

STEFANIE HACHEM

Freisetzungskinetik des therapeutischen Agens Sr^{2+}
aus einem Calciumphosphatzement und dessen
passiver Transport im trabekulären Knochen
gesunder und osteoporotischer Ratten

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2022

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publisher.

1st Edition 2022

© 2022 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5598888 Fax: 0641-5598890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Freisetzungskinetik des therapeutischen Agens Sr^{2+}
aus einem Calciumphosphatzement und dessen
passiver Transport im trabekulären Knochen
gesunder und osteoporotischer Ratten**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Hachem, Stefanie, geb. Pfitzenreuter

aus Leinefelde, jetzt: Leinefelde-Worbis

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: PD Dr. Ulrich Thormann

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Lange

Tag der Disputation: 20.10.2022

Die Experimente zur Erstellung der hier vorgelegten Arbeit erfolgten vornehmlich am Physikalisch-Chemischen Institut des Fachbereichs Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 79 (SFB/TRR 79). Die Anleitung und die Betreuung fanden durch PD Dr. rer. nat. Marcus Rohnke statt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Motivation und Zielsetzung	1
1.2 Stand der Literatur.....	3
1.2.1 Knochenheilung bei Osteoporose.....	3
1.2.2 Osteoporoseinduktion bei Versuchstieren	7
1.2.3 Strontium als Medikament in der Osteoporosetherapie	8
1.2.4 Funktionalisierung von Implantaten mit Wirkstoffen	9
1.2.5 Freisetzung von Wirkstoffen aus Implantaten.....	10
1.2.6 Wirkstoffnachweis im Knochen	17
2. Material und Methoden	20
2.1 Löslichkeitsexperiment	20
2.1.1 Zementprobe.....	20
2.1.2 Aufbau der Versuchsanordnung, verwendete Materialien und Durchführung	21
2.1.3 Sr^{2+} -Konzentrationsbestimmung mittels ICP-MS	24
2.1.4 Überprüfung der Oberflächenbedeckung durch UHU-Alleskleber.....	25
2.2 Diffusionsexperiment	26
2.2.1 Versuchstiere	26
2.2.2 Präparation der Rattenknochen.....	28
2.2.3 Herstellung der Schliffe.....	28
2.2.4 Eindiffusion von Sr^{2+}	29
2.2.5 Methode ToF-SIMS zur Detektion des therapeutischen Agens Sr^{2+}	30
2.2.6 Messmodi ToF-SIMS.....	37
2.2.7 Konfokalmikroskopie	38
2.2.8 Berechnung der Diffusionskoeffizienten.....	39

2.2.9	Statistische Analyse.....	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	Ergebnisse der ICP-MS-Messungen	40
3.2	Ergebnisse der ToF-SIMS-Messungen	45
3.2.1	Mobilität des therapeutischen Agens Sr^{2+} im Rattenknochen.....	45
3.2.2	Gesunder und osteoporotischer Knochen im Vergleich.....	49
3.2.3	Berechnungen der Diffusionskoeffizienten.....	51
3.2.4	Statistische Auswertungen.....	54
4.	Diskussion	56
4.1	Diskussion des Freisetzungsvorgangs.....	56
4.1.1	Methode des Freisetzungsvorgangs.....	56
4.1.2	Ergebnisse des Freisetzungsvorgangs.....	58
4.2	Diskussion des Diffusionsversuchs.....	59
4.2.1	Diskussion des Modells des Diffusionsversuchs.....	59
4.2.2	Diskussion des Ergebnisses des Diffusionsversuchs.....	60
4.2.3	Einordnung und Ausblick.....	63
5.	Zusammenfassung.....	64
6.	Summary	65
7.	Abbildungs-, Abkürzungs- und Tabellenverzeichnis.....	66
7.1	Abkürzungsverzeichnis	66
7.2	Abbildungsverzeichnis	67
7.3	Tabellenverzeichnis.....	68
8.	Literaturverzeichnis.....	69
9.	Anhang	79
10.	Publikationsverzeichnis	84
10.1	Originalarbeit	84
10.2	Kongressbeiträge/Posterpräsentation	84

11.	Ehrenwörtliche Erklärung.....	85
12.	Danksagung	86
13.	Lebenslauf.....	87

1. Einleitung

Die vorgelegte Arbeit ist im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 79 (SFB/TRR 79) entstanden. Das Ziel dieses Sonderforschungsbereichs war die Entwicklung neuer Werkstoffe für den systemisch erkrankten Knochen. Im Rahmen des Teilprojektes M5, welches am Physikalisch-Chemischen Institut der JLU Gießen lokalisiert und auf die Materialentwicklung und bildgebende Analytik von Wirkstoffen im osteoporotischen Knochen fokussiert war, fanden die Experimente hierzu statt (Teilprojekt M5 2017).

1.1 Motivation und Zielsetzung

Die Wirkung von Strontium in der Osteoporosebehandlung konnte mehrfach belegt werden (Kołodziejska et al. 2021; Hegde et al. 2016). Durch den lokalen Einsatz von Strontium als Osteoporosemedikament, werden systemische Nebenwirkungen umgangen. In vorangegangenen Arbeiten konnte der anabole Effekt von Strontium zur lokalen Anwendung im osteoporotischen Rattenknochen gezeigt werden (Thormann et al. 2013).

Moderne Knochenersatzmaterialien sind möglichst spezifisch an die Situation im systemisch erkrankten (zum Beispiel an Osteoporose) Knochen angepasst. So ist es aktuell von großem wissenschaftlichem Interesse Transportvorgänge therapeutischer Agenzien *in vivo* darzustellen (Bose et al. 2013).

Auch das therapeutische Agens Sr^{2+} ist im menschlichen Körper beweglich. Es unterliegt aktiven und passiven Transportvorgängen. Strontiumionen weisen ähnliche chemische Eigenschaften zu Calciumionen auf. So liegt es nahe, dass Strontium agonistisch über den Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR), welcher für die Calciumhomöostase zuständig ist, agieren kann. Er ist beispielsweise in der Nebenschilddrüse sowie in den Nieren lokalisiert. Allerdings ist er auch auf der Oberfläche von Osteoblasten und Osteoklasten anzutreffen. (Hamdy 2009; Colella et al. 2016; Kołodziejska et al. 2021). Dort führt Sr^{2+} zu einer Stimulation der Osteoblasten und Inhibition der Osteoklasten (Marx et al. 2020; Marie et al. 1993).

Es konnte bereits mehrfach in Tierversuchen gezeigt werden, dass oral substituiertes Strontium in den Knochen eingebaut wird. Es kann durch Adsorption an der Oberfläche von Calciumphosphatapatit angereichert und durch Bindung der Strontiumionen an die Phosphatgruppen in die kristalline Gitterstruktur eingebaut werden (Kołodziejska et al. 2021).

Zudem unterliegt Sr^{2+} auch dem passiven Transport durch Diffusion, welcher sich auch *in vitro* darstellen lässt.

Das Ziel dieser Abhandlung ist es:

1. Die Freisetzungskinetik von Sr^{2+} aus Calciumphosphatzement zu ermitteln.
2. Eine Methode zur Bestimmung des passiven Sr^{2+} -Transportes im trabekulären Rattenknochen zu erarbeiten. Dabei soll der passive Transport von Sr^{2+} im trabekulären Knochen bei Osteoporose induzierten vs. gesunden Ratten gegenübergestellt werden.

Bei der Ermittlung der Freisetzungskinetik von Sr^{2+} aus Calciumphosphatzement handelt es sich um einen tierfreien *in vitro* Vorversuch.

Für das Diffusionsexperiment sollen rechte Rattenfemora aus dem Versuchsvorhaben „Knochenheilung im osteoporotischen Femur“ (Aktenzeichen V 54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/28 Nr. 45/2015) genutzt werden, welche für das eigentliche Versuchsvorhaben nicht benötigt werden. Dies soll zu einer Reduzierung (*Reduction*) der Versuchstierzahl gemäß des in der Europäischen Richtlinie 2010/63/EU verankerten 3 R Prinzips (*Replacement, Reduction, Refinement*) nach Russel und Burch führen.

Durch das Diffusionsexperiment soll eine Vorhersage für die Mobilität von Sr^{2+} im trabekulären Rattenknochen getroffen werden. Dieser Versuch kann zudem als Grundlage für weitere 3D Modelle dienen, welche zum *Replacement* von Tierversuchen führen. Somit leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch und stützt sich somit auf zwei der 3R nach Russel und Burch (3R Prinzip - BfR 2021) .

1.2 Stand der Literatur

1.2.1 Knochenheilung bei Osteoporose

Der menschliche Körper eines Erwachsenen besteht aus 213 Knochen (Drake und Gray 2014), welche zwei Hauptaufgaben besitzen. Zum einen dienen sie als Stütz- und Halteapparat des menschlichen Körpers und zum anderen als metabolisches Lager vor allem für Calcium und Phosphat (Boskey und Coleman 2010). Der Knochen beherbergt das Knochenmark, welches unter anderem für die Hämatopoese verantwortlich ist (Lüllmann-Rauch 2015).

Knochen ist aus verschiedenen Zellen und Extrazellulärmatix aufgebaut. Die Extrazellulärmatix besteht wiederum vorwiegend aus Kollagenfibrillen, Hydroxyapatit, Proteoglykanen, Glykoproteinen und anorganischen Ionen. Die Kollagenfibrillen sind im reifen Knochen zu Lamellenknochen organisiert. Des Weiteren gibt es noch Geflechtknochen, in dem Kollagenbündel geflechtartig vorliegen. Dieser entsteht überall dort, wo schnelles Knochenwachstum auftritt, z.B. bei der Frakturheilung oder in der Entwicklung von der Embryonalzeit bis ca. zum ersten Lebensjahr. Durch Umbauprozesse wird dieser im Verlauf in Lamellenknochen umgewandelt (Lüllmann-Rauch 2015).

Makroskopisch besteht reifer Knochen aus Kompakta, der Rinde des Knochens, und Spongiosa, dem schwammartigen Konstrukt, mit welchem er gefüllt ist. Kompakta macht 80 % der Knochenmasse aus. Dagegen macht Spongiosa nur 20 % der Masse, allerdings 80 % der Oberfläche aus (Hadjidakis und Androulakis 2006). Im Zwischenraum der porösen Spongiosa findet sich das Knochenmark.

Histologisch bestehen Kompakta sowie Spongiosa aus Lamellenknochen. Dieser besteht aus 3-5 µm messenden, gleichsinnig orientierten Kollagenfibrillen, den sogenannten Lamellen. Eine flächige Anordnung der Lamellen findet man in der Spongiosa, wobei hingegen in der Kompakta die Lamellen zu Osteonen, mit einem gefäßführenden System, den Haver'schen und den Volkmann'schen Kanälen, angeordnet sind. In der Spongiosa findet man keine gefäßführenden Kanäle. Die Versorgung erfolgt durch das umliegende Mark (siehe Abbildung 1). Diese gefäßführenden Kanäle sind nicht mit den Canaliculi der Osteozyten zu wechseln.

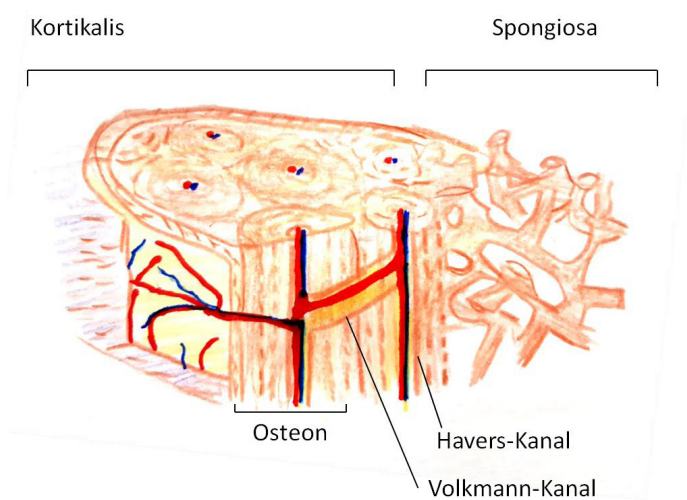


Abbildung 1: Aufbau des Knochens: Die Abbildung zeigt den mikrostrukturellen Aufbau eines Knochens. Links im Bild sieht man die Kompakta. Im rechten Teil des Bildes die Spongiosa. Des Weiteren sind ein Osteon und dessen Gefäßversorgung über die Volkman- und Havers-Kanäle abgebildet (Modifiziert nach Huch und Jürgens 2019).

Knochen befindet sich in einem ständigen Umbauprozess. Dieser Prozess zwischen Knochenauf- und -abbau beim Adulten wird als *bone remodeling* bezeichnet und wurde erstmals 1990 von Frost beschrieben (Frost 1990). Physiologisch sind während des *bone remodelings* knochenresorbierende Osteoklasten und knochenbildende Osteoblasten im Einklang. So werden Knochenmasse und Stärke kontinuierlich reguliert (Boudin und van Hul 2017).

Osteoblasten sind spezielle Knochenzellen, welche aus mesenchymalen Stammzellen entstehen. Sie befinden sich im Verbund mit mehreren Osteoblasten an der Knochenoberfläche, wo sie Kollagen I und weitere nichtkollagene Proteine sowie Alkalische Phosphatase sezernieren, um die Knochensubstanz aufzubauen. Bei diesem Prozess gehen die meisten von ihnen in Apoptose, andere mauern sich selbst in der aufgebauten Knochensubstanz ein. Dabei bilden sich Lakunen, in denen sich die Osteoblasten befinden, und feine Kanäle, in welchen die dendritischen Fortsätze liegen. Diese eingemauerten Osteoblasten nennt man Osteozyten (Kular et al. 2012). Wieder andere der Osteoblasten findet man später als *bone lining cells* an der

Knochenoberfläche, von wo aus sie bei Bedarf wieder zu Osteoblasten generieren (Bellido et al. 2013).

Osteozyten stellen den Hauptteil der Knochenzellen dar und können als Koordinator der Knochenhomöostase betrachtet werden. Neben der Steuerung der Osteoklasten über das RANK/RANKL/OPG-System sind sie unter anderem als Mechanosensoren tätig. Sie sezernieren Sclerostin, welches die Knochenbildung hemmt. Des Weiteren können sie über FGF23 den Mineralhaushalt regulieren (Rupp et al. 2018; Crockett et al. 2011).

Bei den Osteoklasten handelt es sich um vielkernige Riesenzellen, welche aus mononuklearen Vorläuferzellen entstehen. Sie sind auf der Knochenoberfläche und in den Haver'schen Kanälen lokalisiert und bauen in Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen, Knochensubstanz ab. Der eigentliche Reaktionsort wird als *ruffled border* bezeichnet, ein Bürstensaum, über den die Knochensubstanz mithilfe eines niedrigen pH-Wertes und Proteinen abgebaut wird (Kular et al. 2012).

Bone remodeling findet in unterschiedlichen Phasen statt. Zuerst kommt es zur Resorption des vorhandenen Knochens durch Osteoklasten. Anschließend folgt die Bildung neuen Knochens durch Osteoblasten. Durch diesen Prozess kann die Knochenarchitektur der mechanischen Belastung angepasst werden und können Mikrotraumen repariert werden (Frost 1990; Hadjidakis und Androulakis 2006).

Das *bone remodeling* wird auf zwei Wegen reguliert. Systemisch erfolgt die Regulation über Parathormon, welches die Calcium-Freisetzung fördert und die renale Rückresorption von Calcium steigert sowie die renale Calcitonin-Produktion erhöht, seinen Gegenspieler Calcitonin, welches den Calcium-Spiegel senkt, und weitere Hormone wie Wachstumshormone, Glucocorticoide, Sexualhormone, IGFs, Prostaglandine, TGF- β , BMP und Cytokine. Auf lokaler Ebene wird das *bone remodeling* durch das OPG/RANKL/RANK-System reguliert (Hadjidakis und Androulakis 2006).

Ist das *bone remodeling* gestört, kommt es zu einem erhöhten Aufbau oder Abbau von Knochenmasse, welche als Osteopetrose bzw. Osteoporose bezeichnet wird. Osteoporose ist somit durch einen Verlust von Knochenmasse gekennzeichnet. Durch den Verlust von Knochenmasse sind die Funktionalität und die Materialeigenschaften des Knochen verändert, weshalb sich die Frakturanfälligkeit erhöht (Consensus development conference 1993).

Osteoporose lässt sich in die postmenopausale sowie jene Männer und Frauen gleichwertig betreffende senile Osteoporose einteilen (Pietschmann und Peterlik 1999). Eine mittels DXA gemessene um das 2,5-Fache reduzierte *bone mineral density* (BMD) im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung spricht für eine Osteoporose (Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.).

Knochen besitzt enorme Fähigkeiten in der Regeneration von Frakturen, Struktur- und Stellungsanomalien sowie deren physiologische Funktion. Die Frakturheilung kann einmal primär geschehen, indem lamellares Knochengewebe direkt generiert wird, oder sekundär über die Bildung von Kallus. Dieser besteht aus Geflechtknochen und wird später zu Lamellenknochen umgebaut (Lüllmann-Rauch 2015).

Einige Faktoren führen dazu, dass sich die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen von jener im gesunden Knochen unterscheidet. So zeigen sich Differenzen in der Rekrutierung, Proliferation und Differenzierung von Vorläuferzellen, der Revaskularisierung und auch die mechanische Empfindlichkeit spielt eine Rolle (Cheung et al. 2016).

Verschiedene Artikel zeigen Unterschiede in den Eigenschaften von osteoporotischen und gesundem Knochen auf. Dazu ist die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen beeinträchtigt (Augat et al. 2005; Kubo et al. 1999; Cheung et al. 2016).

Zur Frakturheilung sind systemische und lokale Regulatoren, die biologische Umgebung (z.B. Vaskularisierung) und die mechanische Belastung wichtige Voraussetzungen (Augat et al. 2005; Lee und Shin 2007b).

Nichtausgewachsene haben die größte Heilungskapazität. Die umgebenden Voraussetzungen für Frakturheilung (Vaskularisierung, Periostdicke), systemische Regulation durch Hormone und lokale Gegebenheiten entsprechen jenen des Wachstums und bedingen somit bessere Voraussetzungen (Kawai et al. 1997; Augat et al. 2005). Dies konnte in einem Versuch mit Ratten reproduziert werden (Ekeland et al. 2009).

Ein wichtiger Risikofaktor für Osteoporose ist das Lebensalter. Folglich steigt in einer älter werdenden Gesellschaft die Inzidenz der an Osteoporose Erkrankten. Die Anzahl osteoporotischer Frakturen lag 2010 bei 3,5 Millionen. Für das Jahr 2025 werden bis zu 4,5 Millionen vorausgesagt (Hernlund et al. 2013).

Somit stehen diese Erkrankung und vor allem ihre Therapie im Interesse der aktuellen Forschung.

1.2.2 Osteoporoseinduktion bei Versuchstieren

Ratten sind etablierte Versuchstiere in der Osteoporoseforschung. Dies resultiert aus der hohen Reproduzierbarkeit der Osteoporose durch Ovariectomie (OVX). OVX schafft ein Modell, welches mit der postmenopausalen Osteoporose des Menschen vergleichbar ist. Sowohl die Menopause des Menschen als auch die OVX der Ratte induzieren einen Östrogenmangelzustand (Jee und Yao 2001; Omi und Ezawa 1995; Frost und Jee 1992). Ein geringer Östrogenspiegel korreliert mit Knochenmasseverlust und ist somit mitverantwortlich für die postmenopausale Osteoporose (Canpolat et al. 2010). Einem geringen Östrogenspiegel folgt ein verändertes *bone remodeling* mit vermehrtem Knochenabbau (Thompson et al. 1995). Der vermehrte Knochenabbau zeigt sich in besonderem Maße in spongiösem Knochen. Kortikaler Knochen spielt hingegen im OVX-Modell eine geringere Rolle (Yoon et al. 2012). Ein weiterer Faktor ist das Alter der Versuchstiere. Das *remodeling* rückt in den Vordergrund, sobald das Knochenwachstum abgeschlossen ist. Dies zeigt sich bei Ratten nach etwa 9 Monaten (Jee und Yao 2001). Somit spielen bei der Auswahl der Versuchstiere adulte Tiere eine wichtige Rolle. Effekte der Osteoporoseinduktion offenbaren sich bei Ratten etwa nach 8 Wochen post OVX (Yoon et al. 2012).

Neben oder zusätzlich zur OVX als Osteoporoseinduktion ist auch eine Immobilisation (IM) möglich. Dabei führen z.B. induzierte Lähmungen von Nerven und Muskel oder das Tragen von Bandagen zur Immobilisation einer Extremität und somit zur Induktion eines lokal begrenzten *bone remodelings* (Jee und Yao 2001). Weitere Möglichkeiten der Osteoporoseinduktion bestehen durch Steroidapplikation oder genetische Knock-outs (Komori 2015).

1.2.3 Strontium als Medikament in der Osteoporosetherapie

Zweiwertige Strontiumionen führen zur Hemmung der Osteoklasten und zur Induktion der Osteoblasten (Marie et al. 1993). Hierbei hat Strontium unterschiedliche Effekte im gesunden und osteoporotischen Knochen. Es konnte eine deutliche Kallusbildung im osteoporotischen Knochen im Vergleich zum gesunden Knochen gezeigt werden, wodurch es sich speziell zur Therapie osteoporotischer Frakturen eignet (Hegde et al. 2016).

In den 1950er Jahren kam Strontium nach einer Studie von Shorr und Carter erstmals in der Osteoporosetherapie zum Einsatz. Aufgrund der notwendigen hohen Dosis und damit einhergehender starker Nebenwirkungen verlor es rasch an klinischer Bedeutung (SHORR und CARTER 1952). Erst im Jahr 2004 erlebte es als Strontiumranelat seine Wiederkehr. Strontium wurde in Form von Strontiumranelat zur oralen Therapie der Osteoporose eingesetzt (Meunier et al. 2004). Durch eine geringere Dosierung, die eine Komplexierung mit Ranelinsäure ermöglicht, sollten Nebenwirkungen verringert werden. Aufgrund erneut aufgetretener Nebenwirkungen und fallender Absatzzahlen kam es 2017 zu einem Produktionsstopp von Strontiumranelat (Schwabe et al. 2017; Servier Deutschland GmbH vom 13.05.2013). Aktuell ist Strontiumranelat auf dem Markt nicht mehr erhältlich. Um die hohen Nebenwirkungen von Strontium in der oralen Therapie zu umgehen, bietet sich bei osteoporotischen Frakturen der lokale Einsatz an, z.B. in Form strontiumhaltiger Knochenersatzmaterialien (Saint-Jean et al. 2005; Schumacher et al. 2013; Kruppke et al. 2020; Harrison et al. 2021).

1.2.4 Funktionalisierung von Implantaten mit Wirkstoffen

Sämtliche Implantate aus körpereigenem Material werden als sogenannte *Autografts* bezeichnet (Löfgren et al. 2000). Das körpereigene Reservoir an Knochenersatzmaterialien ist aufgrund von Komorbiditäten wie Schmerzen, Infektionen, Blutungen etc. begrenzt (Bajammal et al. 2008; Baroli 2009). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verwendung von *Allografts*, dabei handelt es sich um Implantate gleicher Spezies, oder *Xenografts*, anderer Spezies (Löfgren et al. 2000). Hierbei bestehen Gefahren, wie die Übertragung von Krankheiten oder Abstoßungsreaktionen. Aus diesem Grund wird seit einiger Zeit versucht, synthetische Implantate zur Füllung von Knochendefekten kritischer Größe zu entwickeln. Dabei zeigt sich derzeit eine Bandbreite an organischen, anorganischen sowie Komposit-Materialien. Calciumphosphat stellt wegen seiner Biokompatibilität sowie Abbaufähigkeit eine hervorragende Variante dar (Ducheyne und Qiu 1999; Dorozhkin 2010). Es besteht eine hohe Ähnlichkeit zu der mineralischen Phase des Knochens (Parent et al. 2017). Allen synthetischen Knochenersatzmaterialien fehlen allerdings Faktoren, welche das Knochenwachstum beeinflussen. Ein wachsendes Feld besteht daher darin entsprechende Knochenersatzmaterialien mit Wirkstoffen zu kombinieren (Lee und Shin 2007a). Somit stellt die Kombination aus Knochenersatzmaterial mit Strontium als therapeutisches Agens bei osteoporotischen Frakturen ein vielversprechendes Modell dar (Schumacher et al. 2013).

1.2.5 Freisetzung von Wirkstoffen aus Implantaten

Die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Implantat stellt die Grundvoraussetzung für dessen Aufnahme am Zielort und die davon abhängige Wirkung des Stoffes dar. Oft ist eine kontinuierliche Freisetzung aus dem Implantat in das Medium ein tiefergreifendes Ziel (Robinson und Lee 1987). Um die Freisetzungskinetik von Wirkstoffen aus Knochenzementen zu ermitteln, sollte eine kontinuierliche Messung über eine bestimmte Zeit erfolgen. Aus den ermittelten Daten kann der Mechanismus der Freisetzung abgeleitet werden. Hierzu werden geeignete mathematische Modelle zur Beschreibung der Freisetzungskinetik gesucht, um Geschwindigkeitskonstanten für das freizusetzende therapeutische Agens zu errechnen (Dash et al. 2010).

Neben den graphischen Darstellungen, die die Reaktionskinetiken der Reaktion 0. sowie 1. Ordnung visualisieren, existiert eine Vielzahl an Modellen, welche die Freisetzungskinetik eines therapeutischen Agens beschreiben, z.B. jene von Huguci, Korsmeyer et al. oder Kopcha et al., auf die nachfolgend näher eingegangen wird (Bruschi 2015; Malekjani und Jafari 2021).

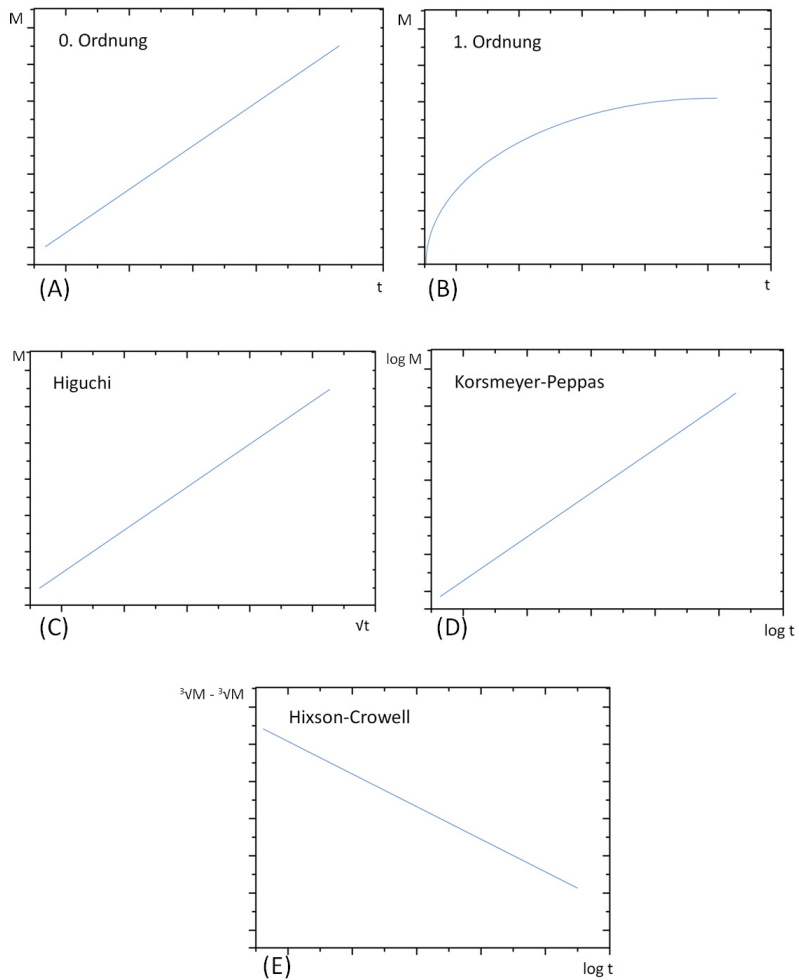


Abbildung 2: Reaktion 0. und 1. Ordnung sowie Freisetzungskinetiken verschiedener komplexer Modelle: (A) Reaktion 0. Ordnung, (B) Reaktion 1. Ordnung, (C) Higuchi, (D) Hixson-Crowell, (E) Korsmeyer-Peppas (Modifiziert nach Bruschi 2015; Malekjani und Jafari 2021)

Reaktion 0. Ordnung

Die Reaktion nullter Ordnung beschreibt das Reaktionsverhalten bzw. Löseverhalten über die Zeit unabhängig von der Konzentration.

Stellt man den Konzentrationsverlauf einer Reaktion nullter Ordnung graphisch in Abhängigkeit der Zeit dar, verläuft der Graph linear (s. Abbildung 2).

$$M = M_0 - k \cdot t \quad (1)$$

M = Konzentration zur Zeit t [mol/L]

M_0 = Anfangskonzentration [mol/L]

k = Geschwindigkeitskonstante

t = Zeit [t]

Diese Art der Freisetzung ist z.B. gewünscht, wenn ein therapeutisches Agens über einen längeren Zeitraum freigesetzt werden soll. Ein Beispiel aus der Medizin für eine gewünschte, verlängerte und kontinuierliche Freisetzung wäre die Agensabgabe über ein transdermales Pflaster.

Reaktion 1. Ordnung

Die Freisetzungsrates des therapeutischen Agens über die Zeit ist abhängig von der Konzentration. Die Kurve verläuft exponentiell.

$$M = M_0 \cdot e^{-k \cdot t} \quad (2)$$

M = Konzentration zur Zeit t [mol/L]

M_0 = Anfangskonzentration [mol/L]

k = Geschwindigkeitskonstante

t = Zeit [t]

Diverse therapeutische Systeme weisen eine Freisetzung nach einer Reaktion erster Ordnung auf.

Arthur Amos **Noyes** und Willis Rodney **Whitney** stellten 1897 eine Gleichung zur Lösungsgeschwindigkeit von Feststoffen auf (Noyes und Whitney 1897).

$$\frac{dM}{dt} = \frac{-D \cdot A}{x} \cdot (c_s - c_t) \quad (3)$$

dM/dt = Menge an Feststoff [mol], welche pro Zeit in Lösung geht

D = Diffusionskoeffizient [m^2/s]

A = Oberfläche des Feststoffes [m^2]

x = Dicke des Feststoffes [m]

c_s = Sättigungskonzentration [mol/L]

c_t = Konzentration des gelösten Feststoffes im Medium [mol/L]

Die Gleichung besagt, dass die Menge an Feststoff, welche pro Zeit in Lösung geht, proportional zu der Oberfläche und der Differenz aus der Sättigungskonzentration und der Konzentration der umgebenden Lösung ist.

Die damit ermittelbare Auflösegeschwindigkeit wird laut der Gleichung von Noyes und Whitney durch Diffusion bestimmt. Die Gleichung beruht auf der Annahme, dass sich an der Oberfläche des Implantats, direkt nach Auflösen des Wirkstoffes, eine gesättigte Lösung bildet, welche in die Peripherie diffundiert (Lippold et al. 2017).

Higuchi

1961 stellte Higuchi das erste Modell zur Freisetzung eines Wirkstoffes aus einer Matrix auf (Higuchi 1963). Seine ersten Berechnungen führte er an Freisetzungsuntersuchungen von Therapeutika in Salbengrundlage (dünne Filme) durch (Higuchi 1961).

Das Modell beschreibt die Freisetzung in Abhängigkeit von der Quadratwurzel der Zeit t .

$$\frac{M}{A} = \sqrt{D(2c_0 - c_s)c_s \cdot t} \quad (4)$$

M = Wirkstoffmenge [mol]

A = Fläche [m^2]

t = Zeit [s]

C_0 = Anfangskonzentration [mol/L]

C_s = Sättigungskonzentration [mol/L]

D = Diffusionskoeffizient [m^2/s]

M beschreibt die pro Zeit t freigesetzte Wirkstoffmenge pro Fläche A , D den Diffusionskoeffizienten und C_0 die Anfangskonzentration des Wirkstoffes bzw. c_s die Sättigungskonzentration. Die Gleichung ist gültig für dünne Filme.

Aus der vereinfachten Higuchi-Gleichung lässt sich schließen, dass sich die Menge an freigesetztem therapeutischem Agens proportional zur Quadratwurzel der Zeit verhält. (Bruschi 2015)

$$M = k \cdot \sqrt{t} \quad (5)$$

M = Anteil an freigesetztem therapeutischem Agens [mol/L]

k = Freisetzungskonstante

t = Zeit [s]

Hixson-Crowell

Das von Hixson und Crowell (Hixson und Crowell 1931) entwickelte Modell beschreibt die Lösungsgeschwindigkeit, welche abhängig vom Volumen der Partikel bzw. Tablette ist (Dash et al. 2010) .

$$\sqrt[3]{M_0} - \sqrt[3]{M} = k \cdot t \quad (6)$$

M_0 = Menge des therapeutischen Agens zur Zeit 0 [g]

M = gelöste Masse zur Zeit t [g]

k = substanzspezifische Konstante [$\text{g}^{1/3}/\text{s}$]

t = Zeit [s]

Korsmeyer-Peppas

1983 wurde durch Korsmeyer, Gurny, Doelker, Buri und Peppas eine allgemein gültige Formel zur Freisetzungskinetik eingeführt. Diese ist auch als Korsmeyer-Peppas-Modell bekannt (Korsmeyer et al. 1983).

Die Berechnungen wurden am Freisetungsverhalten aus Polymeren durchgeführt (Bruschi 2015).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k \cdot t^n \quad (7)$$

M_t/M_∞ = Anteil des freigesetzten Wirkstoffes [mol/m^2]

k = Geschwindigkeitskonstante [$\text{mol}/(\text{m}^2\text{h})$]

t = Zeit [h]

n = Freisetzungsexponent

Dabei stellt M_t/M_∞ den Anteil des freigesetzten Wirkstoffes zu der Zeit t dar. k ist die Geschwindigkeitskonstante und n der Freisetzungsexponent.

Der Freisetzungsexponent n spezifiziert den Freisetzungsmechanismus. Unter Annahme Fick'scher Diffusion entspricht $n = 0,5$ für dünne Filme.

Freisetzungsexponent, n	Freisetzungsmechanismus
0,5	Fick'sche Diffusion
$0,5 < n < 1$	Anormaler Transport
1	Konstante Freisetzung

Tabelle 1: Exponent n der Korsmeyer-Peppas-Gleichung: Die Tabelle zeigt den Exponenten n der Korsmeyer-Peppas-Gleichung in bestimmten Freisetzungsmechanismen bei dünnen Filmen (Modifiziert nach Dash et al. 2010).

Liegen die Werte zwischen diesen Grenzen, spricht man von anormalem Transport, bei dem Diffusion und Erosion nebeneinander vorliegen.

In den letzten 30 Jahren konnten ausgesprochen große Fortschritte im Bereich der kontrollierten Freisetzung therapeutischer Agenzien erzielt werden. Ein gut beschriebenes Freisetzungsverhalten bietet eine ideale Ausgangssituation für die Konzentration und Darreichungsform des therapeutischen Agens. Mathematische Freisetzungsmodelle sind wichtig um pharmazeutische Lösungen für optimale Systeme der therapeutischen Agenzien zu finden. Sie ermöglichen Geschwindigkeitskonstanten zu ermitteln.

1.2.6 Wirkstoffnachweis im Knochen

Im zweiten Teil der Arbeit soll nach erfolgter Freisetzung des Wirkstoffes seine Diffusion in den trabekulären Knochen gezeigt werden.

Aktuell sind wenige analytische Methode verfügbar, welche es ermöglichen die Wirkstofffreisetzung im Knochen *in vivo* zu verfolgen.

Aw et al. konstruierten einen 3D-Knochen-Bioreaktor mit echtem Knochen, um die Mobilität von Rhodamin B *ex vivo* mittels Fluoreszenz-Mikroskopie zu detektieren (Aw et al. 2012).

Eine andere Möglichkeit ist es ausgesprochen hohe Konzentrationen an Wirkstoff mittels Magnetresonanztomographie (MRT) aufzuzeichnen. Auch dies bringt neben der unabdingbar hohen Wirkstoffkonzentration weitere Einschränkungen mit sich, wie z.B. einen geringen Zeitraum zur Detektion oder eine Verfälschung der Ergebnisse durch die Kopplung an Marker und deren Diffusionsverhalten (Giers et al. 2014). Somit bleibt zur Detektion kleiner Konzentrationen die Untersuchung post mortem. Eine geeignete Methode stellt die Massenspektrometrie dar (Rohnke et al. 2017; Caprioli 2015). Zur Detektion anorganischer Agenzien, wie z.B. Strontium eignet sich „*inductively coupled plasma mass spectrometry*“ (ICP-MS). Dazu ist eine Probenvorbereitung am Ende des Tierversuches unerlässlich. Es werden kleine Proben des Knochen in Säure gelöst und der Gehalt an therapeutischen Agens mittels ICP-MS bestimmt (Mani-Varnosfaderani et al. 2016). Diese Weise ermöglicht die absolute Konzentration an therapeutischen Agens in der Knochenprobe zu bestimmen. Allerdings ist dadurch die laterale Auslösung sehr gering (ca. 2 mm), da makroskopische Knochenabschnitte präpariert werden müssen. Eine gute Alternative bietet die bildgebende Massenspektrometrie, hier Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (*Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry*/ToF-SIMS). Es handelt sich um eine semiquantitative Methode, welche aufgrund einer hohen lateralen Auflösung von 100 nm der ICP-MS mit einer lateralen Auflösung von 2 mm, gemäß der o.g. Versuchsaufbaus, überlegen ist (Vickerman und Briggs 2013). Dass es sich um eine semiquantitative Methode handelt, bedeutet, dass nicht die absolute Konzentration des therapeutischen Agens bestimmt werden kann, jedoch erhaltene Zählraten an unterschiedlichen Proben absolut miteinander verglichen werden können. Zudem eignet sich die Bestimmung mittels ICP-MS nur wenn es sich um anorganische Wirkstoffe wie Strontium handelt. Für die Bestimmung mittels ToF-

SIMS wären auch organische Agenzien geeignet. Im speziellen Fall von Strontium wäre z.B. Mikro-Röntgen möglich (Rohnke et al. 2017).

Der Einsatz des ToF-SIMS ermöglicht es Daten zur semiquantitativen Strontiumkonzentration und zur räumlichen Verteilung zu generieren und somit einen Diffusionskoeffizienten zu ermitteln.

Hierzu werden Messdaten der Intensität von Strontiumionen nicht nur an der Oberfläche des Knochens gemessen, sondern auch in tieferen Schichten, indem Knochenmaterial durch eine O₂-Sputterquelle abgetragen wird. Anschließend kann die Tiefe des dabei entstandenen Kraters z.B. mittels Konfokalmikroskopie ausgemessen werden.

Anhand der Informationen über die Intensitäten von Strontium sowie der Kratertiefe kann ein Diagramm erstellt und der Diffusionskoeffizient ermittelt werden (siehe Abbildung 3). Die Grundlage zur Berechnung des Diffusionskoeffizienten bietet das 2. Fick'sche Gesetz. Die Verwendung der Gleichung des 2. Fick'schen Modells ist eine mögliche Lösung zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten (Gleichung 8).

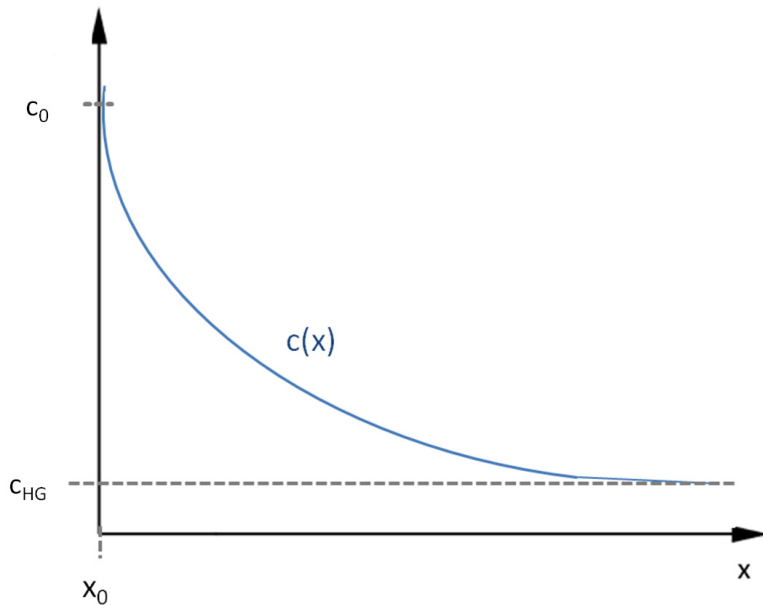


Abbildung 3: 2. Fick'sches Gesetz: Die Abbildung zeigt ein Modell des 2. Fick'schen Gesetzes. Dies beschreibt die Freisetzung aus einer unerschöpflichen Quelle in den halbbunendlichen Raum. Es ist die Intensität (Zählrate) gegen die Kratertiefe aufgetragen.

$$c(x) = y_0 + c_0 \cdot \left(1 - \operatorname{erf} \frac{x-x_0}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (8)$$

y_0 = Hintergrundintensität an Sr^{2+} [Anzahl]

c_0 = Konzentration an Sr^{2+} aus unerschöpflicher Quelle [1 mol/L] / [Anzahl]

$c(x)$ = Intensität an Sr^{2+} zur jeweiligen Kratertiefe [Anzahl]

x = Ortskoordinate Sputtertiefen [m]

x_0 = Krateroberfläche [m]

D = Diffusionskoeffizient [m^2/s]

t = Diffusionszeit [s]

(Rohnke et al. 2017; Crank 1976)

2. Material und Methoden

Die Arbeit basiert auf zwei wesentlichen Experimenten. Im ersten Experiment wird die Auflösung des Knochenzements *in vitro* untersucht. Hierzu wurden gepresste Knochenzementtabletten in verschiedene Lösungsmittel gegeben (demineralisiertes Wasser, Zellkulturnährmedium) und ihr Auflöseverhalten aufgezeichnet.

2.1 Löslichkeitsexperiment

2.1.1 Zementprobe

Als Probe diente eine Tablette aus strontiumhaltigem Calciumphosphatzement (CPZ-Tablette), mit einem Durchmesser von 11 mm und einer Dicke von 2 mm. Die Massenanteile der Mischkomponenten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Mischungskomponenten	Formel	Massenanteil w_i [%]
Alpha-Tricalciumphosphat	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	58,0
Calciumhydrogenphosphat	CaHPO_4	24,0
Strontiumcarbonat	SrCO_3	8,5
Hydroxylapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	8,5

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zementprobe : Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung der Zementprobe (Schumacher et al. 2013).

2.1.2 Aufbau der Versuchsanordnung, verwendete Materialien und Durchführung

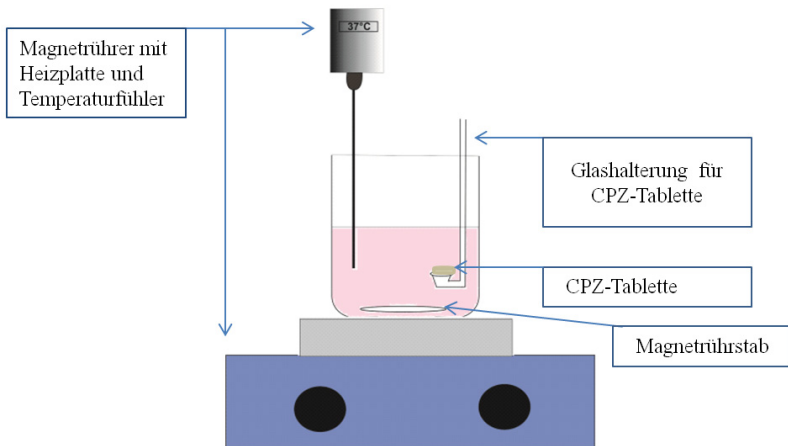


Abbildung 4: Versuchsaufbau: Die Abbildung zeigt den Versuchsaufbau des Löslichkeitsexperiments, in dem Nährmedium bzw. Wasser mittels Magnetrührer mit Heizfunktion auf 37 °C temperiert wurde. Anschließend wurde die CPZ-Tablette, welche sich in einer speziellen Haltung befindet, eingetaucht.

Die CPZ-Tablette wurde in eine speziell angefertigte Glashalterung, mit Hilfe von UHU-Alleskleber (UHU GmbH, Bühl, Deutschland), geklebt. Dadurch wurde erreicht, dass nur die Oberseite der Tablette an der Auflösung teilnimmt. Die Oberfläche der Probe schloss bündig mit der Glashalterung ab, welche sich in einem Polypropylen-Becherglas befand. Als Lösungsmittel wurden 250 ml Nährmedium (Minimal Essential Medium Eagle Jolik Modifikation, MEM M8028, Sigma-Aldrich Produktnummer: M8028-500ml, Inhalt siehe Tabelle unten), welches mit einer Antibiose aus Penicillin und Streptomycin (10,000 Units Penicillin und 10 mg Streptomycin/mL, Produktnummer: P4333-20ml, Sigma-Aldrich) versetzt wurde, genutzt.

Nachdem das Nährmedium mit einem Magnetrührer mit Heizfunktion (MR Hei-Standard, Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) auf 37 °C temperiert worden war, startete der Versuch mit dem Eintauchen der Probe. Ab diesem Zeitpunkt wurden in regelmäßigen Abständen, über 10 Tage, 5 ml des Nährmediums über einen Spritzenfilter (0,2 µm Polypropylenmembran, VWR Internationals, USA) entnommen.

Die entnommenen 5 ml Probevolumina wurde gegen 5 ml frisches Nährmedium, welches ebenfalls mit Antibiotika im gleichen Mischungsverhältnis versetzt worden war, ausgetauscht. Das Becherglas wurde durch Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) verschlossen, um die Verdampfung des Nährmediums zu reduzieren.

Bestandteil	Konzentration c [g/L]
Magnesiumchlorid • 6H ₂ O	0,2
Kaliumchlorid	0,4
Natriumbicarbonat	2
Natriumchlorid	6,5
Natriumdihydrogenphosphat	1,154
L-Arginin • HCl	1,26
L-Cystin • 2HCl	0,0324
L-Glutamin	—
L-Histidin • HCl • H ₂ O	0,042
L-Isoleucin	0,052
L-Leucin	0,052
L-Lysin • HCl	0,0725
L-Methionin	0,015
L-Phenylalanin	0,032
L-Threonin	0,048
L-Tryptophan	0,01
L-Tyrosin • 2Na • 2H ₂ O	0,05452
L-Valin	0,046
Cholinchlorid	0,001
Folsäure	0,001
Inosit	0,002
Nikotinamid	0,001
Pantothensäure	0,001
Pyridoxin	0,001
Riboflavin	0,0001
Thiamin • HCl	0,001
Glucose	2
Phenolrot	0,011
L-Glutamin	0,292

Tabelle 3: Zusammensetzung des Nährmediums: Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Nährmediums Minimum Essential Medium Eagle (MEM) Joklik Modification gemäß Herstellerangaben.

2.1.3 Sr^{2+} -Konzentrationsbestimmung mittels ICP-MS

Zur Ermittlung der Wirkstofffreisetzung wurde das entnommene Probenmaterial auf seinen Gehalt an Strontium mittels „*inductively coupled plasma mass spectrometry*“ (ICP-MS, Element 2, Thermo Fisher) untersucht. Die entnommenen Aliquote wurden nach der Entnahme gewogen, mit konzentrierter Salpetersäure bei 60 °C aufgeschlossen und 1:1000 verdünnt. Anschließend wurde die Strontiumkonzentration mittels ICP-MS bestimmt. Zur Kalibrierung wurden Kalibrierlösungen mit 50, 100, 500, 1000, 5000 ppt Sr^{2+} genutzt.

Der beschriebene Versuch wurde unter gleichen Bedingungen auch in vollentsalztem Wasser (Milli-Q, Merck-KGaA) als Lösungsmittel durchgeführt. Der Versuch konnte in beiden Medien jeweils dreimal reproduziert werden.

Die gewonnenen Daten wurden in einem Diagramm jeweils nach der Konzentration gegen die Zeit aufgetragen.

2.1.4 Überprüfung der Oberflächenbedeckung durch UHU-Alleskleber

Um sicherzugehen, dass nur eine Fläche der Tablette Kontakt zum Nährmedium hat und kein Strontium durch den UHU-Alleskleber diffundiert, wurde eine Tablette komplett mit UHU-Alleskleber benetzt und 10 Tage in der Halterung in Millipore® Wasser eingetaucht. Die ICP-MS-Messungen ergaben, dass keine erhöhte Strontiumkonzentration in dem Wasser zu finden war. Somit konnte gezeigt werden, dass während des Versuchs kein Strontium über die eingeklebte Seitenfläche bzw. die eingeklebte Unterseite freigesetzt wird, sondern nur über die frei zugängliche obere Seite der Tablette. Somit betrug der Durchmesser der Oberfläche, welche an der Diffusion teilnahm, $d = 11 \text{ mm}$.

2.2 Diffusionsexperiment

2.2.1 Versuchstiere

Für die Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren wurde die Genehmigung (Aktenzeichen V 54 – 19 c 20 15 h 01 GI 20/28 Nr. 45/2015) für das Versuchsvorhaben „Knochenheilung im osteoporotischen Femur“ eingeholt. Der Antrag wurde im Rahmen des Sonderforschungsbereichs Transregio 79 gestellt. Unter dem Versuchsvorhaben „Knochenheilung im osteoporotischen Knochen“ wurden die linken Femora der Versuchstiere osteotomiert und im Anschluss eine Osteosynthese, unter der Verwendung neuer Knochenersatzmaterialien für den osteoporotischen Knochen, durchgeführt. Für die Experimente, auf denen die angefertigte Arbeit beruht, wurden ausschließlich die rechten Femora der Tiere verwendet.

Es wurden Femora zweier Gruppen untersucht – bei den Versuchstieren einer Gruppe wurde Osteoporose induziert (OVX), bei der anderen Gruppe handelte es sich um eine Kontrollgruppe (SHAM). Die Versuchstiere wurden im zentralen Tierlabor der Universität Gießen gehalten. Die Femora stammen aus weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld). Im Alter von 10 Wochen wurde der OVX-Gruppe, zur Induktion einer Osteoporose, eine Kombination aus einer bilateralen Ovariectomie und einer defizitären Diät zugeführt. Diese Diät weist einen Mangel an Vitamin D2/D3, Vitamin K sowie Calcium auf (Fa. Altromin). Bis zur Euthanasie wurde bei den Versuchstieren somit über 15 Wochen eine Osteoporose induziert. Im Rahmen des Versuchs zur „Knochenheilung des osteoporotischen Femurs“ wurden die linken Femora aller Versuchstiere aus beiden Gruppen nach 84 Tagen osteotomiert.

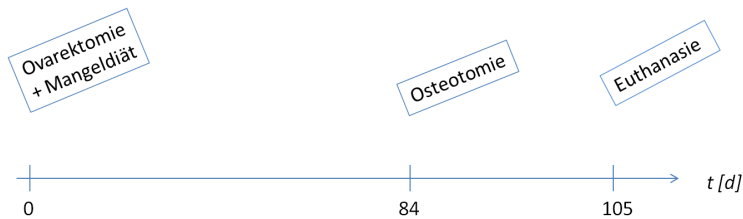


Abbildung 5: Tiermodell OVX: Die Abbildung zeigt den zeitlichen Ablauf des Tiermodells der osteoporotischen Gruppe von Beginn der Osteoporoseinduktion (Tag 0), über die Osteotomie (Tag 84) bis zur Euthanasie (Tag 105).

Bei der Kontrollgruppe (SHAM) wurde keine Osteoporose induziert. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden zur besseren Vergleichbarkeit laparotomiert. Die Ovarien wurden dabei nicht entfernt. Als Futtermittel wurde ihnen eine Standarddiät ad libitum (Altromin 1320) zur Verfügung gestellt.

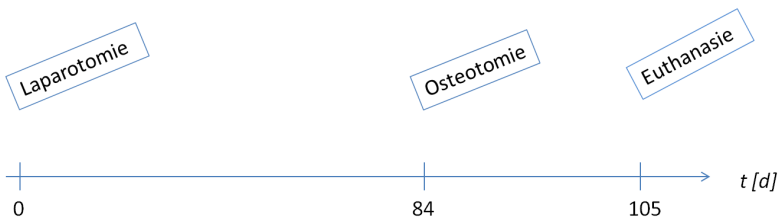


Abbildung 6: Tiermodell SHAM: Die Abbildung zeigt den zeitlichen Ablauf des Tiermodells der Kontrollgruppe angefangen mit der Laparotomie (Tag 0), über die Osteotomie (Tag 84) bis zur Euthanasie (Tag 105).

2.2.2 Präparation der Rattenknochen

Nach 15 Wochen wurden die Versuchstiere euthanasiert. Die Femora wurden freipräpariert und anschließend wurde das Weichteilgewebe entfernt.

2.2.3 Herstellung der Schliffe

Die nativen Femora wurden zur besseren Lagerung bei -80 °C eingefroren und anschließend vor der Weiterverarbeitung in 4%igem Formalin fixiert, dehydriert und in Methylmethacrylat (Technovit 9100, Heraeus Kulzer, Hanau, Deutschland) eingebettet. Das Femur wurde querschnitten und es wurden einzelne Blöcke erstellt. Aus diesen Blöcken wurden ca. 50 µm dicke Knochenschliffe hergestellt und anschließend plan geschliffen.

2.2.4 Eindiffusion von Sr^{2+}

Es wurden verschiedene Eintauchzeiten der Schliffe in Strontiumchloridlösung getestet. Als Optimum hat sich eine Eintauchzeit von 10 min erwiesen. Die angefertigten Knochenschliffe wurden 10 min in 1 mol/L wässriger Strontiumchloridlösung eingetaucht, im Anschluss mit destilliertem Wasser abgespült und im Exsikkator über Nacht getrocknet.

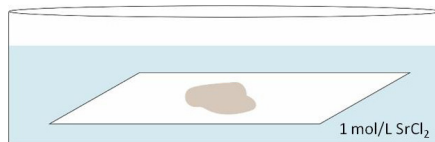


Abbildung 7: Eindiffusion von Sr^{2+} : Die Abbildung zeigt den Objektträger mit aufgebrachtem Probenmaterial, welcher in 1 mol/L SrCl_2 -Lösung eingetaucht ist.

Die Eintauchzeit von 10 min erwies sich als am besten geeignet, da nach anderen Eintauchzeiten (1 h, 5 h) Sr^{2+} bereits zu tief in den Knochenschnitt ($60\text{ }\mu\text{m}$) diffundiert war, sodass am Ende der Messung immer noch Strontium detektierbar war, welche deutlich über der Hintergrundkonzentration lag. Nach einer Eintauchzeit von 10 min wurde die auf dem Objektträger aufgebrachte Probe aus SrCl_2 -Lösung entfernt und mit vollentsalztem Wasser abgespült und anschließend über Nacht im Exsikkator getrocknet. Da auf einem Knochenschnitt die Reproduzierbarkeit der Diffusionsprofile gezeigt werden konnte, lässt sich beweisen, dass die Diffusion nach der Eintauchzeit gestoppt werden kann.

2.2.5 Methode ToF-SIMS zur Detektion des therapeutischen Agens Sr^{2+}

Die Flugzeit-Sekundärionen-Massenspektrometrie (ToF-SIMS) hat als bildgebende Methode in den letzten Jahren immer mehr Einzug in die Lebenswissenschaften gehalten. Sie bietet die Möglichkeit räumlicher Auflösung aller Elemente verschiedener fester anorganischer sowie organischer Materialien. Dabei verfügt sie über eine hohe Ortsauflösung von bis zu 50 nm und die Möglichkeit kleiner Nachweisgrenzen im ppb-Bereich.

ToF-SIMS bezeichnet die Kopplung einer SIMS (Sekundärionen-Massenspektrometrie) mit dem ToF(Flugzeit/*Time of Flight*)-Analysator.

Bei der SIMS wird das Probenmaterial mit Primärionen beschossen. Die Primärionenquelle wird auch LMIG (*liquid metal ion gun*) genannt. Der Emittor besteht aus Bismut. Aus dem erzeugten Ionenstrahl können Bismut-Ionen (Bi^+) oder Bismut-Cluster (Bi_3^+ , Bi_3^{++} , Bi_5^+ , Bi_7^+) separiert werden. Des Weiteren ist auch die Verwendung von Fullerenen (C_{60}) möglich. Bei allen Messungen, welche für die vorliegende Arbeit durchgeführt wurden, wurde ein Bi_3^+ -Ionenstrahl verwendet.

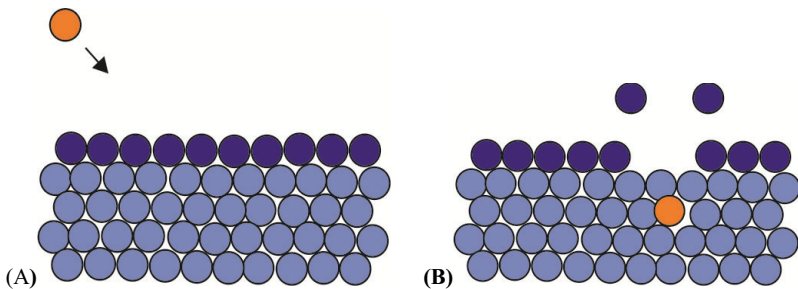


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Emission von Sekundärionen: (A) Das Primärion (orange) trifft auf die Oberfläche des Probenmaterials. (B) Das Primärion dringt wenige Atomschichten (5-10 nm) in das Probenmaterial ein und löst eine Stoßkaskade aus, bei der Ionen der ersten ein bis zwei Monolagen (dunkelblau) Sekundärionen emittiert werden.

Der Bi_3^+ -Primärionenstrahl wurde in einem angelegten elektrischen Feld auf das Probenmaterial beschleunigt und dringt wenige Atomlagen tief in das Material ein. Die Teilchen der ersten ein bis zwei Monolagen erhalten genügend Energie, um aus dem Probenmaterial herausgelöst zu werden und dieses zu verlassen. Durch die Ionisation der Atome des Probenmaterials entstehen je nach Probenmaterial meist einfach positiv

oder negativ geladene Ionen, wie z.B. Sr^+ . Die entstandenen Sekundärionen bewegen sich nun im angelegten elektrischen Feld in Richtung Analysator.

Entsprechend der angelegten Vorspannung des Analysators können so relevante Ionen „eingesaugt“ und detektiert werden. Hier werden die ankommenden Ionen nach steigender Zeit aufgezeichnet. Anschließend folgt die Umrechnung auf die Masse. Die entstandenen Sekundärionen werden gemäß ihrer Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z im Detektor aufgezeichnet. Doppelt geladene Ionen werden bei halber Masse aufgezeichnet, da diese mehr Energie aufweisen und sich schneller im elektrischen Feld bewegen (IONTOF 2019; Vickerman und Briggs 2013).

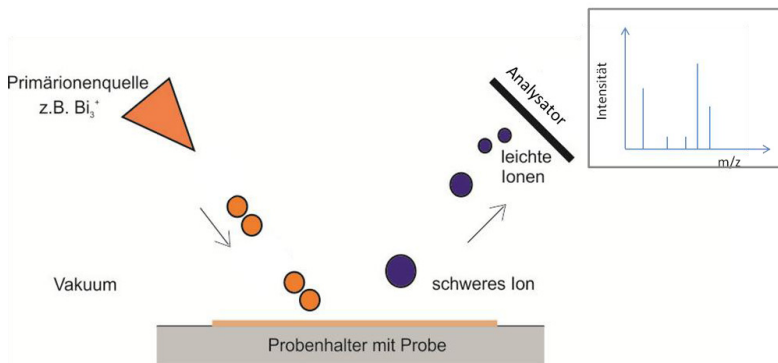


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ToF-SIMS: Der Primärionenstrahl trifft auf das Probenmaterial und führt zur Emission von Sekundärionen. Die Geschwindigkeit der Sekundärionen unterscheidet sich auf der Flugstrecke aufgrund ihrer Masse. Die Geschwindigkeit leichter Ionen ist höher als die schwerer Ionen (Modifiziert nach IONTOF 2019).

Dadurch lassen sich Massenspektren mit den Sekundärionen aufgetrennt nach Masse-zu-Ladungsverhältnis erstellen.

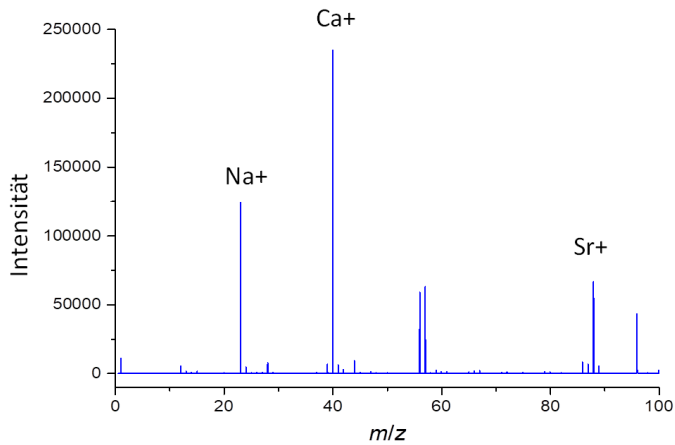


Abbildung 10: Massenspektrum (m/z) 0 bis 100: Die Abbildung zeigt ein Massenspektrum einer in Sr^{2+} eingetauchten Knochenprobe mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis [m/z] von 0 bis 100 (Modifiziert nach Henss et al. 2015).

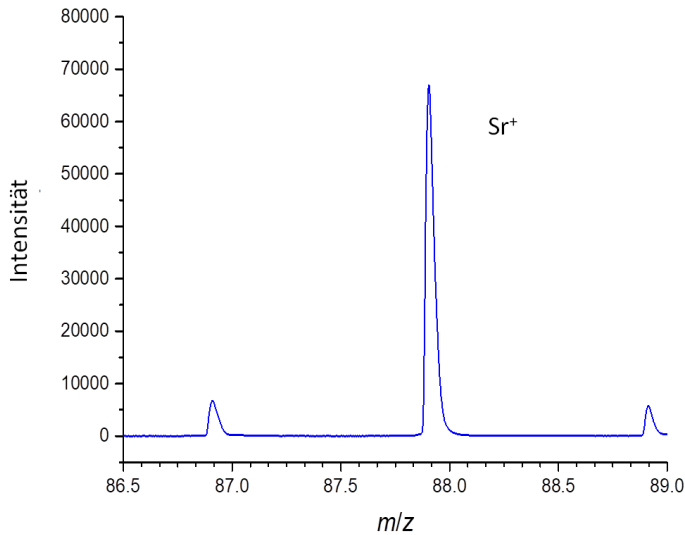


Abbildung 11: Massenspektrum (m/z) 86 bis 89: Die Massenspektren der in Sr^{2+} eingetauchten Knochenproben zeigen den Sr^+ -Peak bei dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis [m/z] 87,75.

Es besteht die Möglichkeit die gesamte Oberfläche bzw. einen definierten Bereich der Probe zu scannen und somit aus den gewonnenen Daten ein zweidimensionales Bild der Oberfläche zu erstellen. Dies wird als Massenbild bezeichnet.

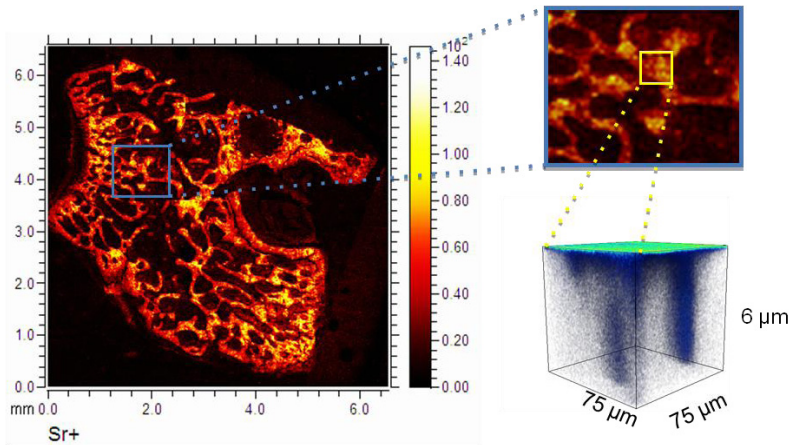


Abbildung 12: Sr^+ -Massenbild: Im linken Bild sieht man das Femur einer Ratte im Querschnitt (Sr^+ -Signals). Es wurde ein Trabekel ausgewählt, um ein Tiefenprofil zu erstellen (rechts oben). An dieser Position wurde eine 3D-Rekonstruktion des Tiefenprofils erstellt (rechts unten).

Des Weiteren ist es möglich mit einer zweiten, deutlich intensiveren Ionenquelle (Sputterquelle), welche schrittweise lokal die oberen Atomlagen abträgt und somit einen Krater in das Probenmaterial schießt, ein sogenanntes Tiefenprofil zu erstellen.

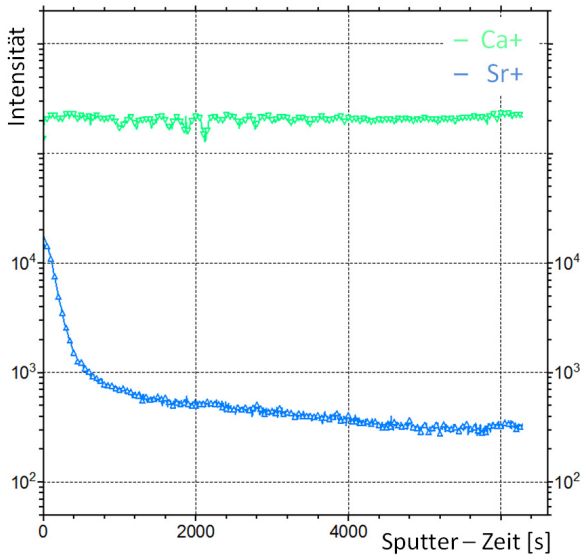


Abbildung 13: Tiefenprofil: Die Abbildung zeigt die Intensität der Sr^+ - (blau) sowie Ca^+ - Signale (grün), aufgetragen gegen die Sputter-Zeit [s]. Der Ort der Aufnahme wurde in Abbildung 12 markiert.

Das gleichbleibende Calciumsignal spricht für eine homogene Knochenstruktur in dem Bereich, in welchem das Tiefenprofil erstellt wurde. Das abnehmende Strontiumsignal spricht für eine abnehmende Intensität an Strontium in tieferen Knochenschichten.

Aus den ermittelten Daten kann eine dreidimensionale Darstellung des Knochens konstruiert werden.

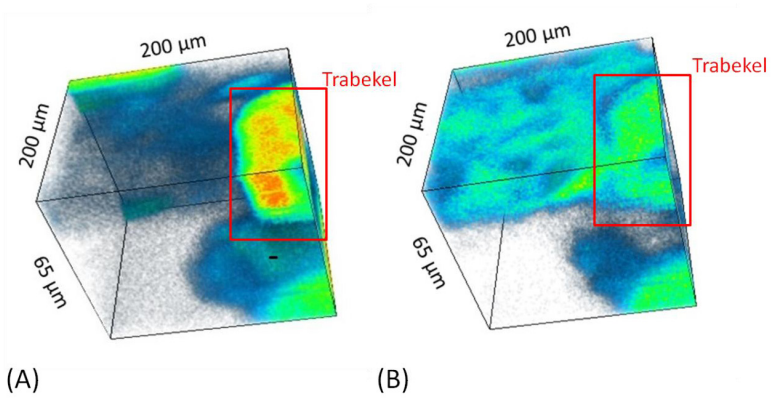


Abbildung 14: 3D-Rekonstruktionen aus Tiefenprofilen:

- (A) Calciumverteilung eines Anschnittes eines Knochentrabekels
- (B) Strontiumverteilung eines Knochenausschnittes

2.2.6 Messmodi ToF-SIMS

Zur Messung der Proben wurde ein ToF-SIMS 5 (Firma IONTOF GmbH, Münster) verwendet. Die hergestellten Proben mussten trocken, vakuumstabil und ihre Oberfläche frei von Fett- und Staubschichten sein.

Als Primärionen wurden 25 keV Bi_3^+ -Cluster mit 25 keV Energie verwendet. Der Analysenstrom wurde mit 0,16 – 0,32 pA gemessen. Es wurde zum Materialabtrag eine O_2^+ -Sputterquelle mit der Energie von 1 keV genutzt, da mit O_2^+ die Ionisierungswahrscheinlichkeit für Ca^+ , Sr^+ größer ist. Die Ströme der Sputterquelle wurden mit 332 – 347 nA gemessen.

Für die zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten relevanten Messungen wurden folgende Messmodi verwendet.

Zur Erstellung der Tiefenprofile wurde mit der Sputterquelle ein Krater mit einer Grundfläche von $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ geschossen. Die mittels Primärionen abgerasterte Analysenfläche betrug $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ in der Kratermitte. Die Zykluszeit war 60 μs . Es wurde der *non-interlaced mode* verwendet. Hierfür wurde 10 s Material mit der O_2^+ -Sputterquelle abgetragen, anschließend 5 s pausiert, um mit einer niederenergetischen Elektronenquelle die Probenaufladung zu kompensieren. Die erzielte Massenauflösung für das Ca^+ -Signal $m/\Delta m$ (FWHM) betrug für alle Messungen > 4400 .

Für die Auswertung wurde die Software Surface Lab 6.6 (IonToF GmbH, Münster, Deutschland) benutzt.

2.2.7 Konfokalmikroskopie

Unter der Annahme, dass sich die Tiefe der Sputterkrater linear zur Sputter-Zeit verhält, wurde Tiefe der Krater ausgemessen. Dazu wurde ein Konfokalmikroskop Modell PLu neox 3D der Firma Sensofar-Tech (Terrassa, Spanien) benutzt. Die Kratertiefen wurden mit einem Konfokal-Objektiv mit 50-facher Vergrößerung und einer Tiefenauflösung $< 3 \text{ nm}$ bestimmt.

2.2.8 Berechnung der Diffusionskoeffizienten

Die Auswertung der ToF-SIMS-Daten erfolgte mit der Surface Lab Software Version 6.6 (IonToF GmbH, Münster, Deutschland).

Die gewonnenen Daten wurden in einem Diagramm dargestellt. Dabei wurde die Zählrate von Strontium gegen die jeweilige Sputtertiefe des Kraters aufgetragen. Die Verwendung der Gleichung des 2. Fick'schen Gesetzes ist eine mögliche Lösung zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten.

$$c(x) = y_0 + c_0 \cdot \left(1 - \operatorname{erf} \frac{x-x_0}{2\sqrt{Dt}} \right) \quad (9)$$

y_0 = Hintergrundintensität an Sr^{2+} [Anzahl]

c_0 = Konzentration an Sr^{2+} aus unerschöpflicher Quelle [1 mol/l] / [Anzahl]

$c(x)$ = Intensität an Strontium zur jeweiligen Kratertiefe [Anzahl]

x = Ortskoordinate Sputtertiefe [m]

x_0 = Krateroberfläche [m]

D = Diffusionskoeffizient [m^2/s]

t = Diffusionszeit [s]

2.2.9 Statistische Analyse

Für unabhängige Stichproben kann der T-Test angewendet werden. Dafür muss Varianzengleichheit gegeben sein und die Stichproben müssen normalverteilt sein. Bei Varianzenungleichheit ergibt sich das Behrens-Fisher-Problem. Anstelle des T-Tests wird der Behrens-Fisher Test angewendet.

Signifikante Unterschiede wurden auf dem 5%-Niveau und dem 1%-Niveau geprüft.

3. Ergebnisse

Im ersten der beiden aufeinanderfolgenden Experimente wurde die Auflösung des Knochenzements *in vitro* untersucht. Hierzu wurden gepresste Knochenzementtabletten in verschiedene Lösungsmittel gegeben (demineralisiertes Wasser, Zellkulturnährmedium) und ihr Auflöseverhalten aufgezeichnet. Die Messungen der Strontiummengen, welche aus dem Calciumphosphatzement freigesetzt wurde, erfolgten mittels ICP-MS. Aus den erhaltenen Werten konnte die Freisetzung von Strontium ermittelt werden.

Im zweiten Experiment wurden Knochenschnitte in eine strontiumhaltige Lösung getaucht und das Eindringprofil von Strontium untersucht. Die Ermittlung des Eindringprofils von Strontium in den trabekulären Knochen erfolgte mittels ToF-SIMS. Daraus konnte ein Diffusionskoeffizient berechnet werden.

3.1 Ergebnisse der ICP-MS-Messungen

Es wurde eine Calciumphosphatzement-Tablette in das auf 37 °C temperierte Lösungsmedium (Wasser und Nährmedium) eingetaucht. Die Tablette hatte einseitig Kontakt zum Medium. Anschließend wurden über einen gesamten Zeitraum von 10 Tagen mehrere Aliquote der Lösung entnommen, und deren Strontiumkonzentration bestimmt.

Die Stoffmenge an Strontium im Wasser und im Nährmedium, welche aus der strontiumhaltigen Calciumphosphat-Tablette freigesetzt wurde, wurde mittels ICP-MS bestimmt. Die erhaltene Stoffmenge wurde auf das Gesamtvolumen hochgerechnet und auf die Kontaktfläche normiert.

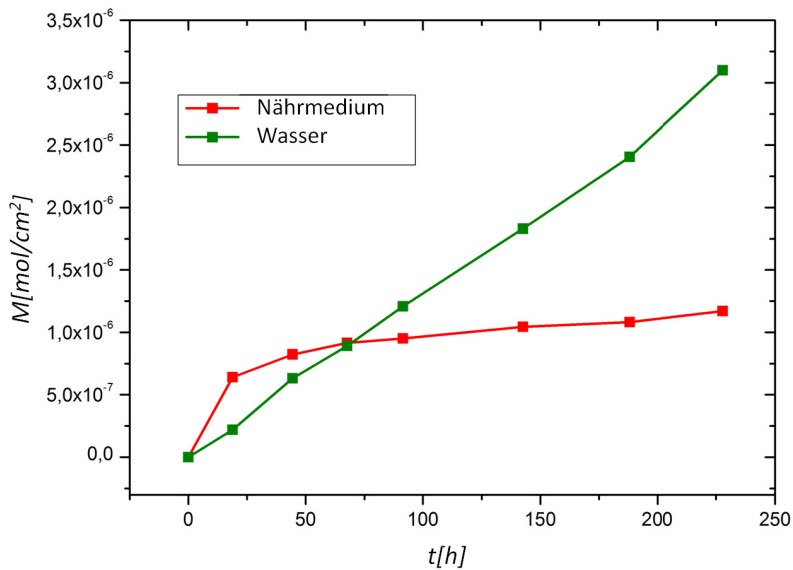


Abbildung 15: Freigesetzte Flächenkonzentration Sr^{2+} in Wasser und Nährmedium: Die Abbildung zeigt die Flächenkonzentration von Sr^{2+} M [mol/cm²] in Wasser (grün) und Nährmedium (rot) gegen die Zeit t [h] bei 37 °C

In Abbildung 15 ist die Flächenkonzentration an Sr^{2+} gegen die Zeit aufgetragen. Man sieht eine deutlich flacher verlaufende Kurve für die Freisetzung in Nährmedium im Vergleich zu Wasser. Dies sagt aus, dass die Freisetzung von Sr^{2+} in Nährmedium im Vergleich zum Wasser gehemmt ist.

Anschließend wurden passende kinetische Modelle gesucht, welche die Freisetzung von Sr^{2+} in Wasser und in Nährmedium beschreiben.

Im Diagramm in Abbildung 16 ist die Flächenkonzentration von Sr^{2+} gegen die Zeit in Wasser aufgetragen. Die dargestellte Ausgleichskurve basiert auf dem kinetischen Modell von Noyes und Whitney.

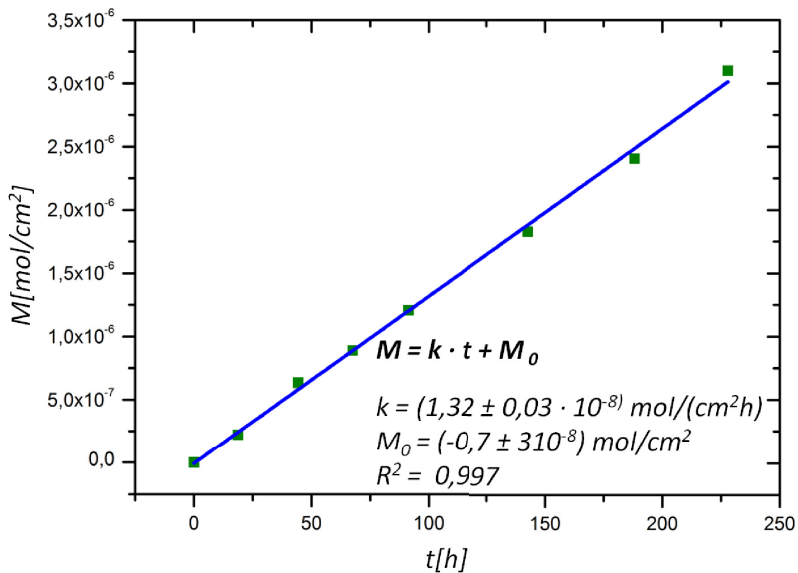


Abbildung 16: Freisetzungskinetik in Wasser: Die Abbildung zeigt eine Anpassungskurve nach Noyes und Whitney der zeitabhängigen Flächenkonzentration M [mol/cm^2] von Sr^{2+} in Wasser.

Somit konnte eine kinetische Freisetzungskonstante für Wasser mit $k = 1,32 \pm 0,03 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/(\text{cm}^2 \text{h})$, anhand des Noyes-Whitney-Modells, ermittelt werden.

Im Diagramm in Abbildung 17 ist die Flächenkonzentration von Sr^{2+} gegen die Zeit in Nährmedium aufgetragen. Die dargestellte Ausgleichskurve basiert auf dem kinetischen Modell von Korsmeyer-Peppas.

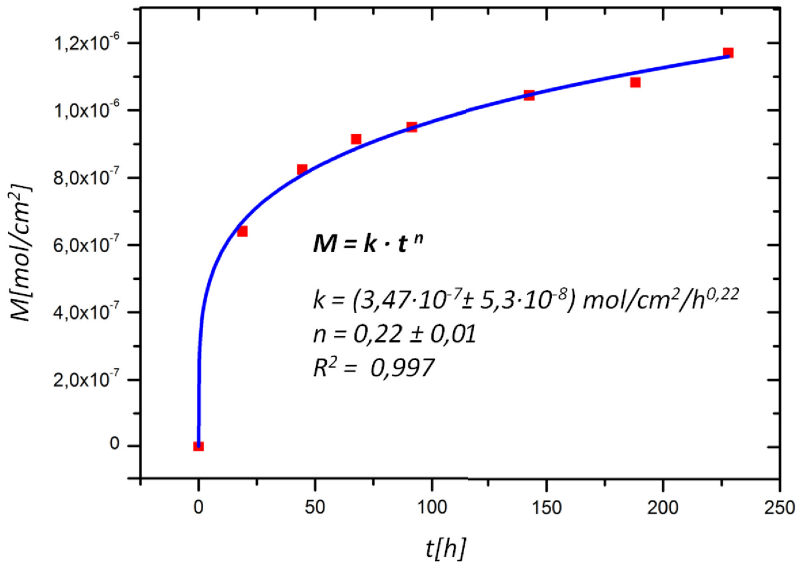


Abbildung 17: Freisetzungskinetik in Nährmedium: Die Abbildung zeigt eine Anpassungskurve nach Korsmeyer und Peppas der zeitabhängigen Flächenkonzentration M [mol/cm²] von Sr^{2+} in Nährmedium.

Die Freisetzung von Sr^{2+} in α -MEM zeigt im Gegensatz zum linearen Graphen in Wasser eine mit der im Gegensatz zum Wasser weniger stark steigende Kurve. Die Freisetzung von Sr^{2+} ließ sich mit dem Modell von Korsmeyer und Peppas beschreiben. Die ermittelte Freisetzungskonstante betrug $3,47 \cdot 10^{-7} \pm 5,3 \cdot 10^{-8} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0,22}$.

Durch Wiederholung der Versuche konnte eine Reproduzierbarkeit gezeigt werden.

Wasser	Freisetzungskonstante	Fehler	R ²
	k/(mol/(cm ² h))	Δk(mol/(cm ² h))	
	1,21 · 10 ⁻⁸	0,09 · 10 ⁻⁸	0,984
	1,32 · 10 ⁻⁸	0,03 · 10 ⁻⁸	0,997
	2,69 · 10 ⁻⁸	0,14 · 10 ⁻⁸	0,987
Mittelwert	1,74 · 10 ⁻⁸	0,26 · 10 ⁻⁸	

Tabelle 4: Erhaltene Werte für die Freisetzungskonstante in Wasser : Die Tabelle zeigt die erhaltenen Werte der Freisetzungskonstante in Wasser.

Somit konnte für Wasser im Mittel eine Freisetzungskonstante mit $k = 1,74 \cdot 10^{-8} \pm 0,26 \cdot 10^{-8} \text{ mol/cm}^2/\text{h}$, anhand des Noyes-Whitney-Modells, ermittelt werden.

α-MEM	Freisetzungskonstante	Fehler	n	Δ n	R ²
	k/(mol/(cm ² h))	Δk(mol/(cm ² h))			
	3,47 · 10 ⁻⁷	0,53 · 10 ⁻⁷	0,22	0,01	0,997
	1,80 · 10 ⁻⁷	0,24 · 10 ⁻⁷	0,27	0,03	0,985
	0,45 · 10 ⁻⁷	0,18 · 10 ⁻⁷	0,48	0,07	0,964
Mittelwert	1,91 · 10 ⁻⁷	0,96 · 10 ⁻⁷	0,32	0,04	

Tabelle 5: Erhaltene Werte für die Freisetzungskonstante in α-MEM : Die Tabelle zeigt die erhaltenen Werte der Freisetzungskonstante in α-MEM.

Die ermittelte Freisetzungskonstante in α-MEM betrug im Durchschnitt $1,91 \cdot 10^{-7} \pm 0,96 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0,32}$.

3.2 Ergebnisse der ToF-SIMS-Messungen

3.2.1 Mobilität des therapeutischen Agens Sr^{2+} im Rattenknochen

Die Femurquerschnitte der gesunden (SHAM) sowie osteoporotischen Gruppe (OVX) wurden in 1 mol/L wässriger Strontiumchloridlösung für 10 min eingetaucht und anschließend mittels ToF-SIMS vermessen. Dabei wurden Massenbilder des Femurquerschnitts aufgenommen (siehe Abbildung 18). Das Calciumionenbild zeigt die typische knöcherne Struktur des Femurs im Querschnitt. Im Randbereich des Knochens ist die Kortikalis und im Inneren das trabekuläre System zu sehen. Das Strontiumsignal zeigt das Vorhandensein von Strontium in den knöchernen Strukturen. Anhand der Intensität des Strontiumsignals lässt sich eine Gleichverteilung von Strontium an der Oberfläche der knöchernen Strukturen erkennen.

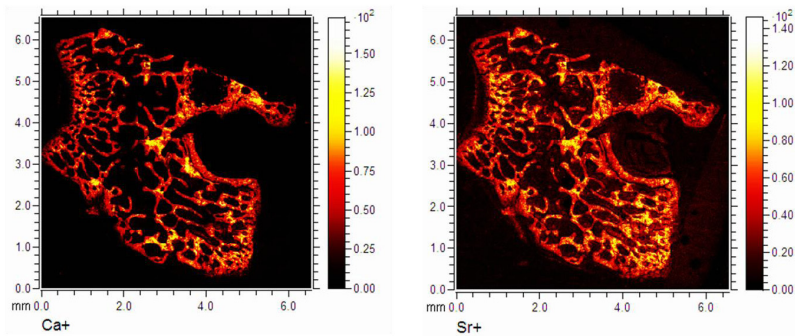


Abbildung 18: Massenbilder: Massenbild eines Femurs (SHAM) im Querschnitt (Ca-Signal links, Sr-Signal rechts) nach Eintauchen in 1 mol/L-Strontiumchloridlösung.

Anhand der Massenbilder wurde eine geeignete Position, auf einem Trabekel, für die Erstellung eines Tiefenprofils ausgewählt.

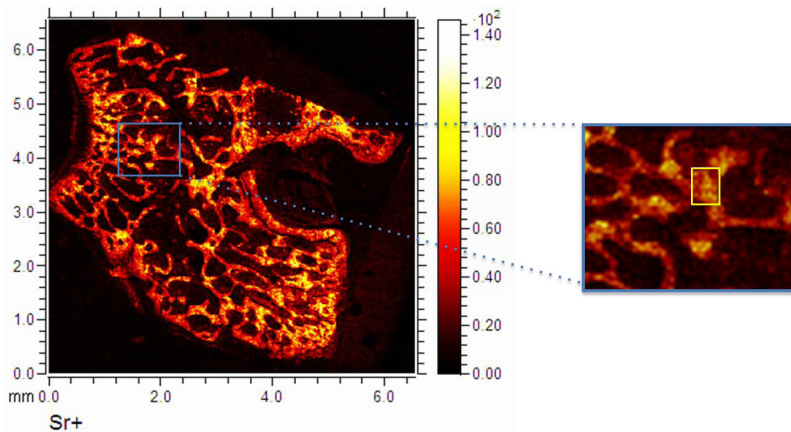


Abbildung 19: Auswahl eines Trabekels im Massenbild: Massenbild eines Femurs (SHAM) im Querschnitt (Sr-Signal). Das blaue Quadrat zeigt die Auswahl eines Trabekels zur Erstellung eines Tiefenprofils. Im gelben Quadrat ist der Trabekelabschnitt zu sehen, in welchem das Tiefenprofil erstellt werden soll.

Aus den erstellten Tiefenprofilen wurden die Informationen über die Calcium- und Strontiumintensität entnommen und es wurde ein 3D-Bild (Abbildung 20) erstellt. Hier zeigte die Rekonstruktion des Calciumsignals einen vollständig ausgefüllten Würfel. Das Calcium spiegelt als Bestandteil harter Knochensubstanz den trabekulären Knochen wider (Abbildung 20 links). Somit wurde bestätigt, dass das Tiefenprofil in Knochensubstanz, im Trabekel, aufgenommen wurde. Die Strontiumverteilung hingegen zeigte eine Abnahme der Strontiumintensität in der Tiefe (Abbildung 20 rechts).

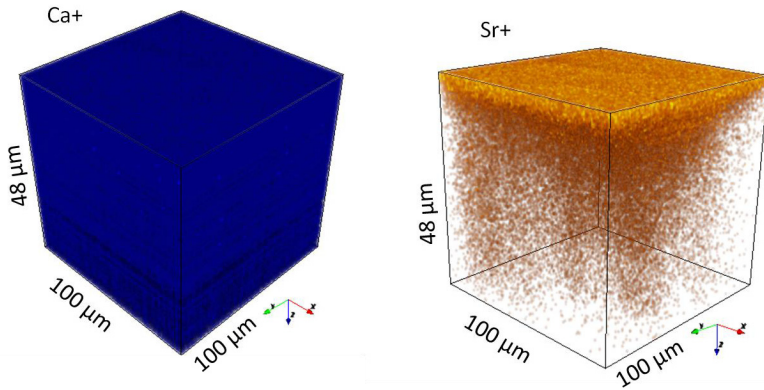


Abbildung 20: 3D-Rekonstruktion von Tiefenprofilen: Die Abbildung zeigt die 3D-Rekonstruktion eines Tiefenprofils, welche die Calciumverteilung (links) und Strontiumverteilung (rechts) im Vergleich darstellt.

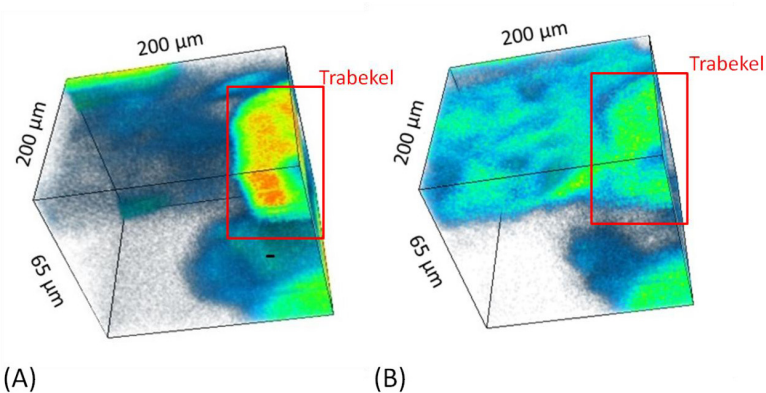


Abbildung 21: 3D-Rekonstruktionen im trabekulären System: Das linke Bild zeigt das Calciumsignal und im rechten Bild ist das Strontiumsignal zu sehen.

ToF-SIMS-Messungen, welche Trabekelanschnitte darstellten, zeigten zudem die Calciumintensitäten eines Trabekels im Gegensatz zur Einbettmasse (Abbildung 21: linkes Bild). Bei Messungen der Strontiumintensität zeigte sich eine oberflächliche Anreicherung des Strontiums im Trabekel sowie in der Einbettmasse. Allerdings ließ

sich in tieferen Schichten erkennen, dass das Strontium lediglich im Bereich der Trabekel in die Probe eindiffundiert ist (Abbildung 21: rechtes Bild).

3.2.2 Gesunder und osteoporotischer Knochen im Vergleich

Die vorgelegte Arbeit zielt darauf ab, Diffusionskoeffizienten für das therapeutische Agens Sr^{2+} im trabekulären Knochen gesunder sowie osteoporotischen Ratten zu bestimmen.

Mittels ToF-SIMS wurden Oberflächenbilder sowie Tiefenprofile im trabekulären Anteil der Femora gesunder sowie osteoporotischer Ratten erstellt. Die Informationen der Tiefenprofile ließen sich in Form von 3D-Rekonstruktionen visualisieren.

Die Ergebnisse zeigt die nachfolgende Abbildung 22.

Die erste Reihe stellt Oberflächenprofile im trabekulären Rattenknochen gesunder (links) sowie osteoporotischer Versuchstiere (rechts) dar.

Anhand der Calcium- und Strontiumbilder ließen sich die typischen Knochenstrukturen erkennen. Somit konnte eine geeignete Stelle für ein Tiefenprofil gewählt werden. In der unteren Reihe sind 3D-Rekonstruktionen der ausgewählten Trabekelregionen dargestellt. Hier zeigte sich eine homogene Calciumverteilung sowohl im Knochen gesunder (links) als auch im Knochen osteoporotischer Tiere (rechts). Anhand des Strontiumsignals sieht man ein Diffusionsprofil dieses Wirkstoffes. Es zeigt sich, dass die Diffusion im trabulären Knochen osteoporotischer Versuchstiere (rechts unten) stärker voranschreitet als bei gesunden Versuchstieren (links unten).

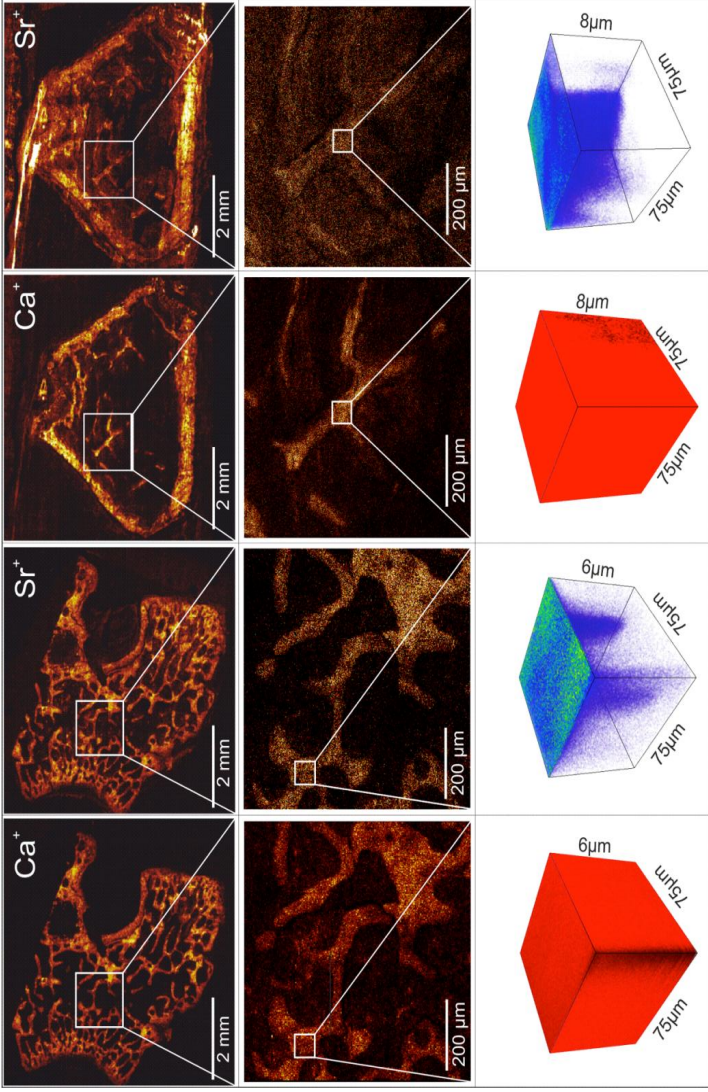


Abbildung 22: Diffusion im trabekulären Knochen gesunder und osteoporotischer Ratten im Vergleich: Die Abbildung zeigt einen Vergleich zwischen gesundem (links) und osteoporotischem Versuchstieren (rechts). Die obere Reihe zeigt Massbilder der Femurquerschnitte. Die mittlere Reihe zeigt eine Vergrößerung der Aufnahmen der oberen Reihe dar. Darunter befindet sich die jeweilige 3D-Rekonstruktion der Tiefenprofile (untere Reihe).

3.2.3 Berechnungen der Diffusionskoeffizienten

Die Diffusion des Wirkstoffes Sr^{2+} wurde unter der Annahme, dass es sich um eine Diffusion aus einer unerschöpflichen Quelle (1 mol/L SrCl_2) in den halbbunendlichen Raum (Knochen) handelt, beschrieben.

Die Verwendung der Gleichung des 2. Fick'schen Modells bietet eine mögliche Lösung zur Ermittlung des Diffusionskoeffizienten.

$$c(x) = y_0 + c_0 \cdot \left(1 - \operatorname{erf} \frac{x-x_0}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (10)$$

y_0 = Hintergrundintensität an Sr^{2+} [Anzahl]

c_0 = Konzentration an Sr^{2+} aus unerschöpflicher Quelle [1 mol/l] / [Anzahl]

$c(x)$ = Intensität an Sr^{2+} zur jeweiligen Kratertiefe [Anzahl]

x = Ortskoordinate Sputtertiefe [m]

x_0 = Krateroberfläche [m]

D = Diffusionskoeffizient [m^2/s]

t = Diffusionszeit [s]

(Rohnke et al. 2017; Crank 1976)

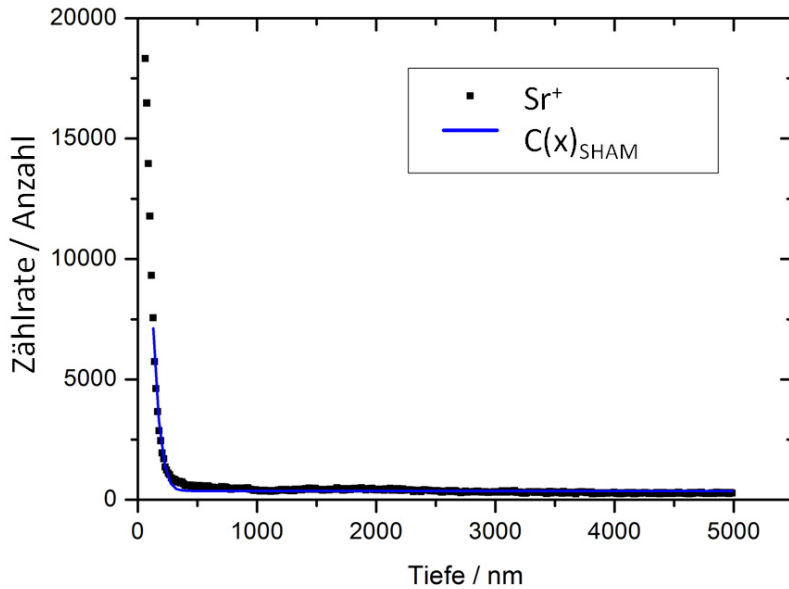


Abbildung 23: Ermittlung des Diffusionskoeffizienten im Knochen gesunder Ratten: In dem dargestellten Diagramm wurde die Zählrate an Strontium gegen die Tiefe aufgetragen. Die Probenoberfläche befindet sich entsprechend bei 0 nm. $c(x)$ bezeichnet die Funktion, welche die Diffusion von Strontium im trabekulären Knochen gesunder Ratten nach einer Eindiffusionszeit von 10 min beschreibt.

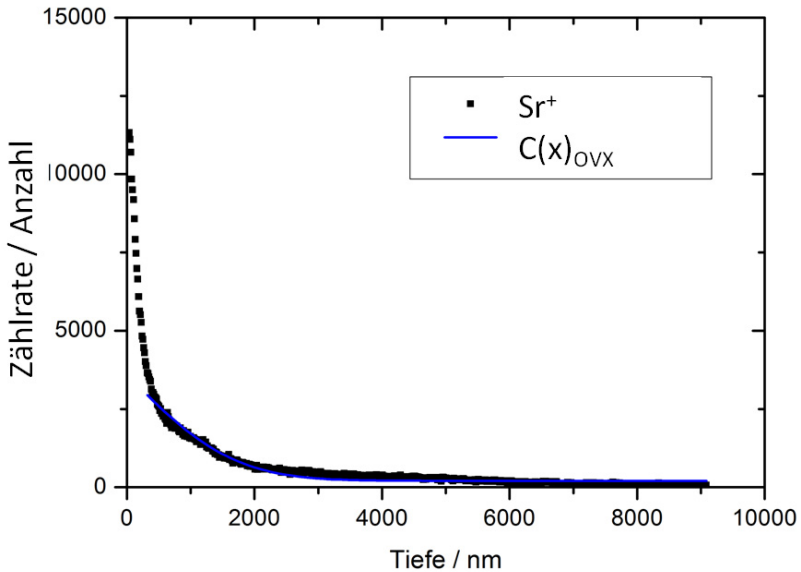


Abbildung 24: Ermittlung des Diffusionskoeffizienten im Knochen osteoporotischer Ratten: In dem dargestellten Diagramm wurde die Zählrate an Strontium gegen die Tiefe aufgetragen. Die Probenoberfläche befindet sich entsprechend bei 0 nm. $c(x)$ bezeichnet die Funktion, welche die Diffusion von Strontium im trabekulären Knochen osteoporotischer Ratten nach einer Eindiffusionszeit von 10 min beschreibt.

Für die Anpassungsrechnung wurden die Anfangsdaten des Tiefenprofils nicht berücksichtigt, da aufgrund von Dotiereffekten der Beginn der Tiefenprofile nicht aussagekräftig ist. Bei Dotiereffekten handelt es sich um Einbringen von Fremdatome wie z.B. Bi_3^+ und O_2^+ an der Oberfläche, welche zu Veränderungen im Strontiumsignal führen.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen graphische Darstellungen der Diffusion, aus denen die Diffusionskoeffizienten für den Knochen gesunder Ratten $(9,83 \pm 0,24) \cdot 10^{-14} \text{ cm}^2/\text{s}$ und für den Knochen osteoporotischen Ratten $(1,42 \pm 0,03) \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$ ermittelt wurden.

Wie in diesem ausgewählten Beispiel gezeigt, ergaben sich für osteoporotische Versuchstiere größere Diffusionskoeffizienten als für den gesunde. Dies konnte in weiteren Messungen bestätigt werden.

Daraus ließ sich folglich ableiten, dass die Diffusion des therapeutischen Agens Sr^{2+} in den trabekulären Knochen osteoporotischer Ratten schneller erfolgt im Vergleich zu gesunden Tieren (Rohnke et al. 2017).

3.2.4 Statistische Auswertungen

Es wurden Diffusionskoeffizienten für zwei voneinander unabhängige Messreihen kleiner Stichprobengruppen ermittelt. Für diese Voraussetzungen kann normalerweise der T-Test angewendet werden. Die Anzahl der Diffusionskoeffizienten in der OVX- und in der SHAM-Gruppe betrug 6. Die verwendeten Knochenschnitte stammen von Tieren der OVX-Gruppe sowie von 3 Tieren der SHAM-Gruppe. Bei diesen Gegebenheiten, das heißt einer kleinen Stichprobenanzahl sowie zwei voneinander unabhängigen Stichprobengruppen, kann der T-Test angewendet werden.

Um den T-Test durchführen zu dürfen, müssen zwei Bedingungen erfüllt sein: Zum einen müssen die Diffusionskoeffizienten der Stichproben in der Grundgesamtheit, welcher sie entstammen, normalverteilt sein; zum anderen muss eine Varianzgleichheit der beiden Stichprobengruppen vorliegen. Da keine Varianzgleichheit vorlag, wurde der Behrens-Fisher-Test angewandt.

Die einzelnen Rechenschritte sind im Anhang aufgeführt

D _{osteoporotisch} in cm^2/s	D _{gesund} in cm^2/s
$(2,44 \pm 0,06) \cdot 10^{-10}$	$(9,83 \pm 0,24) \cdot 10^{-14}$
$(1,42 \pm 0,03) \cdot 10^{-11}$	$(6,78 \pm 0,31) \cdot 10^{-13}$
$(1,01 \pm 0,06) \cdot 10^{-10}$	$(2,83 \pm 0,16) \cdot 10^{-12}$
$(2,09 \pm 0,06) \cdot 10^{-10}$	$(4,50 \pm 0,28) \cdot 10^{-12}$
$(1,37 \pm 0,08) \cdot 10^{-11}$	$(2,21 \pm 0,20) \cdot 10^{-14}$
$(2,40 \pm 0,20) \cdot 10^{-10}$	$(2,22 \pm 0,94) \cdot 10^{-13}$

Tabelle 6: Diffusionskoeffizienten: Die Tabelle zeigt die Diffusionskoeffizienten (D) der osteoporotischen (links) sowie der gesunden Gruppe (rechts).

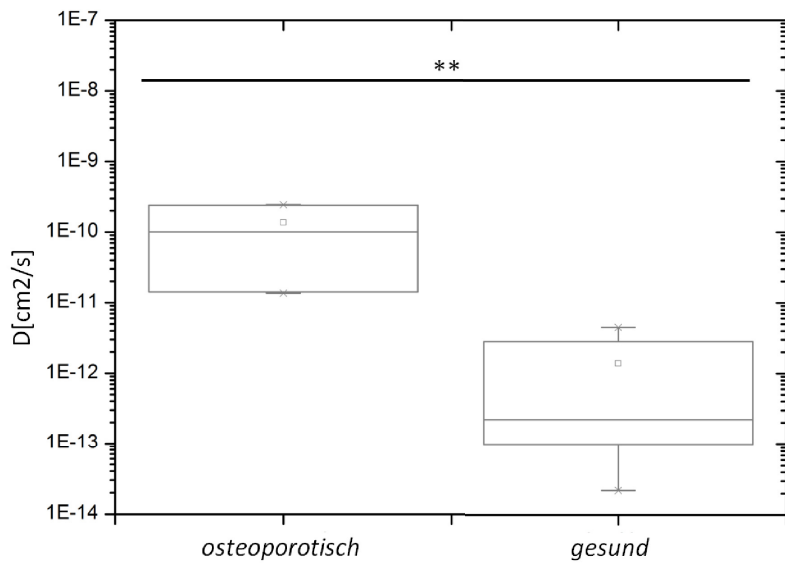


Abbildung 25: Boxplot: Die Abbildung zeigt die graphische Darstellung der Diffusionskoeffizienten des osteoporotischen (links) und gesunden (rechts) trabekulären Knochens. Die Sternchen ** bedeuten ein Signifikanzniveau von $p < 0,01$ (Behrens-Fisher-Test).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Konzeption eines Modells zur Darstellung der Mobilität des Wirkstoffes Sr^{2+} im mineralisierten Knochengewebe. Es sollte gezeigt werden, wie Sr^{2+} aus Calciumphosphatzement freigesetzt wird und anschließend in den trabekulären Knochen diffundiert. Dabei wurden zwei aufeinanderfolgende Prozesse untersucht. Zuerst erfolgte die Messung der Freisetzung des Wirkstoffes Sr^{2+} aus Knochenersatzmaterial, um ein kinetisches Modell zu beschreiben. Sodann wurde die Diffusion des Wirkstoffes in den trabekulären Knochen untersucht.

4.1 Diskussion des Freisetzungsversuchs

4.1.1 Methode des Freisetzungsversuchs

Die Freisetzung des Wirkstoffes Sr^{2+} aus einer strontiumhaltigen Calciumphosphatzement-Tablette, welche in 250 ml Lösungsmittel (Wasser oder Nährmedium) über 10 Tage bei 37 °C eingetaucht war, wurde gemessen. Dabei wurden regelmäßig Aliquote der Flüssigkeit entnommen und der Strontiumgehalt wurde mittels ICP-MS bestimmt. Die entnommene Flüssigkeitsmenge wurde direkt durch die gleiche Menge an neuem Lösungsmittel ersetzt.

Das verwendete Versuchsmodell beruht auf Versuchen, welche von Schumacher et al. durchgeführt wurden (Schumacher et al. 2013). Schumacher führte Versuche zur Löslichkeit des Calciumphosphatzements S100 durch. Hierbei wurde ebenso Nährmedium als Lösungsmittel bei 37 °C verwendet. Allerdings wurde das Nährmedium komplett nach jeder Messung gewechselt. Die somit erlangten Ergebnisse spiegeln ein semidynamisches Modell wider. Ein Ziel dieser Arbeit war ein kinetisches Modell zur Löslichkeit von Sr^{2+} aus Calciumphosphatzement zu erhalten.

Um die Freisetzungskonstante zu ermitteln, wurde ein Zeitraum von 10 Tagen betrachtet. Der angewandte Versuchsablauf zeigt ein geschlossenes System, aus dem kleine Mengen Probevolumen entnommen wurden, um den Strontiumgehalt zu bestimmen. Die Bestimmung mittels ICP-MS ermöglichte die Verwendung kleiner Probenvolumina von 5 ml zur Mehrfachbestimmung. Das entnommene Volumen wurde durch Lösungsmittel aufgefüllt. Dies stellt einen Vorteil im Vergleich zu dem von

Schumacher et al. beschriebenen Versuchsmodell dar, bei dem die gesamte Menge an Lösungsmittel ausgetauscht und zur Strontium-Gehaltsbestimmung genutzt wurde.

Um die Versuchsbedingungen realitätsnaher darzustellen, wurde zusätzlich zu Wasser α -MEM als Lösungsmittel genutzt. Durch die Verwendung von Nährmedium als Lösungsmittel sollte eine Art extrazelluläre Matrix imitiert und der Einfluss vorhandener Aminosäuren und Salze auf das Lösungsverhalten berücksichtigt werden. Der Versuch wurde bei 37 °C durchgeführt, um die Körpertemperatur zu imitieren.

Limitation

Durch die regelmäßige Entnahme der Aliquoten aus der Probeflüssigkeit, welche durch Lösungsmittel im gleichen Volumen ersetzt wurden, wurde die Konzentration regelmäßig etwas erniedrigt. Somit stellt die Methode keine kontinuierliche Messung dar. Weitere analytische Messverfahren wie über die pH-Wert-Änderung oder die Leitfähigkeitsänderung stellten sich allerdings in Vorversuchen als nicht praktikabel dar.

Nährmedium als Lösungsmittel zu verwenden erwies sich als suboptimal und barg diverse Fehlerquellen. Zuerst einmal stellt Nährmedium eine Matrix dar, welche auf schnelles Wachstum von Organismen ausgelegt ist. Es kam zum Befall durch Bakterienkulturen und Pilzen. Diese ließen sich durch Zugabe von Penicillin und Streptomycin reduzieren. Eine Durchführung des Versuchs unter sterilen Bedingungen würde die Ergebnisse wahrscheinlich optimieren. Während der Versuche kam es außerdem zum Absetzen von schwerlöslichen Zementpartikeln. Um diese nicht gelösten Zementpartikel nicht in der Probe zu enthalten und somit das Ergebnis nicht zu verfälschen, wurde die Probenentnahme über Millipore-Spritzenfilter durchgeführt. So konnten falsch hohe Werte vermieden werden. Verglichen mit dem menschlichen Körper fehlen im durchgeführten Versuch weitere Inhaltsstoffe sowie immunologische, zytologische Komponenten und eine Dynamik durch verschiedene Transportsysteme. Des Weiteren sind hormonelle oder nervale Einflüsse zu beachten. Somit ist die Vergleichbarkeit mit extrazellulärem Medium des menschlichen Körpers sehr eingeschränkt gegeben.

4.1.2 Ergebnisse des Freisetzungsversuchs

Aus den gewonnenen Ergebnissen ist zu folgern, dass sich das Sr^{2+} aus einem Calciumphosphatzement in Wasser und Nährmedium löst.

Der Mittelwert der Freisetzungskonstanten des Wirkstoffes Sr^{2+} in α -MEM beträgt $1,91 \pm 0,96 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0,32}$ und in Wasser $1,74 \pm 0,26 \cdot 10^{-8} \text{ mol}/(\text{cm}^2\text{h})$. Vergleicht man die graphische Darstellung beider Freisetzungsversuche, zeigen sich ein linearer Zusammenhang bei dem Lösungsmittel Wasser und ein exponentieller Zusammenhang der Freisetzung in α -MEM. Die Freisetzung in Wasser ließ sich mit dem Noyes-Whitney-Modell beschreiben, wohingegen die Freisetzung in α -MEM mit dem Modell von Korsmeyer und Peppas vereinbar ist.

Der Grund für den geringeren Löslichkeitskoeffizienten für α -MEM könnte die Anreicherung von Proteinen auf der CPC-Tablette sein (Rohnke et al. 2013). Zudem stellt das eventuelle Vorhandensein eines Biofilms auf der Zementtablette eine mögliche Erniedrigung der Löslichkeit dar.

Für den nach der Formel von Korsmeyer und Peppas ermittelten Freisetzungsexponent n wurde ein durchschnittlicher Wert von $n = 0,32$ ermittelt ($k = 1,91 \cdot 10^{-7} \pm 0,96 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0,32}$). Bei einem Wert von $n = 0,5$ entspricht der Freisetzungsexponent einer reinen Fick'schen Diffusion bei dünnen Filmen, so wie sie bei unserem Versuch zu erwarten wäre. Bei einem Wert von $n < 0,45$ spiegelt dies eine Fick'sche Diffusion bei zylindrischen Formen wider (Dash et al. 2010). Somit lässt sich bei dem Freisetzungsexponenten $n = 0,32$ schlussfolgern, dass sich die Oberfläche durch ihre Porosität weder einer einfachen geometrischen Form zuordnen lässt, noch ist die Freisetzung allein durch Fick'sche Diffusion limitiert (Rohnke et al. 2017).

4.2 Diskussion des Diffusionsversuchs

4.2.1 Diskussion des Modells des Diffusionsversuchs

Im zweiten Experiment wurde die Diffusion des therapeutischen Agens Sr^{2+} in den trabekulären Knochen untersucht. Knochenschnitte der Femora von Ratten wurden in 1 mol/L Strontiumchloridlösung getaucht. Nach 10 min wurden die Schnitte aus der Lösung entnommen und mit destilliertem Wasser abgespült, um die Diffusion zu stoppen. Aus den Sr^{2+} -angereicherten Proben wurden Diffusionsprofile erstellt. Dabei konnte die Diffusion von Sr^{2+} in den trabekulären Knochen gezeigt und Diffusionskoeffizienten ermittelt werden. Dies bedeutet, dass das therapeutische Agens Sr^{2+} im Frakturspalt lokalisiert und wirksam werden kann.

Die Grundlage zur Erstellung der Diffusionsprofile boten ToF-SIMS-Messungen. Durch ToF-SIMS Messungen konnte die Diffusion und der Verbleib des therapeutischen Agens in den trabekulären Knochen gezeigt werden. Durch zeitlich aufeinanderfolgende Aufzeichnung mehrerer Diffusionsprofile mit reproduzierbaren Diffusionskoeffizienten auf einem Knochenschnitt konnte gezeigt werden, dass die Diffusion nach Ende der Eintauchzeit gestoppt wird.

Limitation

Die Stoffmenge an Sr^{2+} im trabekulären System konnte durch das angewandte Messverfahren nicht bestimmt werden. Stattdessen wurde die Zählrate an Strontium bestimmt. Dies stellt ein semiquantitatives Verfahren dar. Eine quantitative Analyse der Strontiumkonzentration ist mittels ToF-SIMS erst durch eine Kalibrierung durch Standardlösungen möglich.

Die verwendeten Rattenknochen für diesen Versuch stammen von 3 Tieren aus der osteoporotischen und 3 Tieren aus der SHAM-Gruppe. Aus statistischer Sicht betrachtet stellt dies eine an der Untergrenze liegende Gruppengröße dar. Allerdings konnte aus analytischer Perspektive eine Reproduzierbarkeit gezeigt werden.

Da Strontiumionen, aufgrund ihrer ähnlichen Struktur, ähnliche chemische Eigenschaften zu Calciumionen aufweisen, (beide Elemente befinden sich in der 2. Hauptgruppe) fungieren Sr^{2+} agonistisch zu Calciumionen. Sie können teilweise deren biologische Funktion einnehmen und in Knochen eingebaut werden. Es konnte bereits

mehrfach in Tierversuchen gezeigt werden, dass oral substituiertes Strontium in den Knochen eingebaut wird. Es kann durch Adsorption an der Oberfläche von Calciumphosphatapatit angereichert und durch Bindung der Strontiumionen an die Phosphatgruppen in die kristalline Gitterstruktur eingebaut werden (Kołodziejska et al. 2021).

Strontium aktiviert den Calcium-sensitiven Rezeptor (CaSR), ein membranständiger G-Protein gekoppelter Rezeptor, welche für die Calciumhomöostase zuständig ist. So findet man ihn beispielsweise in der Nebenschilddrüse sowie in den Nieren. Er ist allerdings auch auf der Oberfläche von Osteoblasten und Osteoklasten anzutreffen. (Hamdy 2009; Colella et al. 2016; Kołodziejska et al. 2021). Dort führt Sr^{2+} zu einer Stimulation der Osteoblasten und Inhibition der Osteoklasten (Marx et al. 2020). Thormann et al konnten bereits in *in vivo* Experimenten zeigen, dass es durch die Verwendung eines strontiumhaltigen Knochenzementes zu einer signifikant höheren Knochenneubildung im Gegensatz zur Verwendung eines Knochenzementes ohne Strontium kam (Thormann et al. 2013). Bei den in dieser Abhandlung durchgeführten *in vitro* Experimenten wird der Sr^{2+} -Transport ausschließlich durch passiven Transport (Diffusion) berücksichtigt.

4.2.2 Diskussion des Ergebnisses des Diffusionsversuchs

Es zeigten sich unterschiedliche Diffusionskoeffizienten für den gesunden und osteoporotischen Knochen. Für die Gruppe SHAM wurde ein Mittelwert von $1,39 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ (addierter Fehler: $5,69 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$, Standardabweichung: $1,69 \cdot 10^{-12}$) und für die Gruppe OVX ein Mittelwert der Diffusionskoeffizienten von $1,37 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ (addierter Fehler: $3,91 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, Standardabweichung: $9,9 \cdot 10^{-11}$) ermittelt. Somit diffundiert Sr^{2+} schneller in den trabekulären Knochen osteoporotischer Versuchstiere als in jenen gesunder Versuchstiere (Rohnke et al. 2017). Die Ergebnisse sind nach dem Behrens-Fisher Test auf dem 1%-Niveau signifikant (Bortz 1999).

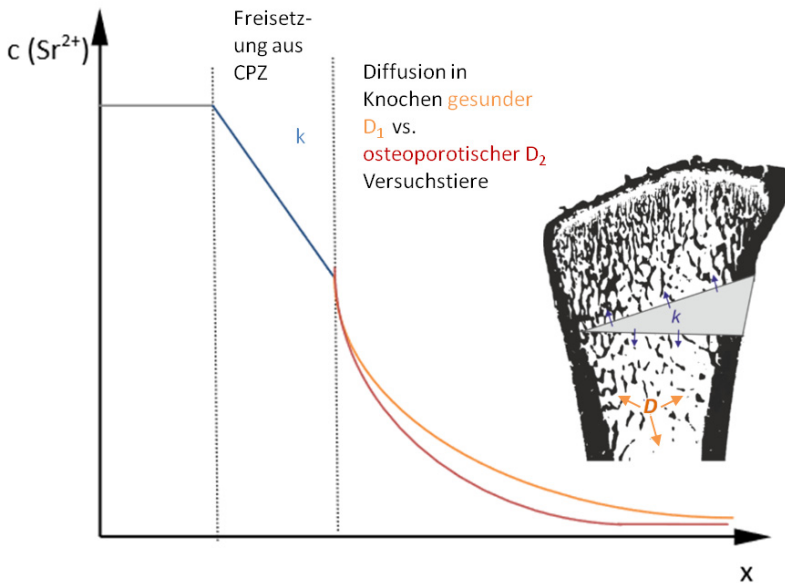


Abbildung 26: Freisetzung von Sr^{2+} und Diffusion in den Knochen: Die Abbildung zeigt die Freisetzung von Sr^{2+} aus dem CPZ (k , blau) und die anschließende Diffusion in den trabekulären Knochen gesunder (D_1 , orange) und osteoporotischer (D_2 , rot) Versuchstiere.

Die unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten lassen eine unterschiedliche Struktur des gesunden im Vergleich zum osteoporotischen Knochen vermuten.

In angefertigten Transmissionselektronenmikroskopie-(TEM-)Aufnahmen zeigte sich ein eindeutiger Unterschied im mineralisierten Bereich zwischen den beiden Knochen, osteoporotisch und gesund. Während der gesunde Knochen eine reguläre fibrilläre Struktur aufweist, zeigt der osteoporotische Knochen eine irreguläre Struktur wie etwa im Faserknochen, welchen man in Trabekellecken findet. Die TEM-Bilder liefern eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten, welche im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurden. Unterschiedliche Struktur – unterschiedliche Diffusionskoeffizienten. Die Diffusion scheint durch Verwebung und Canaliculi vereinfacht. Unterschiede in Kollagenstrukturen zwischen gesunden und osteoporotischen Rattenknochen zeigten auch Kafantari et al. (Kafantari et al. 2000). In ihrer Arbeit konnte eine Unordnung der Kollagenfibrillen bei ovariectomierten Ratten

im Gegensatz zu den Gesunden gezeigt werden. Ebenso sind die Kollagenfibrillen ovarektomierter Ratten signifikant kürzer (Kafantari et al. 2000).

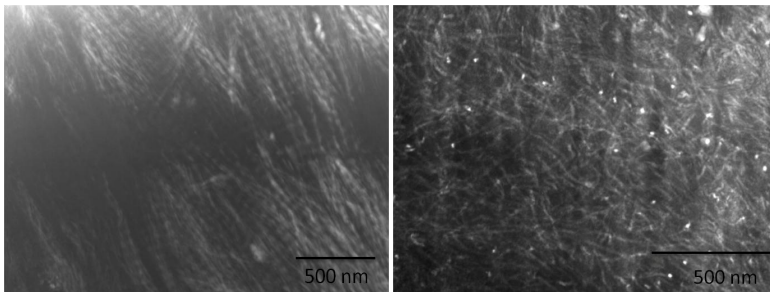


Abbildung 27: TEM-Aufnahmen: Die Abbildung zeigt TEM-Aufnahmen des gesunden (a) und osteoporotischen (b) Knochens.

Durch Arbeiten von Ferretti et al. sowie Yoon et al. konnte belegt werden, dass der Verlust an Knochen nach Ovariectomie im trabekulären Knochen nicht jenem im kortikalen Knochen entspricht (Ferretti et al. 2010; Yoon et al. 2012). Ferretti et al. zeigten, dass die Knochenmasse früher und stärker im trabekulären Knochen abnimmt als im kortikalen Knochen.

Anders an die in dieser Arbeit berechneten unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten zwischen gesundem und osteoporotischem trabekulärem Knochen wiesen Kern et al. nach, dass der Diffusionskoeffizient für Sr^{2+} im gesunden kortikalen Knochen nur gering von jenem im osteoporotischen kortikalen Knochen abweicht (Kern et al. 2019).

Eine geringere Veränderung der Knochenmasse im kortikalen Knochen im Vergleich zum trabekulären Knochen nach Ovariectomie könnte die Ursache der deutlich unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten im trabekulären (osteoporotisch vs. gesund) im Gegensatz zu kaum unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten im kortikalen Knochen (osteoporotisch vs. gesund) sein.

Bone remodeling von kortikalem Knochen geschieht in der Kortikalis deutlich langsamer als in der Spongiosa (Meunier 1985). Dies stellt einen bei Osteoporose typischen Befund dar und liefert die Erklärung zu von Kern et al. erbrachten Ergebnissen.

4.2.3 Einordnung und Ausblick

Mit Hilfe der Ergebnisse kann eine kontinuierliche Freisetzung des therapeutischen Agens Sr^{2+} angenommen werden. Dies führt zu einer direkten und maximalen Strontiumkonzentration am gewünschten Wirkstoffort – dem Frakturspalt osteoporotischer Knochen. Der lokale Einsatz des therapeutischen Agens führt zu einer geringeren systemischen Konzentration und somit voraussichtlich geringeren Nebenwirkungen.

Weitere Studien sind notwendig, um die Komplexität der Mobilität des therapeutischen Agens Sr^{2+} im Knochen genauer zu beschreiben und weitere Einflüsse wie nervale und hormonelle Einflüsse und die Vaskularisierung zu berücksichtigen. Ebenso interessant ist die Betrachtung von lokaler, zellulärer Aufnahme oder Adsorption an umliegende Strukturen von Sr^{2+} *in vivo*.

Die Ratte ist das am häufigsten verwendete Versuchstier in der Osteoporoseforschung. Die vorliegende Arbeit könnte einen Schritt dazu beitragen, Versuche an diesen Tieren zu reduzieren. Mit Hilfe des ermittelten Diffusionskoeffizienten konnte bereits die Ausbreitung von Sr^{2+} im Knochen in einem 2D-Modell simuliert werden. Nach Erhebung weiterer Messdaten wäre eine 3D-Modell-Simulationen denkbar. Ebenso könnte die Ausbreitung anderer therapeutischer Agenzien bzw. Wirkstoffe simuliert werden. Somit könnte die Zahl an Tierversuchen reduziert werden. Die Arbeit hat somit einen wichtigen Beitrag zur Umsetzung des 3R-Prinzips nach Russell und Burch geleistet. Das 3 R Prinzip (*Replacement, Reduction, Refinement*) beabsichtigt Ersatzmethoden für Tierversuche zu etablieren, die Anzahl von eingesetzten Versuchstieren zu reduzieren sowie das Leiden der Tiere zu minimieren. Dieses Prinzip wurde 2010 in der Europäischen Richtlinie verankert (3R Prinzip - BfR 2021).

5. Zusammenfassung

Die angefertigte Abhandlung besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Teilversuchen zur Mobilität des therapeutischen Agens Sr^{2+} aus Knochenersatzmaterial (Calciumphosphatzement) in den trabekulären Knochen gesunder vs. osteoporotischer Rattenfemora. Die Verwendung von Knochenersatzmaterial bei Osteoporose nimmt in unserer alternden Gesellschaft eine stetig größer werdende Rolle ein.

Für die Freisetzung des Wirkstoffes Sr^{2+} in Nährmedium konnte anhand des Modells von Korsmeyer und Peppas eine Freisetzungskonstante von $1,91 \pm 0,96 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0,32}$ (addierter Fehler: $0,69 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0,32}$) ermittelt werden. Die darauffolgende Diffusion von Sr^{2+} in den trabekulären Knochen konnte mittelsToF-SIMS aufgezeichnet werden. Es ergab sich ein Diffusionskoeffizient im osteoporotischen Knochen von $1,37 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ (addierter Fehler: $3,91 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, Standardabweichung: $9,9 \cdot 10^{-11}$) und gesunden von $1,39 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ (addierter Fehler: $5,69 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$, Standardabweichung: $1,69 \cdot 10^{-12}$). Somit zeigte sich eine schnellere Diffusion von Sr^{2+} in den osteoporotischen Knochen im Vergleich zum Gesunden (Rohnke et al. 2017). Diese Ergebnisse korrelieren mit TEM-Messungen. Hier zeigte sich im osteoporotischen Knochen eine ungeordnetere Struktur mit kürzeren Kollagenfibrillen, wodurch eine schnellere Diffusion erklärbar ist. Kern et al. konnten für die Diffusion im kortikalen Knochen keinen signifikanten Unterschied vom osteoporotischen gegenüber dem gesunden Knochen feststellen (Kern et al. 2019). Yoon et al zeigten, dass OVX keinen signifikanten Einfluss auf die Knochendichte im kortikalen Knochen hat, im Trabekelsystem allerdings schon (Yoon et al. 2012). Auch diese Erkenntnisse unterstreichen die Ergebnisse der hier dargelegten Arbeit.

Für die Zukunft bleiben weitere Versuche zur Komplexität des Knochens und dessen Wirkstoffausbreitung wünschenswert - hoffentlich mit einer Verringerung von Tierversuchen durch den Beitrag dieser Arbeit. Insbesondere könnten durch ermittelte Diffusionskoeffizienten Simulationen zur Mobilität von therapeutischen Agenzien erstellt werden und somit Versuche *in vivo*, gemäß des 3R Prinzips von Russel und Burch, eingegrenzt werden.

6. Summary

This work consists of two consecutive partial experiments on the mobility of the active substance Sr^{2+} from bone replacement material (CPC) into the trabecular bone of healthy vs. osteoporotic femora of rats. The use of bone replacement material in osteoporosis is becoming increasingly important in our ageing society.

A rate constant of $1.91 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0.32}$ (added error: $0.69 \cdot 10^{-7} \text{ mol/cm}^2/\text{h}^{0.32}$) was determined for the release of the active substance Sr^{2+} in nutrient medium using the model of Korsmeyer and Peppas. The subsequent diffusion of Sr^{2+} into the trabecular bone could be recorded using ToF-SIMS. A diffusion coefficient in osteoporotic bone of $1.37 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$ (added error: $3.91 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2/\text{s}$, standard deviation: $9.9 \cdot 10^{-11}$) and healthy bone of $1.39 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ (added error: $5.69 \cdot 10^{-13} \text{ cm}^2/\text{s}$, standard deviation: $1.69 \cdot 10^{-12}$) was obtained. Thus, a faster diffusion of Sr^{2+} into osteoporotic bone was observed compared to healthy bone (Rohnke et al. 2017). These results correlate with TEM measurements. The osteoporotic bone showed a more disordered structure with shorter collagen fibrils. Kern et al. could not find a significant difference in diffusion in cortical bone between osteoporotic and healthy bone (Kern et al. 2019). Yoon et al. showed that OVX has no significant influence on bone density in cortical bone. In the trabecular system, however, OVX does (Yoon et al. 2012). These statements also underline the results of the work presented here. Further experiments on the complexity of the bone and the spread of the active agent will be carried out in the future - hopefully with a decrease of animal experiments by the contribution of this work. The determined diffusion coefficients could be used to create simulations for the mobility of therapeutic agents and thus downsize tests in vivo according to the 3R principle of Russel and Burch.

7. Abbildungs-, Abkürzungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abkürzungsverzeichnis

BMP	bone morphogenetic proteins
BMD	bone mineral density
CaSR	calciumsensitiver Rezeptor
CPZ	Calciumphosphatzement
DXA	dual-energy X-ray absorptiometry
FGF23	Fibroblast growth factor 23
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
IGFs	Insulin-like growth factors
IM	Immobilisation
LMIG	liquid metal ion gun
MRT	Magnetresonanztomographie
α -MEM	minimum essential medium
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie
pH	potentia hydrogenii
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF- β	Transforming growth factor β
ToF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Knochens.....	4
Abbildung 2: Reaktion 0. und 1. Ordnung sowie Freisetzungskinetiken verschiedener komplexer Modelle.....	11
Abbildung 3: 2. Fick'sches Gesetz.....	19
Abbildung 4: Versuchsaufbau	21
Abbildung 5: Tiermodell OVX	27
Abbildung 6: Tiermodell SHAM.....	27
Abbildung 7 : Eindiffusion von Sr^{2+}	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung zur Emission von Sekundärionen:	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung der ToF-SIMS	31
Abbildung 10: Massenspektrum (m/z) 0 bis 100	32
Abbildung 11: Massenspektrum (m/z) 86 bis 89	33
Abbildung 12: Sr^+ -Massenbild	34
Abbildung 13: Tiefenprofil.....	35
Abbildung 14: 3D-Rekonstruktionen aus Tiefenprofilen.....	36
Abbildung 15: Freigesetzte Flächenkonzentration Sr^{2+} in Wasser und Nährmedium....	41
Abbildung 16: Freisetzungskinetik in Wasser.....	42
Abbildung 17: Freisetzungskinetik in Nährmedium	43
Abbildung 18: Massenbilder	45
Abbildung 19: Auswahl eines Trabekels im Massenbild	46
Abbildung 20: 3D-Rekonstruktion von Tiefenprofilen.....	47
Abbildung 21: 3D-Rekonstruktionen im trabekulären System	47
Abbildung 22: Diffusion im trabekulären Knochen gesunder und osteoporotischer Ratten im Vergleich.....	50
Abbildung 23: Ermittlung des Diffusionskoeffizienten im Knochen gesunder Ratten..	52
Abbildung 24: Ermittlung des Diffusionskoeffizienten im Knochen osteoporotischer Ratten.....	53
Abbildung 25: Boxplot	55
Abbildung 26: Freisetzung von Sr^{2+} und Diffusion in den Knochen	61
Abbildung 27: TEM-Aufnahmen	62

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Exponent n der Korsmeyer-Peppas-Gleichung	16
Tabelle 2: Zusammensetzung der Zementprobe.....	20
Tabelle 3: Zusammensetzung des Nährmediums	23
Tabelle 4: Erhaltene Werte für die Freisetzungskonstante in Wasser	44
Tabelle 5: Erhaltene Werte für die Freisetzungskonstante in α -MEM.....	44
Tabelle 6: Diffusionskoeffizienten	54

8. Literaturverzeichnis

3R Prinzip - BfR (2021). Online verfügbar unter https://www.bfr.bund.de/de/3r_prinzip-193970.html, zuletzt aktualisiert am 21.02.2021, zuletzt geprüft am 21.02.2021.

Augat, Peter; Simon, Ulrich; Liedert, Astrid; Claes, Lutz (2005): Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 16 Suppl 2, S36-43. DOI: 10.1007/s00198-004-1728-9.

Aw, Moom Sinn; Khalid, Kamarul A.; Gulati, Karan; Atkins, Gerald J.; Pivonka, Peter; Findlay, David M.; Losic, Dusan (2012): Characterization of drug-release kinetics in trabecular bone from titania nanotube implants. In: *International journal of nanomedicine* 7, S. 4883–4892. DOI: 10.2147/IJN.S33655.

Bajammal, Sohail S.; Zlowodzki, Michael; Lelwica, Amy; Tornetta, Paul; Einhorn, Thomas A.; Buckley, Richard et al. (2008): The use of calcium phosphate bone cement in fracture treatment. A meta-analysis of randomized trials. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 90 (6), S. 1186–1196. DOI: 10.2106/JBJS.G.00241.

Baroli, Biancamaria (2009): From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics. Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 98 (4), S. 1317–1375. DOI: 10.1002/jps.21528.

Bellido, Teresita; Plotkin, Lilian I.; Bruzzaniti, Angela (2013): Bone Cells. In: David B. Burr und Matthew R. Allen (Hg.): *Basic and Applied Bone Biology*. Burlington: Elsevier Science, S. 27–45.

Bortz, Jürgen (1999): *Statistik für Sozialwissenschaftler*. 5., vollst. überarb. und aktualisierte Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).

Bose, Susmita; Fielding, Gary; Tarafder, Solaiman; Bandyopadhyay, Amit (2013): Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate

ceramics. In: *Trends in biotechnology* 31 (10), S. 594–605. DOI: 10.1016/j.tibtech.2013.06.005.

Boskey, A. L.; Coleman, R. (2010): Aging and bone. In: *Journal of Dental Research* 89 (12), S. 1333–1348. DOI: 10.1177/0022034510377791.

Boudin, Eveline; van Hul, Wim (2017): MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY. Genetics of human bone formation. In: *European journal of endocrinology* 177 (2), R69–R83. DOI: 10.1530/EJE-16-0990.

Bruschi, Marcos Luciano (2015): Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems. Burlington: Elsevier Science (Woodhead Publishing series in biomedicine, number 85). Online verfügbar unter <http://gbv.ebilib.com/patron/FullRecord.aspx?p=2071158>.

Canpolat, S.; Tug, N.; Seyran, A. D.; Kumru, S.; Yilmaz, B. (2010): Effects of raloxifene and estradiol on bone turnover parameters in intact and ovariectomized rats. In: *Journal of physiology and biochemistry* 66 (1), S. 23–28. DOI: 10.1007/s13105-010-0008-8.

Caprioli, Richard M. (2015): Imaging mass spectrometry. Enabling a new age of discovery in biology and medicine through molecular microscopy. In: *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 26 (6), S. 850–852. DOI: 10.1007/s13361-015-1108-z.

Cheung, Wing Hoi; Miclau, Theodore; Chow, Simon Kwoon-Ho; Yang, Frank F.; Alt, Volker (2016): Fracture healing in osteoporotic bone. In: *Injury* 47, S21–S26. DOI: 10.1016/S0020-1383(16)47004-X.

Colella, Matilde; Gerbino, Andrea; Hofer, Aldebaran M.; Curci, Silvana (2016): Recent advances in understanding the extracellular calcium-sensing receptor. In: *F1000Research* 5. DOI: 10.12688/f1000research.8963.1.

Consensus development conference. Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis (1993). In: *The American journal of medicine* 94 (6), S. 646–650.

Crank, John (1976): The mathematics of diffusion. 2. ed., reprint. Oxford: Clarendon Press.

Crockett, Julie C.; Rogers, Michael J.; Coxon, Fraser P.; Hocking, Lynne J.; Helfrich, Miep H. (2011): Bone remodelling at a glance. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 7), S. 991–998. DOI: 10.1242/jcs.063032.

Dash, Suvakanta; Murthy, Padala Narasimha; Nath, Lilakanta; Chowdhury, Prasanta (2010): Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. In: *Acta poloniae pharmaceutica* 67 (3), S. 217–223.

Dorozhkin, Sergey V. (2010): Bioceramics of calcium orthophosphates. In: *Biomaterials* 31 (7), S. 1465–1485. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.050.

Drake, Richard L.; Gray, Henry (2014): Gray's atlas of anatomy. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone.

Ducheyne, P.; Qiu, Q. (1999): Bioactive ceramics. The effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. In: *Biomaterials* 20 (23-24), S. 2287–2303.

Ekeland, Arne; Engesæter, Lars B.; Langeland, Norvald (2009): Influence of Age on Mechanical Properties of Healing Fractures and Intact Bones in Rats. In: *Acta Orthopaedica Scandinavica* 53 (4), S. 527–534. DOI: 10.3109/17453678208992252.

Ferretti, Marzia; Bertoni, Laura; Cavani, Francesco; Zavatti, Manuela; Resca, Elisa; Carnevale, Gianluca et al. (2010): Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. II. Role in recovering osteoporosis. In: *Journal of anatomy* 217 (1), S. 48–56. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2010.01242.x.

Frost, H. M. (1990): Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU). 2. Redefining Wolff's law: the remodeling problem. In: *The Anatomical record* 226 (4), S. 414–422. DOI: 10.1002/ar.1092260403.

Frost, H. M.; Jee, W.S.S. (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. In: *Bone and Mineral* 18 (3), S. 227–236. DOI: 10.1016/0169-6009(92)90809-R.

Giers, Morgan B.; McLaren, Alex C.; Schmidt, Kenneth J.; Caplan, Michael R.; McLemore, Ryan (2014): Distribution of molecules locally delivered from bone cement. In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 102 (4), S. 806–814. DOI: 10.1002/jbm.b.33062.

Hadjidakis, Dimitrios J.; Androulakis, Ioannis I. (2006): Bone remodeling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1092, S. 385–396. DOI: 10.1196/annals.1365.035.

Hamdy, Neveen A. T. (2009): Strontium ranelate improves bone microarchitecture in osteoporosis. In: *Rheumatology (Oxford, England)* 48 Suppl 4, iv9-13. DOI: 10.1093/rheumatology/kep274.

Harrison, Caroline J.; Hatton, Paul V.; Gentile, Piergiorgio; Miller, Cheryl A. (2021): Nanoscale Strontium-Substituted Hydroxyapatite Pastes and Gels for Bone Tissue Regeneration. In: *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 11 (6). DOI: 10.3390/nano11061611.

Hegde, V.; Jo, J. E.; Andreopoulou, P.; Lane, J. M. (2016): Effect of osteoporosis medications on fracture healing. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 27 (3), S. 861–871. DOI: 10.1007/s00198-015-3331-7.

Henss, Anja; Hild, Anne; Rohnke, Marcus; Wenisch, Sabine; Janek, Juergen (2015): Time of flight secondary ion mass spectrometry of bone-Impact of sample preparation and measurement conditions. In: *Biointerphases* 11 (2), 02A302. DOI: 10.1116/1.4928211.

Hernlund, E.; Svedbom, A.; Ivergård, M.; Compston, J.; Cooper, C.; Stenmark, J. et al. (2013): Osteoporosis in the European Union. Medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). In: *Archives of osteoporosis* 8, S. 136. DOI: 10.1007/s11657-013-0136-1.

Higuchi, T. (1961): Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 50, S. 874–875. DOI: 10.1002/jps.2600501018.

Higuchi, T. (1963): Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 52 (12), S. 1145–1149. DOI: 10.1002/jps.2600521210.

Hixson, A. W.; Crowell, J. H. (1931): Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation. In: *Ind. Eng. Chem.* 23 (8), S. 923–931. DOI: 10.1021/ie50260a018.

Huch, Renate; Jürgens, Klaus Dieter (2019): Mensch, Körper, Krankheit. Anatomie, Physiologie, Krankheitsbilder. 8. Auflage.

IONTOF (2019): IONTOF - TOF-SIMS (time of flight secondary ion mass spectrometry) - LEIS (low energy ion scattering). Ion beam technology products for surface spectrometry, surface analysis, depth profiling, surface imaging, 3D analysis, retrospective analysis. <https://www.iontof.com>. Online verfügbar unter <https://www.iontof.com/>, zuletzt aktualisiert am 30.10.2019, zuletzt geprüft am 05.12.2019.

Jee, W. S.; Yao, W. (2001): Overview. Animal models of osteopenia and osteoporosis. In: *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 1 (3), S. 193–207.

Kafantari, H.; Kounadi, E.; Fatouros, M.; Milonakis, M.; Tzaphlidou, M. (2000): Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. In: *Bone* 26 (4), S. 349–353. DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00279-3.

Kawai, T.; Murakami, S.; Hiranuma, H.; Sakuda, M. (1997): Radiographic changes during bone healing after mandibular fractures. In: *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 35 (5), S. 312–318. DOI: 10.1016/S0266-4356(97)90402-2.

Kern, Christine; Quade, Mandy; Ray, Seemun; Thomas, Jürgen; Schumacher, Matthias; Gemming, Thomas et al. (2019): Investigation of strontium transport and strontium quantification in cortical rat bone by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. In: *Journal of the Royal Society, Interface* 16 (151), S. 20180638. DOI: 10.1098/rsif.2018.0638.

Kołodziejaska, Barbara; Stępień, Natalia; Kolmas, Joanna (2021): The Influence of Strontium on Bone Tissue Metabolism and Its Application in Osteoporosis Treatment. In: *IJMS* 22 (12), S. 6564. DOI: 10.3390/ijms22126564.

Komori, Toshihisa (2015): Animal models for osteoporosis. In: *European journal of pharmacology* 759, S. 287–294. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.03.028.

Korsmeyer, Richard W.; Gurny, Robert; Doelker, Eric; Buri, Pierre; Peppas, Nikolaos A. (1983): Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. In: *International Journal of Pharmaceutics* 15 (1), S. 25–35. DOI: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.

Kruppke, Benjamin; Ray, Seemun; Alt, Volker; Rohnke, Marcus; Kern, Christine; Kampschulte, Marian et al. (2020): Gelatin-Modified Calcium/Strontium Hydrogen Phosphates Stimulate Bone Regeneration in Osteoblast/Osteoclast Co-Culture and in Osteoporotic Rat Femur Defects-In Vitro to In Vivo Translation. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (21). DOI: 10.3390/molecules25215103.

Kubo, T.; Shiga, T.; Hashimoto, J.; Yoshioka, M.; Honjo, H.; Urabe, M. et al. (1999): Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. In: *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 68 (5-6), S. 197–202.

Kular, Jasreen; Tickner, Jennifer; Chim, Shek Man; Xu, Jiake (2012): An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. In: *Clinical biochemistry* 45 (12), S. 863–873. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021.

Lee, Soo-Hong; Shin, Heungsoo (2007a): Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. In: *Advanced drug delivery reviews* 59 (4-5), S. 339–359. DOI: 10.1016/j.addr.2007.03.016.

Lee, Soo-Hong; Shin, Heungsoo (2007b): Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. In: *Advanced drug delivery reviews* 59 (4-5), S. 339–359. DOI: 10.1016/j.addr.2007.03.016.

Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.: Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der OSTEOPOROSE.

Lippold, Bernhard C.; Müller-Goymann, Christel; Schubert, Rolf (2017): Pharmazeutische Technologie. Mit Einführung in Biopharmazie und Biotechnologie. Unter Mitarbeit von Jörg Breitzkreutz, Frauke Gaedcke, Heinz Schilcher, Harald G.

Schweim, Janna K. Schweim, Wolfgang Süß und Nora Anne Urbanetz. 10., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Online verfügbar unter <https://elibrary.hirzel.de/textbook/99.105015/9783804734821>.

Löfgren, H.; Johansson, V.; Olsson, T.; Ryd, L.; Levander, B. (2000): Rigid fusion after cloward operation for cervical disc disease using autograft, allograft, or xenograft. A randomized study with radiostereometric and clinical follow-up assessment. In: *Spine* 25 (15), S. 1908–1916.

Lüllmann-Rauch, Renate (2015): Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Malekjani, Narjes; Jafari, Seid Mahdi (2021): Modeling the release of food bioactive ingredients from carriers/nanocarriers by the empirical, semiempirical, and mechanistic models. In: *Comprehensive reviews in food science and food safety* 20 (1), S. 3–47. DOI: 10.1111/1541-4337.12660.

Mani-Varnosfaderani, Ahmad; Jamshidi, Mahbobeh; Yeganeh, Ali; Mahmoudi, Mani (2016): Concentration profiling of minerals in iliac crest bone tissue of opium addicted humans using inductively coupled plasma and discriminant analysis techniques. In: *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 120, S. 92–99. DOI: 10.1016/j.jpba.2015.12.005.

Marie, P. J.; Hott, M.; Modrowski, D.; Pollak, C. de; Guillemain, J.; Deloffre, P.; Tsouderos, Y. (1993): An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 8 (5), S. 607–615. DOI: 10.1002/jbmr.5650080512.

Marx, Daniella; Rahimnejad Yazdi, Alireza; Papini, Marcello; Towler, Mark (2020): A review of the latest insights into the mechanism of action of strontium in bone. In: *Bone Reports* 12, S. 100273. DOI: 10.1016/j.bonr.2020.100273.

Meunier, P. J. (1985): L'ostéoporose-maladie chez la femme ménopausée. Physiopathologie et incidences thérapeutiques. In: *Revue française de gynécologie et d'obstétrique* 80 (4), S. 205–207.

Meunier, Pierre J.; Roux, Christian; Seeman, Ego; Ortolani, Sergio; Badurski, Janusz E.; Spector, Tim D. et al. (2004): The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. In: *The New England journal of medicine* 350 (5), S. 459–468. DOI: 10.1056/NEJMoa022436.

Noyes, Arthur A.; Whitney, Willis R. (1897): THE RATE OF SOLUTION OF SOLID SUBSTANCES IN THEIR OWN SOLUTIONS. In: *J. Am. Chem. Soc.* 19 (12), S. 930–934. DOI: 10.1021/ja02086a003.

Omi, N.; Ezawa, I. (1995): The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. In: *Bone* 17 (4 Suppl), 163S–168S.

Parent, Marianne; Baradari, Hiva; Champion, Eric; Damia, Chantal; Viana-Trecant, Marylène (2017): Design of calcium phosphate ceramics for drug delivery applications in bone diseases. A review of the parameters affecting the loading and release of the therapeutic substance. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 252, S. 1–17. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.02.012.

Pietschmann, P.; Peterlik, M. (1999): Pathophysiologie und Therapie der Osteoporose. In: *Der Radiologe* 39 (3), S. 228–234.

Robinson, Joseph R.; Lee, Vincent H. L. (Hg.) (1987): Controlled Drug Delivery. Fundamentals and applications. 2. ed., rev. and exp. New York: Dekker (Drugs and the pharmaceutical sciences, 29).

Rohnke, Marcus; Henss, Anja; Kokesch-Himmelreich, Julia; Schumacher, Matthias; Ray, Seemun; Alt, Volker et al. (2013): Mass spectrometric monitoring of Sr-enriched bone cements--from in vitro to in vivo. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 405 (27), S. 8769–8780. DOI: 10.1007/s00216-013-7329-8.

Rohnke, Marcus; Pfitzenreuter, Stefanie; Mogwitz, Boris; Henß, Anja; Thomas, Jürgen; Bieberstein, Dina et al. (2017): Strontium release from Sr²⁺-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 262, S. 159–169. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.07.036.

Rupp, Markus; Merboth, Felix; Daghma, Diaa Eldin; Biehl, Christoph; El Khassawna, Thaqif; Heiß, Christian (2018): Osteozyten. In: *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. DOI: 10.1055/a-0658-5922.

Sachs, Lothar (1999): *Angewandte Statistik. Anwendung statistischer Methoden*. Neunte, überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-05750-6>.

Saint-Jean, S. Jegou; Camiré, C. L.; Nevsten, P.; Hansen, S.; Ginebra, M. P. (2005): Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted alpha-TCP cements. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 16 (11), S. 993–1001. DOI: 10.1007/s10856-005-4754-z.

Schumacher, M.; Henß, A.; Rohnke, M.; Gelinsky, M. (2013): A novel and easy-to-prepare strontium(II) modified calcium phosphate bone cement with enhanced mechanical properties. In: *Acta biomaterialia* 9 (7), S. 7536–7544. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.03.014.

Schwabe, Ulrich; Paffrath, Dieter; Ludwig, Wolf-Dieter; Klauber, Jürgen (2017): *Arzneiverordnungs-Report 2017*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=5113054>.

Servier Deutschland GmbH vom 13.05.2013: Rote-Hand-Brief und Anhang zu Protelos® (Strontiumranelat).

SHORR, E.; CARTER, A. C. (1952): The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man. In: *Bulletin of the Hospital for Joint Diseases* 13 (1), S. 59–66.

Teilprojekt M5 (2017). Online verfügbar unter https://www.uni-giessen.de/fbz/fb11/forschung/schwerpunkte/sfb/trr79/teilprojekte/material/projekt_m5, zuletzt aktualisiert am 24.10.2017, zuletzt geprüft am 05.12.2019.

Thompson, D. D.; Simmons, H. A.; Pirie, C. M.; Ke, H. Z. (1995): FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. In: *Bone* 17 (4 Suppl), 125S-133S.

Thormann, Ulrich; Ray, Seemun; Sommer, Ursula; Elkhassawna, Thaqif; Rehling, Tanja; Hundgeburth, Marvin et al. (2013): Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Biomaterials* 34 (34), S. 8589–8598. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.036.

Vickerman, John C.; Briggs, David (Hg.) (2013): ToF-SIMS. Materials analysis by mass spectrometry. 2nd edition. Manchester, Chichester, West Sussex: SurfaceSpectra Limited; imp IM Publications.

Yoon, Kyung-Hyuk; Cho, Dae-Chul; Yu, Song-Hee; Kim, Kyoung-Tae; Jeon, Younghoon; Sung, Joo-Kyung (2012): The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats. Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. In: *Journal of Korean Neurosurgical Society* 51 (6), S. 323–327. DOI: 10.3340/jkns.2012.51.6.323.

9. Anhang

Test auf Varianzgleichheit

Aus den Diffusionskoeffizienten wurden zunächst die Mittelwerte der beiden Gruppen bestimmt. Der Mittelwert der Diffusionskoeffizienten der osteoporotischen Gruppe beträgt $1,37 \cdot 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$. Für die gesunde Gruppe ließ sich ein Mittelwert von $1,39 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$ ermitteln.

Die Mittelwerte werden benötigt, um die Varianz zu errechnen.

D _{osteoporotisch} in cm^2/s	D _{gesund} in cm^2/s
$(2,44 \pm 0,06) \cdot 10^{-10}$	$(9,83 \pm 0,24) \cdot 10^{-14}$
$(1,42 \pm 0,03) \cdot 10^{-11}$	$(6,78 \pm 0,31) \cdot 10^{-13}$
$(1,01 \pm 0,06) \cdot 10^{-10}$	$(2,83 \pm 0,16) \cdot 10^{-12}$
$(2,09 \pm 0,06) \cdot 10^{-10}$	$(4,50 \pm 0,28) \cdot 10^{-12}$
$(1,37 \pm 0,08) \cdot 10^{-11}$	$(2,21 \pm 0,20) \cdot 10^{-14}$
$(2,40 \pm 0,20) \cdot 10^{-10}$	$(2,22 \pm 0,94) \cdot 10^{-13}$

Die Tabelle zeigt die Diffusionskoeffizienten (D) der osteoporotischen (links) sowie der gesunden Gruppe (rechts).

Berechnung des Arithmetischen Mittels:

$$AM = \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

OVX:

$$\begin{aligned} \bar{x} &= \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{2,44 \cdot 10^{-10} + 1,42 \cdot 10^{-11} + 1,01 \cdot 10^{-10} + 2,09 \cdot 10^{-10} + 1,37 \cdot 10^{-11} + 2,40 \cdot 10^{-10}}{6} \\ &= 1,37 \cdot 10^{-10} \end{aligned}$$

SHAM:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{9,83 \cdot 10^{-14} + 6,78 \cdot 10^{-13} + 2,83 \cdot 10^{-12} + 4,5 \cdot 10^{-12} + 2,21 \cdot 10^{-14} + 2,22 \cdot 10^{-13}}{6} \\ = 1,39 \cdot 10^{-12}$$

Berechnung der Varianz für die OVX Gruppe

Für die OVX-Gruppe ergibt sich:

Arithmetisches Mittel (OVX) = $\bar{x} = 1,37 \cdot 10^{-10}$

D _{OVX}	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
$2,44 \cdot 10^{-10}$	$1,07 \cdot 10^{-10}$	$1,14 \cdot 10^{-20}$
$1,42 \cdot 10^{-11}$	$1,23 \cdot 10^{-10}$	$1,51 \cdot 10^{-20}$
$1,01 \cdot 10^{-10}$	$3,6 \cdot 10^{-11}$	$1,29 \cdot 10^{-21}$
$2,09 \cdot 10^{-10}$	$7,2 \cdot 10^{-11}$	$5,18 \cdot 10^{-21}$
$1,37 \cdot 10^{-11}$	$1,23 \cdot 10^{-10}$	$1,52 \cdot 10^{-20}$
$2,40 \cdot 10^{-10}$	$1,03 \cdot 10^{-10}$	$1,06 \cdot 10^{-20}$
		$\Sigma = 5,88 \cdot 10^{-20}$

Rechenschritte für die Berechnung der Varianz der OVX-Gruppe

$$s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} = \frac{5,88 \cdot 10^{-20}}{6} = 9,8 \cdot 10^{-21}$$

Die Varianz der OVX-Gruppe beträgt $9,8 \cdot 10^{-21}$.

Berechnung der Varianz für die SHAM Gruppe

Für die SHAM-Gruppe ergab sich:

Arithmetisches Mittel (SHAM) = $\bar{x} = 1,39 \cdot 10^{-12}$

D_{SHAM}	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
$9,83 \cdot 10^{-14}$	$1,29 \cdot 10^{-12}$	$1,67 \cdot 10^{-24}$
$6,78 \cdot 10^{-13}$	$7,12 \cdot 10^{-13}$	$5,07 \cdot 10^{-25}$
$2,83 \cdot 10^{-12}$	$1,44 \cdot 10^{-12}$	$2,07 \cdot 10^{-24}$
$4,5 \cdot 10^{-12}$	$3,11 \cdot 10^{-12}$	$9,67 \cdot 10^{-24}$
$2,2 \cdot 10^{-14}$	$1,37 \cdot 10^{-12}$	$1,87 \cdot 10^{-24}$
$2,2 \cdot 10^{-13}$	$1,17 \cdot 10^{-12}$	$1,37 \cdot 10^{-24}$
		$\Sigma = 1,72 \cdot 10^{-23}$

Rechenschritte für die Berechnung der Varianz der SHAM-Gruppe

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} = \frac{1,72 \cdot 10^{-23}}{6} = 2,86 \cdot 10^{-24}$$

Die Varianz der SHAM-Gruppe beträgt $2,86 \cdot 10^{-24}$

$$n_{\text{OVX}} = 6$$

$$\bar{x}_{\text{OVX}} = 1,37 \cdot 10^{-10}$$

$$s^2_{\text{OVX}} = 9,8 \cdot 10^{-21}$$

$$s_{\text{OVX}} = 9,9 \cdot 10^{-11}$$

$$n_{\text{SHAM}} = 6$$

$$\bar{x}_{\text{SHAM}} = 1,39 \cdot 10^{-12}$$

$$s^2_{\text{SHAM}} = 2,86 \cdot 10^{-24}$$

$$s_{\text{SHAM}} = 1,69 \cdot 10^{-12}$$

Test auf Varianzengleichheit: Vergleich zweier Stichprobenvarianzen (F-Test)

Die beiden Stichprobenvarianzen $s_{OVX}^2 = 9,8 \cdot 10^{-21}$ und $s_{SHAM}^2 = 2,86 \cdot 10^{-24}$ werden miteinander verglichen. (Bortz 1999)

Durch den indizierten F-Test wird die Nullhypothese überprüft.

$$H_0: \sigma_{OVX}^2 = \sigma_{SHAM}^2$$

H0 besagt, dass die beiden Stichprobengruppen, OVX und SHAM, aus Grundgesamtheiten gleicher Varianzen entnommen wurden. Eventuelle Varianzunterschiede wären somit nur aufgrund der Stichprobenauswahl vorhanden.

$$H_1: \sigma_{OVX}^2 \neq \sigma_{SHAM}^2$$

H1 besagt, dass die Stichproben der beiden Gruppen OVX und SHAM aus Grundgesamtheiten ungleicher Varianzen entnommen wurden.

H0 wurde erfüllt, wenn auf dem α -Niveau = 0,05 erwiesen ist, dass

$$F_\alpha > \frac{s_{OVX2}}{s_{SHAM2}}. \text{ Es besteht Varianzengleichheit.}$$

$$\text{Bei } F_\alpha < \frac{s_{OVX2}}{s_{SHAM2}} \text{ gilt H1 und somit keine Varianzengleichheit.}$$

F_α beträgt 6,26 auf dem 5%-Signifikanzniveau.

$$F = \frac{s_{OVX2}}{s_{SHAM2}} = \frac{9,8 \cdot 10^{-21}}{2,86 \cdot 10^{-24}} = 3426$$

$$F_\alpha < \frac{s_{OVX2}}{s_{SHAM2}}$$

Es liegen heterogene Varianzen zwischen den beiden Stichprobengruppen vor.

H1 ist erfüllt und H0 abgewiesen.

Es ergeben sich ungleiche Varianzen. Der T-Test ist somit nicht möglich.

Das Behrens-Fisher-Problem beschreibt den T-Test bei heterogenen Varianzen.

Behrens-Fisher-Test

Der nachfolgende Signifikanzvergleich (Behrens-Fisher) beinhaltet keine Voraussetzungen für Varianzengleichheit.

$$H_0: \leq 3,365$$

$$H_1: > 3,365 \quad \text{bei } df = n_{\text{SHAM}} - 1 = 5 \quad (\text{Sachs 1999})$$

H_0 besagt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten der beiden zu vergleichenden Gruppen besteht.

H_1 besagt, dass ein signifikanter Unterschied besteht.

$$t = \frac{|\bar{x}_{\text{OVX}} - \bar{x}_{\text{SHAM}}|}{\sqrt{\frac{s_{\text{OVX}}^2}{n_{\text{OVX}}} + \frac{s_{\text{SHAM}}^2}{n_{\text{SHAM}}}}} = 3,368$$

$$|\bar{x}_{\text{OVX}} - \bar{x}_{\text{SHAM}}| = 1,36 \cdot 10^{-10}$$

$$\sqrt{\frac{s_{\text{OVX}}^2}{n_{\text{OVX}}} + \frac{s_{\text{SHAM}}^2}{n_{\text{SHAM}}}} = \sqrt{\frac{9,8 \cdot 10^{-21}}{6} + \frac{2,86 \cdot 10^{-24}}{6}} = 4,0379 \cdot 10^{-11}$$

$3,368 > 3,365$ ($0,01 > 2,015$ ($0,05$)), somit ist H_1 erfüllt. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den Diffusionskoeffizienten beider Stichprobengruppen.

Der Unterschied war signifikant auf dem 5%-Niveau bei 5 Freiheitsgraden (Untergrenze für H_1 : 2,015) und auf dem 1%-Niveau (Untergrenze: 3,365).

(Bortz 1999)

10. Publikationsverzeichnis

10.1 Originalarbeit

Rohnke, Marcus; **Pfitzenreuter, Stefanie**; Mogwitz, Boris; Henß, Anja; Thomas, Jürgen; Bieberstein, Dina et al. (2017): Strontium release from Sr²⁺-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone. In: *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 262, S. 159–169. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.07.036.

10.2 Kongressbeiträge/Posterpräsentation

Pfitzenreuter, Stefanie; Rohnke, Marcus; Ray, Seemun; Alt, Volker; Janek, Jürgen: Kinetics of drug release and mobility in healthy and osteoporotic rat bone. Projekttreffen Transregion 79 Meißen 2015/2016.

11. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 20.10.2022

Ort/Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Ich danke der DFG, Herrn PD Dr. Ulrich Thormann sowie Herrn Prof. Dr. Jürgen Janek für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Arbeit.

Im besonderen Maße bedanke ich mich bei PD Dr. Marcus Rohnke für die Betreuung. Ebenso danke ich Dr. Anja Henß und dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Janek.

Besonders danke ich auch Dr. Christian Filz für seine tatkräftige Unterstützung und Expertise zur Datenauswertung des Diffusionsversuchs und bei der Erstellung der Tiefenprofile.

Ich danke Jan Bamberger und Prof. Uwe Linne für die ICP-MS-Analysen. Ferner gilt mein Dank Dr. Seemun Ray, Olga Dakischew und Ida Oberst für die Beschaffung und Verarbeitung des Probenmaterials.

Prof. Dr. Bernhard Miebach danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei den Mitarbeitern der Werkstätten des Physikalisch-Chemischen Instituts, insbesondere der Glasbläserei.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden sowie Nadim Hachem.

13. Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7075-5



9 783835 197075