

# Entwicklung poröser, multifunktionaler Materialien zur Knochenregeneration

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Marvin Lietzow, M. Sc.

2024

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Giese

Korreferent: Prof. Dr.-Ing. habil. Dr. h. c. Aldo R. Boccaccini

Tag der Promotion: 14. November 2023



## Kurzzusammenfassung

Knochendefekte können unter anderem als Folge von mechanischen Traumata, bakteriellen Infektionen oder Ausschabung nach einem Tumor auftreten. Ein Teil der Defekte kann nicht mehr selbstständig vom Körper ausgeheilt werden. Hiermit kann eine große Beeinträchtigung im Alltag einhergehen, sodass der lange Heilungsprozess einer optimalen Unterstützung bedarf. Der Knochen selbst ist ein Kompositmaterial, was ihm seine einzigartigen Eigenschaften verleiht. Hydroxylapatit stellt die anorganische Komponente dar. Dessen Kristalle werden in dem organischen Kollagen eingebettet. Die äußere Schicht stellt die dichte Kompakta dar, welche die offenporige Spongiosa einhüllt; beide Teile sind stark vaskularisiert. Das Knochengewebe unterliegt einem immerwährenden Auf- und Abbauprozess, sodass normalerweise ein gesundes Gleichgewicht erzeugt wird. Der Körper kann somit als Antwort auf eine erhöhte Belastung die Knochendichte erhöhen. Dies erfolgt in verschiedenen Signalkaskaden an die Knochenzellen, sodass zum Beispiel Osteoblasten an einem Ort den Knochen aufbauen oder Osteoklasten ihn abbauen. Auch die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Knochenzellen ist ein Teil des komplexen Gleichgewichts, was die Gesundheit des Knochengewebes erhält. Einflussfaktoren für dieses Gleichgewicht sind Proteine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Ionen.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein elastisches, offenporiges Knochenregenerationsmaterial entwickelt werden. Das Scaffold soll biokompatibel und –aktiv, osteogen und –konduktiv und degradierbar sein. Besonders der Einfluss von Ionen soll genutzt werden, um die genannten Anforderungen zu erreichen. Hierzu wird ein Kompositmaterial aus einem bioaktiven Glas auf Silica-Calcium Basis und dem synthetischen Biopolymer Polyglycerolsebacat und seinem Derivat mit Calciumglycerolsebacat aufgebaut. Das Polymer wird mithilfe von Mikrowellenstrahlung als auch konventionellem Heizen synthetisiert. Das bioaktive Glas wird mit Mesoporen versehen, welche mit Strontiumchlorid beladen werden können. In Summe setzt das Implantat Orthokieselsäure, Calcium-, Phosphat- und Strontiumionen frei, welche jeweils eine entscheidende Rolle in den Signalkaskaden der Homöostase von Knochengewebe spielen.

Das bioaktive Glas konnte erfolgreich via des *sponge-template* Verfahrens hergestellt werden, dessen Masse an Silicamaterial sich vorhersagen lässt und offene Makroporen besitzt. Die erhaltene Replik wurde mit Mesoporen ausgestattet und mit Strontiumchlorid beladen, wobei auch andere Moleküle oder Salze infrage kämen. Polyglycerolsebacat konnte erfolgreich als Copolymer mit Calciumglycerolsebacat synthetisiert werden, was durch Kernspinresonanzspektroskopie bestätigt werden konnte. Als alternative Syntheseroute ließ sich die Mikrowellensynthese im Sinne der grünen Chemie etablieren. Die vereinten Materialien ergaben ein elastisches, offenporiges Scaffold, welches degradierbar ist. Die Randbedingungen des Beschichtungsverfahrens konnten festgelegt werden. In Freisetzungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Orthokieselsäure, Calcium- und Phosphationen über 65 Tage und Strontiumionen über 14 Tage in Konzentrationen freigesetzt werden können, welche nahe den physiologisch wirksamen Konzentrationen liegen, sodass ein osteogener und –konduktiver Effekt erwartet werden kann. Die Biokompatibilität der Scaffolds konnte in Zelluntersuchungen bestätigt werden. Die Oberfläche des Implantats bietet sowohl auf der Innenseite als auch auf der Außenseite die Möglichkeit zur Zelladhäsion, wobei eine konventionell hergestellte Scaffoldsorte auf Basis von Calciumglycerolsebacat am besten abschnitt. Untersuchungen im Tiermodell verglichen Scaffolds mit und ohne eingebrachtes Calciumglycerolphosphat. Es zeigte sich für beide Sorten eine sehr gute Verträglichkeit, kaum Immunreaktionen und eine hohe Tendenz zur Vaskularisierung. Besonders bei Letzterem zeigte die Scaffoldsorte mit Calciumglycerolphosphat eine stärkere Vaskularisierung, was ein wichtiger Grundpfeiler für eine erfolgreiche Ausheilung eines Knochendefekts darstellt.

**Stichworte:** bioaktives Glas, Polyglycerolsebacat, Komposit, Biomaterialentwicklung für Knochenregeneration, Mikrowellensynthese, mesoporöse Materialien, *sponge-template* Verfahren

## Abstract

Bone defects can occur, among other things, as a result of mechanical trauma, bacterial infections or even curettage after a tumour. Some of the defects can no longer be healed independently by the body. This can be accompanied by great impairment in everyday life, so that the long healing process requires optimal support. The bone itself is a composite material, which gives it its unique properties. The inorganic component is hydroxyapatite. Its crystals are embedded in the organic collagen. The outer layer of the bone is the dense compacta, which envelops the open-pored cancellous bone; both parts are highly vascularised. Bone tissue is subject to a perpetual process of building up and breaking down so that a healthy balance is normally produced. This allows the body to increase bone density in response to permanent increased stress. This occurs in different signalling cascades to the bone cells, so that, for example, osteoblasts build up bone or osteoclasts break it down. The differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells is also part of the complex balance, which maintains the health of the bone tissue. Proteins, growth factors, hormones and ions are factors which influence this balance.

In the context of this work, an elastic, open-pored bone regeneration material is the goal. The implant should be biocompatible and -active, osteogenic and -conductive and degradable. Especially the influence of ions shall be used to achieve the mentioned requirements. For this purpose, a composite material of a silica-calcium based bioactive glass and the synthetic biopolymer polyglycerol sebacate and its derivative with calcium glycerol sebacate will be synthesised using both microwave radiation and conventional heating. The bioactive glass is equipped with nanopores that can be loaded with strontium chloride. In total, the implant releases orthosilicic acid, calcium, phosphate and strontium ions, each of which plays a crucial role in the signalling cascades of bone tissue homeostasis.

The bioactive glass was successfully produced via the sponge-template process, whose mass of silica material can be predicted and has open macropores. The replica obtained was equipped with mesopores and loaded with strontium chloride, although the incorporation of other molecules or salts are also possible. Polyglycerol sebacate could be successfully synthesised as a copolymer with calcium glycerol sebacate, which could be confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Microwave synthesis in the sense of green chemistry could be established as an alternative synthesis route. The combined materials resulted in an elastic, open-pored scaffold, which is degradable. The boundary conditions of the coating process were explored. In release experiments, it was shown that orthosilicic acid, calcium and phosphate ions can be released over 65 days and strontium ions over 14 days in concentrations that are close to the physiologically effective concentrations, so that an osteogenic and -conductive effect can be expected. The biocompatibility of the scaffold was demonstrated in cell tests. The surface of the implant offers the possibility of adhesion on the inside as well as on the outside, whereby a conventionally produced scaffold type based on calcium glycerol sebacate performed best. Studies in the animal model compared scaffolds with and without incorporated calcium glycerol phosphate. Both showed very good compatibility, hardly any immune reactions and a high tendency to vascularisation. The scaffold with calcium glycerol phosphate showed significantly higher vascularisation which is an important cornerstone for successful healing of a bone defect.

**Key words:** bioactive glass, polyglycerol sebacate, composite, bone tissue engineering, microwave synthesis, nanoporous materials, sponge-template synthesis

## Danksagung

Es bedarf einer Vielzahl an besonderen Menschen, damit ein Einzelner am Ende eine Dissertation in den Händen hält. Für mich, wie für viele andere beginnt dieser Abschnitt mit Herrn Prof. Peter Behrens; leider darf eben jener Abschnitt nicht mit ihm enden. Am 13.01.2023 haben Sie im Herzen von unzähligen Menschen eine Lücke hinterlassen. Jeder dieser Menschen hat, wenn er einmal überlegt, seinen ganz eigenen Moment, an den er sich mit Herrn Prof. Behrens erinnert. Er war stets höflich, respektvoll und für jeden Scherz zu haben. So möchte ich in der vorliegenden Arbeit, auch jenen wissenschaftlichen Diskurs führen, den Herr Behrens leidenschaftlich liebte.

Mein nächster Dank ist Herrn Prof. Ulrich Giese gewiss. Er erklärte sich bereit, sowohl die Rolle des Erstreferenten zu übernehmen und auch als Betreuer sicherzustellen, dass ich meine Arbeit zu Ende führen konnte. An dieser Stelle möchte ich auch Merle Feldt für Ihre Geduld und Unterstützung im Rahmen dieses Prozederes danken. Herrn Prof. Aldo R. Boccaccini und Herrn Prof. Denis Gebauer möchte ich meinen Dank für die Übernahme der Funktion als Zweitreferent bzw. des Prüfungsvorsitzes und Drittprüfer aussprechen.

Die Kooperationen mit Frau Prof. Meike Stiesch und Henning Hartwig der Medizinischen Hochschule Hannover der Klinik für Zahnärztliche Prothetik und Biomedizinische Werkstoffkunde und mit Herrn Dr. Andreas Kampmann und Frau Dr. Sarah Gniesmer der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie haben dieser Arbeit großen Wert beigefügt. Felix Krull vom Deutschen Institut für Kautschuktechnologie übernahm freundlicherweise die GPC-Messungen. Vielen Dank für die Unterstützung.

Dr. Nina Ehlert ist eine tragende Säule im Laboralltag gewesen; sowohl die Diskussion von Ergebnissen als auch die Aktivitäten und Gespräche abseits des Fachlichen waren immer eine Bereicherung. Dies gilt natürlich auch für die gesamte NIFE-Crew. Wenn wir doch den Weg aus dem NIFE in die AC gefunden haben, so fand sich dort auch stets jemand für einen Kaffee. Hierbei möchte ich Inga, Mosi, Tim, Karen B., Moni, Luisa, Timo, Flo, Valle, Nils, Arne, Lauritz, Thea, Dominik und Songül erwähnen. Vielen Dank an euch alle!

Für die durchgeführten Messungen von Dr. Arne Schierz (TEM; TG), Dr. Alexander Mohmeyer, Dr. Mandy Jahns, Songül Noyun (Physisorption) und Katharina Nolte (TG) möchte ich mich ebenso bedanken. Die technischen Umsetzungen wie das Anfertigen von Probenformen wäre ohne die Werkstatt in Person von Herrn Uwe Löhr und Younes Senft nicht möglich gewesen.

Die Betreuung der Abschlussarbeiten von Roxana, Desiree und Lisa haben wichtige Erkenntnisse erbracht, welche diese Arbeit vorangetrieben haben. Gleiches gilt auch für die fleißigen Hiwis Desiree, Monika und Luisa.

Ohne dieses tolle Netzwerk aus Freunden und Familie hätte ich so manche Phase der vergangenen Jahre nicht bewältigen können. Meine Eltern, meine Geschwister, meine Jungs, die Biberrotte, ich wusste, ich kann mich immer auf euch verlassen! Die Geburt meines Sohnes Emil Ragnar Hermerding während der Promotionszeit hat für ordentlich Wirbel gesorgt und mich geerdet. Ich liebe es, euch alle in meinem Leben zu haben. Danke für eure vielseitige Unterstützung!

Schlussendlich habe ich in Desiree Riex eine Heimat gefunden. Du bist die Liebe meines Lebens. Du hast alles verändert und alles mag sich ändern, aber du wirst immer bleiben.

## Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Danksagung.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1 Einleitung.....	1
2 Allgemeine Grundlagen.....	6
2.1 Knochenmaterial.....	6
2.1.1 Aufbau von Knochengewebe.....	6
2.1.2 Einfluss von Ionen auf die Knochenbildung.....	15
2.2 Knochendefekte und ihre Regeneration.....	19
2.2.1 Klassische Ansätze zur Regeneration des Knochengewebes.....	20
2.2.2 Forschungsansätze zur Regeneration des Knochengewebes.....	22
2.3 Bioaktive Gläser.....	27
2.4 Polyglycerolsebacat.....	29
2.4.1 Mikrowellensynthese.....	32
3 Analytische Methoden.....	34
3.1 Thermogravimetrie.....	34
3.2 Infrarot-Spektroskopie.....	34
3.2.1 Stickstoff-Physisorption.....	34
3.3 Kleinwinkelröntgenstreuung.....	34
3.4 Titrimetrie.....	35
3.5 Kernspinresonanzspektroskopie.....	35
3.6 Mikroskopie.....	35
3.6.1 Digitalmikroskopie.....	36
3.6.2 Rasterelektronenmikroskopie.....	36
3.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie.....	36
3.7 Mechanische Charakterisierungen.....	36

---

3.7.1	Uniaxiale Zugprüfung.....	36
3.7.2	Druckprüfung.....	37
3.8	Biologische Charakterisierung .....	37
3.8.1	Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma .....	37
3.8.2	Zytotoxizität.....	38
3.8.3	Zelladhäsion.....	38
3.8.4	Rückenhautkammer und Intravitalmikroskopie im Tiermodell.....	39
3.8.4.1	Intravitalmikroskopie.....	40
4	Experimentelle Durchführung .....	42
4.1	Synthese von Polyglycerolsebacat.....	42
4.1.1	Synthese von Polyglycerolphosphatsebacat.....	42
4.1.2	Mikrowellensynthese von Polyolsebacaten .....	43
4.2	Herstellung von Repliken auf Silicabasis.....	44
4.2.1	Beladung mit Strontium.....	45
4.3	Herstellung eines Kompositmaterials .....	45
4.4	Freisetzungsexperiment.....	46
4.4.1	Bestimmung der Ionen via Atomemissionsspektrometrie.....	46
5	Ergebnisse und Diskussion.....	48
5.1	Polymer.....	48
5.1.1	Konversion.....	50
5.1.2	IR-Spektroskopie .....	57
5.1.2.1	PGS vs. PGPS.....	57
5.1.2.2	PGS vs. PGS $\mu$ .....	59
5.1.3	Thermogravimetrie und XRD .....	60
5.1.4	Kernspinresonanzspektroskopie.....	64
5.1.5	Gelpermeationschromatographie.....	71
5.1.6	Uniaxiale Zug- und Druckprüfung .....	74
5.2	Evaluation der Herstellung von Repliken und Scaffolds.....	78
5.2.1	Morphologie .....	80

---

5.2.2	Gewichtsverlauf im Herstellungsprozess.....	83
5.2.3	Physisorption der Repliken.....	93
5.2.4	Kleinwinkelröntgenstreuung der Repliken.....	97
5.2.5	Kompressionstests von Scaffolds und Repliken.....	99
5.2.6	Freisetzungsexperiment.....	106
5.2.7	Zytotoxizitätstest.....	112
5.2.8	Zelladhäsionstest.....	113
5.2.9	Untersuchung im Tiermodell.....	123
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	134
7	Quellen- und Literaturverzeichnis.....	144
8	Anhang.....	156
8.1	Chemikalienverzeichnis.....	168
8.2	Lebenslauf.....	169
8.3	Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge.....	170

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>1</sup> H-NMR	Wasserstoff-Kernspinresonanzspektroskopie
α-MEM	<i>minimum essential medium Eagle-alpha modification</i> , standardisiertes Nährmedium
ALP	Alkalische Phosphatase
ATR	abgeschwächte Totalreflexion
BET	BRUNAUER, EMMETT, TELLER
BMP-2	<i>bone morphogenic protein 2</i>
BMU	<i>basic multicellular units</i>
CaGly	Calciumglycerolphosphat
CaSR	<i>calcium-sensing receptors</i>
CHA	Carbonat-Hydroxylapatit
CNT	Kohlenstoffnanoröhren
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTB	CellTiter-Blue™-Assay
DPSC	dentale Pulpastammzellen
DTA	Differenzthermoanalyse
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie
E-Modul	Elastizitätsmodul
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FCS	fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>



---

FKD	funktionelle Kapillardichte
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
Gly	Glycerol
H&E	Hämatoxylin/Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	Hochfrequenz
HIF $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor (engl.: <i>hypoxia-induced factor-<math>\alpha</math></i> )
HUVEC	Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen
ICP-OES	optische Emissionsspektrometrie / optisches Emissionsspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma
IR	Infrarot-Spektroskopie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KM	Knochenmanschette
LNQE	Laboratorium für Nano- und Quantenengineering an der Leibniz Universität Hannover
LUH	Leibniz Universität Hannover
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (engl.: <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MEP®	<i>middle ear prosthesis</i>
MGP	matrix Gla Protein
MMA	Methylmethacrylat
$\mu$ w	Mikrowellensynthese
NLDFT	nichtlokales Dichtefunktionaltheorem

OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	Polycaprolacton
PDI	Polydispersitätsindex
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
PGPS10	Polyglycerolphosphatsebacat mit 10 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz)
PGPS10@SiCa	Polyglycerolphosphatsebacat mit 10 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz) auf eine Silica- Calcium Replik beschichtet
PGPS10@SiCaSr	Polyglycerolphosphatsebacat mit 10 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz) auf eine Silica- Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PGPS10 $\mu$	Polyglycerolphosphatsebacat mit 10 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz)
PGPS10 $\mu$ @SiCa	Polyglycerolphosphatsebacat mit 10 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet
PGPS10 $\mu$ @SiCaSr	Polyglycerolphosphatsebacat mit 10 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PGPS20	Polyglycerolphosphatsebacat mit 20 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz)
PGPS20@SiCa	Polyglycerolphosphatsebacat mit 20 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz) auf eine Silica- Calcium Replik beschichtet
PGPS20@SiCaSr	Polyglycerolphosphatsebacat mit 20 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz) auf eine Silica- Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist

PGPS20 $\mu$	Polyglycerolphosphatsebacat mit 20 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz)
PGPS20 $\mu$ @SiCa	Polyglycerolphosphatsebacat mit 20 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet
PGPS20 $\mu$ @SiCaSr	Polyglycerolphosphatsebacat mit 20 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PGPS30	Polyglycerolphosphatsebacat mit 30 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz)
PGPS30@SiCa	Polyglycerolphosphatsebacat mit 30 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet
PGPS30@SiCaSr	Polyglycerolphosphatsebacat mit 30 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Standardsynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PGPS30 $\mu$	Polyglycerolphosphatsebacat mit 30 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz)
PGPS30 $\mu$ @SiCa	Polyglycerolphosphatsebacat mit 30 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet
PGPS30 $\mu$ @SiCaSr	Polyglycerolphosphatsebacat mit 30 mol-% Calciumglycerolphosphatanteil (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PGS	Polyglycerolsebacat (Standardsynthese Harz)
PGS@SiCa	Polyglycerolsebacat (Standardsynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet
PGS@SiCaSr	Polyglycerolsebacat (Standardsynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PGS $\mu$	Polyglycerolsebacat (Mikrowellensynthese Harz)
PGS $\mu$ @SiCa	Polyglycerolsebacat (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet

---

PGS <sub>μ</sub> @SiCaSr	Polyglycerolsebacat (Mikrowellensynthese Harz) auf eine Silica-Calcium Replik beschichtet, welche mit Strontiumchlorid beladen ist
PKA	Protein Kinase A
PLA	Polylactonsäure
PLGA	Poly(lactid-co-glycolid)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PNIPAm	poly( <i>N</i> -isopropylacrylamid)
ppb	<i>parts per billion</i>
ppm	<i>parts per million</i>
PTH	Parathormon
PU	Polyurethan
RANK-L	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RUNX2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SA	Sebacinsäure
SAXS	Kleinwinkelröntgenstreuung
SBF	simulierte Körperflüssigkeit
SiCa	Silica-Calcium Replik
SiCaSr	Silica-Calcium Replik mit Strontium beladen
SIEM-n	<i>saline ionic essentials medium</i> , neutraler pH-Wert
SMAD5	<i>mothers against decapentaplegic homolog 5</i>
std	konventionell geheizt / Standardsynthese

---

TCP	Tricalciumphosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethylorthosilicat
TG	Thermogravimetrie
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>



## 1 Einleitung

Der Bewegungsapparat des Körpers trägt einen gesunden Menschen buchstäblich durch das gesamte Leben. Das Zusammenspiel aus Muskeln, Sehnen, Bändern und Knochen ermöglicht es dem Menschen komplexe Bewegungen auszuführen. Als Teil dieses Bewegungsapparates sind Knochen und somit auch Defekte dieser so alt, wie die Menschheit selbst. Zusätzlich besitzen bestimmte Knochen wie der Schädelknochen oder die Rippen eine Schutzfunktion von Organen. Eine häufige Ursache von Knochendefekten stellen mechanische Traumata dar.<sup>[1]</sup> Aber auch abseits von den klassischen Knochenbrüchen können bakterielle Infektionen wie eine Osteomyelitis oder Knochenkrebs und die damit einhergehenden Ausschabungen der betroffenen Bereiche zum Verlust von Knochengewebe führen.<sup>[2,3]</sup> Als weitere degenerative Krankheit ist Osteoporose zu nennen, von der besonders ältere Menschen betroffen sind.<sup>[4]</sup> Die erfolgreiche Therapie dieser Krankheitsbilder ist für die Erhaltung der Lebensqualität sehr wichtig. Gesundes Knochengewebe trägt vor allem bei älteren Menschen dazu bei, dass sie in der Gesellschaft inkludiert bleiben und am Leben aufgrund eines intakten Bewegungsapparates selbstbestimmt teilnehmen können. Eine Behandlung der Defekte kann durch Knochentransplantate oder Biomaterialien wie z. B. Implantate erfolgen, welche sich durch Anwendungsgebiet und –art sehr unterscheiden können. Es können ganze Hüftgelenke ersetzt oder Metallimplantate bei großen Brüchen eingesetzt werden, aber auch vermeintlich kleine, nicht lasttragende Defekte im Gesichtsbereich oder Lücken im kortikalen Knochen können mit einem *autograft* behandelt werden. Besonders bei letzterem Defekt können Biomaterialien oder genauer Knochenregenerationsmaterialien Anwendung finden, die den Körper unterstützen sollen im behandelten Bereich neues Knochengewebe zu bilden, um den Defekt auszuheilen. Durch das Altern unserer Gesellschaft bzw. der steigenden Lebenserwartung nimmt der Bedarf an medizinischen Lösungen zu.

Die Anforderungen an die Biomaterialien können je nach Anwendung sehr stark variieren, gemeinsam haben die allermeisten jedoch, dass sie biokompatibel und langlebig sein, keine große Einschränkung hervorrufen und den Mangel optimal kompensieren sollten.<sup>[5]</sup> Im Falle eines Biomaterials für Knochendefekte verbietet es schon die Vielzahl von 206 Knochen im menschlichen Körper, dass genau eine optimale Lösung existiert. Knochen werden nach ihrer Form unterschieden: Lange Knochen oder auch Röhrenknochen (bspw. im Oberarm), kurze Knochen (bspw. in den Händen und Füßen), platte Knochen (bspw. Schulterblätter) und unregelmäßige Knochen (bspw. Wirbel).<sup>[6]</sup> Hierbei bildet eine äußere, dünne Schicht die Kompakta, welche die Spongiosa einhüllt. Erstere ist eine sehr dichte Knochenschicht, während Letztere eine schwammartige Struktur aufweist, welche hoch vaskularisiert ist und das Knochenmark beinhaltet.<sup>[7]</sup>

Im Falle eines Knochendefekts erfordert die jeweilige Position des betroffenen Knochens eine spezielle Therapie. Ein Defekt im Schädel-, Gesichts-, und Kieferbereich hat andere Ansprüche als ein klassischer Bruch des Femurs, dem größten Knochen des menschlichen Körpers. Und auch die Aufgabe dieses Knochens im Bewegungsapparat, lasttragend oder nicht-lasttragend, bedarf einer angepassten Therapie. Für die Entwicklung eines Knochenregenerationsmaterials, das eine mögliche Therapie von Knochendefekten darstellt, ist es wichtig zuerst zu verstehen, dass das Knochengewebe Teil des lebenden Organismus ist, der sich im ständigen Auf- und Abbau befindet. Der Knochen ist ein Kompositmaterial, das sich aus anorganischem Hydroxylapatit und organischem Kollagen zusammensetzt. Dieses Zusammenspiel ergibt seine einzigartigen mechanischen Eigenschaften. Knochen sind stabil und gleichzeitig elastisch, sodass sie Zug- und Druckfest sind und leichter Biegung und Drehung standhalten<sup>[8]</sup> Zeitgleich dient das Skelett als Reservoir für Calcium- und Phosphationen. Ein komplexes System aus kommunizierenden Zellen sorgt für den Erhalt der Gesundheit des Knochengewebes. Dies bedingt eine hohe Vaskularisierung, sodass Zellen versorgt und Abbauprodukte abtransportiert werden können. Als Signalgeber für dieses komplexe Gleichgewicht und seine Kaskaden kommen mechanische Reize, Peptide, Hormone, Metallionen, Wachstumsfaktoren oder andere Zellen infrage.<sup>[9-11]</sup>

Die Beschaffenheit eines Defekts kann eine alleinige Selbstheilung des Körpers unmöglich machen. Hierbei spielt die Größe der entstandenen Lücke durch bspw. einer Ausschabung eine große Rolle. Die kritische Grenze ist nicht klar definiert, aber im Heilungsverlauf kann der Körper nicht über das Stadium der Verknorpelung des Defekts hinauskommen.<sup>[12]</sup> Als Goldstandard für einen solchen kritischen Defekt gilt der *autograft* (Selbsttransplantat): Hierzu wird aus dem Beckenkamm gesundes Knochenmaterial entnommen und als zerkleinertes Gemisch in den Defekt injiziert. Dies ermöglicht dem Körper eine Regeneration von gesundem Knochengewebe am Ort des Defekts.<sup>[13]</sup> Weitere Quellen hierfür stellen der *allograft* (Spende von fremden Menschen) oder *xenograft* (nicht-humane Spende) dar.<sup>[14]</sup> Bei einem *autograft* werden aber zwei separate Operationen notwendig, welche den bereits geschwächten Körper belasten und das Risiko bspw. für eine postoperative Infektion erhöhen.<sup>[12]</sup> Weiterhin ist eine Behandlung mit ‚Knochenzement‘, welcher auf Polymethylmethacrylat (PMMA) basiert, eine Option.<sup>[15]</sup> Zur Strukturgebung und Stabilisation kennt die klassische Medizin weiterhin Metallimplantate, welche eine hohe Verweildauer im Körper aufweisen und das umgebende Gewebe durch den *stress shielding effect* schädigen können. Hierdurch wird zu viel mechanische Belastung durch das Metallimplantat abgefangen, sodass dem Körper signalisiert wird, dass umliegendes Knochengewebe abgebaut werden kann. Sie sind in der Regel nicht sonderlich osteokonduktiv, -induktiv oder osteogen, sodass der Körper auf die Selbstheilung angewiesen ist.<sup>[16]</sup>



Das Feld des *bone tissue engineering* (Biomaterialentwicklung für Knochenregeneration) beschäftigt sich mit der Entwicklung von neuen Knochenregenerationsmaterialien. Es existieren aufgrund der Komplexität der Herausforderung, aber auch der bekannten Materialien, äußerst viele Technologien zur Behandlung von Knochendefekten. Die Anforderungen an ein Material sind vielfältig; es muss biokompatibel, bioaktiv, osteokonduktiv, osteoinduktiv und osteogen sein. Ein Biomaterial gilt als osteoinduktiv, wenn es *de novo* die Bildung von Knochengewebe auslösen kann. Das bedeutet, dass Vorläuferzellen wie mesenchymale Stammzellen zu Knochenzellen differenzieren und Knochen bspw. im Muskelgewebe bilden können. Osteokonduktiv bedeutet, dass auf dem Material Knochengewebe wächst. Ein Material gilt als osteogen, wenn es die Knochenregeneration unterstützt.<sup>[17]</sup> Weiterhin muss es mechanische Stabilität und Integrität bei gleichzeitiger Degradierbarkeit aufweisen, wobei die Abbauprodukte ebenfalls zytokompatibel sein sollten und die Verstoffwechslung im Körper bekannt sein sollte.<sup>[18]</sup>

Im *bone tissue engineering* werden natürliche und synthetische Biopolymere und anorganische (Nano)materialien verwendet, wobei besonders die bioaktiven Gläser zu erwähnen sind.<sup>[19,20]</sup> Sowohl deren spezifischen Synthesewege oder deren Modifikation, aber auch die Verarbeitung und Kombination können Innovation hervorbringen. Aus Polymersicht kommen Vertreter wie Kollagen, Gelatine, Chitosan, Seidenprotein, Polylactid (PLA), Polycaprolacton (PCL) oder Polyglycerolsebacat (PGS) infrage.<sup>[21-23]</sup> Es existieren einige Herstellungsmethoden und Prozessierungen wie Gefriertrocknung, Elektrospinnen, additive Druckverfahren, Salzauslaugung oder Polykondensation zur Darstellung der Polymere.<sup>[19]</sup> Aus der Welt der anorganischen Materialien finden beispielweise Nano-Hydroxylapatit<sup>[24]</sup>,  $\beta$ -Tricalciumphosphat<sup>[25]</sup>, Kohlenstoff-Nanoröhren<sup>[26]</sup> und bioaktive Gläser<sup>[27]</sup> Einzug in das *bone tissue engineering*. Letztere sind besonders hervorzuheben, weil sie als eine Art Freisetzungssystem für Ionen verwendet werden können. Durch die Degradation des bioaktiven Glases können die freigesetzten Ionen wie Orthokieselsäure, Calcium- und Phosphationen mit den Zellen des Körpers interagieren und verschiedene Signalkaskaden induzieren. Dies kann je nach Ion die Vaskularisierung, die Knorpelbildung, die Nervenzellbildung oder die Knochenbildung auslösen. Weiterhin gibt es antimikrobiell wirksame bioaktive Gläser. Abseits von ihrer biologisch wirksamen Rolle ist eine lokale Sättigung von Calcium- und Phosphationen essenziell für eine erfolgreiche Knochenbildung, weil sie die Grundbausteine des Hydroxylapatits repräsentieren. Hieraus resultieren hervorragende osteogene und -konduktive Eigenschaften.<sup>[20,28]</sup>

Durch die Kombination von organischen Polymeren und anorganischen Materialien lässt sich die Compositeigenschaft des Knochens mit seinen mechanischen Vorteilen abbilden. Aber auch (Nano)komposite, in denen der anorganische Füllstoff in die Polymermatrix eingemischt wird, lassen sich darstellen.

Es lassen sich über die Gefriertrocknung, Salzauslaugung oder das Schaum-Abformungsverfahren Makroporen in das Knochenregenerationsmaterial einbringen, um eine Vaskularisierung zu ermöglichen.<sup>[19,29]</sup> Die Verwendung von Silica ermöglicht die Einführung von Mesoporen in das Material. Diese können als Freisetzungssystem für Medikamente, therapeutisch wirksame Ionen oder auch Wachstumsfaktoren wie *bone morphogenic protein 2* (BMP-2) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) genutzt werden.<sup>[30]</sup>

In der vorliegenden Arbeit wird ein multifunktionales, elastisches, meso- und- makroporöses Knochenregenerationsmaterial vorgestellt. Die anorganische Route verfolgt die Synthese einer Replik eines PU-Schwammes aus einem bioaktiven Glas. Die Makroporen der Schwammstruktur sind der irregulären Spongiosa nachempfunden und ermöglichen eine hohe Vaskularisierung. Die Verwendung eines bioaktiven Glases gibt dem Material osteogene und -konduktive Eigenschaften. Die über die Syntheseroute eingebrachten Mesoporen in den Trabekeln der Replik eignen sich als Freisetzungssystem für weitere Therapeutika, wofür Strontiumionen eingelagert werden. Diese verstärken den osteogenen Effekt. Das anorganische Material soll mithilfe von Stickstoff-Physisorption, Röntgenbeugung, Licht-, Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie, sowie uniaxialer Druckprüfung chemisch, mechanisch und physikalisch analysiert werden, um den Erfolg der Synthesen zu bewerten.

Um die spröden Eigenschaften des bioaktiven Glases zu kompensieren, wird es mit einem Biopolymer zu einem Scaffold kombiniert. Hierfür wird PGS ausgewählt, welches elastisch und biodegradierbar ist. Zugleich sind dessen Abbauprodukte und deren Verstoffwechslung bekannt.<sup>[31]</sup> Das PGS soll modifiziert werden, indem ein Copolymer mit Calciumglycerolphosphat aufgebaut wird. Dies ist als Zusatz für Zellmedien zur osteogenen Differenzierung aus der Zellkultur für Untersuchungen an Knochenzellen bekannt und verstärkt diese Eigenschaften des Scaffolds.<sup>[32,33]</sup> Gleichzeitig ist zu erwarten, dass hierdurch ein Komposit aufgebaut wird, da das Calciumglycerolphosphat als Ausscheidung im Polymer vorliegen kann. Hierdurch kann ein kombiniertes Freisetzungssystem von schnell löslichem Calciumglycerolphosphat aus der Ausscheidung und langsam löslichem kovalent eingebauten Calciumglycerolphosphat, welches erst im Verlauf der Degradation aus dem Copolymer freigesetzt wird, entstehen. Es soll weiterhin die Möglichkeit der Mikrowellensynthese des Polymers untersucht werden, weil dies eine signifikante Beschleunigung der Reaktion mit sich bringt und somit zur Ressourcenschonung und den Regeln der grünen Chemie beiträgt.<sup>[34-36]</sup> Das Polymer und seine Modifikationen werden mittels Titrimetrie, Infrarotspektroskopie, Kernspinresonanzspektroskopie, Gelpermeationschromatographie, Thermogravimetrie mit kombinierter Röntgenbeugung etwaiger Rückstände und uniaxialer Zug- und Druckprüfung charakterisiert.

Die Kombination der anorganischen Replik mit dem Biopolymer stellt das endgültige Knochenregenerationsmaterial bzw. Scaffold dar, welches sich wie ein elastischer Schwamm verhalten soll. Hierzu wird das Harz des Biopolymers in einer Lösung auf die Replik beschichtet und quervernetzt. Zur Bewertung der Güte der Scaffolds wird der Gewichtsverlauf aufgezeichnet, die Morphologie mit bildgebenden Verfahren bestimmt und die mechanischen Eigenschaften in uniaxialen Druckprüfungen untersucht. Die Freisetzung von eingebrachten Ionen wird in einem Freisetzungsexperiment untersucht und deren Mengen via optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma quantifiziert. Weiterhin wird eine umfangreiche biologische Charakterisierung durchgeführt, indem die Zytotoxizität untersucht wird. In einem weiteren Experiment wird die Zelladhäsion an der Innen- und Außenseite der Scaffolds bewertet. Abschließend sollen Untersuchungen im Tiermodell in einem Rückenhautkammer-Modell Antworten über die allgemeine Verträglichkeit, der Entstehung von Granulationsgewebe, der Vaskularisierung und möglicher Immunantworten geben.

## 2 Allgemeine Grundlagen

Im folgenden Abschnitt werden die grundlegenden theoretischen Hintergründe, welche zum Verständnis der vorliegenden Arbeit beitragen, erläutert. Zu Anfang wird der Aufbau und die Bildung des gesunden Knochens erläutert. Im Anschluss wird detailliert auf die Rolle von relevanten Ionen auf die Bildung bzw. den Wiederaufbau des Knochens eingegangen. Daraufhin werden verschiedene Defekte und Krankheiten im Knochenbereich skizziert, welche den Einsatz eines Knochentransplantats oder eines Biomaterials notwendig machen. Weiterhin werden die zur Behandlung getroffenen medizinischen Maßnahmen im Vergleich zu Ansätzen aus der Forschung verglichen.

Nachdem die Grundlagen hinsichtlich des Knochens und seiner Regeneration besprochen worden sind, werden die ausgewählten Materialien zum Aufbau des Knochenregenerationsmaterials erläutert.

### 2.1 Knochenmaterial

Im ersten Teilabschnitt wird der gesunde Knochen und sein Auf- bzw. Umbau diskutiert. Das nachfolgende Kapitel 2.1.1 basiert auf dem Taschenlehrbuch *Histologie* von Renate Lüllmann-Rauch (2009).<sup>[9]</sup>

#### 2.1.1 Aufbau von Knochengewebe

Knochengewebe kann aus der Sicht eines Chemikers als Kompositmaterial aufgefasst werden. Es besteht zu 45 % aus Mineralien, 30 % organischem Material und zu 25 % aus Wasser. Der Anteil der Mineralien findet sich vor allem in der Extrazellulärmatrix (EZM) in Form von Hydroxylapatit-Kristallen wieder, welche in Kollagenfibrillen eingebettet sind. Das Mineral Hydroxylapatit besitzt die Summenformel  $\text{Ca}_5[\text{OH}(\text{PO}_4)_3]$ , was bereits einen Hinweis auf einen Teil der relevanten Ionen für die Bildung und Erhaltung von Knochen gibt. Knochengewebe, welches nicht vollständig ausgereift ist, wird als Geflechtknochen bezeichnet, wohingegen der reife Knochen Lamellenknochen genannt wird. Das reife Knochengewebe lässt sich in zwei unterschiedliche Strukturen einteilen; die Spongiosa ist in einer schwammartigen Struktur aufgebaut und besteht aus dünnen Plättchen und Trabekeln, welche in einer Vorzugsrichtung entsprechend der zu erwartenden Belastung angeordnet sind. Dem gegenüber besteht die Kompakta aus schichtartig aufgebautem Knochen wie eine Rinde. Die beiden Typen sind in Abbildung 1 dargestellt.

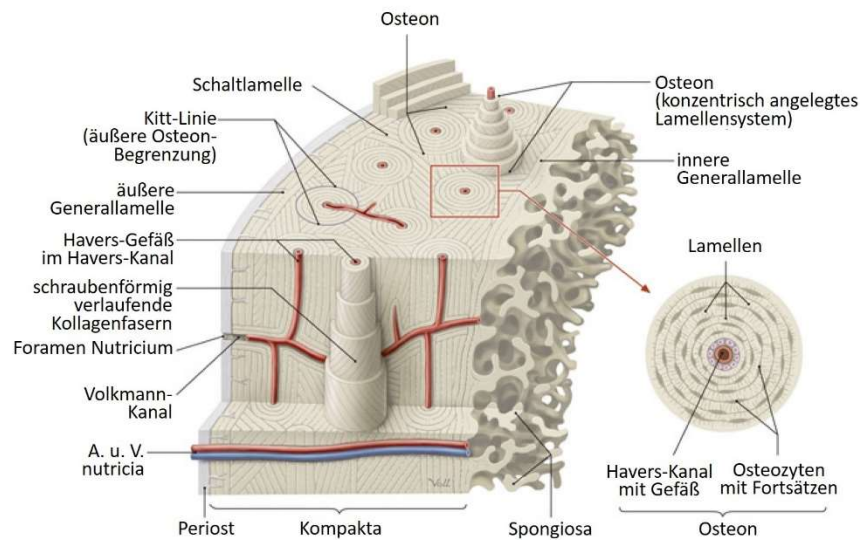


Abbildung 1: Gegenüberstellung von Kompakta (links) und Spongiosa (rechts).<sup>[37]</sup>

Aus der obigen Abbildung geht hervor, dass der Knochen ein hoch vaskularisiertes Gewebe ist. Dies ist wichtig, um Zellen mit Nährstoffen zu versorgen und Stoffwechselprodukte abzutransportieren. Die Kompakta wird von Lamellen aufgebaut, in deren Zentrum ein Blutgefäß im sogenannten Havers-Kanal liegt. Diese verlaufen longitudinal im Knochen und werden von den Volkmann-Kanälen, welche transversal im Knochen verlaufen, ergänzt. Durch die Diaphyse verläuft die *arteria nutricia*, welche das Blutgefäßnetzwerk versorgt. Eine Lamelle ist aus der extrazellulären Matrix, bestehend aus mehreren Schichten (3-5  $\mu\text{m}$  pro Schicht) mineralisierten Kollagenfibrillen, zwischen denen jeweils eine Schicht Osteozyten liegen, aufgebaut. Dies sind ehemalige Osteoblasten, welche beim Knochenbau von der äußeren Lamelle überschichtet, bzw. eingemauert wurden. Ein Havers-Kanal wird von etwa fünf bis zwanzig Lamellen umgeben, wobei die Schraubrichtung, welche durch die Kollagenfibrillen erzeugt wird, sich mit jeder Schicht abwechselt. Dies ergibt für ein Osteon einen Durchmesser von ca. 100 – 400  $\mu\text{m}$ . Die Osteozyten werden durch Knochenkanälchen, welche strahlenförmig im Osteon verlaufen, über das Blutgefäß im Havers-Kanal versorgt. Die Osteone untereinander sind kaum miteinander vernetzt. In Abbildung 2 ist eine menschliche Tibia mit einer Schmorl-Färbung im Querschnitt gezeigt.

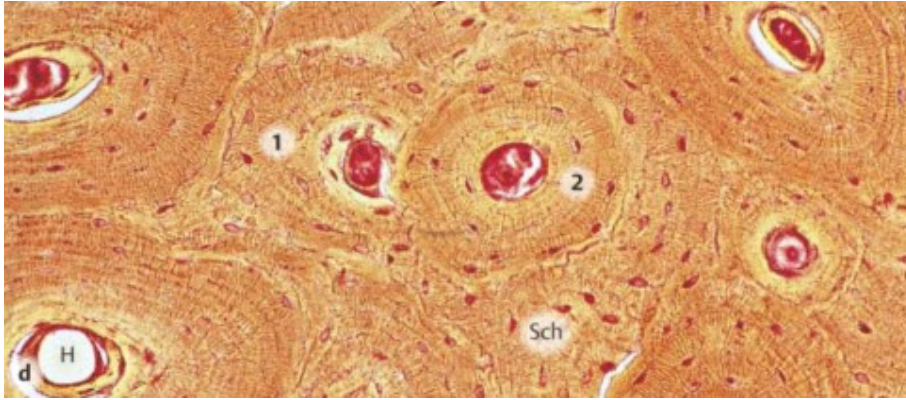


Abbildung 2: Schmorl-Färbung einer menschlichen Tibia. In dunkelrot sind die Kavitäten des Havers-Kanals und der Knochenlakunen zu erkennen. In braun sind die Osteone erkennbar, welche aus Schichten von Lamellen aufgebaut sind (150x Vergrößerung).<sup>[9]</sup>

Der Kompositaufbau der EZM aus Kollagenfibrillen, welche zugfest sind, mit den eingebetteten Hydroxylapatit-Kristallen, welche druckfest sind, führt zu einem biegefesten, elastischen Knochen. In der Spongiosa verlaufen keine Blutgefäße innerhalb der Trabekel. Die Zellen werden von Gefäßen aus dem Knochenmark, die o. g. *arteria nutricia*, und deren Gefäßgeflecht versorgt. Die Bälkchen selbst sind ca. 300 – 400 µm groß. Die Spongiosa ist von einer Schicht Kompakta umgeben und findet sich im Knocheninneren wieder. Die spongiöse Struktur wird von Knochenmark gefüllt.

### Knochenzellen

Die Knochenzellen, welche aktiv am Auf- und Umbau des Knochengewebes beteiligt sind, sind die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. So wie die meisten Zellen, welche das körperliche Gewebe aufbauen (Muskelzellen, Fettzellen, Knorpelzellen, etc.) leiten sich Osteoblasten von mesenchymalen Stammzellen ab. Sie sind verantwortlich für den Aufbau von Knochengewebe, indem sie sowohl die Kollagenfibrillen synthetisieren als auch die Ausscheidung des eingelagerten Hydroxylapatits steuern. Weiterhin überwachen die Osteoblasten das Gleichgewicht zwischen ihnen und den Osteoklasten, deren Aufgabe der Knochenabbau ist. Dieses Gleichgewicht ist essenziell für einen gesunden Knochen und bei verschiedener Belastung anpassbar; so kann die Knochendichte bei höherer Beanspruchung zunehmen oder bei reduzierter Beanspruchung, wie beispielsweise einer langen Bettlägerigkeit, abnehmen. Osteozyten sind ehemalige Osteoblasten, welche im Vorgang des Knochenaufbaus in den Osteonen zwischen den Knochenlamellen eingemauert worden sind. Die in Abbildung 2 gezeigten Lakunen und Knochenkanälchen sind die Aufenthaltsräume der Osteozyten. Hierbei füllen sie diese aber nicht vollständig aus, der restliche Raum wird von Kollagenfibrillen und interstitieller Flüssigkeit eingenommen, wodurch die Zellen versorgt werden können.

Osteozyten scheinen eine Art Kommunikationsaufgabe zwischen dem Knochengewebe und den Osteoblasten bzw. den Osteoklasten zu besitzen. Wenn die Osteozyten in einem Bereich absterben, wird das Gewebe von Osteoklasten gänzlich abgebaut. Charakteristisch für die Osteozyten ist die Verbindung zum nächsten Nachbarn durch *gap junctions*. Dies sind Kanäle, welche die Zellen durch die Zellmembran hindurch verbinden. Diese sind in Abbildung 3 mit einem roten Kreis markiert.

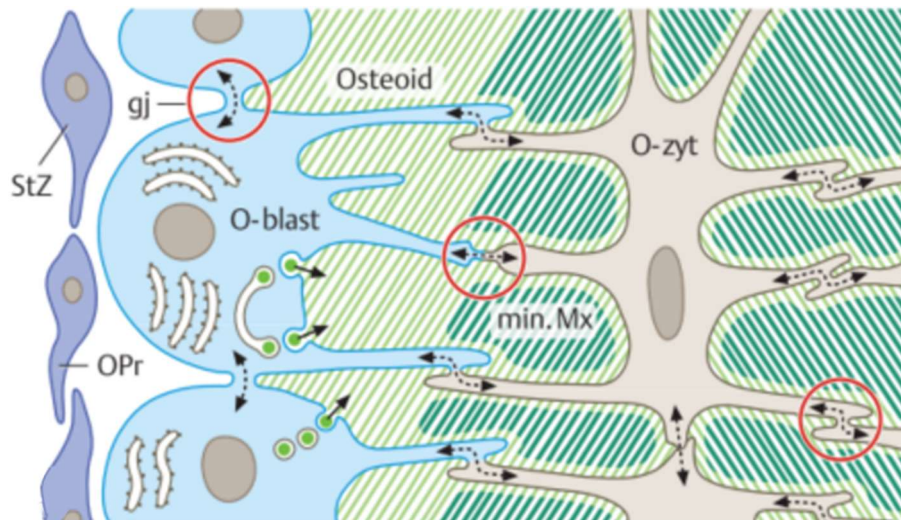


Abbildung 3: Osteoblasten (O-blast) bauen eine neue Schicht im Osteon auf. Das Osteoid wird gebildet, ehemalige Osteoblasten liegen als Osteozyten (O-zyt) vor. Diese sind durch *gap junctions* (gj) miteinander verbunden (roter Kreis). Mesenchymale Stammzellen (StZ) sind bereit, um zu Osteoblasten zu differenzieren.<sup>[9]</sup>

Wie zuvor erläutert, werden Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen gebildet. Hierbei spielen Hormone und der Wachstumsfaktor BMP-2 (*bone morphogenic protein 2*) in der Kaskade eine wichtige Rolle. Eine neue Schicht einer Lamelle wird entweder auf einer bereits vorhandenen Schicht gebildet oder auf der Innenseite der Knochenhaut, dem Periost, welche den Knochen von außen überzieht und als Reservoir für Osteoblasten fungiert. Auf der Oberfläche liegt eine Monolage von Osteoblasten; der erste Schritt ist die Bildung des Osteoids, welches die ausschließlich organischen Bestandteile des Knochens beinhaltet. Anschließend findet die Mineralisation statt. Entsprechend der klassischen Kristallisation sind Kristallisationskeime nötig und eine Überschreitung des Löslichkeitsprodukts. Die Keime werden durch Matrixvesikel gebildet, diese sind ca. 70 nm groß und werden an den Ausläufern der Osteoblasten abgeschnürt und freigegeben. An der Außenseite der Membran ist u.a. das Enzym alkalische Phosphatase befestigt. Sie spaltet organische Phosphate und das Pyrophosphat. Hierdurch wird eine hohe lokale Konzentration von Phosphat-Ionen erreicht. Im Inneren des Vesikels bilden sich ausgehend von calciumbindenden organischen Molekülen erste Kristallisationskeime von Hydroxylapatit.



Das Wachstum führt schließlich zum Platzen der Vesikel, woraufhin die Keime weiterwachsen und sich an die Kollagenfibrillen anlagern. Die Bildung eines gesamten neuen Osteons dauert mehrere Monate.

Osteoklasten sind Zellen, welche aus mehreren Vorläuferzellen gebildet werden und somit sehr groß und mehrkernig werden, analog zu Makrophagen. Die Osteoklasten legen sich auch in Form einer Monolage auf den abzubauenen Bereich nieder. Hierbei werden Gruben und Bohrkanäle in den Knochen gefressen, welche als Resorptionslakunen bzw. Howship-Lakunen bezeichnet werden. In Abbildung 4 ist die schematische Arbeitsweise eines Osteoklasten gezeigt.

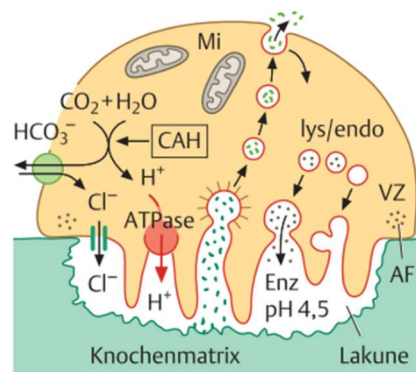


Abbildung 4: Schematische Funktionsweise eines Osteoklasten. Er beinhaltet Carboanhydrase (CAH), Mitochondrien (Mi) und Endosomen (endo), welche lysosomale Enzyme (lys) enthalten. Durch Aktinfilamente (AF) entsteht eine Versiegelungszone (VZ).<sup>[9]</sup>

In einem ersten Schritt werden durch eine Absenkung des pH-Werts die anorganischen Calciumverbindungen aufgelöst. Hierzu kapselt der Osteoklast einen Teilbereich am Knochen an der Versiegelungszone (VZ) ab und pumpt Protonen über die H<sup>+</sup>-ATPase in den isolierten Raum, wodurch ein pH-Wert von etwa 4,5 erreicht wird. Zeitgleich werden Chloridionen hineingepumpt, was durch das Enzym Carboanhydrase (CAH) gesteuert wird. Im weiteren Schritt werden die Kollagenfibrillen durch Enzyme (lys) abgebaut. Am Schluss werden die Fragmente durch Endozytose (Aufnahme und Abtransport von Zellen) entfernt (endo). Ein Osteoklast arbeitet ungefähr zwei Wochen, wonach er durch Apoptose abstirbt und ersetzt wird oder in einen Ruhezustand versetzt wird.

### Endost und Periost

Das Endost und Periost, welche bereits oben als Knochenhaut erwähnt wurden, bedecken im Fall des Ersteren sämtliche innen liegende Knochenoberflächen, wohingegen das Periost die außenliegenden Knochenoberflächen bedeckt. Das Endost besteht aus einer Schicht nicht mineralisierter Matrix von Kollagenfibrillen, an welche sich in einer Monolage alle wichtigen Zellen anlagern.



Im Falle eines Knochenumbaus oder auch der Reparatur eines Knochenbruchs können von hier aus mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen (Knochenvorläuferzellen), Osteoblasten und Osteoklasten aktiviert werden. Das Periost hingegen wird von zwei Schichten bedeckt. Auf dem Knochen selbst liegt wie im Endost eine Schicht der Kollagenfibrillen mit anhaftenden Zellen. Darüber liegt eine Bindegewebsschicht, dessen elastische Fasern in den Knochen hineinragen. Somit fungiert die Knochenhaut als eine Art Zellreservoir.

### Knochenumbau

Das Knochengewebe unterliegt dem dynamischen Prozess des Auf- und Abbaus, um Defekte zu reparieren oder sich an Belastungen anzupassen. Das Skelett ist das Calciumreservoir des Körpers (99 %) und kann bei Bedarf durch dessen Abbau Calciumionen bereitstellen. Ein weiterer Aspekt, welcher später diskutiert wird, ist die Bildung von Geflechtknochen im Wachstum des Menschen zum ausgereiften Lamellenknochen. In der Kompakta werden ca. 4 % und in der Spongiosa 28 % des Knochengewebes jährlich umgebaut, unter der Berücksichtigung des Anteils am Gesamtskelett von 3:1 ergibt sich ein jährlicher Knochenumbau von ca. 10 %. Ist ein Umbau nötig, so sind die Osteoblasten und Osteoklasten in *bone multicellular units* (BMU) organisiert, wodurch ein über mehrere Monate koordinierter Prozess abläuft, währenddessen die Zellen immer wieder aufgrund ihrer begrenzten Lebenszeit ersetzt werden. In Abbildung 5 ist schematisch der Knochenumbau gezeigt.

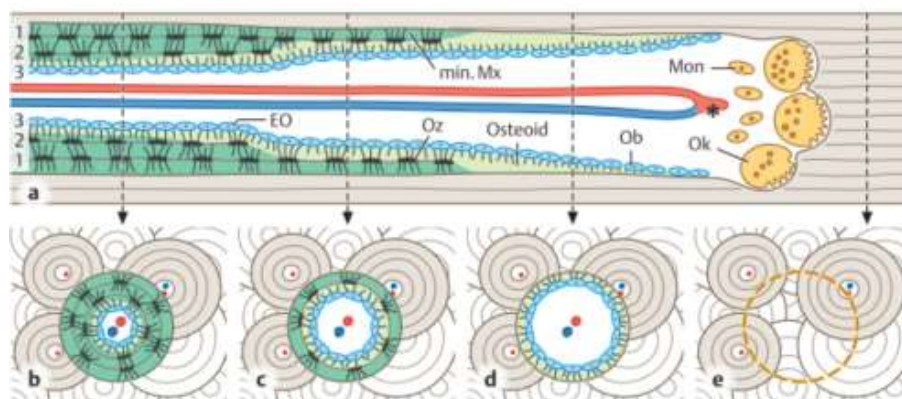


Abbildung 5: Schematischer Ablauf des Knochenumbaus. In der Mitte findet sich das Havers-Gefäß; Osteoklasten (Ok) bauen fortlaufend Knochenlamellen ab, während parallel abgebaute Bereiche durch Osteoblasten (Ob) aufgebaut werden. So wird kontinuierlich mineralisierte Kollagenmatrix aufgebaut (min. Mx) mit eingebauten Osteozyten (Oz). Gleichzeitig wird eine neue Schicht Osteoid (hellgrün) durch Osteoblasten, welche zu Zellen des Endosts (EO) geworden sind, abgeschieden.<sup>[9]</sup>

Während Osteoklasten einen kreisrunden Bereich durch das Osteon hindurch abbauen, wird bereits dahinter mit dem Aufbau von neuem Knochengewebe von den Osteoblasten begonnen. Die Regeneration des Knochens bewegt sich sozusagen wellenförmig mit simultanem Auf- und Abbau durch den zu erneuernden Bereich.

Dies wird aus den Abbildungen b bis e deutlich, weil sich der neu freigelegte Bereich zu dem alten Bereich durch die Neubildung verjüngt. Hierbei spielen bereits vorhandene Osteone bzw. deren Grenzen keine Rolle, es wird ein neues Osteon mit fünf bis zwanzig Lamellen aufgebaut, was mehrere Monate in Anspruch nimmt. Die Reste von alten Osteonen, welche zwischen den vollständigen Osteonen liegen, heißen Schaltlamellen. Durch die zuvor beschriebenen Knochenkanälchen und Lakunen kann die Mineralisation der Kollagenmatrix durch Hydroxylapatit-Kristalle gewährleistet werden. In der Spongiosa findet der Umbau nicht so starr nach Geometrien statt. Hier werden flächige Bereiche, genannt Howship-Lakunen, freigelegt und anschließend erneuert, wodurch sich das ungeordnete Bild in der Spongiosa ergibt.

Im Folgenden wird die Signalkaskade erläutert, auf der die Koordination von Osteoblasten und Osteoklasten basiert. In Abbildung 6 ist vereinfacht die Signalkaskade zur Regulierung des Gleichgewichts zwischen Osteoblasten und Osteoklasten gezeigt.

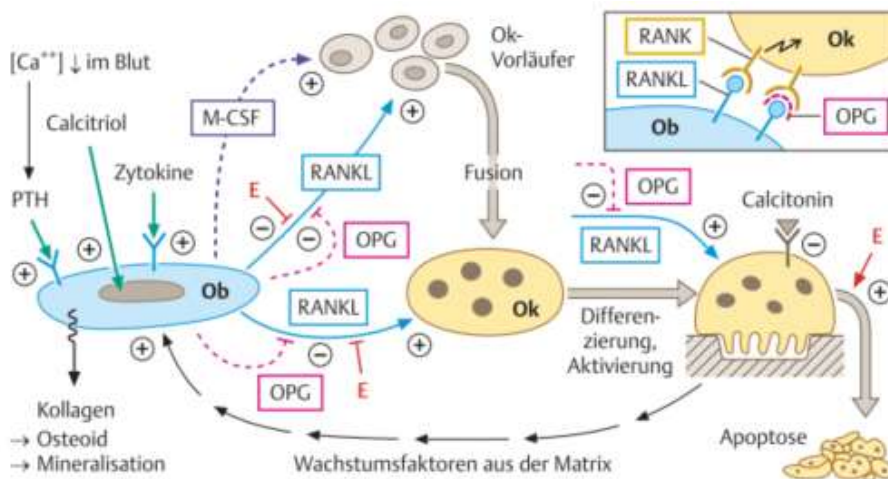


Abbildung 6: Signalkaskade zwischen Osteoblasten und Osteoklasten. Stimulierende (+) und hemmende (-) Botenstoffe können die Osteoklastenaktivität regulieren. Abkürzungen: Osteoklast (Ok); Osteoblast (Ob); Osteoprotegerin (OPG); *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL); *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF); Parathormon (PTH); Östrogen (E).<sup>[9]</sup>

Für das Gleichgewicht zwischen den Osteoblasten und Osteoklasten sind die Proteine *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANK-L) und Osteoprotegerin (OPG) verantwortlich. Die Osteoblasten sondern M-CSF ab, was die Proliferation der Osteoklasten-Vorläufer stimuliert. Damit diese keine Apoptose einleiten und sich zu mehrkernigen Osteoklasten zusammenschließen können, ist RANK-L nötig, welches mit einem Rezeptor auf den Vorläuferzellen, als auch den Osteoklasten interagiert. Der Antagonist zu RANK-L stellt das OPG dar, welches Ersteres blockiert. Das Hormon Östrogen wirkt unabhängig von Osteoblasten blockierend auf die Kaskade und fördert sogar die Apoptose der Osteoklasten, was zu einer Verlangsamung des Knochenabbaus führt.

Werden die Osteoklasten nun tätig und bauen die Knochenmatrix ab, so werden aus ihr Wachstumsfaktoren freigesetzt, welche wiederum die Aktivität der Osteoblasten stimulieren und diese mit dem Aufbau von neuem Knochengewebe beginnen. Die Osteoblasten können noch Abseits der Kaskade beeinflusst werden. Der Calciumspiegel im Blut wird vor allem vom Parathormon (PTH) geregelt. Wie zuvor erwähnt stellt das Skelett das Calciumreservoir des Körpers dar. Zur Einstellung des Gleichgewichts kann PTH stimulierend auf die Osteoblasten wirken, was wiederum die Osteoklasten stimuliert und den Abbau des Knochens fördert. Hierdurch werden Calciumionen freigesetzt und deren Blutspiegel steigt. Weiterhin können Calcitriol, die aktive Form des Vitamin-D<sub>3</sub>, und verschiedene Zytokine die Osteoblasten stimulieren. Ersteres steht erneut im Zusammenhang mit dem Calciumspiegel im Blut, weil die Synthese von Calcitriol mit dem PTH verknüpft ist. Weiterhin spielt Calcitriol eine Rolle in der Steuerung der Resorption von Calciumionen durch die Niere und im Darm.

### Knochenentwicklung

Nachdem die Vorgänge im gereiften Knochen detailliert beschrieben worden sind, wird im Folgenden die Entwicklung von Knochen erläutert. Es lassen sich zwei Prozesse unterscheiden hinsichtlich der Knochenbildung, wobei beide als Ausgangspunkt gemein haben, dass sich an dessen Ort eine große Zahl von mesenchymalen Stammzellen sammeln. In der desmalen Osteogenese differenzieren die MSC zu Osteoblasten und es wird neuer Knochen gebildet. Der Ort der Neubildung ist vorab hoch vaskularisiert und von Osteoblasten besiedelt, welche via *gap junctions* ein Geflecht bilden. Wie zuvor beschrieben, wird im ersten Schritt das Osteoid um jeden Osteoblasten herum gebildet. Nach der Mineralisation verbleiben die Osteoblasten als Osteozyten im jungen Knochen, von dessen Positionen aus sich weiterer Knochen bildet und die einzelnen Teilbereiche zu einem Gesamtwerk zusammenwachsen. Ein solcher Wachstumsmechanismus über eine Anlagerung neuer Schichten auf bereits vorhandenen wird appositionelles Wachstum genannt. Das bedingt, dass der Knochen von innen nach außen wächst, also wird im ersten Schritt die primäre Spongiosa gebildet. Parallel hierzu sind bereits Osteoklasten aktiv, bspw. wird an der Schädeldecke die Innenseite wieder abgebaut, damit Platz für das wachsende Hirn geschaffen wird, wobei die Außenseite vergrößert wird. Weitere Beispiele für desmale Osteogenese sind der Gesichtsschädel und die Schlüsselbeine, deren Entwicklung bereits in der achten Embryonalwoche einsetzen.

Dem gegenüber steht die chondrale Osteogenese, welche mehrheitlich im Körper abläuft. Die MSC differenzieren nicht zu Osteoblasten, sondern zu Chondroblasten, welche für die Bildung von Knorpel verantwortlich sind. Diese bilden im Embryo das Primordialskelett, also eine Grundstruktur aus hyalinem Knorpel, welcher von einer Knochenmanschette umgeben wird.

Die Ossifikation kann auf zwei Wegen stattfinden. In Abbildung 7 sind die verschiedenen Stadien der chondralen Osteogenese gezeigt.

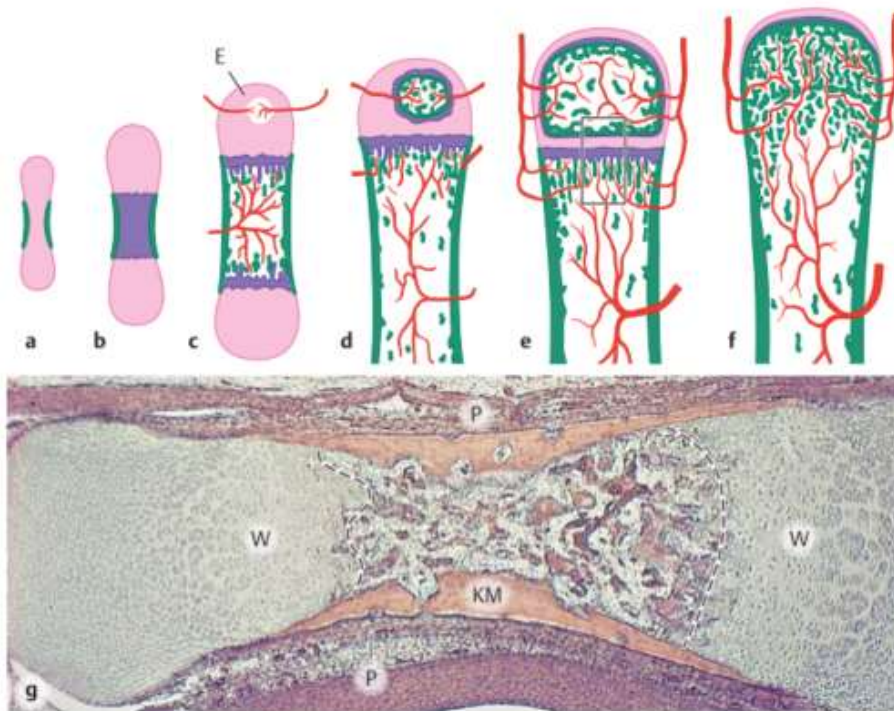


Abbildung 7: Abfolge der chondralen Osteogenese (a-f). Anfangs bildet sich Knorpel (rosa), welcher von einer Knochenmanschette (grün) umgeben wird. Anschließend wird mineralisierte Knorpelmatrix (lila) vaskularisiert, während der Knorpel weiterwächst. Erst im ausgereiften Knochen (f) ist die Wachstumsfuge (e) ebenfalls verknöchert. (g) zeigt einen Fingerknochen eines Fötus, der sich dem Stadium aus (c) zuordnen lässt. Erkennbar ist die Knochenmanschette (KM) mit Periost (P) und die Wachstumszone (W) des Knorpels.<sup>[9]</sup>

Die perichondrale Ossifikation beschreibt die Knochenbildung um die Knorpelstruktur herum. Es bildet sich eine sogenannte Knochenmanschette. In der endochondralen Ossifikation findet interstitielles Wachstum statt, was bedeutet, dass der Knochen gegenüber dem appositionellen Wachstum von innen heraus gebildet wird. Die Chondroblasten differenzieren zu Chondrozyten, welche die Mineralisation des Knorpels vorantreiben. Osteoklasten beginnen durch die Knochenmanschette Wege für die Vaskularisierung freizulegen. Chondroklasten bauen nun einen Großteil der Knorpelmatrix im Kern ab, wodurch die künftige Markhöhle des Knochens entsteht. Übrig gebliebene Bestandteile bieten Osteoblasten eine Gerüststruktur um von hier ausgehend die Spongiosa zu bilden. Die Wachstumsplatte bildet in der derselben Geschwindigkeit, in der die Ossifikation stattfindet, neuen Knorpel, um das Längenwachstum des Knochens zu gewährleisten und wandert in Richtung der Epiphyse. In Abbildung 8 ist schematisch das Wandern der Wachstumsplatte und die folgende Verknöcherung gezeigt.

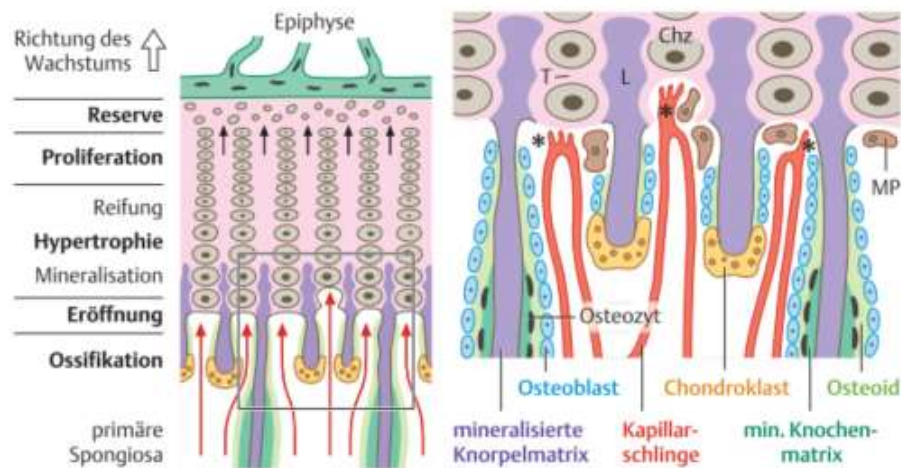


Abbildung 8: Prozesse in der Wachstumsplatte, um das Längenwachstum des Knochens zu gewährleisten.<sup>[9]</sup>

Im oberen Abschnitt der Wanderrichtung liegt im Knorpel eine Zellreserve vor, welche zu Chondrozyten differenziert. Diese mineralisieren den Knorpel, welcher zum Teil von Chondroblasten abgebaut wird. Übrig gebliebene Stützstrukturen dienen als Ausgangspunkt für die Ossifikation und frei gewordene Bereiche werden vaskularisiert.

### 2.1.2 Einfluss von Ionen auf die Knochenbildung

Nachdem die Osteogenese vom biologisch-medizinischen Standpunkt beleuchtet wurde, soll im folgenden Abschnitt der Einfluss von Ionen im Prozess erläutert werden. Dies ist dahingehend interessant, weil in der vorliegenden Arbeit konzeptionell auf Biomoleküle wie Wachstumsfaktoren verzichtet wird, um Osteogenese zu induzieren, sondern mithilfe von Ionen aus vorheriger Beladung des Knochenregenerationsmaterials oder aus dessen Degradationsprodukten eine Verstärkung der Neubildung von Knochen zu bewirken. Hierbei werden die Einflüsse von Orthokieselsäure bzw. Silicium, Calcium-, Phosphat- und Strontiumionen erläutert.

#### Silicium

Silicium wurde lange als ein unwichtiges Spurenelement betrachtet. 1970 zeigten CARLISLE et al., dass Silicium und Calcium im Zusammenhang mit dem Vorgang der Ossifikation stehen, also dem Übergang vom hyalinen Knorpel zum fortschreitenden Verknöchern. Hierbei sind besonders hohe Silicium-Konzentrationen im Osteoid zwischen dem Periost und dem bereits verknöcherten Bereich zu finden.<sup>[38]</sup> Dies deutet an, dass Silicium eine essenzielle Rolle in der Bildung des Osteoids spielt. Später konnten CARLISLE et al. die These bestätigen. Einen Tag alte Küken wurden mit extrem wenig Silicium supplementiert und zeigten ein unterentwickeltes Skelett, der Schädelknochen war kleiner und flacher.



Knochen waren verformt, hatten einen geringeren Durchmesser, einen dünneren Knochenmantel und zeigten weniger Elastizität. Dies deutet an, dass weniger Kollagen enthalten war.<sup>[39]</sup> NIELSEN et al. zeigten im Tiermodell an Ratten, dass ein Defizit an Silicium zu einer schlechteren Wundheilung und Knochenregeneration führt. Dies führten sie genauer auf eine signifikant verringerte Bildung von Hydroxyprolin zurück, welche essentiell für die Synthese von Kollagen ist.<sup>[40]</sup> Ein Vorschlag für den möglichen Signalweg gaben 2016 DONG et al.<sup>[41]</sup> Sie zeigten anhand von Knochenvorläuferzellen von Ratten und menschlichen Osteosarkomzellen („Knochenkrebszellen“), dass eine erhöhte Gabe von Orthokieselsäure mehrere Faktoren beeinflusst. Es wurde eine Stimulierung des *runt-related transcription factor 2* (RUNX2) nachgewiesen. Dieses Protein ist ein Transkriptionsfaktor, welcher die Differenzierung zu Osteoblasten und Endothelzellen induziert. Weiterhin werden Wachstumsfaktoren bzw. Zytokine der *bone morphogenetic protein* (BMP) Gruppe hochreguliert, welche via *mothers against decapentaplegic homolog 5* (SMAD5) die Proliferation von MSC und die Differenzierung zu Osteoblasten begünstigen. Diese Signalwege münden in einer erhöhten Synthese von Kollagen-I als Knochenmatrix und Osteocalcin, ein Peptidhormon, welches Calcium an sich bindet und so die Mineralisation hemmt.<sup>[41]</sup> SHIE et al. konnten zeigen, dass die Zellproliferation von MG-63 Zellen durch bis zu 4 mM Orthokieselsäure gesteigert werden kann. Eine Erhöhung auf 6 mM führt jedoch zu einer starken Apoptose. Gegenüber der Konzentration von 6 mM konnten Konzentrationen von bis zu 4 mM die Bildung von Kollagen und der Calcium-Matrix stimulieren.<sup>[42]</sup> ZHOU et al. zeigten *in vitro*, dass Orthokieselsäure die Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten induziert. Dies erfolgt durch die Induzierung einer erhöhten Genexpression von microRNA-146a (miR-146a). Dies unterdrückt die durch das Zytokin Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induzierte Aktivierung des Transskriptionsfaktors *nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B). Letzteres ist ein Signalweg, der die Knochenbildung durch Osteoblasten hemmt.<sup>[43]</sup> Das bedeutet, dass Orthokieselsäure bisher *in vitro* osteoinduktives Potenzial zeigt. In dieser Arbeit soll mit Calcium modifiziertes Silica als Grundgerüst für das Knochenregenerationsmaterial dienen.

## Calcium

Calcium spielt eine Rolle für die Mineralisation der Kollagenmatrix, weil es Teil des Hydroxylapatits ist. So geht aus der vorherigen Betrachtung der Verteilung von Silicium hervor, dass Calcium sich vor allem im Bereich des ossifizierenden Knochens wiederfindet.<sup>[38]</sup> In Zellkulturuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen zwischen 2 – 6 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die Proliferation von Osteoblasten aus Mäusen signifikant erhöhen, wohingegen 6 – 10 mM die Differenzierung zu Osteoklasten und die Bildung von Hydroxylapatit begünstigt.<sup>[44]</sup>

Verantwortlich kann eine Signalkaskade der *calcium-sensing receptors* (CaSR) sein, welche sich unter anderem in Knochenzellen wiederfinden. Hierüber kann Calcium aus der extrazellulären Matrix die Proliferation, Differenzierung und das Ausbleiben von Apoptose von Osteoblasten und Osteoklasten bewirken.<sup>[45]</sup> Proteinkinase C und Phospholipase C sind für die Signalweiterleitung in der Zellmembran von Osteoblasten abhängig von Calcium und begünstigen die Chemotaxis (Bewegung entlang eines Stoffkonzentrationsgradienten der Zelle) und die mitogene Zellteilung (durch ein Peptid ausgelöste Zellteilung).<sup>[46]</sup> Es werden im Rahmen der CaSR verschiedene Signalwege, z.B. die *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2)<sup>[47]</sup>, die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)<sup>[48]</sup> und die *protein kinase A* (PKA)<sup>[49]</sup> aktiviert, welche allesamt die Proliferation fördern. Dies verdeutlicht, dass Calcium nicht nur zur Kristallisation des Hydroxylapatits im Sinne der anorganischen Chemie nötig ist, sondern eine Vielzahl von biologischen Signalwegen aktivieren kann, welche förderlich für die Bildung von Osteoblasten sind. Im Hinblick auf das zu synthetisierende Material sind das Grundgerüst aus bioaktivem Glas und das verwendete Biopolymer mit Calcium modifiziert.

### Strontium

Strontiumionen können die Dynamik im Knochen entscheidend beeinflussen. Dies hängt mit der chemischen Ähnlichkeit zum Calcium zusammen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Elementen führt eine diätische Strontium-Ernährung von Nagern (<4 mmol Sr pro kg pro Tag)<sup>[50]</sup> jedoch zu keinem negativen Effekt auf die physiologischen Vorgänge im Knochen, wie Verformungen oder Missbildungen. Es führt zu einem leichten Verschieben des Gleichgewichts zwischen Osteoblasten und Osteoklasten, sodass die Knochendichte leicht erhöht wird.<sup>[51-53]</sup> Strontium fand zwischen 2004 bis 2017 unter dem Handelsnamen PROTELOS Anwendung in Form von Strontiumranelat zur Behandlung von Osteoporose bei Frauen in der Postmenopause. Allerdings führten Nebenwirkungen dazu, dass das Medikament vom Markt verschwand. Hier wurde allerdings oral eine Menge von 2 g pro Tag vom Patienten eingenommen, sodass die angestrebte Anwendung von Strontium im Knochenregenerationsmaterial nicht zwangsläufig zu ähnlichen Nebenwirkungen führen muss. Strontium induziert die Expression des Peptids Alkalische Phosphatase (ALP) und des Hormons Osteocalcin (OCN) durch Osteoblasten. Deren erhöhte Expression führt zu einer erhöhten Mineralisation und somit Knochenneubildung. Zusätzlich fördert Strontium die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2), was eine vermehrte Differenzierung zu Osteoblasten zur Folge hat.<sup>[54]</sup> Auf der anderen Seite hemmt Strontium die Bildung von Osteoklasten, was in Summe zu einer höheren Knochendichte führt.<sup>[55]</sup>

## Phosphor

Gemeinsam mit Calcium bilden Phosphor und seine anorganischen Salze in Form von Hydroxylapatit ein grundlegendes Element des Knochens.  $\beta$ -Glycerolphosphat ist eine natürlich vorkommende Quelle für Phosphat im Körper.<sup>[56]</sup> Dieses kann während der Mineralisation im Körper von ALP zu anorganischem Phosphat gespalten werden. Weiterhin kann  $\beta$ -Glycerolphosphat im Prozess der Mineralisation auch durch anorganisches Phosphat direkt ersetzt werden.<sup>[57]</sup> Allerdings sind auch anorganische Phosphorsalze in der Lage, in Interaktion mit Knochenzellen zu treten und Signalkaskaden zu aktivieren. So kann die Expression des *matrix Gla protein* (MGP) in Osteoblasten durch anorganische Phosphate induziert werden, welches einen Hemmer für die Mineralisierung darstellt, weil es Calcium bindet. Hierdurch wird der Prozess der Mineralisation in einem Gleichgewicht gehalten und z. B. Arterienverkalkung verhindert.<sup>[58]</sup> Der dafür vorgeschlagene Signalweg läuft via ERK 1/2, welcher auch von Calcium angesprochen wird, ab.<sup>[59]</sup>



## 2.2 Knochendefekte und ihre Regeneration

Nachdem die Situation im gesunden Knochengewebe und dessen dynamischen Auf- und Abbauprozesse erläutert sind, werden nun typische Knochendefekte vorgestellt. Im Anschluss werden die Ansätze aus dem medizinischen Klinikalltag zur Behandlung gezeigt und auf verschiedene Herangehensweisen aus dem Forschungsbereich eingegangen.

Da Knochen in seinem natürlichen Gleichgewicht ständig auf- und abgebaut wird, besitzt er hervorragende Selbstheilungskräfte im Vergleich zu anderen Organen. Allerdings werden zwischen *noncritical size* und *critical size bone defects* unterschieden. Erstere werden durch die körpereigene Regeneration unter Zuhilfenahme von Fixierung oder Ausrichtung der Knochen therapiert und Letztere lassen sich nur mit den im weiteren Verlauf besprochenen Ansätzen wie dem *autograft* behandeln. Hierbei wird aus dem eigenen Beckenhüftkamm Knochenmaterial entnommen und an der zu behandelnden Stelle appliziert.<sup>[60]</sup> Der vermutlich am häufigsten auftretende Knochendefekt wird durch ein hochenergetisches, mechanisches Trauma hervorgerufen. Zuerst wird die Heilung eines *noncritical size defect* besprochen. Dieser Prozess ähnelt der in Kapitel 2.1.1 besprochenen endochondralen Knochenbildung. Erleidet ein Röhrenknochen transversal einen Bruch, so beginnt der Körper sofort mit der Heilung, welche sekundäre oder indirekte Knochenregeneration genannt wird. Im Vergleich zu anderen Geweben findet dies ohne Bildung von Narbengewebe statt.<sup>[61]</sup> Es werden vier verschiedene Bereiche im Defekt unterschieden: Die Knochenmarkhöhle im Inneren der Knochen, der Bereich zwischen den beiden Brüchen, die Kambiumschicht im Periost und das umgebende Weichgewebe. Die Heilung läuft zudem in vier Stadien ab, welche in Abbildung 9 gezeigt sind.

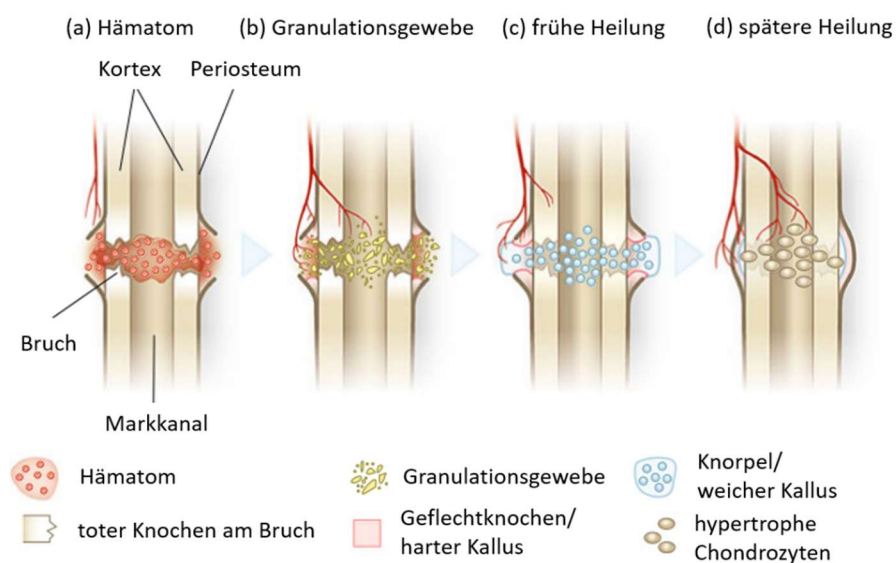


Abbildung 9: Vier Stadien der Knochenheilung. Direkt nach dem Bruch liegt ein Hämatom (a) vor. Anschließend bildet sich Granulationsgewebe (b), welches durch den weichen Kallus (c) ersetzt wird. In der letzten Phase wird dieser ossifiziert.<sup>[62]</sup>

In der Bruchzone zwischen den Knochen wird ein weicher Kallus gebildet, welcher durch endochondrale Ossifikation geheilt wird.<sup>[62]</sup> Im Bereich des Periosts bildet sich direkt ein Mantelknochen um den Bruch herum.<sup>[63]</sup> Das umliegende Gewebe wird bei dem Bruch in Mitleidenschaft gezogen, sodass Kapillare oder auch Muskeln und Sehnen reißen können. Hierdurch entsteht ein Hämatom samt Entzündungsreaktion. In der Bruchregion bildet sich ein Blutpfropf, welcher als Stützstruktur für die Zellen in der Bildung des Granulationsgewebes dient.<sup>[62]</sup> Durch den niedrigen pH-Wert und die hypoxischen Bedingungen in der Entzündungsreaktion fördern Wachstumsfaktoren wie *Hypoxia-induced factor- $\alpha$*  (HIF $\alpha$ ), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und BMPs die Blutgefäßbildung und leiten die Osteogenese ein.<sup>[64–66]</sup> So wird die zweite Stufe der Heilung initiiert, was die Umwandlung des Hämatoms in Granulationsgewebe bedeutet. Im intrakortikalen Bereich wird das nekrotische Knochengewebe abgebaut und Vaskularisierung erfolgt, wodurch eine Vielzahl von MSC, welche in den Defekt migrieren, versorgt werden können. Ein Großteil differenziert zu Chondrozyten, welche für die Bildung des hyalinen Knorpelgewebes verantwortlich sind. Hierdurch tritt die Heilung in die dritte Stufe, der Bildung des weichen Kallus, ein. Dieser bietet eine Art Blaupause für den endgültigen Knochen und stabilisiert die Fraktur.<sup>[67]</sup> Auf beiden Seiten der Fraktur beginnt im Bereich des Periost, welches als Reservoir für MSCs, Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten und –klasten dient, direkt die Bildung von Geflechtknochen, was vor allem durch den Wachstumsfaktor BMP gefördert wird, welcher durch die MSCs freigesetzt wird.<sup>[68,69]</sup> Dies stützt die Bruchstelle zusätzlich von außen und bildet mit dem weichen Kallus gemeinsam den Stützkallus. Die vierte Stufe der Heilung beinhaltet den Umbau des weichen Kallus in harten Kallus und primäre Knochenbildung. Dieser Vorgang verläuft in Analogie zur endochondralen Osteogenese, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben ist. Das hyaline Knorpelgewebe wird zu großen Teilen abgebaut und durch Osteoid ersetzt, welches im weiteren Verlauf mineralisiert wird. Im ersten Schritt wird Geflechtknochen gebildet (primäre Knochenbildung), welcher anschließend zu Lamellenknochen umgebaut wird (sekundäre Knochenbildung). Hierbei wird je nach örtlicher Lage kortikaler oder spongiöser Knochen gebildet, welcher in seiner Ausrichtung in die vorhandenen Knochenstrukturen integriert wird, um optimal den Belastungen standzuhalten.<sup>[67]</sup>

### 2.2.1 Klassische Ansätze zur Regeneration des Knochengewebes

Im Falle eines *critical size defect* ist der Körper nicht in der Lage die Fraktur nach den zuvor beschriebenen Schritten eigenständig zu heilen. Entgegen mancher Literatur ist aber die Angabe einer scharfen Grenze im Sinne einer Größenangabe des Defekts nicht sinnvoll. Hierfür spielen zu viele Faktoren eine Rolle, beispielweise, welcher Knochen betroffen ist und wo der Defekt liegt oder das Alter und der Allgemeinzustand des Patienten.

Wenn es sich beispielweise um eine Knochenausschabung nach einem Tumor oder einer bakteriellen Infektion handelt, ist der Patient ohnehin angeschlagen.<sup>[70]</sup> Die beschriebenen Werte liegen um 2 – 3 cm oder auch, dass der Defekt nicht größer als der zweifache Durchmesser der Diaphyse des betroffenen Knochens sein darf.<sup>[12]</sup> Liegt ein *critical size defect* vor und wird nicht behandelt, so zeigt sich im Rattenmodell eine geringe Bildung von Knorpelgewebe innerhalb der ersten zwei Wochen. Dies entspricht dem zuvor besprochenen Heilungsprozess (vgl. Kapitel 2.2). Ab hier stagniert der Heilungsprozess jedoch und kommt nicht über das Stadium der Kallusbildung hinaus.<sup>[71]</sup> Unabhängig von der Behandlung gelten drei Eigenschaften eines Knochenregenerationsmaterials als essentiell für die Genesung. Es sollte osteogen, -konduktiv und -induktiv sein. Zur Osteogenese sind Zellen im Material nötig, welche zu Osteoblasten differenzieren, um neuen Knochen zu bilden. Ein osteoinduktives Material regt die Differenzierung von Stammzellen zu Knochenzellen an. Osteokonduktiv bedeutet, dass auf dem Material Hydroxylapatit abgeschieden wird. Hierdurch wächst es sozusagen an den Knochen an und bietet eine Art Stützstruktur zum Einwachsen von bspw. Kapillaren. Hierdurch können körpereigene Zellen versorgt und im Bereich des Defekts aktiv werden. Weiterhin kann es für den Aufbau von neuem Gewebe als Keim fungieren, ähnlich zur endochondralen Osteogenese, wo ein Teil des hyalinen Knorpels abgebaut wird und der verbliebene Rest als Stützstruktur fungiert.<sup>[70,72]</sup>

In der klinischen Anwendung ist der *autograft* der Goldstandard zur Behandlung von *critical size defects*.<sup>[73]</sup> Dieser erfüllt die o. g. Kriterien und minimiert Abstoßungsreaktionen, weil es sich um eine körpereigene Spende handelt.<sup>[74]</sup> Dies bedingt allerdings auch eine zusätzliche Operation zur Entnahme des Knochenmaterials aus dem Beckenkamm, was unter Berücksichtigung des Allgemeinzustands des Patienten die Entnahmemorbidität kritisch steigen lassen kann. Weiterhin steht nur ein begrenztes körpereigenes Material zur Verfügung.<sup>[75]</sup> Eine häufig praktizierte Alternative stellt der *allograft* dar. Hierbei ist die Knochenspende menschlichen Ursprungs von einem fremden Spender. Somit sinkt aber sowohl das osteoinduktive als auch das osteogene Potential, weil das Material fremde DNA aufweist. Die Funktion als osteokonduktive Leitstruktur zu dienen, bleibt hiervon unberührt.<sup>[76]</sup> Allerdings geht mit einem *allograft* ein höheres Kontaminationsrisiko z.B. mit bakteriellen Infektionen im Vergleich zum *autograft* einher. Dies bedingt eine Medikation mit Antibiotika, was einen weiteren Stressor darstellt.<sup>[77]</sup> Die beschriebene Situation führt sowohl auf Seiten der universitären, aber auch industriellen Forschung zu großem Interesse an der Entwicklung von Biomaterialien, welche die Vorteile bei gleichzeitiger Minimierung der Nachteile weiter voranbringen. Knochenzement basiert auf dem Polymer PMMA und dient der Fixierung von Endoprothesen, wie einem Hüftgelenk, lässt sich aber auch zum Auffüllen von kleinen Defekten verwenden.<sup>[15]</sup> Laut Daten des statistischen Bundesamtes verteilen sich die eingesetzten Materialien aus dem Jahre 2018 bei 99863 Eingriffen auf 55 % *autografts*, 24 % Biomaterialien und 21 % *allografts*.

Es ist zu erkennen, dass die Biomaterialien bereits die *allografts* überholt haben. Die Biomaterialien setzen sich aus 42 % Keramiken, 37 % Knochenzement und den restlichen 21 % sonstige Biomaterialien zusammen. Zwei Drittel der Behandlung mit Biomaterialien konnte ohne zusätzliche Gabe von Antibiotika erfolgen. Eine Gabe erfolgte in den meisten Fällen im Zusammenhang mit Knochenzementen.<sup>[73]</sup>

Der Begriff Knochenzement ist etwas irreführend, weil kein typischer Zement eingesetzt wird, sondern Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet wird. Er verbindet im Bereich der Gelenkersatzchirurgie den vorhandenen Knochen mit dem Gelenk und stellt hierfür den Goldstandard dar.<sup>[15]</sup> Andere Knochenzemente basieren auf Calciumphosphat<sup>[78]</sup> und Glas-Polyalkenoat<sup>[79]</sup>, wobei letztere wegen ihrer hohen Bioresorption nur in nicht-lasttragenden Defekten in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eingesetzt werden.<sup>[78]</sup> In der Anwendung werden flüssiges Methylmethacrylat (MMA) und pulverförmiges Copolymer aus MMA mit Styrol gemischt, wodurch die Polymerisationsreaktion gestartet wird.<sup>[80]</sup> Dies wird *in-situ* im Operationssaal vom Chirurg durchgeführt.

### 2.2.2 Forschungsansätze zur Regeneration des Knochengewebes

Um ein geeignetes Knochenregenerationsmaterial zu entwickeln, ist es nötig zu verstehen, dass es nicht das eine Material gibt, das allen anderen überlegen ist. So bestimmen eine Vielzahl an Variablen die Gleichung für den individuellen Fall eines Patienten und es muss zwischen den Vor- und Nachteilen, welche jede Materialklasse mit sich bringt, abgewogen werden. Weiterhin bedingen medizinische Produkte höchste Herstellungsstandards, Reproduzierbarkeit und letztendlich eine behördliche Zulassung. Dies sollte beim Materialdesign zumindest nicht außer Acht gelassen werden, wenn sie auch im Laboralltag noch keine Rolle spielen, um Herausforderungen zu bewältigen.<sup>[81]</sup> Im Folgenden werden nun verschiedene Materialien und Herstellungsansätze erläutert und anschließend näher auf die für diese Arbeit ausgewählten Materialien eingegangen.

Biomaterialien umfassen alle Materialien, welche zu therapeutischen oder diagnostischen Zwecken in Kontakt mit biologischen Systemen wie dem menschlichen Körper kommen. Eine Aufgabe kann der Ersatz von Körperfunktionen sein, die der Körper nicht mehr selbst leisten kann. Dies setzt eine Verträglichkeit des Materials und positive Interaktion mit dem Körper voraus. Im Falle des Knochenregenerationsmaterials soll zusätzlich auch Biomineralisation stattfinden. Das bedeutet, dass eine im Körper ablaufende biologische Erzeugung von Material erfolgt.<sup>[82]</sup> Es lassen sich Biomaterialien aus Metallen, natürlichen Biopolymeren, synthetischen Biopolymeren, bioinerten Keramiken, bioaktiven Keramiken und bioaktiven Gläsern unterscheiden. Diese lassen sich bspw. zu Kompositmaterialien kombinieren, wodurch Metall-Matrix, Polymer-Matrix oder funktionelle Komposite erhalten werden.

In Abbildung 10 ist gezeigt, wie durch die Kombination von einzelnen Materialien zu Kompositmaterialien ein Gewinn an mechanischer Stabilität, aber auch Elastizität entstehen kann.

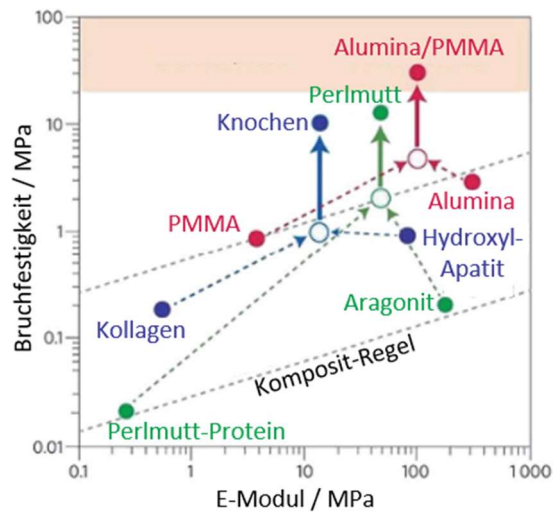


Abbildung 10: Ashby-Grafik über die mechanischen Eigenschaften von Materialien, sowie deren Steigerung durch Kombination zu Kompositmaterialien.<sup>[18]</sup>

Hierbei werden im Falle des Knochens und des Perlmutter anorganische Kristalle in eine natürliche, organische Polymermatrix eingebettet. Polymethylmethacrylat (PMMA) ist ein synthetisches Polymer und lässt sich mit Aluminiumoxid, einer Hochleistungskeramik, kombinieren.

### Metallische Implantate

Metalle als Materialklasse besitzen besonders für lasttragende Defekte hervorragende mechanische Eigenschaften. Tantal gilt als bioaktiv und korrodiert nicht, es wird bereits klinisch angewendet, jedoch ist die Inertheit gleichzeitig auch ein Nachteil, weil es eine Explantation nach dem Ausheilen des Defekts von Nöten macht.<sup>[83-85]</sup> Mechanische Eigenschaften, welche deutlich höher als die des Knochens liegen, können einen sogenannten *stress shielding effect* hervorrufen. Hierbei wird ein Großteil der Belastung des umliegenden gesunden Knochengewebes durch das Implantat abgefangen. Die Osteozyten signalisieren daraufhin, dass die Knochendichte aufgrund ausbleibender mechanischer Reize gesenkt wird und es kommt zur Osteopenie.<sup>[81]</sup> Magnesiumbasierte Implantate bieten eine Lösung für die Problematik einer weiteren Operation. Die mechanischen Eigenschaften liegen in der Größenordnung von Knochen, es lassen sich poröse Strukturen herstellen und es ist biodegradierbar. Allerdings kann eine zu hohe lokale Magnesiumkonzentration toxisch wirken.<sup>[86,87]</sup>

Titan und seine Legierungen besitzen die zuvor besprochenen Nachteile einer Explantation, aber der *stress shielding effect* fällt deutlich geringer aus, weil sich die mechanischen Eigenschaften besser auf die der Spongiosa einstellen lassen. Das Material gilt als osteokonduktiv und ist sehr korrosionsbeständig und langlebig, was es für einen langen Verbleib im Körper bei großen Defekten prädestiniert.<sup>[88-91]</sup>

### Natürliche Biopolymere

Im Bereich der natürlichen Biopolymere gibt es Beispiele tierischen Ursprungs wie Kollagen, Gelatine und Chitosan aber auch pflanzlichen Ursprungs wie Alginat. Sie sind biodegradierbar und weisen eine gute Biokompatibilität auf. Allerdings ist die mechanische Stabilität begrenzt und fällt relativ gering aus. Besonders die ersten beiden Vertreter sind naheliegend für ein Knochenregenerationsmaterial, weil Kollagen als Bestandteil der Knochenmatrix im Körper vorkommt und Gelatine die denaturierte Version hiervon ist. Kollagen ist ein Eiweiß, welches in verschiedenen Typen vorliegen kann, wobei die Hauptbestandteile Glycin, Hydroxyprolin und Prolin sind. Direkt aus Kollagen hergestellte Gelatine ist die durch Hydrolyse denaturierte Form, welche wasserlöslich ist und ein Hydrogel bildet. Hierdurch ergibt sich eine freie Formgebung.<sup>[92]</sup>

Alginat wird aus der Braunalge gewonnen und beschreibt ein Polysaccharid. In der Braunalge verleiht es der Pflanze als Hauptbestandteil der Zellwände Stabilität und Elastizität.<sup>[93]</sup> Es gilt als biokompatibel und kann ebenfalls als Hydrogel verarbeitet werden.<sup>[94]</sup> Analog hierzu besteht Chitosan auch aus einem Polysaccharid, welches aus dem Chitin von Krustentieren gewonnen wird.<sup>[95]</sup> Ein Alleinstellungsmerkmal ist die natürliche antibakterielle Wirkung von Chitosan. Ein Wirkungsmechanismus basiert auf der Interaktion der polykationischen Struktur mit den negativ geladenen Bereichen der Zellwände, wodurch deren Durchlässigkeit verringert wird. Zusätzlich kann Chitosan auch an die DNA binden und somit die Synthese von mRNA unterdrücken.<sup>[96]</sup> Es weist eine gute Osteokonduktivität auf, wohingegen die Osteoinduktivität sehr gering ausfällt.<sup>[97]</sup> Chitosan kann in Form eines Hydrogels verarbeitet werden.<sup>[98]</sup> Dies lässt sich mit  $\beta$ -Glycerolphosphat vermischen und direkt in den Defekt injizieren.<sup>[32]</sup> Chitosan wird sowohl alleinig als auch als Basis für Kompositmaterialien oder Copolymeren als Scaffold im *bone tissue engineering* verwendet.<sup>[99]</sup>

### Komposite

Kommerziell erhältliche Komposite zur Knochenregeneration basieren bspw. auf Kollagen und Calciumphosphat-Mineralen, was den Verhältnissen im Knochen sehr ähnelt. Für die mineralische Phase werden häufig direkt Hydroxylapatit (HA), Tricalciumphosphat (TCP) oder deren Mischung biphasisches Calciumphosphat (BCP) verwendet.<sup>[100]</sup>

Im Tiermodell zeigen diese Komposite wie CollaGraft® ein besseres Einwachsen als kommerzialisierte Produkte der einzelnen Materialklassen wie die Biokeramik ProOsteon® oder die demineralisierte Knochenmatrix DBX®.<sup>[101]</sup> Das Komposit Collapat® zeigte im Tiermodell eine fünffach schnellere Heilung des Knochens im Vergleich zu einem unbehandelten Defekt.<sup>[102]</sup> Interessant ist der Vergleich der Produkte Vittoss® und Vitoss® Bioactive: Ersteres besteht aus 20 % Kollagen und 80 %  $\beta$ -TCP und Letzteres aus 20 % Kollagen, 70 %  $\beta$ -TCP und 10 % BioGlass®. Durch das bioaktive Glas und den damit einhergehenden freigesetzten Ionen zeigt Vitoss® Bioactive eine schnellere Osteogenese. Ein Nachteil von Kollagen-basierten Materialien ist der tierische Ursprung, wodurch Pathogene übertragen werden können oder allergische Reaktionen möglich sind.<sup>[103]</sup> Die Verwendung von Gelatine anstatt von Kollagen eliminiert diese Risiken für die Komposite. Eine Einschränkung für diese Biomaterialien ist ihre mangelnde Elastizität. Weiterhin ist die Homogenität durch das Aggregieren der anorganischen Partikel eine Herausforderung, sodass die mechanischen Eigenschaften nicht immer zufriedenstellend sind. Ein Ansatz zur Verbesserung der Homogenität ist die Herstellung via Copräzipitation. Ein anderer Ansatz ist die Verwendung von Nanomaterialien als Füllstoffe zur besseren Verteilung.<sup>[100]</sup>

### Nanokomposite

Aus den Biopolymeren und anorganischen Füllstoffen lassen sich eine Vielzahl von verschiedenen Nanokompositen herstellen. Die verwendeten Biopolymere lassen sich nach natürlichen und synthetischen Biopolymeren unterscheiden. Erstere wurden im vorangegangenen Unterkapitel besprochen; in die Gruppe der synthetischen Biopolymere fallen beispielweise Polycaprolacton (PLA), Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA), Polyethylenglykol (PEG) oder Polyurethan (PU). Als anorganische Füllstoffe kommen Partikel oder auch speziell Nanopartikel infrage. Diese basieren auf Hydroxylapatit, Calciumphosphat (CaP)<sup>[104]</sup>, Zirkoniumdioxid, Silica, Silber, Titandioxid oder Graphenoxid.<sup>[19]</sup>

Hierbei bieten die Nanokomposite spezifische Vor- und Nachteile. Nanohydroxylapatit ähnelt dem natürlichen Hydroxylapatit sehr, sodass dieser mit natürlichen Biopolymeren kombiniert wird. Hier kommen Chitosan/Tamarinden-Extrakt,<sup>[105,106]</sup> Alginate,<sup>[107]</sup> oder eine Kombination aus Kollagen/Fibroin<sup>[108]</sup> infrage. Die Scaffolds werden über Gefrier Trocknung hergestellt. Dies ergibt eine gewisse Porosität und durch den Füllstoff eine verbesserte mechanische Stabilität. Die biologische Aktivität der Nanokomposite ist gegenüber den Einzelmaterialien gesteigert. Ein Nachteil ist allerdings, dass die Porosität mit erhöhtem Füllstoffgrad immer kleiner wird und daher nicht beliebig hoch gefüllt werden kann.<sup>[19]</sup> Die Verwendung von anderen Füllstoffen verschiebt die Vor- und Nachteile: Mit Silber ausgestattete Chitosan/Cellulose-Scaffolds erzeugen einen antibakteriellen Effekt.<sup>[109]</sup>

Das Einbringen von Zirkoniumdioxid- und Calciumzirkonat-Nanopartikeln führt zu einer ausgezeichneten mechanischen Stabilität, während die biologischen Eigenschaften gegenüber der Kontrollgruppe aus Nanohydroxylapatit/Chitosan verbessert sind.<sup>[110]</sup> Werden synthetische Biopolymere verwendet, so müssen andere Methoden zur Verarbeitung und Herstellung der Scaffolds angewandt werden. So werden Nanohydroxylapatit/Polycaprolacton Nanokomposite durch Salzauslaugung hergestellt.<sup>[111]</sup> Aber auch Elektrosponnen von Graphenoxid/PCL-Fasermatten kommt infrage.<sup>[112]</sup> Die Herstellung eines PLGA/Titan-Nanotube Komposits erfolgt durch Sintern bei milden Temperaturen.<sup>[113]</sup> Grundsätzlich sind in der Landschaft der Nanokomposite sehr viele Kombinationen möglich, welche wiederum ihre spezifischen Herstellungsmethoden, sowie Vor- und Nachteile mit sich bringen. Ein direkter Vergleich der Performance als Knochenregenerationsmaterial ist jedoch nicht möglich, weil jedes Material mit anderen Zell-Linien oder gegen andere Referenzen getestet ist. Auch hier gilt der Grundsatz, dass es nicht das eine beste Material gibt.

### 3D Druck

Ein weiterer Ansatz ist das 3D-Drucken von Knochenregenerationsmaterialien. Es lassen sich beispielweise Zellen in einem synthetischen Material in einer gewünschten Form unterbringen. Hierbei können anatomische Strukturen imitiert werden.<sup>[114]</sup> Als Material wird häufig poly(*N*-isopropylacrylamid) (PNIPAm) eingesetzt, welches mit UV-Licht quervernetzt werden kann. Im PNIPAm lassen sich Zellen verkapseln, welche anschließend in einem Biopolymer wie Gelatine eingebettet werden können.<sup>[115]</sup> Als Materialien in der additiven Herstellung kommen auch Biokeramiken infrage, welche auf Calciumphosphat, Calciumsilikat, Aluminiumoxid oder Zirkoniumoxid basieren. Die beiden Letzteren sind nicht biodegradierbar.<sup>[116]</sup> Es lassen sich auch Komposite aus den Keramiken mit Polymeren drucken. Dies führt zu einer Verbesserung der mechanischen Eigenschaften.<sup>[117]</sup> Als Polymere komme Polycaprolacton (PCL), Polylactonsäure (PLA) oder Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA) infrage.<sup>[118,119]</sup> Außerdem lassen sich auch Implantate aus Metallen und deren Legierungen drucken. Hierbei wird das Pulver mithilfe eines Lasers aufgeschmolzen und das Implantat kann passgenau für den Defekt aufgebaut werden. Hierfür werden vorrangig Titan und seine Legierungen verwendet.<sup>[120]</sup>



## 2.3 Bioaktive Gläser

Silicamaterialien haben vielfältige Anwendungsgebiete. Sie können als Nanopartikel synthetisiert werden und mit einem Porensystem ausgestattet werden. Dies erlaubt vielfältige Anwendungen, beispielweise in medizinischen Fragestellungen.<sup>[121,122]</sup> Hier kommen der Einsatz als Medikamentenfreisetzungssystem<sup>[123]</sup> oder auch als kombiniertes Erkennungs- und Bekämpfungssystem für Krebs infrage.<sup>[124]</sup> Aber auch außerhalb der medizinischen Anwendung haben Silicamaterialien große Bedeutung. In der Petrochemie wurden mesoporöse Silicamaterialien in den Neunzigern als M41S eingeführt und dienen der Katalyse.<sup>[125]</sup>

Eine besonders spannende Entdeckung gelang HENCH et al. mit dem 45S5 Bioglass® im Jahr 1969. Sie läutete den Start der dritten Generation der Biomaterialien ein; diese sind in der Lage, Signalwege im Körper zu aktivieren. Die erste Generation wurde durch eine möglichst hohe Inertheit gegenüber dem biologischen Gewebe und die zweite Generation durch eine starke Anbindung an das Körpergewebe definiert.<sup>[20]</sup> Das von HENCH entwickelte Material beschreibt ein keramisches Implantat, welches an den Knochen anbindet.<sup>[126]</sup> Dies setzt sich aus 45 Gew% SiO<sub>2</sub>, 24.5 Gew% CaO, 24.5 Gew% Na<sub>2</sub>O, und 6.0 Gew% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> zusammen und wird gesintert.<sup>[127]</sup> Zwei Annahmen führten die Biogläser zum Erfolg: Erstens wurde erkannt, dass die bisher benutzten Metalle und Polymere sich chemisch zu sehr von dem umgebenden Gewebe unterscheiden und dadurch eine Einkapselung stattfindet und zweitens braucht ein zukünftiges Material die Fähigkeit Hydroxylapatit auf der eigenen Oberfläche abzuscheiden, weil es der anorganischen Phase des Knochens entspricht und so nicht abgestoßen wird.<sup>[126]</sup> Hierbei nimmt die Auflösung der Glasstruktur und die damit einhergehende Freisetzung von Metallionen eine Schlüsselrolle ein. Durch die chemische Zusammensetzung lassen sich verschiedene Fähigkeiten und Eigenschaften einstellen und kombinieren. Gläser, welche Borat oder Phosphat enthalten lösen sich schneller auf und zeigen eine hohe Bildungsrate von Hydroxylapatit.<sup>[128]</sup> Ein antibakterieller Effekt lässt sich durch die Inkorporation von Silberionen in das Glasnetzwerk verstärken, welcher sich nicht auf die Osteoblasten auswirkt.<sup>[129,130]</sup> Für die Wundheilung ist die Vaskularisierung essentiell; über die Modifikation des bioaktiven Glases mit Kupferionen kann eine Angiogenese ausgelöst werden.<sup>[131]</sup> Die in Kapitel 2.1.2 diskutierten Ionen und deren Einfluss auf die Signalwege im Körper lassen sich ebenso in ein bioaktives Glas einbringen. Dies konnte für Strontium<sup>[132]</sup>, Calcium und Phosphat<sup>[133]</sup> gezeigt werden. Durch die Abscheidung von Hydroxylapatit auf dem Biomaterial ist jedoch nicht nur die Osteokonduktivität gewährleistet, sondern gleichzeitig geht mit dem Material auch die Fähigkeit zur Osteoinduktion einher.<sup>[134]</sup>

Im letzten Drittel des vorangegangenen Jahrhunderts haben es viele Medizinprodukte auf Basis von bioaktiven Gläsern im Bereich der Knochenregeneration auf den Markt geschafft, welche oft eine bestimmte Applikation hatten.

Es folgt eine Auswahl von Beispielen, um die Bandbreite zu verdeutlichen. MEP® (*middle ear prosthesis*) zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, das Weichgewebe mit dem Knochen im Mittelohr zu verbinden.<sup>[135]</sup> NovaBone® wurde in nicht lasttragenden Knochendefekten in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie eingesetzt. Hierbei wurde das Pulver mit dem Blut des Patienten aus dem Defekt vermischt und die so gewonnene Paste in den Defekt gedrückt.<sup>[136]</sup> Dieser Ansatz ist recht ähnlich zu dem Prinzip der *press-fit* Implantation, wie er im Rahmen dieser Arbeit verfolgt wird. Hierzu passt auch das Produkt TheraGlass®, welches nicht durch Sinterung hergestellt wird, sondern über einen Sol-Gel Prozess, wodurch gegenüber Ersteren eine höhere Wundheilung erzielt werden kann.<sup>[137]</sup> Besonders interessant ist eine beschleunigte Wundheilung mithilfe eines bioaktiven Glases in der Struktur von Zuckerwatte, welches dem körpereigenen Fibrin Pfropfen ähnelt, um eine Wunde zu verschließen. Das watteartige Material kann die Wunde verschließen, eine Gerüststruktur bereitstellen und eine durch Ionen induzierte Heilung ermöglichen.<sup>[138]</sup> Die Vielseitigkeit zur Heilung von Defekten wird durch das Produkt Corglas® erweitert. Hier wurden im Tiermodell mit Schafen die beiden Enden eines Gesichtsnervs im Inneren einer Hohlröhre des bioaktiven Glases angenäht. Nach zehn Monaten war das bioaktive Glas vollständig aufgelöst und der Nerv zusammengewachsen.<sup>[139]</sup> Als letztes Beispiel soll ein bioaktives Glas mit Yttriumoxid dienen. Dieses kann in Form von mikrometergroßen Partikeln in eine metastasierende Leber injiziert werden, nachdem die Partikel mit einem Neutronenstrahl behandelt wurden. Hierdurch wurde <sup>90</sup>Y erzeugt, welches radioaktiv ist. Die Partikel verweilen so im hoch vaskularisierten Gewebe der Leber und dienen der Bekämpfung von Krebszellen.<sup>[140,141]</sup> Es gibt auch deutliche Hinweise darauf, dass sich bioaktive Gläser zur Heilung von Weichgeweben eignen, weil sie die Angiogenese stark induzieren.<sup>[142,143]</sup>

Die spröden, rigiden Eigenschaften der bioaktiven Gläser beschränken die Anwendungsfelder und Applikationsmöglichkeiten. Die Kombination von bioaktiven Gläsern mit Biopolymeren kann das Anwendungsspektrum erweitern, weil die mechanischen und chemischen Eigenschaften der Biopolymere durch den Aufbau eines Kompositmaterials bspw. die mechanischen Nachteile des bioaktiven Glases kompensieren. Andererseits können die Biopolymere auch als Trägermatrix für Partikel aus bioaktivem Glas dienen, welche aus dieser Matrix freigesetzt werden und ihre Wirkung entfalten können. Dies führt zu Synergien zwischen den verschiedenen Materialklassen, wodurch ein Knochenregenerationsmaterial potenter wird. Die alkalische Natur von bioaktiven Gläsern kann beispielweise die entstehenden Protonen während der Degradation von Polyglycerolsebacat abfangen. Dies wird im nachfolgenden Kapitel unter anderem erläutert.

## 2.4 Polyglycerolsebacat

Das Biopolymer Polyglycerolsebacat (PGS) wurde erstmals 2002 von WANG et al. präsentiert.<sup>[144]</sup> Die Synthese besteht aus zwei Schritten, in denen via Polykondensation aus Sebacinsäure und Glycerol eine Polymerstruktur aufgebaut wird. Letzteres ist durch die *Food and Drug Administration* (FDA) als generell sicher anzusehenden Inhaltsstoff zugelassen, was große Relevanz für die Kommerzialisierung besitzt.<sup>[145]</sup> Sebacinsäure ist als Produkt aus der  $\omega$ -Oxidation des menschlichen Körpers bekannt, wodurch auch hier kein unbekanntes Risiko vom Edukt ausgeht.<sup>[146]</sup> Polyglycerolsebacat wird als Elastomer<sup>[147]</sup> beschrieben, welches gute Biokompatibilität,<sup>[148]</sup> Degradierbarkeit<sup>[149]</sup> und eine vielseitige chemische Modifizierbarkeit und Prozessierbarkeit bietet.<sup>[22]</sup> Die außergewöhnlichen mechanischen Eigenschaften, welche sich in bestimmten Grenzen einstellen lassen, erlauben eine Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen im Bereich des *tissue engineering*.<sup>[150]</sup> PGS bietet sich als Lösung in Fragestellungen für Gefäße, Nerven, den Herzmuskel und auch den Knochen an.<sup>[151]</sup>

Das Harz von PGS aus der ersten Synthesestufe kann vor der Quervernetzung mit verschiedenen Füllstoffen versehen werden. So können beispielweise Nanocellulose oder *Carbon Nanotubes* (CNT) eingebracht werden, wodurch die mechanischen Eigenschaften verstärkt werden.<sup>[152,153]</sup> Der Degradationsmechanismus von PGS zu dessen Produkten kann zu einem Absenken des pH-Werts führen, was ein zytotoxisches Risiko birgt. Ein Nanokomposit aus PGS mit Bioglass®-Nanopartikeln ist in der Lage, kritische Absenkungen des pH-Werts durch die alkalische Natur von bioaktiven Gläsern abzufangen. Weiterhin zeigt sich zusätzlich eine höhere Biokompatibilität und ähnliche mechanische Eigenschaften zu denen des Herzmuskels.<sup>[154]</sup> Von dieser Synergie kann auch das im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Knochenregenerationsmaterial profitieren und mögliche zytotoxische Effekte im Degradationsprozess verhindern. Um poröse Strukturen von PGS zu synthetisieren kommt u.a. die Salzauslaugung infrage. Hierzu wird das Harz mit Salzpartikeln einer definierten Größe vermischt und quervernetzt. Das Auslaugen des Salzes führt zu Makroporen, wodurch die Fähigkeit zur Wasseraufnahme erhöht wird und eine größere Durchlässigkeit bei Anwendung als Membran generiert wird.<sup>[155]</sup>

PGS wird in vielen biomedizinischen Anwendungen wie dem *nerve tissue engineering*,<sup>[156]</sup> *skin tissue engineering*,<sup>[155]</sup> *cardiac tissue engineering*,<sup>[157]</sup> *vascular tissue engineering*,<sup>[158]</sup> und als Medikamenten-Freisetzungssystem<sup>[159]</sup> untersucht. Reines PGS lässt sich aufgrund seiner Viskosität nicht via Elektrospinnen verarbeiten.<sup>[160]</sup> Um die Vorteile von elektrogewebenen Fasermatten zugänglich zu machen, wird das Harz von PGS mit PCL<sup>[161]</sup> oder PU<sup>[162]</sup> verarbeitet. Somit lassen sich die sehr steifen Eigenschaften der Thermoplasten für Anwendungen im *soft tissue engineering* optimieren.<sup>[22]</sup>

Es lassen sich auch eine Vielzahl von Copolymeren aufbauen. Dies führt zu einer gezielten Veränderung der mechanischen und chemischen Eigenschaften des Materials. Generell muss die Menge an Glycerol durch das entsprechende Monomer oder Polymer ersetzt werden. Ein PGS-co-PCL benötigt jedoch zusätzlich eine Ringöffnungsagens.<sup>[163]</sup> Dies wird genauso wie PGS-co-Gelatine im Ansatz eines Nanokomposits mit einem geeigneten Füllstoff untersucht.<sup>[164]</sup> PGS-co-PEG ist eine weitere Variante, welche sich als Reservoir für Zellen eignen kann.<sup>[165]</sup> Solch ein Polymer kann minimalinvasiv als Hydrogel injiziert werden.<sup>[166]</sup> Um das Polymer photochemisch quervernetzen, lassen sich auch Acrylat- bzw. Methacrylatgruppen einbauen. Dieses Polyglycerolsebacat-Acrylat lässt sich innerhalb weniger Minuten durch UV-Licht quervernetzen.<sup>[167]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit soll das konventionelle PGS durch die Inkorporation von Calciumglycerolphosphat im ersten Syntheseschritt des Harzes modifiziert werden. Hierdurch soll einerseits der kovalente Einbau über Kondensation der Alkohol- und Carbonsäuregruppen in das Polymernetzwerk und gleichzeitig der Aufbau eines Komposits auf Basis von ausgedehntem Calciumglycerolphosphat, Calciumphosphat und Glycerid erfolgen.

Abseits der Salzauslaugung kommt auch Gefriertrocknung von PGS infrage, um poröse Strukturen zu erzeugen und das mögliche Anwendungsspektrum zu erweitern. Analog zum Elektrosponnen bedarf es jedoch einer Stützstruktur, damit das während der Quervernetzung verflüssigte Harz vom PGS nicht die gebildeten Poren verschließt.<sup>[168,169]</sup> FRYDRYCH et al.<sup>[170]</sup> kombinierten den Ansatz der Gefriertrocknung mit der chemisch induzierten Quervernetzung eines Polyglycerolsebacat-Urethans und stellten ein weiches, hochporöses Scaffold dar, welches die Angiogenese induzieren konnte.

Die Oberflächenbeschaffenheit eines Materials kann für die Interaktion mit Zellen oder umgebenden Proteinen ausschlaggebend sein. SHI et al.<sup>[171]</sup> haben ein mikrostrukturiertes, mit Graphen gefülltes Nanokomposit aus PGS synthetisiert, welches als Implantat am Herzmuskel Verwendung finden soll. Zur Erzeugung der Mikrostrukturierung wird ein Siliciumwafer photolithographisch behandelt und die Struktur durch Polydimethylsiloxan (PDMS) abgebildet. Die PDMS-Form wird verwendet, um das strukturierte PGS zu erzeugen. Die Strukturierung entspricht der Anisotropie des Herzmuskels und die Leitfähigkeit des Graphens ermöglicht eine Reizweiterleitung unter den Kardiomyozyten.<sup>[171]</sup> Eine weitere Möglichkeit der Mikrostrukturierung bietet die Laserablation. Die entstandenen Kanäle lassen sich bspw. nutzen, um ein Implantat mit Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) zu prävascularisieren.<sup>[172]</sup>

PGS allein lässt sich aufgrund seiner Eigenschaften nicht als Material im 3D-Druck prozessieren. Die vielseitigen Möglichkeiten der Modifizierung machen jedoch 3D-gedruckte Strukturen zugänglich. Ein Polyglycerolsebacat-Acrylat, welches photochemisch quervernetzt wird, eignet sich zur Extrusion im 3D Druck und zeigt gute Zytokompatibilität.<sup>[173]</sup> Um die Eigenschaften als Implantat weiter zu optimieren, haben TOURÉ et al. den 3D-Druck mit Elektrosponnen kombiniert und ein Multischichtsccaffold aus PGS-PCL und bioaktivem Glas dargestellt. Hierdurch konnte der E-Modul unter Beibehaltung der biologischen Eigenschaften gegenüber reinen 3D-gedruckten PGS-Scaffolds gesteigert werden. Dies ermöglicht eine Anwendung für den Sehnen- und Bänderersatz.<sup>[174]</sup>

PGS als Ausgangsmaterial eignet sich auch für eine Vielzahl von Ansätzen im *bone tissue engineering*. So zeigt ein PGS, welches einen Film als Hybridmaterial mit einem bioaktiven Glas bildet, verbesserte mechanische Eigenschaften hinsichtlich der Anforderungen des Knochens, hohe Bioaktivität und -degradierbarkeit. Hierzu wird das Harz in Ethanol mit dem Silica-Calcium Sol in Ethanol gelöst und anschließend quervernetzt.<sup>[175]</sup> Die Einmischung von Materialien, welche als osteoinduktiv gelten liegt nahe, sodass auch Silikate<sup>[176]</sup> oder  $\beta$ -Tricalciumphosphat<sup>[177]</sup> Verwendung fanden. Letzteres wurde in einem Gradienten eingebracht, um auf der einen Seite optimale Osteokonduktivität zu bieten und auf der anderen Seite gute Anbindung an das Weichgewebe. Dieses Material wurde noch mit einer Formgedächtnisfunktion versehen, um sich noch besser an den individuellen Defekt anzupassen.<sup>[178]</sup> ZAKY et al. konnten zeigen, dass PGS im Vergleich zu PLGA in der Lage ist, einen Knochendefekt von kritischer Größe zur Heilung anzuregen. Dies basiert auf den besser passenden mechanischen Eigenschaften und damit besserer Übertragung der mechanischen Belastung und der damit einhergehenden Induzierung von Osteogenese.<sup>[179]</sup>

Ein anderer Ansatz beschreibt die Beschichtung einer makroporösen Struktur mit PGS. Die Struktur wird über das *sponge-template* Verfahren aufgebaut und anschließend mit einer dünnen PGS-Schicht versehen. Hierbei bietet PGS gegenüber bspw. Gelatine oder Chitosan den Vorteil der hohen Elastizität.<sup>[180-182]</sup> Dies ermöglicht, die spröden Eigenschaften der anorganischen Komponente zu minimieren. Es lässt sich sogar auf den Schritt der Quervernetzung verzichten, sodass aufgrund des Verzichts der harschen Bedingungen Biomoleküle zur Beladung des Scaffolds infrage kommen können.<sup>[183]</sup> Der Ansatz des *sponge-template* Verfahrens soll in dieser Arbeit untersucht werden, indem die makroporöse Struktur eines PU-Schwammes durch ein mit Strontium beladenes, mesoporöses, bioaktives Glas repliziert wird und im Anschluss mit einem kompositären Polyglycerolphosphatsebacat beschichtet wird.

### 2.4.1 Mikrowellensynthese

Im folgenden Abschnitt werden die Charakteristika der Mikrowellensynthese im Allgemeinen und hinsichtlich des verwendeten Polymers PGS beschrieben. Die Geschichte der Mikrowellensynthese beginnt mit einer Anekdote: Der amerikanische Physiker PERCY LE BARON SPENCER beobachtete während seiner Arbeiten mit Mikrowellen zur Anwendung in Radar-Anlagen, dass sein Schokoriegel in der Tasche zu schmelzen begann.<sup>[35]</sup> Dieser Effekt wird als eine dielektrische Aufheizung in Abhängigkeit von dem Vermögen des Materials, mit Mikrowellenstrahlung zu interagieren, beschrieben.<sup>[184]</sup> Mikrowellenstrahlung liegt im elektromagnetischen Spektrum zwischen einer Frequenz von 0.3 – 300 GHz bzw. einer Wellenlänge von 1 mm – 1 m. Die Mikrowellenstrahlung selbst reicht demnach nicht zur Brechung von kovalenten Bindungen aus. Neben dem erfolgreichen Einzug während der 50er Jahre in die Haushalte als Küchengerät, erlebte die Mikrowellensynthese in der Chemie ihr Debut im Jahr 1986. GEDYE et al.<sup>[185]</sup> und GIGUERE et al.<sup>[186]</sup> beschrieben unabhängig voneinander die Anwendung der Mikrowellensynthese in der organischen Chemie. Einige Eigenschaften sind für die Mikrowellensynthese sehr wichtig: Die Permittivität und der Emissionsgrad der Edukte, die Intensität der angelegten Mikrowellenstrahlung, die Probengeometrie und die Reaktionszeit.<sup>[34,187]</sup>

Die Erwärmung des Materials kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Ein Mechanismus beschreibt die Polarisierung von Dipolen in der molekularen Struktur der Edukte oder des Lösungsmittels.<sup>[188]</sup> Hierbei folgt der Dipol dem ständig oszillierenden Feld der Mikrowellenstrahlung, um sich danach auszurichten, woraus Reibung mit der Umgebung entsteht, was auch als Energiedissipation der Strahlungsenergie verstanden werden kann. Dies verdeutlicht, dass die Reaktionsbedingungen entscheidend sind: Oszilliert ein Feld zu schnell, so haben die Dipole nicht genug Zeit zum Folgen, oszilliert es zu langsam, wird nicht genug Wärmeenergie übertragen.<sup>[189]</sup> Im zweiten Mechanismus, der Ionenleitung, folgen gelöste Ionen der Oszillation des Feldes. Durch die gegensätzlichen Ladungen von Anionen und Kationen bewegen diese sich in die entgegengesetzten Richtungen, was eine Vielzahl von Kollisionen zur Folge hat, welche wiederum eine hohe Energiedissipation zur Folge haben. In diesem Mechanismus wird in der Regel mehr Wärme als während der Polarisierung der Dipole erzeugt.<sup>[190,191]</sup>

Ein Grund für die verkürzten Reaktionszeiten liegt in der Frequenz der Mikrowellenstrahlung. Diese liegt für eine Haushaltsmikrowelle bei 2.45 GHz, das bedeutet, dass alle  $2.45 \cdot 10^{-9}$  s ein Wechsel bzw. Energieübertrag erfolgt. Ein Molekül relaxiert diesen Eintrag aber innerhalb von  $10^{-5}$  s, also deutlich langsamer. Hierdurch erfolgt ein schnelles Aufheizen und eine erhöhte Konversion in der Reaktion nach Arrhenius.

Nach  $k = Ae^{-\frac{E_a}{RT}}$  hängt die Reaktionskonstante  $k$  von der Anzahl der Stöße  $A$  mit der richtigen Geometrie und dem Anteil an Molekülen mit der ausreichenden Energie zur Reaktion  $e^{-\frac{E_a}{RT}}$  ab. Die Anwendung von Mikrowellenstrahlung kann weder die Stöße und ihre Geometrie beeinflussen, noch verändert sie die benötigte Aktivierungsenergie, jedoch führt der rapide Energieeintrag und seine Dissipation zu extremen Verhältnissen im Reaktionsgemisch und somit zur schnelleren Konversion.<sup>[192]</sup>

Die erste Mikrowellensynthese von PGS wurde 2013 von AYDIN et al. veröffentlicht. Hierbei wurde in einer Haushaltsmikrowelle der erste Schritt der Polykondensation unter Zuhilfenahme von Mikrowellenstrahlung erfolgreich durchgeführt. Es wurden äquimolare Mengen von Sebacinsäure und Glycerol in eine Petrischale gegeben und dreimal eine Minute bei 650 W Leistung angelegt. Zwischen den Minuten wurde die Tür geöffnet und zehn Sekunden pausiert. Entgegen der Synthese unter konventioneller Heizung musste kein Schutzgas angelegt werden. Die erhaltene Matte wurde anschließend konventionell bei 150 °C für einige Stunden quervernetzt. Das erhaltene Material entsprach den mechanischen Eigenschaften, wie sie aus der konventionellen Synthese bekannt sind.<sup>[193]</sup> LAU et al. beschrieben die Möglichkeit den Veresterungsgrad der ersten Synthesestufe mithilfe von Mikrowellenstrahlung einzustellen. Dieser wurde über das entstandene Wasser in der Veresterung bestimmt. Über eine höhere Polymerisierung des Harzes haben sich auch nach einer konventionellen Quervernetzung die mechanischen Eigenschaften verstärkt; der E-Modul stieg um 50 %. Hiermit geht auch eine verlangsamte Degradation einher, weil eine größere Anzahl an Esterbindungen gespalten werden muss.<sup>[194]</sup> Dieselbe Gruppe berichtete später von einem Biokomposit aus PGS und  $\beta$ -Tricalciumphosphat, welches in einer Mikrowellensynthese hergestellt wurde. Hierbei wurde das Harz vom PGS mit der Präkursorlösung des  $\beta$ -Tricalciumphosphat vermischt und in einer Mikrowelle für bis zu 60 min bis maximal 180 °C behandelt. Das Material wurde hydrophiler, die Degradation verringert und es zeigte gute biologische Eigenschaften.<sup>[195]</sup> In Kombination mit der Salzauslaugung und einem definierten Temperaturanstieg stellten LEE et al. poröse Scaffolds aus PGS her. Hierbei zeigten sich keinerlei Nachteile in mechanischen und biologischen Eigenschaften im Vergleich zum konventionell hergestellten PGS.<sup>[196]</sup>

In der vorliegenden Arbeit soll ebenfalls die Anwendung von Mikrowellensynthese in Bezug auf die Synthese und Quervernetzung von PGS und seinem Copolymer erfolgen.

### 3 Analytische Methoden

#### 3.1 Thermogravimetrie

Thermogravimetrische Messungen wurden von KATHARINA NOLTE mithilfe eines STA Thermoanalysers der Firma NETZSCH durchgeführt. Es wurde in Luftatmosphäre mit einer Heizrate von  $10\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$  auf bis  $1000\text{ °C}$  geheizt und dabei die Masse detektiert. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software Proteus Thermal Analysis der Firma NETZSCH. Es wurden sowohl die PU-Schwämme Ligasano White, die hergestellten Repliken, die beschichteten Scaffolds und die hergestellten Polymere hinsichtlich ihres anorganischen Anteils untersucht.

#### 3.2 Infrarot-Spektroskopie

Zur Bestätigung der erfolgreichen Synthese wurden Messungen der Infrarot-Spektroskopie durchgeführt. Hierfür wurde in ATR-Geometrie (*attenuated total reflection*) mit einer Hintergrundkorrektur gegen Luft im Bereich von  $4000\text{ cm}^{-1}$  bis  $600\text{ cm}^{-1}$  gemessen. Die Untersuchungen wurden an einem Tensor 27 der Firma BRUKER durchgeführt und mit der zugehörigen Software OPUS 5.0 ausgewertet. Es wurden die hergestellten Repliken und Polymere auf ihre charakteristischen Banden untersucht.

##### 3.2.1 Stickstoff-Physisorption

Unter Zuhilfenahme der Stickstoff-Physisorption wurden die hergestellten Silicamaterialien untersucht. Es wurden die spezifische Oberfläche, die Porenweitenverteilung und das Porenvolumen ermittelt. Die Messungen wurden von MANDY JAHNS, ALEXANDER MOHMEYER, SONGÜL NOYUN, NILS KEPPLER und KAREN HINDRICKS an einem Gasadsorptionssystem der Firma QUANTACHROME durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software ASiQwin 2.0. Die Proben wurden zur Vorbereitung für 24 h bei  $150\text{ °C}$  im Vakuum ausgeheizt und anschließend mit Stickstoff als Adsorptiv bei  $77\text{ K}$  gemessen. Die spezifische Oberfläche wurde nach dem BET-Modell im Bereich zwischen  $0.05\text{ }p/p_0$  bis  $0.3\text{ }p/p_0$  bestimmt. Das Porenvolumen wurde im Bereich um  $0.95\text{ }p/p_0$  ermittelt. Zur Charakterisierung der Porenweitenverteilung wurde die nichtlokale Dichtefunktionaltheorie (NLDFT) mit dem Kernel *N2 at 77 K on silica (cylindr. Pore, NLDFT desorption branch)* verwendet.

#### 3.3 Kleinwinkelröntgenstreuung

Die Kleinwinkelröntgenstreuung (*small angle X-ray scattering, SAXS*) wurde zur weiteren Charakterisierung der Mesoporen der Silicamaterialien genutzt. Die Messungen wurden im Rahmen der Masterarbeit von LISA GÜLKER von Dr. ANDREAS SCHAATE und Dr. ARNE SCHIERZ an einem Messinstrument der Firma RIGAKU durchgeführt. Es wurde mit CuK-Strahlung ( $\lambda = 1.5405\text{ Å}$ ) im Bereich von  $0.5^\circ$  bis  $5^\circ$  gemessen.



### 3.4 Titrimetrie

Die Konversion der hergestellten Harze aus der ersten Synthesestufe der Biopolymere sollen titrimetrisch bestimmt werden. Hierzu wird eine definierte Menge des Polymers in Ethanol (Titrand) gelöst und mit wenigen Tropfen einer ethanolischen Lösung von Bromthymolblau versetzt. Dies färbt die Lösung mit einem pH-Wert < 5.8 gelb. Neutrale Lösungen erscheinen grün und pH-Werte >7.6 sind blau. Anschließend wird über eine Bürette (Klasse AS) eine 0.1 M Lösung von KOH in Ethanol (Titrator) hinzugegeben, bis eine grün-bläuliche Färbung eintritt. Der Verbrauch steht im Verhältnis zu den Säuregruppen der nicht reagierten Sebacinsäure. Hierbei werden zwei Einheiten KOH zur Deprotonierung verbraucht. Die Konversion in % ergibt sich nach:

$$K = \left( 1 - \frac{\text{Einheiten nicht reagierter Carboxylgruppen}}{\text{Einheiten aller Carboxylgruppen}} \right) * 100$$

$$K = \left( 1 - \frac{V(\text{KOH}) * c(\text{KOH}) / m(\text{Probe})}{2 / (M(\text{Sa}) + M(\text{Gly}) * n(\text{Gly}) / n(\text{Sa}) + M(\text{CaGly}) * n(\text{CaGly}) / n(\text{Sa}))} \right) * 100$$

Hierbei ist  $V(\text{KOH})$  das Volumen an titrierter, ethanolischer Kaliumhydroxid-Lösung und  $c(\text{KOH})$  die Konzentration dieser Lösung. Die tatsächliche Masse der Probe vom Harz wird durch  $m(\text{Probe})$  beschrieben. Die molaren Massen von Sebacinsäure, Glycerol und Calciumglycerolphosphat werden durch  $M(\text{Sa})$ ,  $M(\text{Gly})$  und  $M(\text{CaGly})$  und ihre korrespondierenden molaren Anteile durch  $n(\text{Sa})$ ,  $n(\text{Gly})$  und  $n(\text{CaGly})$  beschrieben. Die Anteile, die nicht die Sebacinsäure repräsentieren, spiegeln deren Anteil an der entnommenen Probe wider, welcher nicht in der Titration reagiert.

### 3.5 Kernspinresonanzspektroskopie

Zur Charakterisierung der hergestellten Harze aus der ersten Synthesestufe der Biopolymere wurde sowohl  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie,  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie als auch  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Hierzu wurden ca. 30 mg der Probe in 1 mL Aceton- $\text{d}_6$  gelöst. Es wurden ca 600  $\mu\text{L}$  in ein Probenröhrchen überführt. Die Messung wurde an einem Spektrometer Ascend 400 Avance III HD der Firma BRUKER von der Abteilung für Kernresonanzspektroskopie des Instituts für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Spektren erfolgte mit der Software ACD/NMR Processor Academic Edition von ADVANCED CHEMISTRY DEVELOPMENTS und der Software TopSpin von BRUKER.

### 3.6 Mikroskopie

Zur Beurteilung der Morphologie und der Reproduzierbarkeit der makroporösen, schwammartigen Struktur wurden digitalmikroskopische und rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zur Untersuchung der Mesoporen des Silicamaterials wurden transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen erstellt.

### 3.6.1 Digitalmikroskopie

Es wurden digitalmikroskopische Aufnahmen von Dr. NINA EHLERT an einem VHX-600 von KEYENCE angefertigt. Aufgrund der verschiedenen Vergrößerungsbereiche wurden sowohl ein VH-Z20WS (20x – 200x) und ein VH-Z100UR (100x – 500x) verwendet.

### 3.6.2 Rasterelektronenmikroskopie

Zur Untersuchung sowohl der allgemeinen Morphologie als auch der Untersuchung von Ausscheidungen am Scaffold und der Beurteilung der Zelladhäsion auf der Scaffoldoberfläche wurden intensive rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Insbesondere zur Untersuchung der Zelladhäsion wurde mithilfe von Kippen und Drehen der Stage die Innen- und Außenseite der Scaffolds aus dem Zelladhäsionsexperiment miteinander verglichen. Hierzu wurden die Scaffolds nach der Fixierung der Zellen mit einem Skalpell mittig halbiert, um eine Zellmigration in das Innere der Scaffolds zu untersuchen (vgl. Kapitel 3.8.3). Der verwendete Kippwinkel betrug 70°, welcher maximal ohne Kollision möglich war. Es wurde an einem JSM-6610LV der Firma JEOL gemessen. Die Beschleunigungsspannung betrug 5 kV oder 10 kV und der Arbeitsabstand 10 mm bis 37 mm, was je nach Probe angepasst wurde.

### 3.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Zur Beurteilung des mesoporösen Systems des hergestellten Silicamaterials wurde Transmissionselektronenmikroskopie herangezogen. Die zu untersuchende Probe wurde fein gemörsert und in Ethanol dispergiert. Es wurden ca. 10 µL der Dispersion auf ein Kupfernetz von Quantifoil® aufgebracht. Das präparierte Kupfernetz wurde über Nacht auf einem Filterpapier getrocknet und vor Staub geschützt. Die Messungen wurden von Dr. ARNE SCHIERZ am Laboratorium für Nano- und Quantenengineering an der Leibniz Universität Hannover (LNQE) durchgeführt. Es wurde ein Gerät vom Typ Tecnai G2 F20 TMP der Firma FEI verwendet. Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Software Fiji bearbeitet.

## 3.7 Mechanische Charakterisierungen

Zur Evaluation der Einflüsse von Variationen in der Synthese auf die mechanischen Eigenschaften der hergestellten Materialien wurden sowohl uniaxiale Zugprüfungen am quervernetzten Polymer als auch Druckprüfungen an den hergestellten Silica-Repliken und den Scaffolds durchgeführt.

### 3.7.1 Uniaxiale Zugprüfung

Die uniaxialen Zugprüfungen fanden im Rahmen der Bachelorarbeit von DESIREE RIEKS statt. In Teflonformen wurden Probenkörper nach der DIN 53504-S3A hergestellt. Das Harz wurde in die Form eingefüllt und anschließend quervernetzt (vgl. Kapitel 4.1).

Die mechanische Charakterisierung wurde an einer Materialprüfmaschine 5565 A von INSTRON am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Hierbei betrug der Traversenweg  $10 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  und die Vorspannung des Probenkörpers  $0.1 \text{ N}$ . Die Messung wurde beendet, sobald ein Kraftabfall von  $40 \%$  detektiert wurde, was einem Riss des Probenkörpers gleichkam. Zur Auswertung wurde die zugehörige Software Bluehill von INSTRON verwendet.

### 3.7.2 Druckprüfung

Sowohl die hergestellten Schwammrepliken aus bioaktivem Glas als auch die Scaffolds und zylindrischen Probenkörper des quervernetzten Polymers wurden einer uniaxialen Druckprüfung unterzogen. Diese wurden ebenfalls an einer Materialprüfmaschine 5565 A der Firma INSTRON am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Die Probe wurde hierzu zwischen den Druckstempeln platziert und mit einer Vorschubgeschwindigkeit von  $4 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  bis zu einer Maximalkraft von  $500 \text{ N}$  gemessen. Zur Auswertung wurde die zugehörige Software Bluehill von INSTRON verwendet.

## 3.8 Biologische Charakterisierung

Die potentielle Anwendung als Knochenregenerationsmaterial bedingt eine umfangreiche biologische Charakterisierung. Hierzu wurden in einem ersten Schritt die Scaffolds auf ihre Biokompatibilität mithilfe von Zytotoxizitäts-Assays untersucht. Anschließend wurden Experimente zur Zelladhäsion durchgeführt. Parallel dazu wurde ein Freisetzungsexperiment mit den Scaffolds durchgeführt, um das Freisetzungsverhalten der enthaltenen Ionen zu untersuchen und diese hinsichtlich ihrer therapeutisch wirksamen Bereiche einzuordnen. In einem letzten Schritt wurden *in vivo* Experimente mit Mäusen mithilfe eines Rückenhammer-Modells durchgeführt. Hierbei wurde eine mögliche Immunreaktion und die Fähigkeit des Materials, eine Angiogenese zu induzieren, untersucht.

### 3.8.1 Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma wird im Rahmen dieser Arbeit genutzt, um die Konzentrationen der Ionen aus einem Freisetzungsexperiment zu bestimmen. Die Messungen wurden von LISA GÜLKER durchgeführt. Es wurde ein Gerät des Herstellers AMETEK des Typs SPECTRO ARCOS FHS12 verwendet. Um die Stabilität des Plasmas zu gewährleisten wurde vor dessen Zündung  $45 \text{ min}$  mit Argon gespült und erst  $30 \text{ min}$  nach der Zündung mit der Messung begonnen. Zwischen den Messungen von verschiedenen Proben wurde für  $60 \text{ s}$  mit  $2.5 \%$ iger  $\text{HNO}_3$  und Reinstwasser gespült. Das Plasma wurde mit einer Leistung von  $1400 \text{ W}$  erzeugt. Die Durchflussmenge des Kühlgases betrug  $12 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , die des Hilfsgases  $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  und die des Zerstäubergases  $0.79 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Die Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von  $30 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}$  zugeführt. Die Messergebnisse wurden mit der Software Smart Analyzer Vision von AMETEK aufgezeichnet.

### 3.8.2 Zytotoxizität

Die hergestellten Scaffolds wurden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht, wozu ein CellTiter-Blue™ Assay (CTB) von HENNING HARTWIG (AG Stiesch, MHH) durchgeführt wurde. Hierzu wurden dentale Pulpastammzellen (DPSC) der Firma LONZA in  $100 \mu\text{L } \alpha\text{-MEM}$  (*minimum essential medium Eagle-alpha modification*, standardisiertes Nährmedium), welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin und Streptomycin versetzt wurde, ausgesät und bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht bei 5 %  $\text{CO}_2$  kultiviert. Der Zellrasen wurde mit 10 mL PBS gewaschen und anschließend mit 4 mL Accutase über 10 min im Brutschrank abgelöst. Den Zellen wurden 8 mL Zellkulturmedium hinzugegeben und gezählt. Hieraus wurde 25 mL Zellsuspension mit 30.000 Zellen pro Milliliter erstellt und  $100 \mu\text{L}$  pro Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden  $100 \mu\text{L}$  der Überstände der Scaffolds hinzugefügt. Nach weiteren 24 h wurde ein CTB-Assay durchgeführt und das Medium gewechselt. Im Detail wird 30 min vor Beginn des Assays bei den Negativkontrollen das Medium gegen Zellkulturmedium mit 1 % Triton X100 getauscht. In jedes Well werden  $100 \mu\text{L}$  der CTB-Gebrauchslösung ( $18.5 \text{ mL Medium} + 3.7 \text{ mL CTB-Konzentrat}$ ) gegeben und nach 4 h wird Fluoreszenz mit einer Anregung von 540 nm und einer Emission von 595 nm gemessen. Die CTB-Gebrauchslösung wird nach der Messung gegen frisches Medium ausgetauscht. 6 Tage nach der erstmaligen Zugabe der Überstände wird erneut ein CTB-Assay nach obiger Beschreibung durchgeführt.

Zur Gewinnung der Überstände der Scaffolds wurden diese in 1 mL Zellkulturmedium gegeben, welches nach 24 h gewechselt wurde. Nach weiteren 24 h wird aus dem Überstand eine Verdünnung erstellt, welche auf die Zellen gegeben werden kann.

### 3.8.3 Zelladhäsion

Die Zelladhäsion wurde mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie auf den Scaffolds untersucht. Hierfür wurde eine DPSC L01 Passage ausgesät, das Zellkulturmedium wurde verworfen und der Zellrasen mit 10 mL PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 4 mL Accutase im Brutschrank über 10 min abgelöst, woraufhin 8 mL Zellkulturmedium hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden gezählt und durch Zentrifugation ( $160 \text{ g}$ , 5 min) konzentriert. Es wurden 100.000 Zellen in  $100 \mu\text{L}$  Medium auf ein Scaffold gegeben und über 2 h in einer Feuchtkammer besiedelt. Die Scaffolds wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit Filterdeckel in 3 mL Medium transferiert, das Medium wurde nach 72 h gewechselt. Nach 7 Tagen wurden die Zellen auf den Scaffolds fixiert. Hierfür wurde eine Lösung mit 4 % Paraformaldehyd, 0.1 % Glutaraldehyd in 200 mM HEPES-Puffer bei pH 7.35 für 4 h verwendet.

Daraufhin wurde mit einer 200 mM HEPES-Lösung bei pH 7.35 gewaschen. Zur Trocknung wurde folgende steigende Ethanolreihe verwendet: 1x10 min 30 % EtOH; 2x7 min 30 % EtOH; 2x5 min 50 % EtOH; 2x5 min 70 % EtOH; 2x5 min 90 % EtOH; 6x5 min 100 % EtOH; 2x1 min Hexamethyldisilazan. Abschließend wurde über Silicagel luftgetrocknet und die Scaffolds mithilfe eines Skalpells halbiert.

### 3.8.4 Rückenhautkammer und Intravitalmikroskopie im Tiermodell

Die Gruppen PGS@SiCa und PGPS20@SiCa wurden im Tiermodell an der Maus untersucht. Dies wurde in Kooperation mit der Rückenhautkammer der AG KAMPMANN der Medizinischen Hochschule Hannover von SARAH GNIESMER durchgeführt. Der nachfolgende Inhalt ist von GNIESMER et al. detailliert beschrieben.<sup>[197,198]</sup> Mithilfe dieses Modells kann *in vivo* die Angiogenese durch Intravitalmikroskopie an der lebenden Maus beobachtet werden. In Abbildung 11 ist eine Rückenhautkammer gezeigt.



Abbildung 11: Eine Rückenhautkammer zur Untersuchung von Implantaten. Sie besteht aus zwei Teilen mit einem Beobachtungsfenster für die Mikroskopie. (Zur Verfügung gestellt von Dr. ANDREAS KAMPMANN)

Sie besteht aus zwei gleichen Rahmen, in deren Mitte sich das Fenster zur Beobachtung des Implantats befindet, das die Intravitalmikroskopie ermöglicht.

Zur Untersuchung wurden pro Proben­gruppe neun Mäuse BALB/cjZtm mit einer Rücken­haut­kammer versehen und das Implantat eingesetzt (3x3x1 mm). Hierzu wurde die Haut der Mäuse in zwei Schichten zwischen den Rahmen fixiert. Von der einen Schicht bzw. Seite wurde die Haut einschließlich *Cutis*, *Subcutis*, *Musculus Pannicus Carnosus* und der *Musculus Retractor* im Bereich des Sicht­fensters entfernt, wodurch der *Musculus Pannicus Carnosus* der gegenüberliegenden Haut­schicht sichtbar wurde. Das Sicht­fenster wurde mit einem Deck­gläschen verschlossen und den Mäusen drei Tage zum Erholen gegeben, parallel erhielten sie das Antibiotikum Enrofloxacin (5 mg/kg) bis zu Tag sieben nach der OP. Des Weiteren wurde als Schmerzmittel Carprofen (5 mg/kg) für drei Tage ab Operation verabreicht. Am dritten Tag nach der Entfernung der Haut wurde das Implantat mittig in das Sicht­fenster der Rücken­haut­kammer eingesetzt.

Im weiteren Verlauf wurden am selben Tag, am dritten Tag, am sechsten Tag, am zehnten Tag und am 14. Tag intravitalmikroskopische Untersuchungen unternommen. Hierfür wurden die Tiere via Inhalation mit Isofluran (5 %) mit einem EZ-7000 Classic System der Firma PLEXX anästhesiert. Die Anästhesie wurde durch das Ausbleiben des Aufrichtreflexes und das Kneifen in die Zehen überprüft. Zum Schutz vor Auskühlung wurden die Mäuse während der Untersuchung auf eine beheizte Matte gelegt und über eine Atemmaske mit einer Dosis von 2-3 % Isofluran in Betäubung gehalten. Die Experimente wurden nach dem Tierschutzgesetz und dem *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*<sup>[199]</sup> durchgeführt. Die Mäuse wurden täglich hinsichtlich ihres Allgemeinzustandes, des Gewichts, ihres Verhaltens, und der Gesundheit begutachtet. Sie waren im Alter zwischen 12 – 18 Wochen mit einem Gewicht von  $22.5 \pm 1.9$  g, wurden im Einzelkäfig bei 22-24 °C mit einem zwölf Stunden Tag/Nacht-Zyklus bei einer Luftfeuchtigkeit von 60-65 % gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Am Ende des Experiments wurden die Versuchstiere unter starker Betäubung durch Genickbruch getötet.

Im Anschluss wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die Proben in Formalin fixiert und in Technovit 9100 eingebettet. Etwa 5 µm dicke Schnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin und eine van Gieson Färbung mit Hämatoxylin und Pikrofuchsin angefertigt. Weiterhin wurde eine CD31-Färbung vorgenommen, wodurch Endothelzellen und somit Blutgefäße sichtbar gemacht werden können. Im Detail wurde mit einem *rabbit anti-mouse* CD31 Antikörper eingefärbt, als zweites wurde ein Biotin-konjugierter Antikörper verwendet. Nachdem mithilfe von HRP-Streptavidin inkubiert wurde, konnte nach der Zugabe von 3,3'-Diaminobenzidin mit einem Mikroskop die Einfärbung beobachtet werden, wonach eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt wurde. Eine Negativkontrolle durch das Weglassen des ersten Schrittes zeigte keine Blutgefäße an. Die histologischen Untersuchungen wurden mit einem Lichtmikroskop Leica DM4000 B von LEICA MIKROSYSTEME vorgenommen.

#### 3.8.4.1 Intravitalmikroskopie

Für diese Arbeit sollte im Rahmen der Untersuchung im Tiermodell Intravitalmikroskopie an der lebenden Maus durchgeführt werden. Es wurde die Anzahl der adhärenenten Leukozyten, der rollenden Leukozyten und die funktionelle Kapillardichte bestimmt. Hierzu wurden die Mäuse erneut betäubt und fixiert. Anschließend wurde über die Schwanzvene 0.1 mL einer 15 %-igen Fluorescein-Isothiocyanat-gelabeltes Dextran in 0.9 %-iger NaCl-Lösung als Kontrastmittel für das Blutplasma und 0.1 mL einer 0.1 %-igen Rhodamin 6G Lösung in 0.9 %-iger NaCl-Lösung zur Beobachtung der Leukozyten gegeben. Für die Intravitalmikroskopie wurde das Modell Axio Scope.A1 der Firma ZEISS mit einer 120 W Quecksilberlampe und einem Illuminator ausgestattet, welcher grünes und rotes Licht blockieren kann.

Mithilfe einer Kamera vom Typ FK-7512-IQ der Firma PIEPER wurden Bilder und Videos aufgenommen. Zur Analyse der Bilder und Videos wurde die Software CAPIMAGE von ZEINTL verwendet. Hierbei wurden vier Bereiche am Rand zum Implantat betrachtet und Vergrößerungen von 2.5x, 10x und 20x, sodass auf dem Bildschirm eine Vergrößerung von 90x, 370x und 940x erreicht werden konnten. Zur Untersuchung wurde eine Venole im Granulationsgewebe in Implantatnähe über 20 s beobachtet. Als adhärenente Leukozyten galten solche, welche sich während der Beobachtungszeit weder bewegt noch abgelöst haben. Rollende Leukozyten waren Zellen in Bewegung, welche sich mit maximal 20 % der Geschwindigkeit der frei beweglichen Zellen in der Mitte des Gefäßes bewegen. Die funktionelle Kapillardichte wurde sowohl am Rand des Implantats als auch in der Mitte bestimmt.

## 4 Experimentelle Durchführung

Im Folgenden werden alle relevanten Synthesen und ihre Arbeitsschritte oder etwaige Besonderheiten in der Präparation beschrieben. Hierbei wird die Synthese des Biopolymers Polyglycerolsebacat und seiner Derivate erläutert. Anschließend wird das *sponge-template* Verfahren zur Herstellung einer Replik aus einem mit Calcium modifizierten bioaktiven Glas auf Silica-Basis sowie die darauffolgende Einlagerung des Strontiums in dieses bioaktive Glas beschrieben. Abschließend werden das Biopolymer und das modifizierte bioaktive Glas zu einem Kompositmaterial, dem Scaffold, vereint.

### 4.1 Synthese von Polyglycerolsebacat

Die Synthese von Polyglycerolsebacat wurde erstmals von WANG et al.<sup>[144]</sup> beschrieben. Diese wird in leicht abgewandelter Form durchgeführt. In einem 250-mL-Zweihalsrundkolben mit einem Magnetrührstab wurden 10 g (49.44 mmol, 1 eq) Sebacinsäure und 4.56 g (49.44 mmol, 1 eq) Glycerol vorgelegt. Auf den Kolben wurde ein leeres Trockenrohr aufgesetzt, um zu verhindern, dass Staub in die Synthese gelangt. Der Kolben wurde vor Beginn der Reaktion für ca. 10 Minuten mit Inertgas gespült und der Strom auf ein Minimum reduziert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch via Ölbad auf 130 °C geheizt und für 24 h bei 350 rpm rühren gelassen. Es entsteht eine klare, viskose Flüssigkeit, wobei sich ein wenig Blasenbildung am Magnetrührstab beobachten lässt. Weiterhin scheidet sich vermutlich Wasser und Glycerol sowohl an der Kolbenwandung als auch im Trockenrohr ab. Nach Abschluss der Reaktionszeit wurde entweder das noch heiße Reaktionsgemisch in ein Aufbewahrungsgefäß überführt oder mithilfe eines Heißluftföns oder einer Mikrowelle geschmolzen und in ein PE-Schraubdeckelgefäß überführt. Nach dem Abkühlen wurde ein weißer, homogener Feststoff in der Konsistenz zwischen weichem Wachs und Honig erhalten.

#### 4.1.1 Synthese von Polyglycerolphosphatsebacat

Das Polyglycerolsebacat soll dahingehend modifiziert werden, dass eine Phosphatquelle in das Gerüst eingebaut werden soll. Um dies zu erreichen, wurde der Anteil an Glycerol in der Synthese zu 10, 20 und 30 mol% durch Calciumglycerolphosphat ersetzt. Analog zur Synthese des literaturbekannten Polyglycerolsebacats wurde in einem 250-mL-Zweihalsrundkolben 10 g Sebacinsäure vorgelegt. Es wurden entsprechend der Variationen in Tabelle 1 zuerst das Glycerol hinzugefügt. Anschließend wurde für ca. 10 Minuten mit Inertgas gespült. Das Reaktionsgemisch wurde mithilfe eines Ölbad auf 130 °C erhitzt bei 350 rpm. Nun wurde in kleinen Portionen die entsprechende Masse an Calciumglycerolphosphat hinzugegeben, wobei immer gewartet wurde, bis das feine, weiße Pulver komplett in die Syntheselösung eingerührt war, wodurch die zuvor klare, viskose Lösung eine weiße Farbe annahm. Die Bedingungen wurden für 24 h gehalten.



Hier fiel die Blasenbildung anfangs etwas intensiver aus im Vergleich zur Synthese des Polyglycerolsebacats. Das Produkt wurde ebenfalls noch heiß nach der Reaktion in ein Aufbewahrungsgefäß überführt oder mit einem Heißluftfön bzw. der Mikrowelle geborgen. Im Kolben blieb ein wenig Rückstand mit vermutlich nicht gelöstem Calciumglycerolphosphat zurück.

Tabelle 1: Massen von Glycerol (Gly) und Calciumglycerolphosphat (CaGly) und die zugehörigen Äquivalente, wie sie in der Synthese verwendet wurden.

Probenname	$m(\text{Gly}) / \text{g}$	$m(\text{CaGly}) / \text{g}$	$eq(\text{Gly})$	$eq(\text{CaGly})$
PGPS10	4.10	1.04	0.9	0.1
PGPS20	3.64	2.08	0.8	0.2
PGPS30	3.19	3.12	0.7	0.3

#### 4.1.2 Mikrowellensynthese von Polyolsebacaten

Eine Mikrowellensynthese vom Präpolymer des Polyglycerolsebacats wurde erstmals von AYDIN et al.<sup>[36]</sup> im Jahre 2013 vorgestellt. Die Synthese wurde in abgewandelter Form durchgeführt. Hierzu wurde ein Mikrowellengerät MW 5000 der Firma LANDGRAF LABORGERÄTE GMBH mit dem kompatiblen Magnetrührwerk MIXcontrol 20 der Firma 2MAG AG verwendet. Da relativ kleine Mengen in der Mikrowelle zur Synthese erhitzt werden, steht zum Geräteschutz ein 1-L-Becherglas mit entmineralisiertem Wasser in der hinteren linken Ecke, um das Magnetron vor überschüssiger Strahlung zu schützen. Auf das Magnetrührfeld wurde ein enges 250-mL-Becherglas mit Magnetrührstab samt 25 g (0.123 mol, 1 eq) Sebacinsäure und 11.4 g (0.123 mol, 1 eq) Glycerol platziert. Vor Beginn des eigentlichen Syntheseprogramms wurden die Edukte für 60 s bei 1000 W geschmolzen, wobei mit 350 rpm durchmischt wird. Sobald alles geschmolzen war, wurde das Reaktionsgemisch 21-mal zu je 1 min bei 700 W erhitzt. Zwischen den Schritten wurden 10 s Pause eingelegt. In der ersten Hälfte der Synthese war eine intensive Blasenbildung zu beobachten. Die Mikrowellensynthese wurde ebenfalls verwendet, um Polyglycerolphosphatsebacat zu synthetisieren. Hierzu wurde analog zu Kapitel 4.1.1 ein Teil des Glycerols durch den entsprechenden molaren Anteil an Calciumglycerolphosphat ersetzt. Die verwendeten Massen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Nachdem die Sebacinsäure vollständig im Glycerol geschmolzen war, wurde portionsweise das Calciumglycerolphosphat hinzugegeben, bis es vollständig eingemischt war.

Tabelle 2: Massen von Glycerol (Gly) und Calciumglycerolphosphat (CaGly) und die zugehörigen Äquivalente, wie sie in der Mikrowellensynthese verwendet wurden.

Probenname	$m(\text{Gly}) / \text{g}$	$m(\text{CaGly}) / \text{g}$	$eq(\text{Gly})$	$eq(\text{CaGly})$
PGPS10 $\mu$	10.25	2.60	0.9	0.1
PGPS20 $\mu$	9.10	5.20	0.8	0.2
PGPS30 $\mu$	7.98	7.78	0.7	0.3

Nach abgeschlossener Reaktion wurde die klare bzw weiße Flüssigkeit etwas abkühlen gelassen und in ein PE-Schraubdeckelgefäß überführt.

## 4.2 Herstellung von Repliken auf Silicabasis

Die Replik einer Schwammstruktur wurde über das *sponge-template* Verfahren hergestellt. In Anlehnung an SHIH et al.<sup>[200]</sup> wurde ein bioaktives Glas auf Basis von Calcium und Silica ausgewählt. Als Schwammstruktur diente ein PU-Schwamm LIGASANO WHITE von LIGAMED, welcher normalerweise als Wundauflagenschwamm Anwendung findet. Der Schwamm wurde zur Herstellung der Replik mit einem Skalpell in ca. 1 cm<sup>3</sup> große Würfel zurechtgeschnitten. Zur Herstellung der Präkursorenlösung wurden in einem 300-mL-Erlenmeyerkolben aus Polyethylen 80 mL Ethanol und 1 mL Salzsäure (0.5 M) vorgelegt. Unter Rühren (500 rpm) wurden 3.5 g Pluronic<sup>®</sup> F-127 und 1.32 g Calciumnitrat-tetrahydrat gelöst. Anschließend wurden 14.28 mL Tetraethylorthosilicat via Kolbenhubpipette hinzugefügt. Die Lösung wurde ca. 24 h bei Raumtemperatur gerührt, damit sich ein Sol bilden kann. Die Lösung wurde in ein PE-Becherglas überführt und die Schwämme zu je 40 Stück in zwei Plastischalen bereitgestellt. Die Schwämme wurden in die Präkursorenlösung gegeben und ausgepresst, sodass sie sich vollständig vollsaugen konnten. Anschließend wurde eine Teilmenge der Schwämme mit einem PE-Löffel herausgeholt und auf diesem Löffel mit den Fingern ausgepresst. Die überschüssige Lösung lief in das Becherglas zurück. Die ausgepressten Schwämme wurden auf Labortücher vom Hersteller KIMTECH vom Typ Science (fusselrei) abgelegt. In einem letzten Schritt wurde mit einer Kernolive ein Stickstoffstrom auf 4 bar eingestellt, welche per Klammer im Abzug befestigt war. Jeder Schwamm wurde für ca. 1 s auf die Öffnung gepresst, damit überschüssige Lösung entfernt wurde. Die behandelten Schwämme wurden abschließend für 30 min bei 80 °C im Umluftofen getrocknet und wurden im Folgenden als imprägnierte Schwämme bezeichnet. Dieser Beschichtungszyklus wurde insgesamt sechsmal durchgeführt, wobei die Farbe der imprägnierten Schwämme immer weiter von weiß ins bräunliche übergingen. Eine Versteifung des Materials und eine Gewichtszunahme waren ebenfalls feststellbar.

Die imprägnierten Schwämme wurden in Keramikschaalen zu je 40 Stück pro Schale überführt und einem Calcinationsprogramm unterzogen. Weil hierbei der gesamte PU-Schwamm durch Oxidation entfernt wurde, musste eine ausreichende Luftzufuhr gewährleistet sein. Es wurde für 6 h bei 600 °C calciniert, wobei eine Aufheizrate von 10 °C·min<sup>-1</sup> gewählt wurde. Nach dem Abkühlen wurden weiße Repliken erhalten, welche ca. 80 % der vorherigen Größe aufwiesen. Sie waren deutlich leichter und mussten mit Vorsicht gehandhabt werden.

#### 4.2.1 Beladung mit Strontium

Die hergestellten Repliken wurden mit Strontiumchlorid beladen, um es zu einem späteren Zeitpunkt freizusetzen. Als Anhaltspunkt, welche Zielkonzentration etwa erreicht werden soll, wurde SCHUMACHER et al.<sup>[201]</sup> herangezogen, welche eine maximale Konzentration um 1 mM Strontiumionen zur Stimulierung einer Proliferation von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten proklamieren. In dem beschriebenen Freisetzungsexperiment (vgl. Kapitel 4.4) sollen eine Replik mit 400 µL einer hergestellten Strontiumchlorid-Lösung (62.5 mM) vollständig vollgesaugt werden, woraufhin die Replik im Ofen bei 80 °C für einige Stunden getrocknet wird.

#### 4.3 Herstellung eines Kompositmaterials

Das synthetisierte Polymer und die hergestellten Repliken sollten zu einem Kompositmaterial kombiniert werden. Das Präpolymer wurde hierzu in Ethanol unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbads gelöst, sodass eine 25 Gew.-%-ige Lösung entstand. Kurz vor der Verwendung wurde die Lösung mit einem Vortex-Mixer homogenisiert. Die Replik wurde auf mehrere Labortücher des Herstellers KIMTECH vom Typ Science (fusselfrei) gelegt und mit 250 µL per Kolbenhubpipette möglichst langsam und gleichmäßig beträufelt, sodass sich die Lösung gleichmäßig über die Replik verteilte. Mithilfe eines Stickstoffstroms, welcher auf 2 bar eingestellt war, wurde die überschüssige Beschichtungslösung entfernt, um ein Verschließen der Poren zu verhindern. Die Repliken wurden hierbei von oben für ca. 3 s mit dem Stickstoffstrom behandelt und daraufhin mit einem Spatel auf das Blech des Vakuumofens transferiert. Zu beachten war, dass die untenliegende Seite auf dem Blech nicht diejenige war, die zuvor auf dem Labortuch unten gewesen war, um das Verschließen der Poren durch das Herabsinken der Lösung in der Replik zu verhindern. Die Repliken wurden für 24 h im Vakuumofen bei 130 °C und ca. 0.1 mbar behandelt. Im Anschluss waren die erhaltenen Scaffolds deutlich widerstandsfähiger gegen mechanische Belastung. Dieser Beschichtungsvorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Grundsätzlich lassen sich aber sowohl der Anteil am Polymer in der Beschichtungslösung bis zum gewissen Grad, als auch die Beschichtungszyklen frei wählen. Als Abschluss werden die Scaffolds autoklaviert, wozu sie 20 min bei 121 °C mit anschließender Trocknung im Vakuum für 10 min behandelt wurden.

## 4.4 Freisetzungsexperiment

Das beschriebene Freisetzungsexperiment wurde im Rahmen der Masterarbeit von LISA GÜLKER durchgeführt. Hierbei wurden fünf probengleiche Scaffolds in ein 5-mL-Mikroreaktionsgefäß gegeben, welche danach ausgewählt wurden, dass sie optisch möglichst würfelförmig und keine großen Abweichungen vom durchschnittlichen Gewicht der Probenreihe zeigten. Eine Anforderung an das Freisetzungsmedium war, dass es weder Calcium- noch Phosphat-Ionen beinhaltet, weil jene im Freisetzungsexperiment determiniert werden sollten. Somit wurde das *saline ionic essentials medium* bei einem pH-Wert von sieben gewählt (SIEM-n). Das Freisetzungsmedium wurde frisch angesetzt; hierzu wurden 5.552 g Natriumchlorid, 0.373 g Kaliumchlorid, 0.143 g Magnesiumchlorid, 2.268 g Natriumhydrogencarbonat und 0.071 g Natriumsulfat in einem Liter Reinstwasser gelöst. Es wurden je 5 mL Medium zu den fünf Scaffolds gegeben. Anschließend wurden etwaige Luftblasen in und zwischen den Scaffolds durch saches Schütteln und mithilfe des Ultraschallbads entfernt.

Die Probengefäße befanden sich über den Zeitraum des Freisetzungsexperiments in einem Umluftofen bei 37 °C. In den ersten 14 Tagen wurde in der Woche alle 24 h der Überstand abgenommen und gegen frisches Medium ausgetauscht. Danach wurde ca. ein bis zweimal in der Woche ausgetauscht. Hierzu wurden bis zu 3.5 mL des Mediums mit einer Kanüle, welche an den Scaffolds zum Gefäßboden vorbeigeführt wurden, abgezogen. Die Scaffolds selbst sind noch mit Medium vollgesogen, weswegen im Anschluss für 10 s geschüttelt wurde, um etwaiges Medium aus den Scaffolds zu gewinnen. Die entnommene Menge wurde mit der Analysenwaage bestimmt und mit einer Kolbenhubpipette ersetzt, wobei hier das Gewicht maßgebend war. Die Proben lagerten im Umluftofen bei 37 °C.

### 4.4.1 Bestimmung der Ionen via Atomemissionsspektrometrie

Die freigesetzten Ionen der entnommenen Überstände wurden mithilfe der optischen Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) bestimmt. Alle zur Messung verwendeten Gefäße und Verbrauchsmaterialien wurden vor der Verwendung mit 2.5 %-iger hochreiner Salpetersäure und Reinstwasser gespült. Zu den zu bestimmenden Ionen Silicium, Calcium, Phosphor und Strontium wurden entsprechende Kalibrationslösungen gekauft, welche für den Messbereich weiter verdünnt wurden. Silicium benötigte den geringsten Konzentrationsbereich mit 0.03 ppm, 0.1 ppm, 0.3 ppm, 0.5 ppm, 0.7 ppm, 0.9 ppm und 1.1 ppm. Der Gehalt von Calcium, Phosphor und Strontium war ca. um ein zehnfaches höher, sodass die Kalibrationslösungen zu 0.3 ppm, 1 ppm, 3 ppm, 5 ppm, 7 ppm, 9 ppm und 11 ppm gewählt wurden. Die Proben, sowie die Kalibrationen wurden mit dem verwendeten Medium SIEM-n 1:100 verdünnt. Da alle Elemente unabhängig voneinander gemessen wurden, wurde mit einem Multistandard über alle Elemente kalibriert.

Die Kalibrationsreihe wurde nach 20 Probenmessungen erneut bestimmt, um eine Schwankung durch das Gerät über einen Messtag auszuschließen. Über die Kalibration wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die jeweiligen Ionen gemäß DIN 32645:2008-11 bestimmt.

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse aus der Entwicklung des Knochenregenerationsmaterials diskutiert. Dies teilt sich in zwei Abschnitte auf: Im ersten Teil wird das Biopolymer und im zweiten Teil die Repliken bzw. die Scaffolds charakterisiert.

### 5.1 Polymer

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Synthese der Harze (1. Synthesestufe) bzw. des Polymers (2. Synthesestufe) diskutiert. Hierbei werden die Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen der Standard-Synthese und der Mikrowellen-Synthese beleuchtet, wobei die Konversionen nach Beendigung der Reaktion, die Konversion über die Zeit und der Einfluss der Temperatur untersucht werden. Hierbei werden die Struktur und Zusammensetzung und die mechanischen Eigenschaften des Polymers aufgeklärt. In Abbildung 12 ist eine Probe vom Harz bei Raumtemperatur gezeigt.



Abbildung 12: Harz einer Polymerprobe bei Raumtemperatur.

Diese Probe zeigt ein eher wachsartiges, teilweise auch klebriges Verhalten. Werden die Harze erwärmt, so schmelzen die PGS-Varianten und werden eine klare, je nach Temperatur niedrig viskose Flüssigkeit. Dies ermöglicht eine Verarbeitung in jeder erdenklichen Gussform. Die PGPS-Varianten bleiben durch den Calciumglycerol-Anteil weiß. In Abbildung 13 ist eine Matte von PGS gezeigt, welche in einer Teflonform hergestellt wurde.

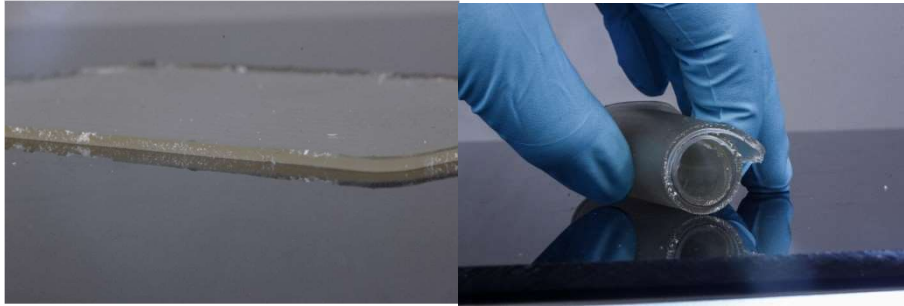


Abbildung 13: Eine Matte von PGS (8x15x3 mm), die in einer Teflonform quervernetzt wurde. Die Elastizität zeigt sich durch das einfache Aufrollen.

Dies zeigt die Elastizität des Materials, was eine Vielzahl an Formen und Größen in der Anwendung des Polymers erlaubt.

### 5.1.1 Konversion

Die Synthese der Harze mithilfe von konventionellem Heizen ist in Abschnitt 4.1.1 erläutert. Für eine optimale Synthese mithilfe der Mikrowelle wurde besonders der Einfluss der Leistung über die Zeit und damit verbunden der Temperaturverlauf untersucht. Das in Abschnitt 4.1.2 beschriebene Verfahren wurde auf Grundlage der folgenden Resultate erarbeitet. Untersucht wurden die Einstellungen von 1000 W, 700 W und 500 W, sowie deren Auswirkungen auf die Temperatur des Reaktionsgemischs. Hierzu wurde das Reaktionsgemisch zuerst bei 1000 W aufgeschmolzen und anschließend ein Leistungsprofil mit 30x 1 min Leistung bei 20 s Pause ausgeführt. In Abbildung 14 sind die Konversionen der ersten Synthesestufe von PGS<sub>μ</sub> gegen die Zeit bei 1000 W (schwarz), 1000 W ohne Rühren (rot), 700 W (blau) und 500 W (grün) aufgetragen.

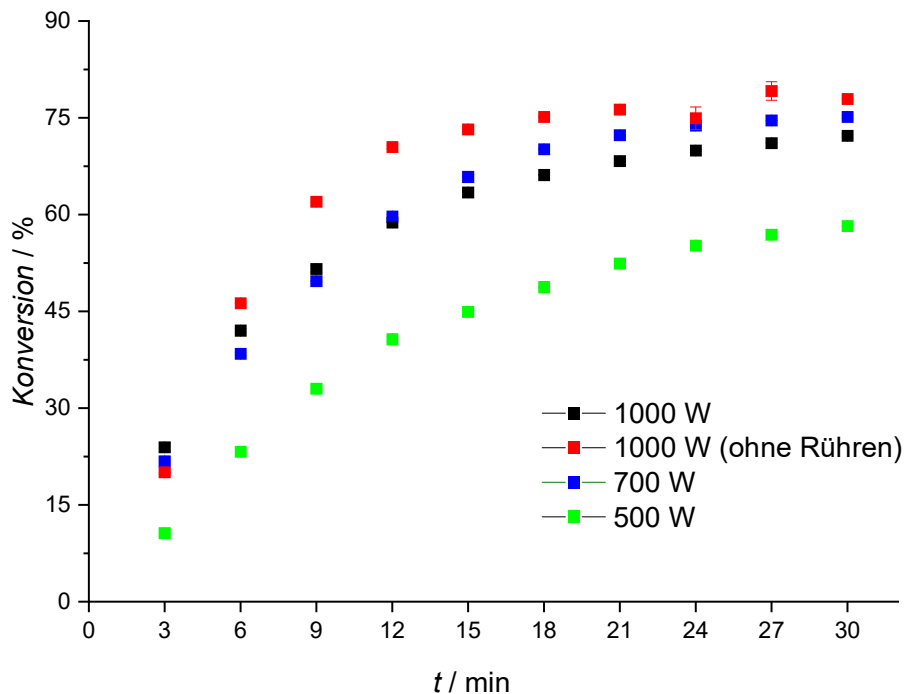


Abbildung 14: Die Konversion der ersten Synthesestufe von PGS<sub>μ</sub> aufgetragen gegen die Zeit bei 1000 W (schwarz), 1000 W ohne Rühren (rot), 700 W (blau) und 500 W (grün).

Es ist zu erkennen, dass sich für die gerührten Varianten ein sehr gleichförmiger Kurvenverlauf ergibt. Im Vergleich hierzu steigt die nicht gerührte Variante steiler an und flacht mit einigen unregelmäßigen und höheren Abweichungen ab, was für eine höhere Inhomogenität spricht. Diese entsteht vermutlich durch eine ungleichmäßige Wärmeverteilung und damit einhergehende unterschiedliche Konversion innerhalb der Probe. Die Konversionen liegen mit 77 % bei 1000 W ohne Rühren am höchsten, gefolgt von 75 % bei 700 W, 72 % bei 1000 W und 58 % bei 500 W.



Interessanterweise führt ein höherer Energieeintrag in das System um den Faktor 1.4 (1000 W vs. 700 W) nicht zu einer merklich höheren Konversion, sodass offensichtlich eine Grenze der umsetzbaren Energie erreicht wird. Ein deutlicher Sprung ist allerdings im Vergleich von 500 W vs. 700 W zu erkennen. Hier führt der o. g. Faktor zu einem signifikanten, gleichförmigen Anstieg der Konversion, was für eine homogene Synthese spricht.

Die Temperatur wurde jede Minute mit einem IR Thermometer auf der Oberfläche des Synthesegemischs bestimmt. In Abbildung 15 ist der Verlauf der Temperatur über die Zeit gezeigt. Hierbei sind die Temperaturen der Synthesen bei 1000 W (schwarz), 1000 W ohne Rühren (rot), 700 W (blau) und 500 W (grün) dargestellt.

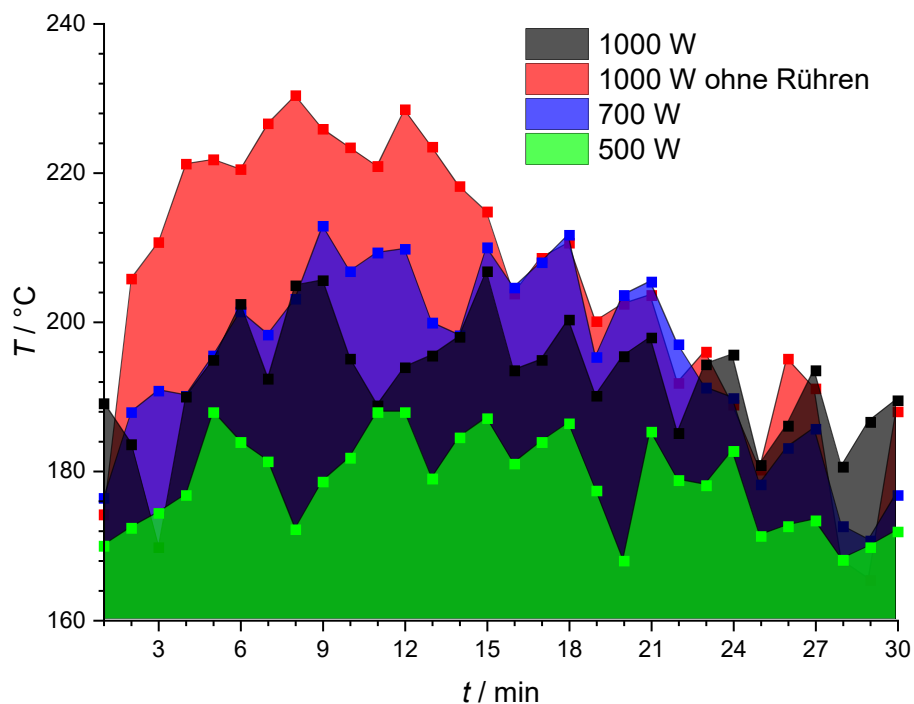


Abbildung 15: Verlauf der Temperatur über die Zeit. Gezeigt sind die Temperaturen der Synthesen bei 1000 W (schwarz), 1000 W ohne Rühren (rot), 700 W (blau) und 500 W (grün).

Auffällig ist der sägezahnartige Verlauf bei allen Synthesen. Die lokalen Minima und Maxima der verschiedenen Proben folgen demselben Muster, sodass diese Schwankungen auf eine evtl. etwas längere Pause während der Probenentnahme alle drei Minuten zurückzuführen sind. Besonders für die Variante bei 1000 W ohne Rühren zeigt sich eine starke Schwankung in der Temperatur. Über die erste Hälfte der Synthese liegt die Temperatur zwischen 220 – 230 °C und fällt in der zweiten Hälfte graduell ab. Zwischen den Synthesen bei 700 W und bei 1000 W gibt es den Unterschied, dass zwischen 9 – 21 min etwas höhere Temperaturen von bis zu +30 °C vorliegen, wohingegen die Synthese bei 1000 W im letzten Drittel durchweg höhere Temperaturen von bis zu +30 °C zeigt.

Bei 500 W bleiben die Temperaturen gänzlich unter 200 °C und zeigen einen recht gleichmäßigen Verlauf. Die Fläche  $A$  unter den Kurven ist proportional zu der Gesamtmenge an Dissipationsenergie. Diese sind in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchung vom Einfluss der Leistung auf die Konversion und dem Temperaturverlauf mit dem Quotienten aus der Fläche und der durchschnittlichen Temperatur.

Probe	Konversion / %	$A$ / a.u.	$T_0$ / °C	$A \cdot T_0^{-1}$ / °C <sup>-1</sup>
1000 W	72	5585	192 ± 8	29.08
1000 W ohne Rühren	77	5978	205 ± 18	29.16
700 W	75	5687	195 ± 12	29.17
500 W	58	5183	178 ± 7	29.12

Hier bestätigt sich der marginale Unterschied zwischen 1000 W und 700 W mit einem Unterschied von  $\Delta A = 98$ , sodass eine höhere Zuführung von Energie nicht sinnvoll erscheint. Von einer Synthese ohne Rühren sollte aufgrund der schlechteren Kontrollierbarkeit der Synthesebedingungen Abstand genommen werden. Weiterhin ist die erzwungene Konvektion für die Synthese der PGPS-Varianten erforderlich, um das pulverförmige Edukt möglichst homogen zu verteilen. 500 W als Leistung zu wählen erscheint auch nicht optimal, da sich in der gleichen Zeit bei höherer Leistung eine signifikant höhere Konversion erzielen lässt. An dem Quotienten aus der Fläche und der durchschnittlichen Temperatur von ca. 29.1 °C<sup>-1</sup> lässt sich erkennen, dass die Fläche unter der Kurve durchaus als eingetragene thermische Energie verstanden werden kann. Da sich in der konventionellen Synthese eine Konversion um 70 – 75 % mit 130 °C bei 24 h erzielen lässt und während der Mikrowellensynthese bereits eine Quervernetzung des Harzes auftreten kann, wird die Dauer des Programms auf 21x1 min mit 10 s Pause bei 700 W festgelegt. Hierdurch werden zwar geringere Konversionen erzielt, aber so ist eine gute Verarbeitbarkeit und Handhabung gewährleistet und ein partielles Quervernetzen vermieden. In Abbildung 16 sind die ermittelten Konversionen der Polymere nach der ersten Synthesestufe gezeigt.

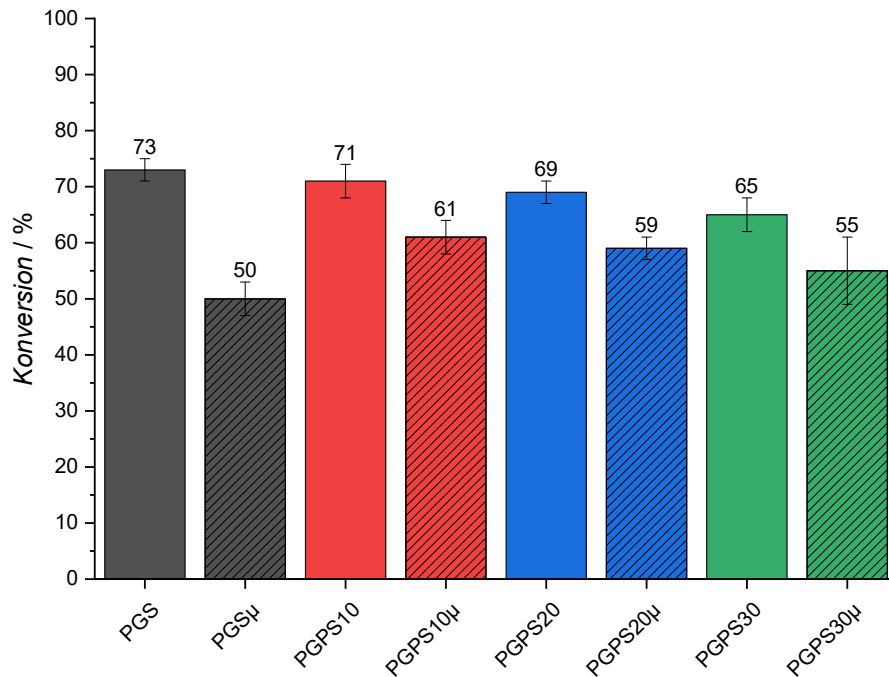


Abbildung 16: Durch Titrimetrie ermittelte Konversion der Harze nach der ersten Synthesestufe von PGS (grau), PGPS10 (rot), PGPS20 (blau), PGPS30 (grün) und in schraffiert der jeweiligen Pendants aus der Mikrowellensynthese.

Die konventionell synthetisierten Harze liegen zwischen 73 – 65 % Konversion. Grundsätzlich ist die Konversion für das PGS im Rahmen der Literatur einzuordnen.<sup>[202]</sup> Die Konversion sinkt mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat, dem könnte zugrunde liegen, dass dessen Zugabe als nur teilweise löslichem Feststoff erfolgt, sodass dieses für die Synthesereaktion nicht vollständig zur Verfügung steht, während im Falle der geschmolzenen Sebacinsäure mit dem Glycerol eine echte Lösung vorliegt. Da kein klassisches Lösemittel verwendet wird, muss sich das Calciumglycerolphosphat immer wieder in kleinen Portionen lösen, hierdurch sind Diffusionswege länger bzw. eine eintretende Reaktion unwahrscheinlicher. Für die Mikrowellensynthese zeigt sich ein gemischtes Bild. Hier liegen die Konversionen für die PGPS $\mu$ -Reihe im Schnitt um 10% geringer als die der konventionell hergestellten PGPS, jedoch signifikant höher als die des PGS $\mu$ . Eine mögliche Erklärung liegt im ionischen Charakter des Calciumglycerolphosphats. Dem Synthesegemisch wird kein Wasser hinzugefügt, kann aber über das Glycerol, welches auch Anwendung als Feuchthaltemittel Verwendung findet<sup>[203]</sup>, eingetragen werden oder *in situ* als Nebenprodukt der Kondensationsreaktion entstehen. Hierdurch können sich geringe Mengen an Ionen im Wasser lösen, welche stark der Ausrichtung des elektromagnetischen Wechselfelds folgen und somit die Temperatur lokal erhöhen können, wie in Kapitel 2.4.1 erläutert. Dies konnte auch TANAKA et al. im Vergleich von der Mikrowellenerwärmung von Eis, Wasser und Salzwasser zeigen.<sup>[204]</sup>

Laut der RGT-Regel führt bereits eine Temperaturerhöhung um 10 K zu einer Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit um den Faktor zwei bis vier. Bei der Mikrowellensynthese liegt der Unterschied der Konversion zwischen PGS $\mu$  und PGPS10 $\mu$  ca. 13 % höher als der Sprung zwischen PGS und PGPS10. Unter Einbeziehung der RGT-Regel reicht also eine vergleichsweise geringe Temperatursteigerung aus, um die Reaktionsgeschwindigkeit derartig zu erhöhen.

In Abbildung 17 ist die Konversion einer ersten Synthesestufe von PGS (schwarz) und PGS $\mu$  (rot) im zeitlichen Verlauf gezeigt. In Abbildung 18 ist eine detailliertere Darstellung der Konversion von PGS $\mu$  in der Mikrowellensynthese gezeigt. Dem PGS wurde innerhalb der ersten vier Stunden alle 30 min zwei Proben entnommen, anschließend nur noch jede Stunde. Die Konversion liegt bei ca. 70 %. Beim PGS $\mu$  wurde alle drei Minuten über 30 min zwei Proben entnommen.

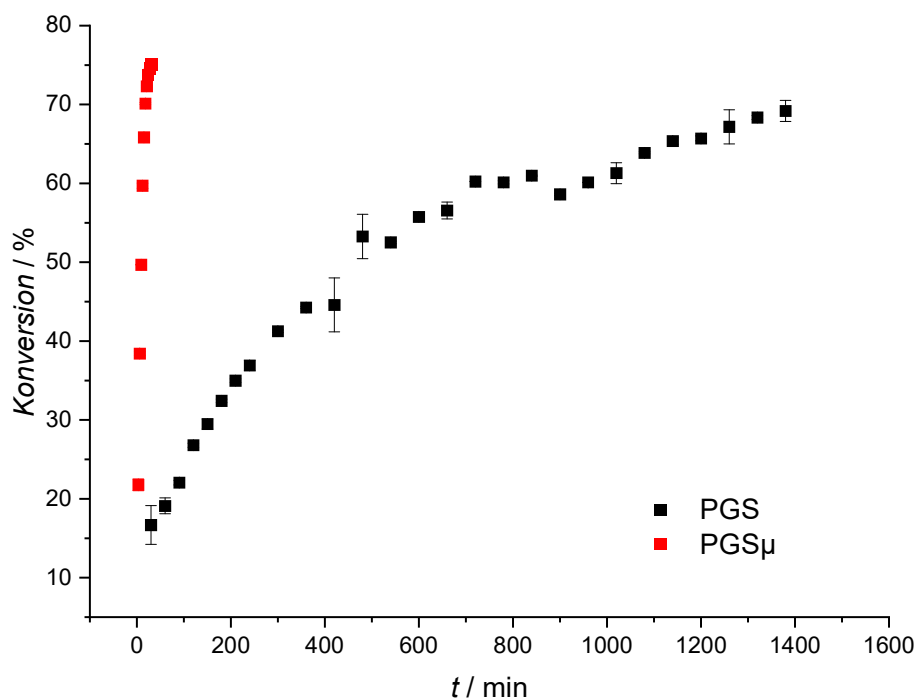


Abbildung 17: Konversion von PGS über insgesamt 24 h. In den ersten 4 h wurden alle 30 min Proben entnommen, anschließend jede Stunde.

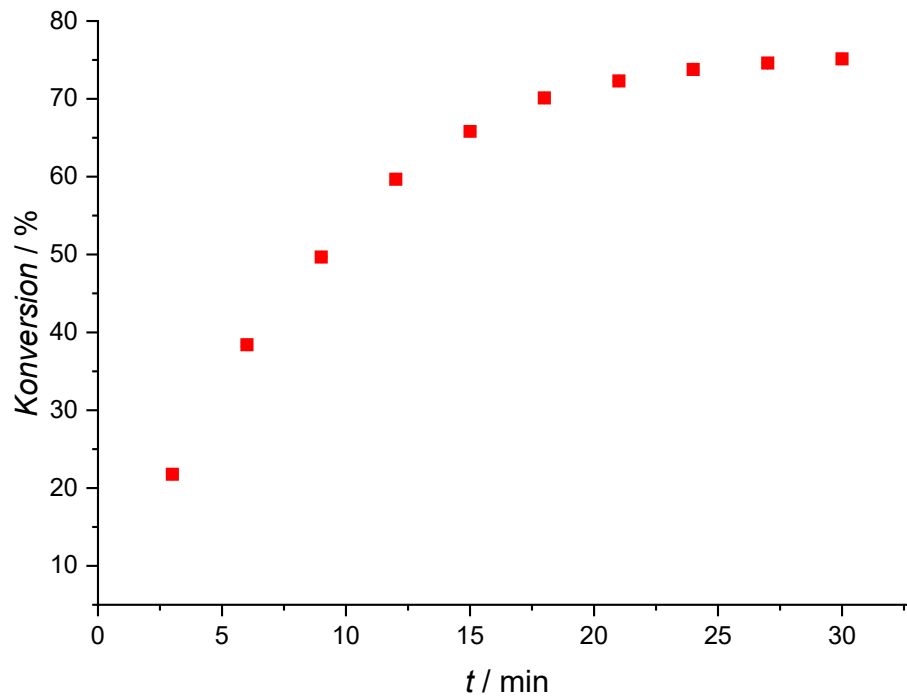


Abbildung 18: Detaillierte Darstellung der Konversion der Mikrowellensynthese von PGS $\mu$  aus Abbildung 17.

Auffällig für das PGS ist der Verlauf nach einem beschränkten Wachstum. Anfangs verläuft die Reaktion sehr intensiv und fängt ab ca. 600 min an träger zu verlaufen, bis sich gegen Ende eine Sättigung andeutet. Dies steht im Einklang mit der Blasenbildung innerhalb der Reaktion, die anfangs recht heftig verläuft und immer weiter abnimmt. Sie lässt sich als eine Reaktion von zweiter Ordnung klassifizieren. Um die Reaktion weiter voranzutreiben ist eine Erhöhung der Reaktionszeit kein sinnvoller Parameter, sodass im zweiten Syntheseschritt zur Quervernetzung des Polymers ein Vakuum angelegt wird. Analog zum PGS folgt die Konversion von PGS $\mu$  auch einem beschränkten Wachstum. Es wird deutlich, wie groß die Ersparnis hinsichtlich Zeit und Ressourcen durch die mikrowellengestützte Synthese ausfällt. Innerhalb von 30 min lässt sich eine Konversion erzielen, die sonst 24 h dauerhaftes Heizen und Schutzgasstrom benötigt. In Tabelle 4 sind die Syntheszeiten und die Abschätzung der Reaktionsdauer in Abhängigkeit von der Temperatur mithilfe der RGT-Regel aufgeführt.

Tabelle 4: Syntheszeiten und die Abschätzung der Reaktionsdauer in Abhängigkeit von der Temperatur mithilfe der RGT-Regel bei einer angenommenen Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit pro 10 K Temperaturerhöhung.

$t / \text{min}$	$T / ^\circ\text{C}$
1440	130
720	140
360	150
180	160
90	170
45	180
22.5	190
11.25	200

Werden hierzu die durchschnittlichen Temperaturen der Mikrowellensynthesen aus Tabelle 3 betrachtet, so fällt auf, dass die erhöhte Reaktionsgeschwindigkeit im Einklang zu der Temperatur steht. Bspw. läge  $T_{700\text{ W}} = 195 \pm 12 \text{ }^\circ\text{C}$  bei einer rechnerischen Dauer zwischen 5 – 50 min. Dies ist für eine Abschätzung ein sehr gutes Ergebnis, weil über die Dauer der Reaktionsführung nicht immer die gleiche Temperatur anliegen kann, da mit Leistungspulsen in der Mikrowelle gearbeitet wird. Das Spektrum von 12  $^\circ\text{C}$  spiegelt diesen Fakt sehr gut wider; weiterhin folgt die RGT-Regel einem exponentiellen Zusammenhang, sodass kleine Änderungen der Variablen eine große Wirkung haben. Es kann also gesagt werden, dass ein Großteil der erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit durch die Mikrowellensynthese auf die erhöhte Temperatur zurückzuführen ist. Gleichzeitig ist sie gegenüber dem thermischen Heizen deutlich effizienter.

## 5.1.2 IR-Spektroskopie

### 5.1.2.1 PGS vs. PGPS

In Abbildung 19 ist das IR-Spektrum von den ersten Synthesestufen von PGS (schwarz) und PGPS20 (blau) als Stellvertreter für die Phosphatvarianten gezeigt. Es wurde in ATR-Geometrie gemessen.

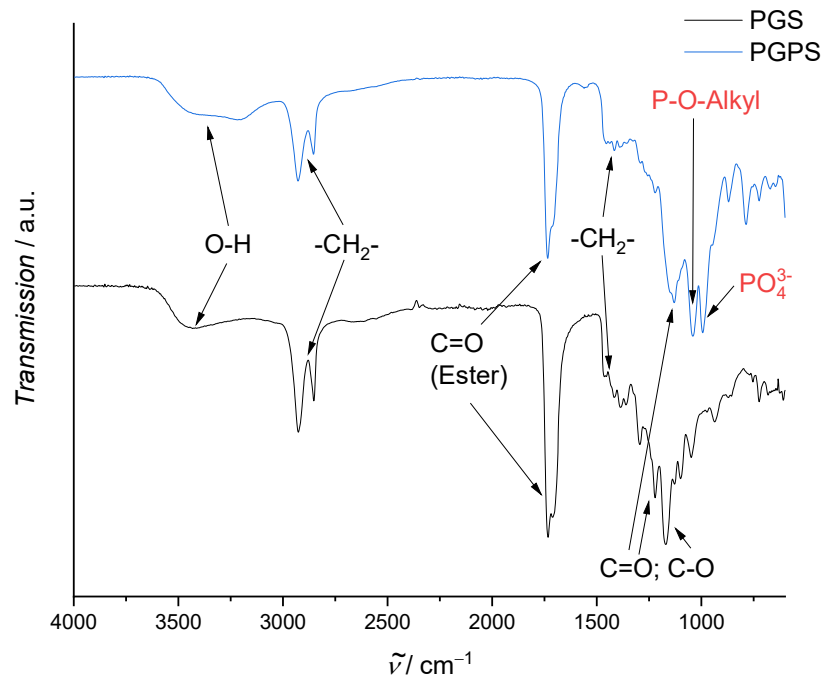


Abbildung 19: IR-Spektrum von den Harzen von PGS (schwarz) und PGPS20 (blau) in ATR-Geometrie.

In Übereinstimmung mit der Literatur lassen sich die charakteristischen Banden der Gruppen im Polymer wiederfinden. Die aliphatische Kohlenwasserstoffkette der Sebacinsäure-Einheit als auch im Glycerol wird in Form der C-H-Valenzschwingung bei  $2885\text{ cm}^{-1}$  und der Deformationsschwingung bei  $1475\text{ cm}^{-1}$  identifiziert. Durch die Kondensationsreaktion entstandene Ester lassen sich dem Signal bei  $1730\text{ cm}^{-1}$  zuordnen. Zwischen  $1330\text{ cm}^{-1}$  bis  $1050\text{ cm}^{-1}$  finden sich Deformationsschwingungen wieder, welche charakteristisch für Carbonylgruppen sind. Diese können sowohl durch das synthetisierte Harz, also der Estergruppe, als auch von der Carbonsäure von nicht reagiertem Monomer oder endständigen Gruppen im Polymer verursacht werden. Das breite Signal um  $3460\text{ cm}^{-1}$  kann die Alkohole repräsentieren, weil es charakteristisch für diese Gruppe in Wasserstoffbrückenbindung ist. Wird das PGS (schwarz) mit dem PGPS20 (rot) verglichen, so ist auffällig, dass der Fingerprint-Bereich Unterschiede aufweist. Die Bande bei  $1000\text{ cm}^{-1}$  lässt sich der Schwingung von anorganischem Phosphat zuordnen. Vermutlich handelt es sich um Calciumphosphat, welches im Polymer ausgeschieden vorliegt. Das Signal bei  $1040\text{ cm}^{-1}$  zeigt eine P-O Schwingung an, wie sie für organisch gebundene Phosphate charakteristisch ist.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Funktionalisieren des Polymers mit einer Phosphatgruppe durch den kovalenten Einbau von Calciumglycerolphosphat in das Polymergerüst erfolgreich war. Zeitgleich liegt unter anderem aufgrund der nicht vollständigen Konversion auch Calciumglycerolphosphat als Monomer vor, was das Signal ebenfalls verursachen kann. Hinzu kommt das Signal von der anorganisch vorliegenden Phosphatgruppe, was ein Hinweis darauf ist, dass sich bereits Phosphat aus dem Polymer oder Monomer abgespalten hat und in Form von Calciumphosphat vorliegt. Dies sollte aber generell kein Hindernis darstellen, weil auch diese Spezies in Lösung geht mit der Zeit und so den Körper in der Knochenregeneration unterstützen kann. Die erwähnten Banden sind in Tabelle 5 zusammenfassend aufgeführt.

Tabelle 5: Vergleich der experimentellen Banden von PGS (Harz) mit Literaturwerten und zusätzliche Banden von PGPS20 (Harz) in rot.

$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$	$\tilde{\nu}_{\text{Lit}} / \text{cm}^{-1}$	Bandenzuordnung
3460	3460 <sup>[205]</sup>	OH in H-Brücke <sup>[205]</sup>
2885	2960-2850 <sup>[206]</sup>	-CH <sub>2</sub> -, (C-H)-Valenzschwingung <sup>[206]</sup>
1730	1731 <sup>[205]</sup>	C=O-Valenzschwingung <sup>[205]</sup>
1475	1470-1430 <sup>[206]</sup>	-CH <sub>2</sub> -, (C-H)-Deformationsschwingung <sup>[206]</sup>
1330-1050	1330-1050 <sup>[206]</sup>	O=C-O-C, Deformationsschwingung <sup>[206]</sup>
1040	1050-1030 <sup>[206]</sup>	P-O-Alky <sup>[206]</sup>
1000	1100-1000 <sup>[206]</sup>	Phosphate <sup>[206]</sup>



### 5.1.2.2 PGS vs. PGS $\mu$

Im folgenden Abschnitt wird nun der Einfluss von der Mikrowellensynthese auf die chemische Struktur beschrieben. In Abbildung 20 sind die IR-Spektren von PGS, PGS $\mu$  und reiner Sebacinsäure im für diese Betrachtung relevanten Messbereich gezeigt.

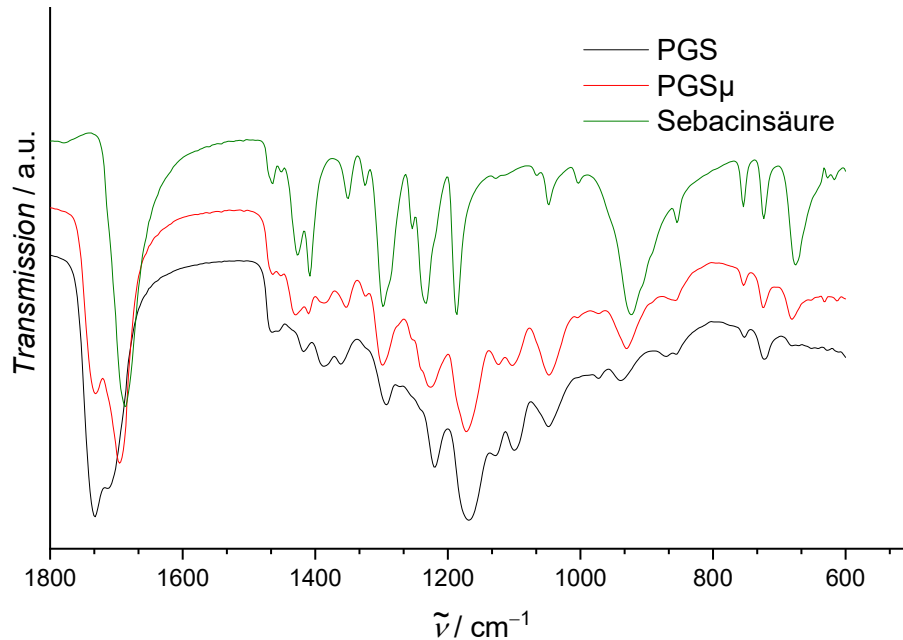


Abbildung 20: IR-Spektrum von PGS (schwarz), PGS $\mu$  (rot) und Sebacinsäure (grün) im relevanten Messbereich.

Es lassen sich alle charakteristischen Banden analog zu Tabelle 5 finden, jedoch spiegelt das IR-Spektrum von PGS $\mu$  die geringere Konversion wider. Hier liegt ein Unterschied von ca. 23 % vor, sodass der Anteil an Sebacinsäure im Gemisch signifikant höher liegt. Dies ist bspw. um 1090 cm<sup>-1</sup> erkennbar, wo PGS $\mu$  und reine Sebacinsäure eine starke Bande im Vergleich zu PGS aufweisen. Gleiches gilt für die Bande bei 1405 cm<sup>-1</sup> und 1430 cm<sup>-1</sup>. Das IR-Spektrum von PGS $\mu$  weist die zu erwartenden Banden auf, zeigt jedoch den höheren Anteil an Sebacinsäure im Harz.

### 5.1.3 Thermogravimetrie und XRD

Im folgenden Abschnitt wird das thermogravimetrische Verhalten von den Harzen von PGS und PGPS10 diskutiert. Da sich die thermogravimetrischen Aufnahmen von den Harzen von PGPS20 und PGPS30 nur durch den erhöhten Calciumphosphatanteil in der Restmasse unterscheiden, sind diese im Anhang unter Abbildung 91 und Abbildung 92 zu finden. Es soll über die Restmassen in den thermogravimetrischen Aufnahmen der PGPS-Varianten ein Vergleich zwischen den theoretischen Gew% von Calciumglycerolphosphat aus der Synthese und aus den TG-Messungen erfolgen. In Abbildung 21 ist die TG-Aufnahme von PGS gezeigt.

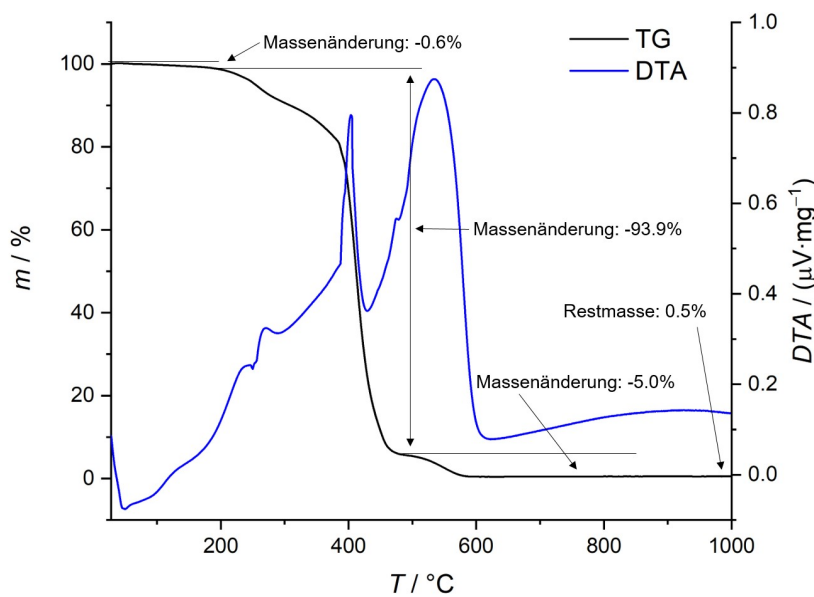


Abbildung 21: Thermogravimetrische Messung des Harzes von PGS.

Es lassen sich drei Stufen unterscheiden. In der ersten Stufe beträgt der Massenverlust bis ca. 200 °C lediglich 0.6 % und lässt sich auf adsorbiertes Wasser zurückführen. Weiterhin ist eine Veresterungsreaktion möglich, sodass hier gebildetes Wasser die Probe verlässt. In der nächsten Stufe lässt sich ein Massenverlust von 93.9 % bis ca. 500 °C ausmachen. Hier kann nicht reagiertes Glycerol zusätzlich zur Oxidation der organischen Bestandteile verdampfen. In der letzten Stufe mit einem Massenverlust von 5 % werden die restlichen organischen Anteile vollständig oxidiert, weil die Restmasse mit 0.5 % innerhalb der Fehlertoleranz der TG von  $\pm 1$  % liegt.

Zum Verständnis der Thermogravimetrischen Aufnahmen der PGPS-Varianten der Harze muss ein Röntgenpulver-Diffraktogramm hinzugezogen werden. Durch das Einbringen eines anorganischen Anteils in Form von Phosphat ist ein Rückstand in den TG-Messungen zu erwarten, der als weißes Pulver auftritt.

Hiervon wurde ein Röntgenpulver-Diffraktogramm angefertigt, welches in Abbildung 22 samt der zugeordneten Literaturwerte zu den Reflexen dargestellt ist.

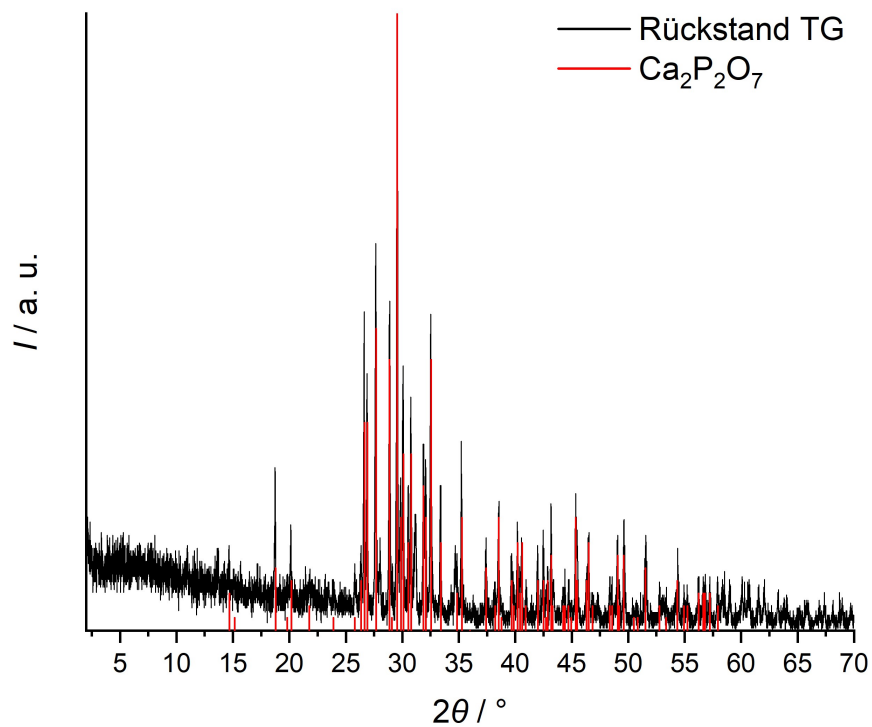


Abbildung 22: Röntgenpulver-Diffraktogramm des Rückstands aus der TG-Messung (schwarz) und Reflexe aus Literaturdaten (WinXPow; C9-346) von Calciumpyrophosphat (rot).

Es lässt sich eindeutig feststellen, dass sich das Calciumphosphat, welches über das Calciumglycerolphosphat in das Polymer gelangt, in der thermogravimetrischen Messung durch die hohen Temperaturen in Calciumpyrophosphat ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , wasserfrei) umwandelt. Für die weitere Betrachtung ist von Bedeutung, dass zwei Äquivalente Calciumglycerolphosphat zur Bildung von einem Äquivalent Calciumpyrophosphat benötigt werden.

In Abbildung 23 ist die TG-Aufnahme vom Harz von PGPS10 dargestellt.

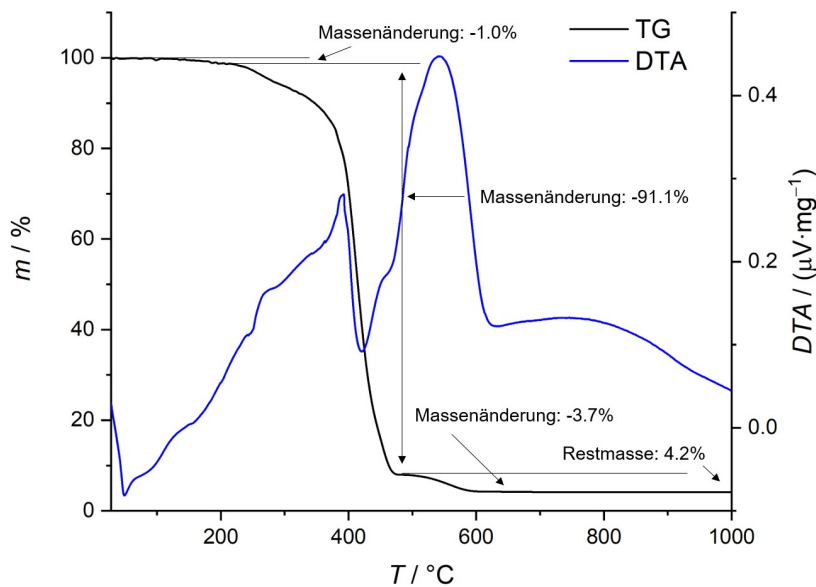


Abbildung 23: Thermogravimetrische Messung des Harzes von PGPS10.

Hier ähnelt das thermische Verhalten dem vom Harz des PGS. In der ersten Stufe beträgt die Massenänderung 1 % bis ca. 200 °C, was erneut einer weiteren Veresterungsreaktion und der Desorption von Wasser zugeordnet werden kann. In der nächsten Stufe von 91,1 % bis ca. 500 °C kann neben der Oxidation der Organik Glycerol verdampfen, woraufhin mit der letzten Massenänderung von 3,7 % die restliche Organik verbrennt. Es bleibt eine Restmasse von 4,2 % in Form des oben diskutierten weißen Pulvers zurück, welches als Calciumpyrophosphat identifiziert wurde. Beispielhaft werden nun die Gew% aus den Daten der TG-Messung berechnet; die absolute Restmasse kann aus dem Produkt von prozentualer Restmasse und Einwaage berechnet werden:

$$m_{\text{Restmasse}} = 0,042 \cdot 0,1122 \text{ g} = 0,0047 \text{ g.}$$

Anschließend kann die Stoffmenge des nach der TG vorliegenden Calciumpyrophosphats mithilfe der molaren Masse bestimmt werden:

$$n_{\text{Calciumpyrophosphat}} = \frac{m_{\text{Restmasse}}}{M_{\text{Calciumpyrophosphat}}} = \frac{0,0047 \text{ g}}{254,53 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 1,85 \cdot 10^{-5} \text{ mol.}$$

Aufgrund der oben erläuterten stöchiometrischen Beziehung gilt:

$$n_{\text{Calciumglycerolphosphat}} = 2 \cdot n_{\text{Calciumpyrophosphat}} = 3,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol.}$$

Somit folgt:

$$\begin{aligned} m_{\text{Calciumglycerolphosphat}} &= n_{\text{Calciumglycerolphosphat}} \cdot M_{\text{Calciumglycerolphosphat}} \\ &= 3.7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot 210.14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 7.78 \cdot 10^{-3} \text{ g}. \end{aligned}$$

Dies ergibt einen Massenanteil von:

$$\omega_{\text{Calciumglycerolphosphat,TG}} = \frac{7.78 \cdot 10^{-3} \text{ g}}{0.1122 \text{ g}} \cdot 100 = 6.93 \text{ Gew\%}.$$

Der Massenanteil aus den eingesetzten Mengen in der Synthese beträgt:

$$\begin{aligned} \omega_{\text{Calciumglycerolphosphat,Synthese}} &= \frac{m_{\text{Calciumglycerolphosphat}}}{\sum m_{\text{Edukte}}} \cdot 100 \\ &= \frac{1.04 \text{ g}}{10 \text{ g} + 4.1 \text{ g} + 1.04 \text{ g}} \cdot 100 = 6.87 \text{ Gew\%}. \end{aligned}$$

Es lässt sich also sagen, dass der theoretische Massenanteil aus der Synthese nahezu mit dem experimentell ermittelten Massenanteil aus der Thermogravimetrie übereinstimmt. Die Ergebnisse für PGPS10, 20 und 30 sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Berechnungen der Massenanteile von PGPS10, PGPS20 und PGPS30 aus den thermogravimetrischen Daten und aus den in der Synthese eingesetzten Mengen.

Probe	$m(\text{EW}) / \text{mg}$	$m(\text{RM}) / \text{mg}$	$\omega(\text{TG}) / \text{Gew\%}$	$\omega(\text{Synthese}) / \text{Gew\%}$
PGPS10	112.20	4.70	6.93	6.87
PGPS20	47.10	4.05	14.19	13.23
PGPS30	45.4	4.63	16.84	19.13

Für PGPS20 ergibt sich eine Abweichung von unter einem Prozent, was auch hier bedeutet, dass der in der Synthese eingesetzte Anteil an Calciumglycerolphosphat in das Harz eingebracht werden konnte. Die Abweichung für PGPS30 fällt mit knapp über zwei Prozent etwas größer aus. Ein Anteil von den ersetzten 30 mol% in der Synthese scheint sich an der Grenze zu einem homogenen Gemisch im Harz zu befinden. Die Abweichung lässt sich am ehesten damit erklären, dass das Harz nach der Synthese keine ideal homogene Verteilung der Komponenten aufweist, eventuelle anorganische Ausscheidungen können inhomogen vorliegen, wodurch eine Schwankung in der Probe verursacht wird. Somit lässt sich sehr genau ein gewünschter Anteil an Calciumglycerolphosphat als Funktionalisierung in das Polymer inkorporieren.

### 5.1.4 Kernspinresonanzspektroskopie

Im Folgenden werden die Ergebnisse der kernspinresonanzspektroskopischen Untersuchungen diskutiert. Es wurden von PGS, PGPS10/20/30, PGS $\mu$  und PGPS10/20/30 $\mu$   $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aufgenommen. Weiterhin wurde eine Probe von PGPS10 über mehrere Wochen dialysiert und ein  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum aufgezeichnet. Die Dialyse diente der Entfernung nicht reagierter Edukte damit nur die Polymerketten zurückbleiben, sodass die Anwesenheit von kovalent gebundenem Phosphor im Polymer unter den gestellten Annahmen nachgewiesen werden konnte. Da sich die Kernresonanzspektren aufgrund unterschiedlicher Probenmenge und Konversionen in den Intensitäten der Signale unterscheiden und leicht andere chemische Verschiebungen aufweisen, aber in ihrer Grundaussage ansonsten identisch sind, werden im Folgenden die Spektren von PGS beispielhaft diskutiert. Die weiteren Spektren finden sich im Anhang in Abbildung 93 bis Abbildung 99 wieder. Dies bedeutet, dass es zwischen Synthesen aus der Mikrowelle im Vergleich zum konventionellen Heizen keine grundlegenden strukturellen Unterschiede gibt. In Abbildung 24 ist das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von PGS gezeigt.

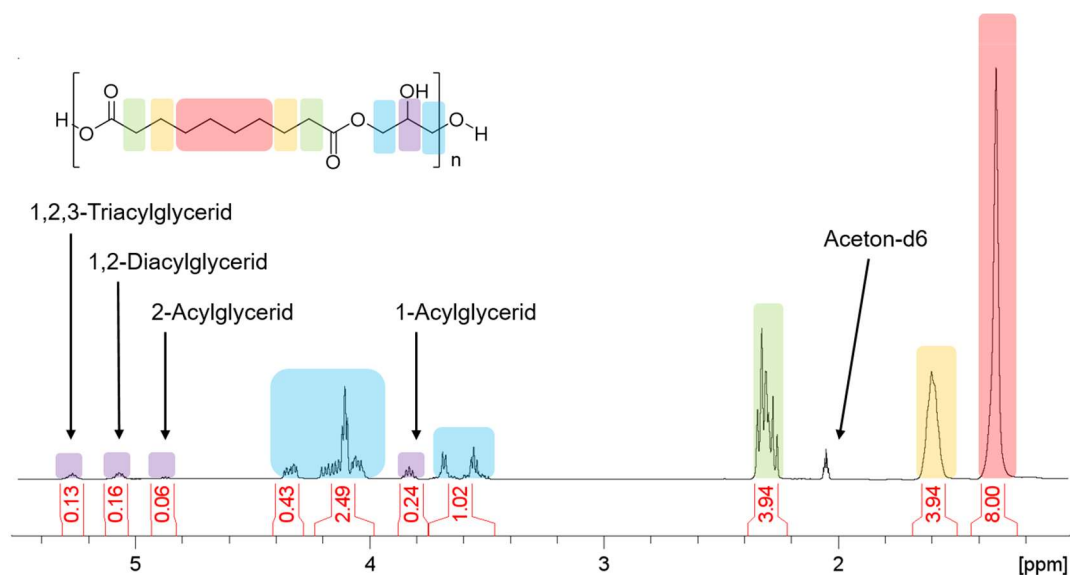


Abbildung 24:  $^1\text{H}$ -NMR vom Harz von PGS in Aceton- $d_6$ . 1.34 ppm (s, CH $_2$ ), 1.62 ppm (s, CH $_2$ ), 2.24–2.39 ppm (m, CH $_2$ ), 3.49–3.62 ppm (m, CH $_2$ ), 3.81–3.88 ppm (m, CH: 1-Acyglycerid), 4.01–4.24 ppm (m, CH $_2$ ), 4.85–4.92 ppm (m, CH: 2-Acyglycerid), 5.05–5.12 ppm (m, CH: 1,2-Diacylglycerid), 5.26–5.32 ppm (m, CH: 1,2,3-Triacylglycerid).

Im Einklang mit Kapitel 5.1.1 steht die Detektion von nicht-reagierter Sebacinsäure bei 2.8 ppm und nicht reagiertem Glycerol bei ca. 3.7 ppm. Im Bereich um 1.33 ppm, 1.60 ppm und 2.3 ppm finden sich die Signale der aliphatischen Kohlenwasserstoffkette aus der Sebacinsäure wieder. In höheren Verschiebungen lassen sich die Signale zu den verschiedenen Spezies der Glyceroleinheit nach der Reaktion zuordnen. Diese sind in Abbildung 25 dargestellt.

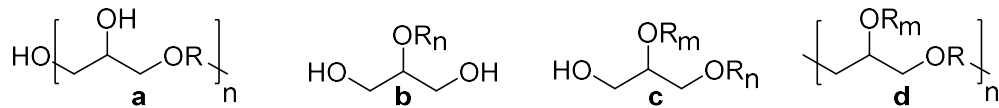


Abbildung 25: Mögliche Baueinheiten des Glycerols im Harz nach der Reaktion; 1-Acylglycerid (a), 2-Acylglycerid (b), 1,2-Diacylglycerid (c) und 1,2,3-Triacylglycerid (d).

Werden die Integrale der zugehörigen Signale im NMR-Spektrum normiert, so lassen sich die Verhältnisse der Baugruppen zueinander bestimmen. An dem Anteil vom 1,2,3-Triacylglycerid lässt sich direkt der Quervernetzungsgrad ablesen. Dieser kann großen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften besitzen. Hierbei zeigt sich auch ein signifikanter Unterschied von 22 % im PGS zu 40 % im PGPS20. Die Verhältnisse der verschiedenen Glycerid-Baueinheiten aus allen NMR-Spektren sind in Abbildung 26 zusammengefasst.

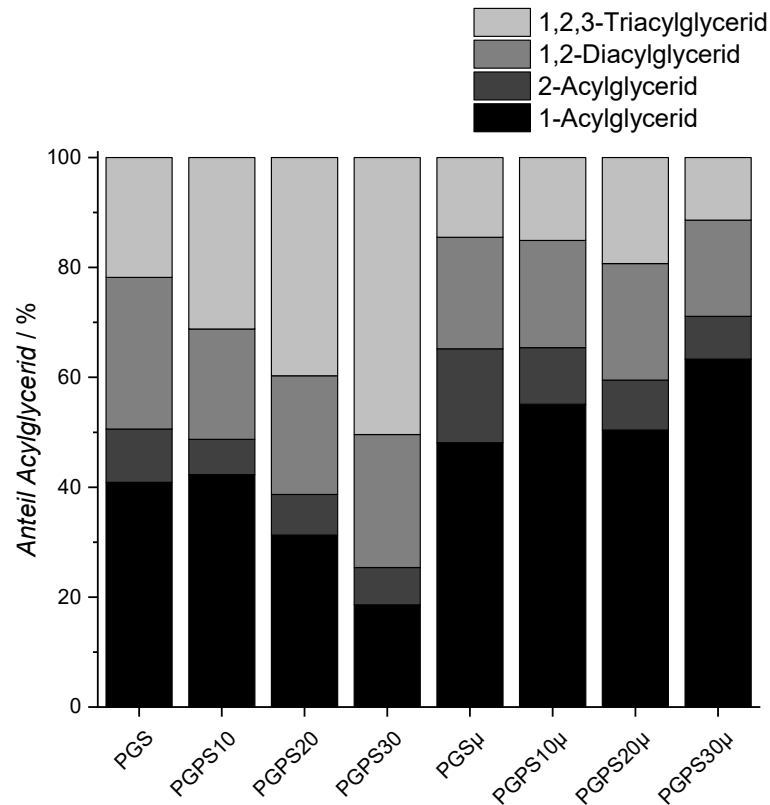


Abbildung 26: Ermittelte Verhältnisse der verschiedenen Acylglycerid-Derivate der Proben PGS, PGPS10/20/30, PGS $\mu$  und PGPS10/20/30 $\mu$ .

Es ist möglich, dass die Inkorporation von Calciumglycerolphosphat in das Netzwerk mit einer vermehrten Quervernetzung einhergeht. Ein Faktor hierfür kann sein, dass die Phosphatgruppe eine gute Abgangsgruppe ist. Hierdurch kann sich ein stabilisiertes Carbenium-Ion bilden, welches im Anschluss nucleophil angegriffen wird. Der vorgeschlagene Mechanismus ist in Abbildung 27 gezeigt.

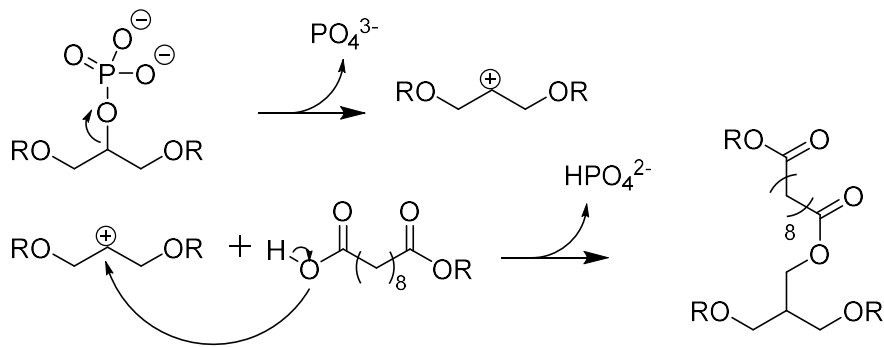


Abbildung 27: Möglicher Mechanismus zur Polymerisation unter dem Zusatz von Calciumglycerolphosphat.

Für die konventionelle Synthese steigt mit dem Anteil an Calciumglycerolphosphat auch der Anteil der 1,2,3-Triacylglyceride auf bis zu 50.4 %. Der umgekehrte Trend zeigt sich für die 1-Acyglyceride. Die beiden anderen möglichen Baugruppen lassen keinen Trend erkennen und variieren um ca.  $\pm 3 \%$ . Die Ergebnisse für die Synthesen mithilfe der Mikrowelle zeigen kaum klare Trends. Die größte Varianz zeigen die 1-Acyglyceride zwischen 48.1 % bis 63.3 %. Der Anteil an 2-Acyglycerid sinkt mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat. Die Anteile von 1,2-Diacylglycerid variieren in einem engen Bereich um  $\pm 2 \%$  und die von 1,2,3-Triacylglycerid um  $\pm 4 \%$ . Die verschiedenen Synthesewege weisen sehr unterschiedliche Bedingungen auf, sodass der oben vorgeschlagene Mechanismus für die Mikrowellensynthese nur bedingt gilt. Zum einen liegen in der Mikrowellensynthese deutlich höhere Temperaturen im Reaktionsgemisch vor, wodurch vermutlich auch unwahrscheinlichere Reaktionen begünstigt sind. Der Anteil an 2-Acyglycerid der mikrowellensynthetisierten Polymere ist bspw. kontinuierlich höher als der der konventionellen. Zum anderen ist die Syntheszeit deutlich kürzer. Dieser Faktor kann für den oben beschriebenen Mechanismus entscheidend sein, weil das Calciumglycerolphosphat eventuell in kleinen Portionen immer wieder in Lösung geht und dann entsprechend abreagieren kann. Weil diese Zeit nicht zur Verfügung steht, kann der Anteil an 1,2,3-Triacylglyceriden deutlich geringer sein. Es ist also möglich, dass die Mikrowellensynthese gegenüber der konventionellen Synthese ein eher zufallsbasiertes Produkt hinsichtlich der Acyglyceride generiert. Ein hoher Anteil an 1-Acyglyceriden kann auch ein Hinweis auf durchschnittlich kürzere Polymerketten sein.



In Abbildung 28 ist das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d<sub>6</sub> gezeigt.

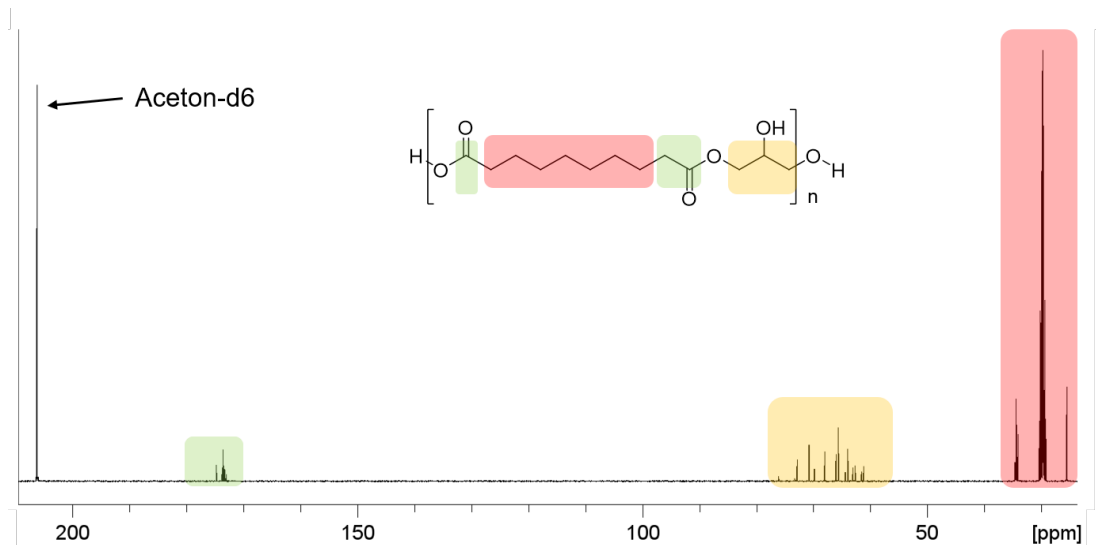


Abbildung 28:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d<sub>6</sub>. In kleineren Verschiebungen zeigen sich die Signale des Gerüsts der Sebacinsäure (rot), bei mittleren Verschiebungen die der verschiedenen Glycerid-Einheiten (gelb) und bei hohen chemischen Verschiebungen die der Carboxyl- bzw. Estergruppen (grün).

Bei kleinen chemischen Verschiebungen zeigen sich die Signale des Gerüsts der Sebacinsäure (rot), bei mittleren Verschiebungen die der verschiedenen Glycerid-Einheiten (gelb) und bei hohen chemischen Verschiebungen die der Carboxyl- bzw. Estergruppen (grün). Diese Bereiche werden im Folgenden genauer betrachtet. Abbildung 29 zeigt die Detailansicht des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d<sub>6</sub> im Bereich von 25 bis 35 ppm.

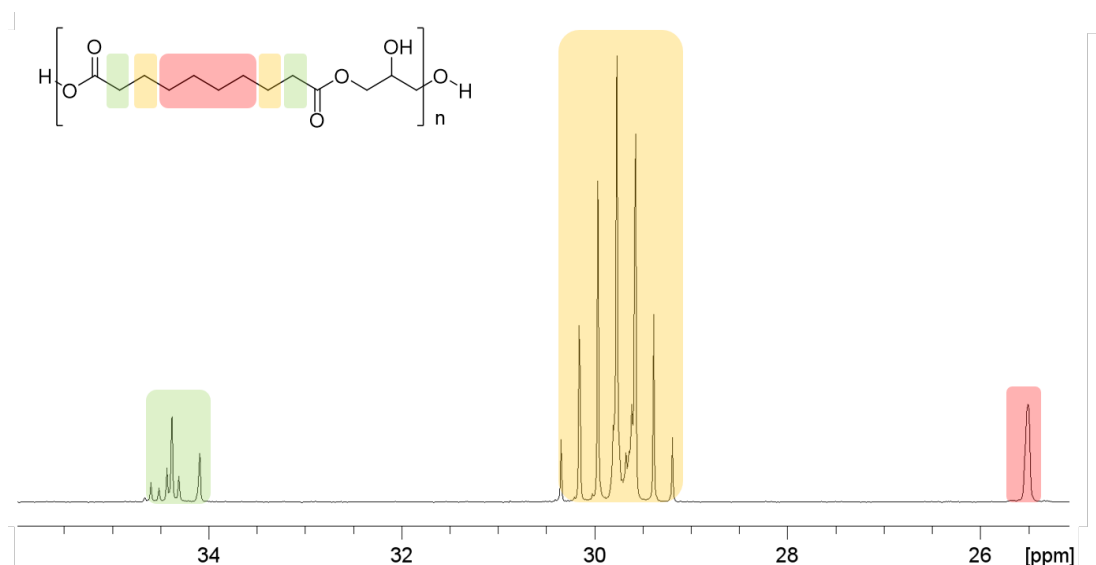


Abbildung 29: Detailansicht des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d<sub>6</sub> im Bereich von 25 bis 35 ppm. Es sind die verschiedenen Einheiten des Gerüsts der Sebacinsäure erkennbar. 25.51 ppm, 29.19 ppm, 29.61 ppm, 29.64 ppm, 29.67 ppm, 29.8 ppm, 30.02 ppm, 30.21 ppm, 30.35 ppm, 34.09 ppm, 34.31 ppm, 34.38 ppm, 34.43 ppm, 34.52 ppm, 34.60 ppm, 34.66 ppm (alle CH<sub>2</sub>).

Es ist erkennbar, dass die kleineren Verschiebungen von 25.51 ppm die innenliegenden Methyl-Kohlenstoffe der Kette zeigen. Darauf folgen die Signale der benachbarten Kohlenstoffe im Bereich von 29.19 bis 30.35 ppm. Die größte Verschiebung zeigen die Kohlenstoffe neben den Carbonyl-Funktionen von 34.09 bis 34.66 ppm. Nachfolgend ist in Abbildung 30 das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d6 im Bereich von 65 bis 80 ppm gezeigt.

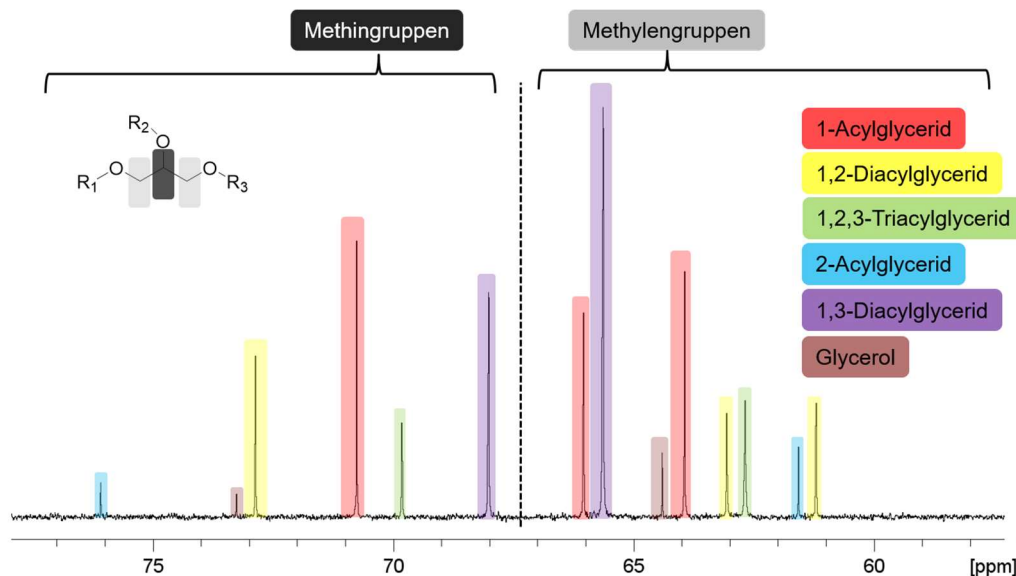


Abbildung 30: Detailansicht des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d6 im Bereich von 65 bis 80 ppm. Es sind die verschiedenen Einheiten des Gerüsts der Glyceride erkennbar. Bei den kleineren Verschiebungen zeigen sich die Signale der Methylen-Kohlenstoffe der entsprechenden Glycerideinheit und bei höheren die des Methin-Kohlenstoffs. 61.20 ppm, 61.56 ppm, 62.67 ppm, 63.05 ppm, 63.93 ppm, 64.39 ppm, 65.63 ppm, 66.03 ppm, 68.01 ppm, 68.81 ppm, 70.75 ppm, 72.86 ppm, 73.25 ppm, 76.08 ppm.

Es sind die verschiedenen Einheiten des Gerüsts der Glyceride erkennbar. Von 61.20 bis 66.03 ppm zeigen sich die Signale der Methylen-Kohlenstoffe der entsprechenden Glycerideinheiten und zwischen 68.01 bis 76.08 ppm die des Methin-Kohlenstoffs des entsprechenden Glycerids. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit VLAHOV et. al.<sup>[207]</sup>, welche die Glyceride in Olivenöl untersucht haben. Im Vergleich zu Abbildung 98 im Anhang ist anzumerken, dass das Signal für das nicht reagierte Glycerol durch die Dialyse der Probe von PGPS10 dort gänzlich verschwunden ist. Somit lässt sich festhalten, dass die Dialyse im Hinblick auf die Entfernung des Glycerols funktioniert hat. Die fehlenden Baugruppen lassen sich in Abbildung 31 finden. Hier ist das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton-d6 im Bereich von 170 bis 178 ppm abgebildet.

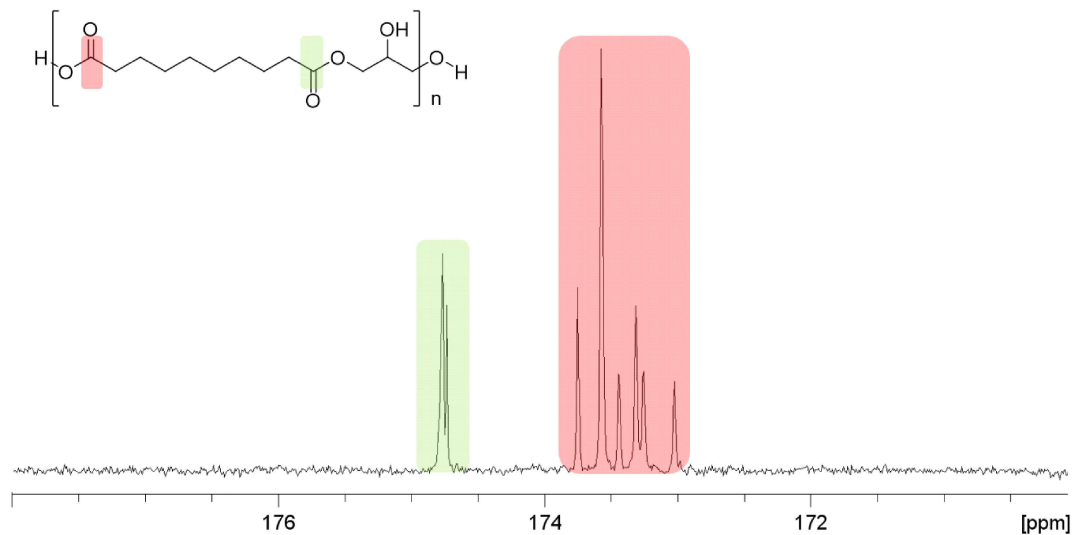


Abbildung 31: Detailansicht des  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von PGS in Aceton- $d_6$  im Bereich von 170 bis 178 ppm. Es sind die verschiedenen Einheiten der azideren Kohlenstoffe der Carboxyl- und Estergruppe erkennbar. 173.02 ppm, 173.25 ppm, 173.31 ppm, 173.44 ppm, 173.57 ppm, 173.75 ppm, 174.73 ppm, 174.76 ppm.

Es sind die verschiedenen Einheiten der azideren Kohlenstoffe erkennbar. Im Bereich von 173.02 bis 173.75 ppm sind die Signale des Carboxyl-Kohlenstoffs erkennbar und von 174.73 bis 174.66 ppm die Signale des Ester-Carbonyls.

Abschließend ist in Abbildung 32 das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum einer dialysierten Probe von PGPS10 dargestellt. Das Signal bei 0.8 ppm lässt sich dem einzigen vorhandenen Phosphor zuordnen.

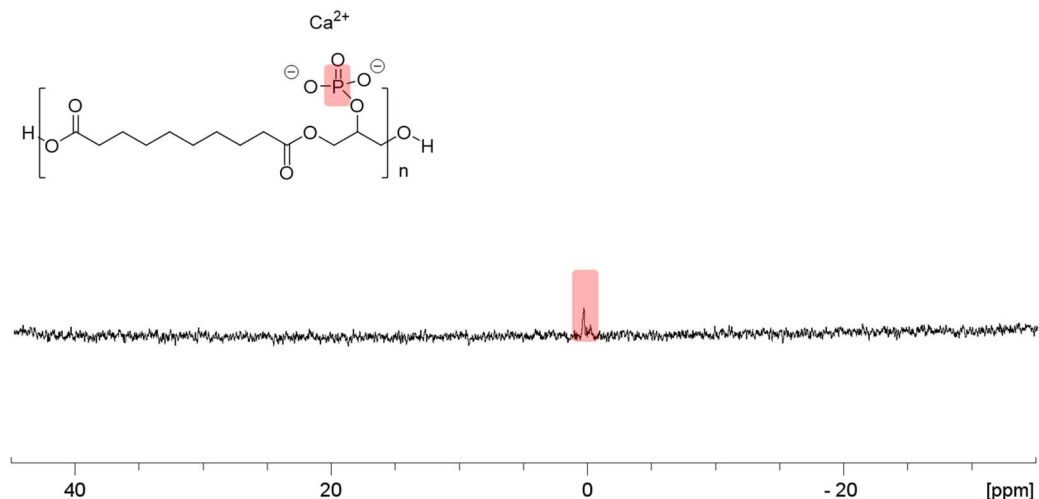


Abbildung 32:  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum einer dialysierten Probe von PGPS10. Das Signal bei 0.85 ppm lässt sich dem einzigen vorhandenen Phosphor zuordnen.

HUANG et al.<sup>[208]</sup> haben ein ähnliches Polymer über eine Synthese von Sebacoylchlorid mit Phosphoroxychlorid dargestellt. Dies ergab im  $^{31}\text{P}$ -NMR in Aceton- $d_6$  ein einziges Signal bei einer Verschiebung von 1.8 ppm.

Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass sich das Glycerolphosphat im vorliegenden Experiment auch kovalent in die Kette des Polymers einbauen lässt. Zusammenfassend lassen sich alle Baugruppen der Polymere identifizieren, sodass eine erfolgreiche Synthese, auch mit der Mikrowelle, stattgefunden hat. Die Bestimmung der Verteilung der Glycerideinheiten unterscheidet sich jedoch zwischen den Syntheserouten. Generell wird der erwartete Trend einer höheren Quervernetzung durch den Anteil am 1,2,3-Triacylglycerid bei mechanischen Prüfungen eine Rolle spielen.

### 5.1.5 Gelpermeationschromatographie

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Gelpermeationschromatographie besprochen. Die Proben wurden freundlicherweise von Dr. FELIX KRULL am Deutschen Institut für Kautschuktechnologie gemessen. Im Anhang in Abbildung 100 sind die Ergebnisse aller Proben, welche in einer Säule bis  $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  gemessen wurden, zu finden. Die relativen Intensitäten der konventionell hergestellten Harze liegen durchweg niedriger als die der mikrowellensynthetisierten Harze. Es scheint eine Fraktion aufgrund eines höheren durchschnittlichen Polymerisationsgrades jenseits der  $1000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  zu existieren, sodass die konventionell hergestellten Proben in einer größeren Säule gemessen werden müssen. Es ist allerdings auch erkennbar, dass die lokalen Maxima bei allen Proben durchweg demselben Schema folgen. Lediglich im niedrigen Bereich um  $270 - 315 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  unterscheiden sich die Proben etwas.

In Abbildung 33 sind die relativen Auftretswahrscheinlichkeiten der verschiedenen molaren Massen der mikrowellensynthetisierten Harze und in Abbildung 34 die der konventionell hergestellten Harze gezeigt.

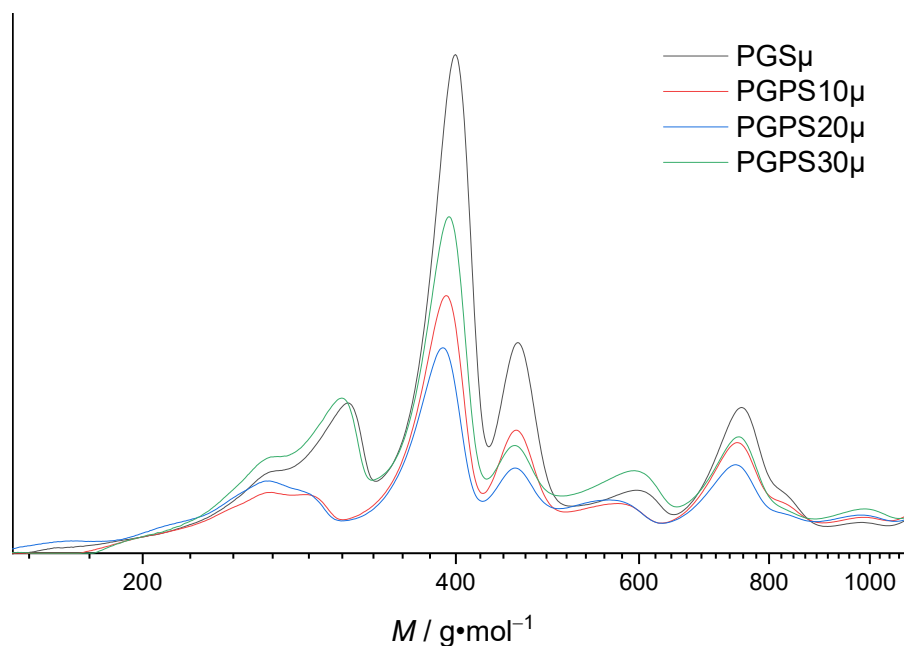


Abbildung 33: Relative Auftretswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Gewichtsfractionen der mikrowellensynthetisierten Harze.

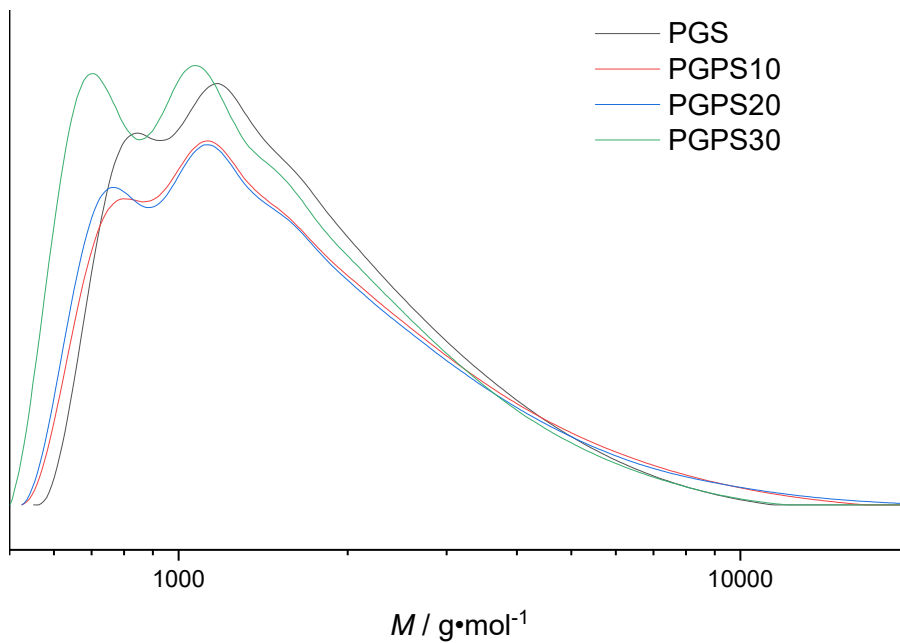


Abbildung 34: Relative Auftretswahrscheinlichkeiten der verschiedenen Gewichtsfractionen der konventionell synthetisierten Harze.

Es ist erkenntlich, dass bei den verschiedenen Proben bestimmte Maxima auftreten. Diese sind in Tabelle 7 gesammelt.

Tabelle 7: Maxima der molaren Massen aus den chromatographischen Untersuchungen und vermutlich zugehörige Bausteine der Polymere basierend auf Sebacinsäure (SA) und Glycerol-Derivate (GLY).

Max / g·mol <sup>-1</sup>	Einheit	M / g·mol <sup>-1</sup>
270	SA-GLY	276
315	GLY-SA-GLY	350
400-460	SA-GLY-SA	460
600	(SA-GLY) <sub>2</sub>	516
	(SA) <sub>3</sub> -GLY	644
700	(SA-GLY) <sub>2</sub> -SA	700
750	(SA-GLY) <sub>3</sub>	774
	GLY-(SA-GLY) <sub>3</sub>	848
1000	(SA-GLY) <sub>3</sub> -SA	958
	(SA-GLY) <sub>4</sub>	1032
1200	(SA-GLY) <sub>4</sub> -SA	1216

Aus den Bausteinen des Polymeren von Sebacinsäure (SA) und Glycerol (GLY) ergeben sich unter Berücksichtigung der Wasserabspaltung mögliche Kombinationen im Polymergemisch.

Diese lassen sich überwiegend genau zuordnen. Die Gelpermeationschromatographie ist jedoch eine relative Methode, bei der hier gegen Polystyrol als Standard gemessen wird, was sich chemisch vom Polymer unterscheidet. Weiterhin können die Phosphatvarianten zu Ungenauigkeiten führen. Eine letzte Möglichkeit ist auch, dass die verschiedenen Fraktionen nicht komplett voneinander durch die Säule getrennt sind und sich überlagern können.

Es lassen sich mithilfe der Gelpermeationschromatographie das Zahlenmittel  $M_n$  und das Gewichtsmittel  $M_w$  bestimmen. Der Polydispersitätsindex (PDI) ergibt sich aus dem Quotienten vom Zahlen- und Gewichtsmittel. Der durchschnittliche Polymerisationsgrad  $X_w$  ergibt sich aus dem Quotienten vom Gewichtsmittel und einer Monomereinheit des Polymers. Hierbei wurden für die Phosphatvarianten anteilig der Calciumglycerolgehalt berücksichtigt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Ergebnisse der Untersuchung via Gelpermeationschromatographie. Es wurde das Zahlenmittel  $M_n$ , das Gewichtsmittel  $M_w$ , der Polydispersitätsindex (PDI) und der durchschnittliche Polymerisationsgrad  $X_w$  unter Zuhilfenahme der molaren Massen einer Wiederholungseinheit  $M_{\text{Mono}}$  bestimmt.

Probe	$M_n / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$M_w / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$	PDI	$X_w$	$M_{\text{Mono}} / \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$
PGS	1856	2802.8	1.51	10.2	276
PGPS10	2013.5	3496.2	1.74	12.3	284
PGPS20	2009.2	3729.9	1.86	12.8	292
PGPS30	1677.7	2693.6	1.61	8.9	300
PGS $\mu$	536.9	752.5	1.40	2.7	276
PGPS10 $\mu$	725.9	1285.9	1.77	4.5	284
PGPS20 $\mu$	762.3	1524.2	2.00	5.2	292
PGPS30 $\mu$	586.5	903.4	1.50	3.0	300

Hinsichtlich der Polydispersionsindices lässt sich sagen, dass diese in einem engen Bereich von 1.4 bis 2.0 liegen; dies sind für ein Harz realistische Werte. Zwischen den verschiedenen Herstellungsmethoden gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Polydispersität. Unterschiede werden bei der Betrachtung des durchschnittlichen Polymerisationsgrades  $X_w$  deutlich. Die Kettenlängen für die konventionellen Harze variieren zwischen 8.9 bis 12.3 Wiederholungseinheiten, die der mikrowellensynthetisierten Harze fallen wie zu erwarten war mit 2.7 bis 5.2 deutlich kleiner und etwas breiter aus. Die kürzeren Kettenlängen resultieren aus den gewählten Reaktionsbedingungen. Hierbei wurde eine geringere Konversion angestrebt, um eine gute Verarbeitung der Harze zu gewährleisten. Gleichzeitig führt die zuvor beschriebene höhere durchschnittliche Temperatur zu einer breiteren Molmassenverteilung.

### 5.1.6 Uniaxiale Zug- und Druckprüfung

Im folgenden Abschnitt werden uniaxiale Zugprüfungen an konventionell hergestellten Polymeren nach ihrer Quervernetzung diskutiert. Dies wird mit einer Druckprüfung eines mikrowellensynthetisierten Harzes, welches in zylindrischer Form unter Zuhilfenahme der Mikrowelle quervernetzt wurde, verglichen. In Abbildung 35 sind Fotos der verschiedenen Probenkörper gezeigt.



Abbildung 35: Fotografische Aufnahmen der aus PGS hergestellten Probenformen. Links: Eine zylindrische Probenform ( $d = 16$  mm;  $h = 15$  mm), welche gänzlich in der Mikrowelle synthetisiert wurde. Rechts: Ein konventionell hergestellter und quervernetzter Probenkörper nach S3A (DIN 53504), wie er in den uniaxialen Zugprüfungen verwendet wurde.

Links ist die zylindrische Probenform ( $d = 16$  mm;  $h = 15$  mm), welche gänzlich in der Mikrowelle synthetisiert wurde, gezeigt. Rechts ist ein konventionell hergestellter und quervernetzter Probenkörper nach S3A (DIN 53504), wie er in den uniaxialen Zugprüfungen verwendet wurde. Hierfür wurden Teflonformen verwendet. Zur Quervernetzung des Harzes in der Mikrowelle wurde ein Reaktor in der Mikrowelle auf 17 mbar evakuiert und das Harz insgesamt für 35 min bei 1000 W behandelt. Anschließend konnte der quervernetzte Zylinder, welcher eine vergleichbare Haptik zu den bisher bekannten konventionellen Proben aufwies, geborgen werden. Dies war die einzige, gezielt erfolgreiche Quervernetzung, welche mithilfe der Mikrowelle erzielt werden konnte und soll ein Machbarkeitsnachweis für das generelle Quervernetzen von Harzen auf Basis von PGS darstellen. In misslungenen Experimenten ließ sich ebenfalls eine Quervernetzung erzielen, aber die Probenform war durch starke Blasenbildung zerstört. Dies ist auch hin und wieder in der konventionellen Herstellung der Probenkörper geschehen. Große Einflussfaktoren scheinen die Position innerhalb der Mikrowelle, der vorherrschende Druck, das Intervall der Leistung, aber vor allem auch die Menge des Harzes und in welcher Geometrie es vorliegt, zu sein. Probenkörper nach S3A bspw., dünne Schichten oder zylindrische Scheiben führten nicht zum Erfolg, sodass eine möglichst voluminöse Form nötig zu sein scheint. Vermutlich ist das Verhältnis aus der Probengröße zur Größe des Reaktionsraums zu gering, sodass ein signifikanter Teil der Mikrowellenstrahlung nicht auf das Reaktionsgemisch wirkt.



In Abbildung 36 sind uniaxiale Zugprüfungen bis zur Zerstörung der Probe von PGS (schwarz), PGPS10 (rot), PGPS20 (blau) und PGPS30 (grün) gezeigt.

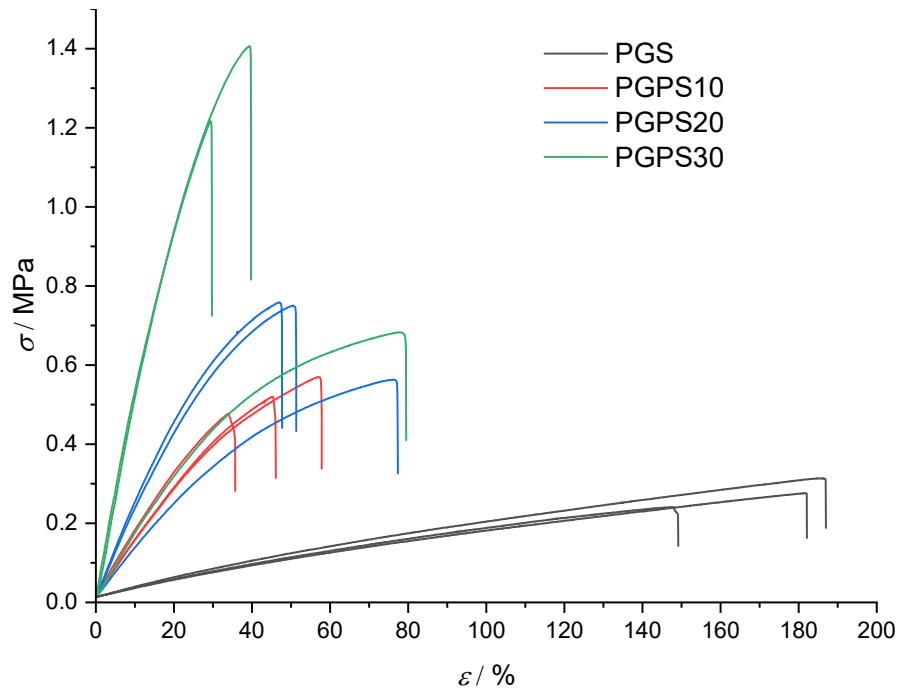


Abbildung 36: Uniaxiale Zugprüfungen von PGS (schwarz), PGPS10 (rot), PGPS20 (blau) und PGPS30 (grün), welche bis zur Zerstörung des Probenkörpers durchgeführt wurden.

Es ist erkenntlich, dass ein steigender Anteil an Calciumglycerolphosphat im Polymer zu einer geringeren Elastizität und einer Verschiebung zu höheren Spannungen führt. Die Abgrenzung zwischen den Proben ohne und mit Phosphatzusatz fällt sehr deutlich aus. Die Proben von PGPS20 und PGPS30 zeigen jeweils eine Probe, welche signifikant unterhalb der anderen beiden Messungen liegt. Der Trend ist aber durchaus erkennbar. In Tabelle 9 sind die E-Moduln der Proben aufgeführt.

Tabelle 9: E-Moduln von Proben in uniaxialen Zugprüfungen bis zur Probenzerstörung von konventionell hergestellten und quervernetzten Proben nach S3A-Probenkörpern.

Probe	<i>E-Modul</i> / MPa
PGS	$0.24 \pm 0.02$
PGPS10	$1.50 \pm 0.20$
PGPS20	$2.00 \pm 0.60$
PGPS30	$4.00 \pm 2.00$

Die Steifigkeit der Proben nimmt mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat zu. Aus der Auswertung der NMR-Spektroskopie (vgl. Kapitel 5.1.4) ist bekannt, dass ein steigender Anteil an Calciumglycerolphosphat zu einer höheren Quervernetzung führt.

Weiterhin lässt sich der Effekt aber auch erklären, indem die elektrostatischen Verhältnisse genauer betrachtet werden. Einerseits liegen in dem Polymergemisch mit Calciumglycerolphosphat freie Calcium-Ionen vor. Andererseits besitzen endständige Einheiten von Sebacinsäure im Polymer Carboxylat-Gruppen. Somit können die Calciumionen weitere Knotenpunkte zur Quervernetzung bieten und fungieren wie eine Art Füllstoff. Dies ist schematisch in Abbildung 37 gezeigt.



Abbildung 37: Schematische Darstellung des Polymers mit den Wiederholungseinheiten von Sebacinsäure (S) und Glycerol bzw. Glycerolphosphat (G). Calcium-Ionen (grün) können mit den Carboxylat-Gruppen aufgrund der unterschiedlichen Ladungen in Wechselwirkung treten.<sup>[205]</sup>

Es lässt sich also sagen, dass über den Anteil an Calciumglycerolphosphat in dem Synthesegemisch Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften genommen werden kann.

In Abbildung 38 ist die Druckprüfung des zylindrischen Probenkörpers von PGS<sub>μ</sub> gezeigt, welcher ausschließlich in der Mikrowelle hergestellt wurde.

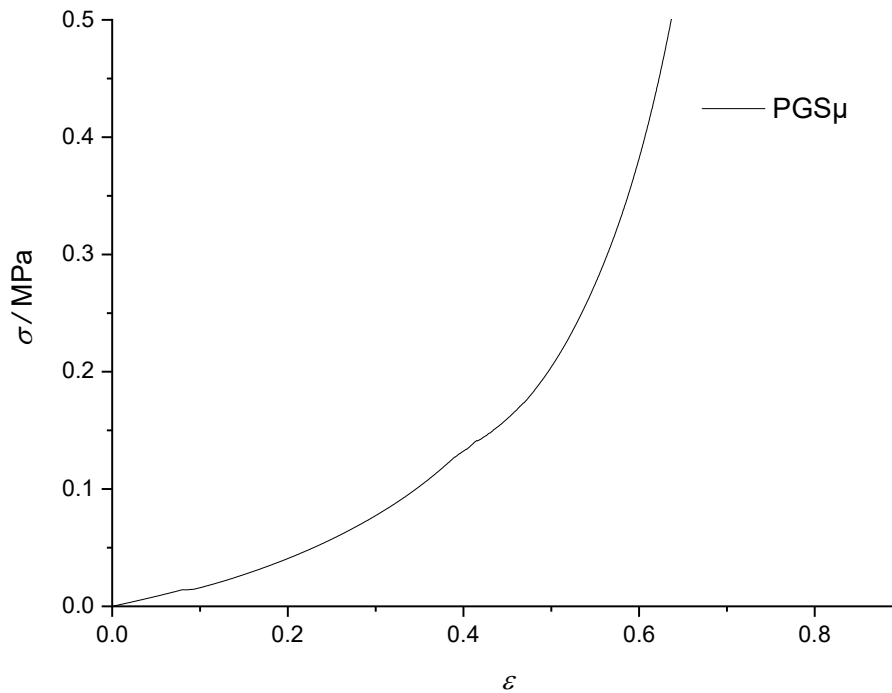


Abbildung 38: Druckprüfung bis 500 N des zylindrischen Probenkörpers eines in der Mikrowelle quervernetzten Harzes von PGS $\mu$ .

Auch hier lässt sich der E-Modul bestimmen und liegt mit  $E_{\text{PGS}\mu} = 0.22 \text{ MPa}$  sehr nah im Bereich von PGS mit  $E_{\text{PGS}} = 0.24 \pm 0.02 \text{ MPa}$ , welches mit der Literatur übereinstimmt.<sup>[209]</sup> Dieses Ergebnis sollte aber nur als ein Hinweis darauf verstanden werden, dass die Mikrowellensynthese ein Polymer mit den gleichen mechanischen Eigenschaften eines konventionell synthetisierten Polymers liefern kann. Aus bereits erläuterten Gründen ließ sich die Quervernetzung in der Mikrowelle nicht reproduzieren, sodass eine Mehrfachmessung nicht möglich ist. Zusätzlich werden zwei verschiedene mechanische Prüfungen miteinander verglichen. In der Theorie sollten sie aber das gleiche Ergebnis generieren.

## 5.2 Evaluation der Herstellung von Repliken und Scaffolds

Die nach Kapitel 4.2 und 4.3 hergestellten Repliken und Scaffolds werden im folgenden Abschnitt hinsichtlich ihrer Morphologie und der mechanischen und chemischen Eigenschaften bewertet. In Abbildung 39 sind verschiedene Repliken gezeigt, welche durch das *sponge-template* Verfahren hergestellt wurden.

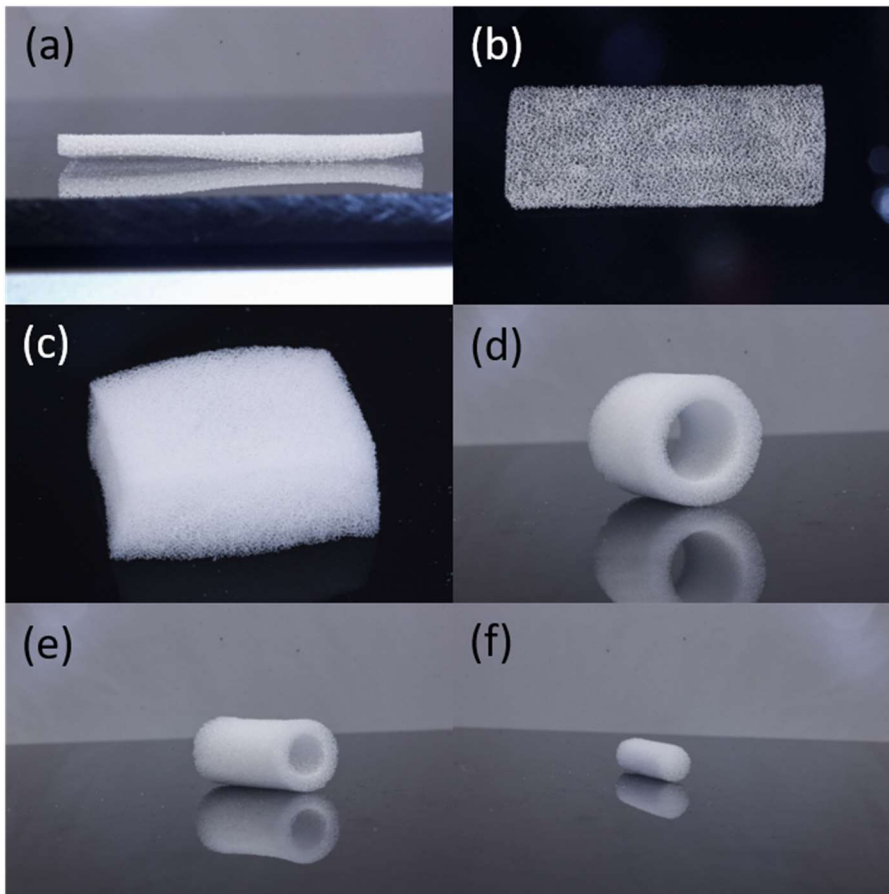


Abbildung 39: Verschiedene Repliken, welche durch das *sponge-template* Verfahren hergestellt wurden. (a) und (b) zeigen eine Matte von 2x20x60 mm. (c) zeigt einen Quader mit einer Größe von 20x20x40 mm. In (d), (e) und (f) sind (hohle) Zylinder gezeigt, welche sich ineinanderstecken lassen.

Es lässt sich im Prinzip jeder poröse Schwamm beliebiger Form aus dem Silicamaterial abbilden. Hierbei sind runde, hohle, besonders dünne und voluminöse Formen möglich. In Abbildung 40 sind verschiedene Repliken gezeigt, welche mit Polymer beschichtet wurden.

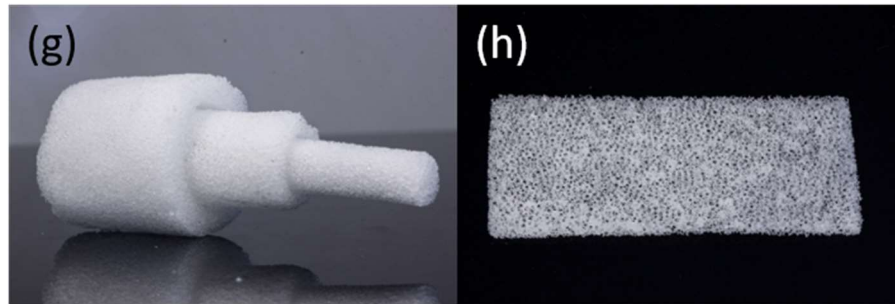


Abbildung 40: Es sind verschiedene mit Polymer beschichtete Repliken gezeigt. Links: verschiedene Zylinder, welche sich ineinanderstecken lassen. Rechts: Dünne Matte, welche mit Polymer beschichtet wurde.

Die zuvor gezeigten zylindrischen Repliken erhalten durch die Polymerbeschichtung eine hohe mechanische Stabilität, sodass sie ohne Probleme ineinandergesteckt werden können. Weiterhin ist es möglich, dünne Matten zu beschichten, wobei sich zeigt, dass ein Großteil der Poren offenbleibt. Somit lassen sich nahezu alle erdenklichen Formen herstellen und mit Polymer beschichten.

### 5.2.1 Morphologie

In Abbildung 41 sind digitalmikroskopische Aufnahmen vom verwendeten PU-Schwamm (a), einem imprägnierten PU-Schwamm (b), einer Replik (c) und einem Scaffold (d) gezeigt.

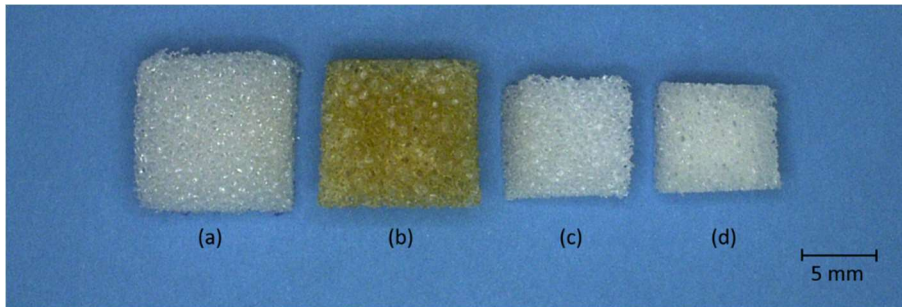


Abbildung 41: Digitalmikroskopische Aufnahmen vom verwendeten PU-Schwamm (a), einem imprägnierten PU-Schwamm (b), einer Replik (c) und einem Scaffold (d).

Auffällig hierbei ist die Schrumpfung des Schwammes von ca.  $10 \text{ mm}^3$  auf  $8 \text{ mm}^3$  nach der Calcination. Die braun-gelbe Färbung der Schwämme nach der Imprägnierung ist auf die Bildung von Nitrit während des Trocknungsprozesses im Ofen bei  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  zurückzuführen. Die Schwämme werden händisch aus einer Matte mit 1 cm Höhe mit einer Schere oder einem Skalpell zugeschnitten, wodurch sich Abweichungen von einem idealen Würfel mit einer Kantenlänge von 1 cm ergeben. Diese Form bleibt über die Herstellung der Repliken erhalten, wodurch sie in der Größe variieren können oder auch bspw. auch eine rhomboedrische Form besitzen können. Die Abweichung wird im folgenden Kapitel (vgl. 5.2.2) detailliert beschrieben. Es ist erkennbar, wie das *sponge-template* Verfahren zu einer erfolgreichen Nachbildung der ursprünglichen Schwammstruktur durch ein bioaktives Glas führt und anschließend mit den ausgewählten Polymeren beschichtet werden kann.

In Abbildung 42 sind Digitalmikroskopische Aufnahmen der Makroporen vom verwendeten PU-Schwamm (a), einem imprägnierten PU-Schwamm (b), einer Replik (c) und einem Scaffold (d) gezeigt.

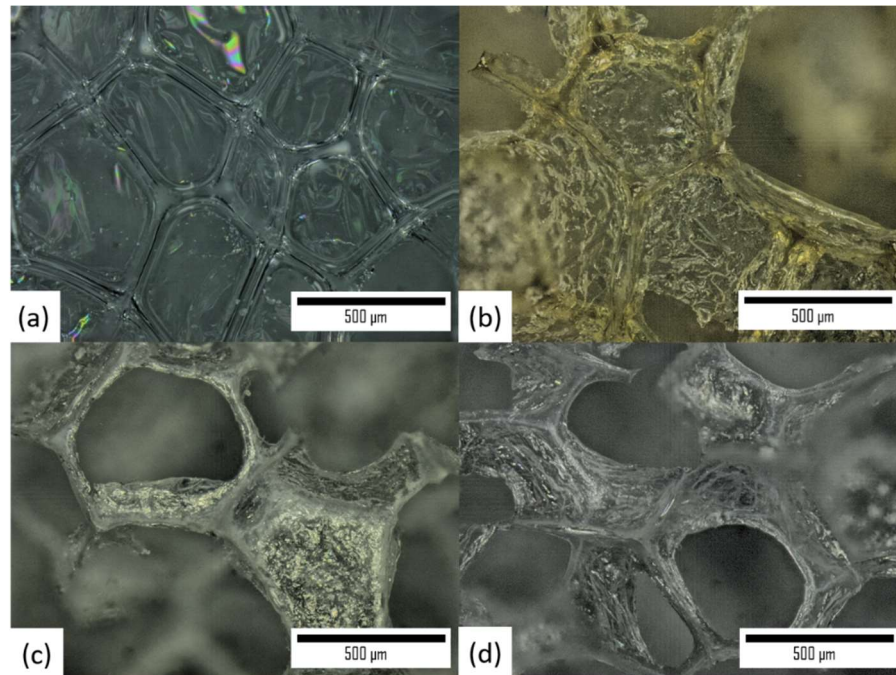


Abbildung 42: Digitalmikroskopische Aufnahmen der Makroporen vom verwendeten PU-Schwamm (a), einem imprägnierten PU-Schwamm (b), einer Replik (c) und einem Scaffold (d).

Es ist erkennbar, dass bereits im PU-Schwamm Makroporen durch Häutchen verschlossen sein können. Die Porengeometrie entspricht eher einem Vieleck als dass kreisrunde Poren vorliegen. Zur Bestimmung des Porendurchmessers wurde die engste des Mittelpunkts durchkreuzende Stelle gewählt, weil diese limitierend in Bezug auf den Durchmesser für etwaige Blutgefäße, welche in das Scaffold hineinwachsen können, ist. Der durchschnittliche Porendurchmesser des verwendeten PU-Schwammes ergibt sich zu  $d_{\text{Pore, LW}} = 450 \pm 150 \mu\text{m}$ . Der ermittelte Wert liegt in einem Bereich, der sich ideal für eine Vaskularisierung eignet. Der durchschnittliche Porendurchmesser der Replik beträgt  $d_{\text{Pore, Replik}} = 415 \pm 115 \mu\text{m}$ . Dies ist in Bezug auf die beobachtete Schrumpfung ein zu erwartendes Ergebnis. Ein beschichtetes Scaffold wurde ebenfalls untersucht und besitzt einen durchschnittlichen Porendurchmesser von  $d_{\text{Pore, Scaffold}} = 395 \pm 140 \mu\text{m}$ . Dieser Wert deutet bereits eine kleine Verringerung an, welches durch das Auftragen der Polymerschicht zustande kommen kann. Allerdings beträgt der Wert keinen signifikanten Unterschied zur Replik. Es zeigt aber, dass auch die Scaffolds mit Porendurchmessern in der Größenordnung von mehreren hundert Mikrometern ideale Bedingungen zur Vaskularisierung bieten und in der Größenordnung der Poren der Spongiosa (vgl. 2.1.1) liegen.

In Abbildung 43 ist eine TEM-Aufnahme vom hergestellten Silicamaterial gezeigt.

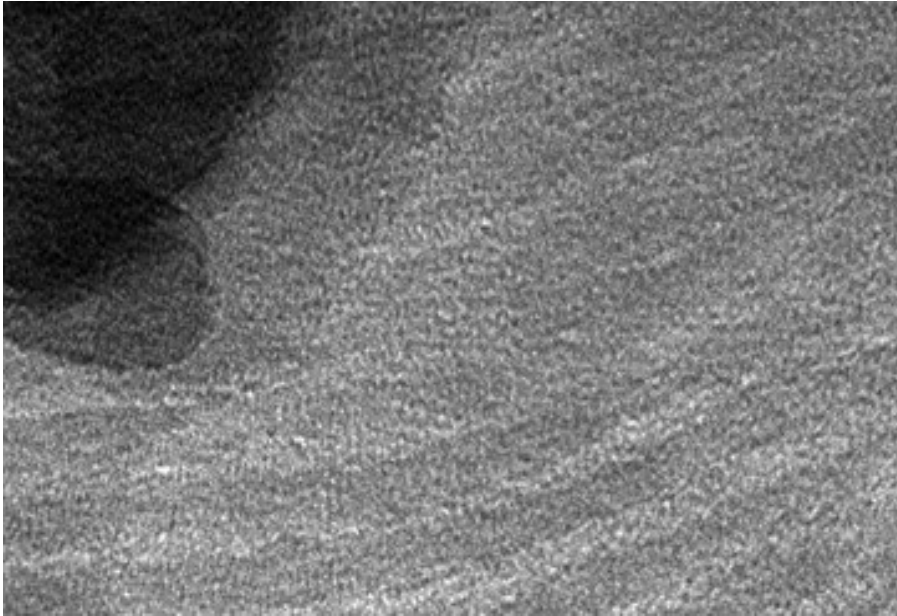


Abbildung 43: TEM-Aufnahme des hergestellten Silicamaterials mit erkennbaren Mesoporen.

Hierbei ist zu erkennen, dass sich parallel zueinander Poren durch die Probe ziehen, wie es zu erwarten war. Die Porengröße ergibt sich aus den TEM-Aufnahmen zu  $4.0 \pm 0.5$  nm. In den nachfolgenden Kapiteln werden die mesoporösen Eigenschaften des Silicamaterials noch mithilfe von Physisorption untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein makro- und nanoporöses Kompositmaterial dargestellt werden konnte. Die Größe der Makroporen liegen in einem passenden Bereich, damit das Scaffold vaskularisiert werden und etwaige Zellen versorgt werden können. Die Nanoporen bieten vielfältige Anwendung für Medikamenten-Freisetzungssysteme oder weitere Ionen.



## 5.2.2 Gewichtsverlauf im Herstellungsprozess

Es wurde die Gewichtszunahme der Repliken in Abhängigkeit von der Anzahl der Beschichtungszyklen untersucht, was in Abbildung 44 dargestellt ist.

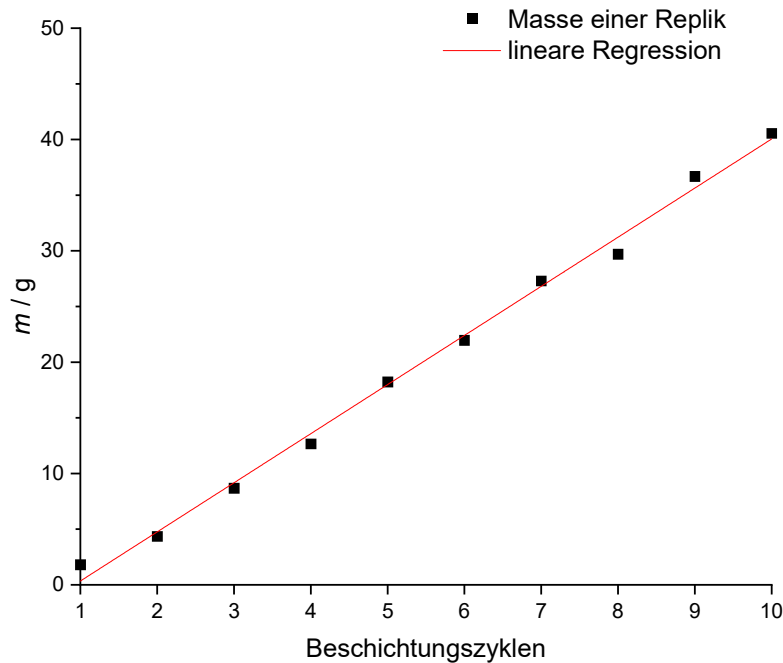


Abbildung 44: Durchschnittliche Masse einer Replik pro Beschichtungszyklus (schwarz) und lineare Regression (rot).

In einer Versuchsreihe wurden jeweils zehn Repliken mit bis zu zehn Beschichtungszyklen hergestellt. Die Zunahme des Gewichts der Repliken scheint den Gesetzmäßigkeiten eines linearen Zusammenhangs zu folgen. Hieraus ergibt sich ein Massenzuwachs von durchschnittlich 4.4 mg pro Beschichtungsvorgang für ein Volumen von 1 cm<sup>3</sup> des ursprünglichen Schwammes. Somit lässt das *sponge-template* Verfahren ein genaues Einstellen der Gesamtmasse der Replik und damit der für die Anwendung interessanten Menge an Orthokieselsäure zu. Die sehr geringe Dichte der Repliken setzt eine vorsichtige Handhabung voraus, um Schäden zu vermeiden. In den theoretischen Grundlagen (vgl. 2.1.2) wurde die biologische Rolle von Orthokieselsäure als *induceron* für die Knochenregeneration beschrieben, sodass ein großes Potential vorliegt, über die Anzahl der Beschichtungszyklen und über die Resultate der Freisetzungsexperimente die Konzentration für eine optimale biologische Wirksamkeit einzustellen.

Nachfolgend sollen die Gewichte der verschiedenen Scaffolds betrachtet werden. In Abbildung 45 sind die Gewichte von immer mindestens 38 Proben pro Sorte als Box-Plot dargestellt. Hierbei ist der PU-Schwamm, der imprägnierte PU-Schwamm, die Replik, als auch jede hergestellte Probenvariation aufgeführt.

Die Probenvariationen unterscheiden sich darin, ob die Repliken kein Strontium (SiCa) oder Strontium (SiCaSr) beinhalten, ob ein oder zwei Beschichtungsvorgänge durchgeführt wurden und ob die Herstellung des Harzes konventionell (std) oder mit der Mikrowelle erfolgt ist ( $\mu w$ ). Diese Unterscheidungen werden für PGS (grau), PGPS10 (rot), PGPS20 (blau) und PGPS30 (grün) betrachtet.

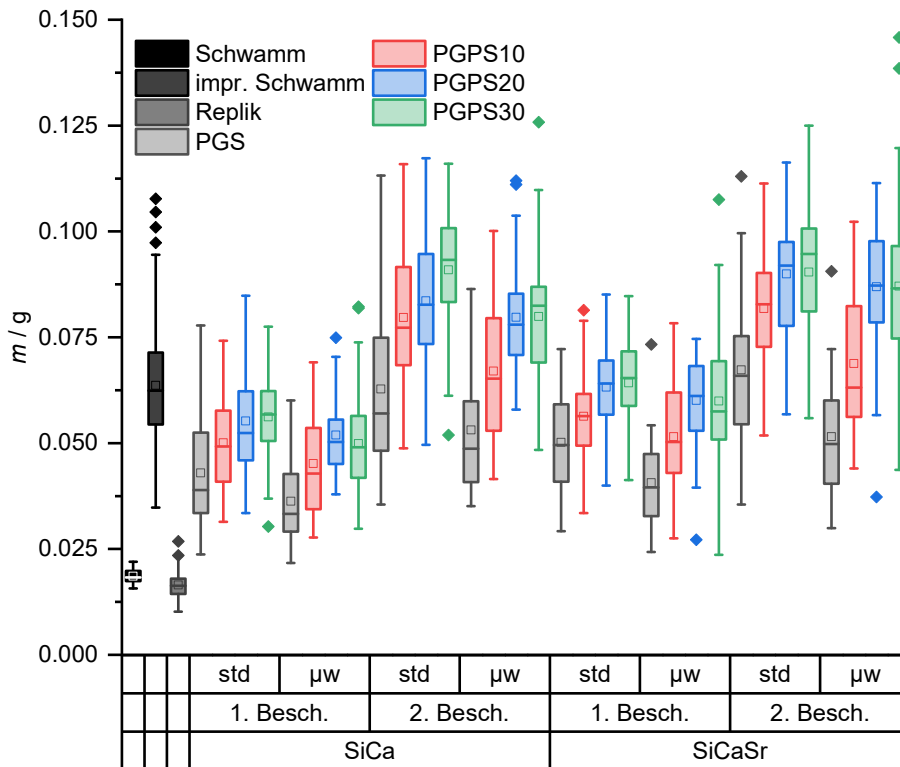


Abbildung 45: Ein Box-Plot über die Verteilung der Gewichte vom PU-Schwamm, imprägniertem PU-Schwamm, Repliken, sowie jeder Variation der Scaffolds von mindestens 38 Proben. Hierbei wird unterschieden, ob die Replik ohne Strontium (SiCa) oder mit Strontium beladen ist (SiCaSr), wie viele Beschichtungsvorgänge durchgeführt wurden und ob die Harze konventionell (std) oder mithilfe der Mikrowelle ( $\mu w$ ) hergestellt wurden.

Der PU-Schwamm kann zu Beginn mit sehr niedriger Abweichung zugeschnitten werden. Durch das Imprägnieren des PU-Schwamms mit der Silica-Präkursorlösung gewinnen die Proben stark an Gewicht. Hierbei scheinen Unterschiede im Auspressen der Schwämme während des Beschichtungsverfahrens zu größeren Abweichungen zu führen. Diese reduzieren sich erneut nach dem Calcinieren der Proben, wodurch die Repliken mit einer geringen Abweichung erhalten werden. Aus der Betrachtung der verschiedenen Versuchsgruppen zueinander lassen sich einige Zusammenhänge ableiten. Werden die unterschiedlichen Polymere PGS, PGPS10, PGPS20 und PGPS30 und ihre  $\mu$ -Varianten in ihren jeweiligen Gruppen verglichen, so lässt sich feststellen, dass die Masse innerhalb der Reihe kontinuierlich zunimmt. In Abbildung 46 ist der durchschnittliche Anteil des ersten und zweiten Beschichtungsvorgang am Endgewicht der Polymerbeschichtung gezeigt.

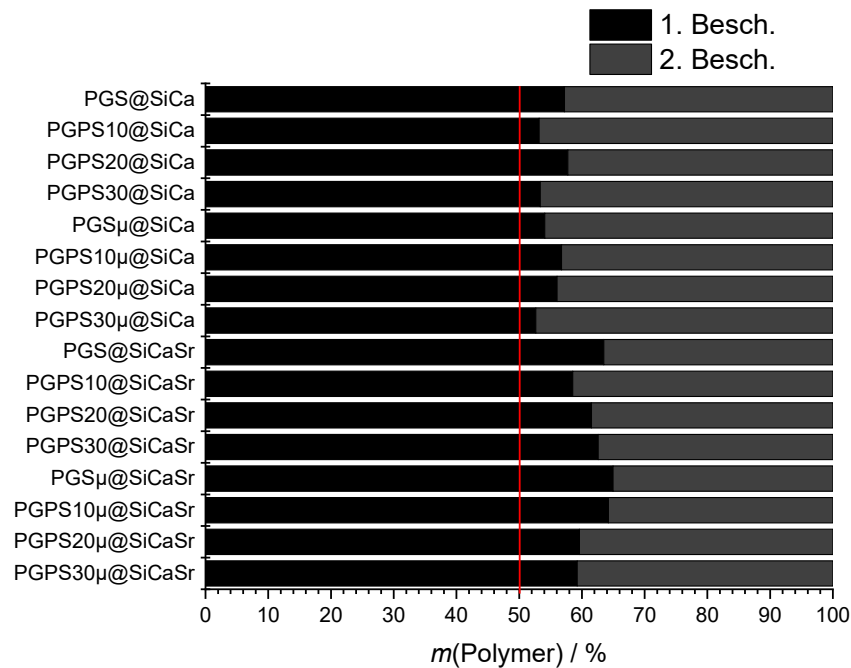


Abbildung 46: Durchschnittlicher Anteil des ersten und zweiten Beschichtungsvorgangs am Endgewicht des jeweiligen Scaffolds. Der Wert von 50 % ist in rot markiert. Von den jeweiligen Werten wurden die Gewichte der Repliken abgezogen und für die Strontiumbelastung das mögliche Maximalgewicht von 3.96 mg addiert.

Die Masse der durchschnittlichen Replik mit 16.5 mg wurde vom Gesamtgewicht des jeweiligen Scaffolds abgezogen, um die Masse des Polymers zu erhalten. Für die strontiumbeladenen Repliken wurde die Masse von 3.96 mg zusätzlich subtrahiert, was die maximal mögliche Masse darstellt, welche als Strontium beladen werden kann. Über alle Proben hinweg zeigt sich, dass im ersten Beschichtungsvorgang mehr Material auf die Replik aufgebracht wird. Die Scaffolds, welche ein SiCa-Gerüst besitzen, erlangen im ersten Beschichtungsvorgang 53 – 57 % und im zweiten 47 – 43 %. Die Proben mit einem SiCaSr-Gerüst zeigen im ersten Beschichtungsvorgang mit 58 – 64 % bzw. 36 – 42 % im zweiten Durchgang etwas andere Tendenzen. Dies kann auf eine leicht veränderte Oberfläche der Replik zurückzuführen sein, zum einen kann durch das Imprägnieren mit einer wässrigen Strontiumchlorid-Lösung die Silica-Oberfläche durch Auflösungserscheinung rauer werden, zum anderen können lokal hohe mechanischen Belastungen durch das Wasser im Scaffold entstehen, wodurch Trabekel brechen und mehr Möglichkeit zur Anhaftung des Polymers bieten. Das anhaftende Salz bietet durch seine Polarität neue Bereiche zur Interaktion, was beispielweise mit den polaren Gruppen wie den Carbonyl-Gruppen, den endständigen Carbonsäuren oder Alkoholgruppen zu attraktiven Wechselwirkungen führen kann. Zwischen dem Syntheseweg oder dem Anteil von Calciumglycerolphosphat der Polymere lässt sich kein Zusammenhang zu den Massen pro Beschichtungsvorgang erkennen.

Zur Vergleichbarkeit der Massen der Scaffolds untereinander wurde das einfach beschichtete Scaffold PGS@SiCa mit seiner durchschnittlichen Masse auf 100 % gesetzt, um so etwaige Trends besser diskutieren zu können. Dazu wurden die Massen der Scaffolds, deren Polymer mikrowellensynthetisiert wurde, mit denen aus konventioneller Synthese gestapelt. Dies ist in Abbildung 47 gezeigt.

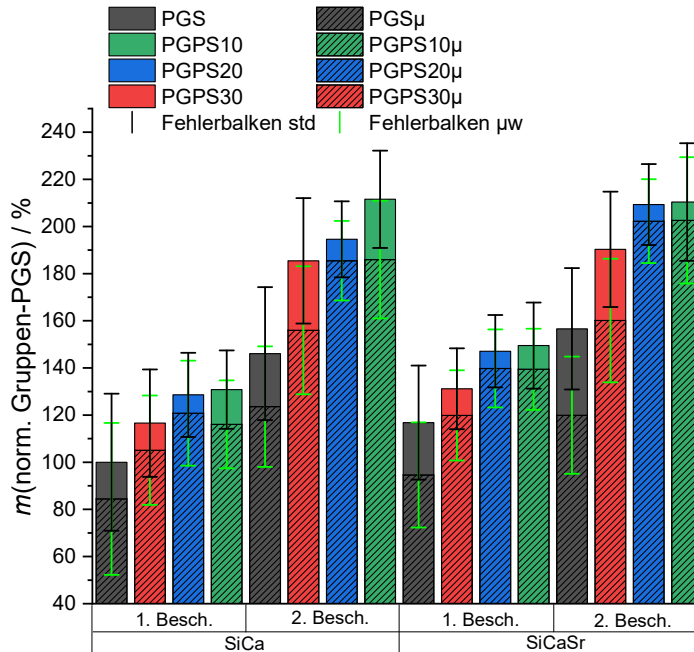


Abbildung 47: Durchschnittliche Massen der Scaffolds in Prozent. Das Gewicht von der ersten Beschichtung von PGS@SiCa ist auf 100% gesetzt.

Werden die Syntheserouten der ansonsten identischen Polymere miteinander verglichen, so fallen die Gewichte der Scaffolds mit mikrowellensynthetisiertem Polymer durchweg geringer als ihr konventionell hergestelltes Pendant aus. Für die erste Beschichtung liegen sie 7 – 22 Prozentpunkte und für die zweite Beschichtung 7 – 36 Prozentpunkte geringer. Der Effekt der geringeren Massenzunahme der Scaffolds mit mikrowellensynthetisiertem Polymer pflanzt sich über die Anzahl der Beschichtungsvorgänge fort, sodass der Abstand immer weiterwächst. Für die Proben PGPS20( $\mu$ )@SiCa(Sr) und PGPS30( $\mu$ )@SiCaSr fielen die Unterschiede am geringsten aus, wohingegen sie für PGS( $\mu$ )@SiCa(Sr) am höchsten waren. Die GPC-Messungen zeigten für die Mikrowellensynthesen generell kleinere mittlere Molmassen und somit vermutlich kürzere Polymerketten. Sie können mobiler sein und leichter im Beschichtungsvorgang abfließen. Wird die verwendete Replik der Scaffolds mit dem ansonsten gleichen Polymer verglichen, so ergeben sich für die SiCaSr-Scaffolds in der Regel größere Massen. Im ersten Beschichtungsvorgang fallen sie um 10 – 23 Prozentpunkte größer aus. Den geringsten Unterschied zeigt PGS $\mu$ @SiCa(Sr) und den größten PGPS30 $\mu$ @SiCa(Sr).

Im zweiten Beschichtungsvorgang fallen die Unterschiede mit 0 – 16 Prozentpunkte deutlich geringer aus. Dies sollte allerdings nicht mehr auf die unterschiedlichen Repliken als Gerüststruktur zurückzuführen sein, weil durch den ersten Beschichtungsvorgang eine Haftung zwischen Polymer und der ethanolischen Beschichtungslösung mit dem Harz vermittelt wird. Die Beobachtung im Vergleich des ersten Beschichtungsvorgangs deckt sich mit den Ergebnissen aus Abbildung 46. Vermutlich wird anfangs die gewonnene Masse mit der Anzahl an Beschichtungszyklen sinken, bis die Poren so klein geworden sind, dass die Beschichtungslösung durch bspw. Kapillarkräfte immer weniger abfließt und sehr viel im Scaffold haften bleibt.

Zur Untersuchung des Einflusses vom Anteil an Calciumglycerolphosphat in der Synthese wurden innerhalb einer Gruppe die PGS-Scaffolds auf 100 % Masse gesetzt. Hierdurch sind die Werte zwischen den Gruppen nicht vergleichbar, allerdings lässt sich so der Einfluss der verschiedenen Syntheserouten im Zusammenhang mit dem Anteil an Calciumglycerolphosphat ermitteln. Dies ist in Abbildung 48 gezeigt.

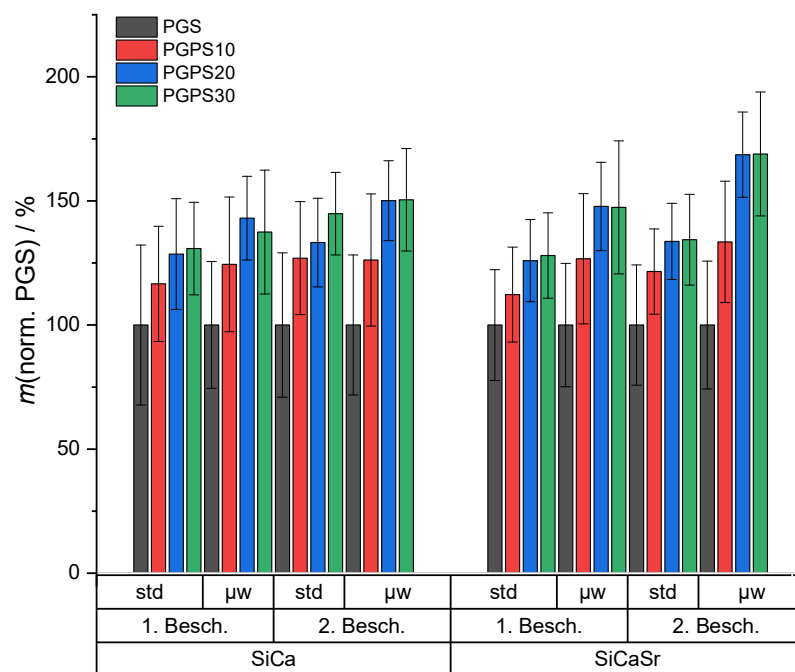


Abbildung 48: Gewichte der verschiedenen Scaffoldsorten in Prozent. Die Gewichte sind innerhalb ihrer Gruppe auf die PGS-Variante normiert, welche immer bei 100 % liegen. Dadurch lassen sich die Gruppen gegeneinander nicht vergleichen, allerdings ist es so möglich, den Einfluss der Variation des Calciumglycerolphosphat-Anteils nach Herstellungsmethode der Scaffolds zu untersuchen.

Innerhalb der Gruppen zeigen sich unterschiedliche Tendenzen, wie stark die Variation des Anteils von Calciumglycerolphosphat in der Synthese des Polymers das Gewicht beeinflusst. Hierbei ist der Gewichtssprung von PGS( $\mu$ )- zu der PGPS10( $\mu$ )-Variante mit ca. 12 – 26 Prozentpunkten in der ersten und 21 – 33 Prozentpunkten für die zweite Beschichtung am höchsten.

Besonders für die Mikrowellensynthese fallen die Sprünge hoch aus. Das kann erneut mit den Ergebnissen der GPC erklärt werden. Die durchschnittliche Anzahl an Wiederholungseinheiten im PGS $\mu$  beträgt 2.7 und im PGPS10 $\mu$  4.5, was relativ ein viel größerer Unterschied zueinander ist als 10.2 zu 12.3 von PGS zu PGPS10. Weiterhin kann eine höhere Dichte des Harzes durch die Ausscheidung des nicht reagierten Calciumglycerolphosphats zu dem generellen Phänomen der höheren Massen führen. Für die Proben mit 20 % Anteil an Calciumglycerolphosphat sinkt die Massenzunahme auf ca. 11 – 21 Prozentpunkte für die erste und auf 6 – 12 Prozentpunkte für die zweite Beschichtung ab. Ausnahmen bilden PGPS20 $\mu$ @SiCa (1. Besch.) und PGPS20 $\mu$ @SiCaSr (2. Besch.) mit einem Zuwachs von 23 Prozentpunkten bzw. 35 Prozentpunkten. Wird der Anteil von Calciumglycerolphosphat auf 30 % erhöht, so ergibt sich nahezu kein Effekt. Die Massen erreichen ein Plateau; lediglich für PGPS30@SiCa (2. Besch.) steigt sie um weitere 11 Prozentpunkte. Für die Probe PGPS30 $\mu$ @SiCa (1. Besch.) sinkt das durchschnittliche Gewicht sogar, was ein Indiz für einen Fehler während des Beschichtungsvorgangs ist. Um in zukünftigen Arbeiten bessere Vorhersagen zu treffen, welche Masse mit welchem Anteil an Calciumglycerolphosphat in der Synthese erzielt wird, wurde bis zu einem Anteil von 20 % eine lineare Regression der vorhandenen Daten durchgeführt. Dies ermöglicht eine Abschätzung der zusätzlichen Masse in Bezug auf die Referenz PGS aus der jeweiligen Syntheseroute. Dies ist in Abbildung 49 dargestellt und die Steigungen samt R-Quadrat in Tabelle 10 zusammengefasst.

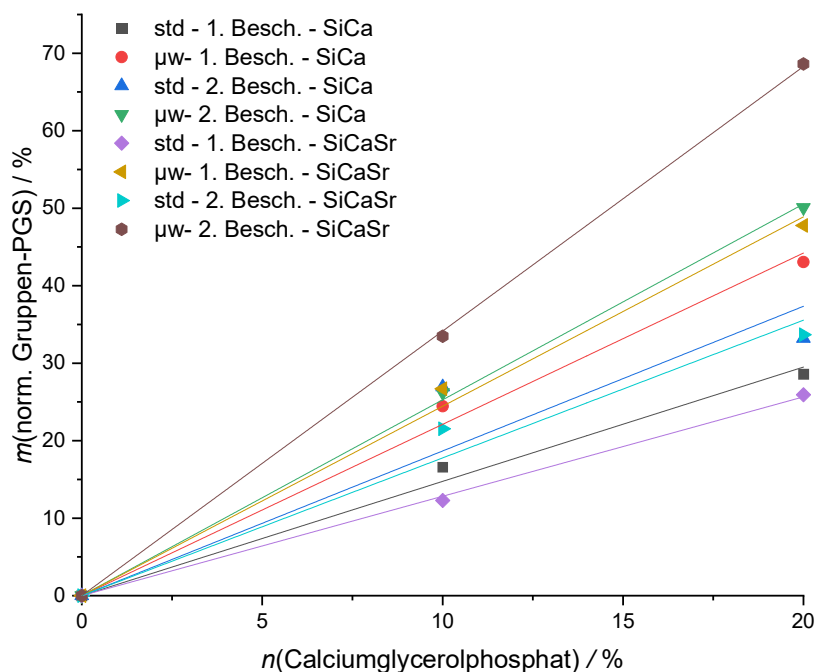


Abbildung 49: Durchschnittliche Massen der Scaffoldsorten in Prozent, welche auf das probenspezifische PGS normiert sind. In gleicher Farbe ist die lineare Regression gezeigt.

Tabelle 10: Steigungen und zugehörige R-Quadrate der verschiedenen Herstellungsmethoden der Scaffolds aus der linearen Regression aus Abbildung 49.

Replik	Steigung (R-Quadrat)			
	1. Besch.		2. Besch.	
	std	$\mu w$	std	$\mu w$
SiCa	1.48 (0.9961)	2.21 (0.9972)	1.87 (0.9532)	2.53 (0.9996)
SiCaSr	1.28 (0.9995)	2.44 (0.9978)	1.78 (0.9889)	3.41 (0.9999)

Hierbei zeigt sich für die Synthesen mit konventionellem Heizen ein geringerer Einfluss des Anteils von Calciumglycerolphosphat auf die Gewichtszunahme als für die mikrowellensynthetisierten Polymere. Dies kann mit dem großen Einfluss von Ionen auf die Konversion in der Mikrowellensynthese zusammenhängen. Durch die Anwesenheit der Salze findet eine schnellere Reaktion statt, so einen Effekt kann für das konventionelle Heizen nicht beobachtet werden. Mit der Anzahl an Beschichtungen nimmt auch für jedes hinzugefügte Prozent Calciumglycerolphosphat der Einfluss auf das Endgewicht zu. Für die Repliken, welche Strontiumchlorid eingelagert haben, fällt der Einfluss gegenüber den Repliken ohne Strontiumchlorid etwas geringer aus.

Wie zuvor beschrieben, ergeben sich aus der händischen Probenherstellung Abweichungen in der Größe. Diese Abweichungen wurden quantitativ erfasst, indem der Mittelwert des Gewichts einer Charge als idealer Quader mit  $a = 1$  angenommen wird. Die Dichte des Materials in jeder Probengruppe wird als gleich angenommen, sodass Gewichtsunterschiede nur durch Abweichung von der idealen Form zustande kommen können. Diese ergibt sich dann aus der dritten Wurzel des Quotienten vom tatsächlichen Gewicht einer Probe zu dem als ideal angenommenen Mittelwert aller Gewichte. Somit entspricht es dem Faktor der Abweichung von jeweils den drei Kantenlängen. Wenn eine ideale Probe eine Größe von  $8 \cdot 8 \cdot 8 \text{ mm}^3$  hat, so besitzt eine reale Probe mit einem Faktor von 1.2 die Größe von  $9.6 \cdot 9.6 \cdot 9.6 \text{ mm}^3$ . Dies ist eine vereinfachte Betrachtung zur Fehlererfassung, weil sie nicht betrachtet, wenn sich Fehler eliminieren, also kein Würfel mit  $a^3$ , sondern ein orthorhombischer Würfel mit  $a \cdot b \cdot c$  vorliegt. Weiterhin werden Fehler durch abweichende Winkel beim Zuschneiden der Schwämme nicht gesondert betrachtet. In Abbildung 50 sind die theoretischen Abweichungen der Kantenlängen dargestellt, um die Abweichung von der idealen Form quantifizieren zu können. Hier werden erneut der PU-Schwamm, der imprägnierte PU-Schwamm, die Repliken und alle Probensorten betrachtet. Es wird nach der Beladung ohne (SiCa) und mit (SiCaSr) Strontiumchlorid, der Anzahl der Beschichtungen und der Herstellung der Harze nach konventioneller Art (std) und mithilfe der Mikrowelle ( $\mu w$ ) unterschieden.

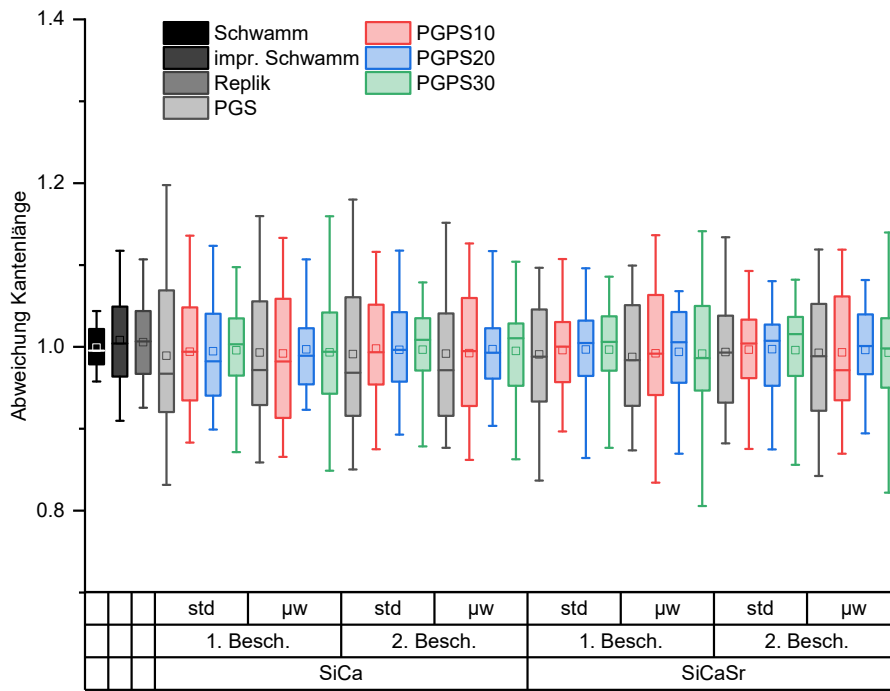


Abbildung 50: Theoretische Abweichungen der Kantenlängen aller Proben vom idealen Quader.

Der Faktor zur Abweichung des Würfels liegen bei der Hälfte aller Proben (farbige Fläche) in den Grenzen von 0.9 bis 1.1, jeweils 20 % im Bereich von 0.8 bis 1.2 (Whisker). Dies beschreibt eine Abweichung von max. 1.6 mm, was bei der händischen Präparation mithilfe von Schere, Skalpell und Lineal als sehr genau betrachtet werden kann. Dies zeigt sich auch in den experimentellen Daten. Im späteren Abschnitt 5.2.5 werden die Kompressionstests der Repliken und Scaffolds evaluiert. Von 248 Scaffolds wurden die Kantenlängen und die Massen bestimmt. Es ergibt sich unter der Annahme eines idealen Würfels eine Kantenlänge von  $a = 7.65 \pm 0.54 \text{ mm}^3$ . Es findet eine minimale Unterschätzung der Kantenlänge statt, allerdings kann dies durch die Messung der Kantenlängen mit dem Messschieber zustande kommen. Ein minimal zu hoher Druck beim Messen des elastischen Materials kann dazu führen, dass das Scaffold nachgibt und ein etwas kleinerer Wert gemessen wird. Eine weitere Präparation der Proben mit höherer Genauigkeit könnte das Zuschneiden der Schwämme mittels heißem Draht und Führungsschienen zum Bewegen sein. So ließen sich die Matten des PU-Schwamms fixieren und mit langsamem Vorschub präzise zuschneiden.

Die ermittelten Daten aus den Gewichten und Kantenlängen der Proben sollen in diesem Abschnitt zur Betrachtung der Dichte der Scaffolds dienen. Hierzu wurde eine Probenwahl aus den hergestellten Scaffolds getroffen, welche die gesamte Sorte repräsentieren soll. Es wurden insgesamt vier Testkategorien gewählt: jeweils fünf Proben, welche den lokalen Mittelwert der Scaffoldsorte repräsentiert. Wie in Abbildung 45 gezeigt wurde, liegt dieser für jede Sorte um einen anderen Wert herum.



Um eine Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen Probensorten zu gewährleisten, wurde auch ein globaler Mittelwert gewählt. Dies betrifft fünf Proben pro Sorte, welche im Gewichtsbereich zwischen 60 – 80 mg liegen, weil dies bei jeder Probenkategorie vorzufinden ist. Die letzten beiden Kategorien umfassen jeweils drei Proben mit den maximalen bzw. minimalen Massen aus der Probensorte. Ein Auswahlkriterium war die Form, welche dem idealen Quader möglichst nah kommen sollte. Zur Durchführung der Kompressionstests wurden für jedes Scaffold das Gewicht und die Kantenlängen bestimmt. Hierdurch lassen sich die Massen bereinigt durch die abweichenden Kantenlängen betrachten. Diese Daten stehen für alle Probensorten nach der zweiten Beschichtung zur Verfügung und sind in Abbildung 51 dargestellt.

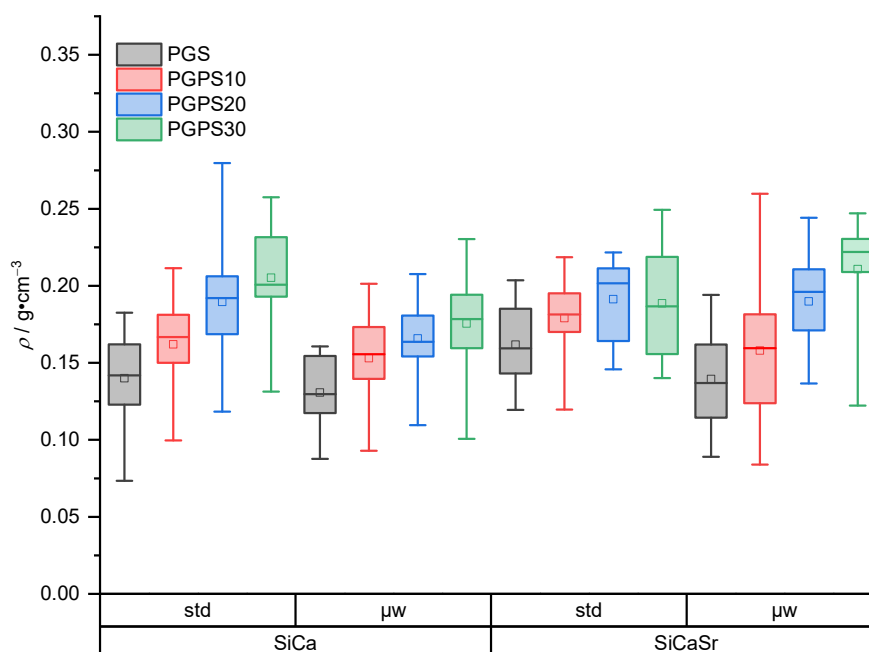


Abbildung 51: Dichten von 16 Scaffolds pro Probensorte nach der zweiten Beschichtung, mit welchen die Kompressionstests durchgeführt wurden. Hierbei wird nach dem Grundgerüst mit Strontium (SiCaSr) bzw. ohne Strontium (SiCa) und nach der Herstellungsart der konventionellen Synthese (std) und der Mikrowellensynthese ( $\mu$ w) unterschieden.

Es scheint ein Zusammenhang zwischen der Dichte und den gemessenen Gewichten (Abbildung 45) zu existieren. Die Zunahme der Dichte über den Anteil von Calciumglycerolphosphat in der Synthese verläuft ähnlich wie die Massen. Es zeigt sich keine Steigerung der Dichte von PGPS20@SiCaSr auf PGPS30@SiCaSr. Anders als bei der Betrachtung der Gewichte zeigt die Betrachtung der Dichten von PGPS20 $\mu$ @SiCaSr zu PGPS30 $\mu$ @SiCaSr hingegen einen signifikanten Unterschied.

In Abbildung 52 sind die Dichten der Proben um den globalen Mittelwert zwischen 60 – 80 mg dargestellt.

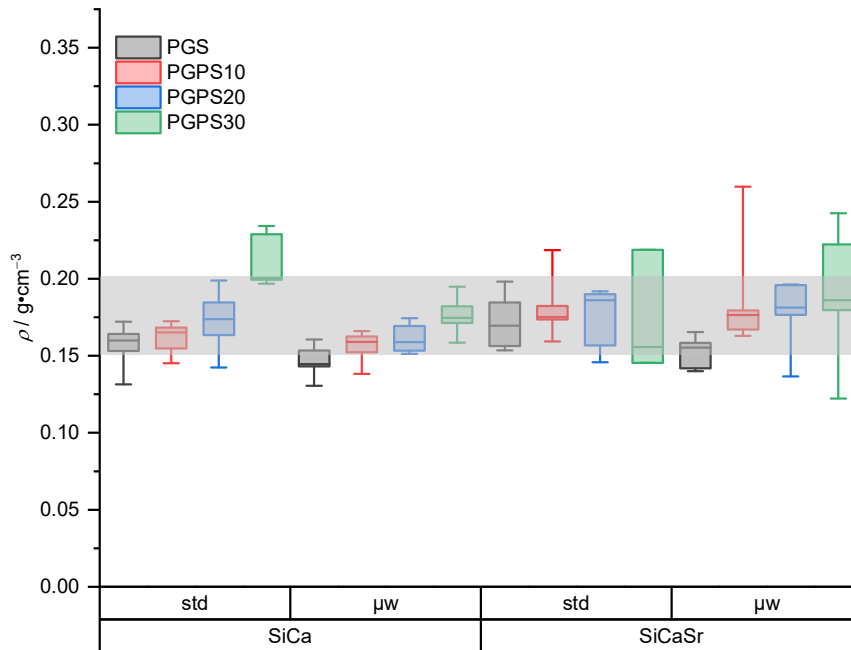


Abbildung 52: Darstellung der Dichten der Proben mit dem globalen Mittelwert des Gewichts zwischen 60 – 80 mg. Hierbei sind die Proben der zweiten Beschichtung gezeigt.

Diese sollten eine gewisse Vergleichbarkeit der Proben innerhalb eines Gewichtsbereichs bieten. Der Großteil der Proben liegt im schmalen Bereich von  $0.15 - 0.2 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Lediglich  $\text{PGS}\mu @ \text{SiCaSr}$  und  $\text{PGS}\mu @ \text{SiCa}$  liegen knapp unterhalb des Bereichs und  $\text{PGPS30} @ \text{SiCaSr}$  und  $\text{PGPS30}\mu @ \text{SiCaSr}$  teilweise oberhalb des Bereichs.  $\text{PGPS30} @ \text{SiCa}$  liegt nahezu komplett oberhalb des definierten Bereichs. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die aufgebrauchte Polymermenge generell in einem schmalen Fenster variiert und die Proben in Kompressionstests untereinander verglichen werden können. Für  $\text{PGPS30} @ \text{SiCa}$  sind eventuell Abweichungen in den Kompressionstests zu erwarten.

In zukünftigen Arbeiten kann eine Abschätzung der Massen der Repliken und der Scaffolds je nach Syntheseroute stattfinden. In Anbetracht der folgenden Freisetzungsexperimente (Kap. 5.2.6) und der biologischen Wirksamkeit der Ionen kann das Knochenregenerationsmaterial in Bezug auf Degradationszeiten oder auch Gesamtmenge an gelieferten Ionen eingestellt werden. Werden jeweils die erste und zweite Beschichtung einer Reihe betrachtet, so nimmt das Gesamtgewicht grob um den Faktor 1.5 zu. Für alle Beschichtungen auf SiCaSr-Repliken erscheint die Zunahme etwas geringer. Ein indirekter Zusammenhang kann in den Temperaturen der Beschichtungslösungen liegen. Die Beschichtungen wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt und die Lösungen mit dem Ultraschallbad homogenisiert. Eine höhere Temperatur kann zu einer geringeren Viskosität und einem schnelleren Abfließen bei schlechterer Anhaftung führen.

### 5.2.3 Physisorption der Repliken

In Abbildung 53 ist beispielhaft eine Stickstoff-Physisorptionsisotherme des hergestellten Silica-Calcium Materials gezeigt.

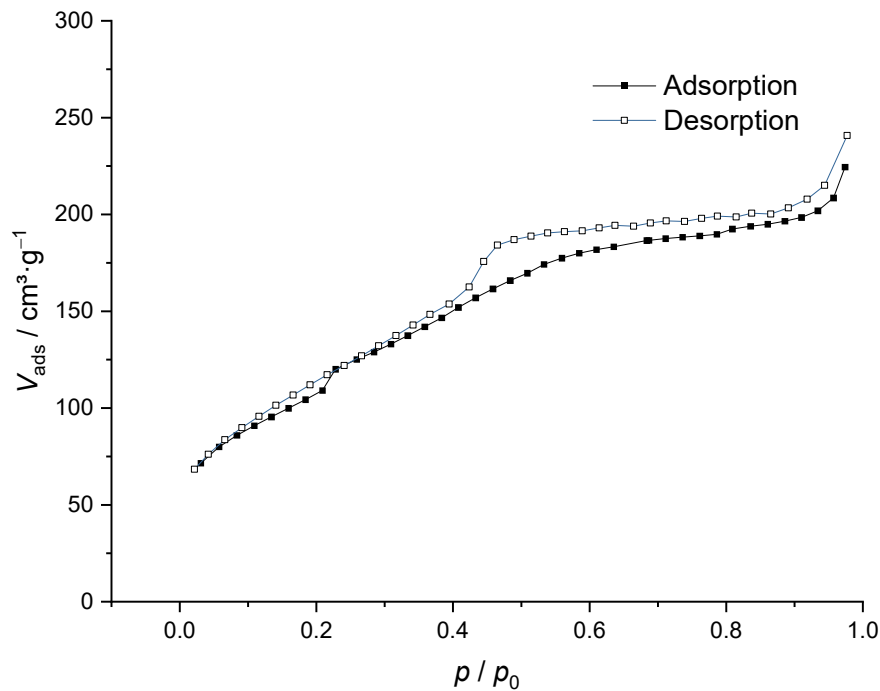


Abbildung 53: Stickstoff-Physisorptionsisotherme vom Silica-Calcium Material der Repliken.

Diese entspricht dem Typen IV(a) nach IUPAC<sup>[210]</sup>, weil eine Hysterese erkennbar ist, welche für Porensysteme größer als 4 nm auftreten kann.<sup>[211]</sup> Für die BET-Oberfläche ergibt sich ein Wert von  $395 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ . Es wurde erfolgreich ein mesoporöses Silicamaterial mit einer großen inneren Oberfläche hergestellt, wie bereits die TEM-Aufnahmen andeuteten. Die hohe innere Oberfläche kann z.B. mit verschiedenen Salzen beladen werden. Grundsätzlich kommen auch Antibiotika infrage. Die hohe Temperatur in der nachfolgenden Quervernetzung des Harzes kann diese organischen Moleküle jedoch zerstören oder unwirksam machen.

Abbildung 54 stellt die Porenweitenverteilung vom Silica-Calcium Material der Repliken dar, welche mithilfe des Dichtefunktionaltheorems ermittelt wurde.

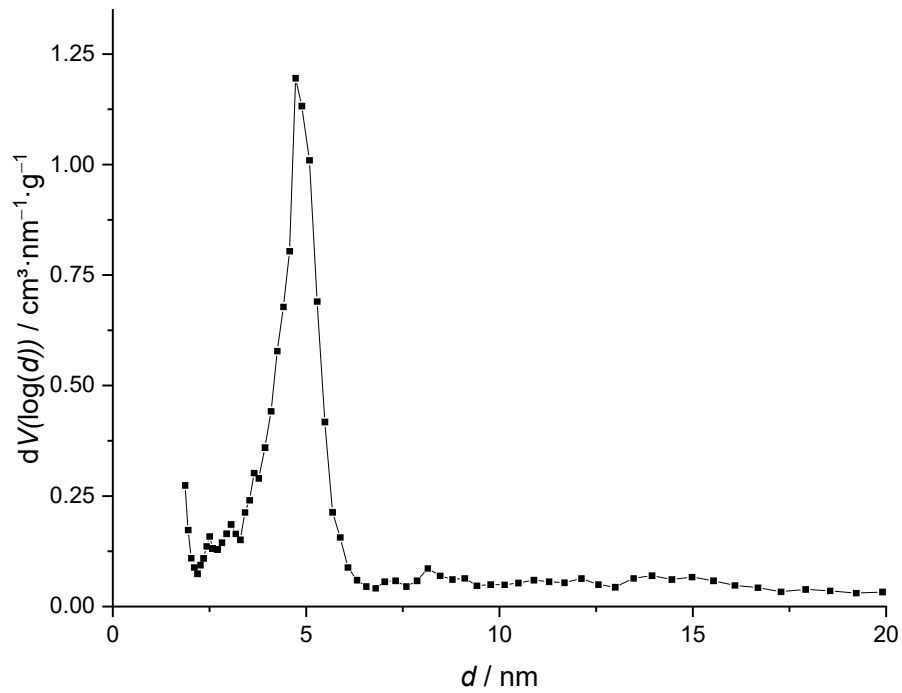


Abbildung 54: Porenweitenverteilung (NLDFT) vom Silica-Calcium Material der Repliken.

Hierbei ist zu erkennen, dass sich ein mittlerer Porendurchmesser von 5 nm ergibt. Aus der graphischen Auswertung der TEM-Aufnahmen ergab sich ein Porendurchmesser von  $4.0 \pm 0.5$  nm, was etwas kleiner ausfällt, aber dennoch im Einklang mit dem Ergebnis der Physisorption steht.

Abbildung 55 zeigt die Stickstoff-Physisorptionsisotherme vom Silica-Calcium Material der Repliken, welches mit Strontiumchlorid infiltriert wurde.

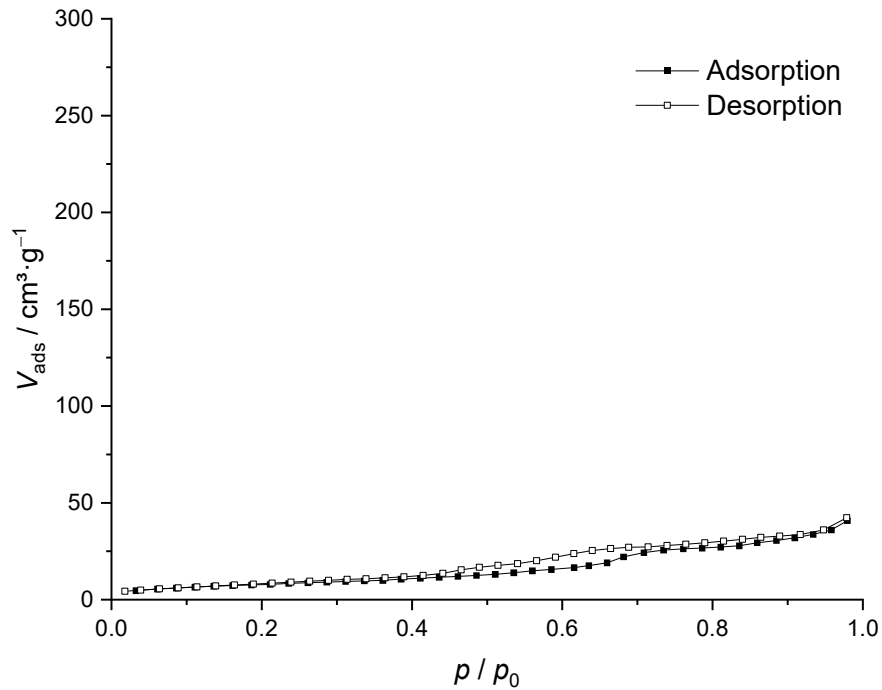


Abbildung 55: Stickstoff-Physisorptionsisotherme vom Silica-Calcium Material der Repliken, welches mit Strontiumchlorid infiltriert wurde.

Der Kurvenverlauf ist deutlich weniger ausgeprägt gegenüber der SiCa-Replik, aber zeigt noch ähnliche Tendenzen. Die BET-Oberfläche ist mit  $30 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  stark verringert. Dies kann einerseits daran liegen, dass die Infiltration erfolgreich verlaufen ist und Poren gefüllt oder durch aufliegendes Strontiumchlorid verschlossen sind. Andererseits kann die wässrige Lösung zu einer stellenweisen Zerstörung des Porensystems durch Auflösung geführt haben.

In Abbildung 56 ist die Porenweitenverteilung vom Silica-Calcium Material der Repliken, welches mit Strontiumchlorid infiltriert wurde, dargestellt.

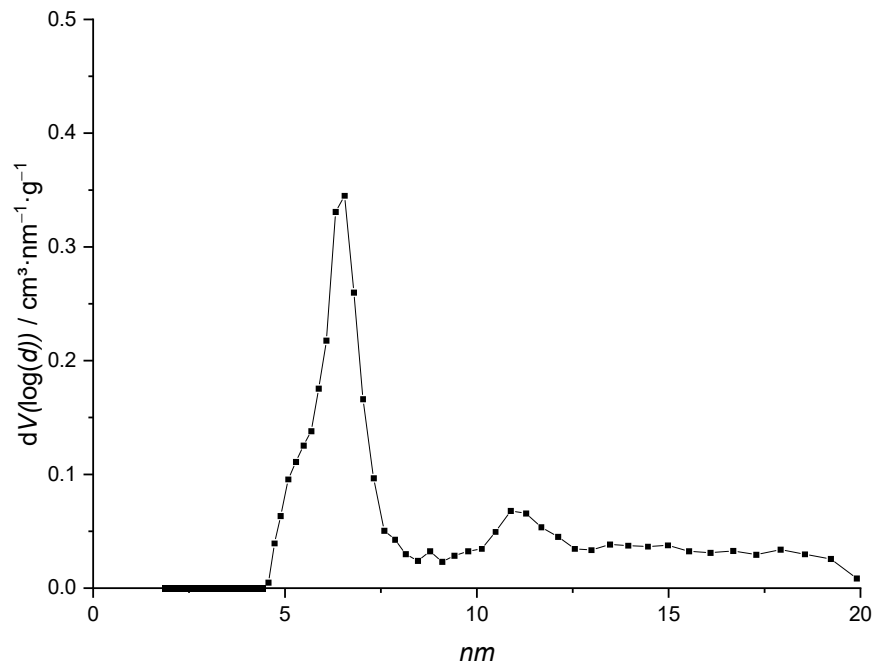


Abbildung 56: Porenweitenverteilung (NLDFT) vom Silica-Calcium Material der Repliken, welches mit Strontiumchlorid infiltriert wurde.

Hierbei scheinen größere Poren um 6 nm vorzuliegen, was aber angesichts der vorherigen Messung nicht sinnvoll erscheint. Die Ermittlung der Porenweitenverteilung auf Grundlage der Physisorptionsergebnisse beinhaltet für ein beladenes und angegriffenes Material offensichtlich Unsicherheiten, die zu dieser Verschiebung und dem relativ großen Grundrauschen führt. Das lokale Maximum kann aus dem vorangegangenen Grund vorliegen oder ein Hinweis auf die Zerstörung von Poren zu größeren Kavitäten sein. In den Freisetzungsexperimenten wird sich die Beladung mit Strontiumchlorid bestätigen lassen.

### 5.2.4 Kleinwinkelröntgenstreuung der Repliken

Zur Beurteilung des mesoporösen Systems wurde neben TEM und Physisorption auch Kleinwinkelröntgenstreuung am SiCa- und SiCaSr-Material durchgeführt. In Abbildung 57 sind die beiden Messungen dargestellt.

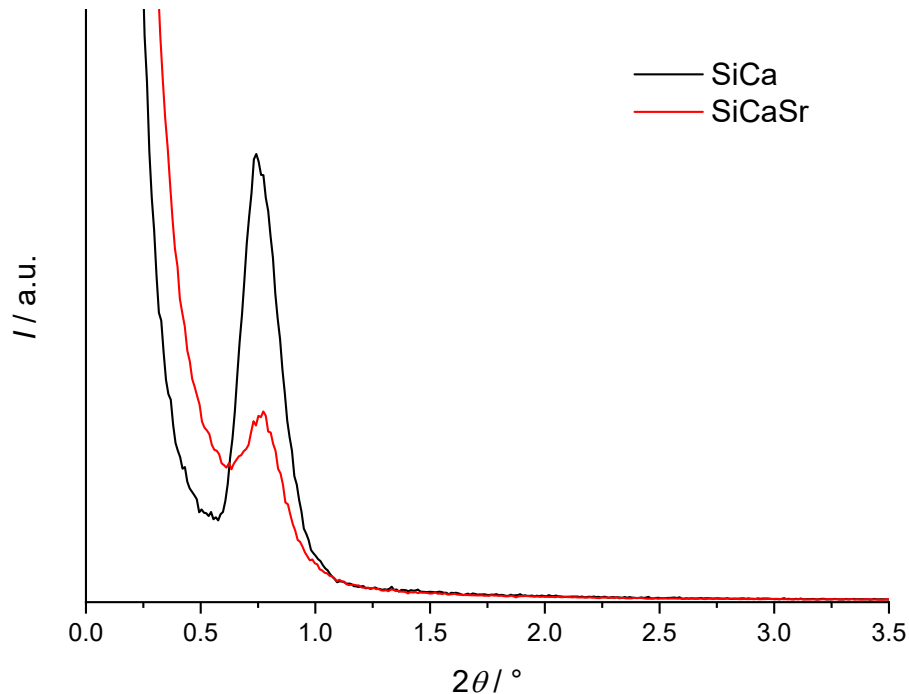


Abbildung 57: Kleinwinkelröntgenstreuung von SiCa (schwarz) und SiCaSr (rot) gemessen bei der Wellenlänge von Cu- $K_{\alpha}$ .

Die Proben unterscheiden sich vor allem in der Intensität. Die Maxima geben den Glanzwinkel an, der für SiCa (schwarz) bei  $0.74^{\circ} 2\theta$  und für SiCaSr (rot) bei  $0.77^{\circ} 2\theta$  liegt. Mithilfe der BRAGG'schen Gleichung lässt sich der Abstand zwischen den Mittelpunkten von zwei benachbarten Poren bestimmen. Somit ergeben sich Abstände für SiCa von 11.9 nm und für SiCaSr von 11.4 nm. Aus den TEM-Bildern ergibt sich ein Abstand von  $9.9 \pm 1.0$  nm. Diese minimale Diskrepanz liegt jedoch im Rahmen der Genauigkeit der Messmethoden.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse aus Physisorption, SAXS und den TEM-Aufnahmen zur Analyse des Mesoporensystems zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Physisorption, SAXS und TEM zur Analyse des Mesoporensystems.

Probe	$A_{\text{BET}} / \text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$	$d_{\text{Pore}} / \text{nm}$	$d-d_{\text{Pore}} (\text{SAXS}) / \text{nm}$	$d-d_{\text{Pore}} (\text{TEM}) / \text{nm}$
SiCa	395	5	11.9	$9.9 \pm 1.0$
SiCaSr	30	6	11.4	-

Es kann zum SiCa-Material gesagt werden, dass ein mesoporöses Material, welches eine hohe innere Oberfläche aufweist, synthetisiert wurde. Grundsätzlich ist dies auch für das SiCaSr-Material der Fall, weil es sich um das gleiche Material handelt, welches nachträglich beladen wurde. Hierbei kann nun die verringerte Oberfläche als eine erfolgreiche Beladung mit gleichzeitiger möglicher Veränderung des Porensystems betrachtet werden



### 5.2.5 Kompressionstests von Scaffolds und Repliken

In Abbildung 58 ist beispielhaft eine Druckprüfung einer Replik ohne Beschichtung mit Polymer gezeigt.

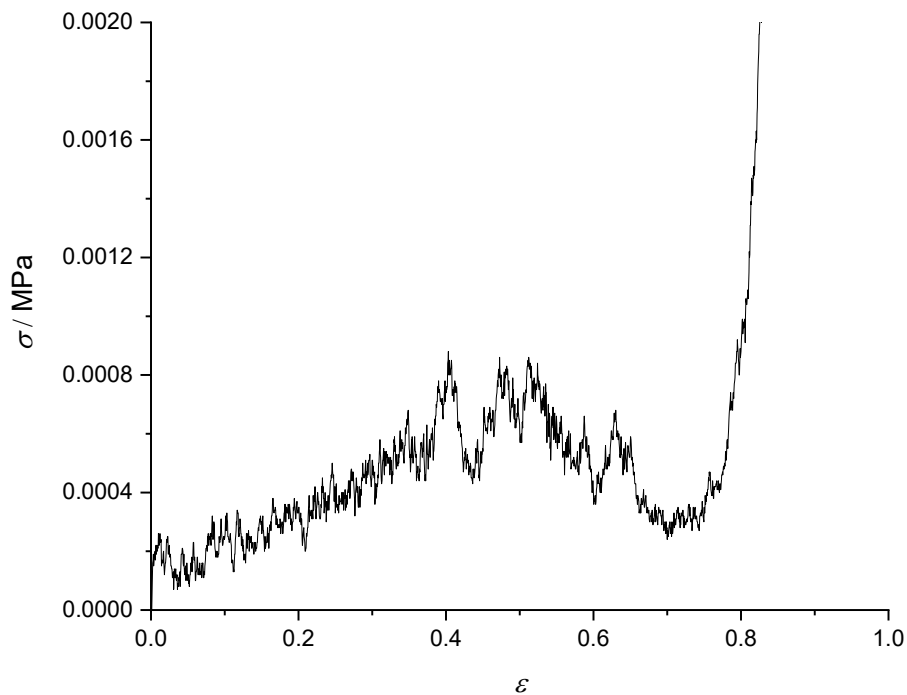


Abbildung 58: Beispiel für eine Druckprüfung einer Replik durch Messung einer Spannungs-Dehnungs-Kurve ohne Polymerbeschichtung. Die Replik wog 16.5 mg und besaß die Maße von 8 mm<sup>3</sup>.

Die sehr geringe Druckspannung mit einem Maximum um 0.0008 MPa beschreibt den empfindlichen Habitus der Repliken. Auffällig ist der graduierte Verlauf der Messkurve, was einerseits auf das spröde Silicamaterial zurückzuführen ist, andererseits auch auf der Schwammstruktur des Materials basiert. So bieten manche Schichten mit mehr Trabekeln mehr Widerstand, welcher nach deren Brechen schwindet, bis zu einem erneuten Maximum. Der Anstieg deutet an, dass die Bruchstücke teilweise aufliegen und zum Gesamtwiderstand beitragen, bis sie nahezu pulverisiert werden. Es ist sehr deutlich, dass das ausgewählte Silicamaterial sich sowohl sehr gut als Formgebung der Schwammstruktur eignet, als auch Mesoporen für ein Freisetzungssystem bereitstellen kann. Der exemplarische Drucktest zeigt jedoch das Defizit in den mechanischen Eigenschaften, sodass aus den Erkenntnissen der uniaxialen Zuguntersuchungen (vgl. Kapitel 5.1.6) der Nachteil kompensiert werden soll, indem ein Kompositmaterial mit dem Polymer aufgebaut wird.

In Abbildung 59 sind beispielhaft die Kompressionstests der Proben von PGPS20@SiCa gezeigt. Zu den chemischen und mechanischen Untersuchungen sind insgesamt pro Sorte mindestens 38 Scaffolds als Probenkörper hergestellt worden.

Hieraus wurden fünf Proben ausgewählt, die dem lokalen Mittelwert der Masse dieser Sorte entsprechen (schwarz), fünf Proben, welche dem globalen Mittelwert über alle Probensorten hinweg zugeordnet werden können (rot), drei Proben, die das Maximalgewicht (grün) und drei Proben, die das Minimalgewicht (blau) repräsentieren.

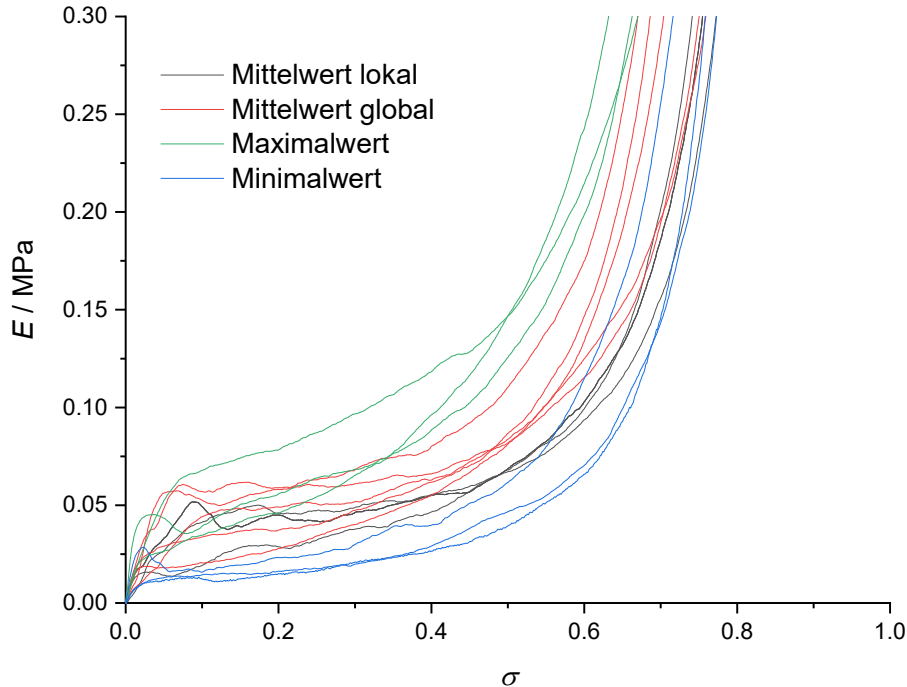


Abbildung 59: Darstellung der Kompressionstests von PGPS20@SiCa als Beispiel. Zu sehen sind fünf Messungen, die dem lokalen Mittelwert der Masse der speziellen Probe (schwarz) zugeordnet werden, fünf Messungen, die dem globalen Mittelwert in der Masse über alle Proben hinweg entsprechen (rot), drei Messungen mit einem Maximalgewicht (grün) und drei Messungen mit dem Minimalgewicht der Probenreihe.

Die Messkurven verschieben sich von den Minimalgewichten über die lokalen und globalen Mittelwerte zu den Maximalgewichten. Die höhere Polymermasse geht bis zu einem bestimmten Punkt mit einem höheren Widerstand einher, wo theoretisch ein ausgefüllter Würfel aus Polymer vorläge. Zur Bestimmung der E-Moduln ist besonders der erste lineare Anstieg der Messkurve von Bedeutung. Allgemein zeigen die Kurven einen glatten, überwiegend gleichförmigen Verlauf, wie es für ein elastisches Material zu erwarten ist. Dieser Verlauf ist zwar weniger gleichförmig als der der Zuguntersuchungen der reinen Polymere, aber es zeigt sich, dass das spröde Silica durch den Aufbau eines Kompositmaterials mit dem Polymer in ein elastisches Material überführt wurde. In Abbildung 60 ist eine Detailansicht der ersten 20 % des obigen Kompressionstests gezeigt.

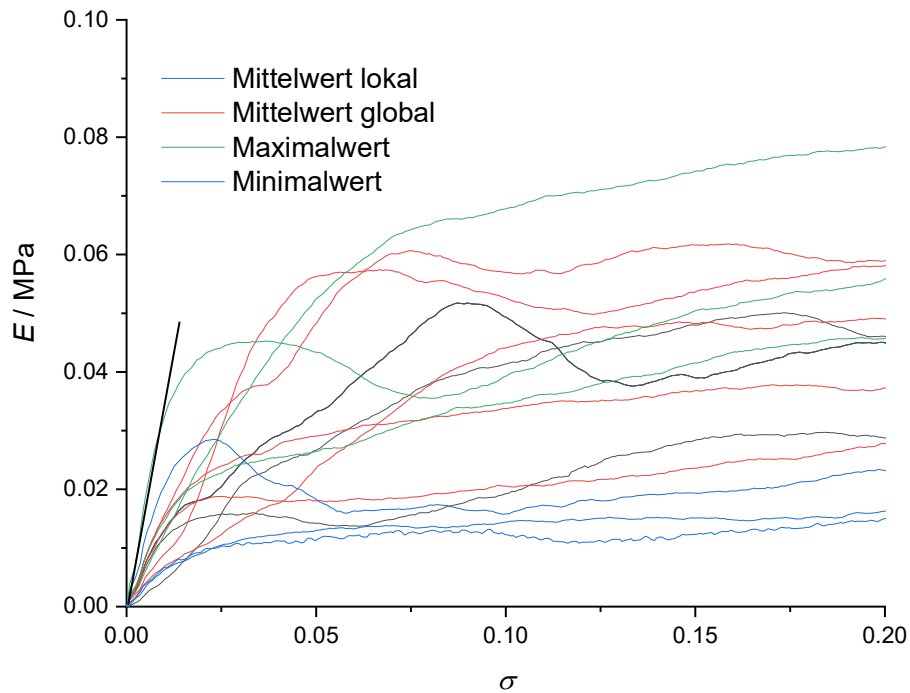


Abbildung 60: Detailansicht der ersten 20 % der Kompressionstests von PGPS20@SiCa als Beispiel. Zu sehen sind fünf Messungen, die dem lokalen Mittelwert der Masse der speziellen Probe (schwarz) zugeordnet werden, fünf Messungen, die dem globalen Mittelwert in der Masse über alle Proben hinweg entsprechen (rot), drei Messungen mit einem Maximalgewicht (grün) und drei Messungen mit dem Minimalgewicht der Probenreihe.

Die erste Steigung entspricht hier dem E-Moduln, was durch die schwarze Gerade für eine Messkurve des Maximalgewichts gezeigt ist. Einige Proben zeigen in ihrem Messverlauf lokale Maxima, die einen Punkt des größten Widerstandes darstellen. Dies kommt durch den ungeordneten Aufbau der Schwammstruktur, der Ausrichtung der Trabekel, sowie deren Beschichtung zustande.

In Abbildung 61 sind die ermittelten E-Moduln aller Proben dargestellt.

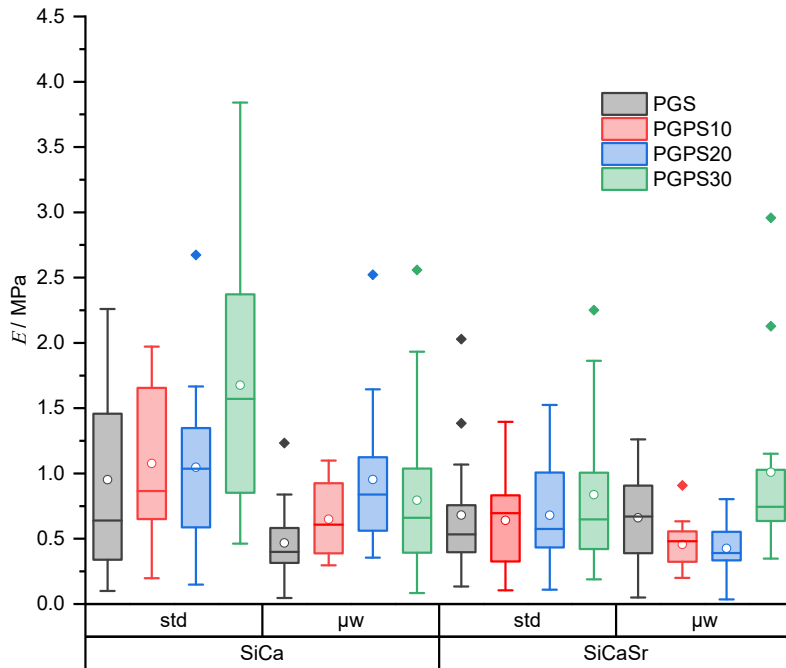


Abbildung 61: Darstellung aller ermittelten E-Moduln aller Proben ( $n = 16$ ) in einem Box-Plot-Diagramm.

Die E-Moduln bewegen sich für alle Proben von ca. 0.2 – 2.5 MPa, mit ein paar Ausreißern bis zu 4 MPa (PGPS30@SiCa). Die Probenreihe von PGS@SiCa bis PGPS30@SiCa zeigt die größten E-Moduln im Vergleich zum Rest. Dies wird durch einige wenige Probenmessungen nach oben getrieben. Eine Probe aus der Kategorie Minimalgewicht zeigt einen Wert von  $E = 3.8$  MPa und eine mit Maximalgewicht  $E = 2.9$  MPa. Der Wert von  $E = 2.6$  MPa findet sich bei einer Probe des lokalen Mittelwerts der PGPS30@SiCa-Reihe wieder. Es wird deutlich, dass ein hohes Gewicht nicht zwangsläufig mit einem hohen E-Modul einhergeht. Besonders die erste Probe bringt von ihrer Masse (64.7 mg), den Maßen (7.37 mm x 7.19 mm x 6.75 mm) und der resultierenden Dichte ( $0.18 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) keine Kenndaten mit, die ein außergewöhnlich hohes E-Modul vermuten lassen würden. Eventuell gab es Abweichungen in der Herstellung. Bei insgesamt 248 Proben liegen lediglich eine Handvoll Proben oberhalb von 2.5 MPa. Letztendlich schließt ein etwas höherer E-Modul die Probe nicht grundsätzlich von den verwendbaren Proben zur Implantation aus. Durch die bewusst gewählte, breite Probenauswahl in den Massen zeigt sich für alle Proben also ein ähnliches Bild. Offensichtlich haben die chemischen Veränderungen keinen großen Einfluss auf die Steifigkeit des Scaffolds. Der Großteil des verwendeten Materials ist nach wie vor bei allen das PGS, sodass dies eventuell das Gesamtbild dominiert. Die Kettenlängen der Harze aus der Mikrowellen- und konventionellen Synthese unterscheiden sich zwar signifikant laut GPC, allerdings hat dies nur begrenzten Einfluss auf die endgültigen mechanischen Eigenschaften.

Dies kann daran liegen, dass alle Proben im letzten Schritt bei 130 °C für 24 h quervernetzt werden, wodurch der endgültige Quervernetzungsgrad nicht so stark variiert. Zwischen den konventionell hergestellten Polymeren und den mikrowellensynthetisierten Polymeren lassen sich keine offensichtlichen Unterschiede ausmachen. Das Ziel hierbei ist jedoch auch nicht die mechanischen Eigenschaften zu verändern, sondern lediglich zu charakterisieren, ob Einflüsse durch die chemischen Modifizierungen vorliegen und um eine allgemeine Bewertung vorzunehmen, ob eine *press-fit* Implantation möglich sei. Durch den elastischen Charakter, welcher nach einer Kompression eine Entspannung zur Folge hat, ist Letzteres besonders gut durchführbar.

Eine alternative Betrachtungsmöglichkeit ist es, nicht die einzelnen Messkurven auszuwerten, sondern zu einer repräsentativen Messkurve aus den 16 Messungen zu mitteln. Hierzu wurde die Funktion „Kurven mitteln“ des Programms *OriginPro* verwendet, wobei jede Einzelkurve gleichgewichtet wurde. Diese gemittelten Messkurven sind in Abbildung 62 dargestellt. Es sind vier Quadranten zu sehen, die jeweils eine Variation aus konventioneller und Mikrowellensynthese, sowie der SiCa- und SiCaSr-Replik zeigen.

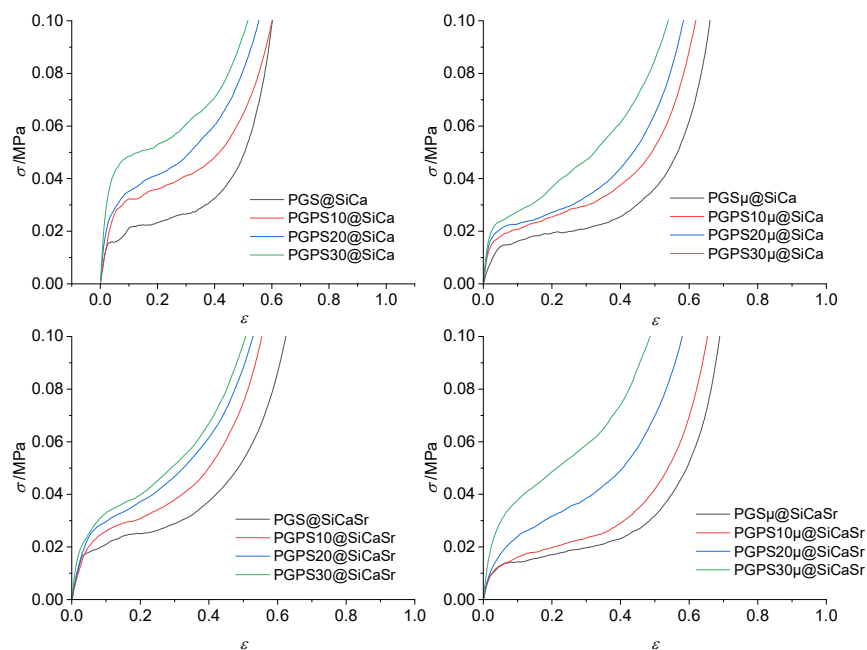


Abbildung 62: Darstellung der gemittelten Messkurven aus den Kompressionstests von allen Proben.

Hierbei ist über alle vier Quadranten hinweg gut erkennbar, wie mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat eine Verschiebung der Messkurven zu höheren Steifigkeiten stattfindet. Dieser Effekt kann aufgrund der im Schnitt höheren Masse auftreten oder aufgrund der höheren Quervernetzung der Phosphatvarianten. In Abbildung 63 sind die E-Moduln aus den beiden Betrachtungsansätzen dargestellt.

Die eckigen Symbole stellen die E-Moduln dar, die nach dem Mitteln aller Einzelkurven zu einer Kurve bestimmt wurden. Die runden Symbole stellen den Mittelwert der E-Moduln dar, welche aus den Einzelkurven ermittelt wurden. Die Übereinstimmung der beiden Herangehensweisen ist durch die Hintergrundfarben grün und rot gezeigt, was bedeutet, ob die Trends übereinstimmen oder gegensätzlich sind.

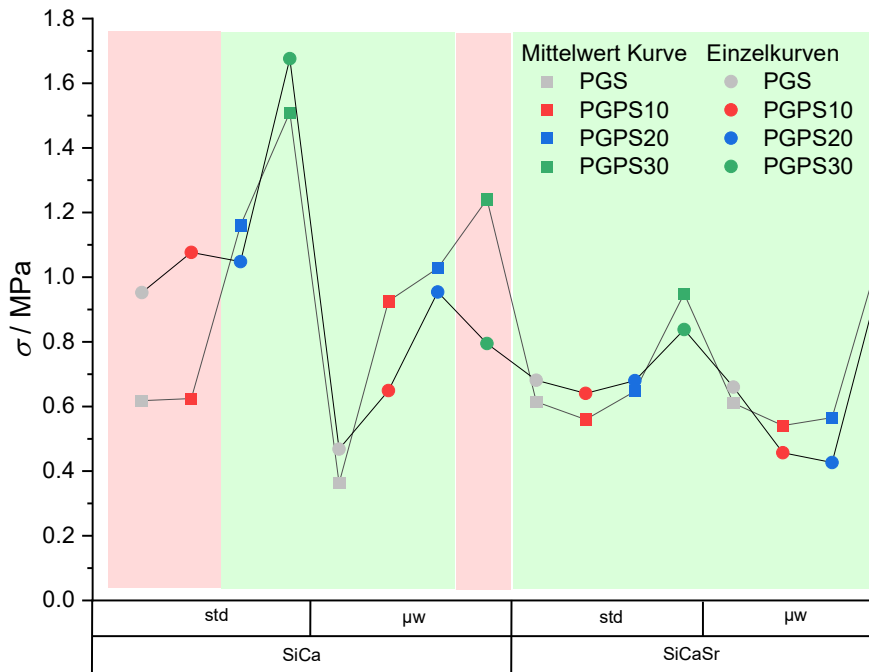


Abbildung 63: E-Moduln aus den beiden verschiedenen Betrachtungsansätzen. Die runden Symbole repräsentieren die E-Moduln, welche aus den einzelnen Messkurven bestimmt und anschließend gemittelt wurden. Die eckigen Symbole stellen die E-Moduln dar, welche nach Mitteln aller Messkurven einer Probe bestimmt wurden. In grün und rot sind die Bereiche hinterlegt, wo die beiden Betrachtungsansätze dem gleichen Trend folgen bzw. gegensätzliche Trends zeigen.

In der Gegenüberstellung zeigt sich ein gemischtes Bild. Für die Proben, welche das SiCaSr-Gerüst als Struktur besitzen, stimmen die Trends recht genau überein. Für die Proben PGS@SiCa und PGPS10@SiCa gehen die Werte stark auseinander, gleiches gilt für die Probe PGPS30 $\mu$ @SiCa. Auch das Ausschließen von Ausreißern aus der Betrachtung sorgte nicht für ein Angleichen der E-Moduln. Die Darstellungsweise der gemittelten Kurven hilft, die ermittelten Daten etwas zu vereinfachen und den Trend der höheren Steifigkeit mit ansteigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat zu zeigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kompressionstests keine kritischen Unterschiede zwischen den Proben hervorbringen, welche für die Anwendung berücksichtigt werden müssen. Die Untersuchungen der Massen und Dichten haben gezeigt, dass ein steigender Trend im Zusammenhang mit dem Anteil an Calciumglycerolphosphat existiert.

Zusätzlich haben die Untersuchungen des reinen Polymers gezeigt, dass die aus den NMR-Untersuchungen bekannten höheren Quervernetzungen zu höheren E-Moduln in uniaxialen Zuguntersuchungen geführt haben. Hierbei war der Spitzenwert für PGPS30 4 MPa. Diese Erkenntnisse ließen sich nicht so eindeutig auf das Kompositmaterial übertragen. Weiterhin scheint der E-Modul durch die Makroporosität der Schwammstruktur begrenzt zu sein, weil die Hohlräume nicht zur Stabilität beitragen, aber für eine Vaskularisierung von Nöten sind und dafür, dass sich Zellen ansiedeln können, damit eine erfolgreiche Heilung stattfinden kann. Die mechanischen Eigenschaften sind aber letztendlich nicht als Nachteil zu verstehen, weil sie keinen Zielwert erreichen sollen. Es muss lediglich von der Handhabbarkeit gewährleistet sein, dass eine Implantation möglich ist. Allerdings ist zu bedenken, dass die mechanischen Eigenschaften mit der Masse des Scaffolds und der Art des Polymers zusammenhängen. Das bedeutet, dass etwaige Änderungen an der Zusammensetzung, um bestimmte Ionenkonzentrationen für Freisetzungsexperimente zu erreichen, in einem Rahmen stattfinden müssen, in dem die elastische Eigenschaft erhalten bleibt. Das Knochenregenerationsmaterial kann für einen nicht-lasttragenden Knochendefekt verwendet werden, denn trotz der elastischen Eigenschaften, liegt der E-Moduln der Spongiosa mit 50 – 500 MPa deutlich höher.<sup>[212]</sup>

### 5.2.6 Freisetzungsexperiment

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Freisetzungsexperimente beschrieben. Diese wurden im Rahmen der Masterarbeit von LISA GÜLKER durchgeführt. Die Proben zur Untersuchung der Freisetzung von Calcium, Phosphat und Orthokieselsäure sind von MARVIN LIETZOW hergestellt worden, die Proben zur Untersuchung von Strontium im Rahmen der oben genannten Masterarbeit. Nach Kapitel 4.4 sollte das Potential der Scaffolds zur Freisetzung und Degradation untersucht werden. Im Anhang (Kapitel 8) finden sich in Abbildung 101 bis Abbildung 104 die Freisetzungskurven nach den Tagen der Freisetzung wieder. Ebenfalls im Anhang befinden sich in Tabelle 15 bis Tabelle 18 die einzelnen Messergebnisse pro Messzeitpunkt sowohl kumulativ als auch die Einzelwerte.

#### Calcium

In Abbildung 64 ist die kumulative Freisetzung von Calciumionen über 65 Tage nach äquidistanten Messpunkten gezeigt. Dies dient der besseren Darstellung gegenüber der Zeit nach Tagen, weil die verschiedenen Zeitabstände zwischen den Messpunkten (bspw. durch Wochenenden) das Interpretieren des Kurvenverlaufs erschweren.

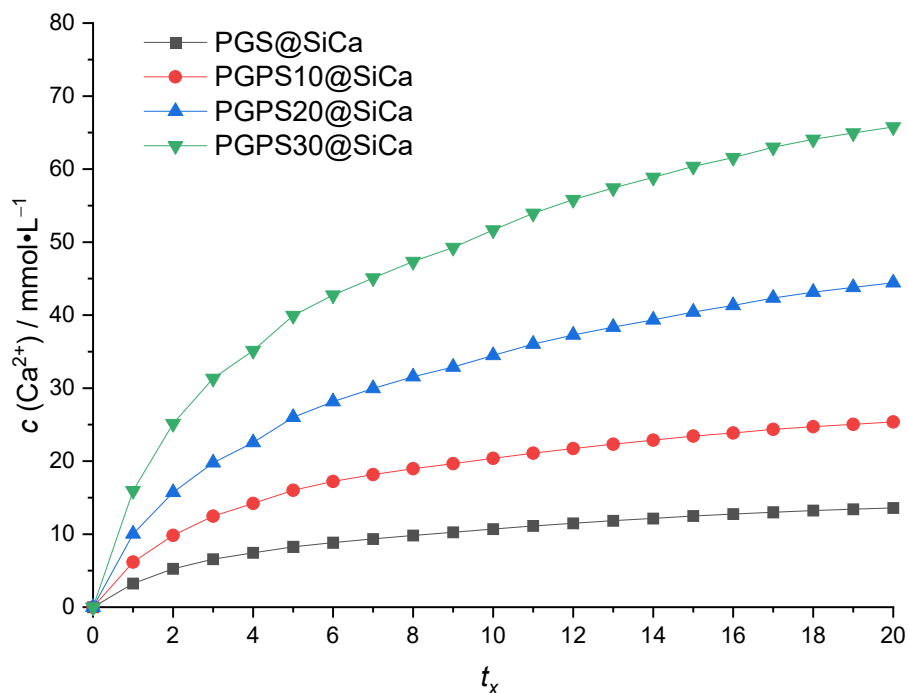


Abbildung 64: Kumulative Konzentrationen freigesetzter Calciumionen nach äquidistanten Messpunkten über 65 Tage in SIEM-n bei 37 °C.

Die freigesetzten Calciumionen können sowohl aus der SiCa-Replik stammen, als auch aus der mit Calciumglycerolphosphat modifizierten Version des Polymers. Grundsätzlich scheinen alle Probensorten über die ersten vier Messpunkte etwas größere freigesetzte Konzentrationen zu zeigen.



Es scheinen leicht aufzulösende oder nicht reagierte, salzartige Bestandteile in Lösung zu gehen. Die Freisetzungskurven entsprechen einem *continuous release*. Im Falle des Polymers können die Esterbindungen gespalten werden oder organisch gebundene Phosphatgruppen in Lösung gehen, wodurch auch die angelagerten Calciumionen in Lösung gehen. Bereits alleinig aus dem SiCa-Gerüst lassen sich über 65 Tage  $13.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Calciumionen freisetzen. PGPS10 zeigt eine freigesetzte Konzentration von  $25.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PGPS20 von  $44.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und PGPS30 von  $65.8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Wird nur der Beitrag des Polymers zur Freisetzung betrachtet, indem der Wert der SiCa-Replik subtrahiert wird, so ergeben sich die Werte, welche nachfolgend in Tabelle 12 zusammengefasst sind.

Tabelle 12: Kumulative freigesetzte Konzentrationen von Calciumionen über 65 Tage. Von den Gesamtwerten der Proben der Phosphatvarianten wurde der Wert von PGS@SiCa abgezogen, um den Einfluss des Polymers zu bewerten.

Probe	$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$c(\text{Ca}^{2+}) - c(\text{Ca}^{2+}; \text{PGS}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$c(\text{Ca}^{2+}) / \%$
PGS@SiCa	13.6	-	-
PGPS10@SiCa	25.4	11.8	100
PGPS20@SiCa	44.4	30.8	262
PGPS30@SiCa	65.8	52.2	443

Aus der prozentualen Betrachtung der freigesetzten Menge lässt sich schließen, dass durch die Erhöhung des Anteils an Calciumglycerolphosphat die kumulative freigesetzte Konzentration von Calciumionen äquidistant, allerdings nicht linear steigt. So scheint eine Erhöhung des Anteils um 10 % zu einer Steigerung der freigesetzten Calciumionen um den Faktor von ca. 2.5 zu führen. Dies lässt sich eventuell darauf zurückführen, dass mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat ein größerer Teil davon nicht reagiert im Polymernetzwerk vorliegt oder Calciumphosphat häufiger als anorganische Ausscheidung auftritt. Weiterhin ist zu beachten, dass die Massen der Scaffolds pro Beschichtungsvorgang nicht identisch sind, mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat im Polymer haftet auch pro Beschichtungsvorgang mehr Polymer auf einer Replik. Eine physiologische Wirksamkeit der freigesetzten Ionen ließe sich letztendlich nur im Tiermodell in einer Untersuchung der Ossifikation klären, wie aber bereits in Kapitel 2.1.2 erläutert, liegt die physiologische Wirksamkeit im einstelligen Konzentrationsbereich von  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . In einem ersten Experiment liegen die freigesetzten Konzentrationen bereits lediglich eine Potenz unterhalb des Bereichs, wenn die Einzelwerte pro Messpunkt der freigesetzten Konzentrationen von Calciumionen aus Tabelle 15 im Anhang herangezogen werden.

Hierbei ist das Zusammenspiel mit der Physiologie des Patienten entscheidend, weil das Knochenregenerationsmaterial den Körper bei der Heilung unterstützen soll und nicht gänzlich dafür verantwortlich ist. Es ist denkbar, dass die zusätzlichen Heilungsprozesse und körpereigenen, bereitgestellten Ionen in Kombination mit den freigesetzten Ionen aus dem Scaffold die kritische Marke zur vollständigen Regeneration eines Knochens überschreitet, wo ohne Knochenregenerationsmaterial ansonsten nur eine geringe Knorpelbildung stattgefunden hätte. Über die ersetzte Menge an Glycerol durch Calciumglycerolphosphat lässt sich die freigesetzte Konzentration an Calciumionen über einen weiten Bereich einstellen.

### Phosphat

Parallel wurde auch die Freisetzung von Phosphor aus den Scaffolds untersucht, wobei hier angenommen wurde, dass dies in Form der Spezies Phosphat stattfindet. Als einzige Quelle für Phosphor kommt das modifizierte Polymer infrage. In Abbildung 65 sind die kumulativen, freigesetzten Konzentrationen der Phosphationen gegen äquidistante Messpunkte über 65 Tage gezeigt. Hierbei wird auf eine Darstellung von PGS@SiCa verzichtet, weil die Messungen unterhalb der Nachweisgrenze lagen.

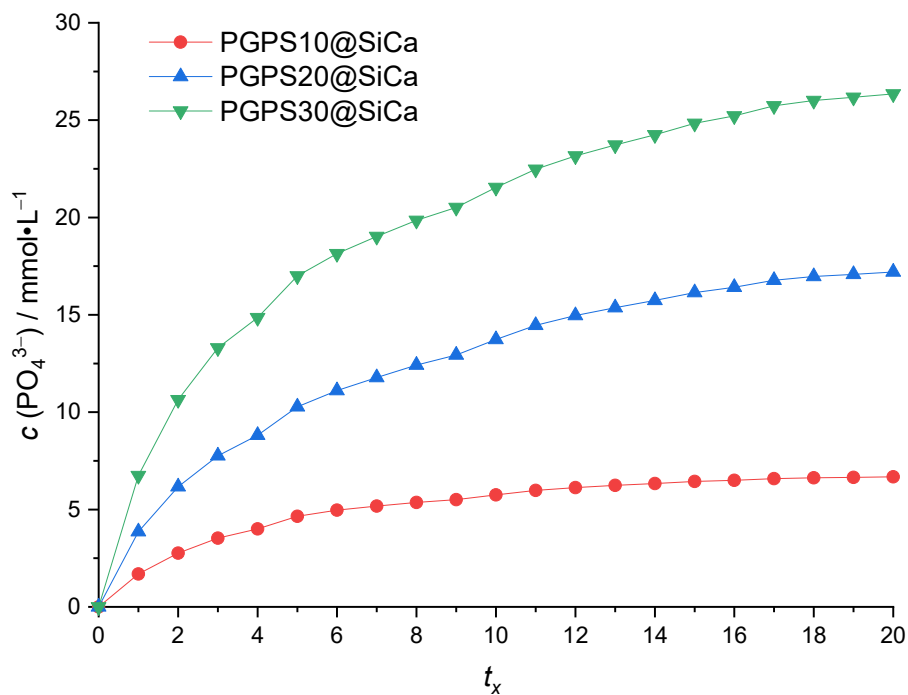


Abbildung 65: Kumulative Konzentrationen freigesetzter Phosphationen nach äquidistanten Messpunkten über 65 Tage in SIEM-n bei 37 °C.

Analog zur Freisetzungskurve der Calciumionen zeigt sich auch hier eine etwas höhere Konzentration an freigesetzten Phosphationen über die ersten vier Messpunkte, was insgesamt aber einem *continuous release* entspricht.

Nach insgesamt 65 Tagen wurde eine Gesamtmenge von  $6.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (100 %) von PGPS10@SiCa,  $17.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (257 %) von PGPS20@SiCa und  $26.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (394 %) von PGPS30@SiCa freigesetzt. Hierbei ist erneut auffällig, dass die Abstände zwischen den verschiedenen Scaffoldsorten grob äquidistant sind, wobei die freigesetzte Menge von Phosphat aus der PGPS30-Variante etwas geringer ausfällt im Vergleich zu der Calciumfreisetzung. Es könnte weiteres Phosphor in das Scaffold inkorporiert werden, indem anstatt einer SiCa-Replik eine SiCaP-Replik synthetisiert wird.<sup>[213]</sup> Dies würde vermutlich vor allem einen Beitrag zum *continuous release* leisten, weil die Auflösung der Silicastruktur über einen langen Zeitraum stattfindet. Zur physiologischen Wirksamkeit kann gesagt werden, dass zu den einzelnen Messpunkten Konzentrationen im Bereich von  $0.1$  bis  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  freigesetzt wurden. BOHNER et al.<sup>[214]</sup> hält für die Konzentration von Phosphat im Serum/Plasma von  $0.8 - 1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  und in der interstitiellen Flüssigkeit von  $0.61 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  fest. Die im Experiment freigesetzten Werte liegen in dem Bereich, in dem Phosphationen in einem gesunden Körper vorkommen, sodass ein positiver Effekt auf die Osteogenese möglich ist. Dies müsste in einer weiteren Studie im Tiermodell untersucht werden.

### Orthokieselsäure

Die Freisetzung von Orthokieselsäure kann ausschließlich aus den SiCa-Repliken erfolgen. In Abbildung 66 sind die kumulativen Konzentrationen der freigesetzten Orthokieselsäure nach äquidistanten Messpunkten über 65 Tage gezeigt.

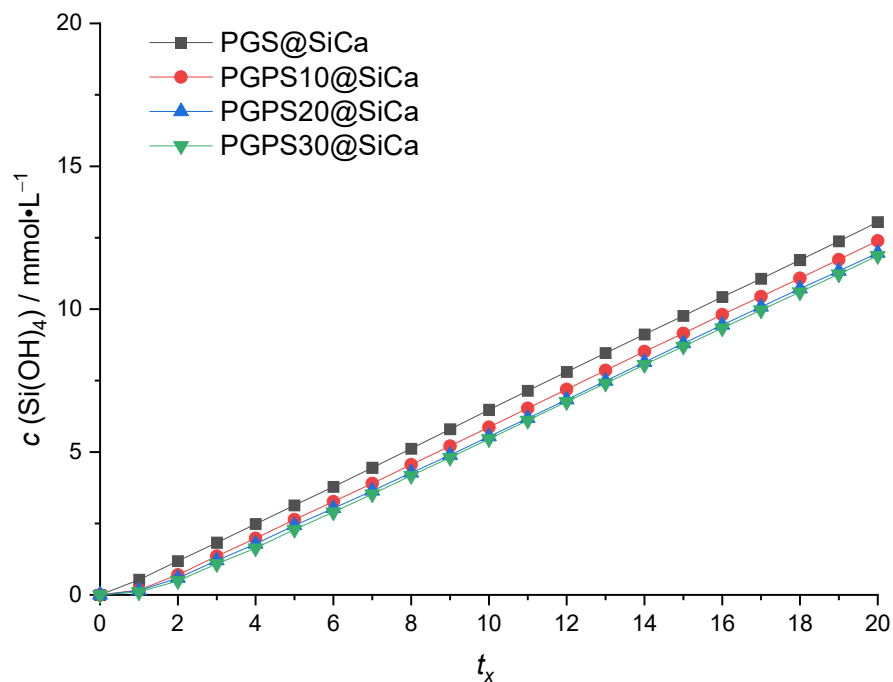


Abbildung 66: Kumulative Konzentrationen freigesetzter Orthokieselsäure nach äquidistanten Messpunkten über 65 Tage in SIEM-n bei  $37^\circ\text{C}$ .

Im Gegensatz zu den vorangegangenen Ionen zeigt sich im Falle der Freisetzung der Orthokieselsäure ein *steady release*. Im Vergleich dazu deutet die Darstellung der Freisetzung nach Messtagen in Abbildung 103 im Anhang einen *burst release* mit einem folgenden *continuous release* an. Die Löslichkeit von amorpher Kieselsäure wird mit  $120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  bei  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  angegeben, was umgerechnet ca.  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  entspricht.<sup>[215]</sup> Die Löslichkeit ist allerdings stark von der Kristallinität des Siliciumdioxid abhängig. Aus Tabelle 17 im Anhang ist ersichtlich, dass zu den einzelnen Messpunkten ca.  $0.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  im Schnitt freigesetzt wurden. Wahrscheinlich hat sich die Replik so schnell aufgelöst, dass sich das Medium mit Orthokieselsäure gesättigt hat. Vermutlich war durch kinetische Hemmung und der Herabsetzung der Löslichkeit durch den fremdionischen Zusatz der Ionen aus dem Medium und der anderen in Lösung gehenden Ionen der oben genannte thermodynamische Wert der Löslichkeit nicht erreichbar. Zur weiteren Untersuchung des Degradations- und Freisetzungsverhaltens sollte ein separates Experiment zur Untersuchung der Freisetzung von Orthokieselsäure durchgeführt werden, in dem das Medium häufiger gewechselt wird. SHIE et al. konnten zeigen, dass die Zellproliferation von MG-63 Zellen durch bis zu  $4 \text{ mM}$  Orthokieselsäure gesteigert werden kann. Eine Erhöhung auf  $6 \text{ mM}$  führt jedoch zu einer starken Apoptose. Gegenüber der Konzentration von  $6 \text{ mM}$  konnten Konzentrationen von bis zu  $4 \text{ mM}$  die Bildung von Kollagen und der Calcium-Matrix stimulieren.<sup>[42]</sup> Die freigesetzten Konzentrationen von Orthokieselsäure müssen sorgfältig eingestellt werden. Hierzu sollte die Kausalität zwischen der Anzahl der Beschichtungsvorgänge des Schwamms mit der Silica-Präkursorenlösung und der freigesetzten Konzentration beachtet werden.

### Strontium

Strontiumionen, welche freigesetzt wurden, stammen aus der Einlagerung in die Mesoporen bzw. dem Anhaften an der Oberfläche der Replik. In Abbildung 67 ist die kumulative Freisetzung von Strontiumionen über 14 Tage nach äquidistanten Messpunkten gezeigt.

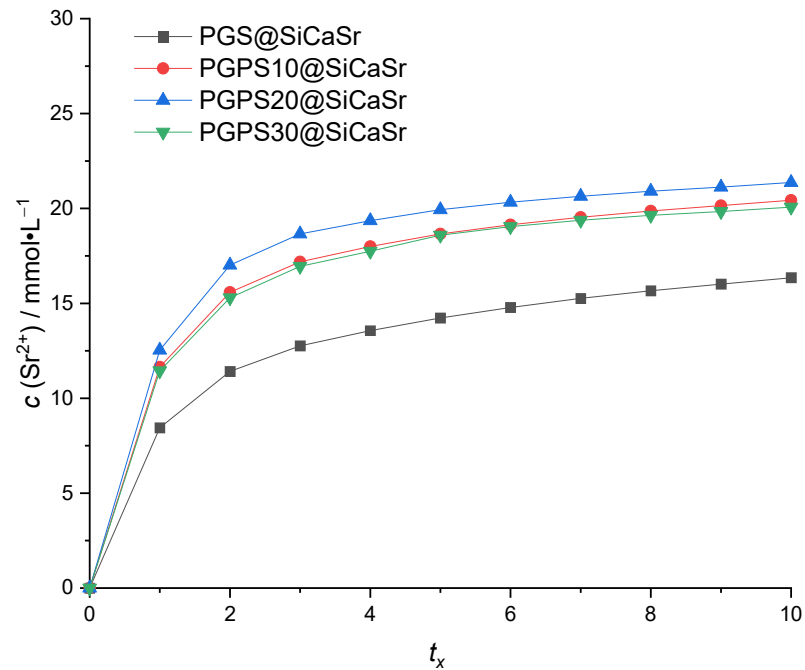


Abbildung 67: Kumulative Konzentration freigesetzter Strontiumionen nach äquidistanten Messpunkten über 14 Tage in SIEM-n bei 37 °C.

Es findet ein *burst release* über die ersten drei Messpunkte statt, dem ein *continuous release* folgt. Dies lässt sich vermutlich auf die beiden oben beschriebenen Anlagerungen zurückführen. Auf der Oberfläche anhaftendes Salz geht rasch in Lösung, wohingegen die Freisetzung von in den Mesoporen eingelagerte Ionen verzögert stattfindet. Grundsätzlich sollte es keine Unterschiede in den kumulativ freigesetzten Konzentrationen geben, jedoch wurde aus der Probe PGS@SiCaSr mit  $16.35 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  gegenüber ca.  $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  signifikant weniger freigesetzt, was vermutlich auf die händische Herstellung der Proben zurückzuführen ist. Aus Tabelle 18 im Anhang ist ersichtlich, dass für die einzelnen Messpunkte Konzentrationen zwischen  $0.1$  bis  $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  freigesetzt wurden. Laut AIMAITI *et al.* wirken Konzentrationen von Strontiumionen zwischen  $0.025$  bis  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  osteogen, wohingegen Konzentrationen von  $1 - 3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  zu einer erhöhten Apoptose der Stammzellen, welche ansonsten differenzieren würden, führen. Das bedeutet, dass die freigesetzten Konzentrationen im förderlichen Bereich lagen, aber das das Freisetzungssystem für Strontiumionen mit großer Sorgfalt zu designen ist, um einen schädlichen Bereich zu vermeiden. Generell könnte auch hier das Strontium im Sinne eines Netzwerkwandlers in das SiCa-Gerüst eingebaut werden.<sup>[216]</sup> Generell muss bei der Bewertung der Mengen an freigesetzten Ionen beachtet werden, dass *in vivo* dynamischere Prozesse ablaufen, wie beispielweise die Zirkulation von Körperflüssigkeiten.

### 5.2.7 Zytotoxizitätstest

Zur Charakterisierung des Verhaltens der Scaffolds in einer biologischen Umgebung wurde nach Kapitel 3.8.2 die Zytotoxizität untersucht. Hierzu wurde ein CellTiter-Blue™ Assay durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abbildung 68 dargestellt sind.

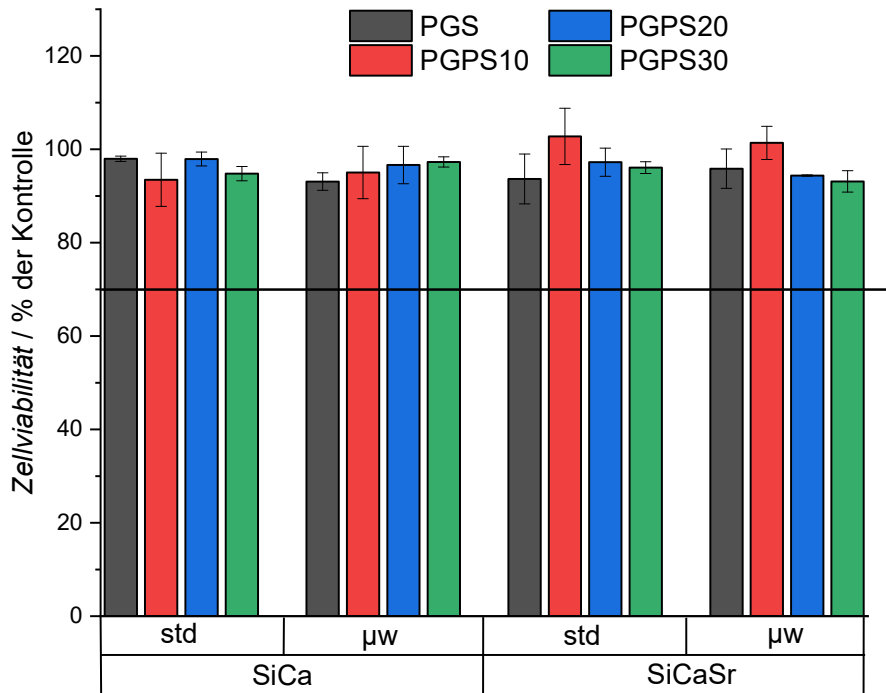


Abbildung 68: Ergebnisse des Zytotoxizitätstests. Die verwendeten DPSC wurden mit den Überständen der Scaffolds in einem CellTiter-Blue™ Assay untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse nach sechs Tagen gegen die Kontrolle. Es wurden DPSC der Firma LONZA in 100 µL  $\alpha$ -MEM (*minimum essential medium Eagle-alpha modification*, standardisiertes Nährmedium) verwendet, welches mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin und Streptomycin versetzt wurde, ausgesät bei 37 °C über Nacht bei 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Alle Scaffoldsorten liegen ausnahmslos im Bereich einer Zellviabilität von ca. 90 – 100 %. Somit zeigen die Scaffolds eine hohe Biokompatibilität jenseits der eingezeichneten, dafür nötigen 70 %. Dies ist ein sehr guter Hinweis darauf, dass sich die Scaffolds als biomedizinisches Material anwenden lassen, weil ihr Verweilen in einem biologischen Medium nicht dazu führt, dass umgebende Zellen sterben.

### 5.2.8 Zelladhäsionstest

Im folgenden Kapitel werden die Zelladhäsionsexperimente ausgewertet. Gemäß Kapitel 3.8.3 wurden DPSCs auf den Scaffolds angesiedelt und nach Kapitel 3.6.2 mithilfe der Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Für das Experiment wurde von jeder Sorte Scaffolds jeweils ein kleines und ein großes ausgewählt. Nachdem das Anwachsen der Zellen beendet wurde, die Zellen fixiert und die Proben getrocknet wurden, wurden Aufnahmen von der Außenfläche und der Innenfläche angefertigt. Hierzu wurden alle Scaffolds mittig mit dem Skalpell durchgeschnitten und mit Gold bedampft. Die Bühne im REM wurde auf einen Verkippungswinkel von 70° gekippt, sodass durch Rotation sowohl die innere Querschnittsfläche als auch die äußere Fläche zugänglich war. Zur Untersuchung wurde eine Übersichtsaufnahme erstellt, welche beispielhaft in Abbildung 69 gezeigt ist.

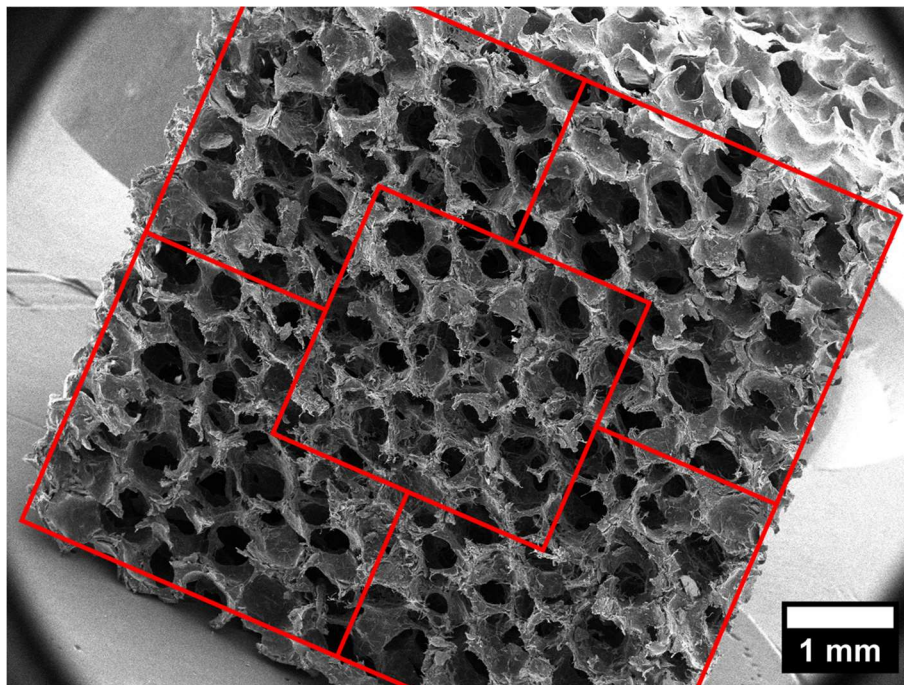


Abbildung 69: REM-Aufnahme des gesamten Querschnitts eines Scaffolds. In Rot sind beispielhaft die Sektoren eingezeichnet, bei denen die Scaffolds bei 30-facher Vergrößerung hinsichtlich der Zelladhäsion untersucht wurden.

Von jeder Probe wurden neben der Übersichtsaufnahme fünf Aufnahmen bei 30-facher Vergrößerung (roter Rahmen) und jeweils zwei bei 50-facher und 250-facher Vergrößerung erstellt. Zur Bewertung der Zelladhäsion am Scaffold wurden gemäß Abbildung 69 die fünf Sektoren in 30-facher Vergrößerung aufgenommen. Hierbei sollte die Zelladhäsion bewertet werden, indem die Dichte der DPSCs bestimmt wurde. Eine beispielhafte REM-Aufnahme von DPSCs ist in Abbildung 70 gezeigt. Die auswachsenden Dendriten sind gut erkennbar.



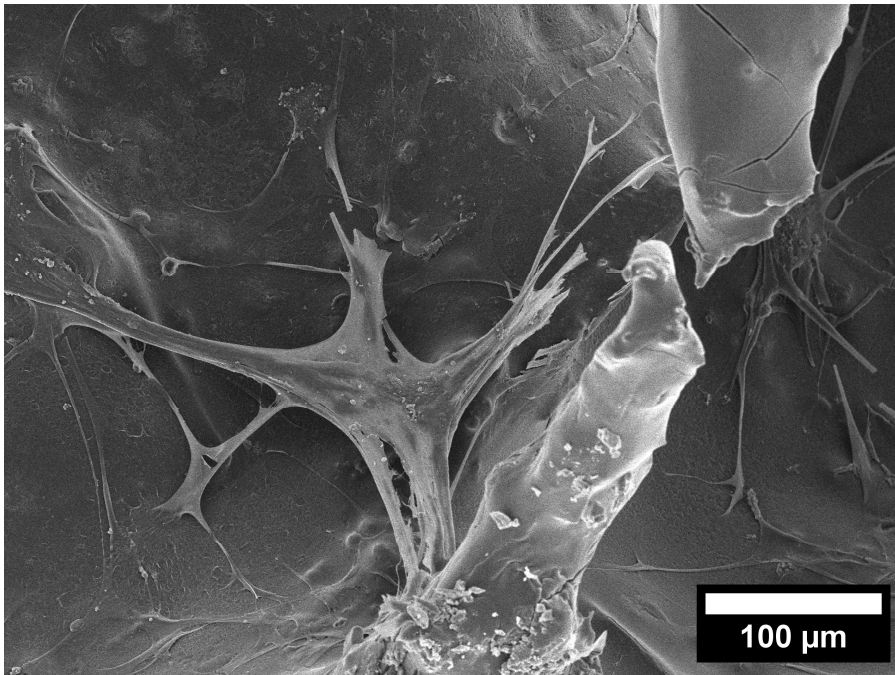


Abbildung 70: Beispielhafte REM-Aufnahme einer DPSC auf der Oberfläche eines Scaffolds der Sorte PGPS30@SiCaSr (außen); die Dendriten der Zellen sind gut erkennbar.

Zur Beurteilung der Zelldichte werden fünf Stufen einer Skala definiert, welche in Tabelle 13 dargestellt sind.

Tabelle 13: Skala zur Beurteilung des Besiedelungsgrads der Scaffolds mit DPSCs.

(nahezu) blank
sehr wenig bewachsen
bewachsen
stark bewachsen
überwuchert

Es wird zwischen nahezu blanken (Abbildung 71), sehr wenig bewachsenen (Abbildung 72), gleichmäßig bewachsenen (Abbildung 73), gleichmäßig stark bewachsenen (Abbildung 74) und überwucherten Proben (Abbildung 75) unterschieden. Die Auswertung der REM-Aufnahmen erfolgte nach subjektiver Beurteilung. Hierbei zeigen manche Proben inhomogene Besiedlung, sodass dies durch die Einteilung in die Sektoren wiedergegeben wird.



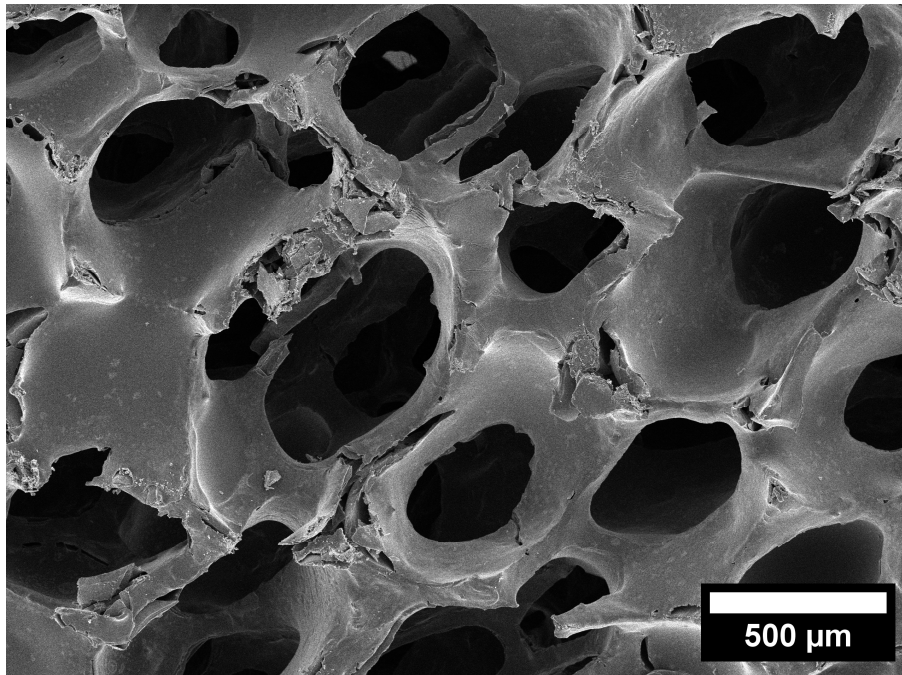


Abbildung 71: REM-Aufnahme der Außenseite einer (nahezu) blanken Probe von PGS@SiCa.

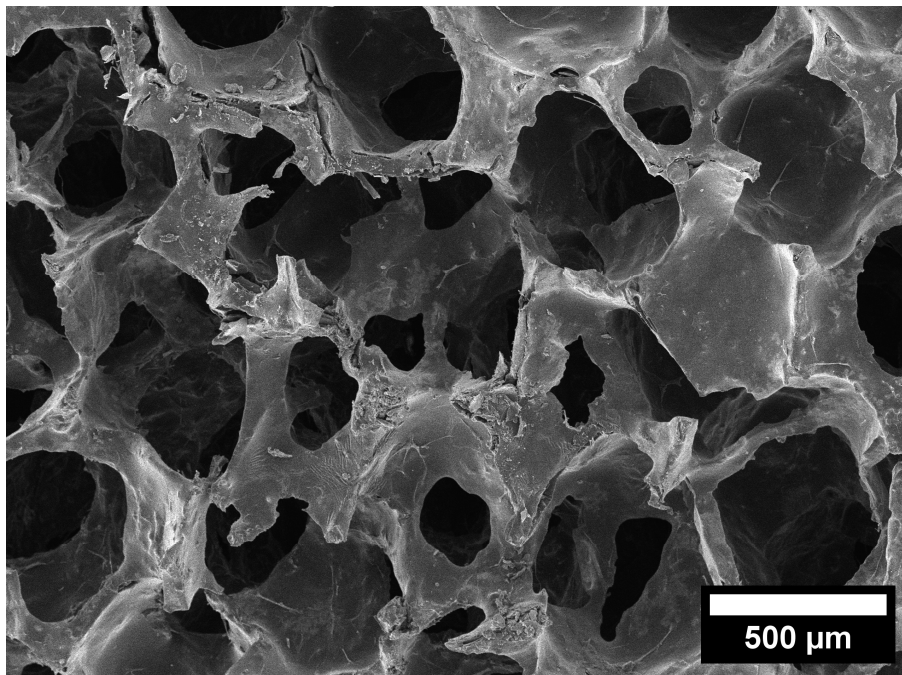


Abbildung 72: REM-Aufnahme von der Außenseite einer sehr wenig bewachsenen Probe von PGS20@SiCa.

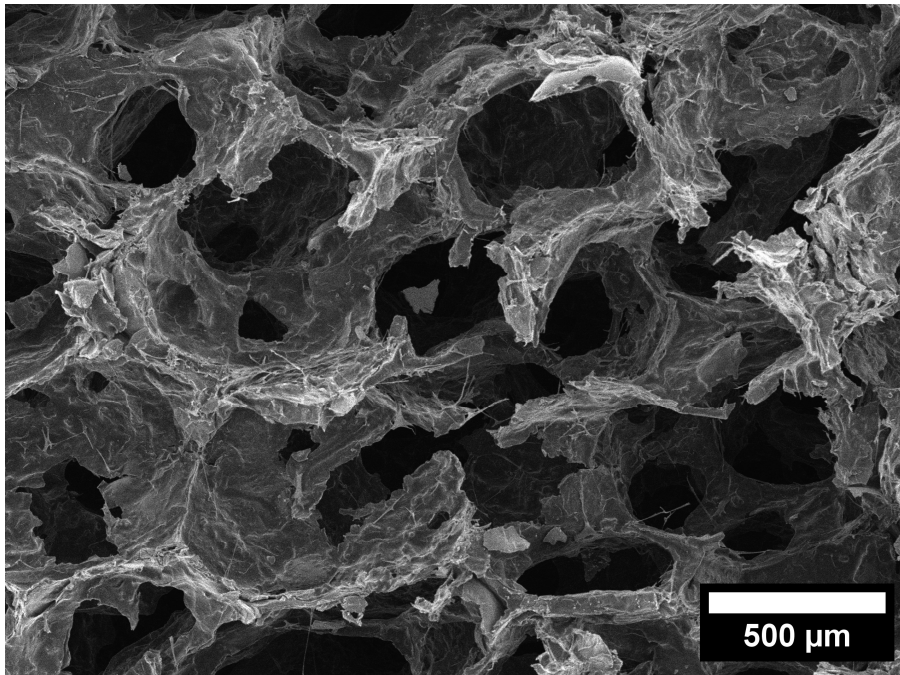


Abbildung 73: REM-Aufnahme von der Außenseite einer bewachsenen Probe von PGPS10@SiCaSr.

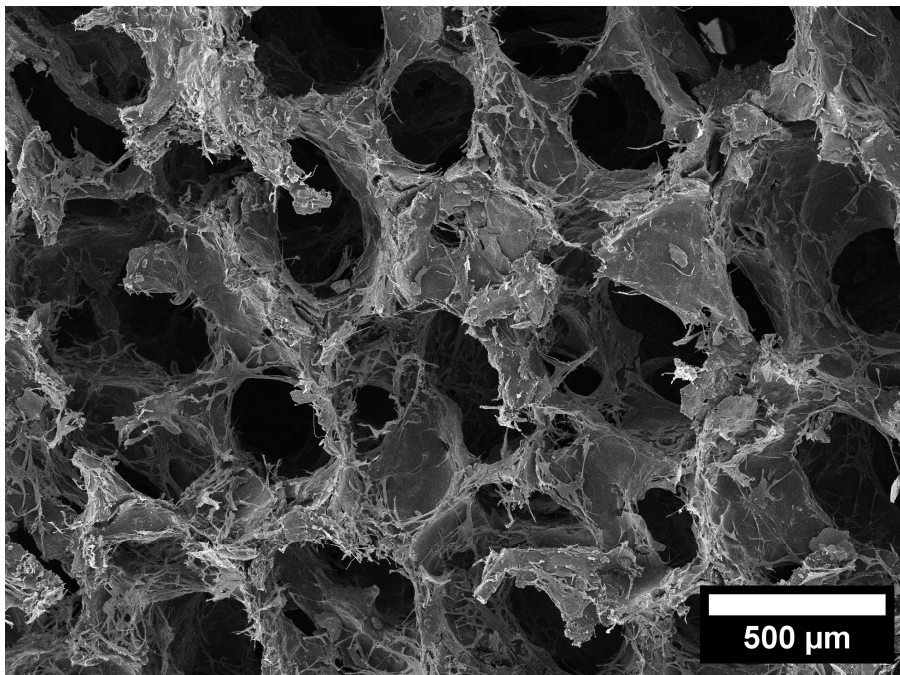


Abbildung 74: REM-Aufnahme von der Innenseite einer stark bewachsenen Probe von PGPS10@SiCaSr.

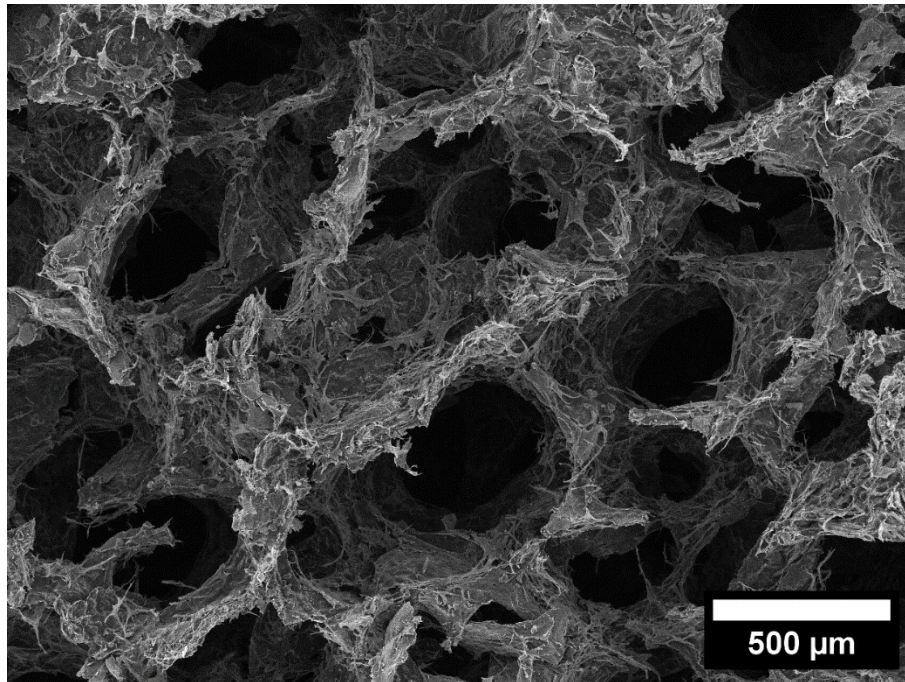


Abbildung 75: REM-Aufnahme von der Innenseite einer überwucherten Probe von PGPS20@SiCa.

Gemäß den fünf Sektoren, wie sie in Abbildung 69 gezeigt sind, wird eine schemenhafte Darstellung des Scaffolds gezeigt, indem jeder Sektor nach der Skala für sich bewertet wurde. Das Farbspektrum spiegelt die Dichte der adhärenierten Zellen wider. In Abbildung 76 ist die schematische Darstellung eines Scaffolds mit den fünf Sektoren und der Farbskala zur Wiedergabe der Zelldichte gezeigt.

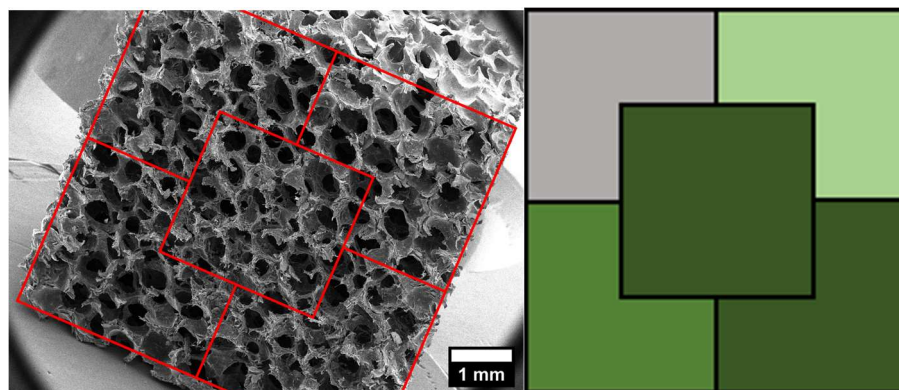

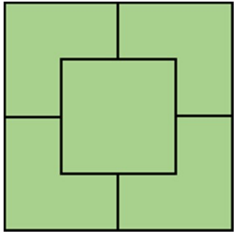
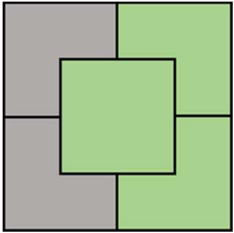
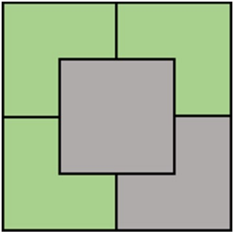
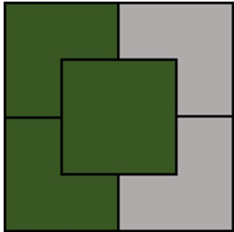
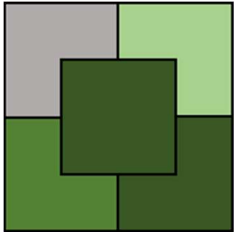
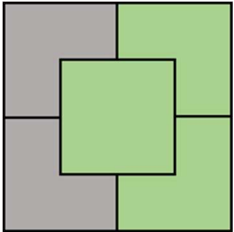
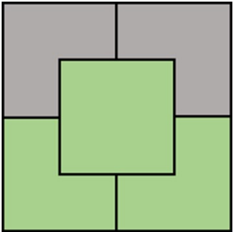

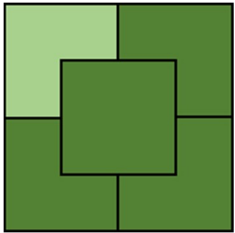
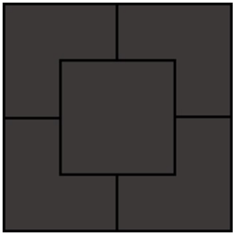
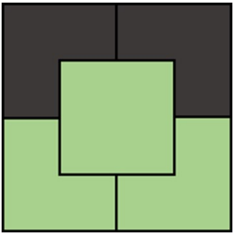
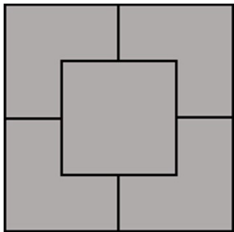
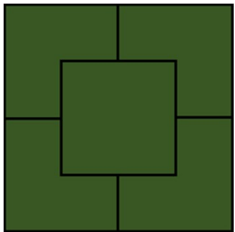
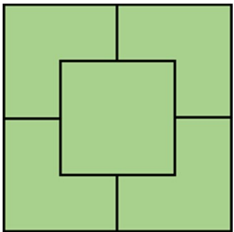
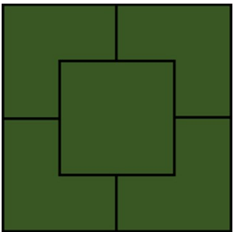
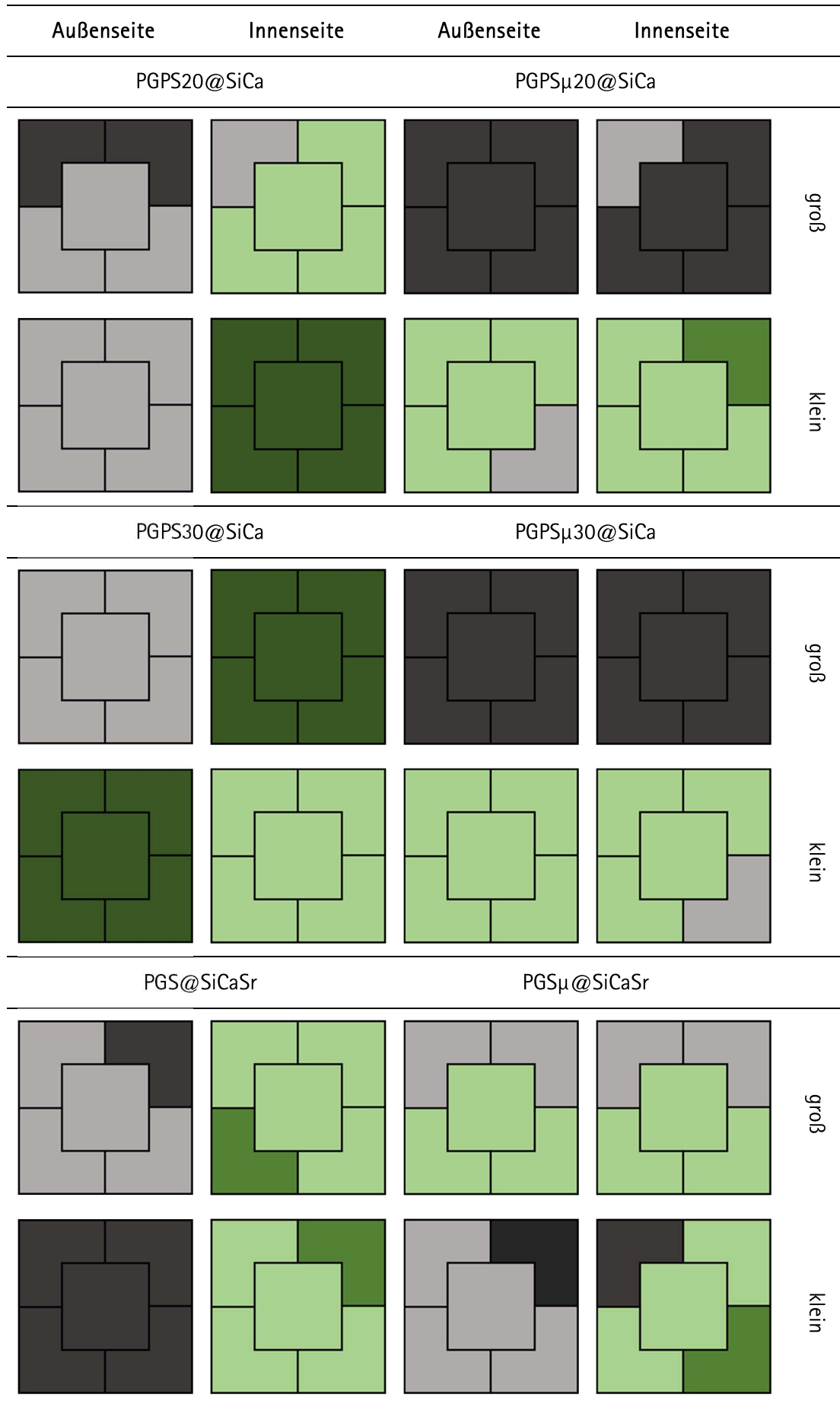


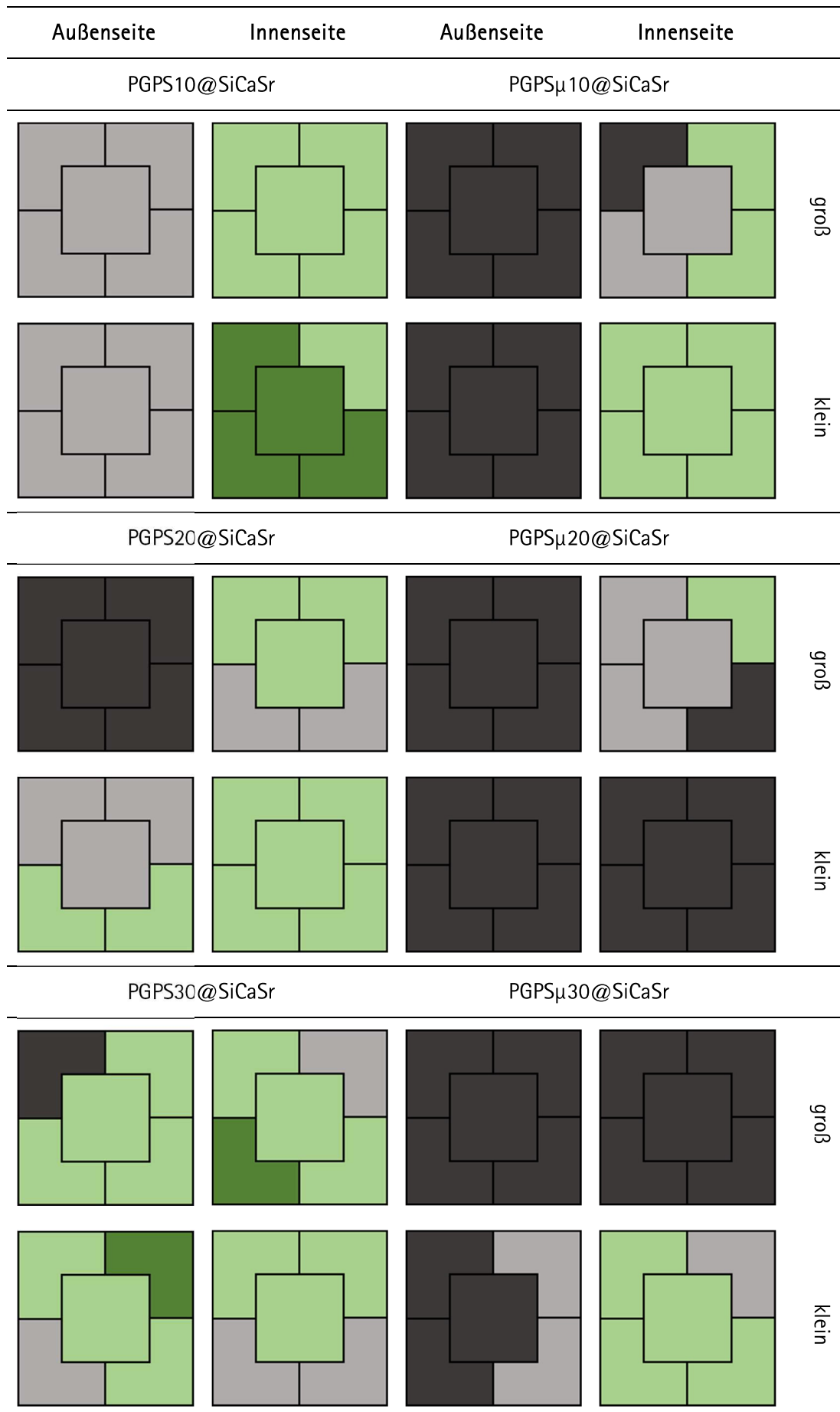
Abbildung 76: Schematische Darstellung eines Scaffolds bestehend aus fünf Sektoren und der Farbskala zur Bewertung der Zelldichte.

Die Untersuchung wurde für die Innenseite und die Außenseite vorgenommen, wobei pro Scaffoldsorte eine große und eine kleine Probe untersucht wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Tabelle 14: Ergebnisse der Untersuchung der Zelladhäsion. Pro Scaffoldsorte sind je eine große und eine kleine Probe untersucht worden. Zusätzlich wurde die Innen- und Außenseite betrachtet.

Außenseite	Innenseite	Außenseite	Innenseite	
PGS@SiCa		PGS $\mu$ @SiCa		
				groß
				klein
PGPS10@SiCa		PGPS $\mu$ 10@SiCa		
				groß
				klein





Hinsichtlich der Dichte der adhärerten Zellen auf den Proben ergeben sich inhomogene Bilder. In der Regel finden sich im Inneren des Scaffolds mehr Zellen wieder als auf den Außenflächen. Ein Grund hierfür kann der Vergleich von einem dreidimensionalen Raum im Inneren mit einer zweidimensionalen Fläche im Äußeren sein. Durch die offenporige Struktur im Inneren finden die Zellen viele Möglichkeiten zu adhären, wohingegen auf der Außenfläche vor allem die Grenzfläche von Medium und Scaffold vorliegt. Denkbar ist auch, dass Inhomogenitäten der Beschichtungen der Replik mit dem Polymer zu Bereichen führen, in denen die Zellen besser adhären können. Dass eine Adhäsion grundsätzlich möglich ist, ist essenziell für die Anwendung als Knochenregenerationsmaterial, weil sich so körpereigene Zellen im Porensystem ansiedeln und Blutgefäße gebildet werden können. Innerhalb der Reihe von PGS@SiCa bis PGPS30@SiCa zeigt sich, dass eine Beschichtung mit der Phosphatvariante des Polymers zu homogenen, überwucherten Zelldichten führt. Das PGS zeigt ebenfalls das Potential zur Überwucherung, jedoch nicht in der Homogenität wie die Phosphatvarianten.

Wird der Einfluss der Inkorporation von Strontium untersucht, so nimmt die Zelldichte für die Reihe von PGS@SiCaSr bis PGPS30@SiCaSr um mindestens eine Stufe ab; hier lassen sich keine Überwucherungen finden. Einige Proben zeigen jedoch lokal das Potential zur dichten Besiedelung mit Zellen. Die Besiedelung der Außenseite zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Beim Vergleich der Herstellungsart des Harzes ergibt sich zwischen PGS@SiCa etc. mit der Reihe von PGS $\mu$ @SiCa bis PGPS30 $\mu$ @SiCa eine schlechtere Performance hinsichtlich der Zelladhäsion für die Mikrowellenvariante. Allerdings zeigt PGPS10 $\mu$ @SiCa ein exzellentes Ergebnis auf der Innenseite, sodass ein mikrowellensynthetisiertes Polymer ebenfalls das Potential zur Überwucherung besitzen kann.

Wird nun die Probenreihe mit zusätzlichem Strontiumchlorid herangezogen (PGS $\mu$ @SiCaSr) und mit der PGS@SiCa-Reihe verglichen, ergibt sich besonders für die Außenseite ein schlechteres Bild. Nur auf einer Probe lässt sich auf der Außenseite eine lokale Bewachung von Zellen feststellen, der Rest ist durchweg nahezu blank. Auf der Innenseite lassen sich für fast jede Probe auch nahezu ein Sektor finden, welcher (nahezu) blank ist. Beide Proben von PGPS $\mu$ 20@SiCaSr zeigen fast keine Tendenzen, dass Zellen adhären können, ebenso für eine Probe von PGPS30 $\mu$ @SiCaSr. Offensichtlich führt die Kombination beider Modifizierungen am Ausgangssystem zu einer signifikanten Veränderung, sodass kein Adhären von Zellen möglich erscheint.

Auffällig ist, dass bei der Betrachtung des Calciumglycerolphosphat-Anteils am Polymer über die verschiedenen Synthesewege hinweg die Varianten mit 10 % zu den besten Adhäsionsergebnissen geführt haben.



Es lässt sich festhalten, dass sowohl durch die Verwendung der Mikrowellensynthese als auch durch die Beladung mit Strontium die Dichte an adhärenierten Zellen reduziert wird. Allerdings lassen sich in der Regel noch große Bereiche mit Zellen wiederfinden. Lediglich 4 von 64 Proben zeigten auf der Innenseite eine durchweg (nahezu) blanke Oberfläche. In zukünftigen Experimenten sollte eine Quantifizierung des Zellmaterials durch spätere Ablösung durch das Verwenden von fluoreszenten Zellen in Betracht gezogen werden, um genauere Aussagen zu erhalten. Parallel sollte die Untersuchung mit mesenchymalen Stammzellen, Progenitorzellen, Osteoblasten, und -klasten wiederholt werden.



### 5.2.9 Untersuchung im Tiermodell

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse aus den Untersuchungen im Tiermodell vorgestellt. Es wird begonnen, indem aus den beiden Testgruppen PGS@SiCa und PGPS20@SiCa Daten aus der Intravitalmikroskopie zu den gebildeten Blutgefäßen mit Daten aus der Literatur verglichen werden. Anschließend werden eine mögliche Immunreaktion anhand der Leukozytenzahl bewertet und die Dichte der gebildeten Kapillare über die Zeit quantifiziert. Als letztes werden Zellfärbungen von histologischen Schnitten evaluiert.

Der Tiermodellversuch ist mit neun von elf Mäusen pro Gruppe gestartet, jeweils zwei sind aufgrund eines schlechten Allgemeinzustands direkt zu Beginn ausgeschieden. In der Gruppe PGS@SiCa sind drei Mäuse und in PGPS20@SiCa zwei Mäuse nach Tag 10 ausgeschieden. Dies ist ebenfalls auf einen schlechten Allgemeinzustand oder auf die starke Verkipfung der Kammer auf dem Rücken zurückzuführen. Eine direkte Kausalität im Sinne einer Infektion am Implantat oder Ähnliches konnte nicht festgestellt werden, kann aber auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Grundsätzlich ist es ein gutes Resultat, dass ein Großteil der Mäuse bis zum Ende des Experiments gelebt hat.

In Tabelle 19 im Anhang sind die wichtigen Kenndaten zu den Blutgefäßen aus der Intravitalmikroskopie gesammelt. Zu jedem Messtag wurden der durchschnittliche Venolendurchmesser  $d$  (Venole), die Scherrate  $\gamma$ , welche das Verhältnis von Venolendurchmesser zur Fließgeschwindigkeit des Blutes  $v$  beschreibt, und der Blutfluss  $Q$  bestimmt. Die Fließgeschwindigkeit ergibt sich aus  $Q = \pi \cdot (d/2)^2 \cdot v / 1.6$ , wobei  $d$  der Venolendurchmesser ist und  $v$  die Fließgeschwindigkeit des Blutes ist. Mit 1.6 ist der Baker-Weyland Faktor gemeint, welcher zur Beschreibung der Effekte von roten Blutkörperchen auf den Blutfluss genutzt wird.<sup>[217]</sup> Die Scherrate  $\gamma$  berechnet sich nach  $\gamma = 8 \cdot v / d$ , mit den vorher beschriebenen Variablen. Dies beschreibt den Gradienten in der Fließgeschwindigkeit vom Mittelpunkt des Blutgefäßes bis zur Kontaktfläche mit der Venolenwand. Hier können bspw. die Blutkörperchen mit den Endothelzellen interagieren. Die Daten werden mit GNIESMER et al.<sup>[197]</sup> verglichen, um nicht nur innerhalb der eigenen Gruppe zu vergleichen. Hier wurden im identischen Tiermodell die Vaskularisierung von Poly( $\epsilon$ -caprolacton) Fibernatten zur Heilung von Verletzungen an der Rotatorenmanschette untersucht. Es wurde mit einem kommerziell erhältlichen PU-Scaffold verglichen (Biomerix RCR Patch). In Abbildung 77 ist der durchschnittliche Durchmesser der Venolen  $d$  (Venole), in Abbildung 78 der Blutfluss  $Q$  und Abbildung 79 die sich aus dem Venolendurchmesser und dem Blutfluss ergebenden Scherrate  $\gamma$  von PGS@SiCa und PGPS20@SiCa zu verschiedenen Zeitpunkten, welche im Tiermodell durch Intravitalmikroskopie bestimmt wurden, gezeigt.

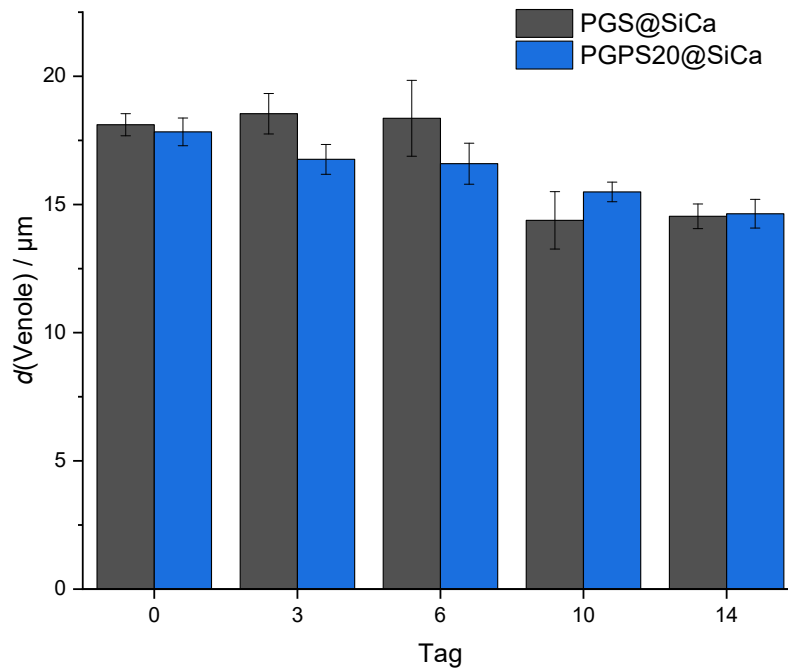


Abbildung 77: Durchschnittlicher Durchmesser der Venolen  $d(\text{Venole})$  von PGS@SiCa und PGPS20@SiCa zu verschiedenen Zeitpunkten, welche im Tiermodell durch Intravitalmikroskopie bestimmt wurden.

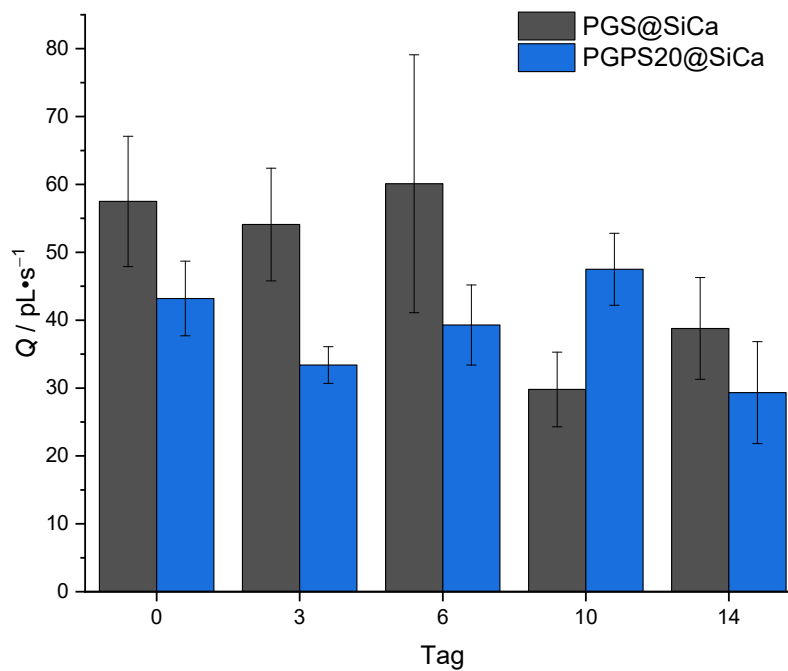


Abbildung 78: Blutfluss  $Q$  von PGS@SiCa und PGPS20@SiCa zu verschiedenen Zeitpunkten, welche im Tiermodell durch Intravitalmikroskopie bestimmt wurden.

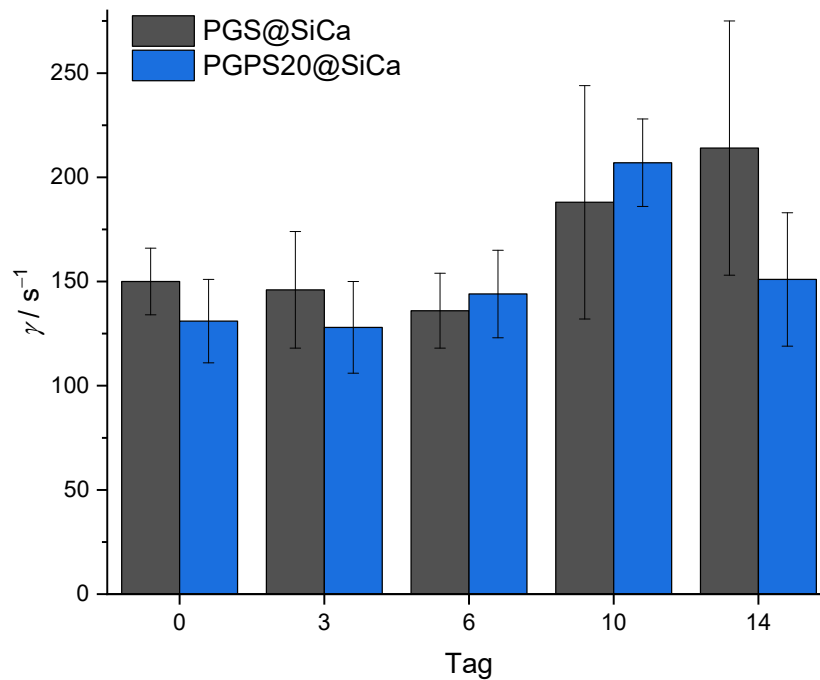


Abbildung 79: Scherrate  $\gamma$  von PGS@SiCa und PGPS20@SiCa zu verschiedenen Zeitpunkten, welche im Tiermodell durch Intravitalmikroskopie bestimmt wurden.

Innerhalb der beiden Gruppen zeigen sich für alle drei Messparameter keine signifikanten Unterschiede. Über die 14 Versuchstage scheint der Venolendurchmesser leicht zu sinken, was durch die Bildung von vielen kleinen, neuen Venolen erklärbar ist. Der Blutfluss  $Q$  bewegt sich über den Zeitraum zwischen 30 – 60  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ , wobei die Schwankung für PGPS20@SiCa geringer ausfällt. Dies ist vergleichbar mit GNIESMER et al. (30 – 70  $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Die Scherraten  $\gamma$  können als konstant zwischen ca. 130 – 215  $\text{s}^{-1}$  angesehen werden, wenn diese auch somit grob doppelt so hoch liegen wie im o.g. Experiment. Dies kann auf die Streuung einer solchen Untersuchung im Tiermodell zurückgeführt werden, weil letztendlich jedes Tier individuell ist. Es kann auch an einer allgemein höheren Anzahl von roten oder weißen Blutkörperchen liegen, die mit der Innenwand interagieren, wobei letzteres ein Hinweis auf eine erhöhte Immunantwort sein kann.

In Abbildung 80 ist die Anzahl der adhärennten Leukozyten und in Abbildung 81 die Anzahl der rollenden Leukozyten über die Versuchsdauer gezeigt.

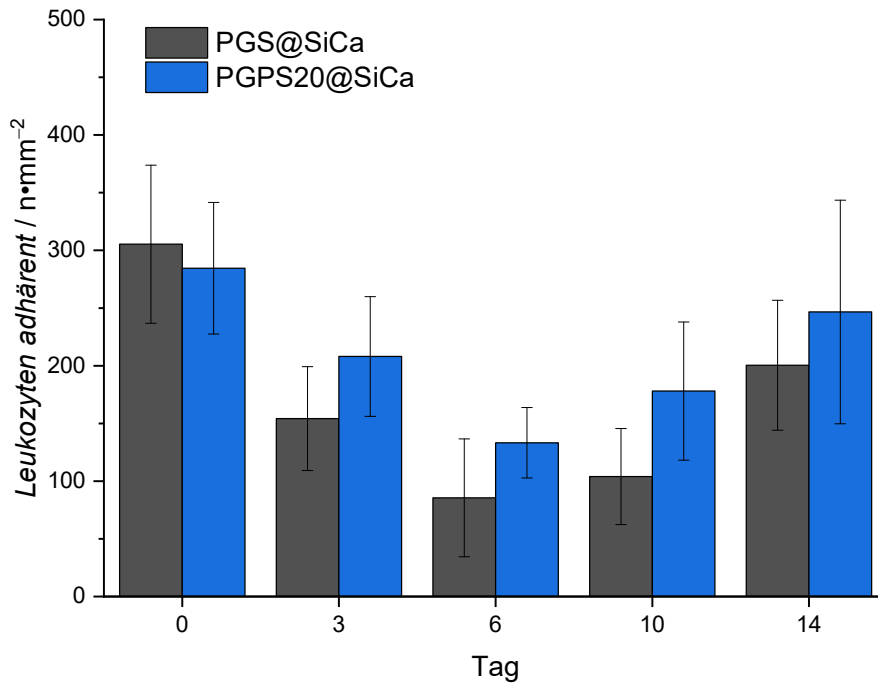


Abbildung 80: Anzahl der adhärenen Leukozyten pro Quadratmillimeter über bis zu 14 Tage

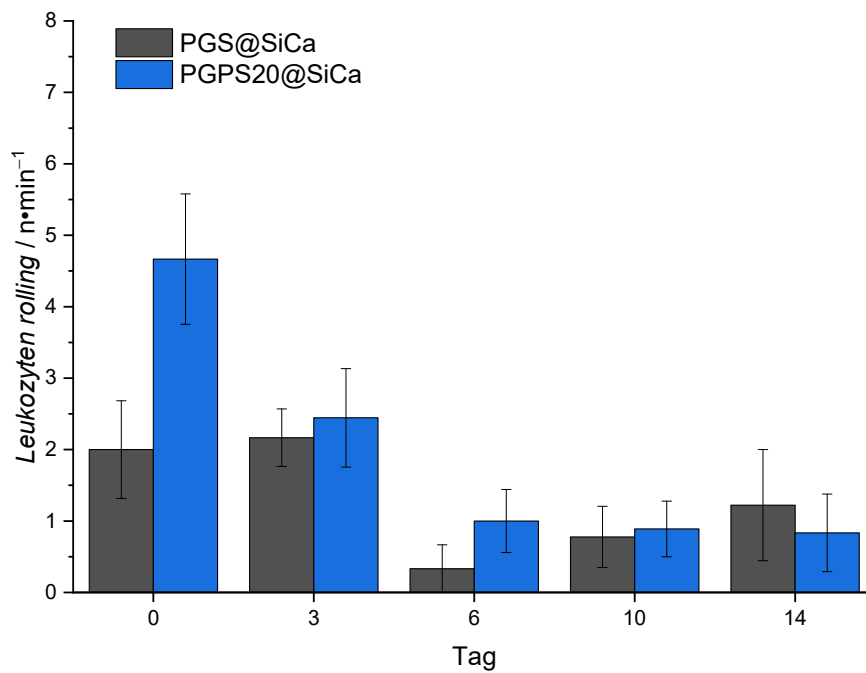


Abbildung 81: Anzahl der Leukozyten über bis zu 14 Tage, welche pro Minute in einer ausgewählten Venole gezählt werden können.

Für die adhärenen Leukozyten ergibt sich ein gemischtes Bild. Bis einschließlich Tag sechs sinkt die Anzahl signifikant von ca. 280 – 300 mm<sup>-2</sup> auf 100 – 150 mm<sup>-2</sup> und steigt dann leicht auf 220 – 250 mm<sup>-2</sup>. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung der leicht zunehmenden Scherraten.

Sowohl, dass der Großteil der Mäuse das Experiment mit gutem Zustand durchlebt hat, als auch der abnehmende Trend der rollenden Leukozyten, zeigt, dass keine Immunantwort erfolgt. Eine besonders starke Abnahme ist für PGPS20@SiCa erkennbar.

Abbildung 82 und Abbildung 83 zeigen Aufnahmen mit dem Intravitalmikroskop an Tag null bzw. an Tag 14 aus der Gruppe von PGS@SiCa.

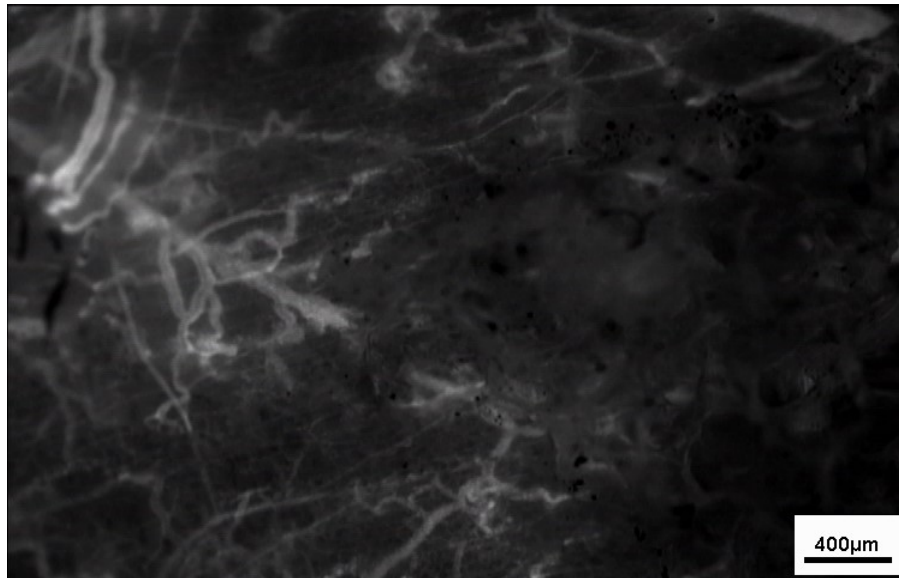


Abbildung 82: Aufnahmen einer Maus mithilfe des Intravitalmikroskops an Tag 0 des Experiments im Tiermodell. Es ist beispielhaft eine Probe aus der Gruppe PGS@SiCa gezeigt. Wenige, dicke Blutgefäße heben sich in weiß von dem Untergrund ab.



Abbildung 83: Aufnahmen einer Maus mithilfe des Intravitalmikroskops an Tag 14 des Experiments im Tiermodell. Es ist beispielhaft eine Probe aus der Gruppe PGS@SiCa gezeigt. Viele, neue Kapillaren heben sich in weiß von dem Untergrund ab.

An Tag null liegen ein paar wenige, dicke Blutgefäße vor, wobei ein großer Teil des Gewebes kaum Vaskularisierung aufweist. Dies ändert sich stark innerhalb von 14 Tagen.

Hier ist ein feines Netz aus neu gebildeten Venolen erkennbar. Das Implantat hingegen ist leider nicht so gut erkennbar, deutet sich aber in den unscharfen Bereichen an. Die Bildung neuer Blutgefäße lässt sich mithilfe der funktionellen Kapillardichte (FKD) ausdrücken, welche die Gesamtlänge der Venolen in  $\text{cm}\cdot\text{cm}^{-2}$  ausdrückt. In Abbildung 84 ist die FKD über den Zeitraum des Experiments gezeigt.

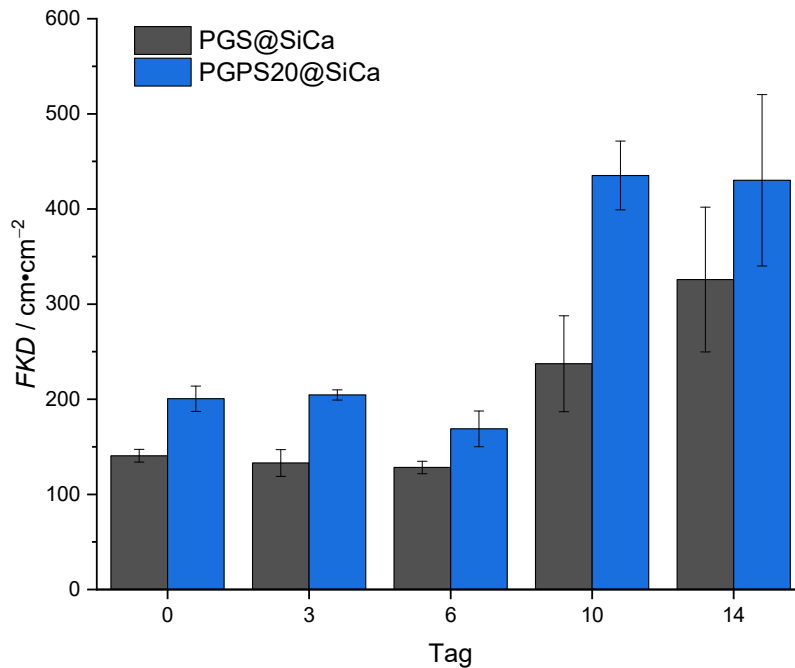


Abbildung 84: Funktionelle Kapillardichte über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen.

Es ergibt sich ein deutliches Bild. Besonders ab Tag zehn lässt sich für beide Versuchsgruppen eine signifikante Erhöhung der FKD feststellen, wobei die Gruppe PGPS20@SiCa hier deutlich höhere Werte aufweist. Für die Gruppen steigen die FKD um den Faktor von ca. 2.2, wohingegen die Gruppen der PCL-Matten in GNIESMER et al. maximal um den Faktor 1.5 stiegen. Natürlich lassen sich diese Materialien nicht direkt vergleichen, aber es soll zeigen, dass eine beachtliche FKD erzielt werden konnte, welche publizierte Materialien übertrifft. Ein Grund hierfür kann im Silicium liegen, welches die PCL-Matten nicht enthalten und laut Kapitel 2.1.2 bei Abwesenheit zu einer schlechten Wundheilung führt. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Gruppen PGS@SiCa und PGPS@SiCa in der Lage sind, eine Angiogenese zu induzieren und so einen essenziellen Schritt zur Wund- und Knochenheilung leisten zu können, ohne eine signifikante Immunantwort auszulösen.

Abschließend sollen die histologischen Untersuchungen besprochen werden. Hierzu ist als Beispiel in Abbildung 85 ein histologischer Schnitt der Probe PGS@SiCa gezeigt. Es wurde eine H&E-Färbung angefertigt.

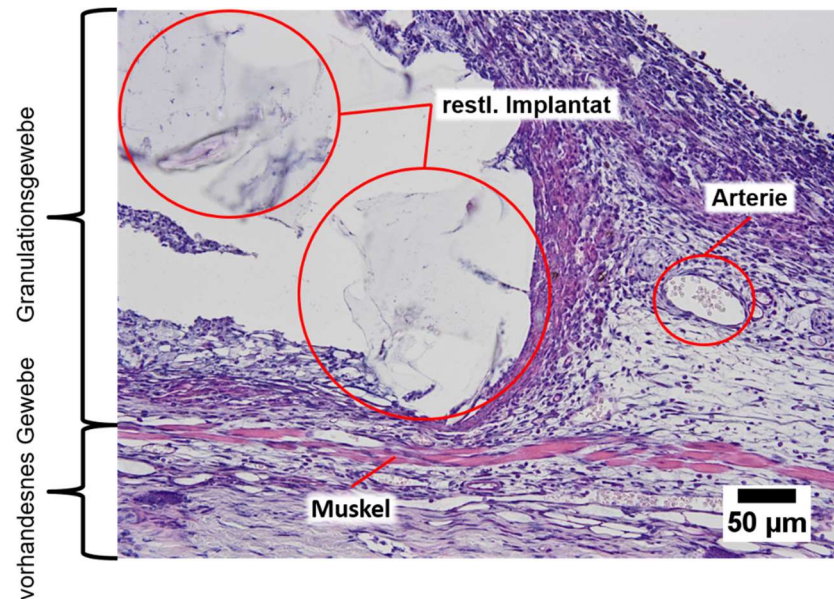


Abbildung 85: Histologischer Schnitt einer Probe nach 14 Tagen im Rückenhautkammermodell in der Maus aus der PGS@SiCa-Gruppe mit einer H&E-Färbung (Hämatoxylin/Eosin-Färbung). Durch den histologischen Schnitt wurde das Implantat beschädigt, sodass dort nur Reste sind.

Es ist sehr gut erkennbar, wie der *Musculus Pannicus Carnosus* das ursprüngliche Gewebe von dem Granulationsgewebe trennt, was sich aus der in Kapitel 3.8.4 beschriebenen Präparation ergibt. Leider ist das Implantat durch die Schnitte teilweise herausgelöst worden. Allerdings deutet sich in den Randbereichen eine Migration der Zellen ins Innere an, was unter Berücksichtigung der Zelladhäsionstests ein erwartbares Ergebnis ist. Weiterhin sind dunklere Bereiche mit verbliebenen Implantatstücken erkennbar, welche gefärbte Zellen aufweisen und in Rot markiert sind. Auch ein großes, neu gebildetes Blutgefäß ist eingekreist, welches Blutkörperchen enthält. In Abbildung 86 ist die H&E-Färbung der PGPS20@SiCa-Gruppe gezeigt, welche ein identisches Bild liefert.

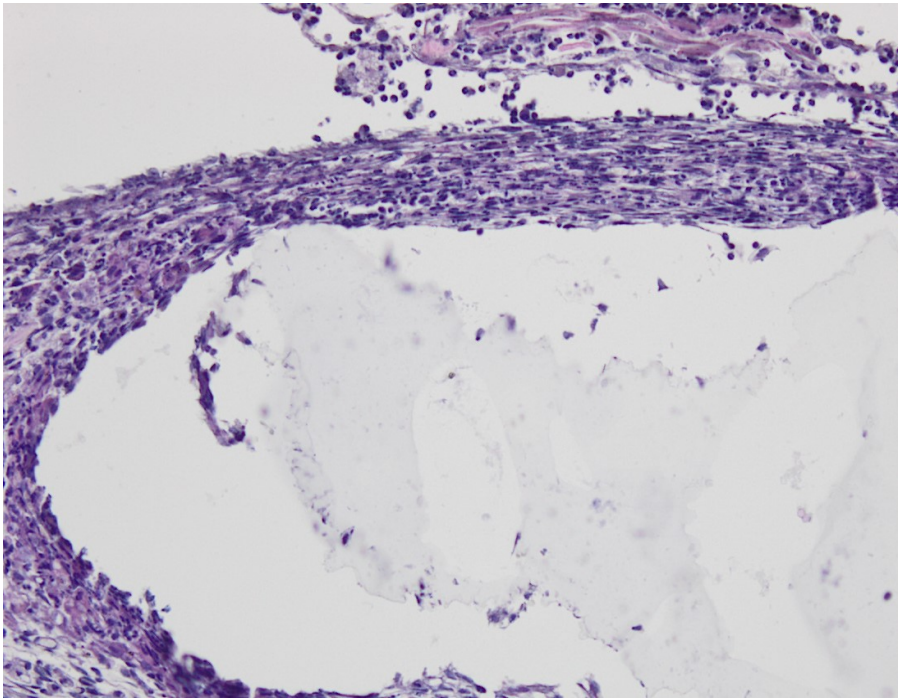


Abbildung 86: Histologischer Schnitt einer Probe nach 14 Tagen im Rückenhautkammermodell in der Maus aus der PGPS20@SiCa-Gruppe mit einer H&E-Färbung (Hämatoxylin/Eosin-Färbung). Durch den histologischen Schnitt wurde das Implantat beschädigt, sodass dort nur Reste sind.

Hier deuten sich ebenfalls eingewachsene Zellen im Randbereich des grauen Schattens an.

Mithilfe einer CD31-Färbung entsteht eine blaue Grundfärbung. In Braun werden Endothelzellen eingefärbt. Diese Zellen sind für die Bildung von Blutgefäßen verantwortlich und bilden die Innenwand von Blutgefäßen. In Abbildung 87 und Abbildung 88 ist jeweils der histologische Schnitt einer CD31-Färbung von PGS@SiCa bzw. PGPS20@SiCa nach 14 Tagen gezeigt.



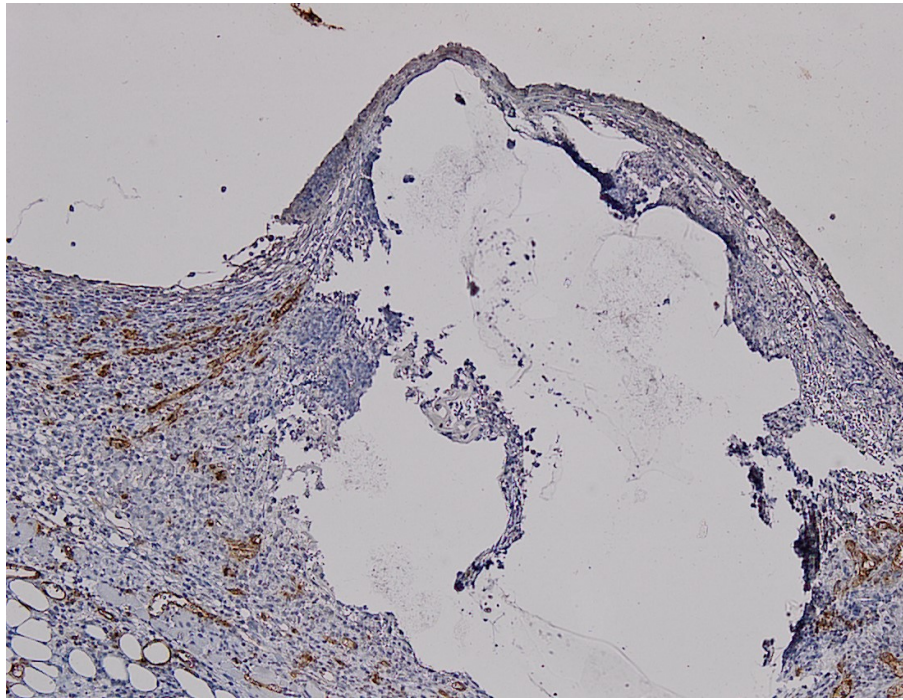


Abbildung 87: Histologischer Schnitt einer Probe nach 14 Tagen aus der PGS@SiCa-Gruppe mit einer CD31-Färbung für Endothelzellen. Von der blauen Färbung heben sich in braun Endothelzellen ab, welche die Innenwand von Blutgefäßen besiedeln. Die braunen Bereiche können also als neu gebildete Blutgefäße aufgefasst werden. Durch den histologischen Schnitt wurde das Implantat beschädigt, sodass dort nur Reste sind.

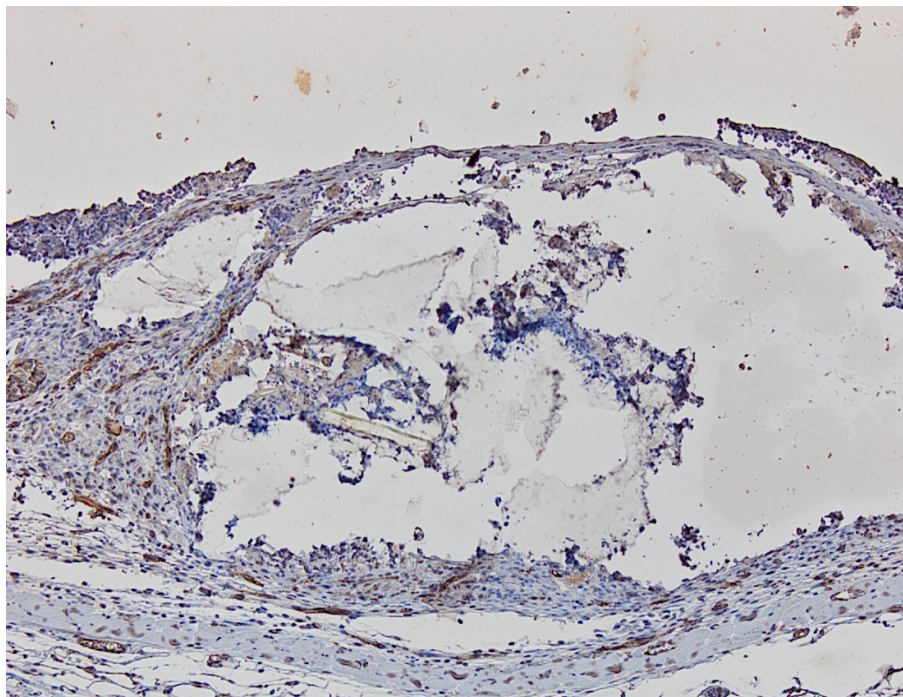


Abbildung 88: Histologischer Schnitt einer Probe nach 14 Tagen aus der PGPS20@SiCa-Gruppe mit einer CD31-Färbung für Endothelzellen. Von der blauen Färbung heben sich in braun Endothelzellen ab, welche die Innenwand von Blutgefäßen besiedeln. Die braunen Bereiche können also als neu gebildete Blutgefäße aufgefasst werden. Durch den histologischen Schnitt wurde das Implantat beschädigt, sodass dort nur Reste sind.

Für beide Proben zeigt sich erneut ein beschädigtes Implantat. Es ist erkennbar, dass im Bereich um das Implantat herum eine dichte, wiederkehrende braune Färbung der Endothelzellen zu finden ist. Weiterhin deutet sich erneut ein Einwachsen der Zellen in die Implantatstruktur an, was ein Hinweis darauf ist, dass das Implantat durchvaskularisiert werden kann und eine Angiogenese im Gewebe induziert.

Abschließend soll in einem histologischen Schnitt die Van Gieson-Färbung betrachtet werden. Hierdurch wird Kollagen pink eingefärbt. Findet sich um das Implantat herum eine dichte Schicht aus Kollagen, so kann dies als eine Immunantwort in Form von Verkapselung interpretiert werden. In Abbildung 89 und Abbildung 90 ist jeweils der histologische Schnitt einer Van Gieson-Färbung von PGS@SiCa bzw. PGPS20@SiCa nach 14 Tagen gezeigt.

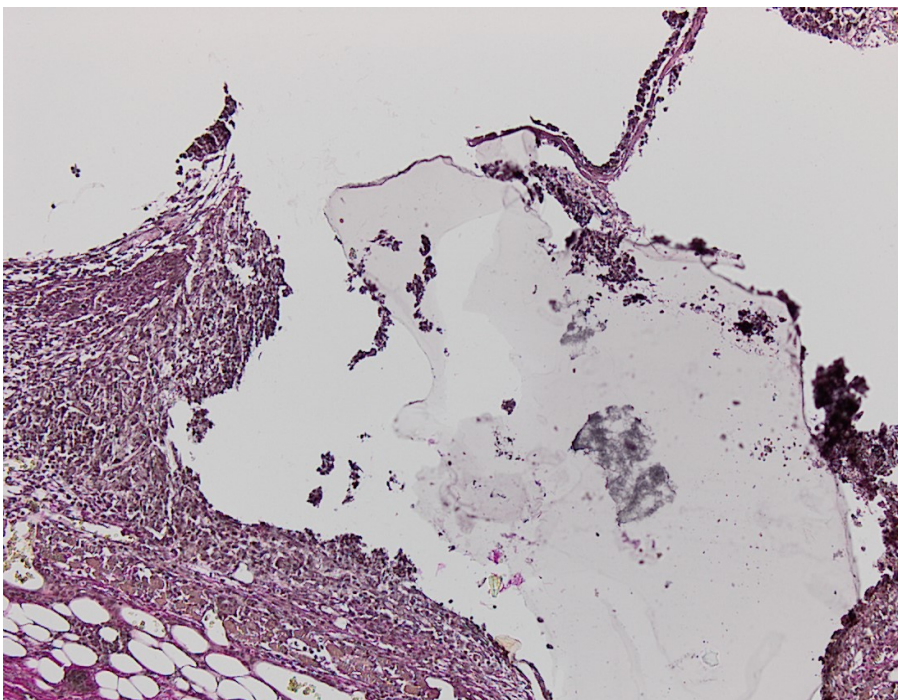


Abbildung 89: Histologischer Schnitt einer Probe nach 14 Tagen aus der PGS@SiCa-Gruppe mit einer Van Gieson-Färbung. Die pinke Färbung, welche besonders im unteren Bereich zu sehen ist, färbt Kollagen ein. Dies kann ein Hinweis auf eine Immunreaktion in Form von Verkapselung sein. Durch den histologischen Schnitt wurde das Implantat beschädigt, sodass dort nur Reste sind.



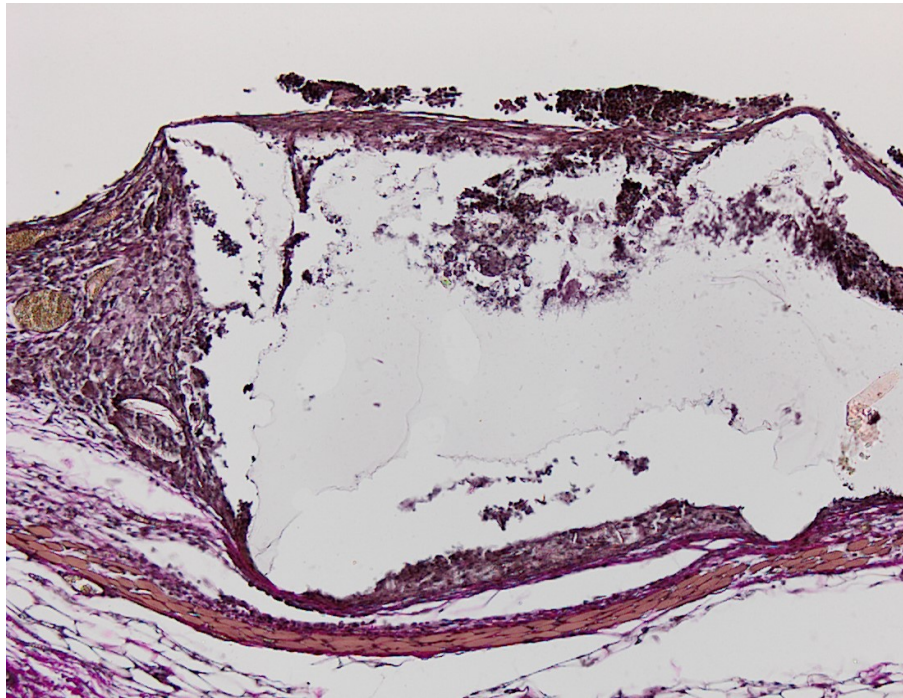


Abbildung 90: Histologischer Schnitt einer Probe nach 14 Tagen aus der PGPS20@SiCa-Gruppe mit einer Van Gieson-Färbung. Die pinke Färbung, welche besonders im unteren Bereich zu sehen ist, färbt Kollagen ein. Dies kann ein Hinweis auf eine Immunreaktion in Form von Verkapselung sein. Durch den histologischen Schnitt wurde das Implantat beschädigt, sodass dort nur Reste sind.

Für die PGS@SiCa-Probe lässt sich keine pinke Einfärbung um das Implantat direkt herum ausmachen. Der histologische Schnitt von PGPS20@SiCa zeigt ein etwas anderes Bild. In einzelnen Bereichen scheint die Bildung einer dünnen Kollagenschicht vorzuliegen. Von einer deutlichen Immunantwort kann in diesem Fall jedoch nicht gesprochen werden. Allerdings waren die Ergebnisse der adhärenen Leukozyten in Zusammenhang mit der Scherrate  $\gamma$  nicht ganz eindeutig, sodass eine milde Immunantwort nicht ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sehr wenige Tiere aus dem Experiment frühzeitig ausscheiden mussten. Dies ist ein sehr guter Hinweis auf die Verträglichkeit des Materials und ermuntert zu weiteren Untersuchungen im Tiermodell, wie bspw. der ähnlichen Femur-Kammer. Eine Untersuchung der Fähigkeit des Materials zur Osteogenese wäre wünschenswert. Es konnte gezeigt werden, dass das Material keine signifikante Immunantwort hervorruft. Es ist in der Lage in das vorhandene Gewebe einzuwachsen, die Angiogenese zu induzieren und zu fördern und die Wundheilung durch die Auswahl der enthaltenen Ionen zu beschleunigen.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung eines multifunktionalen, offenporigen Materials zur Knochenregeneration. Die durchgeführten Untersuchungen fanden im Hinblick auf Anwendungen für nicht-lasttragende Knochendefekte statt, welche der Körper in den meisten Fällen nicht selbst regenerieren kann. Die Entwicklung eines Knochenregenerationsmaterials für solche Anwendungen bringt komplexe Anforderungen an das Material mit sich: Das Biomaterial muss biokompatibel und – aktiv, osteogen, –konduktiv, und –induktiv sein, die Osteogenese fördern, eine Gerüststruktur zur Vaskularisierung und zur Knochenneubildung bieten. Gleichzeitig soll es degradierbar oder sogar bioresorbierbar sein.

Um die oben genannten Anforderungen zu erfüllen, wurden zwei Materialien synthetisiert und vereint. Ein Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Synthese einer Schwammreplik auf Basis eines bioaktiven Glases. In Anlehnung an SHIH et al.<sup>[200]</sup> wurde ausgehend von einem ca. 1 cm<sup>3</sup> großen PU-Schwamm nach dem *sponge-template* Verfahren eine Replik der offenporigen, makroporösen Schwammstruktur erzeugt. Weiterhin wurden die Trabekel mit Mesoporen ausgestattet, welche mit Strontiumchlorid beladen wurden. Für das bioaktive Glas wurde eine Variante gewählt, welche Calcium enthält, sodass während der Degradation der Replik Orthokieselsäure, Strontiumionen und Calciumionen freigesetzt werden. Die Verwendung dieses bioaktiven Glases bietet dem Körper durch seine Makroporen eine Gerüststruktur zur Vaskularisierung und zur Knochenneubildung. Bioaktive Gläser gelten als osteokonduktiv und osteogen. Die freigesetzten Ionen sind in der Lage, die Signalkaskaden im menschlichen Körper auszulösen, welche die Knochenbildung einleiten oder verstärken. Weiterhin kann die Anreicherung von Calciumionen für die Bildung von weiterem Hydroxylapatit von Vorteil sein. Die Beladung der Mesoporen mit Strontiumionen und deren Freisetzung lässt ebenfalls einen osteogenen Effekt erwarten.

Der andere Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Synthese eines Biopolymers, um den spröden Charakter der oben beschriebenen Replik zu marginalisieren und ein elastisches Kompositmaterial aufzubauen. Ein Hauptaugenmerk wurde auf die weitere Modifizierung des Polymers zur Optimierung der Eigenschaften hinsichtlich der Anwendung als Knochenregenerationsmaterial gelegt. Die Wahl fiel auf das Polyglycerolsebacat, welches in Anlehnung an LI et al.<sup>[144]</sup> synthetisiert wurde. Ausgehend hiervon wurde der Aufbau eines Copolymers mit Calciumglycerolphosphat untersucht. Dies sollte einerseits kovalent in die Polymerkette eingebaut werden, als auch als anorganische Ausscheidung in der Polymermatrix vorliegen. Dies führte neben dem Aufbau eines Copolymers zur Bildung eines Komposits. Parallel hierzu wurde auf Basis von AYDIN et al.<sup>[36]</sup> die Möglichkeit der Mikrowellensynthese der oben beschriebenen Schritte evaluiert.

Das Knochenregenerationsmaterial soll von den vorteilhaften mechanischen Eigenschaften des PGS, seiner Biodegradierbarkeit und der Möglichkeit zur Modifikation profitieren. Der Aufbau des Copolymers und des Komposits mithilfe von Calciumglycerolphosphat erweitert die Eigenschaften des Polymers um die Fähigkeit Calciumionen und Phosphat freizusetzen. Parallel dazu kann die Degradationsgeschwindigkeit verändert werden. Der Mechanismus wird von reiner Oberflächenerosion zur Volumenerosion verschoben, weil das Auflösen der Ausscheidungen zu Hohlräumen führt. Die Degradationsprodukte werden über bekannte Stoffwechselprozesse im Körper abgebaut und die freigesetzten Ionen gelten als osteogen. Die mögliche lokal erhöhte Konzentration an Calcium- und Phosphationen kann die Ausscheidung von Hydroxylapatit begünstigen.

Im letzten Schritt wurde aus den synthetisierten Materialien in einem Beschichtungsverfahren das eigentliche Knochenregenerationsmaterial aufgebaut. Dies vereinte die oben beschriebenen Eigenschaften der einzelnen Materialien und optimierte das mechanische Verhalten. Dieser Ansatz ermöglicht eine freie Formgebung für die Anpassung an einen vorliegenden Defekt. Die einzelnen Komponenten können als Plattform verstanden werden, dessen Eigenschaften in gewissen Rahmen eingestellt werden können. Beispielsweise kann das bioaktive Glas um andere Ionen erweitert werden oder die Poren anderweitig beladen werden. Die Anzahl der Beschichtungsvorgänge des PU-Schwammes kann erhöht werden, wodurch mehr Material zur Verfügung steht. Das Komposit des Biopolymers kann zusätzlich oder ersatzweise mit anderen anorganischen Materialien oder Ionen beladen werden. Auch hier kann die Anzahl an Beschichtungsvorgängen erhöht werden. Es können weitere Copolymere aufgebaut werden, um bspw. ein hydrophileres Material zu erhalten. Dies verdeutlicht den vielseitigen Charakter des Materials und ermöglicht maßgeschneiderte Lösungen, welche für die jeweiligen Defekte optimal sind.

Das PGS wurde jeweils mit 10 mol%, 20 mol% und 30 mol% Calciumglycerolphosphat im Austausch gegen Glycerol variiert. Parallel wurden diese Synthesen auch mithilfe der Mikrowelle vorgenommen (PGS<sub>μ</sub>). Anhand des Modells von PGS<sub>μ</sub> wurde das optimale Leistungsprogramm mit der zur Verfügung stehenden Mikrowelle ermittelt und auf 21 x 1 min mit 10 s Pause bei 700 W unter Rühren festgelegt. Hierbei zeigte sich der Zusammenhang von der Temperatur im Reaktionsgemisch mit der Reaktionszeit, wie es laut der RGT-Regel zu erwarten war. Dies führt zur Betrachtung der Konversion: Diese sank für die konventionell geheizten Proben mit der Zeit stetig ab. Das PGS<sub>μ</sub> zeigte eine 23 % geringere Konversion im Vergleich zu PGS, jedoch fiel bei den Phosphatvarianten der Unterschied nur 10 % kleiner zur korrespondierenden Probe aus.

Dies lässt sich ebenfalls mit der Theorie der Mikrowellensynthese erklären, nach derer Ionen im Wechselfeld zu sehr hoher Reibung und Energiedissipation führen. PGPS $\mu$  enthält gegenüber PGS deutlich mehr Ionen, sodass lokal mehr thermische Energie in das Reaktionsgemisch gebracht wird, wodurch die Konversion höher ausfällt. Es konnte also eine zeit- und ressourcenschonende Variante der Synthese von PGS und seinen Derivaten erarbeitet werden und der Aufwand von 24 h bei 130 °C unter Schutzgas auf den Aufwand von ca. 30 min reduziert werden. Die Quervernetzung des Harzes zum Polymer ließ sich nicht zuverlässig mit Mikrowellenstrahlung reproduzieren. Je nach gewählten Reaktionsbedingungen fand keine Quervernetzung statt oder sie lief zu rasch ab, sodass das Material in den entstehenden großen Blasen erstarrte. Der nächste Schritt sollte sein, eine andere Mikrowelle mit kleinerem Reaktionsraum zu testen. Da auf einer beschichteten Replik sehr wenig Material anhaftet, erscheint es schwierig, dieses zu erwärmen. Es könnte getestet werden, z. B. eine 10 x 15 x 1 cm<sup>3</sup> große Replik-Matte herzustellen, zu beschichten und anschließend in der Mikrowelle zu behandeln.

Mithilfe der Infrarotspektroskopie konnten alle relevanten Banden von PGS denen aus der Literatur bekannten Banden zugeordnet werden. Im Vergleich von PGS vs. PGPS zeigte sich, dass sowohl Banden existieren, welche anorganischem Phosphat als auch organisch gebundenem Phosphat zugeordnet werden können, sodass sich möglicherweise ein Copolymer gebildet hat. Zeitgleich kann Calciumglycerolphosphat in der Polymermatrix als Füllstoff vorliegen. Wird PGS mit PGPS $\mu$  verglichen, so lassen sich erneut alle relevanten Banden der jeweiligen Strukturen finden. Allerdings ist die Intensität der Banden für PGPS $\mu$  zum Teil verringert bzw. zeigen sich deutlicher Banden der reinen Sebacinsäure. Dies ist auf den geringeren Konversionsgrad zurückzuführen.

Die Thermogravimetrie mit anschließendem XRD der Rückstände für die Phosphatvarianten konnte Aufschluss über die Homogenität der PGPS-Varianten geben. Die über die Synthese eingebrachten Massen wurden mit den Restmassen aus der TG verglichen. Hierzu konnte der Rückstand via Röntgenpulver-Diffraktometrie als Calciumpyrophosphat identifiziert werden. Die Abweichungen zwischen realem Rückstand und theoretischem Rückstand liegen unter einem Prozent, nur für PGPS30 beträgt sie 2.29 %. Dies deutet an, dass eine Erhöhung des Anteils an Calciumglycerolphosphat zu einer immer größeren Inhomogenität in der Probe führen würde, sodass dieser Austausch als obere Grenze angesehen werden kann. Die Aggregation und das Absinken des Füllstoffs kann die Inhomogenität verursachen.

Die Kernspinresonanzspektroskopie erbrachte genaueste strukturelle Aufklärung der Polymerderivate. Es konnten über alle Proben hinweg mittels <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Spektroskopie alle Baugruppen identifiziert werden.

Die Verwendung von Aceton-d<sub>6</sub> ermöglichte eine genaue Betrachtung der Zusammensetzung der möglichen Acylglyceride, deren Anteil im jeweiligen Polymer quantifiziert wurde. In der konventionell geheizten Polymerreihe steigt der Anteil an 1,2,3-Triacylglycerid kontinuierlich mit dem Anteil an Calciumglycerolphosphat an, was mit dem Anstieg des Quervernetzungsgrades in Einklang steht. Ein vorgeschlagener Mechanismus erklärt dies für die PGPS-Varianten durch die gute Abgangsgruppe Phosphat am mittelständigen Kohlenstoffatom im Calciumglycerolphosphat. Die Mikrowellenvarianten zeigten kaum klare Trends in den Verhältnissen der möglichen Acylglyceride zueinander, was vermutlich auf die signifikant höhere Temperatur, kürzere Reaktionszeit und damit mehr zufälliges Produkt liegt. Eine Probe von PGPS10 wurde mehrere Wochen dialysiert, um alles nicht in der Polymerkette gebundenes Phosphat zu entfernen. Das <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigte im Vergleich zu den nicht dialysierten Proben ein Verschwinden des Peaks von Glycerol. Es wurde ein <sup>31</sup>P-NMR angefertigt, welches einen Peak bei 0.8 ppm zeigt, der die Anwesenheit von Phosphor im Polymer bestätigt.

Die Untersuchung aller Harze mit der Gelpermeationschromatographie konnte die Molmassenverteilung aufklären. Während der Polykondensation der ersten Synthesestufe kommen verschiedene Bausteine als Resultate der Kondensation infrage, da Glycerol drei Hydroxylgruppen besitzt. Die auftretenden Maxima ließen sich den möglichen Baugruppen zuordnen. Die konventionell geheizten Proben zeigen einen durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 9 – 13 Einheiten, dies fällt für die mikrowellengeheizten Proben mit 3–5 Baueinheiten deutlich kleiner aus. Dies steht allerdings auch im Einklang mit der geringeren Konversion. Der Polydispersitätsindex liegt für alle Proben zwischen 1.5 bis 2.0, was für eine relativ homogene Synthese ob mit der Mikrowelle oder konventionell geheizt spricht. Eine alternative Syntheseroute für PGS bietet sich über die Epoxidierung der Carboxylgruppe von PGS und somit der Bildung von Diglycidsebacat an. Dieses bildet mit Glycerol vorrangig Polydiglycidsebacat. Hierdurch wird der Anteil an linearen Ketten erhöht und es stehen weiterhin in der mittelständigen Position am Glycerid Hydroxylgruppen zur Quervernetzung zur Verfügung.<sup>[209]</sup> In Kombination mit der Bildung des Copolymers mit Calciumglycerolphosphat kann es zu einem erhöhten Anteil an kovalent gebundenem Phosphat in der Kette kommen, weil die endständigen Hydroxygruppen zur Polymerisation genutzt werden. Eine weitere Variante des Copolymers wäre mit Polyethylenglykol (PEG) möglich, wodurch das Polymer hydrophiler wird. Dies kann sich positiv auf die biologischen Eigenschaften auswirken.<sup>[218]</sup>

Uniaxiale Zug- und Druckversuche sollten zeigen, inwieweit sich die Charakteristika aus den chemischen Untersuchungen in den mechanischen Eigenschaften widerspiegeln. Es wurde die Reihe von konventionell geheizten Polymeren untersucht, von denen in Teflonformen S3A Probenkörper hergestellt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass der Aufbau eines Copolymers und Komposits den E-Modul von 0.24 MPa von PGS auf bis zu 4 MPa für PGPS30 steigern ließ. Hierbei erhöhte sich die Steifigkeit enorm und die Dehnung bis zum Reißen nahm ab. Die aus den NMR-Untersuchungen bekannte Steigerung der 1,2,3-Triacylglyceride mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat steht im Einklang mit diesen Ergebnissen. Dies ist eine überaus wichtige Eigenschaft, da die vergleichsweise niedrige Steifigkeit des Knochenregenerationsmaterials in Kombination mit seiner Elastizität eine Anwendung möglich macht. Weiterhin lassen sich die mechanischen Eigenschaften über die Wahl des Füllstoffs und dessen Gehalt in gewissen Grenzen einstellen. Möglich ist auch, dass in den Proben von PGPS weitere Quervernetzungsstellen durch die Calciumionen vorliegen, an welche sich die Phosphatgruppen oder auch die Carbonylgruppen anlagern. Abseits von der Herstellung des Harzes in der Mikrowelle wurde auch die Möglichkeit untersucht, die zweite Synthesestufe in der Mikrowelle zu realisieren. Grundsätzlich führten die Untersuchungen zu spontan polymerisierten Produkten, es ließ sich kein zuverlässiges, reproduzierbares Verfahren ausarbeiten. Ein Versuch führte jedoch zu einem polymerisierten PGS $\mu$ -Zylinder, welcher einer Druckprüfung unterzogen wurde und ein E-Modul von 0.22 MPa lieferte, welcher dem von PGS entsprach. Zum aktuellen Stand ist eine Quervernetzung des Harzes von PGS via Mikrowellenstrahlung nicht in der Literatur beschrieben. Die verschiedenen Einflüsse und deren Zusammenwirken wie das Verhältnis von Probengröße zum Reaktionsraum, das angelegte Vakuum und das gewählte Leistungsprofil der Mikrowelle bedürfen jedoch weiterer intensiver Untersuchung. Zur Bildung der Komposite könnten weitere Materialien wie Nano-Hydroxylapatit herangezogen werden und deren Einfluss untersucht werden. Aber auch Salze von biologisch aktiven Ionen können eingemischt werden. Möglicherweise können schwer lösliche Varianten als Füllmaterial eine konstante Freisetzung mit gleichzeitigem Verhindern einer toxischen Konzentration gewählt werden. Für ein antibakterielles bioaktives Glas käme eine Kombination aus Silbernitrat für den ersten Effekt nach der Implantation und Silberchlorid für eine fortwährende Freisetzung infrage. Aber auch Kupfersalze können interessant sein, weil sie die Angiogenese induzieren.<sup>[219]</sup> Das Harz und das Polymer selbst könnten weiter analysiert werden. Hierzu käme Rheometrie zur Untersuchung der viskoelastischen Eigenschaften des Polymers infrage oder die Untersuchung des Quellverhaltens und die Bestimmung der Quervernetzung über die Kapazität zur Aufnahme von Flüssigkeiten.

Als weiteres Material wurden die Repliken aus einem bioaktiven Glas dargestellt, die Poren mit Strontiumchlorid beladen und mit Polymer beschichtet, um das Knochenregenerationsmaterial zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die *sponge template* Methode eine freie Formgebung durch die Wahl und Anpassung des PU-Schwammes ermöglicht. Zur Untersuchung des Materials wurde jedoch eine Größe von 1 cm<sup>3</sup> eines PU-Schwammes gewählt.



Hier bietet sich die einfache Möglichkeit, PU-Schwämme mit anderen Porositäten zu verwenden, um den Einfluss des Makroporensystems zu evaluieren. Weiterhin könnte die Genauigkeit des Zuschneidens der Schwämme über eine Schablone oder einer Form zum Ausstanzen erhöht werden.

Die Untersuchung der Morphologie der Proben mit Licht- und Rasterelektronenmikroskopie ergab, dass sich die makroporöse Schwammstruktur sehr gut replizieren lässt, wobei eine Schrumpfung der Replik gegenüber dem PU-Schwamm von ca. 20 % eintritt. Die Makroporen von ca. 415  $\mu\text{m}$  eignen sich ideal zur Vaskularisierung. TEM-Aufnahmen bestätigten die Existenz von Mesoporen mit einer Größe von ca. 4 nm in den Trabekeln. Diese Größe bestätigen auch die Ergebnisse der Stickstoff-Physisorption. Die BET-Oberfläche betrug 395  $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ . Die Kleinwinkelröntgenstreuung ergab einen Durchmesser von Porenmittelpunkt zu Porenmittelpunkt von 11.9 nm; die TEM-Aufnahmen von  $9.9 \pm 1.0$  nm. Somit konnte erfolgreich ein makro- und mesoporöses Grundgerüst aus bioaktivem Glas mit hoher innerer Oberfläche synthetisiert werden. Die Mesoporen wurden erfolgreich mit Strontium beladen. Dies wird später in den Freisetzungsexperimenten genauer beleuchtet. Die Synthese des bioaktiven Glases ließe sich vielseitig durch den Einbau von Metallionen, welche biologisch aktiv sind, modifizieren.<sup>[20]</sup> Die Veränderungen am Netzwerk dürfen die Brüchigkeit der Replik nicht zu stark erhöhen, sodass eine Beschichtung ohne Schäden an der Replik möglich bleibt. Die Beladung der Poren bietet auch viele Möglichkeiten für Metallsalze. Hier könnte auch die Wahl nach der Löslichkeit zu einer Einstellung einer optimalen Freisetzungskurve führen.

Der Gewichtsverlauf während des Herstellungsverlaufes ist eine wichtige Stellschraube zur Anpassung der Masse der Bestandteile des Knochenregenerationsmaterials und der damit einhergehenden freigesetzten Menge an Ionen, der Degradationszeit und der mechanischen Eigenschaften. Für die Herstellung der Repliken konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Beschichtungszyklen und der erhaltenen Masse hergestellt werden. Dies ermöglicht die Einstellung der insgesamt zur Verfügung stehenden Menge an Silica bzw. Kieselsäure als auch von Calciumionen. Für weitere Experimente wurde eine Beschichtungszahl von sechs gewählt. Die Repliken wurden mit einer ethanolischen Lösung des jeweiligen Harzes zweimal beschichtet. Zwischen den Beschichtungsvorgängen wurde quervernetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die Masse durch das aufgebrauchte Polymer signifikant zunimmt. Im ersten Beschichtungsschritt wird knapp mehr als 50 % der Gesamtmasse an Polymer aufgebracht. Die Proben mit SiCaSr-Gerüst zeigten tendenziell höhere Massen nach der ersten Beschichtung, was an Oberflächenveränderungen oder auch der höheren Polarität durch das anhaftende Salz und den damit einhergehenden elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Beschichtungslösung und Oberfläche der Replik liegen kann.

Die Massenzunahme fiel für die Scaffolds, welche mit mikrowellengeheiztem Polymer beschichtet wurden, durchweg kleiner aus. Dies kann auf die bekannte kürzere Kettenlänge und mögliche veränderte Viskosität zurückzuführen sein. Hierdurch fließt mehr Polymer im Beschichtungsvorgang ab. Das Gewicht nahm von PGS zu PGPS10 sehr stark zu, innerhalb der PGPS-Reihe fiel dies deutlich geringer aus. Von PGPS20 auf PGPS30 nahm das Gewicht kaum zu. Gleiches gilt für die Mikrowellenvarianten. Der Einfluss des Anteils von Calciumglycerolphosphat auf die Masse fällt je nach Syntheseweg unterschiedlich aus. Prozentual zum PGS der eigenen Probengruppe nahmen die Massen der mit mikrowellensynthetisiertem Polymer beschichteten Scaffolds im Verlauf am stärksten zu. Durch die Darstellung eines Komposits im Polymer liegt eine höhere Dichte vor, wobei sich eine Grenze bei 30 % Anteil von Calciumglycerolphosphat gezeigt hat, sodass hier das Gewicht der Scaffolds in geringerem Maße gestiegen ist. Zwischen den Beschichtungsvorgängen nimmt die Masse grob um den Faktor 1.5 zu. Es lassen sich also Regeln ableiten, die es möglich machen in Zusammenhang mit Anforderungen an die Degradationszeit oder der Menge an freigesetzten Ionen eine bestimmte Herstellungsrouten abzuschätzen. Es kann eine Voraussage getroffen werden, wie die Masse pro Prozent Calciumglycerolphosphat je nach Syntheseweg steigt. Eine Abschätzung des Fehlers durch das händische Zuschneiden ergab eine maximale theoretische Abweichung der Dimensionen von ca. 1.6 mm, was eine hohe Genauigkeit widerspiegelt. Dies kann jedoch durch einen schienengeführten Schneidvorgang bspw. verbessert werden. Da sowohl die Regeln des Massenzuwachses der Repliken, als auch die der Herstellung der Scaffolds ermittelt wurden, lassen sich zukünftige Synthesen und Beschichtungszyklen unter Berücksichtigung möglicher freizusetzender Konzentrationen an Ionen zielgenau anpassen.

Die Scaffolds und Repliken wurden uniaxialen Kompressionstests unterzogen. Eine beschichtete Replik weist im Vergleich zu einer Replik ein um den Faktor 100 höheren E-Modul auf. Dazu gewinnt das Scaffold Elastizität und die spröden Eigenschaften der Replik dominieren nicht mehr das mechanische Verhalten. Die offensichtlichen Trends aus den Zugversuchen des reinen Polymers lassen sich nicht direkt auf die verschiedenen Scaffoldsorten übertragen. Die E-Moduln liegen zwischen 0.1 - 4 MPa, grundsätzlich tendieren aber die PGPS und PGPS $\mu$  Scaffolds im Schnitt zu etwas höheren E-Moduln. Die Spongiosa besitzt ein E-Modul, welches grob 10 - 100 x höher liegt. Allerdings ist die Hauptaufgabe des Scaffolds nicht, den verlorenen Knochen dauerhaft zu ersetzen und mechanische Stabilität zu gewährleisten, sondern die Heilung durch den Körper zu induzieren und zu unterstützen, sodass es nicht notwendig ist, den E-Modul des Scaffolds anzugleichen. Da sich alle E-Moduln der Scaffolds in der gleichen Größenordnung bewegen, sind die Unterschiede als sehr gering zu betrachten, sodass alle Probensorten als Knochenregenerationsmaterial eingesetzt werden können. Eine Mittelung aller Messkurven einer Probensorte erbrachte ein klareres Bild.

Hierbei findet eine Verschiebung mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat zu einer erhöhten Steifigkeit statt. Die breite Probenauswahl ihrerseits marginalisiert zusätzlich die Unterschiede der verschiedenen Scaffoldsorten, gibt aber auch zeitgleich das realistische Spektrum einer Charge aus dem Herstellungsprozess wieder. Die Untersuchung der Scaffolds in einem zyklischen Druckversuch könnte eine Aussage über die Widerstandsfähigkeit der Beschichtung treffen.

Die Freisetzungsexperimente wurden für Calcium, Phosphat und Orthokieselsäure über 65 Tage und für Strontium über 14 Tage durchgeführt. Für die beiden ersten Ionen ergab sich der Trend, dass mit steigendem Anteil an Calciumglycerolphosphat auch die Konzentration an freigesetzten Calcium- und Phosphationen grob um den Faktor 2–2.5 pro 10 % Anteil zunimmt. Der Verlauf entspricht einem *continuous release*. Die freigesetzten Mengen der Calciumionen liegen zwischen 14 – 66 mmol·L<sup>-1</sup> und für die Einzelwerte ca. eine Potenz unterhalb der möglichen physiologischen Wirksamkeit, wenn die Einzelwerte pro Tag betrachtet werden. Die freigesetzten Mengen der Phosphationen liegen zwischen 7 – 26 mmol·L<sup>-1</sup>. Die Einzelwerte liegen mit 0.1 bis 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> laut BOHNER et al.<sup>[214]</sup> in der Größenordnung der physiologisch wirksamen Konzentration von Phosphat im Plasma, Serum und der interstitiellen Flüssigkeit. Das bedeutet, die erreichten Konzentrationen können sich sehr gut für die Unterstützung der Knochenregeneration eignen. Die Freisetzung der Orthokieselsäure entspricht einem *steady release*. Es wurden pro Tag ca. 0.6 mmol·L<sup>-1</sup> freigesetzt, was für alle Scaffoldsorten wie zu erwarten gleich war. Die Rolle von Kieselsäure in der Knochenregeneration liegt vor allem im Anfangsstadium in der Knorpelbildung im Kallus und in der Induzierung von Angiogenese, bis zu einer Konzentration von 4 mmol. Ab 6 mmol findet eine stark erhöhte Apoptose der Osteoblasten-ähnlichen MG63-Zellen statt. Wichtig wäre es, die Freisetzungsdynamik im Körper zu untersuchen und ggf. mehr bioaktives Glas durch mehr Imprägniervorgänge im *sponge-template* Verfahren auf die Replik aufzubringen. Hierdurch könnte mehr Orthokieselsäure pro Zeiteinheit freigesetzt werden. Aktuell liegen die freigesetzten Konzentrationen recht gering, was aber eine biologische Aktivität in der Knochenregeneration nicht ausschließt. Die Freisetzung von Strontiumionen zeigt anfangs einen *burst release*, welcher in einen *continuous release* übergeht. Ersteres ist vermutlich auf das an der Oberfläche anhaftende Salz zurückzuführen und Letzteres auf in den Mesoporen verhaftetes Strontiumchlorid. Insgesamt wurden zwischen 16 bis 20 mmol·L<sup>-1</sup> und pro Messpunkt 0.1 bis 1.0 mmol·L<sup>-1</sup> freigesetzt. Hierbei liegen die Konzentrationen teilweise in der Größenordnung, die als proliferierend für Osteoblasten bzw. unterdrückend für Osteoklasten gilt.<sup>[220]</sup> Die Freisetzungsexperimente sind als sehr positiv zu bewerten, weil die Freisetzungsprofile eine Anpassung der freigesetzten Mengen der enthaltenen Ionen an eine Zielmenge ermöglichen.

Das komplexe System aus der Physiologie eines Patienten oder Versuchstiers, dem Defekt und dem Knochenregenerationsmaterial macht eine Abschätzung der Leistung des Materials über die Freisetzung sehr schwierig, aber die freigesetzten Konzentrationen haben gezeigt, dass *in vivo* positive Ergebnisse erwartet werden können. Die gewählte Route zur Darstellung des Knochenregenerationsmaterials erfüllt die Anforderungen sehr gut. Über alle Freisetzungen hinweg konnten Konzentrationen nahe der biologischen Relevanz von osteogen wirkenden Ionen freigesetzt werden.

Zur biologischen Charakterisierung wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt, der über alle Proben hinweg eine Zellviabilität um 90 -100 % der Kontrolle ergab und somit alle Scaffolds ausnahmslos als biokompatibel gelten. Weiterhin wurde ein Zelladhäsionstest durchgeführt. Hierbei wurden DPSCs auf den Scaffolds angesiedelt und anschließend deren Adhäsion auf der Innen- und Außenseite der Scaffolds untersucht, wozu das Scaffold nach Sektoren abgerastert und nach einer internen Skala bewertet wurde. Es fanden sich über alle Scaffoldsorten hinweg im Inneren tendenziell mehr adhärierte Zellen als an den Außenflächen wieder. Die Verwendung von PGPS führt gegenüber PGS zu etwas besserer, gleichmäßigerer Adhäsion. Im Vergleich SiCa zu SiCaSr fällt auf, dass die Proben mit eingelagertem Strontiumchlorid eine Absenkung der Adhäsion um mindestens eine Stufe zeigen, wobei sich dennoch lokal überwucherte Stellen zeigen. Werden die Scaffolds mit mikrowellensynthetisiertem Polymer ohne Strontiumchlorid betrachtet, so sinkt die Güte der Adhäsion ebenfalls etwas. Allerdings zeigt die Probe PGPS10 $\mu$ @SiCa ein exzellentes Ergebnis, sodass auch Polymer aus der Mikrowelle zu optimaler Adhäsion führen kann. Werden sowohl die Mikrowellensynthese und die Beladung mit Strontium gemeinsam betrachtet, so zeigt die Probenreihe das schlechteste Ergebnis. Teilweise findet keine Adhäsion statt. Die global beste Probe war PGPS30@SiCa. Die Zelladhäsion ist essenziell für die Anwendung als Knochenregenerationsmaterial, sodass bspw. Vaskularisierung stattfinden kann oder Osteoblasten Hydroxylapatit auf dem Scaffold abscheiden können. In zukünftigen Experimenten sollte eine Quantifizierung des Zellmaterials durch spätere Ablösung durch das Verwenden von fluoreszenten Zellen in Betracht gezogen werden, um genauere Aussagen zu erhalten. Parallel sollte die Untersuchung mit mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Endothelzellen wiederholt werden. Hierbei sollten auch längere Zeiträume bzw. der Verlauf über die Zeit untersucht werden.

Abschließend wurden die Proben PGS@SiCa und PGPS20@SiCa im Tiermodell analog zu GNIESMER et al.<sup>[197]</sup> untersucht und verglichen. Die Versuche im Tiermodell in dieser Arbeit wurden von GNIESMER et al. nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Kein Tier schied aus dem Experiment aufgrund einer starken Immunantwort, welche auf das Biomaterial zurückzuführen wäre, aus.

Die grundsätzliche Verträglichkeit aus dem Zytotoxizitätstest bestätigte sich im Tiermodell aufgrund des guten Allgemeinzustands der Versuchstiere. Beide Versuchsgruppen zeigten für den durchschnittlichen Venolendurchmesser, der Fließgeschwindigkeit des Blutes und der Scherrate keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur Literatur war die Scherrate durch adhärierte weiße Blutkörperchen an der Gefäßwand höher, was eine milde Immunantwort vermuten lässt. Allerdings fand dies keinen Ausdruck in Symptomen bei den Versuchstieren. Dies spiegelt sich in den adhären Leukozyten wider, welche im Verlauf des Experiments erst sinken und zur Mitte hin wieder steigen. Die rollenden Leukozyten hingegen sinken auf ein sehr niedriges Niveau.

Die funktionelle Kapillardichte zeigt, dass für die Probe PGPS20@SiCa signifikant mehr Blutgefäße gebildet wurden als bei PGS@SiCa. Die FKD über beide Proben hinweg ist allerdings auch deutlich höher als die im Vergleichsexperiment von GNIESMER et al.<sup>[197]</sup> erzielten Werte. Es wurden ein kommerziell erhältliches poröses Polymer Scaffold (Biomerix RCR Patch) mit elektrogenesponnenen PCL-Matten für die Reparatur der Rotatorenmanschette in der Schulter untersucht. Für das Knochenregenerationsmaterial stieg die FKD um den Faktor von 2.2 an, im Vergleichsexperiment jedoch maximal um den Faktor 1.5. In den Zellfärbungen der histologischen Schnitte lassen sich viele neu gebildete Blutgefäße finden. Es ist erkennbar, dass eine gewünschte Infiltration des Implantats von Zellen stattfand. Eine mögliche Verkapselung durch Bindegewebe als Immunantwort konnte ausgeschlossen werden. Es lässt sich sagen, dass das Knochenregenerationsmaterial eine Stützstruktur für Zellen bieten kann und die essenziell wichtige Vaskularisierung induziert.

Es wurde ein Knochenregenerationsmaterial hergestellt, indem die Vorteile von anorganischen bioaktiven Gläsern mit denen des synthetischen Biopolymers PGS und seinen Derivaten zu einem dem Knochen ähnelnden Kompositmaterial kombiniert wurden. Makroskopisch ist das Implantat der Spongiosa nachempfunden. Es konnte der erfolgreiche Aufbau eines Copolymers und gleichzeitig eines Polymer-Komposits mit Calciumglycerolphosphat durchgeführt werden; hierdurch wurden die mechanischen Eigenschaften verbessert. Die Materialien besitzen eine sehr gute Biokompatibilität im Zelltest und die Fähigkeit, dass Zellen adhären können. Die inhärenten Materialeigenschaften, wie die freisetzbaren Ionen und deren Konzentrationen, lassen darauf schließen, dass das Knochenregenerationsmaterial osteogene und -konduktive Eigenschaften besitzt. Die Fähigkeit zur Osteoinduktion aufgrund der Freisetzung von Orthokieselsäure sollte in einem separaten Experiment überprüft werden. Die vielseitige Modifizierbarkeit lässt die Einstellung weiterer Eigenschaften zu, wie das Erzielen einer antimikrobiellen Wirkung. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass das Material die Vaskularisierung fördert, in den Körper einwächst und keine starke Immunantwort hervorruft. In einem nächsten Schritt sollte im Tiermodell das Potential zur Osteogenese untersucht werden.

## 7 Quellen- und Literaturverzeichnis

- [1] N. L. Fazzalari, *Osteoporos. Int.* **2011**, *22*, 2003–2006.
- [2] D. P. Lew, F. A. Waldvogel, *N. Engl. J. Med.* **1997**, *336*, 999–1007.
- [3] M. Campanacci, P. Ruggieri, *Z. Orthop. Ihre Grenzgeb.* **2008**, *130*, 259–264.
- [4] T. D. Rachner, S. Khosla, L. C. Hofbauer, *Lancet* **2011**, *377*, 1276–1287.
- [5] J. M. Kanczler, J. A. Wells, D. M. R. Gibbs, K. M. Marshall, D. K. O. Tang, R. O. C. Oreffo, in *Princ. Tissue Eng.*, Elsevier, **2020**, pp. 917–935.
- [6] M. M. Stevens, *Mater. Today* **2008**, *11*, 18–25.
- [7] G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, D. Reißig, J. Salvetter, W. Schmidt, F. Schmitz, E. Schulte, K. Spänel-Borowski, W. Wolff, L. J. Wurzinger, H.-G. Zilch, *Anatomie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2010**.
- [8] L. Roseti, V. Parisi, M. Petretta, C. Cavallo, G. Desando, I. Bartolotti, B. Grigolo, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 1246–1262.
- [9] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2009**.
- [10] T.-M. De Witte, L. E. Fratila-Apachitei, A. A. Zadpoor, N. A. Peppas, *Regen. Biomater.* **2018**, *5*, 197–211.
- [11] V. M. Schatkoski, T. Larissa do Amaral Montanheiro, B. R. Canuto de Menezes, R. M. Pereira, K. F. Rodrigues, R. G. Ribas, D. Morais da Silva, G. P. Thim, *Ceram. Int.* **2021**, *47*, 2999–3012.
- [12] E. Roddy, M. R. DeBaun, A. Daoud-Gray, Y. P. Yang, M. J. Gardner, *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* **2018**, *28*, 351–362.
- [13] S. G. Hopp, L. E. Dahners, J. A. Gilbert, *J. Orthop. Res.* **1989**, *7*, 579–584.
- [14] N. Shibuya, D. C. Jupiter, *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **2015**, *32*, 21–34.
- [15] R. Vaishya, M. Chauhan, A. Vaish, *J. Clin. Orthop. Trauma* **2013**, *4*, 157–163.
- [16] N. Shayesteh Moghaddam, M. Taheri Andani, A. Amerinatanzi, C. Haberland, S. Huff, M. Miller, M. Elahinia, D. Dean, *Biomanufacturing Rev.* **2016**, *1*, 1.
- [17] A. T., J. C., *Eur. Spine J.* **2001**, *10*, S96–S101.
- [18] H. Qu, H. Fu, Z. Han, Y. Sun, *RSC Adv.* **2019**, *9*, 26252–26262.
- [19] A. Bharadwaz, A. C. Jayasuriya, *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *110*, 110698.

- [20] F. Baino, S. Hamzehlou, S. Kargozar, *J. Funct. Biomater.* **2018**, *9*, 25.
- [21] S. Pramanik, S. Kharche, N. More, D. Ranglani, *Eng. Regen.* **2023**, *4*, 193–204.
- [22] L. Vogt, F. Ruther, S. Salehi, A. R. Boccaccini, *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2002026.
- [23] W. Wang, B. Zhang, L. Zhao, M. Li, Y. Han, L. Wang, Z. Zhang, J. Li, C. Zhou, L. Liu, *Nanotechnol. Rev.* **2021**, *10*, 1359–1373.
- [24] J. Venkatesan, S.-K. Kim, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 3124–3140.
- [25] P. Gao, H. Zhang, Y. Liu, B. Fan, X. Li, X. Xiao, P. Lan, M. Li, L. Geng, D. Liu, Y. Yuan, Q. Lian, J. Lu, Z. Guo, Z. Wang, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 23367.
- [26] S. Shokri, B. Movahedi, M. Rafieinia, H. Salehi, *Appl. Surf. Sci.* **2015**, *357*, 1758–1764.
- [27] J. R. Jones, *Acta Biomater.* **2015**, *23*, S53–S82.
- [28] M. Montazerian, E. Dutra Zanotto, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2016**, *104*, 1231–1249.
- [29] S. Pina, J. M. Oliveira, R. L. Reis, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 1143–1169.
- [30] R. Eivazzadeh-Keihan, K. K. Chenab, R. Taheri-Ledari, J. Mosafer, S. M. Hashemi, A. Mokhtarzadeh, A. Maleki, M. R. Hamblin, *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *107*, 110267.
- [31] X. J. Loh, A. Abdul Karim, C. Owh, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 7641–7652.
- [32] S. Saravanan, S. Vimalraj, P. Thanikaivelan, S. Banudevi, G. Manivasagam, *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *121*, 38–54.
- [33] M. . Coelho, M. . Fernandes, *Biomaterials* **2000**, *21*, 1095–1102.
- [34] A. Mishra, R. Dubey, in *Green Chem. Environ. Remediat.*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, **2012**, pp. 379–424.
- [35] A. Kumar, Y. Kuang, Z. Liang, X. Sun, *Mater. Today Nano* **2020**, *11*, 100076.
- [36] H. M. Aydin, K. Salimi, Z. M. O. Rzayev, E. Pişkin, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 503–509.
- [37] G. A. Spinaz, S. Fischli, *Endokrinologie Und Stoffwechsel*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2011**.
- [38] E. M. Carlisle, *Science (80-. )*. **1970**, *167*, 279–280.
- [39] E. M. Carlisle, *Calcif. Tissue Int.* **1981**, *33*, 27–34.

- [40] C. D. Seaborn, F. H. Nielsen, *Biol. Trace Elem. Res.* **2002**, *89*, 251–261.
- [41] M. Dong, G. Jiao, H. Liu, W. Wu, S. Li, Q. Wang, D. Xu, X. Li, H. Liu, Y. Chen, *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, *173*, 306–315.
- [42] M. Y. Shie, S. J. Ding, H. C. Chang, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2604–2614.
- [43] X. Zhou, F. M. Moussa, S. Mankoci, P. Ustriyana, N. Zhang, S. Abdelmagid, J. Molenda, W. L. Murphy, F. F. Safadi, N. Sahai, *Acta Biomater.* **2016**, *39*, 192–202.
- [44] S. Maeno, Y. Niki, H. Matsumoto, H. Morioka, T. Yatabe, A. Funayama, Y. Toyama, T. Taguchi, J. Tanaka, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4847–4855.
- [45] P. J. Marie, *Bone* **2010**, *46*, 571–576.
- [46] S. L. Godwin, S. P. Soltoff, *Bone* **2002**, *30*, 559–566.
- [47] M. M. Dvorak, A. Siddiqua, D. T. Ward, D. H. Carter, S. L. Dallas, E. F. Nemeth, D. Riccardi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5140–5145.
- [48] N. Chattopadhyay, S. Yano, J. Tfelt-Hansen, P. Rooney, D. Kanuparthi, S. Bandyopadhyay, X. Ren, E. Terwilliger, E. M. Brown, *Endocrinology* **2004**, *145*, 3451–3462.
- [49] S. Choudhary, A. Kumar, R. K. Kale, L. G. Raisz, C. C. Pilbeam, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *322*, 395–402.
- [50] P. J. Marie, P. Ammann, G. Boivin, C. Rey, *Calcif. Tissue Int.* **2001**, *69*, 121–129.
- [51] P. J. Marie, M. T. Garba, M. Hott, L. Miravet, *Miner. Electrolyte Metab.* **1985**, *11*, 5–13.
- [52] M. D. Grynpas, P. J. Marie, *Bone* **1990**, *11*, 313–319.
- [53] M. D. Grynpas, E. Hamilton, R. Cheung, Y. Tsouderos, P. Deloffre, M. Hott, P. J. Marie, *Bone* **1996**, *18*, 253–259.
- [54] S. Choudhary, P. Halbout, C. Alander, L. Raisz, C. Pilbeam, *J. Bone Miner. Res.* **2007**, *22*, 1002–1010.
- [55] R. Baron, Y. Tsouderos, *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *450*, 11–17.
- [56] P. Rahmanian-Devin, V. Baradaran Rahimi, V. R. Askari, *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2021**, *2021*, 1–17.
- [57] C. G. Bellows, J. N. M. Heersche, J. E. Aubin, *Bone Miner.* **1992**, *17*, 15–29.



- [58] M. Julien, S. Khoshniat, A. Lacreusette, M. Gatius, A. Bozec, E. F. Wagner, Y. Wittrant, M. Masson, P. Weiss, L. Beck, D. Magne, J. Guicheux, *J. Bone Miner. Res.* **2009**, *24*, 1856–1868.
- [59] M. Julien, D. Magne, M. Masson, M. Rolli-Derkinderen, O. Chassande, C. Cario-Toumaniantz, Y. Cherel, P. Weiss, J. Guicheux, *Endocrinology* **2007**, *148*, 530–537.
- [60] A. Nauth, M. D. McKee, T. A. Einhorn, J. T. Watson, R. Li, E. H. Schemitsch, *J. Orthop. Trauma* **2011**, *25*, 462–466.
- [61] R. Jahagirdar, B. E. Scammell, *Surg.* **2009**, *27*, 63–69.
- [62] M. S. Wietecha, W. L. Cerny, L. A. Dipietro, *New Perspectives in Regeneration*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [63] A. M. Phillips, *Injury* **2005**, *36*, S5–S7.
- [64] D. A. Towler, *J. Clin. Invest.* **2007**, *117*, 1477–1480.
- [65] D. A. Towler, *Curr. Osteoporos. Rep.* **2008**, *6*, 67–71.
- [66] D. A. Towler, *J. Bone Miner. Res.* **2011**, *26*, 2579–2582.
- [67] A. Schindeler, M. M. McDonald, P. Bokko, D. G. Little, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2008**, *19*, 459–466.
- [68] K. N. Malizos, L. K. Papatheodorou, *Injury* **2005**, *36*, S13–S19.
- [69] J. R. Dwek, *Skeletal Radiol.* **2010**, *39*, 319–323.
- [70] B. M. Willie, A. Petersen, K. Schmidt-Bleek, A. Cipitria, M. Mehta, P. Strube, J. Lienau, B. Wildemann, P. Fratzl, G. Duda, *Soft Matter* **2010**, *6*, 4976.
- [71] P. Kolar, K. Schmidt-Bleek, H. Schell, T. Gaber, D. Toben, G. Schmidmaier, C. Perka, F. Buttgerit, G. N. Duda, *Tissue Eng. Part B Rev.* **2010**, *16*, 427–434.
- [72] M. Mehta, K. Schmidt-Bleek, G. N. Duda, D. J. Mooney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1257–1276.
- [73] M. Rupp, M. Kerschbaum, L. Klute, L. Frank, V. Alt, *Unfallchirurg* **2021**, *124*, 146–152.
- [74] Y. Fillingham, J. Jacobs, *Bone Joint J.* **2016**, *98-B*, 6–9.
- [75] W. Palmer, A. Crawford-Sykes, R. E. C. Rose, *West Indian Med. J.* **2008**, *57*, 490–2.
- [76] P. Baldwin, D. J. Li, D. A. Auston, H. S. Mir, R. S. Yoon, K. J. Koval, *J. Orthop. Trauma* **2019**, *33*, 203–213.

- [77] J. . Liu, L. . Chao, L. . Su, J. . Wang, C. . Wang, *J. Hosp. Infect.* **2002**, *50*, 293–297.
- [78] L. C. Chow, in *Octacalcium Phosphate*, KARGER, Basel, **2001**, pp. 148–163.
- [79] J. W. Nicholson, J. H. Braybrook, E. A. Wasson, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1991**, *2*, 277–285.
- [80] A. Carter, *Nurs. Stand.* **1992**, *7*, 55–55.
- [81] G. L. Koons, M. Diba, A. G. Mikos, *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 584–603.
- [82] M. Epple, *Biomaterialien Und Biomineralisation*, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [83] X. Wei, D. Zhao, B. Wang, W. Wang, K. Kang, H. Xie, B. Liu, X. Zhang, J. Zhang, Z. Yang, *Exp. Biol. Med.* **2016**, *241*, 592–602.
- [84] K. Alvarez, H. Nakajima, *Materials (Basel)*. **2009**, *2*, 790–832.
- [85] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 546–554.
- [86] K. F. Farraro, K. E. Kim, S. L.-Y. Woo, J. R. Flowers, M. B. McCullough, *J. Biomech.* **2014**, *47*, 1979–1986.
- [87] M. Nabiyouni, T. Brückner, H. Zhou, U. Gbureck, S. B. Bhaduri, *Acta Biomater.* **2018**, *66*, 23–43.
- [88] Y. Chen, J. E. Frith, A. Dehghan-Manshadi, H. Attar, D. Kent, N. D. M. Soro, M. J. Bermingham, M. S. Dargusch, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2017**, *75*, 169–174.
- [89] H. J. Haugen, M. Monjo, M. Rubert, A. Verket, S. P. Lyngstadaas, J. E. Ellingsen, H. J. Rønold, J. C. Wohlfahrt, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 5390–5399.
- [90] J. Liu, J. Ruan, L. Chang, H. Yang, W. Ruan, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 503–512.
- [91] T. Takizawa, N. Nakayama, H. Haniu, K. Aoki, M. Okamoto, H. Nomura, M. Tanaka, A. Sobajima, K. Yoshida, T. Kamanaka, K. Ajima, A. Oishi, C. Kuroda, H. Ishida, S. Okano, S. Kobayashi, H. Kato, N. Saito, *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1703608.
- [92] Z. Sheikh, S. Najeeb, Z. Khurshid, V. Verma, H. Rashid, M. Glogauer, *Materials (Basel)*. **2015**, *8*, 5744–5794.
- [93] M. Rinaudo, *Polym. Int.* **2008**, *57*, 397–430.
- [94] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106–126.
- [95] R. Shepherd, S. Reader, A. Falshaw, *Glycoconj. J.* **1997**, *14*, 535–542.

- [96] N. R. Sudarshan, D. G. Hoover, D. Knorr, *Food Biotechnol.* **1992**, *6*, 257–272.
- [97] A. R. Costa-Pinto, R. L. Reis, N. M. Neves, *Tissue Eng. Part B Rev.* **2011**, *17*, 331–347.
- [98] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S. M. Samani, Z. Amoozgar, *Res. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 1–16.
- [99] S. K. L. Levengood, M. Zhang, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3161.
- [100] R. Yunus Basha, S. K. Sampath, M. Doble, *Mater. Sci. Eng. C* **2015**, *57*, 452–463.
- [101] J. A. Leupold, W. R. Barfield, Y. H. An, L. A. Hartssock, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2006**, *79B*, 292–297.
- [102] B.-D. Katthagen, H. Mittelmeier, *Arch. Orthop. Trauma. Surg.* **1984**, *103*, 291–302.
- [103] L. Cen, W. Liu, L. Cui, W. Zhang, Y. Cao, *Pediatr. Res.* **2008**, *63*, 492–496.
- [104] A. Malhotra, P. Habibovic, *Trends Biotechnol.* **2016**, *34*, 983–992.
- [105] M. Shakir, I. Zia, A. Rehman, R. Ullah, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 903–916.
- [106] M. A. Nazeer, E. Yilgör, I. Yilgör, *Carbohydr. Polym.* **2017**, *175*, 38–46.
- [107] M. Mehedi Hasan, M. Nuruzzaman Khan, P. Haque, M. M. Rahman, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *117*, 1110–1117.
- [108] L. Chen, J. Hu, J. Ran, X. Shen, H. Tong, *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *65*, 1–7.
- [109] A. Hasan, G. Waibhaw, V. Saxena, L. M. Pandey, *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 923–934.
- [110] B. Gaihre, A. C. Jayasuriya, *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *91*, 330–339.
- [111] S. Moeini, M. R. Mohammadi, A. Simchi, *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 146–155.
- [112] A. Marrella, G. Tedeschi, P. Giannoni, A. Lagazzo, F. Sbrana, F. Barberis, R. Quarto, F. Puglisi, S. Scaglione, *Mater. Sci. Eng. C* **2018**, *93*, 1044–1053.
- [113] H. Eslami, H. Azimi Lisar, T. S. Jafarzadeh Kashi, M. Tahriri, M. Ansari, T. Rafiei, F. Bastami, A. Shahin-Shamsabadi, F. Mashhadi Abbas, L. Tayebi, *Biologicals* **2018**, *53*, 51–62.
- [114] D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, J. A. Lewis, *Adv. Mater.* **2014**, *26*, 3124–3130.
- [115] F. Doberenz, K. Zeng, C. Willems, K. Zhang, T. Groth, *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 607–628.
- [116] R. Trombetta, J. A. Inzana, E. M. Schwarz, S. L. Kates, H. A. Awad, *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 23–44.

- [117] A. Bandyopadhyay, I. Mitra, S. Bose, *Curr. Osteoporos. Rep.* **2020**, *18*, 505–514.
- [118] J. K. Placone, A. J. Engler, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1701161.
- [119] S. Bose, N. Sarkar, S. Vahabzadeh, *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *105*, 110096.
- [120] M. Dumas, P. Terriault, V. Brailovski, *Mater. Des.* **2017**, *121*, 383–392.
- [121] F. Tang, L. Li, D. Chen, *Adv. Mater.* **2012**, *24*, 1504–1534.
- [122] R. R. Castillo, M. Vallet-Regí, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 929.
- [123] M. Vallet-Regí, F. Balas, D. Arcos, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 7548–7558.
- [124] Y. Feng, N. Panwar, D. J. H. Tng, S. C. Tjin, K. Wang, K.-T. Yong, *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *319*, 86–109.
- [125] J. C. Vartuli, K. D. Schmitt, C. T. Kresge, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, S. B. McCullen, S. D. Hellring, J. S. Beck, J. L. Schlenker, D. H. Olson, E. W. Sheppard, **1994**, pp. 53–60.
- [126] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee, *J. Biomed. Mater. Res.* **1971**, *5*, 117–141.
- [127] L. L. Hench, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2006**, *17*, 967–978.
- [128] M. N. Rahaman, D. E. Day, B. Sonny Bal, Q. Fu, S. B. Jung, L. F. Bonewald, A. P. Tomsia, *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 2355–2373.
- [129] M. Bellantone, N. J. Coleman, L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *51*, 484–490.
- [130] M. Miola, E. Verné, C. Vitale-Brovarone, F. Baino, *Int. J. Appl. Glas. Sci.* **2016**, *7*, 238–247.
- [131] Y. Lin, R. F. Brown, S. B. Jung, D. E. Day, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102A*, 4491–4499.
- [132] E. Gentleman, Y. C. Fredholm, G. Jell, N. Lotfibakhshaiesh, M. D. O'Donnell, R. G. Hill, M. M. Stevens, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3949–3956.
- [133] L. Yu, Y. Li, K. Zhao, Y. Tang, Z. Cheng, J. Chen, Y. Zang, J. Wu, L. Kong, S. Liu, W. Lei, Z. Wu, *PLoS One* **2013**, *8*, e62570.
- [134] L. L. Hench, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2009**, *29*, 1257–1265.
- [135] G. E. Merwin, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* **1986**, *95*, 78–82.
- [136] L. L. Hench, J. Wilson, in *Clin. Performance Skelet. Prostheses*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2004**, pp. 1–10.
- [137] S. Lin, J. R. Jones, *Biomed. Glas.* **2018**, *4*, 13–20.

- [138] D. Westenberg, R. Viswanathan, D. L. Kadyk, S. Hibbs, J. Kopel, D. Day, *Adv. Microbiol.* **2021**, *11*, 646–656.
- [139] T. Gilchrist, M. A. Glasby, D. M. Healy, G. Kelly, D. V. Lenihan, K. L. McDowall, I. A. Miller, L. M. Myles, *Br. J. Plast. Surg.* **1998**, *51*, 231–237.
- [140] F. Baino, E. Fiume, S. Ciavattini, S. Kargozar, R. Borges, L. A. Genova, J. Marchi, E. Verné, *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1131.
- [141] G. J. Ehrhardt, D. E. Day, *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part B. Nucl. Med. Biol.* **1987**, *14*, 233–242.
- [142] S. Kargozar, S. Hamzehlou, F. Baino, *Materials (Basel)*. **2017**, *10*, 1429.
- [143] V. Miguez-Pacheco, L. L. Hench, A. R. Boccaccini, *Acta Biomater.* **2015**, *13*, 1–15.
- [144] Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 602–606.
- [145] <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=182.132>  
0&SearchTerm=glycerin, 13.03.2023
- [146] N. Gregersen, F. Rosleff, S. Kølvrå, N. Hobolth, K. Rasmussen, R. Lauritzen, *Clin. Chim. Acta* **1980**, *102*, 179–189.
- [147] Q.-Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M. Q. Tran, S. E. Harding, N. N. Ali, A. R. Boccaccini, *Biomaterials* **2008**, *29*, 47–57.
- [148] C. Sundback, J. Shyu, Y. Wang, W. Faquin, R. Langer, J. Vacanti, T. Hadlock, *Biomaterials* **2005**, *26*, 5454–5464.
- [149] Y. Wang, Y. M. Kim, R. Langer, *J. Biomed. Mater. Res.* **2003**, *66A*, 192–197.
- [150] X. Li, A. T. L. Hong, N. Naskar, H. J. Chung, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1525–1533.
- [151] R. Martín-Cabezuelo, J. C. Rodríguez-Hernández, G. Vilariño-Feltrer, A. Vallés-Lluch, *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, 382.
- [152] L. Zhou, H. He, C. Jiang, S. He, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, 42196.
- [153] Q. Liu, J. Wu, T. Tan, L. Zhang, D. Chen, W. Tian, *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, *94*, 1427–1435.
- [154] S.-L. Liang, W. D. Cook, G. A. Thouas, Q.-Z. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8516–8529.

- [155] X. Zhang, C. Jia, X. Qiao, T. Liu, K. Sun, *Polym. Test.* **2016**, *54*, 118–125.
- [156] J. Hu, D. Kai, H. Ye, L. Tian, X. Ding, S. Ramakrishna, X. J. Loh, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *70*, 1089–1094.
- [157] R. Rai, M. Tallawi, N. Barbani, C. Frati, D. Madeddu, S. Cavalli, G. Graiani, F. Quaini, J. A. Roether, D. W. Schubert, E. Rosellini, A. R. Boccaccini, *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33*, 3677–3687.
- [158] M. A. Hiob, G. W. Crouch, A. S. Weiss, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *40*, 149–154.
- [159] Z.-J. Sun, C. Chen, M.-Z. Sun, C.-H. Ai, X.-L. Lu, Y.-F. Zheng, B.-F. Yang, D.-L. Dong, *Biomaterials* **2009**, *30*, 5209–5214.
- [160] S. Sant, C. M. Hwang, S.-H. Lee, A. Khademhosseini, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2011**, *5*, 283–291.
- [161] I. Apsite, G. Constante, M. Dulle, L. Vogt, A. Caspari, A. R. Boccaccini, A. Snytycka, S. Salehi, L. Ionov, *Biofabrication* **2020**, *12*, 035027.
- [162] L. Jiang, Y. Jiang, J. Stiadle, X. Wang, L. Wang, Q. Li, C. Shen, S. L. Thibeault, L.-S. Turng, *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *94*, 740–749.
- [163] M. Rostamian, M. R. Kalaei, S. R. Dehkordi, M. Panahi-Sarmad, M. Tirgar, V. Goodarzi, *Eur. Polym. J.* **2020**, *138*, 109985.
- [164] H. Golbaten-Mofrad, M. H. Salehi, S. H. Jafari, V. Goodarzi, M. Entezari, M. Hashemi, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2022**, *110*, 2241–2257.
- [165] Y. Wang, H. Wu, Z. Wang, J. Zhang, J. Zhu, Y. Ma, Z. Yang, Y. Yuan, *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, 965.
- [166] Q. Hou, P. A. De Bank, K. M. Shakesheff, *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 1915.
- [167] C. L. E. Nijst, J. P. Bruggeman, J. M. Karp, L. Ferreira, A. Zumbuehl, C. J. Bettinger, R. Langer, *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3067–3073.
- [168] A. Samourides, L. Browning, V. Hearnden, B. Chen, *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *108*, 110384.
- [169] M. Frydrych, B. Chen, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 6650.
- [170] M. Frydrych, B. Chen, *Polymer (Guildf)*. **2017**, *122*, 159–168.
- [171] M. Shi, L. Bai, M. Xu, Z. Li, T. Hu, J. Hu, Z. Zhang, Z. Yin, B. Guo, *Biofabrication* **2022**, *14*, 035001.
- [172] A. Tevlek, B. Topuz, E. Akbay, H. M. Aydin, *J. Biomater. Appl.* **2022**, *37*, 287–302.

- [173] Y.-C. Yeh, C. B. Highley, L. Ouyang, J. A. Burdick, *Biofabrication* **2016**, *8*, 045004.
- [174] A. B. R. Touré, E. Mele, J. K. Christie, *Nanomaterials* **2020**, *10*, 626.
- [175] X. Zhao, Y. Wu, Y. Du, X. Chen, B. Lei, Y. Xue, P. X. Ma, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 3222–3233.
- [176] P. Kerativitayanan, A. K. Gaharwar, *Acta Biomater.* **2015**, *26*, 34–44.
- [177] A. Tevlek, P. Hosseinian, C. Ogutcu, M. Turk, H. M. Aydin, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *72*, 316–324.
- [178] A. Tevlek, D. T. Agacik, H. M. Aydin, *J. Appl. Polym. Sci.* **2020**, *137*, 1–9.
- [179] S. H. Zaky, K. W. Lee, J. Gao, A. Jensen, K. Verdelis, Y. Wang, A. J. Almarza, C. Sfeir, *Acta Biomater.* **2017**, *54*, 95–106.
- [180] D. Bellucci, A. Sola, P. Gentile, G. Ciardelli, V. Cannillo, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2012**, *100A*, 3259–3266.
- [181] Q.-Z. Chen, J. M. W. Quinn, G. A. Thouas, X. Zhou, P. A. Komesaroff, *Adv. Eng. Mater.* **2010**, *12*, B642–B648.
- [182] Q. Yao, P. Nooeaid, J. A. Roether, Y. Dong, Q. Zhang, A. R. Boccaccini, *Ceram. Int.* **2013**, *39*, 7517–7522.
- [183] D. Lin, K. Yang, W. Tang, Y. Liu, Y. Yuan, C. Liu, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *137*, 1–11.
- [184] J. Hoffmann, M. Nüchter, B. Ondruschka, P. Wasserscheid, *Green Chem.* **2003**, *5*, 296–299.
- [185] R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge, J. Rousell, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279–282.
- [186] R. J. Giguere, T. L. Bray, S. M. Duncan, G. Majetich, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4945–4948.
- [187] C. Gabriel, S. Gabriel, E. H. Grant, E. H. Grant, B. S. J. Halstead, D. Michael P. Mingos, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 213.
- [188] M. J. Collins Jr, *Future Med. Chem.* **2010**, *2*, 151–155.
- [189] D. M. P. Mingos, *Res. Chem. Intermed.* **1994**, *20*, 85–91.
- [190] D. Bogdal, A. Prociak, S. Michalowski, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 178–188.

- [191] D. Bogdal, S. Bednarz, K. Matras-Postolek, **2014**, pp. 241–294.
- [192] G. S. J. Sturm, M. D. Verweij, T. van Gerven, A. I. Stankiewicz, G. D. Stefanidis, *Int. J. Heat Mass Transf.* **2013**, *57*, 375–388.
- [193] H. M. Aydin, K. Salimi, Z. M. O. Rzayev, E. Pişkin, *Biomater. Sci.* **2013**, *1*, 503–509.
- [194] C. C. Lau, M. K. Bayazit, J. C. Knowles, J. Tang, *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 3937–3947.
- [195] C. C. Lau, M. Al Qaysi, N. Owji, M. K. Bayazit, J. Xie, J. C. Knowles, J. Tang, *Mater. Today Adv.* **2020**, *5*, 100023.
- [196] S. H. Lee, K. W. Lee, P. S. Gade, A. M. Robertson, Y. Wang, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2018**, *29*, 907–916.
- [197] S. Gniesmer, R. Brehm, A. Hoffmann, D. de Cassan, H. Menzel, A. L. Hoheisel, B. Glasmacher, E. Willbold, J. Reifenrath, N. Ludwig, R. Zimmerer, F. Tavassol, N. C. Gellrich, A. Kampmann, *PLoS One* **2020**, *15*, 1–18.
- [198] S. Gniesmer, R. Brehm, A. Hoffmann, D. de Cassan, H. Menzel, A. L. Hoheisel, B. Glasmacher, E. Willbold, J. Reifenrath, M. Wellmann, N. Ludwig, F. Tavassol, R. Zimmerer, N. C. Gellrich, A. Kampmann, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2019**, *13*, 1190–1202.
- [199] K. Bayne, *Physiologist* **1996**, *39*, 199, 208–11.
- [200] C. J. Shih, P. S. Lu, W. C. Chen, Y. W. Chiang, C. S. Chien, *Ceram. Int.* **2014**, *40*, 15019–15025.
- [201] M. Schumacher, A. Lode, A. Helth, M. Gelinsky, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 9547–9557.
- [202] Y. Li, W. D. Cook, C. Moorhoff, W. C. Huang, Q. Z. Chen, *Polym. Int.* **2013**, *62*, 534–547.
- [203] J. W. Fluhr, R. Darlenski, C. Surber, *Br. J. Dermatol.* **2008**, *159*, 23–34.
- [204] M. Tanaka, M. Sato, *J. Chem. Phys.* **2007**, *126*, 034509.
- [205] S. L. Liang, W. D. Cook, G. A. Thouas, Q. Z. Chen, *Biomaterials* **2010**, *31*, 8516–8529.
- [206] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in Der Organischen Chemie*, Thieme, Stuttgart, **2005**.
- [207] G. Vlahov, *JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1201–1203.
- [208] P. Huang, X. Bi, J. Gao, L. Sun, S. Wang, S. Chen, X. Fan, Z. You, Y. Wang, *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 2090–2101.
- [209] Z. You, H. Cao, J. Gao, P. H. Shin, B. W. Day, Y. Wang, *Biomaterials* **2010**, *31*, 3129–3138.



- [210] K. S. W. Sing, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603–619.
- [211] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, *Pure Appl. Chem.* **2015**, *87*, 1051–1069.
- [212] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. X. F. Lam, K. C. Tan, T. C. Lim, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, *1*, 245–260.
- [213] J. R. Jones, *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 4457–4486.
- [214] M. Bohner, R. J. Miron, *Mater. Today* **2019**, *22*, 132–141.
- [215] W. Hummel, U. Berner, E. Curti, F. J. Pearson, T. Thoenen, *Radiochim. Acta* **2002**, *90*, 805–813.
- [216] S. Kargozar, M. Montazerian, E. Fiume, F. Baino, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, DOI 10.3389/fbioe.2019.00161.
- [217] R. N. Pittman, M. L. Ellsworth, *Microvasc. Res.* **1986**, *32*, 371–388.
- [218] A. Patel, A. K. Gaharwar, G. Iviglia, H. Zhang, S. Mukundan, S. M. Mihaila, D. Demarchi, A. Khademhosseini, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3970–3983.
- [219] G. Hu, *J. Cell. Biochem.* **1998**, *69*, 326–335.
- [220] A. Aimaiti, A. Maimaitiyiming, X. Boyong, K. Aji, C. Li, L. Cui, *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8*, 282.

## 8 Anhang

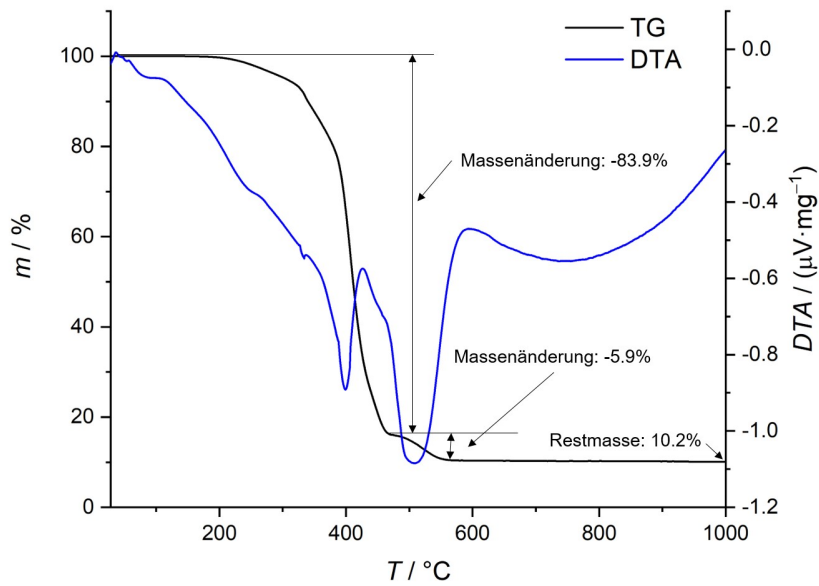


Abbildung 91: Thermogravimetrische Messung des Harzes von PGPS20.

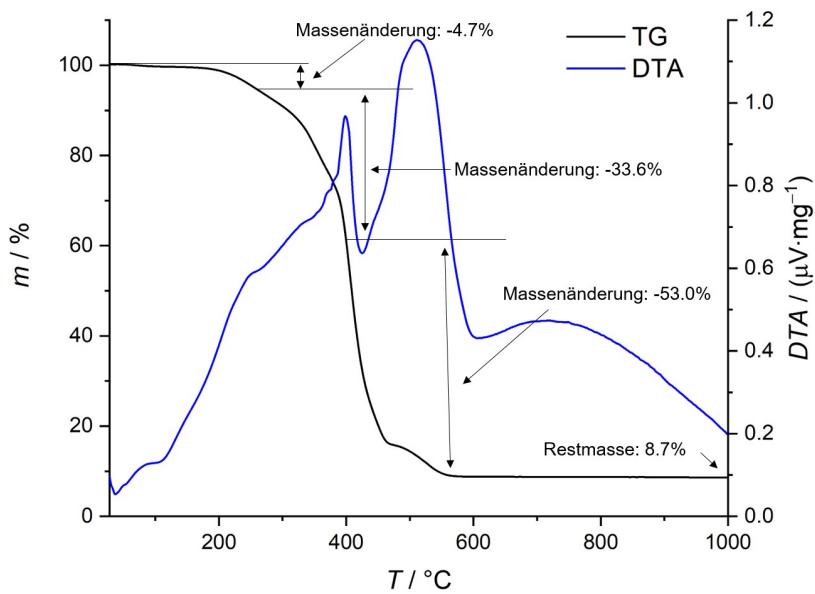
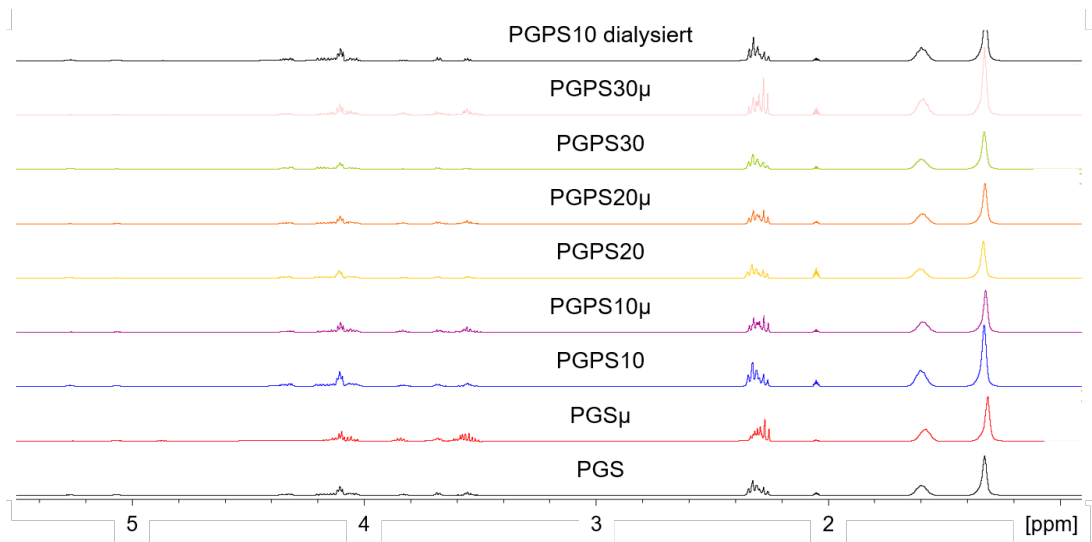
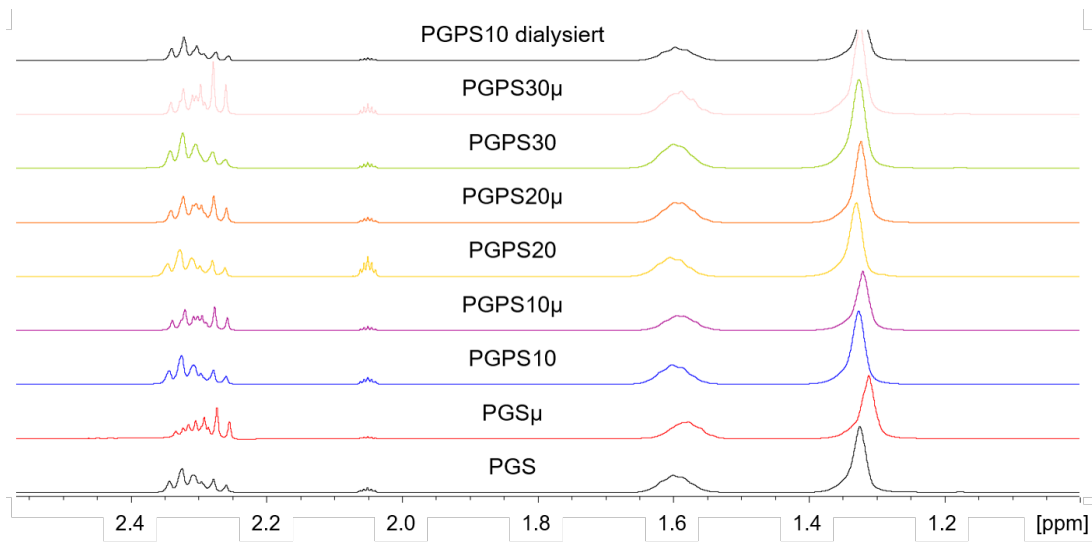
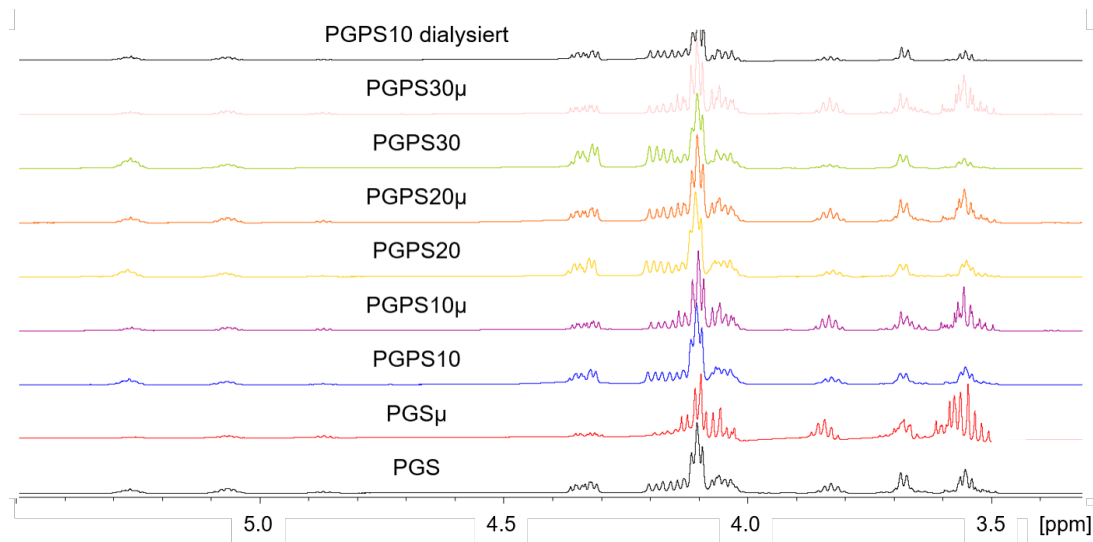
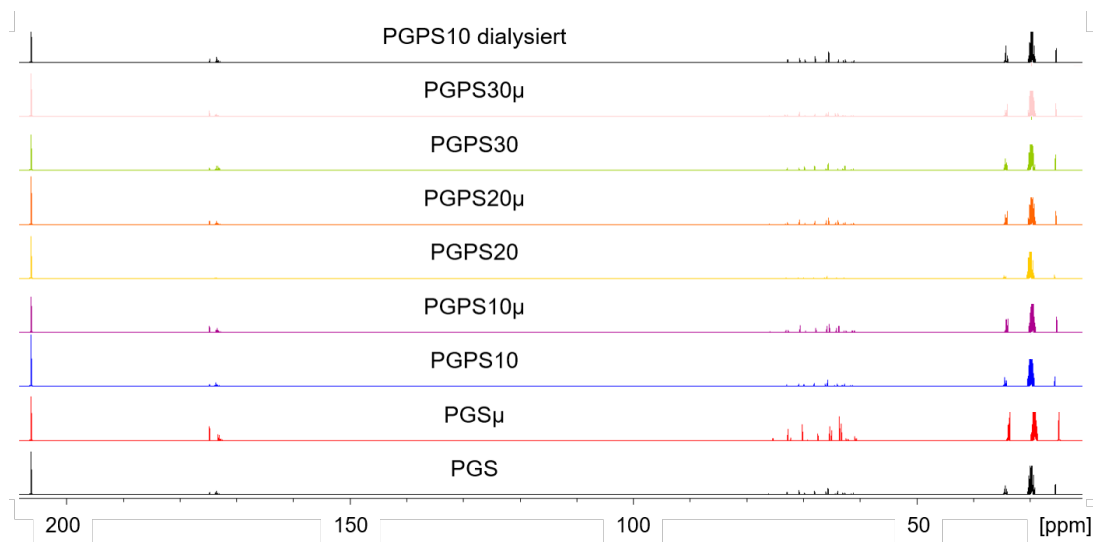
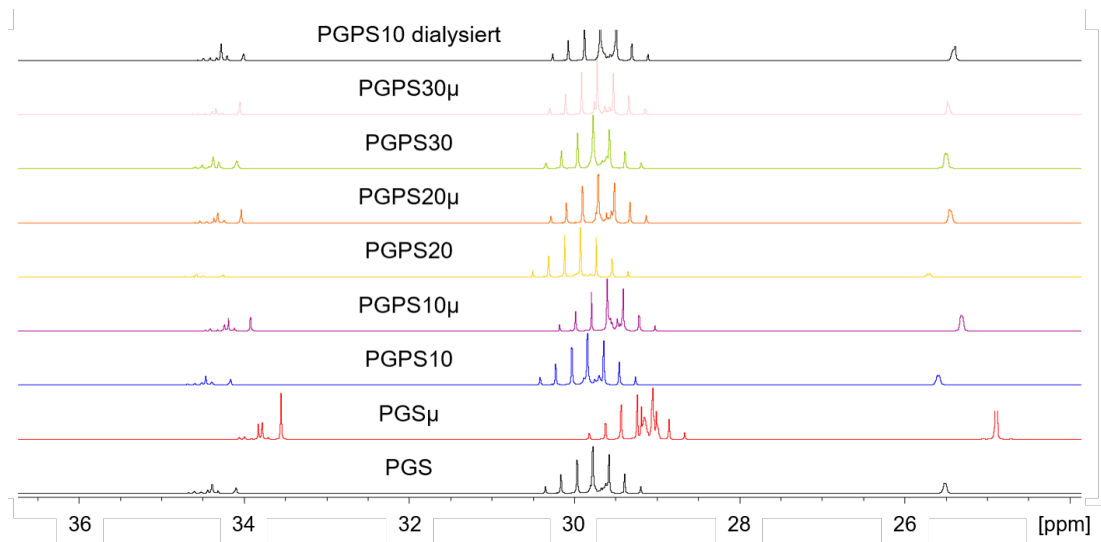
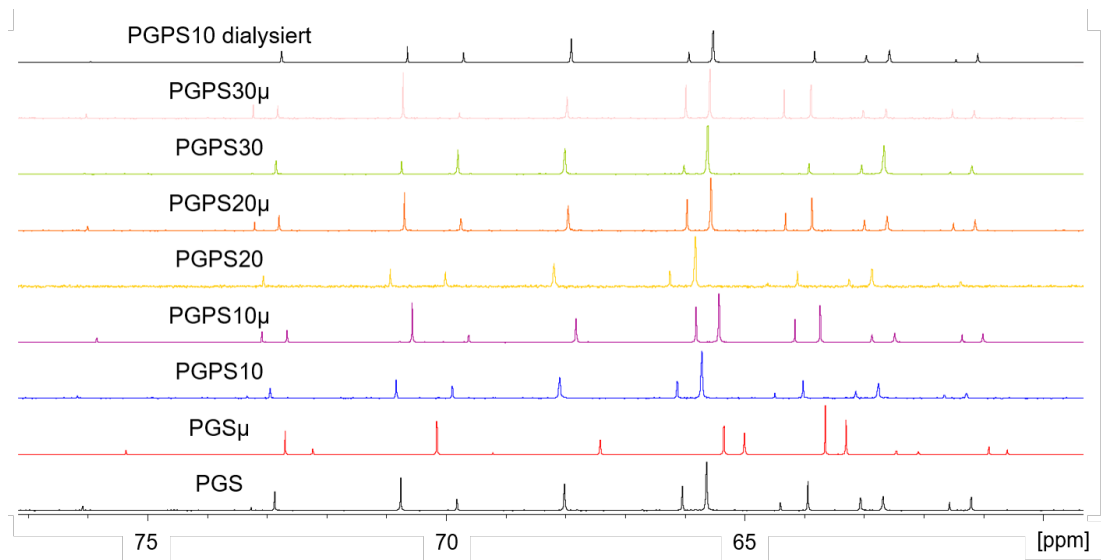


Abbildung 92: Thermogravimetrische Messung des Harzes von PGPS30.

Abbildung 93:  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aller Proben in der Übersicht.Abbildung 94: Detailansicht 1 der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aller Proben.

Abbildung 95: Detailansicht 2 der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren aller Proben.Abbildung 96:  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren aller Proben in der Übersicht.

Abbildung 97: Detailansicht 1 der  $^{13}\text{C}$ -NMR -Spektren aller Proben.Abbildung 98: Detailansicht 2 der  $^{13}\text{C}$ -NMR -Spektren aller Proben.

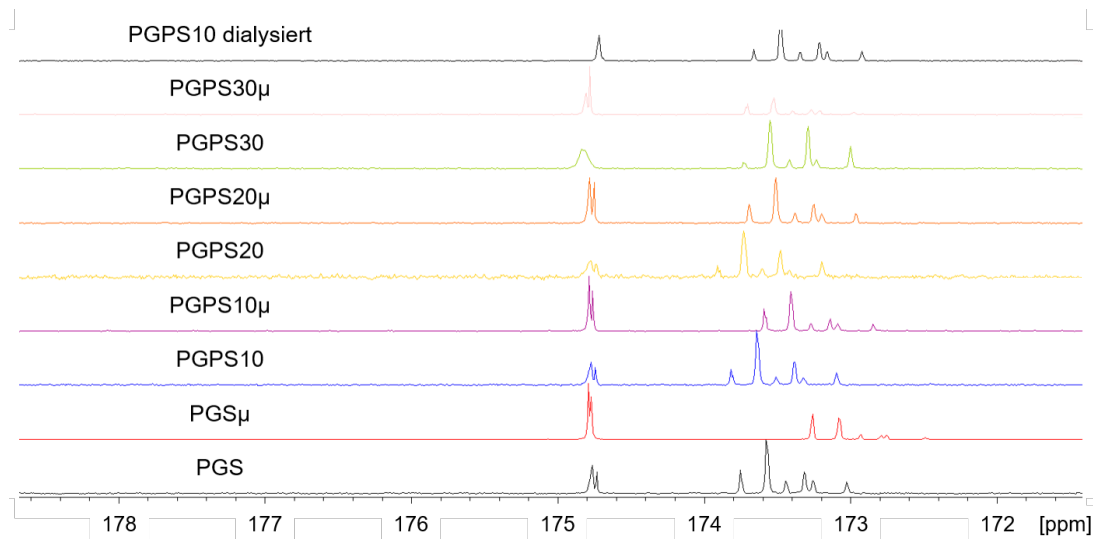


Abbildung 99: Detailansicht 3 der  $^{13}\text{C}$ -NMR -Spektren aller Proben.

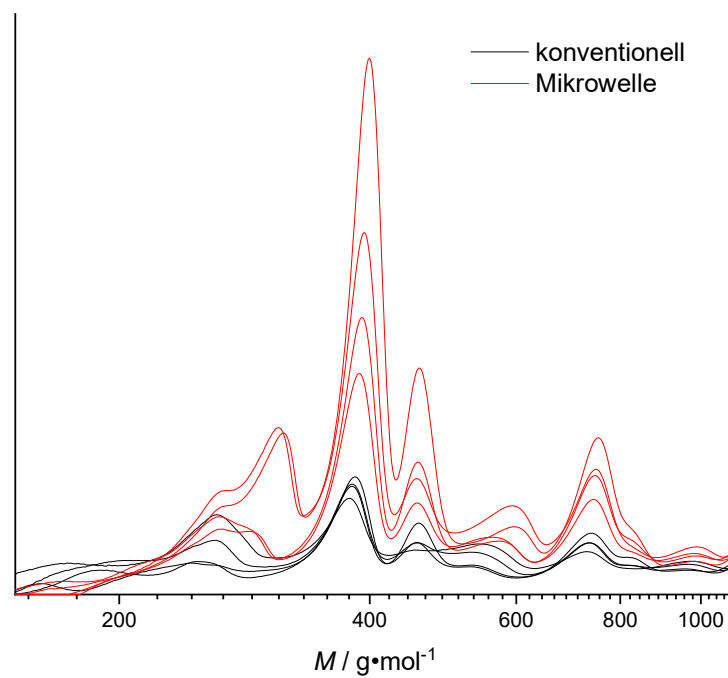


Abbildung 100: Gelpermeationschromatographie von allen Probenvariationen nach konventioneller Herstellung (schwarz) und mithilfe der Mikrowelle (rot) unterschieden. Die konventionell hergestellten Proben stoßen an die Ausschlussgrenze, sodass mit einer größeren Säule erneut gemessen wird.

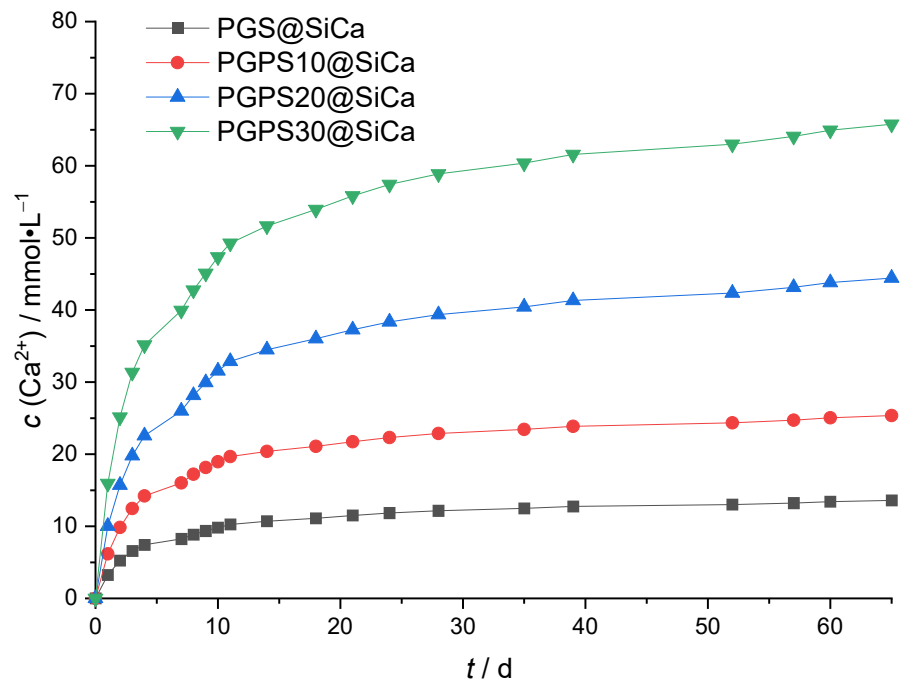


Abbildung 101: Kumulative Konzentration freigesetzter Calciumionen über 65 Tage.

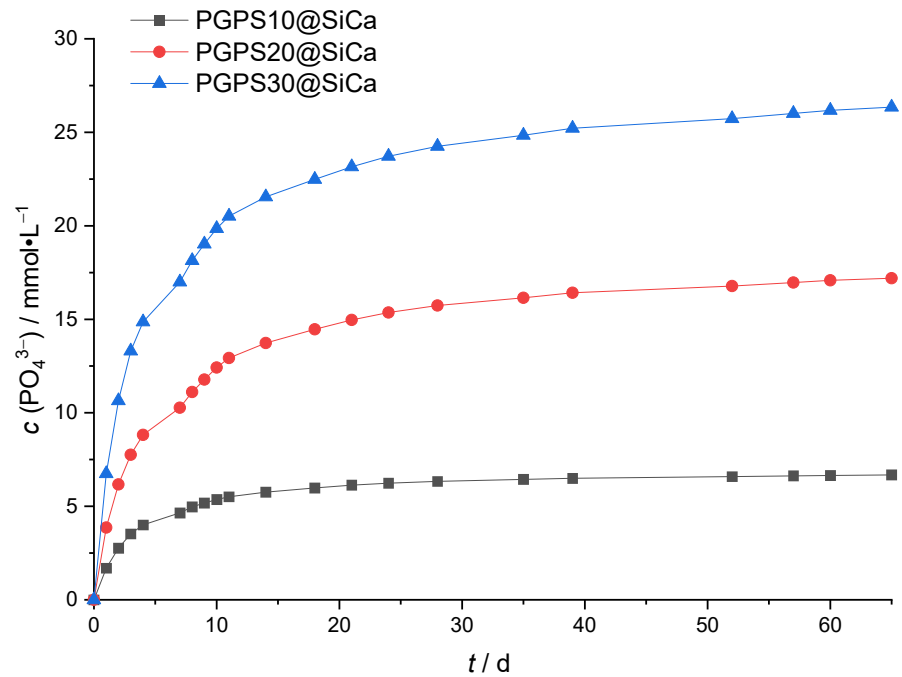


Abbildung 102: Kumulative Konzentration freigesetzter Phosphationen über 65 Tage.

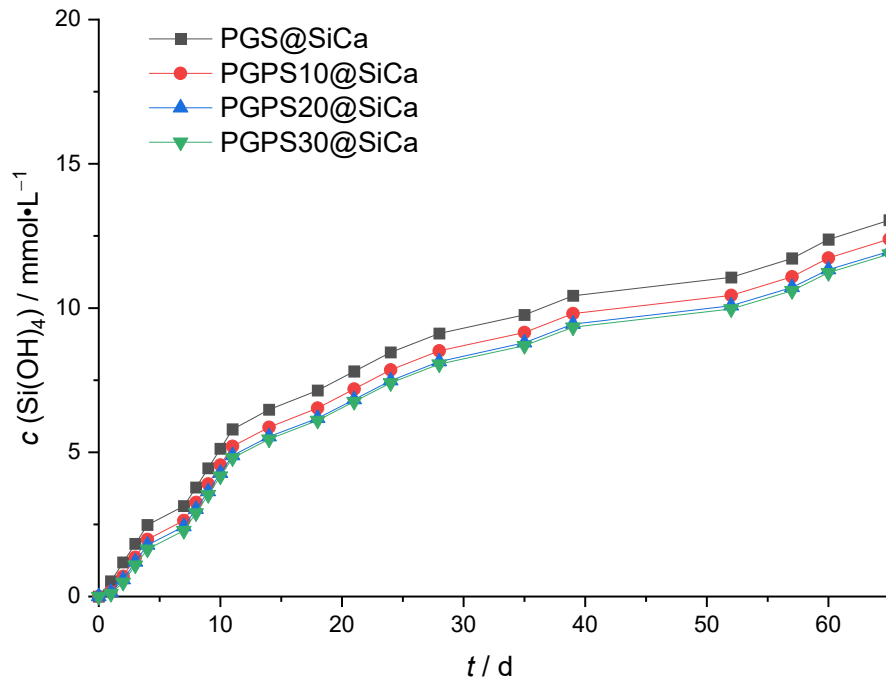


Abbildung 103: Kumulative Konzentration freigesetzter Orthokieselsäure über 65 Tage.

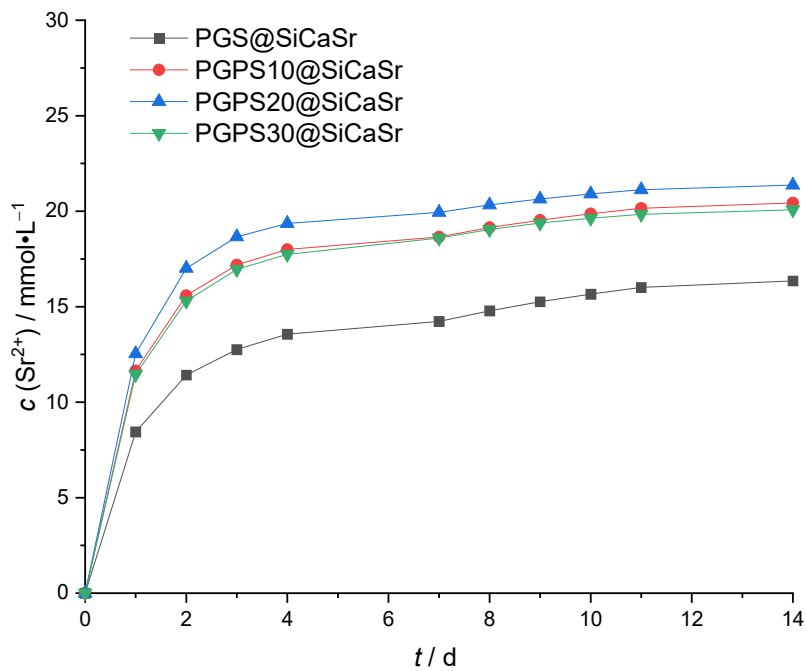


Abbildung 104: Kumulative Konzentration freigesetzter Strontiumionen über 14 Tage.



Tabelle 15: Konzentrationen freigesetzter Calciumionen.

Messpunkt	Tag	$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kumulativ				$c(\text{Ca}^{2+}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ einzeln			
		PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30	PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30
1	1	3.24	6.18	10.03	15.94	3.24	6.18	10.03	15.94
2	2	5.25	9.84	15.72	25.14	2.01	3.66	5.69	9.20
3	3	6.58	12.47	19.78	31.34	1.32	2.63	4.06	6.20
4	4	7.44	14.21	22.56	35.15	0.87	1.74	2.78	3.81
5	7	8.26	16.02	26.00	39.94	0.81	1.81	3.44	4.79
6	8	8.85	17.22	28.16	42.75	0.59	1.20	2.16	2.81
7	9	9.36	18.15	29.95	45.08	0.51	0.94	1.79	2.33
8	10	9.82	18.96	31.56	47.35	0.47	0.80	1.61	2.27
9	11	10.25	19.66	32.88	49.26	0.43	0.70	1.32	1.91
10	14	10.69	20.39	34.48	51.65	0.44	0.73	1.61	2.40
11	18	11.11	21.09	36.02	53.93	0.42	0.70	1.54	2.28
12	21	11.49	21.73	37.27	55.82	0.38	0.64	1.25	1.88
13	24	11.84	22.32	38.35	57.42	0.35	0.59	1.08	1.60
14	28	12.16	22.87	39.36	58.87	0.32	0.55	1.01	1.45
15	35	12.48	23.44	40.43	60.37	0.32	0.56	1.07	1.50
16	39	12.75	23.86	41.32	61.57	0.27	0.43	0.89	1.20
17	52	13.01	24.35	42.35	62.99	0.26	0.48	1.03	1.42
18	57	13.23	24.71	43.15	64.08	0.22	0.37	0.80	1.08
19	60	13.42	25.05	43.80	64.94	0.19	0.34	0.65	0.87
20	65	13.59	25.36	44.43	65.77	0.17	0.32	0.63	0.83

Tabelle 16: Konzentrationen freigesetzter Phosphationen.

Messpunkt	Tag	$c(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kumulativ				$c(\text{PO}_4^{3-}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ einzeln			
		PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30	PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30
1	1	-	1.69	3.86	6.75	-	1.69	3.86	6.75
2	2	-	2.76	6.17	10.64	-	1.07	2.31	3.90
3	3	-	3.53	7.76	13.30	-	0.77	1.59	2.66
4	4	-	4.01	8.82	14.86	-	0.48	1.06	1.56
5	7	-	4.65	10.27	17.00	-	0.65	1.46	2.14
6	8	-	4.97	11.11	18.14	-	0.32	0.83	1.15
7	9	-	5.18	11.78	19.03	-	0.21	0.67	0.88
8	10	-	5.36	12.42	19.86	-	0.19	0.64	0.83
9	11	-	5.51	12.93	20.51	-	0.14	0.51	0.66
10	14	-	5.75	13.73	21.55	-	0.25	0.80	1.03
11	18	-	5.98	14.46	22.48	-	0.23	0.73	0.93
12	21	-	6.13	14.96	23.16	-	0.15	0.50	0.68
13	24	-	6.24	15.36	23.72	-	0.11	0.40	0.56
14	28	-	6.33	15.74	24.25	-	0.09	0.37	0.53
15	35	-	6.44	16.15	24.84	-	0.11	0.41	0.59
16	39	-	6.50	16.42	25.22	-	0.06	0.27	0.38
17	52	-	6.59	16.78	25.73	-	0.09	0.36	0.52
18	57	-	6.63	16.97	26.01	-	0.04	0.19	0.28
19	60	-	6.65	17.08	26.17	-	0.02	0.11	0.16
20	65	-	6.68	17.20	26.35	-	0.03	0.12	0.18

Tabelle 17: Konzentrationen freigesetzter Orthokieselsäure.

Messpunkt	Tag	$c(\text{Si}(\text{OH})_4) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kumulativ				$c(\text{Si}(\text{OH})_4) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ einzeln			
		PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30	PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30
1	1	0.53	0.17	0.15	0.10	0.53	0.17	0.15	0.10
2	2	1.19	0.70	0.59	0.49	0.66	0.53	0.43	0.39
3	3	1.83	1.36	1.20	1.09	0.64	0.66	0.61	0.60
4	4	2.48	1.98	1.78	1.64	0.65	0.62	0.59	0.55
5	7	3.13	2.63	2.43	2.29	0.66	0.65	0.64	0.65
6	8	3.78	3.26	3.03	2.90	0.65	0.63	0.60	0.61
7	9	4.45	3.90	3.64	3.53	0.67	0.64	0.61	0.63
8	10	5.12	4.56	4.27	4.17	0.67	0.66	0.63	0.64
9	11	5.79	5.21	4.89	4.81	0.67	0.65	0.62	0.63
10	14	6.48	5.87	5.54	5.46	0.68	0.66	0.65	0.65
11	18	7.14	6.53	6.18	6.10	0.66	0.66	0.64	0.65
12	21	7.80	7.19	6.83	6.76	0.66	0.66	0.65	0.65
13	24	8.46	7.86	7.48	7.40	0.66	0.67	0.65	0.65
14	28	9.12	8.52	8.14	8.06	0.66	0.66	0.66	0.65
15	35	9.77	9.15	8.80	8.70	0.65	0.64	0.65	0.64
16	39	10.42	9.81	9.45	9.34	0.66	0.66	0.65	0.64
17	52	11.06	10.44	10.08	9.97	0.64	0.63	0.63	0.63
18	57	11.72	11.08	10.71	10.60	0.66	0.64	0.64	0.63
19	60	12.38	11.74	11.33	11.23	0.66	0.65	0.62	0.63
20	65	13.05	12.39	11.96	11.87	0.67	0.66	0.63	0.64

Tabelle 18: Konzentrationen freigesetzter Strontiumionen.

Messpunkt	Tag	$c(\text{Sr}^{2+}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ kumulativ				$c(\text{Sr}^{2+}) / \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ einzeln			
		PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30	PGS	PGPS10	PGPS20	PGPS30
1	1	8.44	11.65	12.54	11.45	8.44	11.65	12.54	11.45
2	2	11.42	15.58	17.01	15.30	2.98	3.93	4.48	3.85
3	3	12.76	17.19	18.66	16.95	1.34	1.61	1.64	1.65
4	4	13.56	18.00	19.36	17.74	0.80	0.81	0.70	0.79
5	7	14.23	18.66	19.94	18.59	0.67	0.66	0.58	0.85
6	8	14.78	19.14	20.33	19.04	0.55	0.49	0.39	0.45
7	9	15.26	19.53	20.64	19.38	0.48	0.39	0.31	0.34
8	10	15.66	19.87	20.91	19.64	0.40	0.33	0.27	0.25
9	11	16.01	20.15	21.13	19.84	0.35	0.29	0.22	0.20
10	14	16.35	20.43	21.37	20.07	0.34	0.28	0.24	0.23

Tabelle 19: Daten aus dem Tiermodell über eine Dauer von 14 Tagen. Gemessen wurden die Scherrate, der Durchmesser der Venolen  $d$  (Venole) und der Blutfluss.

Tag	PGS@SiCa	PGPS20@SiCa
$d$ (Venole) / $\mu\text{m}$		
0	$18.11 \pm 0.43$	$17.83 \pm 0.54$
3	$18.54 \pm 0.79$	$16.76 \pm 0.58$
6	$18.36 \pm 1.48$	$16.59 \pm 0.80$
10	$14.38 \pm 1.12$	$15.49 \pm 0.38$
14	$14.54 \pm 0.48$	$14.64 \pm 0.56$
$Q$ / $\mu\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$		
0	$57.5 \pm 9.6$	$43.2 \pm 5.5$
3	$54.1 \pm 8.3$	$33.4 \pm 2.7$
6	$60.1 \pm 19.0$	$39.3 \pm 5.9$
10	$29.8 \pm 5.5$	$47.5 \pm 5.3$
14	$38.78 \pm 7.5$	$29.33 \pm 7.5$
$\gamma$ / $\text{s}^{-1}$		
0	$150 \pm 16$	$131 \pm 20$
3	$146 \pm 28$	$128 \pm 22$
6	$136 \pm 18$	$144 \pm 21$
10	$188 \pm 56$	$207 \pm 21$
14	$214 \pm 61$	$151 \pm 32$

## 8.1 Chemikalienverzeichnis

Tabelle 20: Chemikalien und ihre Bezugsquelle, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Chemikalie	Bezugsquelle	Reinheitsgrad	CAS-Nr.
Aceton-d <sub>6</sub>	Sigma Aldrich®	≥ 99.9 %	666-52-4
Bromthymolblau	Merck	-	76-59-5
Calciumglycerolphosphat	Sigma Aldrich®	≥ 98 %	58409-70-4
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Sigma Aldrich®	≥ 99.0 %	13477-34-4
Ethanol (absolut)	Fisher Chemical	≥ 99.0 %	64-17-5
Glycerol	Sigma Aldrich®	≥ 99 %	56-81-5
ICP-Standard-Lösung Calcium, 10000 ppm	Carl Roth®	Startreagenz: CaCO <sub>3</sub> 99.994 %	-
ICP-Standard-Lösung Phosphor, 10000 ppm	Carl Roth®	Startreagenz: NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 99.999 %	-
ICP-Standard-Lösung Silicium, 10000 ppm	Carl Roth®	Startreagenz: (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SiF <sub>6</sub> 99.999 %	-
ICP-Standard-Lösung Strontium, 10000 ppm	Carl Roth®	Startreagenz: SrCO <sub>3</sub> 99.998 %	-
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich®	≥ 99 %	7447-40-7
Kaliumhydroxid in Ethanol, 0.1 M	Carl Roth®	-	-
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich®	≥ 98 %	7786-30-3
Natriumchlorid	Sigma Aldrich®	≥ 99.5 %	7647-14-5
Natriumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich®	≥ 99.7 %	144-55-8
Natriumsulfat	Sigma Aldrich®	≥ 99 %	7757-82-6
Pluronic® F-127	Sigma Aldrich®	-	9003-11-6
Salpetersäure	Fisher Chemical	70 %	7697-37-2
Salzsäure	Sigma Aldrich®	36.5 – 38.0 %	7647-01-0
Sebacinsäure	Sigma Aldrich®	99 %	111-20-6
Strontiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth®	≥ 99 %, p. a.	10025-70-4
Tetraethylorthosilicat	Sigma Aldrich®	≥ 99.0 %	78-10-4

## 8.2 Lebenslauf

<b>Name</b>	Marvin Lietzow
<b>Geburtsort und -datum</b>	Bückeburg, 28.12.1990
<b>Sprachen</b>	Deutsch (Muttersprache), Englisch (fließend), Französisch (Grundkenntnisse)

---

### Berufserfahrung

---

10/2022 - heute	Material Developer for Sustainable Materials Continental AG, Hannover
11/2017 - 09/2021	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Anorganische Chemie, Leibniz Universität Hannover (LUH)
04/2012 - 04/2017	Wissenschaftliche Hilfskraft Institut für Anorganische Chemie, LUH

---

### Ausbildung

---

11/2017 - heute	Promotionsstudium zum Dr. rer. nat. Institut für Anorganische Chemie, Leibniz Universität Hannover (LUH)
10/2015 - 11/2017	Masterstudium Material- und Nanochemie Institut für Anorganische Chemie, LUH
10/2010 - 10/2015	Bachelorstudium Chemie Institut für Anorganische Chemie, LUH

---

## 8.3 Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

### Poster

M. Lietzow, L. Burmeister, A. Hoffmann, N. Ehlert: *Elastic, open-pored Scaffolds for Bone Regeneration based on Bioactive Glass and Variations of Polyglycerol Sebacate*, 14. Nanoday Hannover, 2018

M. Lietzow, L. Burmeister, A. Hoffmann, N. Ehlert: *Elastic, open-pored Scaffolds for Bone Regeneration based on Bioactive Glass and Variations of Polyglycerol Sebacate*, DGBM Braunschweig, 2018

M. Lietzow, K. Besecke, R. Hinterding, M. Stiesch, A. Kampmann, A. Hoffmann, N. Ehlert: *Elastic Polymer-coated Nano- and Macroporous Bioactive Glass Composites for Bone Regeneration*, 15. Nanoday; Hannover, 2019

M. Lietzow, K. Besecke, R. Hinterding, M. Stiesch, A. Kampmann, A. Hoffmann, N. Ehlert: *Elastic Polymer-coated Nano- and Macroporous Bioactive Glass Composites for Bone Regeneration*, 15. EuroBioMAT; Weimar, 2019

### Vortrag

M. Lietzow, K. Besecke, M. Seegers, D. Rieks, L. Gülker, R. Hinterding, K. Doll, M. Dalton, H. Hartwig, A. Winkel, M. Stiesch, S. Gniesmer, A. Kampmann, A. Hoffmann, N. Ehlert: *Elastic Polymer-coated Nano- and Macroporous Bioactive Glass Composites for Bone Regeneration*, 31. ESB; Porto und virtuell, 2021