

# Morphologie und Mikromechanik von Knochen und neuartigen, partiell resorbierbaren Knochenzementen

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Sven Henning  
geb. am: 23.08.1965 in: Merseburg

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. G.H. Michler, Halle (Saale)
2. Prof. Dr. F.J. Baltá Calleja, Madrid
3. Prof. Dr. R. Mühlhaupt, Freiburg im Breisgau

Halle (Saale), 07.06.2006

Verteidigungsdatum: 01.11.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000012394**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012394>]

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>3</b>
2.1	Knochen.....	3
2.1.1	Definition.....	3
2.1.2	Chemische Zusammensetzung .....	4
2.1.3	Strukturelle Hierarchie .....	7
2.1.4	Mechanische Eigenschaften des kortikalen Knochens.....	15
2.1.5	Mikromechanische Untersuchungen .....	20
2.2	Knochenzement .....	24
2.2.1	Definition.....	24
2.2.2	Konventionelle Knochenzemente.....	25
2.2.3	Anforderungen an Knochenzemente und wichtige Eigenschaften.....	28
2.3	Morphologie und Eigenschaften teilchengefüllter Polymere .....	34
2.3.1	Beschreibung teilchengefüllter Polymere.....	34
2.3.2	Nanokomposite.....	37
2.3.3	Zähigkeitserhöhung hoch vernetzter Systeme.....	39
2.4	Biokompatibilität .....	41
2.4.1	Bioabbaubare Polymere.....	41
2.4.2	Struktur- und Oberflächenkompatibilität.....	44
<b>3</b>	<b>Experimente .....</b>	<b>48</b>
3.1	Materialien.....	48
3.1.1	Knochenproben.....	48
3.1.2	Konventionelle Knochenzemente.....	49
3.1.3	Modellsysteme.....	50
3.2	Mechanische Prüfverfahren .....	55
3.2.1	Zugversuche .....	55
3.2.2	Mikrodeformation von Knochenproben .....	56
3.2.3	Mikrohärte .....	57
3.3	Tiermodell .....	58
3.3.1	Implantation im Knochen .....	58
3.3.2	Präparation.....	59
3.4	Mikroskopische Untersuchungen .....	59

3.4.1	Lichtmikroskopie.....	59
3.4.2	Rasterelektronenmikroskopie und Röntgenmikroanalyse.....	59
3.4.3	Atmosphärische Rasterelektronenmikroskopie (ESEM).....	61
3.4.4	Transmissionselektronenmikroskopie .....	63
3.4.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM) .....	64
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
4.1	Morphologie, mechanische Eigenschaften und Mikromechanik des Knochens .....	65
4.1.1	Mikro- und Nanostruktur des Knochens .....	65
4.1.2	Beschreibung des Knochens als Nanokompositwerkstoff .....	81
4.1.3	Lokale mechanische Eigenschaften des Knochens: Mikrohärtigkeit .....	82
4.1.4	Mikromechanik des Knochens .....	85
4.2	Defekte in konventionellen Knochenzementen.....	94
4.2.1	Morphologie der Pulverkomponente .....	94
4.2.2	Defekte und Versagensmechanismen konventioneller Knochenzemente .....	95
4.3	Morphologie und Eigenschaften partiell resorbierbarer Modellsysteme .....	101
4.3.1	Morphologie der Polymermatrix: Variation der molekularen Architektur ....	102
4.3.2	Morphologie der Komposite.....	116
4.3.3	Mechanische Eigenschaften der Modellsysteme.....	120
4.3.4	Biokompatibilität der neuartigen, resorbierbaren Knochenzemente .....	125
4.4	Nanostrukturierte Materialien zum Knochenersatz: Biomimetische Ansätze.....	134
4.4.1	Hydroxylapatit: Bioaktive Nanopartikel .....	135
4.4.2	Aushärtbare, partiell resorbierbare Knochenzemente .....	136
4.4.3	Resorbierbare, bioaktive Nanokomposite auf Basis von PHB .....	139
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>147</b>



# 1 Einleitung

---



*Die Größe der lebendigen Kräfte der Muskeln ... hält, hebt und bewegt nicht nur einen Arm oder ein Bein, sondern die ganze beseelte Maschine, ermöglicht ihr sogar, zu tanzen.*

Giovanni Alfonso Borelli: *De Motu Animalium*, 1680 [1]

Die Entwicklung von Werkstoffen für einen dauerhaften oder zeitweiligen Ersatz von Organfunktionen des menschlichen Körpers ist ein außerordentlich wichtiger, rasant aufstrebender Zweig der Materialwissenschaften im 21. Jahrhundert [2]. Polymere und Kompositwerkstoffe auf Polymerbasis spielen dabei in allen Bereichen der Biomaterialforschung eine herausragende Rolle [3]. Die Suche nach neuen Materialien und die Optimierung bewährter Werkstoffanwendungen tragen einen ausgeprägt interdisziplinären Charakter. Probleme und Anforderungen müssen in der klinischen Praxis erkannt und definiert werden, wobei nicht nur das Wohl der Patienten, sondern zunehmend auch wirtschaftliche Aspekte einer Behandlung Berücksichtigung finden. Materialwissenschaftler müssen die Parameter erkennen, welche die Biokompatibilität eines Implantates bestimmen; diese Parameter hängen in vielfältiger Weise vom anatomischen Einsatzort und den zu erfüllenden Funktionen ab. Einmal definiert, müssen die neuen Materialien hergestellt, verarbeitet und in simulierten oder realen biologischen Systemen getestet werden. Die Langzeitstabilität oder das Abbauverhalten sind abzuschätzen, und nicht zuletzt sind rechtliche und wirtschaftliche Fragen zu klären, bevor eine Überführung in die klinische Anwendung erfolgen kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, auf der Basis neuer Erkenntnisse zu den Struktur-Eigenschafts-Beziehungen des Knochens neuartige, vollständig oder partiell resorbierbare, bioaktive Materialien zum Knochenersatz bzw. zur Fixierung von Implantaten im Knochen zu entwickeln. Der biomimetische Ansatz, d.h. die Nachahmung struktureller und funktioneller Eigenschaften des Knochens, ist der Schlüssel zum mikro- und nanoskopischen Konstruieren neuer Knochenersatzmaterialien mit hervorragender Biokompatibilität.

Gleichzeitig werden Strukturen und Versagensmechanismen konventioneller Implantate analysiert. Durch die neuartigen Systeme sollen Schwachstellen und negative Effekte der konventionellen Knochenzemente, wie z.B. durch Polymerisationswärme hervorgerufene thermische Gewebeschädigung, Toxizität der Monomere und der auftretende Polymerisationsschrumpfung, verringert oder ausgeschlossen werden.

Schwerpunkt der hier vorgestellten Untersuchungen ist, die Morphologie und Mikromechanik neuartiger Matrixpolymere und der daraus hergestellten Komposite und Nanokomposite in Abhängigkeit von gewählten Synthesewegen, Zusammensetzungen und Verarbeitungsverfahren aufzuklären. Das durch die Komposite erreichte mechanische Eigenschaftsniveau wird vor dem Hintergrund der an Knochenzemente gestellten Mindestanforderungen diskutiert (*Strukturkompatibilität*). Durch Aufklärung der bei Deformation und Bruch ablaufenden mikromechanischen Prozesse und die Anwendung mikromechanischer Prinzipien und Konzepte soll das dem untersuchten System innewohnende Optimierungspotential aufgedeckt und ein Weg zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften, wie Festigkeit, Zähigkeit und Ermüdungsverhalten, aufgezeigt werden [4]. Als zweiter wesentlicher Aspekt der Biokompatibilitätsanalyse soll die Grenzschicht zwischen Implantat und Gewebe, hier also speziell dem Knochen, beurteilt werden (*Oberflächenkompatibilität*). Ein Hauptproblem ist, ob und wie durch partielle Degradation und Resorption von Komponenten des Materials schrittweise ein Einwachsen von neu gebildetem Knochen ermöglicht wird.

Zur mikro- und nanoskopischen Charakterisierung von Oberflächen und Grenzschichten sowie zur Analyse von Morphologie und Mikromechanik des Knochens, der neuartigen Knochenzemente sowie innovativer Materialien zum Knochenersatz wurden neue Präparationsverfahren entwickelt und gerätetechnische Neuerungen angewendet. Von besonderer Bedeutung sind hierbei mikroskopische Methoden, welche eine Untersuchung von Implantaten und Implantat-Gewebe-Grenzflächen in einem unter Einsatzbedingungen relevanten, d.h. im feuchten Zustand gestatten, wie die atmosphärische Rasterelektronenmikroskopie.

Schlussfolgernd aus den Untersuchungen und Analysen sollen Vorschläge für einen modellartigen, nanostrukturierten Knochenersatz unterbreitet werden.

## 2 Grundlagen

---

### 2.1 Knochen

Während noch in der Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts eine überschaubare Menge von Veröffentlichungen einzelner Arbeitsgruppen (u.a. WEINER und WAGNER in Rehovot, Israel, CURREY in York, UK, KATZ in Cleveland, USA, WEINANS in Nijmegen, Niederlande) zu Struktur-Eigenschafts-Beziehungen des Knochens erschien, erfolgt heute ein exponentieller Anstieg der Zahl der Publikationen. Diese Entwicklung ist typisch für die Initiierung eines neuen Forschungszweiges. Von Beginn an ist dieses Gebiet ausgesprochen interdisziplinär: Medizin, Biologie und Materialwissenschaften sind innig verknüpft.

Der Zeitraum 2000-2010 wird international als „Bone and Joint Decade“ charakterisiert [5]. Damit steht die Biomechanik des Knochens und der Gelenke klar im Mittelpunkt moderner orthopädischer und biomechanischer Forschung. Richtungsweisende Diskussionen erfolgten auf der 12. Konferenz der Europäischen Gesellschaft für Biomechanik (Dublin 2000 [6]). Schwerpunkte dieser Veranstaltungsreihe, die mit einer Konferenz 2003 in Dresden fortgesetzt wurde, sind die Mikroschädigung des Knochens bei Osteoporose, die Beurteilung der Knochenqualität und die Strukturanpassung des Knochens [7]. Man steht erst am Anfang einer nanoskopischen Betrachtung des Knochens in seiner Struktur und seinem Deformationsverhalten im gesunden und kranken Zustand. Osteoporose, genetisch bedingte Erkrankungen (z.B. *Osteogenesis imperfecta*), Höchstbeanspruchung im Leistungssport und Knochenabbau bei Langzeitraumflügen sind Faktoren, deren Einfluss auf Struktur und Eigenschaften des Knochens untersucht worden ist bzw. derzeit untersucht wird. Laufende Forschungsarbeiten in aller Welt zielen dabei vorrangig auf die Aufklärung pathogenetischer Zusammenhänge, kaum jedoch auf die Ableitung technisch verwertbarer Erkenntnisse. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt der Übergang von mikroskopischen zu nanoskopischen Strukturuntersuchungen.

#### 2.1.1 Definition

Um die an einen Werkstoff im Knochenkontakt bzw. zum lokalen Knochenersatz gestellten Anforderungen formulieren zu können, soll zunächst das komplexe System „Knochen“ in

seiner Struktur- und Funktionenvielfalt beschrieben werden. Man kann den Knochen als *Material* folgendermaßen definieren:

**Knochen ist ein biologisch synthetisierter Nanokomposit mit einer über viele Größenordnungen ausgeprägten, hierarchischen Architektur und der Fähigkeit, sich durch Umbauprozesse aktiv an die während der Lebenszeit eines Individuums auftretenden Variationen seiner mechanischen Belastungen anzupassen und strukturelle Defekte zu reparieren.**

Im Rahmen dieser Arbeit stehen die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen des Knochens hinsichtlich seiner Funktionen im Stütz- und Bewegungsapparat deutlich im Vordergrund. Es sei aber darauf hingewiesen, dass der Knochen als Organ intensiv in den Stoffwechsel des Organismus einbezogen ist. Er ist, wie zum Beispiel bei der Bildung von Blutzellen im Mark der Femurknochen, Träger lebenswichtiger biologischer Prozesse. Knochengewebe unterliegt unter Umständen starken Veränderungen infolge ererbter oder erworbener Krankheiten, wobei der im Alter oder durch dauerhafte Entlastung auftretenden *Osteoporose* besondere Beachtung gilt.

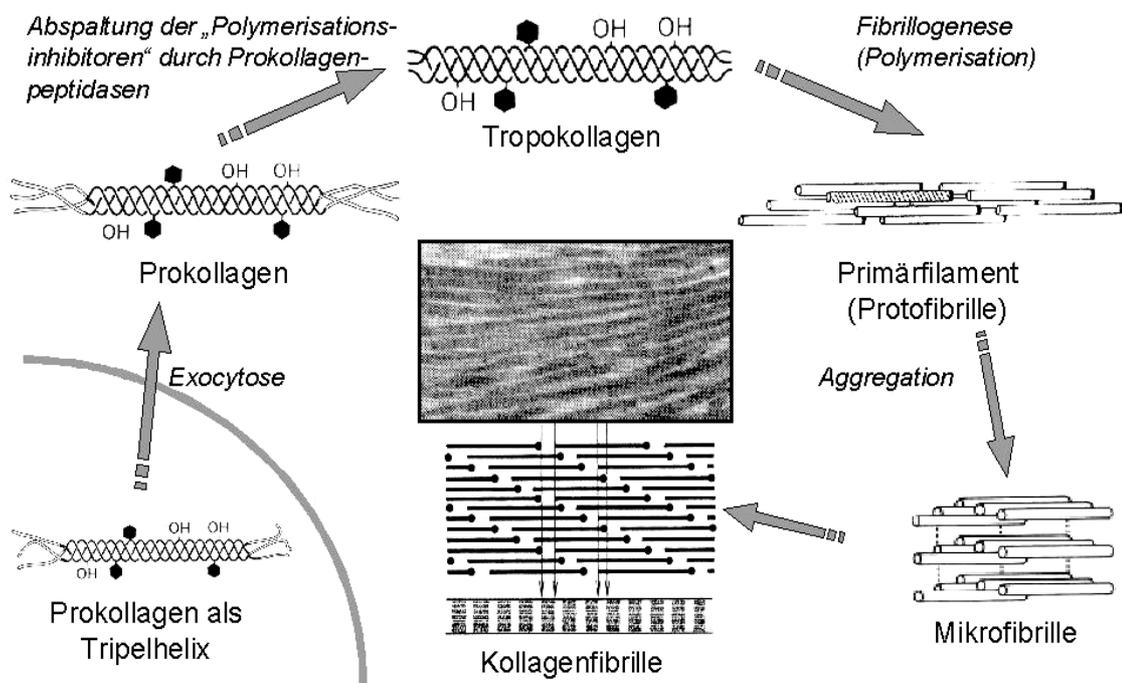
In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts vollzog sich ein Wandel von einem stoffwechselbiologischen hin zu einem biomechanischen Verständnis des Knochens [8]. Damit wurde der Knochen nicht mehr primär als universelles Reservoir (z.B. Kalzium, Phosphor) für den Rest des Körpers angesehen, sondern als ein in erster Linie mechanisches Organ: Alle im Knochen ablaufenden biologischen Prozesse und die dadurch geschaffenen Mikro- und Nanostrukturen dienen zuerst der Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität des Skelettes. Die Frage, wie diese Aufgabe durch Verbände kommunizierender Zellen bei gleichzeitiger Erfüllung von Stoffwechselfaufgaben gelöst wird, ist ein Schwerpunkt moderner orthopädischer Forschung.

### 2.1.2 Chemische Zusammensetzung

- **Kollagen**

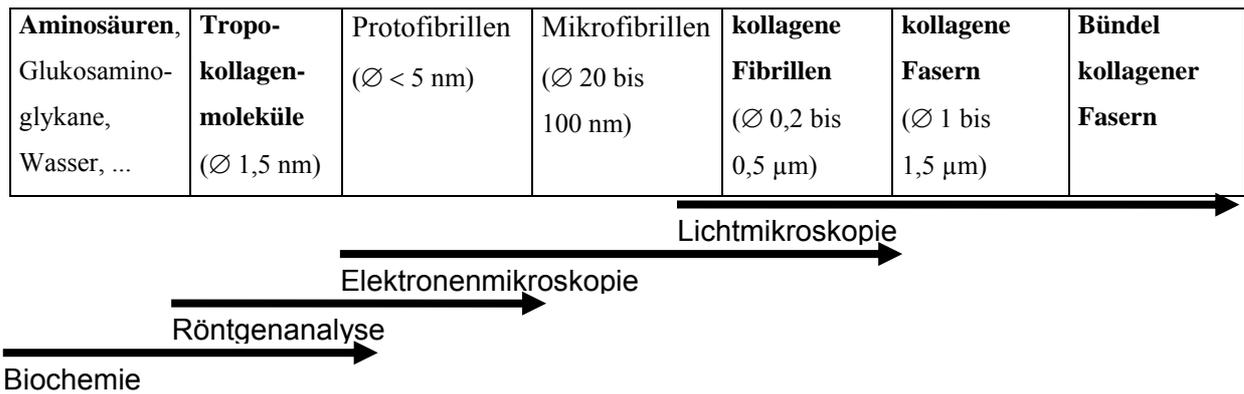
Kollagen (*κολλα*: Leim) ist ein Strukturprotein, welches in mehr als einem Dutzend verschiedener Variationen im menschlichen Körper vorkommt. Vorherrschend ist das auch in Haut, Sehnen und Bändern vorkommende Kollagen Typ I. Kollagen organisiert sich über mehrere Strukturebenen zu elastischen Fasern, welche für die Flexibilität und die hohe

Zugfestigkeit des Knochens verantwortlich sind. Als *Primärstruktur* wird die vollständige Aminosäuresequenz entlang jeder Polypeptidkette (*Konstitution*) bezeichnet. Dabei sind jeweils 3 Stränge zu einer Einheit in Form einer dreifachen Helix zusammengefasst. Die *Sekundärstruktur* ist die *lokale Konfiguration* einer Polypeptidkette. Die *globale Konfiguration* (Tertiärstruktur) ist durch eine Dreifach-Helix, das etwa 300 nm lange *Tropokollagenmolekül* [9, 10] ausgezeichnet. Die höchste Strukturebene des Kollagen (Quaternärstruktur), die eigentliche Kollagenfibrille, wird durch *Polymerisation* von Tropokollagenmolekülen zu *Mikrofibrillen*, laterale Aggregation der Mikrofibrillen und letztlich eine End-zu-End-Anordnung der Aggregate erreicht. Der Prozess der Fibrillenbildung ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1:** Quaternärstruktur - vom Molekül (Tripelhelix) zur Kollagenfibrille mit angedeuteter, elektronenmikroskopisch sichtbarer Querstreifung

Die Kollagenfibrillen können elektronenmikroskopisch nach geeigneter Kontrastierung anhand einer typischen Querstreifung mit einer Periode von 64 nm identifiziert werden [11-13]. In Abbildung 2 sind die typischen Größenordnungen der verschiedenen Hierarchieebenen des Kollagen und die zu ihrer Aufklärung einsetzbaren Untersuchungsverfahren zusammengefasst.



**Abb. 2:** Nano- und mikroskopische Organisation von Kollagenfasern nach [14]

- **Hydroxylapatit (HAp)**

Die mineralische, harte Komponente des Knochens, welche die Steifigkeit und Druckfestigkeit des Materials „Knochen“ gewährleistet, besteht fast ausschließlich aus Hydroxylapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Der im Knochen vorkommende „biologische“ Hydroxylapatit unterscheidet sich vom stöchiometrischen HAp (39,9% Ca, 18,5% P, 3,4%  $\text{OH}^-$ )<sup>1</sup> durch ein kleineres Ca/P – Verhältnis ( $\text{Ca/P} < 1,67$ ). Durch Substitution von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$  können zusätzliche Bestandteile wie Natrium-, Magnesium-, Carbonat-, Fluorid- und Chlorid-Ionen eingebaut werden [2].

- **Weitere Bestandteile**

Die auch als *Grundsubstanz* bezeichneten Proteoglykane (Mucopolysaccharide) wie Decorin und Biglycan modulieren die Zusammenlagerung der Kollagenfibrillen und möglicherweise Ort und Rate der Mineralisation. Nichtkollagenartige Proteine wie Osteopontin, Osteonectin und Osteocalcin treten zahlreich und mit nicht völlig geklärter Funktion auf. Das letztgenannte Protein wird von Osteoblasten gebildet, wirkt als Signalsubstanz und scheint eine wichtige Rolle bei der Mineralisation des in Neubildung begriffenen Knochens (*Osteoid*) zu spielen. Wasser liegt im Knochen teils frei, teils an andere Moleküle gebunden vor. Im Laufe der Knochenneubildung durch Mineralisierung der extrazellulären, organischen Substanz verändert sich auch der Wassergehalt des Knochengewebes.

Die Anteile der verschiedenen Komponenten variieren von Individuum zu Individuum, unterliegen altersbedingten Veränderungen und sind stark von der Art des Knochens,

<sup>1</sup> Alle Angaben in Gew.%.

innerhalb einzelner Knochen wiederum vom Ort abhängig. Entsprechend findet man in der Literatur stark streuende Werte für Volumen- bzw. Massenanteile der Komponenten. Ein Beispiel dafür ist in Tabelle 1 gegeben.

Komponente und gesamter Volumenanteil	Ort / spezifisches Molekül	davon Volumenanteil
<b>Wasser 25%</b>	gebunden an Kollagen	60%
	sonst	40%
<b>organische Matrix 32%</b>	Kollagen	89%
	Proteoglykan	1%
	andere organische Verbindungen, z.B.	} 10%
	Osteocalcin, <1%	
Osteonectin, <1%		
<b>Apatitmineral 43%</b>	in Lücken zwischen Fibrillenenden	28%
	intrafibrillar	58%
	interfibrillar	14%

**Tab. 1:** Zusammensetzung des Knochens (Beispiel: Lamellenknochen des Hundes) nach [8]

### 2.1.3 Strukturelle Hierarchie

Der hierarchische Aufbau des Knochens kann, in Anlehnung an die historischen Entwicklungen der Knochenforschung (*Osteologie*) und der mikroskopischen Techniken, absteigend vom makroskopischen in den Nanometerbereich grob in drei Ebenen abstuft werden:

#### I. Makroskopische Ebene (500 µm bis 0,5 m):

Unterscheidung von kompaktem und spongiösem (schwammartigem) Knochen

Unterscheidung nach Form der Knochen: Röhrenknochen, platte Knochen, pneumatisierte Knochen

→ **Makroskopische und mikroskopische Morphologie (Histologie)**

#### II. Mikroskopische Ebene (500 nm bis 500 µm):

Unterteilung nach Art der Entstehung (Ossifikation): Geflechtknochen, Lamellenknochen

→ **Mikroskopische Struktur**

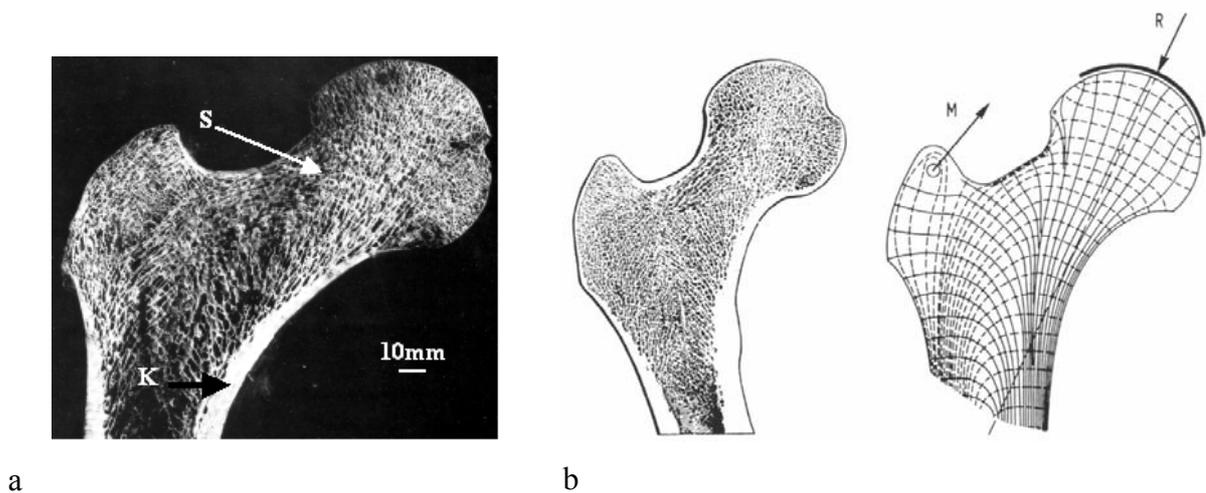
### III. Nanoskopische Ebene (5 nm bis 500 nm):

Organisation der Polymerphase (Kollagen) und der Mineralphase (Hydroxylapatit), insbesondere Orientierung und Qualität der Kollagenfibrillen, Größe, Form und Verteilung der HAp-Partikel sowie Kopplung beider Phasen

→ **Nanostruktur, Nanokomposit-Morphologie**

### I. Die makroskopische Struktur: Gestalt und histologische Charakterisierung

Anhand seiner Gestalt (makroskopische *Morphologie* im medizinischen Sinne des Begriffes) kann der Knochen in folgende Kategorien unterteilt werden: *Röhrenknochen (Ossa longa)* sind lange, relativ gerade, hohle Knochen (u.a. Oberschenkelknochen, Oberarmknochen, Elle, Speiche, Fingerknochen). *Platte Knochen (Ossa plana)* bestehen aus dünnen Platten kompakten Knochens mit dazwischen liegenden Schichten spongiösen Knochens (u.a. Schädelkalotte, Beckenkamm, Schulterblatt). Einige Schädelknochen (u.a. Keilbein, Schläfenbein, Oberkieferkochen) enthalten luftgefüllte Hohlräume, die mit der Nasenhöhle in Verbindung stehen. Diese werden als *pneumatisierte Knochen (Ossa pneumatica)* bezeichnet. Unterschiede in der mikroskopischen Morphologie (*Histologie*) des Knochens führen zu einer weiteren Unterteilung nach den zwei Knochenformen *Kompakta* und *Spongiosa* (siehe Abb. 3) [2, 15, 16].



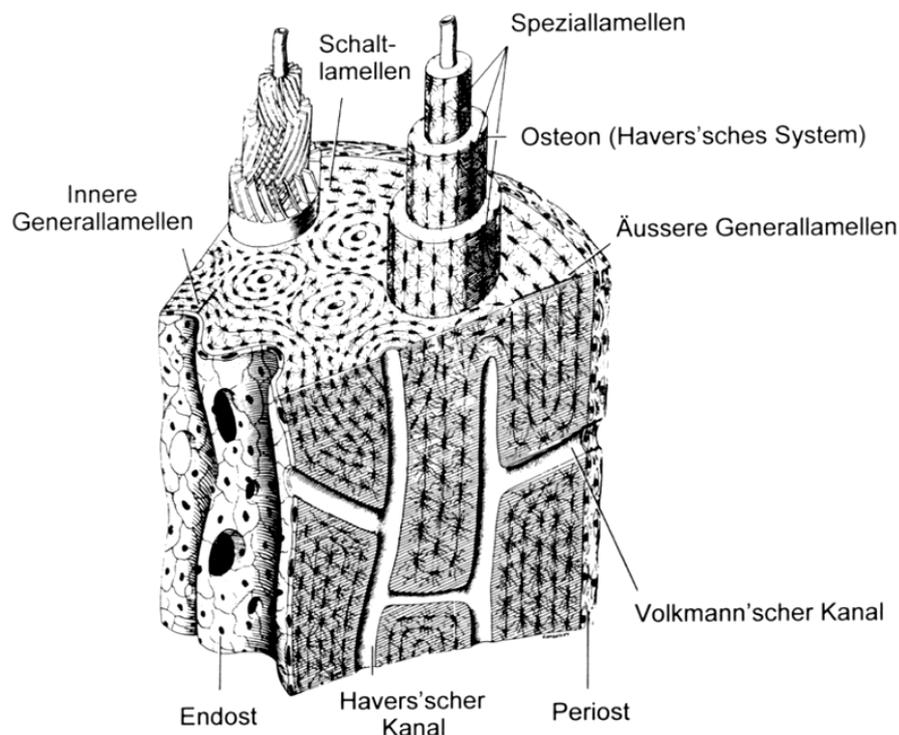
**Abb. 3:** a) Schnitt durch den Femurkopf mit kortikalem (K...Kompakta) und spongiösem (S...Spongiosa) Knochen [17]; b) Schema des Verlaufs der Spongiosabälkchen mit angedeutetem Verlauf der Hauptspannungsrichtungen im proximalen Femurende; R...resultierende Druckkraft, M...Zugkräfte durch Muskeln [2]

- Quantifizierbare Parameter

Mit Hilfe von Röntgenbefunden, gering vergrößernden lichtmikroskopischen Aufnahmen oder rasterelektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahmen können die Dicke der Kortikalis, die Dicken der Knochenbälkchen (Trabekel) sowie das Volumenverhältnis von Trabekeln und Poren („Dichte“ des spongiösen Knochens) bestimmt werden. Diese Parameter werden üblicherweise zur Beurteilung der Knochenqualität herangezogen. So kann z.B. die Diagnose einer Osteoporose anhand von Normabweichungen dieser Parameter gestellt werden.

## II. Die mikroskopische Struktur

Die wesentlichen Merkmale der mikroskopischen Struktur sind Abbildung 4 aufgezeigt.



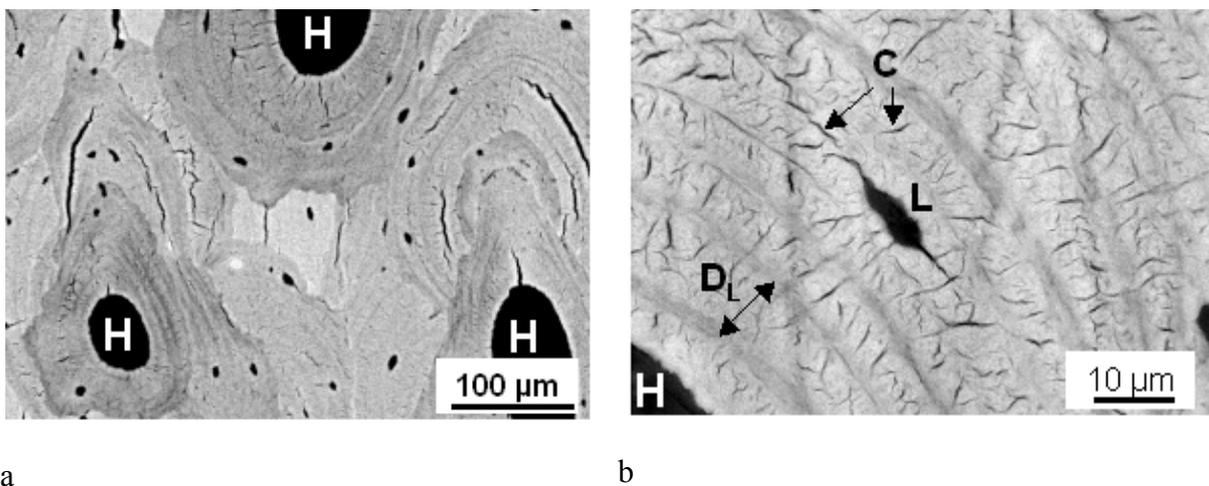
**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Kompakta eines Röhrenknochens mit Havers<sup>2</sup>-Systemen (Osteonen) und Volkmann<sup>3</sup>-Kanälen; Wichtigste Merkmale sind die vier Lamellensysteme: Osteone mit Speziallamellen, Schaltlamellen und innere bzw. äußere Generallamellen; Quelle: [2]

---

<sup>2</sup> Nach Clopton Havers (1650-1702), Londoner Arzt und Anatom; „Osteologia Nova, or some observations of the bones and the parts belonging to them, with the manner of accretion and nutrition“, 1691. Schon 1675 von Antoni van Leeuwenhoek als „canals in bone“ in den „Philosophical Transactions“ beschrieben [18].

<sup>3</sup> Von Alfred Wilhelm Volkmann (1800-1877), Professor für Anatomie und Physiologie in Dorpat, 1873 erstmals beschrieben [18].

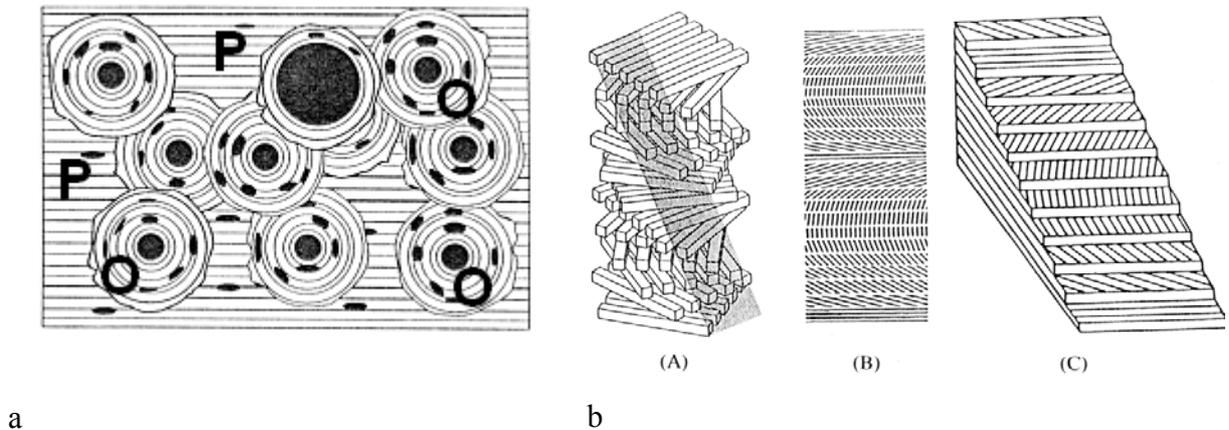
Das auffälligste Merkmal der mikroskopischen Strukturebene sind sogenannte Lamellen, die sich insbesondere als konzentrische, jahresringartige Muster innerhalb der Havers-Systeme, aber auch am inneren und äußeren Saum (innere bzw. äußere Generallamelle) und in den Zwickeln zwischen den Osteonen (Schaltlamellen) zeigen. Das kompakte Material ist von Kanälen durchzogen, die der Versorgung des Knochens dienen. Die in Knochenlängsachse verlaufenden Havers-Kanäle bilden das Zentrum der Havers-Systeme oder Osteone, während die Volkmann-Kanäle den kompakten Knochen senkrecht zur Längsachse durchziehen. Im Rückstreuungselektronen-Materialkontrastmodus gewonnene ESEM-Aufnahmen (Abb. 5) zeigen die lamellare Struktur auf besonders eindrucksvolle Weise. Betrachtet man höhere Vergrößerungen, findet man als weitere poröse „Fehlstellen“ in der kompakten Knochensubstanz die sogenannten Lakunen als die Orte, in denen sich im lebenden Knochen die eingemauerten Knochenzellen befinden. Die in Abbildung 5b erkennbaren feinen, fadenartigen Störungen sind feine Kanälchen (*canaliculi*), die die Kommunikation der lebenden Zellen sicherstellen.



**Abb. 5:** a) Anschliffpräparat aus der Kortikalis des humanen Femur senkrecht zur Knochenlängsachse mit Havers-Systemen (Osteonen); b) Lamellen, Canaliculi und Lakunen innerhalb eines Osteons:  $D_L$ ...Lamellenabstand, L...lacuna, C...canaliculi, H...Havers-Kanal; ESEM-Aufnahmen (BSE-Materialkontrast)

Die mikroskopisch (z.B. im Polarisationsmikroskop oder in ESEM-Übersichtsaufnahmen wie Abb.b) beobachtbare lamellare Struktur erklärt sich als periodische Abfolge von Schichten mit wechselnder Orientierung der mineralisierten Kollagenfibrillen (s. Abb. 6b-(B)).

Die Lücken zwischen den Osteonen werden durch Reste älterer Osteone, die sogenannten Schaltlamellen, ausgefüllt. Jüngere Osteone sind gegen die ältere Umgebung deutlich durch eine Kittlinie (*cement line*) abgegrenzt (Abb. 6).



**Abb. 6:** a) Schematische Darstellung von sekundären Osteonen (O) in einem Feld aus primärem (Geflecht-) Knochen (P); b) Schema der helikalen, sperrholzartigen Struktur innerhalb der Osteone: A...dreidimensionale Darstellung der Variation der Kollagenfaser-Orientierungen, B...visueller Effekt bogenförmiger Strukturen beim Schnitt z.B. durch die in A grau schraffierte Fläche, C...alternative, dreidimensionale Darstellung der veränderlichen Orientierung der Fasern; Quelle: [8]

- Einsatz rasterelektronenmikroskopischer Techniken zur Aufklärung der Mikrostruktur

Lokale Variationen der Mineralkonzentration des Knochens können zur Erzeugung eines Rückstreuungselektronensignals im Rasterelektronenmikroskop (REM) genutzt werden. Das so erhaltene Grauwertbild beinhaltet Informationen über die im Untersuchungsgebiet vorherrschende Knochendichte bzw. deren lokale Variation [19, 20]. Darüber hinaus erhält man ein weitgehend von Präparationsartefakten (Risse, Schleif- und Schneidespuren) freies Bild. Der international führenden Gruppe (BOYDE, London) ist es gelungen, durch den Einsatz von Standard-Proben mit bekannter Rückstreuungselektronen-Signalintensität ein auf die tatsächliche Knochendichte kalibriertes Grauwertbild zu erhalten. Durch Falschfarb-Darstellungen erhält man Karten der Knochendichteveriation innerhalb einer Knochenprobe, und Mineralkonzentrationen verschiedener Knochenproben sind quantitativ vergleichbar [21]. Insbesondere wurde berichtet, dass die übermäßige Mineralisation des Knochens bei gestörter Kollagensynthese (*Osteogenesis imperfecta*) zu einer klinisch belegten, pathologischen Versprödung des Knochens führt [22].

Durch die Kombination von ESEM-Technik und hochauflösenden Geräten (Feldemissionsquelle) konnten Mikro- und Nanostrukturen des Knochens weitgehend ohne schädigende Präparationsschritte (z.B. Entwässerung) sichtbar gemacht werden. Es ist allerdings festgestellt worden, dass der abtastende Primärelektronenstrahl selbst bei Anwendung probenschonender Techniken eine messbare Schädigung verursacht.

- Quantifizierbare Parameter

Neben der Dicke der Kortikalis, die vom anatomischen Ort und der Herkunft des Knochens abhängt und in starkem Maße vom Alter und von vorliegenden Erkrankungen (Osteoporose) beeinflusst sein kann, ist die Dicke der Lamellen ein wichtiger morphologischer Parameter. Die periodische Abfolge von Schichten unterschiedlicher Orientierungen der mineralisierten Kollagenfibrillen kann anhand von im REM gewonnenen BSE-Materialkontrastaufnahmen oder SE-Topographiekontrastaufnahmen (Cryo-Bruchflächen) exakt vermessen werden. Die Lamellendicken betragen typischerweise 3 bis 10  $\mu\text{m}$ .

### **III. Die Nanostruktur**

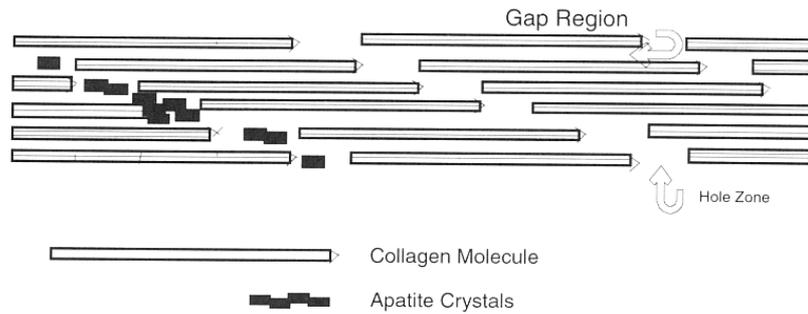
Hydroxylapatit (HAp) bildet unregelmäßig geformte Plättchen, deren typische Abmessungen im Nanometerbereich liegen. So gibt z.B. CURREY in [23] typische Maße für die Länge, Dicke und Breite der Kristallite mit etwa 50, 50 und 4 nm an. Tatsächlich aber variieren die Angaben verschiedener Quellen deutlich. Offensichtlich hängen Form, Größe und Größenverteilung der HAp-Kristallite in starkem Maße u.a. von der Herkunft des Knochens (Schaf, Rind, Mensch usw.), der Art des Knochens (Gewebeknochen oder Lamellenknochen, Kompakta oder einzelne Trabekel usw.), dem Geschlecht sowie dem Alter des Individuums bzw. dem Alter der untersuchten Knochenstruktur ab [24, 25]. Eine Zusammenstellung einiger repräsentativer Beispiele für in der neueren Literatur angegebene morphologische Parameter biologischer HAp-Kristallite ist in Tabelle 2 gegeben.

<b>Meßmethode, Herkunft der Probe</b>	<b>Typische Form</b>	<b>Länge [nm]</b>	<b>Breite [nm]</b>	<b>Dicke [nm]</b>	<b>Quelle</b>
<b>TEM</b> , Trabekel gesunden und osteoporotischen Knochens, Mensch	Längliche Plättchen mit unregelmäßigen Kanten	<b>57±6,7</b>	<b>27±3,0</b>	<b>7,7±3,5</b>	[26]
<b>TEM</b> , isolierte Kristallite aus Geflechtknochen, Fötus, Mensch <sup>4</sup>	Längliche Plättchen mit unregelmäßigen Kanten	<b>18,1±10,4</b> bis <b>31,6±17,5</b>	<b>11,5±5,4</b> bis <b>19,2±9,2</b>		[27]
<b>HV-TEM</b> , Ultradünnschnitte aus embryonalem Knochen, Huhn	Unregelmäßig geformte Plättchen	<b>80</b>	<b>30</b>	<b>8</b>	[24]
<b>TEM</b> und <b>FE-LVSEM</b> , kalzifizierte Proben, Rind	Längliche Plättchen mit unregelmäßigen Kanten	<b>30 bis 120</b>	<b>20 bis 60</b>	<b>6 bis 9</b>	[28]
<b>AFM</b> , Oberfläche von Anschliffen, Kompakta, keine Angaben zur Herkunft	Unregelmäßig geformte Plättchen	ca. <b>50</b>	ca. <b>50</b>	<b>10 bis 20</b>	[29]
<b>AFM</b> ; isolierte Kristallite aus der Kortikalis von Femur und Tibia, Rind	Längliche Plättchen mit unregelmäßigen Kanten	Mittel: <b>90</b>	Mittel: <b>64</b>	<b>98 ≤ 2</b>	[30]

**Tab. 2:** Übersicht zu den für verschiedene Knochenproben mittels verschiedener mikroskopischer Methoden für HAP-Kristallite ermittelten morphologischen Parameter Länge, Dicke und Breite

Die Ablagerung von HAP-Kristallen wird durch Keimbildung an bzw. in den aus knochen**aufbauenden** Zellen (*Osteoblasten*) in den extrazellulären Raum ausgeschleusten Proteinen (Protokollagen, Tropokollagen) gesteuert. Dadurch wird die aus kristallinen Nanopartikeln bestehende, anorganische Komponente optimal in der organischen Matrix dispergiert (siehe Abb. 7). Dabei können Vorzugsorientierungen der Kristallite, welche durch den Richtungssinn der zuvor synthetisierten Kollagenfibrillen definiert sind, realisiert werden. Die so erreichte Orientierung sowohl der Proteinfasern als auch der eingebundenen Mineralkomponente ist über relativ große Bereiche koordiniert, was eine mechanische Anisotropie des Knochens als Material zur Folge hat. Es wird angenommen, dass die Apatitplättchen auch chemisch an die organische Matrix gekoppelt sind [31].

<sup>4</sup> Kleinere Werte für jüngere (16 Wochen), höhere Werte für ältere (26 Wochen) Föten.



**Abb. 7:** Schematische Darstellung zur Mineralisation: initiale Ablagerung von mineralischen Kristallen in den Lochregionen (*hole zones*) der Kollagenfibrillen, welche sich dann in die Lücken zwischen den Kollagenmolekülen (*gap regions*) fortsetzt; Quelle: [33].

- Einsatz elektronenmikroskopischer Techniken zur Aufklärung der Nanostruktur

Bis vor kurzem wurde die Transmissionselektronenmikroskopie am Knochen fast ausschließlich als histologische Technik eingesetzt. Es existiert eine unüberschaubare Fülle von Arbeiten, in denen nach verschiedensten Fixierungs- und Anfärbeprozessen Zellen, Zellbestandteile und extrazelluläre Matrix des Knochens untersucht werden. Im Vordergrund stehen in diesen Publikationen Fragen der Kollagensynthese und deren Störungen sowie die Mechanismen der Kalzifizierung des Knochens. Wenige Arbeitsgruppen (z.B. WEINER, Rehovot, Israel) nutzten die TEM zur Aufklärung der eigenschaftsbestimmenden Nanostrukturen des „fertigen“ Knochens [24, 25, 27]. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Wie und an welcher Position sind die Mineralkristalle an die Kollagenfasern angelagert? Welche Form, welche Größe besitzen die Nanokristalle? Welche Variationen treten von Individuum zu Individuum auf? Auf der Basis dieser Befunde wurden neue Morphologiemodelle für den Knochen vorgeschlagen bzw. herkömmliche Vorstellungen konkretisiert („*twisted plywood*“ [34]). Erst in den letzten Jahren begannen systematische Untersuchungen zu Verteilung und Orientierung der Apatitkristalle in der durch die Kollagensynthese vorgegebenen Matrix. Besonders hervorzuheben ist eine aktuelle Arbeit, in welcher ein Zusammenhang zwischen der histologisch nachgewiesenen, typischen Querstreifung der Kollagenfasern mit einer periodischen Anordnung der Kristallite nachgewiesen wird [26]. Von großem Interesse ist die Feststellung, dass elektronenmikroskopisch keine Unterschiede in Kristallitgröße und -form zwischen normalem und osteoporotischem Knochen gefunden wurden.

Erste AFM-Untersuchungen zur Nanostruktur des Knochens wurden seit Mitte der 90er Jahre unternommen [29, 30, 35]. Dabei wurden sowohl die Morphologie und die Orientierung der Kollagenfasern als auch Form, Größe und Ausrichtung der Apatitkristalle gemessen. Von

Vorteil ist, dass Aufgrund der unterschiedlichen Nachgiebigkeiten der Knochenbestandteile ein nutzbarer Materialkontrast vorhanden ist. Vorherige Kontrastierung ist nicht erforderlich, und prinzipiell sind auch frische, nicht entwässerte und nicht chemisch fixierte Proben verwendbar. Grosse Schwierigkeiten entstehen allerdings dadurch, dass die Rasterkraftmikroskopie extrem glatte Probenoberflächen erfordert. Es besteht ein erheblicher Präparationsaufwand: Anschliffe, Anschnitte oder durch Ultrafräsen bearbeitete Oberflächen wurden untersucht.

#### ▪ Quantifizierbare Parameter

Hochauflösende elektronenmikroskopische Techniken (TEM, ESEM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) erlauben die Quantifizierung folgender nanoskopischer Strukturdetails:

- Dicke, Breite und Länge der HAp-Nanopartikel
- Form und Orientierung der Nanopartikel
- Periode der Querstreifung der Kollagenfasern (nach Kontrastierung, TEM) bzw. Periode der eingebauten Kristallite (TEM, ESEM-BSE)
- Orientierung der Faserbündel
- Winkel zwischen alternierenden Faserorientierungen

### 2.1.4 Mechanische Eigenschaften des kortikalen Knochens

#### a) Experimentelle Ansätze zur Ermittlung mechanischer Kennwerte des Knochens

Die ausgeprägt hierarchische Organisation, die starke Anisotropie und die Abhängigkeit von Herkunft, Alter, Präparation usw. macht eine pauschale Angabe typischer mechanischer Kennwerte des Materials Knochen unmöglich. Röhrenknochen können etwa in Abhängigkeit vom tatsächlichen Entnahmeort entlang der Längsachse bzw. entlang des Umfanges stark variierende Messwerte liefern. Der distale Bereich des Femur ist geringer mineralisiert und schwächer unter Zug- und Druckbelastung [23]. Es existiert eine Vielzahl experimenteller Ansätze, die sich auf verschiedene strukturelle Ebenen beziehen und verschiedene physikalische Meßmethoden umfassen. Das Spektrum mechanischer Prüfverfahren umfasst Tests am ganzen Knochen (Oberschenkelknochen, Wirbelkörper) und Prüfungen in mikroskopischem Maßstab (Zug- und Biegeversuche an Miniaturprüfkörpern aus einzelnen Trabekeln oder aus kortikalem Knochen) ebenso wie Untersuchungen im Nanometer-Bereich (Nanoindentation). So wird berichtet, dass eine Prüfung sehr kleiner Proben kleinere Werte für Festigkeit und Steifigkeit erbringt als die Prüfung großer, kompakter Prüfkörper [23].

Höhere Dehnraten ergeben im Zugversuch höhere Werte für Elastizitätsmodul, Festigkeit und Bruchdehnung [23]. Neben den vom Messverfahren abhängigen Variationen der mechanischen Kennwerte wird das Messergebnis von der Vorbehandlung der Probe beeinflusst (Entwässerung, Einbettung, Desinfektion, Lagerzeit u.a.) [36].

#### b) Messverfahren

Die Steifigkeitsparameter des Knochens wie z.B. der Elastizitätsmodul) können auf verschiedenen Wegen ermittelt werden. Häufig findet man Angaben, die aus mechanischen Zug- bzw. Druckprüfungen durch Auswertung der Spannungs-Dehnungs-Diagramme abgeleitet werden. Nach CURREY [23] treten keine signifikanten Unterschiede zwischen unter Zug- bzw. Druckbelastung erhaltenen Werten auf. Ein weiteres, oft eingesetztes Prüfverfahren ist der Dreipunktbiegeversuch. Beide jeweils an standardisierte Materialprüfverfahren angelehnte Methoden verwenden dabei meist miniaturisierte Vorrichtungen und Prüfkörper. Dadurch wird einerseits das Vorliegen eines hinreichend homogenen und repräsentativen Prüflings sichergestellt, andererseits ermöglicht eine Miniaturisierung in gewisser Weise die Messung lokaler Eigenschaften ausgewählter Baueinheiten des Knochens (Kompakta, Osteon, Trabekel usw.) und die Erfassung der Anisotropie des Knochens (z.B. Miniaturzugprüfkörper, welche eine Belastungsrichtung senkrecht oder parallel zur Längsachse eines Röhrenknochens repräsentieren). Eine elegante Methode zur Bestimmung des Elastizitätsmoduls ausgewählter Bereiche unter Berücksichtigung der Richtungsabhängigkeit bietet die akustische Rastermikroskopie (*scanning acoustic microscopy*, SAM). Ist die Dichte des Knochens bekannt, kann der Elastizitätsmodul aus der gemessenen Schallgeschwindigkeit errechnet werden. Die laterale Auflösung dieser Methode liegt im Bereich von ungefähr 10  $\mu\text{m}$ . Die registrierende (Ultra-) Mikrohärtemessung (UMH) stellt ein weiteres Verfahren zur Bestimmung der lokalen mechanischen Eigenschaften, ebenfalls unter Berücksichtigung der Anisotropie des Knochens, dar. Unter mikroskopischer Kontrolle wird ein Probenbereich gewählt, in den ein Eindringkörper (Diamant) durch eine in einem definierten Zeitregime aufgebrachte Kraft eindringt. Die Auswertung des zeitabhängigen Zusammenhanges von Kraft und Eindringtiefe ergibt Werte für die Härte und den Elastizitätsmodul des Materials. Die laterale Auflösung ist heute besser als 1  $\mu\text{m}$ , die Auflösungsgrenze der gemessenen Kräfte liegt im Bereich von einigen 100nN. Neueste Verfahren koppeln den Eindringkörper mit einem Rasterkraftmikroskop (Nanoindenter).

Die Festigkeit des Knochens wird z.B. bei CURREY aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen von (miniaturisierten) Zug- und Druckversuchen bzw. aus Biegeversuchen abgeleitet. So wird meist die Bruchspannung angegeben, um die Festigkeiten von Knochen unterschiedlicher Herkunft, unterschiedlichen Alters, verschiedener Mineralisation usw. zu vergleichen.

Eine umfassende Darstellung der eingesetzten Prüfverfahren, Prüfkörpergeometrien und Messergebnisse ist in [36, 38] gegeben. In Tabelle 3 sind ausgewählte Beispiele für mittels verschiedener Versuchsanordnungen erhaltene mechanische Kennwerte wiedergegeben.

Verfahren	Ermittelte Kennwerte	Quelle
<b>Zugversuch</b>		
- Zugstäbe aus Femurkompakta, altersabhängig	$\sigma_B=(55\dots103)$ MPa, $\sigma_B^*=(89\dots140)$ MPa, $\epsilon_B=(0,47\dots0,82)$ %, $E=(10,5\dots33,2)$ GPa	[39]
- Femurkompakta, longitudinal transversal	$\sigma_B=133$ MPa, $\sigma_y=114$ MPa, $\epsilon_B=0,31$ % $\sigma_B=52$ MPa, $\epsilon_B=0,07$ %	[23]
<b>Druckversuch</b>		
- ohne Angabe longitudinal transversal	$\sigma_B=205$ MPa $\sigma_B=130$ MPa	[23]
<b>Biegeversuch</b>		
- Balken, einseitig befestigt	$E=7,8$ GPa	[38]
- ohne Angabe	$E=14,8$ GPa	[38]
- Dreipunkt-Biegeversuch, Platten, (7x5x0,3)mm, Metaphyse Diaphyse	$E=9,6$ GPa (longitudinal), 5,5 GPa (transversal) $E=12,5$ GPa (longitudinal), 6,0 GPa (transversal)	[23]
<b>Mikro- und Nanoindentation</b>		
- Nanoindentation	$E=11,4$ GPa (feucht) bis 18,1 GPa (trocken)	[38]
- Nanoindentation (Osteon, feucht)	$E=19,1$ GPa (Diaphyse), $E=15,8$ GPa (Hals), $H=(0,23\dots0,76)$ GPa	[40]
- Mikro- und Nanoindentation	$H=(0,28\dots0,74)$ GPa	[38]
<b>Akustische Messungen</b>		
- Akustisches Rastermikroskop (SAM)	$E=17,5$ GPa	[38]

**Tab. 3:** Zusammenstellung ausgewählter Beispiele für Prüfverfahren und mechanische Kennwerte des kortikalen Knochens (Femur, Mensch); \*auf hohlraumfreien Querschnitt bezogen

### c) Anisotropie der mechanischen Eigenschaften des kortikalen Knochens

Ein herausragendes Merkmal des Knochens ist seine ausgeprägte Anisotropie. Schon die Betrachtung der Strukturen des Knochens im Lichtmikroskop zeigt, dass innerhalb aller hierarchischer Ebenen Vorzugsrichtungen festgestellt werden können. So verlaufen die zylindrischen Osteone parallel zur langen Achse der Röhrenknochen. Die innerhalb der Osteone sperrholzartig angeordneten Lamellen erweisen sich als Bereiche alternierender Faserorientierungen. Innerhalb dieser kollektiven Anordnungen von Bündeln hybrider Nanofasern zeigt sich bei TEM- oder AFM-Untersuchungen, dass die Orientierung der Kollagenfasern mit einer Ausrichtung der an- bzw. eingelagerten plättchenförmigen HAP-Nanopartikel einhergeht. Die strukturelle Anisotropie spiegelt sich in einer komplexen Anisotropie der mechanischen Eigenschaften wieder, welche den mechanischen Beanspruchungen unter physiologischen Belastungen gerecht wird.

Sowohl unter Druck- und Zugbelastung bzw. im Biegeversuch, als auch bei der Bestimmung lokaler mechanischer Eigenschaften durch UMH- und SAM-Messungen wird eine deutliche Abhängigkeit der ermittelten mechanischen Kennwerte von der Prüfrichtung, z.B. bezogen auf die Längsachse der Röhrenknochen, festgestellt. In Tabelle 3 sind Beispiele für die zum Teil deutliche Variation der mechanischen Eigenschaften (Werte für Prüfung longitudinal bzw. transversal, d.h. parallel bzw. senkrecht zur Längsachse der Röhrenknochen) gegeben. Es sei unbedingt erwähnt, dass diese eher illustrative Darstellung des Phänomens der mechanischen Anisotropie den komplizierten Verhältnissen bei Weitem nicht gerecht wird. Eine tiefer gehende Analyse der komplexen Verhältnisse ist z.B. in [8] gegeben.

Weitere wichtige mechanische Eigenschaften wie das Ermüdungsverhalten und die viskoelastischen Eigenschaften sowie weitere Effekte wie Strömungsprozesse der flüssigen Komponenten in den Hohlräumen des Knochens und piezoelektrische Effekte werden hier nicht betrachtet. Eine gute Übersicht hierzu bietet CURREY in [23]. Als umfassendes Werk zu den mechanischen Eigenschaften des Knochens sei eine von COWIN editierte Anthologie empfohlen ([36, 38, 41]).

### d) Veränderung mechanischer Eigenschaften durch physikalische und chemische Präparation

Durch Entwässerung werden Festigkeit und Elastizitätsmodul erhöht, während die Zähigkeit des Knochens deutlich absinkt (Versprödung) [23]. So wird berichtet, dass der E-Modul um 17% und die Zugfestigkeit um 31% ansteigen, während die Zähigkeit (keine Angabe zur Ableitung dieses Wertes, wahrscheinlich gemessen als Bruchdehnung) um 55% zurückgeht [36]. Allerdings können die ursprünglichen Werte durch Lagerung in physiologischer

Kochsalzlösung wiederhergestellt werden. Ein mehrfaches Durchlaufen eines Trocknungs-Befeuchtungs-Zyklus führt zu einer signifikanten Verringerung der Biegefestigkeit [37]. Eine Zusammenfassung der Veränderungen der Eigenschaften des Knochens nach Zelltod, durch Fixierungsverfahren (Einfrieren, chemische Fixierung) und durch andere physikalische Behandlungen (Bestrahlung, Wärmebehandlung) ist auf umfassende Weise in [41] gegeben. Insbesondere werden hier die Konsequenzen diskutiert, die sich aus möglichen Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Materials Knochen mit Hinblick auf die Qualität eines knöchernen Transplantates (Allograft) ergeben. Demnach ist es nicht möglich, eine allgemeingültige Aussage zum Einfluss bestimmter Behandlungen abzuleiten. Den geringsten Einfluss scheint eine Gewebefixierung durch Einfrieren zu haben. Hier werden in den meisten Fällen keine Veränderungen registriert, während in Ausnahmefällen sowohl ein Ansteigen als auch ein Abfallen des E-Moduls, der Bruchdehnung, der Bruchspannung und der Bruchenergie (*energy to failure*) festgestellt wurden. Ebenso gibt es keine einheitlichen Voraussagen zum Einfluss einer Lagerung in Alkohol, Formalin oder einem chemischen Fixativ („Einbalsamierung“). Ionisierende Strahlung höherer Dosen (50 bis 1000 kGy) führt zu einer Vernetzung des Kollagen und zu einem signifikanten Abfall von Zähigkeit, E-Modul und Zug- bzw. Druckfestigkeit. Während moderate Erwärmung (60°C) zu keinen signifikanten Veränderungen führt, werden E-Modul und Druckfestigkeit des Knochens durch höhere Temperaturen (100°C bis 134°C, Autoklavierung) deutlich reduziert.

#### e) Wachstum, Adaption und Remodelling

Im Gegensatz zu allen bisher eingesetzten technischen Werkstoffen ist der „fertige“ Knochen in der Lage, durch ständig stattfindende Umbauprozesse auf Veränderungen der Lastsituation zu reagieren. Dieser Vorgang ist für das Design strukturkompatibler Werkstoffe zum Knochenersatz von immenser Bedeutung: Das Biomaterial muss in seiner Festigkeit und Steifigkeit möglichst gut an die entsprechenden Werte des knöchernen Lagers angepasst werden. Einerseits werden lasttragende Implantate notwendig, um den in Heilung befindlichen Knochen zu entlasten. Andererseits wird durch zu steife Implantate jeglicher Lastreiz auf den Knochen abgeschirmt (*stress shielding*), wodurch das Gleichgewicht aus Resorption und Neuaufbau gestört wird. Die Folge ist ein übermäßiger Knochenabbau, der wiederum zu Frakturen oder zu Implantatlockerung führen kann.

Darüber hinaus können mikroskopische Defekte (Mikrorisse, siehe unten) repariert werden, indem geschädigte Zonen resorbiert und durch neu gebildeten Knochen aufgefüllt werden. Treten durch nicht physiologische Belastungen Gewaltbrüche auf, kann unter geeigneten

Bedingungen (Ruhigstellung, Osteosynthese) eine vollständige Verheilung erfolgen. Nicht zuletzt sei darauf hingewiesen, dass Knochen im Zuge der Individualentwicklung mitwachsen, ohne dass zu irgend einem Zeitpunkt die mechanische Integrität des Stütz- und Bewegungsapparates in Frage gestellt ist.

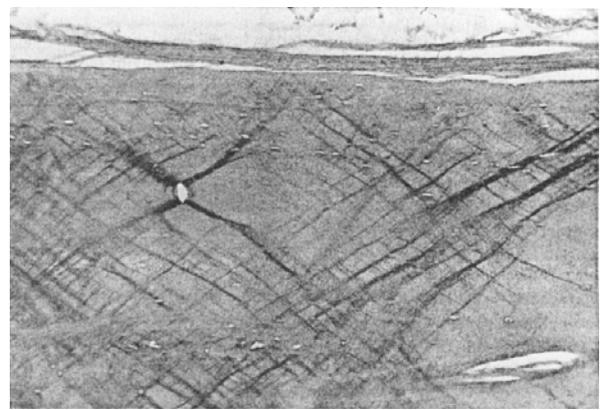
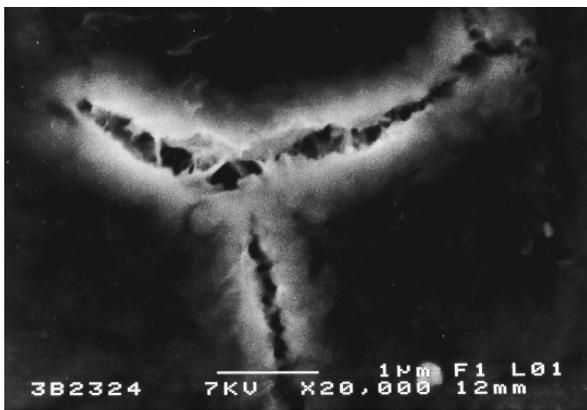
### 2.1.5 Mikromechanische Untersuchungen

Systematische Analysen der bei der Deformation von Knochen auftretenden mikro- und nanoskopischen Prozesse scheinen schwierig. Nur wenige Arbeitsgruppen haben sich bisher mit der Entstehung und Ausbreitung von Mikrorissen im Knochen und einer Bruchmechanik des Knochens beschäftigt [42-45]. Im Wesentlichen werden Knochenproben dabei wie technische Kompositwerkstoffe (Lamine, Faserverbunde) behandelt, und mikroskopische Befunde zu Risseinleitung und Rissausbreitung werden mit solchen Systemen verglichen und entsprechend interpretiert. Nach geeigneter Kontrastierung mittels Schwermetallverbindungen konnten beispielsweise Mikrodeformationszonen im kompakten Knochen unter Nutzung des Rückstreuungselektronensignals abgebildet und qualitativ beschrieben sowie mit Rissausbreitungsprozessen in technischen Kompositwerkstoffen verglichen werden [46]. Die mikromechanische Analyse des Knochens auf Basis der die Materialeigenschaften bestimmenden Nanostrukturen steht ganz am Anfang [47]. Experimentelle Probleme ergeben sich aus der Tatsache, dass der Knochen über einen überaus komplizierten, hierarchischen Aufbau verfügt. Eine konventionelle Messung mechanischer Kennwerte im Zug- oder Biegeversuch kann nur integrale Werte über viele Osteone und Lamellen mit verschiedenen Orientierungszuständen und Mineralisierungsgraden liefern. Die Situation entspricht etwa dem Versuch, aus dem Crashtest eines Automobils auf mechanische Kennwerte der in den einzelnen Bauteilen eingesetzten Werkstoffe zu schließen. Miniaturisierungen, z.B. zur Messung der mechanischen Eigenschaften einzelner Trabekel des spongiösen Knochens [48], werfen das Problem einer geeigneten Befestigung auf.

Häufig werden in der Literatur die abgebildeten Nanostrukturen, die lokal oder integral ermittelten mechanischen Kennwerte sowie beobachtete Deformationsmechanismen mit klinischen Befunden, Ergebnissen lichtmikroskopischer Histologie und der (Mikro-) Radiographie bzw. Mikrotomographie abgeglichen.

### a) Deformationsstrukturen

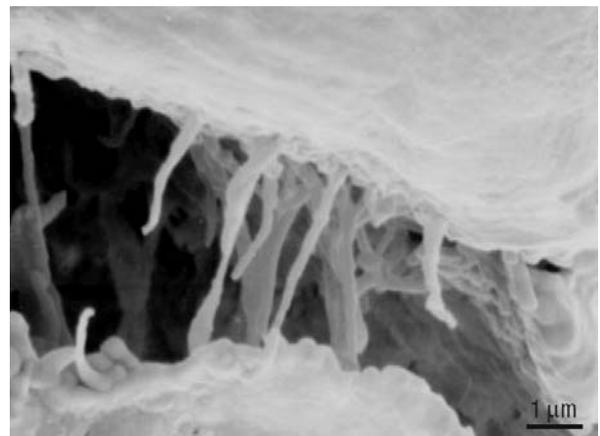
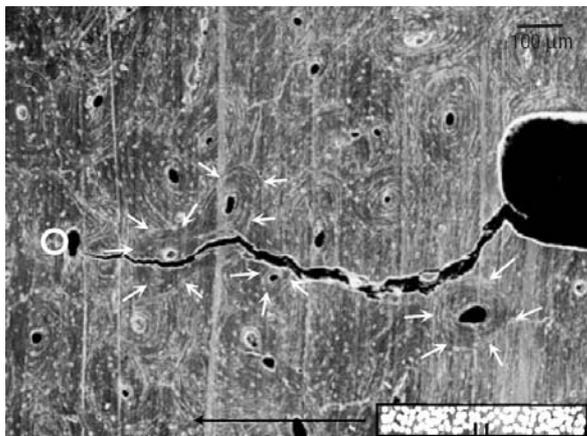
Wenige Untersuchungen befassen sich mit der Aufklärung von Deformationsstrukturen, die im Knochen nach Druck-, Zug- oder Biegebelastung bzw. nach zyklischer Belastung auftreten. Es existieren bisher nur sehr wenige Arbeiten, die die mikroskopische Struktur von Deformationszonen zeigen. Es ist üblich, von Mikroschädigung (*microdamage*) bzw. Mikrorissen (*microcracks*) zu sprechen. Es wurde beobachtet, dass im Zuge der Präparation des kompakten Knochens für die Abbildung im AFM durch Trocknung und anschließende Bearbeitung mit dem (Ultra-) Mikrotom Mikrorisse erzeugt werden, die durch feine Fibrillen überbrückt sind. Solche crazeartigen Zonen sind in Abbildung 8a dargestellt.



a

b

**Abb. 8:** a) Crazeartige Deformationszone als Präparationsartefakt im (REM) [49], b) Scherbandbildung in einer deformierten Knochenprobe; lichtmikroskopische Aufnahme [8]



a

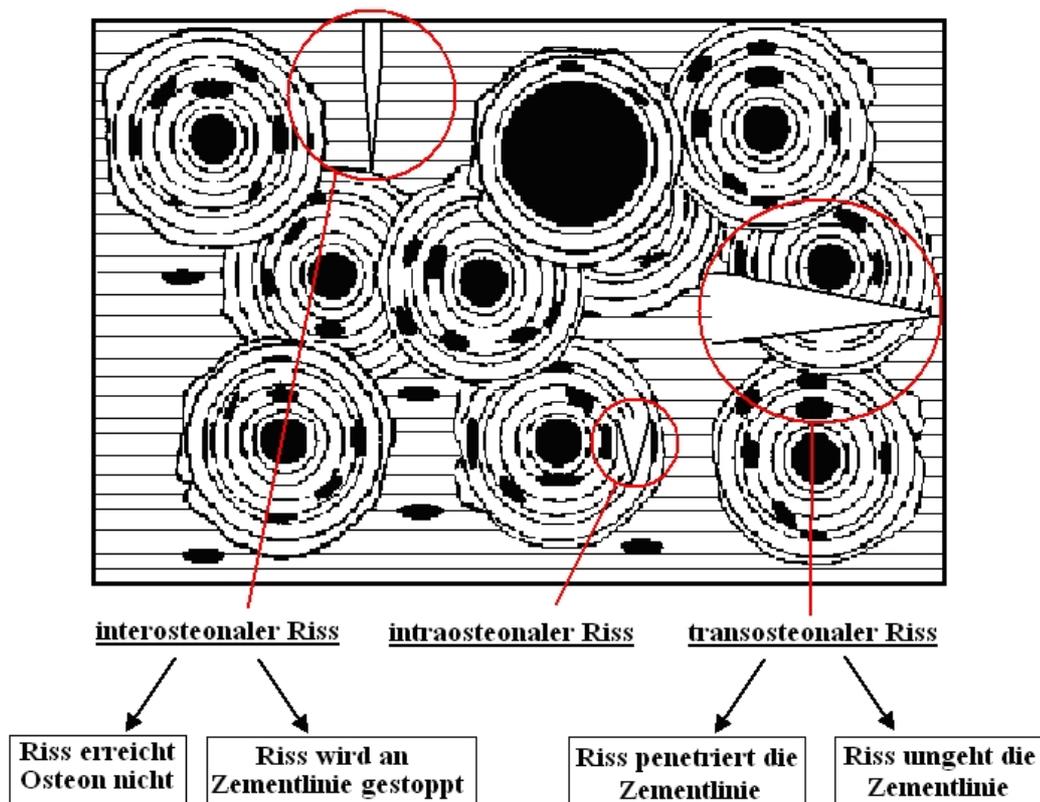
b

**Abb. 9:** Rissausbreitung im Knochen: a) Der durch einen Kerb erzeugte Riss wird nicht durch osteonale Strukturen abgelenkt; b) Mikrorisse sind durch Fibrillen überbrückt [45]

Erst seit kurzem wird berichtet, dass Mikrorisse durch Kollagenfibrillen überbrückt sein können. Dabei werden rasterelektronenmikroskopische Befunde an gekerbten Knochenproben diskutiert (Abb. 9, [50]). Es ist bekannt, dass im kompakten Knochen Scherbänder (*slip bands*) auftreten können. Diese werden mit in Metallen beobachteten Deformationsstrukturen verglichen. Sie werden als Gebiete „partiellen Versagens des Materials entlang der Ebenen der maximalen Scherung“ und als mögliche Auslöser für eine Mikrorissbildung im Knochen interpretiert (Abb. 8b).

**b) Rissentstehung, Rissausbreitung und Riss-Stopp-Prozesse**

Es liegen einige Arbeiten vor, die sich mit den Mechanismen der Rissentstehung, der Rissausbreitung und des Riss-Stopps beschäftigen. Dabei existieren verschiedene Vorstellungen, welche morphologischen Einheiten Rissbildung begünstigen oder unterdrücken. So wird z.B. in Abbildung 9a ersichtlich, dass die Rissausbreitung kaum durch morphologische Einheiten des kortikalen Knochens (Osteone) beeinflusst wird, wenn der Riss von einer Kerbe ausgeht, die longitudinal (parallel zur Längsrichtung des Knochens) eingebracht wurde.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung möglicher Rissausbreitungswege im Havers-Knochen [51]

Die entsprechende Situation ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Einen wesentlich stärkeren Einfluss üben mikroskopische Strukturdetails aus, wenn der Kerb transversal zur Knochenlängsachse liegt [45, 50]. Soweit bekannt, beschränken sich Arbeiten zur Mikromechanik des Knochens auf die Beschreibung und Vermessung von Deformationsstrukturen (Risslängen, kritische Risslängen, Rissverlauf), ohne dass ein Bezug zu eigenschaftsbestimmenden Strukturen auf mikro- und nanoskopischer Ebene hergestellt wird. Insbesondere fehlt bisher eine systematische Analyse mikromechanischer Mechanismen im Nanobereich.

### c) Mikro- und Ultramikrohärtemessungen

Erst in den letzten Jahren hat man begonnen, die Methoden zur Messung der Mikrohärtigkeit bzw. Ultramikrohärte auf den kortikalen Knochen anzuwenden, um die mikromechanischen Prozesse bei Deformation näher zu charakterisieren [52-55]. Einige Publikationen berichten über die erfolgreiche Korrelation von Mikrohärtigkeit- und Ultramikrohärtemessungen mit Ergebnissen mikroskopischer Strukturuntersuchungen [56, 57]. In einer neuesten Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen dem Mineralgehalt ausgewählter Bereiche des subchondralen Knochens und den an derselben Stelle durch Nanoindentation erhaltenen Elastizitätsmoduln untersucht [58]. In den zuletzt genannten Arbeiten werden erstmals Messergebnisse verschiedener physikalischer Sonden (Ultramikrohärte, REM, TEM) erfolgreich miteinander korreliert.

## 2.2 Knochenzement

### 2.2.1 Definition

Unter einem *Zement* (engl. *cement*) versteht man im biomedizinischen Kontext nach WILLIAMS [59] ein

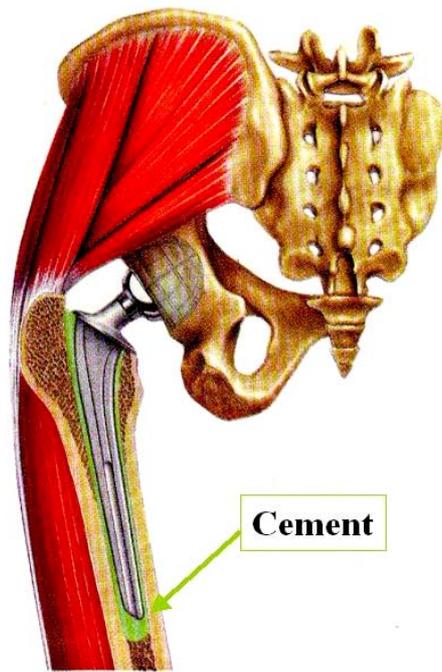
**„nichtmetallisches, aushärtendes Material zur Verankerung eines Biomaterials oder einer implantierbaren Vorrichtung in einer Kavität“.**

Spezifiziert man weiter auf den Begriff *Knochenzement*, so dient das oben definierte Material der

**„Verankerung einer Prothese zum Gelenkersatz.“**

Es sei betont, dass diese Definition eines (Knochen)zementes keinerlei Aussagen zur Adhäsion zwischen den vorliegenden Komponenten, etwa im Sinne eines Klebstoffes, enthält. Vielmehr wird ein Formschluss zwischen nicht exakt ausarbeitbaren Materialpartnern angestrebt. Häufig wird diese strenge Begriffsbestimmung um Materialien zur dauerhaften oder temporären Verfüllung von Kavitäten oder großvolumigen Defekten, z.B. nach Entfernung von Tumoren im Knochengewebe, erweitert.

Hauptanwendungsgebiet derartiger Knochenzemente ist die Verankerung von Hüft- und Kniegelenksendoprothesen nach Methoden, die direkt auf die bahnbrechenden Arbeiten von CHARNLEY in den 50er Jahren des 20. Jahrhunderts rückführbar sind (Abb. 11, [60]). Während die chemische Zusammensetzung des „klassischen“ Knochenzementes über Dekaden im Prinzip unverändert blieb, konnten durch Produktpflege und -weiterentwicklung, Verbesserungen der Verarbeitungsprozeduren *in situ* und insbesondere durch stetige Verfeinerung der Operationstechniken entscheidende Fortschritte, gemessen beispielsweise an der Häufigkeit intra- und postoperativer Komplikationen oder der Standzeit der Implantate, erzielt werden [61]. In den folgenden Abschnitten sollen die Anforderungen an Knochenzemente sowie der gegenwärtige Stand der Technik mit den innewohnenden Nachteilen und den sich bietenden Alternativen umrissen werden. Vor diesem Hintergrund werden die Synthese und die Verarbeitungs- und Endigenschaften der weiter unten diskutierten, neuartigen Systeme beschrieben.



a

b

## ACRYLIC CEMENT IN ORTHOPAEDIC SURGERY

John Charnley *C.B.E., D.Sc., F.R.C.S.*

Consultant Orthopaedic Surgeon,  
Centre for Hip Surgery, Wrightington Hospital,  
near Wigan, Lancashire, England.  
Honorary Lecturer in Orthopaedics,  
University of Manchester;  
Honorary Lecturer in Mechanical  
Engineering, Institute of Science & Technology,  
Manchester University



E & S LIVINGSTONE  
EDINBURGH AND LONDON 1970

**Abb. 11:** a) Beispiel für den Einsatz eines Knochenzementes (grün dargestellt) zur Verankerung des Schaftes einer Hüftgelenksendoprothese im Femur [62] und b) Titelblatt des Buches von CHARNLEY [60].

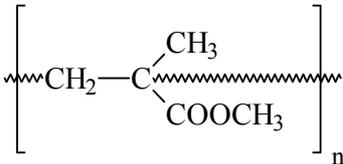
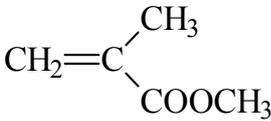
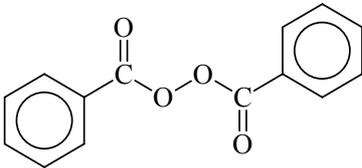
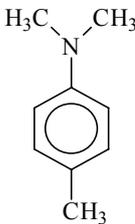
### 2.2.2 Konventionelle Knochenzemente

Wesentliche Eigenschaften konventioneller Knochenzemente können unter folgenden Punkten zusammengefasst werden [63-65]:

- Konventionelle Knochenzemente sind selbsthärtende, d.h. nach Anmischen und Einbringen in die entsprechende Kavität durch Polymerisation aushärtende Materialien auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) und ggf. zusätzlichen Copolymeren. Sie dienen der Fixierung bzw. Verankerung von Implantaten im lebenden Knochen. Hauptanwendungsgebiete liegen im vollständigen oder teilweisen Ersatz von Knie- und Hüftgelenken.
- Eine weitere Anwendung liegt in der Verfüllung von Knochendefekten (Knochenersatz) und in der Wiederherstellung knöcherner Strukturen z.B. von Wirbelkörpern oder des Schädels.

- Es besteht keine Haftung zwischen Knochen, Knochenzement und Implantat. Die Verankerung resultiert aus einem intensiven Formschluss der Komponenten.
- PMMA ist ein amorphes (nicht kristallines, glasartiges) Polymer mit einer Glasübergangstemperatur ( $T_g$ ) von  $105^\circ\text{C}$ . Bei einer Körpertemperatur von  $37^\circ\text{C}$  ist PMMA ein hartes, semiduktiles Material. Das Polymer wird als unter physiologischen Bedingungen unlöslich und biologisch inert bezeichnet.
- Mechanische Eigenschaften, Pastenviskositäten, Temperaturverlauf während der Polymerisation und zeitliche Verarbeitungsfenster („Teigzeiten“) der auf PMMA basierenden („akrylischer“) Knochenzemente können durch den Einbau von Comonomeren (z.B. Butylmethacrylat (BMA) mit  $T_g \approx 21^\circ\text{C}$ ), durch Mischen mit anderen Polymeren (z.B. PMMA/PBMA/Styrolpolymere) und durch Wahl des Polymer-Monomer-Verhältnisses (Anteile PMMA-Pulver und flüssigem MMA-Monomer zur Pastenherstellung) variiert werden.
- Erhöhter Widerstand gegen Risseinleitung und Risswachstum kann durch den Einbau flexibler Seitengruppen (Copolymere) und dadurch erhöhte Kettenmobilität erreicht werden.
- Die Morphologie der Pulverbestandteile und der gewählte Verarbeitungsweg (Mischprozess) beeinflussen die mechanischen Endeneigenschaften. Eine Vielzahl spezieller Mischverfahren und Mischersysteme stehen zur Verfügung. Zur Optimierung der Materialeigenschaften der Zemente kommen häufig Vakuummischsysteme oder Mischsysteme mit Kühlvorrichtung zum Einsatz.
- Knochenzemente sind in der Regel teilchengefüllte Systeme. Häufig enthalten sind Antibiotika und Röntgenkontrastmittel.

Ein Beispiel für die Zusammensetzung eines konventionellen Pulver-Flüssigkeits-Systems ist in Tabelle 4 gegeben. Obwohl z. B. die Verhältnisse von Flüssig- zu Pulverkomponente, das verwendete Kontrastmittel und Antibiotikabehalten variieren können, gilt dieses Schema prinzipiell für alle Knochenzemente auf PMMA-Basis.

	<i>Komponente 1</i>	<i>Komponente 2</i>
<b>Lieferform</b>	Pulver, sterilisiert (Ethylenoxid), in Portionsbeuteln (10,2g) 	Flüssigkeit, sterilfiltriert, portioniert in Ampullen (5ml) 
<b>Hauptbestandteile</b>	Poly-(methylacrylat, methylmethacrylat), davon 6,95g 6:94 und 1,42g 42:58, als Pulver 	4,6g Methylmethacrylat 
<b>Inhibitor</b>		Hydrochinon
<b>Initiator/Aktivator-system</b>	0,08g Dibenzoylperoxid (DBPO) 	0,094g N,N-Dimethyl-p-toluidin (DMpT) 
<b>Optisches Kontrastmittel</b>	Chlorophyll-Kupfer-Komplex E141	Chlorophyll-Kupfer-Komplex E141
<b>Röntgenkontrastmittel</b>	Zirkondioxid ZnO <sub>2</sub>	
<b>Antibiotikum</b>	0,209g Gentamicinsulfat	
<b>Zubereitung</b>	Portionen werden unmittelbar vor dem Einbringen in den Knochen manuell oder maschinell (ggf. unter Vakuum) gemischt	

**Tab. 4:** Beispiel für die Zusammensetzung eines klassischen Knochenzementes; hier: REFOBACIN<sup>®</sup>-PALACOS<sup>®</sup>-R10 (Merck KGaA, Merck Biomaterial)

## 2.2.3 Anforderungen an Knochenzemente und wichtige Eigenschaften

### a) Mechanische Eigenschaften des ausgehärteten Materials (Strukturkompatibilität)

- Normen:

Die Prüfung von Knochenzementen ist durch eine Vielzahl von Normen und Standards reglementiert. Einige wichtige Prüfverfahren und zugehörige Normen sind in der Tabelle 5 aufgelistet.

Norm	Prüfverfahren und Kennwerte
DIN 53435	Biegefestigkeit, Dreipunktbiegeversuch
	Schlagzähigkeit
ISO 5833	Biegefestigkeit, Vierpunktbiegeversuch
	Druckfestigkeit
	Elastizitätsmodul, Vierpunktbiegeversuch

**Tab. 5:** Ausgewählte Verfahren und Normen zur Prüfung von Knochenzementen nach [66]

- Zeitstandsverhalten und Mikrorissbildung

Die Messung der Dauerschwingfestigkeit (*fatigue strength*) von Knochenzementen kann z.B. mittels Vierpunktbiegeeinrichtung erfolgen [66]. Wichtig ist, dass die Probe selbst vollständig in Ringer-Lösung (37°C) eingetaucht ist. Durch Lagerung der Probe in Ringerlösung soll zuvor sichergestellt sein, dass die spezifische Feuchtigkeit des Materials mindestens 95% beträgt. Die Be- und Entlastung erfolgt sinusförmig mit einer Frequenz von 5 Hz. Die Maximalkraft wird anhand der im Biegeversuch ermittelten Biegefestigkeit festgelegt und variiert (10%, 20%, usw.). Gemessen wird die Zahl der Zyklen bis zum Bruch der Probe. Ein alternatives Testverfahren verwendet hantelförmige Zugstäbe unter sinusförmiger Zugbelastung. Auch hier wird in wässrigem Medium bei 37°C unter Sicherstellung einer spezifischen Feuchtigkeit des Materials von mindestens 95% geprüft. Durch Verwendung eines transluzenten Knochenzementes konnten im letztgenannten Fall durch lichtmikroskopische Untersuchungen Mikrorisse ausgemessen und deren Akkumulation bzw. deren Wachstum im Prüfkörper vermessen werden. Es wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Zahl der Mikrorisse mit der Zahl der im Zement vorhandenen Poren korreliert werden kann. Die Poren wurden als rissauslösende Defekte identifiziert. Die Porosität des PMMA-Zementes kann damit eindeutig als ein Faktor definiert werden, der maßgeblich zur

Zerrüttung des Zementköchers und damit zum Versagen der Prothese unter zyklischer Wechsellast beiträgt [67, 68].

- **Mindestanforderungen**

Um einen sicheren Einsatz von Knochenzementen sicherzustellen, sind folgende (mechanische) Mindestanforderungen definiert:

<b>Eigenschaft</b>	<b>Variationsbreite für verschiedene Knochenzemente</b>	<b>Mindestanforderung</b>
<b>Druckfestigkeit (ISO 5833)</b>	82 bis 104 MPa	70 MPa
<b>Schlagzähigkeit</b>	2.7 bis 2.8 kJ/mm <sup>2</sup>	
<b>Biegefestigkeit (ISO 5833)</b>	45 bis 80 MPa	50 MPa
<b>Elastizitätsmodul (ISO 5833)</b>	1.7 bis 3.1 GPa	1.8 GPa

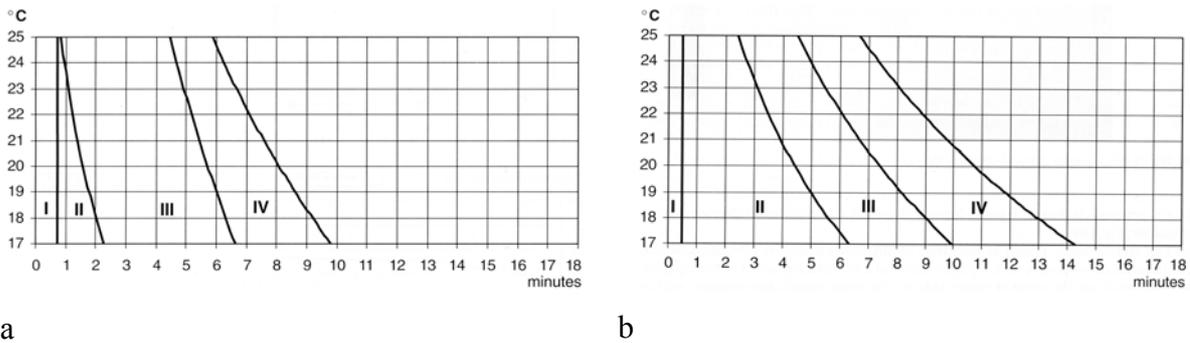
**Tab. 6:** Mindestanforderungen an ausgewählte mechanische Eigenschaften von Knochenzementen nach [66]

b) Verarbeitungseigenschaften *in situ*:

- **Viskosität:**

Die Viskosität der Knochenzementpaste muss so eingestellt sein, dass eine per Hand formbare, ausreichend zähe Masse („Teig“) vorliegt, die jedoch die Ausformbarkeit möglichst feiner Strukturdetails ermöglicht. Insbesondere sollen die im knöchernen Implantatlager nach dessen Ausarbeitung noch vorhandenen porösen Strukturen der Spongiosa möglichst gut abgeformt werden. Da die mechanische Verankerung ausschließlich auf einem exakten Formschluss beruht, hat die Viskosität des Teiges einen direkten Einfluss auf die Fixierung und Haltbarkeit der Prothese. Daneben existieren besonders niedrigviskose, injizierbare Systeme, die z.B. bei der Reparatur von Defekten in Wirbelkörpern zum Einsatz kommen.

Die in Abbildung 12 gezeigten Verarbeitungskurven geben die für die Anwendung wichtigen Verarbeitungszeiträume in Abhängigkeit von der Verarbeitungstemperatur an. Das eigentliche Verarbeitungsfenster, d.h. die zur Einbringung der Zementpaste in das knöcherne Lager und zur Einpassung des Implantates nutzbare Zeitspanne beträgt nur 4 bis 5 Minuten.



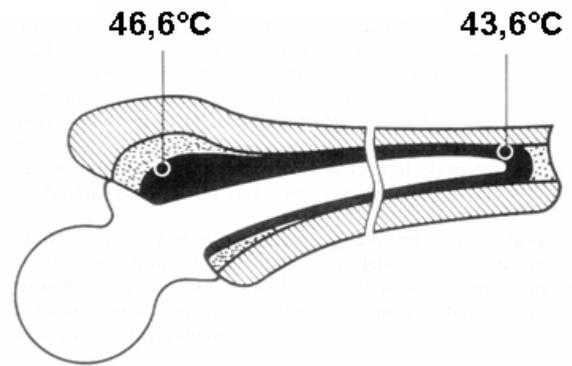
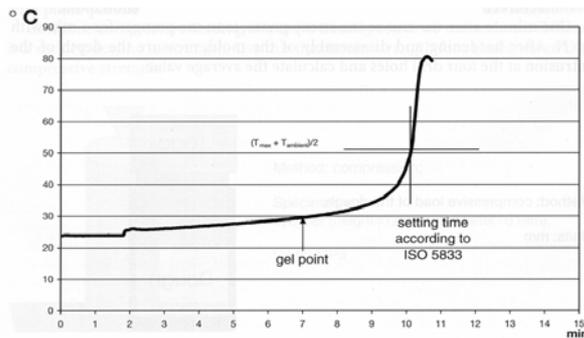
**Abb. 12:** Verarbeitungskurven für a) Refobacin-Palacos R und b) niedrigviskosen Palacos LV: I ... Mischphase, II ... Wartezeit, III ... Verarbeitungsfenster, IV ... Aushärtung. Quelle: [66]

### c) Oberflächenkompatibilität

- Verträglichkeit der Ausgangskomponenten und des ausgehärteten Endproduktes

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass vollständig polymerisiertes PMMA ein nicht toxisches, nicht allergenes und im Körper nicht veränderliches Material ist. Es gilt als biologisch inert. Beachtet man jedoch, dass während der Operation ein Kontakt mit dem Monomeren erfolgt, müssen dessen Eigenschaften Berücksichtigung finden. MMA gilt als toxisch und steht im Verdacht, allergische Reaktionen auslösen zu können. Auch wenn während der Operation Maßnahmen getroffen werden, die Exposition mit dem Monomeren zu minimieren, kann eine Schädigung durch Freisetzung von Restmonomer nicht ausgeschlossen werden.

Ein weiteres Problem besteht darin, dass die während der Polymerisation frei werdende Wärme zu einer thermischen Schädigung des angrenzenden Gewebes führen kann. Bei der Polymerisation größerer Teigmengen (z.B. einer Kugel von 4 cm Durchmesser) können Temperaturen von bis zu 80°C erreicht werden (Abb. 13a). In dem bis zu 1cm dicken Zementköcher können Temperaturen auftreten, die eine Schädigung des Implantatlagers zur Folge haben (Abb. 13b).



a

b

**Abb. 13:** a) typischer Temperaturverlauf während der Aushärtung (Polymerisation) eines PMMA-Knochenzementes, ermittelt nach ISO 5833; b) maximale Temperaturen *in situ*. Quelle: [66]

#### d) Sterilisation

Die Sterilisation der Pulverkomponente erfolgt üblicherweise durch Begasung mit Ethylenoxid. Die Monomerkomponente kann durch Filtration keimfrei gemacht werden.

#### e) Bioaktivität

Eine Bioaktivität liegt in gewissem Sinne dann vor, wenn durch Einarbeitung von Medikamenten eine lokale therapeutische Wirkung erzielt wird. Durch die Zugabe verschiedener Antibiotika können Infektionen des Implantatlagers bekämpft werden. Problematisch hierbei ist, dass nach anfänglich starker Freisetzung des an der Oberfläche des Zementköchers zugänglichen Antibiotikums ein starkes Abklingen der Konzentration zu verzeichnen ist. Ein über lange Zeit ausreichend hoher Antibiotikaspiegel ist kaum realisierbar.

Ähnliches gilt für Versuche, z.B. durch Zugabe eines die Knochenneubildung stimulierenden Wirkstoffes (in der Regel Hydroxylapatit) positive Effekte zu erzielen. Der bei weitem größte Teil des bioaktiven Materials ist in der inerten PMMA-Matrix eingeschlossen und nicht zugänglich.

#### f) Sichtbarkeit im Operationsgebiet und Röntgendiagnostik

Einigen Knochenzementen werden Farbstoffe, z.B. Chlorophyll, zugegeben, um die Erkennbarkeit des Werkstoffes im Operationsgebiet bei Einbringung bzw. bei einer notwendigen Entfernung zu verbessern. Knochenzementen werden in den meisten Fällen Röntgenkontrastmittel in Form mehr oder weniger fein verteilter Partikel mit typischen

Durchmessern von 0,5 bis 10  $\mu\text{m}$  beigegeben. Übliche Kontrastmittel sind Bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) und Zirkondioxid ( $\text{ZrO}_2$ ).

g) Alternative Konzepte

▪ Zementfreie Implantation vs. zementierte Prothese

Betrachtet man den Knochenzement ausschließlich in seiner Rolle als fixierendes Element einer totalen Knie- oder Hüftgelenksendoprothese, so dient er in erster Linie der mechanisch stabilen Verfüllung der Lücke zwischen nicht formschlüssigen Materialpartnern (z.B. knöchernes Implantatlager und Prothesenschaft). Mittlerweile haben sich Operationsverfahren etabliert, welche einen exakten Formschluss zwischen Knochenlager und Implantat gewährleisten. Neue bildgebende Verfahren erlauben die genaue Planung des durchzuführenden Eingriffs; die biomechanischen Verhältnisse können exakt vermessen, geeignete Implantatgeometrien gewählt werden. Entsprechend genau kann nun auch das Implantatlager ausgearbeitet werden. Stattet man zusätzlich die Oberfläche z. B. des Femurschaftes einer Hüftgelenksendoprothese mit einer mikroporösen Oberfläche (Porengröße typischerweise um 500  $\mu\text{m}$ ) und/oder einer osteoinduktiven Beschichtung aus, wird ein inniger Verbund von Knochen und Implantat erzielt. Ein potentieller Schwachpunkt des Gesamtsystems – der Zementköchler – wird eliminiert. Sehr grob kann man abschätzen, dass das Verhältnis von zementierter und zementfreier Knie- und Hüftgelenksendoprothetik heute bei 50:50 liegt [69]. Indikationen beider Verfahren sind in der folgenden Tabelle gegeben.

<b>zementierte Endoprothese</b>	<b>zementfreie Endoprothese</b>
- sofortige Mobilisierung (stabile Verankerung der Prothese nach Aushärtung des Zementes) - sichere Verankerung auch dann, wenn viel Knochensubstanz verloren ist → ältere Patienten, Revisionen, Osteoporose	- Mobilisierung erst nach Wartezeit, dann aber - inniger Verbund von Prothese und Knochen, ggf. An- und Einwachsen neuen Knochens durch Oberflächenstrukturierung → jüngere Patienten, gesunde Knochensubstanz

**Tab. 7:** Vor- und Nachteile von Verankerungsprinzipien

▪ Kalziumphosphat-Zemente

Bewährt haben sich solche Systeme, bestehend z.B. aus nanopartikulärem HAP (OSTIM<sup>®</sup> [70]), zum Neuaufbau (Augmentation) von Knochen, der durch Operation entfernt wurde oder durch Verletzung verloren ging. Ein prominentes Beispiel ist die Aufbereitung des

knöchernen Lagers für ein Titanimplantat im Kieferknochen. Die unzureichende Endfestigkeit des Materials verbietet Anwendungen in lasttragenden Bereichen oder zur Verfüllung großer (belasteter) Defekte. Der Vorteil dieser Systeme liegt darin, dass ein osteoinduktives bzw. osteokonduktives Material passgenau in einen Defekt eingebracht wird und dort aushärtet. Nach vollständiger Resorption des Biomaterials ist der Defekt durch gesunden Knochen verfüllt, welcher den biomechanischen Anforderungen in bester Weise gerecht wird.

- Bioaktive, resorbierbare, aushärtbare Systeme

Grundidee dieses Ansatzes ist, ein aushärtbares Material zur Verfügung zu stellen, welches deutlich bioverträglicher und bioaktiver ist als konventionelle Knochenzemente auf PMMA-Basis. Dabei müssen die Verarbeitungseigenschaften (Viskosität, Teigzeit) so ausgelegt sein, dass „klassische“ Anwendungsroutinen beibehalten werden können. Ziel ist eine Synthese aus sofortiger Fixierung und Belastbarkeit des Implantates und einer osteokonduktiven Wirkung. Im Idealfall sichert ein solcher Zement die Verankerung der Prothese, bis die lasttragenden Aufgaben sukzessive durch neu gebildeten Knochen übernommen werden. In Kapitel 4.3 werden Ergebnisse zu einem solchen System diskutiert.

- Konzepte zu biomimetischen Knochenersatzwerkstoffen

Neue Ansätze gehen von der Grundidee aus, den Knochen in seiner (nanostrukturierten) Morphologie nachzuahmen, wobei häufig resorbierbare Matrixpolymere mit osteoinduktiven, keramischen Nanopartikeln kombiniert werden. Ziel ist hier, eine möglichst gute Übereinstimmung des Elastizitätsmoduls von Biomaterial und Knochen zu erreichen. Gleichzeitig soll eine gerichtete Knochenneubildung angeregt werden. Im optimalen Falle erfolgt die Resorption des Kompositwerkstoffes synchron zur Knochenneubildung. Vorteil eines solchen Systems wäre, dass strukturkompatible „Reparaturen“ auch in belasteten Bereichen möglich werden. Allerdings müssten solche *grafts* zunächst ex vivo (z.B. anhand computertomographisch erstellter dreidimensionaler Bilder des Defektes) passgenau hergestellt und dann in den Defekt eingesetzt werden. Eine Prothesenverankerung in Analogie zu den Zementierungsverfahren klassischer Knochenzemente ist ausgeschlossen. Ein biomimetischer Werkstoff im beschriebenen Sinne wird in Kapitel 4.4 dieser Arbeit vorgeschlagen.

## **2.3 Morphologie und Eigenschaften teilchengefüllter Polymere**

### **2.3.1 Beschreibung teilchengefüllter Polymere**

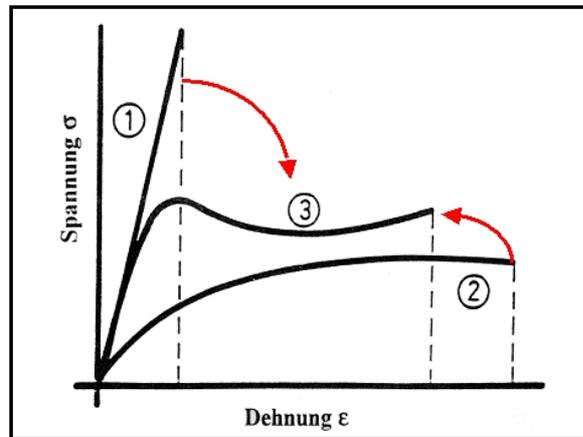
Zunächst wurden harte, anorganische Füllstoffe schlicht zur Kostenreduktion, zur „Streckung“ der relativ teuren Kunststoffe eingesetzt. Die Zugabe von Füllstoffen dient heute der Steuerung und Verbesserung bestimmter Eigenschaften: Steifigkeit und Wärmeformbeständigkeit werden erhöht, Schrumpfung bei der Verarbeitung vermindert. Spezielle Eigenschaften von Füllstoffen spielen z.B. bei flammwidriger Ausstattung, Farbgebung (Pigmente), chemischer Stabilisierung, Nukleierung usw. eine Rolle [71]. In der Regel ist jedoch die Zugabe effektiver Füllstoffmengen mit einer Verschlechterung der Zähigkeit verbunden. Ziel ist, die Einbuße an Zähigkeit zu minimieren bzw. zähigkeitssteigernde Effekte aufzuklären und gezielt einzusetzen.

Ein wichtiger Aspekt ist die Einarbeitung bioaktiver Komponenten in medizinische Polymerwerkstoffe. Hier werden häufig besonders hohe Füllgrade angestrebt. Einerseits soll eine nennenswerte Steigerung des Elastizitätsmoduls von Polymeren mit dem Ziel der Anpassung an die Steifigkeit des Knochens erreicht werden. Andererseits ist insbesondere bei der Verwendung bioinertter Polymere wie PE oder PMMA die Zugänglichkeit einer bioaktiven Komponente nur dann gegeben, wenn die Perkolationschwelle überschritten wird (siehe Kap. 2.4.1). Besonders kritisch ist die Situation, wenn von vornherein relativ spröde Matrixpolymere vorliegen, wie z.B. hoch vernetzte Systeme (Kap. 4.3) oder hoch kristallines Poly( $\beta$ -hydroxybutyrat) (PHB) (Kap. 4.4).

Ziel der Modifizierung von Polymeren mit harten, anorganischen Füllstoffen ist, ein Material mit möglichst hoher Festigkeit und Steifigkeit unter Beibehaltung der Zähigkeit zu erhalten. Angestrebt wird, durch Zugabe harter Füllstoffpartikel eine Zähigkeitssteigerung zu erlangen. Dies gelingt z.B. im Falle des PP durch Zugabe geeigneter  $\text{CaCO}_3$ -Partikel [71]. In Anlehnung an allgemeine Konzepte zur Zähigkeitssteigerung kann man hier folgende Voraussetzungen postulieren [72]:

- Große Defekte, die hohe Konzentrationen mechanischer Energie auf kleine Probenbereiche (kritische Spannungsspitzen) bewirken, müssen vermieden werden.
- Angestrebt werden viele kleine „Defekte“, die eine von außen eingetragene Energie auf viele kleine Probenbereiche verteilen.

- Die Energiedissipation soll durch möglichst intensive plastische Deformation der Matrix erfolgen.



**Abb. 14:** Ziel der Modifizierung von Polymeren: Synthese ③ aus mit harten Partikeln erreichbarer Steifigkeitserhöhung ① und durch gummielastische Partikel erzielbarer Zähigkeitserhöhung ② [4]

Wesentliche Einflussfaktoren sind:

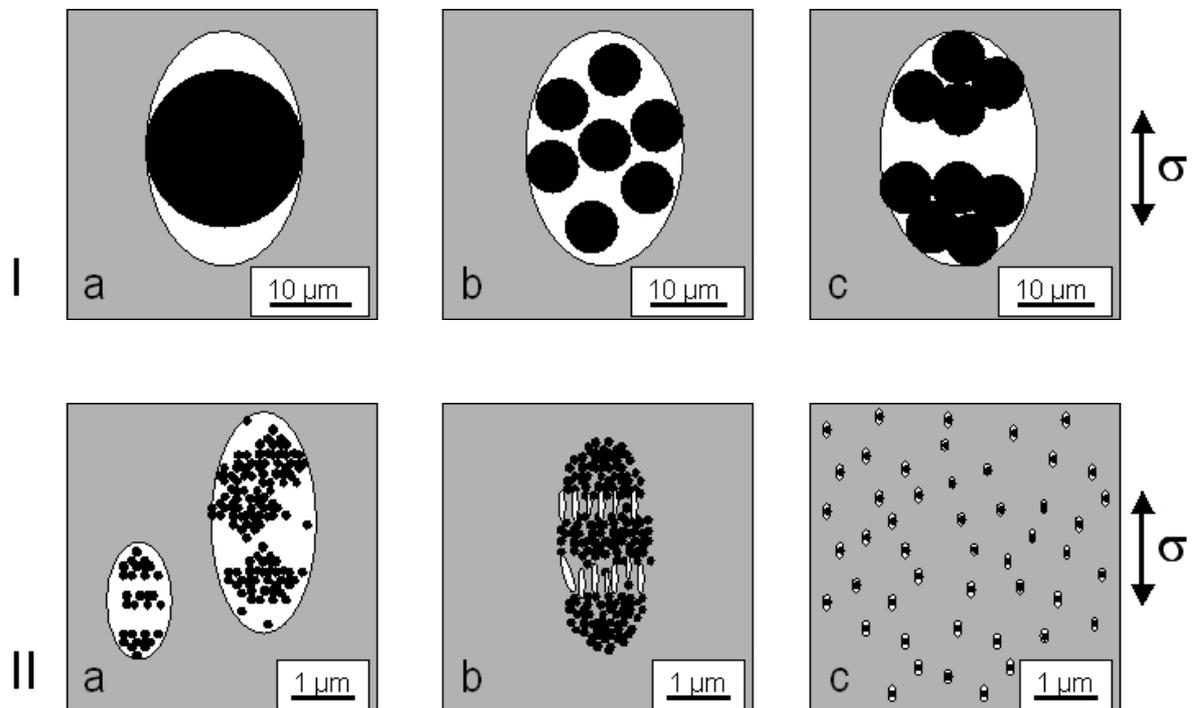
- mechanische Eigenschaften der Polymermatrix
- Volumenanteil der Füllstoffpartikel
- Größe und Größenverteilung der Füllstoffpartikel
- Partikelabstand, Partikelabstandsverteilung
- Partikelform
- Partikel-Matrix-Haftung und Grenzschichtstruktur
- Versuchsbedingungen<sup>5</sup>

Für die Deformationsprozesse in teilchengefüllten Polymeren wird ein Dreistufenmechanismus diskutiert [4]:

- lokale Spannungskonzentration
- lokale Hohlrumbildung an den Teilchen bzw. in den Teilchenagglomeraten
- induziertes Scherfließen der Matrixstege zwischen den Teilchen bzw. zwischen den Hohlräumen

<sup>5</sup> In Zusammenhang mit dem Einsatz der hier besprochenen Systeme als Material im Knochenkontakt bzw. zum Knochenersatz: wässriges Medium, 37°C, ungefähr 1Hz

Dafür muss der Teilchenabstand unterhalb eines matrixabhängigen kritischen Abstandes liegen. Diese Bedingung wird bei gleichen Füllgraden durch Nanopartikel eher erfüllt (siehe Abb. 16).



**Abb. 15:** Mikromechanische Mechanismen in teilchengefüllten Polymeren; I ... Mikroteilchen, II ... Nanopartikel

Mögliche mikromechanische Mechanismen sind in dem in Abbildung 15 gegebenen Skizzen angedeutet. Konventionelle Partikel mit Teilchengrößen zwischen 500 nm und 10 µm sind durch Reihe I repräsentiert, während Reihe II die Verhältnisse für die kleineren Nanopartikel wiedergibt:

- **I a)** Relativ schlechte Phasenhaftung: Bei einer außen angelegten Zugspannung erfolgt eine Ablösung und Lochbildung an den Polen.
- **I b)** Partikelagglomerat aus kleineren Partikeln mit schlechter Teilchen-Teilchen-Haftung und schlechter Kopplung der Teilchen an die Matrix: wie I a.
- **I c)** Transpartikulärer Bruch bei Agglomeraten mit guter Haftung der Primärpartikel untereinander und guter Ankopplung an die Matrix; Lochbildung.
- **II a)** Große Agglomerate von Nanopartikeln mit fehlender Partikel-Matrix-Haftung; schlechter Aufschluss. Resultierende Situation wie in Reihe I.

- **II b)** Gute Benetzung der Nanopartikel durch das Matrixpolymer, aber kein vollständiger Aufschluss. Deformation unter Bildung crazeartiger Strukturen innerhalb des Agglomerates.
- **II c)** Optimale Situation. Die Partikel sind fein in der Matrix verteilt und wirken lokal als Spannungskonzentratoren. Die Partikelabstände sind klein. In einem großen Materialvolumen werden in der Matrix energiedissipative Prozesse eingeleitet (*debonding*, *nanovoiding*, multiples Scherfließen)

Ein wesentliches Problem bei der Einarbeitung insbesondere größerer Volumenanteile und mangelhafter Kompatibilität der Füllstoffe ist die Bildung von Aggregaten und Agglomeraten. Oft liegen die Abmessungen der eigentlichen (Primär-) Partikel zwar in einem akzeptablen Bereich (500 nm bis 10  $\mu\text{m}$ ), jedoch wird die Morphologie des Komposites durch wenige übergroße Partikelansammlungen bestimmt. Diese sind:

- Partikelaggregate, die bereits vor der Einarbeitung vorhanden sind und im Verarbeitungsprozess nicht aufgeschlossen werden oder
- Agglomerate, die durch Zusammenlagerung während der Mischung der nicht kompatiblen Komponenten entstehen [71].

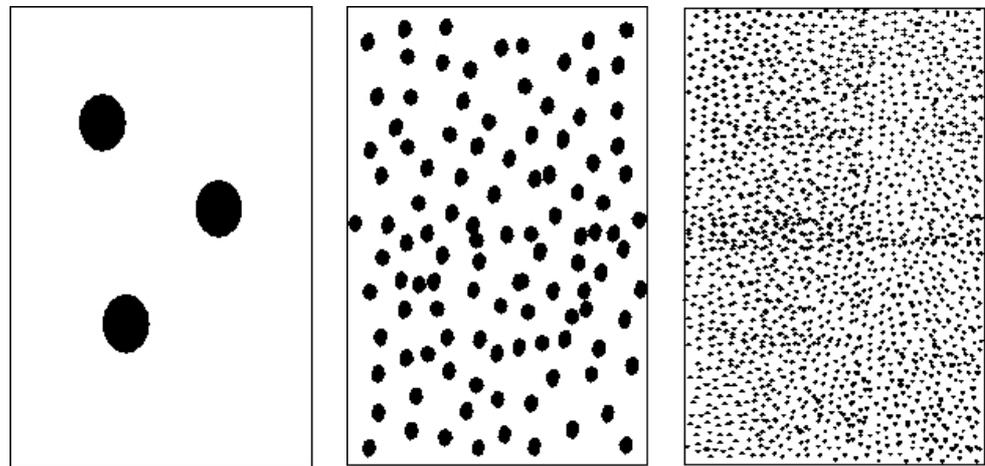
Häufig verdienen als Nanokomposite bezeichnete Polymerwerkstoffe diesen Namen nicht, da ein wesentlicher Anteil der Nanopartikel in Form großer Agglomerate vorliegt. Diese bestimmen die mikromechanischen Mechanismen und das mechanische Eigenschaftsbild. Bestenfalls bewegen sich die tatsächlichen Partikelgrößenverteilungen im Bereich klassischer teilchengefüllter Systeme. Im ungünstigen Fall bewirken sie als überkritische Defekte ein vorzeitiges Versagen des Materials.

### 2.3.2 Nanokomposite

#### a) Strukturelle Besonderheiten und Eigenschaften

Der Übergang zu immer kleineren, tatsächlich fein verteilten Füllstoffpartikeln führt in den Bereich der Nanokomposite. Die wesentliche Besonderheit besteht darin, dass die spezifische Oberfläche mit abnehmender Partikelgröße drastisch ansteigt. Dadurch werden z.B. intensive Wechselwirkungen zwischen Füllstoff und Matrix hervorgerufen; der Einfluss der Füllstoffe auf die Eigenschaften der Polymermatrix ist nicht mehr vernachlässigbar. Schon sehr geringe Füllgrade bringen große Effekte. Eigenschaften der Komposite wie Härte, Kratzfestigkeit,

Verschleißverhalten, Flammwidrigkeit, Barriereigenschaften, elektrische Eigenschaften und nicht zuletzt Biokompatibilität können deutlich verbessert werden.



<b>Teilchengröße:</b>	<b>10 µm</b>	<b>1 µm</b>	<b>100 nm</b>
<b>Anzahl:</b>	<b>3</b>	<b>3 000</b>	<b>3 000 000</b>

**Abb. 16:** Schematische Darstellung des Einflusses der Partikelgröße auf die Kompositmorphologie, insbesondere auf den mittleren Teilchenabstand. Der Füllstoffanteil ist konstant (etwa 3%) [74].

#### b) Mikromechanische Effekte

Aus mechanischer Sicht ist der in Abbildung 16 dargestellte Effekt kleiner Partikelgrößen von Bedeutung. Durch die Beigabe einer geringen Fraktion sehr kleiner Partikel werden kleine Partikelabstände realisiert, die für die Einleitung zähigkeitssteigernder mikromechanischer Prozesse bevorzugt werden. Die angestrebten mikromechanischen Prozesse sind in Abbildung 15 dargestellt: Die Situation in IIb entspricht z. B. dem Fall der von Polymermaterial durchdrungenen, aber nicht vollständig aufgeschlossenen Schichtsilikate (*intercalated layers*), während IIc den optimalen Fall der vollständig getrennten Partikel bzw. Schichten repräsentiert (*exfoliated layers*). Nur im letzten Fall kann man davon ausgehen, dass die hohen Erwartungen erfüllt werden, die mit dem Begriff Nanokomposit verknüpft sind. Durch die Nanostrukturierung kann man auch bei teilchengefüllten Systemen eine gleichzeitige Erhöhung von Steifigkeit und Zähigkeit erreichen.

### 2.3.3 Zähigkeitserhöhung hoch vernetzter Systeme

#### a) Zähigkeitssteigernde Mechanismen

Hoch vernetzte Polymersysteme wie Epoxidharze oder wie die in Kapitel 4.3 beschriebenen partiell resorbierbaren, aushärtbaren Knochenzemente sind häufig hart-spröde Materialien. In der Regel werden solche Systeme durch Zuschlag einer dispersen Phase modifiziert. Diese kann, wie bei schlagzäh ausgestatteten Thermoplasten, aus weichen, gummielastischen Teilchen bestehen. Hier kommen jedoch auch harte Teilchen (steife Polymere oder anorganische Partikel) zum Einsatz. Neben der Verbesserung wichtiger Verarbeitungseigenschaften wie der Viskosität der Ausgangskomponenten und der Verringerung von Polymerisationswärme und Polymerisationsschrumpf dienen diese Zuschläge auch der Zähigkeitserhöhung. Folgende zähigkeitssteigernde Mechanismen werden diskutiert [75, 76]:

- Massive Scherbandbildung, Scherfließen der Matrix  
Lokalisiertes Deformationsgeschehen der Matrix, hervorgerufen durch Spannungskonzentration um die Füllstoffpartikel. Wenn viele Partikel effektiv an diesem Prozess beteiligt sind (Partikelabstand!), kann auf diesem Wege starke plastische Deformation (Energiedissipation durch die Matrix) erfolgen.
- Crack Pinning  
Änderung der Länge der Rissfront durch Wechselwirkung mit Partikeln. Der zähigkeitssteigernde Effekt ist abhängig vom Partikeldurchmesser und dem mittleren Schwerpunktabstand der Teilchen. Dieses Modell bevorzugt kleine Partikelgrößen.
- Brückenbildungsmechanismus (*particle bridging*)  
Gilt für steife, aber duktile Partikel. Plastisch deformierte Partikel überbrücken einen Mikroriss und stabilisieren diesen. Zusätzlich trägt das plastisch deformierbare Material in der unmittelbaren Umgebung zu einer Abschirmung des Risses bei. Dieses Modell bevorzugt größere Partikel.
- Risswegablenkung (*crack path deflection*)  
Wird erklärt durch einen die Spannungsintensität berücksichtigenden Ansatz: Die Ablenkung des Rissweges unterdrückt den mode-I-Charakter der Rissöffnung und

favorisiert den mode-II-Charakter (Schermodus). Da die meisten Materialien einen größeren Widerstand gegen den letztgenannten Rissöffnungsmodus zeigen, kann auf diesem Wege eine höhere Zähigkeit erreicht werden. Dieser Effekt wird durch die Partikelabstandsverteilung gesteuert.

- Mikrorissbildung (*microcracking*)

Für diesen Mechanismus existieren verschiedene Typen. Entscheidend ist, dass steife, schlecht an die Matrix gekoppelte Partikel durch Ablösung von der Matrix Mikrohohlräume bilden (*debonding*), wodurch der Modul um die Prozesszone an der Risspitze erniedrigt wird; dadurch wird die Spannungsintensität verringert. Die Zähigkeitssteigerung kann gut mit Füllstoff-Volumenanteil und Partikelgröße korreliert werden. Auch hier sind kleinere Partikel wirksamer.

Für alle Mechanismen gilt: Von entscheidender Bedeutung für eine Zähigkeitssteigerung sind Partikelgröße, Füllstoffgehalt, mittlerer Partikelabstand und Partikel-Matrix-Kopplung [77, 78]. Mit Ausnahme duktiler Partikel (Brückenbildungsmechanismus) sind in jedem Falle kleine Partikel bzw. kleine Partikelabstände zu bevorzugen. Eine allgemeingültige Angabe existiert nicht. Eine sehr grobe, willkürliche Einteilung könnte eine Grenze bei etwa 10 µm Teilchendurchmesser ziehen. Als „kleine Teilchen“ könnte man – in Anlehnung an das in [71] für teilchengefüllte Thermoplaste angegebene Fenster – Partikel mit Durchmessern von 500 nm bis 10 µm bezeichnen. Alle beschriebenen Effekte mit Ausnahme des eine Ablösung voraussetzenden *microcracking* erfordern eine gute Füllstoff-Matrix-Haftung, die ggf. durch Präparation der Füllstoffe mit einem Kopplungsmittel erreicht wird [78].

b) Übergang zu Nanopartikeln: *massive nanovoiding*

Partikel im Größenbereich von einigen nm bis einigen 100 nm werden heute üblicherweise als Nanopartikel bezeichnet. Zur Modifizierung hoch vernetzter Systeme werden z.B. POSS-Modifikatoren (polyhedral oligosilsesquioxane) eingesetzt. Ein zähigkeitssteigernder Effekt ist hier die massive Hohlräumgebung in der Matrix, die auf sehr kleine Bereiche (*nanovoids*) begrenzt ist, aber große Teile der Matrix beteiligt. In diesem Falle scheint eine feste Ankopplung der Nanopartikel nicht zwingend erforderlich.

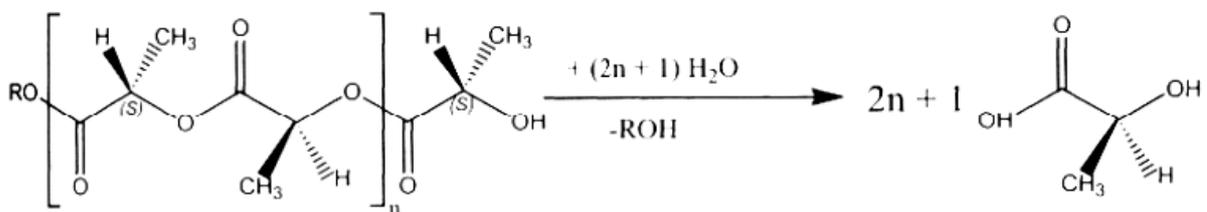
## 2.4 Biokompatibilität

### 2.4.1 Bioabbaubare Polymere

Unter Bioabbau (*biodegradation*) ist nach einer von der Europäischen Gesellschaft für Biomaterialien (ESB) vorgeschlagenen Definition die „... Zerrüttung eines Materials unter Wirkung eines biologischen Systems“ zu verstehen [59]. In Anlehnung an diese Definition beinhaltet der biologische Abbau von Polymeren deren Zerlegung in oligomere oder monomere Bausteine. Für die hier untersuchten Polymere sind thermische bzw. thermooxidative, enzymatische und hydrolytische Abbauprozesse von Bedeutung. Thermische und thermooxidative Abbauvorgänge sind insbesondere bei der Verarbeitung von Polyhydroxyalkanoaten zu berücksichtigen, da hier innerhalb kürzester Zeit eine drastische Verringerung des Molekulargewichtes und damit eine Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften erfolgen kann. Durch enzymatische Prozesse (Hydrolyse, Oxidation, Kettenspaltung) können Polymerketten sehr schnell in Oligomere und durch nachfolgende Hydrolyseprozesse in Monomere zerlegt werden. Enzymatische Prozesse spielen jedoch bei der Degradation der hier diskutierten Polymere im menschlichen Organismus wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle.

#### a) Hydrolytischer Abbau von aliphatischen Polyestern

Die Degradation der in dieser Arbeit behandelten Polymere bzw. Oligomere erfolgt im Wesentlichen über Hydrolyse. Als Beispiel sei der hydrolytische Abbau des Poly(L-lactid) zu L-Milchsäure (Abb. 17) angegeben.



**Abb. 17:** Hydrolytischer Abbau von PLLA zu L-Milchsäure; Quelle: [79]

Der Abbau der Polylactide erfolgt durch sogenannte *bulk erosion*, d.h. durch Prozesse im gesamten Materialvolumen. Nach Eindiffusion von Wasser und damit verbundener Quellung des Polymers findet zunächst eine homogene, langsame Esterhydrolyse statt. Durch nur

langsam nach außen diffundierende, carboxylgruppenhaltige Abbauprodukte wird die Hydrolyse autokatalysiert; der Abbau erfolgt im Materialinneren am schnellsten [79].

Während der Abbau der Polyhydroxyalkanoate, z.B. von Poly( $\beta$ -hydroxybutyrat) (PHB), durch Mikroorganismen auf enzymatischem Wege (Depolymerasen) sehr schnell erfolgt, wird das Polymer in höheren Organismen rein hydrolytisch und sehr langsam degradiert. Unter Anwesenheit von Wasser unterliegen Polyhydroxyalkanoate einer statistischen hydrolytischen Spaltung der Esterbindungen, die bis zu den Monomeren (Hydroxysäuren) führen kann. Auch hier steigt die Abbaurrate mit sinkender Molmasse und wird durch gebildete Carboxylgruppen katalysiert [80]. Im Vergleich zu Polylactiden erfolgt der Abbau im Wesentlichen als Oberflächenerosion und relativ langsam. Ursache ist die wesentlich geringere Wasseraufnahme des PHB.

Die Abbaurrate ist u.a. von folgenden Eigenschaften der Polymere abhängig:

- Kristallinitätsgrad: In der Regel nimmt die Abbaurrate mit zunehmendem Kristallinitätsgrad ab. Es ist gesichert, dass der hydrolytische Abbau bevorzugt in der amorphen Phase erfolgt, wodurch u. U. der Kristallinitätsgrad im Zuge des Abbaus ansteigen kann. Im Extremfall werden nicht weiter abbaubare Kristallite in das Gewebe eingelagert [79, 81].
- Der Einbau von Comonomeren kann Abbauprozesse beschleunigen oder verlangsamen. Ein beschleunigter Abbau erfolgt, wenn Comonomere die Hydrophilie des Polymers erhöhen (z.B. P(LLA-co-GL)) oder den Kristallinitätsgrad verringern (z.B. P(HB-co-HV)) [79, 82].
- Molekulargewicht: Die Abbaurrate verringert sich mit steigendem Molekulargewicht.

Daneben ist der Abbau in starkem Maße von der Umgebung abhängig. Hydrolytische Prozesse werden z.B. vom pH-Wert und der Temperatur beeinflusst. Für Anwendungen im menschlichen Körper gilt in erster Näherung: pH = 7,4, T = 37°C (physiologische Bedingungen).

#### b) Resorbierbarkeit

Resorption umfasst die Aufnahme, Verstoffwechslung und Ausscheidung von Stoffen durch den Organismus. So können Oligomere oder Monomere, also die Produkte des hydrolytischen Polymerabbaus, vollständig aus der Implantatumgebung entfernt und umgewandelt werden. Einige Beispiele sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Polymer	Monomer, Hydrolyseprodukt	Resorptionsweg
Poly(L-lactid) (PLLA)	L-Milchsäure	Umwandlung, Citratzyklus
Poly(D-lactid) (PDLA)	D-Milchsäure	Ausscheidung
Polyglycolid (PGL)	Glycolsäure	Umwandlung in Glycin
Poly( $\beta$ -hydroxybutyrat) (PHB)	Hydroxybutyrat	

**Tab. 8:** Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten bioabbaubaren Polymeren, deren Hydrolyseprodukte und Resorptionswege

Resorption in einem ähnlichen Sinne erfolgt, wenn lösliche Kalziumphosphat-Verbindungen in den Knochen eingebracht werden. Die gelösten Kalzium- und Phosphorionen stehen der Biomineralisation des Knochens zur Verfügung. Es ist nachgewiesen, dass nanopartikulärer Hydroxylapatit vollständig resorbiert und durch neu gebildeten Knochen ersetzt werden kann [70].

### c) Wirkstoffabgabe, Verfügbarkeit der bioaktiven Komponente

Häufig werden Polymere für biomedizinische Anwendungen mit therapeutischen Substanzen versehen. Im Falle abbaubarer bzw. resorbierbarer Trägerpolymere wird das Abgabeprofil durch die Kinetik des Polymerabbaus und ggf. der Freisetzungsort durch die Dimension der polymeren Trägerpartikel gesteuert. Die gezielte Einstellung solcher *drug delivery*-Systeme ist Gegenstand eines eigenen Forschungsgebietes in der Biomaterialentwicklung.

Problematisch ist die Beladung biologisch nicht abbaubarer, d.h. bioinertter Polymere mit wirksamen Substanzen. Beispiele sind in PMMA-Knochenzemente eingelagerte Antibiotika und in Polyethylen oder PMMA eingebrachte HAp-Partikel. Generell muss man davon ausgehen, dass nur die an der Polymeroberfläche liegenden Bestandteile zugänglich und biologisch verfügbar sind. So ist bekannt, dass mit einem Antibiotikum gefüllte PMMA-Knochenzemente tatsächlich eine hohe Freisetzung des Wirkstoffes erzielen, so lange dieser an der Polymeroberfläche verfügbar ist. Die Freisetzung sinkt danach deutlich ab, und therapeutisch wirksame Antibiotikaspiegel werden nicht mehr gewährleistet.

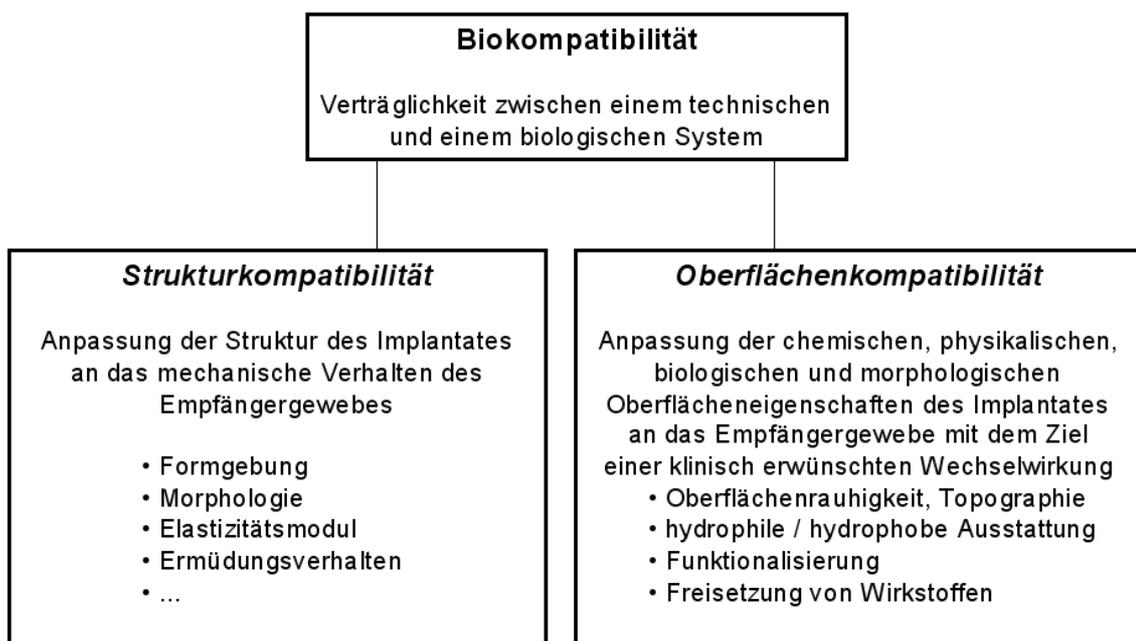
Die Verfügbarkeit wirksamer Bestandteile ist gegeben, wenn die geometrische Perkolationschwelle überschritten wird. In diesem Falle sind die meisten Partikel miteinander verbunden und über Kontaktkanäle von der Oberfläche aus zugänglich. Für sphärische Partikel liegt diese Schwelle bei einem Füllstoffgehalt (Volumenanteil) von ungefähr 32% [83, 84].

## 2.4.2 Struktur- und Oberflächenkompatibilität

Die Definition des Begriffes Biokompatibilität hängt häufig vom Blickwinkel des Betrachters und der spezifischen Anwendung eines Materials im menschlichen Körper ab. Eine ältere und relativ allgemeine, minimale Definition beschreibt Biokompatibilität als „... die Eigenschaft, keine toxischen oder schädlichen Einflüsse auf biologische Systeme auszuüben.“ (Dorland Medical, in [59]). Eine weitergehende Begriffsbestimmung nach WILLIAMS [59] definiert die Biokompatibilität eines Werkstoffes als

**„die Fähigkeit eines Materials, sich entsprechend den Anforderungen einer spezifischen Anwendung zu verhalten und eine angemessene Antwort des Empfänger(gewebe)s hervorzurufen“.**

Eine Unterteilung des Begriffes in eine strukturbezogene und eine auf die Oberflächeneigenschaften bezogene Komponente wird von WINTERMANTEL vorgenommen [2]. Gerade bei Werkstoffen und Implantaten für die Orthopädie ist die Einbeziehung des mechanischen Eigenschaftsbildes in die Diskussion der Biokompatibilität unerlässlich. In Abbildung 18 ist ein modifiziertes Schema zur Unterteilung des Begriffes Biokompatibilität in seine wesentlichen Komponenten gegeben.



**Abb. 18:** Schema zur Unterteilung des Begriffes der Biokompatibilität nach WINTERMANTEL [2], modifiziert

Die **strukturelle Kompatibilität** eines Werkstoffes zum Knochenersatz umfasst insbesondere die Anpassung des Elastizitätsmoduls und der Festigkeit an die Gegebenheiten des zu ersetzenden oder zu fixierenden Knochens. Einerseits soll eine ausreichende Stabilität des Implantates und eine die Knochenheilung fördernde Entlastung des geschädigten Knochens gegeben sein, andererseits muss eine dauerhafte Entlastung weiter Knochenbereiche durch zu steife Implantate vermieden werden. Eine dauerhafte Lastabschirmung (*stress shielding*) führt zu einem verstärkten Abbau des Knochens (Atrophie). Ein ähnlicher Effekt wird z.B. durch eine den biomechanischen Verhältnissen nicht optimal angepasste Endoprothese hervorgerufen. Auch die Morphologie eines Werkstoffes, d.h. die Mikro- und Nanostruktur, sollte dem Einsatzzweck entsprechen. So ist die Nachahmung natürlicher Strukturen z.B. des Knochens (Struktur-Mimikry) ein wichtiges Ziel der Biomaterialforschung [2].

Zur Differenzierung erwünschter oder unerwünschter Wechselwirkungen von Implantatoberfläche und Empfängergewebe (**Oberflächenkompatibilität**) kann man die in Tabelle 9 definierten Kategorien heranziehen. Abbaubare bzw. partiell abbaubare Materialien stellen einen Sonderfall dar, da hier sowohl strukturelle Aspekte (Morphologie, Degradation mechanischer Eigenschaften im Zuge des Abbaus) als auch Oberflächeneigenschaften eine Rolle spielen.

<b>Materialeigenschaft</b>	<b>Gewebereaktion</b>
<b>toxisch</b>	Gewebenekrose (Absterben von Gewebe)
<b>inert</b>	Gewebe bildet nicht anhaftende Bindegewebskapsel um das Implantat
<b>bioaktiv</b>	Gewebe bildet eine Bindung mit dem Implantat aus
<b>degradabel</b>	Neu gebildetes Gewebe ersetzt nach einem definierten Zeitraum das Implantat

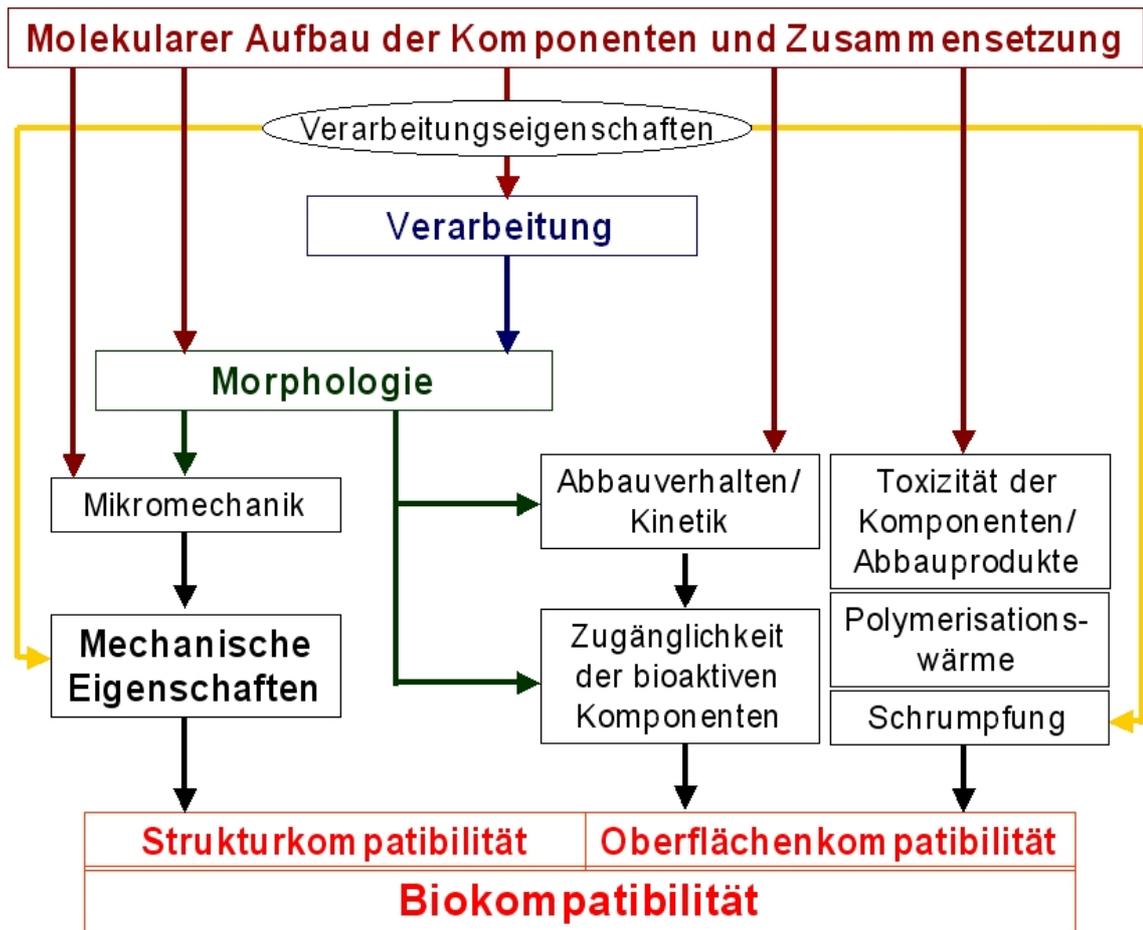
**Tab. 9:** Schema der durch Implantate hervorgerufenen Gewebereaktionen nach [2]

Im Falle einer gewünschten Fixierung eines Implantates im Knochen bzw. bei Implantaten zum zeitweiligen oder dauerhaften Knochenersatz sind zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. Hier wird ein inniger Verbund von Knochen und Biomaterial angestrebt, dessen Qualität z.B. in der Ausprägung der Haftung zwischen den Materialpartnern oder dem An- bzw. Einwachsen neu gebildeten Knochens beurteilt werden kann. Die wichtigsten Fälle der Wechselwirkungen an Knochen-Implantat-Grenzflächen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

<b>Inkompatibel</b>	Freisetzung von Substanzen in toxischen Konzentrationen oder von Antigenen Reaktionen: Allergie, Fremdkörperreaktion, Entzündung, Nekrose, Abstoßung
<b>Biokompatibel</b>	Freisetzung von Substanzen in nichttoxischen Konzentrationen Reaktionen: Einkapselung in Bindegewebe, schwache Fremdkörperreaktion
<b>Bioinert</b>	keine Freisetzung toxischer Substanzen
<b>Bioaktiv</b>	Positive Wechselwirkung mit Gewebedifferenzierung Reaktion: Bindung oder Adhäsion von Knochen entlang der Grenzfläche zwischen Implantat und Empfängergewebe
<b>Induktiv</b>	Induktion von Knochenbildung
<b>Konduktiv</b>	Werkstoff dient in osteogener Umgebung als Gerüst für Knochenablagerung ( <i>tissue engineering</i> )

**Tab. 10:** Für Knochenimplantate definierte Grade der Biokompatibilität nach SCHENK (in [2])

Schließlich wird in Abbildung 19 versucht, den Zusammenhang zwischen molekularer Struktur, Zusammensetzung und Verarbeitung und den Struktur-Eigenschafts-Beziehungen herzustellen und mit dem Begriff der Biokompatibilität zu verknüpfen. Dabei wird deutlich, dass der chemische Aufbau der Makromoleküle und die Zusammensetzung der Systeme zunächst auf direkte Weise Werkstoffmorphologie, mechanische Eigenschaften, Verarbeitungseigenschaften und die biologische Verträglichkeit bzw. Aktivität bestimmen. Darüber hinaus kommt der Morphologie eine zentrale Rolle zu: Sie bestimmt in starkem Maße die bei mechanischer Belastung auftretenden mikromechanischen Prozesse und damit die mechanischen Eigenschaften des Implantates. Diese werden durch den Begriff der Strukturkompatibilität zusammengefasst. Andererseits hängt die Verträglichkeit oder gar Bioaktivität einer Implantatoberfläche sicher auch von deren Oberflächengestalt ab. Letztlich werden Abbaukinetik und Verfügbarkeit einer dem Implantat zugeschlagenen, therapeutisch wirksamen Komponente über die Morphologie gesteuert. Der Terminus „eigenschaftsbestimmende Strukturen“ bekommt vor dem Hintergrund der strukturellen und funktionellen Nachahmung des Knochens einen hohen Stellenwert. Ziel ist es, durch mikro- und nanostrukturelles Konstruieren neue Materialien mit hervorragender Biokompatibilität herzustellen.



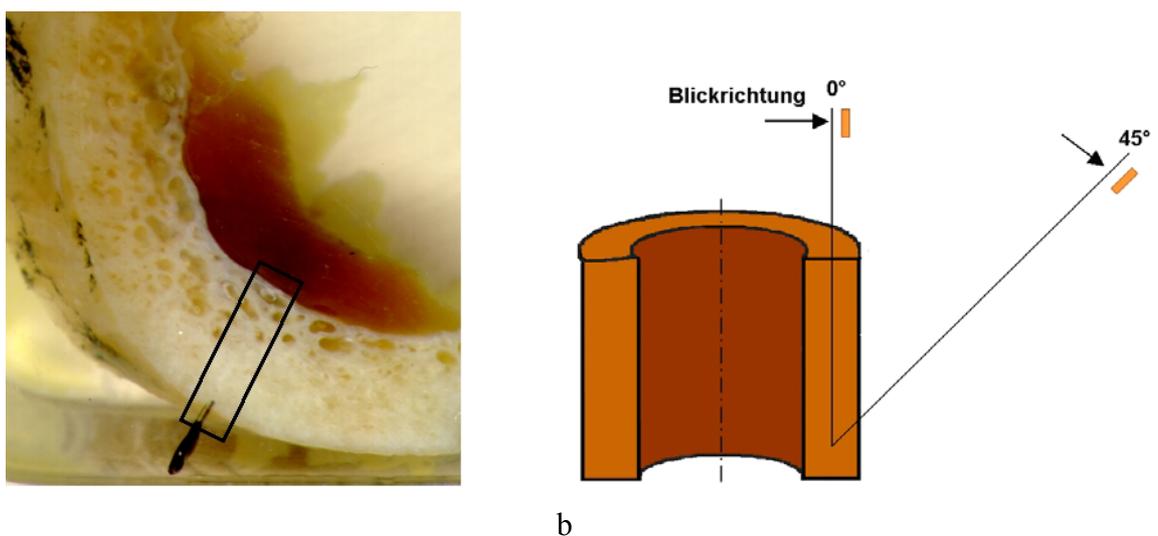
**Abb. 19:** Schema zur Ableitung der Biokompatibilität von Knochenzementen bzw. von Materialien zum Knochenersatz; der Block „Verarbeitungseigenschaften“ bezieht sich hier nur auf *in vivo* aushärtbare Systeme (siehe auch Abschnitt 2.2.3)

### 3 Experimente

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Knochenproben

Alle in dieser Arbeit untersuchten Knochenproben entstammen der Kompakta des proximalen Femurendes. Diese wurden als archiviertes Operationsgut durch das Labor für Experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin, MLU Halle-Wittenberg, zur Verfügung gestellt und präpariert. Die Knochenpräparate wurden in einer üblichen histologischen Prozedur in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, entfettet und anschließend in ein niedrigviskoses Methylmethacrylat mit Weichmacherzusatz eingebettet und nach mehrfachem Wechsel des Einbettmediums mit zunehmendem Katalysatoranteil polymerisiert. Nach dem Aushärten des Einbettmediums wurden mittels einer Präzisions-Diamanttrenneinrichtung (Exakt Apparatebau, Norderstedt) dünne Schnitte vom Präparatblock abgenommen. Während des Sägevorganges wurde mit Wasser gekühlt. Diese Technik dient sowohl der groben Aufbereitung der Proben zur Herstellung von Schliffpräparaten als auch der Herstellung planparalleler Scheibchen zur weiteren Präparation im Ultramikrotom. Die Proben lagen danach in Form dünner Scheiben vor, welche einen Querschnitt des Knochens repräsentieren (Abb. 20a).



**Abb. 20:** a) Auflichtmikroskopische Abbildung eines Segmentes eines Knochenquerschnittes mit eingezeichneter Untersuchungsregion (Kompakta) der Probe 13/98 (45°); b) Beispiel zur Nomenklatur der realisierten Schnittwinkel

Dabei wurden verschiedene Schnittwinkel realisiert, um die Richtungsabhängigkeit der Struktur und der mikromechanischen Mechanismen erfassen zu können (Abb. 20b). Ein Winkel von 0° entspricht der Untersuchungsrichtung senkrecht zur Knochenlängsachse, ein Winkel von 90° dem Blick in Längsrichtung. Probenbezeichnungen, Besonderheiten, Schnittwinkel und durchgeführte Experimente sind in Tabelle 11 aufgelistet.

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Alter</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Besonderheiten</b>	<b>Winkel</b>	<b>Experimente</b>
<b>13/98</b>	70	w	Osteoporose	30°/45°/60°	Morphologie
<b>358/97</b>	79	m	Osteoporose	0°/45°	Morphologie
<b>28/98</b>	53	w	erwachsener Knochen	0°/45°	Morphologie
<b>340/97</b>	31	m	erwachsener Knochen	15°/45°	Morphologie
<b>361/97</b>	68	w	alter Knochen	0°/45°	Morphologie
<b>355/97</b>	64	m	alter Knochen	0°/45°	Morphologie
<b>45/98</b>	39	m	erwachsener Knochen	0°	Mikromechanik
<b>334/97</b>	43	m	erwachsener Knochen	0°	Mikromechanik

**Tab. 11:** Übersicht zu den in dieser Arbeit untersuchten Proben

Die gesägten Scheiben werden auf Objektträger geklebt, planparallel geschliffen und abschließend mit Diamantpaste bis zur erforderlichen Oberflächengüte (Korngröße 0,25µm) poliert. Die Oberflächen der polierten Proben eignen sich ohne weitere Präparation für die Untersuchungen im atmosphärischen Rasterelektronenmikroskop (ESEM) und zur Messung der Ultramikrohärte.

### 3.1.2 Konventionelle Knochenzemente

Die Knochenzemente Nr. 1 und Nr. 2 (Tab. 12) lagen als handelsübliche Abpackungen einer Pulver- und einer Flüssigkomponente vor und wurden nach Anleitung der Hersteller (Beipackzettel) per Hand gemischt. Der fertig angemischte Teig wurde unter Beachtung der jeweils vorgeschriebenen Verarbeitungsfenster in vorbereitete Formen (siehe Kap. 3.2.1) eingefüllt und dort mindestens 24h belassen.

Knochenzement Nr. 3 (Tab. 12) wurde als industrielles Versuchsmuster in Form standardisierter Prüfkörper (Kerbschlagbiegeversuch) zur Verfügung gestellt. Dieser PMMA-Zement wurde durch den Hersteller selbst unter Vakuum angemischt und verarbeitet.

Nr.	Hersteller	Handelsname	Spezifikation
<b>1</b>	BIOMET MERCK	Palacos <sup>®</sup> R	hochviskos, handgemischt, röntgenpositiv
<b>1a</b>		Refobacin <sup>®</sup> Palacos <sup>®</sup> R	wie oben, enthält Antibiotikum (Gentamicin)
<b>2</b>	HOWMEDICA Int.	Antibiotic Simplex <sup>®</sup>	mittelviskos, handgemischt, röntgenpositiv, enthält Antibiotikum (Erythromycin)
<b>3</b>	industrielles Versuchsmuster		Vakuummischung, röntgenpositiv

**Tab. 12:** Übersicht zu den untersuchten konventionellen Knochenzementen verschiedener Hersteller

### 3.1.3 Modellsysteme

Die hier behandelten Systeme wurden von SEIDEL [85] und GOPP [86] am Institut für Technische und Makromolekulare Chemie der MLU Halle-Wittenberg im Rahmen eines von Prof. Dr. B. Sandner geleiteten Projektes synthetisiert und charakterisiert und in Promotionsarbeiten und Publikationen ausführlich beschrieben [87-93]. Eine umfangreiche mechanische Prüfung erfolgte am Fachbereich Ingenieurwissenschaften, Institut für Werkstoffwissenschaft, Professur Bruchmechanik/Werkstoffdiagnostik (Prof. Dr. W. Grellmann). Zusätzlich zur chemischen und mechanischen Charakterisierung der Syntheseprodukte waren umfangreiche Untersuchungen zur Verträglichkeit der Ausgangsstoffe, der ausgehärteten Produkte und der Abbauprodukte notwendig, welche an Zellkulturen bzw. Tiermodellen in der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität (Dr. A. Bernstein, Prof. Dr. W. Hein) durchgeführt wurden.

Ziel des Projektes war es, einen neuartigen, biokompatiblen und partiell resorbierbaren Kompositwerkstoff zu entwickeln. Dieser sollte wie ein konventioneller Knochenzement appliziert werden können: Eine Paste mit einstellbarer Viskosität wird in eine Kavität des knöchernen Lagers eingefüllt und härtet dort innerhalb eines definierten Zeitraumes aus. Entsprechend der Definition eines Knochenzementes soll dieses System sowohl zur Verfüllung von Defekten als auch zur Fixierung eines Implantates im Knochen eingesetzt werden. Die sofortige Fixierung und Grundstabilität des Systems wird durch den Einsatz einer vernetzungsfähigen, nicht abbaubaren Rückgratkette sichergestellt. Abbaubare Oligolacton-Seitenketten gewährleisten eine partielle Resorbierbarkeit. Im Idealfall soll der partielle Abbau des Systems *in vivo* und der damit einhergehende Stabilitätsverlust mit der Neubildung

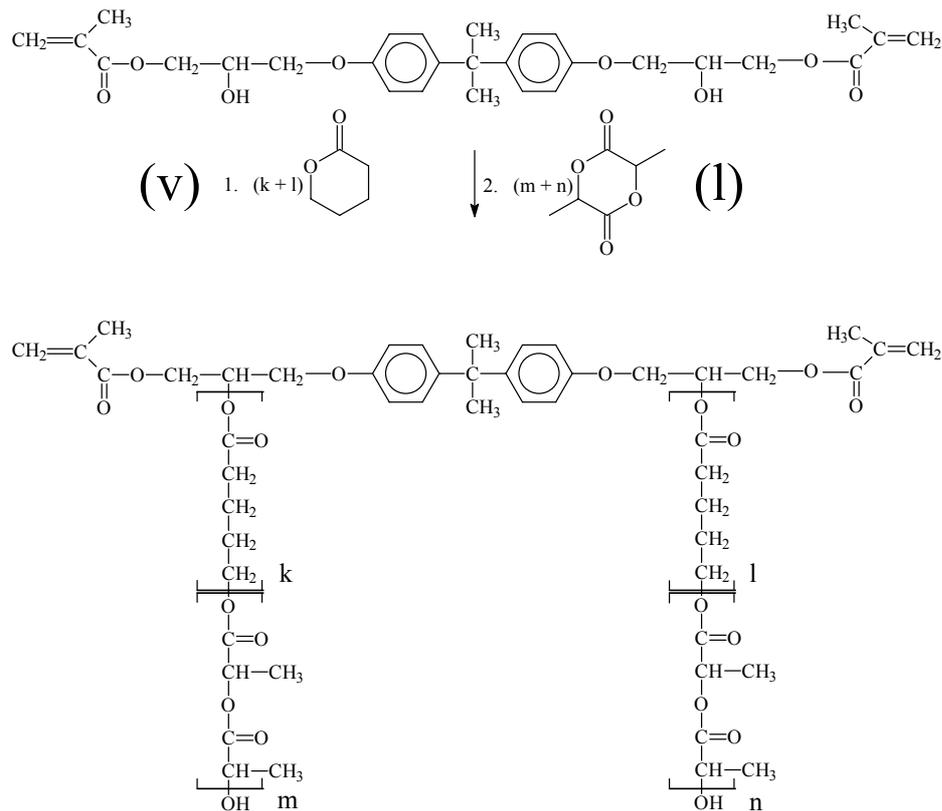
von körpereigenem, gesundem Knochen synchron verlaufen. Die Neubildung des Knochens wird durch einen bioaktiven Füllstoff, hauptsächlich den für seine osteoinduktive Wirkung bekannten Hydroxylapatit (HAp) stimuliert. Durch den Füllstoff können gleichzeitig die Pastenviskosität reguliert und die mechanische Festigkeit des ausgehärteten Kompositwerkstoffes gesteuert werden. Die Systeme erfüllen nach ihrer vollständigen Aushärtung die an Knochenzemente gestellten Mindestanforderungen. Es wurde nachgewiesen, dass zugeschlagene Antibiotika durch Degradation der Matrix schrittweise verfügbar werden. Damit können über einen längeren Zeitraum therapeutisch wirksame Dosen abgegeben werden, d.h., es wird über einen z.B. gegenüber konventionellen Knochenzementen deutlich verlängerten Zeitraum ein erwünschter Wirkstoffspiegel gehalten [85]. Durch Untersuchungen zur Zelltoxizität und im Tierversuch wurde nachgewiesen, dass der beschriebene Kompositwerkstoff eine gute Bioverträglichkeit aufweist. Polymerisationswärme und -schrumpfung wurden gegenüber herkömmlichen PMMA-Zementen deutlich reduziert. Durch die Vermeidung toxischer Monomere, die Auswahl geeigneter Katalysatoren sowie die Verringerung der zur Polymerisation erforderlichen Menge des Aktivator-Initiator-Systems werden wesentliche Verbesserungen erreicht. Ein intensiver Kontakt zwischen Knochen und Knochenzement wird beobachtet. Vermittelt durch den bioaktiven Füllstoff erfolgt teilweise ein Einwachsen neu gebildeten Knochens [85].

Ein Nachteil des Systems besteht darin, dass der Kompositwerkstoff nach Einlagerung in Wasser, d.h. unter physiologischen Bedingungen, sehr schnell seine im trockenen Zustand ausreichende Festigkeit einbüsst. Bereits nach wenigen Stunden fällt z.B. die Druckfestigkeit unter die geforderten Werte. Im Zuge des hydrolytischen Abbaus gehen die ursprünglich guten mechanischen Eigenschaften im Verlaufe von Tagen und Wochen weiter deutlich zurück. Zurückgeführt wird dies auf die Wasseraufnahme und damit verbundene Quellung des Matrixpolymers und auf den einsetzenden hydrolytischen Abbau [86].

#### a) Makromonomer-Synthese

Durch die Makromonomersynthese wird eine Kombination aus einer stabilen, vernetzbaren Methacrylatbasis und einem resorbierbaren Ester erreicht. Als Methacrylatkomponente für die Makromonomersynthese wird Isopropyliden-bis[1,4-phenylenoxy(2-hydroxytrimethylen)] dimethacrylat (BisGMA) eingesetzt. Die Hydroxylgruppen dienen als Startgruppen für die ringöffnende Oligomerisation verschiedener Lactone. Als Lactone für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme wurden verwendet:  $\delta$ -Valerolacton (VL), L-Lactid (LLA), D-Lactid (DLA) und Glycolid (GLY). Die Makromonomersynthese erfolgt unter Einsatz eines

Katalysators als Stufen- oder Parallelreaktion. In der Stufenreaktion werden die die Seitenkette bildenden Monomere VL, LLA, DLA oder GLY nacheinander zugegeben, wodurch die Abfolge der in den oligomeren Seitenketten eingebauten Comonomere gesteuert werden kann. In dem in Abbildung 21 gezeigten Beispiel werden durch Ringöffnung an den Hydroxylgruppen des BisGMA zunächst kurze Oligo-Valerolacton-Ketten der Länge k und l angefügt. In einer zweiten Stufe der Reaktion wird Oligo-Lactid (m, n) gebildet [79, 85, 86].



**Abb. 21:** Beispiel für die Makromonomersynthese im Stufenverfahren; (v) ... Valerolacton, (l) ... Lactid; Quelle: [86]

## b) Weitere Ausgangskomponenten

### ▪ Comonomere

Als Verdünnermonomere (Comonomere) wurden für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) verwendet. In allen hier diskutierten Systemen beträgt das Verhältnis von Makromonomer zu Verdünnermonomer 7:3 (Masse).

### ▪ Katalysatoren

Als Katalysatoren wurden MgO bzw. Sn(oct)<sub>2</sub> verwendet.

- Aktivator-Initiator-System

Als Initiator wurde Dibenzoylperoxid (DBPO), als Aktivator N,N-Dimethyl-p-toluidin (DMpT) verwendet. Der Anteil DBPO der Initiator-Comonomermischung betrug 0,17 bis 0,4 % (Masse).

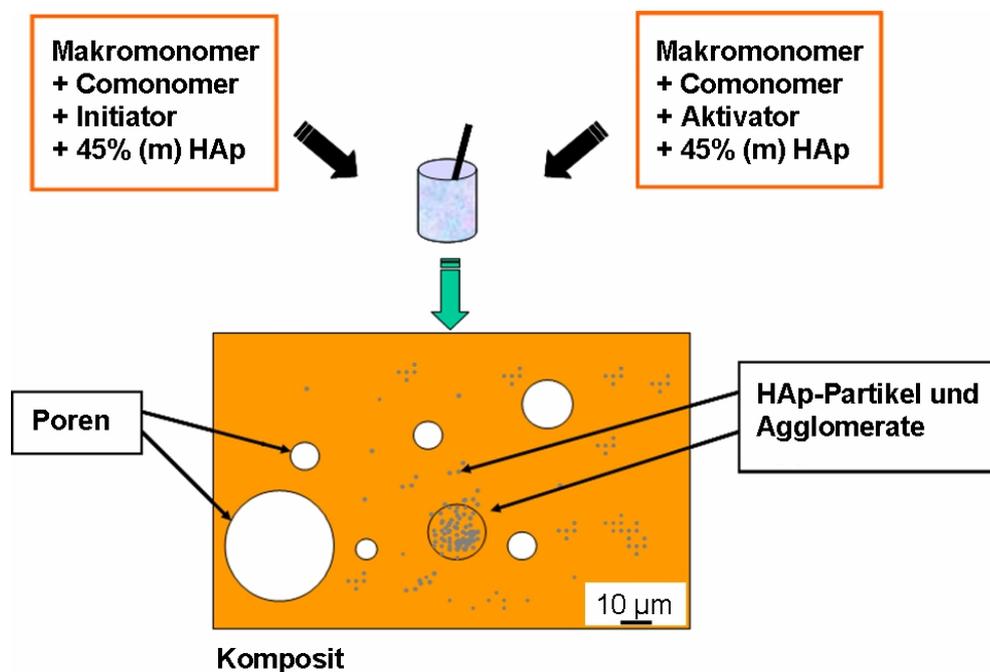
- Füllstoffe

Der hier eingesetzte synthetische Hydroxylapatit (HAp) OSPROVIT® (Cerasiv Plochingen),  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , ist chemisch dem im Knochen vorkommenden HAp weitgehend ähnlich. Der Füllstoffanteil liegt bei allen untersuchten Proben bei 45% (Masseanteil).

c) Vernetzende Copolymerisation unter Anwesenheit von Hydroxylapatit

Die reaktionsfähigen Knochenzementpasten werden als Zweikomponentensystem vorgelegt.

**Paste A** beinhaltet neben Makromonomer, gewählttem Verdünnermonomer und Füllstoff (Hydroxylapatit und ggf. Antibiotikum) den Aktivator, **Paste I** bei ansonsten identischer Zusammensetzung den Initiator. Die vernetzende Copolymerisation startet, wenn beide Pasten gemischt werden. Die Copolymerisation der Makromonomere mit niedrigviskosen Verdünnermonomeren in Gegenwart von HAp führt zu Kompositmaterialien. Der Vorgang des Anmischens ist in Abbildung 22 skizziert. Wie die Abbildung zeigt, können bei diesem Mischvorgang strukturelle Defekte im Material verursacht werden.



**Abb. 22:** Beispiel zur Herstellung der Knochenzemente durch Mischung zweier Komponenten und verarbeitungsbedingte strukturelle Defekte

#### d) Nomenklatur

Die verschiedenen Probensysteme werden nach folgendem Schlüssel codiert, welcher Angaben zur Zusammensetzung der Makromonomere, zu den verwendeten Comonomeren und den eingesetzten Katalysatoren zusammenfasst. So bedeutet z.B. der Code **B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA**, dass das Verhältnis der Monomere BisGMA:Valerolacton:L-Lactid 1:2:10 beträgt. Der verwendete Katalysator ist Zinnoctanoat (Sn(oct)<sub>2</sub>), die Makromonomersynthese erfolgte als Parallelreaktion. Zur Orientierung sind im Ergebnisteil Piktogramme eingefügt, die den Aufbau der Makromonomere skizzieren (Abb. 23).



**Abb. 23:** Beispiel für ein Piktogramm: Schematisch Darstellung des Makromonomers B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>

Die Zusammensetzungen aller untersuchten Systeme sind in Tabelle 13 gegeben.

Code	Makromer (mol/mol)	Comonomer	Katalysator	Reaktion
B <sup>1</sup> LLA <sup>10</sup> -co-HEMA*	BisGMA:LLA 1:10	HEMA	k.A.	-
B <sup>1</sup> LLA <sup>10</sup> -co-TEGDMA*	BisGMA:LLA 1:10	TEGDMA	k.A.	-
B <sup>1</sup> GLY <sup>3</sup> LLA <sup>7</sup> -co-TEGDMA*	BisGMA:GLY:LLA 1:3:7	TEGDMA	k.A.	k.A.
B <sup>1</sup> LLA <sup>8</sup> (Sn)-co-TEGDMA	BisGMA:LLA 1:8	TEGDMA	Sn(oct) <sub>2</sub>	-
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> DLA <sup>6</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:DLA 1:2:6	TEGDMA	MgO	Stufe
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> DLA <sup>6</sup> (Sn,pll)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:DLA 1:2:6	TEGDMA	Sn(oct) <sub>2</sub>	parallel
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>10</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:2:10	TEGDMA	MgO	Stufe
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>10</sup> (Sn,pll)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:2:10	TEGDMA	Sn(oct) <sub>2</sub>	parallel
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>6</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:2:6	TEGDMA	MgO	Stufe
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>6</sup> (Sn,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:2:6	TEGDMA	Sn(oct) <sub>2</sub>	Stufe

B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>8</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:2:8	TEGDMA	MgO	Stufe
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>8</sup> (Sn,pll)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:2:8	TEGDMA	Sn(oct) <sub>2</sub>	parallel
B <sup>1</sup> VL <sup>4</sup> LLA <sup>6</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:VL:LLA 1:4:6	TEGDMA	MgO	Stufe
B <sup>1</sup> GLY <sup>2</sup> LLA <sup>6</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA	BisGMA:GLY:LLA 1:2:6	TEGDMA	MgO	Stufe
B <sup>1</sup> GLY <sup>2</sup> LLA <sup>6</sup> (Sn,pll)-co-TEGDMA	BisGMA:GLY:LLA 1:2:6	TEGDMA	Sn(oct) <sub>2</sub>	parallel

**Tab. 13:** Übersicht zu den untersuchten Kombinationen; Alle Systeme sind bei GOPP [86], alle durch Stern\* gekennzeichneten Systeme durch SEIDEL [85] synthetisiert.

## 3.2 Mechanische Prüfverfahren

### 3.2.1 Zugversuche

#### a) Herstellung miniaturisierter Prüfkörper für Zugversuche

Die Knochenzementpasten wurden nach Herstellerangabe bzw. nach den vorgeschlagenen Prozeduren angemischt und in vorbereitete Formen aus Dentalwachs eingefüllt, mit Aluminiumfolie abgedeckt und 48 h bei 37°C ausgehärtet. Zur Prüfung wurden Zugstäbe ausgewählt, die keine sichtbaren Defekte (s. Abb. 24) aufwiesen.



**Abb. 24:** Beispiel für einen Miniaturzugstab (hier: Knochenzement PALACOS<sup>®</sup>) mit typischen Lufteinschlüssen (Poren); Quelle: [94]

#### b) Einlagerung

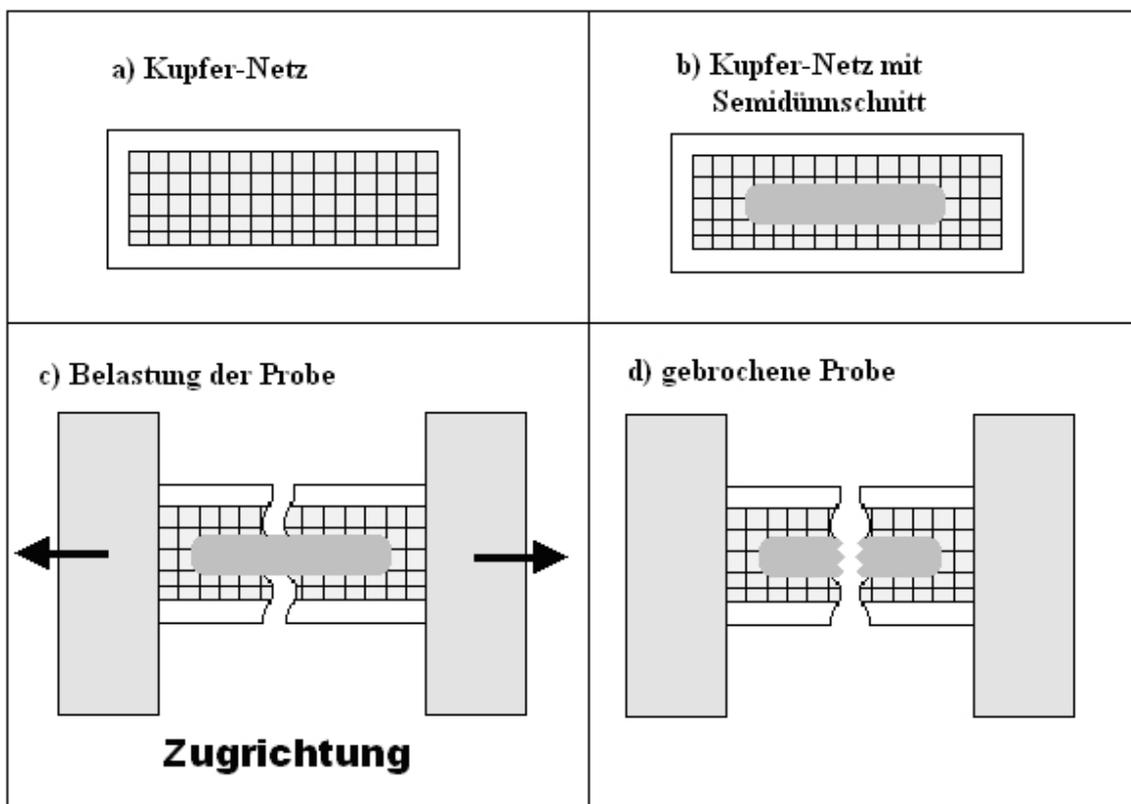
Zur Simulation der Verhältnisse im Körper wurde ein Teil der Prüfkörper für 1 bis 14 Tage bei 37°C in destilliertem Wasser bzw. in Pufferlösung (Ringerlösung, pH 7,4) eingelagert.

#### c) Durchführung der Zugversuche

Zugversuche wurden mit einer Miniaturprüfmaschine (MINIMAT) bzw. mit einer Universalprüfmaschine (ZWICK) durchgeführt. Die Prüfgeschwindigkeit betrug 0,5mm/min.

### 3.2.2 Mikrodeformation von Knochenproben

Zur Aufklärung der unter Zugbelastung im Knochen auftretenden mikromechanischen Mechanismen wurden Semidünnschnitte des kortikalen Knochens unter lichtmikroskopischer Beobachtung in oben beschriebener Zugvorrichtung (MINIMAT) deformiert. Die Anfertigung der Semidünnschnitte ist in Abschnitt 3.4.4 beschrieben. Die Situation des Zugversuches ist schematisch in Abbildung 25 dargestellt. Die Dehngeschwindigkeit betrug 1mm/min. Die Belastung der Probe erfolgt, bis eine lichtmikroskopisch sichtbare, zuvor nicht vorhandene Schädigung in einem festgelegten Bereich des Semidünnschnittes registriert wird. Die deformierte Masche kann unter Beibehaltung des Dehnzustandes mittels Skalpell aus dem Netzchen herausgetrennt und so zugeschnitten werden, dass sie samt anhaftendem, deformierten Semidünnschnitt in einen Standard-Probehälter eines TEM überführt werden kann.



**Abb. 25:** Durchführung der Versuche zur Deformation von Semidünnschnitten des kortikalen Knochens: a) collodiumbefilmtes Netzchen, b) Netzchen mit Semidünnschnitt, c) Verstreckung; d) gebrochene Probe, Fixierung des Dehnzustandes durch tragendes, plastisch deformiertes Netzchen [51]

### 3.2.3 Mikrohärte

Die hier eingesetzten Verfahren der Mikrohärtemessung ermöglichen es, mechanische Eigenschaften des Knochens an ausgewählten Probenstellen zu bestimmen bzw. an neuartigen Materialien zum Knochenersatz, von denen nur kleine Mengen vorlagen, erste Abschätzungen zum Einfluss der Zusammensetzung auf die mechanischen Eigenschaften treffen zu können. Mit einer (hier: pyramidenförmigen) Diamantspitze wird durch eine vorgegebene und über einen definierten Zeitraum aufgebrachte Kraft ein Eindruck in das zu untersuchende Material erzeugt, dessen Geometrie direkte Schlüsse auf die Materialeigenschaften erlaubt [95]. So ist die Mikrohärte  $H$  bei vielen Materialien direkt mit der mechanischen Spannung am Fließpunkt des Spannungs-Dehnungs-Diagrammes verknüpft ist (TABOR-Beziehung [95]):

$$H = 3 \sigma_y \quad (1)$$

Andere Geräte erlauben die Aufzeichnung der bei der Be- und Entlastung auftretenden Zusammenhänge von aufgebrachter Kraft und Eindringtiefe der Sonde (registrierende Ultramikrohärtemessung, UMH) [96]. Im letztgenannten Fall wird neben der Mikrohärte z.B. auch der Elastizitätsmodul des Materials am Ort der Messung bestimmbar. Alle Untersuchungen wurden am Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Instituto de Estructura de la Materia (Prof. Dr. F.J. Baltá Calleja), Madrid, durchgeführt.

#### a) Bestimmung der Mikrohärte

Die Bestimmung der Mikrohärte erfolgte bei Raumtemperatur ( $21^\circ\text{C} \pm 1\text{K}$ ) unter Verwendung eines mit einem pyramidenförmigen VICKERS-Indenter ( $168^\circ$ ) ausgerüsteten LEICA VMHT MOT Mikrohärtemessgerätes. Die aufgebrachten Kräfte wurden im Bereich zwischen 9,81 mN und 0,981 N variiert und für 6 s gehalten. Der verbleibende Eindruck wurde sofort nach Entlastung mit Hilfe eines eingekoppelten Messokulars optisch vermessen. Die Mikrohärte  $H$  wurde aus den Diagonalen des verbleibenden Eindrucks nach folgender Gleichung bestimmt [95]:

$$H = kP/d^2 \quad (2)$$

Dabei ist  $d$  die Länge der Diagonale des Eindrucks in  $\mu\text{m}$ ,  $P$  die aufgebrachte Kraft in N und  $k$  ein Geometriefaktor der VICKERS-Pyramide mit dem Wert  $k=1,854 \times 10^6$ .

## b) Registrierende Mikrohärtemessung

Zur Bestimmung von Mikrohärte und Elastizitätsmoduln definierter Bereiche des kortikalen Knochens wurde ein registrierendes Ultramikrohärtemessgerät SHIMADSU DUH 202 verwendet. Das Gerät war mit einem VICKERS-Indenter ausgestattet. Bei Belastung wird die Last  $P$  mit konstanter Geschwindigkeit bis zum Maximalwert  $P_{\max}$  erhöht, für eine definierte Zeitpanne gehalten und anschließend mit konstanter Rate reduziert. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen betragen die aufgebrauchten Kräfte 9,81 mN, 98,1 mN bzw. 0,981 N. Diese wurden jeweils für eine Zeitspanne von 6 s gehalten. Die Raumtemperatur wurde in einem engen Bereich von  $21^{\circ}\text{C} \pm 1\text{K}$  konstant gehalten. Der Elastizitätsmodul wurde aus der Analyse der Entlastungskurven gewonnen. Eine genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung und der Auswerteroutinen ist in der Literatur gegeben [97]. Die Anhand der Auswerteroutine errechneten Werte für den Elastizitätsmodul  $E^*$  wurden durch Anwendung der Gleichung (3) korrigiert ( $E_{\text{corr}}$ , „reduzierter E-Modul“, [97]),

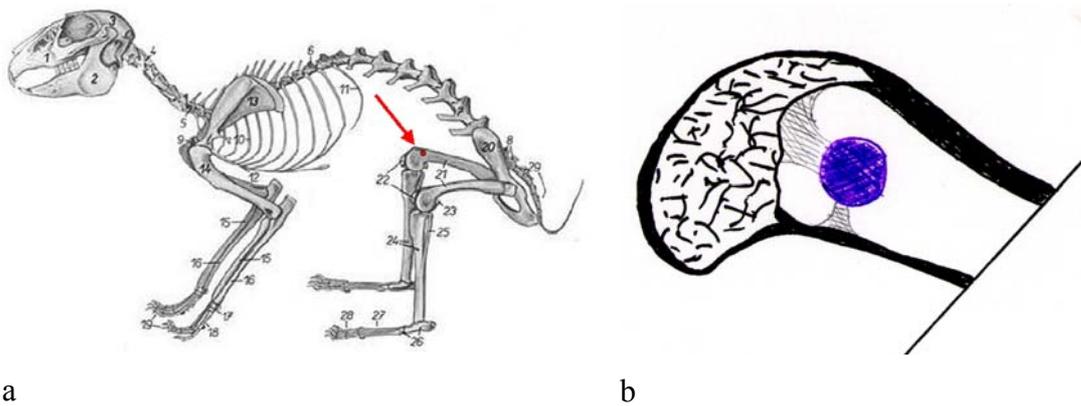
$$E_{\text{corr}} = \frac{1-\nu^2}{E^*} + \frac{1-\nu_0^2}{E_0} \quad (3)$$

wobei gilt:  $E_0 = 1141\text{GPa}$  (Elastizitätsmodul Diamant),  $\nu_0 = 0.07$  (Poisson-Zahl Diamant) und  $\nu=0,39$  (Poisson-Zahl Knochen [8]).

## **3.3 Tiermodell**

### 3.3.1 Implantation im Knochen

*Ex vivo* ausgehärtete, zylindrische Testkörper mit 10mm Durchmessern und einer Höhe von 4,5mm wurden in entsprechend vorbereitete Bohrlöcher in Hinterläufe des Kaninchens implantiert. Die Untersuchungen wurden durch das Labor für Experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin, MLU Halle-Wittenberg (Dr. A. Bernstein) durchgeführt und sind detailliert bei SEIDEL beschrieben [85]. Die Implantationszeit der in dieser Arbeit untersuchten Prüfkörper betrug 24 Wochen. Die Position der Prüfkörper im Tier und die Lage der Prüfkörper im Knochen sind in Abbildung 26 gezeigt.



**Abb. 26:** Position der implantierten Prüfkörper im Tier (a, [98]) und schematische Darstellung der Lage eines Prüfkörpers (blau) in einem Dünnschliffpräparat aus dem distalen Ende des Femur (b)

### 3.3.2 Präparation

Die Präparation erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben. Die Anschliffpräparate konnten ohne weitere Vorbereitung im ESEM untersucht werden. Ein Teil der Schliffpräparate wurde zur Untersuchung im konventionellen REM und zur Durchführung der Röntgenmikroanalyse mit 10 nm Kohlenstoff bedampft.

## 3.4 Mikroskopische Untersuchungen

### 3.4.1 Lichtmikroskopie

Die Präparation der Knochenzementpasten erfolgte durch Aufstreichen der Paste auf Glasobjektträger und anschließendes Abdecken mit Deckgläschen. Die Untersuchung der Präparate erfolgte in einem Polarisationsmikroskop LEICA MZ 16. Die Bildaufnahme erfolgte über eine Digitalkamera LEICA DC 300. Bildspeicherung und -bearbeitung wurden über das System LEICA IM 1000 realisiert.

### 3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie und Röntgenmikroanalyse

Alle Untersuchungen erfolgten an einem mit einer Wolframkathode ausgerüsteten REM JEOL JSM 6300. Die Beschleunigungsspannung wurde in Abhängigkeit vom gewählten

Abbildungsmodus und der Probenempfindlichkeit zwischen 5 und 25 kV gewählt. Als bilderzeugende Signale wurden genutzt:

- Sekundärelektronen (*secondary electrons*, SE): Zur Abbildung von Strukturen mit ausgeprägter Topographie (Bruchflächen, strukturierte bzw. geätzte Oberflächen usw.) mit hoher Auflösung (in dieser Konfiguration ungefähr 50 nm), insbesondere nach Goldbeschichtung und zur probenschonenden Untersuchung mit geringen Strahlströmen.
- Rückstreuielektronen (*backscattered electrons*, BSE): Unter Nutzung des Materialkontrast-Modus (Detektion von Unterschieden in der mittleren Kernladungszahl im Wechselwirkungsgebiet) Informationen zu materialspezifischen Heterogenitäten, insbesondere nach Kohlenstoffbedampfung. Es sind relativ hohe Strahlströme erforderlich, die erreichbare Auflösung ist relativ gering (ungefähr 0,5 µm).

Die Bildaufnahme und -speicherung erfolgte über ein mit dem REM gekoppeltes digitales Bildarchivierungssystem (BOERDER). Die Elementanalyse und die Erstellung von Elementverteilungskarten (*mapping*) erfolgte unter Nutzung einer Einrichtung zur energiedispersiven Röntgenmikroanalyse (*energy dispersive X-ray microanalysis*, EDX) vom Typ NORAN VOYAGER.

#### a) Präparation

Zur Vermeidung von Aufladungen wurden alle im konventionellen REM untersuchten Proben mit einer leitfähigen Schicht versehen. Bei Nutzung des SE-Signals (Topographieabbildung) wurde eine ungefähr 12 nm dicke Goldschicht über einen Sputterprozess aufgetragen (EDWARDS sputter coater). Für Abbildungen unter Nutzung des Rückstreuielektronen-Materialkontrastes und für Untersuchungen mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse wurden die Proben im Hochvakuum-Bedampfungsverfahren mit einer ca. 10 nm dicken Kohlenstoffschicht versehen (P30, Hochvakuum Dresden).

#### b) Entwicklung neuer Ätztechniken zur Morphologieaufklärung

Zur Freilegung der Morphologie ist es unter Umständen notwendig, der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung einen chemischen oder physikalischen Ätzprozess voranzustellen. Unter Ätzung versteht man hier den Prozess der selektiven Entfernung einer oder mehrerer Komponenten eines heterophasigen Systems. Dadurch wird ein Relief geschaffen, welches unter Nutzung des Sekundärelektronen-Topographiekontrastes Informationen über die Morphologie liefert. Für die in dieser Arbeit untersuchten neuartigen,

resorbierbaren Knochenzemente musste ein solches Ätzverfahren entwickelt werden. Folgende Prozeduren haben sich als zweckmäßig erwiesen:

- Essigsäureätzung

Zur Aufklärung der Matrixmorphologie wurden Probenoberflächen und Bruchflächen von nicht mit Hydroxylapatit gefüllten, ausgehärteten Systemen mit 50%iger Essigsäure geätzt. Die vorbereiteten Proben wurden unter intensivem Schütteln für 20min in der Säure belassen, anschließend mehrfach mit destilliertem Wasser gespült und mindestens 24h an Luft getrocknet.

- Ätzung mit Ameisensäure

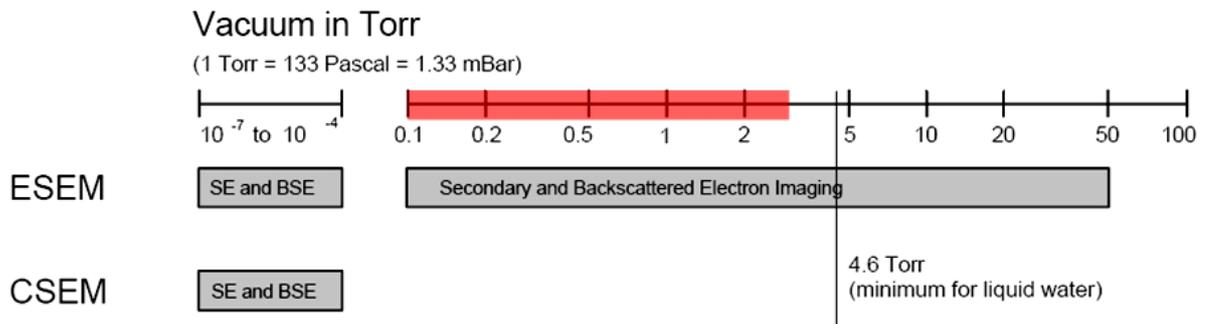
Die Ätzung erfolgte hier in identischer Abfolge der Präparationsschritte, jedoch unter Verwendung 50%iger Ameisensäure.

- Ätzung mit Methylamin [84, 99]

Weitere Ätzversuche wurden nach ähnlichem Schema unter Einsatz einer 33%igen Methylamin-Lösung durchgeführt. Ein optimales Ergebnis wurde auch hier bei einer Ätzzeit von 20 min erreicht.

### 3.4.3 Atmosphärische Rasterelektronenmikroskopie (ESEM)

Gerätetechnische Weiterentwicklungen haben das REM zu einem insbesondere für die Biomaterialforschung extrem interessanten Gerät werden lassen. Während die ESEM-Technik (*environmental scanning electron microscopy*) die Begutachtung feuchter, nicht elektrisch leitender Proben (z.B. Polymere, Keramiken, Knochen und deren Grenzflächen) erlaubt [100, 101], ergeben moderne Strahlerzeugungssysteme (Feldemissions-Elektronenquelle) ein verbessertes Auflösungsvermögen von einigen nm [102]. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde ein PHILIPS ESEM XL 30 FEG eingesetzt. Zur Analyse der Morphologie des Knochens, zur Erfassung der mikromechanischen Mechanismen in deformierten Knochenpräparaten sowie zur Beurteilung der Implantat-Knochen-Grenzflächen wurde das Gerät im *low vacuum*-Bereich des ESEM-Modus betrieben (Abb. 27). Der Druck in der Kammer wurde zur Optimierung der Abbildungsbedingungen (Verhinderung von Aufladungen bei gleichzeitig hoher Auflösung) im Bereich von 0,1 bis 2,5 Torr variiert (Wasserdampf-Atmosphäre).



**Abb. 27:** Vergleich der möglichen Arbeitsdrücke in der Probenkammer für ESEM und konventionelles REM (CSEM), rot markiert der in dieser Arbeit verwendete Druckbereich; Quelle: [100], modifiziert

In diesem Modus wurden folgende Signale und Detektionsverfahren verwendet:

- Sekundärelektronen (SE, *gaseous secondary electron detector* GSED)

Dieser Modus wurde hauptsächlich verwendet, um die Oberflächengüte der Präparate zu beurteilen, d.h., präparationsbedingte Risse, Schleif- und Schneidartefakte abzubilden. Aufgrund des hier möglichen größeren Gesichtsfeldes wurde das SE-Signal verwendet, um bei geringen Vergrößerungen Übersichtsaufnahmen des Untersuchungsgutes anzufertigen und Messregionen für hochauflösende Abbildungen zu definieren.

- Rückstreuielektronen (BSE, Halbleiterdetektor)

Der Vorteil der Verwendung des BSE-Detektors im Materialkontrast-Modus liegt in der fast vollständigen Unterdrückung oben beschriebener präparationsbedingter Artefakte. Für eine glatte, perfekt flache Probe ist das BSE-Signal proportional zur mittleren Kernladungszahl der Elemente in einer Oberflächenschicht des Wechselwirkungsbereiches [103]. Dieses Detektionsverfahren ist extrem empfindlich für Variationen in der Materialzusammensetzung und daher für die Untersuchung von Knochenproben (Unterschiede in der Mineralisation des Knochens) hervorragend geeignet [104].

Eine spezielle Präparation der vorliegenden Proben war nicht erforderlich. Insbesondere die Anschliffe eingebetteter Knochenproben und der explantierten Knochenzemente konnten für die Abbildung im ESEM problemlos verwendet werden.

### 3.4.4 Transmissionselektronenmikroskopie

#### a) Ultramikrotomie [105]

- Knochen

Die Herstellung von Ultra- und Semidünnschnitten erfolgte mit einem Ultramikrotom RMC bei Raumtemperatur. Die wichtigsten Schneideparameter sind in Tabelle 14 angegeben.

<b>Parameter</b>	<b>Ultradünnschnitte zur Morphologieuntersuchung</b>	<b>Semidünnschnitte für Dehnversuche</b>
<b>Schnittgröße (angetrimmte Fläche)</b>	0,1 mm x 0,1 mm	5 mm x 0,5 mm
<b>Messer</b>	Diamant	Diamant
<b>Messerwinkel</b>	45°	45°
<b>Freiwinkel</b>	5°	5°
<b>Schneidgeschwindigkeit</b>	0,5 mm/s	0,5 mm/s
<b>Abschwemmflüssigkeit</b>	destilliertes Wasser	destilliertes Wasser
<b>Schneidetemperatur</b>	RT	RT
<b>Schnittdicke</b>	60 nm (Silber bis Grau)	300 nm
<b>Netz</b>	Kupfer-Netz Standard, kohlenstoff- oder collodiumbeschichtet	Kupfer-Netz „Athene“ collodiumbeschichtet

**Tab. 14:** Wichtige Schneidparameter für die Herstellung von Ultra- bzw. Semidünnschnitten des Knochens [51]

- Knochenzemente und Modellsysteme

Die vollständig ausgehärteten Proben wurden angetrimmt, ggf. kontrastiert und unter Verwendung von Glas- oder Diamantmessern ultradünn geschnitten (RMC, LEICA Ultracut). Die Schnittdicken betragen 60 bis 100 nm.

#### b) Kontrastierung

Zur Abbildung der Morphologie der in Abschnitt 3.1.3 beschriebenen neuartigen Modellsysteme wurden zunächst die für Polymere beschriebenen Standardverfahren eingesetzt [106, 107]. Da so kein befriedigendes Ergebnis erzielt werden konnte, wurde in Anlehnung an bekannte Kombinationsverfahren (z.B. [108]) ein neues Zweistufenverfahren entwickelt und erprobt.

- Bekannte, einstufige Kontrastierung: RuO<sub>4</sub>

Angetrimmte Blöcke wurden für 2 bis 6 Stunden in RuO<sub>4</sub>-Dampf kontrastiert. Anschließend wurden die Proben ultradünn geschnitten und gegebenenfalls in RuO<sub>4</sub>-Dampf nachkontrastiert.

- Neue, mehrstufige Kontrastierverfahren
  - Sequenz 1: Essigsäure / OsO<sub>4</sub>: Die angetrimmten Proben wurden 20 Minuten in 50%iger Essigsäure gelagert und anschließend 2 h in OsO<sub>4</sub>-Dampf kontrastiert.
  - Sequenz 2: Methylamin / OsO<sub>4</sub>: Die angetrimmten Proben wurden 20 Minuten in 33%iger Methylamin-Lösung gelagert und anschließend 2 h in OsO<sub>4</sub>-Dampf kontrastiert.

### c) Untersuchungstechniken

Die Untersuchung kontrastierter Ultradünnschnitte der neuartigen Modellsysteme erfolgte an einem TEM JEOL JEM 2010 bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV. Unkontrastierte Ultradünnschnitte des kortikalen Knochens wurden in einem LEO 912 EFTEM bei einer Beschleunigungsspannung von 120 kV analysiert. Die Untersuchung undeformierter und deformierter Semidünnschnitte des Knochens (unkontrastiert) erfolgte mittels Hochspannungs-TEM (HTEM) JEOL JEM 4010 FX (Max-Planck-Institut für Mikrostrukturphysik, Halle/Saale) mit einer Beschleunigungsspannung von 400 kV.

#### 3.4.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Zur Untersuchung von Proben des kortikalen Knochens wurde ein AFM Multimode D3000 (DIGITAL INSTRUMENTS) verwendet. Das Gerät wurde bei Raumtemperatur im *tapping mode* betrieben. Dabei wurde ein Silizium-Cantilever mit einer Resonanzfrequenz von 300-400 kHz und einer Federkonstante von 15 N/m genutzt.

Der Erfolg rasterkraftmikroskopischer Untersuchungen hängt in hohem Maße von der Güte der zu analysierenden Oberflächen ab. Diese sollten möglichst glatt und planparallel zur Auflagefläche sein. Als geeignet erwiesen sich geschliffene und polierten Scheibchen, die nach dem im Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Verfahren gewonnen wurden. Weiterhin wurden die Anschnitte verwendet, die nach der Abtragung von Ultra- bzw. Semidünnschnitten (3.4.4) verblieben. Diese Anschnittpräparate wurden in einen geeigneten Probehälter eingespannt, planparallel ausgerichtet und in das Mikroskop übertragen.

## 4 Ergebnisse

---

### 4.1 *Morphologie, mechanische Eigenschaften und Mikromechanik des Knochens*

#### 4.1.1 Mikro- und Nanostruktur des Knochens

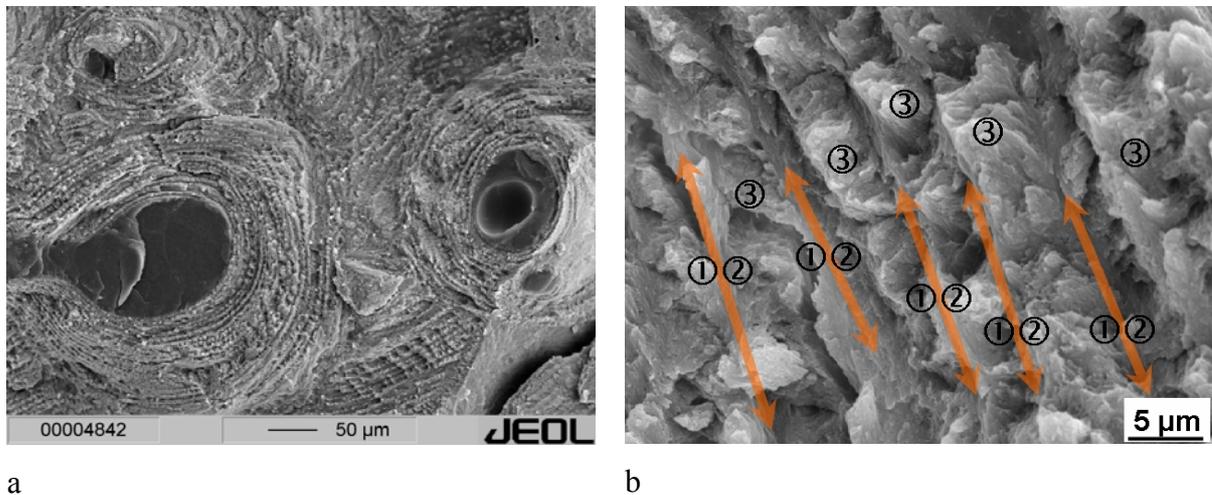
Durch die Anwendung von an Polymerwerkstoffen und Kompositmaterialien erprobten elektronen- und rasterkraftmikroskopischen Techniken ist es gelungen, die verschiedenen Strukturebenen des kortikalen Knochens abzubilden und morphologische Parameter quantitativ zu erfassen. Strukturdetails der mikroskopischen Ebene sind weitestgehend in der Literatur beschrieben und gut verstanden. Daher sollen an dieser Stelle nur wenige, signifikante Beispiele gegeben werden. Ziel war hier, den Stand der Technik zu adaptieren, weiterzuentwickeln und als Werkzeug für Analysen der Knochen-Implantat-Grenzfläche und zur Abbildung mikromechanischer Mechanismen verfügbar zu machen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Darstellung und Interpretation neuer Erkenntnisse zur Nanostruktur des Knochens.

#### a) Ergebnisse der REM-Untersuchungen zur Mikrostruktur

##### ▪ Untersuchung von Bruchflächen

Cryobruchflächen eignen sich besonders, um den lamellaren Aufbau des kortikalen Knochens im REM abzubilden (Abb. 28). Die verschiedenen Orientierungen der mineralisierten Kollagenfibrillen beeinflussen das Bruchverhalten, wodurch eine sehr schroffe Bruchfläche entsteht, deren Topographie durch sich abwechselnde glatte und raue Bereiche gekennzeichnet ist. Die glatten Regionen entsprechen Fibrillenbündeln, die parallel zur Bildebene und damit zur Bruchfläche verlaufen (in Abb. 28b durch ①, ② und Pfeile gekennzeichnet). Die rauen Bereiche dazwischen entstehen beim Riss von Fibrillen, die in verschiedenen Winkeln aus der Bildebene herausragen (Bereiche ③ in Abb. 28b). Eine Interpretation dieses Effektes wird in [109] vorgeschlagen: Die glatten Bereiche ①, ② repräsentieren Fibrillen mit Ausrichtung parallel zur Bildebene. In den rauen Bereichen ③ rotieren die Fibrillen aus der Bildebene heraus. Man kann weiterhin annehmen, dass nach einer Rotation um 180° wieder eine parallel zur Bildebene gelagerte Anordnung erreicht wird, wodurch eine Sequenz (Lamellenperiode) abgeschlossen ist. Das Überstreichen des

Winkelbereiches  $0^\circ$  bis  $180^\circ$  führt zu der typischen bogenförmigen Anordnung der Fibrillen zwischen den Parallelsegmenten (siehe auch Abb. 6b).



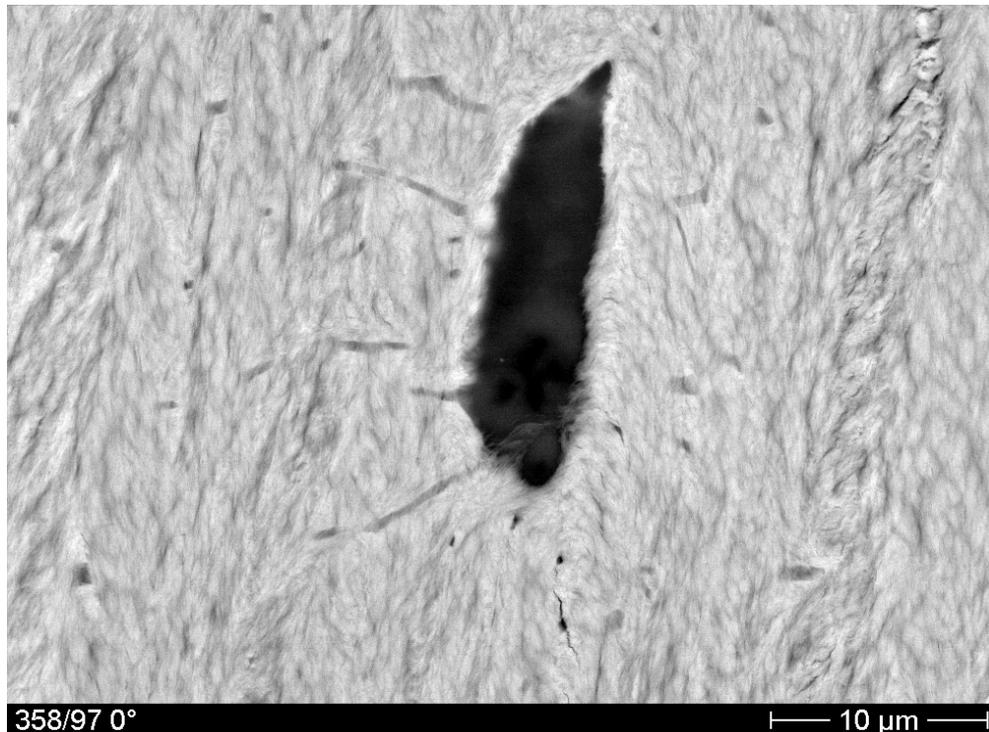
**Abb. 28:** REM-Abbildungen einer Cryobruchfläche des kortikalen Knochens (Femur, Mensch). a) konzentrische Anordnung von Lamellen innerhalb der Osteone, b) Detail; Lamellendicke 5 µm

▪ Untersuchung von Anschliffpräparaten und Mikrotom-Anschnittflächen

Anschliffpräparate und Anschnittflächen bieten den Vorteil, dass diese nahezu ideal glatten Flächen den Informationsgehalt des materialspezifischen Kontrastes zugänglich machen. Frei von Überlagerungen durch topographische Effekte (Kanteneffekt, Winkelabhängigkeit der Signalausbeute) können Sekundärelektronensignal (SE), Rückstreuелеktronensignal (BSE) und energiedispersive Röntgenmikroanalyse (EDX) wirkungsvoll eingesetzt werden. Proben mit solchen wohldefinierten Oberflächen bieten darüber hinaus den Vorteil, dass sie gleichzeitig auch für andere analytische Verfahren wie akustische Rastermikroskopie (*scanning acoustic microscopy*, SAM), Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Mikro- bzw. Ultramikrohärtemessungen geeignet sind. Diese Präparate bieten also die Möglichkeit, verschiedene Messmethoden zu kombinieren, wobei grundsätzlich die Untersuchung ein und derselben Probenregion durch verschiedene physikalische Sonden möglich ist.

Beispiele zur Darstellung der Mikrostruktur des Knochens sind in Abbildung 5 gegeben. In der Übersichtsaufnahme des Anschliffpräparates (Abb. 5a) sind Grundelemente des kortikalen Knochens (Osteone) erkennbar. Der unter Ausnutzung des BSE-Signals erhaltene Materialkontrast zeigt lokale Unterschiede im Mineralgehalt des Knochens. Höhere Vergrößerungen (Abb. 5b) ermöglichen die Abbildung des lamellaren Aufbaus eines Osteons. Die schmaleren, etwas dunkler erscheinenden, konzentrisch um den zentralen Havers-Kanal

angeordneten Ringe entsprechen dabei exakt den auf der Bruchfläche (Abb. 28b) erkennbaren glatten, mit ① und ② bezeichneten Bereichen. Bereits in Abbildung 5b sind Lakunen und feine Kanälchen erkennbar. Ein Bildausschnitt (Abb. 29) zeigt eine Lakune und zugehörige *canaliculi* im Detail.

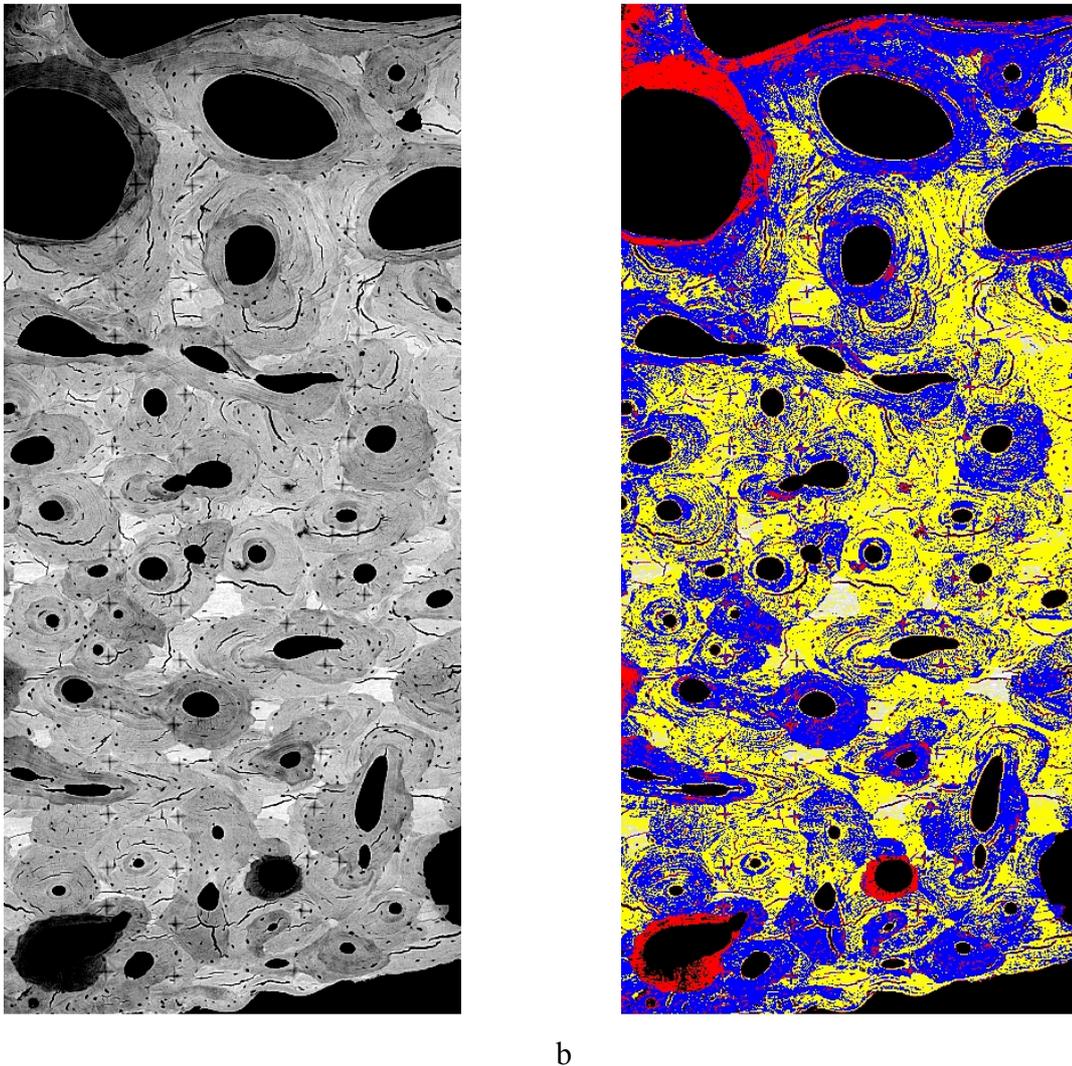


**Abb. 29:** Lakune (Sitz einer eingemauerten Knochenzelle) und *canaliculi* (Zellfortsätze zur interzellulären Kommunikation); Anschliffpräparat, ESEM, BSE-Materialkontrast

- Darstellung von Variationen der Knochendichte: BSE-Materialkontrast

Im REM konnte der BSE-Materialkontrast erfolgreich zur Visualisierung lokaler Variationen des Mineralisationsgrades (Knochendichte) herangezogen werden. Dabei werden Unterschiede der Konzentration der anorganischen, mineralischen Komponente als unterschiedliche Grauwerte abgebildet. Dieses von verschiedenen Autoren für Untersuchungen am Knochen vorgeschlagene Verfahren unterdrückt dabei weitestgehend Artefakte (Trocknungsrisse). Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 30 gegeben. Zur besseren Veranschaulichung können mittels digitaler Bildbearbeitung den verschiedenen Grauwerten Falschfarben zugeordnet werden. Im gezeigten Beispiel erscheint stark mineralisierter, „alter“ Knochen weiß (Zwickel zwischen Osteonen, „Schaltlamellen“), die schwächer mineralisierten sekundären Osteone verschiedenen Alters werden gelb und blau

dargestellt. Rot eingefärbte Bereiche sind Resorptionszonen, d.h. Bereiche, in denen der Abbau der Knochensubstanz zur nachfolgenden Restrukturierung (*remodelling*) erfolgt.



**Abb. 30:** Querschnitt der Kortikalis des Femur im ESEM (Anschliffpräparat, Rückstreuелектрон-Materialkontrast); a) Grauwertbild, b) Falschfarbdarstellung zur Hervorhebung von Regionen unterschiedlicher Mineralkonzentration

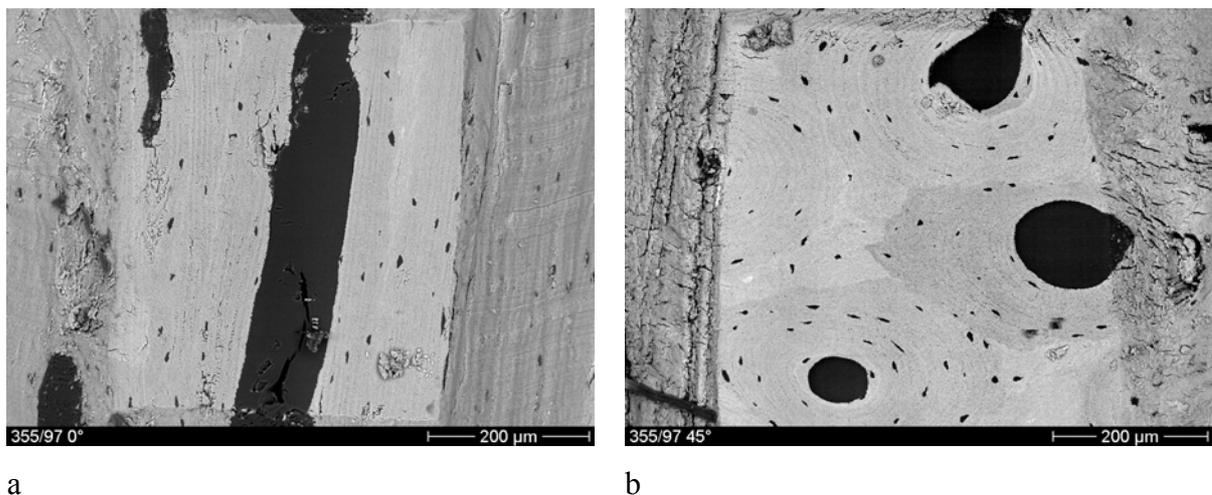
Unbefriedigend ist, dass bisher kein Absolutwert der Knochendichte in Analogie zur kalibrierten Mikrodensitometrie (Röntgenuntersuchungen, Ultraschalluntersuchungen) gegeben werden kann. Eine Messung von Absolutwerten trifft auf grundlegende gerätetechnische Schwierigkeiten: Einerseits ist die Intensität des Rückstreuелектронensignals in starkem Maße von der Neigung der betrachteten Fläche zum einfallenden Primäreлектронenstrahl und vom Arbeitsabstand abhängig. Während diese Parameter durch geeignete Bearbeitung der Probe (Planparallelität) und exakte Positionierung zu beherrschen

wären, sind andere Einflussfaktoren wie Strahlstrom und Beschleunigungsspannung durch nicht vollständig kompensierbare elektronische Drift schwerer kontrollierbar [104]. Insbesondere ist die Angabe von Absolutwerten an ein spezielles Gerät und konkrete Detektorkonfigurationen und Vakuumbedingungen gebunden und daher nur schwer universell, also geräteunabhängig möglich.

Eine quantitative Analyse der Mineraldichte, die einen Vergleich verschiedener Mineralkonzentrationen innerhalb einer Probe und den Vergleich von Knochendichten unterschiedlicher Proben erlaubt, setzt die exakte Kalibrierung des BSE-Signals durch Nutzung absoluter Standards voraus. Idealerweise sollten solche Standards eine ähnliche chemische Zusammensetzung wie der Knochen aufweisen, d.h. verschiedene und genau definierte Konzentration eines dem Knochenmineral vergleichbaren HAp enthalten. Die Partikel sollten ähnliche Abmessungen wie natürliche HAp-Partikel aufweisen und müssen homogen verteilt sein. Solche „Phantome“ sind bisher aus der Literatur nicht bekannt. Ein potentiell Standardsystem stellen die in dieser Arbeit beschriebenen biomimetischen Nanokomposite dar (siehe Abschnitt 4.4).

#### ▪ Hochauflösende Abbildung im ESEM

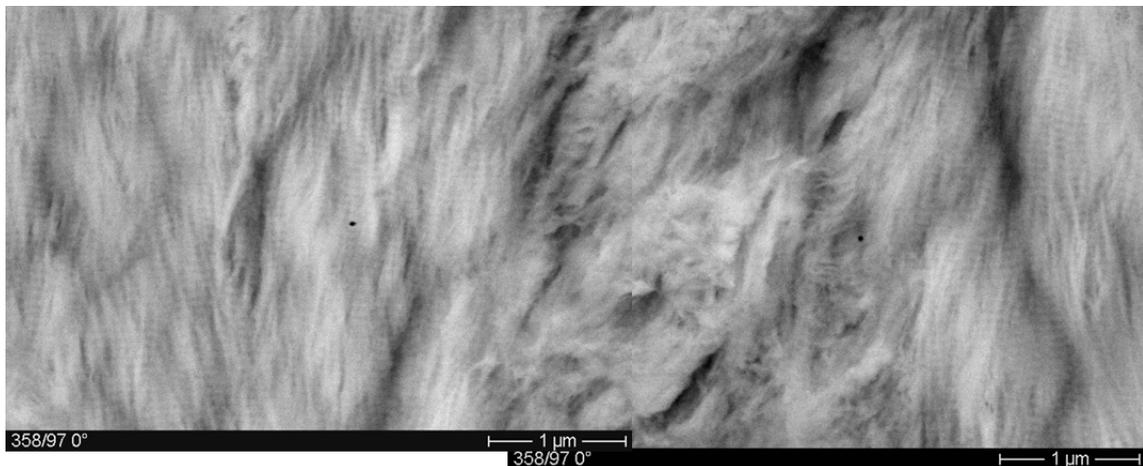
Präparative und gerätetechnische Weiterentwicklungen bieten die Möglichkeit der hochauflösenden Abbildung der Strukturen des Knochens. Voraussetzungen sind die Anwendung der Ultramikrotomie zur Erzeugung glatter Anschnittflächen (Abb. 31) und die Nutzung eines mit Feldemissionsquelle (FEG) ausgestatteten atmosphärischen REM (ESEM).



**Abb. 31:** Nach Präparation mittels Ultramikrotom erhaltene Anschnittflächen, Probe 355/97; a) Blickwinkel 0°, längs angeschnittener Havers-Kanal, b) Blickwinkel 45°; zur Erklärung des Blickwinkels s. Abb. 20.

Eine im konventionellen REM notwendige Beschichtung der nichtleitenden Proben würde feine Strukturdetails verdecken. Die Nutzung des Materialkontrastes schließt insbesondere eine Beschichtung mit Metallen (Gold, Chrom, Platin) aus.

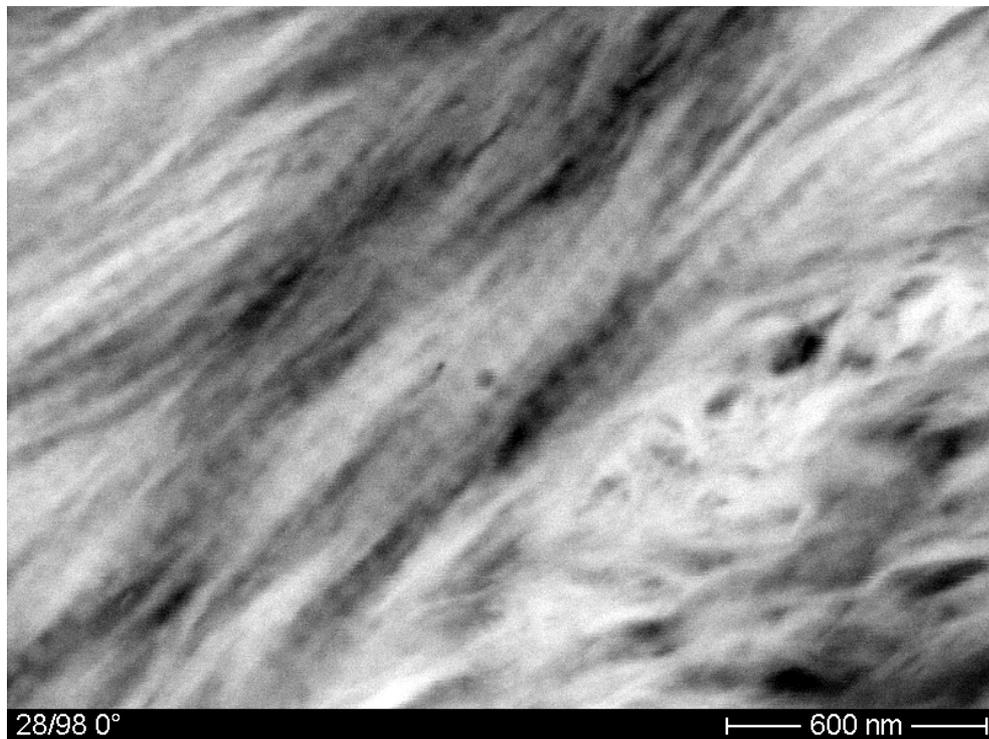
ESEM-Untersuchungen liefern ein Bild der Orientierung der Kollagenfibrillen am Ort der Beobachtung (Abb. 32). In diesem Bild erkennt man eine Sequenz verschiedener Fibrillenorientierungen, d.h. den Übergang zwischen zwei Lamellen innerhalb eines Osteons (Kortikalis des Femur, Mensch). Im linken bzw. rechten Bildteil dominieren Stränge parallel laufender, in der Bildebene liegender Kollagenfibrillen (oben nach unten), die durch aus dieser Richtung abbiegende Stränge unterbrochen werden. Gut erkennbar ist bereits in diesem Bild die typische Querstreifung des Kollagen mit einer Periode von ca. 63 nm.



**Abb. 32:** Außerhalb von Strängen parallel laufender Fibrillen erfolgt ein bogenförmiges Abkippen der Faserbündel. Diese geringer geordneten Bereiche entsprechen dem Übergang zur benachbarten Lamelle innerhalb eines Osteons. ESEM, BSE-Materialkontrast.

Noch deutlicher wird dieser Effekt in der hoch aufgelösten ESEM-Aufnahme (Abb. 33). Es ist zunächst überraschend, dass an einer nicht chemisch vorbehandelten, d.h. unkontrastierten Probe in einem durch Nutzung von Rückstreuielektronen erzielten Materialkontrast die typische Querstreifung des Kollagen sichtbar wird. Dieser hier erstmals für ESEM-Untersuchungen beschriebene Effekt kann dadurch erklärt werden, dass die bevorzugt an definierten Positionen der Kollagenfasern angehefteten und somit ebenfalls periodisch angeordneten Nanokristalle des Hydroxylapatit einen periodischen, im Rückstreubild beobachtbaren Kontrast verursachen. Bisherige Interpretationen einer im konventionellen REM beobachteten Periodizität gingen davon aus, dass durch den Präparationsvorgang (Einbetten, Schleifen, Polieren) verschieden orientierte Fibrillenbündel unterschiedlich stark

an die Oberfläche treten und dadurch eine elektronenmikroskopisch detektierbare Topographie erzeugen [104].



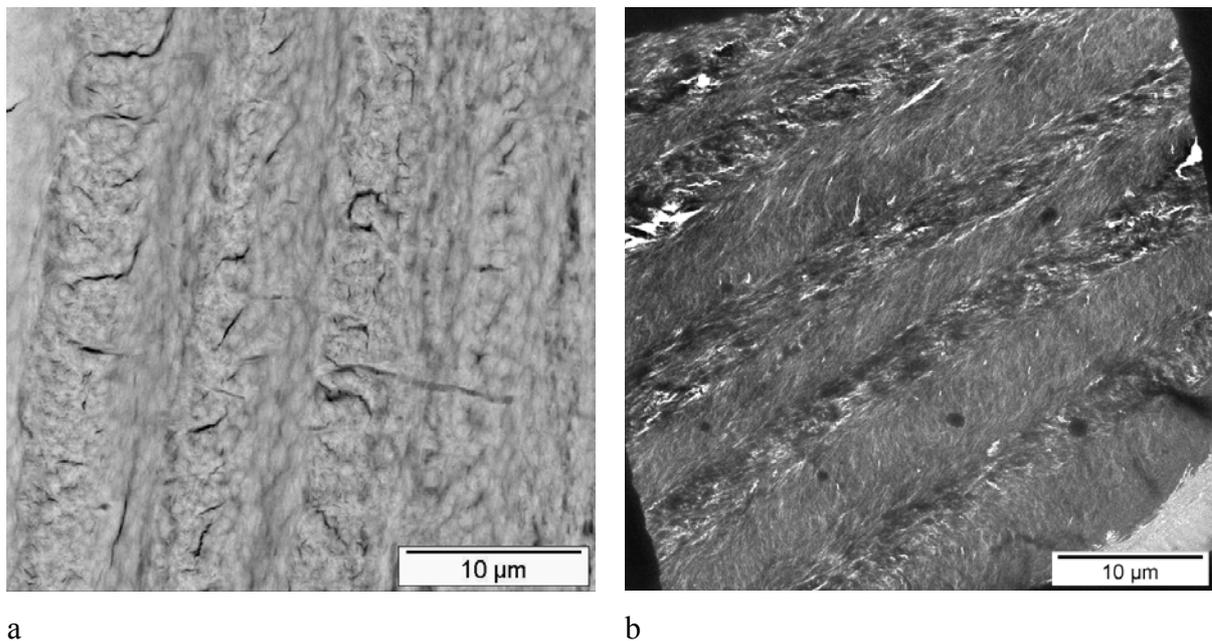
**Abb. 33:** Querstreifung der mineralisierten Kollagenfibrillen mit einer Periode von 64 nm; ESEM, BSE-Materialkontrastaufnahme einer Ultramikrotom-Anschnittfläche

Der Vergleich der ESEM-Aufnahme (Abb. 33) mit weiter unten gezeigten TEM- und AFM-Aufnahmen (Abb. 37 bzw. Abb. 41) beweist, dass hier ein reiner Materialkontrast vorliegt, der auf die periodische Anordnung der HAp-Plättchen in bzw. an der Kollagenfaser rückführbar ist. Von technischen Interesse ist die Feststellung, dass hoch auflösende ESEM-Abbildungen ein gleichwertiges Analogon zu den wesentlich aufwendiger zu erhaltenden TEM- bzw. HVEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten darstellen. Insbesondere die hoch auflösende (d.h. die Nanostruktur des Knochens berücksichtigende) Untersuchung von durch Ultramikrotomie nur sehr schwer intakt zu präparierenden Knochen-Implantat-Grenzschichten wird wesentlich einfacher.

#### b) Ergebnisse der TEM- und EFTEM-Untersuchungen zur Mikro- und Nanostruktur

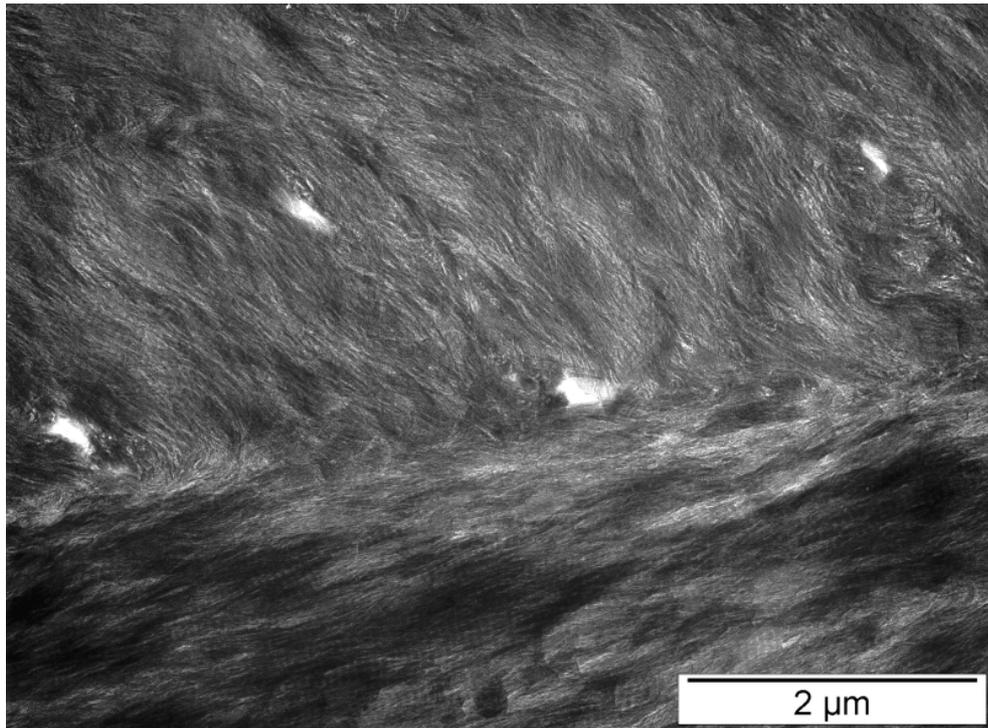
Zur Abbildung der Mikro- und Nanostrukturen des Knochens wurden ausschließlich unkontrastierte Semi- bzw. Ultradünnschnitte untersucht. Der im TEM-Bild auswertbare Kontrast entsteht durch lokale Unterschiede der Mineralkonzentration und durch Variation

der Orientierung der flachen HAp-Plättchen in der Schnittebene. Bei Verwendung hinreichend dünner Schnitte (ungefähr 60 nm) liegen HAp-Plättchen einzeln bzw. in wenigen Lagen geschichtet vor und erscheinen wegen ihrer höheren Dichte und damit stärkeren Streuung des einfallenden Elektronenstrahls dunkler als die transparente, aus leichten Elementen aufgebaute Kollagenmatrix. Das im TEM von Dünnschnitten erhaltene Bild ist das mit umgekehrten Kontrasten erscheinende Analogon zum REM-Materialkontrastbild der entsprechenden Anschnittflächen. In Abbildung 34 sind bei gleicher Vergrößerung im ESEM bzw. TEM erhaltene Bilder identischer Proben gegenübergestellt.



**Abb. 34:** Lamellare Strukturen innerhalb eines Osteons der Probe 358/97 0°: a) REM-Abbildung der Anschnittfläche (ESEM-Materialkontrast), b) TEM-Aufnahme eines Semidünnschnittes (HTEM)

Wie in Abbildung 35 dargestellt, erscheint der kollektive Richtungswechsel der mineralisierten Fibrillen zwischen den hoch orientierten Fibrillenbündeln wesentlich abrupter als in der REM-Aufnahme der Cryobruchfläche (Abb. 28). Dünnschnitte bzw. Anschnittflächen repräsentieren eine bestimmte Ebene innerhalb eines Osteons, d.h. einen Bereich mit konstantem Winkel der alternierenden Fibrillenorientierungen, während der Bruchverlauf beim Cryobruch den variierenden Faserorientierungen folgt und so ein bogenförmiges Relief erzeugt.



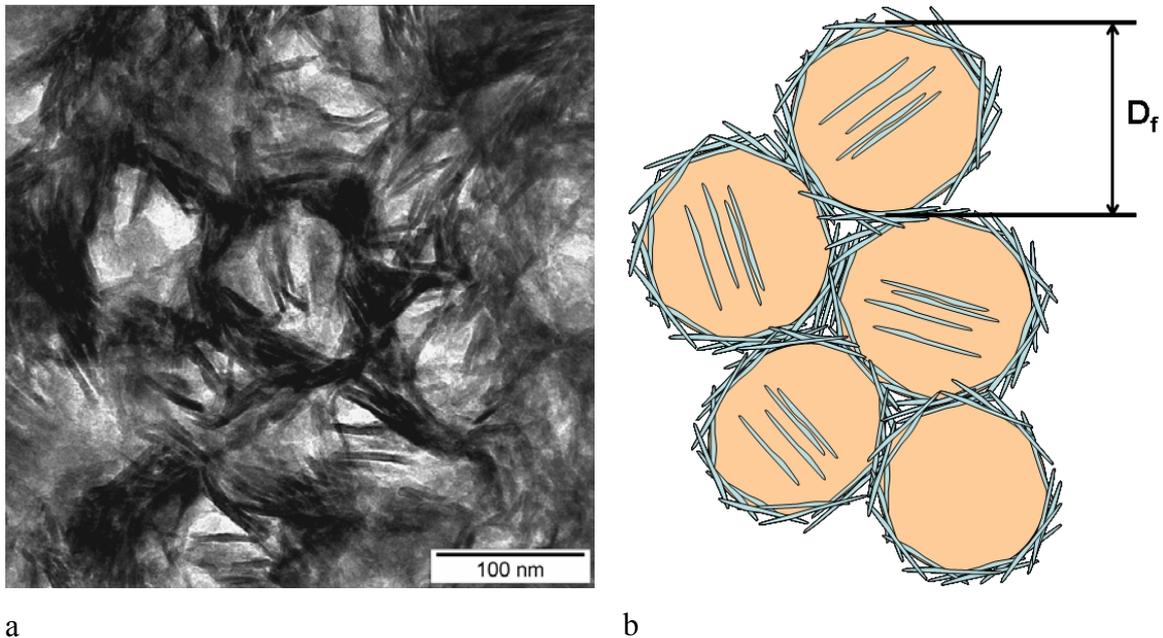
**Abb. 35:** Scharf abgegrenzter Übergang zwischen Bereichen alternierender Faserorientierung; unterer Bildteil: Bündel parallel zum Umfang eines Osteons verlaufender Fibrillen, oberer Bildteil: weniger geordnete, aus der Vorzugsrichtung der Lamelle ausdrehende Fibrillen; Probe 358/97 0°, HTEM

Der wesentliche Vorteil der von Ultradünnschnitten unkontrastierter Knochenproben erhaltenen TEM-Aufnahmen besteht darin, dass die für die Charakterisierung der Nanostruktur wichtigen morphologischen Parameter direkt gemessen werden können. Diese Parameter sind:

- Gestalt und Anordnung der HAp-Nanopartikel

Abbildung 36 zeigt quer angeschnittene Fasern, so dass alle HAp-Plättchen bezüglich der Bildebene auf Kante (*edge-on*) stehen und im TEM-Bild als feine Nadeln der Dicke  $D$  erscheinen. Der Vergleich mit Aufnahmen von flach in der Bildebene liegenden mineralisierten Fasern (Abb. 37) belegt eindeutig, dass es sich tatsächlich um plättchenförmige Kristallite handeln muss. Aus den Bildern lässt sich eindeutig folgern, dass alle HAp-Nanopartikel als unregelmäßig geformte, flache Plättchen vorliegen. Darüber hinaus wird festgestellt, dass diese Plättchen sowohl an die Kollagenfibrille angeheftet als auch in diese eingelagert sein können. Sie besitzen dabei keine eindeutig bevorzugte Ausrichtung sondern sind um den Faserumfang herum so angeordnet, dass die Längsachse  $L$  der Plättchen in Faserlängsachse ausgerichtet ist, wobei die Querachse (Breite  $B$ ) tangential zum

Faserumfang verläuft. Die Plättchen haften mit der flachen Seite an der Kollagenfaser. Die innerhalb der Kollagenfasern befindlichen HAp-Plättchen sind auf ähnliche Weise in Längsrichtung arrangiert und bilden Stapel parallel geordneter, voneinander separierter Platten.

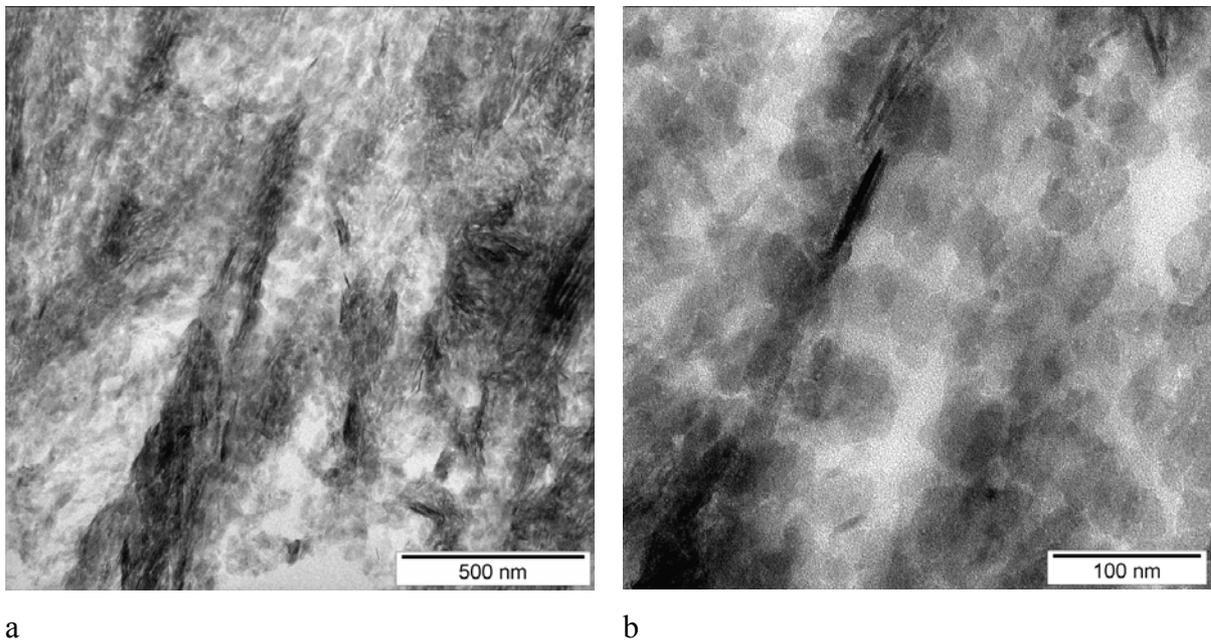


**Abb. 36:** Anordnung der HAp-Plättchen um und in hybriden Nanofasern eines quer angeschnittenen Fibrillenbündels (Blickrichtung senkrecht zur Faserlängsachse); a) EFTEM-Aufnahmen eines Ultradünnschnittes der Probe 340/97 0°; b) Interpretation des EFTEM-Bildes mit Angabe der Dicke der hybriden Nanofaser

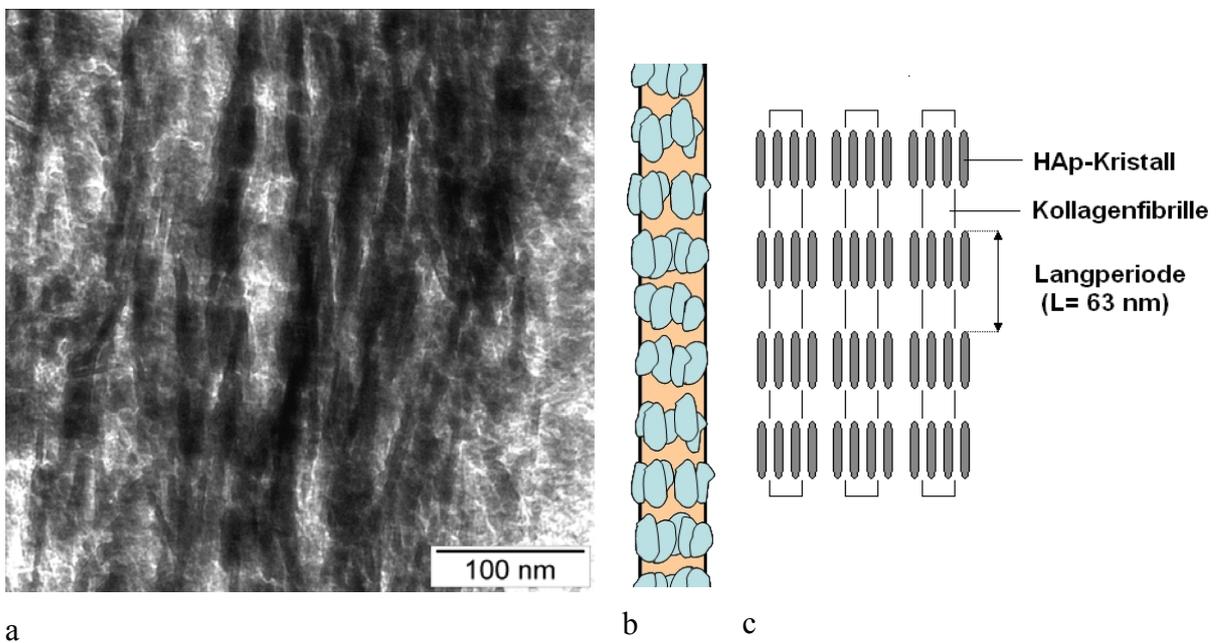
- Interpretation der Querstreifung

Anhand der Abbildungen 37 a und b wird deutlich, auf welche Weise die am unkontrastierten Ultradünnschnitt sichtbare Querstreifung zustande kommt: Entlang der Kollagenfibrille existieren Bereiche, an denen das Mineral bevorzugt abgeschieden wird. Da die Plättchen in ihrer Längsrichtung etwas kleiner sind als die Abstände der hierfür verantwortlichen Regionen der Kollagenfaser erfolgt an diesen Stellen eine etwas stärkere Überlappung der Plättchen, was zu einer geringfügig stärkeren Streuabsorption und damit zu einem Schichtdickenkontrast der gezeigten Periodizität führt. Genau dieser Effekt bewirkt aufgrund einer geringfügig höheren Dichte auch den im REM detektierbaren BSE-Materialkontrast (Abb. 33), der als Analogon mit invertierten Signalintensitäten (Grauwerten) aufgefasst werden kann. In Abbildung 38 werden die beschriebenen Beobachtungen schematisch zusammengefasst. Abbildung 39 schließlich zeigt eine einzelne mineralisierte

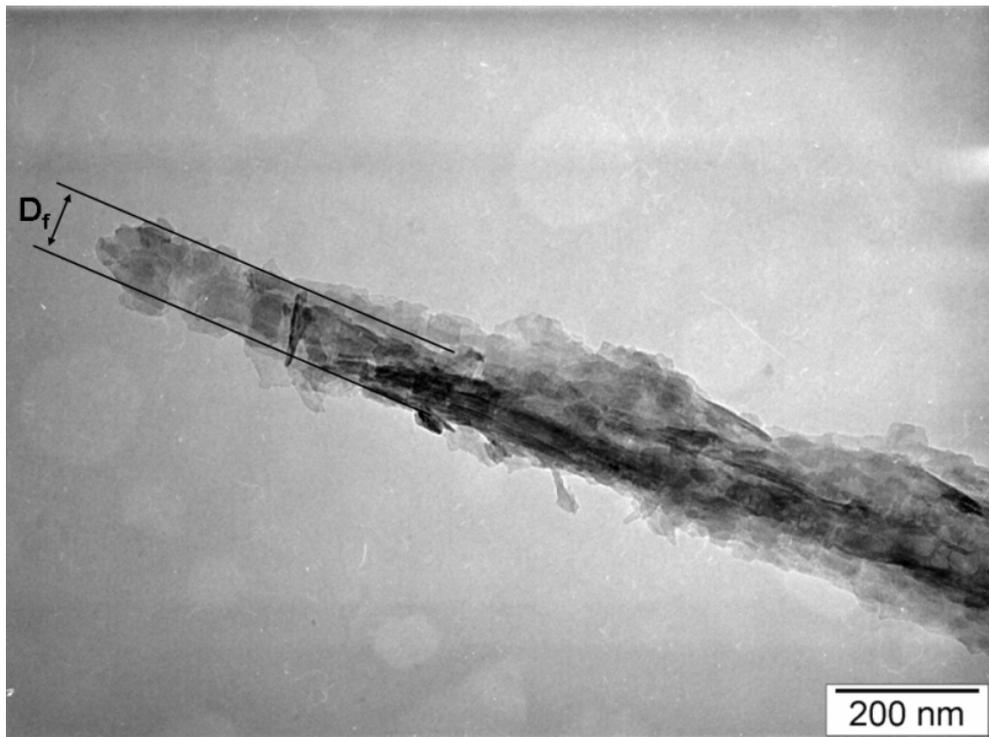
Kollagenfibrille. Im linken Bildbereich wird besonders eindrucksvoll sichtbar, wie Cluster von HAp-Nanopartikeln an die Faser angeheftet sind.



**Abb. 37:** Periodisches Muster der entlang der Kollagenfibrillen angeordneten HAp-Plättchen; Ultradünnschnitt der Probe 340/97 45°, EFTEM



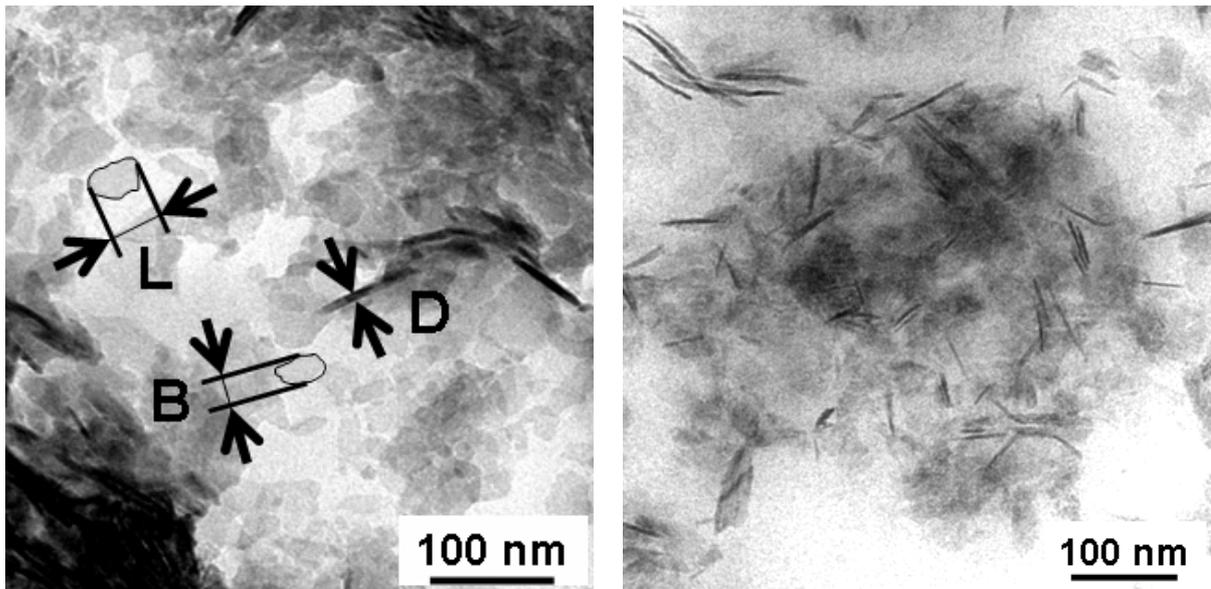
**Abb. 38:** a) Periodisches Muster der entlang der Kollagenfibrillen angeordneten HAp-Plättchen; Ultradünnschnitt der Probe 355/97 0°, EFTEM b) schematische Darstellung der Anordnung der HAp-Plättchen, c) Messvorschrift zur Bestimmung der Langperiode



**Abb. 39:** Darstellung einer einzelnen mineralisierten Kollagenfibrille mit einem Fibrillendurchmesser  $D_f \approx 90$  nm; EFTEM, Ultradünnschnitt der Probe 361/97 0°

- Messung der Partikelgröße

TEM-Aufnahmen erlauben die exakte Bestimmung der Abmessungen (Länge, Breite, Dicke) der in die Kollagenmatrix eingebetteten HAp-Plättchen. Untersuchungen am nicht kontrastierten Ultradünnschnitt haben den Vorteil, dass eine Beeinflussung der Kristallitgestalt ausgeschlossen ist. Alternativ wurden Kristallite untersucht, die nach enzymatischer Zersetzung des Kollagen in Suspension vorlagen. Wie in Abbildung 40 dargestellt, führen beide Vorgehensweisen zu vergleichbaren Resultaten. In Abbildung 40a wird deutlich, dass Ultradünnschnitte nicht kontrastierter Knochenproben hervorragend geeignet sind, um Länge, Breite und Dicke der HAp-Plättchen zu bestimmen, sofern die Schnitte hinreichend dünn sind. Schnittdicken von 50 bis 60 nm haben sich als optimal erwiesen. Alle in dieser Arbeit angegebenen Messwerte (Tab. 15) wurden aus TEM-Abbildungen von Ultradünnschnitten gewonnen.



a

b

**Abb. 40:** Alternative Messverfahren zur Bestimmung der Kristallitabmessung aus TEM-Aufnahmen: a) Messung am Ultradünnschnitt, b) Messung nach enzymatischem Abbau der Kollagenmatrix (Suspension auf beschichtetem Netzchen)

▪ Ergebnisse der Morphologieanalyse

In Tabelle 15 sind die durch Auswertung von TEM-Aufnahmen erhaltenen morphologischen Parameter zusammengefasst (unter Verwendung von Daten aus [51]).

Probencode	340/97	355/97	28/98	361/97	13/98
Beschreibung (Alter, Geschlecht, Besonderheit)	31, m, gesund	64, m, gesund	53, w, gesund	68, w, gesund	73, w, Osteoporose
	→		→		
Kristallitlänge L [nm]	44,4	49,0	47,5	55,8	52,0
Kristallitbreite B [nm]	22,5	24,6	23,8	33,2	30,5
Kristallitdicke D [nm]	5,1	5,3	4,8	6,5	6,5
Fibrillendurchmesser [nm]	-	79	75	92	100
Lamellensequenz [µm]	6,9	6,5	6,4	6,8	5,6

**Tab. 15:** Ergebnisse der Morphologieanalyse für HAp-Nanopartikel, Fibrillendurchmesser und Lamellensequenz verschiedener Knochenproben (m ... männlich, w ... weiblich, Pfeil: Alter)

Das wesentliche Ergebnis der Morphologieanalyse ist, dass geschlechtsunabhängig eine leichte Tendenz der Zunahme von Länge, Breite und Dicke der HAp-Plättchen mit dem Alter des Individuums auftritt. Ebenso nehmen die ermittelten Fibrillendurchmesser mit dem Alter zu. Bei der Lamellensequenz (Abstand der konzentrischen Lamellen innerhalb der Osteone) wurde kein Zusammenhang mit dem Alter festgestellt.

Die Beobachtung einer Tendenz zur Vergrößerung der Nanostruktur des Knochens mit zunehmendem Alter kann als eine mögliche Ursache für die Abnahme der Knochenqualität interpretiert werden. Neben altersbedingten Veränderungen der Qualität der Kollagenmatrix, der Mineralkonzentration sowie des Verlustes an Knochenmasse (Dicke der Kortikalis, Verringerung der Zahl und Dicke der Knochenbälkchen der Spongiosa) muss also bei der Diskussion von Veränderungen der Knochenqualität in jedem Falle auch die Nanostruktur des Materials Knochen berücksichtigt werden.

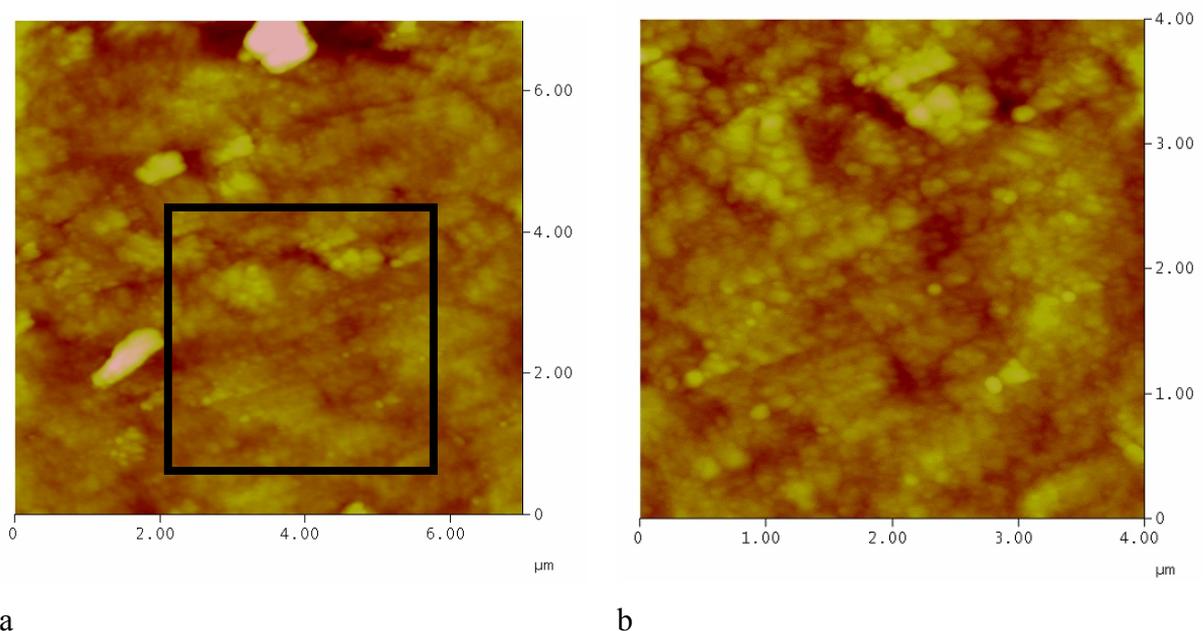
Die hier vorgestellten Ergebnisse beziehen sich auf eine sehr geringe Zahl von Proben, so dass die gemachten Aussagen nicht als statistisch gesichert gewertet werden dürfen. Vielmehr sollte gezeigt werden, dass mit den entwickelten Abbildungsmethoden wertvolle Aussagen zur Knochenstruktur gewonnen werden können. Die Quantifizierung der wesentlichen morphologischen Parameter ist möglich. Weitere Untersuchungen müssen eine größere Gesamtheit an Knochenproben umfassen, wobei verschiedene Alterskollektive zu berücksichtigen sind. Insbesondere fehlen in den hier vorgestellten Analysen Aussagen zu embryonalem und jungem Knochen.

### c) Ergebnisse der AFM-Untersuchungen

Durch die gezeigten Untersuchungsergebnisse wird nachgewiesen, dass sich Anschliffpräparate und im Ultramikrotom erzeugte Anschnittflächen hervorragend zur Abbildung der Nanostruktur des Knochens im Rasterkraftmikroskop eignen. Bei diesem Abbildungsverfahren ist eine hinreichend glatte und planparallel zur Scanrichtung positionierbare Probe von entscheidender Bedeutung für den Erfolg der Untersuchungen.

Abbildung 41 gibt ein Beispiel für die AFM-Untersuchung eines Anschliffpräparates. Auch hier wird deutlich sichtbar, dass die HAp-Nanopartikel entlang der Fasern streng periodisch, „geldstapelartig“ angeordnet sind. Der Kontrast dieser im *tapping mode* aufgezeichneten Bilder ist auf die unterschiedlichen mechanischen Eigenschaften der wichtigsten Komponenten des Materials Knochen zurückzuführen: Hydroxylapatit weist einen hohen Elastizitätsmodul und eine hohe Härte auf und erscheint heller als die umgebende weiche, nachgiebige Matrix (Kollagen). Die Tatsache, dass mittels AFM unter Nutzung völlig anderer

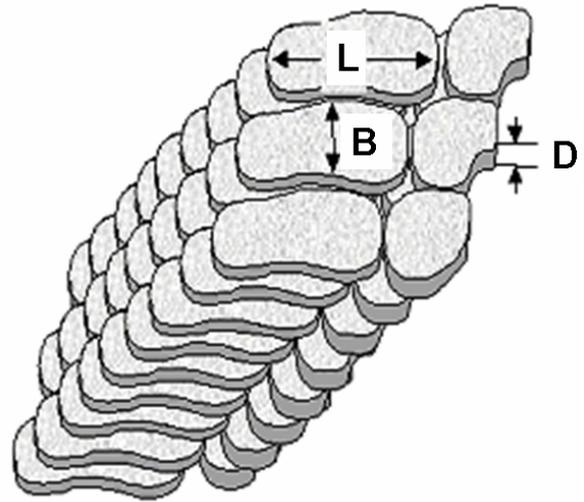
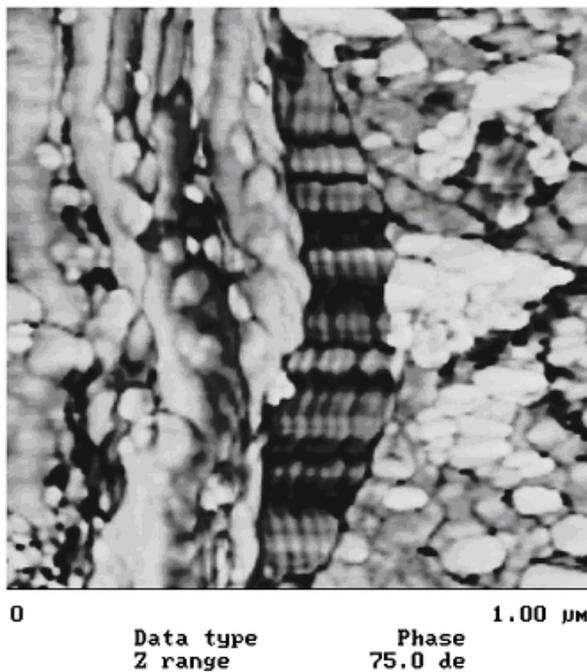
Mechanismen der Kontrastentstehung analoge Strukturen wie im ESEM-Materialkontrastbild gefunden werden, bestätigt die dortige Bildinterpretation (Abb. 33). Die Verwendung der Anschliffe eingebetteter Proben bietet den Vorteil, dass diese Präparate problemlos in andere Geräte (ESEM, SAM, Lichtmikroskop) übertragen werden können, wobei durch typische, unverwechselbare Muster in der Knochenstruktur (individuelle Anordnung der Havers-Systeme) eine Wiederauffindbarkeit definierter Probenbereiche gewährleistet ist. Da bei AFM-Untersuchungen im Gegensatz zu elektronenmikroskopischen Techniken die Probenoberfläche nicht merklich geschädigt wird, stehen diese Präparate anschließend unzerstört für andere Analyseverfahren zur Verfügung.



**Abb. 41:** AFM-Abbildung der geldstapelartigen Anordnung der HAp-Kristallite entlang der Faserorientierung: a) Übersichtsaufnahme, b) Detail; *tapping mode*; Anschliffpräparat aus der Kortikalis des Kaninchenfemur

Mit dem Ultramikrotom erzeugte Anschnittflächen haben den Vorteil, dass prinzipiell auch nicht fixierter, nicht entwässerter bzw. entfetteter und nicht eingebetteter Knochen zur Strukturaufklärung nativer, nicht durch Präparation beeinflusster Strukturen herangezogen werden kann. Allerdings kann bei der Handhabung der Proben an Luft nicht vermieden werden, dass der Knochen austrocknet. So auftretende Trocknungsriss beeinträchtigen, wie in der Abbildung 42a gezeigt, die Güte der aufgezeichneten Bilder. Ein an der durch flach (*flat-on*) liegende Kristallite gekennzeichneten Materialoberfläche erzeugter Riss erlaubt den Einblick in tiefer liegende, auf Kante (*edge-on*) stehende HAp-Plättchen. Die in der rechten

Bildhälfte dargestellten Strukturen, die als flach in der Bildebene liegende Plättchen gedeutet werden, können nach dem in Abbildung 42b gezeigten Schema vermessen werden.



a

b

**Abb. 42:** a) AFM-Aufnahme einer durch Ultramikrotom-Anschnitt erzeugten Oberfläche (Kortikalis des Femur, Mensch, *tapping mode*) und b) Vorschrift zur Messung der Kristallitabmessungen

In Tabelle 16 sind Mittelwerte für die anhand der AFM-Aufnahmen ermittelten Kristallitabmessungen angegeben. Es fällt auf, dass die gewonnenen Werte deutlich höher liegen als vergleichbare Werte aus der Literatur bzw. als die in dieser Arbeit aus Messungen an TEM-Aufnahmen gewonnenen Angaben (Tab. 15). Ursache für diese Abweichungen ist, dass die Messungen durch die nicht exakt bekannte Spitzengeometrie des verwendeten Cantilevers (Spitzenradius) überlagert sind. Eine korrekte Bestimmung der Partikelgrößen ist auf diese Weise nicht möglich.

Dimension (Mittelwert)	Länge L	Breite B	Dicke D	Abstand d
Ergebnisse der AFM-Untersuchungen, Femur, männlich, 70 [110]	91 nm	53 nm	17 nm	8 nm
Literaturangaben [24, 25]	50-80 nm	20-30 nm	2-8 nm	(6,7 nm)

**Tab. 16:** Abmessungen der HAp-Kristallite, abgeleitet aus AFM-Aufnahmen (Abb. 42) und Vergleich mit Literaturangaben

Es wird berichtet, dass eine exakte Bestimmung der Kristallitgrößenverteilung im AFM gelingt, wenn Kristallite auf enzymatischem Wege aus der Knochenmatrix gelöst und auf glatte Substrate aufgebracht werden [30]. Dann jedoch ist eine Abbildung des natürlichen Verbundes aus Kollagenfaser und Hydroxylapatit ausgeschlossen.

#### 4.1.2 Beschreibung des Knochens als Nanokompositwerkstoff

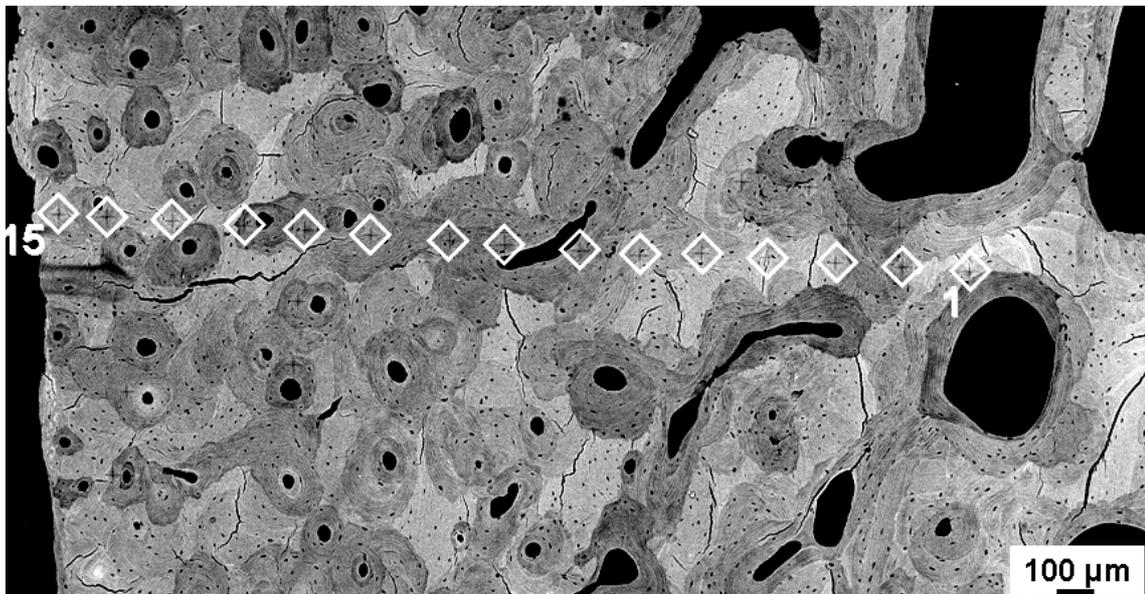
Auf Basis der vorgestellten Ergebnisse der Nanostrukturuntersuchungen des menschlichen Knochens können folgende Postulate aufgestellt werden:

- Das Material Knochen wird aus hybriden Nanofasern gebildet. Diese Nanofasern haben typische Durchmesser von 75 bis 100 nm. Dabei auftretende individuelle Variationen sind möglicherweise altersabhängig.
- Die hybriden Nanofasern bestehen aus einer organischen, weichen Komponente (Kollagen), die in fibrillärer Gestalt vorliegt. Im Zuge der Biomineralisation werden anorganische, harte Partikel (Hydroxylapatit) um die Faser an- und in die Faser eingelagert. Entlang der Kollagenfasern existieren Bereiche, in denen die Biomineralisation bevorzugt erfolgt, wodurch eine Querstreifung mit einer Periode von ungefähr 64 nm auftritt.
- Die anorganischen Partikel sind unregelmäßig geformte Plättchen mit folgenden typischen Abmessungen: Länge  $L \approx 50$  nm, Breite  $B \approx 25$  nm, Dicke  $D \approx 5$  nm. Es treten altersabhängige Variationen von Länge, Breite und Dicke der Partikel auf, wobei mit zunehmendem Alter eine Tendenz zu höheren Werten beobachtet wird.
- Durch Parallellagerung hybrider Nanofasern entsteht ein kompakter Nanokompositwerkstoff. Die Orientierung führt zu einer Anisotropie der Struktur. Es existieren Sequenzen von Verbänden hybrider Nanofasern mit alternierenden Orientierungen. Diese führen auf mikroskopischer Ebene zu einer lamellaren, sperrholzartigen Überstruktur mit einer typischen Periode von ungefähr 5  $\mu\text{m}$ .
- Im kompakten Material liegen alle Hydroxylapatit-Plättchen voneinander separiert vor, d.h., diese werden in jedem Falle von organischer Matrix umgeben. Diese Anordnung entspricht der Morphologie synthetischer Nanokomposite mit exfolierten Nanopartikeln.
- Gesunder Knochen ist ein Nanokompositwerkstoff mit perfekter Balance der Materialeigenschaften der Komponenten, deren Abmessungen und Anordnung.

#### 4.1.3 Lokale mechanische Eigenschaften des Knochens: Mikrohärtete

Mikrohärtemessungen haben sich als besonders geeignet erwiesen, um ausgewählte mechanische Eigenschaften des Knochens zu erfassen. Dabei können unter mikroskopischer Kontrolle definierte Regionen des Knochens ausgewählt werden. Die ermittelten Kennwerte repräsentieren die Eigenschaften des Materials an sich; die geeignete Wahl der Messregion schließt die Verfälschung der Messung durch die im Knochen vorhandenen Poren, Lakunen und *canaliculi* aus. Von Vorteil ist, dass im Prinzip auch nicht entwässerter oder eingebetteter Knochen untersucht werden kann. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden eingebettete, planparallel geschliffene und polierte Proben verwendet, die anschließend ohne weitere Präparationsschritte im ESEM charakterisiert wurden.

Abbildung 43 zeigt den Querschnitt der Kortikalis eines menschlichen Femurs im Rückstreuungselektronen-Materialkontrast. Ausgehend von den spongiösen Strukturen im Inneren des Knochens erfolgten Mikrohärtemessungen entlang einer Linie bis zum äußeren Rand (Periost). Zur besseren Veranschaulichung sind die Indentationsmarken im REM-Bild weiß gekennzeichnet. Die Nummerierung erlaubt die spätere Zuordnung von Messwerten zu morphologischen Details und den nachträglichen Ausschluss fehlerbehafteter Messungen. So wurde z.B. Messpunkt 8 nicht berücksichtigt, da ein Volkmann-Kanal berührt wird.



**Abb. 43:** Indentationsmarken einer Serie von Ultramikrohärtemessungen über die Kortikalis des Femur (Probe 13/98, Schnittwinkel 45°), lokalisiert in Bereichen verschiedener Mineralkonzentration (Grauwert) und in verschiedenen Osteonen; siehe Tabelle 17

Nr.	Kommentare	H [MPa]	E korr. [GPa]
1	auf kompaktem Knochen	509,5	11,4
2	auf kompaktem Knochen	498,0	12,6
3	auf kompaktem Knochen	443,9	15,3
4	auf kompaktem Knochen	630,4	14,1
5	auf kompaktem Knochen	769,2	11,2
6	auf kompaktem Knochen	515,4	12,3
7	auf kompaktem Knochen, nahe Volkmann-Kanal	391,2	10,2
8	auf kompaktem Knochen, berührt Kanal	-	-
9	auf kompaktem Knochen	510,8	11,2
10	auf kompaktem Knochen	580,5	12,7
11	auf kompaktem Knochen	479,5	11,5
12	auf kompaktem Knochen	552,2	12,3
13	auf kompaktem Knochen	589,1	12,9
14	auf kompaktem Knochen	515,5	12,5
15	auf kompaktem Knochen, nahe Periost	650,7	14,5
<b>Mittelwerte für kompakten Knochen:</b>		<b>573,5</b>	<b>12,7</b>
<b>Mittelwerte aus 40 Einzelmessungen nach 12monatiger Lagerzeit:</b>		<b>557,4</b>	<b>13,1</b>

**Tab. 17:** Mikrohärten und Elastizitätsmoduli ausgewählter Bereiche der Kortikalis des Femur (Probe 13/98, Schnittwinkel 45°; Messungen mit einer Last von 100g, entspricht 0,981 N). Die Messpunkte sind im ESEM-Rückstreuelektronenbild (Abb. 43) markiert.

Die entlang der in Abbildung 43 dargestellten Linie durchgeführten Messungen errechneten Werte für die Mikrohärte H und für den Elastizitätsmodul E sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Um einen Einfluss der Lagerzeit der Proben auf die Messwerte auszuschließen, wurden die Messungen nach einem Jahr wiederholt. Dabei wurden nach einem identischen Schema 40 Einzelmessungen durchgeführt.

Etwas geringere Werte für die Mikrohärte und für den Elastizitätsmodul erhält man für den selben Knochen, wenn der Schnittwinkel leicht variiert wird (Abb. 44, Tab. 18; zur Erklärung des Schnittwinkels siehe Abschnitt 3.1.1). Dieser Effekt kann auf die bekannte Anisotropie der Materialeigenschaften in Quer- und Längsrichtung der Knochenachse zurückgeführt werden (siehe Tab. 3). So ist bekannt, dass Druck- und Zugfestigkeit des Knochens in Längsrichtung (longitudinal) deutlich höher sind als quer zur Knochenlängsachse (transversal) [23].



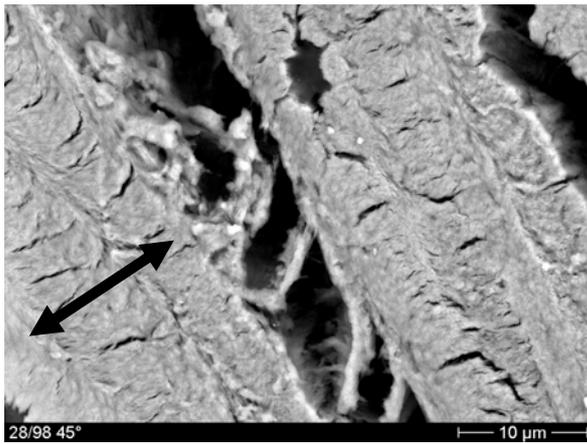
analysierte übermineralisierte, pathologisch versprödete Knochen (*Osteogenesis imperfecta*). Weiterhin wurde festgestellt, dass unterschiedlich stark mineralisierte Bereiche innerhalb einer Probe erwartungsgemäß unterschiedliche Mikrohärten und Elastizitätsmoduln aufweisen. So unterscheidet sich z.B. der Modul stärker mineralisierter Bereiche (im REM-Bild heller) mit 13,6 GPa deutlich vom Modul schwächer mineralisierter Zonen (im REM-Bild dunkler), für die ein Wert von 11,2 GPa gemessen wurde. Damit ist der Nachweis gelungen, dass strukturelle Unterschiede des biologischen Werkstoffes Knochen sich deutlich in den mechanischen Eigenschaften niederschlagen.

#### 4.1.4 Mikromechanik des Knochens

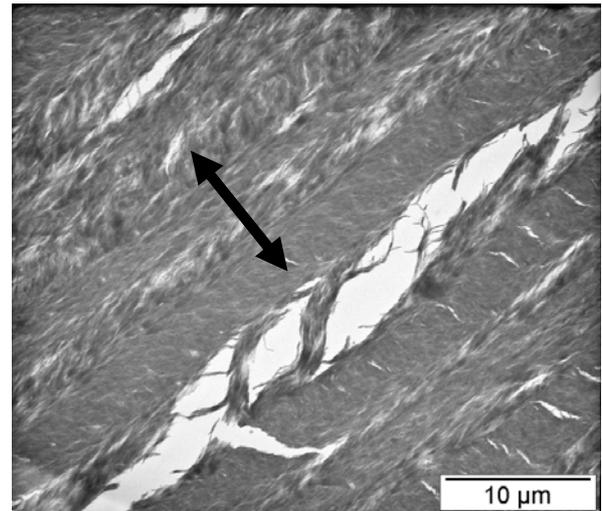
Wenig bekannt sind bisher die mikro- und nanoskopischen Prozesse, die bei Deformation und Bruch des Knochens auftreten. In dieser Arbeit werden Ergebnisse von Analysen vorgestellt, die mittels einer neu entwickelten mikromechanischen Untersuchungstechnik erhalten werden konnten. Dabei war die Frage zu klären, auf welche Weise die oben festgestellten Mikro- und Nanostrukturen des Knochens die mikromechanischen Mechanismen bestimmen. Schließlich soll versucht werden, die mechanischen Eigenschaften des Materials Knochen auf eigenschaftsbestimmende Strukturen und Mikromechanismen zurückzuführen.

##### a) Präparationsbedingte Deformation (Schneid- und Schleifartefakte)

Erste Informationen über mikromechanische Prozesse gewinnt man bei der Betrachtung nicht erwünschter Präparationsartefakte. Bei der Bearbeitung der Probe senkrecht zu den Lamellen eines Osteons tritt eine Separation der Lamellen auf (Abb. 45). Dabei werden Fibrillenbündel so abgelenkt, dass der entstehende Mikroriss durch Fibrillen überbrückt wird. Diese Bilder legen nahe, dass die in Bündeln parallel vorliegenden hybriden Fasern relativ leicht voneinander separiert werden können. Eine völlig andere Situation liegt vor, wenn die Deformation senkrecht zur Faserorientierung erfolgt (Abb. 46): Ein entstehender Mikroriss wird durch senkrecht dazu orientierte Fibrillen überbrückt und stabilisiert. In Abbildung 46a erkennt man Bündel aus hybriden Nanofasern (Querstreifung!), die von einem Ufer des Mikrorisses zum anderen laufen. Wird der Riss weiter geöffnet, reißen die überspannten Fasern und hinterlassen an den Rissufern typische „Zipfel“ des deformierten Materials. Bereits diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass es sich bei den bestimmenden mikromechanischen Mechanismen um crazeartige Prozesse handelt.

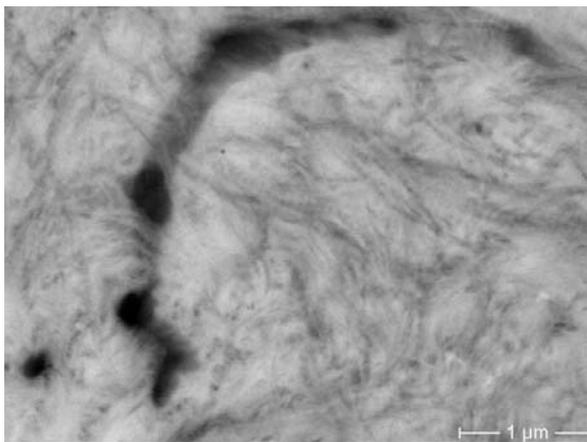


a

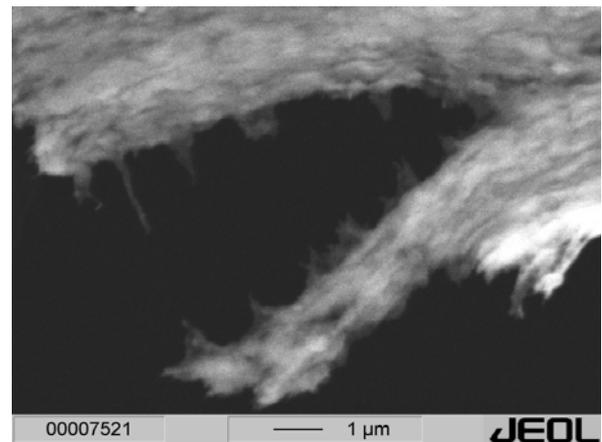


b

**Abb. 45:** Deformationsstrukturen (Präparationsartefakte) nach Ultramikrotomie: a) Lamellen-separation auf einer Anschnittfläche (ESEM), b) Lamellenseparation in einem Semidünnschnitt (HTEM)



a



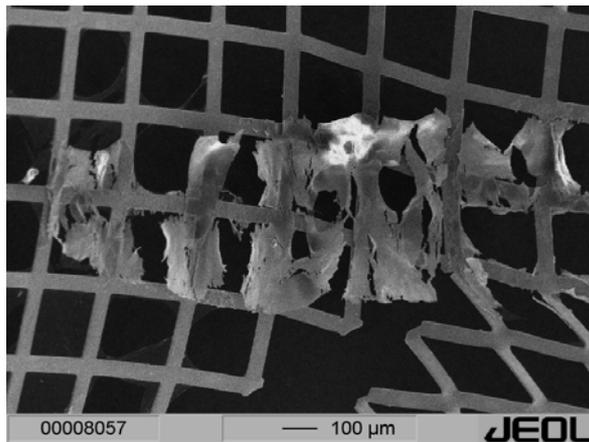
b

**Abb. 46:** a) Überbrückung eines durch Schleifen erzeugten Mikrorisses durch senkrecht zum Riss liegende Fasern, b) Fibrillierung und Riss der Fibrillen bei präparationsbedingter Erzeugung eines Mikrorisses senkrecht zur Faserrichtung; ESEM-Materialkontrastaufnahmen

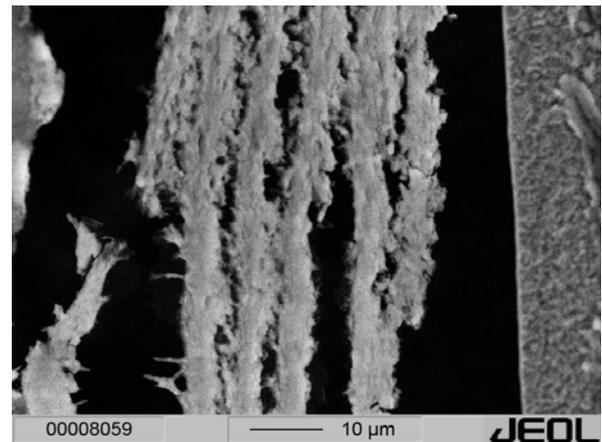
### b) Mikromechanische Mechanismen in gedehnten Semidünnschnitten

Die neu entwickelte Präparations- und Deformationstechnik erlaubt die Abbildung mikromechanischer Prozesse unter definierten Bedingungen. Unter lichtmikroskopischer Kontrolle wird ein auf ein duktiles Kupfernetzchen aufgebrachter Semidünnschnitt so lange gedehnt, bis in einem von Präparationsartefakten freien Bereich des Schnittes Deformationsstrukturen erkannt werden. Durch das plastisch deformierte Kupfernetzchen

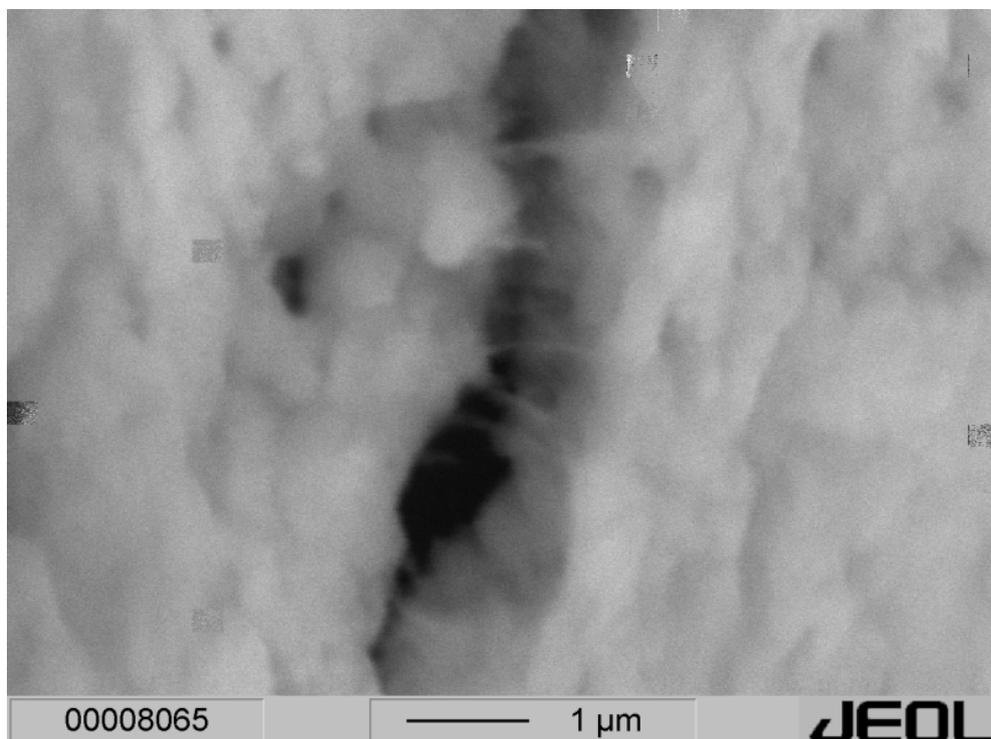
wird dieser Dehnzustand fixiert, und der Semidünnschnitt kann zur Analyse der Deformationsstrukturen in REM, ESEM oder TEM übertragen werden. In Abbildung 47 wird dieser Vorgang dargestellt. Die REM-Aufnahmen zeigen crazeartige Deformationsstrukturen. Die Rissbildung findet bevorzugt in den Bereichen statt, in denen Lamellenbündel senkrecht zur Dehnrichtung laufen (Abb. 47b). Die Lamellen werden separiert, wobei vereinzelt Fibrillen auftreten, die die Rissufer überbrücken (Abb. 47c).



a

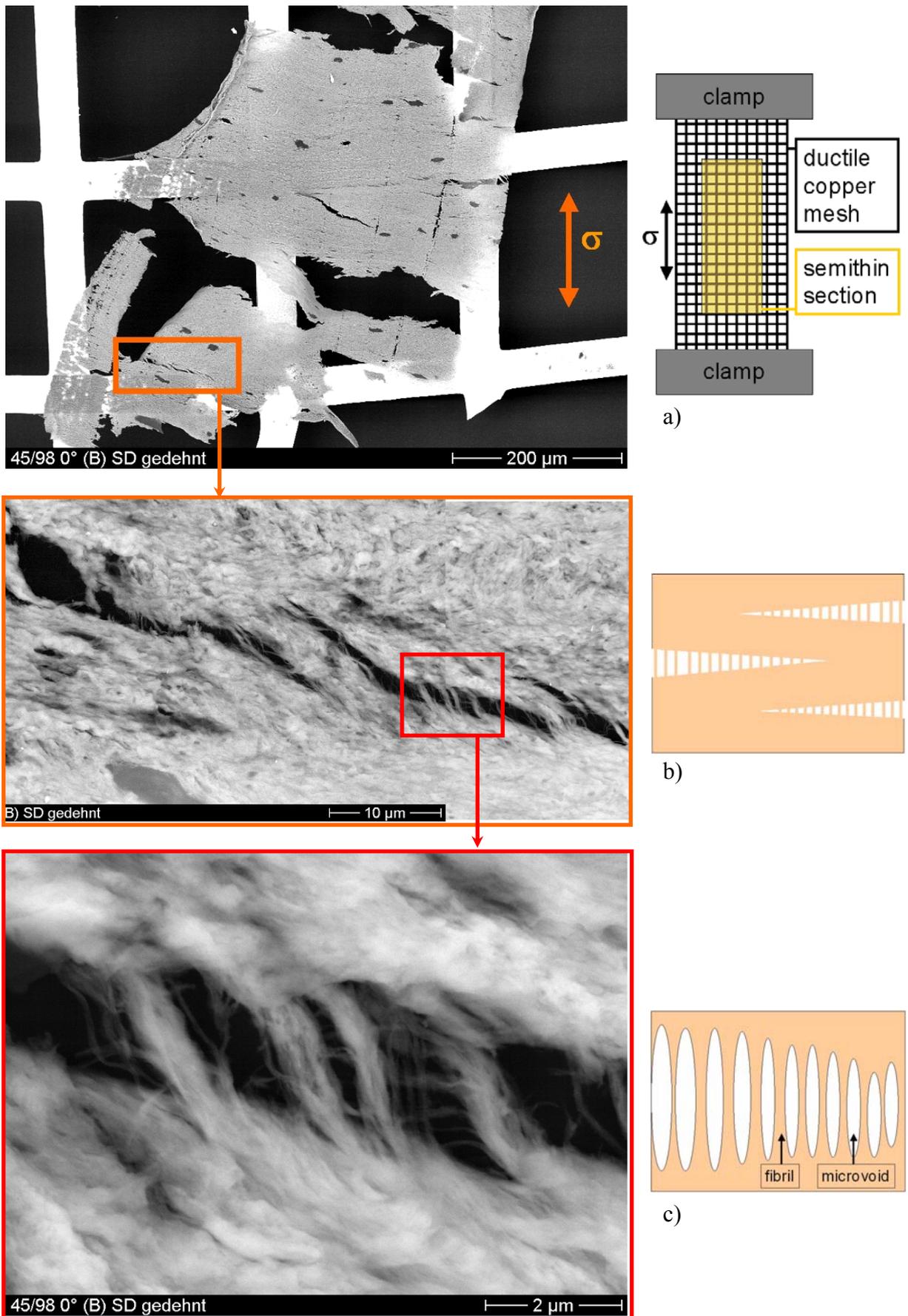


b



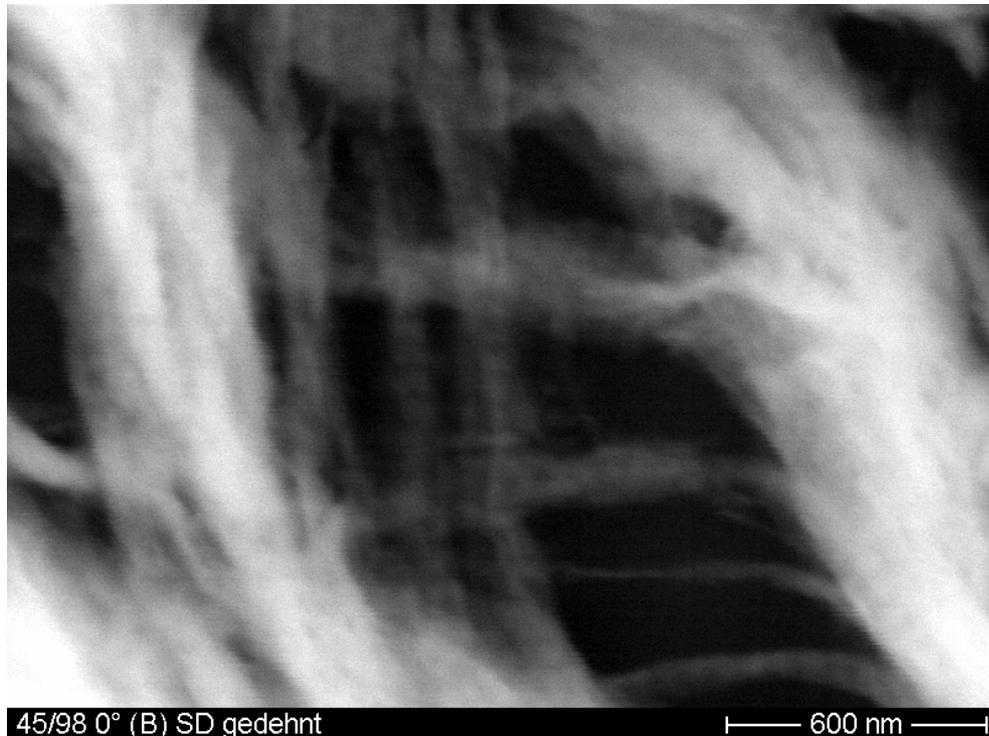
c

**Abb. 47:** Beispiel für den Einsatz der neu entwickelten Deformationstechnik: a) Ansicht des gesamten Semidünnschnittes auf plastisch deformiertem Kupfernetzchen, b) Detailansicht einer deformierten Masche, c) crazeartige Deformationszone; REM-Materialkontrastaufnahmen

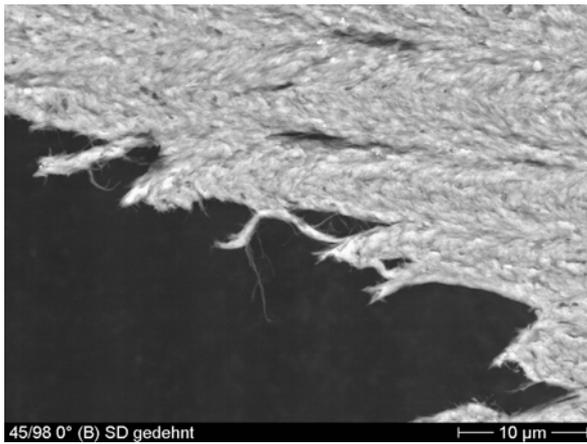


**Abb. 48:** Serie von ESEM-BSE-Aufnahmen eines deformierten Semidünnschnittes aus der Kortikalis des Femur (Mensch, Probe 45/98 0°) mit schematischen Darstellungen zum Deformationsverhalten

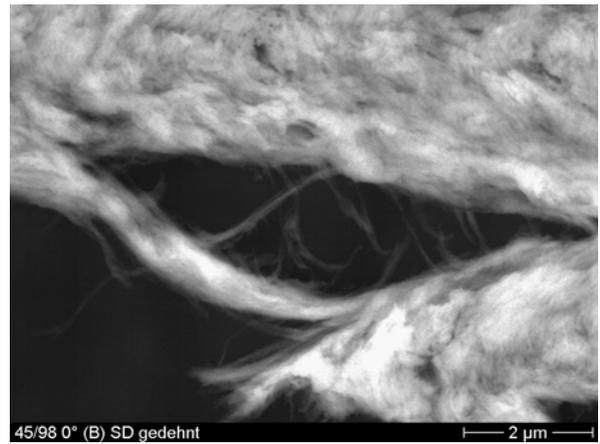
In Abbildung 48 ist eine Serie von ESEM-Aufnahmen wiedergegeben. Die Übersichtsaufnahme zeigt die Position eines Semidünnschnittes auf einem im Dehnexperiment plastisch verformten Kupfernetzchen (Abb. 48a). Im gekennzeichneten Bereich wurde ein Mikroriss erzeugt. Durch lichtmikroskopische Begutachtung vor und während des Zugversuches kann ausgeschlossen werden, dass dieser Riss bereits vor dem Versuch vorhanden war. Höhere Vergrößerungen offenbaren, dass der senkrecht zur Dehnrichtung auftretende Riss durch feine Fibrillen überbrückt ist (Abb. 48b). Auch in diesem Falle kann man daher von einem crazeartigen Mechanismus sprechen. Senkrecht zur Dehnrichtung liegende Fasern werden separiert, wobei abgelenkte Faserbündel von einem Craze-Ufer zum anderen laufen. Diese Situation wird in einer hoch aufgelösten ESEM-Aufnahme genauer dargestellt (Abb. 49): Bei den Craze-fibrillen handelt es sich um hybride Nanofasern, welche einzeln oder als Faserbündel zwischen den Crazeufern vorliegen. Es kann festgestellt werden, dass die als Grundbaustein des Materials Knochen definierten hybriden Nanofasern (Querstreifung!) auch die mikromechanischen Prozesse des Knochens dominieren. Die Aufnahmen in den Abbildungen 50 und 51 geben weitere Beispiele für crazeartige Deformationsprozesse.



**Abb. 49:** Detail aus Abb. 48: Feinstruktur einer crazeartigen Deformationszone. Die Fibrillen weisen die typische Querstreifung der hybriden Nanofasern des Knochens auf; ESEM, BSE-Materialkontrast, deformierter Semidünnschnitt

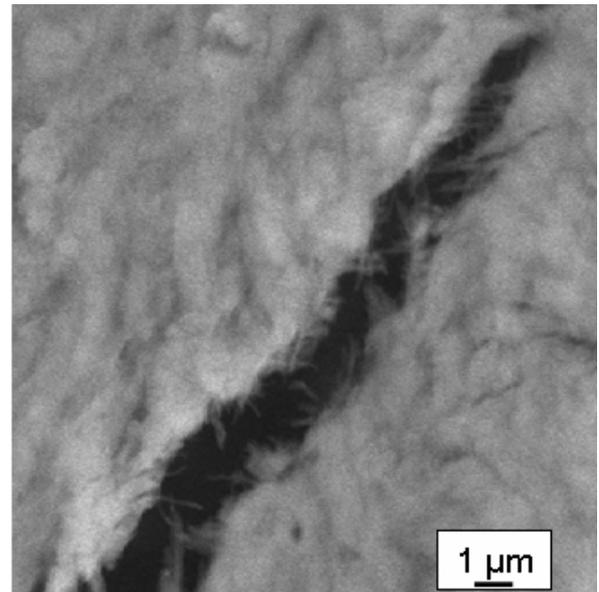
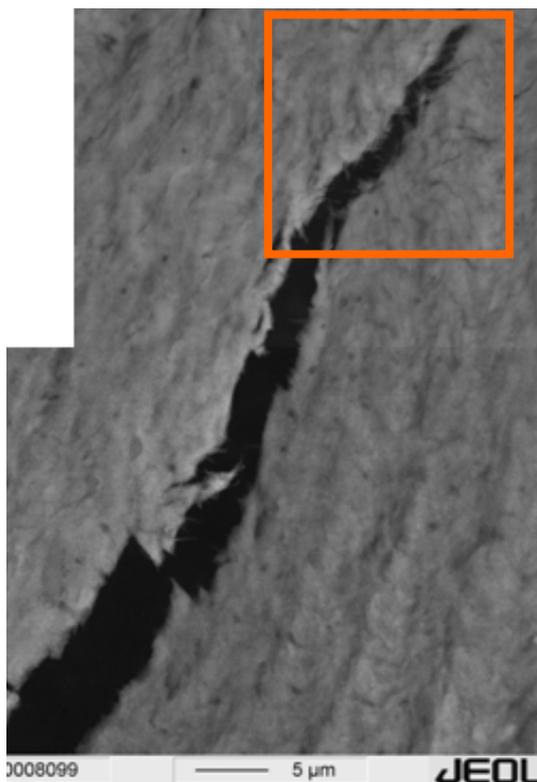


a



b

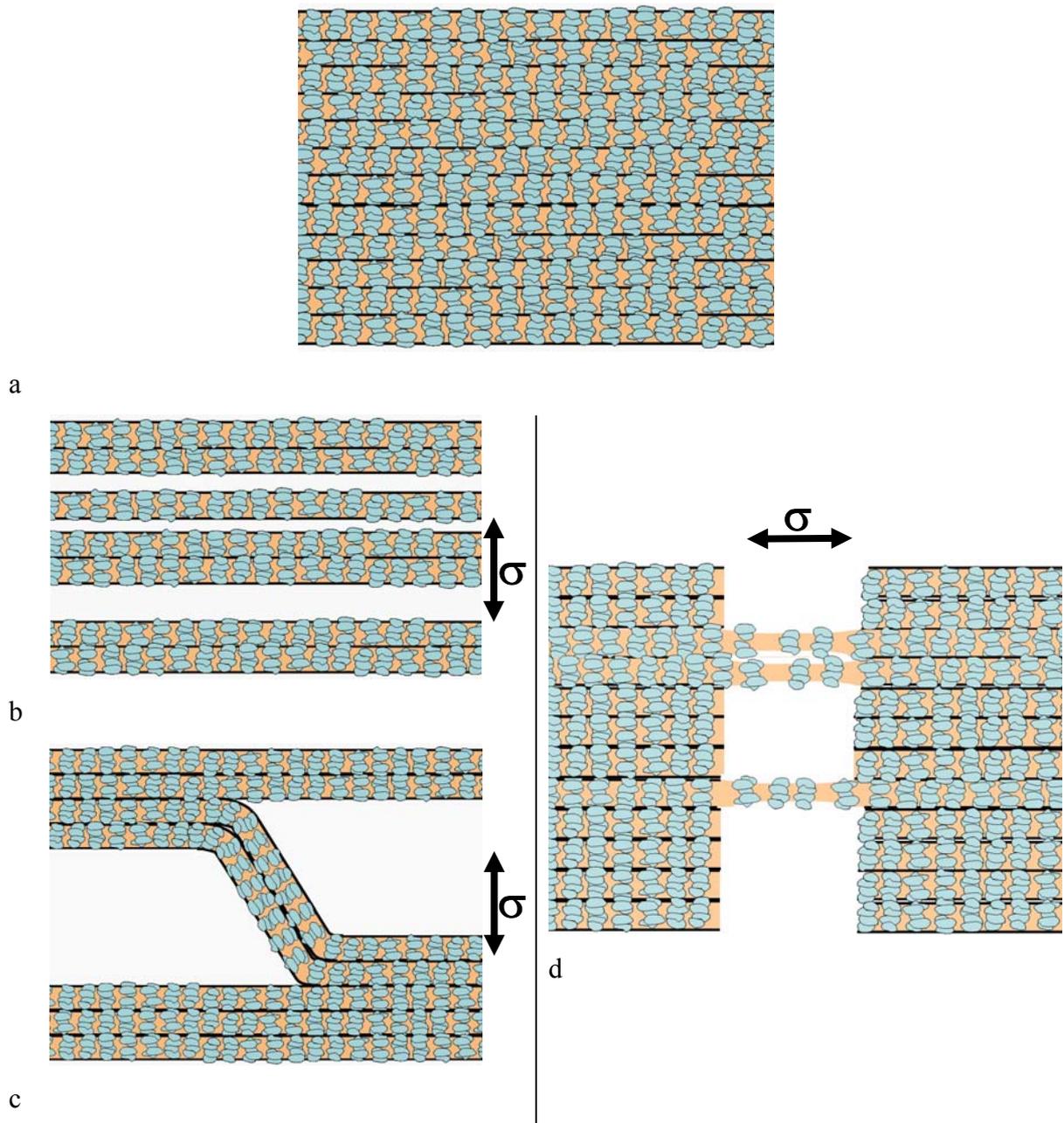
**Abb. 50:** Rissufer eines Mikrorisses (a) mit Resten einer crazeartigen Deformationszone (b). Der Riss wird durch abgelenkte Fibrillen überbrückt. ESEM, BSE-Materialkontrast, deformierter Semidünnschnitt



**Abb. 51:** Crazeartige Deformationszone an der Spitze eines Mikrorisses; Probe 45/98 (0°), gedehnter Semidünnschnitt, REM, BSE-Materialkontrast

Die vorgestellten Ergebnisse werden in Abbildung 52 zusammengefasst. Abbildung 52a zeigt den Ausgangszustand. Dabei wird der kompakte Knochen aus parallel verlaufenden, hybriden

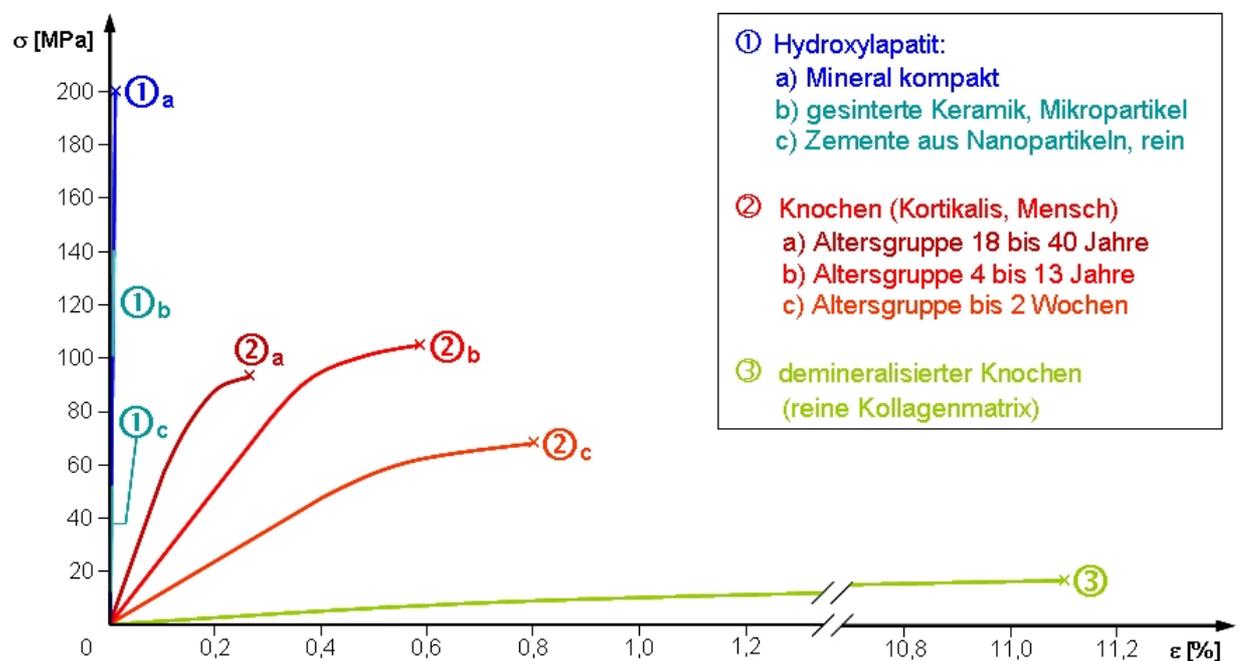
Nanofasern gebildet. Es können zwei Deformationstypen unterschieden werden. Bei Zugbeanspruchung senkrecht zur Faserorientierung tritt Lamellenseparation auf (Abb. 52b). Dabei kann es zur Fibrillierung kommen, die durch eine Ablenkung von Fasern bzw. Faserbündeln entsteht (Abb. 52c). Bei Zugbeanspruchung in Richtung der Faserorientierung wird der entstehende Mikroriss durch gedehnte Nanofasern bzw. Faserbündel überbrückt (Abb. 52d).



**Abb. 52:** Schematische Darstellung von Deformationsmechanismen bei Zugbelastung senkrecht bzw. parallel zur Orientierung der mineralisierten Kollagenfibrillen a): un deformiertes Material, b): Faserseparation ohne Fibrillierung, c) Faserseparation mit Fibrillierung (crazeartig), d) crazeartige Deformation mit Rissüberbrückung durch gedehnte Fibrillen

**Fazit:**

Die Eigenschaften des Materials Knochen werden in starkem Maße durch die in dieser Arbeit beschriebenen Nanostrukturen bestimmt. Entscheidend sind die als strukturelles Grundelement definierten hybriden Nanofasern. Diese gewährleisten einerseits die nanostrukturelle Perfektion des Materials, d.h. die optimale Dispergierung der harten, anorganischen Plättchen in der duktilen, organischen Matrix. Sie steuern andererseits die bei Deformation des Materials ablaufenden mikromechanischen Prozesse und damit die biomechanische Anpassung des Materials. Der bestimmende mikromechanische Mechanismus ist *Crazing*. Die im Material auftretenden Mikrorisse werden durch feine Fibrillen überbrückt und dadurch stabilisiert. Fibrillierung und Hohlrumbildung können als plastische Prozesse aufgefasst werden, die die Dissipation mechanischer Energie ermöglichen und damit trotz hoher Füllgrade (45% Masseanteil) eine ausreichende Zähigkeit des Materials Knochen gewährleisten. Damit stellt Knochen ein exzellentes Beispiel für durch optimale Nanostrukturen erreichbare Synergieeffekte dar. Insbesondere wird hier eine hohe Steifigkeit mit einer hohen Zähigkeit des Materials verbunden (Abb. 53).



**Abb. 53:** Idealisierte Spannungs-Dehnungs-Diagramme für reinen Hydroxylapatit (blau), reines Kollagen (grün) und für Knochen verschiedenen Alters (rot); Datenquellen: [2, 111] (Hydroxylapatit), [112] (Kollagen), [39] (Knochen)

Reiner, mineralischer Hydroxylapatit ist ein hart-sprödes Material. Betrachtet man isolierte HAp-Nanokristallite, die z.B. zum Auffüllen von Knochendefekten verwendet werden, erhält man die in Abbildung 53 angedeutete Kurve 1c. Das Material ist bei geringer Festigkeit ausgesprochen spröde. Reines Kollagen dagegen ist weich, aber relativ duktil. Erst die geschickte Anordnung der harten HAp-Nanopartikel in der duktilen Kollagenmatrix führt zu einem Material, das den Aufgaben im Stütz- und Bewegungsapparat gerecht wird.

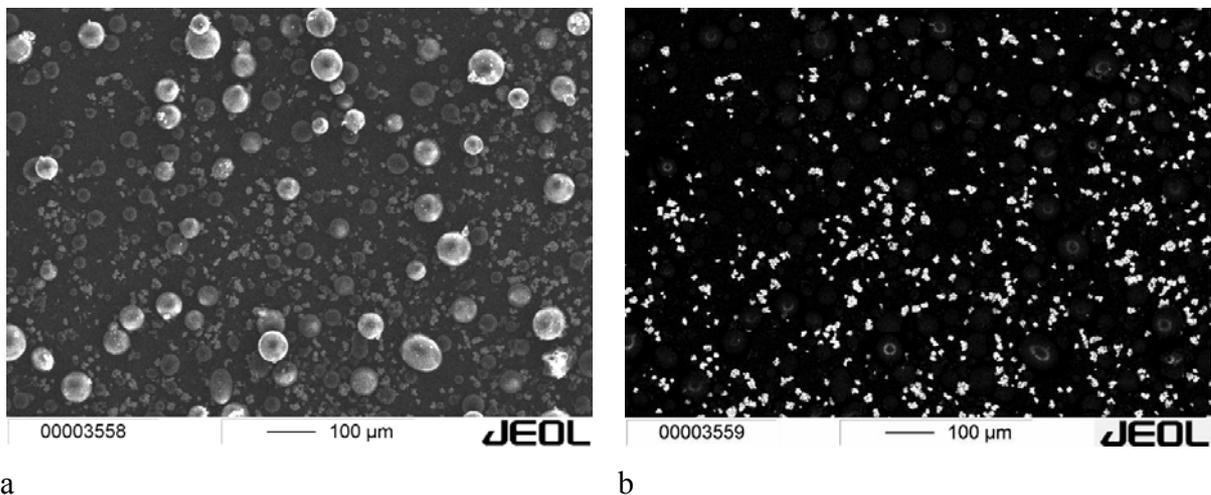
Die Kurvenschar 2 zeigt ein Optimum. Kurve 2b belegt, dass menschlicher Knochen der Altersgruppe 4 bis 13 Jahre die beste Balance von Festigkeit und Zähigkeit aufweist. Jüngerer Knochen ist geringer mineralisiert und daher weicher, älterer Knochen versprödet. Dieser Effekt kann zumindest teilweise auf die in dieser Arbeit nachgewiesene Vergrößerung der Nanostrukturen zurückführbar sein, die damit als eine Abweichung vom nanostrukturellen Optimum zu werten ist.

## 4.2 Defekte in konventionellen Knochenzementen

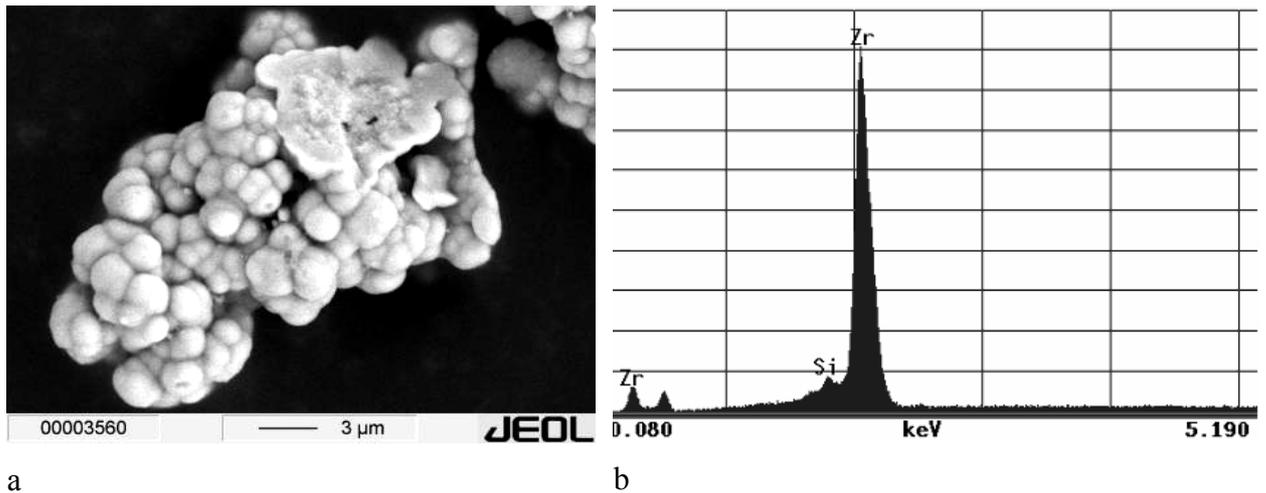
### 4.2.1 Morphologie der Pulverkomponente

Die Größe der primären Partikel (Perlen, teilweise auch Flocken) der polymeren Komponente (PMMA bzw. Copolymere und Polymerblends) kann von Hersteller zu Hersteller deutlich variieren. Typische Durchmesser der Primärpartikel betragen 10 bis 100  $\mu\text{m}$  (Abb. 54a). Ein häufiger Bestandteil der Pulverkomponente ist ein Röntgenkontrastmittel (Bariumsulfat oder Zirkondioxid), wobei typische Partikeldurchmesser 0,5 bis 10  $\mu\text{m}$  betragen (Abb. 54b). Größere Partikelfraktionen werden dabei aus Agglomeraten kleinerer Partikel gebildet (Abb. 55a), die bei der späteren Mischung der Pasten nicht aufgeschlossen werden und daher im ausgehärteten Produkt wieder auffindbar sind.

Ist der Knochenzement mit einem Antibiotikum ausgestattet, ist dieses in der Regel in Form von oft unregelmäßig geformten Teilchen mit typischen Größen von einigen  $\mu\text{m}$  bis einigen 10  $\mu\text{m}$  in der Pulverkomponente enthalten. Diese Teilchen finden sich ebenfalls in unveränderter Form im späteren Zement wieder.



**Abb. 54:** Morphologie der Pulverkomponente von PALACOS<sup>R</sup> R. Das REM-Sekundärelektronenbild (a) zeigt die PMMA-Mikroperlen, das Rückstreuелеktronenbild (b) die Partikel des Röntgenkontrastmittels.



**Abb. 55:** REM-Aufnahme eines Agglomerates aus Röntgenkontrastmittel-Partikeln (a) und zugehöriges EDX-Spektrum (b)

#### 4.2.2 Defekte und Versagensmechanismen konventioneller Knochenzemente

Morphologische Defekte in Knochenzementen auf PMMA-Basis können durch die Zusammensetzung der Ausgangskomponenten oder durch die Bedingungen beim Mischen und Aushärten der Komponenten verursacht werden. Dabei kann man eine Unterteilung in 3 wesentliche Defekttypen treffen.

- **Typ 1: Poren**

Große Poren mit Durchmessern von über 10 μm, die als rissauslösende Defekte wirken, entstehen durch Luft einschluss vornehmlich bei von Hand angemischten Zementen (Abb. 56a). Es wurde nachgewiesen, dass große Poren die entscheidenden Auslöser für Mikrorissbildung, Rissakkumulation und Risswachstum unter zyklischer Wechsellast und damit für das Versagen des Zementköchers und zwangsläufig des gesamten Implantates sind [67]. In Abbildung 57 wird deutlich, auf welche Weise übergroße Poren Risse initiieren. Die großen Poren wirken als Spannungskonzentratoren. Die Lücken zwischen nicht von der sekundär polymerisierten Matrix benetzten Perlen wirken wie Kerben. Solche Poren stellen damit die wesentlichen Schwachpunkte des gesamten Systems dar. Dieses Problem ist seit langem bekannt und muss unter allen Umständen vermieden werden.

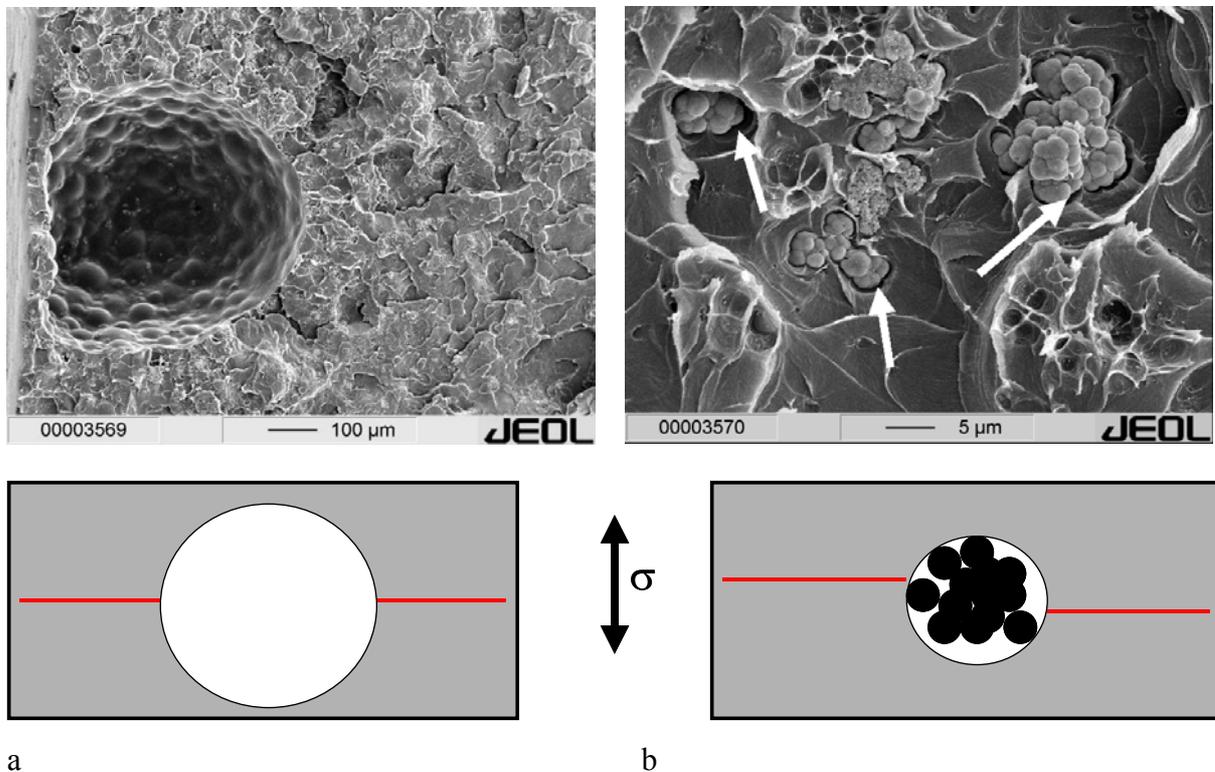
Diese Defekte können durch den Einsatz von Vakuum-Mischsystemen weitgehend unterdrückt werden, wobei jedoch darauf zu achten ist, dass keine Poren durch Gaseinschlüsse durch in die Dampfphase übergehendes Monomer erzeugt werden. Vakuum-

Mischsysteme, die gleichzeitig die Handhabung der Komponenten und die Zementmischung vereinfachen und eine optimale Durchmischung der Pulver- und Flüssigkeitsportionen gewährleisten, finden zunehmende Verbreitung. Der erhaltene Zement ist weitgehend porenfrei. Ein Vergleich der Porositäten verschiedener handgemischter Knochenzemente mit unter Nutzung diverser Mischsysteme hergestellten Zemente ist in [113] gegeben.

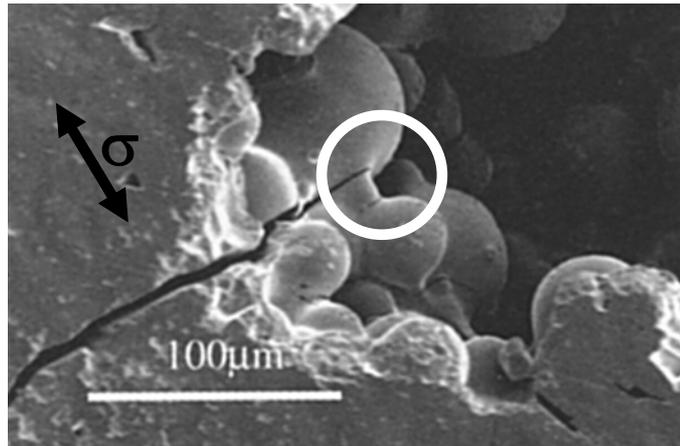
Zu Defekten vom Typ 1 gehören auch mit Blut gefüllte Hohlräume im Zement, die bei der Einbringung in den Knochen entstehen.

- **Typ 2: Partikelagglomerate**

Abhängig vom Typ des verwendeten Röntgenkontrastmittels sind im Zement große Einzelpartikel oder Partikelagglomerate vorhanden, welche ebenfalls Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  überschreiten können. Da diese Partikel bzw. Partikelagglomerate nicht an die Polymermatrix gekoppelt sind, müssen sie ebenfalls als überkritische Defekte gewertet werden. Die mikromechanischen Effekte großer Poren und großer Agglomerate sind vergleichbar. Unter mechanischer Wechsellast wirken sie als rissinitiierende Defekte, wobei die Risseinleitung bezogen auf die Lastrichtung in den Äquatorbereichen der Defekte erfolgt (Abb. 56b).

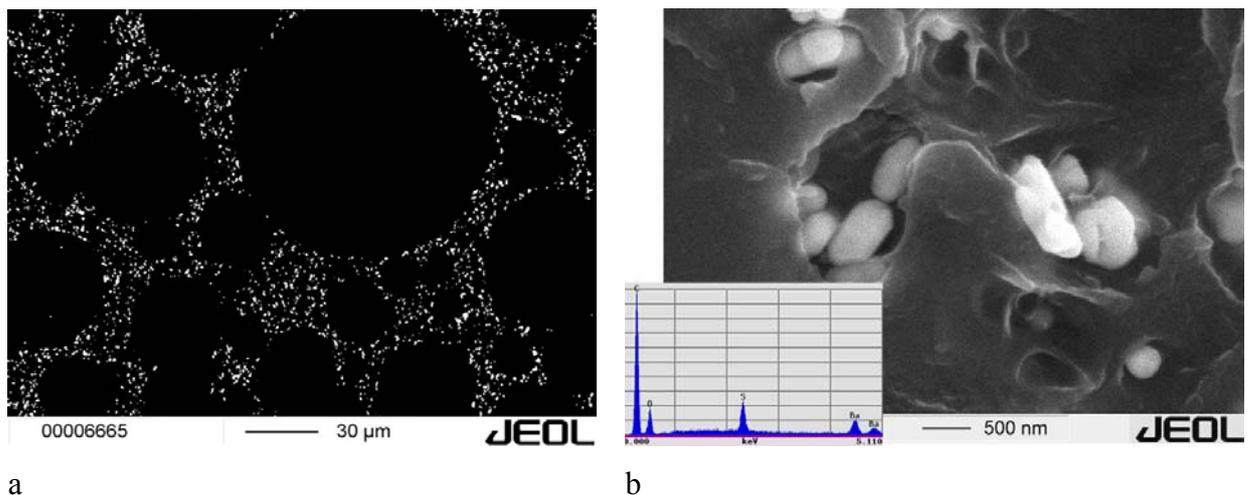


**Abb. 56:** Defekte in Knochenzementen und deren schematische Darstellung: a) Typ 1: große Pore in einem handgemischten Knochenzement (Palacos<sup>®</sup>); b) Typ 2: schlecht an die Matrix gekoppelte Agglomerate des Röntgenkontrastmittels (Palacos<sup>®</sup>); rote Linien: Risseinleitung bei Zugbelastung



**Abb. 57:** Risseinleitung in der Äquatorregion einer großen Pore; Quelle: [68]

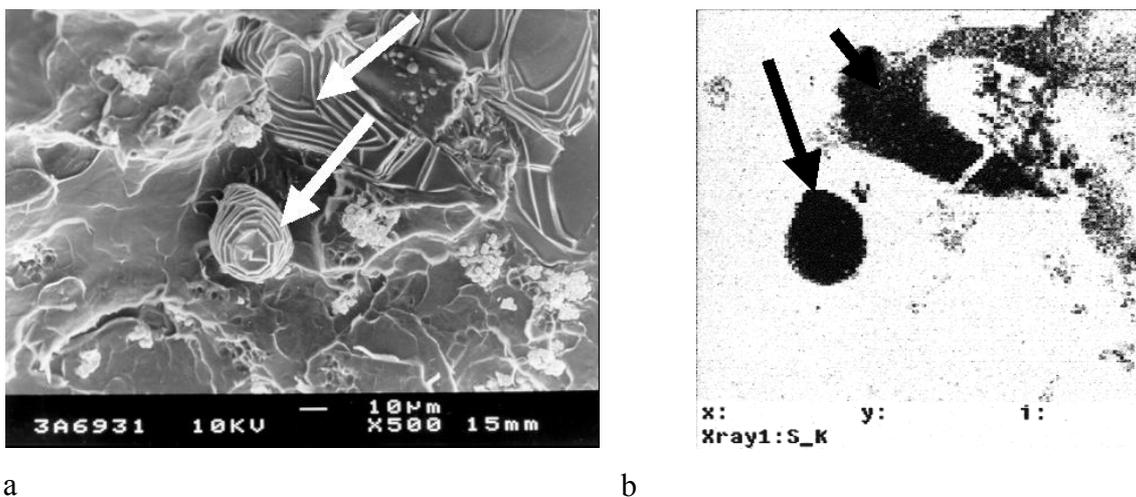
Die für Poren (Luft einschlüsse) getroffenen Aussagen gelten sinngemäß auch für Defekte vom Typ 2. Hier können überkritische Defekte durch die Wahl eines Kontrastmittels mit kleineren, nicht zur Aggregatbildung neigenden Partikeln weitgehend vermieden werden (Abb. 58).



**Abb. 58:** Deutlich verbesserte Partikelgröße bei guter Partikelverteilung in der Matrix durch Verwendung eines nanopartikulärem Röntgenkontrastmittels ( $\text{BaSO}_4$ , Antibiotic Simplex<sup>®</sup>); a) Bruchfläche des Systems; Rückstreuelektronen-Materialkontrast, b) Partikelmorphologie und zugehöriges EDX-Spektrum

Als Defekte vom Typ 2 können weiterhin große, ebenfalls als partikuläre Einschlüsse auftretende Antibiotika-Beigaben kategorisiert werden (Abb. 59). Die REM-Aufnahme und das zugehörige Elementverteilungsbild zeigen bis zu 50  $\mu\text{m}$  große Einschlüsse. Solche Defekte könnten durch eine geeignete Aufbereitung des Antibiotikums vermieden werden. Andererseits wird aber mitgeteilt, dass durch die Verwendung von pulverförmigen

Antibiotika mit Partikelgrößen von 50 bis 100  $\mu\text{m}$  eine signifikant verbesserte Freisetzungskinetik erreicht wird, d.h. die Konzentration des Antibiotikums kann längere Zeit auf einem wirksamen Niveau gehalten werden [114]. Dies ist vermutlich auf einen geometrischen Effekt zurückzuführen: Da angenommen werden kann, dass nur die von der Materialoberfläche her zugängliche Bestandteil pharmazeutisch wirksam werden kann, spielen Partikelgröße und Partikelverteilung eine große Rolle. Treten größere Partikel an die Oberfläche des Zementes, so wird dadurch eine relativ große Menge des in die PMMA-Matrix eingeschlossenen Antibiotikums zugänglich.



**Abb. 59:** Weitere Defekte vom Typ 2: Grosse Partikel des Antibiotikums Gentamicinsulfat (Refobacin Palacos®); a) Bruchfläche, b) EDX-Elementverteilungsbild für das Element S

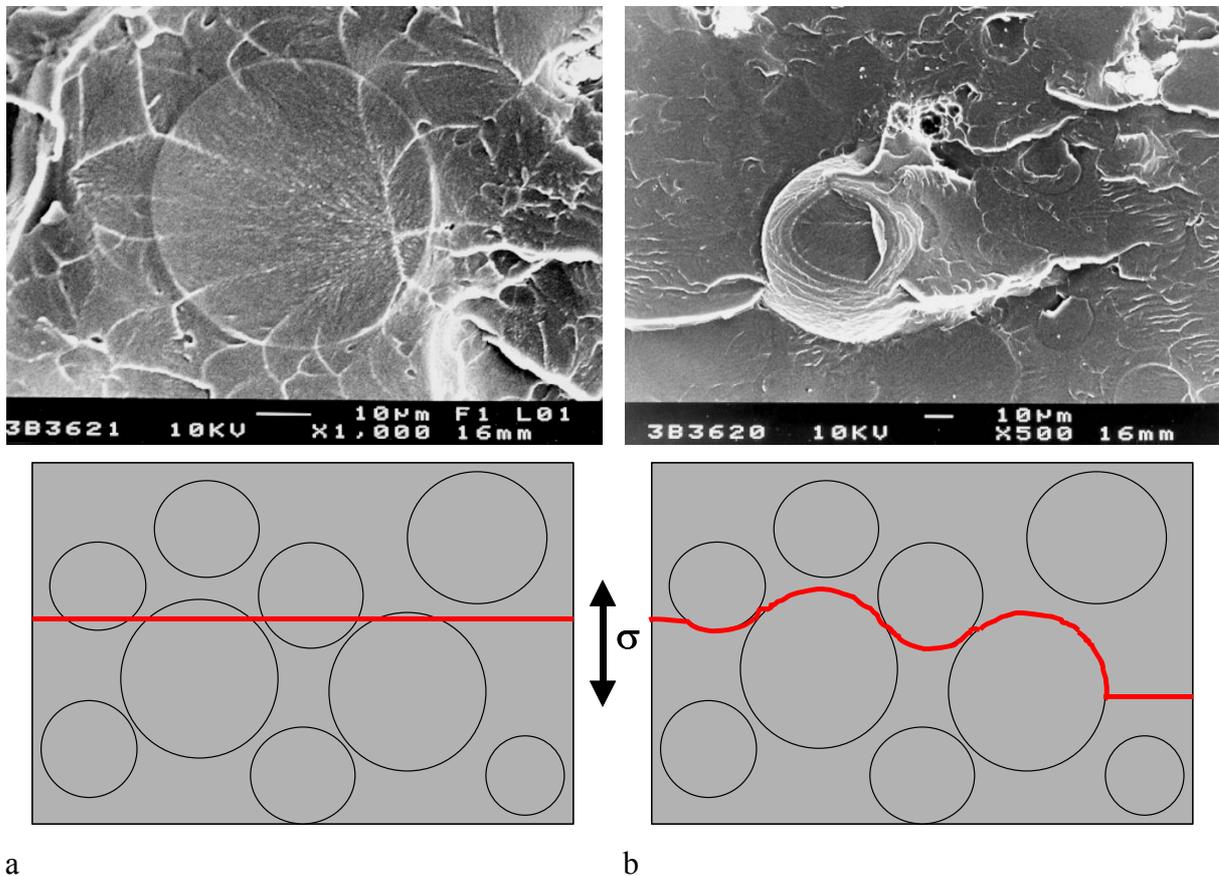
- **Typ 3: Unzureichende Kopplung von primären Polymerperlen an die Matrix**

Unzureichend an die sekundär polymerisierte Matrix angekoppelte Perlen des vorgelegten PMMA-Pulvers wirken als Sollbruchstellen. Da die Partikel selbst (siehe Abb. 54a) bis 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser aufweisen, sind auch diese Defekte als überkritisch anzusehen. Eine solche Situation ist in Abbildung 60b dargestellt. Zum Vergleich zeigt Abbildung 60a einen transpartikulären Bruchverlauf bei guter Kopplung.

- **Andere Defekte**

Zusätzlich können im Verlauf der Operation Fehlstellen eingetragen werden. So können z.B. schon erwähnte Bluteinschlüsse auftreten, welche als porenartige Fehlstellen (Typ 1) zu werten sind. Möglicherweise werden Knochenfragmente, die bei der Ausarbeitung des Implantatlagers im Knochen anfallen, als Fremdkörper in den eingebrachten Zementteig eingearbeitet (Typ 2). Eine unzureichende Mischung der Komponenten kann u. U. dazu

führen, dass der Knochenzement nicht vollständig aushärtet oder Regionen existieren, in denen Primärperlen nicht an die sekundär polymerisierte Matrix angekoppelt sind (Typ 3).



**Abb. 60:** Bruchflächen von Gewaltbrüchen eines Knochenzementes und schematische Darstellung der Risswege (rote Linien): a) gute Partikel-Matrix-Kopplung, b) Defekt vom Typ 3: unzureichende Kopplung von primären PMMA-Perlen an die sekundär polymerisierte PMMA-Matrix

**Fazit:**

Knochenzemente auf der Basis von PMMA werden seit Jahrzehnten mit großem Erfolg eingesetzt. Das Material erweist sich, auch im Hinblick auf gut eingespielte Routinen im Operationssaal und die ausgezeichnete Produktpflege und -überwachung von Seiten der Hersteller, als hervorragend geeignet und stellt heute einen „goldenen Standard“ dar. Akrylische Knochenzemente haben den millionenfachen Einsatz von totalen Knie- und Hüftgelenksendoprothesen erst ermöglicht. Auch solche Aspekte sollten, bei allen bekannten Nachteilen, als Argument *pro* Biokompatibilität angesehen werden.

Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass die beschriebenen morphologischen Defekte nach vielen Wechsellastzyklen eine Desintegration des Zementknochens und damit ein Versagen des Implantates zur Folge haben. Daher bestehen folgende Forderungen:

- Poren (Defekte Typ 1) müssen vermieden werden.
- Partikel und Agglomerate (Typ 2) sollten unterkritische Durchmesser aufweisen ( $< 10 \mu\text{m}$ , besser  $< 1 \mu\text{m}$ )
- Die Mischung muss so erfolgen, dass eine gute Haftung von Primärpartikeln und sekundär polymerisierter Matrix vorliegt.

Andere Aspekte, wie Toxizität des verwendeten Monomers und der Aktivator-Initiator-Systeme, Polymerisationswärme und -schrumpfung usw. werden in diesem Zusammenhang und an dieser Stelle nicht diskutiert.

### **4.3 Morphologie und Eigenschaften partiell resorbierbarer Modellsysteme**

Mit dem Ziel der Überwindung oben beschriebener Nachteile konventioneller Knochenzemente wurde von SANDNER et al. ein partiell resorbierbarer, aushärtbarer und potentiell bioaktiver Knochenzement entwickelt [85-93] (Abschnitt 3.1.3). Dieser sollte bei geringerer Toxizität der Ausgangskomponenten bzw. geringeren Anteilen toxischer Substanzen, insbesondere der gewählten Aktivator-Initiator-Kombination, verminderter Wärmeentwicklung im Zuge der Polymerisation und minimiertem Polymerisationsschrumpf die an Knochenzemente gestellten mechanischen Mindestanforderungen erfüllen und nach üblichen Verfahren in den Knochen eingebracht werden können (Abschnitt 2.2.3). Eine Zielstellung war, dass durch partielle Resorption der Polymermatrix Fehlstellen erzeugt werden, in die der neu gebildete Knochen einwachsen kann. Damit könnte eine intensive Verzahnung von Zement und Knochen herbeigeführt werden. Das gerichtete Wachstum des Knochens (Osteokonduktion) wird dabei durch den bioaktiven Füllstoff Hydroxylapatit moderiert. Idealerweise sollte die Resorption des Knochenzementes mit der Neubildung von Knochen synchronisiert verlaufen: In dem Maße, wie das Implantat desintegriert wird, nimmt Knochen substanz die entstehenden Freiräume ein, wodurch eine gewisse Kontinuität der mechanischen Stabilität des Verbundes gewährleistet werden sollte. Schließlich sollte der synthetische Zement vollständig von gesundem, körpereigenem Knochen substituiert sein. Es liegen umfangreiche Ergebnisse zu Makromonomerumsatz, Reaktionskinetik, mechanischen und thermischen Eigenschaften, Quellung, Abbauverhalten u.a. vor. Bei allen Arbeiten wurde zunächst von stark vereinfachenden Morphologiemodellen ausgegangen, durch die die realen Strukturen nicht richtig wiedergegeben wurden [85, 86, 93]. Insbesondere sind hier die Größenverhältnisse von Vernetzungspunkten, resorbierbaren Seitenketten und den Füllstoffteilchen nicht berücksichtigt. Die Möglichkeit der Ausbildung von Mikro- bzw. Nanostrukturen durch Phasenseparation wurde nicht diskutiert.

Da mechanische Eigenschaften, Verarbeitungseigenschaften und Abbauverhalten neben der chemischen Zusammensetzung des vernetzungsfähigen Systems auch von der Morphologie abhängen, müssen möglichst alle relevanten Strukturebenen im Nanometer- und Mikrometerbereich erfasst werden. Durch Steuerung der Morphologie könnte eine Steuerung des Abbauverhaltens und damit der Zugänglichkeit einer wirksamen Komponente, der Verarbeitungseigenschaften, des Verlaufes der Vernetzungsreaktion und schließlich der mechanischen Eigenschaften des Endproduktes möglich werden. Ziel der hier vorgestellten Arbeiten ist, ein korrektes Modell zur Morphologie der neuartigen Knochenzemente zu

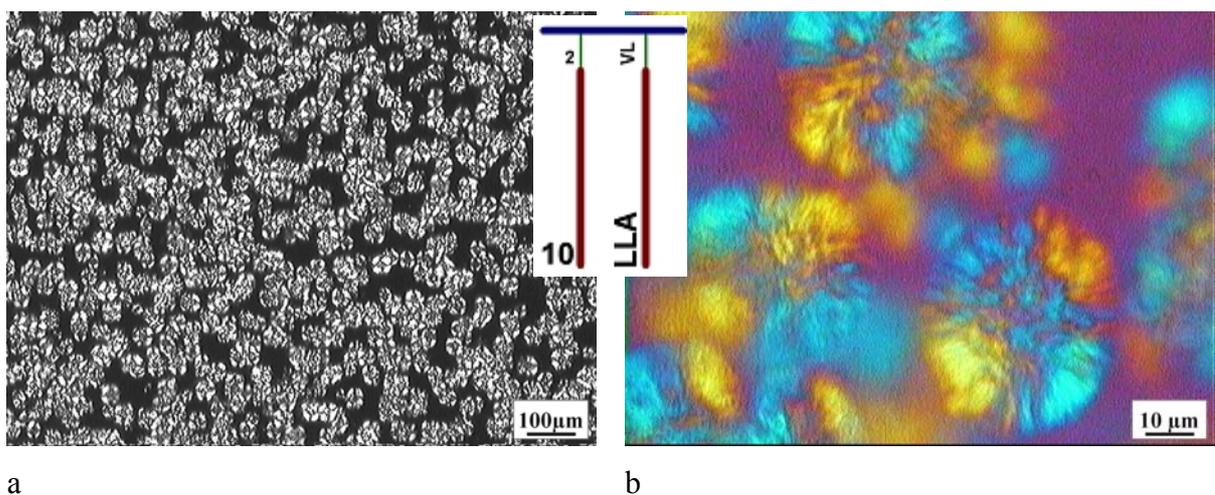
entwerfen. Dazu soll zunächst die Morphologieanalyse der Polymermatrix des neuen Systems erfolgen, die dann durch die Untersuchungen zur Kompositmorphologie ergänzt wird. Zur Lösung der Aufgabenstellung war es erforderlich, zunächst geeignete Verfahren zur Abbildung der Mikro- und Nanostruktur zu entwickeln und zu erproben. Von den aus den umfangreichen Strukturuntersuchungen zahlreich vorliegenden Aufnahmen werden nur einige exemplarisch gezeigt.

#### 4.3.1 Morphologie der Polymermatrix: Variation der molekularen Architektur

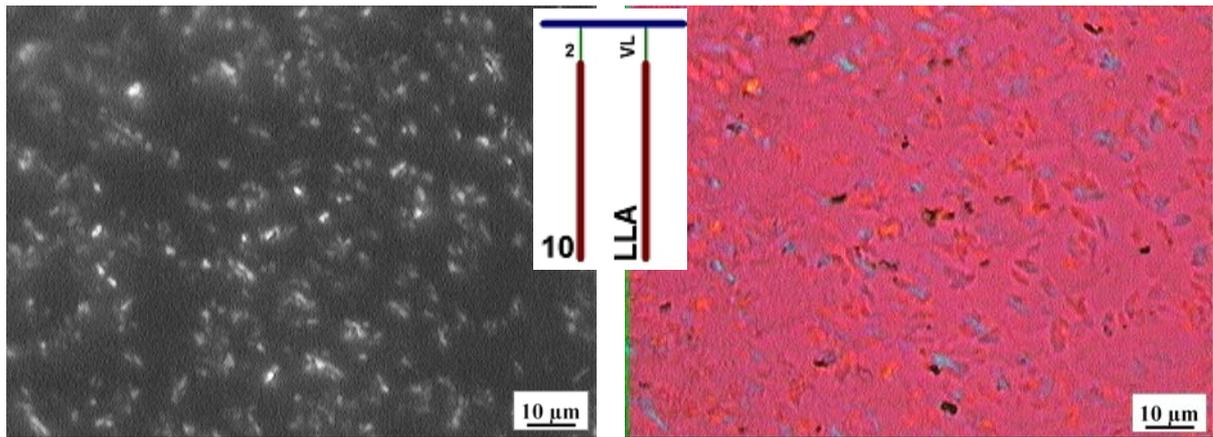
##### a) Ergebnisse der polarisationsmikroskopischen Untersuchungen

Betrachtet man zunächst die aus Makromonomeren mit relativ kurzen Oligolacton-Seitenketten aufgebaute Systeme, sind sowohl in den flüssigen Pasten als auch in den vernetzten Systemen lichtmikroskopisch keinerlei kristalline Strukturen erkennbar.

Im Gegensatz dazu zeigen alle in dieser Arbeit untersuchten Systeme mit OligoLLA-Seitenkettenlängen  $n \geq 8$  eine ausgeprägte, lichtmikroskopisch nachweisbare Struktur. So zeigt das 12 Monate bei Raumtemperatur (23°C) gelagerte System  $B^1VL^2LLA^{10}$  (Mg,stu)-*co*-TEGDMA (Abb. 61) eine sphärolithische Morphologie, wobei die Sphärolithe noch nicht das gesamte Volumen einnehmen, d.h., das radiale Wachstum der Sphärolithe ist nicht abgeschlossen. Die Sphärolithdurchmesser, welche eine sehr enge Verteilung aufweisen, betragen ungefähr 40  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 61:**  $B^1VL^2LLA^{10}$  (Mg,stu)-*co*-TEGDMA; Pasten nach ca. 12monatiger Lagerung (RT) vernetzt  
a) Übersichtsaufnahme, Polarisatoren in Dunkelstellung, b) Ausschnitt (Polarisatoren in Dunkelstellung,  $\frac{1}{4} \lambda$ -Plättchen)



a

b

**Abb. 62:** B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA; Pasten unmittelbar nach Synthese vernetzt (Lagerzeit weniger als 7 Tage): a) Polarisatoren in Dunkelstellung, b) Polarisatoren in Dunkelstellung, ¼ λ-Plättchen)

Eine andere Morphologie wird beobachtet, wenn die flüssigen Pasten unmittelbar nach der Makromonomersynthese bzw. nach relativ kurzer Lagerzeit vernetzt und lichtmikroskopisch untersucht werden. Abbildung 62 zeigt die Morphologie des im vorhergehenden Absatz behandelten Systems B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup> (Mg,stu)-co-TEGDMA nach nur 7 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur. Bei höheren Vergrößerungen findet man kleinere, unregelmäßig geformte Kristallite mit maximalen Längsausdehnungen von wenigen μm. Eine sphärolithische Überstruktur wird nicht beobachtet

Zwei Beobachtungsergebnisse sind von besonderem Interesse:

- 1) Die Ausprägung der sphärolithischen Morphologie hängt in starkem Maße von der Lagerungszeit der flüssigen Pasten ab.
- 2) Die für die nicht ausgehärteten Pasten festgestellte sphärolithische Textur wird während der Vernetzung der Pasten nicht verändert.

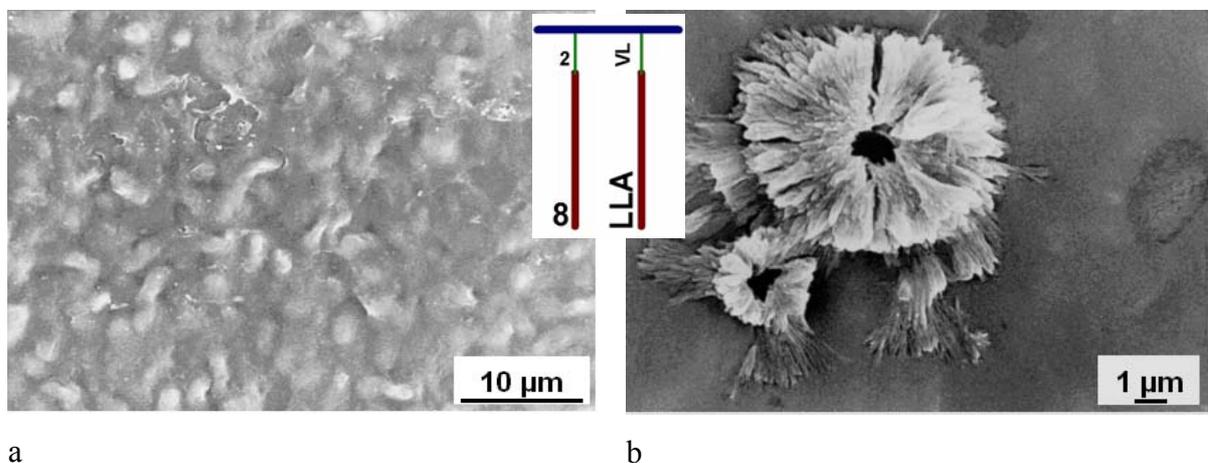
Die in den Pasten im flüssigen Zustand im Laufe der Lagerzeit ausgebildete Morphologie wird durch die Vernetzungsreaktion fixiert. Allerdings kann man durch mechanische Einwirkung (intensives Mischen, starker Druck auf die zwischen Glasobjektträger und Deckgläschen befindlichen Pasten) die Sphärolithe vollständig zerstören, wobei diese in kleinere Fragmente in Form doppelbrechender Kristallite zerfallen. Es ist anzunehmen, dass die in den Pasten ablaufenden zeitabhängigen Kristallisationsvorgänge Konsequenzen für den Verlauf von Vernetzungsreaktionen haben.

b) Ergebnisse der REM-Untersuchungen an geätzten Proben

▪ Oberflächen

Allen Systemen, die oligomeres DLA bzw. LLA mit Seitenkettenlängen  $n = 6$  enthalten, fehlen signifikante Strukturdetails, die auf eine teilkristalline Überstruktur (z.B. Sphärolithe, Garben) bzw. mikroskopische Heterogenitäten (z.B. Lochbildung durch selektive Entfernung einer separierten Phase) hindeuten könnten. Weder durch die Ätzung mit einer Säure noch durch die Behandlung mit Methylamin wurden rasterelektronenmikroskopisch auswertbare Strukturdetails freigelegt. Gelegentlich traten präparationsbedingte Artefakte auf (z.B. Mikrorissbildung nach Methylaminätzung). Die bei allen Systemen beobachteten Oberflächenstrukturen (Globuli mit Durchmessern von einigen  $\mu\text{m}$ ) werden nicht als mögliche morphologische Einheiten behandelt, da diese bei den weiter unten diskutierten Sprödruchflächen ausnahmslos fehlen.

Beim Übergang zu Systemen mit längeren LLA- bzw. DLA-Seitenketten ( $n \geq 8$ ) treten nach Anwendung der verschiedenen Ätzverfahren Strukturdetails zutage, die als morphologische Einheiten der Polymermatrix interpretiert werden können. Die Darstellung dieser morphologischen Details kann sich dabei in Abhängigkeit vom verwendeten Ätzmittel unterscheiden.



**Abb. 63:** Oberfläche des Systems  $B^1VL^2LLA^8(Mg,stu)-co-TEGDMA$  nach a) Essigsäure-Ätzung, b) Ätzung mit Ameisensäure

Die Übersichtsaufnahme der mit Essigsäure geätzten Oberfläche des Systems  $B^1VL^2LLA^8(Mg,stu)-co-TEGDMA$  (Abb. 63a) zeigt eine wurmartige Struktur, wobei die erkennbaren Einheiten Längen von einigen  $\mu\text{m}$  aufweisen. Möglicherweise handelt es sich bei den hier freigelegten, nach Ätzung als Erhebungen über dem stärker abgetragenen Untergrund

verbleibenden Strukturen um jene doppelbrechenden, also kristallinen Bereiche, die bereits lichtmikroskopisch für ein ähnliches System nachgewiesen wurden ( $B^1VL^2LLA^{10}$  (Mg,stu)-*co*-TEGDMA, Abb. 62). Vereinzelt findet man in derselben Probe nach Ätzung mit Ameisensäure die in Abbildung 63b dargestellte sphärolithartige Struktur. Ausgehend von einem Bildungszentrum wachsen Lamellenbündel nach außen. Insbesondere in den äußeren Ausläufern dieser Gebilde tritt der lamellenartige Charakter deutlich zutage. Die für eine ähnliche Struktur aufgenommene Verteilungskarte der durch EDX nachgewiesenen Elemente (*EDX-mapping*) zeigt, dass in diesen Fällen sehr wahrscheinlich die Reste des verwendeten Katalysators MgO als Keime wirken.

Die starke Ähnlichkeit mit aus teilkristallinen Polymeren bekannten Sphärolithen und der Vergleich mit den für ein ähnliches System erstellten lichtmikroskopischen Aufnahmen (z.B. Abb. 61) lassen den Schluss zu, dass es sich hier um Sphärolithe im frühen Bildungsstadium handelt. Der Vergleich mit den oben genannten polarisationsmikroskopischen Aufnahmen legt außerdem nahe, dass die im REM-Bild sichtbaren, im Wesentlichen radial vom zentralen Bildungszentrum nach außen verlaufenden Lamellen kristallin sind.

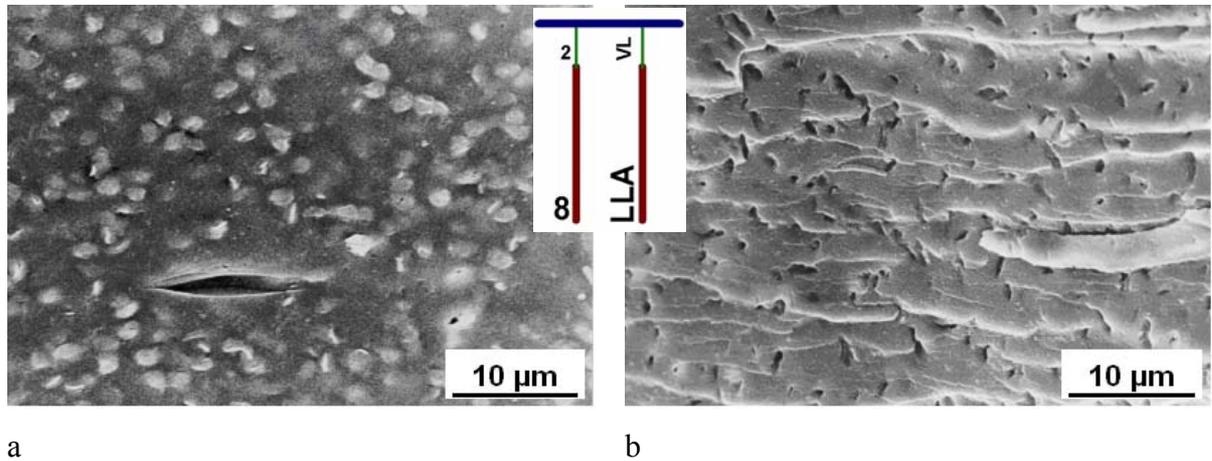
#### ▪ Bruchflächen

Zusätzliche Bruchflächenuntersuchungen erfolgten zum einen mit dem Ziel, die ggf. durch die bei der Aushärtung in einer Form eingepprägten Oberflächenstrukturen auszuschließen. Zum anderen sollte geprüft werden, ob Variationen der Morphologie über den Probenquerschnitt vorliegen. Darüber hinaus hat sich ergeben, dass die relativ glatten Sprödbrechflächen ein deutlich besseres Ätzergebnis ermöglichen.

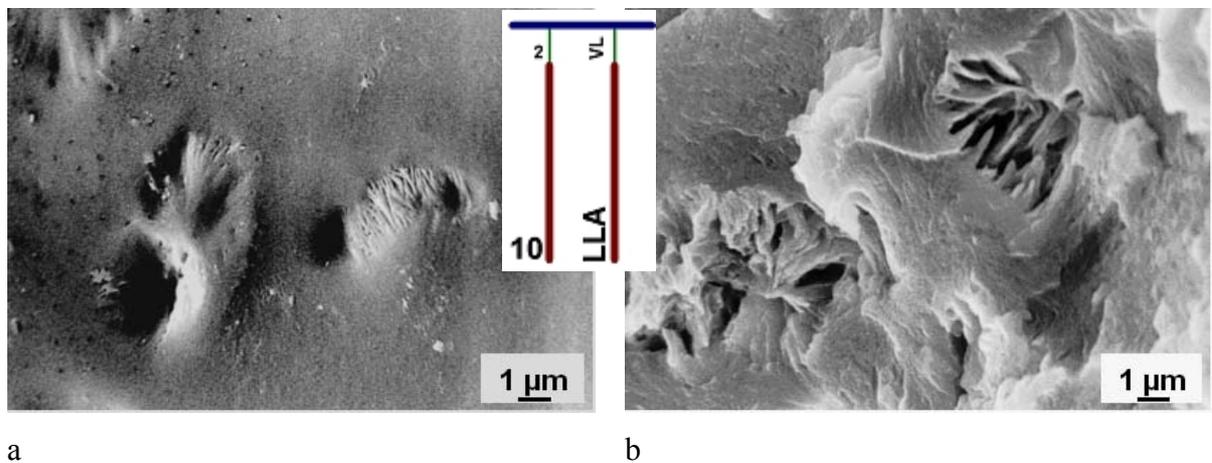
Bei hohen Vergrößerungen treten bei den zuvor als lichtmikroskopisch und rasterelektronenmikroskopisch amorph charakterisierten Proben mit kurzen Seitenketten ( $n = 6$ ) lamellare Strukturen hervor, die jedoch erst nach Anwendung digitaler Bildbearbeitung äußerst schwach erkennbar werden. Es lag nahe, durch Verwendung eines höher auflösenden REM (ESEM mit Feldemissions-Elektronenquelle) eine tiefere Einsicht in die sich andeutenden lamellaren Strukturen zu erhalten. Allerdings hat sich gezeigt, dass die durch Ätzung erzielbaren Strukturdetails keine über die hier vorgestellten Ergebnisse hinausreichenden Erkenntnisse zulassen. Ob tatsächlich sehr feine lamellare Strukturen vorliegen ist durch Einsatz weiterführender elektronenmikroskopischer Techniken zu klären (TEM nach geeigneter Kontrastierung, siehe unten).

Durch Ätzung der Bruchflächen mit Essig- bzw. Ameisensäure treten die auch schon an den Oberflächen der Systeme mit längeren Seitenketten ( $n \geq 8$ ) beobachteten Überstrukturen auf.

Es handelt sich um einige  $\mu\text{m}$  große, sphärolithartig bzw. garbenförmig organisierte Verbünde von Lamellen (Abb. 64a und Abb. 65a), welche nach Säureätzung als Erhebungen hervortreten. Im Gegensatz dazu scheint eine Ätzung mit Methylamin diese Bereiche bevorzugt zu entfernen (Abb. 64b).



**Abb. 64:** Bruchflächen des Systems  $B^1VL^2LLA^8(Mg,stu)\text{-}co\text{-}TEGDMA$  nach Ätzung mit a) Essigsäure, b) Methylamin



**Abb. 65:** Bruchflächen des Systems  $B^1VL^2LLA^{10}(Sn,p1l)\text{-}co\text{-}TEGDMA$  nach Ätzung mit a) Ameisensäure, b) Methylamin

Besonders deutlich ausgeprägte sphärolithische Strukturen finden sich für das System  $B^1VL^2LLA^{10}(Mg,stu)\text{-}co\text{-}TEGDMA$ . REM-Übersichtsaufnahmen belegt, dass 5 bis 10  $\mu\text{m}$  große Sphärolithe vorliegen, die jedoch noch nicht das gesamte verfügbare Volumen einnehmen. Dieser Befund erinnert stark an die im Polarisationsmikroskop für dieses System gemachten Beobachtungen (Abb. 61), wobei die für die REM-Aufnahmen festgestellten

kleineren Sphärolithdurchmesser auf eine kürzere, leider nicht bekannte Lagerzeit der zu diesen Proben verarbeiteten Pasten zurückführbar sein könnten.

Die in Abbildung 65 wiedergegebenen garbenförmigen, aus Lamellenstapeln gebildeten Überstrukturen repräsentieren das System  $B^1VL^2LLA^{10}(Sn,pll)-co-TEGDMA$ , welches sich durch die Verwendung eines anderen Katalysatorsystems (SnOct) von dem in Abb. dargestellten System (Katalysator MgO) unterscheidet. Hier wird der Ursprung der im Lichtmikroskop bei nur sehr kurz gelagerten Pasten sichtbaren doppelbrechenden, wurmartigen Strukturen (Abb. 62) deutlich: Die nur rudimentär ausgebildete Überstruktur besteht aus lokal begrenzten Bereichen parallel gelagerter Lamellen bzw. den „Kernen“ von Sphärolithen. Die maximale Ausdehnung dieser geordneten Bereiche beträgt wenige  $\mu m$ . Für diesen Befund gibt es zwei mögliche Erklärungen:

- 1) Die Lagerzeit der Pasten war zu gering, um die Bildung größerer sphärolithischer Überstrukturen zu ermöglichen,
- 2) Die bei Pastenmischung eingetragene mechanische Energie (Scherung) hat die in der flüssigen Phase gebildeten Überstrukturen zerstört.

Für den letztgenannten Fall spricht die im weiter oben behandelten Abschnitt beschriebene Beobachtung, dass die im Polarisationsmikroskop sichtbaren Sphärolithe bei Scherung der Pasten in kleinere, in der Flüssigphase schwimmende Kristallite zerfallen.

Der Vergleich der Bilder Abbildung 65 a und b zeigt, dass die verschiedenen Ätzverfahren unterschiedliche selektive Wirkung auf die kristallinen Bereiche haben: Säureätzung bewirkt einen stärkeren Abbau des umgebenden, amorphen Materials (Dimethacrylat-Komponente), wodurch die kristallinen Bereiche erhaben aus dem Probenrelief hervortreten, während Methylamin die kristallinen Strukturen (Oligolacton-Komponente) bevorzugt abbaut und zu einer Lochbildung führt.

### c) Ergebnisse der TEM-Untersuchungen an kontrastierten Proben

Aus den u.a. von GOPP erbrachten Befunden aus DSC- und Röntgenstrukturuntersuchungen geht hervor, dass die untersuchten Systeme bei Erreichen einer kritischen oligomeren Seitenkettenlänge eine teilkristalline Morphologie aufweisen können [86, 87, 89]. In dieser Arbeit wurde bisher nachgewiesen, dass sowohl die Mischungen aus Makromonomeren und Verdünnermonomeren (Pasten) als auch deren ausgehärteten Vernetzungsprodukte bei Erreichen einer kritischen OligoLLA-Seitenkettenlänge ( $n \geq 8$ ) im Polarisationsmikroskop

doppelbrechende Strukturen zeigen, welche auf das Vorliegen einer teilkristallinen Morphologie hinweisen. Diese Ergebnisse werden durch die vorgestellten REM-Aufnahmen geätzter Proben unterstützt. Darüber hinaus liegen bisher keine konkreten Vorstellungen zur Morphologie der Matrix vor. Mit Hinblick auf den möglichen Einfluss der Morphologie auf das mechanische Eigenschaftsniveau und das Abbauverhalten der neuartigen, resorbierbaren Knochenzemente ist eine weitergehende, die nanoskopische Strukturebene einschließende Aufklärung der Morphologie erforderlich.

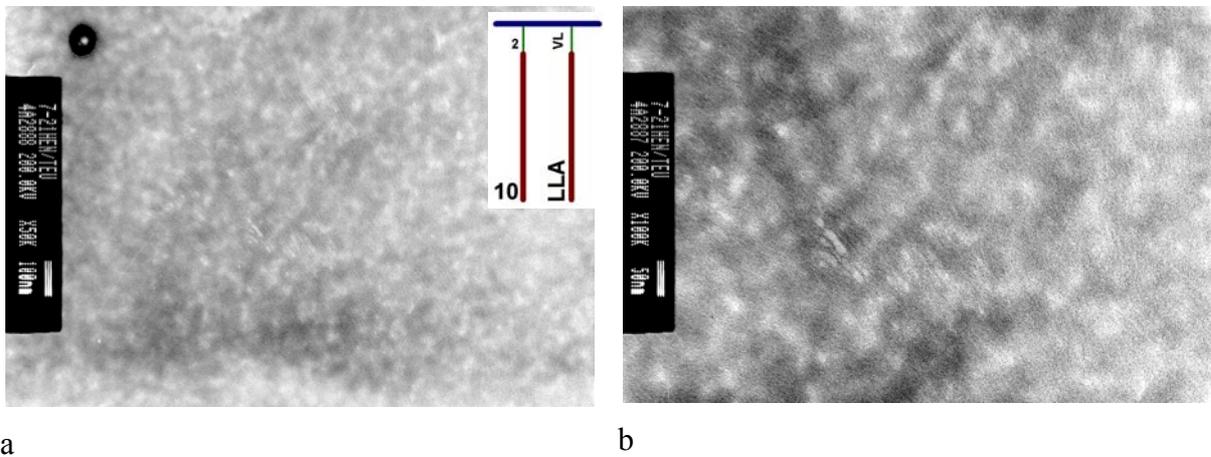
- Kontrastierung mit RuO<sub>4</sub>

Als wenig erfolgreich erwies sich die klassische, einstufige Kontrastierung durch RuO<sub>4</sub>. Selbst nach relativ langer Lagerung der Proben in RuO<sub>4</sub>-Dampf konnte nur ein unbefriedigendes Ergebnis erreicht werden. Der erzielte Kontrast ist relativ schwach. Eine Stabilisierung (Fixierung) gegen Schädigung bei Elektronenbeschuss konnte nicht erreicht werden; die Proben zeigten sich im TEM ausgesprochen elektronenstrahlempfindlich. Eine Nachkontrastierung der Ultradünnschnitte brachte keine Verbesserung. Die Abbildung 66 zeigt typische Resultate.

Auffallend für alle untersuchten Systeme sind die globularen oder körnigen Strukturen (Abb. 66a). Die sich abwechselnden hellen (nicht oder schwach angefärbten) und dunklen (stark angefärbten) Bereiche haben Durchmesser von 10 bis 30 nm. Da das verwendete Kontrastierverfahren in erster Linie durch Diffusionsprozesse und damit auch durch die Dichte des vorhandenen Materials gesteuert wird, könnten die so sichtbar gemachten Strukturdetails als lokale Dichteunterschiede interpretiert werden. Weil es sich bei den hier vorliegenden Proben um hoch vernetzte Systeme handelt, könnte dieser Kontrast als lokale Variationen der Vernetzungsdichte erklärt werden.

Bei höheren Vergrößerungen (Abb. 66b) erkennt man die äußerst schwache, erst nach Entwicklung des im TEM belichteten Negatives sichtbare Andeutung einer lamellaren Struktur. Aufgrund der sehr schwach ausgeprägten Kontraste ist eine quantitative Analyse der Lamellendickenverteilung nicht sinnvoll. Es kann jedoch abgeschätzt werden, dass die Lamellendicken deutlich unter 10 nm liegen. Das bedeutet, dass neben der als Fluktuation der Vernetzungsdichte interpretierbaren, körnigen Struktur eine weitere, feinere Strukturebene existiert, welche direkt mit der molekularen Architektur der (Makro-) Monomere verknüpft sein muss. Die Kontrastentstehung könnte ebenfalls auf Dichteunterschiede im Material zurückführbar sein. So ist zu erwarten, dass eine ggf. vorhandene kristalline Komponente

etwas schwerer färbbar sein und damit im TEM-Bild heller erscheinen sollte als die umgebende amorphe, leichter färbbare Phase.



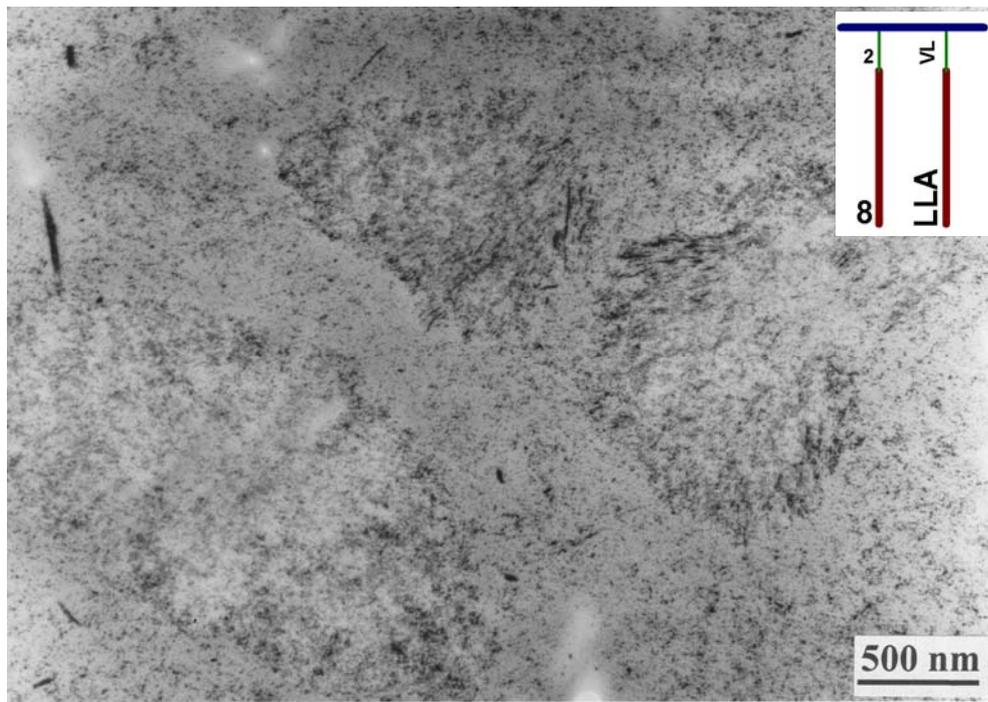
**Abb. 66:** Morphologie der Probe B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Mg,stu)-*co*-TEGDMA; a) globulare Morphologie, b) Ausschnittvergrößerung mit Andeutung einer lamellaren Struktur; TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes, 90 min Kontrastierung in RuO<sub>4</sub>

- Mehrstufige Kontrastierung mit OsO<sub>4</sub>

Gute Ergebnisse konnten mit den für die diskutierten Systeme neu entwickelten, mehrstufigen Kontrastierverfahren erzielt werden (siehe 3.4.2). Diese sprechen gezielt auf Unterschiede im chemischen Aufbau der Komponenten an (vernetzte Methacrylat-Rückgratketten bzw. Methacrylat-Verdünermonomere und oligomere Lactid-Seitenketten). Durch einen ersten Schritt (Ätzung) werden Komponenten selektiv vorgeschädigt. Anschließend wird in einem zweiten Schritt (Kontrastierung) Osmium in geschädigte Bereiche eingelagert bzw. durch chemische Reaktion gebunden. Anhand der Unterschiede im Kontrast der mit Säure bzw. mit Methylamin vorbehandelten Proben sowie unter Berücksichtigung der bei der REM-Untersuchung geätzter Proben beobachteten Unterschiede kann folgendes Modell der Kontrastierwirkung vorgeschlagen werden:

- Durch Methylamin-Ätzung wird die Oligolactid-Komponente bevorzugt geschädigt und durch nachfolgende Behandlung mit OsO<sub>4</sub> stärker eingefärbt. Die durch partielle Kristallisation der Oligolacton-Seitenketten entstehenden sphärolithartigen Überstrukturen (Domänen mit hohem Anteil an Oligolactid) erscheinen als dunkel eingefärbte Bereiche auf hellem, weniger stark gefärbtem Hintergrund (s. Abb. 67).

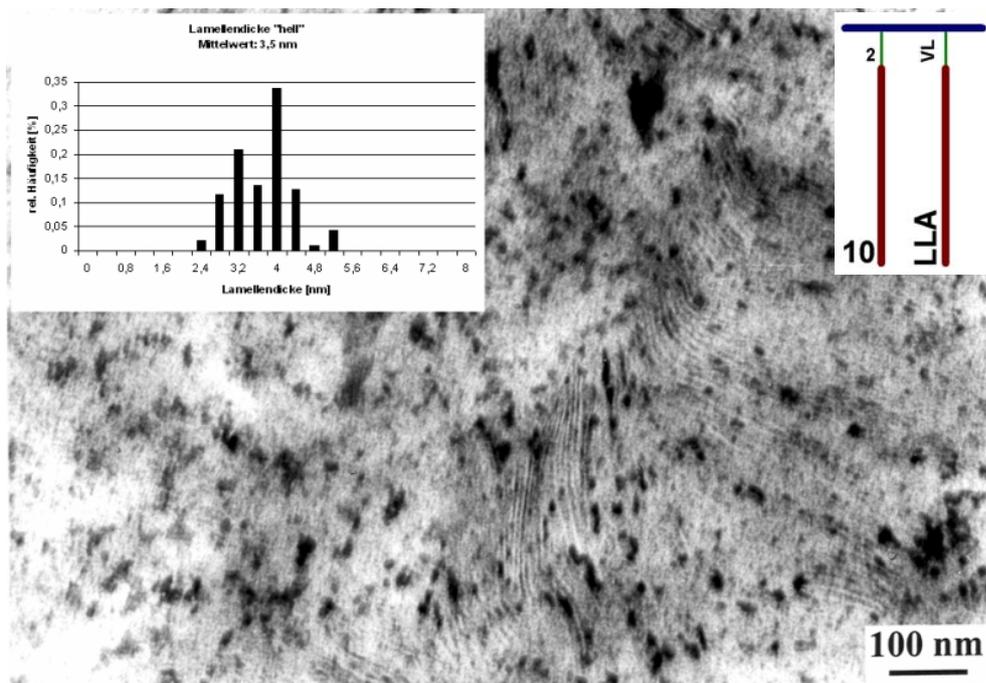
- Durch Säureätzung (Essigsäure bzw. Ameisensäure) wird die Dimethacrylat-Komponente bevorzugt geschädigt und anschließend stärker durch  $\text{OsO}_4$  angefärbt. Der entstehende Kontrast hebt ggf. vorhandene sphärolithartige Strukturen (höherer Oligolactid-Anteil mit geringerer Empfindlichkeit) als helle Struktur vor stark angefärbtem amorphem (methacrylatreichem) Hintergrund hervor



**Abb. 67:** Morphologie der Probe  $\text{B}^1\text{VL}^2\text{LLA}^8(\text{Mg,stu})\text{-co-TEGDMA}$ ; TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes nach Ätzung in Methylamin und Kontrastierung mit  $\text{OsO}_4$

In den bei höheren Vergrößerungen erhaltenen TEM-Bildern offenbart sich eine schlierenartige Anordnung von Paketen parallel verlaufender Lamellen (Abb. 68). Entsprechend den diskutierten Vorstellungen zur Kontrastentstehung muss die nach Säureätzung und anschließender Behandlung mit  $\text{OsO}_4$  erhaltene TEM-Abbildung folgendermaßen interpretiert werden: Die hell erscheinenden Lamellen repräsentieren die (kristallinen) Oligolacton-Domänen, welche weniger empfindlich gegen die chemische Vorbehandlung und die nachfolgende  $\text{OsO}_4$ -Einwirkung sind. Die dunkel erscheinenden Domänen sind Lamellen des amorphen Materials der Rückgratketten und möglicherweise des verträglichen Verdünnermonomers. Für die Lamellendicken  $D_1$  der hell kontrastierten Oligolacton-Domänen wurde ein Mittelwert von 3,5 nm ermittelt. Der Mittelwert für die Lamellenabstände (Dicke der dunklen Domänen  $D_a$ ) beträgt hier 4,0 nm. Während die Lamellendickenverteilung relativ eng ist (Einfügung in Abb. 68), weisen die

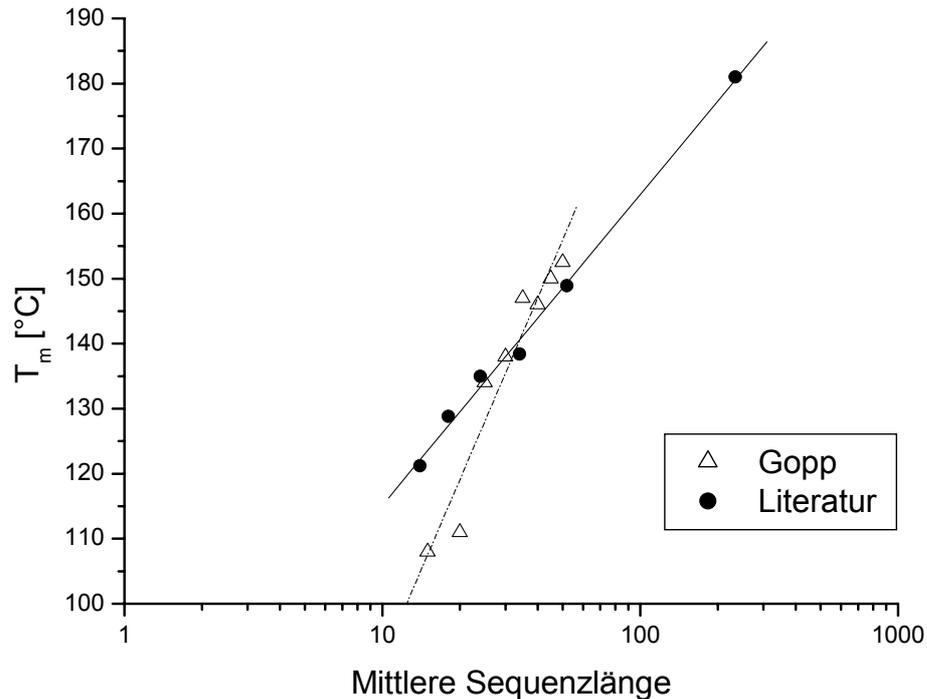
Lamellenabstände eine starke Streuung auf. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die zu teilkristallinen Lamellen organisierten Oligolacton-Seitenketten eine definierte Länge aufweisen und damit Lamellen einer definierten Dicke ergeben. Die Lamellenabstände variieren mit dem Volumenanteil des in die Strukturen eingebauten Verdünnermonomers, welches mit der vernetzungsfähigen Rückgratkette relativ gut verträglich ist. Die Langperiode kann auch hier aus den Mittelwerten für die Dicken der kristallinen Lamellen und der amorphen Phase abgeschätzt werden:  $D_1 + D_a = L = 7,5 \text{ nm}$ .



**Abb. 68:** Morphologie der Probe  $B^1VL^2LLA^{10}(Sn,pll)-co-TEGDMA$  mit deutlich erkennbarer lamellarer Struktur; Einfügung: Lamellendickenverteilung der nicht kontrastierten, hellen Domänen; TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes nach Ätzung in Ameisensäure und Kontrastierung mit  $OsO_4$

#### d) Morphologie der Polymermatrix: Sequenzlänge und Kristallinität

Um weitere Argumente zur Erklärung der im TEM nachweisbaren lamellaren Nanostrukturen zu erhalten, wurden die von GOPP durch thermische Analyse für Makromonomere ermittelten Schmelztemperaturen  $T_m$  und Schmelzenthalpien  $\Delta H_m$  über der Sequenzlänge der Oligolacton-Seitenketten  $n$  aufgetragen [86, 87]. Da im Diagramm ein System mit Oligolactid- (LLA)-Seitenketten gewählt wurde, wird versucht, diese Daten mit entsprechenden Werte für reines Poly (L-lactid) zu vergleichen. Die angegebenen Sequenzlängen entsprechen in diesem Falle der mittleren Länge der isotaktischen LLA-Sequenzen des verwendeten Polylactids [121].

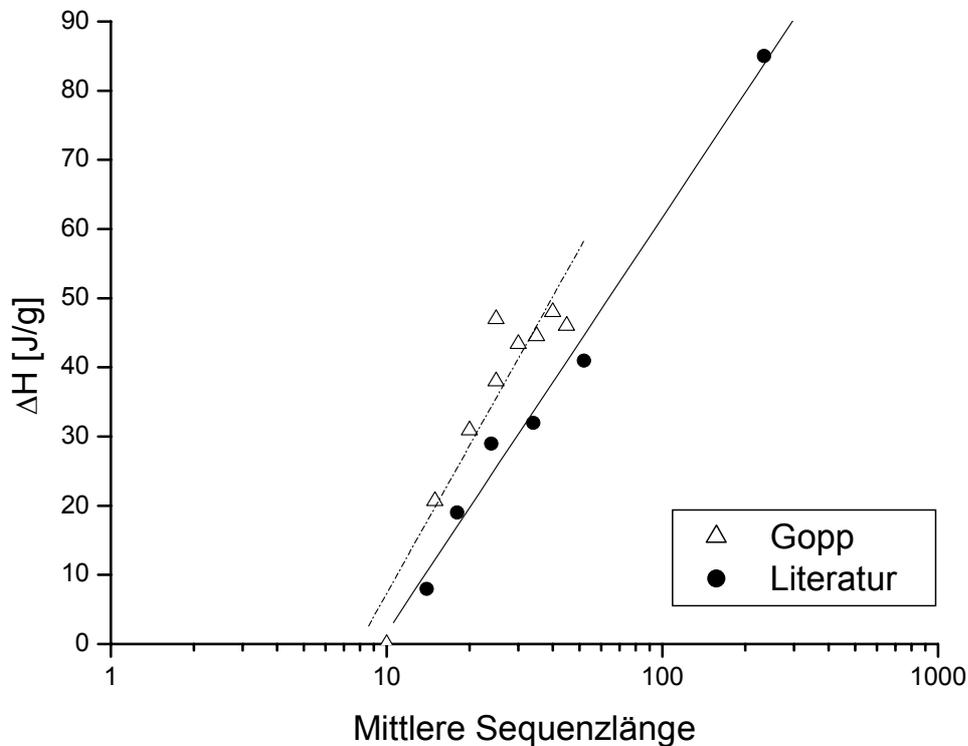


**Abb. 69:** Auftragung der Schmelztemperatur  $T_m$  für Makromonomere  $B^1LLA^n$  über Sequenzlänge  $n$  (Anteil LLA pro Makromonomer) [86, 87]; Literaturangaben beziehen sich auf die Schmelztemperaturen reiner Polylactide verschiedener isotaktischer LLA- Sequenzlängen [121]

In der halblogarithmischen Auftragung der Schmelztemperatur  $T_m$  über der Sequenzlänge  $n$  zeigt sich für die Makromonomere mit zunehmender Länge der LLA-Seitenketten ein kontinuierlicher Anstieg der gemessenen  $T_m$  (Abb. 69). Diese Beobachtung deutet auf die Zunahme der Dicke der kristallinen Lamellen mit zunehmender Seitenkettenlänge hin. Der deutliche Unterschied im Anstieg der Kurven kann auf das Vorhandensein von *confinements* im Falle der Oligolactid-Makromonomere zurückführbar sein. Das Kristallisationsverhalten wird hier über die zuvor ablaufende Nanophasenseparation, die bei reinen PLLA nicht vorhanden ist, signifikant beeinflusst.

Es existiert ein systematischer Zusammenhang zwischen der Sequenzlänge  $n$  der Oligolactid-Seitenketten und der Schmelzenthalpie  $\Delta H_m$  der Makromonomere. In der halblogarithmischen Darstellung (Abb. 70) wird ersichtlich, dass mit zunehmender Sequenzlänge ein kontinuierlicher Anstieg von  $\Delta H_m$  erfolgt. Werden die Oligolactid-Seitenketten länger, so steigt der Kristallinitätsgrad der Makromonomere. Aus diesem Diagramm ist eine wichtige Schlussfolgerung ableitbar: Der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der x-Achse liegt leicht unterhalb  $n = 8$ . Das bedeutet, dass für  $n < 8$  eine Kristallisation der Oligolactid-

Komponente ausgeschlossen werden kann. Auch hier kann der etwas steilere Verlauf auf einen Einfluss der Umgebung der kristallisationsfähigen Komponente (*confinements*) zurückgeführt werden.



**Abb. 70:** Auftragung der Schmelzenthalpie  $\Delta H_m$  für Makromonomere  $B^1LLA^n$  über Sequenzlänge  $n$  (Anteil LLA pro Makromonomer) [86, 87]; Literaturangaben beziehen sich auf die Schmelzenthalpien reiner Polylactide verschiedener isotaktischer LLA-Sequenzlängen [121]

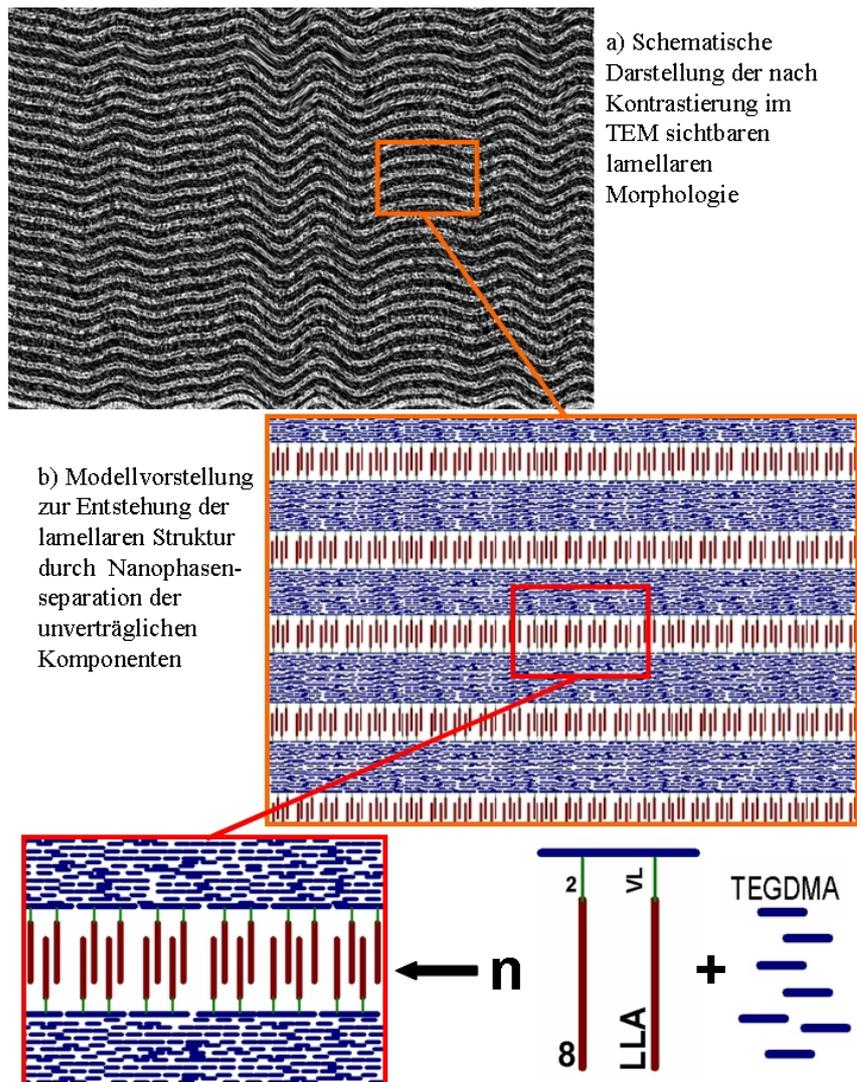
#### e) Modell zur Morphologie der Polymermatrix

Aus den vorgestellten Ergebnissen der TEM-Morphologieanalyse kann in Anlehnung an BEINER et al. [116, 117] und zahlreiche Arbeiten anderer Autoren (z.B. 118-120)) ein Modell zur Morphologiebildung abgeleitet werden. Das Entstehen einer lamellaren Morphologie ist danach mit folgenden Schritten verbunden:

1. Die Unverträglichkeit der Komponenten führt in den flüssigen Gemischen aus Makromonomer und Verdünnermonomer zu einer Phasenseparation. Die Oligolacton-Seitenketten bilden eine Domäne, die Dimethacrylat-Rückgratketten bilden gemeinsam mit den verwendeten Verdünnermonomeren eine zweite Domäne. Bereits in diesem Schritt entsteht eine elektronenmikroskopisch nachweisbare lamellare

- Nanostruktur. Dadurch, dass alle kristallisationsfähigen Anteile durch Nanophasenseparation in eine Domäne gedrängt werden, wird die Kristallisation der Seitenketten begünstigt.
2. Durch homogene Nukleierung beginnt die Oligolacton-Phase zu kristallisieren, sofern die Oligolacton-Seitenketten kristallisationsfähig sind. Dabei wird die Ausbildung doppelbrechender Strukturen im Lichtmikroskop für Seitenketten mit einer Sequenzlänge  $n \geq 8$  beobachtet. **Primäre Kristallisation** erfolgt innerhalb der so erzeugten *confinements* durch das laterale Wachstum kristalliner Lamellen ausgehend vom Inneren der Oligolacton-Nanodomänen. Die sich dabei ausbildenden Überstrukturen sind Sphärolithe. **Sekundäre Kristallisation** umfasst die anschließende Verdickung der Lamellen. Die maximale Dicke der kristallinen Lamellen ist durch die Länge der Oligolacton-Seitenketten bestimmt.
  3. Die entstehende Langperiode wird durch die Menge des in die Dimethacrylat-Domäne eingebauten Verdünnermonomers variiert. Die Situation kann z.B. mit der Zugabe von PS-Homopolymer zu lamellaren SBS-Blockcopolymeren verglichen werden [122, 123].
  4. Die durch Selbstorganisation entstandenen Nanostrukturen werden bei der vernetzenden Copolymerisation des Systems fixiert und sind im ausgehärteten Material unverändert erhalten.

In Abbildung 71 wird versucht, die im TEM nachgewiesenen Strukturen auf das oben beschriebene Morphologiemodell zurückzuführen.



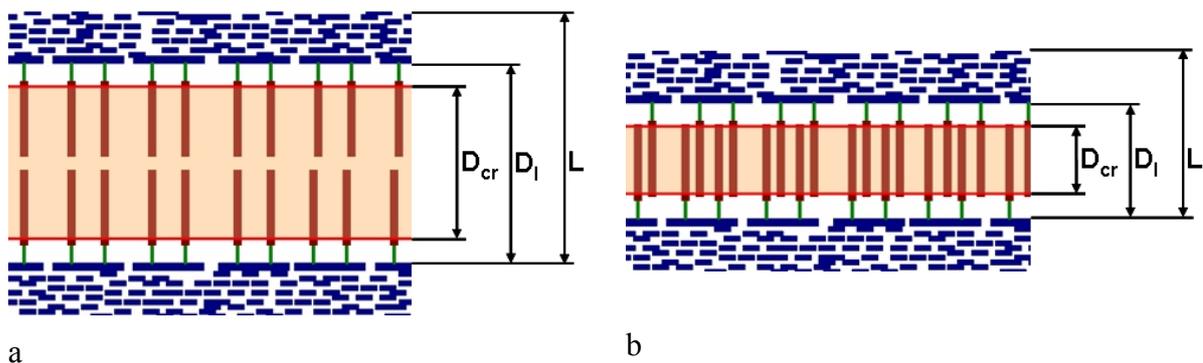
**Abb. 71:** Modell zur Interpretation der im TEM sichtbaren lamellaren Morphologie als Folge eines Nanophasen-Separationsprozesses am Beispiel des Systems  $B^1VL^2LLA^{10}$ -co-TEGDMA

Prinzipiell sind drei verschiedene Anordnungen der kammartigen Gebilde denkbar:

- alle Seitenketten zeigen in eine Richtung:  $\text{|||}$
- die Seitenketten sind einander zugewandt, greifen aber nicht ineinander:  $\text{|||}$
- die Seitenketten sind einander zugewandt und greifen ineinander:  $\text{|||}$

In Abbildung 72 werden die beiden letztgenannten Vorschläge dargestellt. Beide Anordnungen sind aufgrund der hohen Verträglichkeit der chemisch identischen Bausteine wahrscheinlich. Es gibt Hinweise, dass im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Makromonomere ein Ineinandergreifen der Seitenketten erfolgt. Durch HELWIG et al. [124] wurde ermittelt, dass die Oligolactid-Seitenkette eines Makromonomers mit  $n = 10$  eine Länge von ungefähr 5,8 nm besitzt. Die aus den TEM-Aufnahmen für ein vergleichbares

System (B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA, Abb. 68) ermittelte mittlere Lamellendicke von  $D_1 = 3,5$  nm deutet eher auf die Variante des Ineinandergreifens der Seitenketten hin. Durch Röntgenkleinwinkelstreuung wurde für das bei HELWIG beschriebene System HEMA/LLA 1:10 (Seitenkettenlänge  $n = 10$ ) eine Langperiode von  $L = 7,7$  nm bestimmt. Diese Langperiode entspricht relativ genau der für das System B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA aus TEM-Aufnahmen ermittelten Langperiode  $L = 7,5$ . Die aus TEM-Aufnahmen ermittelte Langperiode kann nur realisiert werden, wenn die Seitenketten wie in Abbildung 72b ineinandergreifen

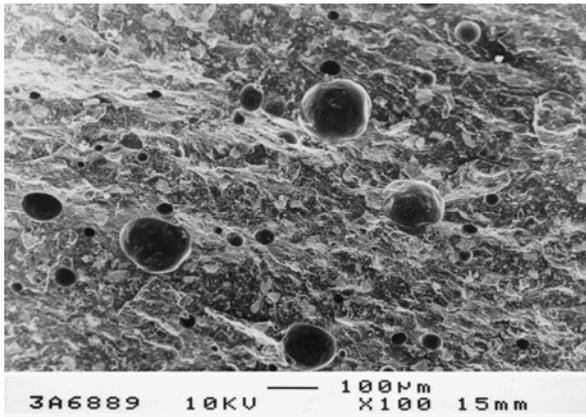


**Abb. 72:** Alternative Modelle zur Bildung von Lamellen der Dicke  $D_1$  bzw. zur Definition kristalliner Bereiche der Dicke  $D_{cr}$  sowie der Langperiode  $L$ : a) End-zu-End-Anordnung der Seitenketten, b) Ineinandergreifen („interdigitating“) der Seitenketten; schematische Darstellung in Anlehnung an [120]

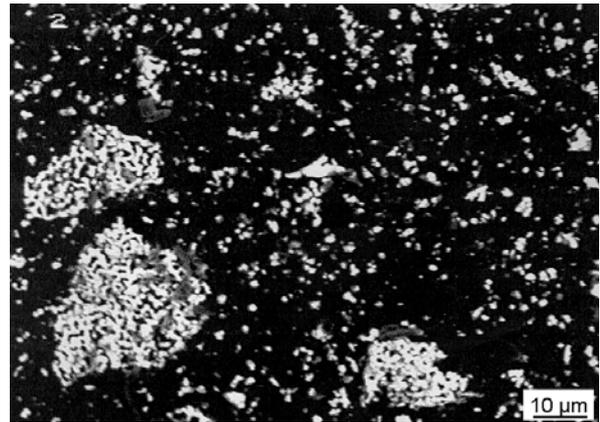
#### 4.3.2 Morphologie der Komposite

##### a) Kompositmorphologie nach Aushärtung und im trockenen Zustand

Die *Bruchflächen* der Komposite weisen auffällige Hohlräume von 20 bis 500  $\mu\text{m}$  auf, welche auf Gaseinschlüsse (Luft) während der Pastenmischung zurückführbar sind (Abb. 73a). Der Füllstoff, im wesentlichen silanisierter und unsilanisierter Hydroxylapatit, welcher zu 45% (Masse) im Komposit enthalten ist, zeigt eine deutlich bimodale Verteilung. Etwa 60% des Füllstoffes liegen als 10 bis 50  $\mu\text{m}$  große Agglomerate vor, während etwa 40% als 1  $\mu\text{m}$  große Einzelpartikel in der Matrix dispergiert sind (Abb. 73b, [125]). Vergleichsuntersuchungen an Füllstoffproben (Pulver, [86]) ergaben, dass die Agglomerate bereits vor dem Einmischen in das Polymere vorliegen und während des Mischens nicht aufgeschlossen werden. Die HAp-Einzelpartikel sind ungefähr 1  $\mu\text{m}$  große Polyeder (Abb. 74a). Sie sind gut durch das Matrixpolymer benetzt und sind teilweise an die Polymermatrix gekoppelt (Abb. 74b).

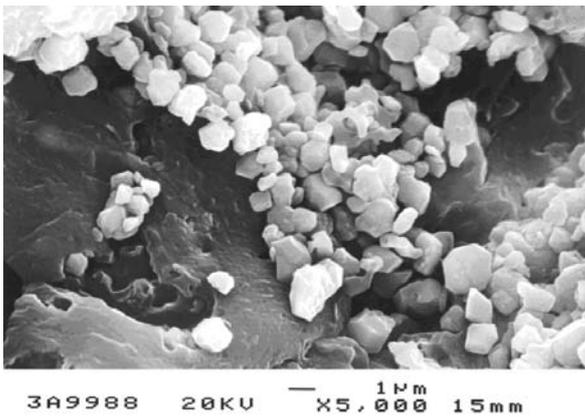


a

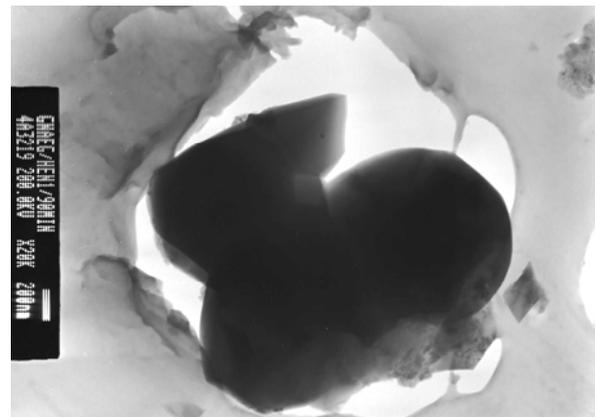


b

**Abb. 73:** Morphologie der ausgehärteten Komposite am Beispiel des Systems  $B^1VL^2LLA^8(Sn,pll)-co-TEGDMA + 45\% HAp$ : a) große Poren (SE-Übersichtsaufnahme), b) große HAp-Agglomerate neben Einzelpartikeln (BSE-Materialkontrast); REM



a



b

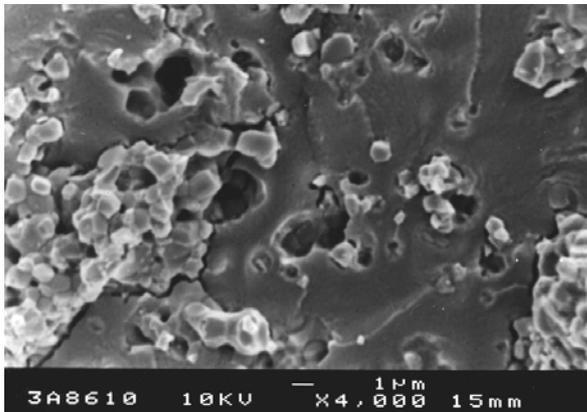
**Abb. 74:** Gestalt der verwendeten HAp-Partikel, eingebettet in  $B^1LLA^{10}-co-HEMA$ ; a) REM-Aufnahme einer Bruchfläche nach 24 Wochen Lagerung in Pufferlösung, b) TEM-Aufnahme (Ultradünnschnitt)

Es wurde keinerlei Zusammenhang zwischen Morphologie der Polymermatrix (Nanostruktur) und der Kompositmorphologie (Füllstoffverteilung) gefunden.

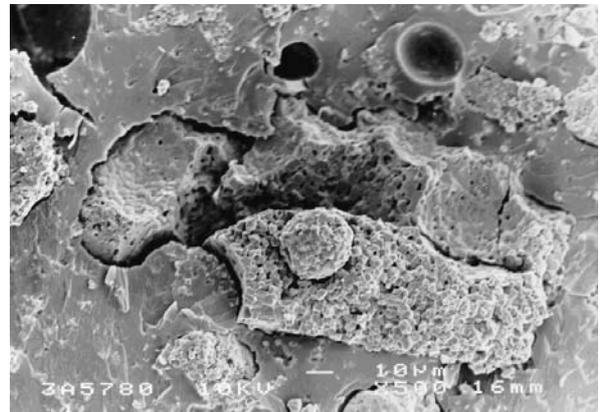
#### b) Morphologie der Komposite nach Quellung und Degradation

Komposite, welche einer *in vitro-Degradation* unterlagen, zeigen in Abhängigkeit von der Abbaurrate mehr oder weniger ausgeprägt aus der Matrix hervorragende Hydroxylapatit-Partikel, was auf einen Abbau der Polymermatrix hinweist. Der Grad der im Vergleich zu den Ausgangsproben ersichtlichen Erosion ist stark von der Probenzusammensetzung abhängig.

Die beobachteten Unterschiede stimmen gut mit den Differenzen unter den experimentell ermittelten Abbauraten überein.

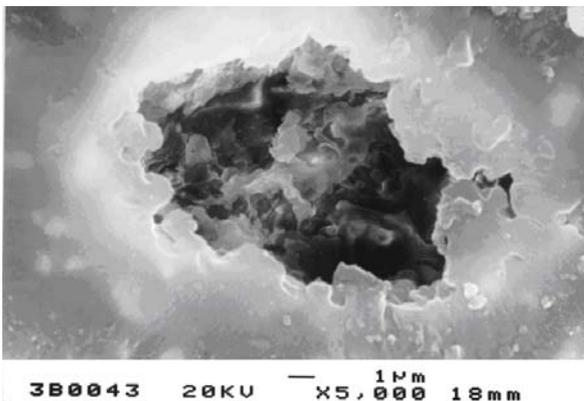


a

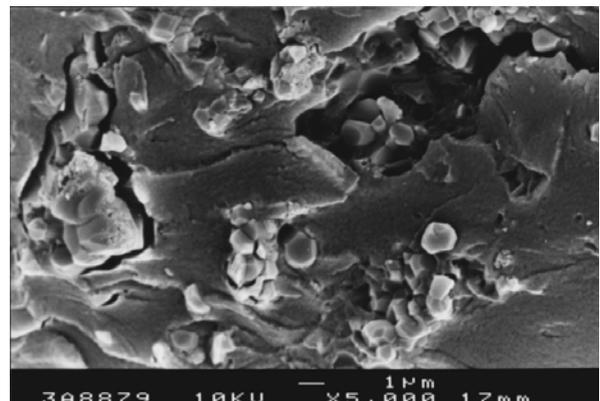


b

**Abb. 75:** Morphologie der Komposite nach Wasserlagerung bzw. Implantation a) System  $B^1VL^2LLA^8(Sn,pHl)-co-TEGDMA + 45\% HAp$  nach 8d Lagerung in Wasser, b) System  $B^1GLY^3LLA^7-co-TEGDMA + 45\% HAp$  24 Wochen nach Implantation im Muskelgewebe der Ratte



a



b

**Abb. 76:** a) Oberfläche des Systems  $B^1LLA^{10}-co-TEGDMA + 45\% HAp$  nach 24 Wochen Lagerung in Pufferlösung, b) Bruchfläche des Systems  $B^1GLY^2LLA^6(Mg,stu)-co-TEGDMA + 45\% HAp$  nach 6 Wochen Lagerung in Wasser

Eine wesentliche Feststellung ist, dass sich bereits nach kurzer Lagerzeit in einem wässrigen Medium (z.B. 8 Tage, Abb. 75a) deutliche Lücken zwischen den Füllstoffpartikeln bzw. den Partikelagglomeraten und der Matrix gebildet haben. Die Aufhebung der Partikel-Matrix-Haftung ist die erste sichtbare Veränderung der Kompositmorphologie. Je länger die Einlagerung in ein wässriges Medium andauert (destilliertes Wasser, Ringerlösung, siehe

Abb. 75a und Abb. 76a) bzw. je länger die Prüfkörper unter physiologischen Bedingungen verbleiben (Tierversuch, Abb. 75b), desto deutlicher wird dieser Effekt. Zunächst sind die Lücken zwischen Füllstoff und Matrix nur vereinzelt zu beobachten. Die Benetzung der Agglomerate mit Matrixpolymer, d.h. die mechanische Integrität der Agglomerate, scheint zunächst noch gegeben. Der Bruch verläuft durch die Agglomerate hindurch, was auf eine gewisse Kopplung zwischen Füllstoff und Matrix hinweist (Abb. 75a). Nach langer Lagerung bzw. Implantation im Versuchstier liegen die Agglomerate ohne jede Kopplung lose in der Matrix (Abb. 75b). Es kann daher angenommen werden, dass der partielle Abbau der Polymermatrix zu einer Verbreiterung der Lücke zwischen Füllstoff und Matrix führt.

Vereinzelt werden an den Oberflächen von Proben, die über längere Zeiträume in Pufferlösung gelagert wurden, Grübchen bzw. Trichter gefunden, die auf den Abbau des Matrixpolymers zurückzuführen sind. Abbildung 76a zeigt eine trichterförmige Schädigungszone mit einem Durchmesser von ungefähr 10  $\mu\text{m}$ , die nach 24 Wochen Lagerung in Pufferlösung festgestellt wurde.

Der partielle Abbau, der u.a. durch GOPP [86] als Masseverlust der Komposite in Abhängigkeit von Lagerzeit, Lagermedium und Makromonomerzusammensetzung erfasst wurde, hat also wesentliche Veränderungen der Kompositmorphologie zur Folge:

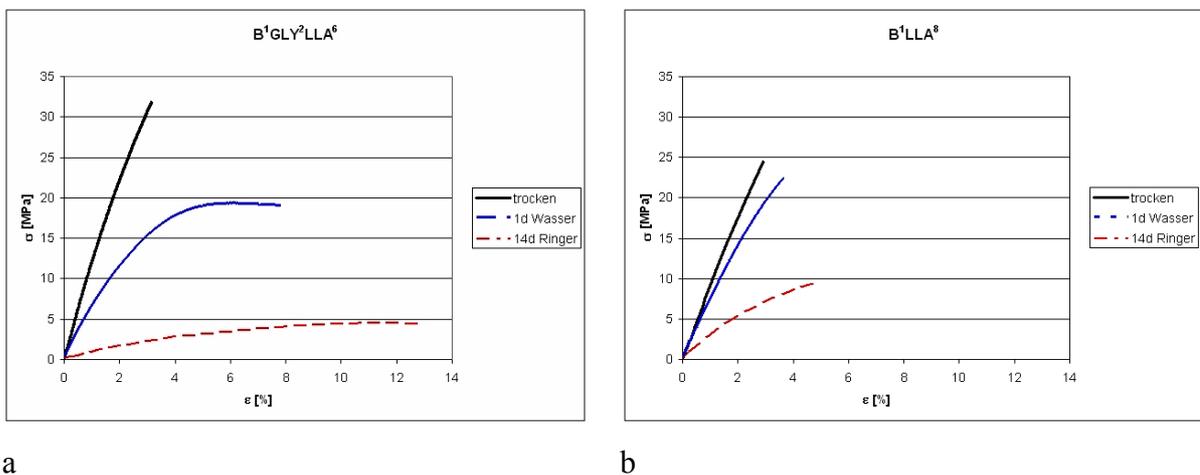
1. Zerstörung der Füllstoff-Matrix-Haftung durch Wassereinlagerung in die Grenzfläche
2. Desintegration der zunächst mechanisch relativ stabilen Füllstoffagglomerate
3. Bildung von trichter- oder grubenförmigen Schädigungszonen an der Oberfläche der Prüfkörper

Ein Zusammenhang zwischen den durch partielle Degradation der Matrix geschaffenen Strukturen und der weiter oben beschriebenen Nanostruktur des Matrixpolymers konnte nicht gefunden werden. Alle beobachteten Oberflächen- und Volumenprozesse laufen in der Polymermatrix homogen ab.

### 4.3.3 Mechanische Eigenschaften der Modellsysteme

#### a) Mechanische Eigenschaften der Polymermatrix im trockenen Zustand

Bei dem Matrixpolymer handelt es sich im trockenen Zustand um ein hart-sprödes Material. Bei einer von der Materialzusammensetzung abhängigen Bruchspannung von 25 bis 32 MPa werden maximale Dehnungen von ungefähr 3% erreicht (Abb. 77). Während die Bruchdehnung damit etwa dem Wert für PMMA entspricht, ist die Bruchspannung deutlich geringer (PMMA:  $\sigma_B \approx 70$  MPa [126]). Die im trockenen Zustand erreichte Bruchspannung ist für das in Abbildung 77a gezeigte nicht kristalline System höher als für das teilkristalline System in Abbildung 77b. Ein Vergleich der für verschiedene Makromonomere erhaltenen Mittelwerte für die Bruchspannungen ist in Abbildung 78 gegeben. Auch in dieser Darstellung weist das nicht kristalline System die höchste Festigkeit auf. Gleiches gilt für die aus den Spannungs-Dehnungs-Diagrammen abgeleiteten Elastizitätsmoduln (Abb. 79). Das nicht kristalline System weist mit  $E \approx 1200$  MPa den höchsten Wert auf. Auch der Elastizitätsmodul liegt damit deutlich unter den für PMMA im Zugversuch ermittelten Werten (PMMA:  $E = 3200$  MPa [126]).

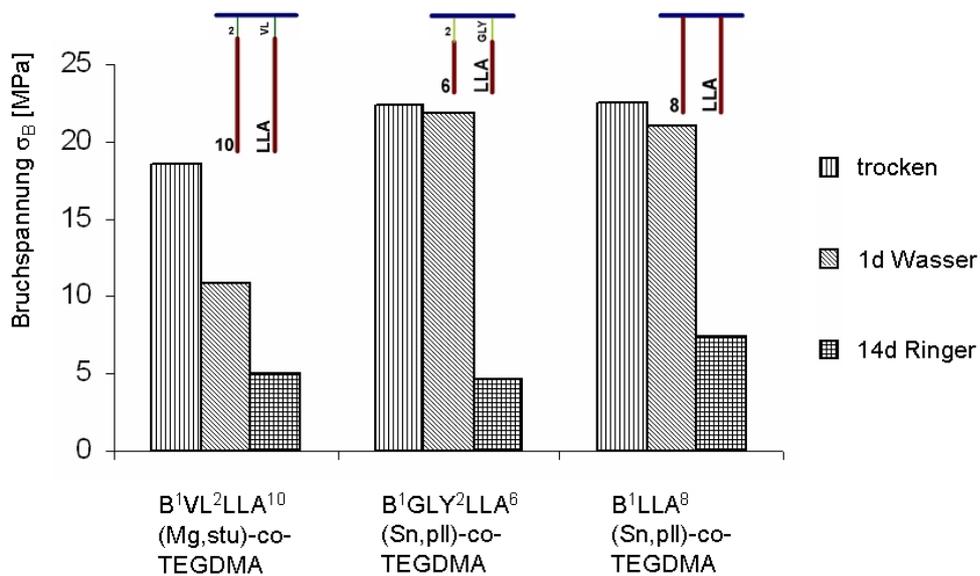


**Abb. 77:** Beispiele für typische Spannungs-Dehnungs-Diagramme trockener, feuchter und in wässrigem Medium gelagerter Miniaturprüfkörper; a) amorphes, b) teilkristallines Matrixpolymer

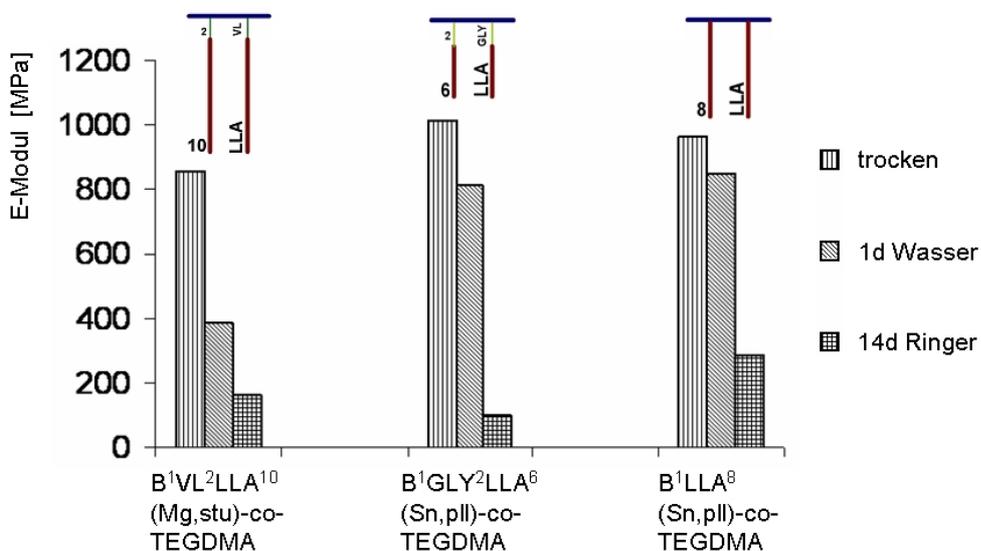
#### b) Mechanische Eigenschaften der Polymermatrix nach Wasserlagerung und Abbau

Die Materialeigenschaften unterliegen durch Wasseraufnahme und nachfolgende partielle Degradation dramatischen Veränderungen. Besonders eindrucksvoll zeigen die Spannungs-Dehnungs-Diagramme in Abbildung 77, dass ein signifikantes Umschlagen des Materialverhaltens erfolgt. Durch Wasseraufnahme und damit verbundener Quellung der

Matrix wird die Bruchspannung zum Teil deutlich verringert (Abb. 77a). Der Abfall ist für das amorphe Material, welches im trockenen Zustand die höhere Bruchspannung zeigt, wesentlich stärker. Während im Falle des amorphen Materials bereits hier eine signifikante Zunahme der Bruchdehnung zu verzeichnen ist, bleibt diese beim teilkristallinen System fast unverändert gering. Durch weitere Wasseraufnahme und durch einsetzende partielle Degradation wird die Festigkeit weiter reduziert. Nach 2wöchiger Lagerung ist die Festigkeit für beide in Abbildung 77 gezeigten Systeme weiter abgefallen.

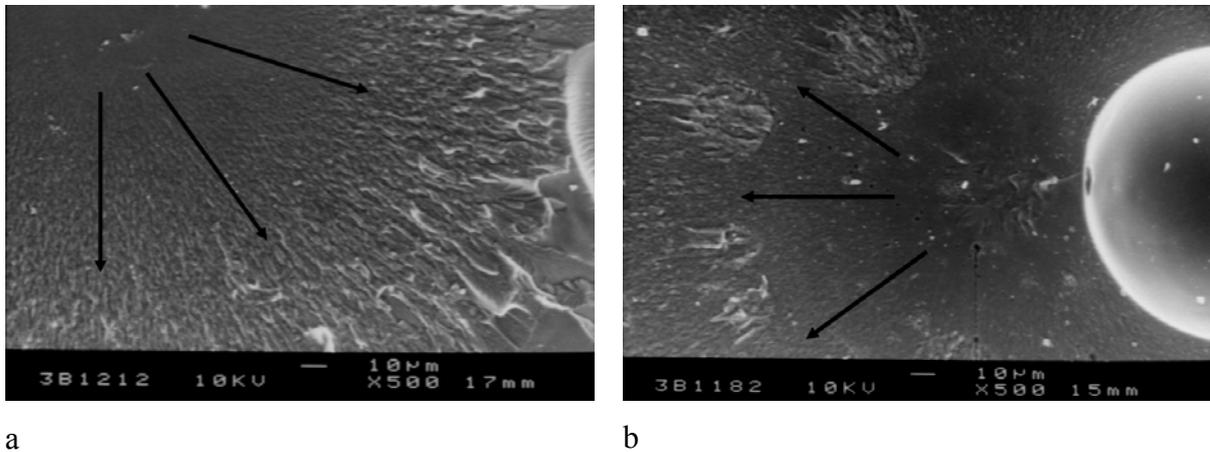


**Abb. 78:** Mittelwerte für die im Zugversuch ermittelten Bruchspannungen der Matrixpolymere (ohne Füllstoff) im trockenen Zustand, nach Einlagerung in Wasser bzw. Ringerlösung [94]



**Abb. 79:** Werte für die Elastizitätsmoduli (Matrixpolymere ohne Füllstoff, Zugversuch) im trockenen Zustand, nach Einlagerung in Wasser bzw. Ringerlösung [94]

Das zunächst überlegene System B<sup>1</sup>Gly<sup>2</sup>LLA<sup>6</sup> erleidet einen deutlich stärkeren Abfall der Bruchspannung (Abb. 78) und des Elastizitätsmoduls (Abb. 79) als die im trockenen Zustand schlechteren teilkristallinen Systeme.



**Abb. 80:** Bruchflächen von im Zugversuch gebrochenen trockenen Prüfkörpern a) B<sup>1</sup>GLY<sup>2</sup>LLA<sup>6</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA, b) B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Mg,stu)-co-TEGDMA

Die Abbildung 80 zeigt typische Spröbruchflächen für zwei im trockenen Zustand im Zugversuch geprüfte Matrixpolymere. Ausgehend von einem im Materialinneren vorhandenen Defekt (Fremdkörper, Lufteinschluss) breitet sich der Riss aus. Beachtenswert ist, dass die im Abschnitt 4.3.1 beschriebenen sphärolithischen Strukturen den Rissverlauf beeinflussen (Abb. 80b).

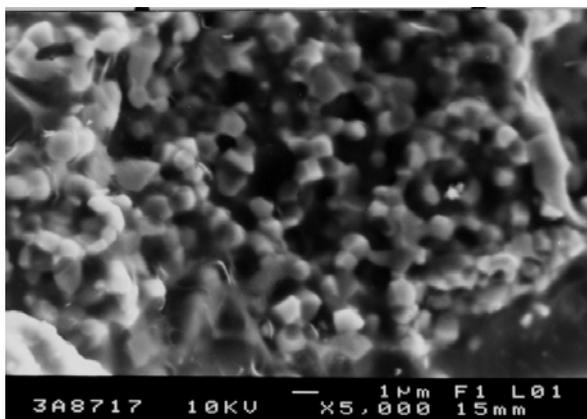
#### b) Mechanische Eigenschaften der Komposite im trockenen Zustand

Die mechanischen Eigenschaften der Komposite sind ausführlich von GOPP untersucht und beschrieben [86]. Da in allen untersuchten Systemen der Füllstoffgehalt bei 45% lag, können auftretende Unterschiede der mechanischen Endigenschaften einerseits auf unterschiedliche Eigenschaften der nach vernetzender Copolymerisation erhaltenen Matrixpolymere und andererseits auf verarbeitungsbedingte Defekte (Agglomerate und Poren) zurückgeführt werden. Bei GOPP werden hauptsächlich Ergebnisse von Druck- und Biegeversuchen (ISO/DIS 5833-1E bzw. 1F) vorgestellt, da alle Komposite ein hart-sprödes Verhalten zeigen und die auch für konventionelle Knochenzemente vorgeschriebenen Prüfverfahren verwendet wurden. Zusätzlich wurde ein als inverse Zugfestigkeit (diametral tensile strength  $\sigma_T$ ) bezeichneter Wert bestimmt. Wie in Tabelle 19 gezeigt, werden die für Knochenzemente geforderten Kennwerte (Kapitel 2.2.3) nur für die Druckfestigkeit erreicht.

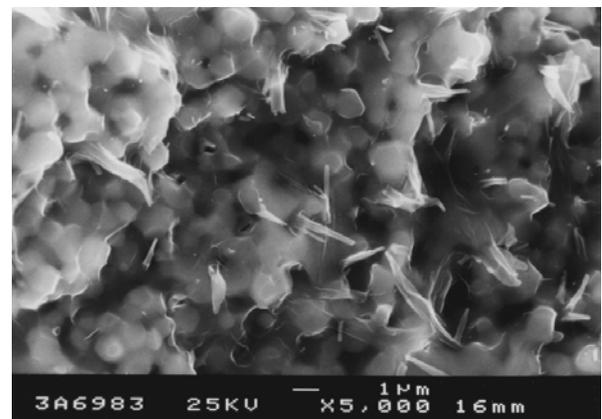
System	Biege- festigkeit B [MPa]	E-Modul (Biegung) E <sub>B</sub> [MPa]	Druck- festigkeit σ <sub>a</sub> [MPa]	diametral ten- sile strength σ <sub>T</sub> [MPa]
Comonomer: TEGDMA Füllstoffgehalt: 45%				
B <sup>1</sup> Gly <sup>2</sup> LLA <sup>6</sup> (pll)*	27 ± 5	832 ± 10	106 ± 7	14,7 ± 2,2
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>6</sup> (stu)	31 ± 4	377 ± 28	89 ± 13	18,7 ± 0,8
B <sup>1</sup> LLA <sup>8</sup> *	26 ± 4	958 ± 34	71 ± 21	9,3 ± 2,0
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>10</sup> (pll)	28 ± 4	331 ± 51	67 ± 4	10,6 ± 2,1
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>10</sup> (stu)*	22 ± 1	789 ± 25	90 ± 12	11,6 ± 1,4

**Tab. 19:** Ausgewählte mechanische Kennwerte von Kompositen verschiedener Makromonomerzusammensetzung bei konstantem Füllstoffgehalt von 45%; trockene Prüfkörper nach redox-initiiertem Vernetzung, Quelle: [86]; \*) auch als reine Matrixpolymere untersucht

Für trockene Prüfkörper haben zwei Faktoren wesentlichen Einfluss auf die mechanischen Kompositeigenschaften. Für Systeme mit gleicher Zusammensetzung ergibt die Reaktionsführung der Makromonomersynthese (Parallelreaktion, Stufenreaktion) signifikante Unterschiede. Ergänzende Untersuchungen zeigen, dass Valerolacton (VL) eine Weichmacherwirkung auf die Polymermatrix ausübt [86]. Einen Hinweis darauf gibt auch der Vergleich der von trockenen Prüfkörpern erhaltenen Bruchflächen. Die bei Verwendung identischer Katalysatoren in Parallelreaktion erhaltenen Produkte unterscheiden sich in einem Detail: Während die Bruchfläche des Systems ohne Valerolacton ( $n_{LLA} = 6$ , nichtkristallin) sehr glatt erscheint, weist die Bruchfläche des Systems mit Valerolacton ( $n_{LLA} = 8$ , kristallin) plastisch verstreckte Anteile auf (Abb. 81) und deutet damit auf eine gewisse Duktilität hin.



a



b

**Abb. 81:** Bruchflächen nach Druckversuch im trockenen Zustand: a) B<sup>1</sup>GLY<sup>2</sup>LLA<sup>6</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA + 45% HAp, b) B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>8</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA + 45% HAp

c) Mechanische Eigenschaften der Komposite nach Wasserlagerung und Abbau

Durch die starke Hydrophilie der Matrix wird bei Lagerung in wässrigem Medium sehr schnell relativ viel Wasser aufgenommen. Die Wasseraufnahme beträgt bis zu 17% (System B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA + 45%HAp) und kann über die Gewichtszunahme der Komposite gut verfolgt werden [86]. Die damit verbundene Quellung der Polymermatrix führt zu einem starken Abfall der Festigkeit. So sinkt die Bruchspannung nach einem Tag Wasserlagerung in einigen Fällen bereits um 40% (B<sup>1</sup>Gly<sup>2</sup>LLA<sup>6</sup>, Abb. 77a). Durch die zusätzliche partielle Degradation des Matrixpolymers erfolgt eine Verstärkung dieses Effektes: Nach 2wöchiger Lagerung in wässrigem Medium ist die Bruchspannung des Systems bereits um 80% gesunken, weist jedoch mit einer Bruchdehnung von 13% nunmehr ein semiduktilen Verhalten auf. Das Materialverhalten wandelt sich von einem hart-spröden zu einem weich-semiduktilen Verhalten.

System	trocken		H <sub>2</sub> O (50h, 37°C)	
	Biege- festigkeit B [MPa]	E-Modul (Biegung) E <sub>B</sub> [MPa]	Biege- festigkeit B [MPa]	E-Modul (Biegung) E <sub>B</sub> [MPa]
Comonomer: TEGDMA Füllstoffgehalt: 45%				
B <sup>1</sup> LLA <sup>8*</sup>	26 ± 4	874 ± 30	23 ± 3	165 ± 24
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>10</sup> (pll)	28 ± 4	398 ± 36	8 ± 2	27 ± 10
B <sup>1</sup> VL <sup>2</sup> LLA <sup>10</sup> (stu)*	22 ± 1	771 ± 53	16 ± 2	144 ± 21

**Tab. 20:** Vergleich der Biegefestigkeiten und Elastizitätsmoduln ausgewählter Komposite im trockenen Zustand und nach 50 h Wasserlagerung bei 37°C; Quelle: [86]; \*) auch als reine Matrixpolymere untersucht

Da das von der Matrix aufgenommene Wasser auch in die Füllstoff-Matrix-Grenzfläche eindringt, wird der Kompositwerkstoff weiter geschwächt (Tab. 20). Die Wassereinlagerung um und in die Füllstoffagglomerate führt schließlich zu einer mechanischen Desintegration des Kompositwerkstoffes. So fällt die Druckfestigkeit des Kompositsystems B<sup>1</sup>VL<sup>2</sup>LLA<sup>10</sup>(Sn,pll)-co-TEGDMA + 45%HAp innerhalb der ersten 10 Tage der Einlagerung in Pufferlösung von 90 MPa auf 35 MPa ab [86]. Das bedeutet, dass die an einen Knochenzement gestellten Mindestanforderungen ( $\sigma_d \geq 70$  MPa, siehe Abschnitt 2.2.3) nicht mehr erfüllt werden.

#### 4.3.4 Biokompatibilität der neuartigen, resorbierbaren Knochenzemente

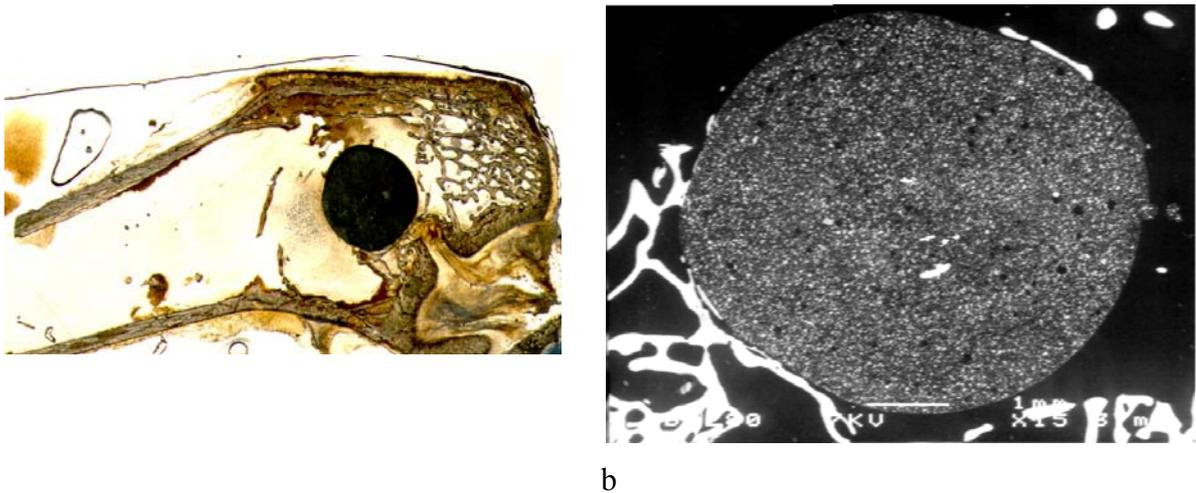
Durch SEIDEL wurde durch Zytotoxizitätstests an Hühnerembryonen nachgewiesen, dass die hier beschriebenen partiell resorbierbaren Knochenzemente bzw. deren Bestandteile und Abbauprodukte nicht toxisch wirken. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen von Implantaten (ausgehärtete Knochenzement-Zylinder in Femora von Kaninchen, siehe 3.3.1) zeigen, dass teilweise ein bindegewebsfreier Kontakt zwischen neu gebildetem Knochen und dem Knochenzement erreicht werden kann. Darüber hinaus konnten vereinzelte Bereiche gefunden werden, in denen neu gebildeter Knochen in verarbeitungsbedingten Poren und Rissen nachweisbar ist, sofern diese Hohlräume mit der Implantatoberfläche in Verbindung stehen [85]. Ziel der hier vorgestellten elektronenmikroskopischen Untersuchungen war, die an der Knochen-Knochenzement-Grenzfläche auftretenden Kontakte zu dokumentieren und zu typisieren. Dabei waren folgende Fragen zu berücksichtigen:

- Ist ein bindegewebsfreier Kontakt zwischen Knochen und Knochenzement vorhanden? → **Biokompatibilität, Bioaktivität**
- Gibt es Hinweise auf die Stimulierung der Knochenneubildung durch die bioaktive Komponente Hydroxylapatit? → **Osteoinduktion**
- Welche Größe müssen Risse, Poren und ggf. durch partielle Degradation erzeugte Hohlräume aufweisen, um das Einwachsen von Knochen zu ermöglichen? → **Formschluss, mechanische Verzahnung**
- Sind mineralisierte Kollagenfasern in durch partiellen Abbau geschaffenen Kavitäten nachweisbar? → **Osteokonduktion**
- Können durch partielle Degradation entstandene Strukturen mit der Morphologie der neuartigen Knochenzemente korreliert werden?
- Welche Orientierungen haben die Faserbündel der hybriden Nanofasern des neu gebildeten Knochens an der Knochen-Knochenzement-Grenzfläche?

Zur Aufklärung dieser Fragestellungen haben sich die Rückstreuelektronen-Materialkontrastabbildungen im REM und insbesondere die von Präparationsartefakten freie und hoch auflösende ESEM-Technik als hervorragend geeignet erwiesen. Eine histomorphometrische Analyse zur statistischen Erfassung der verschiedenen Kontakttypen als Funktion von Implantationsdauer und Zementzusammensetzung wird an der Medizinischen Fakultät durchgeführt und war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

a) Befunde zur Knochen-Knochenzement-Grenzfläche *ex vivo* ausgehärteter Zemente

In der Abbildung 82 sind zwei Beispiele für die Lage der implantierten Knochenzement-Zylinder sowie REM-Übersichtsaufnahmen im Rückstreuелеlektronen-Materialkontrast gegeben. Im REM-Bild erscheinen Einbettmedium (PMMA) und Polymermatrix des partiell resorbierbaren Knochenzementes dunkel, Knochen und Hydroxylapatit-Füllstoff hell. Alle in diesem Kapitel dargestellten Grenzflächen entsprechen einer Implantationszeit von 24 Wochen (siehe 3.3.1).



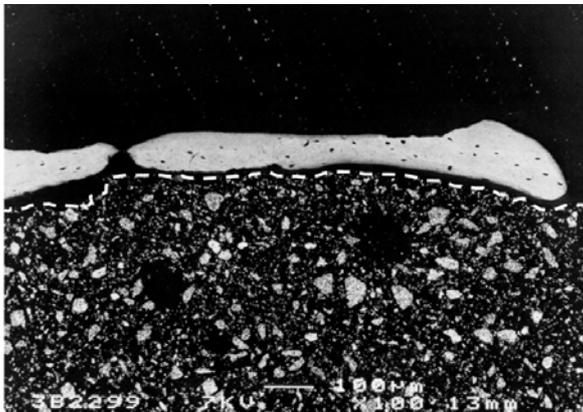
**Abb. 82:** Beispiele zur Lage der implantierten Zylinder des Systems B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-*co*-TEGDMA + 45% HAp in den Femora von Kaninchen (Tier K18re 2. Schnitt): a) lichtmikroskopische Aufnahmen, b) REM, BSE-Materialkontrast; Durchmesser der Zylinder: 10 mm

Im REM-Bild ist deutlich ein heller Saum am Umfang des Implantates zu erkennen, der bereits in früheren Arbeiten als neu gebildeter Knochen identifiziert wurde [85]. Detail-Aufnahmen erlauben eine Unterteilung in verschiedene Typen des Kontaktes zwischen neu gebildetem Knochen und Knochenzement.

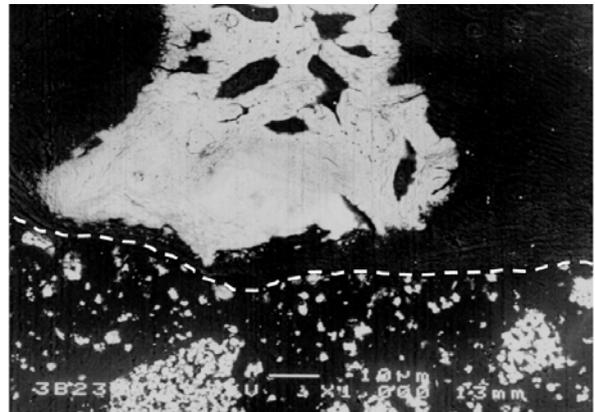
- **Typ A: Kein Kontakt**

Trotz einer beobachteten Neubildung von Knochen in der Nähe des Implantates besteht kein direkter Kontakt zwischen Knochen (in den Abbildungen 83a und b helle Strukturen in der oberen Bildhälfte) und Implantatoberfläche (untere Bildhälfte). Es existiert eine dünne Bindegewebsschicht aus nicht mineralisiertem Kollagen. Die gestrichelten Linien markieren die Oberfläche der Implantate (Abb. 83). Entsprechend Tabelle 10 führt eine solche bindegewebsartige Einkapselung zur Einstufung des Implantates als biokompatibel/bioinert.

Augenfällig ist, dass an hier abgebildeten Stellen kaum HAp-Partikel an die Implantatoberfläche treten.



a

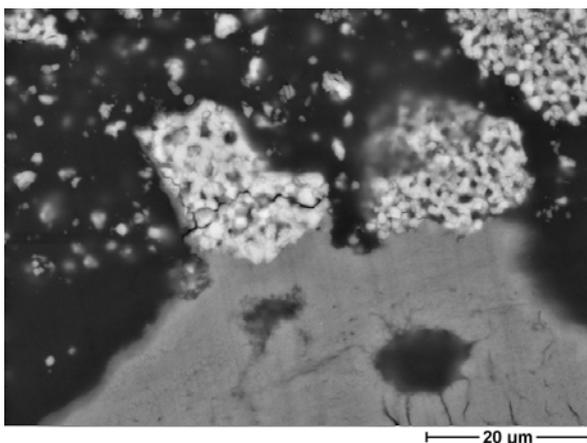


b

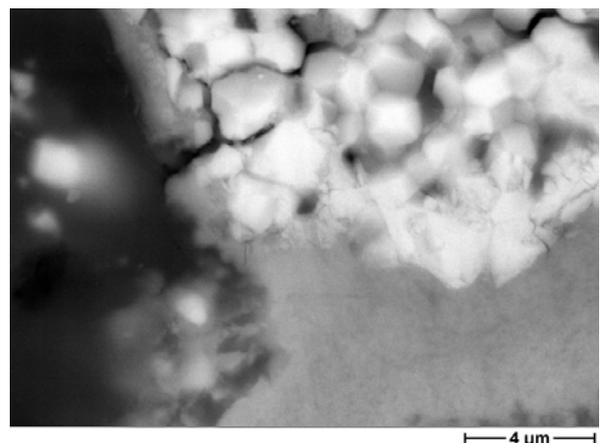
**Abb. 83:** REM-Detaillaufnahmen von Knochen-Knochenzement-Grenzflächen im Typ A (kein Kontakt): a) Tier K18 re, b) Tier K19 re; System B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-co-TEGDMA + 45% HAp, BSE-Materialkontrast

- **Typ B: Intensiver Kontakt**

Ein intensiver, direkter Kontakt von neu gebildetem Knochen und Implantat tritt auf, wenn große Agglomerate des bioaktiven Füllstoffes HAp von der Implantatoberfläche her zugänglich sind (Abb. 84).



a



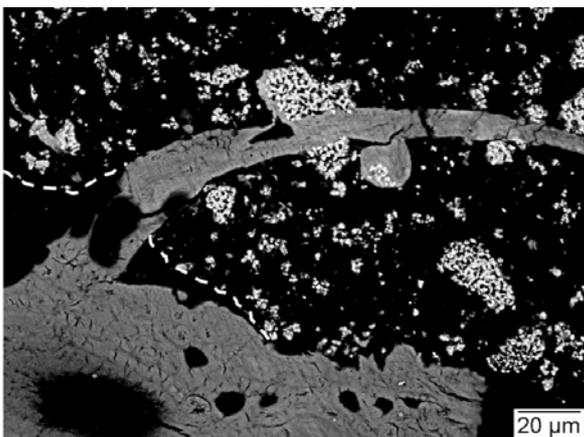
b

**Abb. 84:** ESEM-Detaillaufnahmen einer Knochen-Knochenzement-Grenzfläche im Typ B (intensiver Kontakt): a) Übersicht, b) Ausschnitt ; System B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-co-TEGDMA + 45% HAp, Tier K18 re, BSE-Materialkontrast

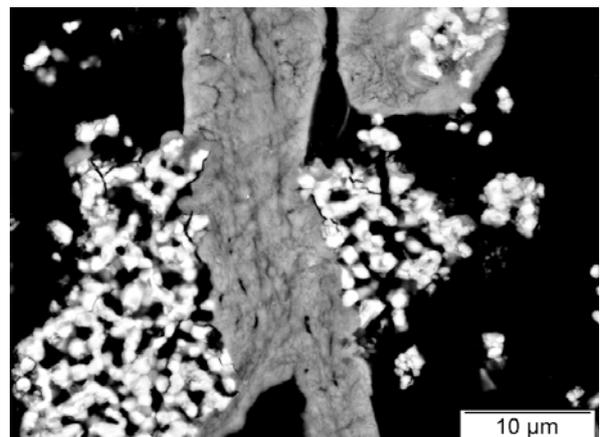
In Abbildung 84a ist eine solche Situation dargestellt: Einbettmedium und Polymermatrix des Zementes erscheinen dunkel, neu gebildeter Knochen in mittleren Graustufen. Die sehr hell dargestellten HAp-Partikel werden fest von Hartgewebe umschlossen. Bei höheren Vergrößerungen stellt man fest, dass der feine Spalt zwischen Füllstoff und Polymermatrix ebenfalls durch mineralisiertes Gewebe verfüllt ist (Abb. 84b). Die hier gezeigte Situation rechtfertigt die Kategorisierung des Implantates als bioaktiv/osteinduktiv. Die Knochenneubildung wird angeregt.

- **Typ C: Einwachsen in primären Defekt (Riss)**

Bei der Entnahme der *ex vivo* ausgehärteten Implantate aus der Form oder bei der Einbringung in das ausgearbeitete Knochenlager wurden feine Risse erzeugt, welche eine Verbindung von der Implantatoberfläche zu im Materialinneren liegenden Füllstoffagglomeraten herstellen. In Abbildung 85 ist an einem Beispiel gezeigt, dass ein solcher primärer, d.h. während der Prüfkörperherstellung bzw. bei der Handhabung erzeugter Riss zu einem Eindringen von mineralisiertem Gewebe führen kann. In Abbildung 85a ist die Implantatoberfläche durch eine unterbrochene Linie hervorgehoben. Die in mittleren Graustufen dargestellte Knochensubstanz ist dabei bis zu einigen 100 µm in das Material hinein nachweisbar. Solche mit mineralisiertem Gewebe gefüllte Risse sind typischerweise mindestens 10 µm breit. Es sei darauf hingewiesen, dass innerhalb solcher Risse niemals Lakunen gefunden wurden, die auf die Existenz von Knochenzellen innerhalb solch feiner Risse hindeuten könnten.



a



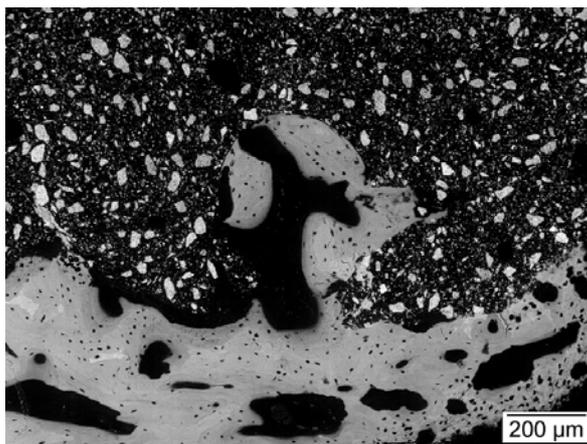
b

**Abb. 85:** ESEM-Detaillaufnahmen einer Grenzfläche im Typ C (Einwachsen in einen Riss): a) Übersicht zu Darstellung der Lage des Risses, b) Ausschnitt (ca. 90° entgegen Uhrzeigersinn gedreht); System B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-co-TEGDMA + 45% HAp, Tier K18 re, BSE-Materialkontrast

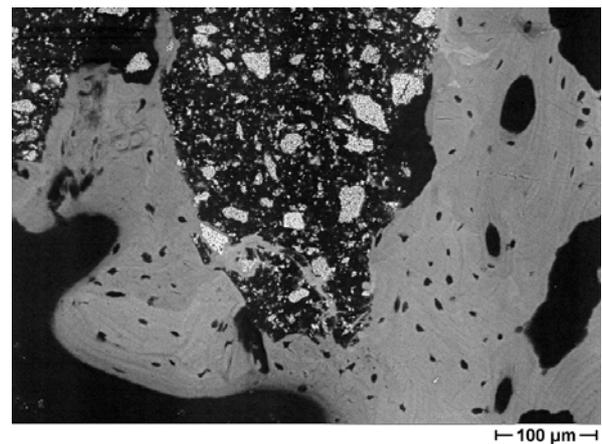
Aufnahmen bei höherer Vergrößerung zeigen, dass eine dem Typ B sehr Ähnliche Situation vorliegt: HAp-Agglomerate werden von mineralisiertem Gewebe umschlossen, die Kavitäten zwischen Füllstoff und Polymermatrix werden teilweise verfüllt (Abb. 85b). Auch in diesem Falle wird durch den zugänglichen HAp die Knochenneubildung angeregt, d.h. das Implantat ist als bioaktiv und osteoinduktiv einzustufen. Interessant ist, dass durch dieses Phänomen in gewissem Sinne eine „Reparatur“ von Defekten erfolgt. Die durch Herstellung, Handhabung oder Wechsellast erzeugten Mikrorisse werden durch Hartgewebe gefüllt, wobei eine innige Verzahnung von mineralisiertem Gewebe und Knochenzement die mechanische Integrität des gesamten Systems gewährleistet.

- **Typ D: Einwachsen in primären Defekt (Pore)**

Häufig werden in den von Hand angemischten Systemen Luft einschüsse gefunden. Die in den neuartigen, partiell resorbierbaren Knochenzementen nachgewiesenen Poren unterscheiden sich nicht von den in konventionellen Knochenzementen auftretenden und als problematisch eingestuften Defekten (Defekt Typ 1, siehe 4.2.2). Vereinzelt wird beobachtet, dass solche Poren von der Implantatoberfläche her zugänglich sind. In diesem Falle ist neu gebildeter Knochen innerhalb dieser Poren nachweisbar (Abb. 86). Im Unterschied zu den wesentlich feineren Rissen kann man jedoch hier Lakunen nachweisen (Abb. 86b), d.h., innerhalb der größeren Poren existieren lebende Knochenzellen. Der neu gebildete Knochen besitzt hier eine lamellare Struktur.



a



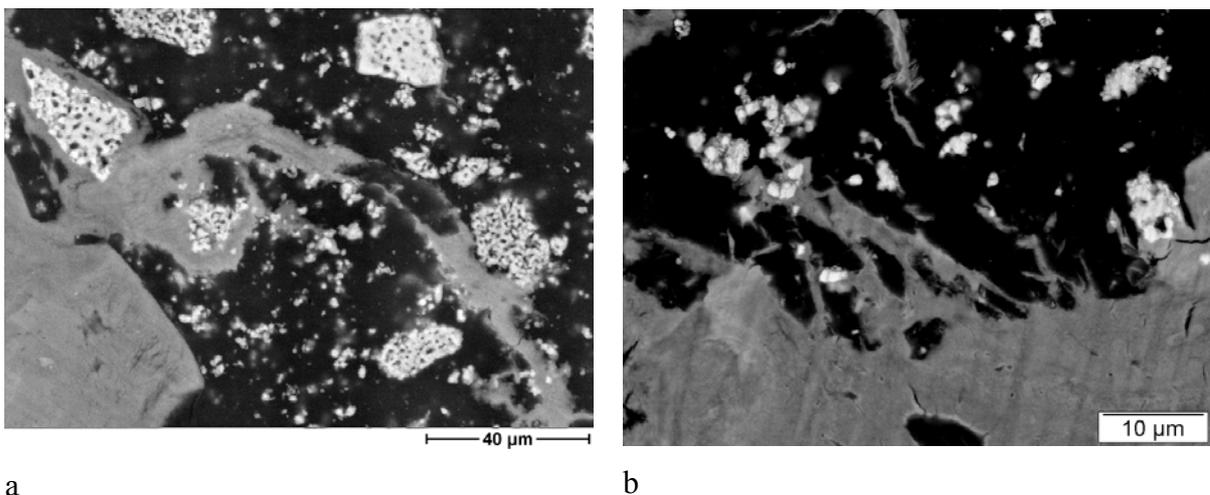
b

**Abb. 86:** ESEM-Detailaufnahmen einer Grenzfläche im Typ D (Einwachsen in eine Pore): a) Übersicht zur Darstellung der Lage der Pore, b) Ausschnitt; System B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-co-TEGDMA + 45% HAp, Tier K14 re, BSE-Materialkontrast

Während also bei der Beschreibung des Kontakttyps C etwas zurückhaltend vom Vorhandensein mineralisierten Gewebes gesprochen wurde, werden in diesem Falle typische Merkmale des Knochens identifiziert. Diese Beobachtung konnte für alle Poren mit Durchmessern größer 150 µm gemacht werden. Das Einwachsen des Knochens in Poren stabilisiert diese und schafft eine intensive Verankerung des Implantates im Knochen. Auch in diesem Falle können dem Knochenzement bioaktive und osteoinduktive Eigenschaften zugeschrieben werden.

- **Typ E: Einwachsen in sekundäre Fehlstellen**

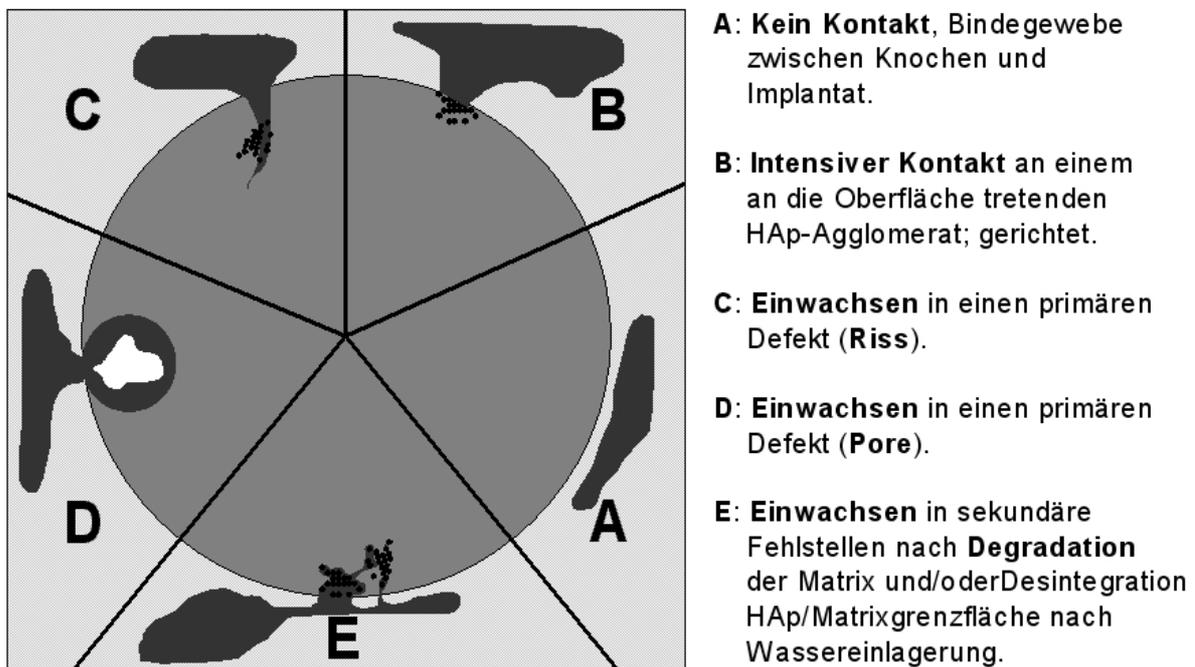
Sehr vereinzelt finden sich Hinweise, dass ein partieller Abbau des Implantatmaterials das Eindringen mineralisierten Gewebes ermöglicht. Abbildung 87a zeigt, dass die durch Quellung und partielle Degradation geschaffenen Lücken zwischen einem nahe der Oberfläche des Implantates gelegenen HAp-Agglomerat und der Polymermatrix vollständig durch mineralisiertes Gewebe aufgefüllt ist. Aber auch einzelne, bis zu einige 10 µm tief in die partiell abbaubare Matrix eingebettete HAp-Partikel werden durch Knochengewebe erreicht (Abb. 87b). Auch in diesem Falle sind die bioaktiven Füllstoffpartikel vollständig umschlossen. Diese Feststellung lässt den Schluss zu, dass dieses System prinzipiell in der Lage ist, durch Abbauprozesse im lebenden Organismus ein Einwachsen neu gebildeten Knochens in das Implantat zu ermöglichen. In diesem Sinne kann der Werkstoff in begrenztem Maße als osteokonduktiv eingestuft werden, d.h., er eignet sich als Substrat zur Neubildung von Knochen.



**Abb. 87:** ESEM-Detailaufnahmen (Ausschnitt aus Abb. 86b, untere Mitte) einer Grenzfläche im Typ E (Einwachsen in sekundäre Defekte): a) Übersicht zu Darstellung der Lage der Pore, b) Ausschnitt; System B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-co-TEGDMA + 45% HAp, Tier K14 re, BSE-Materialkontrast

Eine endgültige Beurteilung der Eignung als Substrat zum *tissue engineering* setzt eine längere Liegezeit des implantierten Materials im Knochen voraus. In jedem Falle aber kann gesagt werden, dass ein inniger Verbund von Knochen und Knochenzement erreicht wird.

Die vorgestellten Ergebnisse sind in Abbildung 88 zusammengefasst. Ein Abgleich der hier gezeigten REM-Aufnahmen mit histologischen Befunden ist erforderlich. Wünschenswert ist eine quantitative Erfassung des Auftretens der verschiedenen Kontakttypen (Histomorphometrie).

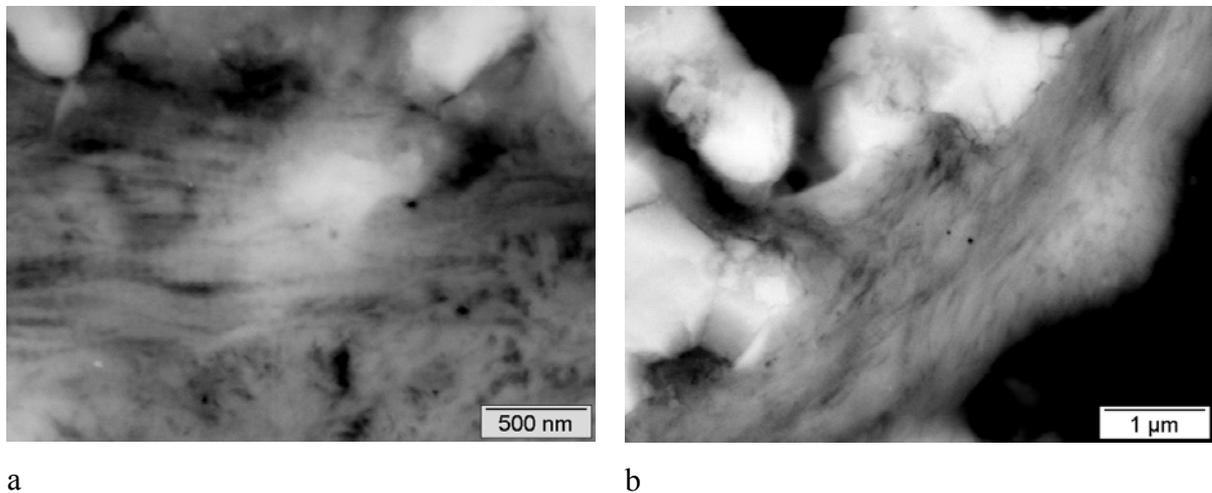


**Abb. 88:** Schematische Übersicht zur Typisierung der Knochen-Implantat-Grenzfläche. Schwarze Punkte: HAp-Partikel, dunkelgrau: Knochen, hellgrau: implantierter Knochenzement-Zylinder

#### b) Hochauflösende Abbildung der Knochenzement-Knochen-Grenzfläche

Die Abbildungen 83b und 84a zeigen eine spezifische Form der „Annäherung“ des in Neubildung begriffenen Knochens an die Implantatoberfläche. Es kommt zur Ausbildung so genannter „Elefantenfüße“ [61], wobei vermutet wird, dass an den „Sohlen“, also den Kontaktstellen zwischen Implantat und Knochen, entweder Stränge von nicht mineralisiertem Bindegewebe tangential zur Implantatoberfläche liegen (bindegewebsartige Einkapselung, Kontakt Typ A, Abb. 83) oder aber eine direkte Überwachsung des an die Oberfläche tretenden bioaktiven Füllstoffes erfolgt (Kontakt Typ B, Abb. 84). Durch hochauflösende BSE-Materialkontrastaufnahmen (ESEM) wurde in allen beobachteten Fällen des Kontaktes

vom Typ B nachgewiesen, dass auch die mineralisierten Kollagenfasern des neu gebildeten Knochens tangential zur Oberfläche des Implantates verlaufen. Ein signifikantes Beispiel ist in Abbildung 89a gegeben. Im oberen Bild Drittel sind sehr hell erscheinende HAp-Partikel erkennbar; die ursprüngliche Knochenzement-Oberfläche verläuft in diesem Bild etwa waagrecht. Im unteren Bildteil erkennt man parallel zur Grenzfläche verlaufende Fibrillenbündel mit typischer Querstreifung. Wie in Abschnitt 4.1.1 dargelegt, ist das Erscheinen der Querstreifung im Rückstreuелеktronen-Materialkontrast eindeutig auf die An- bzw. Einlagerung von HAp-Nanopartikeln mit einer definierten Sequenz zurückzuführen. Diese Beobachtung unterstützt die Behauptung, dass auch auf nanoskopischer Ebene ein direkter, lückenloser Kontakt zwischen Knochen und Implantat vorliegt.



**Abb. 89:** Hochauflösende BSE-Materialkontrastaufnahmen von Knochenzement-Knochen-Grenzflächen; System B<sup>1</sup>GLY<sup>3</sup>LLA<sup>7</sup>-*co*-TEGDMA + 45% HAp, Tier K18 re, ESEM

Auch bei Kontakten vom Typ C und D wird in allen Fällen eine tangentiale Ausrichtung der mineralisierten Fibrillen zur Materialoberfläche festgestellt. Die durch einen Riss erzeugte Oberfläche im Inneren eines Implantates zeigt die Orientierung der mineralisierten Fibrillenbündel parallel zu den Rissufer (Abb. 89b).

Bei hohen Vergrößerungen erscheinen die Grenzschichten sind in allen beobachteten Fällen relativ diffus. Durch partiellen Abbau der Polymermatrix geschaffene Fehlstellen, Hohlräume in Partikelagglomeraten und Lücken zwischen HAp-Partikeln und Polymermatrix werden durch mineralisiertes Gewebe ausgefüllt. Es entsteht eine innige Verzahnung zwischen Knochen und Knochenzement.

## **Fazit:**

Die im letzten Absatz diskutierten Ergebnisse zur Implantation der neuartigen, partiell resorbierbaren Knochenzemente im Knochen von Versuchstieren belegen, dass die an das System gestellten Ansprüche zum Teil erfüllt werden. Tatsächlich wird ein intensiver Kontakt zwischen Knochenzement und Knochen erreicht. Der bioaktive Füllstoff induziert die Neubildung von Knochen. Bereits im Werkstoff vorhandene bzw. durch partielle Degradation geschaffene Freiräume, insbesondere Risse, Poren und die durch Wasseraufnahme entstandenen Lücken zwischen Matrix und Füllstoff, werden in oberflächennahen Bereichen durch mineralisiertes Gewebe aufgefüllt. Die entstehende Knochen-Knochenzement-Grenzfläche gewährleistet eine innige mechanische Verzahnung der Komponenten.

Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die ermutigenden Ergebnisse der Tierversuche nur für *ex vivo* polymerisierte Systeme gelten. Bisher wurde kein Nachweis erbracht, dass eine in den lebenden Knochen eingebrachte Pastenmischung in gewünschter Weise aushärtet und in ähnlicher Weise osteoinduktiv bzw. osteokonduktiv wirksam wird.

Ein großes Problem ist die nach Einlagerung in ein wässriges Medium rapide eintretende Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften. Durch Quellung wird die Festigkeit des Matrixpolymers innerhalb weniger Stunden drastisch reduziert. Besonders nachteilig wirkt sich die Wassereinlagerung in die Füllstoff-Matrix-Grenzfläche aus. Aufgrund des relativ hohen Füllgrades der Systeme und der ungünstigen Partikelverteilung führt der Verlust der Füllstoff-Matrix-Kopplung zu einem weiteren dramatischen Verlust an Festigkeit. Die an einen Knochenzement gestellten Mindestanforderungen werden unter physiologischen Bedingungen nicht erfüllt. Das System scheint damit für lasttragende Anwendungen in der Orthopädie nicht geeignet.

Das sich evtl. durch die Möglichkeit der Steuerung der Matrixmorphologie ergebende Potential zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften wird durch den hohen Anteil an schlecht dispergiertem, große Agglomerate bildenden Füllstoff vollständig überlagert. Eine Optimierung durch Modifizierung des Matrixsystems setzt also in erster Linie die Verwendung eines geeigneteren Füllstoffes voraus. Es ist zu überprüfen, ob die dargelegten Probleme durch die Verwendung eines nanopartikulären Hydroxylapatites zumindest ansatzweise zu lösen sind.

#### **4.4 Nanostrukturierte Materialien zum Knochenersatz: Biomimetische Ansätze<sup>6</sup>**

Die Analysen zur Nanostruktur und zum Deformationsverhalten des Knochens haben gezeigt, dass die hervorragenden Eigenschaften des Materials „Knochen“ auf eine in einem sehr engen Fenster optimal eingestellte Nanokomposit-Morphologie zurückzuführen sind. Die als eigenschaftsbestimmend erkannten hybriden Nanofasern aus Kollagen und Hydroxylapatit, die durch Parallellagerung einen kompakten biologischen Werkstoff bilden, steuern die bei Deformation und Bruch ablaufenden mikromechanischen Mechanismen. Durch crazeartige Prozesse wird gewährleistet, dass das harte und steife Material Knochen eine gewisse Zähigkeit erhält.

Werkstoffe zum zeitweiligen oder dauerhaften Knochenersatz sollten dem Knochen ähnliche mechanische Eigenschaften aufweisen und biologisch verträglich sein bzw. aktiv zur gezielten Neubildung von Knochen beitragen. In den vorangegangenen Abschnitten wurde gezeigt, dass die untersuchten Materialien nur einzelne Teilaspekte der gestellten Anforderungen erfüllen. So zeigt das zuletzt diskutierte Modellsystem eine hervorragende Bioaktivität, da es einen innigen Kontakt zum Knochen ausbildet und die Knochenneubildung stimuliert. Jedoch sind die für lasttragende Anwendungen in der Orthopädie entscheidenden mechanischen Eigenschaften (Biegefestigkeit, Druckfestigkeit, Elastizitätsmodul) nicht ausreichend. Mit anderen Worten: die strukturelle Kompatibilität ist nicht gegeben.

Im Folgenden sollen zwei getrennte Wege aufgezeigt werden, wie durch Nachahmung (*mimicry*) von Strukturen und mikromechanischen Mechanismen des Knochens Verbesserungen der mechanischen Eigenschaften unter Beibehaltung der guten Oberflächenkompatibilität (osteoinduktive bzw. osteokonduktive Eigenschaften) erreicht werden könnten. Dabei sollen alle Systeme (partiell) resorbierbar sein. Diese Ansätze sind:

- Substitution der in den unter 4.3 beschriebenen aushärtbaren Modellsystemen verwendeten HAp-Mikropartikel durch HAp-Nanopartikel (→ Knochenzement)
- Herstellung von Nanokompositen aus PHB und HAp-Nanopartikeln (→ Knochenersatz)

---

<sup>6</sup> Die hier beschriebenen Verfahren und Produkte sind in Teilen zum Patent angemeldet [152].

Eine weitere mögliche Anwendung der Kombination des resorbierbaren Polymers PHB mit dem osteoinduktiven Füllstoff HAp besteht darin, Substrate für die Ansiedlung von Knochenzellen zu formen (*tissue engineering*). Erste Untersuchungen zur Ansiedlung von Chondrozyten in einem vergleichbaren, nicht mit HAp versehenen Substrat sind vielversprechend [153]. Durch Kompaktierung der hybriden PHB/HAp-Nanofasern kann möglicherweise ein Werkstoff hergestellt werden, der in seiner Nanostruktur dem Knochen sehr stark ähnelt (Strukturmimikry). Arbeiten in dieser Richtung sind Gegenstand eigenständiger Untersuchungen, die in einem aus der Fachgruppe Allgemeine Werkstoffwissenschaften und der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin gebildeten Arbeitskreis durchgeführt werden.

#### 4.4.1 Hydroxylapatit: Bioaktive Nanopartikel

Die Verwendung von Hydroxylapatit zur Stimulation der Knochenneubildung ist weit verbreitet. Ob als reiner HAp in Form mikro- oder nanoskopischer Partikel in der Kieferheilkunde, als gesinterte, poröse Körper zum Auffüllen von Knochendefekten oder als osteoinduktive Beschichtung von Implantaten wird dieses Material mit großem Erfolg eingesetzt. Häufig stellt sich jedoch auch hier das Problem, dass kompakte Implantate aus reinem HAp aufgrund ihrer geringen Festigkeit und Sprödigkeit für lasttragende Anwendungen nicht geeignet sind.

Für die in diesem Abschnitt vorgestellten Kompositmaterialien wurden nanoskopische HAp-Füllstoffe verschiedener Herkunft verwendet:

- HAp aus Knochen

Durch enzymatischen Abbau von Schafsknochen und anschließende Reinigungsschritte wurde eine Suspension natürlicher HAp-Nanopartikel in Wasser erhalten. Die Morphologie der aus kompaktem Knochen gewonnenen HAp-Nanopartikel wird z.B. in Abbildung 40b erkennbar. Die dünnen, unregelmäßig geformten Plättchen besitzen ungefähren Abmessungen 50nm x 25nm x 5nm.

- synthetischer HAp

Ein handelsübliches, hauptsächlich zur Augmentation von Defekten im Kieferknochen verwendetes Material (OSTIM SPR, HERAEUS KULZER) besteht aus einer pastös vorliegenden Suspension synthetischer HAp-Nanopartikel in Wasser. Gestalt und Größe der

synthetischen HAp-Nanopartikeln können anhand der Abb. b bestimmt werden: Die nadelförmigen Kristallite sind ungefähr 100 nm lang und 20 nm dick.

#### 4.4.2 Aushärtbare, partiell resorbierbare Knochenzemente

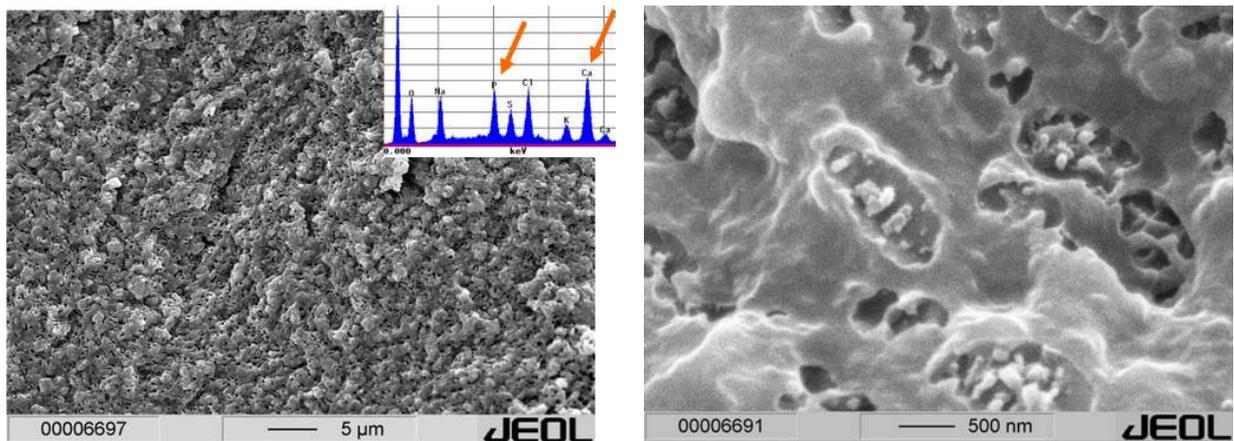
Durch die Substitution der zur Agglomeration neigenden HAp-Mikropartikel durch HAp-Nanopartikel und durch den Einsatz neuer Verfahren zur optimalen Dispergierung der Nanopartikel sollen die durch Füllstoffagglomerate verursachten überkritischen Defekte eliminiert werden. Andererseits ist zu prüfen, ob nanoskalige Füllstoffe mit den durch Selbstorganisation in der Matrix geschaffenen Nanostrukturen in Wechselwirkung treten (siehe Abschnitte 4.3.1 und 4.3.2).

- Herstellung

Dem als Verdünnermonomer (Comonomer) verwendeten HEMA wurden die durch enzymatischen Abbau der organischen Knochensubstanz gewonnenen HAp-Nanopartikel bzw. die synthetischen HAp-Nanopartikel (OSTIM) zugegeben. Durch Ultraschalleinwirkung (1h, 23°C, 250W Ultraschall-Leistung) wurden die Nanopartikel im Monomeren dispergiert. Anschließend wurde das Makromonomer Bis-GMA:LLA 1:15 (in der verwendeten Nomenklatur: B<sup>1</sup>LLA<sup>15</sup>, siehe Abschnitt 3.1.3) zugegeben. Durch Zugabe des Aktivator/Initiator-Systems erfolgte redox-initiiert die vernetzende Copolymerisation unter Anwesenheit des nanoskopischen Füllstoffes HAp. Das Produkt kann nach der oben eingeführten Nomenklatur als B<sup>1</sup>LLA<sup>15</sup>-co-HEMA + 10%nanoHAp bezeichnet werden.

- Morphologie

Nach dem beschriebenen Verfahren ist es also möglich, einen echten Nanokomposit herzustellen. In der Übersichtsaufnahme Abbildung 90a ist zu erkennen, dass die Verteilung des Füllstoffes auch über größere Volumina sehr gleichmassig ist. Neben den dem HAp zuzuordnenden Elementen Ca und P zeigt das EDX-Spektrum peaks der Elemente K, S und Cl, was auf eine nicht zu vernachlässigende Verunreinigung der HAp-Nanopartikel durch Reste des zum Abbau der Kollagenmatrix verwendeten Enzyms und der Pufferlösung hindeutet. Abbildung 90b beweist, dass die HAp-Nanopartikel vereinzelt oder in kleineren Agglomeraten (< 1µm) vorliegen.

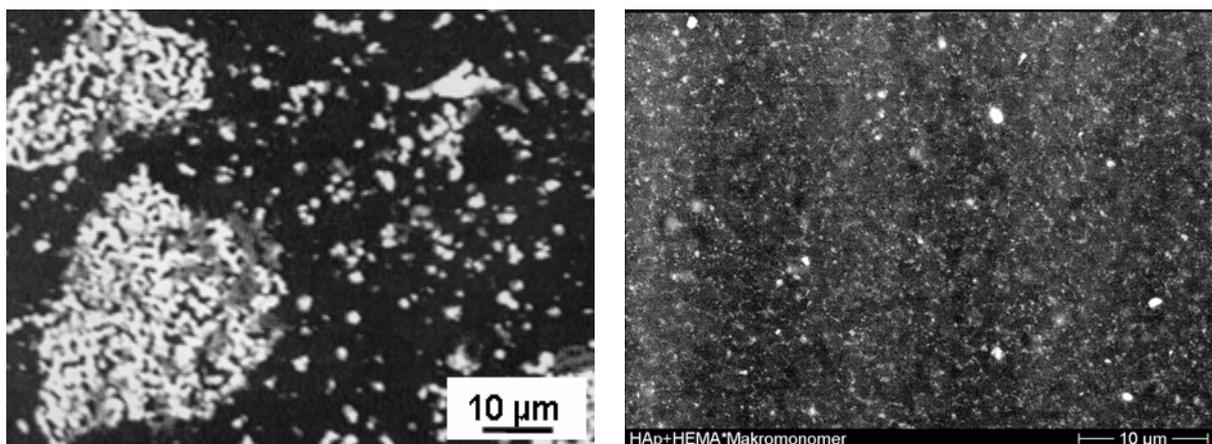


a

b

**Abb. 90:** Morphologie eines Nanokomposites aus einem aushärtbaren, partiell resorbierbaren Matrixpolymer und natürlichem, aus Knochen gewonnenem HAp ( $B^1LLA^{15}$ -*co*-HEMA + 10% nanoHAp); a) Übersichtsaufnahme und EDX-Spektrum, b) Detail; Bruchfläche, REM

Günstiger ist, einen synthetischen, hochreinen und sterilen Hydroxylapatit zu verwenden, der durch umfangreiche klinische Erprobungen seine Verträglichkeit, Resorbierbarkeit und Osteoinduktivität unter Beweis gestellt hat. Auch in diesem Falle gelingt es, durch das beschriebene Verfahren relativ leicht einen Nanokompositwerkstoff zu erzeugen. Die Übersichtsaufnahme zeigt, dass die Nanopartikel über große Bereiche gut dispergiert sind. Die größten beobachteten Agglomerate haben Durchmesser von ungefähr 1 µm (Abb. 91b).



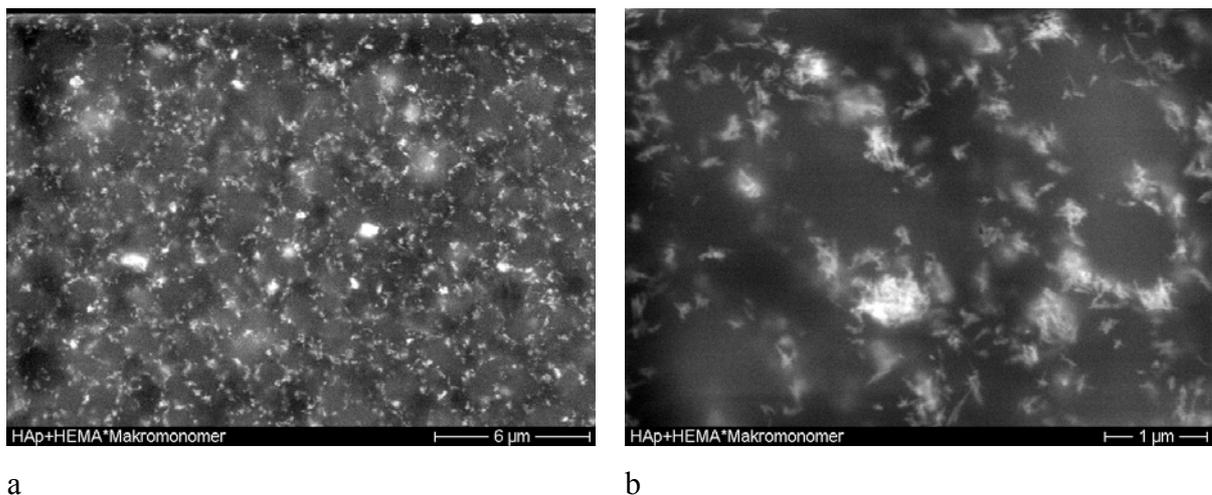
a

b

**Abb. 91:** Vergleich der Kompositmorphologie von partiell resorbierbaren Knochenzementen: a) System mit mikroskopischen, stark agglomerierten HAp-Partikeln ( $B^1VL^2LLA^6(Sn,stu)$ -*co*-TEGDMA + 45%HAp) und b) System  $B^1LLA^{15}$ -*co*-HEMA mit HAp-Nanopartikeln; REM bzw. ESEM, Rückstreuelektronen-Materialkontrast

Interessant ist der Vergleich der Morphologie dieser Nanokomposite mit der Kompositmorphologie der vorhergehenden, mit mikroskopischen und zur Agglomeration neigenden HAp-Partikeln gefüllten Systeme (Abb. 91a). Die Durchmesser der größten beobachtbaren Agglomerate des Nanokomposites liegen im Größenbereich der kleinsten Einzelpartikel des mit Mikropartikeln gefüllten Systems.

Bei höheren Vergrößerungen erhaltene Detailaufnahmen belegen, dass der nadelförmige Füllstoff tatsächlich einzeln, in wenigen Partikeln überlappend oder in kleineren Agglomeraten vorliegt. Die beobachteten Agglomerate sind in jedem Falle kleiner als  $1\ \mu\text{m}$  (Abb. 92a). In Abbildung 92a kann ein interessantes Phänomen festgestellt werden: Es existieren kreisrunde Bereiche von 1 bis  $2\ \mu\text{m}$  Durchmesser, die völlig frei von Füllstoffpartikeln sind. An den Rändern dieser Zonen treten dagegen teilweise Säume auf, in denen HAp-Nanopartikel konzentriert sind. Da es sich bei dem System B<sup>1</sup>LLA<sup>15</sup>-co-HEMA um eine kristallisationsfähige Makromonomer-Comonomer-Mischung handelt ( $n_{\text{LLA}} \geq 8$ , s. Abschnitt 4.3.1), können sphärolithartige Überstrukturen entstehen. Diese bereits in der Flüssigphase (Makromonomer + Verdünnermonomer) vorhandenen Überstrukturen werden bei der Einmischung des nanoskopischen Füllstoffes nicht zerstört. Der Füllstoff liegt nur außerhalb der kristallinen Überstrukturen vor. Damit ist ausgeschlossen, dass der Nanofüllstoff auf dem vorgeschlagenen Wege in eine der durch Selbstorganisation geschaffenen lamellaren Domänen eingebaut werden kann. Die Bildung „hybrider Lamellen“, die die faserartige Struktur des Knochens nachahmen, ist bisher nicht gelungen.



**Abb. 92:** Kompositmorphologie des Systems B<sup>1</sup>LLA<sup>15</sup>-co-HEMA + 10% nanoHAp: a) System mit B<sup>1</sup>LLA<sup>15</sup>-co-HEMA mit synthetischen HAp-Nanopartikeln, b) Detail; Bruchfläche, ESEM, BSE-Materialkontrast

## **Fazit:**

Es ist möglich, die in den neuartigen, resorbierbaren Knochenzementen als katastrophale morphologische Defekte wirkenden übergroßen Teilchenagglomerate vollständig zu eliminieren. Da die chemische Zusammensetzung der Komposite unverändert bleibt, kann von einer weiterhin exzellenten Oberflächenkompatibilität (Verträglichkeit, Stimulierung der Knochenneubildung) in völliger Analogie zu den in Abschnitt 4.3.4 gezeigten Resultaten ausgegangen werden. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Probenmengen war eine Bestimmung der mechanischen Eigenschaften nicht möglich. Es ist aber vorstellbar, dass ein auf dem vorgeschlagenen Wege hergestellter Nanokomposit die Steifigkeit und Festigkeit des Materials erhöhen kann und die negativen Auswirkungen übergroßer Teilchenagglomerate (Erhöhung der Sprödigkeit) vermeidet. Insbesondere könnte bereits ein geringerer Füllgrad eine deutliche Erhöhung von Pastenviskosität (Verarbeitungseigenschaft der Pasten) sowie von Steifigkeit und Festigkeit ( $E$ ,  $B$ ,  $\sigma_D$ ,  $\sigma_T$ ) bewirken.

### 4.4.3 Resorbierbare, bioaktive PHB/HAp-Nanokomposite zum Knochenersatz

In den letzten Jahren wurde eine fast unüberschaubare Zahl von Vorschlägen zur Herstellung biokompatibler, bioresorbierbarer Komposite und Nanokomposite publiziert, in denen ein geeignet erscheinendes Matrixpolymer mit einer bioaktiven, die Knochenneubildung anregenden Komponente kombiniert wird. In fast allen Veröffentlichungen wird dabei auf verschiedenen Wegen gewonnenes Hydroxylapatit mit unterschiedlichen stöchiometrischen Zusammensetzungen und Partikelformen verwendet. Als Matrixpolymere kommen hauptsächlich Polylactide (PLLA, PDLA) [127], Polyhydroxyalkanoate (PHB, P(HB-co-HV)) [128], Polycaprolacton (PCL) [129], Gelatine und Kollagene [130-136] sowie Polysaccharide [137-139] zu Einsatz. In den meisten Fällen wird der bioaktive Füllstoff auf thermomechanischem Wege eingearbeitet. Verbreitet erfolgt die Zumischung auch über Lösungsverfahren. Vielversprechend sind Ansätze, bei denen eine biomimetische Ausfällung von Calciumphosphaten in einer vorgegebenen Polymerlösung oder in einem Gel erfolgt [130, 135, 136]. Auf die große Zahl der Arbeiten zu konventionellen Kompositen aus mikroskopischen HAp-Partikeln mit bioinerten Matrixpolymeren (PMMA und PEMA [140-142], HDPE und UHMWPE [143-148], PP [149] und andere) soll nicht eingegangen werden, obwohl einige von diesen durch die Urheber erstaunlicherweise als „knochenanaloge Werkstoffe“ bezeichnet werden (BONFIELD et al. [147, 148]).

Überraschenderweise existiert nur eine geringe Zahl von Arbeiten, die den durch bakterielle Biosynthese gebildeten aliphatischen Polyester PHB als Matrixpolymer nutzen. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass PHB bereits in reiner Form ein außerordentlich sprödes Material ist. Mit einer Bruchdehnung von maximal 6% [2] scheint die zusätzliche Beimengung eines Füllstoffes nicht sinnvoll. Ursache der Sprödigkeit ist eine aufgrund der hohen optischen Reinheit extrem hohe Kristallinität von bis zu 80%. Die primäre Kristallisation führt zur Ausbildung einer sehr groben sphärolithischen Textur, wobei Sphärolithdurchmesser von einigen 100µm typisch sind. Im Zuge einer intensiven Nachkristallisation bei Raumtemperatur wird dieses Gefüge von vielen inter- und intrasphärolithischen Rissen durchzogen, die ein vorzeitiges Versagen des Materials und damit ein ausgesprochen sprödes Materialverhalten zur Folge haben. Eine evtl. dem Material innewohnende Fähigkeit zur plastischen Deformation kann daher nicht zum Tragen kommen. Dennoch wurden von verschiedenen Autoren Komposite aus PHB und HAp vorgestellt und patentiert. Bei allen Kompositen wurden HAp-Mikropartikel mit mittleren Partikelgrößen von ungefähr 8µm auf thermomechanischem Wege (Extrusion) eingearbeitet. Wie zu erwarten, sinkt schon bei geringen Füllgraden die verbleibende Bruchdehnung auf unter 1%. Der Elastizitätsmodul dagegen konnte erwartungsgemäß gesteigert werden [128]. Eine Patentschrift, in der unter anderem der Anspruch der Herstellung eines Nanokomposites unter Verwendung von PHB und HAp erhoben wird, kommt ohne jede Darstellung der erreichten Morphologie bzw. der realisierten mechanischen Eigenschaften aus [150].

Bei dem hier vorgestellten Nanokomposit sollte geprüft werden, ob auf dem Lösungsweg ein Modellsystem mit hinreichend gut dispergierten HAp-Nanopartikeln erreicht werden kann. Das Material sollte für lasttragende Anwendungen in der Orthopädie und der Kieferheilkunde, z.B. zum temporären Ersatz von Knochen und zum Auffüllen von Knochendefekten, sowie zur Fixierung bei Frakturen, bei Kallusdistraktion und anderen Verfahren der wiederherstellenden und kosmetischen Chirurgie geeignet sein. Dabei ist im Falle der PHB/HAp-Nanokomposite keine Abformung und Aushärtung im knöchernen Lager möglich. Das Implantat muss *ex vivo* in die entsprechende Form gebracht und dann in die ausgearbeitete Kavität eingesetzt werden. Ziel der Arbeiten war die Klärung der Frage, ob im Nanokomposit Effekte eintreten, die eine Zähigkeitssteigerung des PHB bewirken oder zumindest eine weitere Versprödung verhindern können. Dennoch soll durch die Zugabe einer ausreichenden Menge des bioaktiven Füllstoffes eine Erhöhung der Festigkeit und Steifigkeit des Materials erreicht werden. Angestrebt wird eine Annäherung an die entsprechenden

mechanischen Kennwerte des Knochens. Die osteoinduktive Wirkung des HAp soll zur Geltung kommen. Dazu können zwei Hypothesen formuliert werden:

1. Der verwendete bioaktive Füllstoff mit Partikelgrößen kleiner 100 nm wird so fein dispergiert, dass die dadurch realisierten kleinen mittleren Teilchenabstände die für Nanokomposite vermuteten zähigkeitssteigernden Mechanismen auslösen. In den dünnen Matrixstegen werden plastische Fließprozesse initiiert (siehe Abschnitt 2.3.2).
2. Der verwendete Füllstoff beeinflusst das Kristallisationsverhalten des sehr gut kristallisationsfähigen Matrixpolymers. Die Neigung zur Bildung einer grobsphärolithischen Struktur wird unterdrückt. Die damit verbundenen sprödartigen Versagensmechanismen (inter- und intrasphärolithische Risseinleitung) werden vermieden.

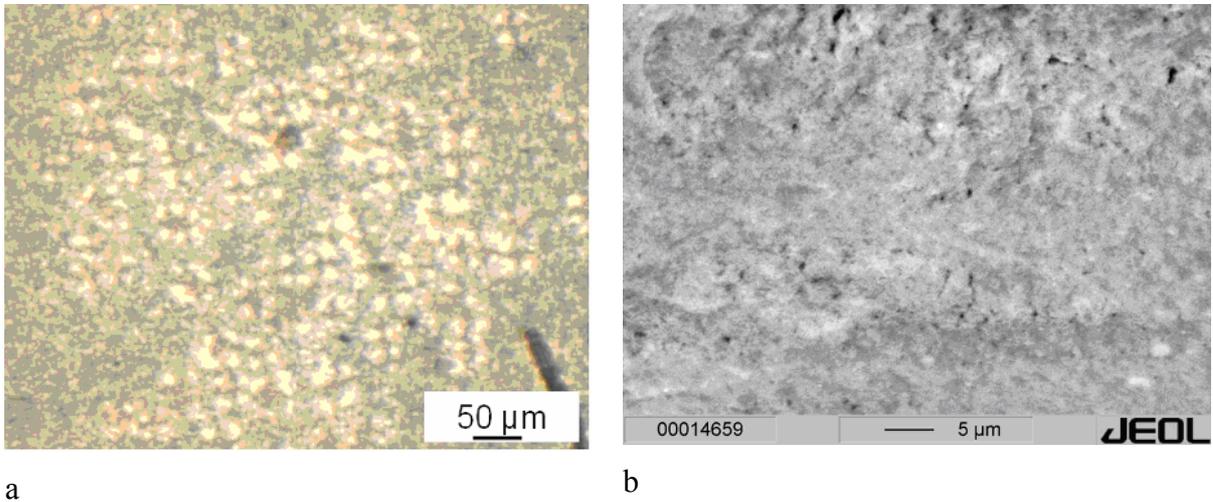
- Herstellung der Nanokompositwerkstoffe

Das als Matrix verwendete PHB Methanomer<sup>®</sup> wird aus Methan nach einem patentierten Verfahren [151] am Umweltforschungszentrum Leipzig hergestellt. Es zeichnet sich durch ein hohes Molekulargewicht von 600.000 bis 2.300.000 g/mol und eine hohe Reinheit (Stickstoffgehalt <0,02%) aus. Hydroxylapatit-Nanopartikel (OSTIMR-SPR, HERAEUS, Deutschland) werden in Äthanol unter Ultraschall-Einwirkung dispergiert. Diese Suspension wird in eine ca. 10%ige Lösung des PHB in Chloroform gegeben. Die Mischung aus Polymerlösung und Hydroxylapatit-Suspension wird bei 80°C unter Ultraschalleinwirkung belassen, bis die Lösung vollständig transparent ist (ca. 4h). Aus der Lösung werden Filme gegossen. Nach Abdampfen des Lösungsmittels erhält man einen ca. 100 µm dicken, flexiblen Film. Dieser wird anschließend getrocknet, aufgeschmolzen und unter Vakuum bei definierten Temperaturen isotherm kristallisiert.

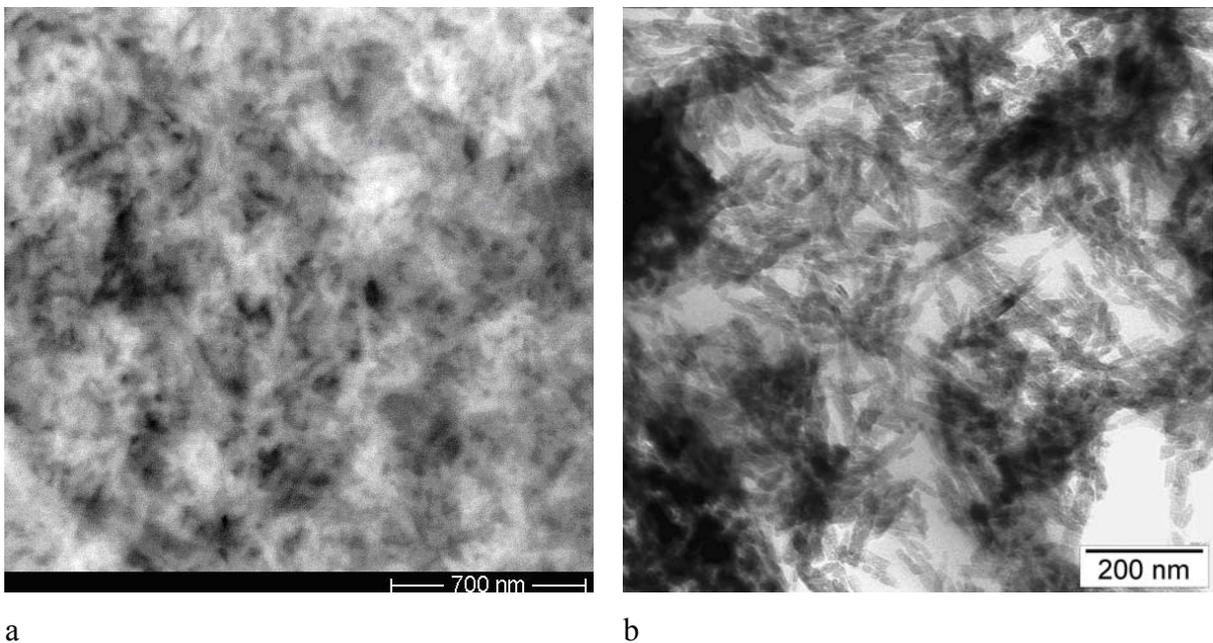
- Morphologie der Nanokomposite

In den im Lichtmikroskop bei geringen Vergrößerungen erhaltenen Übersichtsaufnahmen sind keine Füllstoffagglomerate detektierbar (Abb. 93a). Überraschend ist, dass ein vergleichsweise feines sphärolithisches Gefüge ausgebildet wurde. Die gleichmäßige Verteilung des Füllstoffes wird in der Rückstreuелеktronen-Materialkontrastaufnahme (geringe Vergrößerung im REM, Abb. 93b) deutlich sichtbar. Obgleich geringe Fluktuationen der Füllstoffkonzentration vorliegen, ist die gesamte abgebildete Fläche von den im BSE-Signal hell erscheinenden HAp-Partikeln erfüllt. Einzelpartikel oder Agglomerate können in

der Übersichtsaufnahme nicht detektiert werden, was auf eine homogene Füllstoffverteilung über den gesamten Probenquerschnitt hindeutet.



**Abb. 93:** Übersichtsaufnahmen zur Morphologie eines bei 23°C kristallisierten Nanokomposites aus PHB ( $M_w = 900$  kg/mol) und 20% nanopartikulärem HAp; a) lichtmikroskopische Aufnahme, b) Rückstreuелеktronen-Materialkontrastaufnahme einer Bruchfläche (REM)



**Abb. 94:** Details der Morphologie eines Nanokomposites aus PHB ( $M_w = 900$  kg/mol) und 50% nanopartikulärem HAp bei höheren Vergrößerungen; a) Rückstreuелеktronen-Materialkontrastaufnahme einer Bruchfläche (ESEM), b) TEM-Aufnahme eines Ultradünnschnittes

Hochauflösende ESEM- und TEM-Aufnahmen belegen, dass der im REM-Bild (Abb. 93b) sichtbare homogene „Hintergrund“ tatsächlich aus sehr fein verteilten HAp-Nanopartikeln besteht (Abb. 94). Obwohl die HAp-Nadeln sich aufgrund des hohen Füllstoffgehaltes überlappen (Perkolation), ist eine durchgehende PHB-Matrix erkennbar. Vergleicht man die ESEM-Aufnahme der Nanokompositmorphologie des Systems PHB/HAp (Abb. 94a) mit einer bei gleicher Vergrößerung aufgezeichneten ESEM-Aufnahme des kompakten Knochens stellt man fest, dass eine Ähnlichkeit mit der Nanostruktur des Knochens vorhanden ist.

- Ergebnisse der thermischen Analyse (DSC)

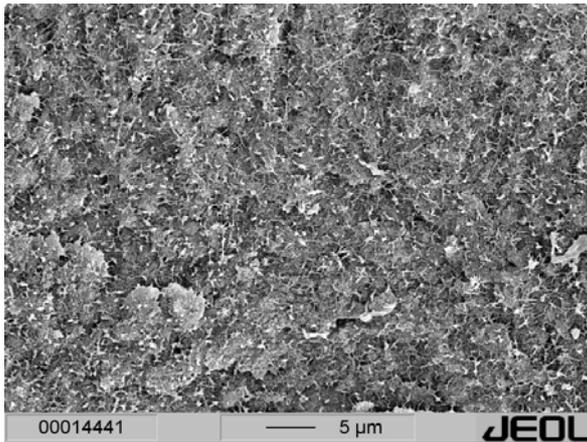
	$T_m$ [°C]	$\Delta H$ [J/g]
PHB rein $M_w = 900.000$ g/mol	174,74	88,72
PHB + 20% HAp	168,74	32,83

**Tab. 21:** Thermische Eigenschaften (DSC) eines reinen PHB-Matrixpolymers sowie eines Nanokompositwerkstoffes mit 20% HAp

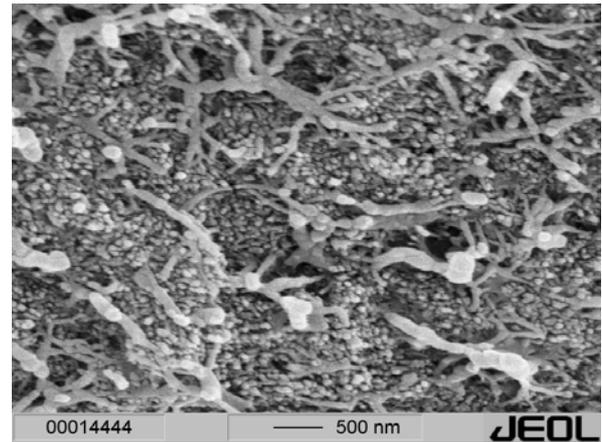
Erste Ergebnisse einer DSC-Analyse belegen, dass die Zugabe des nanopartikulären Füllstoffes eine signifikante Verringerung der Kristallinität des Matrixpolymers bewirkt (Tab. 21). Beide Proben wurden nach identischen Kristallisationsprozeduren (isotherme Kristallisation bei 23°C, 96h) vermessen. Die Schmelzenthalpie der Probe PHB + 20% HAp wurde auf die entsprechende Masse des im Komposit vorhandenen PHB normiert.

- Mikromechanische Mechanismen und mechanische Eigenschaften

In den folgenden Bildern sind durch Gewaltbruch bei Raumtemperatur erzeugte Bruchflächen und die Oberflächen von per Hand auf Biegung beanspruchten Proben abgebildet. Eine definierte Prüfung war aufgrund der geringen Probenmengen (ungefähr 0,5g) nicht möglich. Dennoch sollen die Bilder herangezogen werden, um einige grundlegende Effekte zu illustrieren. Die Übersichtsaufnahme einer Bruchfläche beweist, dass über den Probenquerschnitt eine homogene Verteilung des Füllstoffes vorliegt (Abb. 95a). Die Detailaufnahme der Bruchfläche zeigt plastisch verstreckte Anteile des Matrixpolymers, welche sich nach dem Bruch als fibrillenartige Gebilde auf der Bruchfläche finden (Abb. 95b).

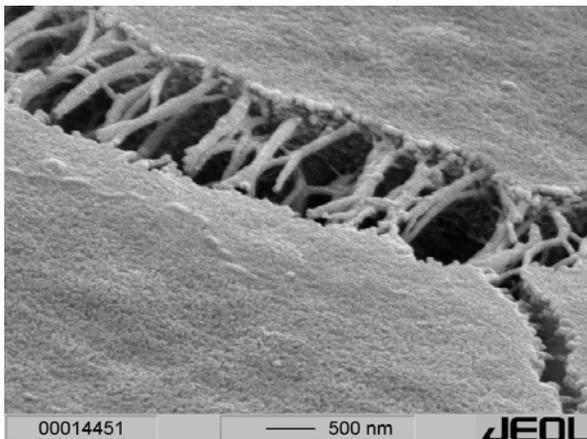


a

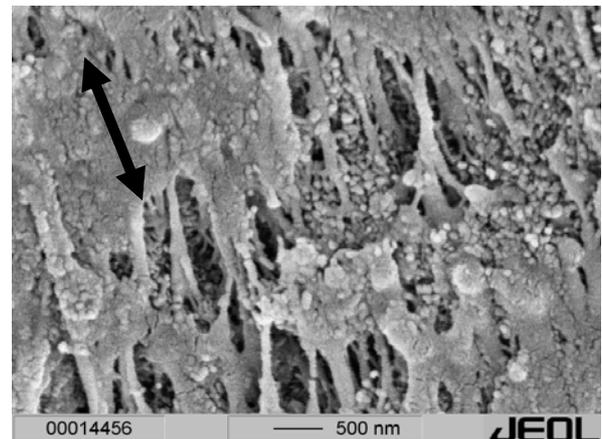


b

**Abb. 95:** Bruchfläche eines Nanokomposites aus PHB ( $M_w = 900$  kg/mol) und 50% nanopartikulärem HAp; a) Übersichtsaufnahme, b) Detail; REM



a



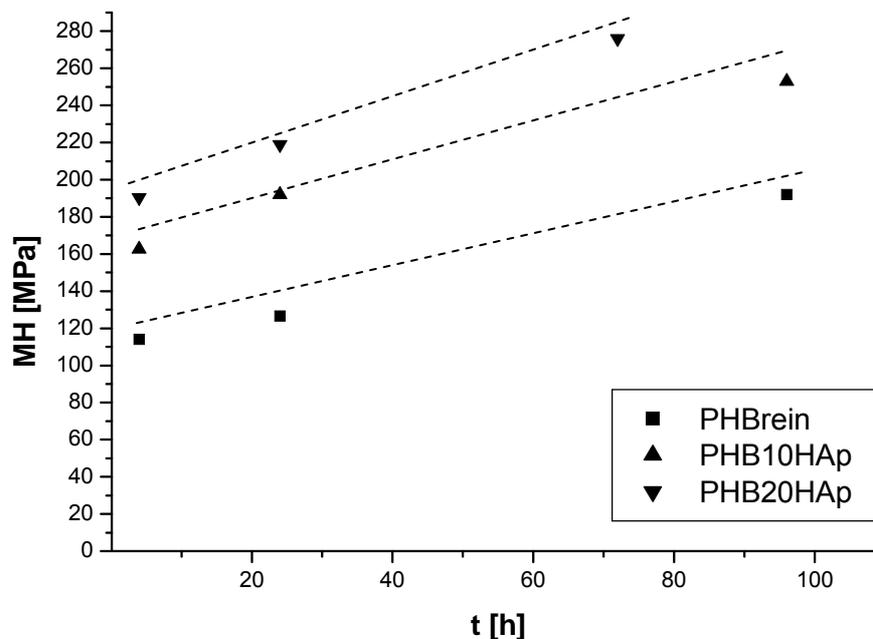
b

**Abb. 96:** Sicht auf im Biegeversuch gedehnte Probenoberflächen eines Nanokomposites aus PHB ( $M_w = 900$  kg/mol) und 50% nanopartikulärem HAp; a) crazeartige Deformationszone, b) starke plastische Deformation (Fibrillierung) des Matrixpolymers zwischen Nanopartikeln

Der Effekt der plastischen Deformation des Matrixpolymers wird in den Abbildungen 96a und b noch deutlicher. In Abbildung 96a erkennt man eine crazeartige Deformationszone, deren Ufer durch ungefähr 100 nm dicke Fibrillen überbrückt werden. Dabei wird in keinem Fall beobachtet, dass diese Crazes sich entlang der für reines PHB typischen intra- und intersphärolithischen Defekte bilden bzw. ausbreiten. Die Crazes erscheinen zufällig im rasterelektronenmikroskopisch als homogen wahrgenommenen Material. Auch hier zeigt der Vergleich mit einer bei identischer Vergrößerung im REM abgebildeten crazeartigen Deformationszone des Knochens eine frappierende Ähnlichkeit (vgl. z.B. Abb. 9b). Die

Betrachtung der bei Biegung zugbelasteten Seite der Probe zeigt ebenfalls, dass das zwischen den Nanopartikeln befindliche Matrixpolymer stellenweise eine hohe plastische Deformation aufweist. Auch in diesem Falle haben die dünnsten beobachtbaren Fibrillen Dicken von ungefähr 100 nm.

Aufgrund der geringen verfügbaren Probenmenge ist eine mechanische Prüfung zur Bestimmung wichtiger Kennwerte z.B. im Druck-, Biege- oder Zugversuch ausgeschlossen. Erste Hinweise auf den Einfluss des Füllstoffes können Mikrohärtmessungen liefern, die an den zur Verfügung stehenden Proben problemlos möglich sind. Dabei wurden das reine PHB ( $M_w = 900.000\text{g/mol}$ ) sowie Nanokomposite mit 10% und 20% Füllstoffanteil untersucht. Die Kristallisation erfolgte nach kurzem Aufschmelzen (2min,  $200^\circ\text{C}$ ) bei  $23^\circ\text{C}$ .



**Abb. 97:** Anstieg der Mikrohärtigkeit von PHB und der PHB/HAp-Nanokomposite durch Nachkristallisation (4h bis 96h Lagerung bei  $23^\circ\text{C}$ )

Wie zu erwarten, wird die Mikrohärtigkeit durch die Zugabe des nanopartikulären HAp deutlich erhöht (Abb. 97). Ein weiterer signifikanter Anstieg der Mikrohärtigkeit mit der Lagerzeit, der für alle Komposite in gleichem Maße erfolgt, ist auf die Erhöhung des Kristallinitätsgrades durch sekundäre Kristallisation zurückzuführen. Die Nachkristallisation ist auch nach 96h nicht abgeschlossen. Nach längerer Lagerzeit sollte mit dem Abschluss der sekundären Kristallisation ein konstanter Wert für die Mikrohärtigkeit erreicht werden. Es sei dennoch darauf

hingewiesen, dass nach 72h Lagerzeit und 20% Füllstoff mit einer Mikrohärtigkeit  $H=280$  MPa ein Wert erreicht wird, der bereits etwa 50% der Mikrohärtigkeit des kompakten Knochens menschlicher Femora entspricht (siehe Abschnitt 4.1.3). Unter Anwendung der TABOR-Beziehung (1) kann man abschätzen, dass eine Bruchspannung (hier identisch mit der Fließspannung) des Komposites von  $\sigma_B \approx 93$  MPa zu erwarten ist. Damit wäre der Bereich der im Zugversuch ermittelten Bruchspannungen des Knochens erreicht (siehe Tab. 3). Ein weiterer Effekt besteht darin, dass der Anstieg der Mikrohärtigkeit mit zunehmendem Füllstoffanteil nicht additiv ist. Der durch Zugabe von 20% Füllstoff gegenüber dem Komposit mit 10% HAp erreichte Zuwachs der Mikrohärtigkeit ist geringer als die gegenüber dem reinen PHB durch die Zugabe von 10% HAp hervorgerufenen Steigerung. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die durch den Füllstoff erreichte Erhöhung der Mikrohärtigkeit teilweise durch eine Verringerung des Kristallinitätsgrades kompensiert wird. Damit wäre neben den Befunden der DSC-Messungen ein weiterer Hinweis auf den Einfluss des nanopartikulären Füllstoffes auf das Kristallisationsverhalten des Matrixpolymers gegeben.

### **Fazit:**

Durch das hier vorgestellte Verfahren ist es möglich, echte Nanokomposite aus PHB und HAp herzustellen. Dabei kann bei exzellenter Dispergierung des Füllstoffes der Füllgrad des Knochens (45 bis 50%) erreicht werden. Durch die Zugabe des nanopartikulären Füllstoffes kann die Kristallisation des Matrixpolymers, die eine wesentliche Ursache der Versprödung des Matrixpolymers PHB darstellt, teilweise unterdrückt werden. Die beobachteten crazeartigen Mechanismen sind mit den bei Deformation des kompakten Knochens festgestellten Prozessen vergleichbar. Es erscheint daher auch möglich, durch optimale Verteilung der Nanopartikel zähigkeitssteigernde Mechanismen in Form starker lokaler plastischer Deformation der Matrixstege zwischen den Füllstoffteilchen zu initiieren. Gleichzeitig belegen erste Resultate der durchgeführten Mikrohärtigkeitsmessungen, dass Mikrohärtigkeit und Bruchspannung (nach TABOR abgeleitet) sich den entsprechenden Werten des kompakten Knochens annähern bzw. diese erreichen. Das vorgestellte System besitzt in Morphologie und mechanischem Verhalten das Potential für eine gute Annäherung an den Knochen (Strukturmimikry). Neben der sich abzeichnenden Strukturkompatibilität kann aus den bekannten Eigenschaften der Komponenten PHB und HAp eine Oberflächenkompatibilität im Sinne einer Verträglichkeit, Resorbierbarkeit und Osteoinduktivität erwartet werden.

## 5 Schlussfolgerungen und Ausblick



*Wer hohe Türme bauen will, muss lange beim Fundament verweilen.*

Anton Bruckner

(Grafik: aus [1])

Die Entwicklung moderner, biokompatibler Werkstoffe zum dauerhaften oder zeitweiligen Knochenersatz bzw. zur stabilen Verankerung von Endoprothesen verfolgt zwei Hauptziele: Erstens wird eine strukturelle Kompatibilität angestrebt, d.h., das Material hat die im Stütz- und Bewegungsapparat gestellten mechanischen Anforderungen zu erfüllen. Zweitens fordert man eine Oberflächenkompatibilität, die in erster Linie die Verträglichkeit im Organismus und, je nach konkretem Einsatzziel, bioinertes Verhalten, Bioaktivität oder Bioresorbierbarkeit umfasst. Die in dieser Arbeit gewählte Strategie zur mechanischen und biologischen Anpassung besteht in der Strukturmimikry des Knochens.

Eines der wichtigen Ziele, die in der vorliegenden Arbeit erreicht wurden, ist die Aufklärung der eigenschaftsbestimmenden morphologischen Parameter und der das mechanische Verhalten dominierenden mikromechanischen Mechanismen des Knochens. Die auf diesem Gebiet gewonnenen Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Bewertung und den Vergleich konventioneller, in der medizinischen Praxis bewährter Knochenzemente und neuartiger, (partiell) resorbierbarer Materialien zum Knochenersatz. Die vorgestellten nanostrukturierten Werkstoffe erlauben, die Morphologie des Knochens auf der Nanometerebene und die bei Deformation ablaufenden mikromechanischen Prozesse und letztlich die resultierenden mechanischen Eigenschaften – mehr oder weniger perfekt – nachzuahmen.

Ein durchaus angestrebter, zukunftsweisender Effekt ist, dass die gewonnenen Einsichten bei der Schaffung technischer Nanokompositwerkstoffe Verwendung finden sollen. Dieser in das Forschungsgebiet der Bionik führende Aufgabenkomplex soll in der Fachgruppe Allgemeine Werkstoffwissenschaften eigenständig weitergeführt werden.

Die im Rahmen der durchgeführten Arbeiten erbrachten Resultate können, nach den thematischen Schwerpunkten geordnet, in Thesen zusammengefasst werden:

#### a) Morphologie und Mikromechanik des Knochens

Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich eine erweiterte materialwissenschaftliche Definition des Knochens:

1. Knochen wird aus hybriden Nanofasern mit typischen Durchmessern von 75 bis 100 nm gebildet. Hauptbestandteile sind Kollagen und Hydroxylapatit (HAp). Der anorganische Füllstoff wird nach definierten Mustern in die polymere Faser eingebaut bzw. angelagert.
2. Das kompakte Material „Knochen“ entsteht durch Parallellagerung hybrider Nanofasern. Diese bilden durch alternierende Orientierungen Überstrukturen; das Material ist in seinen mechanischen Eigenschaften anisotrop.
3. Die HAp-Nanopartikel sind unregelmäßig geformte Plättchen mit typischen Abmessungen: Länge  $L \approx 50$  nm, Breite  $B \approx 25$  nm, Dicke  $D \approx 5$  nm. Die in die organische Matrix (Kollagen) eingebetteten HAp-Nanopartikel sind exfoliert.
4. Die hybriden Nanofasern steuern die bei Deformation und Bruch ablaufenden mikromechanischen Prozesse. Der dominierende mikromechanische Mechanismus ist crazeartig: Die Ufer der beobachteten Mikrorisse werden durch hybride Nanofasern überbrückt und stabilisiert. Mikrohohlraumbildung und Fibrillierung sind energiedissipative Prozesse, die eine gewisse Zähigkeit des Materials gewährleisten.
5. Das Material Knochen weist ein Optimum bezüglich Festigkeit, Steifigkeit und Zähigkeit auf. Abweichungen können mit altersbedingten Veränderungen der Nanokompositmorphologie korreliert werden.

#### b) Defekte und Versagensmechanismen konventioneller Knochenzemente

Versagensmechanismen konventioneller Knochenzemente können auf folgende Weise mit der Morphologie korreliert werden:

6. Große Poren mit Durchmessern von typischerweise 50 bis einigen 100  $\mu\text{m}$ , die durch Luftporen bei der Mischung der Komponenten entstehen, wirken als Spannungskonzentratoren. Die Zwickel zwischen nicht in die sekundär polymerisierte

Matrix eingebundenen PMMA-Perlen wirken als Kerb. Diese Defektkombination wirkt rissauslösend und führt zur Zerrüttung des Zementköchers.

7. Vakuummischsysteme gewährleisten die Herstellung porenfreier Zemente. Die unsachgemäße Verwendung von Vakuummischsystemen kann zu ungenügender Kopplung von Primärpartikeln und sekundär polymerisierter Matrix führen.
8. Porenfreie Zemente weisen einen höheren Polymerisationsschrumpf auf als poröse Zemente. Durch Polymerisationsschrumpf erfolgt u.U. eine Ablösung der als Röntgenkontrastmittel eingearbeiteten Füllstoffpartikel von der Matrix. Große Agglomerate ( $>10\ \mu\text{m}$ ) wirken in ähnlicher Weise negativ wie unter 6. beschrieben.
9. Die Beigabe von Antibiotika erfolgt teilweise in Partikelform. Typische Abmessungen liegen zwischen 10 und 100  $\mu\text{m}$  und haben die gleichen, unter 6. und 8. genannten negativen Folgen. Eine ausreichende Freisetzung des Antibiotikums ist aber durch große Partikel eher gegeben.

Eine wichtige Erkenntnis ist, dass der Begriff der Biokompatibilität um einen praktischen, zunächst trivial erscheinenden Aspekt erweitert werden muss: Ein zur Implantation im Menschen vorgesehenes Material muss wirtschaftlich herstellbar, gut handhabbar und in der klinischen Praxis sicher sein. Vor diesem Hintergrund stellt der Knochenzement auf Basis von PMMA trotz vieler bekannter Nachteile und Nebenwirkungen ein akzeptables, biokompatibles Material dar.

#### c) Morphologie und Eigenschaften neuartiger, partiell resorbierbarer Knochenzemente

Die Ergebnisse zu den für die vernetzbaren Makromomere mit resorbierbaren Oligolacton-Seitenketten durchgeführten Morphologieanalysen, mikromechanischen Untersuchungen und Biokompatibilitätstest führen zu folgenden Schlussfolgerungen:

10. Die Polymermatrix ist durch eine lamellare Morphologie gekennzeichnet. Die durch Phasenseparation entstehenden Lamellen haben Dicken von 3 bis 5 nm. Ab einer Oligolacton-Seitenkettenlänge von  $n \geq 8$  tritt eine Seitenkettenkristallisation innerhalb der durch Phasenseparation geschaffenen *confinements* ein.
11. Die Kompositmorphologie wird durch große Agglomerate des bioaktiven Füllstoffes Hydroxylapatit dominiert. Typische Agglomeratdurchmesser liegen zwischen 10 und 100  $\mu\text{m}$ .

12. Im trockenen Zustand sind Füllstoffpartikel und Agglomerate gut vom Matrixpolymer benetzt. Es wird eine teilweise Haftung zwischen Matrix und Füllstoff beobachtet. Die an einen Knochenzement gestellten (mechanischen) Mindestanforderungen werden zumindest teilweise erfüllt.
13. Durch Wasseraufnahme erfolgt eine signifikante Quellung und Erweichung des Matrixpolymers. Dieser Prozess kann in gewissen Grenzen durch Zusammensetzung und Synthesebedingungen der Makromonomere beeinflusst werden.
14. Durch Wasseraufnahme erfolgt die vollständige Zerstörung der Partikel-Matrix-Grenzfläche. Durch Wassereinlagerung werden die zunächst stabilen Füllstoffagglomerate desintegriert.
15. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. in wässriger Umgebung, werden die an einen Knochenzement gestellten Anforderungen in allen wichtigen Parametern weit unterschritten. Das Material ist daher strukturell nicht kompatibel. Es ist für lasttragende Anwendungen nicht geeignet.
16. Bei Implantation im Knochen wird ein bindegewebsfreier Kontakt zwischen Knochenzement und Knochen erreicht. Der eingearbeitete Füllstoff stimuliert die Neubildung von Knochen in Implantatnähe, Das Material kann daher als osteoinduktiv eingestuft werden.
17. Vereinzelt wird festgestellt, dass neu gebildeter Knochen in Defekte (Risse, Poren) und in durch partiellen Abbau geschaffene Freiräume einwachsen kann. Es erfolgt ein gerichtetes Knochenwachstum. Es wird damit eine intensive Verzahnung von Knochen und Implantat erreicht. Das Material zeigt stellenweise osteokonduktive Eigenschaften.

#### d) Nanostrukturierte Materialien zum Knochenersatz: Biomimetische Ansätze

Für die als aushärtbare Systeme im Sinne eines Knochenzementes bzw. als kompakte Materialien zum temporären Knochenersatz vorgeschlagenen Nanokompositwerkstoffe können folgende Schlussfolgerungen abgeleitet werden:

18. Über in Lösung bzw. im Monomer geführte Prozesse wurden Nanokomposite mit exzellent dispergierten Hydroxylapatit-Nanoteilchen hergestellt. Morphologische Analysen zeigen, dass eine dem Knochen ähnliche Nanostruktur erreicht wurde.

19. Erste Ergebnisse belegen, dass Festigkeit und Mikrohärtigkeit der neuartigen Nanokomposite im Bereich der entsprechenden mechanischen Kennwerte des Knochens liegen.
20. Die bei Deformation und Bruch ablaufenden mikromechanischen Mechanismen sind crazeartig. Sie sind den im Knochen beobachteten Prozessen sehr ähnlich. Durch starke plastische Deformation von Matrixstegen trägt die Matrix zu energiedissipativen Prozessen bei.
21. Die vorgestellten Systeme können hinsichtlich wichtiger struktureller und mikromechanischer Aspekte als knochenanaloge Werkstoffe bezeichnet werden.

Die vorgeschlagenen, neuen Systeme können als Lösungsansätze verstanden werden. Der Nachweis, dass auf den beschriebenen Wegen tatsächlich ein Sprung zu strukturell angepassten und die Knochenneubildung stimulierenden oder gar steuernden Systemen möglich ist, erfordert weitere, intensive und interdisziplinäre Forschungsarbeit. Schwerpunkte dieses Aufgabenkomplexes sind:

- Herstellung größerer Probenmengen, die eine Bestimmung makroskopischer mechanischer Kennwerte erlauben (Biegeversuch, Druckversuch, Zugversuch)
- Herstellung von Kompositen mit orientierten hybriden Nanofasern: Realisierung einer knochenanalogen Überstruktur (Anisotropie)
- Durchführung umfassender mikromechanischer Analysen an deformierten Prüfkörpern und *in situ*-Deformation.

## Literaturverzeichnis

- [1] G.A. Borelli. De motu animalium. Opus posthumum. Pars prima; Romae, Ex Typographia Angeli Bernabo, 1680
- [2] E. Wintermantel, S.-W. Ha: Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen: Implantate für Medizin und Umwelt; Springer, Berlin Heidelberg New York 1996
- [3] MaTech – Neue Materialien für Schlüsseltechnologien des 21. Jahrhunderts. Jahresbericht 1999/2000; Forschungszentrum Jülich, Projektträger Neue Materialien und Chemische Technologien NMT, 2000
- [4] G.H. Michler: Kunststoff-Mikromechanik: Morphologie, Deformations- und Bruchmechanismen; Hanser, München, Wien 1992
- [5] F. Horan: The bone and joint decade – 2000 to 2010; J. Bone Joint Surg. 81(B)(1999), 377-379
- [6] T.C. Lee: Themes for the bone and joint decade – 2000 to 2010: Microdamage in osteoporosis, bone quality and remodelling; in: Prendergast PJ et al. (eds): Proceedings of the 12th Conference of the European Society of Biomechanics, Dublin 2000, 37
- [7] T.C. Lee: Microdamage in osteoporosis, bone quality and remodelling; J. Anat. 203 (2003), 159
- [8] R. Bruce Martin, D.S. Burr, N.A. Sharkey: Skeletal tissue mechanics; Springer, New York Berlin Heidelberg 1998
- [9] I.V. Yannas: Natural Materials; in: B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons (eds.): Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine; Academic Press, San Diego London Boston 1996, p. 86
- [10] H. Leonhardt: Histologie und Zytologie des Menschen; 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971, S. 134
- [11] K. Kühn, W. Graßmann, U. Hofmann: Die elektronenmikroskopische "Anfärbung" des Kollagens und die Ausbildung einer hochunterteilten Querstreifung; Z. Naturforschg. 13b (1958), 154-160

- [12] K. Kühn, E. Gebhardt: Chemische und elektronenoptische Untersuchungen über die Reaktion von Chrom (III)-komplexen mit Kollagen; *Z. Naturforsch.* 15b (1960), 23-30
- [13] T. Nemetschek: Zur Topochemie einiger Reaktionen am Kollagen; *Kolloid-Z. u. Z. Polymere* 215(1) (1967), 1-10
- [14] O. Bucher, H. Wartenberg: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*; 11. Auflage, Huber, Bern Stuttgart Toronto, 1989
- [15] J. Currey: *The Mechanical Adaptions of Bones*; Princeton University Press, Princeton 1984
- [16] <http://flexicon.doccheck.com>
- [17] A. Bernstein, S. Henning, R. Hube, U. Schietsch, W. Hein: Analysis of the interface between bone and biomaterial; G. Bischoff and H.-J. Hein (eds.): *Micro- and nanostructures in biological systems*, 93-108; Shaker, Aachen 2001
- [18] A. Sebastian: *A Dictionary of the History of Medicine*; The Parthenon Publishing Group, New York London 1999
- [19] A. Boyde, S.J. Jones: Back-scattered electron imaging of skeletal tissues; *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.* 5 (1983), 145-150
- [20] P. Roschger, H. Plenck Jr., K. Klaushofer, J. Eschberger: A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities; *Scanning Microscopy* 9(1) (1995), 75-88
- [21] A. Boyde, R. Travers, F.H. Glorieux, S.J. Jones: The mineralization density of iliac crest bone from children with osteogenesis imperfecta; *Calcif. Tissue Int.* 64 (1999), 185-190
- [22] S.J. Jones, F.H. Glorieux, R. Travers, A. Boyde: The microscopic structure of bone in normal children and patients with osteogenesis imperfecta: A survey using backscattered electron imaging; *Calcif. Tissue Int.* 64 (1999), 8-17

- [23] J. Currey: Cortical bone; in: J. Black, G. Hastings (eds.): Handbook of Biomaterials Properties; Chapman&Hall, London Weinheim New York 1998
- [24] W.J. Landis, K.J. Hodgens, J. Arena, M.J. Song, B.F. McEwen: Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography; *Micros.Res.Tech.* 33 (1996), 192-202
- [25] V. Ziv, S. Weiner: Bone crystal sizes: A comparison of transmission electron microscopic and x-ray diffraction line width broadening techniques; *Connective Tissue Res.* 30 (1994), 165-175
- [26] M.A. Rubin, I. Jasiuk, J. Taylor, J. Rubin, T. Ganey, R.P. Apkarian: TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone; *Bone* 33 (2003), 270-282
- [27] X. Su, K. Sun, F.Z. Cui, W.J. Landis: Organization of apatite crystals in human woven bone; *Bone* 32 (2003), 150-162
- [28] V. Benezra Rosen, L.W. Hobbs, M. Spector: The ultrastructure of anorganic bovine bone and selected synthetic hydroxyapatites used as bone graft substitute materials; *Biomaterials* 23 (2002), 921-928
- [29] H.-J. Hein, L. Weisser, T. Engler, A. Bernstein, J. Brandt: Zur Darstellung der Mikrostruktur des Knochens mit dem Raster-Sondenmikroskop; *Z. Med. Phys.* 7 (1997), 21-26
- [30] S.J. Eppell, W. Tong, J.L. Katz, L. Kuhn, M.J. Glimcher: Shape and size of isolated bone mineralites measured using atomic force microscopy; *J. Orthopaedic Res.* 19 (2001), 1027-1034
- [31] I. Eckard, S. Henning, F. Syrowatka, R. Gerlach, H.-J. Hein: Mechanische Veränderungen des Knochens nach Röntgenbestrahlung mit niedrigen Dosen; *Der Radiologe* 41(8) (2001), 695-699
- [32] S.V. Dorozhkin; M. Epple „Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphat“, *Angewandte Chemie* 2002; S. 3260-3277
- [33] A.L. Boskey: Bone Mineralization; in: S.C. Cowin (ed.), *Bone Mechanics Handbook*, second edition, CRC press Boca Raton 2001, Chapt. 5

- [34] M.M. Giraud-Guille: Twisted plywood architecture of collagen fibrils in human compact bone osteons; *Calcif. Tissue Int.* 42 (1988), 167-180
- [35] D. Erts, L.J. Gathercole, E.D.T Atkins: Scanning probe microscopy of interfibrillar crystallites in calcified collagen; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 5 (1994), 200-206;
- [36] Ch. H. Turner, D.B. Burr: Experimental techniques for bone mechanics; in: S.C. Cowin (ed.): *Bone Mechanics Handbook*; second edition, CRC press Boca Raton 2001
- [37] J.D. Currey: The effects of drying and re-wetting on some mechanical properties of cortical bone; *J. Biomech.* 21 (1988), 439-441
- [38] X.E. Guo: Mechanical properties of cortical bone and cancellous bone tissue; in: S.C. Cowin (ed.): *Bone Mechanics Handbook*; second edition, CRC press Boca Raton 2001
- [39] H. Vinz: Die Änderung der Materialeigenschaften und der stofflichen Zusammensetzung des kompakten Knochengewebes im Laufe der Altersentwicklung; *Nova Acta Leopoldina Nummer 192, Band 35, Halle Leipzig* 1970
- [40] P.K. Zysset, X.E. Guo, C.E. Hoffler, K.E. Moore, S.A. Goldstein: Elastic modulus and hardness of cortical and trabecular bone lamellae measured by nanoindentation in the human femur; *J Biomechanics* 32 (1999), 1005-1012
- [41] R.B. Martin, N.A. Sharkey: Mechanical effects of postmortem changes, preservation, and allograft bone treatment; in: S.C. Cowin (ed.): *Bone Mechanics Handbook*; second edition, CRC press Boca Raton 2001
- [42] H. Peterlik: Bruchmechanik und Rißausbreitung im Knochen; *Osteologie* 6 (3) (1997), 103-111
- [43] M.B. Schaffler, K. Choi, C. Milgrom: Aging and matrix microdamage accumulation in human compact bone; *Bone* 17 (6) (1995), 521-525
- [44] Yeh OC, Keaveny TM: Relative roles of microdamage and microfracture in the mechanical behavior of trabecular bone; *J. Orthop. Res.* 19 (2001), 1001-1007
- [45] R.K. Nalla, J.H. Kinney, R.O. Ritchie: Mechanistic fracture criteria for the failure of human cortical bone; *Nature Materials* 2 (3) (2003), 164-168

- [46] M.B. Schaffler, W.C. Pitchford, K. Choi, J.M. Riddle: Examination of compact bone microdamage using back-scattered electron microscopy; *Bone* 15 (5) (1994), 483-488.
- [47] R.O. Ritchie, C.L. Muhlstein, R.K. Nalla: On the fatigue and fracture of „nano“ and „bio“ materials; Proceedings of ATEM'03 International Conference of Advanced Technology in Experimental Mechanics, JSME-MMD, Nagoya, Japan, Sept. 2003
- [48] K. Tsubota, T. Adachi, S. Nishiumi, Y. Tomita: Elastic properties of single trabeculae measured by micro-three-point bending test; Proceedings of ATEM'03 International Conference of Advanced Technology in Experimental Mechanics, JSME-MMD, Nagoya, Japan, Sept. 2003
- [49] S. Henning, R. Adhikari, G.H. Michler, P. Seidel, B. Sandner, A. Bernstein, H.-J. Hein: Analysis of the bone-implant interface of a partially resorbable bone cement by scanning electron and scanning force microscopy; G. Bischoff and H.-J. Hein (eds.): *Micro- and nanostructures in biological systems*, 109-120; Shaker, Aachen 2001
- [50] D. Taylor: How does bone break?; *Nature Materials* 2 (3) 2003, 133-134
- [51] F. Wulf: Diplomarbeit, Halle (Saale) 2004
- [52] J.-Y. Rho, G.M. Pharr: Effects of drying on the mechanical properties of bovine femur measured by nanoindentation; *J. Mat. Sci. Mat. Med* 10 (1999), 485-488
- [53] J.-Y. Rho, M.E. Roy II, T.Y. Tsui, G.M. Pharr: Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation; *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1) (1999), 48-54
- [54] J.-Y. Rho, J.D. Currey, P. Zioupos, G.M. Pharr: The anisotropic Young's modulus of equine secondary osteons and interstitial bone determined by nanoindentation; *J. Exp. Biol.* 204 (2001), 1775-1781
- [55] J.-Y. Rho, T.Y. Tsui, G.M. Pharr: Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation; *Biomaterials* 18 (1997), 1325-1330
- [56] V. Ziv, H.D. Wagner, S. Weiner: Microstructure-microhardness relations in parallel-fibered and lamellar bone; *Bone* 18 (5) (1996), 417-428

- [57] J. Houde, M. Marchetti, J. Duquette, A. Hoffman, G. Steinberg, G.K. Crane, D. Baran: Correlation of bone mineral density and femoral neck hardness in bovine and human samples; *Calcif. Tiss. Int.* 57 (1995), 201-205
- [58] V.L. Ferguson, A.J. Bushby, A. Boyde: Nanomechanical properties and mineral concentration in articular calcified cartilage and subchondral bone; *J. Anat.* 203 (2003), 191-202
- [59] D.F. Williams: *The Williams Dictionary of Biomaterials*; Liverpool University Press, Liverpool 1999
- [60] J. Charnley: *Acrylic cement in orthopaedic surgery*; E&S Livingstone, Edinburgh London 1970
- [61] K. Draenert, Y. Draenert, U. Garde, Ch. Ulrich: *Manual of cementing technique*; Springer, Berlin Heidelberg New York 1999
- [62] Patienteninformation des KKH Prenzlauer Berg, Berlin; Broschüre, keine bibliographischen oder Quellenangaben
- [63] K.-D. Kühn, W. Ege, U. Gopp: Acrylic bone cements: composition and properties; *Orthop. Clin. N. Am.* 36 (2005), 17-28
- [64] K.-D. Kühn, W. Ege, U. Gopp: Acrylic bone cements: mechanical and physical properties; ; *Orthop. Clin. N. Am.* 36 (2005), 29-39
- [65] S.J. Breusch, K.-D. Kühn: Knochenzement auf Basis von Polymethylmethacrylat; *Orthopäde* 32 (2003), 41-50
- [66] K.-D. Kühn: *Bone Cements. Up-to-Date Comparison of Physical and Chemical Properties of Commercial Materials*; Springer Berlin Heidelberg New York 2000
- [67] B.P. Murphy, P.J. Prendergast: Measurement of non-linear microcrack accumulation rates in polymethylmethacrylate bone cement under cyclic loading; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 10 (1999), 779-781
- [68] B.P. Murphy, P.J. Prendergast: The relationship between stress, porosity, damage accumulation and fatigue failure in acrylic bone cement; in: P.J. Prendergast et al. (eds): *Proceedings of the 12th Conference of the European Society of Biomechanics*, Dublin 2000, 235

- [69] Dr. R. Großstück, Klinikum Bergmannstrost, Halle; persönliche Mitteilung
- [70] Produktinformation, Heraeus Kulzer GmbH, Division Dentistry, Hanau
- [71] R.N. Rother: Mineral Fillers in Thermoplastics: Filler Manufacture and Characterisation; Adv. Polym. Sci. 139, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1999, 67-107
- [72] G.-M. Kim: Analyse der Schlagzähigkeitsmechanismen in Abhängigkeit von der Morphologie von modifizierten teilkristallinen Polymeren; Dissertation, Halle/Saale 1996
- [73] B. Pukánszky, E. Fekete: Adhesion and Surface Modification; Adv. Polym. Sci. 139, Springer Verlag Berlin Heidelberg 1999, 109-153
- [74] G.-M. Kim, G.H. Michler: Vorlesung Nanokomposite: Zähigkeitsmechanismen; Halle/Saale 2005
- [75] Y. Huang, D.L. Hunston, A.J. Kinloch, C.K. Riew: Mechanisms of Toughening Thermoset Resins; in: Toughened Plastics I-Science and Engineering; C. K. Riew, A.J. Kinloch (eds.), American Chemical Society, Washinton 1993, 1-35
- [76] R.A. Pearson: Toughening Epoxies Using Rigid Thermoplastic Particles-A Review; in: Toughened Plastics I-Science and Engineering; C. K. Riew, A.J. Kinloch (eds.), American Chemical Society, Washinton 1993, 405-425
- [77] J. Spanoudakis, R.J. Young: Crack propagation in a glass particle-filled epoxy resin: Part1 Effect of particle volume fraction and size; J. Mat. Sci. 19 (1984), 473-486
- [78] J. Spanoudakis, R.J. Young: Crack propagation in a glass particle-filled epoxy resin: Part2 Effect of particle-matrix adhesion; J. Mat. Sci. 19 (1984), 487-496
- [79] E. Helwig: Synthese, Charakterisierung und Copolymerisation von kristallisationsfähigen Oligolacton-Makromonomeren auf Methacrylatbasis; Dissertation, Halle/Saale 2003
- [80] C.G. Pitt: Non-microbial degradation of polyesters: Mechanisms and modifications; in: M. Vert (ed.): Biodegradable Polymers and Plastics; The Proceedings of the

Second International Scientific Workshop on Biodegradable Polymers and Plastics, Montpellier 1991, Royal Society of Chemistry 1992, 7-19

- [81] Y. Doi: Structural effects on the biodegradation of microbial and synthetic poly(hydroxyalcanoates); in: M. Vert (ed.): Biodegradable Polymers and Plastics; The Proceedings of the Second International Scientific Workshop on Biodegradable Polymers and Plastics, Montpellier 1991, Royal Society of Chemistry 1992, 139-148
- [82] M.K. Cox: The effect of material parameters on the properties and biodegradation of "BIOPOL"; in: M. Vert (ed.): Biodegradable Polymers and Plastics; The Proceedings of the Second International Scientific Workshop on Biodegradable Polymers and Plastics, Montpellier 1991, Royal Society of Chemistry 1992, 95-100
- [83] D. Stauffer: Introduction to Percolation Theory; Taylor & Francis, London 1985
- [84] S. Henning: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum biologischen Abbau von Kunststoffen; Diplomarbeit, Merseburg 1994
- [85] P. Seidel. In vitro und in vivo Untersuchungen an partiell abbaubaren Kompositen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit als Knochenzemente; Dissertation, Halle/Saale 1999
- [86] U. Gopp: Synthese und Copolymerisation von Cooligolacton-Makromonomeren auf Methacrylatbasis und ihre Anwendbarkeit als partiell abbaubare Knochenimplantatmaterialien; Dissertation, Halle/Saale 1999
- [87] U. Gopp, B. Sandner, M. Schöch: Synthesis and structures of cooligo(lactone) macromonomers; Macromol. Symp. 130 (1998), 113-126
- [88] B. Sandner, S. Steurich, U. Gopp: Synthesis and characterization of oligo(lactone) methacrylates; Polymer 38(10) (1997), 2515-2522
- [89] P. Seidel, B. Sandner, U. Gopp, M. Schöch, S. Steurich, J.P. Santerre: Degradation of oligo(lactone) branches linked to poly(methacrylate) networks; Macromol. Symp. 144 (1999), 165-177
- [90] E.Helwig, B.Sandner, U.Gopp, F.Vogt, S.Wartewig, S.Henning: Ring opening polymerization of lactones in the presence of hydroxyapatite; Biomaterials 22 (2001), 2695-2702

- [91] B. Sandner, U. Gopp, M. Schöch, K. Schlothauer: Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bei Kompositmaterialien mit Polymethacrylat-Matrix; Polymerwerkstoffe 96, 18.-20.09.1996, Merseburg, Tagungsband S. 400-401
- [92] B. Sandner, S. Steurich, K. Beyer, A. Bernstein, W. Hein, K. Jung: Polymernetzwerke mit biologisch abbaubaren Seitenketten als potentiell Knochentimplantatmaterial; Polymerwerkstoffe 96, 18.-20.09.1996, Merseburg, Tagungsband S. 260-262
- [93] B. Sandner, S. Baudach, K.W.M. Davy, M. Braden, R.L. Clarke: Synthesis of Bis-GMA derivatives, properties of their polymers and composites; J. Mat. Sci. Mat. Med. 8 (1997), 39-44
- [94] M. Buschnakowski: Mechanische Charakterisierung und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an biokompatiblen Dimethacrylatcopolymeren unterschiedlicher Rezeptur; Studienarbeit 1, Merseburg 1999
- [95] F.J. Baltá Calleja, S. Fakirov: Microhardness of polymers; Cambridge University Press, Cambridge 2000
- [96] W.C. Oliver, G.M. Pharr: An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments; J. Mater. Res. 7 (6) (1992), 1564-1583
- [97] A. Flores, F.J. Baltá Calleja: Mechanical Properties of Poly(Ethylene Terephthalate) at the Near Surface from Depth-Sensing Experiments; Phil. Mag. A 78(6) (1998), 1283-1297
- [98] <http://137.222.110.150/restricted/gallery/album23>
- [99] S.J. Organ, P.J. Barham: An etching technique for poly(3-hydroxybutyrate) and its copolymers; J. Mat. Sci. Letters 8 (1989), 621-623
- [100] Environmental Scanning Electron Microscopy- An Introduction to ESEM; Philips Electron Optics Eindhoven, 2nd printing, Robert Johnson Associates 1996 (CD-Rom)
- [101] L. M. Jenkins: Use of the Environmental Scanning Electron Microscope for the Observation of the Swelling Behaviour of Cellulosic Fibres; Scanning 19 (1997), 92-97

- [102] C.M Neubauer: Drying shrinkage of cement paste as measured in an environmental scanning electron microscope and comparison with microstructural models; *J. Mat. Sci.* 32 (1997), 6415-6428
- [103] L. Reimer: Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis; 2.ed., Springer, Berlin 1998
- [104] A. Boyde, S.J. Jones: Scanning electron microscopy of bone: Instrument, specimen, and issues; *Micros. Res. Tech.* 33 (1996), 92-120
- [105] G.H. Michler, W. Lebek: *Ultramikrotomie in der Materialforschung*; Hanser, München 2004
- [106] H. Janik, E. Walch, R.J. Gaymans: Ruthenium tetroxide staining of polybutylene terephthalate (PBT) and polyisobutylene-b-PBT segmented block copolymers; *Polymer* 33(16) (1992), 3522-3524
- [107] J.S. Trent, J.I. Scheinbeim, P. Couchman: Ruthenium Tetraoxide Staining of Polymers for Electron Microscopy; *Macromolecules* 16 (1983), 589-598
- [108] A.M. Hodge, D.C. Basset: On chlorosulphonation and the electron microscopy of polyethylene; *J. Mat. Sci.* 12 (1977), 2065-2075
- [109] V. Ziv, I. Sabanay, T. Arad, W. Traub, S. Weiner: Transitional structures in lamellar bone; *Micros. Res. Tech.* 33 (1996), 203-213
- [110] S. Henning, R. Adhikari, R. Godehardt, G.H. Michler, H.-J. Hein: Atomic force microscopy in bone research: analysis of the composite morphology of human cortical bone; in: *Analysis of biomedical signals and images, 15th International EURASIP Conference-Euroconference BIOSIGNAL 2000*; Proceedings, 228-231
- [111] J.E. Barralet, K.J. Lilley, L.M. Grover, D.F. Farrar, C. Ansell, U. Gburek: Cements from nanocrystalline hydroxyapatite; *J. Mat. Sci. mat. Med.* 15 (2004), 407-411
- [112] S.P. Kotha, N. Guzelsu: Effect of fatigue on the bone organic; 24th Annual Meeting of the American Society of Biomechanics, University of Illinois at Chicago, July 19-22, 2000, <http://asb-biomech.org/onlineabs/abstracts2000/author.html>

- [113] U. Horas, P. Seidel, G. Baumann, O. Kilian, E. Dingeldein, R. Schnettler: Factors influencing the application of vacuum mixing systems for bone cement completion; *Osteosynthesis and Trauma Care* 10 (2002), 106-112
- [114] P. Seidel: persönliche Mitteilung
- [115] J.D. Currey, P. Zioupos, P. Davies, A. Casinos : Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone; *Proc. R. Soc. Lond. B* 268 (2001), 107-111
- [116] M. Beiner, H. Huth: Nanophase separation and hindered glass transition in side-chain polymers; *Nature Materials* 2 (2003), 595-599
- [117] E. Hempel, H. Budde, S. Höring, M. Beiner: On the crystallization behaviour of frustrated alkyl groups in poly(n-octadecyl methacrylate); *J. Non-Crystalline Solids*, in press
- [118] M. Al-Hussein, W.H. de Jeu, L. Vranichar, S. Pispas, N. Hadjichristidis, T. Itoh, J. Watanabe: Bulk and thin film ordering in side-chain liquid crystalline/amorphous diblock copolymers: The role of chain length; *macromolecules* 37 (2004), 6401-6407
- [119] W. Chen, B. Wunderlich: Review article: Nanophase separation of small and large molecules; *Macromol. Chem. Phys.* 200 (1999), 283-311
- [120] K. Inomata, E. Nakanishi, Y. Sakane, M. Koike, T. Nose: Side-chain crystallization behaviour of graft copolymers consisting of amorphous main chain and crystalline side chains; *J. Polym. Sci. B: Polymer Physics* 43 (2005), 79-86
- [121] J.-R. Sarasua, R.E. Prud'homme, M. Wisniewski, A. Le Borgne, N. Spassky: Crystallization and Melting Behavior of Polylactides; *Macromolecules* 31 (1998), 3895-3905
- [122] R. Adhikari, T.A. Huy, S. Henning, G.H. Michler, K. Knoll: Morphology and deformation behaviour of SBS/PS blends: a combined microscopic and spectroscopic study; *Colloid Polym. Sci.* 282 (2004), 1381-1391
- [123] T.A. Huy, R. Adhikari, T. Lüpke, G.H. Michler, K. Knoll: Investigation of morphology formation in SBS block copolymer/homopolystyrene blends; *Polym. Eng. Sci.* 44 (2004), 1534-1542

- [124] E. Helwig, B. Sandner, B. Hahne, S. Henning, K. Busse: Characterization of crystallizeable oligo(lactone) macromonomers and their polymers; Poster P 2000
- [125] A. Loson: Struktur-Eigenschafts-Beziehungen von Polymerwerkstoffen für die Medizintechnik“; Diplomarbeit, Merseburg 1998
- [126] Datenblatt der Röhm GmbH, online: [roehm.digi-info.de/de/formmassen/files/pdf/fm\\_programm.pdf](http://roehm.digi-info.de/de/formmassen/files/pdf/fm_programm.pdf)
- [127] S.N. Nazhat, M. Kellomäki, P. Törmälä, K.E. Tanner, W. Bonfield: Dynamic mechanical characterization of biodegradable composites of hydroxyapatite and polylactides; *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* 58 (2001), 335-343
- [128] C. Doyle, K.E. Tanner, W. Bonfield: In vitro and in vivo evaluation of polyhydroxybutyrate and polyhydroxybutyrate reinforced with hydroxyapatite; *Biomaterials* 12, 9 (1991), 841-847
- [129] J. Hao, M Yuan, X. Deng: Biodegradable and biocompatible nanocomposites of poly ( $\epsilon$ -caprolactone) with hydroxyapatite nanocrystals: Thermal and mechanical properties; *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002), 676-683
- [130] D.L. Christiansen, G.D. Pins, E.K. Huang, F.H. Silver: A novel self-assembled collagenous matrix which serves as a template for oriented growth of hydroxyapatite crystal; *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 414 (1996), 29-34
- [131] M.C. Chang, C.-C. Ko, W.H. Douglas: preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite; *Biomaterials* 24 (2003), 2853-2862
- [132] C. Du, F.Z. Cui, Q.L. Feng, X.D. Zhu, K. de Groot: Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity; *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998), 540-548
- [133] S.-H. Rhee, J. Tanaka: Synthesis of a hydroxyapatite/collagen/chondroitin sulfate nanocomposite by a novel precipitation method; *J. Am. Ceram. Soc.* 84 (2001), 459-461

- [134] M.C. Chang, J. Tanaka: XPS study for the microstructure development of hydroxyapatite-collagen nanocomposites crosslinked using glutaraldehyde; *Biomaterials* 23 (2002), 3879-3885
- [135] A. Tampieri, G. Celloti, E. Landi, M. Sandri, N. Roveri, G. Falini: Biologically inspired synthesis of bone-like composite: Self-assembled collagen fibers/hydroxyl apatite nanocrystals; *J. Biomed. Mater. Res.* 67A (2003), 618-625
- [136] M. Kikuchi, H.N. Matsumoto, T. Yamada, Y. Koyama, K. Takakuda, J. Tanaka: Glutaraldehyde crosslinked hydroxyapatite/collagen self-organized nanocomposites; *Biomaterials* 25 (2004), 63-69
- [137] I. Yamaguchi, K. Tokuchi, H. Fukuzaki, Y. Koyama, K. Takakuda, H. Monma, J. Tanaka: Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites; *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001), 20-27
- [138] R. Murugan, S. Ramakrishna: Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite; *Biomaterials* 25 (2004), 3829-3835
- [139] Q. Hu, B. Li, M. Wang, J. Shen: Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: A potential material as internal fixation of bone fracture; *Biomaterials* 25 (2004), 779-785
- [140] T.N. Opara, M.J. Dalby, E.J. Harper, W. Bonfield: The effect of varying percentage hydroxyapatite in poly (ethyl methacrylate) bone cement on human osteoblast-like cells; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 14 (2003), 277-282
- [141] M.J. Dalby, L. di Silvio, E.J. Harper, W. Bonfield: Increasing hydroxyapatite incorporation into poly(methylmethacrylate) cement increases osteoblast adhesion and response; *Biomaterials* 23 (2002), 569-576
- [142] M.J. Dalby, L. di Silvio, E.J. Harper, W. Bonfield: In vitro evolution of a new polymethylmethacrylate cement reinforced with hydroxyapatite; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 10 (1999), 793-796
- [143] M. Wang, R. Joseph, W. Bonfield: Hydroxyapatite-polyethylene composites for bone substitution: effects of ceramic particle size and morphology; *Biomaterials* 19 (1998), 2357-2366

- [144] P.T. Ton That, K.E. Tanner, W. Bonfield: Fatigue characterization of a hydroxyapatite-reinforced polyethylene composite. I. Uniaxial fatigue; *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000), 453-460
- [145] M. Wang, M. Chandrasekaran, W. Bonfield: Friction and wear of hydroxyapatite reinforced high density polyethylene against the stainless steel counterface; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 13 (2002), 607-611
- [146] M Bonner, L.S. Saunders, I.M. Ward, G.W. Davies, M. Wang, K.E. Tanner, W. Bonfield: Anisotropic mechanical properties of oriented HAPEX<sup>TM</sup>; *J. Mat. Sci.* 37 (2002), 325-334
- [147] L. di Silvio, M. J. Dalby, W. Bonfield: Osteoblast behaviour on HA/PE composite surfaces with different HA volumes; *Biomaterials* 23 (2002), 101-107
- [148] M. J. Dalby, L. di Silvio, G. W. Davies, W. Bonfield: Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro; *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 12 (2000), 805-810
- [149] M. Bonner, I.M. Ward, W. Mc Gregor, K.E. Tanner, W. Bonfield: Hydroxyapatite/polypropylene composite: A novel bone substitute material; *J. Mat. Sci. Letters* 20 (2001), 2049-2051
- [150] Patent WO02/068009 A2
- [151] Patent DE 19619 084
- [152] Deutsche Patentanmeldung 10 2005 022 176.9 und Europäische Patentanmeldung EP 06 009168
- [153] G.-M. Kim, G.H. Michler, J. Brandt: Human chondrocytes on the electrospun PHB nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering; *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, submitted

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen, Fachbegriffe und Formelzeichen

AFM	Rasterkraftmikroskop (eigentlich: <i>atomic force microscope</i> )
BisGMA	Isopropyliden-bis[1,4-phenylenoxy(2-hydroxytrimethylen)] dimethacrylat
BSE	Rückstreuielektronen ( <i>backscattered electrons</i> )
<i>canaliculi</i>	feine Kanäle in der Kompakta zur interzellulären Kommunikation der Osteozyten über Zellfortsätze
CSEM	konventionelles REM ( <i>conventional scanning electron microscope</i> )
distal	von der Körpermitte weg
DLA	D-Lactid
EDX	energiedispersive Röntgenmikroanalyse ( <i>energy dispersive X-ray microanalysis</i> )
<i>edge-on</i>	bezüglich der Bildebene auf Kante stehend
EFTEM	TEM mit Einrichtung zur Elektronenverlustspektroskopie, „energiefilternde TEM“
ESEM	atmosphärisches Rasterelektronenmikroskop ( <i>environmental scanning electron microscope</i> )
exfoliert	voneinander getrennt
FE-LVSEM	<i>field emission low vacuum scanning electron microscope</i>
Femur, pl.: Femora	Oberschenkelknochen
<i>flat-on</i>	flach in der Bildebene liegend

DBPO	Dibenzoylperoxid
DMpT	N,N-Dimethyl-p-toluidin
DSC	differentielle Kalorimetrie ( <i>differential scanning calorimetry</i> )
GL, GLY	Glycolid
GSED	<i>gaseous secondary electron detector</i> , Sonderform der SE-Detektion im ESEM
HAp	Hydroxylapatit
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
HVEM	Hochspannungs-Transmissionselektronenmikroskop ( <i>high voltage transmission electron microscope</i> )
Kompakta	dichter, wenig poröser Teil des Knochens
Kortikalis	kompakter äußerer Teil eines Röhrenknochens
Lactid	ringförmigen Zusammenschluss zweier Milchsäuremoleküle; chirale Moleküle (Enantiomere: L-Lactid, D-Lactid)
Lacton	innere Ester der Hydroxycarbonsäuren, z.B. der Milchsäure (siehe Lactid); weitere Beispiele: Valerolacton und Glykolid
Lakune	Sitz der in den kompakten Knochen eingemauerten Knochenzelle
MH	Mikrohärte
Oligolactid	Oligo-LLA, Oligo-DLA; hier: Lactid-Oligomere mit 6 bis 40 Wiederholungseinheiten
Oligolacton	Oligomeres der Lactone
Osteoblasten	Knochensubstanz aufbauende Knochenzellen
osteoinduktiv	die Knochenbildung stimulierend
osteokonduktiv	die gerichtete Knochenbildung steuernd

Osteon	zylindrisches Grundelement des Havers-Knochens mit typischem, konzentrischen Verlauf der Lamellen um einen zentralen Kanal
Osteozyten	Knochenzellen
PBMA	Polybutylmethacrylat
PE	Polyethylen
PEMA	Polyethylmethacrylat
PLA	Poly lactide (Polymilchsäuren); die optisch aktiven Polymere treten als D- oder als L-Lactide auf
PDLA	Poly(D-Lactid)
PLLA	Poly(L-Lactid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP	Polypropylen
proximal	zur Körpermitte hin
REM	Rasterelektronenmikroskop
SAM	akustisches Rastermikroskop ( <i>scanning acoustic microscope</i> )
SE	Sekundärelektronen ( <i>secondary electrons</i> )
Spongiosa	poröser, "schwammartiger" Teil des Knochens
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
Trabekel	Knochenbälkchen der Spongiosa
UHMWPE	ultrahochmolekulares Polyethylen
UMH	Ultramikrohärte
VL	$\delta$ -Valerolacton

B	Biegefestigkeit
B	Breite der HAp-Kristallite
D	Dicke der HAp-Kristallite
$D_f$	Durchmesser der hybriden Nanofasern des Knochens
d	Abstand der Hap-Kristallite
$D_a$	Dicke der amorphen, interlamellaren Schicht
$D_{cr}$	Dicke der kristallinen Bereiche innerhalb der Lamellen
$D_l$	Lamellendicke
E	Elastizitätsmodul
$E_B$	Elastizitätsmodul, im Biegeversuch ermittelt
H	Mikrohärte
L	Langperiode
L	Länge der HAp-Kristallite
$n_{LLA}$	Sequenzlänge, Länge der Oligo-LLA-Seitenketten im Makromonomer
$T_m$	Schmelztemperatur
$\Delta H_m$	Schmelzenthalpie
$\varepsilon_b$	Bruchdehnung
$\sigma_b$	Bruchspannung
$\sigma_T$	<i>diametral tensile strength</i> ; Bruchspannung im inversen Zugversuch
$\sigma_y$	Fließspannung

## Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Mentor Prof. Dr. Goerg Michler für die Überlassung des interessanten Themas, die fachliche Betreuung der Arbeit, für Geduld und Antrieb, Forderung und Förderung sowie die Bereitstellung der exzellenten Arbeitsbedingungen.

Ich danke meinen Kollegen der Arbeitsgruppe für die stetige Unterstützung: Cornelia Becker, Sylvia Goerlitz, Stefanie Scholtyssek, Birgit Erfurt, Doz. Dr. Klaus Schmutzler, Dr. Reinhold Godehardt, Werner Lebek, Volker Seydewitz, Dr. Gyeong-Man Kim, Matthias Buschnakowski, Wolfgang Schurz. Besonders danken möchte ich Dr. Rameshwar „Ram“ Adhikari, der mit Ruhe, Freundlichkeit und Weisheit half, den Ideen Ordnung und Rahmen zu geben.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Baltá Calleja für die wissenschaftliche Betreuung und Diskussion der am CSIC Madrid durchgeführten Untersuchungen, bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe am CSIC Dr. Araceli Flores, Dr. Esperanza Cagliao, Dr. Fernando Ania und Ines Puente für Unterstützung und Beratung sowie Sabine Baltá für ihre Fürsorge; Madrid ist zu einer zweiten Heimat geworden.

Ich bedanke mich

bei Prof. Dr. B. Sandner, Dr. Udo Gopp und Dr. Peter Seidel (Institut für Technische und Makromolekulare Chemie) für die Überlassung umfangreichen Probenmaterials und die geduldige Erläuterung der Chemie der resorbierbaren Systeme,

bei Dr. Anke Bernstein und OA Dr. Jörg Brandt (Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin) sowie Doz. Dr. H.-J. Hein (AG Biomechanik und Strukturforchung) für den Zugang zu Material aus Tierversuchen, Knochenproben und Aufbereitung der HAp-Suspensionen,

bei Dr. Frank Heyroth und Frank Syrowatka (IWZ Halle): Die Sitzungen am ESEM waren immer höchst gewinnbringend und aufschlußreich.

Dank und Anerkennung den Student(inn)en, die mit der Erstellung von Studien- und Diplomarbeiten wertvolle Beiträge zur vorliegenden Arbeit erbracht haben: Alexandra Loson, Matthias Buschnakowski, Nadine Salikow, Sandra Sarembe und insbesondere Franziska Wulf, die mit Fleiß und Kreativität die Ultramikrotomie des Knochens meisterte.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 418), der Max-Buchner-Forschungstiftung der DECHEMA und der Alexander-von-Humboldt-Stiftung für die großzügige finanzielle Unterstützung.

Tiefe Dankbarkeit gebührt meiner Familie. Ohne die liebevolle und selbstlose Unterstützung meiner Mutter hätte ich diesen Weg nicht beschreiten können. Ich danke meinen Großeltern für beständige Hilfe, Ermutigung und Vertrauen. Dank meiner Tochter Anne, die den meist nicht nur geistig abwesenden Vater moralisch aufgerichtet hat.

Dank meinen Freunden, ganz besonders Thomas Lebek und seiner Familie für Essen, Trinken, nächtliche Philosophie und nie abreißende Versorgung mit auserlesener Musik. Applaus meinen Musikkollegen Uwe Nolte und Frank Machau (*Orplid, Rückgrat*), Peter und Qno (*Days of Grace*).

*Because you're mine  
I walk the line  
(Johnny Cash)*

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Wörtlich und inhaltlich benutzte Stellen wurden als solche gekennzeichnet.

Halle/Saale, den 27.05.2006

Sven Henning

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit bisher an keiner wissenschaftlichen Einrichtung oder Fakultät als Dissertation eingereicht wurde.

Halle/Saale, den 27.05.2006

Sven Henning