

Aus dem Institut für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. rer. nat. J. Groll

# Mechanisch stabile Magnesiumphosphatschäume und deren Zytokompatibilität

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Sabine Annette Zimmermann

aus Rottweil

Würzburg, Juli 2014



**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

**Koreferent:** Prof. Dr. Dr. A. Kübler

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2015

Die Promovendin ist Zahnärztin

Meinen Eltern



## *Inhaltsverzeichnis*

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
1.1	Zielsetzung.....	4
2	Stand der Forschung.....	6
2.1	Calcium- und Magnesiumphosphate .....	7
2.2	Herstellung poröser Trägermaterialien .....	9
3	Material und Methoden .....	14
3.1	Materialien.....	14
3.2	Geräte und Hilfsmittel .....	15
3.3	Herstellung der Scaffolds .....	16
3.4	Charakterisierung der Scaffolds .....	21
3.5	Zytokompatibilität .....	23
4	Ergebnisse.....	33
4.1	Replika Verfahren .....	33
4.2	Durch Albumin geschäumte Mg-Phosphate .....	40
4.3	Anisotrope Porengeometrie .....	43
4.4	Zytokompatibilität .....	50
5	Diskussion .....	58
6	Zusammenfassung.....	67
7	Literaturverzeichnis .....	69

# 1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Knochenersatzmaterialien nehmen sowohl in der zahnärztlichen Chirurgie, als auch in der allgemeinmedizinischen Chirurgie einen immer größeren Stellenwert als Alternative zu autologem Knochenersatz ein. Schon 1890 führten Barth und Ollier experimentelle Untersuchungen mit verschiedenen Materialien durch, die als Knochenersatzmaterial dienen könnten.<sup>1</sup> Der Begriff Knochenersatzmaterial (KEM) fasst alle nicht körpereigenen sowie körpereigenen Substanzen zusammen, die zum Ersatz eines knöchernen Defektes verwendet werden können. Entsprechend ihrer Herkunft werden die Knochenersatzmaterialien in folgende Gruppen unterteilt: autogen, allogen, xenogen, alloplastisch.

Autogenes Transplantationsmaterial stammt vom selben Individuum. Dabei wird in der zahnärztlichen Chirurgie körpereigener Knochen an speziellen Stellen<sup>2</sup> entnommen, was jedoch nur in einem begrenzten Rahmen möglich ist.<sup>3 4</sup> Autogenes KEM ist somit osteoinduktiv sowie osteokonduktiv. Durch knochenspezifische Wachstumsfaktoren (BMP = Bone Morphogenic Protein) erfolgt eine Anregung von undifferenzierten Mesenchymzellen.<sup>5 6</sup> Dies regt die Osteogenese in direkten Knochenverbund an. Zum anderen entsteht durch das KEM eine Stützstruktur. Diese unterstützt die Neogenese des Eigenknochens.

Allogenes KEM stammt von einem genetisch anderen Individuum derselben Art (Mensch-Mensch-Transplantat). Da das KEM von einem anderen Menschen stammt, und es somit nicht möglich ist, sämtliche Proteine aus dem Transplantat zu entfernen, bleibt eine allergene Potenz bestehen. Eine Infektionsquelle (HIV, Hepatitis, etc.) kann bei allogenen Knochenersatzmaterialien nicht definitiv ausgeschlossen werden. Allogenes Material ist im Gegensatz zu autogenem KEM nur osteokonduktiv und nicht osteoinduktiv.<sup>7</sup>

Unter xenogenem KEM versteht man Transplantate artfremder Herkunft. Sie stammen von einer anderen Spezies, wie zum Beispiel vom Rind (bovin) oder Schwein (porcin). Beispiele hierfür sind Kollagen oder Hydroxylapatit sowie BioOss® der Firma Geistlich (Wolhusen, Schweiz) welches nur den mineralischen Anteil bovinen Knochens beinhaltet.<sup>8 9</sup> Bei biologischen Knochenersatzmaterialien besteht selbstverständlich immer die Gefahr einer Antigenität. Auch

die Gefahr einer Krankheitsübertragung kann im Prinzip nicht definitiv ausgeschlossen werden.<sup>10</sup>

Alloplastisches Transplantationsmaterial ist körperfremd. Es handelt sich hierbei um rein synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien. Alloplastische Knochenersatzmaterialien umfassen drei Werkstoffgruppen: Metalle, Keramiken und Polymere. Dies sind zum Beispiel Titan bei der Werkstoffgruppe der Metalle, Polymethacrylate und Co-Polymere bei den Polymeren, sowie Polylaktide/Polyglykoxide. Die Werkstoffgruppe der Keramiken umfasst zum Beispiel Glasionomere, Hydroxylapatit, bioaktive Glaskeramiken,  $\beta$ -Tricalciumphosphate als auch die in dieser Arbeit untersuchten keramischen Magnesiumphosphat-schäume. Nachteil dieser Materialien ist, dass sie weder eine osteopromotive noch eine osteoinduktive Wirkung besitzen. Vorteile alloplastischer Materialien sind ihre Biokompatibilität, eine ausreichende Druckfestigkeit, je nach Material ihre Porosität, Resorbierbarkeit, Formbarkeit, Sterilität und ausreichende Verfügbarkeit.<sup>11</sup>

Ein zu körpereigenem, autologem Knochen gleichwertiges KEM, der sogenannte „Goldstandard“, ist momentan noch nicht realisierbar. Die Anforderungen an heutige Knochenersatzmaterialien sind hoch. Sie sollten zum einen möglichst den biomechanischen Eigenschaften des natürlichen Knochens ähneln zum anderen einfach herzustellen und zu verarbeiten sein. Heutige Transplantationsmaterialien erfüllen in vielfacher Hinsicht wichtige Funktionen. Knochenersatzmaterialien dienen als Platzhalter und anatomischer Formgeber für Knochenneubildung. Sie sind somit eine Leitschiene für die gesteuerte Knochenregeneration. Dabei nehmen sie gleichzeitig eine wichtige Stützfunktion für das Periost, als auch die umliegenden Weichgewebe ein. Für eine Beschleunigung der Knochenneubildung ist die Möglichkeit gegeben, das KEM als Trägersubstanz zu nutzen. Dadurch lassen sich Wachstumsfaktoren oder Antibiotika in die Knochenersatzmaterialien einfügen.<sup>12</sup>

Solche Transplantationsmaterialien müssen spezielle Eigenschaften erfüllen, um ihrer Aufgabe gerecht werden zu können. Ideale Eigenschaften sind eine osteoinduktive, osteokonduktive Wirkung, Biokompatibilität, ausreichende

Druckfestigkeit, Porosität, Resorbierbarkeit, Formbarkeit, Sterilität, einfache Verarbeitung und eine ausreichende Verfügbarkeit.<sup>13</sup>

Als osteoinduktive Wirkung wird die Anregung der Osteogenese, die durch Zytokine in einem direkten Knochenverbund angeregt wird, bezeichnet. Wünschenswert ist auch eine stimulierende Wirkung auf osteogene Zellen, die die Neogenese des Knochens fördern soll. Im Idealfall kann durch eine osteoinduktive Wirkung sogar Knochen an neuen Stellen gebildet werden.<sup>14 15 16</sup> Durch die osteokonduktive Wirkung soll die Neubildung des Eigenknochens durch das Knochenersatzmaterial geleitet und somit auch stabilisiert werden. Es bildet also eine Grundstruktur und Leitstruktur für die zukünftige anatomische Form. Osteokonduktive Knochenersatzwerkstoffe können jedoch keine Neogenese des Knochens induzieren. Diese drei Wirkungen vereint bisher lediglich das autogene Knochenersatzmaterial in sich.

Die Porosität eines Knochenersatzwerkstoffes ist für die Resorptions- und Aufbauvorgänge wesentlich. Ein weiterer Vorteil der Porosität ist die massive Vergrößerung der Oberfläche des Knochenersatzwerkstoffes. Durch interkonnektierende Poren ist eine durchgängige Vaskularisation des Materials möglich. Für eine gute Vaskularisation müssen die Poren einen ausreichenden Durchmesser von ca. 100 µm besitzen.<sup>45</sup> Kleinere Poren ermöglichen das Einwachsen und Anwachsens von Knochengewebe. Somit kann durch kleinere Poren der Zell-Implantat-Kontakt ermöglicht werden. Die Anzahl der kleinen Poren sollte dennoch nicht zu hoch sein, da ansonsten die Gefahr einer unvollständigen Vaskularisierung besteht. Dies kann dazu führen, dass bindegewebig umschlossene Partikel entstehen.<sup>17 18</sup> Die Resorption des Knochenersatzmaterials muss innerhalb eines bestimmten Zeitraumes ablaufen. Die Resorption sollte in derselben Geschwindigkeit ablaufen, in der die Osteogenese durch den Körper vollzogen wird. Laufen diese Vorgänge nicht parallel ab, kommt es zu einer minderwertigen Knochenstruktur oder sogar zu einer Bildung von bindegewebigen Strukturen. Resorptionsvorgänge können entweder biologisch über Zellvermittlung, oder aber über chemisch-physikalische Lösungsvorgänge ablaufen.<sup>19</sup>

## 1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung keramischer Schäume mit möglichst hoher Stabilität, sowie ihrer Analyse hinsichtlich ihrer Biokompatibilität. Um eine verbesserte Stabilität der bisherigen Keramikschaume zu erhalten, werden verschiedene Arten der Herstellung von keramischen Schäumen getestet. In vorangegangenen Arbeiten wurden über die Replikation von Polymerschäumen hochporöse offenporige Magnesiumphosphatschaume (MgP-Schaume) hergestellt, deren Druckfestigkeit jedoch weit unter 1 MPa lag.<sup>20</sup> Ziel der Materialentwicklung in der aktuellen Arbeit ist die Steigerung der Festigkeit durch folgende Ansätze:

- Im bisherigen Replikaverfahren wurden MgP-Schaume mit hohen Porositäten erzeugt. Die filigranen Stege der MgP-Schaume waren mechanisch instabil. Durch die Reduzierung der Porosität von Replika-Schäumen auf ca. 50 % wird versucht eine gesteigerte mechanische Stabilität bei Erhaltung der Interkonnektivität der MgP-Schaume zu erreichen.
- Erzeugung einer günstigeren und stabileren Steggeometrie durch alternative Herstellungsverfahren, bspw. durch Gasbildner im Schlicker.
- Erzeugung einer anisotropen Porengeometrie bei Replika-Schäumen. Durch die Gleichrichtung der Poren im MgP-Schaum erhofft man sich einen knochenähnlichen Aufbau der Schäume sowie mechanische Vorteile. Im Knochen richten sich die Spongiosatrabekel in die Richtung der größten Druck- und Zugspannung, als auch der größten Biegebeanspruchung aus. Dadurch besitzen die Knochen eine höhere Stabilität. Knochenersatzmaterial das der Struktur der Trabekel im Knochen besser entspricht wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.
- Infiltration der keramischen Schäume mit Polymer als auch die Umwandlung zu Struvit soll zu einer Verringerung der Porosität und einer Festigungssteigerung führen. Zudem soll geklärt werden, wie sich eine Infiltration auf die Biokompatibilität auswirkt.

Für die biologische Untersuchung werden die Werkstoffe mit Zelllinien (Bsp. Osteoblasten) besiedelt und diese anschließend kultiviert. Darauf folgt die Zytokompatibilitätsprüfung. Diese erfolgt z.B. durch die Untersuchung der Zell-

proliferation und der Zellaktivität. Zudem werden Proben mittels Licht- und Elektronenmikroskopie analysiert. Die Feststellung der Proteinexpression erfolgt nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot und PCR Analyse.

## 2 STAND DER FORSCHUNG

Der Knochen ist nach dem Zahnschmelz das stabilste Material des menschlichen Körpers. Er nimmt wichtige Funktionen des Stütz- und passiven Bewegungsapparates ein.<sup>21</sup> Im Bereich des Rumpfes, der Wirbelsäule und des Kopfes nehmen Knochen einen wesentlichen Bestandteil der Schutzfunktion für Organe und Nerven ein. Sie dienen der Muskulatur als Ursprungs- und Ansatzort. Die Sehnen der Skelettmuskeln besitzen über das Periost einen festen Verbund mit der Knochensubstanz. Dadurch können Kräfte, die durch Kontraktion der Muskulatur ausgelöst werden, auf den Knochen übertragen werden und somit Bewegungen ausgeführt werden. Auch metabolisch erfüllt der Knochen eine wichtige Aufgabe, denn er ist der wichtigste Kalziumspeicher des Körpers. 99 % des Kalziums ist im Knochengewebe gebunden und spielt bei zahlreichen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle.<sup>22</sup>

Das Knochengewebe besteht sowohl aus Knochenzellen als auch aus Knochengrundsubstanz. Es werden vier verschiedene Knochenzellen unterschieden. Im Endost sowie im Periost befinden sich zeitlebens wenig differenzierte Mesenchymzellen mit hoher Proliferationsaktivität. Osteoblasten und Osteoklasten sind wichtige Zellen des Um- und Aufbaus des Knochens. Die vierte Zellgruppe sind die Osteozyten, die das sogenannte trophische Zentrum, das Knochengewebe, erhalten. Die Knochengrundsubstanz besteht zu 65 % aus anorganischer Matrix und zu 35 % aus organischer Matrix (Prozentangaben sind auf das Trockengewicht bezogen).<sup>23</sup> Die anorganische Matrix besteht aus 50 % Phosphaten, 35 % Kalzium und 7 % Karbonaten, sowie weiteren Mineralien. Die organische Matrix besitzt eine ungeformte und eine geformte Komponente. Die ungeformte Komponente besteht aus Proteoglykanen und adhäsiven Glykoproteinen wie Osteokalzin, Osteonektin und Osteopontin. Zur geformten Komponente gehören Kollagenfasern Typ 1.<sup>23</sup>

Knochen sind durch ihren speziellen Aufbau auf Druck, Zug, Biegung als auch Torsion belastbar. Makroskopisch unterscheidet man die periphere Kortikalis oder auch Kompakta genannte dicht strukturierte äußere Knochenschicht, sowie die im Inneren des Knochens gelegene Spongiosa, ein schwammartiges

Netzwerk aus Platten und Trabekeln. Zwischen diesen Bälkchen befindet sich das Knochenmark. Durch diese Leichtbauweise mit einem Minimum an Bau-substanz und ein Maximum an Stabilität, entfallen nur ca. 10 % des Körpergewichtes auf das Skelett.<sup>6</sup> Die hohe Stabilität des Knochens wird durch die trajektorielle Anordnung der Trabekel erreicht.<sup>24</sup> Dabei richten sich die Spongiosatrabekel immer in die Richtung der größten Druck- und Zugspannung, als auch der größten Biegebeanspruchung aus.<sup>25</sup>

## 2.1 Calcium- und Magnesiumphosphate

Die Nachfrage nach synthetischem Knochenersatzmaterial steigt durch ihre positiven Eigenschaften stetig. Alloplastische Knochenersatzmaterialien sind nicht limitiert vorhanden und ähneln in ihrer Struktur immer mehr dem natürlichen Knochen. Nach Transplantation des Knochenersatzmaterials hängt die Regeneration und Osteosynthese des Knochens von der Resorbierbarkeit des Ersatzmaterials ab.<sup>26</sup> Als vor mehr als 20 Jahren Calciumphosphate als Knochenersatzmaterial vorgestellt wurden, war dies ein großer Fortschritt im Bereich der Biokeramiken.<sup>27 28</sup> Calciumphosphatzemente, wie zum Beispiel der schwer resorbierbare Hydroxylapatit oder das schnell resorbierbare  $\beta$ -Tri-Calcium-Phosphat sind ein alternatives synthetisches Knochenersatzmaterial zu den üblichen Calciumphosphatkeramiken. Calciumphosphate besitzen eine hervorragende Biokompatibilität, Osteokonduktion und Bioaktivität.<sup>29</sup> Dennoch gibt es einige entscheidende Aspekte, die Optimierungspotentiale bieten. Hierzu gehören beispielsweise die Resorbierbarkeit, das vom Knochenersatzmaterial ausgehende Knochenwachstum oder die optimale Handhabung des Materials für den klinischen Bedarf.<sup>30</sup>

Calciumphosphatzemente sind kaltaushärtende pastöse Massen. Sie werden aus Calcium Orthophosphaten und einer flüssigen Phase zu einer Paste gerührt.<sup>21</sup> Diese pastöse Masse ist selbsthärtend und zur Nutzung in verschiedenen klinischen Situationen von Vorteil.<sup>31</sup> Calciumphosphatzemente sind formbar und können entweder nach Implantation im Körper aushärten, oder auf den Defekt abgestimmt und in vitro vorgefertigt werden.<sup>21</sup> Jedoch fehlt diesem Zement die Makroporosität, eine grundlegende Eigenschaft zur Gewebsneubildung.<sup>21</sup>

Keramiken werden im Gegensatz zu den kaltaushärtenden Calciumphosphatzementen zur Verfestigung gesintert. Durch den Sinterprozess wird das Pulver durch Wärmebehandlung verdichtet. Abhängig von der Korngröße des Ausgangspulvers und den Sinterbedingungen, wie der Sintertemperatur und -zeit, kann es zu einer Schrumpfung bzw. Dichtezunahme der Proben kommen. Durch die Sinterung der Proben werden ihre Eigenschaften verändert und verbessert.<sup>32 33</sup>

Bei den Phosphatmaterialien ergeben sich unterschiedliche Stoffsysteme.<sup>34</sup> Dies sind unter anderem Hydroxylapatit (HA), Bruschit (Dicalciumphosphatdihydrate, DCPD), Tricalciumphosphate (TCP) sowie Magnesiumphosphate. Die Orthophosphorsäure ist bei der Bildung von Calciumphosphaten eine wichtige Grundsubstanz. Unter Abspaltung von Wasserstoff kann sie in drei Schritten zu primären, sekundären und tertiären Phosphaten dissoziiert werden. Calciumphosphatverbindungen können durch unterschiedliche Massenkombinationen von Phosphorsäure und Calcium synthetisiert werden.<sup>35</sup> In Tabelle 1 sind einige dieser Verbindungen dargestellt.

**Tabelle 1** Zusammensetzung verschiedener Calciumorthophosphate<sup>34</sup> und Magnesiumphosphate; alle Verbindungen finden Einsatz als Edukte für die Herstellung von Calciumphosphatzementen

Verbindung	Summenformel
Monocalciumphosphat Monohydrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
Monocalciumphosphat Anhydrid (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
Calciumhydrogenphosphat (Monetit)	$\text{CaHPO}_4$
Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Bruschit)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$\alpha$ -Tricalciumphosphat ( $\alpha$ -TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
$\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
Hydroxylapatit (HA)	$\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$
Tetracalciumphosphat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{O} \cdot \text{CaO}$
Magnesiumdihydrogenphosphat	$\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
Magnesiumhydrogenphosphat Trihydrat	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
Trimagnesiumphosphat	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$
Magnesiumdiphosphat	$\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$

Monocalciumphosphat Monohydrat (MCPM) kann aus stark sauren Lösungen gefällt werden. Da MCPM eine hohe Löslichkeit in Wasser besitzt und stark sauer ist, kann es nur in Kombination mit  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tricalciumphosphat als

Knochenzement zum Einsatz kommen.<sup>36 37</sup> Calciumhydrogenphosphat kommt in der Natur als Monetit vor. Die synthetische Herstellung erfolgt durch Umsetzung von Calciumhydroxid mit Phosphorsäure bei einer Temperatur von über 75 °C. Bei einer Herstellung unterhalb von 45 °C bildet sich das monokline Dihydrat des Calciumhydrogenphosphats, das in der Natur als Brushit vorkommt. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Tricalciumphosphate werden durch Sinterungsprozesse gewonnen. Damit zählen sie zu den high-temperature Calciumphosphaten. Dabei bildet sich bei einer Temperatur unter 1100 °C die Niedertemperaturvariante  $\beta$ -TCP. Die Hochtemperaturvariante  $\alpha$ -TCP bildet sich bei einer Sintertemperatur von über 1100 °C.<sup>24</sup> Aufgrund ihrer guten Biokompatibilität und Resorbierbarkeit sind Brushit bildende Calciumphosphatzemente von großem Interesse.<sup>38</sup> Hydroxylapatit ist die am schwer löslichsten Calciumphosphatverbindung, aber auch die stabilste.<sup>39 40</sup> Die synthetische Herstellung erfolgt durch eine Mischung unterschiedlicher Calciumphosphate mit anschließender Sinterung. Magnesiumphosphate werden hauptsächlich als Flammenschutzmittel, Abfuhrmittel, Futtermittelzusatz oder als keramischer Rohstoff verwendet.<sup>24</sup> Im menschlichen Körper finden sich Magnesiumphosphate im Gehirn, Knochen, Zähnen, Nerven, Muskeln sowie in Blutkörperchen. Im Grunde beruhen Magnesiumphosphatzemente auf einer Säure Base Reaktion.<sup>41</sup> Grundkomponente ist dabei Magnesiumoxid Pulver das bevorzugt mit Ammoniumphosphaten, wie zum Beispiel Diammoniumhydrogenphosphat  $((NH_4)_2HPO_4)$  oder Ammoniumdihydrogenphosphat  $(NH_4H_2PO_4)$  als Säure verwendet wird.<sup>41</sup> Auf Grund ihrer guten Resorbierbarkeit, Biokompatibilität und hohen Stabilität sind Magnesiumphosphate eine gute Alternative zu Calciumphosphatzementen.<sup>42</sup> Die unterschiedlichen Magnesiumphosphatderivate sind in Tabelle 1 aufgelistet.

## 2.2 Herstellung poröser Trägermaterialien

Heutzutage verfolgt man das Ziel, Defekte nicht nur zu ersetzen, sondern darüber hinaus die Regenerationsfähigkeit des Körpers zu unterstützen und anzuregen.<sup>43</sup> Um diese Zielsetzung zu erreichen, ist es notwendig, knochenstrukturnachahmende Knochenersatzmaterialien herzustellen.<sup>44</sup> Das Vorhandensein von interkonnektierenden Poren im Knochenersatzmaterial ist ein ent-

scheidender Faktor für die Steuerung und Bildung von Knochengewebe auf synthetischen Knochenersatzmaterialien. Nach Hulbert et al. sollte die Porengröße nicht geringer als 100 µm sein.<sup>45</sup> Spätere Forschungsergebnisse ergaben jedoch, dass bei einer Porengröße ab 300 µm ein besseres Knochenwachstum erzielt werden kann.<sup>46 47 48</sup> Die interkonnektierenden Poren bieten dem Knochenwachstum neuen Raum und steigern somit die Proliferation der Knochenzellen.<sup>49</sup> Um poröse schwammartige Strukturen zu erhalten wurden verschiedene Herstellungsmethoden untersucht, die im Folgenden kurz erläutert werden:

- Durch das Replizieren von Schwämmen versucht man die poröse Struktur nachzuahmen. Dies kann entweder durch die Nachbildung von Schwämmen (positive Replika-Technik)<sup>50</sup> oder durch das Gießen von Schlicker in vorgefertigte Formen (negative Replika-Technik) geschehen.<sup>51</sup> Für die positive Replika-Technik verwendete man zunächst Celluloseschwämme und beschichtete diese in Hydroxylapatitschlicker. Nach Trocknung der Schwämme wurde der Celluloseschwamm herausgebrannt.<sup>52</sup> In einem anderen Experiment versuchte man, sich die Natur zu Nutze zu machen. Hierzu beschichtete man die Oberflächen von verschiedenen Korallenskeletten mit Hydroxylapatit und schnitt diese dann zum Defekt passend zu.<sup>53</sup> Mittlerweile verwendet man anstatt Celluloseschwämmen Polyurethanschäume. Nach Trocknung lässt sich nun der Polyurethanschäum bei 600 °C herausbrennen.<sup>18</sup> Die dabei entstehenden Schwämme besitzen allerdings nur eine geringe Druckfestigkeit, die jedoch durch Infiltration mit Poly(lactid-co-Glycolid) (PLGA) erfolgreich verbessert werden kann.<sup>54</sup> Miao et al. verbesserten durch Infiltration der Schäume mit einem Gemisch aus PLGA und bioaktiven Gläsern sowohl die Druckfestigkeit, als auch die Biokompatibilität.<sup>55 56</sup> Für die negative Replika-Technik werden aus thermoplastischen oder wärmeaushärtenden Materialien Gussformen hergestellt. In diese Formen wird der Schlicker entweder eingegossen oder hineingespritzt. Nachdem der Zement ausgehärtet ist, muss diese Form entfernt werden. Dabei werden häufig toxische Lösungsmittel verwendet, die beim eventuellen Zurückbleiben

auf den Gerüsten jedoch eine Gefahr für den menschlichen Körper darstellen.<sup>18 57 58 59</sup>

- Eine weitere Vorgehensweise bedient sich folgender Methodik: Es wird versucht, durch Gasbildner bzw. gasbildende chemische Reaktionen einen Schaum herzustellen.<sup>60 61</sup> Um eine poröse Struktur zu erhalten, nutzt man eine chemische Reaktion, die in der noch flüssigen Zementpaste abläuft. Hierzu verwendet man die Säure-Base-Reaktion von Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ ) mit Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ ), bei der Wasser ( $H_2O$ ) und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) Blasen entstehen.<sup>62 63</sup> Das so entstehende Knochenersatzmaterial weist jedoch eine geringe Druckfestigkeit auf und kann somit nur beschränkt verwendet werden.<sup>13</sup> Gegen die direkte Transplantation dieser Schäume spricht die Gefahr einer Embolie durch Diffusion des Gases in das umliegende Gewebe.<sup>64</sup>
- In einem anderen Ansatz erhält man durch das Einbringen eines proteinbasierenden Schaumbildners poröse Keramik. Hierbei wurde Albumin als Schaumbildner genutzt.<sup>65</sup> Diese Methode erlaubt eine große Vielfalt an komplexen Formen. Dazu wird Schlicker mit Albumin vermischt. Nach vollständiger Trocknung wird das Albumin herausgebrannt und die erhaltene Struktur gesintert.<sup>66</sup>
- Eine weitere Herangehensweise dafür, eine schwammartige Struktur im Zement zu erhalten, ist es, lösliche Füllstoffpartikel aus der Keramik auszuwaschen oder auszubrennen. Dazu werden feinste Partikel der Zementpaste hinzugefügt. Abhängig von ihrer Löslichkeit werden diese Partikel entweder kurz vor der Implantation oder erst im Körper herausgelöst. Hierbei werden als herauslösbare Partikel unter anderem Mannitol<sup>67</sup>, Natriumphosphatpartikeln<sup>68</sup> oder Calciumsulfatpartikel<sup>69</sup> verwendet. Eine neuartige Entwicklung ist die Fusion von Stärke und Schlicker. Der Grundgedanke dieser Methode basiert auf der Quellung von Stärke bei Hitze und Feuchtigkeit.<sup>70</sup> Die Porengröße und somit auch die Interkonnektivität des Zementes ist von der Löslichkeit der Partikel während des Herstellungsprozesses abhängig.<sup>71</sup> Ebenfalls mit einberechnet werden muss, dass eine große Menge an Partikeln in den Zementen vor-

handen sein sollte, um im Endergebnis eine ausreichende Porosität zu erhalten. Da die so hergestellten Schäume eine geringe Druckfestigkeit aufweisen, versucht man sie durch resorbierbare Fasern zu verstärken. Sie sollen die Brüchigkeit der Zemente verbessern und sich nach Implantation langsam auflösen. Hierzu wurden Polylactide (PLA), Poly-Lactide (PLLA), als auch Polycaprolacton (PCL) Fasern verwendet.<sup>72 73</sup>

Xu et al.<sup>74 75</sup> untersuchten den Einfluss verschiedener Fasern. Dabei wurde der Effekt unterschiedlicher Längen von Fasern, sowie deren Menge im Zement genauer analysiert. Im Zuge dessen ergab sich ein enormer Vorteil von langen Fasern im Vergleich zu kurzen Fasern, da diese, nachdem sie sich aufgelöst haben, die Fähigkeit zur Bildung von interkonnektierenden Poren in den Calciumphosphatzementen besitzen.

- In weiteren Arbeiten wird eine Vermischung von Polylactid-co-Glycolid (PLGA) mit der Zementpaste untersucht.<sup>76 77</sup> Der Grundgedanke hierbei ist es, parallel zum Abbau der Polymerketten die Freisetzung von knochenmorphogenetischen Proteinen (BMP) zu ermöglichen. Dies sind Signalproteine, die die Fähigkeit besitzen, als Wachstumsfaktoren die Knochenbildung anzuregen.<sup>78 79</sup>
- Poröse Werkstoffe können auch durch eine Emulsion erzeugt werden, in der beispielsweise die Zementpaste die hydrophile Phase und Öl die hydrophobe Phase darstellen.<sup>80</sup> Je nach Mengenverhältnis der beiden Phasen und der Art des Emulgators können unterschiedliche Emulsionen gebildet werden.<sup>81</sup> Somit kann entweder eine Emulsion aus Zement-Tröpfchen in Öl entstehen oder umgekehrt eine Emulsion aus Öl-Tröpfchen in der Zementpaste. Um ein poröses Zementgerüst zu erhalten, ist somit nur eine Emulsion aus Öl-Tröpfchen in der Zementpaste sinnvoll. Nachdem der Zement ausgehärtet ist und die Öl-Tröpfchen herausgewaschen sind, bleibt ein poröses Zementgerüst zurück. Die Porengröße wird bei dieser Methode durch Anstieg des Öl-Anteils beeinflusst.<sup>82</sup> Auch hier bleibt, neben der geringen Druckfestigkeit, wie auch bei der gasbildenden Methode, die Gefahr bestehen, dass Öl-Tröpfchen im Gerüst verbleiben und anschließend in den Blutkreislauf gelangen

können. Dies birgt die Gefahr einer Embolie. Durch nachträgliche Sinterung der Gerüste versucht man diese Gefahr auszuschließen.<sup>83 84</sup>

Zu anisotropen Porenstrukturen, die in natürlichen Knochen vorliegen und mechanisch stabiler sind, gibt es derzeit noch keine beschriebenen Herstellungsverfahren. Das Interesse an Magnesiumphosphatkeramiken als Alternative zu Calciumphosphatzementen, die in fast allen Verfahren verwendet werden, steigt stetig an. Dies liegt vor allem daran, dass Magnesiumphosphatkeramiken unter physiologischen Bedingungen eine sehr gute Resorbierbarkeit besitzen.<sup>85 86 87</sup>

<sup>88</sup> Um einen knochenähnliche Struktur aus Magnesiumphosphatkeramik nachahmen zu können, wurden in dieser Arbeit keramische Schäume aus Magnesiumphosphat hergestellt und genauer analysiert.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden die folgenden Materialien verwendet.

#### 3.1 Materialien

<b>Gebrauchsmaterial</b>	<b>Firma/ Firmensitz</b>
Trimagnesiumphosphat Octahydrat ( $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8 H_2O$ )	Fluka/ Seelze
25% Ammoniumhydroxid ( $NH_4OH$ )	Merck/ Darmstadt
Destilliertes Wasser	FMZ-Zelllabor Reinstwasseranlage Uni Würzburg
Hydroxylapatit für Biokeramik ( $Ca_5HO_{13}P_3$ )	Merck/ Darmstadt
Epoxydharz L / Härter L Epoxydharz L / Härter S	R&G Faserverbundwerkstoffe GmbH / Waldenbuch
Albumin from chicken egg white, Grade II	Sigma –Aldrich Chemie GmbH/ Steinheim
Natriumhydrogencarbonat ( $NaHCO_3$ )	Merck/ Darmstadt
Ammoniumhydrogenphosphat	FMZ-Eigenproduktion
PLGA Resomer RG 502 H	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG/Ingelheim am Rhein
Dichlormethan	Merck/ Darmstadt
Aceton	Merck/ Darmstadt
PBS-Lösung	FMZ-Eigenproduktion
Accutase	PAA GmbH, Cölbe
DMEM	Invitrogen, Darmstadt
WST-1	Roche Diagnostics, Mannheim
Isoton-Pufferlösung	Beckmann Coulter, Krefeld
Natriumchlorid	Merck/ Darmstadt
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecanhydrat	Merck/ Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck/ Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck/ Darmstadt
Acetone	Sigma Aldrich, Steinheim
25 % Glutaraldehyd	Sigma Aldrich, Steinheim
Analysesieb 1 mm	Retsch, Haan
Metallbrett 5 x 15 cm	FMZ Werkstatt
PU Schaum 20 ppi	Poret®Ester, EMW Filtertechnik GmbH; Diez
PU Schaum 60 ppi, 80 ppi	PANAfoamtec GmbH, Geretsried
24-/96-Wellplatten	Nunc GmbH&Co KG, Wiesbaden
Locheisen 18 mm	Turnus
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pasteurpipetten	Scherf, Meiningen
Zellkulturflasche 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Falcon, Heidelberg
Deckgläser 12 mm	Hartenstein, Würzburg
Osteoblasten MG-63 (CRL-1427)	ATCC, USA
Provil novo	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
Alsint-Glühkästen 50x25x20	W.Haldenwanger, Technischer Keramik GmbH&Co.KG, Waldkraiburg
Stahlstecknadeln 30 x 0,60 mm	Prym Consumer Europe GmbH, Stolberg

<b>Gebrauchsmaterial</b>	<b>Firma/ Firmensitz</b>
Bis-acrylamid 2K	Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
Acrylamid 4K	Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
3 M Tris-HCL, pH 8,8;	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
0,4 % Sodium dodecyl sulfate	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
0,75 M Tris-HCL, pH 6,8	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
10 % Ammoniumpersulfat-Lösung in Reinstwasser (APS)	Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
50 mM Tris-HCL, pH 8,8;	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
0,38 M Glycin	Fa. Applichem GmbH, Darmstadt
0,1 % Sodium dodecyl sulfate	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
0,1 % Coomassie brilliant blue	Fa. Serva GmbH, Heidelberg
20 % Methanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
7,5 % Essigsäure	Fa. Roth GmbH & Co, Karlsruhe
20 % Methanol	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
60 mM Tris-HCL, pH 6,8	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
10 % Glycerin	Fa. Merck KGaA, Darmstadt
5 % Sodium dodecyl sulfate	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen
10 % $\beta$ -Mercaptoethanol	Fa. Sigma, Taufkirchen
Accutase	Fa PAA GmbH, Cölbe
Proliferations-Reagent WST-1 (water soluble tetrazolium) Farbstoff WST-1 (4 - 3(4 - Iodphenyl) - 2 - (4 - Nitrophenyl) - 2H - 5 - Tetrazolium - 1,3 - Benzendi - sulfonat)	Fa. Roche Diagnostics, Mannheim
Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit von Invitrogen	Eugene, Oregon USA
Ponceau S	Fa. Sigma GmbH, Taufkirchen

### 3.2 Geräte und Hilfsmittel

<b>Geräte/Hilfsmittel</b>	<b>Firma/ Firmensitz</b>
Sterilarbeitsbank	Heraeus GmbH&Co KG Hanau
Inkubator	Juoan GmbH, Unterhaching
Labormikroskop	DMIL, Fa. Leica GmbH, Wetzlar
Zellzähler: Typ Casy 1	Schärfe System GmbH, Reutlingen
Kühl-Gefrierkombination	Bosch GmbH, München
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV	Systec GmbH, Wettenberg
Gefriertruhe -80°C	Bader GmbH, Würzburg
Reinstwasseranlage	USF, Ramsbach
Wippschüttler	Bühler, Hechingen
Rasterelektronenmikroskop	Zeiss, Göttingen
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Labor pH-Meter	WTW, Weilheim
Sinterofen Modell ME 12/13	Rhode GmbH, Prutting
Critical Point Dryer CPD 030	Bal-Tec, Witten
Photometer Tecan Spectra Fluor Plus	Tecan; Crailsheim
Kritisch Punkt Trockner	Bal-Tec; Witten
Mechanischer Teststand	Zwick/Roell; Ulm
TestXpert	Zwick/Roell, Ulm
Excel 2007/ 2010	Microsoft, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, USA
Spektrometer	Magellan 2
OriginLab	OriginLab Corporation, Northampton, USA

### 3.3 Herstellung der Scaffolds

Keramische Schäume aus Magnesiumphosphat können auf unterschiedliche Art und Weise hergestellt werden. Die offenporigen Magnesiumphosphat-schäume wurden sowohl über Replikationen von Polyurethanschäumen (PU-Schäume) als auch über das Vermischen eines Albuminschaumes mit Magnesiumphosphatschlickern hergestellt.

#### **Replika Verfahren**

Mit Hilfe einer Stanze (Innendurchmesser 18 mm), wurde aus einem 10 mm hohen PU-Schaum (60 ppi) Zylinder hergestellt. Diese wurden mit Hilfe eines Cutter Messers in ihrer Höhe halbiert, um PU-Schäume mit einem Durchmesser von 18 mm und einer Höhe von 0,5 cm zu produzieren. Für das Replikationsverfahren wird ein geeigneter Schlicker benötigt, der den gesamten PU-Schaum durchtränken, aber auch den offenporigen Charakter des PU-Schaums beibehalten soll. Hierfür wurden verschiedene Schlickerkonsistenzen getestet. Für die Schlickerherstellung wurde die benötigte Menge destilliertes Wasser in ein Schraubglas abgewogen und zu diesem die entsprechende Menge Ammoniumhydroxid ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) zugegeben. Je nach gewünschter Schlickerkonsistenz wurde die entsprechende Menge Trimagnesiumphosphat Octahydrat  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  zugegeben (vgl. Tab.2). In dem mit einem Deckel verschließbaren Schraubglas wurde die Lösung mit Hilfe eines Rührfisches auf dem Magnetrührer gerührt.

**Tabelle 2** verschiedene Schlickerzusammensetzungen

Destilliertes $\text{H}_2\text{O}$	$\text{NH}_4\text{OH}$	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$	Rührzeiten
15 ml	5 Tropfen	8 g	30 min
15 ml	5 Tropfen	10 g	30 min
15 ml	5 Tropfen	11 g	30 min
15 ml	5 Tropfen	12 g	60 min

Die Schlickerkonsistenz ist ein wichtiger Faktor dafür, die gleichmäßige Durchtränkung der PU-Schäume zu ermöglichen, ohne dabei die offenporige Struktur zu beeinträchtigen. Durch unterschiedliche Mengenzugabe von  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  verändert sich die Viskosität des Schlickers. Mit steigender Menge erhöht sich diese, was zu einer schlechteren Durchtränkung des PU-Schaums führt.

Durch eine erhöhte Rührzeit des Schlickers mit einer hohen Menge an  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  lässt sich diese erhöhte Viskosität geringfügig verbessern. Dies lässt eine verbesserte Durchtränkung der PU-Schäume bei einer erhöhten Pulverzugabe zu. Eine weitere Verbesserung der Viskosität des Schlickers wird durch die Einstellung eines basischen pH-Wertes von 11 erreicht. Durch Zugabe von Ammoniumhydroxid verbessert sich die Pulveraufnahmefähigkeit des Wassers und die Zahl der Agglomerate verringert sich. Dadurch entsteht eine homogenere Benetzung der Probenkörper.

Die vorher hergestellten PU-Schaum Zylinder wurden mit dem jeweiligen Schlicker infiltriert, bis dieser vollständig durchtränkt war. Um den überschüssigen Schlicker aus den Proben wieder zu extrahieren, wurde mittels eines Siebes (Porengr. 1 mm) und eines Blechstücks der überschüssige Schlicker herausgedrückt. Nachdem die Überschüsse abgesaugt waren, wurden die Proben gewendet und wie mit der vorherigen Seite verfahren. So wurde eine Benetzung der Stegstrukturen erreicht, ohne jedoch die Poren dabei zu stark zu verstopfen. Nach der Trocknung der Proben über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde auf einem Blech wurden die Proben bei 1150 °C gesintert.

#### ***Umwandlung in Struvit***

Die durch das Replika-Verfahren erhaltene MgP-Struktur kann in einer Reaktion zu Struvit umgewandelt werden. Dazu wurden die gesinterten  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  - Schäume in Glaspetrischalen gelegt und in eine 3,5 M Di-Ammoniumhydrogenphosphat-Lösung ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) eingelegt. Die Proben verblieben für 20 h bei 40 °C im Trockenschrank und wurden nach Entnahme in destilliertem Wasser gewaschen. Nachdem die Proben über Nacht an der Luft getrocknet wurden, konnten sowohl Druckfestigkeitsmessungen als auch Zellversuche durchgeführt werden. Des Weiteren wurde die Massenzunahme bei der Umwandlung von Farringtonit zu Struvit ermittelt.

#### ***Infiltration mit PLGA***

Um die Druckfestigkeit zu erhöhen wurden die MgP-Schäume mit dem Polymer Polylactic-co-Glycolid (PLGA) infiltriert. Dazu wurde 1 g PLGA Pulver in 10 ml

Dichlormethan gegeben und auf dem Magnetrührer für 15 min gerührt, bis das PLGA Pulver vollständig in Dichlormethan gelöst war. In die so entstandene Lösung wurden die Proben eingetaucht und anschließend mit schwacher Druckluft abgeblasen, um ein Verstopfen der Poren durch die PLGA Lösung zu verhindern. Auch hier war eine Trocknung der Proben über Nacht an der Luft notwendig.

### **Herstellung von Magnesiumphosphatschäumen mittels Albumin**

Bei der Magnesiumphosphatschaumherstellung mittels Albumin, macht man sich die Struktur des aufgeschäumten Albumins zu Nutzen. Zur Herstellung des Albuminschaums wurden 2-6 g Albumin in ein Plastikgefäß abgewogen. Pro 2 g Albumin wurden jeweils 5 ml destilliertes Wasser zugegeben. Das Gemenge wurde mithilfe eines Rührstabes oder eines Löffels solange aufgeschlagen, bis sich ein steifer stabiler Schaum gebildet hatte. Der Schlicker wurde analog zur Herangehensweise der Replika-Methode hergestellt (vgl. Tab.3). Um den Schlicker unter den Albuminschaum heben zu können, ohne ihn dabei zu zerstören, war es notwendig, einen noch gießfähigen Schlicker herzustellen. Dieser sollte sich gleichmäßig mit dem Albuminschaum verbinden, sodass eine einheitliche Schichtstärke erreicht werden kann. Dazu wurden unterschiedliche Verhältnisse ausgetestet, um herauszufinden welche Schlicker Zusammensetzung nach dem Sintervorgang das beste Ergebnis erzielen kann (vgl. Tab.3).

**Tabelle 3** Schlickerzusammensetzung

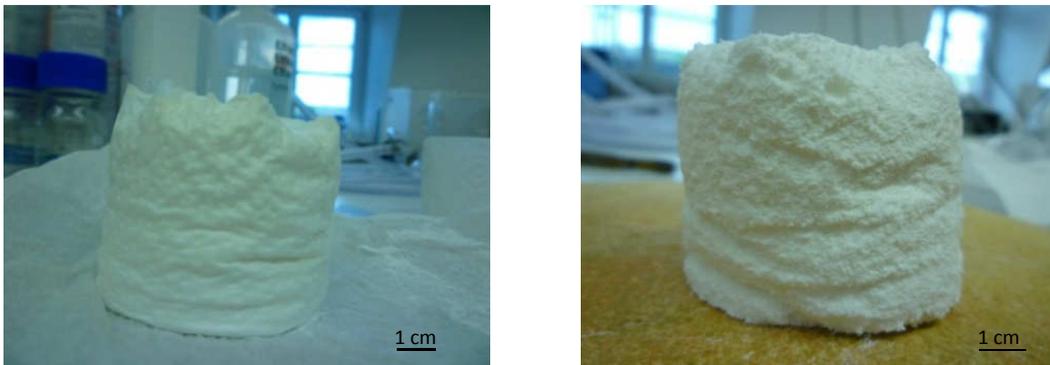
Destilliertes H <sub>2</sub> O	NH <sub>4</sub> OH	Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> * 8 H <sub>2</sub> O	Rührzeiten
15 ml	3 Tropfen	9 g	30 min
15 ml	2 Tropfen	11 g	30 min
15 ml	3 Tropfen	11 g	30 min
15 ml	4 Tropfen	11 g	30 min
15 ml	5 Tropfen	11 g	30 min
15 ml	5 Tropfen	12 g	60 min

Zum hergestellten Albuminschaum von 19 g wurde nun 60 g gießfähiger Schlicker hinzugefügt und untergehoben. Das Albumin-Schlicker-Gemisch wurde in eine herkömmliche Küchenspritze aus Metall gefüllt. Dadurch war ein präzises Einfüllen des Schlicker-Albumin-Schaums in zuvor angefertigte Förmchen aus saugfähigem Papier möglich. Die ausgeschnittenen Papierstücke wurden zu einem Zylinder geformt und mithilfe eines Tesafilms fixiert (siehe Abb. 1). Die

bis zum Rand befüllten Förmchen wurden daraufhin getrocknet. Anschließend wurden die Proben im Ofen gesintert.

### **Papierformen**

Die Papierformen sollen dem Schlicker-Albumin-Gemisch eine einheitliche Form geben, sodass reproduzierbare Proben herstellbar sind. Für die Papierformen wurden zwei unterschiedliche Größen getestet. Die anfänglich benutzten Papierformen besaßen einen Durchmesser von 3 cm und eine Höhe von 2,5 cm. Diese erwiesen sich als zu klein und beeinflussten den fertigen Körper, weswegen sie vergrößert wurden, so dass sie nun einen Durchmesser als auch eine Höhe von 5 cm besaßen.



**Abbildung 1** links: Albumin-Schlicker Gemisch in Papier-Form gefüllt ( $\varnothing$  5 cm), rechts: Albumin-Schlicker Gemisch ohne Papierform getrocknet ( $\varnothing$  5 cm)

### **Trocknungszeiten und Lagerung**

Bei der Trocknungszeit als auch bei der Lagerung des Probenkörpers während des Sintervorgangs wurden unterschiedliche Variationen getestet. Dabei wurden Trocknungszeiten von ca. 2h bei Raumtemperatur als auch 10, 15, 30, sowie 60 min. im Trockenschrank bei 40 °C ausgetestet. Die Lagerung der Probenkörper während des Sintervorgangs fand stehend (wie befüllt), auf dem Kopf stehend und seitlich liegend statt. Zudem wurde getestet ob das Verbleiben der Papier-Form an den Probekörpern einen Einfluss auf die Ausgangsform hat.

### **Anisotrope Porengeometrie**

Zur Herstellung einer anisotropen Porengeometrie benötigt man ein Hilfsmittel, das während des Sintervorgangs sowohl die Kompression auf den PU-Schaum halten kann als auch feuerfest sein muss. Zudem sollte die Kompression möglichst gleichmäßig auf den Schaum übertragen werden. Dafür ist ein rechtecki-

ges Sinterförmchen mit zueinander parallelen Wänden geeignet. Die Innenmaßen der verwendeten Sinterförmchen betragen in der Länge 47 mm, in der Höhe 17 mm und in ihrer Breite 22 mm. Somit ließen sich unterschiedliche prozentuale Kompressionen in Bezug auf den Ausgangswert der PU-Schäume testen. Da die Möglichkeit besteht, dass die Porendichte der PU-Schäume sowohl eine Auswirkung auf die anisotrope Porengeometrie als auch auf die Interkonnektivität zwischen den Poren haben könnte, wurden drei verschiedene Porengrößen verwendet: ppi 20, ppi 60 und ppi 80. Die Kompressionen betragen zwischen 10-60 % in Bezug auf die Ausgangsschäume. Die PU-Schäume wurden je nach gewünschter prozentualer Kompression mit einem Cuttermesser auf die benötigten Maße zugeschnitten, wobei die Höhe des PU-Schaums immer 10 mm betrug. Die Kompression wurde auf die Ausgangsbreite der PU-Schäume bezogen. Mit folgender Formel wurde die für die jeweilige Kompressionsstärke benötigte Breite der Grünkörper errechnet:  $\frac{\Delta B - B}{\Delta B} \times 100\%$

Entsprechend den in früheren Versuchen erlangten Erfahrungen wurden niedrigviskose Schlicker verwendet. Für die Schlickerherstellung wurden 10 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  verarbeitet. Der nun vorher zugeschnittene PU-Schaum wurde mit Hilfe einer Pinzette in das Schraubglas eingebracht und mit dem hergestellten Schlicker infiltriert. Um den überschüssigen Schlicker zu extrahieren, wurde mit den Proben wie beim Replika-Verfahren beschrieben verfahren. Nun wurde der mit Schlicker infiltrierte PU-Schaum in die Sinterförmchen geschoben. Dabei musste genau darauf geachtet werden, dass die beiden äußeren Längsflächen der Probe plan an den Sinterwänden anlag, um eine gleichmäßige Kompression der Schäume gewährleisten zu können. Zudem sollte sich die Probe über ihre gesamte Fläche auf einer Ebene befinden, also keine Wölbungen oder ähnliches aufweisen. Dies war jedoch bei steigender prozentualer Kompression nicht immer möglich.

#### **Sinterprozess**

Der Sinterprozess verlief über zwei Rampen. Zu Beginn wurde der Sinterofen mit einem Temperaturanstieg von 60 K/h langsam auf 600 °C hochgeheizt. Die Temperatur von 600 °C wurde für 15 min gehalten und sollte garantieren, dass

der PU-Schaum vollständig ausbrennt. Daraufhin wurde das für den Sinterprozess benötigte Temperaturmaximum von 1150 °C bei den Magnesiumphosphatschäumen mit einem schnellen Temperaturanstieg von 300 K/h erreicht. Diese Maximaltemperatur wurde für 1 Stunde konstant gehalten und nach Beendigung langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Auch der Sinterprozess des Albumin-Schlicker-Gemisches verlief bis auf das Temperaturmaximum von 1050 °C analog zum zuvor beschriebenen Sinterprozess.

### 3.4 Charakterisierung der Scaffolds

#### **Messung der Druckfestigkeit**

Da sowohl die Herstellung der anisotropen Magnesiumphosphatschäume (MgP-Schäume) als auch die Herstellung mittels Albumin keine einheitlichen Proben hervorbrachten, wurden nur die MgP-Schäume und ihre Modifikationen, die durch die Replika-Methode hergestellt wurden, auf ihre Druckfestigkeit hin untersucht. Die mechanische Druckfestigkeitsprüfung erfolgte mit einem mechanischen Teststand der Firma Zwick/Roell. Dazu wurden die Messparameter wie in Tab. 5 aufgelistet eingestellt. Der Durchmesser der einzelnen Proben bewegte sich vor der Messung zwischen ca. 10,5-11,5 mm. Nach den Messungen wurde aus der Kraft bei einer Verformung der Proben von 30 % die Druckfestigkeit  $\sigma_{\max}$  vom Programm *TestXpert* berechnet.

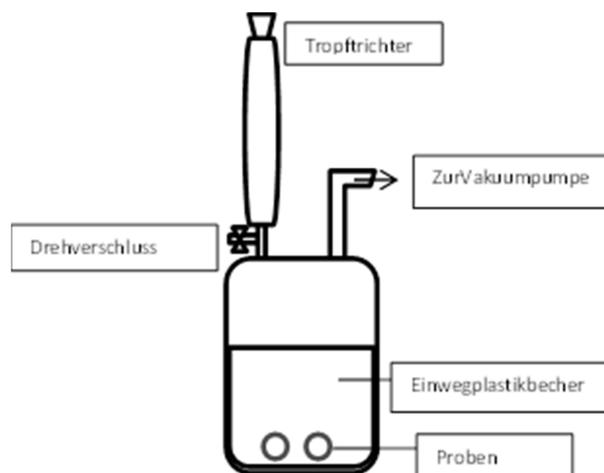
**Tabelle 4** Prüfprotokoll bei Druckfestigkeitsmessungen

Vorkraft	0,02 N
Geschwindigkeit der Vorkraft	5 mm/min
Prüfgeschwindigkeit lagegeregt	5 mm/min
Kraftabschaltswelle	80 % Fmax
Obere Kraftgrenze	2500 N
Max. Verformung	80 %
Kraftmessdose	2,5 kN

#### **Herstellung von Schliffpräparaten**

Zur Analyse mittels Lichtmikroskop wurden Schliffpräparate der Proben hergestellt um eine Aussage über die mögliche Differenz zwischen den Oberflächen der gesinterten Proben und der Interkonnektivität des Inneren des Schaums zu treffen. Dazu wurden Epoxydharz L und der dazugehörige Härter S im vorgegeben Verhältnis von 10:4 zusammengemischt. Bei diesem Versuch wurden 30 g Epoxydharz L und 12 g des dazugehörigen Härters S in einen Plastikbecher

abgewogen und vorsichtig mit einem Holzspatel vermischt. Anschließend wurden verschiedene Proben in eine zylindrische Silikonform gelegt und langsam mit dem vorher hergestellten Epoxydharz infiltriert. Nachdem die Probe vollständig mit Epoxydharz infiltriert war und keine aufsteigenden Luftblasen mehr sichtbar waren, wurde die Form zügig bis zum Rand mit Epoxydharz aufgefüllt. Um die Magnesiumphosphatschäume mittels Albumin zu infiltrieren wurde eine spezielle Konstruktion verwendet um sicher zu stellen, dass der gesamte Schaum von Epoxydharz infiltriert wird. Zur Infiltration unter Vakuum wurde wie folgt verfahren (vgl. Abb.2): Ein Tropftrichter diente zum geregelten Einfluss des Epoxydharzes. In den Zweihalskolben wurden die Proben in einem Einwegplastikbecher, der den Wänden des Zweihalskolbens plan anlag eingebracht. Der zweite Hals des Kolbens war mit einer Vakuumpumpe verbunden. Durch diese wurde die gesamte Apparatur 20 min lang vakuumiert. In dieser Zeit wurde 50 g Epoxydharz L und 20 g des dazugehörigen Härter L abgewogen und mit einem Holzspatel vermischt. Zum Einfüllen des Epoxydharzes wird die Vakuumpumpe ausgeschaltet. Befand sich das gesamte Epoxydharz im Tropftrichter wurde dieser wieder verschlossen, das Vakuum angeschaltet und der Drehverschluss geöffnet, sodass das Epoxydharz langsam einfließen konnte. Nach vollständiger Infiltration wurde die Vakuumpumpe ausgeschaltet. Nach 24 h Aushärtezeit wurden die Proben aus ihren Formen herausgelöst und auf der Nasspapierschleifmaschine eben geschliffen. Zuerst mit einer groben Körnung von 120, bis die Mitte der Probe erreicht wurde, dann mit schrittweise feineren Körnung bis die Körnung von 1200 erreicht war.



**Abbildung 2** Versuchsaufbau zur Infiltration der Proben mit Epoxydharz

### **Kompressionsverhalten**

Um einen genaueren Einblick in das Verhalten des PU-Schaums während der Kompression zu erhalten, wurden vor Kompression des PU-Schaums (ppi 60) Stahlstecknadeln in einem gleichmäßigen Abstand eingebracht. Dieser Abstand betrug jeweils 0,5 cm. Auch hier wurden die Auswirkungen der Kompressionsstärke auf die PU-Schäume untersucht. Die Kompressionen betragen zwischen 10-60 % in Bezug auf die Ausgangsschäume. Der Grünkörper wurde analog dem Verfahren aus Kapitel 3.3 hergestellt. In die mit Schlicker benetzten PU-Schäume wurden daraufhin die Stecknadeln in einem Abstand von 0,5 cm hineingesteckt. Danach wurden die Schäume in die Sinterförmchen geschoben und mitsamt den Stecknadeln wie in Kapitel 3.3 beschrieben bei 1150 °C gesintert. Die Stahlstecknadeln blieben bei einer Temperatur von 1150 °C in ihrer Form weitestgehend erhalten. Nach Sinterung der Schäume wurden die Abstände der Stecknadeln direkt an den Schäumen gemessen und die Werte mit den Ausgangswerten verglichen.

### **3.5 Zytokompatibilität**

Die durch das Replika Verfahren hergestellten Magnesiumphosphatschäume wurden mit Osteoblasten besiedelt und diese anschließend kultiviert. Daraufhin folgte die Untersuchung der Zellproliferation und der Zellaktivität. Die Feststellung der Proteinexpression erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot und PCR-Analyse.

#### **Puffer und Medien**

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellversuche wurden die folgenden Puffer und Medien verwendet.

**PBS-Puffer** (pH-Wert von 7,4) hergestellt aus 8,0 g Natriumchlorid (137 mM), 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat (1,5mM), 2,8 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecanhydrat (7,8 mM), 0,2 g Kaliumchlorid (2,7 mM) Ad 1000ml Reinstwasser, bei 20 min bei 121°C autoklaviert.

**TBS** (Tris – gepufferte Salzlösung): 140 mM *NaCl*, 10 mM *TrisHCl*, pH 7,4

**DMEM** – Kulturmedium für Osteosarkomzellen aus 500ml DULBECCO'S MOD EAGLE MEDIUM (mit 4,5 g/l Glukose, mit GlutaMAX™-Imit Pyruvat) wurden 60 ml entnommen und verworfen, in die restlichen 440 ml DMEM wurden folgende Komponenten hinein pipettiert: 5,0 ml Penicillin-Streptomycin 10 000 IU/l-10 000 IU/ml, 5,0 ml HEPES Buffer (Solution 1M), 50 ml Foetal Bovine Serum (FCS)

**Isotone Lösung** aus 9,72 g/l Natriumsulfat, wasserfrei, 4,00 g/l Natriumchlorid, 1,00 g/l Dimethylolharnstoff, 0,11 g/l Procainhydrochlorid.

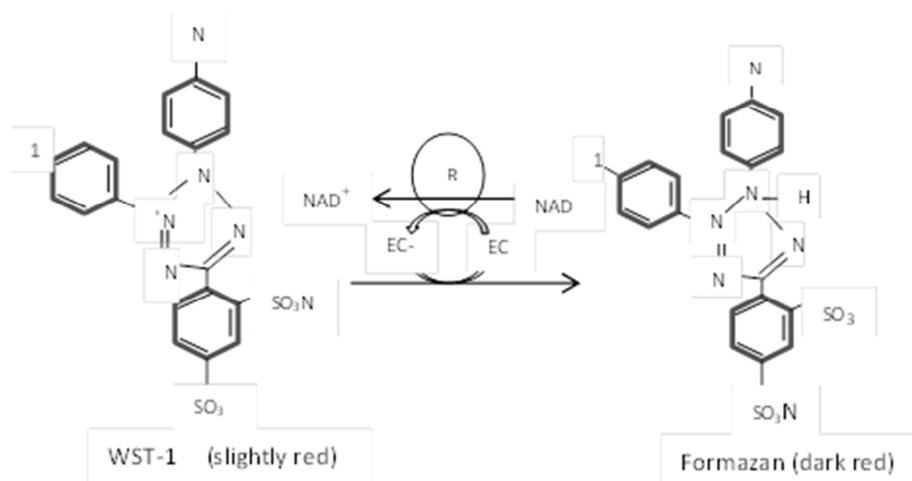
### **Zellkultivierung**

Für die Zellversuche wurde die Osteosarkomzelllinie MG-63 von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen. Die Osteosarkomzellen wachsen in Kultur adhärent und zeigen dabei eine fibroblastide Morphologie. Die Zellen exprimieren die Rezeptoren RI und RII für TGF- $\beta$ . Es liegt eine genetische Abweichung vom normalen Chromosomensatz vor. Die Zellkultivierung erfolgte bei 37 °C unter einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Begasung, als Kulturmedium wurde DMEM verwendet. Bevor eine Kultivierung mit Zellen auf den Proben, die im Replika Verfahren hergestellt wurden, möglich ist, wurden letztere durch mehrmaliges Waschen auf dem Wippschüttler auf einen möglichst neutralen pH-Wert stabilisiert. Dies erfolgte durch achtmaliges Waschen der Proben mit Reinstwasser sowie im Anschluss mit PBS. Dabei wurden die Proben nach dem 4. Wechsel umgedreht. Daraufhin erfolgte die pH-Wert Messung mit dem pH-Meter. Zur Sterilisation der Proben, wurden sie für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Dies ist jedoch nur bei Proben aus HA und Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> möglich. Proben aus Struvit und PLGA konnten aufgrund ihrer Eigenschaften nicht den hohen Temperaturen im Autoklaven ausgesetzt werden. Sie wurden mit 70 % Alkohol für je 30 min von jeder Seite sterilisiert und nach Beendigung der Einwirkzeit in der Sterilbank getrocknet. Von jeder Probe (HA; Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Struvit pH 8,5 bzw. 10,5; PLGA) wurden vier Exemplare in die Wells einer 24-Wellplatte gelegt. Für jeden Messtag wurde eine solche Wellplatte benötigt. Als Referenz über eine erfolgreiche Zellkultur diente hier Polystyrol, aus welchem die 24-Wellplatten hergestellt sind. Als Referenz für die Proben dienten Hydroxylapatitschäume. Zusätzlich zu diesen vier Wellplatten wurde eine Wellplatte für die Rasterelekt-

ronenmikroskopie angesetzt, diese wurde am fünften Messtag weiterverarbeitet. Hierbei wurden von jeder Probe zwei Exemplare verwendet. Als Referenz dienten auch hier die Hydroxylapatitschäume sowie zwei Glasplättchen. Um die Proben mit MG-63 Osteoblasten zu kultivieren wurden Zellsuspensionen mit einer Konzentration von 50 000 Osteoblasten/ml bzw. 100 000 Osteoblasten/ml hergestellt. Hierzu wurde aus T75 Kulturflaschen das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen durch zweimaliges Waschen mit jeweils 10 ml PBS von jeglichen Resten des Kulturmediums befreit. Anschließend wurde 1 ml Accutase in die Kulturflasche pipettiert und für 8 min bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe der Accutase bewirkte eine enzymatische Ablösung der Zellen vom Kulturflaschenboden. Um eine entsprechende Konzentration der Zellsuspension zu erreichen, wurden die gelösten Zellen entsprechend der gewünschten Endkonzentration mit Kulturmedium DMEM verdünnt.

### **WST Zellaktivitätstest**

Dieser Versuch beruht auf der Umsetzung des Farbstoffs WST-1 (4 – 3(4 – Iodphenyl) – 2 – (4 – Nitrophenyl) – 2H – 5 – Tetrazolium – 1,3 – Benzendi – sulfonat) zu dunkelrotem Formazan in stoffwechselaktiven Zellen. Dies geschieht durch die Succinatdehydrogenase in den Mitochondrien. Die im Photometer gemessene Absorption ist somit direkt proportional zu den Stoffwechselaktivitäten der Zellen.



**Abbildung 3** Umsetzung des Farbstoffs WST-1 in Formazan

### *Durchführung*

Unter der Sterilarbeitsbank wurden DMEM-Medium und WST im Verhältnis 10:1 zusammengemischt und jeweils 1 ml des Gemisches pro well in eine 24-well Platte vorgelegt. Die Proben wurden mit ihrer Oberfläche nach oben aus den 24-well Platten in die 24-well Platte mit dem vorgelegten WST-Gemisch überführt. Die 24-well Platte wurde für 30 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden aus jedem Well je 4 x 200 µl der Suspension in eine 96-well Platte pipettiert. Für jede Probe wurden 4 Wells angelegt, sodass bei der Messung mit dem Photometer Vierfachwerte gebildet wurden. Als Leerwert wurde bei der Messung das Gemisch aus DMEM- Medium und WST verwendet. Die 96-well Platte wurde im Photometer *Spectra Fluor Plus* hinsichtlich ihrer Absorption untersucht.

### **Zellzahlbestimmung**

Die Messung der Zellzahl wurde mit dem Zellzähler *Casy Typ 1* der Fa. Schärfe System durchgeführt. Das Messprinzip basiert auf einer Widerstandsmessung, die mit einer Pulsflächenanalyse kombiniert ist.

### *Durchführung*

Nachdem das WST-Reagenz (siehe 3.5.1) von den Proben abgezogen wurde, wurden diese zweimal mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurde jeweils 1 ml Accutase auf die Probe pipettiert und für 15 min bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Die Accutase-Wirkung wurde mit jeweils 1 ml DMEM Medium gestoppt. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und im Zellzähler gemessen. Dies geschah mit einer 1 ml Eppendorf Pipette durch 20 maliges Auf- und Abpipettieren. Nach weiterem fünfmaligen Auf- und Abpipettieren mit der 100 µl Eppendorf Pipette wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml sterile isotone Lösung gegeben und sofort im Zellzähler *Casy* gemessen.

### **Rasterelektronenmikroskop-Analyse**

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden die Zellen getrocknet. Um die Kritisch-Punkt-Trocknung möglich zu machen, ist eine Vorbehandlung der Zellen notwendig, bei der das in den Zellen enthaltene Wasser durch Aceton

ersetzt wird. Die Vorbereitung der Zellen für die Kritisch-Punkt-Trocknung läuft wie folgt ab:

- 1) Waschen der Proben: Zwei- bis viermaliges Waschen der Proben mit PBS-Puffer in der 24-Well-Platte
- 2) Fixieren und Stabilisieren der Zellen: Die Proben wurden auf Eis mit 6 % Glutaraldehyd (Verdünnung aus 4,8 ml 25 % Glutaraldehyd und 15,2 ml PBS) überschichtet und für 15 min auf Eis fixiert
- 3) Entwässerung der Präparate: Umlegen der Schäume in Glas, PBS-Reihe auf Eis: Die Proben wurden fünfmal für jeweils 5 min mit 5 ml PBS gewaschen

Auf die PBS-Reihe folgt die Aceton-Reihe bei Raumtemperatur:

30 % Aceton für 15 min, 50 % Aceton für 20 min, 70 % Aceton für 30 min, 90 % Aceton für 45 min, 100 % Aceton für 30 min, Die Proben wurden weitere sechsmal mit 100 % Aceton gewaschen und konnten in der sechsten Acetonstufe bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

#### *Kritisch-Punkt-Trocknung*

Um die auf den Probekörpern gewachsenen Zellen im REM betrachten zu können, müssen diese mittels der Kritisch-Punkt-Trocknung getrocknet werden, um sie vor Zerstörung zu schützen. Bei der Kritisch-Punkt-Trocknung wird die Flüssigkeit-Gas-Phase nicht durchlaufen, was zum Vorteil hat, dass eine Deformation bzw. Zerstörung der Zellstrukturen durch die Oberflächenspannung vermieden wird. Bei der Kritisch-Punkt-Trocknung wird das in den Zellen enthaltene Aceton durch überkritisches CO<sub>2</sub> ersetzt ( $T_{kritisch} = 31 \text{ °C}$ ;  $p_{kritisch} = 7,375 \text{ MPa}$ )

Dieser Austausch läuft wie folgt ab: Die Druckkammer wurde mit 100 %igem Aceton aufgefüllt. Die Proben wurden in Probenkörbchen in die Druckkammer gegeben und am Boden fixiert. Die Druckkammer wurde fest verschlossen, das CO<sub>2</sub>-Ventil geöffnet und komplett mit CO<sub>2</sub> gefüllt. Nach 5 min wurde das Aceton/ CO<sub>2</sub> Gemisch abgelassen bis nur noch die Proben mit Flüssigkeit bedeckt waren, dann wurde die Kammer erneut mit CO<sub>2</sub> gefüllt. Dieser Vorgang wurde zehnmal wiederholt bis das gesamte Aceton gegen flüssiges CO<sub>2</sub> ausgetauscht war. Beim zehnten Mal wurde das Gemisch erneut abgelassen bis die Proben gerade noch von Flüssigkeit bedeckt sind. Daraufhin wurde die Druckkammer

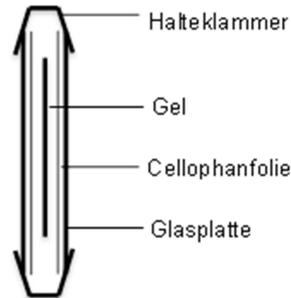
auf 40-42 °C erhitzt, dies dauert ca. 15 min. Bei 31 °C war der kritische Punkt erreicht und die Flüssigkeit geht in die Gasphase über und wurde langsam aus der Druckkammer abgelassen. Nun wurden die Proben aus der Druckkammer entnommen und so bald wie möglich mit Gold bedampft. Nach der Gold Bedampfung waren die Proben bereit im REM betrachtet zu werden.

#### ***Life Dead Färbung***

Die Life Dead Färbung zeigt das Verhältnis zwischen lebenden und toten Osteoblasten auf den besiedelten Proben an. Dazu wurde folgende Lösung hergestellt: 4 ml PBS, 8 µl Calcein 1 mM Stocklösung, 2 µl Ethidium Homodimer 2 mM. Dabei betrug die Endkonzentration der beiden Substanzen 2 µM Calcein und 1 µM Ethidium Homodimer. Von dieser Lösung wurde nun ca. 1 ml auf jede Probe pipettiert und dann für 30 min im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ihren Anteil an lebenden und toten Zellen hin untersucht.

#### ***Polyacrylamid-Gelelektrophorese***

Zur Durchführung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden neun verschiedene Lösungen benötigt. Vor Versuchsbeginn wurden die Glasplatten sowie die Abstandhalter und Kämmen der Gelkammer gründlich mit 96 % Ethanol gereinigt. Zwischen die Glasplatten wurden rechts und links Abstandhalter gelegt und mit Halteklammern fixiert, so dass die Glasplatten aufrecht stehen konnten und die Oberseite der Glasplatten bündig abschlossen (vgl. Abb.4). Die Unterseite der Glasplatten wurde mit Klebefilm verschlossen. Nun wurde 1 % Agarose in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Die flüssige, heiße Agarose wurde zum Abdichten der Ränder zwischen den Glasplatten verwendet. Dazu wurde die Agarose unter Verwendung einer Pasteurpipette am Rand zwischen die Glasplatten pipettiert, sodass ca. 3 mm Agarose das Gel nach unten hin abdichteten. Anschließend wurde die Höhe des Trenngels mit wasserfestem Filzschreiber auf der Glasplatte markiert. Dabei befand sich die obere Kante ca. 4 mm unterhalb des Kammes.



**Abbildung 4** Versuchsaufbau Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das *Trenngel* (12% Acrylamid) wird aus 4 ml Lösung 1 (0,3 Bis-acrylamid 2K, 200 ml Acrylamid 4K), 2,5 ml Lösung 3 (3 M Tris-HCL, pH 8,8, 0,4 % Sodium dodecyl sulfate), 3,4 ml H<sub>2</sub>O reinst, 100 µl Lösung 5 (10 % Ammoniumpersulfat-Lösung in Reinstwasser (APS)), 5 µl TEMED hergestellt. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung gut geschwenkt. Die Acrylamidlösung wurde bis zur Markierung eingefüllt. Das Gel wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette vorsichtig mit Wasser überschichtet. Das Gel wurde nach ca. 20 min fest und das Wasser wurde wieder abgeschüttet. Das *Sammelgel* besteht aus 650 µl Lösung 2 (Acrylamid 4K-Lösung 30%), 1,25 ml Lösung 4 (0,75 M Tris-HCL, pH 6,8, 0,4 % Sodium dodecyl sulfate), 3,1 ml H<sub>2</sub>O reinst, 150 µl Lösung 5 (10 % Ammoniumpersulfat-Lösung in Reinstwasser (APS)), 5 µl TEMED. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung gut geschwenkt. Die Lösung wurde bis an den oberen Rand der Glasplatte auf das Trenngel gegossen. In das frisch gegossene Sammelgel wurde langsam der Kamm gesteckt. Dabei wurde die Bildung von Luftblasen vermieden. Nach ca. 20 min war das Gel fest. Die Proben wurden viermal mit PBS gewaschen und dabei leicht geschwenkt. Daraufhin wurden die Proben mit jeweils 200 µl Probenpuffer (Lösung 9: *Probenpuffer nach Lämmli, 1970*<sup>89</sup> (60 mM Tris-HCL, pH 6,8, 10 % Glycerin, 5 % Sodium dodecyl sulfate, 10 % β-Mercaptoethanol)) suspendiert und für 5 min bei 95 °C im Heizblock gekocht. Daraufhin wurden jeweils 3 µl High und Low Marker in 60 µl Probenpuffer (Lösung 9 s.o.) gelöst und bei 95 °C für 5 min gekocht. Nachdem das Belegungsschema (vgl. Tab. 5) für die Gel-taschen angefertigt war, wurde der Kamm vorsichtig aus dem festen Gel entfernt. Nach Entfernung des Klebe-Filmes und der Halteklammern wurde das Gel in die Gelkammer gestellt. In die untere Kammer wurde der Elektrophoresepuffer (Lösung 6: 50 mM Tris-HCL, pH 8,8; 0,38 M Glycin, 0,1 % Sodium dodecyl

sulfate) gegeben, sodass das Gel im Puffer stand. Anschließend wurde das Gel fest angeschraubt und die obere Kammer mit Puffer gefüllt. Nachdem die Proben aus dem Heizblock entnommen und kurz zentrifugiert wurden, wurden die Proben nach folgenden Belegungsschemata in die Gelkammern mittels einer Eppendorfpipette überführt.

**Tabelle 5** Belegungsschema der Gelkammer für die Elektrophorese

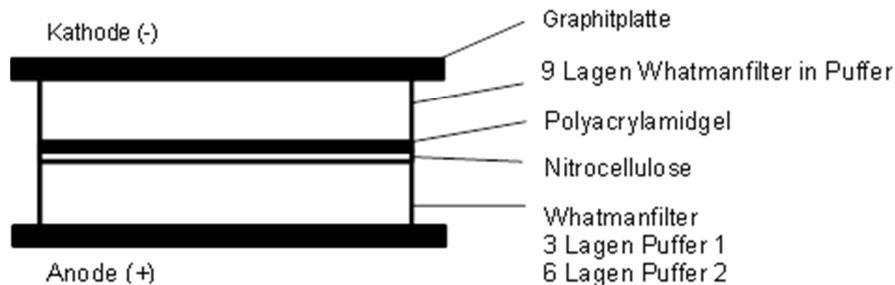
Gel 1	H Marker	L 30 µl	* Bromphenolblau 2 µl	PS 50 µl	HA 80 µl	* Bromphenolblau 2 µl
Gel 2	H Marker	L 30 µl	* Bromphenolblau 2 µl	Mg 80 µl	Struvit pH 10,5 80 µl	* Bromphenolblau 2 µl

Nach der Befüllung der Gelkammern wurde die Elektrophoresekammer an die Spannungsquelle angeschlossen, dabei bildete die obere Kammer die Kathode und die untere Kammer die Anode. Bei einer Stromstärke von 80 mA bei 2 Gelen betrug die Laufzeit ca. 90-120 min. Nach Beendigung der Laufzeit war die Lauffront, die durch das Bromphenolblau markiert wurde, am unteren Rand angelangt. Nun wurde der Strom abgeschaltet und die Gelkammer abgebaut. Nach der Trennung der Glasplatten konnte das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel abgelöst werden. Zur Orientierung des Belegungsschemas wurde die rechte untere Ecke des Gels abgetrennt. Das Trenngel wurde im Western Blot weiterverarbeitet.

### **Western Blot**

Für die Durchführung des Western Blots wurde das bei der Gelelektrophorese entstandene Gel ausgemessen und für 15 Min. in Graphitblotpuffer 3 (25 mM Tris-HCl, 40 mM DL-Norleucin, 20 % Methanol) gelegt. Aus Whatmanpapier wurden 18 Blatt in Gelgröße, 5,8 cm x 8,3 cm, zurechtgeschnitten sowie ein Blatt Nitrozellulose. Für den Blottingvorgang wurde folgender Stapel aufgebaut: 3 Blatt Whatmanfilter wurden in Graphitblotpuffer 2 (300 mM Tris-HCl, 20 % Methanol) getränkt und auf die untere Platte der Blotapparatur gelegt und mit einem Reagenzglas glatt gerollt und mögliche Luftblasen entfernt. Auf diese wurden 3 Blatt in Graphitblotpuffer 2 getränkte Whatmanfilter aufgelegt und glatt gerollt. Nun folgten 3 Blatt Whatmanfilter, die in Graphitblotpuffer 1 (25 mM Tris-HCl, 20 % Methanol) getränkt wurden. Diese wurden auf die vorhergehenden Whatmanfil-

ter aufgelegt und glatt gerollt. Nachdem die Nitrocellulose in Graphitblotpuffer 1 getränkt wurde, wurde diese sorgfältig auf den Whatmanfilter-Stapel gelegt. Auch bei der Nitrocellulose wurde die rechte untere Ecke analog zum Polyacrylamidgel abgeschnitten. Auf die Nitrocellulose wurde vorsichtig das Polyacrylamidgel gelegt. Nun folgten wieder 3 Lagen mit je 3 Blatt in Graphitblotpuffer 3 getränkte Whatmanfilter, diese wurden jeweils glatt gerollt. Zum Abschluss wurde die obere Graphitplatte der Blotkammer aufgelegt (vgl. Abb. 5).



**Abbildung 5** Aufbau der Blotkammer

Die Graphit-Blotkammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen, dabei diente die obere Graphitplatte als Kathode die untere als Anode. Die anzulegende Stromstärke wurde aus der Höhe und Breite des Polyacrylamidgels berechnet. Pro  $\text{cm}^2$  der Blotfläche wurde eine Stromstärke von 0,8 mA angelegt. Diese betrug bei einem Stapel somit 38,5 mA, und bei zwei Stapeln 77 mA. Nach 90 Min. wurde die Spannungsquelle ausgeschaltet und die obere Graphitplatte abgenommen. Die 9 Lagen Whatmanfilterpapier wurden verworfen und das Gel in Comassieblau gefärbt und wieder entfärbt. Die Nitrocellulosemembran wurde für 2 Min. in Ponceau S eingelegt und hiernach mit Reinstwasser auf einer Glasplatte abgespült. Dadurch wurden die Proteinbanden sichtbar und ein vollständiger Transfer ließ sich überprüfen. Die Probenspuren PS, HA, Mg, Struvit pH 10,5 wurden nun in Streifen geschnitten und vorsichtig mit Bleistift beschriftet. Die Probenspuren wurden zum Entfärben in TBST 10 min auf dem Wippschüttler gewaschen. Nachdem der Puffer abgeschüttet wurde, erfolgte die Absättigung über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  in Absättigungslösung. Von den erhaltenen Nitrocellulosestreifen wurde jeweils ein Streifen jeder Probe für die Inkubation mit den Antikörpern verwendet. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für jeweils einen Streifen jeder Probe mit monoklonalem Antikörper

per gegen BSP (Mouse Anti Bone Sialoprotein), alkalischer Phosphatase sowie mit monoclonalem Antikörper gegen Vinkulin. Sowohl das monoclonale anti  $\beta$ -Tubulin als auch das monoclonale anti Vinkulin wurde in einem Verhältnis 1:200 mit Absättigungslösung verdünnt. Das anti BSP sowie die anti alkalische Phosphatase wurden in einem Verhältnis von 1:1000 mit Absättigungslösung verdünnt. Die Nitrocellulose wurde für die Inkubation zwischen Haushaltseinschweißfolie gelegt und diese direkt neben der Cellulose an drei von vier Seiten zusammenschweißt. Nun wurde die jeweilige Antikörperlösung direkt in die offene Seite gefüllt. Nachdem die entstandenen Luftblasen vorsichtig nach oben herausgedrückt wurden, wurde die vierte Seite ebenfalls verschweißt. Die eingeschweißten Nitrocellulosestreifen wurden mit Klebeband auf einem Drehschüttler befestigt und für 90 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 90 Min. wurde die Folie wieder aufgeschnitten und der Blot vorsichtig aus der Folie genommen. Die Nitrocellulosestreifen wurden dreimal für jeweils 10 Min. in TBST auf dem Wippschüttler gewaschen. Nun folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper. Dieser wurde sowohl für die Nitrocellulosestreifen, die als erstes mit monoclonalem anti  $\beta$ -Tubulin inkubiert, als auch für die Streifen, die als erstes mit monoclonalem BSP inkubiert wurden, verwendet. Als zweiter Antikörper wurde Biotin-SP-conj. rabbit anti mouse in einer 1:5000 Verdünnung mit TBST verwendet. Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgte für 60 Min. bei Raumtemperatur in einer Glasschale in 15 ml der Verdünnung auf dem Wippschüttler. Anschließend wurden die Streifen erneut dreimal für 10 Min. in TBST auf dem Wippschüttler gewaschen. Für die Inkubation mit Streptavidin wurde an Qdot 625 gekoppeltes Streptavidin in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST verwendet. Die Inkubation erfolgte für 60 Min. bei Raumtemperatur in einer Glasschale in 1 ml der Verdünnung auf dem Wippschüttler. Anschließend wurden die Streifen erneut dreimal für 10 Min. in TBST auf dem Wippschüttler gewaschen. Daraufhin wurden die fluoreszierten Streifen unter der UV-Lampe sichtbar gemacht und fotografiert.

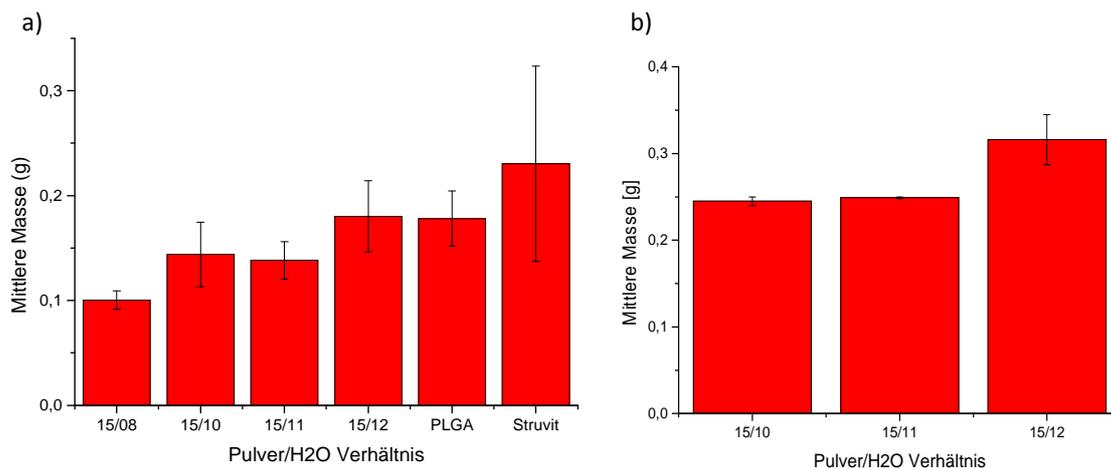
## 4 ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Versuche dargestellt und erläutert.

### 4.1 Replika Verfahren

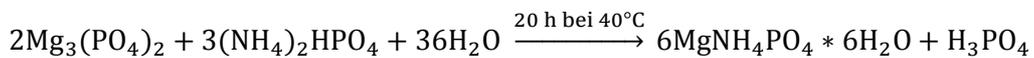
#### *Pulvermenge im Schlicker*

Um die aufgenommene Pulvermenge auf den gesinterten Schäumen zu erfassen, wurde die mittlere Masse von jeweils 10 gesinterten Proben bestimmt, um mögliche Höhenunterschiede der PU-Schäumen zu mitteln. Wie in Abb. 6a zu erkennen ist, ist ein annähernd linearer Anstieg der Massen mit dem steigenden  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$  Verhältnis erkennbar. PU-Schäume, die mit einem niedrig viskosen Schlicker, also mit einer geringeren Pulvermenge ( $8 \text{ g Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O} / 15\text{ml H}_2\text{O}$ ) infiltriert wurden, besitzen auch eine geringere Masse. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass PU-Schäume zwar mehr niedrig viskosen Schlicker aufnehmen, dieser jedoch bei Kompression der Proben auch wieder leichter verdrängt wird. Je höher die Viskosität des Schlickers, desto weniger Schlicker wurde durch Kompression aus dem PU-Schaum entfernt. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl der verstopften Poren mit Anstieg der Pulvermenge im Schlicker zunimmt.



**Abbildung 6** a) Mittlere Masse der gesinterten MgP-Schäume (Grünkörper von 0,5 cm Höhe), der PLGA infiltrierten Schäume sowie der zu Struvit umgewandelten Schäume abhängig von ihrem Pulver/H<sub>2</sub>O Verhältnis; b) Mittlere Masse der gesinterten MgP-Schäume (Grünkörper von 1 cm Höhe) abhängig von ihrem Pulver/ H<sub>2</sub>O Verhältnis

Die mittlere Masse der gesinterten Schäume, deren Grünkörper 1 cm hoch war, entspricht in etwa den doppelten Werten der mittleren Masse der Proben mit einer Ausgangshöhe von 0,5 cm (vgl. Abb. 6b). Durch Umwandlung der Schäume zu Struvit oder Infiltration mit PLGA steigt auch ihre Masse an (vgl. Abb.6a). Die Massenzunahme der zu Struvit umgewandelten Proben mit 0,18 g ist am höchsten. Dagegen zeigt die Infiltration der Proben mit PLGA nur einen geringen Massenzuwachs von 0,04 g. Somit sind die mit PLGA infiltrierten Proben in ihrer Masse nur um ca. 30 % angestiegen. Durch die Umwandlung der zuvor hergestellten MgP-Schäume zu Struvit lagern sich Kristalle an die vorhandene Steggeometrie an und stabilisieren diese. Dabei läuft folgende Reaktionsgleichung ab:



Durch die Umwandlung der MgP-Schäume entsteht eine Massenzunahme von 74 mg bei einer mittleren Ausgangsmasse von  $156 \pm 28,5$  mg. Anhand der Massenzunahme von 74 mg ist erkennbar, dass die Reaktion zu Struvit nicht vollständig ist, da bei einer vollständigen Reaktion die Massenzunahme 120 mg betragen würde. Durch Berechnung des Struvit-Anteils mit Hilfe der Reaktionsgleichung ergab sich im Komposit ein Struvit-Anteil von 73,23 %.

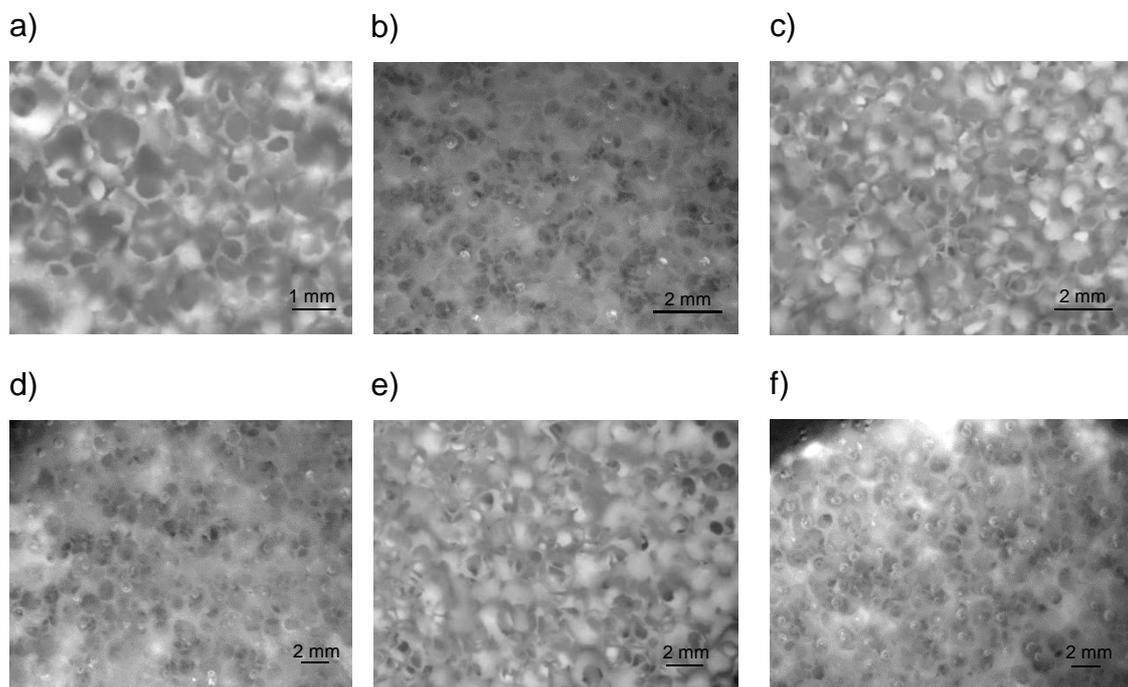
### **Interkonnektivität**

Die Interkonnektivität der keramischen Schäume lässt sich über das Verhältnis an offenen zu geschlossenen Poren ermitteln. Um dieses Verhältnis zu errechnen, wurden mikroskopische Aufnahmen der keramischen Schäume als auch von den angefertigten Schliffbildern angefertigt (vgl. Abb. 7a-f). Dabei wurde der Einfluss der unterschiedlichen Pulvermenge auf die Porosität der Schäume untersucht.

**Tabelle 6** Gezählte offene und geschlossene Poren der gesinterten Schäume, sowie Verhältnisbildung offener Poren zu den gesamten Poren (gesamt=offene+ geschlossene) in %

Verhältnis $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Wasser/Pulvermenge	15/10	15/11	15/12
Anzahl der offenen Poren		~239	~252	~283
Anzahl der geschlossenen Poren		~97	~147	~178
Verhältnisbildung offene Poren / gesamte Poren (offen+geschlossen) in %		~71,1	~63,2	~61,4

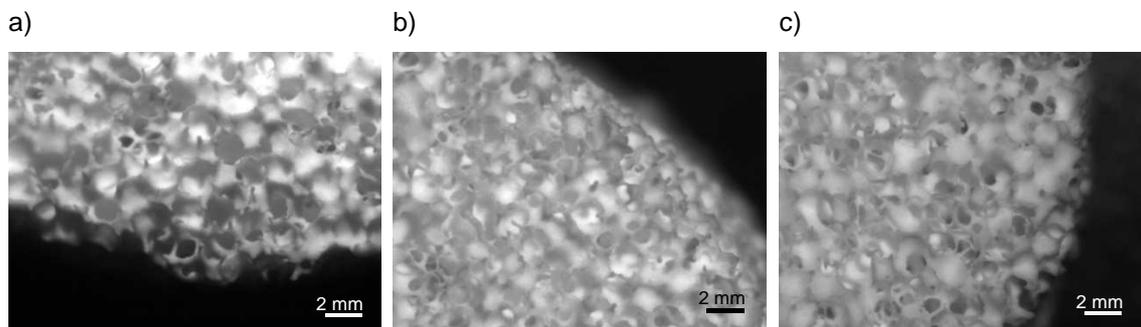
Die offenen und geschlossenen Poren konnten anhand der Aufnahmen gezählt, und unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Vergrößerung auf die mittelwertige Gesamtfläche der Schäume von  $98,52 \text{ cm}^2$  hochgerechnet werden (vgl. Tab. 6). Tabelle 6 verdeutlicht, dass die Pulvermenge einen Einfluss auf die Porosität der Schäume hat. Sowohl die offenen, als auch die geschlossenen Poren steigen bei höherer Pulvermenge an. Jedoch überwiegt die Zunahme der verschlossenen Poren.



**Abbildung 7** a) Mikroskopische Aufnahme bei 12,5 fache Vergrößerung der Oberfläche eines MgP-Schaums (15 ml/10 g); b) Mikroskopische Aufnahme der inneren Porenstruktur des MgP-Schaumes (15 ml/10 g) bei 6,3 fache Vergrößerung eines Schliffpräparates; c) Mikroskopische Aufnahme bei 8 fache Vergrößerung der Oberfläche eines von MgP-Schaums (15 ml/11 g); d) Mikroskopische Aufnahme der inneren Porenstruktur des MgP-Schaumes (15 ml/11 g) bei 6,3 fache Vergrößerung eines Schliffpräparates; e) Mikroskopische Aufnahme bei 8 fache Vergrößerung der Oberfläche eines von MgP-Schaums (15 ml/12 g); f) Mikroskopische Aufnahme der inneren Porenstruktur des MgP-Schaumes (15 ml/12 g) bei 6,3 facher Vergrößerung eines Schliffpräparates

Bei einer Pulvermenge von  $10 \text{ g Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$  sind 71,1 % Poren auf der gesamte Oberfläche des gesinterten Schaums offen. Dagegen sind bei einer Pulvermenge von 11 g und 12 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$  ca. 10 % weniger offene Poren als bei einer Pulvermenge von 10 g auf den gesinterten Schäumen vorhanden. Daraus ergibt sich, dass die Pulvermenge und somit die Schlickerkonsis-

tenz einen Einfluss auf die Interkonnektivität der keramischen Schäume hat. Je geringer die Pulvermenge, das heißt je niedriger die Viskosität des Schlickers ist, desto offener lassen sich die Schäume gestalten. Genaueres Betrachten der Ränder der einzelnen keramischen Proben ergab, dass dieser Bereich vermehrt geschlossene als offene Poren aufweist (vgl. Abb. 8). Besonders deutlich ist dies bei einer Pulvermenge von 12 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ . Es ist davon auszugehen, dass dies durch die Schlickerkonsistenz und die Art der Herstellung bedingt ist. Allgemein ist festzustellen, dass die offene Porosität zum Rand hin abnimmt.

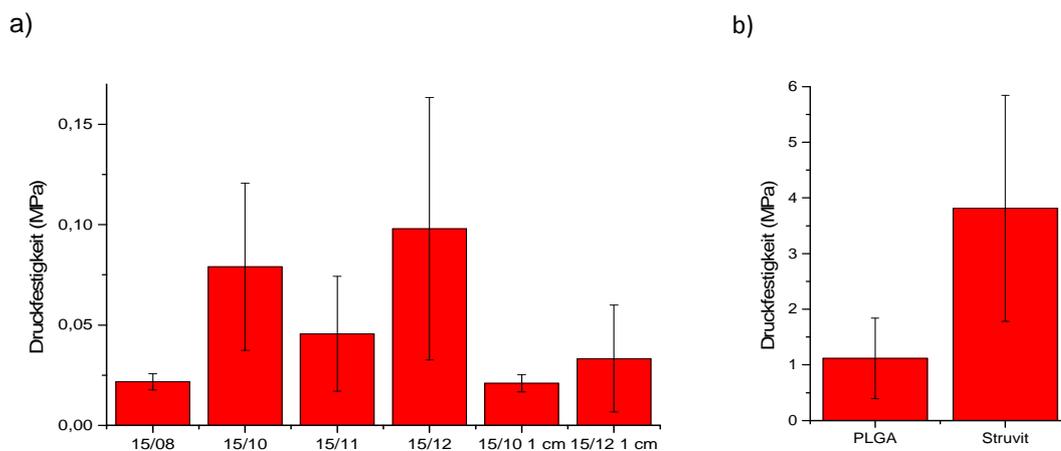


**Abbildung 8** Mikroskopische Aufnahme des Randbereiches der in Abbildung 7 gezeigten MgP-Schäume a) MgP-Schaum (15 ml/ 10 g) bei 8 facher Vergrößerung; b) MgP-Schaum (15 ml/ 11 g) bei 8 facher Vergrößerung; c) MgP-Schaum (15 ml/ 12 g) bei 8 facher Vergrößerung

### ***Mechanische Stabilität***

Mit Druckfestigkeitsmessungen wurde der Einfluss der Pulvermenge an  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  auf die mechanische Stabilität der Magnesiumphosphat-schäume (MgP-Schäume) untersucht. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Druckmessungen der Proben genauer dargelegt und miteinander verglichen. Die unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}/\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  Verhältnisse wirken sich auf die mechanische Stabilität der MgP-Schäume aus. MgP-Schäume mit einer Pulvermenge von 8 g in 15 ml Wasser wiesen eine sehr geringe Druckfestigkeit auf. Sie betrug nur ca. 0,024 MPa. Somit waren die keramischen Schäume sehr fragil und brüchig (vgl. Abb. 9a). Die Proben, die bei gleichbleibender Wassermenge mit einer Pulvermenge von 11 g hergestellt wurden, zeigten mit 0,046 MPa eine rund doppelt so hohe Festigkeit. Eine sehr viel höhere mechanische Stabilität zeigten die Proben mit einem  $\text{H}_2\text{O}/\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  Verhältnis von 15 ml zu

10 g. Bei den Messungen ergab sich eine Festigkeit von 0,095 MPa. Im ähnlichen Bereich lagen die Proben, die mit einer Pulvermenge von 12 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  hergestellt wurden. Die mechanische Stabilität lag um nur 0,003 MPa höher als bei den Proben 15 ml zu 10 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  und betrug 0,098 MPa. Somit ist festzustellen, dass die Pulvermenge im Schlicker sich auf die Stabilität der keramischen Schäume auswirkt (s. Abb. 9a). Auch der subjektive Eindruck bestätigt, dass die Proben mit einer höheren Pulvermenge eine höhere mechanische Stabilität besitzen.



**Abbildung 9** Druckspannung der verschiedenen MgP-Schäume im Vergleich bei 30 % Verformung a) Druckfestigkeit der unterschiedlichen MgP-Schäume bei einer Ausgangshöhe des Grünkörpers von 0,5 cm, die beiden rechten Balken (15/10 1 cm; 15/12 1 cm) zeigen die Druckfestigkeit der MgP-Schäume bei einer Ausgangshöhe des Grünkörpers von 1 cm. b) Druckfestigkeit der mit PLGA infiltrierten und zu Struvit umgewandelten Schäume im Vergleich

Jedoch sind die Messungen mit starken Schwankungen behaftet, so dass der Wert für das Wasser/Pulver-Verhältnis 15/11 von dieser Aussage abweicht. Ursachen für diese Schwankungen liegen möglicherweise im manuellen Verfahren der Probenherstellung. Eine weitere Ursache für die Schwankung könnte darüber hinaus sein, dass die beiden Probenoberflächen nicht exakt planparallel zu den Prüfstempeln lagen. Um eine planparallele Oberfläche zu erhalten wurden die Grünkörper auf 1 cm erhöht. Obwohl die Oberflächen der gesinterten Schäume parallel zueinander waren, wirkte sich dies nicht auf die mechanische Stabilität der gesinterten Schäume aus (s. Abb. 9a). Die mechanische Stabilität nahm überraschenderweise im Vergleich zu den ursprünglichen Proben sogar etwas ab. Keramische Schäume mit einer Pulvermenge von 10 g

bzw. 12 g wiesen eine Abnahme von 0,074 MPa bzw. 0,065 MPa auf. Sowohl die zu Struvit umgewandelten MgP-Schäume als auch die PLGA infiltrierte Schäume wurden auf ihre mechanische Festigkeit untersucht und mit denen der MgP-Schäume verglichen. Hierbei zeigte sich eine deutliche Steigerung der Druckfestigkeit. Die zu Struvit umgewandelten Proben wiesen eine Festigkeitszunahme von ca. 3,71 MPa auf. Bei PLGA infiltrierte Schäumen war eine mechanische Stabilität von ca. 1,1 MPa zu beobachten. Im Vergleich zu den MgP-Schäumen ist dies eine Festigkeitszunahme von ca. 1 MPa. Durch die Modifikationen der MgP-Schäume mit PLGA oder Struvit ist eine deutliche Steigerung der mechanischen Stabilität ersichtlich. Im Vergleich wird deutlich, dass die zu Struvit umgewandelten Schäume eine höhere Stabilität aufweisen, als die mit PLGA infiltrierte Schäume.

### **Relative Dichte**

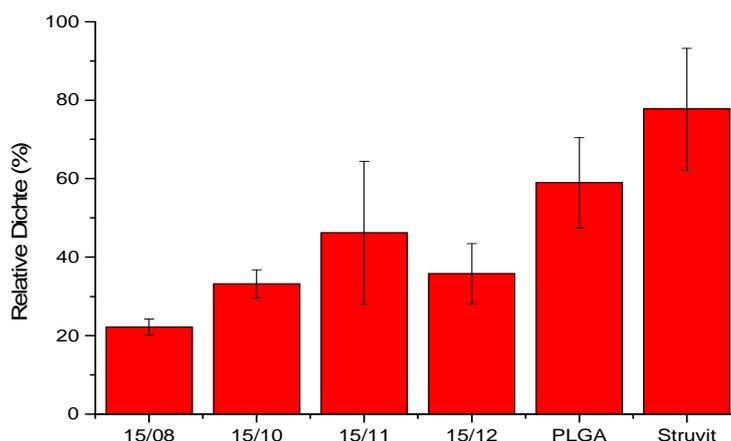
Die Porosität der Proben lässt sich über die relative Dichte der Proben darstellen. Die relative Dichte wurde über die Dichte der Ausgangsprobe und der Dichte von Farringtonit  $\rho = 2,75 \text{ g/cm}^3$  mittels folgender Formel errechnet:

$$\frac{\rho_{\text{Ausgangsprobe}}}{\rho_{\text{Farringtonit}}} \times 100\%$$

Die relative Dichte der Schäume steigt mit der Menge an  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ . MgP-Schäume mit einer Pulvermenge von 11 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  besitzen mit 46,21 % die höchste relative Dichte. Eine hohe relative Dichte sollte eine hohe mechanische Festigkeit der keramischen Schäume zur Folge haben. Dies weicht bei einem Wasser/Pulververhältnis von 15/11 ab. Jedoch kann diese Abweichung angesichts der großen Standardabweichung ausgeklammert werden. Im Vergleich dazu besitzen die Proben mit einer Pulvermenge von 10 g und 12 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  eine ähnliche relative Dichte von 33,17 % bzw. 35,82 %. Dies korreliert mit den Druckfestigkeitswerten der Proben (vgl. Abb. 9a). Die höchste Porosität, sowie auch parallel die niedrigste mechanische Festigkeit, weisen die keramischen Schäume mit einer Pulvermenge von 8 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  auf. Durch die Umwandlung der MgP-Schäume zu Struvit nimmt die Masse durch Anlagerung von Struvitkristallen auf den MgP-Schäumen zu. Die relative Dichte der Proben lässt sich somit neu errechnen.

Die relative Dichte wurde über die Dichte der Ausgangsprobe und einer entsprechend der Mengenanteile gemittelten Dichte ( $\sigma_{(\text{Struvit/Farr.})}=1,989 \text{ g/cm}^3$ ) aus 73,23 % Struvit und 26,77 % Farringtonit ( $\rho_{(\text{Struvit})}= 1,711 \text{ g/cm}^3$ ;  $\rho_{(\text{Farringtonit})}= 2,75 \text{ g/cm}^3$ ) mittels folgender Formel errechnet:  $\frac{\rho_{\text{Ausgangsprobe}}}{1,989} \times 100 \%$

Die Mengenanteile wurden durch die Reaktionsgleichung der Struvitbildung und den Molmassen von Struvit und Farringtonit berechnet. Die relative Dichte beträgt 77 %. Somit ist die Porosität der Struvit-Schäume im Vergleich zu den MgP-Schäumen um ca. 40 % niedriger (Abb. 10). Dies lässt sich durch die Bildung von Struvitkristallen an der Oberfläche erklären. Auch durch die Infiltration mit PLGA nimmt die Masse der Proben zu und erhöht die relative Dichte der Proben. Die relative Dichte wurde, wie bei den mit PLGA infiltrierte MgP-Schäumen, über die Dichte der Ausgangsprobe und einer entsprechend der Mengenanteile gemittelten Dichte ( $\sigma_{(\text{PLGA/Farr.})}=1,725 \text{ g/cm}^3$ ) aus 66,4 % PLGA und 33,6 % Farringtonit ( $\rho_{(\text{PLGA})}= 1,206 \text{ g/cm}^3$ ;  $\rho_{(\text{Farringtonit})}= 2,75 \text{ g/cm}^3$ ) mittels folgender Formel errechnet:  $\frac{\rho_{\text{Ausgangsprobe}}}{1,725} \times 100\%$  Die entsprechenden Mengenanteile wurden aus dem Probenvolumen ermittelt. Die PLGA infiltrierte Schäume weisen eine relative Dichte von 58,9 % auf. Dies bedeutet eine nur geringe Einbuße der Porosität der Schäume. Die relative Dichte der PLGA infiltrierte Schäume liegt somit ca. 16 % unter der der zu Struvit umgewandelten Schäumen.



**Abbildung 10** Relative Dichte der gesinterten MgP-Schäume, PLGA infiltrierte Schäume sowie der zu Struvit umgewandelten Schäume. Die relative Dichte veranschaulicht die Porosität der Schäume.

## 4.2 Durch Albumin geschäumte Mg-Phosphate

### **Mechanische Stabilität**

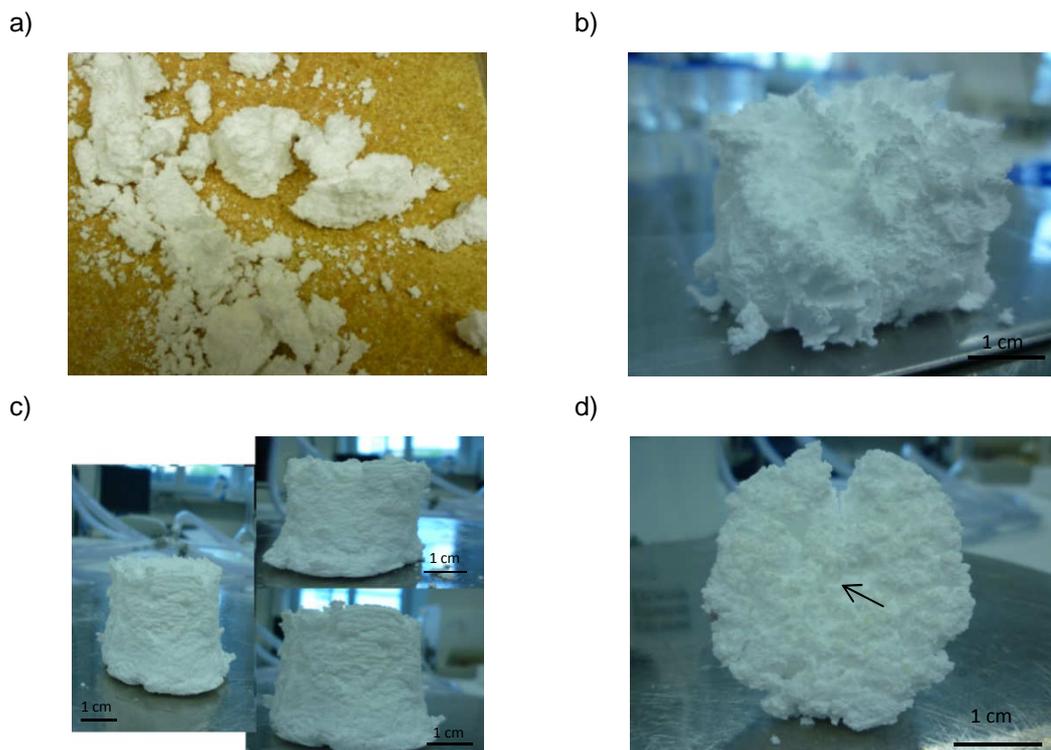
Um einen stabilen keramischen Schaum mit Hilfe von Albumin herzustellen, wurden unterschiedlich viskose Schlicker hergestellt. Dabei wurden unterschiedliche Pulvermengen von 9 g bis 12 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  verwendet (s. Tab. 7). Auch die Tropfenmenge an  $\text{NH}_4\text{OH}$  wurde variiert.

**Tabelle 7** Auflistung der unterschiedlichen Schlickerkombinationen, die Lagerungen der Grünkörper während der Trocknungsphase. Sowie die Ergebnisse der einzelnen Versuchskonstellationen.

Schlickerzusammensetzung $\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}/\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Lagerung	Ergebnis
15 / 3 / 9	stehend	Zerfallen, im mittleren Bereich noch etwas erhalten; keine einheitliche Form
15 / 3 / 11	stehend	zerfallen
15 / 4 / 11	stehend	Boden plan, im Inneren deutlich Risse erkennbar
15 / 5 / 11	stehend	Risse am Boden, keine einheitliche Form
15 / 5 / 12	stehend	Stabil, Risse in der Mitte
15 / 5 / 11	Auf Kopf stehend und 15 min im Trockenschrank bei 40°C	Keine sichtbaren großen Risse mehr vorhanden; Boden plan; stabiler
15 / 5 / 11	Auf dem Kopf stehend und 10 min im Trockenschrank bei 40°, Papierform entfernt	Zylindrische Form; Boden wieder leichte Risse in der Mitte; Zieht sich bis ins Innere durch
15 / 5 / 11	Seitlich liegend + 15 min im Trockenschrank bei 40°C	Seite platt gedrückt; Risse seitlich bis ins Innere, deutlich zu erkennen, dass es nicht zu einem "ganzen" Stück gesintert wurde

Die Schlickerkonsistenz ist für die Stabilität des ungesinterten Albumin-Schlicker Schaums von wesentlicher Bedeutung. Bei einer zu dünnflüssigen Konsistenz verliert der aufgeschlagene Albuminschaum seine Stabilität. Andersherum schadet auch ein zähfließender Schlicker dem Albuminschaum. Dieser ist zu schwer und hat zur Folge, dass der instabile Schaum zusammenfällt. Deshalb musste ein Mittelmaß der Viskosität des Schlickers gefunden werden. Aus diesen verschiedenen Versuchen kann man herauslesen, dass eine Schlickerkombination von 15 ml  $\text{H}_2\text{O}$  / 5 Tropfen  $\text{NH}_4\text{OH}$  / 11 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  die

besten Ergebnisse erzielt. Auch die unterschiedliche Lagerung des Albumin-Schlicker Schaumes während des Sintervorganges wurde untersucht. Eine seitliche Lagerung zeigte keinerlei Besserung hinsichtlich der Rissbildung und somit der mechanischen Stabilität. Dabei war eine Sinterung auf dem Kopf stehend ohne Papierform von Vorteil. Die Schäume hatten ihre Form in etwa behalten, konnten jedoch in ihrer mechanischen Stabilität als Einheit nicht überzeugen. Bei Belastung durch Fingerdruck zerfielen die keramischen Schäume in kleinere Einzelteile. Das Problem der einheitlichen Formgebung konnte trotz unterschiedlicher Lagerungen, Schlickerkonsistenzen und Verwendung verschiedener Formen nicht gelöst werden. Auch der Versuch mit dem Ziel, nach Sinterung der Albuminschäume eine einheitliche Form über einen Ausstecher zu erhalten, konnte nicht realisiert werden, da die keramischen Schäume in sich zu instabil waren (siehe Abb. 11a).

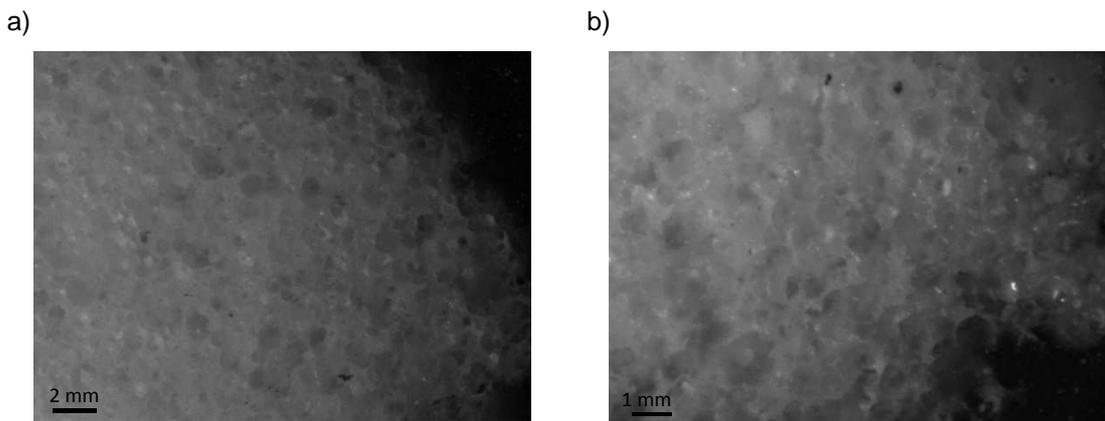


**Abbildung 11** a) Versuch der Formgebung der gesinterten Albumin Schäume durch einen Ausstecher, b) Albumin Schaum (15/5/11) nach Sinterung in seitlicher Lage, der vor der Sinterung für 15 min bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet wurde; c) Albumin Schaum (15/5/11) nach Sinterung des Grünkörpers auf dem Kopf stehend, vor der Sinterung wurde der Grünkörper für 15 min bei 40 °C im Trockenschrank getrocknet; d) Zustand der Unterseite eines Albumin Schaums 15/5/11 nach der Sinterung

In Abb. 11d ist die Rissbildung (siehe Pfeil) an der Unterseite der gesinterten Schäume sichtbar. Durch die Risse in den Proben konnte die Druckfestigkeit nicht sinnvoll gemessen werden.

### **Mikroskopische Analyse**

Auf den mikroskopischen Aufnahmen der Schliffpräparate ist die Porengeometrie der keramischen Schäume im Detail zu sehen. Besonders deutlich ist erkennbar, dass die Poren keine einheitliche Größe besitzen sondern in ihrem Durchmesser variieren (Abb. 12). Des Weiteren wird deutlich, dass die Poren keine Interkonnektivität besitzen sondern in sich geschlossene Kugeln sind. Das heißt es ist keine offenporige Struktur erkennbar. Im Vergleich zu den keramischen Schäumen, die durch die Replika Methode hergestellt wurden, zeigt sich eine geringere offene Porosität.

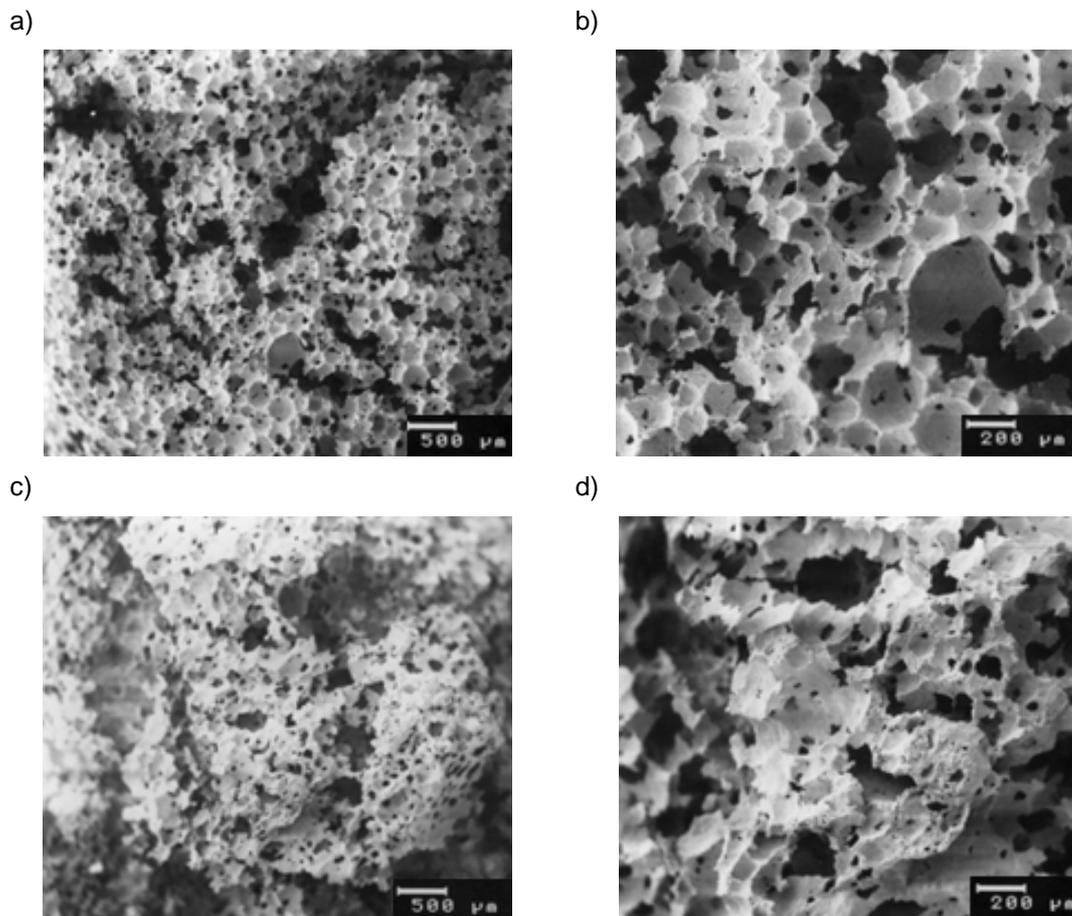


**Abbildung 12** Mikroskopische Aufnahme der Schliffpräparate des Albumin Schaums, deutlich erkennbar ist die fehlende Interkonnektivität und somit eine geringe Porosität a) bei 7-facher Vergrößerung b) bei 12,5-facher Vergrößerung

### **Rasterelektronenmikroskopische Analyse**

Durch REM-Aufnahmen konnten die Ergebnisse, die schon bei der lichtmikroskopischen Analyse erkennbar waren, weitestgehend bestätigt werden. Die Aufnahmen zeigen jedoch, dass die Poren nicht in sich geschlossen sind, sondern kleine Löcher in den Porenwänden besitzen (Abb. 13). Der Porendurchmesser der keramischen Schäume variiert sehr stark und bewegt sich in einem Bereich zwischen 100-500  $\mu\text{m}$ . Es ergibt sich eine uneinheitliche Porengeometrie.

metrie in den MgP-Schäumen. In Abb. 13 ist der Wechsel einer geschlossenen und offenen Oberfläche des MgP-Schaums erkennbar. Die durch Albumin Schaum entstehende Porenstruktur ist grundsätzlich günstiger für eine hohe Stabilität, als die dünnen Stege des Replika-Verfahrens.



**Abbildung 13** REM-Aufnahmen des Albumin Schaumes. Sichtbar sind die einzelnen kugelförmigen Poren, die durch die kleinen Perforationen eine Interkonnektivität aufweisen. Der Porendurchmesser bewegt sich in einem Bereich von 100-500  $\mu\text{m}$  a-b) MgP-Schaum 15/11, c-d) MgP-Schaum 15/12

### 4.3 Anisotrope Porengeometrie

#### *Erzeugung anisotroper Porengeometrie*

Die Testung von Polyurethanschäumen (PU-Schäume) mit unterschiedlichen pore per inch (ppi) Einheiten von 20, 60 und 80 erbrachte folgende Ergebnisse: PU-Schäume mit einer geringen Porendichte (20 ppi) erwiesen sich als mechanisch instabil. Sie zerfielen nach dem Sintern. Auch eine hohe Porendichte der

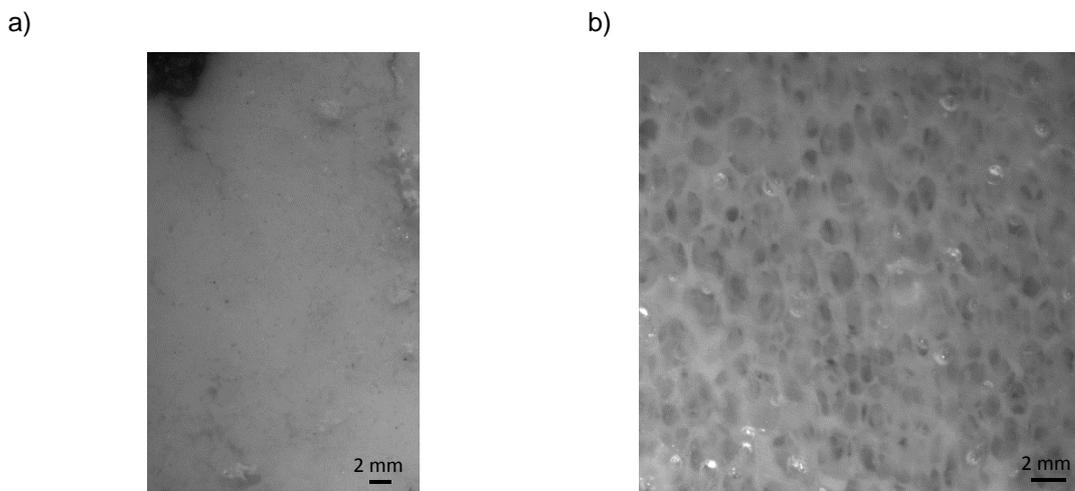
PU-Schäume von 80 ppi wirkte sich bei Komprimierung negativ auf die Porenstruktur aus. Die feinen Poren des PU-Schaums verstopften und verloren ihre Porosität. Bessere Ergebnisse erzielten PU-Schäume mit einer mittleren Porendichte von 60 ppi. Bei ihrer Kompression zeigte sich eine angedeutete, wenn auch nicht einheitliche Porengeometrie. Zudem war auffällig, dass sich auch bei einem 60 ppi PU-Schaum eine starke Kompression des Ausgangschaumes negativ auf die Bildung von offenen Poren auswirkte. In Tabelle 8 ist eine kurze Auflistung der Versuchsreihen mit den jeweiligen Ergebnissen aufgeführt. Eine zu starke Komprimierung der Schäume erwies sich als nachteilig. Sie verstopfte zum einen die Poren und ließ zum anderen keinerlei Porengeometrie erkennen. Die Versuchsreihen wurden mit einem dünnflüssigem Schlicker mit einer Zusammensetzung von 15 ml/10 g  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8 H_2O$  durchgeführt.

**Tabelle 8** Versuchsreihen verschiedener Kompressionen von verschiedenen PU-Schäumen und ihre Ergebnisse

	<b>Kompression</b>	<b>Beobachtung</b>	<b>Schliffpräparate</b>
<b>PPI 20</b>	30%	Schaum nach Sintern zerfallen	--
	50%	Schaum nach Sintern zerfallen	--
	60%	Schaum nach Sintern sehr fragil, zerfällt in einzelne Stücke	--
<b>PPI 60</b>	30%	kompakter rechteckiger Schaum, zerbricht beim Zerschneiden in eine Anzahl von kleineren zusammenhaftende Stücken	Poren teils verstopft, leichte gleichgerichtete Porengeometrie zu erkennen, jedoch nicht gleichmäßig
	50%	Rechteckiger stabiler Schaum	Teils stark verstopft, leichte gleichgerichtete Porengeometrie zu erkennen, jedoch nicht gleichmäßig
	60%	Verbacken zu einem kompakten Stück	Sehr stark verstopft, weder Poren noch Porenstruktur zu erkennen
<b>PPI 80</b>	30%	Innen teils mit Hohlräumen durchsetzt, kompakter rechteckiger Schaum, zerfällt beim Zerschneiden	Stark verbacken, Poren
	50%	Kompakter rechteckiger Schaum nach dem Sintern, auch stabil beim Zerschneiden	Stark verbacken, Poren sind nicht erkennbar
	60%	Kompakter rechteckiger Schaum nach dem Sintern, auch stabil beim Zerschneiden	Stark verbacken, Poren sind verklebt

Durch die Kompression sinkt die Porosität der Schäume und eine Steigerung der Stabilität wäre zu erwarten. Unter dem Mikroskop ist deutlich zu sehen, dass eine zu starke Komprimierung zur fast vollständigen Verstopfung der Po-

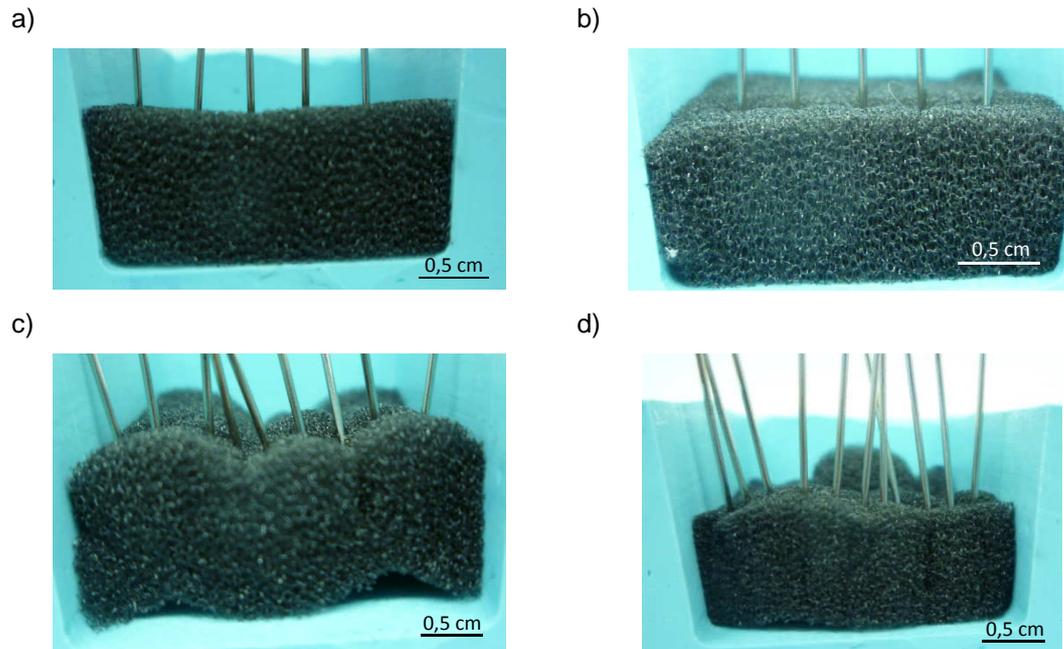
ren führt (vgl. Abb.14a). Es ist somit bei einer Kompression von 60 % des Ausgangschaumes keinerlei Porengeometrie erkennbar. Werden die PU-Schäume um eine geringere Prozentzahl komprimiert, zeigt sich nach Sinterung der Schäume eine angedeutete Porengeometrie (vgl. Abb. 14). Die Porengeometrie ist jedoch nicht einheitlich bzw. nicht ausgeprägt genug. Eine Kompressionsstärke, bei der die Schäume eine gleichmäßige anisotrope Porengeometrie erhalten, konnte noch nicht gefunden werden. Dennoch ist bei einer niedrigen Kompressionsstärke von 10-40 % eine angedeutete Porengeometrie erkennbar.



**Abbildung 14** a) Mikroskopische Aufnahme eines MgP-Schaumes-Schliffpräparates ppi 60 bei 6,3-facher Vergrößerung; die Kompression erfolgte von den Seiten (rechts und links im Bild), 60% Kompression; b) Mikroskopische Aufnahme eines MgP-Schaumes-Schliffpräparates ppi 60 bei 6,3-facher Vergrößerung; die Kompression erfolgte von den Seiten (von rechts und links im Bild), 20% Kompression

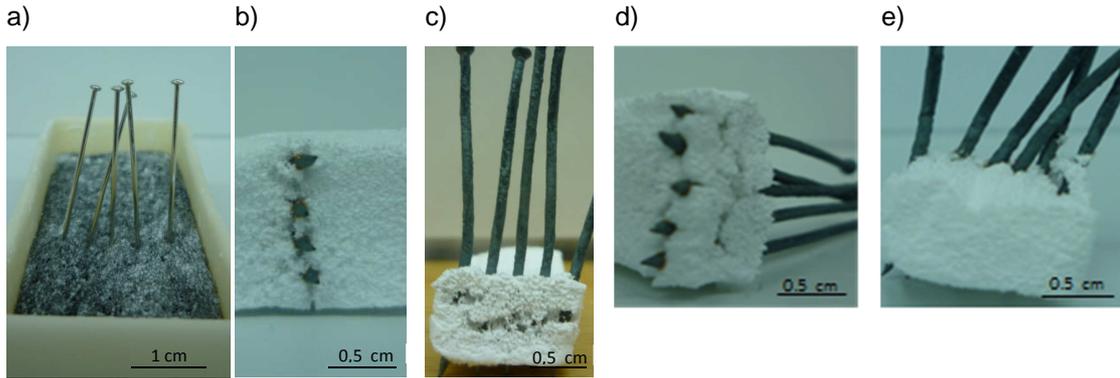
### **Kompressionsverhalten**

Sowohl in den Rasterelektronenmikroskopaufnahmen als auch bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Schliffpräparate war eine angedeutete anisotrope Porengeometrie sichtbar. Diese zeigte sich jedoch nicht einheitlich auf der gesamten Breite des gesinterten keramischen Schaums. Um ein genaueres Bild davon zu erhalten, wie sich die Kompression auf den PU-Schaum (60 ppi) auswirkt, wurden vor der Kompression der Schäume Stecknadeln in einem einheitlichen Abstand von 0,5 cm in den PU-Schaum gesteckt. Dabei wurde der Randbereich mit den beiden äußeren Stecknadeln und der innere Bereich mit den mittleren Stecknadeln definiert.



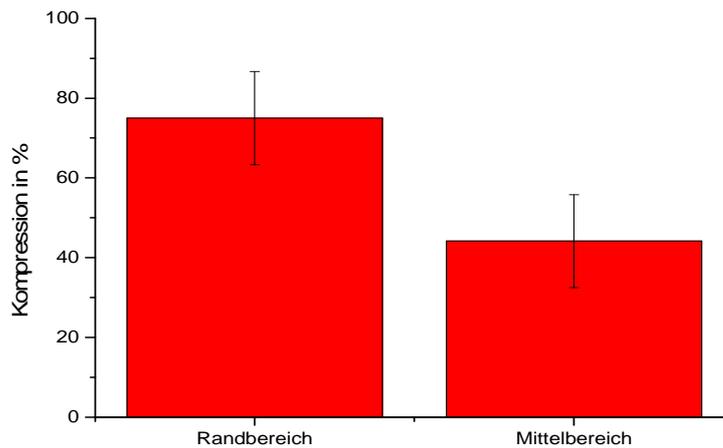
**Abbildung 15** Kompression der PU-Schäume mit Stecknadeln im ungesinterten Zustand a) Kompression eines 60 ppi PU-Schaums um 10 %; b) Kompression eines 60 ppi PU-Schaums um 20 %; c) Kompression eines 60 ppi PU-Schaums um 50 %; d) Kompression eines 60 ppi PU-Schaums um 60 %

Im ungesinterten Zustand war auch bei Kompression der Schäume von 20-40 % der Abstand der Stecknadeln noch recht gleichmäßig, wie in Abb. 15a-b zu sehen ist. Dagegen war bei einer Kompression der PU-Schäume ab 50 % und höher keine Gleichmäßigkeit mehr zu erkennen (vgl. Abb 15c-d). Grund dafür ist wahrscheinlich, dass sich der PU-Schaum nach oben wölbt, was natürlich keine einheitliche Kompression bewirkt. Dieser Effekt verstärkt sich, je größer der Ausgangsschaum wird, sprich je größer die Kompression des Schaumes ist. Um das Kompressionsverhalten der PU-Schäume während des Sinterprozesses zu untersuchen, wurden die Stecknadeln mitgesintert (s. Abb.16). Nach Sinterung wurden die sich ergebenden Abstände direkt am gesinterten Schaum gemessen und mit denen der Ausgangsschäume verglichen. In Abb. 16 b-e wird ersichtlich, dass der Randbereich des Schaums etwas stärker komprimiert wird als der Mittelbereich des Schaumes.



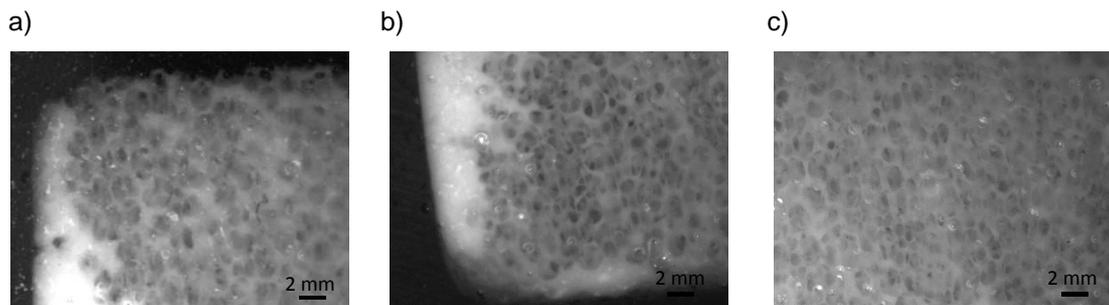
**Abbildung 16** a) In Schlicker getränkter PU-Schaum mit Stecknadeln, die vor Kompression des Schaumes um 30 %, in einem einheitlichen Abstand von 0,5 cm gesteckt wurden; b) Unterseite eines keramischen Schaumes (Breite gesinterten Schaumes ca. 1,2 cm) nach Sinterung mit Stecknadeln bei einer seitlichen (hier im Bild von oben und unten) Kompression von 10 %; c) Frontale Ansicht eines keramischen Schaumes (Breite gesinterten Schaumes ca. 1,3 cm) nach Sinterung mit Stecknadeln bei einer seitlichen (hier im Bild von rechts und links) Kompression von 30 %; d) Unterseite eines keramischen Schaumes (Breite gesinterten Schaums ca. 1,2 cm) nach Sinterung mit Stecknadeln bei einer seitlichen (hier im Bild von oben und unten) Kompression von 40 %; e) Frontale Ansicht eines keramischen Schaumes (Breite gesinterten Schaums ca. 1,5 cm) nach Sinterung mit Stecknadeln bei einer seitlichen (hier im Bild von rechts und links) Kompression von 50 %

Aus den gemessenen Abständen zwischen den Nadeln in den gesinterten Schäumen wurde mit Hilfe der Ausgangswerte folgendes lokales Kompressionsverhalten ermittelt (vgl. Abb.17). Der unterschiedliche Abstand zwischen Rand und Mitte verändert sich auch bei einer geringer werdenden Kompression nicht. Es bleibt auch bei einer geringen Kompression ein kompakter Rand, also eine höhere Kompression an den Rändern bestehen.



**Abbildung 17** Lokales Verhalten der keramischen Schäume bei äußerer Kompression. Durch die gemessenen Abstände der Stecknadeln in den gesinterten Schäumen wurden mit Hilfe der vor der Sinterung bestimmten Ausgangswerte das lokale Kompressionsverhalten ermittelt

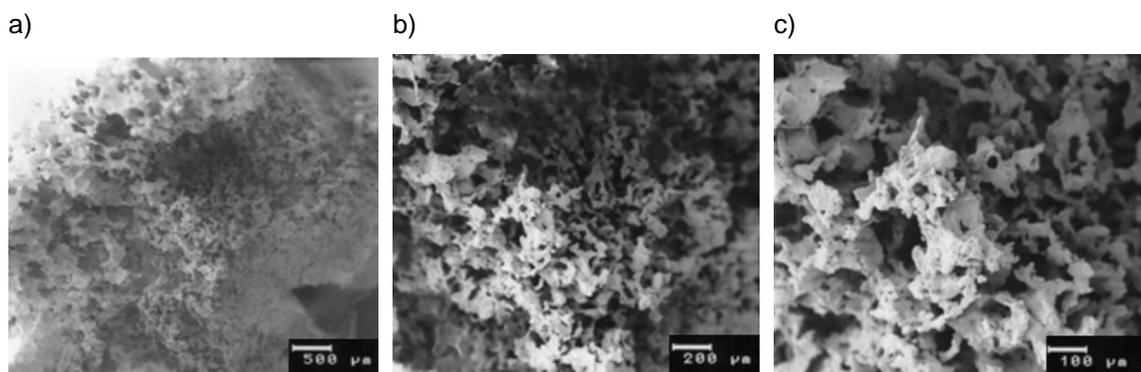
Bei einer geringeren Kompression von 10-40 % zeigt sich im mittleren Bereich ein recht homogenes Kompressionsverhalten, sodass man ähnlich wie im menschlichen Knochen einen kompakten und einen spongiösen Bereich erhält (Abb.18). Somit ist dieser Ansatz eine anisotrope Porengeometrie zu bilden für eine niedrige Kompression des PU-Schaumes ppi 60 von 10-40 % grundsätzlich gut, er muss aber noch optimiert werden.



**Abbildung 18** Schliffpräparate eines keramischen Schaums der seitlich (im Bild von rechts und links) um 20 % komprimiert wurde bei 6,3-facher Vergrößerung a-b) Randbereich des Schaums, c) Mitte des Schaums

#### ***Rasterelektronenmikroskopische Analyse***

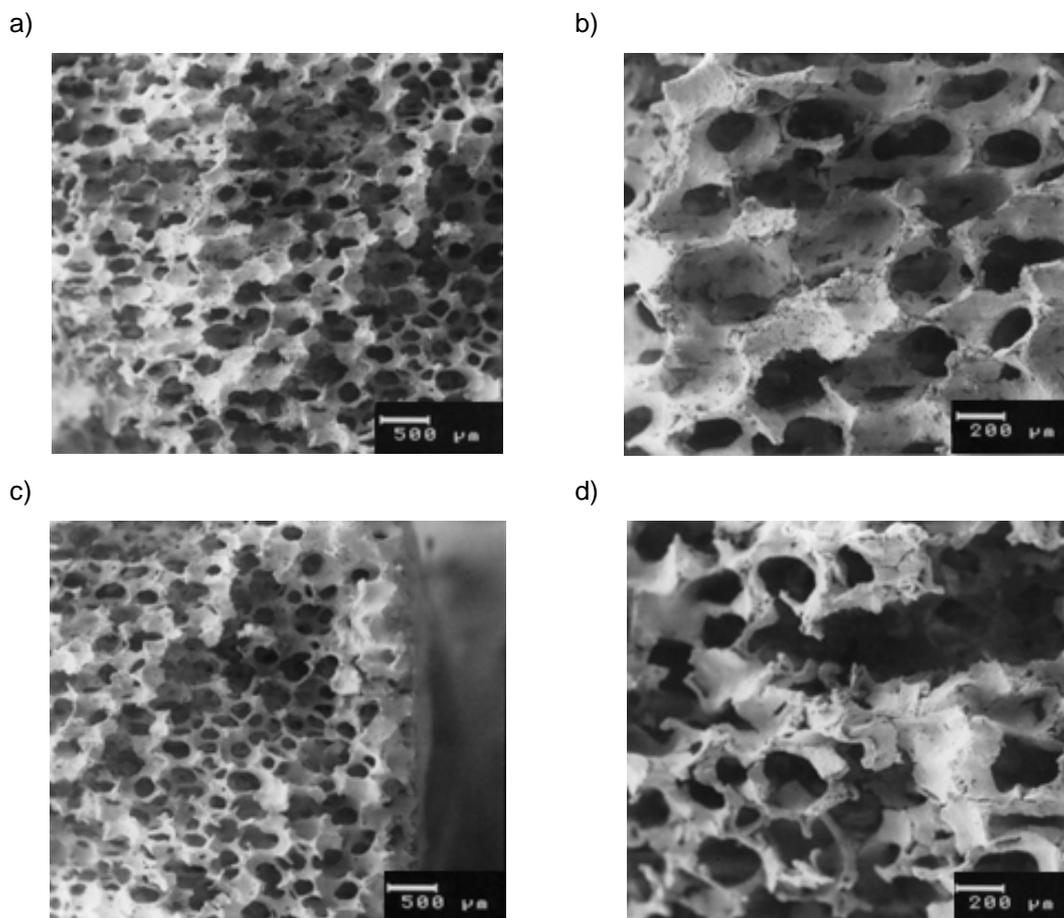
Die REM Analyse ergab ein mit den vorherigen Ergebnissen übereinstimmendes Bild. Wie in Abbildung 19 a-c zu erkennen ist, sind die Poren verstopft und teilweise miteinander verklebt. In Abb. 19 a ist am rechten Bildrand deutlich der Randbereich des gesinterten MgP-Schaumes zu erkennen. Dieser erscheint kompakt und dicht verschlossen - wie die Kompakta des Knochens.



**Abbildung 19** a-c MgP-Schaum 80 ppi bei einer Kompression von 60 %

Bei der Betrachtung des Mittelbereiches eines MgP-Schaumes (60 ppi) bei einer Kompression von 30 % durch das REM lässt sich eine angedeutete aniso-

trope Porengeometrie erkennen (vgl. Abb. 20). Diese Gleichrichtung der Poren ist nicht sehr ausgeprägt, aber durchaus an einer Mehrzahl der Poren erkennbar. Bei Analyse des Randbereichs sind in Abb. 20 c-d eine Zunahme an geschlossenen Poren deutlich zu erkennen. Die geschlossenen Poren nehmen soweit zu, bis sich ein kompakter Rand ohne jegliche Porosität bildet. Dieser Übergang lässt eine Ähnlichkeit zum menschlichen Knochen erkennen. Auch im Knochen gibt es einen Übergang von der Spongiosa zur Kompakta. Damit ähnelt der in den Versuchen hergestellte MgP-Schaum in seinem Aufbau sehr stark der natürlichen Knochenstruktur.



**Abbildung 20** REM-Aufnahmen eines MgP-Schaums, Kompression von 30 %, a-b) Mittelbereich des Schaums; c-d) Randbereich des Schaums

Um die Gleichrichtung der Poren zu verdeutlichen, wurden die Poren jeweils in ihrer X- und Y-Richtung vermessen, gemittelt und ins Verhältnis gesetzt (siehe Tabelle 9). Dabei wird deutlich, dass die Poren in ihrer X-Achsen Richtung breiter sind als in ihrer Y-Richtung. Die Poren sind um das ca. 1,77-fache breiter als

hoch. Mit diesen Daten wird verdeutlicht, dass eine anisotrope Porengeometrie vorhanden ist.

**Tabelle 9** Porendurchmesser in X- und Y-Richtung gemessen, gemittelt

Gemessene Poren	X-Achse	Y-Achse
87	291,67 $\mu\text{m}$	164,77 $\mu\text{m}$

#### 4.4 Zytokompatibilität

In den folgenden Versuchsreihen wurden die MgP-Schäume auf ihre Zytokompatibilität getestet und mit Kontrollen aus Hydroxylapatit (HA) verglichen.

##### ***Zellaktivität und Zellproliferation***

###### *Versuchsreihe 1*

Dabei zeigte sich in der ersten Versuchsreihe ein geringes Zellwachstum der Osteoblasten auf den Referenzschäumen aus HA (vgl. Abb. 21a). Dies führte auch zu einer geringen Zellaktivität der Zellen auf den Referenzschäumen. Im Vergleich dazu war mit jedem Messtag auf den hergestellten MgP-Schäumen eine kontinuierliche Steigerung der Zellzahl ersichtlich. Die dazugehörige Zellaktivität zeigte ein übereinstimmendes Ergebnis (vgl. Abb. 21a). Auf den zu Struvit umgewandelten MgP-Schäumen kultivierten Zellen zeigten im Vergleich zu den MgP-Schäumen sowohl ein etwas geringeres Zellwachstum als auch eine geringere Zellaktivität. In dieser Versuchsreihe wurden zwei in ihrem pH-Wert unterschiedliche Struvit Schäume verwendet. Bei einem höheren pH-Wert der zu Struvit umgewandelten Proben ließ sich eine deutliche Abnahme des Zellwachstums erkennen. Da die mechanische Stabilität unabhängig von den pH-Werten ist, wurden die folgenden beiden Versuche mit Struvit-Proben mit einem pH-Wert von 8,5 fortgeführt. Das Ausbleiben eines Zellwachstums auf den Referenzschäumen könnte von einem alkalischen pH-Wert der Schäume herführen. In den folgenden Versuchsreihen wurde versucht durch vorheriges Waschen der Proben einen neutralen pH-Wert der Proben zu erreichen. MgP-

Schäume zeigten in dieser Versuchsreihe sowohl die höchste Zellproliferation als auch die höchste Zellatmung auf im Vergleich zur Kontrolle aus HA.

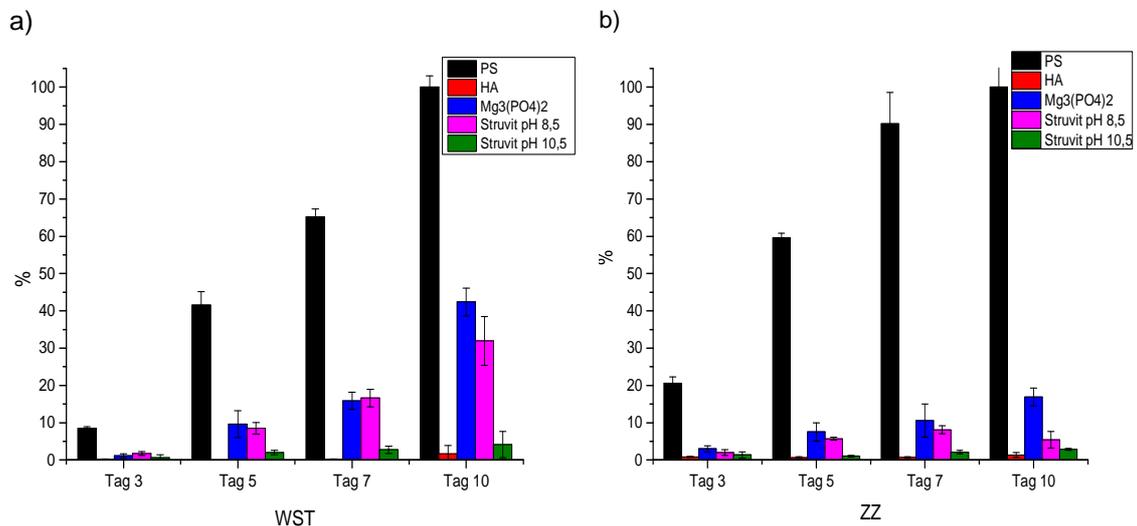


Abbildung 21 a) WST von Osteoblasten MG 63 Versuchsreihe1, b) Zellzahl von Osteoblasten MG 63 Versuchsreihe 1

### Versuchsreihe 2

Die höchste Gesamtaktivität als auch die höchste Zellproliferation zeigten in der zweiten Versuchsreihe die Osteoblasten auf den Referenzschäumen aus HA. Die Zellproliferation der Osteoblasten war auf allen Proben eher gering im Vergleich zu den Referenzproben jedoch vergleichbar (vgl. Abb. 22a). Auch hier wiesen die MgP-Schäume nach den Referenzschäumen, gefolgt von den zu Struvit umgewandelten und PLGA infiltrierte MgP-Schäumen, die höchste Zellzahl auf. Bei der Zellaktivität zeigte sich jedoch ein gegensätzliches Bild (vgl. Abb. 22b). Hier zeigten die auf den PLGA-Proben kultivierten Zellen den höchsten Wert. Deutlich zu beobachten ist auch ein enormer Anstieg der Zellaktivität von Tag 7 auf Tag 10, so dass die zelluläre Gesamtaktivität der Osteoblasten bei den PLGA infiltrierte MgP-Schäumen an Tag 10 am höchsten ist.

## 4 Ergebnisse

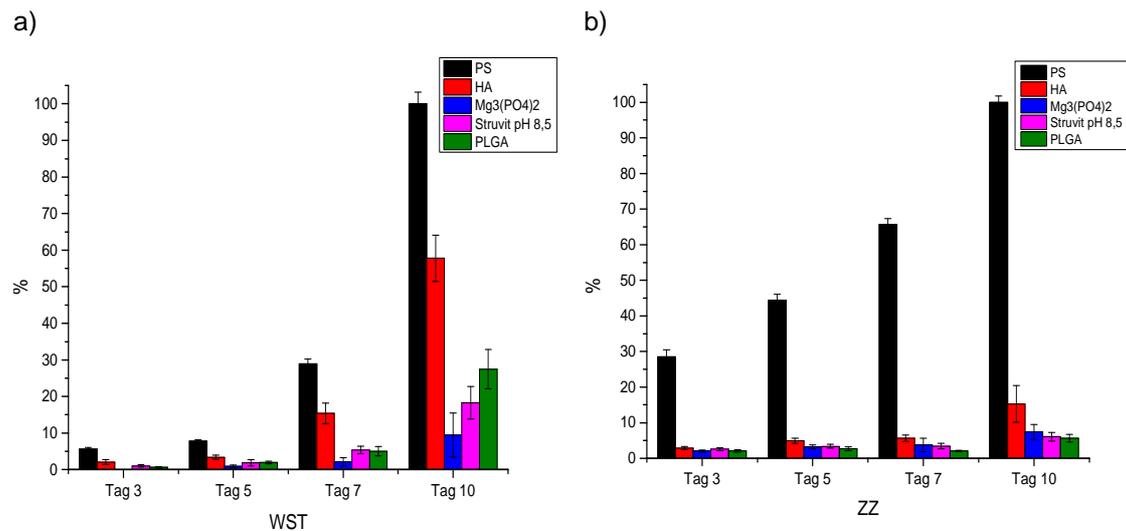


Abbildung 22 a) WST von Osteoblasten MG 63 Versuchsreihe 2, b) Zellzahl von Osteoblasten MG 63 Versuchsreihe 2

### Versuchsreihe 3

Auch in der dritten Versuchsreihe zeigten die Zellen die auf HA kultiviert wurden sowohl die höchste Gesamtaktivität als auch die höchste Zellproliferation. Die Zellzahl auf den MgP-Schäumen liegt im Bereich der Zellzahl der Referenzschäume (vgl. Abb. 23b). Eine dichte Osteoblasten Besiedelung war in dieser Versuchsreihe auf den Struvit-Proben zu erkennen. Die Zellen auf PLGA infiltrierten Farringtonit Schäume wiesen ein etwas geringeres Wachstum im Vergleich zu den Referenzschäumen auf. Bei den WST-Tests ließ sich eine hohe Aktivität der Zellen bei den MgP-Schäumen erkennen (vgl. Abb. 23a). Trotz einer hohen Zellzahl auf den Struvit-Proben wurde eine geringere Zellaktivität festgestellt. Bei genauerer Betrachtung der Wells unter dem Mikroskop konnte man erkennen, dass sich bei den Struvit-Proben im Vergleich zu den Referenzschäumen viele Zellen auf dem Boden der Wells angesiedelt hatten. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den starken Anstieg der Zellzahl auf den Struvit-Proben. Eine weitere Auffälligkeit ist die einheitliche Abnahme der Zellzahlen am 7. Tag der Messungen bei allen Proben. Möglicherweise kam es hier zu einem vollständigen und nicht mehr steigerungsfähigen Bewuchs der Proben, sodass die Zellzahlen rückläufig sind.

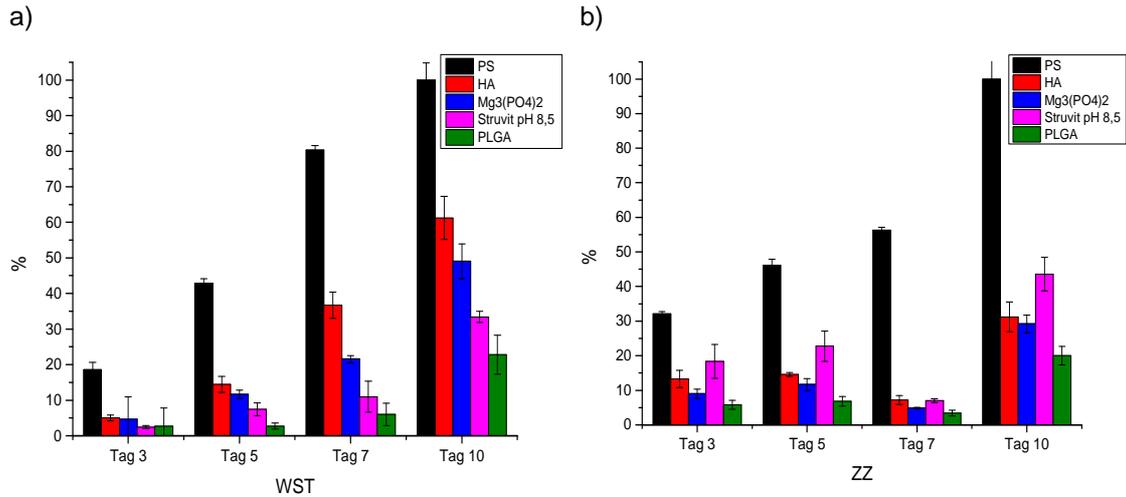


Abbildung 23 a) WST von Osteoblasten MG 63 Versuchsreihe 3, b) Zellzahl von Osteoblasten MG 63 Versuchsreihe 3

### Western Blot

Um die osteoinduktive Wirkung der Strukturen zu überprüfen, wurde die Expression von knochenspezifischen Proteinen mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden die Proteinproben von den auf den Prüfkörpern kultivierten Zellen mit Antikörpern gegen Vinculin, Bone Sialoprotein (BSP) und alkalische Phosphatase (ALP) getestet. Die erhaltenen Signale wurden densitometrisch ausgewertet und auf das Kontrollprotein Tubulin normalisiert. Vinculin ist ein Bestandteil von Zell-Matrix-Verbindungen in fokalen Adhäsionen. Beim immunologischen Protein-Nachweis mit dem spezifischen Antikörper gegen Vinculin zeigte sich, dass auf Struvit die höchsten Signale erhalten werden. Das etwas schlechtere Signal der Osteoblasten an der MgP-Oberfläche kann eventuell aus der Oberflächenstruktur der Schäume resultieren. BSP ist ein Marker für Osteoblasten, der zeigt, wie differenziert die Zellen auf der Oberfläche sind. Hier zeigt sich sowohl bei HA als auch bei MgP-Schäumen ein gleich gutes Ergebnis. Bei Struvit ist der Marker geringer als bei HA. Ein weiterer für Osteoblasten spezifischer Marker ist die ALP, auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild bei HA und MgP-Schäumen (vgl. Abb.24), dass niedrigste Signal erhielt man auf Struvit.

## 4 Ergebnisse

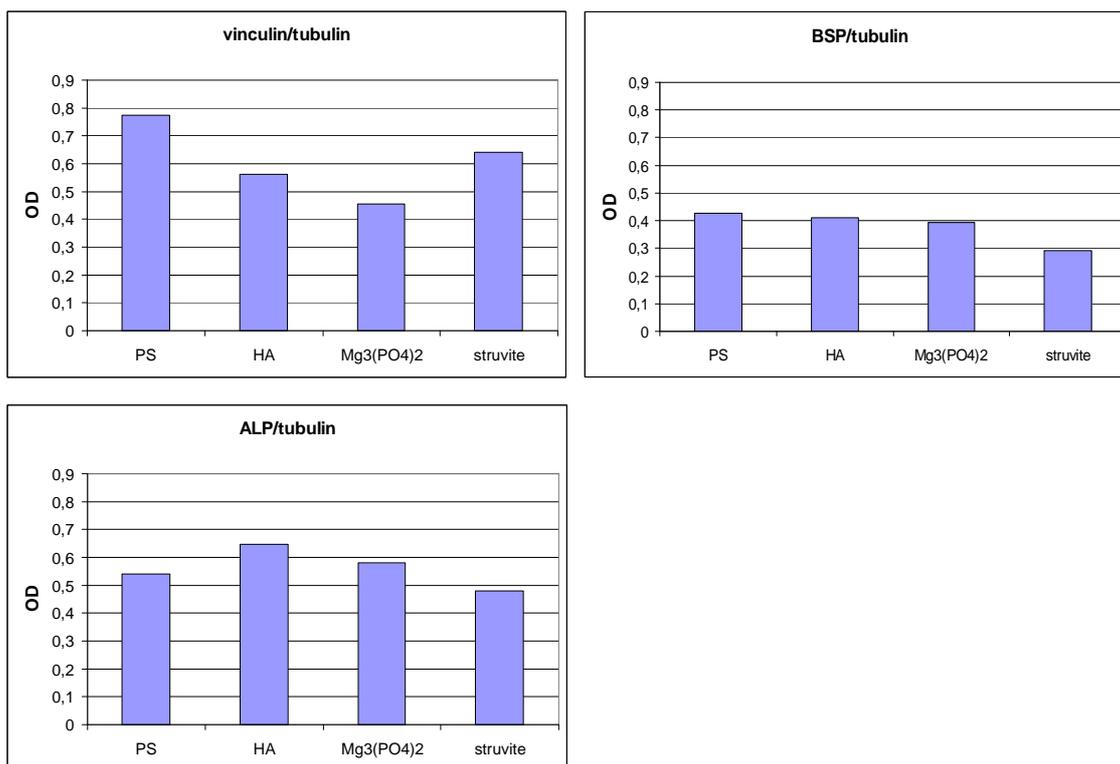


Abbildung 24 Signalstärke normiert zum Tubulin Signal

### **Rasterelektronenmikroskop**

Beim Vergleich des Zellwachstums und der Zellmorphologie konnte eine vergleichbare Form der Osteoblasten beobachtet werden. Es zeigten sich vor allem Unterschiede in der erkennbaren Zellzahl, Zellgröße als auch in der Ausprägung ihrer zytoplasmatischen Fortsätze. Auf den Glasplättchen zeigte sich eine dichte und vollständige Besiedlung mit Osteoblasten (vgl Abb. 25a-b). Auf den Referenzschäumen aus Hydroxylapatit zeigte sich eine glatte Oberfläche, auf der unterschiedlich große Osteoblasten siedelten. Einzelne flache Osteoblasten sind auf Abb. 25c-e erkennbar. Auffällig war hierbei, dass die Osteoblasten sich vermehrt auf den Stegen befanden. In den Poren selbst waren wenige Osteoblasten erkennbar, insgesamt waren die Zellen deutlich größer als auf der Glasoberfläche.

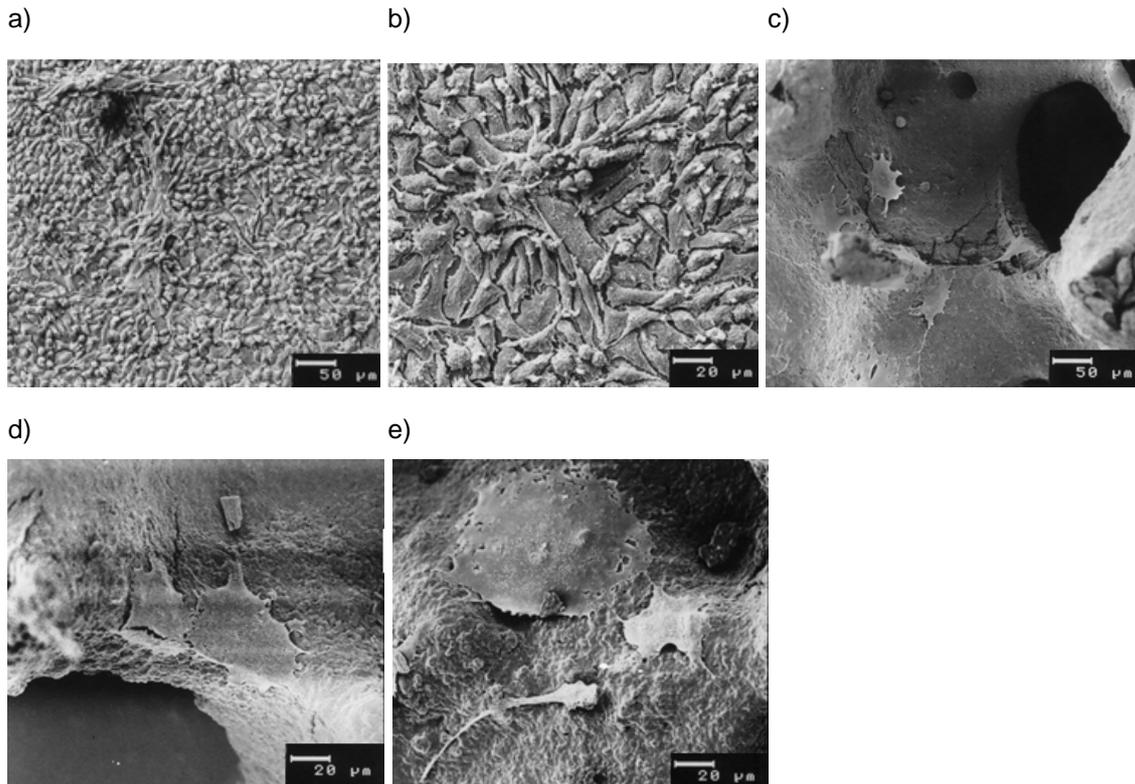


Abbildung 25 a-b) Osteoblasten Besiedlung auf Glasplättchen; c-e) Osteoblasten Besiedlung auf Hydroxylapatit (HA) - Schäumen

Im Vergleich zu den Referenzschäumen zeigten die MgP-Schäume eine raue Oberflächenstruktur. Auf den MgP-Schäumen waren mehrere unterschiedlich große Osteoblasten sichtbar. Im Unterschied zu den Referenzschäumen siedelten die Osteoblasten hier sowohl auf den Stegen, als auch in den Poren. Es zeigte sich hier eine dichtere Besiedlung der Schäume (vgl. Abb. 26a-c). Die Oberfläche der zu Struvit umgewandelten Farringtonitschäume zeigte eine kristalline Struktur (vgl. Abb.26 d-i). Zu beobachten war, dass die Struvit-Kristalle kaum von Osteoblasten besiedelt wurden. Sie könnten aufgrund ihrer Oberfläche zu glatt für die Osteoblasten sein. Vor allem große Kristalle wurden nicht besiedelt. Dennoch waren auch hier mehrere unterschiedlich große Osteoblasten zwischen den Kristallen erkennbar (Abb.26 d-i). Die Zellen besiedelten auch hier die Stege als auch die Poreninnenfläche.

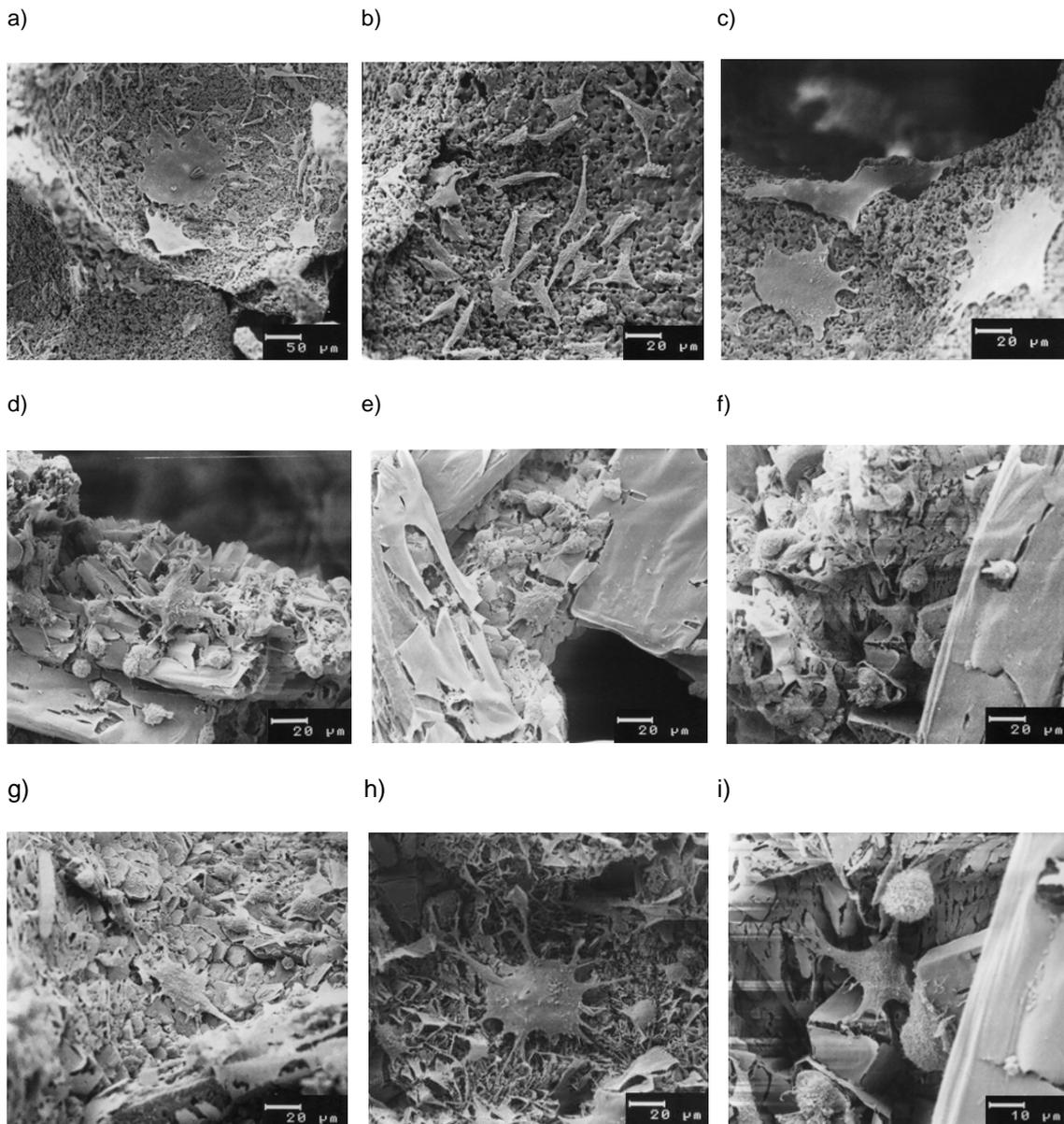


Abbildung 26 a-c) Osteoblasten Besiedlung auf MgP-Schäumen; d-i) Osteoblasten Besiedlung auf Struvit-Proben

### **Life Dead Färbung**

Bei der Life Dead Färbung werden lebende Zellen durch Calcein grün, und tote Zellen durch Ethidium Homodimer rot angefärbt. Danach wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen überprüft. Dabei zeigten sich auf den Referenzschäumen die lebenden Zellen in der Überzahl. Es waren kaum tote Zellen sichtbar (vgl. Abb. 27a). Auch auf den MgP-Schäumen war eine eindeutige höhere Anzahl an lebenden Zellen und nur vereinzelt tote Zellen erkennbar (vgl. Abb. 27b). Eine leichte Abnahme der Gesamtzellzahl war sowohl bei den

#### 4 Ergebnisse

Struvit- als auch PLGA-Proben zu beobachten. Dennoch war bei diesen Proben das Verhältnis zwischen lebenden und toten Zellen recht ausgeglichen.

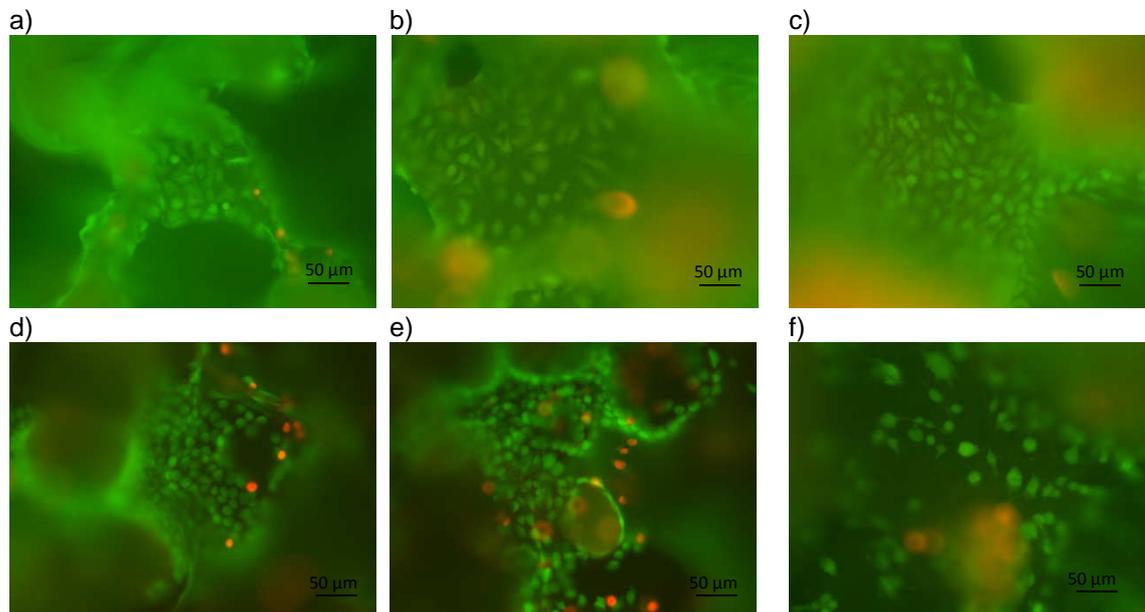


Abbildung 27 Die Osteoblasten wachsen sehr gut auf den jeweiligen Proben, die lebenden Zellen stellen sich grün dar, die abgestorbenen Zellen rot. a) Hydroxylapatit b-c) MgP-Schaum, d-e) PLGA, f) Struvit

## 5 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Herstellung von mechanisch stabilen Magnesiumphosphatschäumen (MgP-Schäume) sowie deren Zytokompatibilität zu untersuchen. Dazu wurden über verschiedene Methoden keramische Schäume aus Magnesiumphosphat hergestellt und sowohl ihre mechanische Stabilität als auch ihre Porosität untersucht. Die Biokompatibilität der einzelnen keramischen Schäume wurde in verschiedenen Zellversuchen überprüft.

Durch unterschiedliche Herstellungsarten, die teilweise bereits in der Literatur beschrieben wurden, wurden keramische Schäume hergestellt.<sup>90</sup> Die Herstellung keramischer Schäume mit einer anisotropen Porengeometrie wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Somit ist dies ein neuer Ansatz um den Knochen ähnliche keramische Schäume herzustellen.

Es wurde zum einen die Replika-Methode verwendet. Hierbei wird versucht, die Struktur eines Polyurethanschaums (PU-Schaum) zu replizieren.<sup>91</sup> Dazu wurden Schlicker mit verschiedenen Pulvermengen ausgetestet. Nach Sinterung wurde der Einfluss der Pulvermenge auf die Porosität, die Massenzunahme, und ihre mechanische Stabilität analysiert. Bei Untersuchung der Masse zeigte sich ein direkter Einfluss der Pulvermenge auf die Massenzunahme der keramischen Schäume. Zwischen der Menge an verwendetem  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  und Massenzunahme ist ein linearer Zusammenhang erkennbar. Dies ist auf den Herstellungsprozess und die Viskosität des Schlickers zurückzuführen. Niedrig viskoser Schlicker kann durch den PU-Schaum zwar besser aufgenommen werden, wird aber bei Kompression auch wieder leichter verdrängt. Je zähfließender der Schlicker ist, desto weniger Schlicker wird durch Kompression aus dem PU-Schaum entfernt. Eine hohe Pulvermenge im Schlicker verringert somit die Porosität der Proben. Da die Gesamtporosität beim Replika-Verfahren tendenziell zu hoch ist, ist eine Absenkung durchaus erwünscht. Von einer Verringerung der Porosität wird eine Steigerung der Druckfestigkeit erhofft. Die Auswirkungen der unterschiedlichen  $\text{H}_2\text{O}/\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  Verhältnisse auf die mechanische Stabilität der MgP-Schäume wurden durch Druckfestigkeitsprüfungen untersucht. Keramische Schäume mit einem geringen Wasser-Pulver-Verhältnis

sind sehr fragil und brüchig und weisen eine geringe Druckfestigkeit auf. Dieses Ergebnis spiegelt auch die niedrige relative Dichte dieser keramischen Schäume wieder. Bei einer Pulvermenge von 10 g  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und höheren Pulvermengen erhält man eine annähernd gleichbleibende mechanische Stabilität der MgP-Schäume. Sie liegt jedoch weit unter 1 MPa. In vorangegangenen Arbeiten lag die Druckfestigkeit bei etwa 0,058 MPa.<sup>92</sup> Die Druckfestigkeit der in dieser Arbeit getesteten Magnesiumphosphatschäume ist um etwa das doppelte höher. Sie liegt bei ca. 0,1 MPa womit die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten Schäume sehr viel stabiler sind, als die bisher bekannten und genutzten. Daraus ergibt sich, dass mit einer Zunahme an Pulvermenge im Schlicker auch die Stabilität der keramischen Schäume steigt. Damit sind die Proben mit einer höheren Pulvermenge weniger brüchig und besitzen eine höhere mechanische Stabilität. Diese Steigerung kann durch die steigende relative Dichte der Schäume erklärt werden. Wie auch schon Barralet et al. beschrieben, wirkt sich die Porosität der Schäume auf die mechanische Stabilität aus.<sup>93</sup> Dabei ist bei den hier hergestellten Schäumen zu beachten, dass die Stabilität der MgP-Schäume auch über die Randbereiche erreicht wird. Durch den Herstellungsprozess werden die Poren an der Oberfläche weitestgehend verstopft, was letztendlich zu einem kompakteren Randbereich führt. Dadurch ergibt sich eine Art stabiler Mantel ähnlich der Kompakta im Knochen um die keramischen Schäume herum, und stabilisiert diese zusätzlich.

Um eine Steigerung der mechanischen Festigkeit zu erhalten wurden die Schäume zum einen mit PLGA infiltriert, als auch zu Struvit umgewandelt. Die poröse Eigenschaft der keramischen Schäume bleibt sowohl bei einer Infiltration mit PLGA als auch bei Umwandlung zu Struvit erhalten.<sup>94</sup> Die Infiltration und Umwandlung der Schäume gleicht kleine Risse in den Stegen, die durch die Sinterung entstehen, aus. Durch PLGA verstärkte Schäume weisen eine Druckfestigkeit von etwa 1,1 MPa auf und liegen damit über der Zielsetzung von 1 MPa. Deutlich höhere Werte wurden für poröse Calciumphosphatkeramiken mit PLGA-Modifikation beobachtet.<sup>95</sup> Ähnliche Ergebnisse waren auch bei PLGA infiltrierten Hydroxylapatit Schäumen zu erkennen.<sup>96</sup> Bei den zu Struvit umgewandelten Schäumen liegt die Erhöhung der Druckfestigkeit sogar noch

um einiges höher, und zwar bei ca. 3,8 MPa. Somit hat die Umwandlung der MgP-Schäume zu Struvit eine starke Druckfestigkeitssteigerung zur Folge. Ursache für Steigerung der Druckfestigkeit ist die Zunahme der relativen Dichte der umgewandelten Schäume. Berechnet auf die jeweiligen Dichten der einzelnen Infiltrate ergibt sich eine Steigerung von 25-40 %. Daraus ergibt sich, dass durch eine Infiltration der MgP-Schäume mit PLGA oder durch die Umwandlung zu Struvit die mechanische Stabilität um ein vielfaches gesteigert werden kann. Als Grund hierfür kann angeführt werden, dass die Porosität der Schäume eine signifikante Auswirkung auf die mechanische Stabilität besitzt.<sup>97</sup>

Um eine günstigere Steggeometrie der keramischen Schäume zu erzeugen, wurde ein alternatives Herstellungsverfahren mittels Albumin untersucht. Die Porengeometrie des Albuminschaumes ist eher kugelförmig mit weitgehend geschlossenen Porenwänden und hat somit eine grundlegend andere Geometrie als der vorgefertigte PU-Schaum. Albumin hat, wie auch schon von Ribeiro et al. gezeigt, einige Vorteile: Es ist gesundheitlich unbedenklich, Biokompatibel, kostengünstig und unlimitiert vorhanden.<sup>98</sup> Um einen mechanisch stabilen keramischen Schaum herzustellen wurden verschiedene Schlickerkonsistenzen ausgetestet und ihr Einfluss auf den Schaum und seine Porosität untersucht. Der wesentliche Einfluss der Viskosität des Schlickers wurde bereits von S. Dhara et al. beschrieben.<sup>99</sup> Bei einer Kombination von 15 ml H<sub>2</sub>O, 5 Tropfen (NH<sub>4</sub>OH) und 11 g Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> \* 8 H<sub>2</sub>O erhielt man recht stabile ungesinterte Albumin-Schlicker-Schäume. Eine weitere Problematik bestand darin, dass die gesinterten Schäume keine einheitliche Form und auch Risse aufwiesen oder sogar während des Sinterungsprozesses zerfielen. Um dieser Problematik entgegenzuwirken wurden sowohl verschiedene Arten von Lagerungen während des Sinterns, als auch unterschiedliche Trocknungen getestet. Die Risse wurden dadurch in ihrer Anzahl geringer, zogen sich aber weiterhin durch den gesinterten Schaum. Trotz mehrerer unterschiedlicher Versuchsansätze konnte die Rissbildung in den gesinterten Schäumen jedoch nicht vollständig verhindert werden. S. Dhara et al.<sup>80</sup> versuchten durch tropfenweise Zugabe von Salpetersäure die Rissbildung während der Trocknung zu verhindern. Aus der Säurezugabe resultiert eine Denaturierung des Albumins und somit ein stabilerer

Grünkörper, der ohne Spaltbildung getrocknet werden kann.<sup>80 100</sup> Dabei kommt es jedoch durch die säurebedingte Koagulation der Pulverpartikel auch zu einer großen Schrumpfung der Schäume, was letztendlich die Porosität der Schäume einschränkt.<sup>80</sup> Um eine weitere Optimierung der Albumin Versuchsreihe zu erzielen, wird empfohlen, in weiteren Versuchen das  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8 H_2O$  Pulver zu kalzinieren. Möglicherweise enthält das hier verwendete  $Mg_3(PO_4)_2 \cdot 8 H_2O$  zu viel Wasser. Eine geringere Menge an Wasser in den ungesinterten Schäumen könnte zu einem stabileren keramischen Schaum führen. Die mikroskopischen und REM Aufnahmen ließen deutlich erkennen, dass die Schaumstruktur nach Sinterung weitestgehend erhalten blieb. Die kugeligen Poren waren über kleine Defekte in den Porenwänden miteinander verbunden. Die Porengröße von 100-500  $\mu m$  ist günstig für das Knochenwachstum.<sup>25</sup> Ähnliche Porengrößen von 100-800  $\mu m$  wurden bei durch Albumin geschäumten Calciumphosphatzementen beobachtet.<sup>101</sup>

Durch die Erzeugung einer anisotropen Porengeometrie bei Replika-Schäumen wurde eine Gleichrichtung der Poren angestrebt. Eine Herstellungsmethode, die eine anisotrope Porengeometrie erzeugt, wurde bislang noch nicht in der Literatur beschrieben. Im Knochen richten sich die Spongiosatrabekel sowohl in die Richtung der größten Druck- und Zugspannung, als auch in die der größten Biegebeanspruchung aus. Dadurch erlangt Knochen eine höhere Stabilität.<sup>24</sup> Zur Herstellung einer anisotropen Porengeometrie wurde versucht, eine einheitliche Kompression auf die PU-Schäume zu übertragen. Dazu wurden unterschiedliche PU-Schäume und Kompressionsstärken untersucht. Hierbei erwies sich eine zu starke Komprimierung der Schäume als nachteilig. Bei einer Komprimierung der Ausgangschäume um den Faktor 50-80 % resultierte eine Verstopfung der Poren. Zudem verdichtete sich der Schlicker in so starkem Maße, dass die Poren verklebten. Somit ließ sich bei einer hohen Kompression keinerlei Porengeometrie erkennen. Auch eine Porendichte der PU-Schäume von 80 ppi wirkte sich bei Komprimierung negativ auf die Porenstruktur aus. Die schon im PU-Schaum bestehenden dichten Poren wurden durch Kompression noch dichter aneinander gepresst, sodass bei einer hohen Kompression fast keinerlei Porengeometrie mehr vorhanden blieb. Auch PU-Schaum mit einer geringen

Porendichte von 20 ppi zeigte kein erfolversprechendes Ergebnis. Nach Sinterung unter Kompression zerfiel der MgP-Schaum. Dabei war die mechanische Instabilität unabhängig von der Stärke der Kompression. Bessere Ergebnisse erzielte eine niedrigere Komprimierung von 10-40 % der Ausgangsschäume bei PU-Schäumen von 60 ppi. Sowohl in den REM Aufnahmen als auch bei den lichtmikroskopischen Aufnahmen der Schliffpräparate zeigten die Schäume eine leichte anisotrope Porengeometrie. Das Kompressionsverhalten der Schäume erwies sich hierbei jedoch lokal unterschiedlich. Mit Hilfe von Stecknadeln, die in einem einheitlichen Abstand von 0,5 cm in den unkomprimierten PU-Schaum (ppi 60) eingebracht und mitgesintert wurden, konnte die unterschiedliche Kompressionsrate des Schaums gemessen werden. Der Randbereich des Schaums wurde deutlich stärker komprimiert als der Mittelbereich. Dafür ist wahrscheinlich die Kontaktfläche zwischen dem PU-Schaum und der Sinterform verantwortlich. Zusätzlich wird durch das Herstellungsverfahren Schlicker im Randbereich aufgestaut. Ein weiterer möglicher Grund könnte sein, dass der Schaum sich beim Versuch der Kompression nach oben auswölbt, wodurch keine einheitliche Kompression erwirkt werden kann. Dieser Effekt nimmt mit zunehmender Größe des Ausgangsschaumes zu. Dennoch war bei einer geringeren Kompression von 10-40 % im mittleren Bereich ein relativ homogenes Kompressionsverhalten zu beobachten. Der zur Peripherie kompakter werdende Schaum ist keineswegs nachteilig, sondern eventuell sogar von Vorteil. Der kompakte Rand könnte als mechanische Stabilisierung der filigranen Schäume genutzt werden. Auch ähnelt dieser Aufbau dem des menschlichen Knochens, der ebenfalls einen kompakten und einen spongiösen Bereich besitzt. Somit stellt der Ansatz, durch eine niedrige Kompression von 10-40 % des PU-Schaumes mit 60 ppi eine anisotrope Porengeometrie zu bilden, prinzipiell eine gute Herangehensweise dar, sie muss jedoch noch in einigen Punkten optimiert werden. Dazu zählt unter anderem die Steigerung der mechanischen Festigkeit, sowie eine stärkere anisotrope Porengeometrie, die möglicherweise durch eine andere Art der Kompression der PU-Schäume erzeugt werden könnte.

Die Biokompatibilitätsprüfung erfolgte durch die Untersuchung der Zellproliferation sowie der Zellaktivität. Zudem wurden die Proben mit Licht- und Elektro-

nenmikroskopie analysiert. Die Feststellung der Proteinexpression erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Kultivierung von humanen Osteoblasten (Osteosarkomzelllinie MG-63) auf den hergestellten MgP-Schäumen, sowie auf Referenzschäumen aus HA. Die Zellkultivierung auf den Oberflächen erfolgte über einen Zeitraum von 10 Tagen. Es wurde das Zellproliferationsverhalten mittels Zellzählung sowie die mitochondriale Aktivität der Zellen mittels WST-Test untersucht. Die Versuchsreihen wurden insgesamt dreimal durchgeführt, dabei wurde in jedem Versuch eine Zellkonzentration von ca. 50 000 Zellen pro ml auf die Schäume aufgebracht. Es wurden im ersten Versuch zwei in ihrem pH-Wert unterschiedliche Struvit Schäume verwendet. Hier ließ sich bei einem höheren pH-Wert der zu Struvit umgewandelten Proben eine deutliche Abnahme des Zellwachstums erkennen. Eine mögliche Erklärung für diesen Einbruch könnte sein, dass die zu Struvit umgewandelten Farringtonit Schäume mit einem pH-Wert von 10,5 alkalischer sind als jene mit einem pH-Wert von 8,5 und somit einen negativen Einfluß auf die Zellkultur haben. Da die mechanische Stabilität unabhängig von den pH-Werten ist, führte man die folgenden Versuche mit Struvit-Proben mit einem pH-Wert von 8,5 fort. Vergleicht man die Ergebnisse der Zellzählung, so war eine unterschiedliche Stärke des Proliferationsverhaltens auf den Schäumen zu beobachten. Auf den MgP-Schäumen konnte in den Versuchen im Vergleich zu den Referenzschäumen aus HA ein kontinuierliches Wachstum der Osteoblasten beobachtet werden. Die Zellen auf den zu Struvit umgewandelten MgP-Schäumen reichten sich in ihrem Proliferationsverhalten zwischen den MgP-Schäumen und den PLGA Proben ein. Auf den PLGA infiltrierten MgP-Schäumen konnte sowohl in Versuch 2 als auch in Versuch 3 das geringste Wachstum der Osteoblasten ermittelt werden. In Versuch 3 ließ sich im Vergleich zu den vorangegangenen Versuchen ein starkes Wachstum auf den zu Struvit umgewandelten Farringtonit Schäumen erkennen. Auffällig in Versuch 3 ist der einheitliche Abfall der Zellzahlen bei allen Proben bis Tag 7. Auch wenn kein einheitliches Wachstumsmuster erkennbar war, zeigte sich dennoch eine ähnliche Wachstumstendenz auf den einzelnen Schäumen. Mögliche Erklärungen für die Variationen der Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen könnten

zum Beispiel unterschiedlichen Lagerungen der einzelnen Prüfkörper sein. Andererseits wäre es auch möglich, dass sich die Zellen am Tag der Aussaat in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus befunden haben und es dadurch zu unterschiedlichen Ergebnissen kam. Anhand des WST-Tests konnte die Stoffwechselaktivität der gesamten Zellen auf den Proben miteinander verglichen werden. Bei der Auswertung der unterschiedlichen Versuchsreihen konnte auch hier keine eindeutige Übereinstimmung der einzelnen Versuchsreihen ermittelt werden. Die Zellen auf den MgP-Schäumen wiesen im ersten und dritten Versuch vergleichbare Werte auf. Sie besaßen in diesen beiden Versuchsreihen nach den Referenzschäumen die stärkste Aktivität, gefolgt von der Aktivität der Zellen auf den Struvit Proben. PLGA infiltrierte MgP-Schäume wiesen auch hier in beiden Versuchen (1 und 3) die geringsten Werte auf.

In Versuch 2 (Abb. 23) war eine umgekehrte Reihenfolge der Aktivität der Osteoblasten auf den Proben zu beobachten. Dabei zeigten Zellen auf den PLGA Proben die stärkste Aktivität nach denen auf HA-Schäumen. Darauf folgten die Kulturen auf den Struvit Proben. Den geringsten Wert zeigten in dieser Versuchsreihe die Zellen auf MgP-Schäumen. Zusammenfassend konnte für die Versuchsreihen festgestellt werden, dass die Osteoblasten auf den MgP-Schäumen sowohl ein kontinuierlich starkes Zellwachstum, als auch eine hohe Zellaktivität aufwiesen. Daran schlossen sich die Kulturen auf den zu Struvit umgewandelten und PLGA infiltrierte MgP-Schäumen an. Die Zellen auf den PLGA Proben zeigten an Tag 7 und 10 sowohl ein stark steigendes Zellwachstum, als auch eine hohe Zellaktivität. Diese Ergebnisse stimmen mit vorangegangenen Experimenten überein.<sup>102 103 104</sup>Die Analyse der Proteinexpression erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung mittels Western Blot. Dabei wurden folgende Proteine getestet: Vinculin, Bone Sialoprotein (BSP) sowie alkalische Phosphatase (ALP). BSP und ALP sind osteoblastenspezifische Marker. Dagegen ist Vinculin ein Bestandteil der fokalen Adhäsionen. Beim immunologischen Proteinnachweis zeigte sich eine etwas stärkere Expression von Vinculin auf den zu Struvit umgewandelten MgP-Schäumen als an der Magnesiumphosphatoberfläche. Diese höhere Vinculinexpression ist ein Indiz für eine bessere Haftung. Allerdings ist es ebenso möglich, dass die Zellen auf der

Magnesiumphosphatoberfläche nicht so gut adhären und so mehr fokale Adhäsionen ausbilden müssen um eine der auf HA äquivalenten Adhäsion zu erhalten. Dafür spricht, dass auf den Struvitkristallen keine Zellen zu finden sind und insgesamt weniger Zellen auf der Magnesiumphosphatoberfläche nachgewiesen wurden. Bei den beiden osteoblastenspezifischen Markern zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis: Die MgP-Schäume wiesen eine fast gleiche Proteinexpression wie die Referenzschäume aus HA auf. Lediglich zu Struvit umgewandelte MgP-Schäume zeigten einen niedrigeren Wert als MgP-Schäume und die Referenzschäume. Die Proteinexpression der osteogenen Marker spricht dafür, dass MgP-Schäume sich als Knochenersatzwerkstoff eignen und durch sie die spezifischen Eigenschaften der Osteoblasten nicht verändert werden.

Durch REM Aufnahmen konnte die Besiedelung der Oberflächen durch Osteoblasten analysiert werden. Beim Vergleich des Zellwachstums und der Zellmorphologie konnten keine Unterschiede in der Form der Osteoblasten beobachtet werden. Es zeigten sich vor allem Unterschiede in der erkennbaren Zellzahl, Zellgröße als auch in der Ausprägung ihrer zytoplasmatischen Fortsätze. Auf den Referenzschäumen aus HA war eine glatte Oberfläche sichtbar, auf der einzelne flache Osteoblasten siedelten. Auffällig war hierbei, dass die Osteoblasten sich vermehrt auf den Stegen befanden. Im Vergleich zu den Referenzschäumen zeigten die MgP-Schäume eine rauere Oberflächenstruktur. Mehrere unterschiedlich große Osteoblasten waren auf den MgP-Schäumen sichtbar. Im Unterschied zu den Referenzschäumen siedelten die Osteoblasten hier sowohl auf den Stegen als auch in den Poren. Die Oberfläche der zu Struvit umgewandelten MgP-Schäume zeigte eine kristalline Struktur. Die Struvit-Kristalle, vor allem die großen Kristalle, wurden kaum von Osteoblasten besiedelt. Sie könnten aufgrund ihrer Oberfläche zu glatt für die Osteoblasten sein. Obwohl sich bei den Struvit Proben Einbußen in der Zellzahl ergaben, konnten höhere Werte bei der Zellaktivität durch die dichte Besiedelung der Zwischenräume erreicht werden. Möglicherweise konnten nicht alle Zellen aus den inneren Bereichen des Schaumes herausgelöst werden, so dass dies zu einer Reduktion der Zellzahl führte. Durch die Life Dead Färbung wurde das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen überprüft. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten sich

sowohl auf den Referenzschäumen als auch auf den MgP-Schäumen die lebenden Zellen in der Überzahl. Auf den Struvit- und PLGA-Proben war ein ausgeglichenes Bild an lebenden und toten Zellen erkennbar. Wobei der Anteil an toten Zellen höher als auf den MgP-Schäumen war. Aufgrund des schlechteren Verhältnisses von lebenden zu toten Zellen kann man schließen, dass die Struvit- und PLGA-Proben eine geringfügig weniger gute Biokompatibilität zeigen als die MgP-Schäume.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, keramische Magnesiumphosphatschäume (MgP-Schäume) herzustellen und sie auf ihre Biokompatibilität hin zu testen. Dabei sollte die mechanische Stabilität durch verschiedene Arten der Herstellung verbessert werden. Hierfür wurden die Replika-Methode, sowie die Methode zur Herstellung von MgP-Schäumen mittels Albumin verwendet.

Mittels der Replika-Methode wurden unterschiedliche Pulvermengen ausgetestet um eine optimale mechanische Stabilität und Porosität zu erhalten. Hierdurch konnten keramische Schäume hergestellt werden, die einer mechanischen Belastung von ca. 0,1 MPa standhielten. Die relative Dichte bewegte sich dabei in einem Rahmen von 25-45 %. Zur Verbesserung der mechanischen Stabilität der hergestellten Farringtonit Schäume erfolgte die Umwandlung zu Struvit bzw. PLGA Infiltration. PLGA-infiltrierte MgP-Schäume wiesen eine enormen Steigerung der Druckfestigkeit von ca. 1 MPa auf, zu Struvit umgewandelte MgP-Schäume führten sogar zu einer Druckfestigkeitssteigerung von etwa 3,5 MPa. Es ergab sich weiterhin eine Steigerung der relativen Dichte, was zu einer Verringerung der Porosität führte. Diese betrug nach Umwandlung zu Struvit ca. 74 %, bei PLGA infiltrierte MgP-Schäumen 58,5 %. Dabei ist zu beachten, dass die Steigerung der relativen Dichte der PLGA infiltrierte Proben in einem akzeptablen Bereich liegt. Dieser Ansatz sollte in zukünftigen Untersuchungen weiter verfolgt werden.

Die alternative Herstellung durch geschäumtes Albumin konnte keine einheitlichen mechanisch stabilen Schäume erzeugen. Trotz mehrerer unterschiedlicher Versuchsansätze konnte die mechanische Instabilität der Schäume nicht signifikant verbessert werden. Die Poren gestalteten sich kugelförmig und besaßen einen Durchmesser von ca. 100-500  $\mu\text{m}$ , was sie gut für eine Vaskularisierung und folgendes Knochenwachstum geeignet macht. Die Poren waren zwar vermehrt in sich geschlossen, jedoch war eine Interkonnektivität durch kleine Defekte zwischen den Porenwänden durchaus gewährleistet. Da die Wände zwischen den Poren sehr dünn waren, wäre es möglich, dass sie sich

ausreichend schnell auflösen. Somit ist letztendlich eine Vaskularisierung auch bei Vorhandensein einer Mehrzahl an geschlossenen Poren plausibel.

Eine anisotrope Porengeometrie bei Replika-Schäumen konnte angedeutet erzeugt werden. Die anisotrope Porengeometrie wurde mittels unterschiedlich starker Kompression verschiedener Polyurethanschäume (PU-Schäume) untersucht. PU-Schäume mit einer hohen (80 ppi) bzw. niedrigen (20 ppi) Porendichte oder eine hohen Kompression der PU-Schäume waren ungeeignet, eine anisotrope Porengeometrie zu erzeugen. Die besten Ergebnisse erzielten 60 ppi PU-Schäume. Bei diesen waren die Poren prinzipiell gleichförmig ausgerichtet, jedoch ergab sich im Randbereich der Proben eine stärkere Kompression, welche die Gleichrichtung schwer erkennbar machte. Dies verlieh den Schäumen einen knochenähnlichen Aufbau.

Die Biokompatibilitätsprüfungen erfolgten mittels Zellproliferations- und Zellaktivitätsmessung, sowie durch Western Blot. Bei den Versuchsreihen zeigten die MgP-Schäume sowohl eine gute Zellproliferation von ca. 17 % (vgl. Referenzschäume ca. 16 %), als auch eine gute Zellaktivität von ca. 33 % (vgl. Referenzschäume ca. 40 %). Auch bei den Proteinnachweisen zeigten MgP-Schäume sich fast gleichauf mit den Referenzschäumen aus HA. Sowohl die Zellzahlen als auch die Zellaktivität waren auf den MgP-Schäumen tendenziell höher als auf den zu Struvit umgewandelten und PLGA infiltrierte Schäumen. Dennoch ist zu bedenken, dass sowohl PLGA infiltrierte als auch zu Struvit umgewandelte Schäume eine Verbesserung ihrer mechanischen Stabilität zeigten und eine gute Biokompatibilität besaßen.

Die in dieser Arbeit erstellten keramischen Schäume stellen hinsichtlich ihrer Stabilität eine Verbesserung dar und bieten aufgrund ihrer knochenähnlichen Struktur eine hervorragende Basis zur Vaskularisierung mit nachfolgendem Knochenwachstum. Weiterhin sprechen die guten Ergebnisse der Biokompatibilitätsprüfungen, sowie die bessere Resorbierbarkeit der MgP-Schäume, für den Einsatz von MgP-Schäumen als alternatives Knochenersatzmaterial. Um dieses Potential endgültig einschätzen, überprüfen und bestätigen zu können, bedarf es sowohl weiterer Versuchsreihen nach den in dieser Arbeit vorgestellten Methoden, als auch weiterführende Ansätze zukünftiger Untersuchungen.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

---

- <sup>1</sup> Glicestein J, History of bone reconstruction, 2000, *Ann Chir Plast Esthet* Vol. 45(3), pp. 171-174
- <sup>2</sup> Umanjec-Korac S, Wu G, Hassan B, Liu Y, Wismeijer D, A retrospective analysis of the resorption rate of deproteinized bovine bone as maxillary sinus graft material on cone beam computed tomography, 2013, *Clin Oral Implants Res.*, [Epub ahead of print]
- <sup>3</sup> Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P, Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes, 2002 *J Bone Joint Surg Am.*, Vol. 84-A(5), pp. 716-720
- <sup>4</sup> Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV, Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review, 2011, *Injury*, Vol. 42 Suppl 2, pp. S3-15
- <sup>5</sup> Kübler N, Osteoinduktion: Ein Beispiel für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Universität Düsseldorf, Jahrbuch 2002
- <sup>6</sup> Fischer CR, Cassilly R, Cantor W, Edusei E, Hammouri Q, Errico T, A systematic review of comparative studies on bone graft alternatives for common spine fusion procedures, 2013, *Eur Spine J.*, Vol. 22(6), pp. 1423-1435
- <sup>7</sup> Bauer TW, Muschler GF, Bone graft materials: An overview of the basic science, 2000, *Clin Orthop Relat Res.*, Vol. 371, pp. 10-27
- <sup>8</sup> Arias-Gallo J, Chamorro-Pons M, Avendaño C, Giménez-Gallego G., Influence of acidic fibroblast growth factor on bone regeneration in experimental cranial defects using spongostan and Bio-Oss as protein carriers, 2013, *J Craniofac Surg.*, Vol. 24(5), pp. 1507-1514
- <sup>9</sup> Denicolo PJ, Guyton MK, Cuenin M, Hokett S, Sharawy M, Borke JL, McPherson JC, Histologic Evaluation of Osseous Regeneration Following Combination Therapy with Platelet-Rich Plasma and BioOss in a Calvarial Critical Size Defect Model, *J Oral Implantol.*, 2013, Epub ahead of print
- <sup>10</sup> Nguyen H, Morgan DA, Forwood MR, Sterilization of allograft bone: is 25 kGy the gold standard for gamma irradiation?, 2007, *Cell Tissue Bank.*, Vol. 8(2), pp. 81-91
- <sup>11</sup> Vaccaro AR, Chiba K, Heller JG, Patel TCh, Thalgott JS, Truumees E, Fischgrund JS, Craig MR, Berta SC, Wang JC, Bone grafting alternatives in spinal surgery, 2002, *Spine J.*, Vol. 2(3), pp. 206-215

- <sup>12</sup>Ginebra MP, Canal C, Espanol M, Pastorino D, Montufar EB, Calcium phosphate cements as drug delivery materials, 2012, *Adv Drug Deliv Rev.*, Vol. 64(12), pp. 1090-1110
- <sup>13</sup> Roffi A, Filardo G, Kon E, Marcacci M, Does PRP enhance bone integration with grafts, graft substitutes, or implants? A systematic review, 2013, *BMC Musculoskelet Disord.*, Vol. 14(1), pp. 330
- <sup>14</sup> Güven O, Tekin US, Healing of bone defects by an osteopromotion technique using solvent-dehydrated cortical bone plate: a clinical and radiological study, 2006, *J Craniofac Surg.*, Vol. 17(6), pp.1105-1110
- <sup>15</sup> Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurström K, Sundin Y, Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis, 1993, *J Periodontol.*, Vol. 64(11s), pp. 1116-1128
- <sup>16</sup> Kenney EB, Jovanovic SA, Osteopromotion as an adjunct to osseointegration, 1993, *Int J Prosthodont.*, Vol. 6(2), pp. 131-136
- <sup>17</sup> Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G, Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth, 1998, *Biomaterials* Vol. 19, pp. 133–139
- <sup>18</sup> Lu JX, Flautre B, Anselme K, Hardouin P, Descamps M, Gallur A, Descamps M, Thierry B, Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo, 1999, *J Mater Sci Mater Med.*, Vol. 10, pp. 111–120
- <sup>19</sup> Søre K, Merrild DM, Delaissé JM, Steering the osteoclast through the demineralization-collagenolysis balance, 2013, *Bone*, Vol. 56(1), pp. 191-198
- <sup>20</sup> Ewald A, Lochner B, Gbureck U, Groll J, Krüger R, Structural Optimization of Macroporous Magnesium Phosphate Scaffolds and their Cytocompatibility, 2012, *Key Eng Mater.*, Vols. 493-494, pp. 813-819
- <sup>22</sup> Emkey RD, Emkey GR, Calcium metabolism and correcting calcium deficiencies, 2012, *Endocrinol Metab Clin North Am*, Vol. 41(3), pp. 527-556
- <sup>23</sup> Seeman E, Delmas PD, Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility, 2006, *N Engl J Med*. Vol. 354(21), pp. 2250-2261
- <sup>24</sup> Fratzi P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P, Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone, 2004, *J Mater Chem*, Vol. 14, pp. 2115–2123
- <sup>25</sup> de Baat P, Heijboer MP, de Baat C, Development, physiology, and cell activity of bone, 2005, *Ned Tijdschr Tandheelkd*. Vol. 112(7), pp. 258-263

- 
- <sup>26</sup> Klammert U, Vorndran E, Reuther T, Müller FA, Zorn K, Gbureck U, Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing, 2010, *J Mater Sci Mater Med.*, Vol.21, pp. 2947-2953
- <sup>27</sup> Brown WE, Chow LC, A new calcium phosphate setting cement, 1983, *J Dent Res.*, Vol.62, p. 672
- <sup>28</sup> LeGeros RZ, Chohayeb A, Shulman A, Apatitic calcium phosphates: possible dental restorative materials, 1982, *J Dent Res.*, Vol. 61, p. 343
- <sup>29</sup> Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G, New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine, 2010, *Acta Biomater.*, Vol. 6(8), pp.2863-2873
- <sup>30</sup> Bohner M, Gbureck U, Barralet JE, Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26(33), pp. 6423–6429
- <sup>31</sup> Ginebra MP, Calcium phosphate bone cements, 2008, in S. Deb (Ed.), *Orthopaedic bone cements*, Woodhead Publishing Ltd Cambridge, pp 206-230
- <sup>32</sup> Kobayashi S, Kawai W, Wakayama S, The effect of pressure during sintering on the strength and the fracture toughness of hydroxyapatite ceramics, 2006, *J Mater Sci Mater Med*, Vol. 17(11), pp. 1089-1093
- <sup>33</sup> Jang S, Kang S, Effect of sintering temperature on the thermal properties of diopside-based glass-ceramics of varying CaO/MgO ratio, 2013, *J Nanosci Nanotechnol*, Vol. 13(8), pp. 5883-5886
- <sup>34</sup> Dorozhkin SV, Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, 2009, *Materials* 2, pp. 399–498
- <sup>35</sup> Dorozhkin SV, Calcium orthophosphates, 2007, *J Mater Sci* Vol. 42, pp. 1061–1095
- <sup>36</sup> Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, Ross J, Goldstein SA, Jupiter JB, Rosenthal DI, Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone, 1995, *Science*, Vol. 267, pp.1796-1799.
- <sup>37</sup> Lemaitre J, Munting E, Mirtchi AA, Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements, 1992, *Rev Stomatol Chir Maxillofac.*, Vol.93(3), pp.163-165
- <sup>38</sup> Ewald A, Helmschrott K, Knebl G, Mehrban N, Grover LM, Gbureck U. Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein expression in osteoblastic cells, 2011, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, Vol. 96(2), pp. 326-332

- <sup>39</sup> Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Bohner M, Matter S, Auer JA, von Rechenberg B, In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements, 2004, *Biomaterials* Vol. 25, pp. 1439–1451
- <sup>40</sup> Willmann G, Materialeigenschaften von Hydroxylapatit-Keramik, 1992 *Materi-  
alwiss und Werkstofftech.*, Vol. 23, pp. 107–110
- <sup>41</sup> Mestres G, Ginebra MP, Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties, 2011, *Acta Biomater.*, Vol. 7, pp. 1853–1861
- <sup>42</sup> Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H, Liu C, Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration, 2008, *Acta Biomater.*, Vol. 4, pp. 1873–1884
- <sup>43</sup> Vallet-Regí M, González-Calbet J, Calcium phosphates in the substitution of bone tissue, 2004, *J Progress in Solid State Chemistry*, Vol. 32, pp. 1–31
- <sup>44</sup> Jones J, Hench L L., Regeneration of trabecular bone using porous ceramics, 2003, *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, Vol. 7(4-5), pp. 301–307
- <sup>45</sup> Hulbert S F, Young F A, Mathews R S, Klawitter J J, Talbert C D, Stelling F H Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses, 1970, *J Biomed Mater Res.*, Vol. 4(3), pp. 433–456
- <sup>46</sup> Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y, Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis, 1997, *J Biochem.*, Vol.121(2), pp. 317–324
- <sup>47</sup> Kuboki Y, Jin Q, Takita H, Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis, 2001, *J Bone Joint Surg.*, Vol. 83A, pp. S105–S115
- <sup>48</sup> Gotz H E, Muller M, Emmel A, Holzwarth U, Erben R G, Stangl R, Effect of surface finish on the osseointegration of laser-treated titanium alloy implants, 2004, *Biomaterials*, Vol. 25 (18), pp. 4057–4064
- <sup>49</sup> Hoelzle D J, Svientek S R, Alleyne A G, Wagoner Johnson A J, Design and manufacture of combinatorial calcium phosphate bone scaffolds, 2011, *J Biomech Eng.*, Vol. 133(10):101001
- <sup>50</sup> Miao X, Hu Y, Liu J, Wong A P, Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements, 2004, *Mater Lett.*, Vol. 58(3-4), pp. 397–402

- 
- <sup>51</sup> Charriere E, Lemaitre J, Zysset Ph, Hydroxyapatite cement scaffolds with controlled macroporosity: fabrication protocol and mechanical properties, 2003, *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 809–817
- <sup>52</sup> Fabbri M, Celotti G C, Ravaglioli A, Hydroxyapatite-based porous aggregates: physico-chemical nature, structure, texture and architecture, 1995, *Biomaterials*, Vol. 16(3), 225-228.
- <sup>53</sup> Pollick S, Shors E C, Holmes L R, Kraut R A, Bone formation and implant degradation of coralline porous ceramics placed in bone and ectopic sites, 1995, *J Oral Maxillofac Surg*, Vol. 53, pp. 915–922
- <sup>54</sup> Miao X, Lim W K, Huang X, Chen Y, Preparation and characterization of interpenetrating phased TCP/HA/PLGA composites, 2005, *Mater Lett.*, Vol. 59, pp. 4000–4005
- <sup>55</sup> Miao X, Tan L P, Tan L S, Huang X, Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA–bioactive glass, 2007, *Mater Sci Eng C.*, Vol. 27, pp. 274–279
- <sup>56</sup> Huang X, Miao X, Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass, 2007, *J Biomater Appl.*, Vol. 21, pp. 351–374
- <sup>57</sup> Li X, Li D, Lu B, Tang Y, Wang L, Wang Z, Design and fabrication of CAP scaffolds by indirect solid free form fabrication, 2005, *Rapid Prototyping J.*, Vol. 11, pp. 312–318
- <sup>58</sup> Li X, Li D, Lu B, Wang L, Wang Z, Fabrication and evaluation of calcium phosphate cement scaffold with controlled internal channel architecture and complex shape, 2007, *Proc Inst Mech Eng H.*, Vol. 221, pp. 951–958
- <sup>59</sup> Guo D, Xu K, Han Y, The in situ synthesis of biphasic calcium phosphate scaffolds with controllable compositions, structures, and adjustable properties, 2009, *J Biomed Mater Res A.*, Vol. 88, pp. 43–52
- <sup>60</sup> Almirall A, Larrecq G, Delgado J A, Martínez S, Planell J A, Ginebra MP, Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an alpha-TCP paste., 2004, *Biomaterials*, Vol. 25(17), pp. 3671-3680
- <sup>61</sup> Hesaraki S, Sharifi D, Investigation of an effervescent additive as porogenic agent for bone cement macroporosity, 2007, *Biomed Mater Eng.*, Vol. 17(1), pp. 29-38.

- <sup>62</sup> Arita I H, Wilkinson D S, Mondragón M A, Castaño V M, Chemistry and sintering behaviour of thin hydroxyapatite ceramics with controlled porosity, 1995, *Biomaterials*, Vol. 16, pp. 403–408
- <sup>63</sup> Del Real R P, Wolke J G C, Vallet-Regí M, Jansen J A, A new method to produce macropores in calcium phosphate cements, 2002, *Biomaterials*, Vol. 23, pp. 3673–3680
- <sup>64</sup> Muth C M, Shank E S, Gas embolism, 2000, *N Engl J Med.*, Vol. 342(7), pp. 476-482
- <sup>65</sup> Ginebra M P, Delgado J A, Harr I, Almirall A, Del Valle S, Planell J A, Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam, 2007, *J Biomed Mater Res A.*, Vol. 80, pp. 351–361
- <sup>66</sup> Ribeiro C, Bressiani JC, Bressiani AHA, Characterization of the Calcium Phosphate Porous Ceramic Obtained by Foam Consolidation Using Albumin, 2008, *Key Eng Mater.*, Vol. 361-363, pp. 971-974
- <sup>67</sup> Markovic M, Takagi S, Chow L C, Formation of Macropores in Calcium Phosphate Cements Through the Use of Mannitol Crystals, 2001, *Key Eng Mater.*, Vol. 192-195, pp. 773-776
- <sup>68</sup> Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR, Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold, 2002, *Biomaterials.*, Vol. 23(15), pp. 3063-3072
- <sup>69</sup> Fernández E, Vlad M D, Gel M M, López J, Torres R, Cauich J V, Bohner M, Modulation of porosity in apatitic cements by the use of  $\alpha$ -tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 3395–3404
- <sup>70</sup> Rodríguez-Lorenzo LM, Vallet-Regí M, Ferreira JM, Fabrication of porous hydroxyapatite bodies by a new direct consolidation method: starch consolidation, 2002, *J Biomed Mater Res.*, Vol. 60(2), pp. 232-240.
- <sup>71</sup> Takagi S, Chow LC, Formation of macropores in calcium phosphate cement implants, 2001, *J Mater Sci Mater Med.*, Vol. 12(2), pp. 135-139
- <sup>72</sup> Xu HH, Quinn JB, Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity, 2002, *Biomaterials*, Vol. 23(1), pp. 193-202
- <sup>73</sup> Zuo Y, Yang F, Wolke JGC, Li Y, Jansen JA, Incorporation of biodegradable electrospun fibers into calcium phosphate cement for bone regeneration, 2010, *Acta Biomater.*, Vol. 6, pp. 1238–1247

- 
- <sup>74</sup> Xu HHK, Eichmiller FC, Giuseppetti AA, Reinforcement of a self-setting calcium phosphate cement with different fibers, 2000, *J Biomed Mater Res*, Vol. 52, pp. 107–114
- <sup>75</sup> Xu HHK, Eichmiller FC, Barndt PR, Effects of fiber length and volume fraction on the reinforcement of calcium phosphate cement, 2001, *J Mater Sci Mater Med.*, Vol. 12, pp. 57–65
- <sup>76</sup> Plachokova A, Link D, van den Dolder J, van den Beucken J, Jansen JA, Bone regenerative properties of injectable PGLA–CaP composite with TGF- $\beta$ 1 in a rat augmentation model, 2007, *J Tissue Eng Regen Med.*, Vol. 1, pp. 457–464
- <sup>77</sup> Habraken WJEM, Wolke JGC, Mikos AG, Jansen JA, PLGA micro-sphere/calcium phosphate cement composites for tissue engineering: in vitro release and degradation characteristics, 2008, *J Biomater Sci Polym E.*, Vol. 19, pp. 1171–1188
- <sup>78</sup> Ruhé PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG, RhBMP-2 release from injectable poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium–phosphate cement composites, 2003, *J Bone Joint Surg Am.*, Vol. 85, pp. 75–81
- <sup>79</sup> Ruhé PQ, Boerman OC, Russel FGM, Spauwen PHM, Mikos AG, Jansen JA, Controlled release of rhBMP-2 loaded poly(dl-lactic-co-glycolic acid)/calcium phosphate cement composites in vivo, 2005, *J Control Release*, Vol. 106, pp. 162–171
- <sup>80</sup> Bohner M. Implant comprising calcium cement and hydrophobic liquid, 2003, US Patent No. 6,642,285 B1
- <sup>81</sup> Binks BP, Emulsion-recent advances in understanding, *Modern aspects of emulsions science*, 1998, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 5–40
- <sup>82</sup> Bohner M, Calcium phosphate emulsions: possible applications, 2001, *Key Eng Mater.*, Vol. 192–195, pp. 765–768
- <sup>83</sup> Bohner M, van Lenthe GH, Grünenfelder S, Hirsiger W, Evison R, Müller R, Synthesis and characterization of porous  $\beta$ -tricalcium phosphate blocks, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 6099–6105
- <sup>84</sup> von Doernberg MC, von Rechenberg B, Bohner M, Grünenfelder S, van Lenthe GH, Müller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J, In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes, 2006, *Biomaterials*, Vol. 27, pp. 5186–5198

- <sup>85</sup> Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U, Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells, 2010, *Tissue Eng Part A.*, Vol. 16(12), pp. 3687-3695
- <sup>86</sup> Krüger R, Joklitschke D, Gbureck U, Ewald A, Development and Cytocompatibility Testing of Trimagnesium Phosphate and Struvite Foams, 2011, *Tissue Eng A.*, Vol. 17(3-4), pp. 562
- <sup>87</sup> Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, Shin JW, Liu C, Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calciumphosphate for bone tissue regeneration, 2010, *Biomaterials*, Vol. 31, pp. 1260–1269
- <sup>88</sup> Vorndran E, Ewald A, Müller FA, Zorn K, Kufner A, Gbureck U. Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO(4) system, 2011, *J Mater Sci Mater Med.*, Vol. 22(3), pp. 429-436
- <sup>89</sup> Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970, *Nature*, Vol. 227(5259), pp. 680-685
- <sup>90</sup> Ribeiro C, Bressiani JC, Bressiani AHA, Characterization of the Calcium Phosphate Porous Ceramic Obtained by Foam Consolidation Using Albumin, 2008, *Key Eng Mater.*, Vol. 361-363, pp. 971-974
- <sup>91</sup> Miao X, Hu Y, Liu J, Wong AP, Porous calcium phosphate ceramics prepared by coating polyurethane foams with calcium phosphate cements, 2004, *Materials Lett.*, Vol. 58(3-4), pp. 397–402
- <sup>92</sup> Ewald A, Lochner B, Gbureck U, Groll J, Krüger R, Structural Optimization of Macroporous Magnesium Phosphate Scaffolds and their Cytocompatibility, 2011, *Key Eng Mater.*, Vol. 493-494, pp. 813-819.
- <sup>93</sup> Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR, Preparation of macroporous calcium phosphate cement tissue engineering scaffold, 2002, *Biomaterials*, Vol. 23(15), pp. 3063–3072
- <sup>94</sup> Miao X, Tan LP, Tan LS, Huang X, Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA–bioactive glass, 2007, *Mater Sci Eng C.*, Vol. 27( 2), pp. 274–279
- <sup>95</sup> Miao X, Tan LP, Tan LS, Huang X, Porous calcium phosphate ceramics modified with PLGA–bioactive glass, 2007, *Mater Sci Eng C.*, Vol, 27, pp. 274–279
- <sup>96</sup> Huang X, Miao X, Novel porous hydroxyapatite prepared by combining H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foaming with PU sponge and modified with PLGA and bioactive glass, 2007, *J Biomater Appl.*, Vol. 21, pp. 351–374
- <sup>97</sup> Karageorgiou V, Kaplan D, Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, 2005, *Biomaterials*, Vol. 26( 27), pp. 5474–5491

- <sup>98</sup> Ribeiro C, Bressiani JC, Bressiani AHA, Characterization of the Calcium Phosphate Porous Ceramic Obtained by Foam Consolidation Using Albumin, 2008, *Key Eng Mater.*, Vols. 361-363, pp. 971-974
- <sup>99</sup> Dhara S, Bhargava P, A Simple Direct Casting Route to Ceramic Foams, 2003, *J Am Ceram Soc.*, Vol. 86(10), pp. 1645–1650
- <sup>100</sup> Lumry R, Eyring, H, Conformation changes of proteins, 1954, *J Phys Chem.*, Vol. 58(2), pp. 110-120
- <sup>101</sup> Delgado JA, Harr I, Almirall A, del Valle S, Planell JA, Ginebra MP, Injectability of a macroporous calcium phosphate cement, 2005, *Key Eng Mater.*, Vol. 284, pp. 157-160
- <sup>102</sup> Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U, Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells, 2010, *Tissue Eng Part A.*, Vol. 16(12), pp. 3687-3695
- <sup>103</sup> Diba, M, Tapia F, Boccaccini AR , Strobel L.A, Magnesium-Containing Bioactive Glasses for Biomedical Applications, 2012, *IJAGS*, Vol. 3(3), pp. 221-253
- <sup>104</sup> Wu Z, Tang T, Guo H, Tang S, Niu Y, Zhang J, Zhang W, Ma R, Su J, Liu C, Wei J, In vitro degradability, bioactivity and cell responses to mesoporous magnesium silicate for the induction of bone regeneration, 2014, *Colloids Surf B Biointerfaces*, Vol. 120, pp. 38-46

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zum Ersten bedanke ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Uwe Gbureck für das Überlassen des Themas meiner Arbeit, für die Betreuung, für die fachliche Unterstützung und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Einen großen Dank für die Hilfsbereitschaft und Betreuung bei der Einarbeitung in die Methoden bei stets freundlicher Atmosphäre möchte ich weiterhin allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg aussprechen. Ganz herzlich möchte ich mich in diesem Rahmen bei meinen Betreuern Dr. Reinhard Krüger und Dr. Andrea Ewald bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen fleißigen Korrekturlesern.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern, die mich auf meinem Weg stets unterstützt haben und mir die Universitätsausbildung ermöglichten.