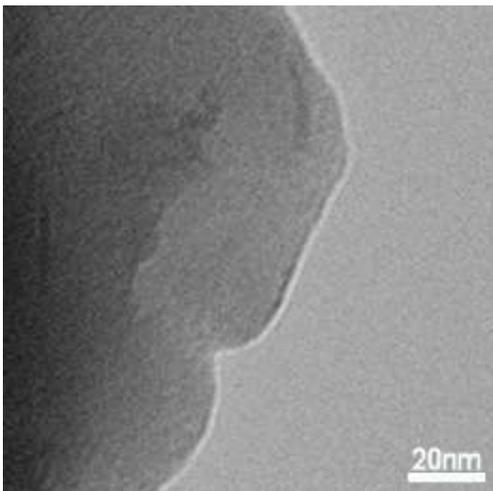


Abbildung 6.10: TEM-Aufnahme eines mit 800°C temperaturbehandelten Gels.

Das wird mit einer TEM-Aufnahme eines mit 800°C temperaturbehandelten Gels bestätigt (Abb. 6.10). Der Verdichtung folgt keine weitere Vernetzung. Die zusätzliche Ausbildung von Siloxanbindungen würde zu größeren streuenden Bereichen führen, was aber nicht der Fall ist. Es haben also keine Sinterprozesse stattgefunden, bei denen deutlich weniger innere Oberflächen existieren würden. Vielmehr erscheint das Gel jetzt als eine dichteste Packung der Primärteilchen. Die in der Abbildung sichtbaren Dichteunterschiede haben ihre Ursache in der unregelmäßigen Dicke der Probe.

Während der Temperaturbehandlung wurden die Rückstände aus dem Gel entfernt. Es verbleibt bereits nach einer Temperaturbehandlung von 700°C ausschließlich amorphes SiO_2 in Form der ursprünglich gebildeten Primärteilchen. Diese werden mit einer dichten Packung für das zu entwickelnde Knochenaufbaumaterial die erforderlichen Nanoporen zur Verfügung stellen.

6.2 Hydroxylapatit

NanoBone[®]-Granulat wird auf der Basis eines stöchiometrischen Apatits angeboten. *NanoBone*[®]-S24 und -S39 sind die Nachfolger von *NanoBone*[®]-Granulat und werden mit einem kalziumdefizitären Apatit gefertigt. Die Eigenschaften beider Apatite werden in diesem Kapitel untersucht.

6.2.1 Stöchiometrisches Hydroxylapatit

Das Hydroxylapatit wurde mit dem *REM* untersucht. Die Abb. 6.11 zeigt, daß die

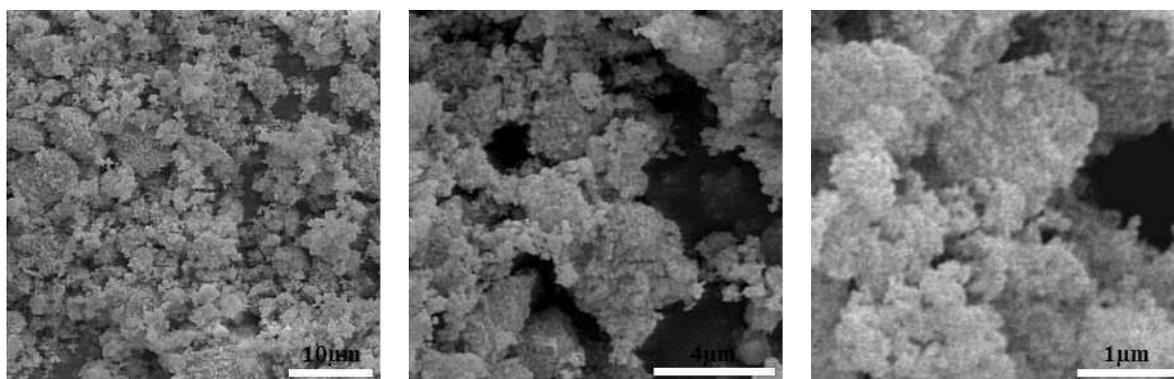


Abbildung 6.11: REM-Aufnahmen des stöchiometrischen Hydroxylapatits.

Apatitpartikel große Strukturen bilden. Sie sind zu Aggregaten mit einem Durchmesser von einem bis zu etwa vier μm zusammengelagert. Für das Hydroxylapatit erfolgte wie für das Gel eine Temperaturbehandlung bis zu einer Temperatur von 800°C . *TEM*-Aufnahmen zeigen, daß ein Mischapatit vorliegt, in dem Partikel unterschiedlicher Morphologie (plättchen- und klötzchenartige Strukturen) enthalten sind (Abb. 6.12 a)). Die Apatit-Partikel werden mit steigender Temperatur größer und haben nach einer Temperaturbehandlung bei 800°C keine plättchenförmigen Bestandteile mehr (Abb. 6.12 b)). Bei 900°C beginnt schließlich (nicht gewünschte) Sinterung (Abb. 6.12 c)).

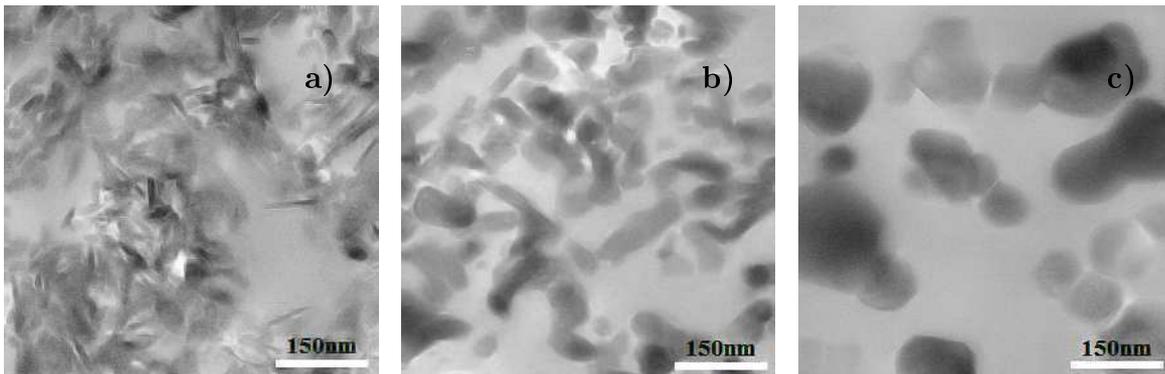


Abbildung 6.12: TEM-Aufnahmen des stöchiometrischen Hydroxylapatits a) ohne Temperaturbehandlung und b) nach Temperaturbehandlung bei 800°C sowie c) 900°C.

In einer Untersuchung mittels Kleinwinkelstreuung ist zu sehen, daß mit zunehmender Temperatur der Anstieg im vorderen Bereich der Streukurven steiler wird (Abb. 6.13 a)). Ein Vergleich des Porod-Auslaufs zeigt, daß sich die streuenden Bereiche mit

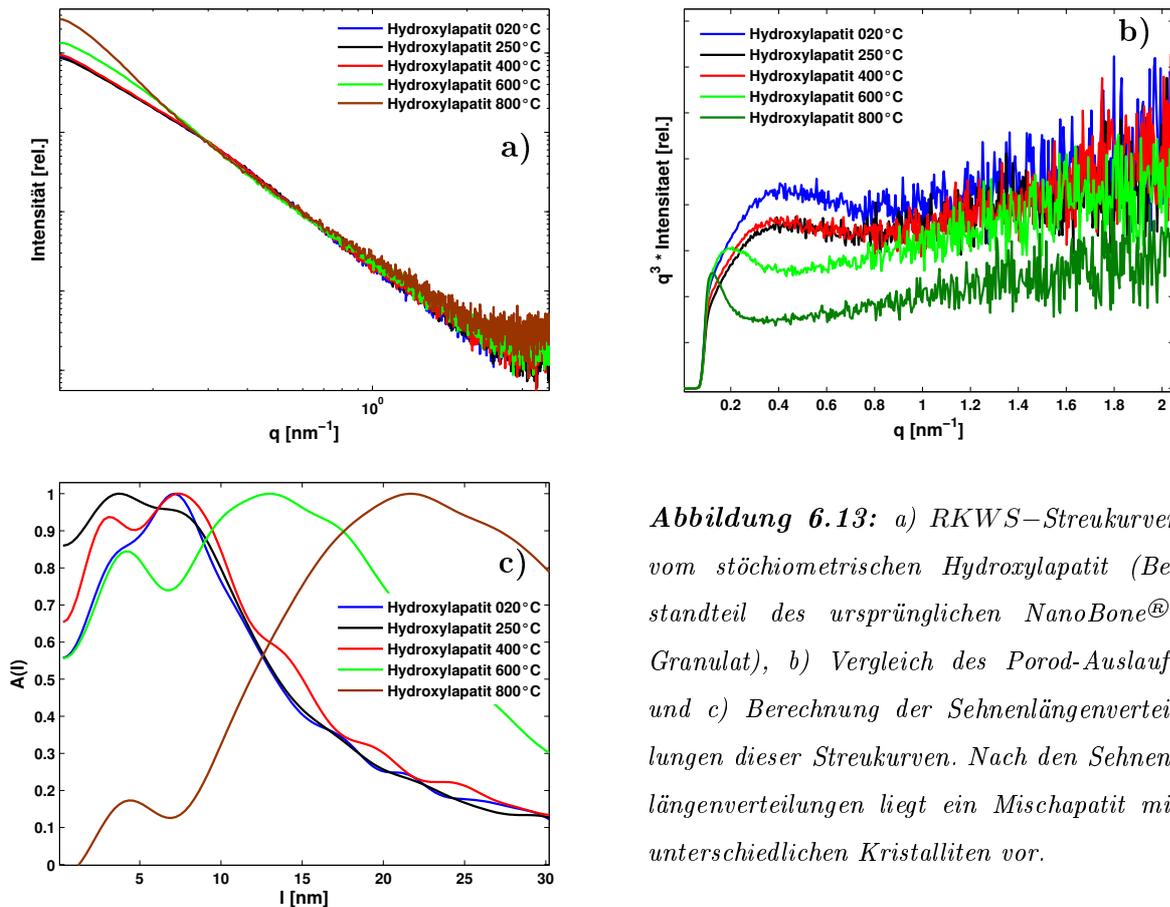


Abbildung 6.13: a) RKWS–Streukurven vom stöchiometrischen Hydroxylapatit (Bestandteil des ursprünglichen NanoBone®-Granulat), b) Vergleich des Porod-Auslaufs und c) Berechnung der Sehnenlängenverteilungen dieser Streukurven. Nach den Sehnenlängenverteilungen liegt ein Mischapatit mit unterschiedlichen Kristalliten vor.

zunehmender Temperatur schärfer und als größere Strukturen ($\approx 7 \text{ nm}$ ohne Temperaturbehandlung bis $\approx 25 \text{ nm}$ bei 800°C) voneinander abgrenzen (Abb. 6.13 b)). Im Vergleich mit den *TEM*-Aufnahmen scheint es sich bei diesen festgestellten Werten um die Dicke der Kristallite zu handeln. Die berechneten Sehnenlängenverteilungen lassen ebenso wie die Porod-Auftragungen verschiedene Kristallitdicken erkennen, wobei mit steigender Temperaturbehandlung die Anzahl großer Dicken zunimmt (Abb. 6.13 c)).

Die beschriebenen Strukturveränderungen wurden mittels Pulverdiffraktometrie untersucht. Mit steigender Temperatur nimmt die Intensität der einzelnen Reflexe bei abnehmender Halbwertsbreite zu (Abb. 6.14). Besonders stark ist die Zunahme der

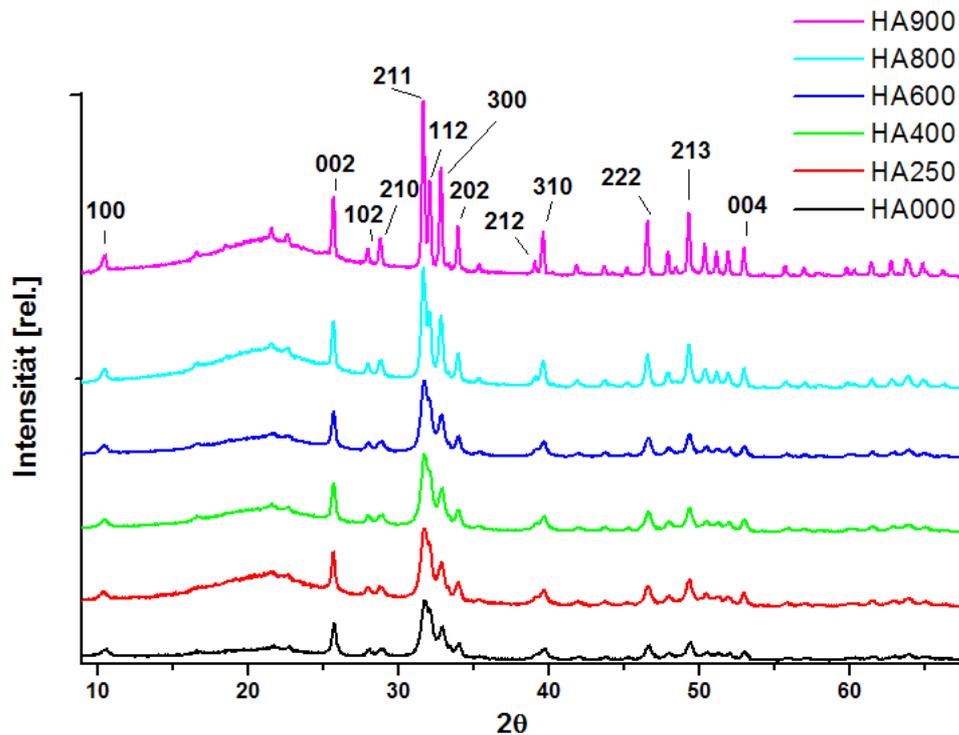


Abbildung 6.14: Pulverdiffraktometrie an HA bei unterschiedlicher Temperaturbehandlung.

Intensität bei der Temperatursteigerung von 800°C auf 900°C . Mit Hilfe der Meßdaten konnten jetzt Länge und Breite der Kristallite bestimmt werden. Das hexagonale Raumgitter (Raumgruppe 'p/63m') der Einkristalle von Hydroxylapatit wird mit den Netzebenenabständen

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{\frac{4}{3}(h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 l^2}} \quad (6.3)$$

beschrieben. Mittels der Reflexe (100) und (002) können unter Nutzung der genannten Gleichung und der Bragg'schen Reflexionsbedingung die Gitterparameter a und c berechnet werden. Die ermittelten Werte $a = b = 9.41\text{\AA}$ und $c = 6.89\text{\AA}$ stimmen mit den Literaturdaten überein [60] und beschreiben die durchschnittliche Größe der Einheitszelle der Apatit-Kristallite. Aus den Halbwertsbreiten dieser Reflexe sind die Kristallitgrößen zu bestimmen.

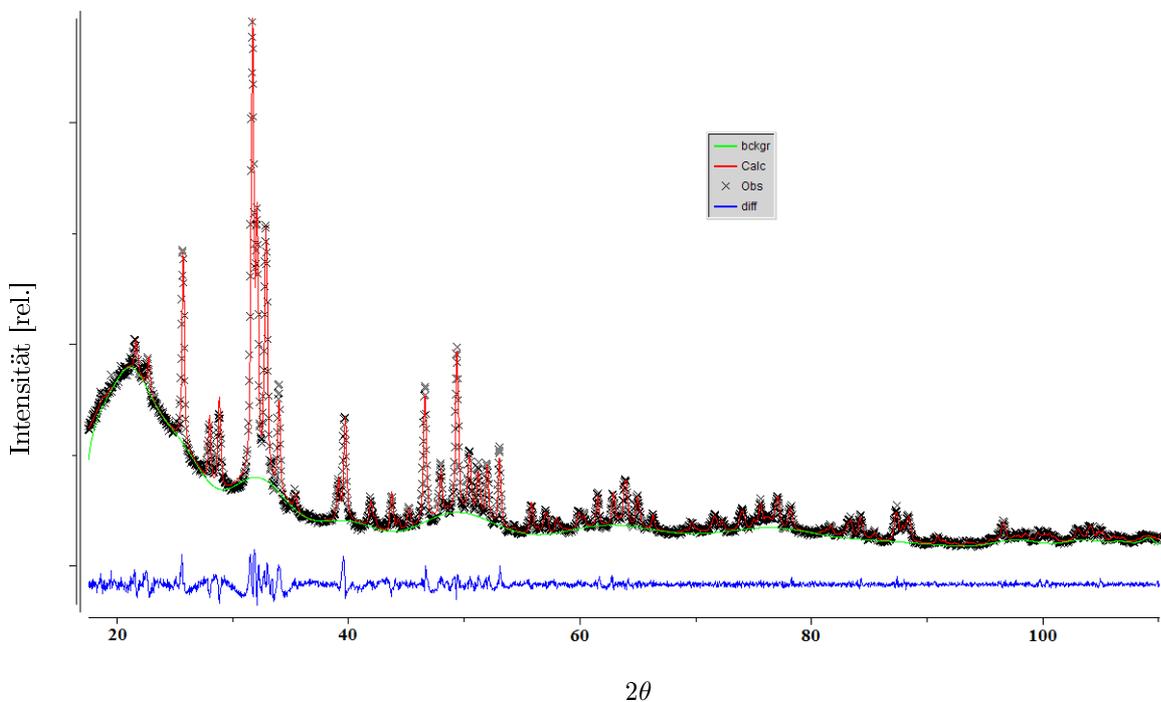


Abbildung 6.15: LeBail-Anpassung eines Röntgendiffraktogramms des verwendeten Hydroxylapatits nach einer Temperaturbehandlung bei 800°C .

Aufgrund der untypischen instrumentellen Verbreiterung wurden die Kristallitgrößen mit Hilfe der Le-Bail-Methode im Computerprogramm *GSAS* bestimmt. Im Gegensatz zum Rietfeldverfahren ist lediglich die vorhandene Raumgruppe mit den zugehörigen Gitterparametern ($a = b = 9.41\text{\AA}$ und $c = 6.89\text{\AA}$, siehe oben) vorzugeben. Diese werden anschließend verfeinert, ohne die Atompositionen zu kennen. Die Profilanpassung ist in Abb. 6.15 gezeigt. Aufgrund der untypischen instrumentellen Verbreiterung

wird auf die Darstellung des Winkelbereichs unterhalb von $2\theta = 17.5^\circ$ verzichtet. Aus den Lorentz-Parametern $'Lx'$ und $'ptec'$ werden die Kristallitgrößen bestimmt [29]:

$$p_a = \frac{18000 \cdot K \cdot \lambda}{\pi \cdot Lx} \quad (6.4)$$

$$p_c = \frac{18000 \cdot K \cdot \lambda}{\pi \cdot (Lx + ptec)} \quad (6.5)$$

In Abb. 6.16 sind die röntgenographisch festgestellten Werte für die Breite und die Länge der Kristallite im Vergleich mit Meßwerten dargestellt, die aus *TEM*-Aufnahmen ermittelt wurden. Die Ausdehnung der Kristallite im nicht temperaturbehandelten Apatit beträgt in der Länge 50 nm , in der Breite 30 nm und in der aus der Kleinwinkelstreuung ermittelten Dicke 7 nm . Diese Apatitkristallite sind etwas breiter und dicker als die Kristallite im menschlichen Kochen (vgl. Kap. 2).

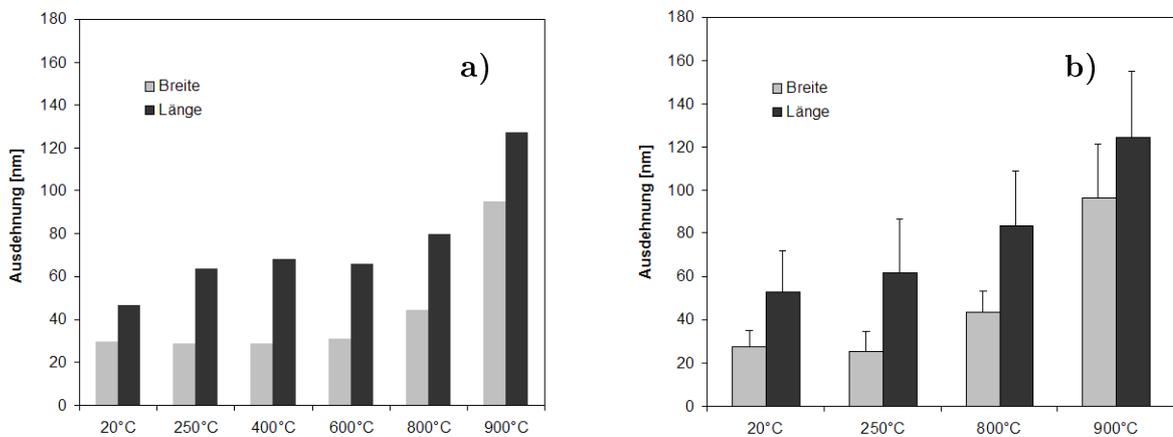


Abbildung 6.16: Analyse der Größe der Apatit-Kristallite a) aus Röntgenbeugungsexperimenten und b) durch Vermessung der Kristallite in *TEM*-Aufnahmen.

Die durchgeführten Profilanpassungen mittels Le-Bail-Anpassung lieferten Werte für die Kristallgrößen, die mit den in *TEM*-Aufnahmen festgestellten Werten übereinstimmen. Ob die chemische Zusammensetzung der von Hydroxylapatit entspricht, wurde mit einer Anpassung im Rietveld-Verfahren überprüft.

Mit den Atomkoordinaten von Hydroxylapatit [60] gelang die Strukturanpassung für jede Temperaturstufe. Der Wert für *Goodness of Fit* (*GOF*) lag allerdings bei keiner durchgeführten Verfeinerung der mit verschiedenen Temperaturstufen behandelten Apatite besser als bei 2.8 (im Fall des mit 250°C getrockneten Apatits, Abb. 6.17).

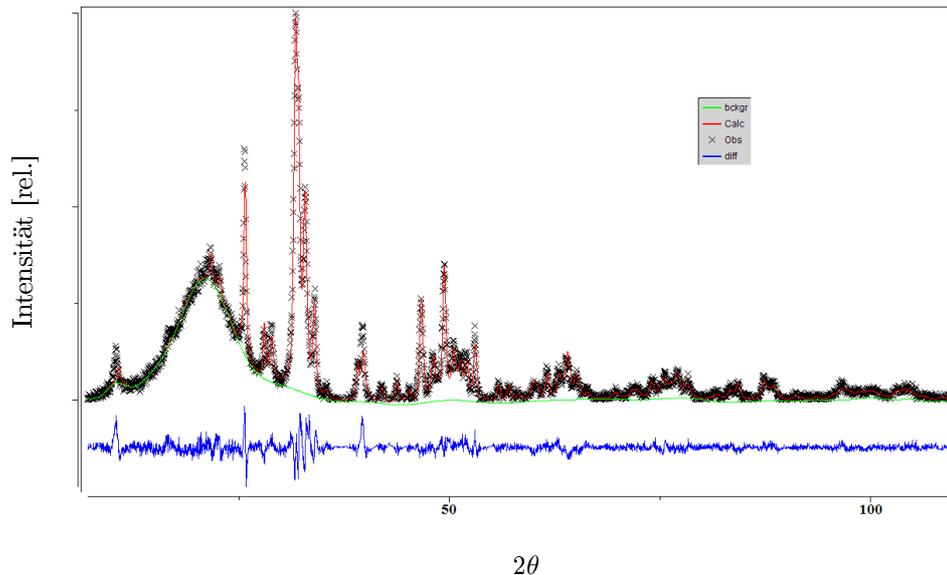
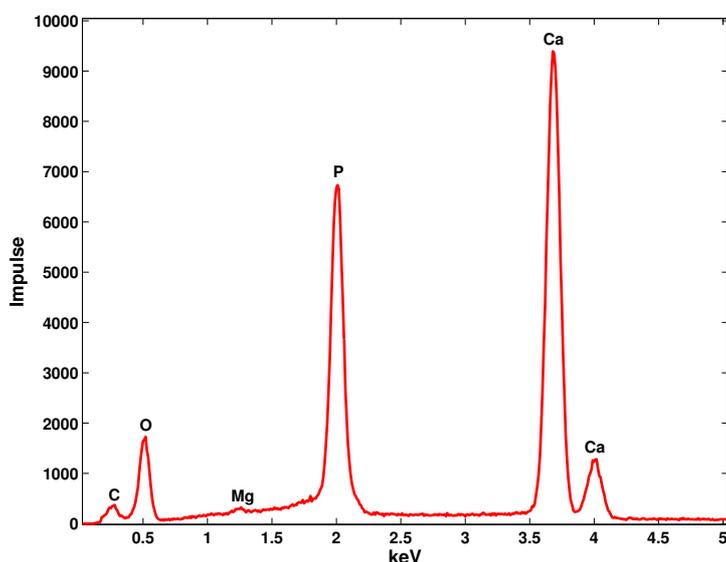


Abbildung 6.17: Profilanpassung im Rietveldverfahren für das in NanoBone[®]-Granulat enthaltene Hydroxylapatit, temperaturbehandelt mit 250°C .

Um eine abweichende chemische Zusammensetzung zu überprüfen, wurde mit dem *REM* eine *EDX*-Analyse durchgeführt (Abb. 6.18). Neben den für Hydroxylapatit typischen Elementen sind auch Kohlenstoff und geringe Anteile von Magnesium in diesem Apatit enthalten. Beide Elemente können in der Elementarzelle enthalten sein. Die Elementarzelle stellt zwei Seiten für den Angriff durch Kationen zur Verfügung, *Ca*(1) und *Ca*(2). Im Falle einer (teilweisen) Substitution von Kalzium- durch Magnesiumionen wird *Ca*(1) bevorzugt durch Magnesiumionen ersetzt [61]. Falls Kohlenstoff ebenfalls als Substituent auftritt, wird eine Karbonatgruppe eine Phosphatgruppe ersetzen. Ist dies zutreffend, muß aber aus Gründen des Ladungsgleichgewichts innerhalb der Einheitszelle auch eine Hydroxylgruppe durch eine Karbonatgruppe ersetzt werden [62]. Nach [61] ist das Zentrum dieser Karbonatgruppe auf der Position 0,0,-0.0081 zu finden. In einer Rietveld-Analyse kann mit Hilfe eines Germanium-Atoms auf dieser Position die CO_3 -Gruppe dargestellt werden [61]. Für die Durchführung der Rietveld-

Verfeinerung wurden die Parameter für die Profilverbreiterung aufgrund der Größe der Apatitpartikel aus der Le-Bail-Anpassung übernommen und die genannten Substitutionen überprüft.



Element	Anteil [%wt.]
Kohlenstoff	6.91
Sauerstoff	41.12
Magnesium	0.14
Phosphor	16.85
Kalzium	34.98

Abbildung 6.18: EDX-Analyse des zur Herstellung von NanoBone[®]-Granulat verwendeten Hydroxylapatits.

Eine solche Struktur Anpassung gelang nicht. Eine Veränderung der chemischen Zusammensetzung des vorgestellten Apatits ist durch pulverdiffraktometrische Messungen am verwendeten Gerät nicht nachzuweisen. Auch durch die Hinzunahme von bei der Herstellung des Apatits eventuell entstandenen Nebenprodukten wie Kalziumoxid oder Kalziumhydroxid gelang keine bessere Struktur Anpassung. Demnach ist festzustellen, daß ein nahezu stöchiometrisches Apatit vorliegt, das Verunreinigungen aufweist. Außerdem haben die Kristallite dieses Apatits eine kleinere relative Oberfläche als die im Apatit des menschlichen Knochens.

6.2.2 Kalziumdefizitäres Hydroxylapatit

Dieses Hydroxylapatit ist in *REM*-Aufnahmen ebenfalls stark agglomeriert. Die Zusammenlagerungen haben eine Ausdehnung von z.T. mehr als $80\ \mu\text{m}$ (Abb. 6.19).

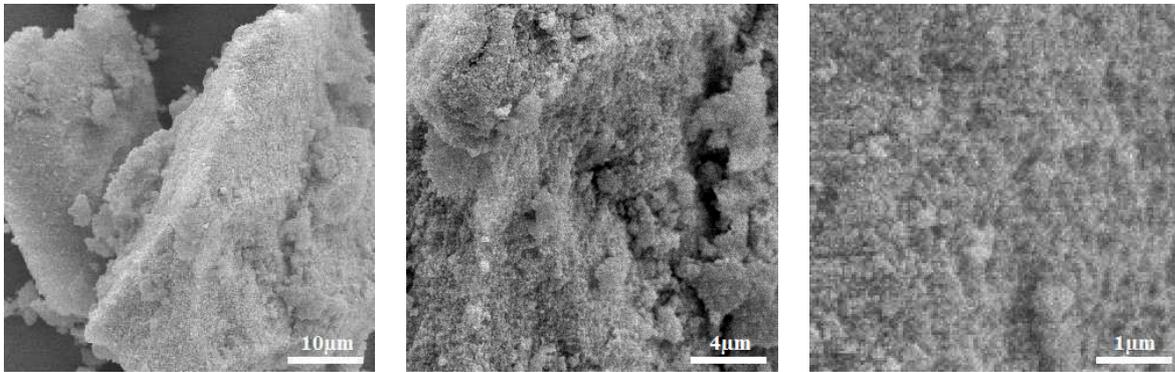


Abbildung 6.19: REM-Aufnahmen des kalziumdefizitären Hydroxylapatits.

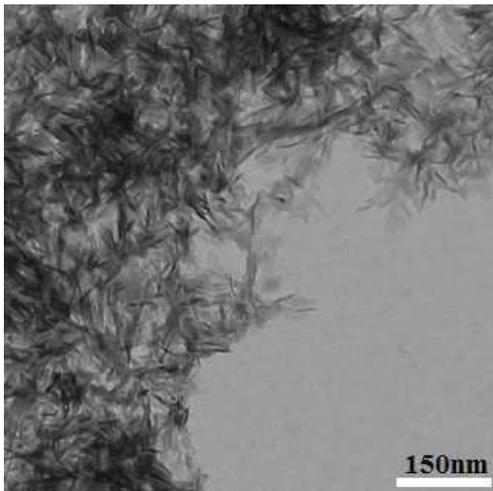


Abbildung 6.20: TEM-Aufnahme des kalziumdefizitären Apatits.

Eine *TEM*-Aufnahme zeigt plättchenförmige Partikel, die unregelmäßig angeordnet sind (Abb. 6.20). Bei den nadelförmigen Partikeln handelt es sich um Plättchen, die seitlich ausgerichtet sind. Im Le-Bail-Verfahren wurde für dieses Apatit eine Länge von $30\ \text{nm}$ und eine Breite von $15\ \text{nm}$ festgestellt. Es gelang eine Le-Bail-Anpassung mit einem Wert für *GOF* von 1.8 und eine Rietveldverfeinerung mit einem Wert für *GOF* von 1.4 (Abb. 6.21).

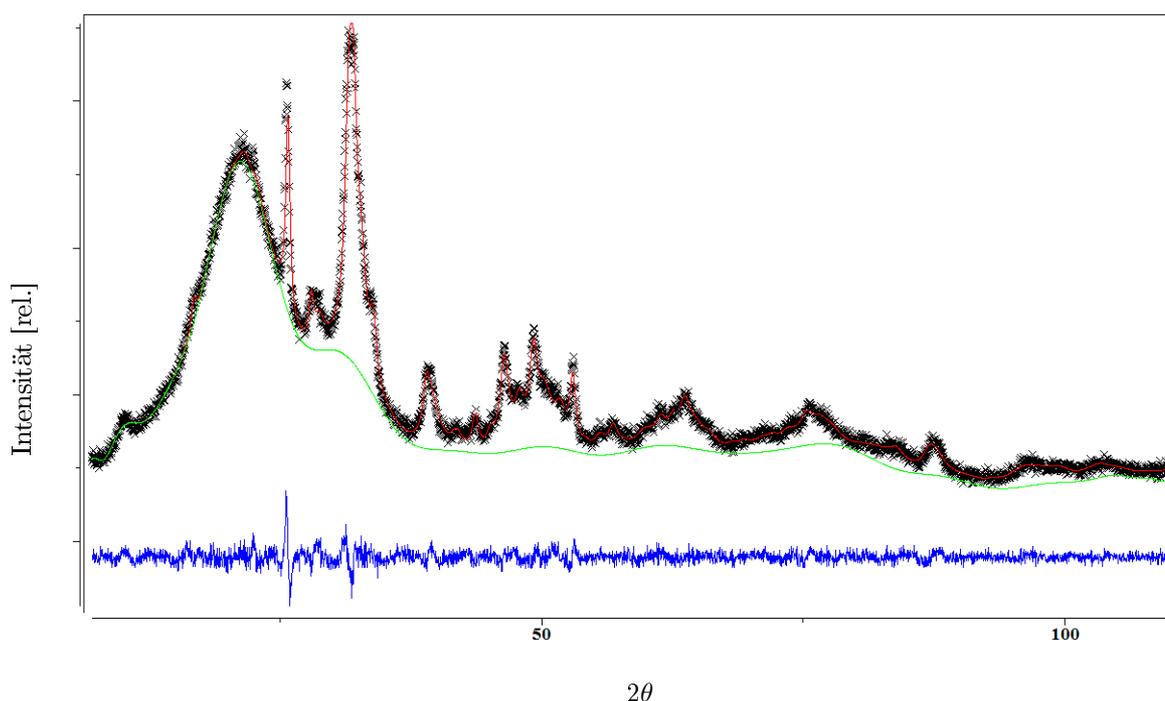
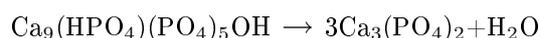


Abbildung 6.21: Profilanpassung für das kalziumdefizitäre Hydroxylapatit, getrocknet bei 250°C.

Während stöchiometrisches und kalziumreiches Apatit bei einer Temperatur von 800°C lediglich ein Kristallitwachstum zeigen, durchläuft kalziumdefizitäres Hydroxylapatit bei einer Temperaturbehandlung oberhalb von 700°C eine Phasenumwandlung zu β -TCP:



Man hat darauf zu achten, daß die Temperatur von 700°C nicht überschritten wird. Selbst wenn das Überschreiten dieser Grenztemperatur nur für wenige Minuten um wenige Grad Kelvin erfolgt, setzt die Phasenumwandlung ein (Abb. 6.22). Bei einer Temperaturbehandlung von 800°C liegt ein biphasisches Material vor, eine Mischung aus Hydroxylapatit und β -TCP.

Wird mit diesem Apatit ein Formkörper hergestellt, darf dieser Formkörper also einer Temperatur von maximal 700°C ausgesetzt werden. Wie in Abschnitt 6.1.5 gezeigt, ist für das Entfernen sämtlicher Rückstände des Gels diese Temperatur ausreichend.

Das stöchiometrische Apatit hat also den Vorteil, daß bis zu einer Temperatur von 800°C keine Phasenumwandlung erfolgt. Das kalziumdefizitäre Apatit hingegen hat den

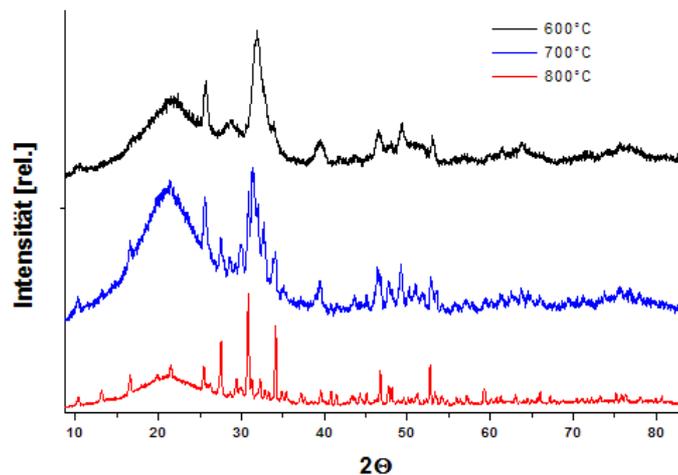


Abbildung 6.22: Für das Hydroxylapatit "HAP700" erfolgte die Temperaturbehandlung mit 700°C. Die Aufheizrate des verwendeten Ofens wurde zu hoch gewählt, so daß für wenige Minuten ein 'Überschwingen' auf 707°C stattfand.

Vorteil einer größeren relativen Oberfläche, so daß eine Resorption schneller erfolgen kann. Beide Apatite sind für den Einsatz im Formkörper geeignet.

6.3 Herstellung des Gel-Apatit-Gemischs

Es wurde eine mit der Masse des Sols übereinstimmende Masse Hydroxylapatit in das Sol eingebracht. Nach kräftigem Rühren lag ein Material mit einer Viskosität von etwa 4000 cP und einem pH-Wert von $pH = 4.2$ vor. Zum Erreichen einer möglichst homogenen Verteilung des Hydroxylapatits im Sol wurde das Material nach Einbringen des Apatits ins Sol mit einem Ultraschall-Desintegrator (Modell S450D, Fa. "Branson") behandelt. Dadurch sollte erreicht werden, daß möglichst kleine Apatit-Agglomerate oder im besten Fall einzelne Apatitkristallite vollständig vom SiO_2 -Gel umschlossen werden.

In Abb. 6.23 ist die Abhängigkeit der Teilchengröße vom Energieeintrag dargestellt. Nach einer Energiezufuhr von 22 bis 35 kJ auf 144 ml Reaktionsvolumen konnte mittels dynamischer Lichtstreuung eine durchschnittliche Teilchengröße von etwa 1.5 μm festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt ist das Sol-Apatit-Gemisch sehr flüssig, eine Viskosität ist mit dem verwendeten Viskometer (Rotationsviskosimeter "Brooks-

hield DV-II“) nicht bestimmbar. Mit weiterer Ultraschallgabe erfolgte keine weitere Verkleinerung der vorhandenen Teilchen. Vielmehr führte eine beginnende Gelbildung wieder zum Auftreten größerer Teilchen, da durch die Energiezuführung eine Temperaturerhöhung bewirkt wurde. Durch die Temperatursteigerung wird die Gelbildung unterstützt. Die sich bildenden Sol-Apatit-Agglomerate neigen zur Sedimentation. Um diese Sedimentation weitestgehend zu unterbinden, erfolgte ein weiterer Energieeintrag von schließlich insgesamt 60 kJ . Jetzt hatte das Sol-Apatit-Gemisch bei einer Temperatur von $54 - 56^\circ\text{C}$ noch immer eine flüssige Konsistenz. Die Gelbildung erfolgte dann innerhalb weniger Sekunden. Dieser kurze Zeitraum genügte, um das Sol in geeignete Behälter zu verbringen.

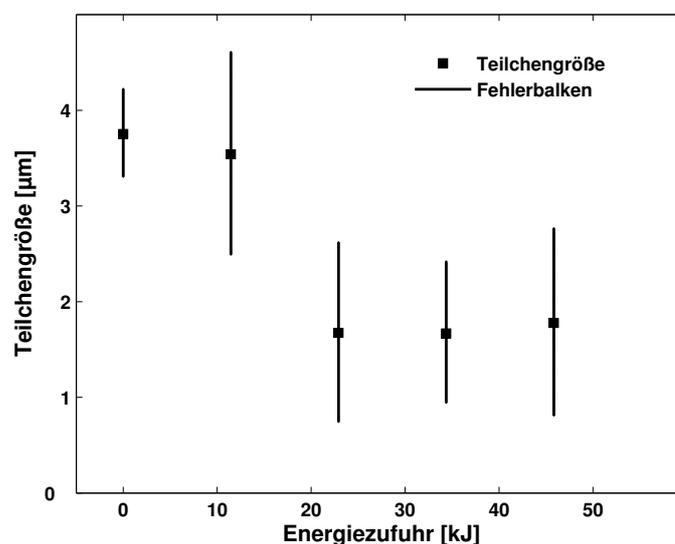


Abbildung 6.23: Abhängigkeit der Größe der im Sol vorhandenen Apatit-Agglomerate vom durch den Ultraschall-Desintegrator erfolgten Energieeintrag.

Durch den kontrollierten Vorgang von Energieeintrag und gleichzeitiger Erhöhung der Temperatur des Sol-Apatit-Gemisches (und somit durch Verringerung der Gelbildungszeit) wird nicht nur die Sedimentation verhindert. Eine Agglomeration, wie sie bei Hydroxylapatit nach Stoppen der Dispersionsenergie auftritt (auch im dispersen System neigen HA-Partikel mehr oder weniger zur Agglomeration, der dominierende Bindemechanismus findet seine Ursache in van-der-Waals-Kräften), wird weitgehend unterbunden. Mit der Verhinderung der Sedimentation und der Agglomeration bei gleichzeitiger Gelbildung gelingt es, die Partikel optimal mit SiO_2 zu ummanteln.

6.4 Formkörper

In einer früheren Arbeit wurden bereits Prüfkörper aus einem Gel-Apatit-Gemisch gefertigt [54]. Dabei wurde das Gel aus einem *TEOS*-Sol hergestellt, wobei die Hydrolysereaktionen mit Salzsäure katalysiert wurden und bei Werten von $r_w = 0.4$ und $r_s = 0.1$ stattfanden [54]. Diese Prüfkörper wiesen eine Festigkeit von 2.5 bis 3.5 *MPa* auf. Diese Grundfestigkeit würde mit Zwischenräumen oder Poren zusätzlich verringert werden.

Zunächst wurde überprüft, welche maximale Festigkeit des getrockneten Gel-Apatit-Gemischs erreichbar ist. Diese Untersuchungen erfolgten mit dem stöchiometrischen Apatit (Kap. 6.2.1). Im weiteren Verlauf der Arbeit erfolgte durch die ARTOSS-GmbH die Bereitstellung des kalziumdefizitären Hydroxylapatits, daß in Morphologie und Kristallitgröße dem Apatit des menschlichen Knochens entspricht. Es erscheint somit als das für den klinischen Einsatz geeignetere Material und findet dann im zu entwickelnden Formkörper Anwendung.

6.4.1 Festigkeit des apatithaltigen Gelkörpers

Nach Zusammenführung der Ausgangskomponenten (Kap. 6.3) wurde die Mischung in Formen gegossen. Die Dispersion hatte eine Temperatur von 54 - 56°C, so daß die Gelbildung innerhalb weniger Sekunden nach dem Gießvorgang erfolgte.

Die resultierenden Prüfkörper hatten entsprechend den Innenmaßen der Formen eine Länge von 30 *mm*, eine Breite von 15 *mm* und eine Höhe von 8 *mm*. Sie wurden regelmäßig während der Trocknung durch eine starke Schrumpfung und Rißbildung im Material zerstört. Deshalb wurden die Prüfkörper nach ihrer Herstellung mit Folie abgedeckt und täglich für wenige Sekunden belüftet. Nach Ablauf von sechs Wochen erfolgte eine Extraktion des Dispersionsmittels bei 250°C im Vakuum-Trockenschrank und eine Entfernung der weiteren Rückstände bei 800°C innerhalb eines Rohrofens.

Der Schrumpfungsprozeß der Prüfkörper ist eine Folge der Trocknung des Materials. Während der Trocknung zieht sich das *SiO₂*-Netzwerk aufgrund der Grenzflächenspannung des enthaltenen Dispersionsmittels zum *SiO₂* zusammen. Dabei zeigte sich, daß

nur die Prüfkörper (bei variierendem Volumen) unzerstört blieben, die eine Volumenschrumpfung von mindestens 42% aufwiesen.

Es erfolgten Belastungstests an einer servohydraulischen Prüfmaschine der Fa. 'MTS Systems Corporation' am Institut für Maschinenbau der Universität Rostock. Aus dem Anstieg der Spannungs-Stauchungs-Kurve kann bei spröden Prüfkörpern kein Elastizitätsmodul ermittelt werden, denn spröde Materialien brechen praktisch ohne vorherige plastische Verformung [63]. Für den ersten Prüfkörper wurde eine Druckfestigkeit von $\sim 40 \text{ MPa}$ ermittelt (Abb. 6.24), bei deren Erreichen die vollständige Zerstörung des Prüfkörpers eintrat.

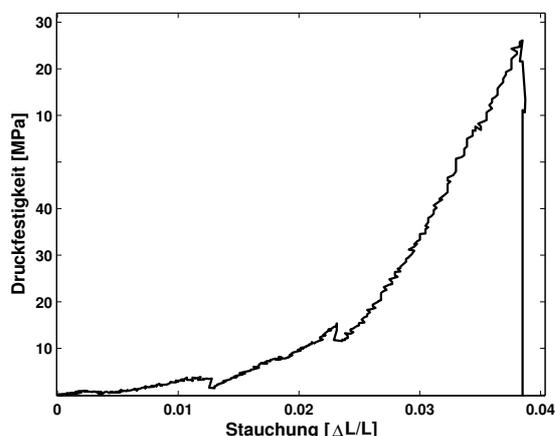


Abbildung 6.24: Stabilitätsuntersuchung zu einem Gel-Apatit-Prüfkörper.

Durch geringe Variation einfacher Parameter wurde versucht, die Festigkeit des Ausgangsmaterials zu optimieren. Indem vor der Trocknung und Temperaturbehandlung das Dispersionsmittelgemisch, bestehend aus Ethanol und Wasser, durch Diffusion vollständig durch Wasser ersetzt wird, kann ein schnelleres Schrumpfen und ein höherer Grad der Schrumpfung der Prüfkörper erreicht werden. Der Austausch des Dispersionsmittels erfolgte, indem die Prüfkörper für einen Zeitraum von 24 Stunden in destilliertem Wasser belassen und anschließend für zwei Tage an Luft getrocknet wurden.

Nach Trocknung und Temperaturbehandlung zeigten die Prüfkörper (bezeichnet mit 'MI') eine Schrumpfung von 48%vol.. Die starke Verdichtung während der Trocknung führte zu einer höheren Festigkeit von maximal 82 MPa (Tab. 6.1). Ein weiterer Anstieg der Festigkeit des Materials wurde durch eine Erhöhung des SiO_2 -Gehaltes erzielt. Dazu wurde weniger Hydroxylapatit in das Ausgangssol eingebracht. Die entstandenen Materialien wurden ebenfalls einem Lösungsmittelaustausch gegen Wasser unterzogen, bevor Trocknungsprozeß und Temperaturbehandlung stattfanden.

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Tabelle 6.1: Schrumpfung, Dichte, Porosität und maximale Festigkeit von NanoBone[®]-Granulat ähnlichen Prüfkörpern sowie von MI - MIV (unterschiedlicher SiO₂-Gehalt, Lösungsmittel vollständig durch H₂O ersetzt), alle Materialien temperaturbehandelt mit 800°C.

	Schrumpfung	Dichte	Porosität	maximale Druckfestigkeit
	[%]	$[\frac{g}{cm^3}]$	[%]	[MPa]
Gel-Apatit-Prüfkörper; 21.3%wt. SiO ₂	42	1.18±0.02	53±0.5	~40
MI; 21.3%wt. SiO ₂	48±1	1.30±0.02	47±0.5	~82
MII; 24.5%wt. SiO ₂	53±1	1.38±0.02	40±0.5	~95
MIII; 28.8%wt. SiO ₂	60±2	1.44±0.02	34±1	~110
MIV; 35%wt. SiO ₂	69±3	1.56±0.02	26±1	~130

Mit steigendem SiO₂-Gehalt zeigten die Materialien eine zunehmende Schrumpfung während der Trocknung und Temperaturbehandlung. Daraus resultierten eine höhere Dichte und eine höhere maximale Festigkeit. Das ist überraschend, denn Hydroxylapatit hat eine Dichte von $3.2 \frac{g}{cm^3}$ und das amorphe SiO₂ hat eine maximale Dichte von $2.2 \frac{g}{cm^3}$. Mit zunehmendem SiO₂-Gehalt wäre also anzunehmen, daß die Dichte des Komposits abnimmt. Durch die räumlichen Abstände der unregelmäßig angeordneten Apatitkristallite liegen Poren vor, die mit SiO₂-Strukturen aufgefüllt worden sind.

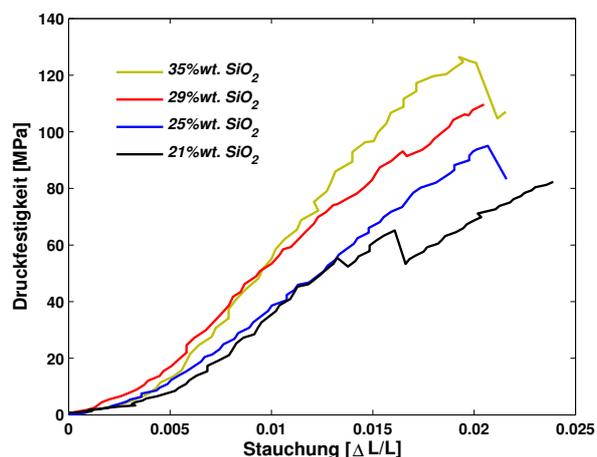
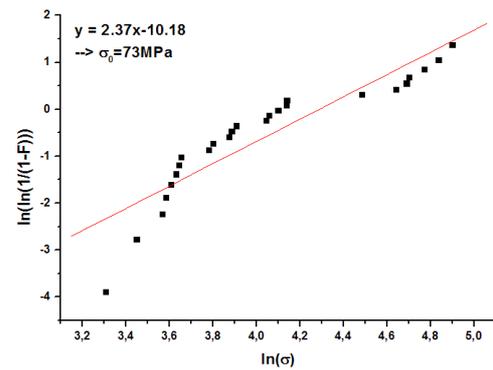
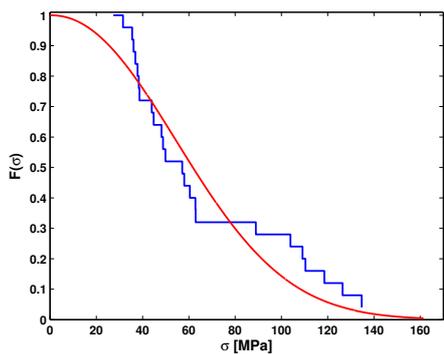
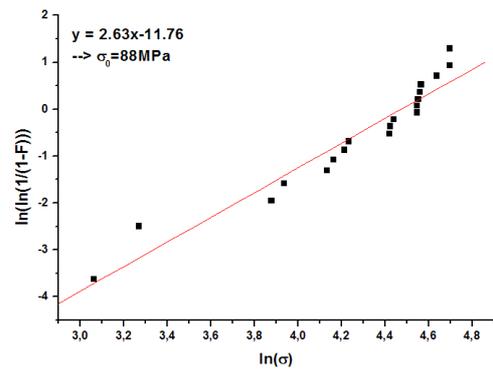
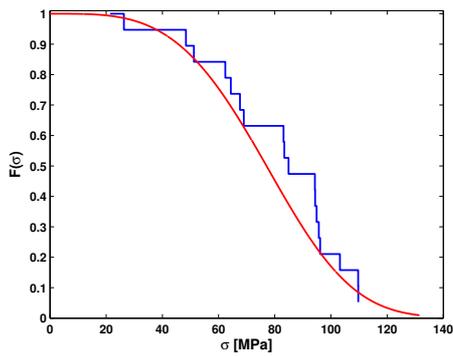
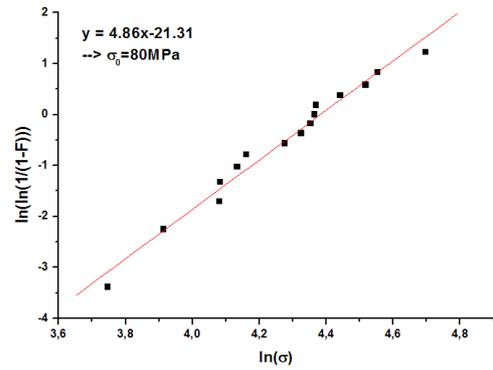
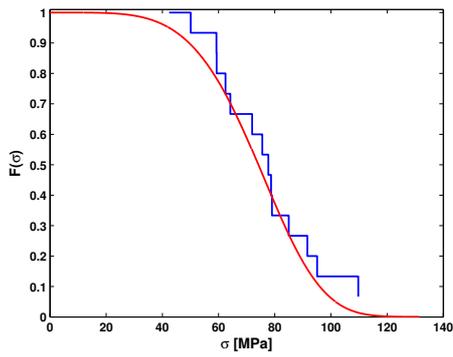
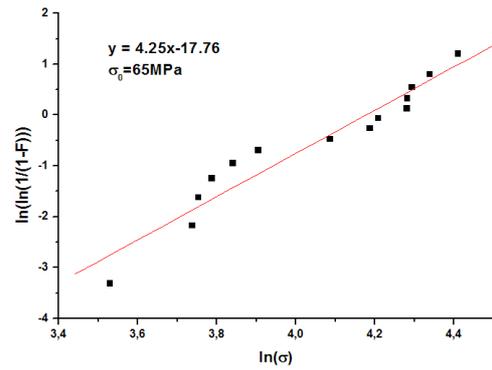
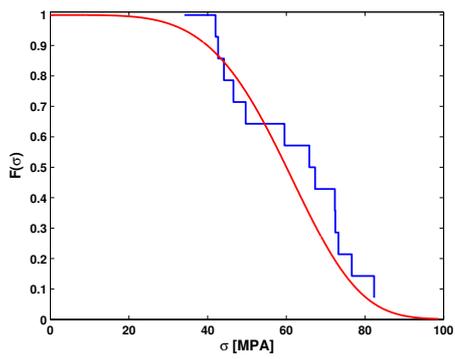


Abbildung 6.25: Stabilitätstests der Materialien MI – MIV nach einer Temperaturbehandlung von 800°C.

Mit höherem SiO₂-Anteil wurden diese Poren besser aufgefüllt (Abb. 6.27 und 6.28), was zu einer höheren Gesamtdichte führte. Auf diese Weise bedingt ein höherer Apatitanteil eine geringere Gesamtdichte.

In Abb. 6.25 ist der Verlauf der Druckfestigkeit ausgewählter Vertreter der Materialien 'MI' bis 'MIV' über der relativen Längenänderung aufgetragen. Der Bereich der Steigung der Kurven umfaßt nicht einmal 3% der Gesamtlänge der Prüfkörper



a)

b)

Abbildung 6.26: a) Weibull-Verteilung und b) Auswertung der charakteristischen Bruchfestigkeit der Materialien 'MI' bis 'MIV' (von oben nach unten).

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

und ist durch das Abplatzen von Material und durch Rißwachstum innerhalb der Prüfkörper gekennzeichnet. So zeigen verschiedene Prüfkörper desselben Materials einen unterschiedlichen Verlauf in der Spannungs-Stauchungs-Kurve. Deshalb wurde der jeweils erreichte Maximalwert der Bruchspannung für den jeweiligen Prüfkörper erfaßt und den Ergebnissen der Festigkeitsuntersuchungen eine Weibull-Verteilung zugrunde gelegt (Kap. A.3).

Die Ergebnisse sind in Abb. 6.26 dargestellt. Die ermittelten Bruchspannungen für mehrere Proben des gleichen Materials variieren sehr stark, was die Folge unterschiedlich orientierter und ausgeprägter Rißlängen innerhalb der Prüfkörper ist. Lage, Länge und Orientierung der Risse ist über das gesamte Volumen des jeweiligen Prüfkörpers statistisch verteilt.

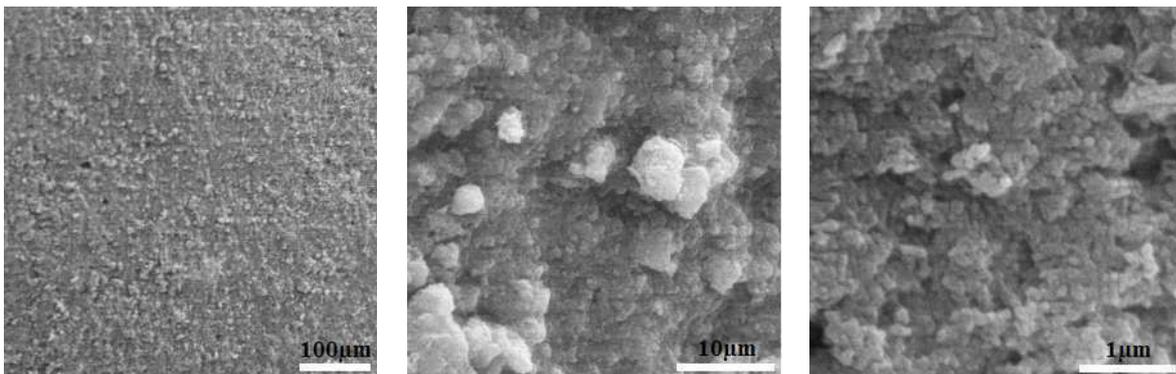


Abbildung 6.27: REM-Aufnahmen des Prüfkörpers 'MI' (22%wt.SiO₂).

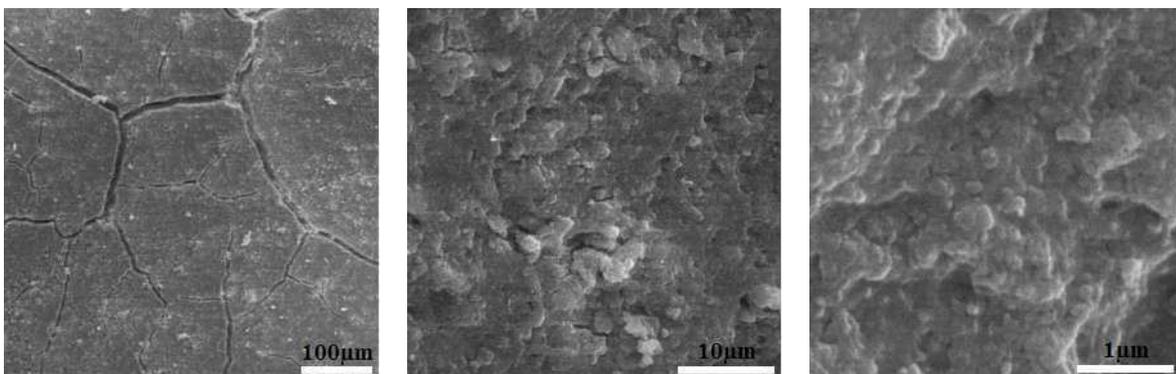


Abbildung 6.28: REM-Aufnahmen des Prüfkörpers 'MIV' (35%wt.SiO₂). Im oberen µm-Bereich ist eine starke Rißbildung sichtbar.

In *REM*-Aufnahmen ist zu sehen, daß eine Erhöhung des SiO_2 -Gehalts zu einer dichteren Struktur führt, aber auch zu einer Zunahme der Anzahl von Rissen innerhalb der Prüfkörper während der Trocknung (Abb. 6.27, 6.28). Deshalb liegt der Maximalwert der Bruchfestigkeit für das Material *MIV* (35%wt. SiO_2) mit 135 MPa zwar am höchsten, allerdings ist für dieses Material der charakteristische Ausfallwert mit 73 MPa niedriger als der für *MII* (24.5%wt. SiO_2) und *MIII* (28.8%wt. SiO_2). Ein Vertreter von 'MIV' wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 63.2% (am Wendepunkt der Verteilungskurve) schon bei einer Druckbelastung von ~ 50 MPa zerstört. Den zuverlässigsten Prüfkörper mit einem Weibull-Exponenten von 4.86 stellt das Material 'MII' (24.5%wt.) dar. Oberhalb eines SiO_2 -Anteils von 25%wt. zeigen die Prüfkörper eine immer stärkere Volumenschrumpfung und deshalb eine immer stärkere Rißbildung. Das angewandte Trocknungsverfahren muß also bei Bedarf für eine gleichbleibende Festigkeit optimiert werden.

In die kompakten Prüfkörper muß ein Makroporensystem installiert werden. Es kann abgeschätzt werden, wie ein Makroporensystem die Festigkeit des späteren makroporösen Formkörpers beeinflussen wird. Die Beschreibung der Festigkeit spröder Materialien nach bruchmechanischen Kriterien erfolgt durch die *Griffith*-Gleichung [64]:

$$\sigma = \left(\frac{2E'\gamma\zeta}{\pi c_0} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (6.6)$$

σ	Festigkeit
E'	Elastizitätsmodul
γ	Grenzflächenspannung SiO_2 /Apatit
c_0	Defektgröße
ζ	Ummantelung der HA-Partikel

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Die Apatitkristallite sind unregelmäßig in der SiO_2 -Matrix verteilt und bedingen durch ihre räumliche Orientierung Poren. Diese Poren sind zum Teil mit der SiO_2 -Matrix ausgefüllt. Die Umhüllung der Kristallite wird mit

$$\zeta = \left(\frac{D_A}{\lambda} \right)^2 f_A \quad (6.7)$$

D_A	Durchmesser der Primärteilchen des Gels
λ	durchschnittlicher Abstand der Primärteilchen im Gelnetzwerk
f_A	prozentualer Anteil des SiO_2 am durch die ungeordneten HA-Partikel bereitgestellten Porenvolumen

ausgedrückt [65]. λ wird mit Hilfe von

$$\lambda = D_A \left[\left(\frac{1}{1 - \epsilon_A} \right)^{\frac{1}{3}} - 1 \right] \quad (6.8)$$

mit

$$\epsilon_A = 1 - \left(\frac{R_A}{R_A + \frac{\lambda}{2}} \right)^3 \quad (6.9)$$

ϵ_A	Porosität
R_A	Primärteilchenradius

bestimmt [65]. Werte für die Festigkeit und Porosität der kompakten Prüfkörper sind der Tab. 6.1 zu entnehmen. Jetzt kann der Wert $\frac{E'\gamma}{c}$ abgeschätzt werden. Legt man nun die Makroporosität des zukünftigen Prüfkörpers mit 50% fest, ergeben sich für die Ummantelung der Apatitpartikel ζ im Mittel wesentlich kleinere Werte als beim kompakten Prüfkörper. Die aus der Festigkeit und Porosität der Prüfkörper *MI-MIV* berechneten Werte für die Variablen $\frac{E'\gamma}{c}$ und ζ sind in Tab. 6.2 gezeigt. Bei einem idealen Trocknungsprozeß und einer idealen Ummantelung der Apatitkristallite entspricht c_0 der größten Ausdehnung eines Kristallits, nämlich 50 nm.

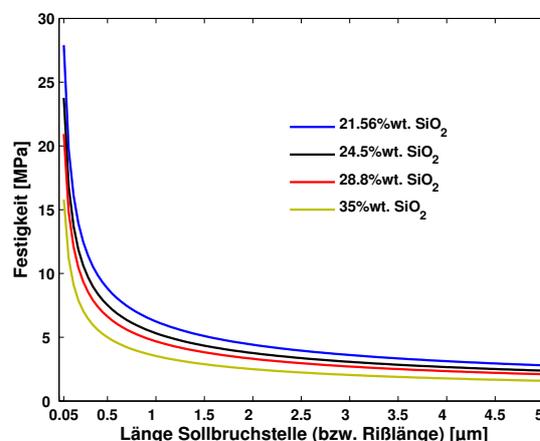


Abbildung 6.29: Festigkeit von zukünftigen Formkörpern in Abhängigkeit von der Defektgröße.

In Abhängigkeit von der Konstruktion des Makroporensystems werden sich andere Defektgrößen ergeben. Für die Festigkeit in Abhängigkeit von der Defektgröße bei einer Makroporosität von 50% ergeben sich die in Abb. 6.29 dargestellten Kurvenverläufe.

Tabelle 6.2: Kalkulation einiger Variablen der beschriebenen mathematischen Zusammenhänge. Der Anstieg der Gesamtporosität aufgrund eines Makroporensystems führt prozentual zu deutlich geringeren Werten für die SiO₂-Befüllung der zwischen den Apatitpartikeln vorliegenden Hohlräume. (MI-MIV – kompakte Prüfkörper, FK-1-FK-4 – theoretisch mit 50% Makroporen ausgestattete Prüfkörper.)

Material	Gesamtporosität [%]	Festigkeit [MPa]	$\frac{E'\gamma}{c}$ [MPa ²]	gefüllte Hohlräume f_A [%]
MI; 21.3%wt. SiO ₂	47±0.5	82	≈1735	≈34
FK-1; 21.3%wt. SiO ₂	73.5	–	siehe MI	≈22
MII; 24.5%wt. SiO ₂	40±0.5	95	≈1156	≈42
FK-2; 24.5%wt. SiO ₂	70	–	siehe MII	≈24
MIII; 28.8%wt. SiO ₂	34±1	110	≈844	≈51
FK-3; 28.8%wt. SiO ₂	67	–	siehe MIII	≈26
MIV; 35%wt. SiO ₂	26±1	130	≈443	≈66
FK-4; 35%wt. SiO ₂	63	–	siehe MIV	≈27

Die Festigkeitsuntersuchungen zeigten, daß ein höherer SiO_2 -Gehalt eine höhere Festigkeit der kompakten Blöcke zur Folge hat. Das Elastizitätsmodul der Materialien wird allerdings mit zunehmendem SiO_2 -Gehalt kleiner. Durch die zusätzliche Einbringung eines Makroporensystems wird der prozentuale Anteil der mit SiO_2 gefüllten Hohlräume, die aufgrund der ungeordneten Lage der Apatitkristallite zueinander zustande kommen, deutlich geringer (Tab. 6.2). Aufgrund dessen ist anzunehmen, daß die zukünftigen makroporösen Formkörper mit zunehmendem SiO_2 -Gehalt eine geringere Festigkeit haben. In jedem Fall zeigt das Apatitgel das Potential, nach Einbringung des Makroporensystems die geforderte Mindestfestigkeit von $3MPa$ zu erreichen. Es wurden diverse Möglichkeiten in Betracht gezogen, das Porensystem zu gestalten.

6.4.2 Verfahren zur Herstellung eines makroporösen Formkörpers

Nachdem das Ausgangsmaterial bezüglich der erreichbaren Festigkeit untersucht wurde, sollten Makroporen im Block zur Verfügung gestellt werden. Die Poren ($d \sim 8 - 10\mu m$) des (aus synthetischem β -Trikalziumphosphat bestehenden) Knochenersatzmaterials *Cerasorb*[®]M (Curasan AG) werden beispielsweise durch mechanische Bearbeitung installiert [32]. Ein Makroporensystem nachträglich mechanisch in die hergestellten kompakten Blöcke einzufügen war nicht möglich, da diese Blöcke mit ihrer hohen Festigkeit bei mechanischer Bearbeitung zum Abplatzen neigen und so kein geeignetes Ergebnis erzielt werden konnte.

Deshalb wurde die Möglichkeit erwogen, ein 3D-Gitter herzustellen, das vom Apatitsol noch vor der Gelbildung umschlossen wird. Dazu ist die Verwendung eines geeigneten Platzhalters notwendig. Es muß beachtet werden, daß das Gel während Trocknung und Temperaturbehandlung schrumpfen wird. Der verwendete Platzhalter wird diesem Vorgang im Weg stehen. Er muß also vor dem Schrumpfungsprozeß, der während der Trocknung einsetzt, entfernt werden. Ein Ansatz war, ein 3D-Gitter aus Wachs zu formen und mit dem Apatitsol zu übergießen. Das entstandene Porensystem (1 - 2 mm Durchmesser, Abb. 6.30) kann durch Verwendung sehr dünner Wachsfäden (Durchmes-

ser $\sim 100 \mu\text{m}$), die z.B. mit einem 3D-Webstuhl angeordnet werden könnten, optimiert werden. Um das Wachs nach der Gelbildung zu entfernen, wurde es mehrere Stunden in Wasser gekocht. Dabei gelang die restlose Entfernung allerdings nicht, das sich verflüssigende Wachs verklebt die Mikroporen. Dieses Verfahren kommt also ebenfalls nicht in Betracht.

Eine in der Literatur häufig erwähnte Methode zur Bereitstellung eines Makroporensystems ist das Aufschäumen von Materialien [66]. Also wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Aufschäumen erprobt. Die erforderliche Gasbildung wird im Apatitsol durch die Verwendung von Ammoniumhydrogenkarbonat ermöglicht. Ammoniumhydrogenkarbonat ist ein Salz, das sich unter dem Einfluß einer Säure zu Ammoniak, Kohlenstoffdioxid und Wasser zersetzt. Es wurde ausgewählt, da sich die Zersetzungsprodukte rückstandsfrei aus dem Formkörper entfernen lassen. Das Apatitsol ist nach Herstellung mit einem pH-Wert von $pH = 4.2$ sauer. Wird das Ammoniumhydrogenkarbonat mit dem Apatitsol vermischt, beginnt sofort die Zersetzung des Salzes. Der freiwerdende Ammoniak erhöht den pH -Wert im Sol, was die Gelbildung beschleunigt. Durch ständiges Rühren des Sols bei einer Sol-Temperatur von 20°C entweicht permanent Gas und führt zu einer sehr plötzlich einsetzenden Gelbildung. Hierbei wurden sowohl Gasbläschen als auch nicht zersetztes Ammoniumhydrogenkarbonat eingeschlossen. Letzteres kann durch Auskochen aus dem entstandenen Formkörper entfernt werden (oberhalb von 60°C zersetzt sich Ammoniumhydrogenkarbonat). Ein auf diese Weise hergestellter Formkörper verfügt

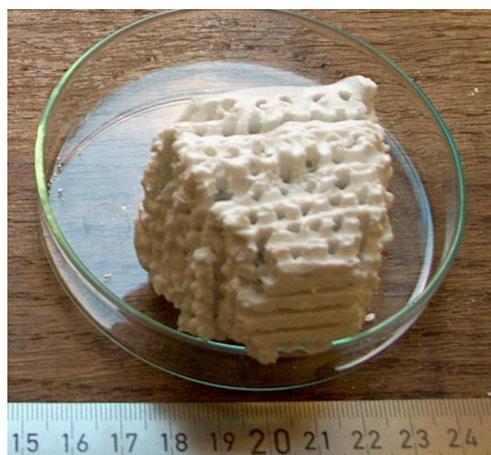


Abbildung 6.30: Formkörper. Das Porensystem wurde durch ein Gitter aus Formwachs zur Verfügung gestellt.

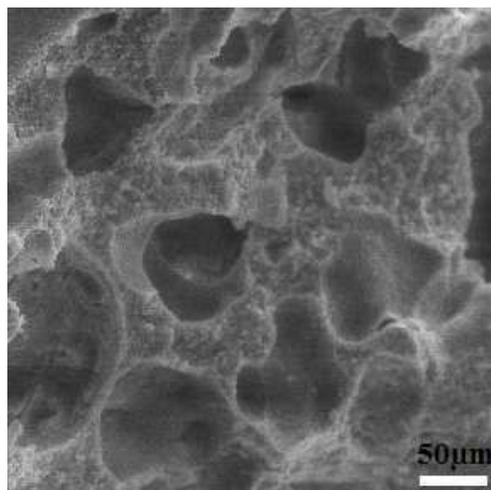


Abbildung 6.31: Mit Ammoniumhydrogenkarbonat aufgeschäumtes Apatitgel. Viele Makroporen sind "geschlossen".

über ein ausgeprägtes Makroporensystem (Abb. 6.31). Allerdings sind innerhalb dieses Porensystems auch Poren vorhanden, die ausschließlich über Nanoporen mit anderen Makroporen interkonnektieren. Diese 'geschlossenen' Poren enthalten Luft. Deshalb kann das Material im biologischen System nicht durchgängig mit Blut benetzt und dementsprechend nicht in den *remodelling*-Prozeß einbezogen werden.

Eine interkonnektierende Makroporenstruktur soll nun durch eine dichte Packung von Platzhalterkörnern (Ammoniumhydrogenkarbonat) gewährleistet werden. Die Platzhalterkörner sollen vom Gel (nicht vom Sol!) umschlossen werden. Danach muß die mit dem Trocknungsprozeß einsetzende Schrumpfung des Materials minimiert werden. Das ist über einen druckgesteuerten Prozeß gelungen.

6.4.3 Fertigung des makroporösen Formkörpers

Der Prozeß der Schrumpfung des Gels infolge Trocknung erfolgt aufgrund von Kapillarkräften, die ihre Ursache in der Grenzflächenspannung von Wasser zu SiO_2 haben und die in der Literatur mit einem Wert von $\gamma = 0.045 \frac{N}{m}$ angegeben wird [67]. Der wirkende Kapillardruck wird durch die Gleichung von Young und Laplace

$$P_c = -\frac{2\gamma}{r} \quad (6.10)$$

- γ Grenzflächenspannung
 r Radius der Krümmung des Meniskus

beschrieben. Der "Radius der Krümmung des Meniskus" beschreibt üblicherweise die Krümmung der Grenzfläche 'flüssige Oberfläche'/'angrenzendes Medium'. Der "Radius der Krümmung des Meniskus" wird mit dem Porenradius gleichgesetzt. Als Porenradius wird der Radius angenommen, den die kleinsten Struktureinheiten in der Kleinwinkelstreuung beim Gelbildungsprozeß zeigen (Kap. 6.1.4, Abb. 6.5).

Bei einem Radius von $r = 1.9 \text{ nm}$ ergibt sich für den wirkenden Kapillardruck ein Wert von $\sim 48 \text{ MPa}$. Wenn die mit der Trocknung verbundene Schrumpfung vermieden

werden soll, muß das durch das Einwirken eines äußeren Drucks in der Größenordnung der wirkenden Kapillarkräfte erfolgen. So kann ein Großteil des enthaltenen Dispersionsmittels aus den Poren entfernt werden. Einzig diese Möglichkeit der Herstellung eines makroporösen Formkörpers hat sich als technisch realisierbar erwiesen.

Die Viskosität von Flüssigkeiten wird mit Hilfe des Newton'schen Gesetzes beschrieben:

$$\vec{F} = \eta \frac{A\vec{v}}{x} \quad (6.11)$$

\vec{F}	Kraft
η	dynamische Viskosität
A	Fläche
v	Geschwindigkeit
x	Abstand

Zur Veranschaulichung stellt man sich zwei Platten der Fläche A vor, die im Abstand x zueinander angeordnet sind und zwischen denen sich eine Flüssigkeit befindet. Man benötigt die Kraft F , um eine der Platten zu verschieben. Aufgrund von Kohäsionskräften bewegt sich die der Platte am nächsten liegende Flüssigkeitsschicht mit derselben Geschwindigkeit v . Die dynamische Viskosität η ist im Fall einer Newtonschen, also ideal viskosen Flüssigkeit unabhängig von der Geschwindigkeit v . Zeigt die Viskosität einer Flüssigkeit aber ein zeit- oder schergeschwindigkeitsabhängiges Verhalten, handelt es sich um nicht-Newtonsche Flüssigkeiten mit z.B. strukturviskosem, plastischem oder thixotropem Verhalten.

Bei dem die Apatitpartikel umschließenden SiO_2 -Gel ist eine Kraft erforderlich, um die Gerüststrukturen im Gel aufzubrechen und das System zum Fließen zu bringen. Nach anschließender Entlastung des Systems fügen sich die Gerüststrukturen wieder zusammen. Dabei wird die Viskosität wieder größer, da sich erneut ein Netzwerk bildet und sich das Material verfestigt. Dieses thixotrope Verhalten soll ausgenutzt werden, um im Folgenden der Bildung eines Formkörpers zu dienen.

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Nach Herstellung des Sol-Apatit-Gemischs (Kap. 6.3) und erfolgter Gelbildung wird das Material granuliert. Die jetzt vorliegenden Rohlinge enthalten ein Wasser-Ethanol-Gemisch als Dispersionsmittel. Sie werden mit Ammoniumhydrogenkarbonat als Platzhalter gemischt, um das Porensystem zu konstruieren. Danach wird dieses Gemisch in eine Edelstahlform mit den Maßen $10\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ eingebracht. Für den endgültigen Formkörper sind diese Seitenmaße und eine Höhe von etwa 5 mm gewünscht. Innerhalb der Form wird mit Hilfe einer hydraulischen Presse ein Druck von mindestens 130 MPa auf das Gemisch ausgeübt (Abb. 6.32). Das SiO_2 -Gel stellt mit dem Clusternetzwerk eine innere Gerüststruktur zur Verfügung, die eine isotherme Gel-Sol-Gel-Umwandlung begünstigt: durch Ausübung von Scherkräften werden die das SiO_2 -Clusternetzwerk stabilisierenden kovalenten Bindungen überwunden und die Viskosität nimmt ab. Dieser Vorgang hat seine Ursache im thixotropen Verhalten des Gels.

Das Gel beginnt zu fließen, wobei es die Platzhalter umschließt. Dabei wird das Dispersionsmittel (also das Wasser-Ethanol-Gemisch) aus dem Material gedrückt, was die erneute Gelbildung begünstigt. Das als Platzhalter dienende Ammoniumhydrogenkarbonat ist in Wasser leicht löslich. Demzufolge wird während des Druckvorgangs ein



Teil des verwendeten Platzhalters gelöst, was den pH -Wert erhöht und dadurch ebenfalls die erneute Gelbildung unterstützt ($pH = 7.75 \pm 0.25$). Aufgrund des Verlustes an Dispersionsmittel sowie der pH -Wert-Erhöhung wird ein weiteres Fließen des Materials unmöglich.

Innerhalb des verwendeten formgebenden Materials entsteht aus dem Gemisch "granulierte Rohlinge" und Platzhalter ein kompakter Block. Nach der Herstellung des Blocks muß der Platzhalter entfernt werden. Das erfolgt, indem er in einem Wasserbad mit einer Temperatur zwischen 70 und 90°C gespült wird, da sich das verwendete Ammoniumhydrogenkarbonat oberhalb einer Temperatur von 60°C zu Ammo-

Abbildung 6.32: *Edelstahlform zur Herstellung von Formkörpern.*

niak und Kohlendioxid zersetzt. Der nun vorliegende makroporöse Formkörper wird im Vakuumschrank bei 250°C getrocknet und anschließend im Rohofen bei 700°C temperaturbehandelt.

6.4.4 Untersuchungen zur Festigkeit des Formkörpers

Die Apatitkristallite des stöchiometrischen Apatits (Kap. 6.2.1) sind größer als die im menschlichen Knochen vorliegenden Apatitkristallite. Das kalziumdefizitäre Apatit (Kap. 6.2.2) dagegen ist in seiner Morphologie den im menschlichen Knochen vorliegenden Apatitkristalliten sehr ähnlich. Deshalb wird in den weiteren Untersuchungen das kalziumdefizitäre Apatit verwendet.

Die Herstellung der Formkörper erfolgte wie beschrieben, allerdings in Versionen von 24%wt. und 39%wt. SiO_2 bei einem ausgeübten Druck von zunächst 130 MPa. Dabei wurde der Platzhalteranteil in der Ausgangsmischung so gering wie möglich gewählt, um bei dementsprechend geringem Makroporenvolumen eine möglichst hohe Festigkeit des Endproduktes zu gewährleisten. Sie wurden nach der Kompaktierung einem Spülvorgang sowie einer Trocknung bei 250°C und einer Temperaturbehandlung bei 700°C unterzogen. Anschließend erfolgten Festigkeitsprüfungen, sowohl am Institut für Maschinenbau (Universität Rostock) als auch am Institut für Biomedizinische Technik (Universität Rostock).

Während der mechanischen Belastung platzten immer wieder Materialteile des Formkörpers ab, der Anstieg der Festigkeitskurven ist deutlich durch diese partiellen Brüche gekennzeichnet. Die Ergebnisse zeigen, daß die Formkörper, die 24%wt. SiO_2 enthielten, eine höhere charakteristische Festigkeit aufwiesen als die Formkörper, die 39%wt. SiO_2 enthielten. Dieses Ergebnis bestätigt den in Kap. 6.4.1 festgestellten Sachverhalt, daß ein höherer SiO_2 -Gehalt bei Installation eines Makroporensystems zu einer geringeren Festigkeit führt.

Da bei der Anwendung von *NanoBone*[®]-Granulat ein erhöhter SiO_2 -Anteil zu einer wesentlich schnelleren Degradation des Biomaterials führt [69], erfolgten die weiteren Untersuchungen ebenfalls an Formkörpern, die einen erhöhten SiO_2 -Anteil aufwiesen (39%wt.).

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

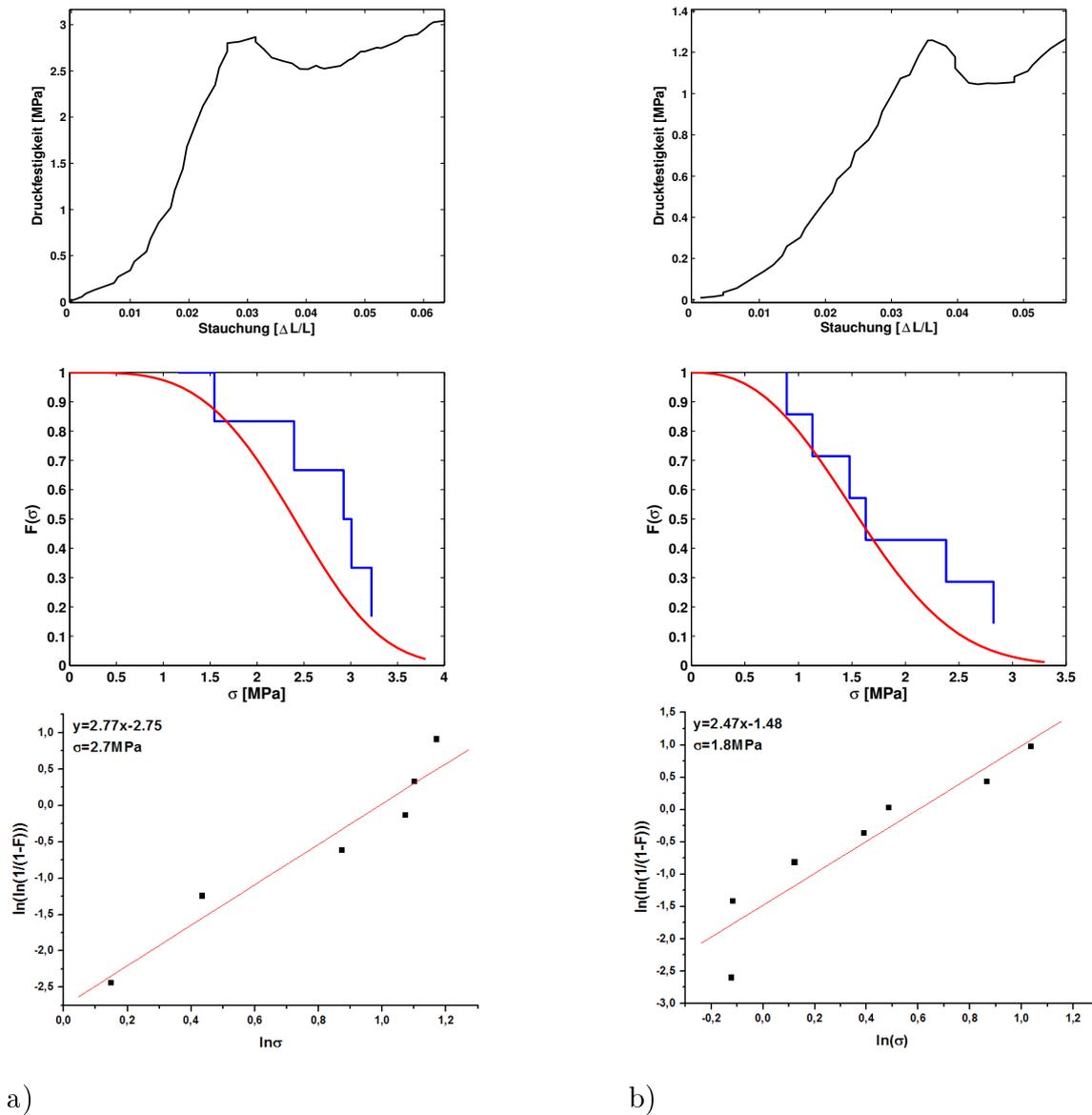


Abbildung 6.33: Es wurden Formkörper durch Ausüben eines Drucks von 130MPa auf das Granulat-Platzhalter-Gemisch gefertigt. Belastungstests dieser Formkörper und Auswertung (von oben nach unten: ein exemplarischer Festigkeitstest, Weibull-Verteilung und lineare Regression) der Untersuchungen, a) 24%wt. SiO₂ und b) 39%wt. SiO₂.

Durch Ausübung eines höheren Drucks während der Herstellung des Formkörpers sollte eine stärkere Verdichtung erfolgen. Entsprechend sollte eine höhere Festigkeit festzustellen sein. Deshalb wurden mit dem Aufwenden höheren Drucks weitere Versuche durchgeführt.

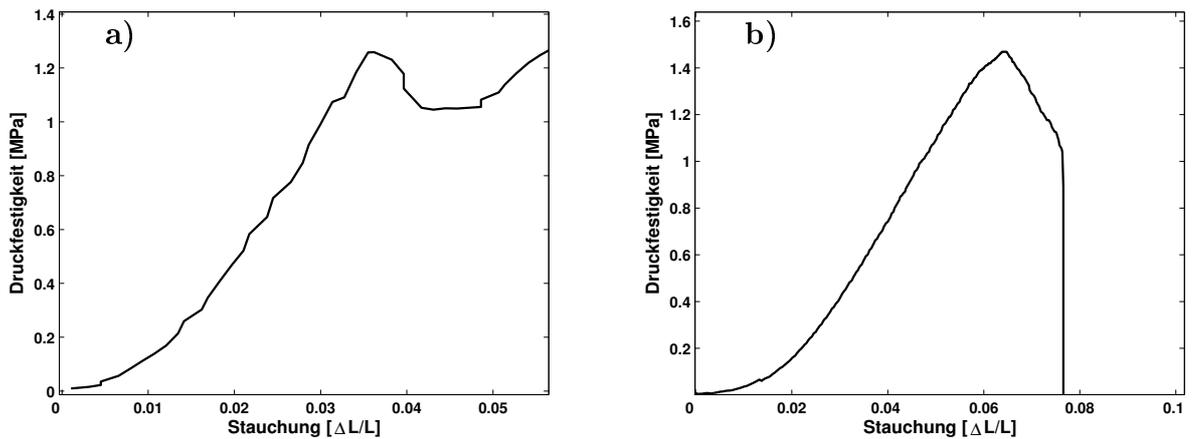


Abbildung 6.34: Festigkeitstests zu einem Formkörper (39%wt.SiO₂), hergestellt mit einem Druck von a) 130 MPa und b) 400 MPa.

Der auszuübende Druck wurde mit bis zu 400 MPa festgelegt. Die Ausübung eines solchen Drucks führte dazu, daß das Material als breiige Masse aus der Halterung geschoben wurde. Deshalb erfolgte die Druckausübung über einen begrenzten Zeitraum von 30 Sekunden. Jetzt hatte der resultierende Formkörper nach Ausübung eines Drucks von 130 MPa und abschließender Spül- und Temperaturbehandlung eine Dichte von $0.64 \frac{g}{cm^3}$ und eine Festigkeit von 1.1 ± 0.4 MPa. Der nach Ausübung eines Drucks von 400 MPa (ebenfalls zeitlich begrenzt) hergestellte Formkörper hatte nach Spül- und Temperaturbehandlung eine Dichte von $0.67 \frac{g}{cm^3}$ und eine Festigkeit von mehr als 1.4 MPa (Abb. 6.34). Neben der erhöhten Festigkeit ist der nun durch weniger partielle Brüche gekennzeichnete Anstieg in den Festigkeitskurven auffällig.

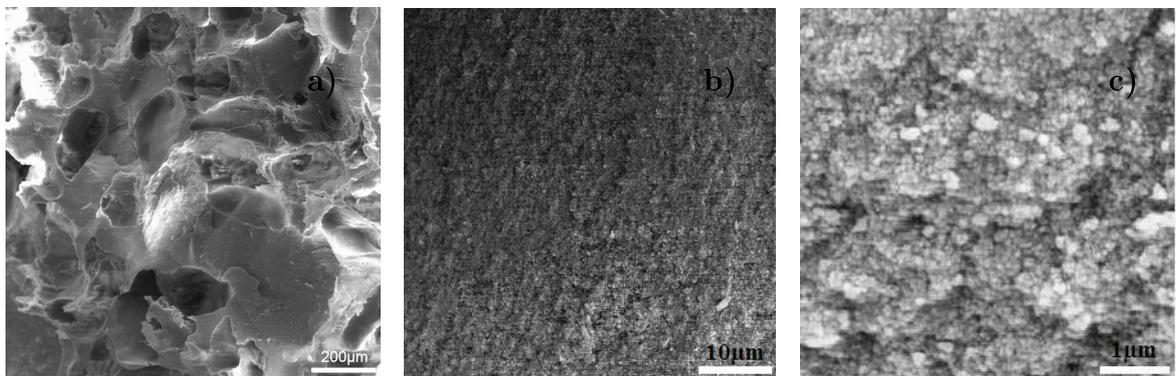


Abbildung 6.35: REM-Aufnahmen eines Formkörpers (39%wt.SiO₂). Die Mikroporenstruktur ist sehr dicht und praktisch rißfrei.

REM-Aufnahmen dieses Formkörpers zeigen zunächst die Makroporenstruktur (Abb. 6.35 a)). Das Makroporensystem ist unregelmäßig interkonnektierend. Die Struktur der mikroporösen Flächen (Abb. 6.35 b) und c)) erscheint sehr viel dichter und homogener als die der kompakten Blöcke (Abb. 6.27 und 6.28) oder die von *NanoBone*[®]-Granulat (Abb. 5.1). Durch den bei der Herstellung des Formkörpers aufgetragenen Druck wird die Struktur so stark verdichtet, daß der Formkörper während Trocknung und Temperaturbehandlung praktisch rissfrei bleibt.

6.4.5 Die Porenstruktur

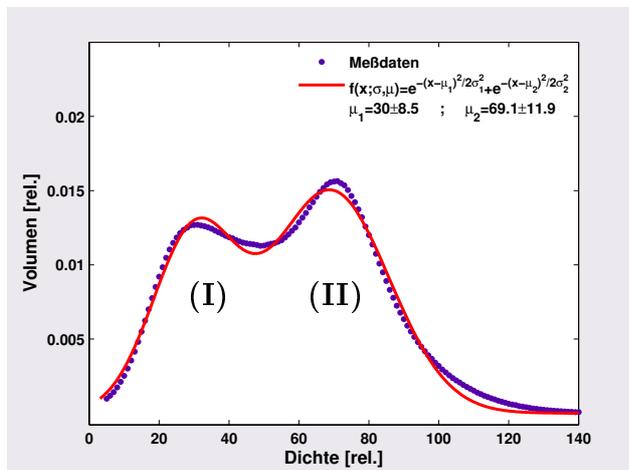


Abbildung 6.36: Auswertung der Dichteverteilung aus einer Untersuchung mit einem μ -CT für den mit einem Druck von 400 MPa gefertigten Formkörper: (I) Anteil der Makroporen, (II) Anteil des Komposit Apatit/SiO₂.

Komposit Apatit-SiO₂. Um den jeweiligen Volumenanteil auszuwerten, wurde der Kurvenverlauf als Summe zweier Gauss-Funktionen gefittet. Die jeweilige Fläche wurde anteilig auf die Gesamtfläche der Kurve bezogen. Im Ergebnis verfügt dieser Formkörper über ein Makroporen-Volumen von 36%vol.. Da für den späteren Formkörper ein Makroporen-Anteil von 50%vol. angestrebt ist, wurde der Platzhalteranteil bei der Herstellung erhöht. Mit diesem höheren Platzhalter-Anteil ist gewährleistet, daß bei Aufwenden des Drucks von 400 MPa kein Material aus der Halterung geschoben werden kann. Die charakteristische Festigkeit des jetzt vorliegenden Formkörpers beträgt

Die Quantifizierung des Makroporenanteils des mit einem Druck von 400 MPa hergestellten Formkörpers erfolgte durch die Auswertung der Dichteverteilung in einem μ -CT (Abb. 6.36). Das in der Meßkurve betrachtete Volumen des Formkörpers beträgt 1.2 cm³. Der Anteil an Makroporen entspricht dem Kurvenverlauf (I) mit der geringeren röntgenographischen Dichte. Der Kurvenverlauf (II) mit der größeren röntgenographischen Dichte entspricht dem

1.2 MPa (Abb. 6.37 d)). Der Makroporen-Anteil beträgt nach einer Untersuchung im μ -CT 50%vol. bei einem untersuchten Probenvolumen von 1.2 cm^3 (Abb. 6.37 b)).

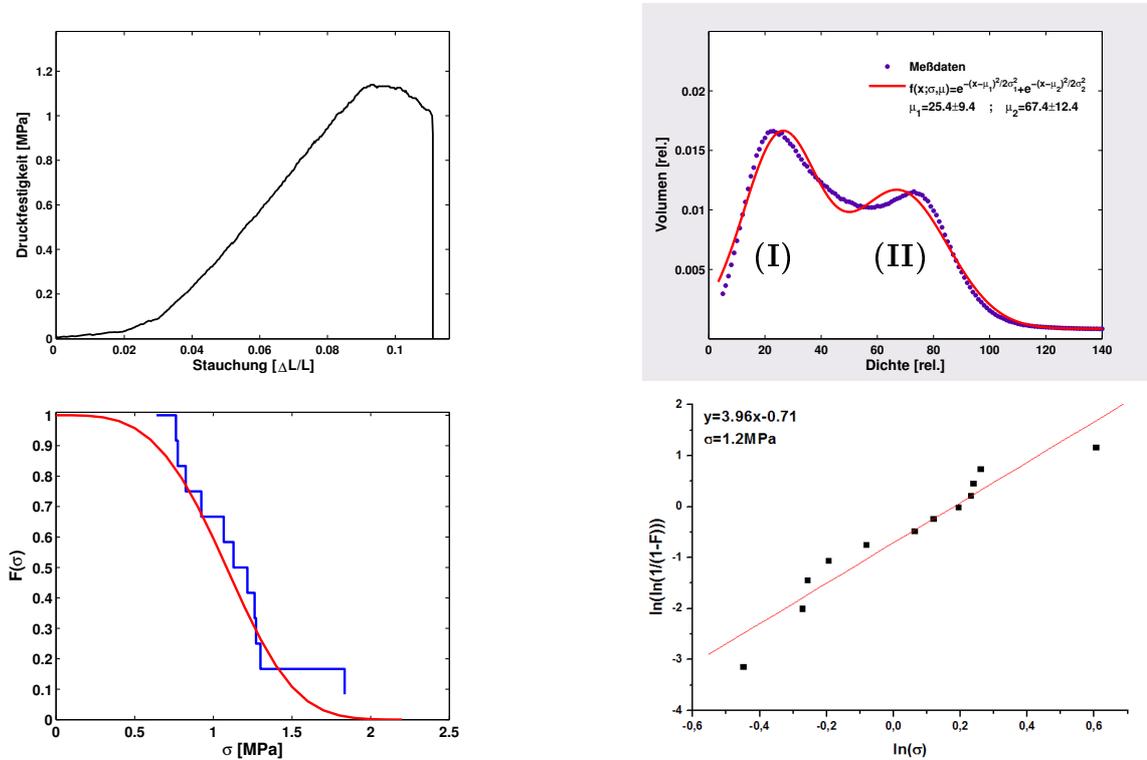


Abbildung 6.37: Auswertung von Festigkeitsuntersuchungen eines Formkörpers (39%wt.SiO₂). Durch eine Erhöhung des Anteils von Ammoniumhydrogenkarbonat in der Ausgangsmischung wurde eine höhere Makroporosität erreicht.

Jetzt bietet sich ein Vergleich der Porenverteilung an. Der Formkörper mit 24%wt.SiO₂ entspricht in seiner Zusammensetzung dem Granulat NanoBone[®]-S24, der Formkörper mit 39%wt.SiO₂ entspricht in seiner Zusammensetzung dem Granulat NanoBone[®]-S39. Die Verteilung der Poren im Nanometerbereich wurde mit der Quecksilberporosimetrie untersucht (Abb. 6.38 und 6.39).

In den untersuchten Materialien ist das Maximum der Porengröße von NanoBone[®]-S24 bei etwa 15 nm zu finden. Das Maximum der Porengröße von NanoBone[®]-S39 liegt bei etwa 7 nm. Mit dem Verdichtungsverfahren, das zum jeweiligen Formkörper führt, verschiebt sich das Maximum der Porengröße jeweils zu größeren Werten, da die kleineren Poren zerstört werden. Durch die Auswertung von RKWS-Experimenten

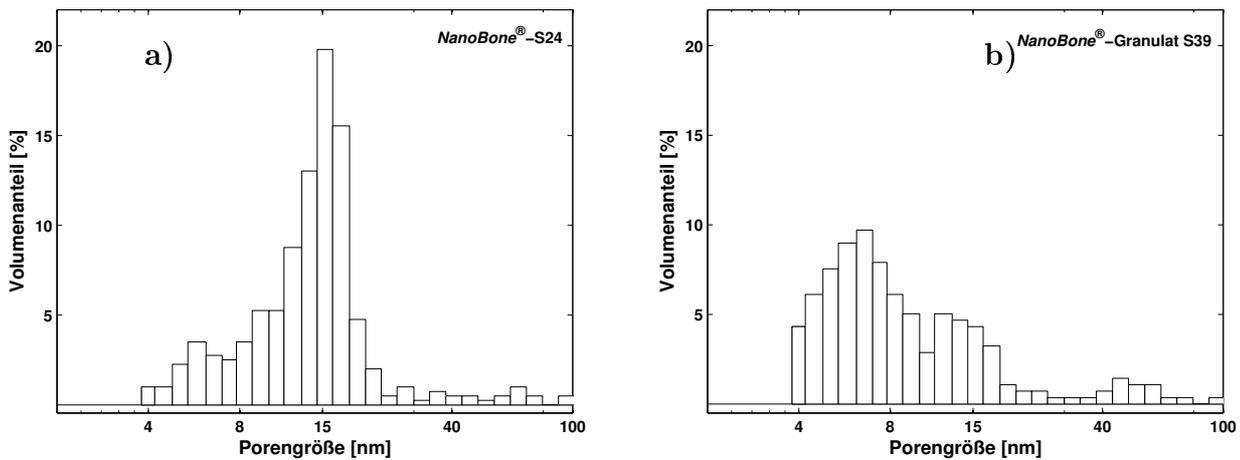


Abbildung 6.38: Mittels Quecksilberporosimetrie festgestellte Porengrößenverteilung von a) NanoBone[®]-S24 und b) NanoBone[®]-S39.

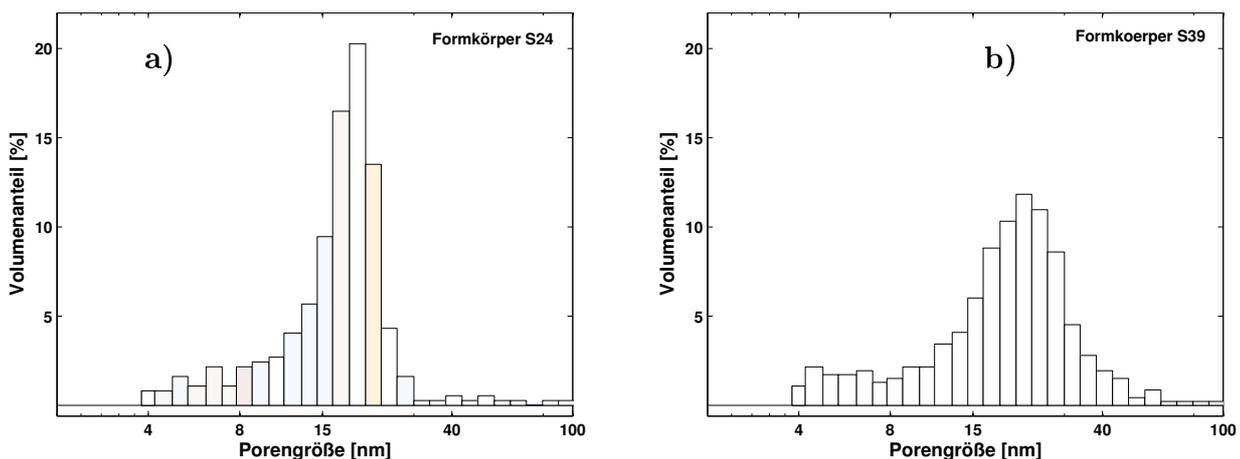


Abbildung 6.39: Mittels Quecksilberporosimetrie festgestellte Porengrößenverteilung von a) Formkörper-S24 und b) Formkörper-S39.

ergibt sich in der Porod-Auftragung der Formkörper jeweils ein Maximum (bei $q = 0.1 \text{ nm}^{-1}$). Mit der Auswertung der Sehnslängenverteilung findet man für die Formkörper separate streuende Objekte. Durch die pH -Wert-Erhöhung während der Herstellung der Formkörper wird bei der erneuten Gelbildung das Partikelwachstum gefördert. Der Streueinfluß der SiO_2 -Matrix ist verändert.

In Abb. 6.40 sind in a) die Streukurven von Formkörpern (24% und 39% wt.wt. SiO_2) wegen der identischen Zusammensetzung von NanoBone[®]-S24 und -S39 vergleichend

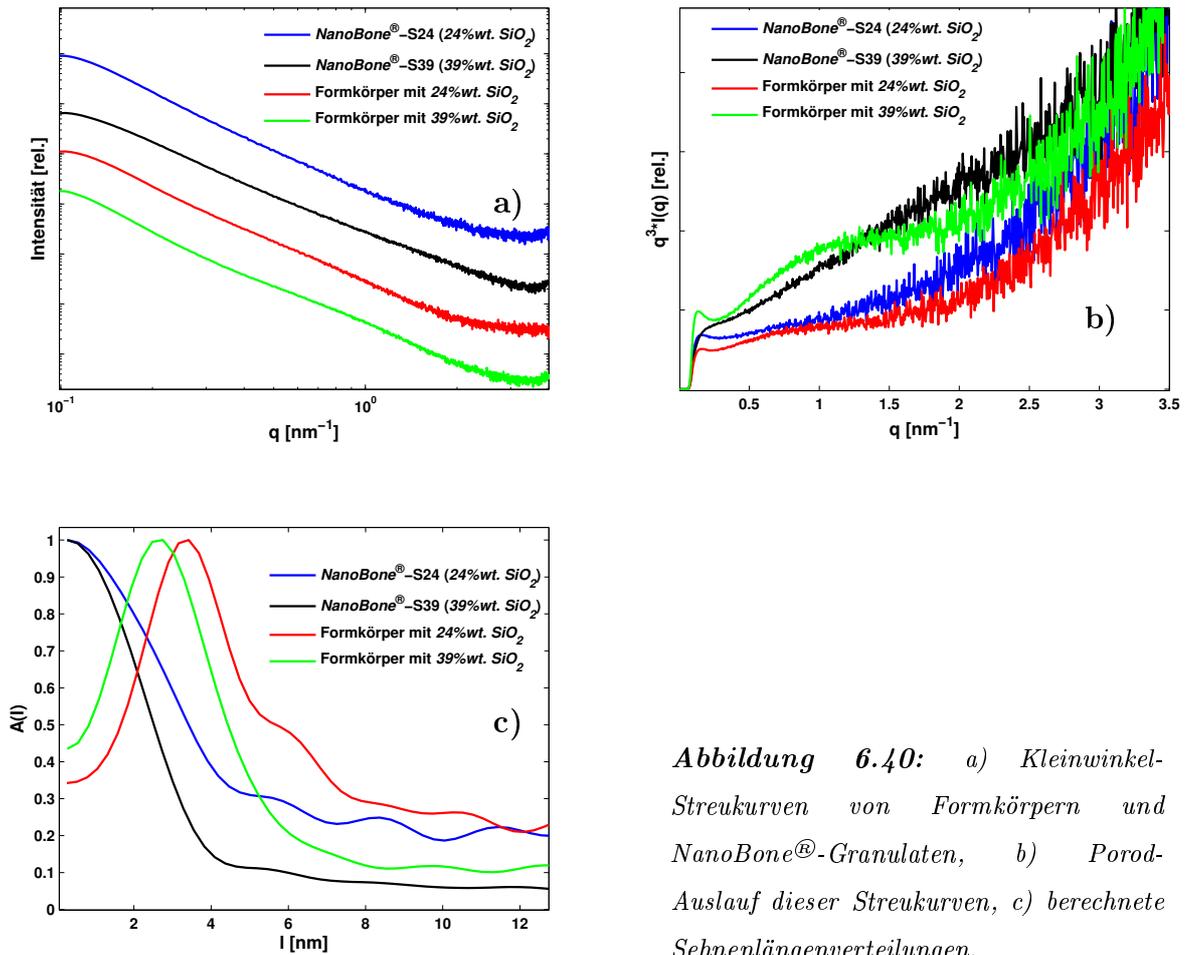


Abbildung 6.40: a) Kleinwinkel-Streukurven von Formkörpern und NanoBone[®]-Granulaten, b) Porod-Auslauf dieser Streukurven, c) berechnete Sehnenlängenverteilungen.

dargestellt. b) zeigt den Porod-Auslauf dieser Streukurven. Aufgrund des Maximums bei etwa $q = 0.1 \text{ nm}^{-1}$ ist bei beiden Formkörpern auf separate Partikel der Größe $r = \frac{\pi}{0.1 \text{ nm}^{-1}} = 31 \text{ nm}$ zu schließen. Bei NanoBone[®]-S24 deutet sich ein solches Maximum ebenfalls an. Dieser Streueinfluß ist also möglicherweise durch Apatit entstanden, das bei den S24-Materialien weniger stark mit SiO₂ ummantelt ist bzw. das bei den Formkörpern nach der Herstellung in der Ummantelung verändert ist.

Um die innere Oberfläche der verschiedenen Materialien zu untersuchen, wurden BET-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle (6.3) zusammenfassend dargestellt. Sämtliche Materialien zeichnen sich durch eine sehr große innere Oberfläche aus. Dabei zeigt NanoBone[®]-S39 die größte innere Oberfläche ($206.83 \frac{\text{m}^2}{\text{g}}$). Dennoch ist die innere Oberfläche des Formkörpers mit $109.67 \frac{\text{m}^2}{\text{g}}$ (24%wt. SiO₂) bzw. $117.99 \frac{\text{m}^2}{\text{g}}$ (39%wt. SiO₂) größer als die des ursprünglichen Granulats ($85.1 \frac{\text{m}^2}{\text{g}}$).

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Tabelle 6.3: Bestimmung der inneren Oberfläche verschiedener NanoBone[®]-Materialien mit BET.

Material	durchschnittlicher Porendurchmesser [nm]	spez. Oberfläche [$\frac{\text{m}^2}{\text{g}}$]
NanoBone [®] -Granulat	34.61	85.1
NanoBone [®] -S24	14.93	152.33
NanoBone [®] -S39	16.03	206.83
Formkörper mit 24%wt. SiO_2	18.84	109.67
Formkörper mit 39%wt. SiO_2	22.25	117.99

Weil bei den Formkörpern die SiO_2 -Matrix möglicherweise zum Nachteil verändert wurde, wurde ergänzend eine Messung mittels Pulverdiffraktometrie durchgeführt. Das Apatit im Formkörper S39 zeigt nach der Temperaturbehandlung kein Kristallitwachstum zeigt (Abb. 6.41). Deshalb ist die SiO_2 -Ummantelung als vollständig anzunehmen.

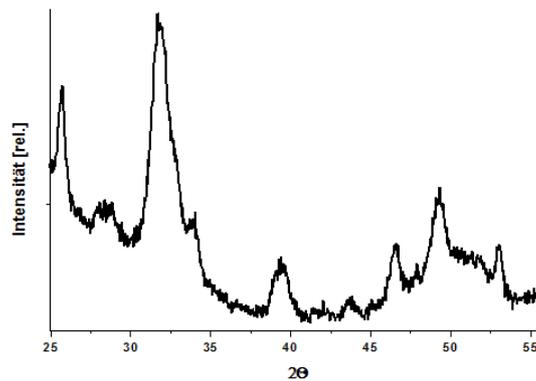


Abbildung 6.41: Röntgendiffrakrogramm eines Formkörpers nach vollständigem Herstellungsprozess.

6.5 Experimente *in vivo*

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden "Göttinger Minipigs" ausgewählt. Diese Tiere haben eine zum Menschen vergleichbare Knochenstruktur, die einem ähnlichen *remodelling*-Prozeß unterliegt. Im Anhang A.4 ist die medizinische Versorgung der Tiere beschrieben. Der extraorale Eingriff, der im Versuch stattfand, stellt keinen realistischen Eingriff beim Menschen für eine alveolare Augmentation dar. In den meisten Fällen ist ein intraoraler Eingriff üblich. Durch den extraoralen Eingriff wird das Risiko einer Wunddehiszenz minimiert. Die Untersuchungen *in vivo* wurden im Juli 2007 an "Göttinger Minipigs" durchgeführt und von der Kommission für Tierversuche des Bundeslandes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Die Tiere hatten ein Alter von fünf Jahren und wogen 35.3 ± 2.7 kg.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um sechs "Göttinger Minipigs". Jedem Versuchstier wurden sechs Formkörper implantiert (Kap. A.4). Nach fünf bzw. zehn Wochen wurden die Tiere getötet, um eine histologische und histomorphometrische Auswertung durchzuführen. Dazu wurden die Knochenproben in 4%igem neutralem, gepuffertem Formalin für sieben Tage fixiert und anschließend in ein bis zwei Millimeter dicke Scheiben zersägt. Danach wurden die Knochenscheiben in Kunststoff ('*Technovit 7200*[®] VLC' der Fa. Heraeus Kulzer, Wehrheim) eingebettet. Von den Proben wurden parallele Scheiben mit einer Dicke von 100 - 200 μ m angefertigt. Dazu wurde eine Mikro-Säge verwendet ('*ETS*[®]' der Fa. Exakt, Norderstedt). Mittels (Trenn-Dünnschliff-Technik [70]) wurde die finale Dicke von 10 - 20 μ m der Proben erreicht (Schleifgerät '*EMS*[®]' der Fa. Exakt, Norderstedt). Die Schriffe wurden mit Toluidin blau eingefärbt.

Die histomorphometrische Analyse erfolgte an den zentralen Schliffen jeder augmentierten Fläche. Dazu wurden diese Proben photographiert (*AxioCam MRC 5* an einem Mikroskop *Axioskop 40* der Fa. Carl Zeiss, Jena) und mit dem PC-Programm *Adobe Photoshop*[®] editiert. Auf diese Weise wurden verbliebenes Biomaterial, Weichgewebe und neugebildeter Knochen sowie die am Knochen *remodelling* beteiligten Zellen sichtbar gemacht.

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Es konnten bereits nach fünf Wochen frühe Zeichen von Osteogenese und Degradation beobachtet werden. Nach zehn Wochen war die Knochenneubildung innerhalb der mit den Formkörpern versorgten Regionen weiter fortgeschritten, die Bildung einer organischen Matrix war offensichtlich. Es wurde neuer Knochen in der zentralen und peripheren Region des Ersatzes gefunden. Deshalb ist anzunehmen, daß sowohl Osteokonduktion als auch -induktion durch das Biomaterial angeregt wurden.

Eine höhere Konzentration des SiO_2 -Anteils im Biomaterial führt zu einer schnelleren Degradation und Knochenneubildung nach fünf und zehn Wochen (Tab. 6.4). Dabei beeinflußt die Rate der Degradation das osteoinduktive Potential des Biomaterials. In den vorgestellten Versuchen umfaßte das Volumen neugebildeten Knochens in der augmentierten Region nach zehn Wochen $32.3\% \pm 10.2\%$ für Formkörper mit $24\%wt.SiO_2$ und $41.7\% \pm 9.1\%$ für Formkörper mit $39\%wt.SiO_2$. Der Einsatz von Zahnimplantaten ist für Formkörper mit $39\%wt.SiO_2$ nach einer Heilungszeit von zehn Wochen möglich.

Tabelle 6.4: Übersicht zu den *in vivo* getesteten Formkörpern. Es wurden Formkörper mit $24\%wt.$ und $39\%wt.SiO_2$ verbaut. Bei höherem SiO_2 -Anteil wurde eine schnellere Resorption festgestellt.

SiO ₂ -Anteil	Biomaterial [%]	Knochen [%]	Gewebe [%]
24%wt. 5 Wochen	53.3 ± 12.1	7.8 ± 13.2	39.0 ± 13.9
39%wt. 5 Wochen	33.1 ± 12.1	17.0 ± 3.6	49.9 ± 7.5
24%wt. 10 Wochen	31.6 ± 10.4	32.3 ± 10.2	36.1 ± 6.2
39%wt. 10 Wochen	10.5 ± 4.5	41.7 ± 9.1	48.4 ± 6.8

Die Ecken des Biomaterials waren nach zehn Wochen abgeflacht. An diesen äußeren Schichten des Biomaterials fand eine Resorption ohne Knochenneubildung statt. Diese sogenannte Oberflächenresorption wird auch bei autologem Knochenersatz beobachtet und durch das Wirken von Spannungen auf solche erhöhten, nicht direkt befestigten Bereiche erklärt. In den Regionen um die Schrauben fand dieser Volumenverlust nicht statt.

Bereits nach fünf Wochen ist Kallusbildung erfolgt. Fibröses, knorpeliges Knochengewebe ist entstanden. Der Formkörper ist mit diesem neugebildeten Knochen durch- und umbaut (Abb. 6.42). Die Abbildungen beziehen sich auf Proben des Versuchstieres "AD11".

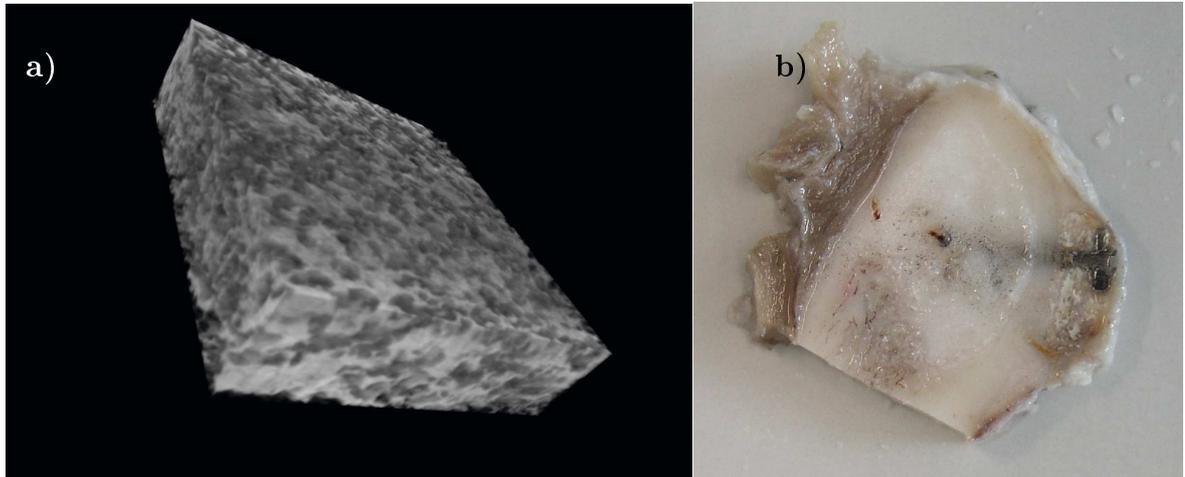


Abbildung 6.42: a) μ -CT-Aufnahme eines Formkörpers vor der Implantation. Fünf Wochen nach der Implantation wurde ein Stück des rechten Unterkieferknochens (des Versuchstieres AD11) entfernt und in Scheiben gesägt. b) Es ist die Schraube zu sehen, die den Formkörper am Knochen fixiert. Der Formkörper ist von neugebildetem Gewebe durchwachsen.

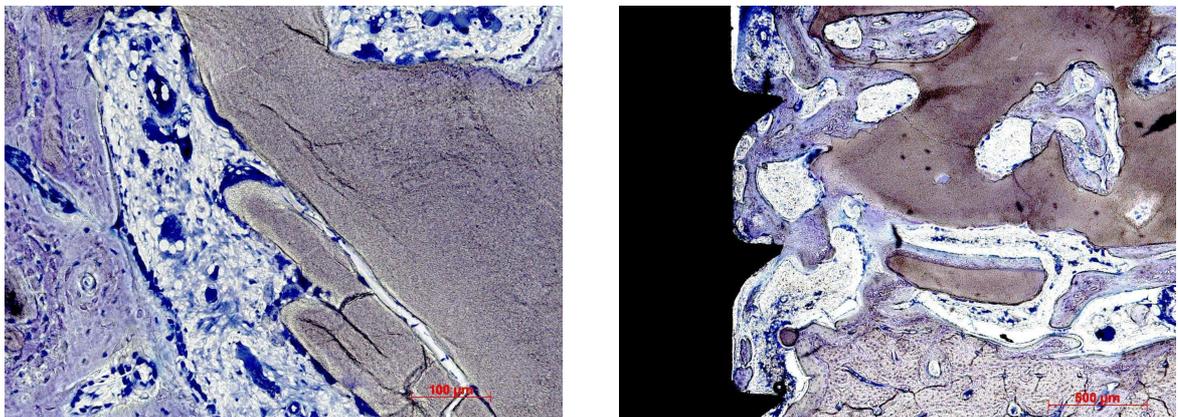


Abbildung 6.43: a) Fünf Wochen nach der Implantation sind Osteoklasten zu finden, die am Apatitrest des ehemaligen Formkörpers lagern. Der Apatitrest ist von neugebildetem Knochen umgeben, in dem offenbar auch Gefäße vorhanden sind. b) Es ist die Schraube zu sehen, die den Formkörper am Knochen fixiert. Ausgehend vom Formkörper bildet neuer Knochen eine Verbindung zu originärem Knochen.

KAPITEL 6. ENTWICKLUNG DES FORMKÖRPERS

Der neugebildete Knochen ist mit Gefäßen durchsetzt, die verbliebenen Bestandteile des ursprünglichen Formkörpers werden von Osteoklasten abgebaut (Abb. 6.45 a)). Der neugebildete Knochen ist Geflechtknochen, der mit Osteoblasten besetzte, brückenartige Übergänge zu originärem Knochen herstellt (Abb. 6.45 b)).

Dem Versuchstier "AD11" wurden zylindrische Formkörper entnommen, um Festigkeitsuntersuchungen durchzuführen (Abb. 6.44). Nachdem das Material beider Formkörper nachgegeben hat und die Kurve dementsprechend abknickt, widersteht eine in Richtung der Höhe ausgerichtete faserige Struktur dem aufgetragenen Druck. Die Formkörper sind nicht mehr spröde, sie sind elastisch geworden.

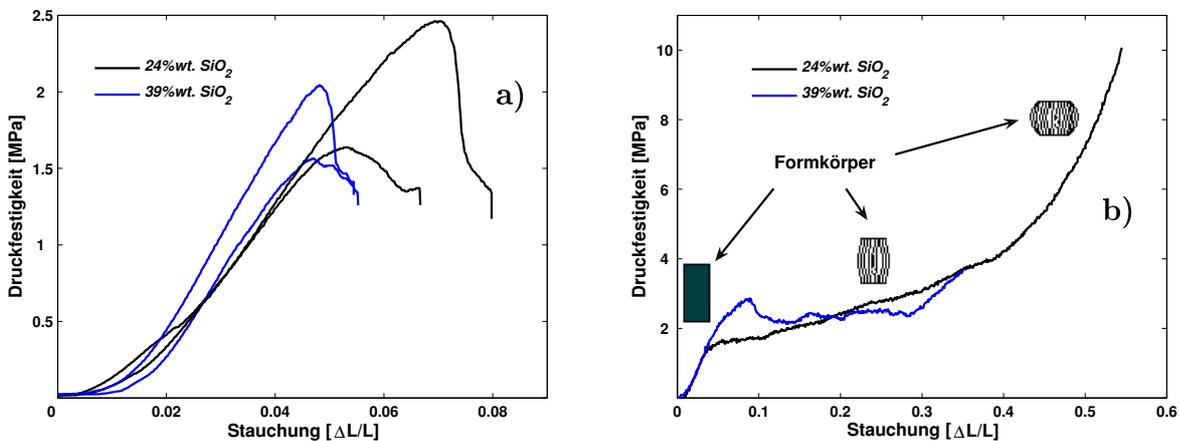
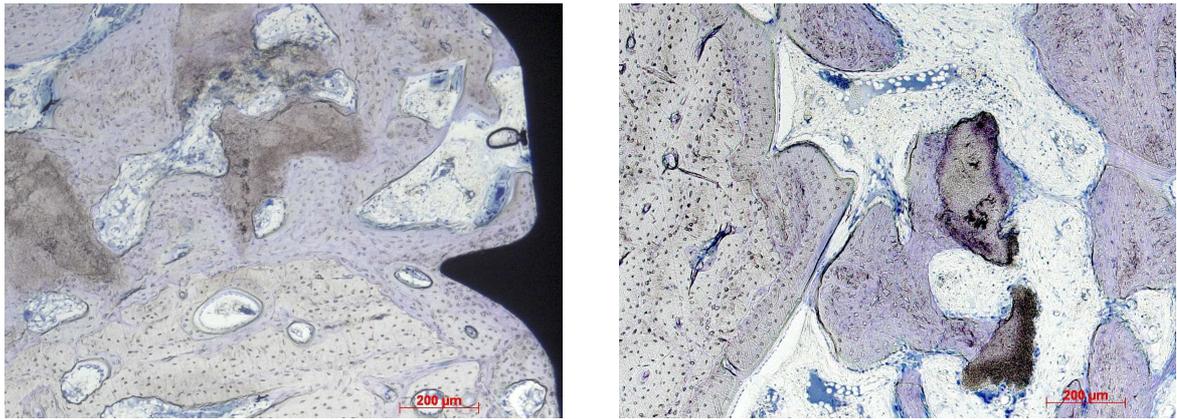


Abbildung 6.44: a) Stabilitätstests zu den Formkörpern vor der Implantation und b) fünf Wochen nach Implantation in das Versuchstier "AD11".

Da die Formkörper bei der Herstellung einem Druck ausgesetzt sind, der die Platzhalter von oben nach unten aufeinanderdrückt, sind durchgehende Makroporen bevorzugt in dieser Richtung des Formkörpers vorhanden. Die zylindrischen Formkörper wurden in Richtung der Länge faserig durchwachsen, da die Porenstruktur des Materials offensichtlich für diese Art der Durchbauung geeignet erscheint. Das Nachgeben des Kallus wird im mechanischen Belastungstest direkt beobachtet.

Zehn Wochen nach Augmentation ist weniger Material des ursprünglichen Formkörpers zu finden. Der Kallus hat sich zu kompakten Knochenstrukturen umgebildet.

An Resten des Formkörpers lagern Osteoklasten. Eine Unterscheidung zwischen originärem und neugebildetem Knochen ist schwierig. Sie wird durch unterschiedlich



a)

b)

Abbildung 6.45: a) Zehn Wochen nach der Implantation sind Osteoklasten zu finden, die an den wenigen verbliebenen Bestandteilen des ehemaligen Formkörpers lagern. b) Neuer Knochen geht fast nahtlos in originären Knochen über. Auch hier sind Osteoklasten und -blasten zu finden.

starke Blaufärbung möglich, bedingt durch die verschiedenen Anteile extrazellulärer Komponenten im alten und neuen Knochen. Am neugebildeten Knochen sind offenbar

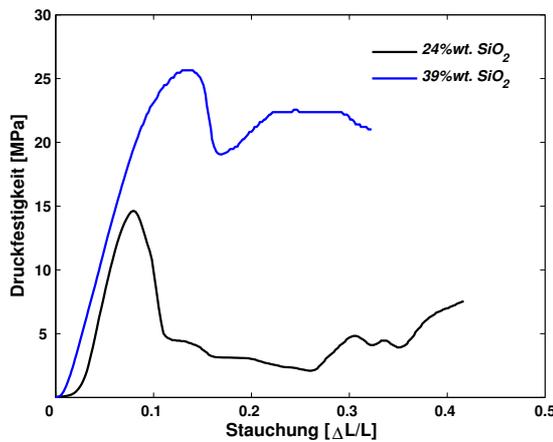


Abbildung 6.46: Stabilitätstests zu den Formkörpern des Versuchstieres "AD13" mit ehemals 24%wt. SiO_2 und "AD15" mit ehemals 39%wt. SiO_2 .

Osteoklasten und -blasten zu finden, er unterliegt dem Prozeß des Knochenremodelling. Auch hier wurden ehemals zylindrische Formkörper aus einem Versuchstier entfernt, um Festigkeitsuntersuchungen durchzuführen (Abb. 6.46). Dabei bezeichnet die Probe "AD13" einen Formkörper mit ehemals 24%wt., die Probe "AD15" einen Formkörper mit ehemals 39%wt. SiO_2 . Die Festigkeit der Formkörper ist 10 Wochen nach Implantation deutlich gestiegen und entspricht im Fall des ehemals 39%wt. SiO_2

enthaltenden Biomaterials etwa der trabekulären Knochens ($\sim 30MPa$, [45]).

Kapitel 7

Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Formkörpers, der aufgrund seiner Stabilität Knochendefekte schließt, an denen Scherkräfte auftreten. Dabei sollte eine Festigkeit von 3 MPa erreicht werden, um den Formkörper optimal im Defekt (an gesundem Knochen) zu befestigen.

Hierzu erfolgte zuerst eine Strukturuntersuchung der Ausgangsmaterialien. Bei den Ausgangsmaterialien handelt es sich um ein aus *Tetraethylorthosilikat* hergestelltes Sol, daß im Optimalfall während der Gelbildung einzelne Hydroxylapatitkristallite umschließt. Nach der Gelbildung erfolgen Trocknung und Temperaturbehandlung zur Entfernung des Dispersionsmittels und zur Entfernung von Kohlenstoffresten.

Die Untersuchungen des Sols bis zur Gelbildung (ohne Einbringung von Apatit in das Sol) zeigten, daß sich aufgrund der hohen SiO_2 -Konzentration ausgesprochen kleine SiO_2 -Strukturen bilden. Die räumliche Begrenzung verhindert die Ausbildung eines isotrop fraktalen Clusternetzwerks. Stattdessen entstehen kleine fraktale Struktureinheiten, die aufgrund des geringen Platzangebots eine dichte Packung bilden.

Während der Einbringung des Apatits in das Sol erfolgte eine Ultraschallgabe mit einem Gesamtenergieeintrag von 35 kJ bei einem Reaktionsvolumen von 144 ml. Dadurch wurden die Apatitagglomerate weitgehend zu Kristalliten vereinzelt bei gleichzeitiger Ummantelung mit dem Sol. Durch den mit Ultraschalleintrag erfolgten Energieeintrag wurde die Temperatur erhöht und so die Gelbildungszeit (nach Abstellen der Dispersionsenergie) auf ein Minimum reduziert. Dadurch wurden eine erneute Ag-

glomeration und Sedimentation des Apatits verhindert.

In einem weiteren Schritt wurde die erreichbare Festigkeit des getrockneten und temperaturbehandelten Apatit-Gel-Gemischs untersucht. Es ist gelungen, kompakte Blöcke Apatitgel mit einer Druckfestigkeit bis zu $\sim 130 \text{ MPa}$ herzustellen. Diese Festigkeit ist durch eine optimale Ummantelung des Apatits mit SiO_2 -Struktureinheiten erreicht worden. Die hergestellten Blöcke sollten jetzt mit einem Makroporensystem versehen werden. Bei der späteren Implantation des Materials sollte eine durchgängige Versorgung des Formkörpers mit Blut und somit der Prozeß der organischen Durchbauung des Materials ermöglicht werden. Das Porensystem konnte mit Hilfe von Ammoniumhydrogenkarbonat geschaffen werden. Das Ammoniumhydrogenkarbonat diente dazu als Platzhaltermaterial, das vom Apatitgel umschlossen wurde. Der Platzhalter garantiert mit einer dichtesten Packung interkonnektierende Poren. Unter Ausnutzung der thixotropen Eigenschaften des Gels ist die Fertigung eines makroporösen Formkörpers gelungen.

Es zeigte sich, daß mit einem steigenden SiO_2 -Anteil am Material eine bessere Ummantelung des Apatits erfolgt. Das führte allerdings zu einer Abnahme des Elastizitätsmoduls. Allerdings wurden Poren, die durch die Stellung der Apatitkristallite zueinander vorhanden sind, zunehmend mit nanoporösem SiO_2 verschlossen. Infolgedessen nahm auch die erreichbare Festigkeit der hergestellten kompakten Blöcke zu. Nach Bereitstellung des Makroporensystems verringert sich die Festigkeit der endgültig vorliegenden Materialien deutlich. Der Gesamtanteil von durch SiO_2 -Strukturen verschlossenen Poren nimmt bei allen variierenden SiO_2 -Anteilen deutlich ab und gleicht sich zunehmend an. Deshalb zeigte sich bei der Herstellung der Formkörper, daß der Formkörper mit 39%wt. SiO_2 eine niedrigere Festigkeit aufwies als der Formkörper mit 24%wt. SiO_2 .

Die entwickelten Formkörper haben eine zu *NanoBone*[®]-S24 bzw. -S39 identische Zusammensetzung. Dabei haben sie eine deutlich höhere Dichte als die Granulate. Durch die Aufwendung eines Drucks von 400 *MPa* während der Herstellung gehen Porenanteile im *nm*-Bereich verloren. Deshalb ist die innere Oberfläche der Formkörper wesentlich geringer als die dieser Granulate, aber dennoch größer als die des ursprüng-

lich vorliegenden *NanoBone*[®]-Granulats.

Aufgrund der Porenverteilung, der großen inneren Oberfläche sowie der Struktur zeigen die entwickelten Formkörper für den medizinischen Einsatz optimale Eigenschaften. Die Bereitstellung des Makroporensystems offenbarte sich als äußerst problematische Aufgabe. Sie wurde auf Kosten der Festigkeit der Materialien gelöst. Der entwickelte Formkörper S39 verfügt derzeit über eine Festigkeit von $1.2 \pm 0.2 \text{ MPa}$, was deutlich unter der angestrebten Mindestfestigkeit von 3 MPa liegt. Mit der angebotenen Festigkeit liegt ein fragiles Material vor, daß mit chirurgischem Geschick in einen zu behandelnden Defekt einzubringen ist. Wie gezeigt wurde, waren Osteogenese und Degradation des Biomaterials erkennbar. Innerhalb von fünf Wochen bildet sich Geflechtknochen. Es wurde gezeigt, daß nach diesem Zeitraum eine Wandlung vom spröden Rohmaterial zu einem zunehmend elastischen Knochen erfolgte. Mit einer erhöhten SiO_2 -Konzentration war auch ein höherer Grad der Degradation erkennbar. In der augmentierten Region war zehn Wochen nach Implantation ein Volumen von $41.7\% \pm 9.1\%$ an neugebildetem Knochen für Formkörper mit $39\% \text{ wt. SiO}_2$ festzustellen. Außerdem wiesen diese Formkörper eine Festigkeit trabekulären Knochens auf (Kap. 6.5).

Es wäre von Vorteil, die Festigkeit des Formkörpers zu erhöhen, um schließlich einen Mindestanspruch von 3 MPa zu erfüllen. Dies könnte erfolgen, indem das Makroporensystem mit SiO_2 gefüllt wird. Allerdings ist nicht bekannt, ob eine so große SiO_2 -Konzentration auch biologisch von Vorteil ist. Man kann dann z.B. versuchen, die Festigkeit des Formkörpers durch partielle Glasübergänge innerhalb der SiO_2 -Matrix zu erhöhen. Es ist dann zu klären, ob und wie der Matrixwechsel *in vivo* erfolgt. Deshalb müssen dann auch weitere tierexperimentelle Studien folgen.

Literaturverzeichnis

- [1] **Jaenicke L.**, Knochen, vollsynthetisch. *Chemie in unserer Zeit* 2002. **2**, 126-127.
- [2] **Bostrom M.P.G., Seigerman D.A.**, The Clinical Use of Allografts, Demineralized Bone Matrices, Synthetic Bone Graft Substitutes and Osteoinductive Growth Factors: A Survey Study. *Hospital for Special Surgery* 2005 **1**, 9-18.
- [3] **Ditzen W., Börner M.**, Klinische Erfahrungen einer neuen Generation von Knochenersatzmaterialien in der Extremitätenchirurgie unter besonderer Berücksichtigung der Praktikabilität, Stabilität sowie Remodellierung. *Trauma und Berufskrankheit* 2001 **4**, 270-277.
- [4] **Betz O., Augat P., Ignatius A., Claes L.**, Biomechanische und histologische Untersuchung autologer Spongiosa-Transplantate in einem teilbelasteten Transplantationsmodell. *Hefte Unfallchir* 2000 **275**, 237-238.
- [5] **Schnürer S.M., Gopp U., Kühn K.-D., Breusch S.J.**, Knochenersatzwerkstoffe. *Der Orthopäde* 2003 **32**, 2-10.
- [6] **Hauschild G., Bader A.**, Vor- und Nachteile synthetischer versus xenogener Knochenersatzmaterialien. *Tierärztl Prax Kleint* 2004 **32** 2, 67-70.
- [7] **Gerber T., Holzhüter G., Götz W., Bienengräber V., Henkel K.-O., Rumpel E.**, Nanostructuring of Biomaterials - A Pathway to Bone Grafting Substitute. *European Journal of Trauma* 2006 **2**, 132-140.
- [8] **Grafelmann H.L., Gross M.**, Neue mikro- und makroporöse β -Tricalciumphosphat-Keramik als Knochenregenerationsmaterial. *ZMK* **21** 1-2/05, 66-67.
- [9] **Albrecht J.**, In-Vivo-Testung ungesinterter, nanokristalliner Knochenaufbaumaterialien auf Hydroxylapatit-Basis bei der Reossifikation von Unterkieferdefekten kritischer Größe. *Dissertation* Bremen 2008.
- [10] **Gupta H.S., Seto J., Wagermaier W., Zaslansky P., Boesecke P., Fratzl P.**, Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *PNAS* 11/06.
- [11] **Weiner S., Traub W.**, Bone structure: from angstroms to microns. *FASEB J.* 1992 **6**, 879-885.

LITERATURVERZEICHNIS

- [12] **Ziv V., Wagner H.D., Weiner S.** Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone. *Bone* **18**, 417-428.
- [13] **Stach R.**, Die Grenzfläche zwischen bioinerten Implantatwerkstoffen und dem Knochen. *Dissertation* RWTH Aachen 1996.
- [14] **Dorozhkin S. V., Epple M.**, Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angew. Chem.* 2002 **114**, 3260 - 3277.
- [15] **Henning S.**, Morphologie und Mikromechanik von Knochen und neuartigen, partiell resorbierbaren Knochenzementen. *Dissertation* Halle-Wittenberg 2006.
- [16] **Weiner S., Wagner H.D.**, THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998 **28**, 271-298.
- [17] **Young R., Brown W.**, Structure of biological minerals. *Biological mineralization and demineralization, Report of the Dahlem Workshop*. Springer Verlag 1982.
- [18] **Hofbauer L.**, Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF- κ B-ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 **280**, 334-339.
- [19] **Burger E.H., Nijweide P.J.**, Cellular Origin and Theories of Osteoclast Differentiation. *Bone Volume 2: The Osteoclast*. CRC Press Inc. 2000.
- [20] **Knoblich B.**, Aggregationsstrukturen von SiO₂ in wässriger Lösung. *Dissertation* Universität Rostock 1999.
- [21] **Stachs O.**, Die Strukturbildung in ZrO₂-SiO₂ Gelen. *Dissertation* Universität Rostock 1996.
- [22] **Jánosi A.**, Neue Aspekte der Phasenbestimmung an Festkörpern mittels Röntgenkleinwinkelstreuung. *Zeitschrift für Physik B - Condensed Matter* 1986, **63**, 375-381.
- [23] **Brunauer S., Emmet P.H., Teller E.**, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. of the Amer. Chem. Soc.* 1938 **60**, 309-319.
- [24] **Toby B. H.**, *CMPR* – a powder diffraction toolkit. *J. Appl. Cryst.* 2005 **38**, 1040-1041.
- [25] **van Laar B.**, The Peak in Neutron Powder Diffraction. *J. Appl. Cryst.* 1984 **17**, 47-54.
- [26] **Finger L.W., Cox D.E., Jephcoat A.P.**, A correction for powder diffraction peak asymmetry due to axial divergence. *J. Appl. Cryst.* 1994 **27**, 892-900.
- [27] **Delhez R., de Keijser T., Mittemeijer E.J., Langford J.I.**, Size and Strain Parameters from Peak Profiles: Sense and Nonsense. *Aust. J. Phys.* 1988 **41**, 213-227.
- [28] **Wilson R.M., Elliott J.C., Dowker S.E.P.**, Rietveld refinement of the crystallographic structure of human dental enamel apatites. *American Mineralogist* 84 (1999), 1406-1414.

- [29] **Berger S.**, Entwicklung von in-situ härtenden Polymer/Apatit-Kompositmaterialien. *Dissertation* Freiberg 2007.
- [30] **Kinast F.**, Der Einfluß der standardisierten Diagnostik und Therapie auf den Heilungsverlauf chronischer Wunden an der unteren Extremität. *Dissertation* Würzburg 2003.
- [31] **Hofmann M.P.**, Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzement. *Dissertation* Würzburg 2003.
- [32] **Hänel T., Peters F., Hoffmann C., Dürr H.**, Aus CT-Daten generierte patientenindividuelle Implantata aus β -Tricalciumphosphat für die Knochenregeneration. *Regenerative Medizin 2009 Heft 1 (2. Jahrgang)* 13-17.
- [33] **Reinle T.**, Untersuchungen zur Biokompatibilität eines Antibiotikumträgers aus Kalziumsulfat und nanopartikulärem Hydroxylapatit und zur Pharmakokinetik von Gentamicin, Vancomycin und Clindamycin nach Implantation in Kaninchenfemura. *Dissertation* Gießen 2005.
- [34] **Levitt S.R., Crayton P.H., Monroe E.A., Condrate R.A.**, Forming Method for Apatite Prostheses. *J. Biomed. Mat. Res.* 1969 **3**, 683-4.
- [35] **Hench L.L., Paschall H.A.**, Histochemical Responses at a Biomaterial's Interface. *J. Biomed. Mat. Res.* 1969 **5**, 49-64.
- [36] **Wong P., Cao Q.**, Correlation function and structure factor for a mass fractal bounded by a surface fractal. *Physical Review B* 1992 **45**, 7627-7632.
- [37] **Teixeira J.**, Small-Angle Scattering by Fractal Systems. *J. Appl. Cryst.* 1988 **21**, 781-785.
- [38] **Kratky O.**, Die Welt der vernachlässigten Dimensionen und die Kleinwinkelstreuung der RÖNTGEN-Strahlen und Neutronen an biologischen Makromolekülen. *Nova Acta Leopoldina* Leipzig 1983.
- [39] **Stützle H., Hallfeldt K., Mandelkow H., Keßler S., Schweiberer L.**, Knochenneubildung durch Knochenersatzmaterialien. *Der Orthopäde* 1998 **27**, 118-125.
- [40] **Kalitzki P.**, Vergleich verschiedener Knochenersatz- bzw. Knochenaufbaumaterialien. *Oralchirurgie Journal.* **4**, 6-12.
- [41] **Geistlich & Söhne AG**, Offenlegungsschrift DE 101 34 514.
- [42] **Hoening J.F., Merten H.D.**, Risk of transmission of agents associated with Creutzfeld-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Plast and Reconstr Surg* 1999 **103**, 1324-1325.
- [43] **Schwartz Z., Weesner T., van Dijk S., Cochran D.L., Mellonig J.T., Lohmann C.H., Carnes D.L., Goldstein M., Dean D.D., Boyan B.D.**, Ability of Deproteinized Cancellous Bovine Bone to Induce New Bone Formation. *J. Periodontol* 2000 **71** 8, 1258-1269.

LITERATURVERZEICHNIS

- [44] **Gerber T.**, "Physics of Nanomaterials", *Research Report 2004-2006*, Institute of Physics of the University of Rostock, 2007.
- [45] **Winter W.**, Knochenfestigkeit und hydrostatische Spannungen - Bone Strength and Hydrostatic Stress. *Biomedizinische Technik 1996* **41**, 209-212.
- [46] **Schmidt H.K.**, Das Sol-Gel-Verfahren. *Chemie in unserer Zeit* **3**, 176-184.
- [47] **Himmel B.**, Strukturbildung und Ordnungsprozesse bei der Entstehung anorganischer Gläser und Gele aus der Schmelze, der Lösung und der Dampfphase. *Habilitationsschrift* Rostock 1994.
- [48] **Iler R.K.**, The chemistry of silica. *Wiley and Sons* New York 1979.
- [49] **Zarzycki J.**, Past and Present of Sol-Gel Science and Technology. *J. of Sol-Gel Science and Technology* **8**, 17-22.
- [50] **Sakka S.**, Gel Method for Making Glass. *Treatise on Material Science and Technology, Academic Press 1982* **22**, 129-167.
- [51] **Brinker C. & Scherer G.**, Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. *Academic Press* New York 1990.
- [52] **Briegleb G.**, Protonenaffinitäten von Säureanionen. *Naturwissenschaften* **Vol. 30**, 436-439.
- [53] **Pope E.J.A., Mackenzie J.D.**, Sol-gel processing of silica: II. The role of the catalyst. *J. Non-Cryst. Solids 1986* **87**, 185-198.
- [54] **Traykova T.**, Development and optimisation of calcium phosphate silica-based ceramics for medical applications. *Dissertation* Rostock 2003.
- [55] **Fricke J.**, Aerogels and their applications. *Journal of Non-Crystalline 1992*, textbf147 & 148, S. 356-362.
- [56] **Gerber T., Himmel B.**, Dissertation B und A, Rostock, 1987.
- [57] **Hosemann R., Bagchi S.H.**, Direct Analysis of Diffraction by Matter, *North Holland Publishing Co.* Amsterdam 1962.
- [58] **A. Hasmy, R. Vachel, R. Jullien**, Small-angle scattering by fractal aggregates: A numerical investigation of the crossover between the fractal regime and the Porod regime. *Phys. Rev. B 1994* **50**, 1305-1308.
- [59] **Schmidt H., Jonschker G., Goedicke S., Mennig M.**, The Sol-Gel-Process as a Basic Technology for Nanoparticle-Dispersed Inorganic-Organic Composites. *Journal of Sol-Gel Science and Technology 2000* **19**, 39-51.
- [60] **Wyckoff R.W.G.**, CRYSTALL STRUCTURES. *Robert E. Krieger Publishing Company* 1981.

- [61] **Elliott J.C.**, Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. *ELSEVIER SCIENCE B.V.* Amsterdam 1994.
- [62] **Gibson I.R., Bonfield W.**, Preparation and characterization of magnesium/carbonate co-substituted hydroxyapatites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2002 **13**, 685-693.
- [63] **Ilschner B., Singer R.F.**, Werkstoffwissenschaften und Fertigungstechnik. *Springer Verlag* Berlin 2005.
- [64] **Voss D.**, Charakterisierung eines neuen, entgasungsarmen und verbrennbaren Formstoffes für Gießerei-Anwendungen: Kohlenstoff AeroSande. *Dissertation* RWTH Aachen 2004.
- [65] **Ratke L., Brück S.**, Mechanical properties of aerogel composites for casting purposes. *J. Mater. Sci.* 2006 **41**, 1019-1024.
- [66] **Studart A. R., Gonzenbach U. T., Tervoord E., Gaukler L. J.**, Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *J. Am. Ceram. Soc.* 2006 **89(6)** 1771-1789.
- [67] **Günther, T.**, Zum Fällungsprozeß und Wachstum kugelförmiger SiO_2 -Partikel. *Dissertation* Magdeburg 2008.
- [68] **Xu W., Holzhüter G., Sorg H., Wolter D., Lenz S., Gerber T., Vollmar B.**, Early matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. *J. Biomed. Mat. Res.* 2009 **91**, 692-699.
- [69] **Xu W., Gradl G., Holzhüter G., Lenz S., Wolter D., Götz W., Gerber T., Vollmar B.**, Evaluation of bone substitutes in tibia defect model in the rat. *Langenbecks Arch. Surg.* 2009 **394**, 938-939.
- [70] **Donath K., Breuner G.**, A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. *J. Oral Path.* 1982, **11(4)**, 318-326.
- [71] **Sachs L., Hedderich J.**, Angewandte Statistik. *Springer Verlag* Berlin 2006.
- [72] **Wu D., Zhou J., Li Y.**, Unbiased estimation of Weibull parameters with the linear regression method. *Elsevier* 2005.

Anhang A

Material und Methoden

A.1 Röntgenkleinwinkelstreuung

In diesem Abschnitt sind die Grundlagen der Kleinwinkelstreuung aus den Arbeiten [21] und [20] zusammengefaßt dargestellt.

Bei Röntgenstreuung an Materie kommt es zur Wechselwirkung der Röntgenstrahlung mit Elektronen durch deren Schwingungsanregung. Die Elektronen emittieren als oszillierende Dipole Strahlung, deren Energie aufgrund des elastischen Streuprozesses der der einfallenden Röntgenstrahlung entspricht. Es werden sphärische Sekundärwellen mit richtungsabhängiger Amplitude emittiert. Die von den verschiedenen Streuzentren ausgehenden Sekundärwellen haben eine feste Phasenbeziehung zur Primärwelle und somit untereinander, so daß sie miteinander interferieren können. Diese Interferenz führt zu einer bestimmten örtlichen Intensitätsverteilung, die das gleiche Fourierspektrum wie das ausgemessene Strahlungsfeld hat und kann als Ergebnis des Streuexperiments registriert werden.

Die kontinuierliche Elektronendichteverteilung gibt die Zahl der Streuzentren pro Volumeneinheit V am Ort r an. Die resultierende Streuamplitude $A(\vec{q})$ einer Streuwelle erhält man durch Summation aller Sekundärwellen:

$$A(\vec{q}) = A_0 \cdot \int_V \rho(\vec{r}) \cdot e^{-i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (\text{A.1})$$

Die Streuamplitude ist die Fouriertransformierte der Elektronendichte des streuenden Objekts. Experimentell erhält man die Intensität $I(\vec{q})$ der Streustrahlung. Sie ergibt sich aus dem Betragsquadrat der Amplitude:

$$I(\vec{q}) = A(\vec{q})A^*(\vec{q}) = 4\pi \int_0^\infty r^2 C(r) e^{-i\vec{q}\vec{r}} d\vec{r} \quad (\text{A.2})$$

Aufgrund dieser Faltung gehen die Informationen über die Phasen der Sekundärwellen verloren. Die erhaltene Streuintensität ist die Fouriertransformierte der Autokorrelationsfunktion der Elektronendichte. Die Autokorrelationsfunktion wird auf das Schwankungsquadrat der Elektronendichte normiert. Die erhaltene Korrelationsfunktion wird im Weiteren mit $C(\vec{r})$ bezeichnet [36]. In einem System mit diskreten streuenden Bereichen stellt $C(\vec{r})$ die über alle Richtungen gemittelte Wahrscheinlichkeit dar, im Abstand r von einem Volumenelement des streuenden Bereichs ein weiteres Volumenelement desselben streuenden Bereichs anzutreffen. Strukturmerkmale bei kleinen r -Werten werden durch die Sehnenlängenverteilung

$$A(l) = l \cdot \left(\frac{d^2 C(r)}{dr^2} \right)_{r=l} \quad (\text{A.3})$$

widergegeben, wobei $A(l)$ die Wahrscheinlichkeit dafür angibt, daß die Länge der Sehne eines Teilchens l ist.

A.2 Röntgen-Diffraktometrie

Die erforderlichen Messungen werden im Debye-Scherrer-Verfahren durchgeführt. Dazu wird eine pulverförmige Probe in eine Kapillare mit einem Durchmesser von 0.6 mm eingebracht. Der Detektor ist ein INEL (ein ortsempfindlicher Detektor) der französischen Fa. 'INEL Instrumentation Electronique'. Der Radius des Diffraktometers entspricht dem Abstand der eingebrachten Probe vom Detektor und beträgt 220 mm. Die Untersuchungen finden bei Kupfer- K_α -Strahlung statt.

Qualitativ kann festgestellt werden, welche kristallographischen Phasen dem aufgenommenen Diffraktogramm zuzuordnen sind. Eine Peakbreitenanalyse gibt Aufschluß über die Größe der kohärent streuenden Bereiche. Die endliche Ausdehnung D_{hkl} des zum Beugungspeak beitragenden Kristallits wird über die Scherrer-Gleichung ermittelt:

$$D_{hkl} = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos\theta} \quad (\text{A.4})$$

- K = von Meßanordnung abhängige Konstante
- λ = verwendete Wellenlänge
- B = integrale Halbwertsbreite [Bogenmaß]
- θ = einfacher Beugungswinkel

Die beobachtete Halbwertsbreite ist im Wesentlichen durch den Einfluß des verwendeten Diffraktometers und durch den Einfluß der Kristallitgröße gekennzeichnet. Um den instrumentellen Einfluß zu beurteilen, wurde das Beugungsspektrum von Silizium aufgenommen. In diesem Spektrum wurde offensichtlich, daß die instrumentelle Verbreiterung bei diesem Detektor winkelspezifisch ist und insbesondere im Winkelbereich von $2\theta < 60^\circ$ einen sehr speziellen Verlauf zeigt (Abb. A.1). Aufgrund dieser komplizierten experimentellen Verbreiterung liefert die Scherrer-Gleichung für die Kristallitgrößen widersprüchliche Ergebnisse. Deshalb wird das Detektorprofil computergestützt analysiert. Danach werden aus dem Pulverdiffraktogramm Zelltyp und Gitterkonstanten des

untersuchten Materials bestimmt, um mit Hilfe des *Le-Bail*-Verfahrens die Kristallitgrößen festzustellen.

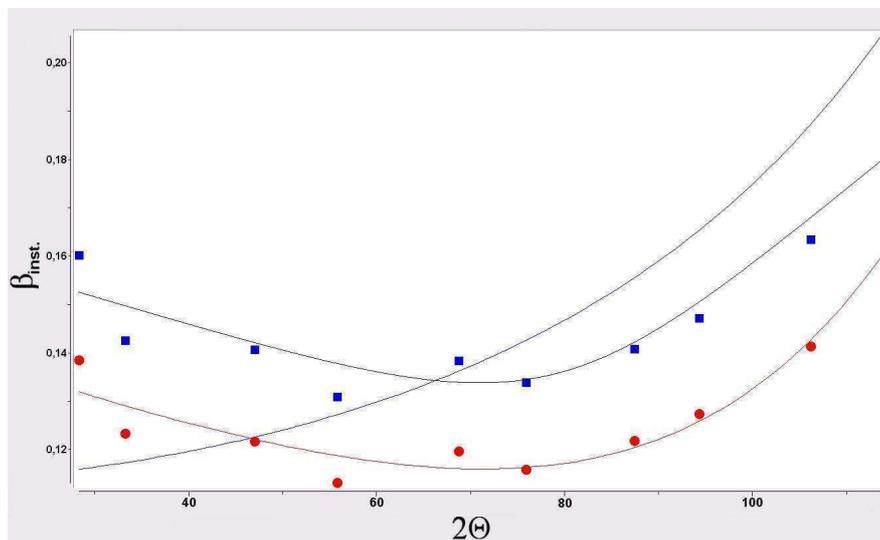


Abbildung A.1: Gauss- (rot) und Lorentz- (blau) -Beiträge zur instrumentellen Verbreiterung des verwendeten INEL. Der Lorentz-Beitrag ist nur mit negativem Koeffizienten 'Y' optimal anzunähern (schwarz).

Das Detektorprofil

Der ermittelte instrumentelle Beitrag ist von der festgestellten Halbwertsbreite des untersuchten Materials abzuziehen. Eigenspannungen oder Verzerrungen zwischen Korngrenzbereichen und Kristalliten haben in der Peakbreitenanalyse ebenfalls Berücksichtigung zu finden. Die Analyse der Halbwertsbreite ist schließlich von der Profilform der betrachteten Reflexe abhängig, wobei man im Allgemeinen in Lorentz'sche und Gauss'sche Profilform unterscheidet. Das Reflexprofil wird mit einem Computerprogramm kalkuliert [24], in das ein mathematischer Formalismus [25] implementiert ist, der es ermöglicht, das Detektorprofil bei Kenntnis der experimentellen Parameter zu beschreiben [26].

Die Lorentz- und Gauss-Beiträge werden wie folgt beschrieben [27]:

Lorentz

$$\beta = \frac{\pi}{2}\Gamma \tag{A.5}$$

β integrale Halbwertsbreite

Γ Breite auf halber Höhe des Reflexes

mit der Thompson-Cox-Hastings-Funktion

$$\Gamma = \frac{X}{\cos(\Theta)} + Y \tan(\Theta)$$

X, Y Lorentz-Koeffizienten

und *Gauss*

$$\beta = \sqrt{\frac{\pi}{4 \ln 2}} \Gamma \tag{A.6}$$

β integrale Halbwertsbreite

Γ Breite auf halber Höhe des Reflexes

mit der Thompson-Cox-Hastings-Funktion

$$\Gamma = U \tan^2 \Theta + V \tan \Theta + W + \frac{P}{\cos \Theta}$$

U, V, W, P Gauss-Koeffizienten

Mit Hilfe dieser Zusammenhänge wird der Gauss-Beitrag mit den Koeffizienten U, V und W dargestellt und im 'Instrument Parameter File' definiert. Für den Lorentz-Beitrag muß der Koeffizient Y negativ werden, um das Profil bestmöglich anzupassen. Da dies unter Umständen für eine zu messende Probe zu einer negativen Kristallitausdehnung führen könnte, wird lediglich ein Wert für X im 'Instrument Parameter File' festgehalten. Aus den anschließend festgestellten und verfeinerten Strukturparametern

ist die Kristallitgröße des zu untersuchenden Materials (durch Analyse des gesamten Spektrums) zu bestimmen. Der Werdegang der Analyse ist in verschiedenen Tutorials und insbesondere im zum PC-Programm gehörenden Manual nachzulesen.

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten kristallinen Material handelt es sich um Hydroxylapatit. Das hexagonale Raumgitter (Raumgruppe 'p/63m') der Einkristalle von Hydroxylapatit wird mit den Netzebenenabständen

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{\frac{4}{3}(h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 l^2}} \quad (\text{A.7})$$

beschrieben. Mittels der Reflexe (100) und (002) können unter Nutzung der genannten Gleichung und der Bragg'schen Reflexionsbedingung die Gitterparameter a und c berechnet werden. Aus den Gauss- und Lorentzbeiträgen werden anschließend die Kristallitgrößen im Rietveld-Verfahren oder mit Hilfe der Le-Bail-Extraktion im PC-Programm *GSAS* bestimmt.

Rietveld-Verfahren

Das Rietveld-Verfahren ist ein Profilanpassungsverfahren, dem ein Strukturmodell für alle zu analysierenden Phasen vorgegeben wird. Dieses Verfahren eignet sich nicht zur Strukturlösung. Bei bekannter grundsätzlicher Struktur (z.B. qualitativ festgestellt: Hydroxylapatit) kann man mit sämtlichen Versionen anerkannter Atomkoordinaten für das untersuchte Material Simulationsrechnungen durchführen, um eine größtmögliche Übereinstimmung zwischen experimentellem Beugungsdiagramm und berechnetem Diffraktogramm zu erreichen.

In der Rietveld-Dekompositionsformel

$$|F_0(hkl)|^2 = |F_c(hkl)|^2 \cdot \sum_{i=m}^M y_i(obs) / \sum_{i=m}^M y_i(calc) \quad (\text{A.8})$$

$F_0(hkl)$	Strukturfaktor
$F_c(hkl)$	kalkulierter Strukturfaktor
$y_i(obs)$	gemessene Intensitäten
$y_i(calc)$	kalkulierte Intensitäten

werden alle Messpunkte i mit analytischen Funktionen beschrieben. Die am i -ten Schritt beobachtete Intensität wird mit der aus dem Strukturmodell Berechneten verglichen. Im Rietveld-Verfeinerungsprozeß wird das Residuum

$$S_y = \sum w_i |y_{i0} - y_{ic}|^2 \quad (\text{A.9})$$

w_i	Wichtungsfaktor, gegeben durch $w_i = \frac{1}{\sigma_{i0}^2}$
y_{i0}	gemessene Intensitäten
y_{ic}	kalkulierte Intensitäten
σ_{i0}^2	Varianz der gemessenen Intensität

über die Methode der kleinsten Quadrate minimiert. Dabei erfolgt die Berechnung der Meßpunkte y_{ic} im Wesentlichen in Abhängigkeit vom Strukturfaktor, von den Miller'schen Indizes und von der berechneten Position des Bragg-Reflexes.

Die Strukturverfeinerung im Rietveld-Verfahren setzt ein bekanntes Strukturmodell (bekannte Atomkoordinaten) voraus. Mit Hilfe der Le-Bail-Methode werden die Reflex-Intensitäten ohne ein Strukturmodell abgeschätzt.

Le-Bail-Extraktion

Die Intensitäten werden iterativ bestimmt. Allgemein wird für alle $F_{hkl}(calc) = 1$ angenommen. Bei der Implementation der Le-Bail-Methode im für die Analyse verwendeten PC-Programm *GSAS* werden Werte für $F_{hkl}(calc)$ mit einem Startmodell

vorgegeben. Dann werden mittels Rietveld-Algorithmus Werte für $F_{hkl}(obs)$ extrahiert. Diese extrahierten Werte werden jetzt als $F_{hkl}(calc)$ übernommen und die Berechnung erneut durchgeführt. Die jetzt extrahierten Werte für $F_{hkl}(obs)$ werden wieder als $F_{hkl}(calc)$ übernommen. Nach endlicher Wiederholung der Rechnung erhalten gut aufgelöste Reflexe ihren korrekten Intensitätswert, überlappende Intensitäten tendieren mehr oder weniger gut zu den wahren Werten.

Durchführung der Le-Bail-Extraktion

Die Anpassung der Reflex-Intensitäten mit den Gauss- und Lorentz-Parametern kann nicht in beliebiger Reihenfolge stattfinden, sondern muß detektorspezifisch erfolgen. Für den verwendeten Detektor erfolgte nach Vorgabe von 40 Rechnungsläufen die Anpassung in der Reihenfolge '*cell parameters*' bei gleichzeitiger Anpassung des mit 36 Koeffizienten vorgegebenden, den Untergrund beschreibenden Chebyshev-Polynoms und des Parameters '*shft*' für die Lageänderung der rotierenden Kapillare. Im weiteren Verlauf erfolgte bei Anwendung der Pseudo-Voigt-III-Funktion die Anpassung der Lorenz- und Gaussparameter, und zwar in der Reihenfolge '*Lx*' zusammen mit '*Ly*'. Bleibt '*Ly*' = 0, erfolgt die weitere Anpassung in der Reihenfolge '*GP*' und '*stec*', dann '*ptec*'. Sollte '*Ly*' \neq 0 sein, werden '*Ly*' und '*ptec*' gemeinsam angepasst. Auf diese Weise werden für '*Lx*' und '*ptec*' Werte erhalten, die eine Berechnung der Kristallgrößen in guter Näherung ermöglichen.

Für die gemessenen Diffraktogramme werden die durchschnittlichen Abmessungen der Kristallite entlang der kristallographischen a- und c-Achse über die Lorentz-Parameter '*Lx*' und '*ptec*' bestimmt [29]:

$$p_a = \frac{18000 \cdot K \cdot \lambda}{\pi \cdot Lx} \quad (A.10)$$

$$p_c = \frac{18000 \cdot K \cdot \lambda}{\pi \cdot (Lx + ptec)} \quad (A.11)$$

Um eine optimale Anpassung zwischen simuliertem Modell und den experimentellen Daten zu erreichen, wurden die aus der *Le-Bail*-Extraktion gewonnenen Parameter in eine Anpassung mittels Rietveldverfahren übernommen. Jetzt erfolgte ausschließlich über eine Variation der chemischen Zusammensetzung ein optimales "Fitten" des gemessenen Diffraktogramms.

A.3 Festigkeitsprüfung

Üblicherweise wird bei der Auswertung einer Festigkeitskurve aus deren linearem Verlauf das Elastizitätsmodul des untersuchten Materials bestimmt. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Materialien durch eine hohe Sprödigkeit gekennzeichnet sind, muß der aus dem Verlauf der Spannungs-Stauchungskurven erreichte Maximalwert der Bruchspannung zugrunde gelegt werden. Die Qualität des Anstiegs der Spannungs-Stauchungskurve gibt eine Aussage über die Homogenität des Bruchverhaltens des untersuchten Materials. Je steiler und homogener der Anstieg, desto weniger Material geht bis zum Erreichen der maximalen Bruchspannung durch Abplatzen verloren.

Für spröde Materialien liefert eine *Weibull*-Verteilung eine Aussage über die Ausfallwahrscheinlichkeit des untersuchten Materials [71]:

$$P(\sigma) = 1 - e^{(-\frac{\sigma}{T})^b} \tag{A.12}$$

P_i	Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Bruchs
σ	Festigkeit
T	charakteristische Festigkeit
b	<i>Weibull</i> -Exponent

Der charakteristische Ausfallwert wird bestimmt, indem zunächst den einzelnen Meßwerten Bruchwahrscheinlichkeiten zugeordnet werden [72]:

$$P_i = \frac{i - 0.5}{N} \quad (\text{A.13})$$

P_i	Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Bruchs
i	i -ter Meßwert, sortiert nach aufsteigenden Festigkeitswerten
N	Anzahl der Meßwerte

Für die Darstellung der *Weibull*-Verteilung mit doppellogarithmischer Ordinate und logarithmischer Abszisse

$$\ln \left(\ln \left(\frac{1}{(1 - P)} \right) \right) = b(\ln(\sigma_i) - \ln(\sigma_0)) \quad (\text{A.14})$$

P	Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines Bruchs
b	<i>Weibull</i> -Exponent
σ_i	gemessene Bruchspannungen
σ_0	mittlere Festigkeit

kann mit den Wertepaaren (σ_i, P_i) für die Gleichung $y = bx + a$ eine lineare Regression durchgeführt werden. Der *Weibull*-Exponent b kennzeichnet den Anstieg der Verteilungskurve. Je größer der Exponent, desto enger liegen die Meßergebnisse beieinander und desto zuverlässiger ist der ermittelte charakteristische Ausfallwert des untersuchten Materials.

Der *Weibull*-Exponent und die charakteristische Festigkeit σ werden über

$$\sigma = e^{\frac{-a}{b}} \quad (\text{A.15})$$

σ	charakteristische Festigkeit
b	<i>Weibull</i> -Exponent,

bestimmt. Diese umfassende Auswertung liefert eine zuverlässige Aussage über die Qualität des untersuchten Materials. Die S-förmige Verteilungsfunktion hat ihren Wendepunkt bei einer Wahrscheinlichkeit von 63.2%. Die mittlere bzw. charakteristische Festigkeit ist dementsprechend die Festigkeit, bei der 63.2% der Proben versagen. Dieser Wert findet im Rahmen dieser Arbeit Anwendung. Im Ergebnis der Weibull-Auswertung kann allerdings in Bezug auf jede beliebige Ausfallwahrscheinlichkeit eine Aussage getroffen werden.

A.4 Tierexperimentelle Untersuchungen

A.4.1 Medizinische Versorgung

Zunächst erfolgte eine intramuskuläre Medikation mit 1mg Atropin ('*Atropine*[®]' der Fa. Braun, Melsungen). Da der operative Eingriff am Kiefer erfolgte, wurde auf diese Weise der Speichelfluß der Tiere verringert. Ebenfalls intramuskulär erfolgte die Medikation mit 5mg/kg (je Kilogramm Körpergewicht) Azaperon ('*Stresnil*[®]' der Fa. Janssen-Cilag, Neuss) zur Beruhigung der Tiere. Die Anästhesie erfolgte durch intravenöse Injektion von 5mg/kg Ketamin ('*Ketamine*[®]' der Fa. Curamed, Karlsruhe), 0.2mg/kg Midazolam ('*Dormicum*[®]' der Fa. Roche, Grenzach-Whylen) und nochmaliger Zufuhr von 1mg Atropin ('*Atropine*[®]' der Fa. Braun, Melsungen) zur Steigerung der Herzfrequenz. Die Behandlungsorte wurden zusätzlich lokal anästhesiert ('*Xylocitin*[®]' der Fa. Mibe, Brehna). Mit der Gabe dieser Spritze wurde zusätzlich der Blutfluß gehemmt.

Der Unterkiefer wurde beidseitig mit einem Schnitt freigelegt. Die freigelegte Fläche wurde glattgeschliffen und zur Kühlung des Unterkiefers mit isotonischer Lösung gespült. Anschließend wurden in die Kortikalschicht Löcher gebohrt. Hier wurden mit Titan-Schrauben ($\varnothing 1.8\text{mm}$, Länge 10mm) von der Fa. Medartis AG, Basel, die Formkörper fixiert.

Bevor die Versuchstiere lateral am Unterkiefer mit zwei Formkörpern auf jeder Seite (jeweils hintereinander) versorgt wurden, wurden die Formkörper im Blut der Tiere getränkt. Nach der Platzierung der Formkörper wurde die Wunde mit einer chirurgi-

schen Naht verschlossen ('Vicryl®', der Fa. Ethicon, Norderstedt). Außerdem wurde der Hinterkopf der Tiere ebenfalls mit je zwei Formkörpern versorgt. Dazu wurden Löcher in den Knochen gebohrt und diese mit zylindrischen Formkörpern (Durchmesser $D =$, Länge $l =$) ohne fixierende Schraube verschlossen.

Nach der OP erhielten die Versuchstiere für die drei folgenden Tage Antibiotika durch intramuskuläre Injektion ('Terramycin®', der Fa. Pfitzer AG, Karlsruhe). Nach Ablauf von fünf Wochen wurden zwei Tiere, nach Ablauf von zehn Wochen die drei weiteren Tiere durch Injektion einer Überdosis Phenobarbital ('Eutha 77®', der Fa. Essex Pharma, München) in den Herzmuskel getötet, beide Unterkieferseiten entfernt und in 4%iger Formalin-Lösung fixiert.

Als Versuchstier wurde das "Göttinger Minipig" wegen seiner zum Menschen vergleichbaren Knochenstruktur und dem ähnlichen *remodelling*-Prozeß ausgewählt. Der extraorale Eingriff, der im Versuch stattfand, stellt keinen realistischen Eingriff beim Menschen für eine alveolare Augmentation dar. In den meisten Fällen ist ein intraoraler Eingriff üblich. Durch den extraoralen Eingriff wird das Risiko einer Wunddehiszenz minimiert. Die Untersuchungen *in vivo* wurden im Juli 2007 an "Göttinger Minipigs" durchgeführt und von der Kommission für Tierversuche des Bundeslandes Mecklenburg-Vorpommern genehmigt. Die Tiere hatten ein Alter von fünf Jahren und wogen $35.3 \pm 2.7 \text{ kg}$.