

Aus der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**In vitro Testung neuer Anwendungsformen kalthärtender
Knochenzemente aus
resorbierbaren Orthophosphaten**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Melanie Bengel
aus Herrieden

Würzburg, November 2018

Referent: Prof. Dr. rer. nat. U. Gbureck

Korreferent: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Für meinen Opa

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Kenntnisstand.....	5
2.1 Calciumphosphat-Zemente	5
2.1.1 Bruschit-bildende Zemente	6
2.1.2 Hydroxylapatit-bildende Zemente	7
2.2 Magnesiumphosphat-Zemente	8
2.3 Calcium-Magnesium-Phosphatzemente	10
2.4 Granulate.....	11
2.5 Präfabrizierte Pasten.....	13
3. Material und Methoden.....	17
3.1 Verwendete Chemikalien.....	17
3.2 Technische Geräte	19
3.3 Herstellung der Zement-Rohmaterialien	20
3.4 Herstellung der Lösungen	21
3.5 Herstellung der Prüfkörper	22
3.5.1 Herstellung der Prüfkörper aus wässriger Zement-Paste	22
3.5.2 Herstellung der Prüfkörper aus ölbasierter Zement-Paste.....	22
3.6 Charakterisierung.....	25
3.6.1 Druckfestigkeit.....	25
3.6.2 Bestimmung des Massenverlustes	25
3.6.3 Porositätsbestimmung	26
3.6.4 Messung des pH-Wert Verlaufes	26
3.6.5 Bestimmung der Ionenfreisetzung	27
3.6.6 Bestimmung der Phasenzusammensetzung mittels Röntgendiffraktometrie	27
3.6.7 Oberflächenmorphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie.....	29
3.7 Biologische Testung	29

3.7.1 Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19.....	29
3.7.3 Herstellung der Prüfkörper für die Eluatiionsstudie.....	30
3.7.4 Bestimmung der Zellaktivität und Zellzahl	31
3.8 Herstellung und Charakterisierung sphärischer Granulate für die Tierstudie	32
4. Ergebnisse	34
4.1 Einfluss der Zementzusammensetzung auf die Bulk-Eigenschaften.....	34
4.1.1 Druckfestigkeit.....	34
4.1.2 Massenverlust	36
4.1.3 Porosität	38
4.2 Einfluss der Zementzusammensetzung auf die Lösungsprozesse.....	40
4.2.1 Massenspektrometrische Analyse	40
4.2.2 pH-Wert-Verlauf	44
4.3 Einfluss der Ionenzusammensetzung auf die Phasenzusammen-setzung und die Morphologie.....	46
4.3.1 Phasenanalyse mittels Röntgendiffraktometrie	46
4.3.2 Mikrostruktur der Zemente mittels Rasterelektronenmikroskopie.....	48
4.4 Charakterisierung der Granulate	51
4.4.1 Siebanalyse der Granulate.....	51
4.4.2 Untersuchung der Phasenzusammensetzung	52
4.4.3 Untersuchung der Oberflächenmorphologie	54
4.5 Zellbiologische Testung	57
4.5.1 Bestimmung der Zellzahl	57
4.5.2 Bestimmung der Zellaktivität.....	58
4.5.3 Normierung der Zellaktivität	61
5. Diskussion	62
5.1 Materialeigenschaften der wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten	63
5.2 Freisetzungsrates der Ionen , Massenverlust und die jeweilige pH-Wert-Änderung	66
5.3 Zytokompatibilität	69
6. Zusammenfassung	71
7. Literaturverzeichnis	73

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** a) Zement-Rohpulver und 2,0 M DAHP / 1,5 ADHP ; b) Paste nach Vermengung der beiden Komponenten..... 22
- Abbildung 2:** a) Dispenser, 5 ml Doppelkammerkartusche mit Paste-MgCPC und K_2HPO_4 -Lösung und Statikmischer; b) zusammengesetzter Dispenser; c) Applikation des Materials; d) 3 ml Spritze mit Abfülladapter für NaCl-Lösung, 10 ml Doppelkammerkartusche mit Paste-CPC, modifizierter Statikmischer.....24
- Abbildung 3:** Druckfestigkeiten der wässrigen Zement-Pasten (a) mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ mit 2,0 M DAHP / 1,5 M ADHP als flüssiger Phase und einem Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis von 2g/ml ; Druckfestigkeiten der ölbasierten Zement-Pasten (b) mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ mit K_2HPO_4 als flüssiger Phase, der Referenzpaste (b) mit NaCl als flüssiger Phase und einem Pulver-Flüssigkeitsverhältnis von 4:1; Lagerung über 2 ,6 ,12, 18, 24 und 30 Tage bei 37°C in PBS.....34/35
- Abbildung 4:** Massenverlust (in %) der Prüfkörper aus wässriger und ölbasierter Zement-Paste mit $Ca_{0,75}$ und $Ca_{0,25}$ und der Referenzpaste.....36
- Abbildung 5:** Porosität (in %) der Prüfkörper aus wässriger Zement-Paste (a) und ölbasierter Zement-Paste (b) mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ und der Referenz-Paste (b) nach 0, 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tagen Lagerung bei 37° in..... 39/40

Abbildung 6:	Konzentrationen (in mg/g) der aus den wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten freigesetzten Magnesium- (a), Phosphat- (b) und Calciumionen (c) im Zuge einer Auslagerung über 30 Tage in PBS bei 37 °C.....	42
Abbildung 7:	pH-Wert-Verlauf der PBS-Lösungen der Massenverluststudie, in denen die Prüfkörper der wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten mit $\text{Ca}_{0,75}$ und $\text{Ca}_{0,25}$ bei 37° C gelagert wurden.....	45
Abbildung 8:	Röntgendiffraktogramme der Ausgangspulver und ausgehärteten wässrigen Zement-Pasten auf Basis von $\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$ (a) bzw. $\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$ (b) nach 2 und 30 Tagen Auslagerung bei 37 °C in PBS.....	47
Abbildung 9:	Röntgendiffraktogramme des Ausgangspulvers und ausgehärteten ölbasierten Zement-Pasten auf Basis von $\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$ (a) bzw. $\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$ (b) als auch der Referenzpaste (c) nach 2 und 30 Tagen Auslagerung bei 37 °C in PBS.....	48
Abbildung 10:	REM-Aufnahmen der Bruchstücke der wässrigen Zement-Pasten bei 3000-facher Vergrößerung.....	49
Abbildung 11:	REM-Aufnahmen der Bruchstücke der ölbasierten Zement-Pasten bei 3000-facher Vergrößerung.....	50
Abbildung 12:	REM-Aufnahmen der Bruchstücke der Referenzpaste bei 3000-facher Vergrößerung.....	51
Abbildung 13:	Größenverteilung, der über Emulsionsverfahren hergestellten Granulate aus jeweils $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ mit einer 2 M DAHP/1,5 M ADHP-Lösung.....	55

Abbildung 14:	Röntgendiffraktogramme der Granulate mit $Ca_{0,75}$ und $Ca_{0,25}$, gemessen jeweils vor und nach der γ -Sterilisation.....	53
Abbildung 15:	REM-Aufnahmen der Granulate vor der Sterilisation bei 50-facher Vergrößerung.....	54
Abbildung 16:	REM-Aufnahmen der Granulate vor und nach der γ -Sterilisation.....	56
Abbildung 17:	Zellzahl humaner fetaler Osteoblasten (hFOB) nach 4, 6 und 10 Tagen.....	58
Abbildung 18:	a) Zellaktivität humaner fetaler Osteoblasten (hFOB) nach 4, 6 und 10 Tagen; b) 96-Wellplatte mit den Ergebnissen des WST-Tests.....	60
Abbildung 19:	Aktivität pro Zelle humaner fetaler Osteoblasten (hFOB) nach 4, 6 und 10 Tagen.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Knochenersatzmaterialien (KEM) nach ihrem Ursprung und Bedeutung.....	1
Tabelle 2: Einteilung alloplastischer Knochenersatzmaterialien und Beispiele.	2
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und deren Herkunft (Firma).....	17/18
Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte mit der Herstellungs-Firma.....	19
Tabelle 5: Bestandteile der Zement-Rohpulver.....	20
Tabelle 6: Zusammensetzung der ölbasierter Zement-Pasten aus Magnesium-Calcium-Phosphat-Pulvern und aus Calcium-Phosphat-Pulver (Referenz).....	23
Tabelle 7: Referenzmuster (PDF-Nr.) zur Auswertung der Diffraktogramme..	28
Tabelle 8: Ergebnisse und Bestimmtheitsmaß des linearen Fits der Graphen aus Abbildung 6 und gesamter Massenverlust m_{final} nach 30 d Auslagerung der Prüfkörper in PBS bei 37 °C.....	38
Tabelle 9: Gesamt-Anteil der nach 30 Tagen aus den wässrigen und ölbasierter Zement-Pasten freigesetzten Mg-, Ca- und P- Ionen in % bezogen auf 1g Rohpulver, auf Masse des Ions im Rohpulver, auf 1g Rohpulver/molar und auf die Stoffmenge des Ions im Rohpulver.....	44
Tabelle 10: Mittels XRD in den Zement-Pasten nachgewiesene Hauptphasen.....	46

Abkürzungsverzeichnis

α -TCP	alpha-Tricalciumphosphat
ADHP	Ammoniumdihydrogenphosphat
β -TCP	β -Tricalciumphosphat
CaP	Calciumphosphat
CDHA	calcium-defizitärem Hydroxylapatit
CMPC	Calcium-Magnesium-Phosphat-Zemente
CPC	Calciumphosphat Zement (engl. Calcium Phosphate Cement)
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat
DCPA	Dicalciumphosphatanhydrat (Monetit)
DCPD	Dicalciumphosphatdihydrat (Bruschit)
DKK	Doppelkammer-Kartusche
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
HA	Hydroxylapatit
hFOB	humane fetale Osteoblasten
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. inductively coupled plasma mass spectrometry)
KEM	Knochenersatzmaterial
MCPM	Monocalciumphosphat Monohydrat
MgO	Magnesiumoxid
MgP	Magnesiumphosphat
MPa	Megapascal

MPC	Magnesiumphosphat Zemente
OCP	Octacalciumphosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PK	Prüfkörper
PLR	Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis (engl. Powder-to-Liquid-Ratio)
PS	Polystyrol
PVC	Polyvinylchlorid
REM	Rasterelektronenmikroskop
TCP	Tricalciumphosphat
XRD	Röntgendiffraktometrie (engl. X-Ray Diffraction)

1. Einleitung und Problemstellung

In Folge traumatischer Verletzungen (Frakturen), Tumorexzisionen oder auch Knochennekrosen entstehen knöcherne Defekte, welche je nach Größe und Lage einen Knochenersatz fordern. ¹ Im Jahre 1668 wurde erstmals von dem Niederländer Job van Meekeren ² eine Knochentransplantation durchgeführt, bei der das Schädeldach eines Soldaten mit einem Teil eines Hundeschädels rekonstruiert wurde. ^{3,4} Alternativ hierzu wurden erstmals um 1890 von Ollier und Barth ² anhand tierexperimenteller Untersuchungen verschiedene Knochenersatzmaterialien (KEM) getestet und somit das Fundament für die heutigen Knochenersatzmaterialien gelegt. ^{5,2}

Zu den Anforderungen, welche an KEM gestellt werden, zählen Belastungsstabilität, Biokompatibilität, Resorbierbarkeit, Sterilisierbarkeit sowie Osteokonduktion, Osteoinduktion, Osteogenese und Osteointegration. ⁵⁻⁸ Bei der Osteokonduktion dient das Transplantat als Leitstruktur, in welches das umliegende Knochengewebe einsprießen kann. Unter Osteoinduktion versteht man die Anregung umliegender Zellen zur Differenzierung. Erfolgt die Knochenneubildung aus Zellen des eingebrachten Transplantates spricht man von Osteogenese.⁹⁻¹¹ Nur durch die Osteointegration ist eine direkte, funktionelle und dauerhafte Verbindung zwischen Eigenknochen und Implantat möglich.¹²

Gemäß Ollier und Barth ^{13, 14} können KEM beispielsweise anhand ihres Ursprungs klassifiziert werden (**Tabelle 1**).^{13, 15, 14}

Tabelle 1: Einteilung der Knochenersatzmaterialien (KEM) nach ihrem Ursprung und Bedeutung.

Autolog	aus dem eigenen Körper/vom selben Individuum stammend
Allogen	Von der gleichen "Spezies" stammend (Mensch-Mensch)
Xenogen	Von einer anderen "Spezies" stammend (Rind, Schwein, Algen..)
Alloplastisch	Synthetische Materialien (vgl. Tab. 2)

Als Goldstandard gilt auch heute noch die autologe Knochentransplantation. Autologer Knochen ist das einzige KEM, welches alle wesentlichen Anforderungen erfüllt.^{1, 16} Es stehen viele Bereiche des Körpers für den Gewinn von Knochenmaterial zur Verfügung. Der Beckenkamm ist die beste Variante, um an die verschiedensten Implantationsorte angepasst zu werden,¹⁷ jedoch ist das Volumen an Material, das entnommen werden kann, begrenzt.¹⁸ Weitere Nachteile bei der Verwendung von Eigenknochen sind der notwendige Zweiteingriff zur Entnahme des Knochens, sowie Infektionen, Hämatome, anhaltende Schmerzen, Nervenschädigungen und eine hohe Entnahmemorbidität.^{19 20 18 21} Auch allogene Knochentransplantate sind wegen der Gefahr einer Immunreaktion und einer Übertragung von Krankheiten, wie zum Beispiel HIV nur bedingt geeignet.²² Rein synthetisch hergestellte Materialien, welche mitunter sehr gute osteokonduktive aber keine osteoinduktiven Eigenschaften aufweisen haben diese Problematiken nicht²³ und sind zudem lagerfähig sowie ausreichend verfügbar.²⁴

Sie lassen sich ihrerseits anhand ihrer Werkstoffklasse in Untergruppen unterteilen (**Tabelle 2**), wobei synthetische KEM meistens auf Basis von Calciumphosphaten und Keramiken basieren.⁶

Tabelle 2: Einteilung alloplastischer Knochenersatzmaterialien und Beispiele.²⁵⁻²⁷

Keramiken	Tricalciumphosphat, Glasionomere	Hydroxylapatit,	Biogläser,
Polymere	Polymethylmethacrylat Polylaktide/Polyglykoxide (degradierbar)	(nicht und andere	degradierbar), Copolymere
Metalle	Titanium, Tantal, Nickel-Titanium-Legierungen, Magnesium-Legierungen		
Komposite	Kombination aus verschiedenen synthetischen Materialien (auch Kombinationen mit nicht-synthetischen Materialien möglich)		

Gegenstand dieser Arbeit sind solche mineralischen Knochenzemente auf Basis von Calcium-²⁸, Magnesium-²⁹ oder Calcium-Magnesium-Phosphaten ³⁰. Die Rohpulver dieser sogenannten Calciumphosphatzemente (CPC) bzw. Magnesiumphosphatzemente (MPC) werden mit einer flüssigen Phase vermengt, um eine formbare Paste zu erhalten, welche direkt in den Defekt eingebracht werden kann. ^{31, 32} Je nach Ausgangspulver entstehen unterschiedliche Endprodukte wie Hydroxlyapatit (HA; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$; CPC)²⁸, Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; CPC)²⁸ oder auch Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; MPC) ³³. Allerdings ist deren Anwendungsgebiet aufgrund ihrer Sprödigkeit auf nicht-lasttragende Bereiche (Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie) beschränkt. ³⁴ Sie sind sowohl osteokonduktiv als auch teilweise bioresorbierbar. ¹ Vorndran et al. ³⁰ zeigten bereits, dass Zementformulierungen auf Basis eines mit Calcium versetzten MPC regulierbare *in vitro* Resorbierbarkeiten besitzen. ³⁰ Für diese Arbeit wurde daher unter anderem $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ aufgrund der vielversprechenden Eigenschaften ausgewählt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Knochenersatzmaterialien aus sekundären Calcium-, und Magnesiumphosphatverbindungen herzustellen, welche eine schnellere Regeneration des Knochens als auch eine höhere Löslichkeit als herkömmliche KEM aufweisen. Hierfür wurden Pulver der Zusammensetzung $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ synthetisiert. Diese wurden mit entsprechender Ammoniumphosphat-Lösung angemischt und die ausgehärteten Produkte anhand ihrer Festigkeit, Löslichkeit, Phasenzusammensetzung, Morphologie und Biokompatibilität untersucht. Der weitere Ansatz bestand darin, andere Anwendungsformen vergleichbarer Zusammensetzung, d.h. sphärische Granulate sowie präfabrizierte, lagerstabile Zement-Pasten hinsichtlich ihres Potentials zur Behandlung knöcherner Defekte *in vitro* zu testen. Granulate dienen maßgeblich dazu, die Resorption sowie Knochenregeneration durch die intergranulären Zwischenräume zu erleichtern. Dagegen haben präfabrizierte Zement-Pasten den Vorteil, dass sie erst nach Applikation in das feuchte Implantationsumfeld durch Diffusion der Körperflüssigkeit in die Paste aushärten. Somit wird die Bearbeitungszeit für den Chirurgen beim Auffüllen des Defektes verlängert und Beeinträchtigungen der Stabilität des ausgehärteten Implantats durch zeitlich bedingte Defizite bei der Pastenhomogenisierung und präzisen Defektauffüllung verhindert.

2. Kenntnisstand

2.1 Calciumphosphat-Zemente

Calciumphosphate gehören zu den wichtigsten Bestandteilen des Körpers und sind als mineralische Hauptkomponente in Knochen und Zähnen vorhanden. Damit ist zu begründen, weshalb so viele Biomaterialien auf Basis von Calciumphosphaten hergestellt werden. ³⁵

Eine mögliche Anwendungsform von Calciumphosphaten sind Calciumphosphat-Zemente (CPC). Diese wurden das erste Mal von Brown und Chow³⁶ in den 80er Jahren beschrieben. ³⁶ Sie sind biokompatibel, bioaktiv und osteokonduktiv. ³⁷ Bedingt durch das spröde Bruchverhalten und die eher geringe Materialfestigkeit kommen CPC's hauptsächlich in der Mund-Kiefer-Gesichts-Chirurgie in nicht lasttragenden Bereichen zum Einsatz. ^{25, 38} Die eher geringe mechanische Festigkeit könnte allerdings durch Verringerung der Partikelgröße als auch der Porosität noch gesteigert werden ³⁴. Vor allem die hohe Biokompatibilität, die gute Modelierbarkeit und damit Anpassung an Defektstrukturen als auch die Abbindeigenschaften sind es, welche die CPC's als KEM auszeichnen. ^{25, 39} Des Weiteren eignen sie sich auch als Trägersystem für verschiedene medizinische Wirkstoffe. ^{38, 40}

CPC's werden hergestellt, indem man ein oder mehrere Calciumphosphat-Pulver mit einer wässrigen Phase vermischt. Die hierdurch erhaltene Paste bindet nach kurzer Zeit in Folge von Lösungs-Fällungs-Prozessen ab.^{28 37} Nach Mischung des Rohpulvers mit der wässrigen Phase, geht dieses in Lösung und fällt aufgrund einer Übersättigung in Bezug auf das Reaktionsprodukt aus. ³⁴ Die Zement-Paste verfestigt sich folgend durch Wachstum und dreidimensionaler Verfilzung der Kristallite. ⁴¹ Je nach pH-Wert der Paste während der Abbindereaktion entstehen zwei unterschiedliche Reaktionsprodukte. So lassen sich die CPC's in sogenannte Bruschi- und Apatit-bildende Zemente unterteilen. Bruschi ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD)) entsteht bei einem pH-Wert unter 4,2 und Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$; HA) bei einem pH-Wert oberhalb von 4,2. ^{28,42}

2.1.1 Bruschit-bildende Zemente

Um das Mineral Bruschit zu erhalten, wird beispielsweise das Zementedukt β -Tricalciumphosphat ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; β -TCP) mit dem sauren Calciumphosphat Monocalciumphosphat Monohydrat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; MCPM) oder aber mit Phosphorsäure (H_3PO_4) vermengt. ⁴³ In **Gleichung (1)** und **(2)** ist die Reaktion von β -TCP mit MCPM (**Gleichung 1**)^{44, 45} und mit Phosphorsäure (**Gleichung 2**)⁴⁶ dargestellt:

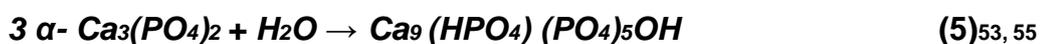


Bruschit unterliegt unter physiologischen Bedingungen einer viel schnelleren Resorbierbarkeit als HA. ^{31, 47} Das eigentlich gute Resorptionspotential von Bruschit wird durch die mögliche Umwandlung *in vivo* zu Apatit oder Calciumphosphatphasen mit vergleichbar geringer Löslichkeit, beeinträchtigt. ⁴⁸ Durch Beimengung eines Magnesium-Salzes kann dies jedoch verhindert werden. ^{31, 47} Bezüglich der mechanischen Belastbarkeit sind die Bruschit-Zemente den HA-Zementen deutlich unterlegen. In der Literatur wurden Druckfestigkeiten von 60 MPa und Zugfestigkeiten von 10 MPa beschrieben. ⁴¹ Die Abbindezeit bei Bruschit ist , bedingt durch die hohe Kristallwachstumsrate, mit ca. 30-60 Sekunden sehr schnell. Um eine klinisch relevante Abbindezeit zu erreichen, werden Abbindeverzögerer wie Citrat- ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7^{3-}$), Pyrophosphat- ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$), oder Sulfationen (SO_4^{2-}) benötigt. ^{49, 50}

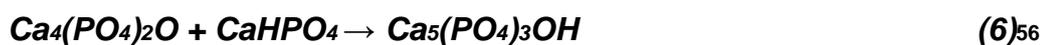
2.1.2 Hydroxylapatit-bildende Zemente

Hydroxylapatit ist unter den Calciumphosphaten das stabilste Mineral und der anorganischen Komponente sowohl der Zähne als auch des Knochens strukturell und chemisch sehr ähnlich.^{39, 51} Stöchiometrisches HA kristallisiert jedoch mit einem molaren Ca/P- Verhältnis von 1,67 , wohingegen biologisches HA mit einem Verhältnis von 1,5-1,67 kristallisiert. Dies erklärt sich durch die Einlagerung von Fremdionen (Na⁺, Mg²⁺, CO₃²⁻, F⁻, Cl⁻) in die Kristallstruktur durch Austausch gegen Ca²⁺ und PO₄²⁻- Ionen. ⁵²

Je nach Reaktionsart können die Apatit-bildenden Zemente in 1-, und 2-Komponenten-CPC unterteilt werden. Die 1-Komponenten-CPC´s können durch Hydrolyse aus α -TCP gewonnen werden, welche wie in folgender **Gleichung (5)** beschrieben zu calciumdefizitärem HA (Ca_{10x}(HPO₄)_x(PO₄)_{6x}(OH)_{2x} (0<x<1)³⁵; CDHA) abbinden. CDHA entsteht durch Hydrolyse bei Raum- bzw. Körpertemperatur und pH-Werten von 6,5 und 9,5. ⁵³⁻⁵⁵



Im Gegensatz dazu findet die Zementreaktion bei 2-Komponenten-Systemen über eine Säure-Base-Reaktion statt. Dazu benötigen diese als Ausgangsstoffe basische Calciumphosphate - wie etwa Tetracalciumphosphat (Ca₄(PO₄)₂O; TTCP) **Gleichung (6)** oder Calciumoxid (CaO) (**Gleichung (7)**)- kombiniert mit leicht sauren Komponenten, wie Monetit (CaHPO₄; DCPA), DCPD (CaHPO₄·2H₂O) oder Octacalciumphosphat (Ca₈H₂(PO₄)₆; OCP).



Generell weisen Hydroxylapatit-Zemente Druckfestigkeiten von bis zu 83 MPa und Zugfestigkeiten von 16 MPa auf und sind somit etwas stabiler als Brushit-Zemente. ^{38, 59} Die Abbindedauer ist im Vergleich hingegen eher lang. Um diese auf Zeiten von 10-15 Minuten zu verkürzen, werden Keimkristalle oder überschüssige Phosphat (PO_4^{3-}) - bzw. Calciumionen (Ca^{2+}) verwendet. ^{31, 38} Auch bezüglich der Löslichkeit und der Resorbierbarkeit unterliegt HA Brushit deutlich. ⁶⁰

2.2 Magnesiumphosphat-Zemente

Magnesiumphosphatzemente (MPC) gehen, vergleichbar mit Brushit im Falle der CPC's, aus einer Säure-Base Reaktion hervor. ³³ Ein mögliches Reaktionsprodukt hierbei ist Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)⁶¹, welches im medizinischen Bereich als möglicher Bestandteil von Nierensteinen bekannt ist, den so genannten Infektsteinen.⁶²

Die Startprodukte der Zementreaktion für die Bildung von Struvit sind meistens Magnesiumoxid (MgO) oder Farringtonit ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$), sowie eine wässrige Ammoniumphosphat-Phase.²⁹ Bei Ersterem dient Magnesiumoxid als Basis-Komponente, wohingegen Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) als auch Ammoniumdihydrogenphosphat (ADHP, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) als Säure-Komponente dienen. ³³

Bei Verwendung von Magnesiumoxid und DAHP als Ausgangsmaterialien kommt es wie in folgender **Gleichung (8)** beschrieben neben der Bildung von Struvit auch zur Freisetzung von gesundheitsschädlichem Ammoniak (NH_3).

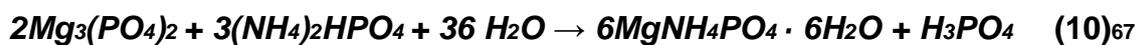


Verwendet man stattdessen ADHP entsteht laut **Gleichung (9)** Struvit ohne die Bildung von Ammoniak.



(9) 64,65, 66

Auch aus Farringtonit und DAHP kann gemäß **Gleichung (10)** Struvit gebildet werden.



Aufgrund ihrer kurzen Abbindedauer und hoher Anfangsfestigkeit werden MPC's im klassischen Sinne zur schnellen Reparatur von Flugbahnen und Straßenbelägen verwendet. 33, 68 Die mögliche Anwendung als Biomaterial wurde 1993 erstmals durch Driesens et al.⁶⁹ in Erwägung gezogen. MPC's zeigen hohe Festigkeitswerte von über 50 MPa und die für eine klinische Anwendbarkeit erforderliche kurze Abbindedauer von 3 bis 10 Minuten. 30, 70 Des Weiteren zeichnen sich diese Zemente durch ihre Biokompatibilität als auch Resorbierbarkeit aus. 71, 72 Im Allgemeinen kann der Abbauprozess auf zwei verschiedene Weisen erfolgen. Zum einen passiv - über Auflösungsprozesse - und zum anderen aktiv durch Osteoklasten. 72 Der passive Abbauvorgang kann nur erfolgen, wenn das Löslichkeitsprodukt des Zements um einiges höher als die dazugehörige Ionenkonzentration in der umgebenden Körperflüssigkeit ist. Bei MPC's ist dies ein deutlicher Vorteil gegenüber den Zementen, die nur über aktive Prozesse abgebaut werden können. Klammert et al.⁷³ erhielten für Struvit Löslichkeiten von $5.21 \cdot 10^{-15}$ bis $2.12 \cdot 10^{-13} \text{ mol l}^{-3}$ in einem pH-Wert Bereich von 7.01 bis 9.62.⁷³

Weiterhin konnten durch Mestres et al.³³ antibakterielle Eigenschaften natriumhaltiger MPC's gegen *Streptococcus sanguinis* nachgewiesen werden.³³ Schließlich wurde auch die Wirksamkeit von MPC's aus MgO und einem Phosphatsalz - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ oder NaH_2PO_4 oder beides vermengt - gegenüber

typischerweise bei infizierten Implantaten auftretenden Bakterien *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gezeigt.⁷⁴

Ein weiterer großer Vorteil der MPC's ist deren neutraler pH-Wert während der Abbindereaktion. Dies gilt für Zemente deren Pulver-, als auch Flüssigkeitsanteil ebenfalls neutral ist. Ein Beispiel hierfür wäre wie in **Gleichung (10)** verwendet: Farringtonit und DAHP.^{30, 72}

2.3 Calcium-Magnesium-Phosphatzemente

Calcium-Magnesium-Phosphatzemente (CMPC) verbinden die positiven Eigenschaften der CPC's und MPC's miteinander. Neben ihrer vielen guten Eigenschaften bringen CPC's auch einige Nachteile, insbesondere die beschriebenen Problematiken bei der Abbaubarkeit, mit.⁷⁵

Im Vergleich zu den CPC's scheinen MPC's vergleichbare bzw. zum Teil überlegene Eigenschaften aufzuweisen: Sie sind ebenfalls biokompatibel und besitzen zudem eine hohe Anfangsfestigkeit und ein erhöhtes Degradationspotential.⁷⁶ Es scheint daher sinnvoll, beide Materialien miteinander zu verbinden, um ein System mit kontrollierbaren Eigenschaften zu erhalten, wie es beispielsweise durch Wu et al ⁷⁷ und Wei et al ⁷⁶ realisiert wurde. Wu et al. ⁷⁷ stellten das CPC-Pulver aus TTCP und DCPA und das MPC-Pulver aus MgO und ADHP her. Durch eingehende Untersuchung der verschiedenen Eigenschaften der neuen Pulvermischung, konnten einige Vorteile gegenüber reinen CPC-, oder MPC-Pulvermischungen herauskristallisiert werden. So zeigte sich, dass bei einem *in vivo*-Versuch nach 6 Monaten bereits der größte Anteil des Defekts (> 80%) mit neuem Knochen aufgefüllt war. Im Vergleich dazu, konnte bei CPC-Probenkörpern nach dem gleichen Zeitraum kaum neuer Knochen nachgewiesen werden (> 10%). Auch wurde bei den CMPC-Probenkörpern bei Implantation keine Abstoßungs-, oder Entzündungsreaktion beobachtet. Bei der Abbindezeit (6-9 min) als auch der

Druckfestigkeit (68-91 MPa) erreichten die Misch-Zemente weitaus bessere Werte als die reinen CPC's bzw. MPC's.⁷⁷

Die meisten bekannten Versuche zu CMPC basierten auf der Vermengung der einzelnen Zementrohpulver miteinander. Problematisch hierbei kann eine mögliche Entmischung entweder während dem Transport oder auf Grund unterschiedlicher Partikelgrößen sein. Um derartige Prozesse zu verhindern, stellten Vorndran et al.³⁰ zum ersten Mal Untersuchungen an, in denen ein einziges Ausgangspulver aus Calcium-Magnesium-Phosphat verwendet wurde. Die Autoren stellten durch Sinterung einen Calcium-dotierten Magnesium-Phosphat mit der Formel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ mit $0 < x < 1.5$ her. Dieser wurde nach einer vierstündigen Mahlung mit 3.5 M (=mol/L) DAHP zu einer Paste angemischt. Das ausgehärtete Produkt setzte sich dabei aus Struvit sowie geringeren Mengen an Newberyit (bei hohem Magnesium-Gehalt) und Bruschit (bei hohem Calcium-Gehalt) zusammen. Beispielsweise konnten in Bezug auf die Festigkeit für das Rohpulver $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ nach vier Stunden Mahlung Werte von über 80 MPa aufgezeichnet werden. Für dieses Mischungsverhältnis wurde bei einer Mahldauer von einer Stunde eine für die klinische Anwendung angemessene Abbindezeit von 14 min erreicht. Auch in dem durchgeführten *in vitro*-Versuch zeigten die verwendeten MG63-Zellen auf der Oberfläche von $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ die besten Wachstumsraten. Folglich sind die Eigenschaften des $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ -Zements vielversprechend für den Einsatz als Knochenersatzmaterial, weshalb unter anderem dieses Material für die vorliegende Arbeit verwendet wurde.³⁰

2.4 Granulate

Granulate finden in der Medizin, vor allem in der Zahnmedizin im Bereich der Implantologie Anwendung. Aufgrund von Kieferatrophie oder Parodontitis ist eine direkte Implantatsetzung ohne vorangegangene Augmentation zum Aufbau des Knochenlagers kaum noch möglich.⁷⁸ Traditionell werden zur Sinusboden-Augmentation oder Deckung parodontaler Knochendefekte β -TCP Granulate

eingesetzt. ⁷⁹ Granulate mit Magnesiumphosphat-Verbindungen, wie sie in dieser Arbeit auf Grundlage der Arbeit von Christel et al.⁸⁰ verwendet wurden, sollten auf Grund ihrer höheren Löslichkeit eine bessere und schnellere Regeneration im Vergleich zu den traditionell angewandten Granulaten aufzeigen. ⁸⁰

Die Herstellung von Granulaten aus mineralischen Knochenzementen ist über mehrere Verfahren, wie beispielsweise durch Zerkleinerung mit anschließender Siebung, Sprühtrocknung oder auch das sogenannte Emulsionsverfahren möglich.⁸¹

Das einfachste aller Verfahren, ist die Zerkleinerung von ausgehärteten Zement-Blöcken mit einem Mörser. Tamimi et al.⁸² stellten Bruschi-Blöcke durch Vermengung von β -TCP mit Monocalciumphosphat Anhydrat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$; MCPA) und Wasser her. Diese wurden nach ihrer Aushärtung zerkleinert und deren Durchmesser durch Siebung auf Größen von 2 bis 200 μm eingestellt. ⁸² Kawai et al.⁸³ produzierten Granulate über Sprühtrocknung. Diese besaßen einen Durchmesser von 40 μm - 1mm. ⁸³ Liu et al. ⁸⁴ benutzten ein Tropfgussverfahren zur Herstellung der Granulate, wobei sie die Zement-Paste mit Hilfe einer Spritze in vorgefertigte Formen tropften. Durch Variation des Abstandes und des Durchmessers der Spritze konnten unterschiedlich große Granulate fabriziert werden. ⁸⁴

Auch über ein sogenanntes Emulsionsverfahren können Granulate gewonnen werden. Emulsionen sind disperse Systeme, bei denen eine flüssige Phase (dispergierte Phase, innere Phase) in eine andere flüssige Phase (kohärente Phase, äußere Phase) verteilt ist. ⁸⁵ Sind die Phasen Wasser und Öl, so spricht man - je nachdem welche Phase in Form isolierter Tropfen in der anderen vorliegt - von einer Öl-in-Wasser- (O/W-) oder einer Wasser-in-Öl- (W/O-) Emulsion. ⁸⁶ Emulsionen sind thermodynamisch instabil. Das hat zur Folge, dass nicht stabilisierte Tropfen Agglomerate bilden oder zusammenfließen. Zur Stabilisierung werden daher sogenannte Emulgatoren eingesetzt. Emulgatoren oder auch Tenside sind amphiphile Moleküle, welche sich aus einer

hydrophoben (unpolar, lipophil) als auch aus einer hydrophilen (polar, lipophob) Gruppe zusammensetzen. Wenn ein Emulgator einem Wasser/Öl Gemisch hinzugefügt wird, wenden sie sich mit der hydrophilen Seite der Wasserphase und mit der hydrophoben Seite der Ölphase zu. Je nach Ladung und/oder Größe der Partikel stoßen sich die von den Tensiden umgebenen Tropfen sterisch oder auch elektrostatisch voneinander ab, was eine Koaleszenz dieser verhindert. ^{86, 87}

Um Granulate mittels Wasser-in-Öl-Emulsion herzustellen wird die hydrophile Zement-Paste unter ständigem Rühren in eine hydrophobe Flüssigkeit (Öl) gegeben und durch die Zugabe von Tensiden stabilisiert. Nach der Abbindereaktion erhält man die fertigen Granulate.⁸⁰

Das Prinzip der Emulsion machten sich Paul et al.⁸⁸ bereits zu nutze. Sie dispergierten eine Mischung aus HA-Partikeln, Chitosan und Essigsäure in Paraffin-Öl. Nach fünfminütigem Rühren fügten sie Glutaraldehyd hinzu, um die erhaltenen Granulate auszuhärten. Anschließend wurde durch Erhitzen und Waschen das Chitosan aus den Partikeln entfernt. ⁸⁸ Der Nachteil dieser Methode bestand in der Verwendung von Paraffin. Komlev et al.⁸⁹ hingegen verwendeten eine wässrige Lösung aus Öl und Gelatine. Dennoch musste auch hier nach Herstellung der Granulate die Gelatine durch Erhitzen und Waschvorgänge entfernt werden.⁸⁹ Bei beiden Prozessen wurden die Granulate zur Verfestigung gesintert. Hierdurch kann es jedoch zu Granulataggregationen und Umwandlung hydratisierter Phasen kommen. ^{81, 88,}

⁸⁹

2.5 Präfabrizierte Pasten

Herkömmliche Zement-Pasten haben den Nachteil, dass der Abbindevorgang unmittelbar nach dem Vermischen der wässrigen mit der festen Phase startet. Dies limitiert das zur Verfügung stehende Bearbeitungszeitfenster für den Chirurgen und kann somit massive Auswirkungen auf die Qualität des

ausgehärteten Implantatmaterials nehmen. Die sogenannten präfabrizierten Zemente liegen schon in pastöser Form vor und sollen erst im Defekt aushärten.

Durch den Wegfall des Anmischvorganges wird die Operationsdauer verkürzt und eine homogene Pastenzusammensetzung gewährleistet. Klassische Pastenformulierungen können je nach Anwender eine inhomogene Vermischung des Pulvers mit der Flüssigkeit bewirken, wodurch erhebliche Schwankungen in der Festigkeit des abgebundenen Zements entstehen können. So wird durch Anwendung von vorgefertigten Pasten als zusätzlicher positiver Aspekt die Qualität des Ergebnisses verbessert. ^{90,91} Weitere Vorteile sind eine Anwendung ohne Zeitdruck sowie eine erhöhte Lagerstabilität. Die Abbindereaktion beginnt, wie bereits angedeutet, erst nach Kontakt des Zementes mit Körperflüssigkeit. Dies liegt daran, dass die Pasten als flüssige Phase eine nicht-wässrige Komponente enthalten, welche im Körper diffusiv mit Körperflüssigkeit ausgetauscht wird und so den Abbindeprozess einleitet. ^{57,37, 92, 93} Es gibt zwei unterschiedliche Möglichkeiten präfabrizierte Pasten herzustellen: Die flüssige Phase ist entweder nicht mit Wasser mischbar oder aber mit Wasser mischbar und somit häufig auf Glycerin- oder Polyethylenglycol (PEG) -Basis. ^{91, 93}

Letztere Variante wurde in der Literatur beispielsweise durch Takagi et al. ⁹⁴ beschrieben. Laut diesen wurden bereits in vorherigen Studien Tetra-Calciumphosphat (TTCP) und DCPA erfolgreich als KEM getestet. Die erhaltene Paste zeigte ein Abbinden *in situ*, Injizierbarkeit und gute Handhabungseigenschaften. Takagi et al. ⁹⁴ erforschten die Eigenschaften von Glycerol-haltigen Pasten, bei welchen - nach Einbringung in den Defekt - der Abbindevorgang durch das umgebende physiologische Medium einsetzt, indem Wasser in die Paste diffundiert und Glycerin herausdiffundiert. Nachteilig hierbei ist die relative lange Abbindedauer von 62-100 Minuten. Sie kombinierten die Flüssigkeit mit Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) und Na_2HPO_4 und untersuchten deren Auswirkung auf die Festigkeit, Auswaschresistenz und Härtedauer. ^{94, 95}

Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich die Zugabe bestimmter Geliermittel wie von HPMC, Carboxyl Methylcellulose (CMC), Chitosan Acetat oder Chitosan Lactat positiv auf die Kohäsion der Paste auswirkt, da eine Resistenz gegen Auswaschen bereits nach < 2 Minuten geschaffen wurde. Im Gegensatz dazu waren Pasten ohne Gelierungsagenzien erst nach 25-30 Minuten kohäsiv in wässriger Umgebung. Jedoch können solche Zusätze, wie es für HPMC gezeigt wurde, eine Verlängerung der Abbindedauer herbeiführen, während beispielsweise Na_2HPO_4 als effektiver Abbindebeschleuniger von präfabrizierten Zement-Pasten eingesetzt wurde. ^{96, 97}

Jedoch wiesen bereits Ginebra et al.⁹¹ auf einen bedeutenden Nachteil bei der Verwendung von mit Wasser mischbaren Flüssigkeiten hin. Dies sei die hohe Affinität zu Wasser, welche die Lagerstabilität durch frühzeitiges Einsetzen der Abbindereaktion reduzieren kann, insofern die entsprechende Pastenkomponenten nicht aufwendig getrocknet und trocken gelagert wurden.⁹¹

Heinemann et al.⁹³ publizierten die Verwendung einer mit Wasser nicht-mischbaren Flüssigkeit, womit die bereits genannte Problematik umgangen wird. Die Autoren strebten ein Verhältnis von 85 % Zementpulver zu 15 % Öl-Tensid-Mischung an, wobei es sich bei der verwendeten Pulverkomponente um eine auf α - TCP basierte Mischung handelt, welche unter der Bezeichnung "Biozement D" von Driessens et al.⁹⁸ eingeführt wurde. ⁹³ Auf Grund des beigemischten Carbonats bildet sich hieraus bei Kontakt mit Wasser Kohlenstoff-haltiger Apatit anstelle von stöchiometrischem HA. ⁹⁹ Die Öl-Tensid-Mischung bestand aus einem synthetischen Triglycerid (Miglyol 812), sowie zwei oberflächenaktiven Substanzen (14,7 % Rizinusölethoxylat 35, 4,9 % Hexadecylphosphat). Auf diese Art hergestellte präfabrizierte Zement-Pasten zeigten deutliche Verbesserungen in der Injizierbarkeit und keine Einbußen in der Härtedauer und Festigkeit gegenüber herkömmlichen CPC's.⁹³ Bisher ist lediglich eine Paste dieser Art auf dem Medizinprodukt-Markt verfügbar. Sie wurde von INNOTERE GmbH unter dem Namen INNOTERE Paste-CPC auf dem Markt etabliert. Diese wird bereits zur Füllung von Knochendefekten nach Trauma oder auch Rekonstruktionen verwendet. ¹⁰⁰

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Paste als Kontrollgruppe, sowie Pasten auf MCPC-Basis mit vergleichbarer Zusammensetzung mittels Doppelkammerkartusche appliziert. Bei Verwendung einer derartigen Vorrichtung wird die Abbindereaktion durch die Vermischung der Öl-Tensid-Zement-Paste sofort aktiviert.⁹³ Dennoch kann die Paste direkt in den Defekt eingebracht werden, da die gerätgestützte Homogenisierung der beiden Phasen die klassische Injektionskanüle ersetzt und somit eine manuelle Vermischung der beiden Komponenten umgeht.

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Chemikalien

In **Tabelle 3** sind alle in der Doktorarbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und deren Herkunft (Firma).

Chemikalie	Firma
CaHPO ₄ (Lot# K32594)	Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland)
CaCO ₃ (Lot# A0915820545)	
NaCl	
KCl	
Na ₂ HPO ₄	
KH ₂ PO ₄	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	
NH ₄ H ₂ PO ₄	
Tween 80	
Paraffin viscous	
ICP-Mehrelementstandardlösung VI Certipur® (Calcium, Magnesium, Phosphor)	
Suprapur®, Salpetersäure 65%	
Paste-MgCPC-DKK (Ca _{0,25} Mg _{2,75} (PO ₄) ₂ bzw. Ca _{0,75} Mg _{2,25} (PO ₄) ₂ mit K ₂ HPO ₄)	
Paste-CPC-DKK (Paste-CPC mit NaCl)	
C ₃ H ₆ O (Aceton)	Honeywell Riedel-de Haën AG (Seelze, Deutschland)
Miglyol 812	Caesar & Loretz GmbH (Hilden, Deutschland)
MgHPO ₄ ·3 H ₂ O (Lot# BCBP3055V)	Fa. Sigma-Aldrich/Honeywell (Steinheim, Deutschland)
Accutase	
Mg(OH) ₂ (Lot# 16D144102)	Fa. VWR Prolabo (Darmstadt, Deutschland)
Destilliertes Wasser	FMZ Reinstwasseranlage Uni Würzburg
Leit-C (nach Göcke)	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Gibco™ DMEM	Fa. Thermo Fisher Scientific

Gibco™ Penicillin-Streptomycin	GmbH (Bremen, Deutschland)
Gibco™ Geneticin™ Selective Antibiotic (G 418 Sulfate)	
Gibco™ FBS (Fetal bovine serum)	
CasyTon	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
WST-1 Reagenz	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

3.2 Technische Geräte

In **Tabelle 4** sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Geräte mit der Herstellungs-Firma.

Geräte	Firma
Planeten-Kugelmühle PM 400	Retsch, Haan
Sinterofen	Oyten, Thermotechnik GmbH Oyten
Sieb Analysette 3 Pro, Vibratory Sieve Shaker	Firma Fritsch, Idar-Oberstein
Trockenschrank	Fa. Memmert, Schwabach
Röntgendiffraktometer Siemens D5005	Bruker AXS, Karlsruhe
Universal-Material-Prüfmaschine	Zwick/Roell, Ulm
ph-Meter inoLab	WTW, Weilheim
Magnetrührer C-MAG HS 7	IKA, Staufen
mechanischer Rührer RW16 basic	IKA, Staufen
Waage CP323S-OCE	Fa. Sartorius AG, Göttingen
ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)	Varian, Darmstadt
TW20 Wasserdampfbad	Julabo GmbH, Seelbach
Analysewaage OHAUS Explorer	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Labor-Kühlschrank Labex-468	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg
Rasterelektronenmikroskop (REM)- CB 340	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen
Sputter-Anlage EM ACE600	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Brutschrank HERACELL 150i	Fa. Thermo Fisher Scientific GmbH, Bremen
Casy® Cell Counter Model TT	Roche Diagnostics, Mannheim
Photometer Spark® 20M	Tecan, Crailsheim

3.3 Herstellung der Zement-Rohmaterialien

Für die Herstellung der Calcium dotierten Magnesiumphosphate $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ wurde $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ mit einer Kaffee-Mühle zerkleinert und auf eine Partikel-Größe von $<125 \mu\text{m}$ gesiebt. Das erhaltene Pulver wurde in der Planeten-Kugelmühle für 1 h bei 200 rpm trocken gemahlen, wobei die Mahlrichtung jede Minute geändert wurde. Die Ansatzgröße lag bei 125 g des Pulvers in 500 ml Achat-Gefäßen mit jeweils vier Achat-Kugeln ($\varnothing 30 \text{ mm}$).

Im Folgenden wurden die verschiedenen Pulverbestandteile $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, CaHPO_4 und CaCO_3 gemäß **Tabelle 5** in definierten Verhältnissen für 1 h in der Planeten-Kugelmühle unter obigen Bedingungen miteinander vermengt.

Tabelle 5: Bestandteile der Zement-Rohpulver .

Produkt	CaHPO_4	CaCO_3	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$\text{Mg}(\text{OH})_2$
$\text{Mg}_{2.75}\text{Ca}_{0.25}(\text{PO}_4)_2$	0,0621 mol 8,45 g	0,0298 mol 2,98 g	0,6804 mol 118,62 g	0,3421 mol 19,95 g
$\text{Mg}_{2.25}\text{Ca}_{0.75}(\text{PO}_4)_2$	0,1883 mol 25,62 g	0,0941 mol 9,42 g	0,5649 mol 98,48 g	0,2824 mol 16,47 g

Das Pulvergemisch wurde im Anschluss für 5 h bei 1100°C gesintert und der "Sinter-Kuchen" mit Hilfe von Mörser und Pistill zermahlen und manuell auf eine Partikelgröße von $<355 \mu\text{m}$ gesiebt.

Das so gewonnene Produkt wurde durch erneutes Mahlen unter oben genannten Bedingungen für 1 h in der Planeten-Kugelmühle mechanisch aktiviert.

3.4 Herstellung der Lösungen

Um im Folgenden die Prüfkörper herstellen zu können, wurde zuvor eine wässrige Phase hergestellt, mit der die Zementpulver abbinden sollen. Diese Ammoniumphosphatlösung wurde aus folgenden Komponenten hergestellt:

2,0 M DAHP (Merck, Darmstadt, Lot# A0731407 437) = $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

1,5 M ADHP (Merck, Darmstadt, Lot# A0369326 415) = $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

Die beiden Komponenten wurden auf der Waage CP323S-OCE abgewogen und in einen 1000 ml Kolben gegeben. Der Kolben wurde bis zur Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt und der Inhalt mit Hilfe eines Magnet-Rührgeräts und eines Magnet-Fisches durchmischt.

Die zweite benötigte Lösung ist eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS = Phosphate buffered saline). Diese wurde zur Lagerung der Prüfkörper verwendet. Da eine größere Menge dieser Lösung benötigt wurde, wurde eine 10fach-konzentrierte PBS-Lösung hergestellt.

Hierzu wurden 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 und 2,4 g KH_2PO_4 in einen 1000 ml Kolben gegeben und auf 1 L mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Das so erzeugte Gemenge wurde wiederum mit dem Magnet-Rührgerät, wie bereits oben beschrieben, durchmischt.

Für die Lagerung der Prüfkörper wurde lediglich eine 1fach-konzentrierte PBS-Lösung benötigt. Um diese herzustellen, wurden 100 ml der 10fach-konzentrierten PBS-Lösung entnommen und in einem neuen Gefäß mit destilliertem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

3.5 Herstellung der Prüfkörper

3.5.1 Herstellung der Prüfkörper aus wässriger Zement-Paste

Die beiden Zementpulver - $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ - wurden jeweils mit 2.0 M $(NH_4)_2HPO_4$ -/1.5 M $NH_4H_2PO_4$ -Lösung (siehe 3.4) in einem Pulver-Flüssigkeit-Verhältnis (PLR = powder-to-liquid-ratio) von 2 g/ml mit Hilfe eines Anrührspatels auf einer Glasplatte zu einer homogenen und blasenfreien Paste vermischt (**Abbildung 1**).

Diese wurde in Silikonformen mit den Abmessungen 6 mm x 6 mm x 12 mm eingebracht und für 1h bei 37° C und >90 % Luftfeuchtigkeit in einem Wasserdampfbad ausgehärtet. Im Anschluss wurden die Prüfkörper (PK) entformt und in einem Probengefäß mit jeweils 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (pH=7,4 , siehe 3.4) pro PK gegeben und bei 37° C gelagert. Nach 48 h wurde ein PBS-Wechsel vorgenommen, welcher alle zwei Tage entsprechend der Laufzeit des Versuches wiederholt wurde.

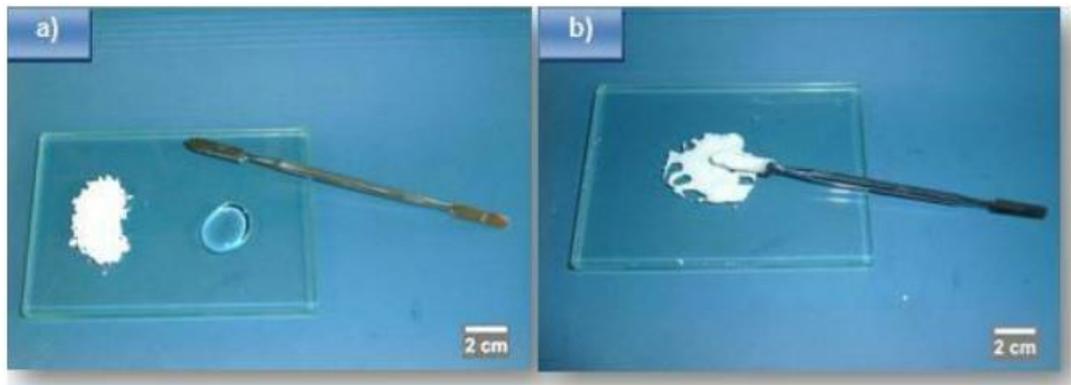


Abbildung 1: a) 3g Zement-Rohpulver (links) und 1,5 ml von 2,0 M DAHP / 1,5 M ADHP (rechts); b) Paste nach Vermengung der beiden Komponenten mit einem Anrührspatel.

3.5.2 Herstellung der Prüfkörper aus ölbasierter Zement-Paste

Der Kooperationspartner INNOTERE GmbH (Radebeul, Deutschland) mahlte die Rohpulver im Anschluss an ihre Sinterung über 4 h auf und stellte die ölbasierten Zement-Pasten her, welche in so genannten Doppelkammer-

Kartuschen (DKK) geliefert wurden (**Abbildung 2 a**). Es wurden die im weiteren Verlauf spezifizierten DKK angefertigt:

Tabelle 6: Zusammensetzung der ölbasierte Zement-Pasten aus Magnesium-Calcium-Phosphat-Pulvern und aus Calcium-Phosphat-Pulver (Referenz).

Paste-MgCPC-DKK	
Paste-MgCPC A = $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$	+ K_2HPO_4
Paste-MgCPC B = $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$	+ K_2HPO_4
Paste-CPC-DKK	
Paste-CPC	+NaCl

Die im Folgenden bezeichnete Paste-MgCPC A enthielt die Formulierung $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ und die Paste-MgCPC B die Formulierung $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ als Pulverbasis. Die Pulverkomponente wurde jeweils mit einer entsprechenden Menge DAHP und einer Öl-Tensid-Mischung zu einer homogenen Paste verarbeitet und befand sich in der jeweils größeren Kartusche des DKK-Systems. Die flüssige Phase aus K_2HPO_4 -Lösung befand sich entsprechend in der kleineren Kartusche, wobei das volumenbezogene Verhältnis aus Zement-Paste und K_2HPO_4 -Lösung bei 4:1 lag. Zum Vermischen der beiden Komponenten mit anschließender Extrusion wurde der DKK ein Statikmischer mit Mischelement aufgesetzt (**Abbildung 2 b**).

Als Referenzmaterial diente, basierend auf einem reinen CPC eine kommerziell verfügbare Zement-Paste (INNOTERE Paste-CPC). Die entsprechende DKK "Paste-CPC-DKK" enthielt bei Lieferung lediglich die ölbasierte CPC-Paste und musste noch über einen Metalladapter mit der entsprechenden Flüssigkeit, hier 0,9 % NaCl befüllt werden, so dass die Füllstände auf beiden Seiten der DKK gleich hoch waren. Dazu wurden nach Herstellerangaben 2,4 - 2,7 ml der NaCl-Lösung eingesetzt. Insgesamt ergab sich ebenfalls ein 4:1 Verhältnis von Paste und Lösung. Zum Vermischen beider Komponenten und zum Extrudieren der homogenisierten Paste wurde ein modifizierter Statikmischer mit befestigter Applikationskanüle ohne Mischelement aufgesteckt (**Abbildung 2 d**).

Als Applikationshilfe diente in beiden Fällen ein Dispenser (**Abbildung 2 a**). Für die Herstellung der Prüfkörper wurden die ölasierten Zement-Pasten direkt in Silikonformen mit den geometrischen Abmessungen 6 mm x 6 mm x 12 mm appliziert. Anschließend wurde entsprechend Punkt **3.5.1** vorgegangen. Für den späteren Tierversuch wurden diese Pasten direkt in den jeweiligen Defekt appliziert.

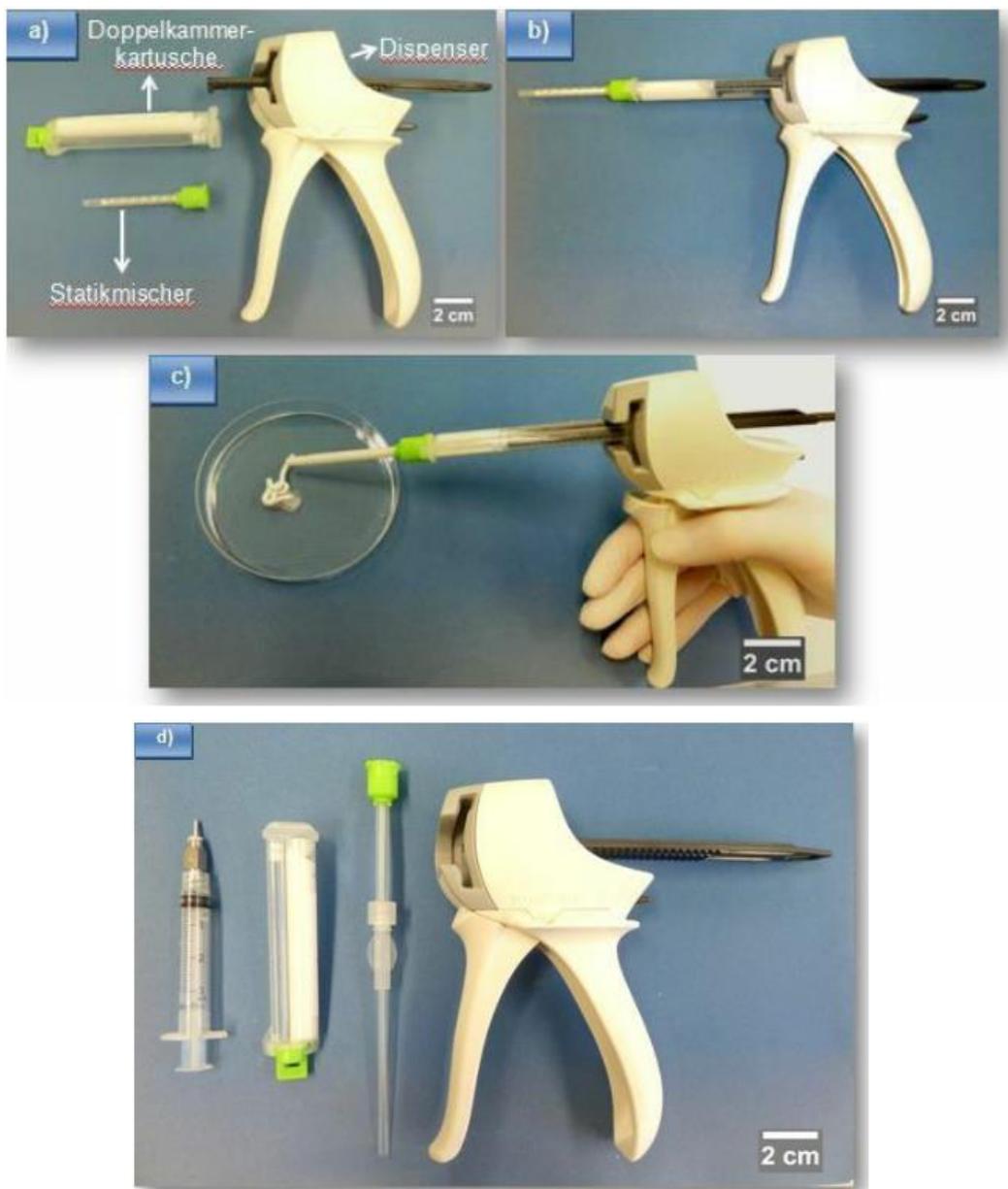


Abbildung 2: **a)** Dispenser (rechts), 5 ml Doppelkammerkartusche mit Paste-MgCPC und K_2HPO_4 -Lösung (oben links) und Statikmischer (mit Mischelement) (unten links); **b)** zusammengebauter Dispenser mit Mischer-DKK-System; **c)** Applikation des Materials; **d)** 3 ml Spritze mit Abfülladapter für NaCl-Lösung, 10 ml Doppelkammerkartusche mit Paste-CPC, modifizierter Statikmischer (ohne Mischelement) mit befestigter Applikationskanüle und Dispenser (von links nach rechts).

3.6 Charakterisierung

3.6.1 Druckfestigkeit

Für die Bestimmung der Druckfestigkeit wurden die Prüfkörper, welche nach dem unter **3.5** beschriebenen Verfahren hergestellt wurden, nach unterschiedlichen Laufzeiten von 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tagen verwendet. Dazu wurden diese zu den entsprechenden Zeitpunkten aus der PBS-Lösung entnommen und mit Schleifpapier der Körnung 500 plan-parallel geschliffen. Anschließend erfolgte die Druckfestigkeitsmessung unter axialer Kraftbelastung mithilfe der Universal-Materialprüfmaschine bei einer Prüfgeschwindigkeit von 1mm/min und mit einer 10 kN Messdose. Die Belastung erfolgte bis zum Versagen, sprich Bruch des Prüfkörpers. Aus der im Moment des Bruchs auftretenden Maximalkraft F_{\max} (N) und der Querschnittsfläche A (mm²) des Prüfkörpers lässt sich die Druckfestigkeit σ (MPa) gemäß **Formel (6)** berechnen.

Als Druckfestigkeit wird dabei die Widerstandsfähigkeit eines Werkstoffs bei der Einwirkung von Druckkräften bezeichnet 2.

$$\sigma = \frac{F_{\max}}{A} \quad (6)$$

3.6.2 Bestimmung des Massenverlustes

Um den Massenverlust der unterschiedlichen Zement-Pasten zu erfassen, wurden jeweils drei Prüfkörper aus den wässrigen und den ölbasierten Zement-Pasten sowie aus der Referenz-Paste hergestellt. Diese wurden in separaten Gefäßen über die gesamte Laufdauer des Versuches von 30 Tagen in 37° PBS gelagert. Es erfolgte alle zwei Tage die Bestimmung des jeweiligen Nassgewichtes. Vor der Lagerung der einzelnen PK in PBS wurde deren Initialgewicht bestimmt (Tag 0) und für jede Sorte als 100 % festgelegt. Der

Massenverlust wurde in Prozent angegeben um eine bessere Darstellung des Gewichtverlustes zu erzielen.

3.6.3 Porositätsbestimmung

Die Porosität ist ein wichtiger Parameter und auch Voraussetzung für eine gute Osteointegration. So kann eine vollständige Durchsetzung des KEM's erst ab einer bestimmten Porengröße/-volumina erreicht werden. Für die Bestimmung der Porosität wurden jeweils drei PK (für die Ermittlung des Mittelwertes) jeder Zement-Sorte aus der Festigkeitsstudie herangezogen. Diese wurden jeweils nach 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tagen Lagerung in PBS bei 37° entnommen und nicht der Druckfestigkeitsprüfung unterzogen. Anschließend wurde das Nassgewicht der PK mit der Analysewaage OHAUS und die geometrischen Abmessungen (Durchmesser, Breite und Höhe in mm) für die Berechnung des Volumens dieser bestimmt. Das Trockengewicht wurde nach 24 Stunden im Trockenschrank erfasst. Für die Berechnung der Porosität war noch die Bestimmung des Gewichtes von 1 ml - bei 24 Stunden in 37° gelagertem - PBS nötig, um somit die Dichte der Flüssigkeit festzustellen, in welcher die PK gelagert wurden.

Aus den so erhaltenen Daten konnte wie folgt die Porosität bestimmt werden:

$$\ddot{a} = \frac{\text{Massendifferenz (Nassgewicht - Trockengewicht)}}{\text{Dichte} \cdot \text{Volumen}}$$

3.6.4 Messung des pH-Wert Verlaufes

Mit Hilfe des pH-Meters inoLab und einer Einstichelektrode wurde der pH-Wert desjenigen PBS-Überstandes bestimmt, in welchem die Prüfkörper sowohl der wässrigen als auch der ölbasierten Knochenzemente bei 37° C gelagert

wurden. Die Messung erfolgte alle 2 Tage über einen Gesamtzeitraum von 30 Tagen an jeweils drei vergleichbaren Proben.

3.6.5 Bestimmung der Ionenfreisetzung

Um zu ermitteln, welche Menge an Calcium-, Magnesium- und Phosphationen aus den einzelnen Zementen freigesetzt wurden, wurde ein Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) verwendet.

Diese Analysemethode ermöglicht die sehr genaue Bestimmung einer Vielzahl von Elementen und Isotopen ¹⁰¹, wobei in der vorliegenden Arbeit die Isotope Ca 44, Mg 24 und P 31 untersucht wurden. Bei der ICP-MS wird durch einen hochfrequenten Strom ein Plasma aus ionisiertem Argon erzeugt. Die Probe wird dann durch einen Zerstäuber in das Plasma gesprüht und somit auf über 5000°C erhitzt. Anschließend werden die im Plasma generierten Ionen in Richtung des Analysators des Massenspektrometers beschleunigt, wo die einzelnen Elemente und deren Isotope messtechnisch erfasst werden. ¹⁰²

Dazu wurden die in Punkt 3.6.4 verwendeten PBS-Überstände in einem Verhältnis von 1:40 mit 1,3 %iger HNO₃-Lösung verdünnt und gegen die ICP-Mehrelementstandardlösung VI (**Tabelle 3**) der Konzentrationen 5 und 10 ppm vermessen. Als Referenz dienten PBS entsprechender Verdünnung sowie die 1,3 %ige HNO₃-Lösung.

3.6.6 Bestimmung der Phasenzusammensetzung mittels Röntgendiffraktometrie

Die qualitative Phasenanalyse der Ausgangspulver, der gemörserten und getrockneten, auf Druck untersuchten Zementprüfkörper, sowie der gemörserten Granulate vor und nach der γ -Sterilisation erfolgte mit Hilfe des Röntgendiffraktometers (XRD) D5005. Diese Art der Röntgenprüfung beruht auf der Beugung der Röntgenstrahlen einer bestimmten Wellenlänge λ (nm) an dreidimensional-periodisch aufgebauten Kristallgittern. ¹⁰³ Da die Beugung in Abhängigkeit des Einstrahlwinkels θ an den vielen parallelen und im gleichen Abstand d (mm) verlaufenden Netzebenenscharen erfolgt, kann es zur

Interferenz (Überlagerung) der gebeugten Röntgenstrahlen kommen. Bei konstruktiver Interferenz führt dies zu einem Reflex im entsprechenden Röntgendiffraktogramm. Diese Reflexe können nach der "Bragg-Gleichung" (**Gleichung 7**)¹⁰⁴ in Gitternetzabstände umgerechnet werden, wobei n die Beugungsordnung darstellt:

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \sin\theta_{hkl} \quad (7)^{104}$$

Da jeder Stoff bzw. Kristall einen charakteristischen Gitterabstand d besitzt, lässt sich somit über das entstandene Diffraktogramm eine exakte Bestimmung der Phasen erzielen. Dies geschieht über einen Vergleich mit Werten aus der Datenbank der ICDD (**Tabelle 7**).¹⁰⁵⁻¹⁰⁷

In der vorliegenden Arbeit wurden die zu untersuchenden Proben mit Cu K α -Strahlung (0,154 nm) in einem Winkelbereich 2 θ von 20°-40° mit einer Schrittweite von 0,02° und einer Schrittgeschwindigkeit von 1,5 s/Schritt gemessen. Der Emissionsstrom betrug 40 mA und die Beschleunigungsspannung 40 kV.

Tabelle 7: Referenzmuster (PDF-Nr.) zur Auswertung der Diffraktogramme .

Stoff	PDF-Nr.
α -TCP	29-0359
Bruschit	09-0077
Calcit	05-0586
Farringtonit	33-0876
Hydroxylapatit	09-0432
Monetit	09-0080
Newberyit	35-0780
Stanfieldit	11-0231
Struvit	15-0762

3.6.7 Oberflächenmorphologie mittels Rasterelektronenmikroskopie

Die unterschiedlich hergestellten Zement-Pasten und Granulate wurden mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) CB 340 bei 50-10.000-facher Vergrößerung betrachtet. Bei einem Rasterelektronenmikroskop wird die gesamte Oberfläche der jeweiligen Probe durch einen feinen Elektronenstrahl abgerastert. Die hierbei herausgelösten Sekundärelektronen dienen als Signal und werden von Detektoren aufgefangen. ^{106, 108}

Dazu wurden die Granulate und die zuvor durch die Druckfestigkeitsprüfung zerbrochenen Prüfkörper nach ihrer Trocknung mit einem leitfähigen Kleber Leit-C auf entsprechenden Proben Tellern fixiert und unter Argonatmosphäre mit 4 nm Platin besputtert, um statische Aufladungen zu vermeiden. Die REM-Analyse erfolgte schließlich bei einer Beschleunigungsspannung von 3 kV und bei Detektion der Sekundärelektronen.

3.7 Biologische Testung

Aus Praktikabilitätsgründen wurde die *in vitro* - Charakterisierung nicht an den Granulaten sondern an Zementblöcken der gleichen Zusammensetzung durchgeführt.

3.7.1 Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19

Dr. Steven A. Harris war derjenige, der erstmals diese Zelllinie im Jahre 1995 beschrieb. ¹⁰⁹ Diese Osteoblastenzelllinie ist ein Klon humaner fetaler Osteoblasten, die immortalisiert wurden. Um dies zu erreichen, wurde in die Zellen eine temperaturempfindliche Mutante des SV40 large T Antigen (tsA58) eingebracht. Diese weist bei unterschiedlichen Temperaturen verschiedene Konformationen auf, welche Auswirkungen auf das Verhalten der Osteoblastenzelllinie hat. So ist das SV40 T Antigen bei einer Temperatur von 33,5°C aktiv. Dies führt zu einer erhöhten Proliferationsrate der hFOB Zellen. Bei erhöhten Temperaturen - um die 39,5°C - stellen die Zellen die Proliferation

ein und differenzieren sich zu reifen Osteoblasten. Dies liegt an der Inaktivität des SV40 T Antigens.^{110, 111} Diese Zelllinie wurde für die durchgeführten Zellversuche verwendet.

3.7.2 Zellkultivierung und Aussaat

Die humane fetale Osteoblasten (hFOB) -Zelllinie 1.19 (LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) wurde in dem Zellkulturmedium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) bei 34° und 5 % CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium enthielt 1 % Penicillin/Streptomycin; 0,3 mg/ml Geneticin G-418 Sulfat und 10 % fetales Kälberserum (FCS). Für den Versuch wurden die Inserts von 24-Well-Platten mit je 50.000 Zellen/ml (23.000 Zellen/cm₂) besät und für 24 h unter obigen Bedingungen vor-kultiviert.

Im Anschluss wurde das Medium durch Medium der Eluationsstudie (siehe **3.7.3**) ausgetauscht, wobei für die Hälfte der Inserts eine 38%ige Verdünnung des jeweiligen Eluats mit Zellkulturmedium hergestellt wurde, während der Rest der Zellen das unverdünnte, 100%ige Eluat zur weiteren Kultivierung erhielt. Für die Kontrollgruppe (Zellkulturplastik Polystyrol, PS) wurde frisches Zellkulturmedium verwendet.

Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel, wobei als frisches Medium entsprechendes Eluat bzw. Verdünnungen hieraus, sowie frisches Zellkulturmedium im Falle der Kontrollgruppe verwendet wurde. Pro Verdünnung und Eluatsorte wurden drei Wells mit hFOB 1.19 besiedelt.

3.7.3 Herstellung der Prüfkörper für die Eluationsstudie

Die wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten wurden wie unter Abschnitt **3.5** beschrieben hergestellt und in eine runde Silikonform mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Höhe von 2 mm überführt (n=16 pro Prüfkörpersorte). Die Zementplättchen wurden nach 1 h im Wasserdampfbad bei 37° C und >90 % Luftfeuchte entformt und bei 37°C getrocknet.

Die γ -Sterilisation der Prüfkörper wurde bei einem kommerziellen Anbieter BBF Sterilisationsservice GmbH (Kernen im Remstal, Deutschland) bei einer Strahlendosis von 25 kGy durchgeführt.

Für die Zytotoxizitätsstudie wurden die Prüfkörper bei 34 C in 1 ml Zellkulturmedium pro Prüfkörper eluiert. Das Medium wurde alle zwei Tage durch ein frisches Medium ausgetauscht und das Eluat rein oder in einer entsprechenden Verdünnung auf die unter Abschnitt 4.7.1 beschriebenen Zellen gegeben, nachdem potentielle Partikelverunreinigungen für jeweils 5 min bei 4.700 rpm abzentrifugiert worden waren. Auf diese Weise erhielten die für 24 h vorkultivierten Zellen das erste, zwei Tage alte Eluat der Studie. Medienwechsel sowie Eluatentnahme wurden für die folgenden Tage parallel für bis zu 10 Tage durchgeführt. Auf diese Weise sollten mögliche Zusammenhänge zwischen der zellfreien Ionenfreisetzung und der Zytotoxizität herausgestellt werden. Für den ersten Messzeitpunkt wurde außerdem Polyvinylchlorid (PVC) als Positivkontrolle mitgeführt.

3.7.4 Bestimmung der Zellaktivität und Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl und -aktivität erfolgte an Tag 4, 6 und 10 nach erstmaliger Inkubation ("Tag 0") der vor-kultivierten Zellen mit Eluat.

Der WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat)-Test diente der Analyse der metabolischen Aktivität der Zellen, und somit auch der Analyse der Zellproliferation und -viabilität. WST-1 ist ein stabiles Tetrazoliumsalz, welches mit Hilfe der mitochondrialen Succinat-Reduktase, welche in metabolisch aktiven Zellen vorkommt, zum orangefarbenen Formazan umgesetzt wird. Dieser Farbumsatz kann mit Hilfe eines Photometers vermessen werden. ¹¹²⁻¹¹⁴

Dazu wurden die Zellen für 30 min bei 34 C und 5 % CO₂ mit Zellkulturmedium im Verhältnis 1:10 verdünnten WST-1 Reagenz inkubiert und der Überstand bei

einer Anregungswellenlänge von 450 nm spektralphotometrisch in Doppelbestimmung vermessen.

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen mittels Accutase von den PS-Oberflächen abgelöst, 1:10 mit der isotonischen Lösung CasyTon verdünnt und automatisch mittels Casy® Cell Counter gezählt. Die Zellzählung erfolgte entsprechend der Durchführung des WST-1-Tests an Tag 4,6 und 10 nach der Aussaat.

Der hier verwendete Zellzähler ist ein elektrischer Zellzähler, der nach dem Prinzip der Widerstandsmessung arbeitet. Hierbei wird die Zellsuspension durch eine unter Spannung stehende Kapillare mit bestimmten geometrischen Abmessungen gesaugt. Da intakte Zellen Isolatoren sind, wird die Elektrolytlösung im elektrischen Feld durch die Zellen verdrängt. Daraus resultierend erhöht sich der Widerstand und es entsteht ein elektrisches Signal, über welches die Zellzahl bestimmt werden kann.

3.8 Herstellung und Charakterisierung sphärischer Granulate für die Tierstudie

Für die Synthese der Granulate wurden zunächst 600 mg des Tensids Tween 80 (3 Gew% in Bezug auf die später verwendeten Zementpulvermenge) und 300 ml einer 2:1 Mischung der beiden pharmazeutisch zugelassenen Öle Paraffinöl (viskös) und Mygliol 812 mithilfe des mechanischen Rührers RW16 basic miteinander vermischt. Anschließend wurden 20 g des jeweiligen Zementpulvers - $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ bzw. $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ - mit 10 ml Ammoniumphosphatlösung (DAHP/ADHP; siehe 3.4) zu einer homogenen Paste vermischt, welche möglichst schnell unter weiterem Rühren bei ca. 427 rpm in die Ölphase überführt wurde. Als Rührwerkzeug diente eine über einen Glasstab angebrachte Teflonscheibe mit einem Durchmesser von 7 cm. Nach 60 min waren die Granulate ausreichend gehärtet und der Rührprozess konnte gestoppt werden.

Zur Reinigung der Granulate wurde der Öl-Überstand aus dem Becherglas abgegossen und das Behältnis mit 300 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Mit einem Holzspatel wurde die Suspension für 5 min vorsichtig gerührt und das Wasser im Anschluss an die Sedimentation der Granulate durch frisches Wasser ausgetauscht. In einem frischen Becherglas folgte erneut dreimalig ein Waschprozess mit jeweils 200 ml destilliertem Wasser unter vorsichtigem Rühren für je 5 min. Zuletzt wurde das Becherglas mit 200 ml Aceton aufgefüllt und für weitere 5 min vorsichtig gerührt. Nach Absinken der Granulate wurde der Überstand erneut abgeschüttet und die Granulate zunächst bei Raumtemperatur und anschließend bei 37 °C getrocknet.

Die getrockneten Granulate wurden mit Hilfe von Analysensieben unterschiedlicher Maschenweite (2mm, 1mm, 710 µm, 500 µm, 355 µm und 200 µm) ihrer Größe nach klassifiziert und das Gewicht der einzelnen Fraktionen bestimmt. Für den Tierversuch wurden Granulate in einem Größen-Spektrum von 500-710 µm benötigt.

Das Referenzgranulat, welches ebenfalls bei den XRD-, als auch REM-Untersuchungen analysiert wurde, wurde von der Firma INNOTERE GmbH bereitgestellt. Dies wurde durch Zerkleinerung, der aus Referenzpaste (CPC) gewonnen Blöcken erstellt.

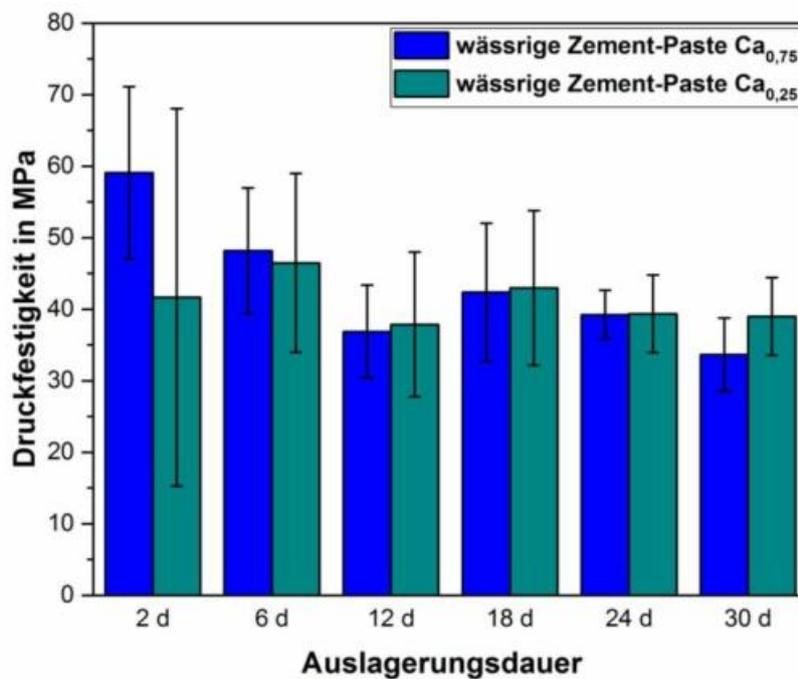
Die γ -Sterilisation der Granulate wurde bei einem kommerziellen Anbieter BBF Sterilisationsservice GmbH (Kernen im Remstal, Deutschland) bei einer Strahlendosis von 25 kGy durchgeführt.

4. Ergebnisse

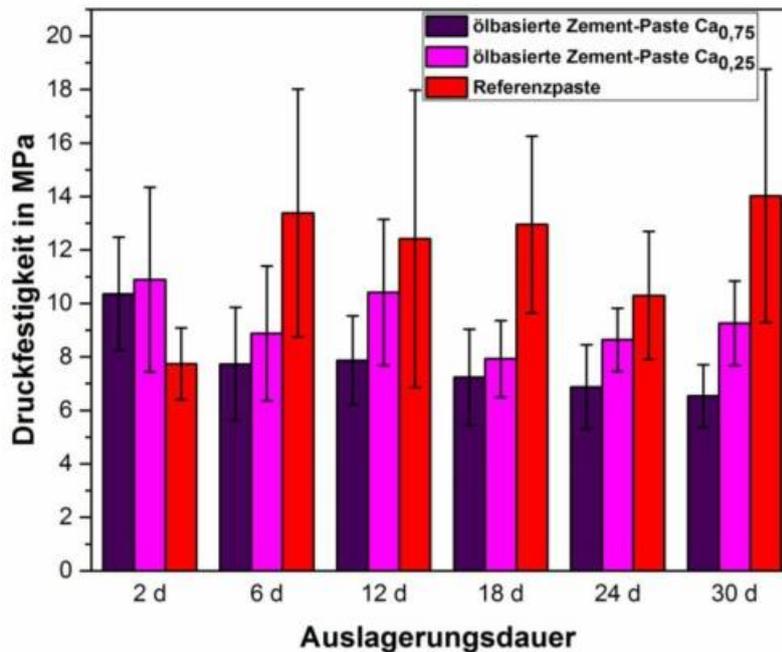
4.1 Einfluss der Zementzusammensetzung auf die Bulk-Eigenschaften

4.1.1 Druckfestigkeit

Die Druckfestigkeiten der Prüfkörper aus ölbasierter (Abbildung 3 b)) und wässrigen (Abbildung 3 a)) Zement-Pasten wurden jeweils nach einer Lagerungsdauer von 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tagen in PBS bei 37°C ermittelt. Die Druckfestigkeitswerte der Langzeituntersuchung sind in **Abbildung 3** dargestellt.



a)



b)

Abbildung 3: Druckfestigkeiten der wässrigen Zement-Pasten (a) mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ mit 2,0 M DAHP / 1,5 M ADHP als flüssiger Phase und einem Pulver-Flüssigkeits-Verhältnis von 2g/ml ; Druckfestigkeiten der ölbasierten Zement-Pasten (b) mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ mit K_2HPO_4 als flüssiger Phase, der Referenzpaste (b) mit NaCl als flüssiger Phase und einem Pulver-Flüssigkeitsverhältnis von 4:1; Lagerung über 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tage bei 37°C in PBS.

Bei Gegenüberstellung der beiden Zementsysteme fiel die deutlich höhere Festigkeit der wässrigen Zement-Pasten auf. Bereits nach 2 Tagen Lagerung in PBS erreichten die Pasten mit der höheren Calcium-Konzentration Festigkeiten von bis zu $59,1 \pm 1$ MPa und diejenigen mit der geringeren Calcium-Konzentration etwas geringere Festigkeiten von bis zu $41,7 \pm 26,4$ MPa (**Abbildung 3 a**). Unter Berücksichtigung der Standardabweichung ließ sich im weiteren Verlauf der Studie bei den wässrigen Zement-Pasten mit niedrigerem Calcium-Gehalt eine konstante Festigkeit von näherungsweise 40 MPa feststellen. Dagegen war bei den anderen wässrigen Zement-Pasten ein Abfall der Druckfestigkeit um etwas weniger als die Hälfte auf $33,6 \pm 5,1$ MPa zu verzeichnen (**Abbildung 3 a**).

Im Unterschied zu den wässrigen Zementsystemen wiesen die ölbasierten Zement-Pasten mit $10,4 \pm 2,1$ MPa ($Ca_{0,75}$) bzw. $10,9 \pm 3,5$ MPa ($Ca_{0,25}$) nach 2 Tagen weitaus geringere, aber von der Calciumkonzentration unabhängige

Festigkeitswerte auf. Die geringste Druckfestigkeit zeigte zu Beginn jedoch die Referenzpaste mit $7,7 \pm 1,3$ MPa. Tendenziell schienen die Festigkeitswerte der Calcium-modifizierten MPC-Pasten ein ähnliches zeitabhängiges Verhalten zu zeigen, wie die entsprechenden wässrigen Pasten. Während bei Formulierungen mit der höheren Calciumkonzentration ein leichter Abfall auf $6,5 \pm 1,2$ MPa an Tag 30 zu verzeichnen war, schienen die Festigkeitswerte der Paste mit niedrigerer Calciumkonzentration stetig um einen Wert von ca. 9 MPa zu fluktuieren. Im Gegensatz dazu erfuhr die Referenzpaste über den gesamten Zeitraum der Auslagerung eine deutliche Steigerung der Festigkeit bis auf einen Endwert von $14,0 \pm 4,7$ MPa (**Abbildung 3 b**).

4.1.2 Massenverlust

Über die gesamte Laufdauer des Versuches von 30 Tagen bei einer Lagerung entsprechender Prüfkörper bei 37 °C in PBS erfolgte alle zwei Tage die Bestimmung des Nassgewichtes. Zur besseren Darstellung des Gewichtsverlustes wurde der Massenverlust in Prozent angegeben (**Abbildung 4**).

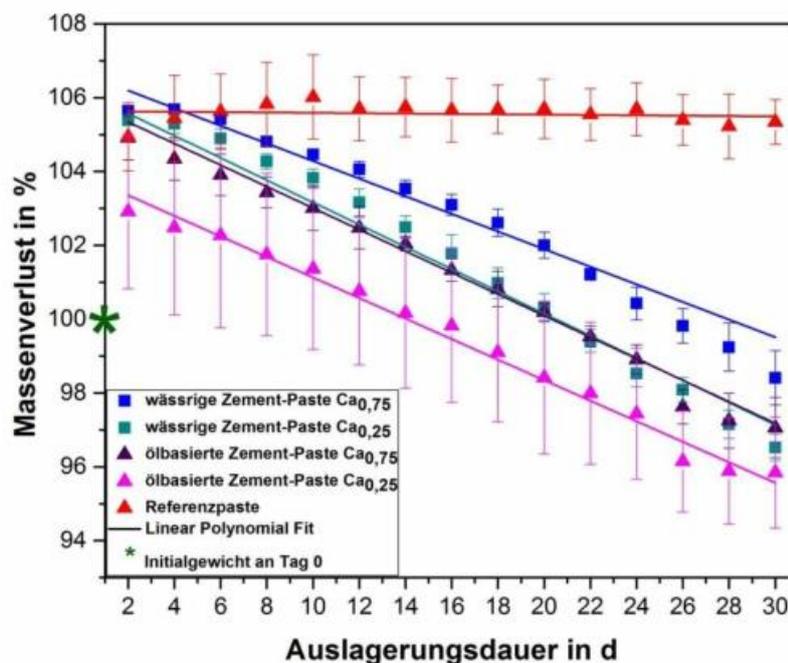


Abbildung 4: Massenverlust (in %) der Prüfkörper aus wässriger und ölbasierter Zement-Paste mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ und der Referenzpaste; Lagerung der PK bei 37°C in PBS über 30 Tage.

Vor der Lagerung der einzelnen Prüfkörper in PBS wurde deren Initialgewicht bestimmt („Tag 0“) und für jede Sorte als 100 % festgesetzt (grüner Stern). In allen Fällen trat eine Zunahme der Masse in den ersten 2 Tagen zwischen 3 bis 6 % auf, wobei dies im Vergleich bei den wässrigen Zement-Pasten stärker war. Im Allgemeinen war aber der Kurvenverlauf beider Zementsorten ab diesem Zeitpunkt vergleichbar konstant abfallend. Im Gegensatz dazu zeigte die Referenzpaste über den gesamten Zeitraum des Auslagerungsversuches keinen nennenswerten Massenverlust.

Für eine bessere Darstellung des Massenverlustes wurden die einzelnen Verläufe durch einen linearen Fit der allgemeinen Funktionsgleichung **(8)** angepasst.

$$f(x) = a \cdot x + b \quad (8)$$

Dabei beschreibt a die Steigung der Gerade und somit den täglichen Massenverlust und b den theoretischen Schnittpunkt der Gerade mit der y-Achse in %. Ein direkter Vergleich der Steigungen verdeutlicht somit, dass der Abfall der Masse der unterschiedlichen Zementsorten mit 0,28 bis 0,30 % pro Tag vergleichbar war. Erwartungsgemäß war die Steigung der Referenzpaste mit -0,004 % pro Tag näherungsweise bei null. Bedingt durch die unterschiedliche Massezunahme der verschiedenen Zementsorten zu Beginn der Auslagerungsstudie ergaben sich minimale Abweichungen der jeweiligen Endmassen. Mit $8,41 \pm 0,35$ % trat der größte Massenverlust bei der wässrigen Zement-Paste mit geringerem Calciumgehalt auf. Die gesamten Massenverluste der ölbasierten Zement-Paste auf Basis von $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ sowie der wässrigen Zement-Paste $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ waren mit ca. 6,8 % annähernd identisch (**Tabelle 8**).

Tabelle 8: Ergebnisse und Bestimmtheitsmaß des linearen Fits der Graphen aus Abbildung 6 und gesamter Massenverlust m_{final} nach 30 d Auslagerung der Prüfkörper in PBS bei 37 °C.

$$y = \text{Intercept} + \text{Slope} \cdot x$$

$$\hat{=} y = b + m \cdot x$$

b/Intercept: y-Achsenschnittpunkt (%)
 m/Slope: Steigung (%/d)
 x: x-Achsenschnittpunkt (Auslagerungsdauer)

Zement-Paste	m in %/d	t in %	R ²	m_{final} in %
wässrige Zement-Paste Ca _{0,75}	-0,24	106,67	0,97	6,84±0,63
wässrige Zement-Paste Ca _{0,25}	-0,30	106,18	0,98	8,41±0,35
ölbasierte Zement-Paste Ca _{0,75}	-0,29	105,92	0,98	7,49±0,94
ölbasierte Zement-Paste Ca _{0,25}	-0,28	103,91	0,99	6,86±1,46
Referenzpaste	-0,004	105,64	0,03	/

4.1.3 Porosität

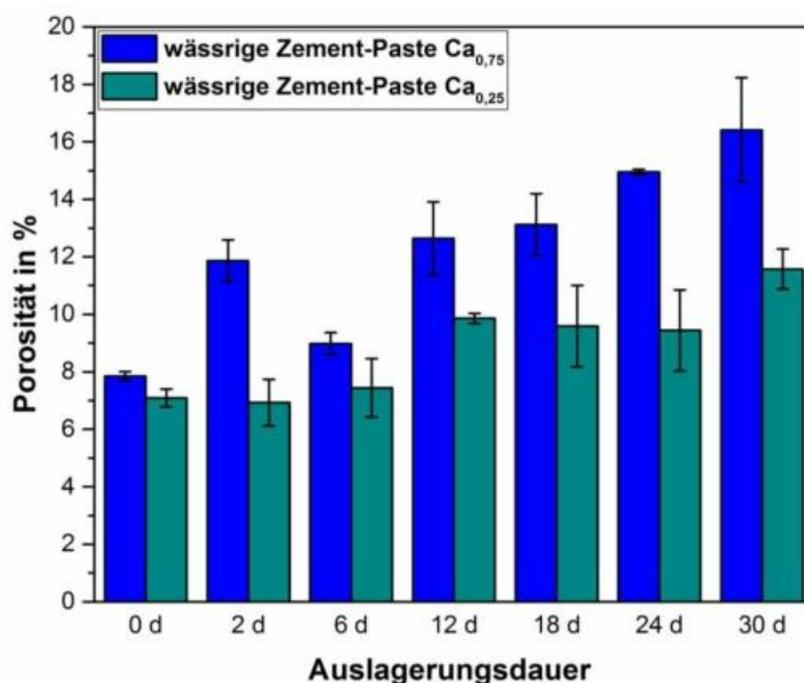
Die Porositätsbestimmung aller fünf Zement-Pasten erfolgte nach der in Kapitel 3.6.3 beschriebenen Gleichung, nach 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tagen Auslagerung in PBS bei 37°C.

Wie in **Abbildung 5** ersichtlich wird, lies sich an Tag 0 eine höhere Porosität der wässrigen als der ölbasierten Zement-Pasten feststellen. Bereits ab dem zweiten Tag und auch im weiteren Verlauf der Studie verhielt es sich umgekehrt: Die ölbasierten zeigten eine deutlich größere Porosität als die wässrigen Zement-Pasten.

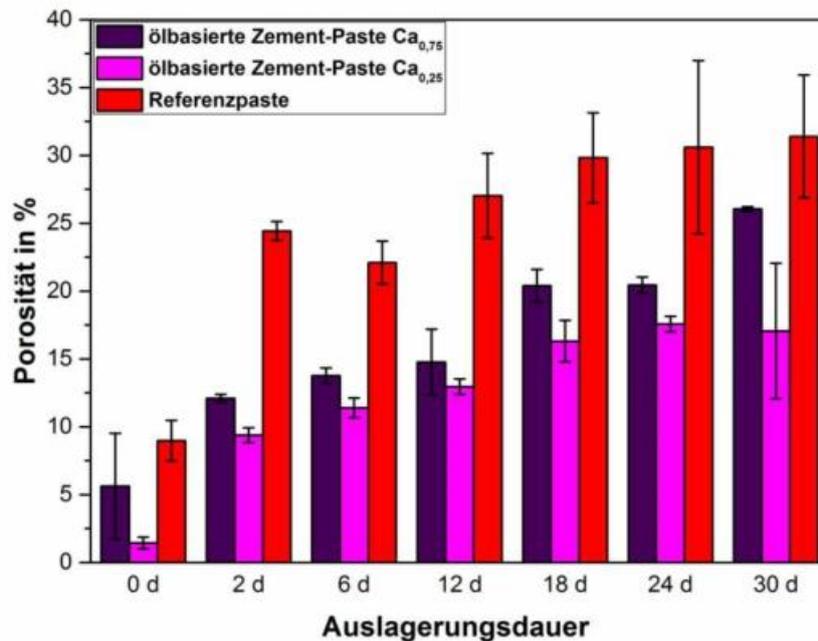
Die in **Abbildung 5 a)** dargestellten wässrigen Zemente wiesen zu Beginn mit ca. 7,5 % von der Calciumdotierung unabhängige Porositäten auf. Über den gesamten Versuchszeitraum stieg die Porosität der Zemente mit höherem Calciumgehalt kontinuierlich weiter an und erreichte an Tag 30 ihr Maximum von 16,4 ± 1,8 %. Im Vergleich dazu erfuhren die Werte der Zement-Paste mit niedrigerem Calciumgehalt eine Porositätszunahme von lediglich 2,4 % in der

ersten Woche und blieben anschließend bis zum Ende der Studie beständig (**Abbildung 5 a**).

Von den in **Abbildung 5 b**) dargestellten Porositätsverläufen der ölbasieren Zement-Pasten zeigte die Paste mit geringerem Calciumgehalt zu Beginn die geringste Porosität von $1,5 \pm 0,4$ %. Nach einer schnellen Zunahme der Porosität innerhalb der ersten beiden Tage um 7,9 % erfuhr diese eine langsame Steigerung bis Tag 18 und pendelte sich bis zum Ende der Studie stabil bei ca. 17 % ein. Wie bereits bei den wässrigen Zement-Pasten beobachtet, war auch bei den ölbasieren Zement-Pasten mit einem höheren Calciumgehalt ein gleichmäßiger Anstieg der Porosität zu verzeichnen. Jedoch wurde hier mit $26,1 \pm 0,2$ % ein höherer Endwert erreicht. Die Referenz-Paste verdreifachte von Tag 0 ($9,0 \pm 1,5$ %) auf Tag 2 ($24,4 \pm 0,7$ %) ihre Porosität, verzeichnete bis Ablauf der 30 Tage jedoch nur noch einen geringen Anstieg. Die Endporosität lag in diesem Fall bei $31,4 \pm 4,5$ % (**Abbildung 5 b**).



a)



b)

Abbildung 5: Porosität (in %) der Prüfkörper aus wässriger Zement-Paste (a) und ölbasierter Zement-Paste (b) mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ und der Referenz-Paste (b) nach 0, 2, 6, 12, 18, 24 und 30 Tagen Lagerung bei 37° in PBS.

4.2 Einfluss der Zementzusammensetzung auf die Lösungsprozesse

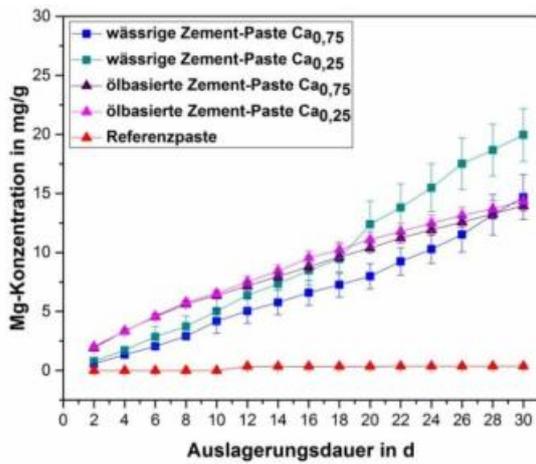
4.2.1 Massenspektrometrische Analyse

Die PBS-Lösung, in welcher die Zementprüfkörper unterschiedlicher Zusammensetzung bei 37°C für 30 Tage ausgelagert wurden, wurde im 2-Tages-Rhythmus entnommen und massenspektrometrisch auf die Freisetzung von Magnesium-, Phosphat- und Calciumionen hin untersucht.

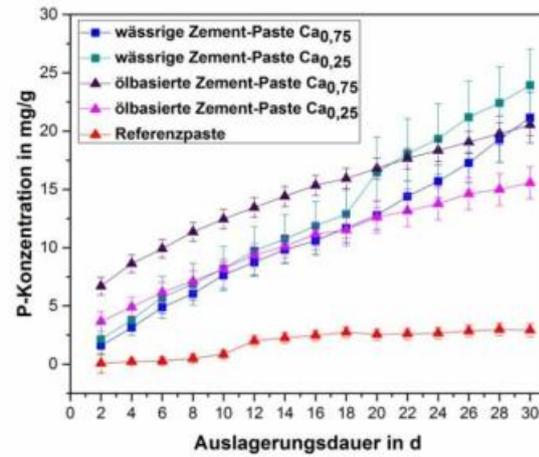
In **Abbildung 6** sind die entsprechenden Freisetzungskinetiken dargestellt. Allgemein betrachtet zeigte sich, unabhängig von der Zementformulierung, die höchste Freisetzung an Phosphationen, wobei ähnlich hohe Mengen an Magnesiumionen freigesetzt wurden.

Die Magnesium-Freisetzung (**Abbildung 6 a**) jeweils beider wässriger als auch beider ölbasierter Zement-Pasten war an Tag 2 nahezu identisch. Die wässrigen Zement-Pasten mit höherer Calciumkonzentration starteten mit einer

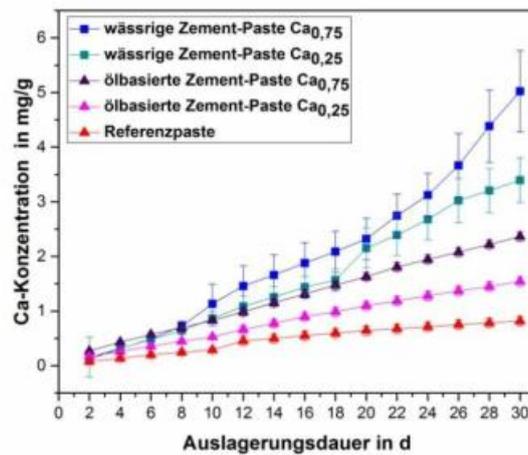
Freisetzung von $0,6 \pm 0,03$ mg/g und diejenigen mit niedrigerer Calciumkonzentration bei $0,8 \pm 0,3$ mg/g. Bei den ölbasierten Zement-Pasten betrug die initiale Magnesiumfreisetzung mit Werten von $1,9 \pm 0,2$ mg/g (Ca 0,75) bzw. $2 \pm 0,1$ mg/g (Ca 0,25) nahezu das Dreifache. Dennoch waren die Freisetzungsverläufe der wässrigen sowie der ölbasierten Pasten über den ganzen Versuchszeitraum hinweg vergleichbar. Dabei zeigte die Freisetzungskinetik der Ölpasten einen viel flacheren Anstieg als die der wässrigen Pasten und schien somit gegen Ende der Studie in eine Sättigung zu gehen. Im Gegensatz dazu nahm die tägliche Freisetzung an Magnesiumionen durch die wässrigen Pasten ab Tag 20 sogar deutlich zu. Ab Tag 28 pendelten sich beide Ölpasten als auch die wässrige Zement-Paste mit dem höherem Calciumgehalt auf nahezu ähnliche Werte von 14 mg/g ein. Dies spiegelte sich auch bei den Werten der durchschnittlichen Freisetzung pro Tag wieder. So zeigten beide ölbasierten als auch die wässrige Paste mit dem höheren Calciumgehalt eine durchschnittliche Freisetzung von 0,5 mg/g pro Tag. Die wässrige Paste aus $\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$ zeigte mit einem Wert von $20 \pm 2,2$ mg/g die höchste Gesamtfreisetzung und auch die höchste durchschnittliche Freisetzung pro Tag mit 0,7 mg/g. Die niedrigste Menge an Magnesium wurde erwartungsgemäß und im Rahmen der Messgenauigkeiten von der Magnesium-freien Referenzpaste freigesetzt (**Abbildung 6 a**).



a)



b)



c)

Abbildung 6: Konzentrationen (in mg/g) der aus den wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten freigesetzten Magnesium- (a), Phosphat- (b) und Calciumionen (c) im Zuge einer Auslagerung über 30 Tage in PBS bei 37 °C.

Die Verläufe der Freisetzungskinetiken für Phosphationen waren mit denjenigen für Magnesiumionen vergleichbar. Die wässrigen Zement-Pasten starteten erneut am niedrigsten, stiegen im Verlauf der Studie stetig an und wiesen ab Tag 20 eine massive Steigerung der Phosphatfreisetzung auf. Sie erreichten somit an Tag 30 mit $24 \pm 3,2$ mg/g (Ca 0,25) bzw. $21,2 \pm 2,2$ mg/g (Ca 0,75) die höchsten Endwerte. Im Gegensatz dazu wiesen die ölbasierten Pasten an Tag

2 die größere Freisetzungsrates auf und setzten in den Folgetagen viel geringere Mengen an Phosphat frei. So lagen die Endwerte der ölbasierten Pasten für die Phosphatfreisetzung bei 21 ± 1 mg/g (Ca 0,75) bzw. $16 \pm 1,4$ mg/g (Ca 0,25). Auch hier spiegelten sich die Werte der durchschnittlichen Freisetzung pro Tag wieder. So wiesen die beiden Pasten mit dem höherem Calciumgehalt eine durchschnittliche Freisetzung von 0,7 mg/g pro Tag, die wässrige Paste mit niedrigerem Calciumgehalt eine Freisetzungsrates von 0,8 mg/g und die ölbasierte Paste mit dem gleichen Calciumgehalt eine Freisetzung von 0,5 mg/g auf. Die Referenzpaste setzte zu Beginn der Studie kaum Phosphat frei, erfuhr jedoch von Tag 10 auf 12 einen Anstieg der Freisetzung um 1,1 mg/g und setzte danach nur noch sehr geringe Mengen frei. So wurden nur insgesamt $3,0 \pm 0,6$ mg/g Phosphat aus der Paste herausgelöst (**Abbildung 6 b**).

Die niedrigste Freisetzungsrates wurde für Calcium nachgewiesen (**Abbildung 6 c**). Während alle Pasten an Tag 2 vergleichbare Mengen an Calcium freisetzten, entwickelte sich die Freisetzungsrates der einzelnen Pasten im Verlauf der Studie unterschiedlich, jedoch ähnlich zu den bereits beschriebenen Freisetzungskinetiken für Magnesium- und Phosphationen. Auch bei der Calciumfreisetzung fiel eine größere Freisetzungsrates der wässrigen gegenüber den ölbasierten Pasten insbesondere ab Tag 10 auf. So stieg bei der Paste auf $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ -Basis die freigesetzte Menge an Calcium von Tag 26 auf 28 um 0,7 mg/g an und erreichte am Ende der Studie eine Gesamtmenge von $5,0 \pm 0,7$ mg/g. Die wässrige Paste auf $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ -Basis setzte innerhalb von 30 Tagen lediglich $3,4 \pm 0,4$ mg/g frei. Die ölbasierten Pasten zeigten erneut eine konstant ansteigende und fast um die Hälfte geringere Freisetzung an Calcium, was in einer Gesamtfreisetzung von lediglich $2,4 \pm 0,1$ mg/g (Ca 0,75) bzw. und $1,5 \pm 0,1$ mg/g (Ca 0,25) resultierte. Auch hier setzte der Zement mit dem höheren Calciumgehalt im Verlauf und auch am Ende der Studie eine größere Menge des entsprechenden Ions frei. Bei der Referenzpaste lag die Gesamtfreisetzung bei lediglich $0,8 \pm 0,1$ mg/g (**Abbildung 6 c**).

In **Tabelle 9** wurde zum besseren Überblick die nach Ende der Studie insgesamt aus den wässrigen und ölbasierten Pasten freigesetzten Mengen an Magnesium-, Calcium- und Phosphationen bezüglich verschiedener Parameter zusammengefasst.

Tabelle 9: Gesamt-Anteil der nach 30 Tagen aus den wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten freigesetzten Mg-, Ca- und P- Ionen in % bezogen auf 1g Rohpulver, auf Masse des Ions im Rohpulver, auf 1g Rohpulver/molar und auf die Stoffmenge des Ions im Rohpulver.

Frei-gesetzte Ionen in %		$Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ Wässrige Zement-Paste	$Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ Wässrige Zement-Paste	$Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ Ölbasierte Zement-Paste	$Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ Ölbasierte Zement-Paste
bezogen auf 1g Rohpulver	Mg	2	1,5	1,4	1,4
	Ca	0,3	0,5	0,15	0,24
	P	2,4	2,1	1,6	2,1
bezogen auf Masse des Ions im Rohpulver	Mg	8	7,4	5,7	7,02
	Ca	9	4,6	4,1	2,2
	P	10,3	9,4	6,7	9,1
bezogen auf 1g Rohpulver/ molar	Mg	21,9	16,6	15,7	15,8
	Ca	2,3	3,4	1	1,6
	P	20,6	18,8	13,4	18,2
bezogen auf Stoffmenge des Ions im Rohpulver	Mg	5,5	3,4	3,9	3,2
	Ca	0,08	0,4	0,04	0,2
	P	4,8	4,4	3,1	4,1

4.2.2 pH-Wert-Verlauf

In **Abbildung 7** ist der pH-Wert-Verlauf der PBS-Überstände dargestellt, in denen die verschieden zusammengesetzten Prüfkörper bei 37°C ausgelagert wurden. Allgemein ist zu sehen, dass jeweils sowohl beide wässrige als auch beide ölbasierte Zement-Pasten initial jeweils zu einem ähnlichen pH-Wert führten. Dieser war neutral (7,3-7,4) für die wässrigen Zement-Pasten und leicht

sauer (6,7-7,1) für die ölbasierten Zement-Pasten. Dabei wies bei beiden Pastenformulierungen die Paste mit dem jeweils höheren Calcium-Gehalt zu Beginn einen niedrigeren pH-Wert auf. Über die weitere Auslagerungsdauer hinweg war jedoch kein Unterschied in Bezug auf den unterschiedlichen Calcium-Gehalt mehr festzustellen. Bei allen PBS-Lösungen war von Tag 2 auf Tag 4 ein erheblicher Anstieg des pH-Wertes zu erkennen, wobei an den folgenden Tagen nur noch geringe Änderungen verzeichnet wurden. Ab Tag 24 pendelten sich die Überstände der ölbasierten Zement-Pasten als auch der wässrigen Zement-Paste mit höherem Calciumgehalt bei ca. 7,8 ein, während die PBS-Lösung der wässrigen Paste mit niedrigerem Calciumgehalt bei einem pH-Wert von ca. 8 lag. Die PBS-Lösung der Referenzpaste dagegen startete im Alkalischen bei 8,2 und fiel an Tag 4 auf $7,3 \pm 0,1$ ab. Ab dem 6. Tag bis zum Ende der Studie blieb der pH-Wert relativ stabil bei ca. 7,2 (**Abbildung 7**).

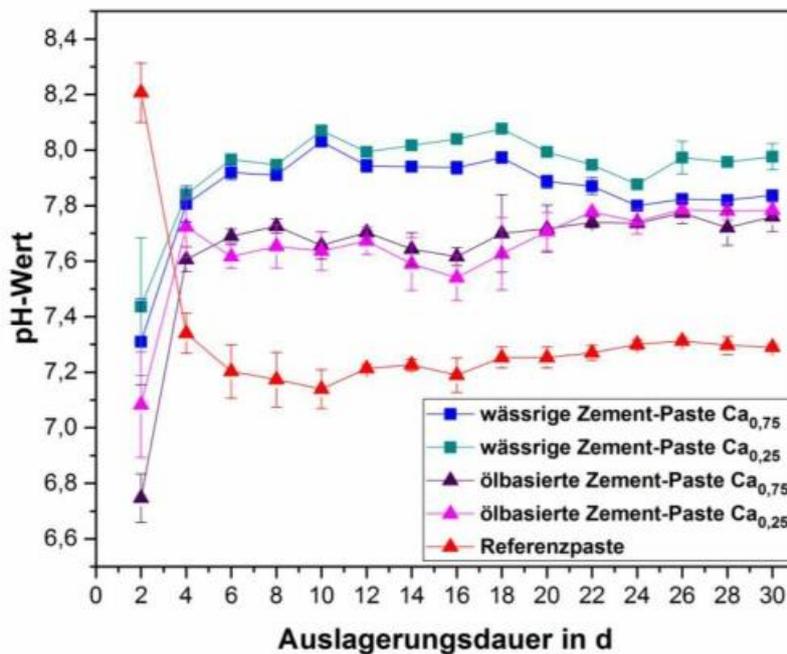


Abbildung 7: pH-Wert-Verlauf der PBS-Lösungen, in denen die Prüfkörper der wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ bei 37° C für insgesamt 30 Tage gelagert wurden.

4.3 Einfluss der Ionenzusammensetzung auf die Phasenzusammensetzung und die Morphologie

4.3.1 Phasenanalyse mittels Röntgendiffraktometrie

Alle Zemente wurden nach der Mahlung der Ausgangspulver, sowie nach 2 und 30 Tagen Auslagerung in PBS bei 37 °C einer Analyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD) unterzogen. **Tabelle 10** beschreibt dabei die in den entsprechenden Röntgendiffraktogrammen verwendeten Abkürzungen für die Zuordnung spezifischer Beugungsreflexe zu den unterschiedlichen Mineralphasen.

Tabelle 10: Mittels XRD in den Zement-Pasten nachgewiesene Hauptphasen und verwendeten Abkürzungen.

Bezeichnung	Abkürzung	Summenformel
Farringtonit	f	$Mg_3(PO_4)_2$
Stanfieldit	s	$Ca_4Mg_5(PO_4)_6$
Struvit	str	$NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$
Newberyit	n	$MgHPO_4 \cdot 3H_2O$
α -TCP	α	$\alpha-Ca_3(PO_4)_2$
Monetit	m	$CaPO_3(OH)$
Calcit	c	$CaCO_3$
Hydroxylapatit	HA	$Ca_5(PO_4)_3(OH)$

Bei den Röntgendiffraktogrammen der Ausgangspulver der wässrigen Zement-Pasten (**Abbildung 8**) sowie der Ausgangspulver der ölasierten Zement-Pasten (**Abbildung 9**) wurden für Farringtonit und Stanfieldit charakteristische Beugungsreflexe nachgewiesen. Dabei zeigten die Farringtonit-Beugungsreflexe bei einem Beugungswinkel 2θ von 23° und 26° für das Rohpulver aus $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ verglichen mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ höhere Intensitäten. Die für die verschiedenen Pastenformulierungen verwendeten Rohpulver identischer chemischer Zusammensetzung unterschieden sich nur geringfügig im Mahlregime und wiesen somit keine Unterschiede bezüglich ihrer XRDs auf.

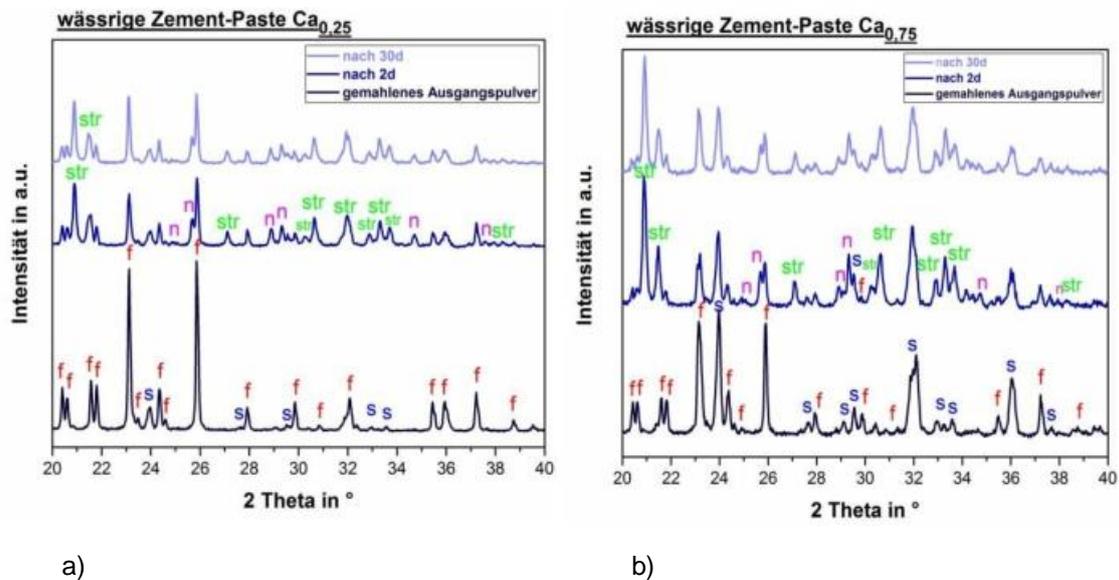


Abbildung 8: Röntgendiffraktogramme der Ausgangspulver und ausgehärteten wässrigen Zement-Pasten auf Basis von $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ (a) bzw. $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ (b) nach 2 und 30 Tagen Auslagerung bei 37 °C in PBS.

Durch die Vermengung des Rohpulvers mit der jeweils wässrigen Phase kam es zur Umsetzung beider Rohpulver vor allem zu Struvit und Newberyit. Diese Umsetzung ging mit einem Rückgang der Ausgangsstoffe Farringtonit und Stanfieldit einher. Dabei trat Newberyit vermehrt bei den wässrigen Zement-Pasten auf, was besonders anhand der höheren Intensitäten von Beugungsreflexen bei einem Beugungswinkel 2θ von 28,9 °, 29,4 ° und 34,7 ° nachgewiesen werden konnte. Zeitabhängige Unterschiede der an Tag 2 bzw. Tag 30 aufgenommenen Röntgendiffraktogramme waren nur bei den Zementformulierungen mit höherer Calciumkonzentration zu erkennen: Hier trat eine minimale Reduktion der Intensität charakteristischer Struvit-Beugungsreflexe auf (**Abbildung 8, 9**).

In der als Referenz dienende CPC-Paste (**Abbildung 9 c**) konnten im Rohpulver α -Tricalciumphosphat, Monetit und Calcit als Hauptphasen nachgewiesen werden. Nach Vermengung des Ausgangspulvers mit der flüssigen Phase und anschließender Auslagerung über 2 Tage in PBS bei 37° war ein deutlicher Rückgang der α -TCP Reflexe zu verzeichnen, der im Laufe der Auslagerung zu einer vermehrten Hydroxylapatit-Bildung führte.

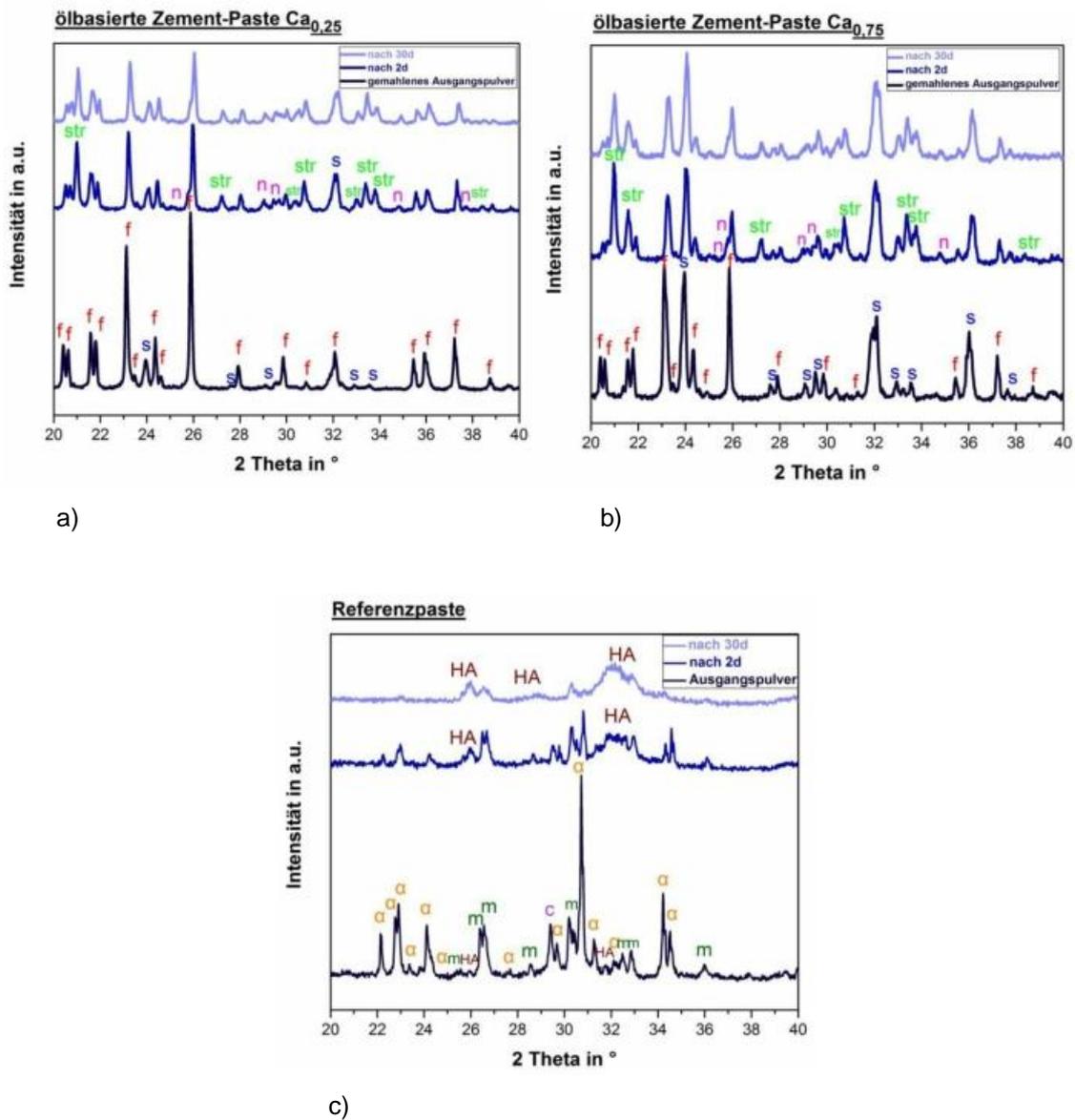


Abbildung 9: Röntgendiffraktogramme des Ausgangspulvers und ausgehärteten ölbasierten Zement-Pasten auf Basis von $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ (a) bzw. $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ (b) als auch der Referenzpaste (c) nach 2 und 30 Tagen Auslagerung bei 37 °C in PBS.

4.3.2 Mikrostruktur der Zemente mittels Rasterelektronenmikroskopie

Abbildung 10-12 zeigt die mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) aufgenommenen Oberflächenstrukturen der für 2 und 30 Tagen in PBS bei 37 °C ausgelagerten Zementproben unterschiedlicher Zusammensetzung.

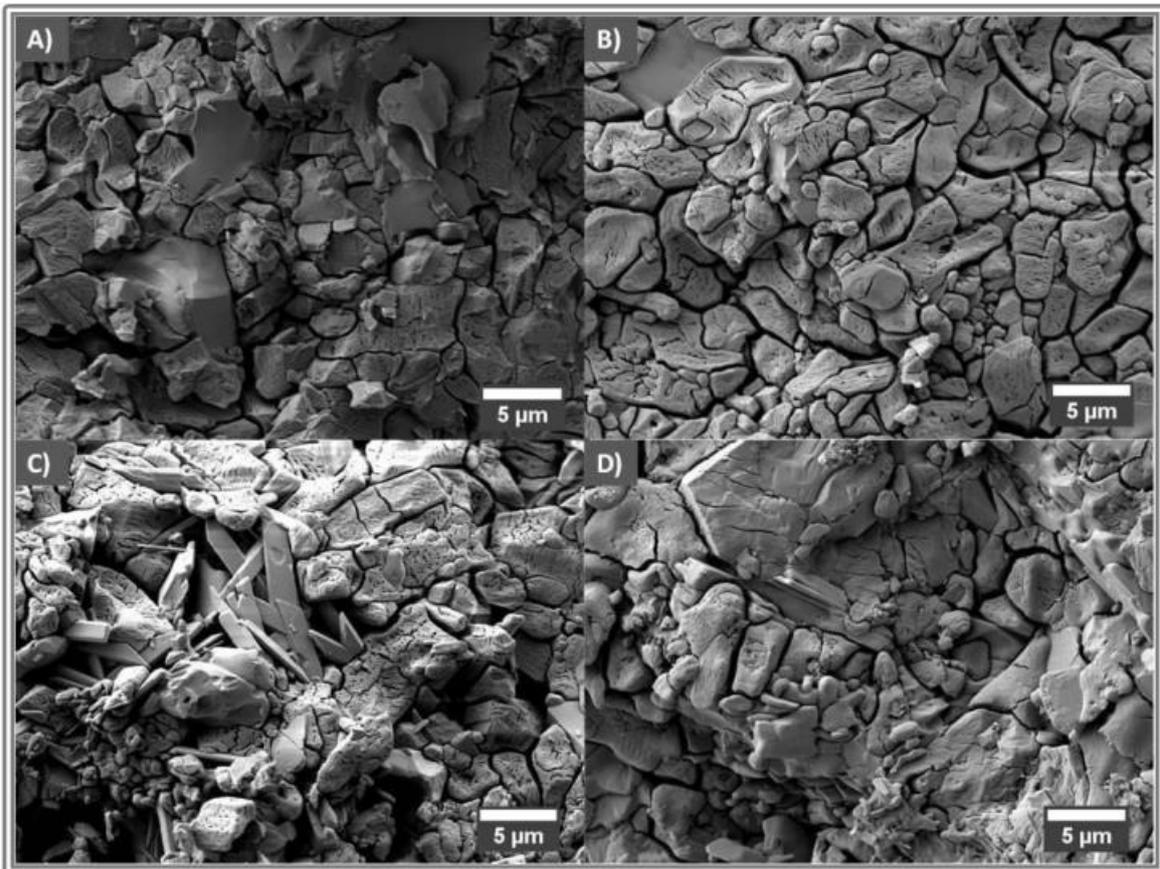


Abbildung 10: REM-Aufnahmen der Bruchstücke der wässrigen Zement-Pasten auf Basis von $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ (A-B) bzw. $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ (C-D) bei 3000-facher Vergrößerung nach 2 (A, C) und 30 Tagen (B, D) Lagerung in PBS bei 37 °C.

Bei beiden wässrigen Pastenformulierungen traten nach 2 Tagen Auslagerung sichtbare Hohlräume und eine insgesamt relativ inhomogene Oberfläche mit unterschiedlichen Kristallstrukturen auf (**Abbildung 10 A), C**). Dies zeigte sich besonders bei der Pastenformulierung mit höherem Calciumgehalt durch schieferartige Kristalle mit Plättchengrößen von 3-5 µm, die von 2-10 µm großen backsteinförmigen Strukturen umgeben waren (**Abbildung 10 C**). Nach 30 Tagen Auslagerung wirkte die Oberflächenstruktur in beiden Fällen mit abgerundeten Kristallen und mit 1-2 µm großen Füllern in den einstigen Poren um einiges homogener (**Abbildung 10 B), D**).

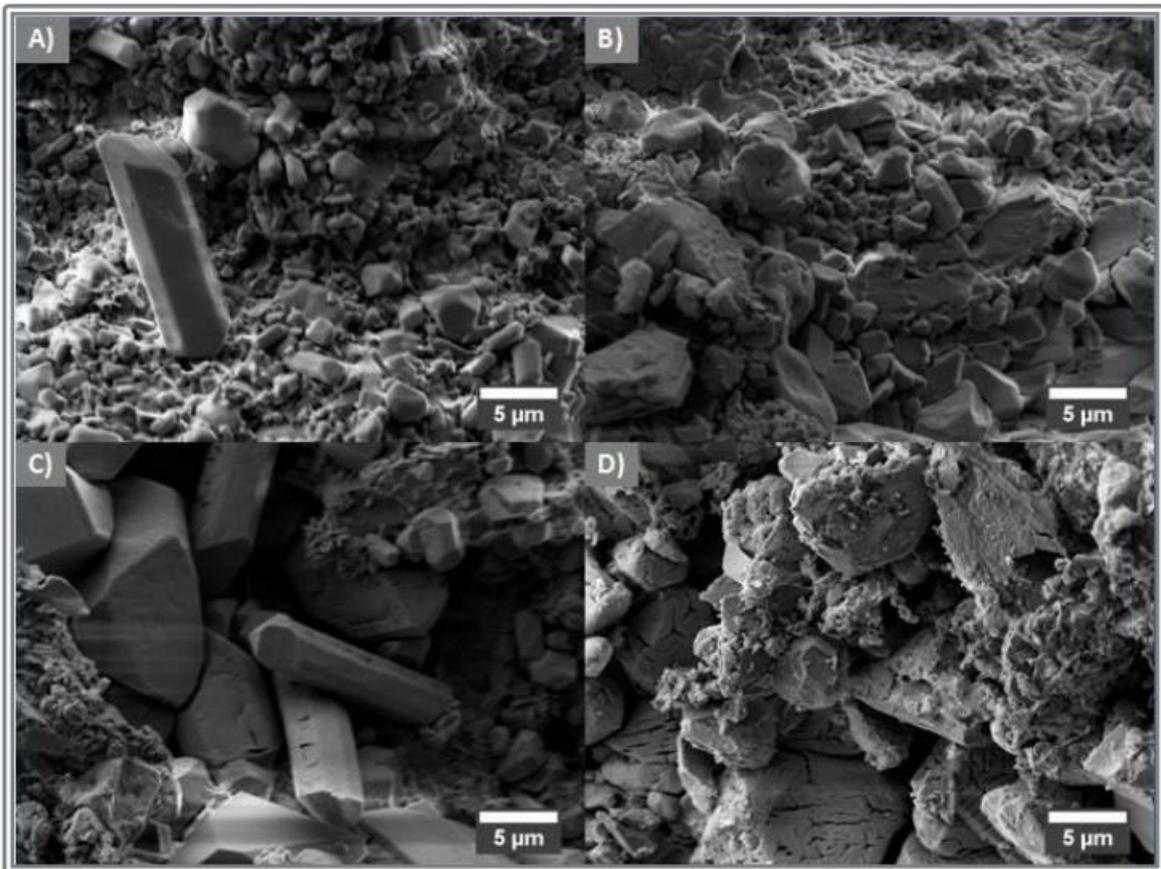


Abbildung 11: REM-Aufnahmen der Bruchstücke der ölbasierten Zement-Pasten auf Basis von $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$ (A-B) bzw. $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ (C-D) bei 3000-facher Vergrößerung nach 2 (A, C) und 30 Tagen (B, D) Lagerung in PBS bei 37 °C.

Für beide ölbasierten Zement-Pasten ergab sich nach 2 Tagen (**Abbildung 11 A), C)** ebenfalls eine sehr ungleichmäßige und grobkörnige Oberfläche. Dabei waren viele hexagonale als auch rhomboedrische Strukturen in einer Größenordnung von 10 µm bis 16 µm zu sehen. Im Gegensatz zu den wässrigen Zement-Pasten trat hier auch nach 30 Tagen (**Abbildung 11 B), D)** keine Homogenisierung der Oberflächenstruktur auf.

Abbildung 12 zeigt die viel filigranere Oberflächenbeschaffenheit der Referenzpaste, welche sich durch das Vorhandensein nadelförmiger Nanokristalle auszeichnete. Der Unterschied zwischen 2 (**Abbildung 12 A)** und 30 Tagen (**Abbildung 12 B)**) Auslagerung zeigte sich, bedingt durch die viel kleineren Strukturen, jedoch erst bei 10.000-facher Vergrößerung

(Abbildung 12 C)) durch den Nachweis der für Hydroxylapatit typischen Strukturen.

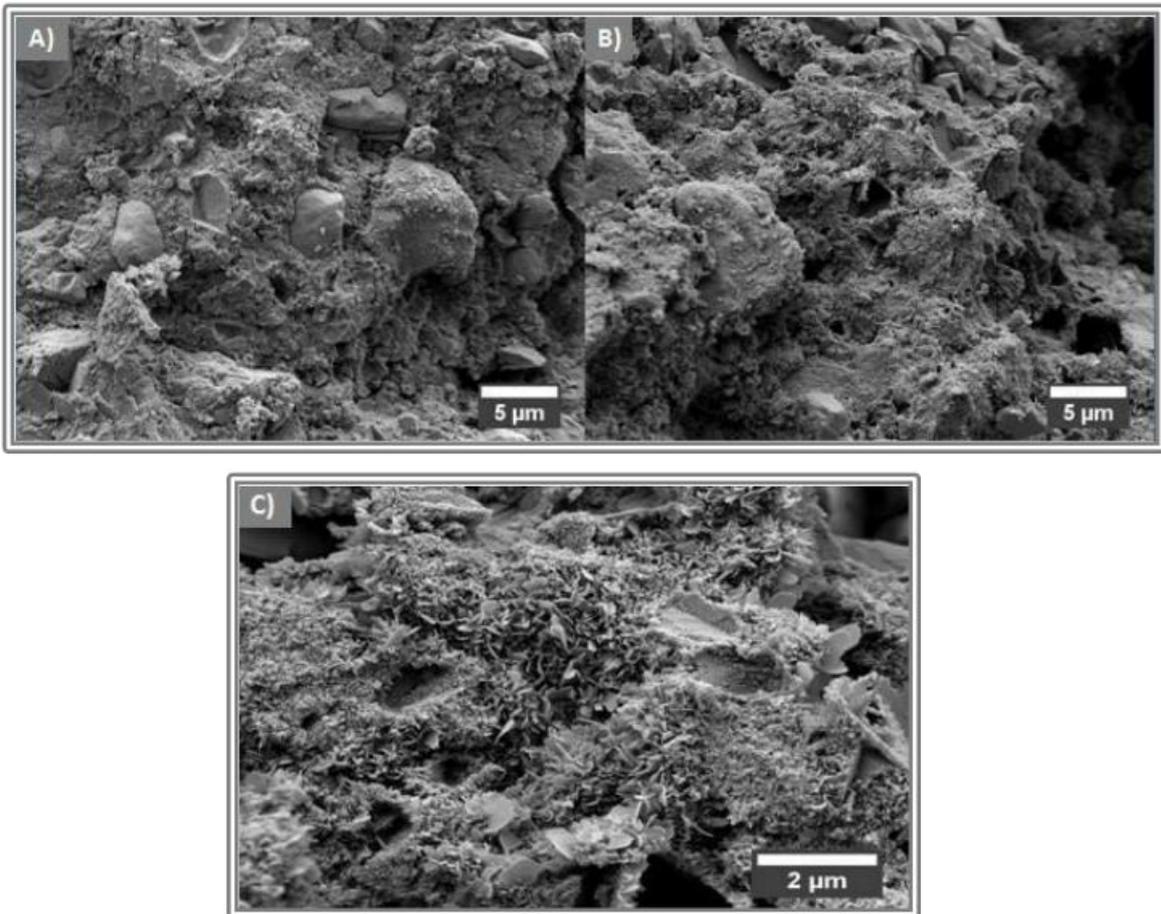


Abbildung 12: REM-Aufnahmen der Bruchstücke der ölbasierten Referenzpaste bei 3000-facher (A-B) bzw. 10.000-facher (C) Vergrößerung nach 2 (A) und 30 Tagen (B-C) Lagerung in PBS bei 37 °C.

4.4 Charakterisierung der Granulate

4.4.1 Siebanalyse der Granulate

Wie bereits unter **3.8** beschrieben wurden die für den Tierversuch über ein Emulsionsverfahren hergestellten Granulate mittels Siebanalyse nach ihrer Größe aufgetrennt und die jeweilige Fraktion gewogen. Die hierdurch entstandene Größenverteilung ist in **Abbildung 13** dargestellt.

Für beide Zemente lag die Hauptfraktion mit jeweils nahezu 50% im gewünschten Größenbereich von 500-710 μm . Die zweitgrößte Menge trat bei Größen zwischen 710 und 1000 μm auf, wobei der Anteil bei ca. 25 Gew.% (Ca 0,25) bzw. 33 Gew.% (Ca 0,75) lag. In absteigender Menge folgten die Granulate mit den Durchmessern von 355-500 μm und >1000 μm .

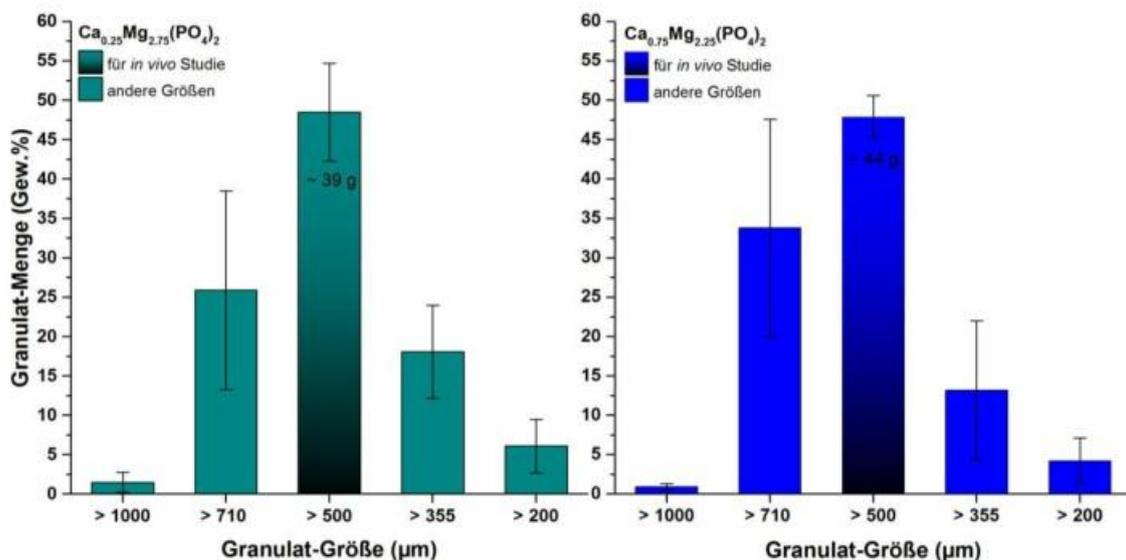


Abbildung 13: Größenverteilung, der über Emulsionsverfahren hergestellten Granulate aus $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ mit einer 2 M DAHP/1,5 M ADHP-Lösung.

4.4.2 Untersuchung der Phasenzusammensetzung

Die hergestellten Granulate wurden mittels XRD auf ihre Zusammensetzung hin untersucht. Dieses Verfahren wurde jeweils vor und nach der γ -Sterilisation durchgeführt, um den Einfluss der Sterilisation auf das Material zu ermitteln (**Abbildung 14**). Die aus $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ hergestellten Granulate enthielten Struvit als Hauptphase, sowie Newberyit, als auch geringe Mengen der Ausgangsstoffe Farringtonit und Stanfieldit. Das Referenzgranulat bestand aus großen Mengen α -Tricalciumphosphat sowie zu kleineren Anteilen aus Monetit, Calcit und Hydroxylapatit. Entsprechendes wurde bereits für die Bulkreaktion von Zementsystemen identischer

Zusammensetzung festgestellt (**Kapitel 4.3.1**), wobei die Reaktionszeiten hier deutlich reduziert waren.

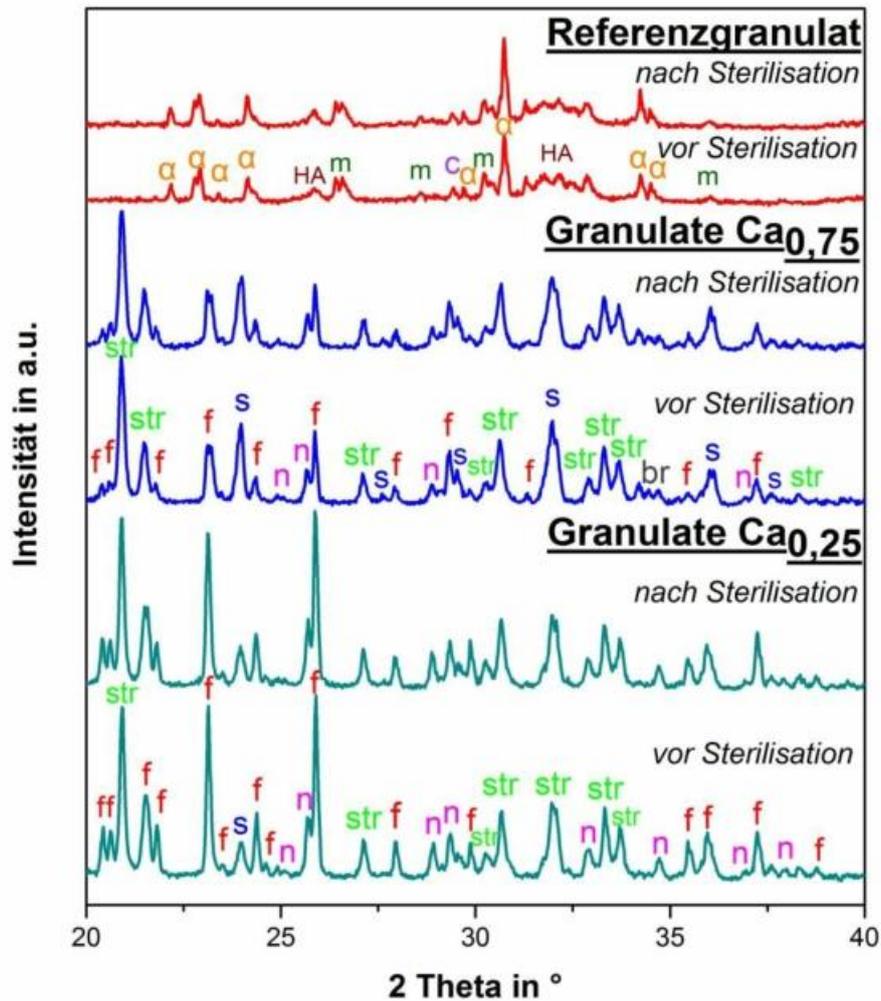


Abbildung 14: Röntgendiffraktogramme der Granulate mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$, gemessen jeweils vor und nach der γ -Sterilisation.

Wie im Diagramm gut sichtbar, lässt sich beim direkten Vergleich der Diffraktogramme, die vor und nach der Sterilisation gemacht wurden, sowohl

bei der Intensität als auch bei der Phasenzusammensetzung kein Unterschied feststellen.

4.4.3 Untersuchung der Oberflächenmorphologie

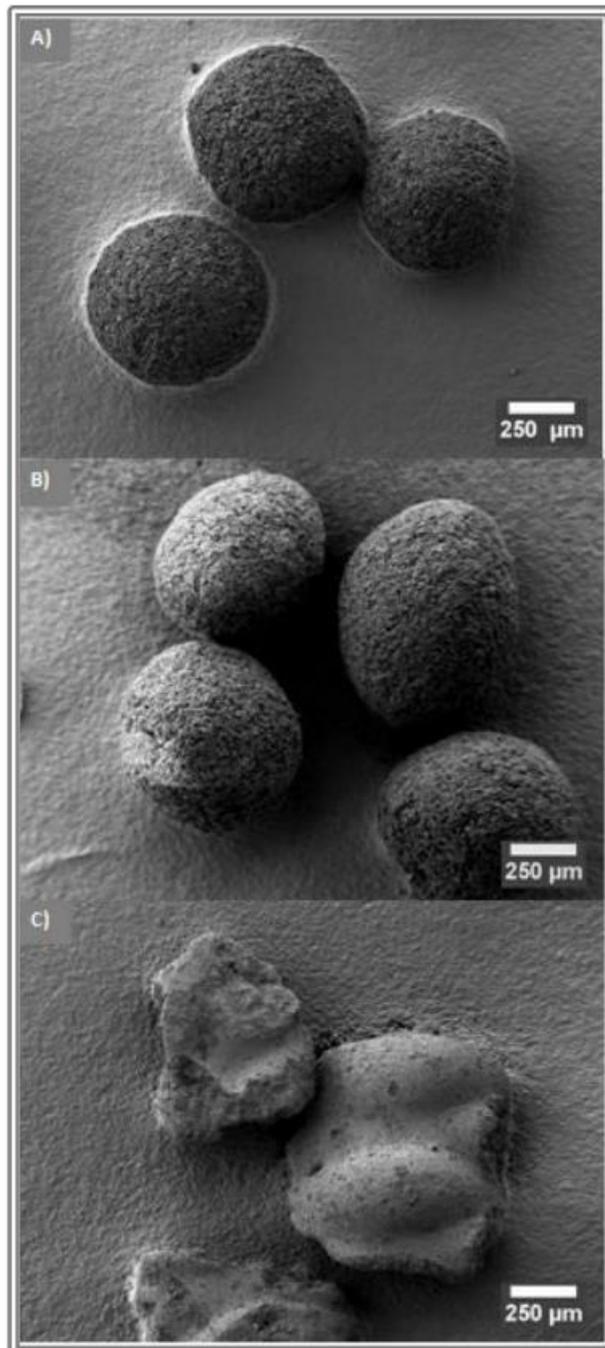


Abbildung 15: REM-Aufnahmen der Granulate vor der Sterilisation bei 50-facher Vergrößerung; **A)** Granulate aus $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$; **B)** Granulate aus $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$; **C)** Referenzgranulat.

Des Weiteren wurde die Morphologie der Granulate unter dem Rasterelektronenmikroskop bei 50-, 1000-, und 10.000-facher (Referenz) Vergrößerung vor und nach der Sterilisation analysiert. **Abbildung 15** zeigt makroskopisch die drei Granulatsorten vor der Sterilisation. Dabei verfügten die mittels Emulsionsverfahren hergestellten Granulate über eine sphärische Form und glatte Oberflächenstruktur (**Abbildung 15 A), B**) während die Referenzgranulate der gleichen Größenfraktion (500-710 μm) eher scharfkantig und unregelmäßig geformt waren (**Abbildung 15 C**). Diese waren aus einem vorgefertigten Zementmonolith mittels Mörsern hergestellt und durch Siebanalyse klassifiziert worden.

Eine Betrachtung der Granulatoberfläche bei deutlich stärkeren Vergrößerungen jeweils vor und nach der Sterilisation zeigte, dass die γ -Sterilisation keinerlei Auswirkung auf die Morphologie der Kristalle hatte. Für beide Granulatsorten aus Calcium-Magnesium-Phosphat (**Abbildung 16 A-D**) zeigte sich sowohl vor (**Abbildung 16 A), C**) als auch nach (**Abbildung 16 B), D**) der γ -Sterilisation eine sehr ungleichmäßige und grobkörnige Oberfläche. Dabei waren viele hexagonale als auch rhomboedrische Strukturen zu sehen. **Abbildung 16 E), F**) zeigt die viel filigranere Oberflächenbeschaffenheit des Referenzgranulates, welches sich durch das Vorhandensein nadelförmiger Nanokristallite auszeichnete.

Vergleicht man die Oberflächenstrukturen vor der Sterilisation (**Abbildung 16**) zudem mit den in **Abbildung 10** dargestellten Zementen, so wird deutlich, dass auch das Herstellungsverfahren keinen Einfluss hatte.



Abbildung 16: REM-Aufnahmen der Granulate vor und nach der γ -Sterilisation ; wobei **A),C),E)** die Granulate vor der Sterilisation und **B), D), F)** nach der Sterilisation zeigen; **A),B)** Granulate aus $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ bei 1000-facher Vergrößerung ; **C), D)** Granulate aus $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ bei 1000-facher Vergrößerung ; **E),F)** Referenzgranulat bei 10 000-facher Vergrößerung.

4.5 Zellbiologische Testung

In diesem Teil der Arbeit wurden Osteoblasten der Zelllinie hFOB 1.19 über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert. Als Medium diente jeweils 38%iges, mit Zellkulturmedium verdünntes Eluat, sowie 100%iges, unverdünntes Eluat. Dieses wurde durch Auslagerung der sterilisierten Prüfkörper, die aus wässriger Zement-Paste mit $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ mit jeweils 2,0 M DAHP/1,5 M ADHP als flüssiger Phase bestanden, in DMEM-Medium gewonnen. Dies wurde alle 2 Tage auf die Zellkultur gebracht und die Zellzahl bzw. Zellaktivität jeweils an Tag 4, 6 und 10 ermittelt. Als Kontrolloberfläche diente PS (genauerer Vorgehen siehe 3.7).

An dieser Stelle sei angemerkt, dass entsprechende Testungen auch mit der ölbasieren Zement-Paste durchgeführt wurden. Das freigesetzte Öl trübte jedoch das Zellkulturmedium so stark ein, dass eine realistische Einschätzung der Testergebnisse nicht möglich war.

4.5.1 Bestimmung der Zellzahl

In der **Abbildung 17** ist die Zu-, bzw. Abnahme der Zellzahl an den jeweiligen Tagen erfasst. Bei einer 38 %igen Konzentration des Eluats konnte bei beiden Zementformulierungen eine stetige Zunahme der Zellzahl von initial 50.000 Zellen/ml bis zum 10.Tag verzeichnet werden. So steigerte sich die Zellzahl bei dem $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ -basierten Zement von Tag 4 mit $3,8 \cdot 10^5 \pm 4,3 \cdot 10^4$ Zellen/ml auf $1,1 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^5$ Zellen/ml an Tag 10. Bei dem $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ -basierten Zement steigerte sich die Zellzahl von $3,6 \cdot 10^5 \pm 9,6 \cdot 10^3$ Zellen/ml auf $9,4 \cdot 10^5 \pm 7,4 \cdot 10^3$ Zellen/ml. Somit resultierte im Falle des 38 %ig konzentrierten Eluats der Zement mit geringerer Calciumkonzentration in einem marginal besseren Zellwachstum, welches an Tag 10 sogar die Negativkontrolle um ein 1,7-faches überstieg. Während unter Verwendung des 100 %igen Eluats im Falle des $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ -basierten Zements die Zellzahl stetig auf bis zu $4,2 \cdot 10^5 \pm 8,2 \cdot 10^4$ Zellen/ml anstieg, so erwies sich das reine Eluat des Zements mit höherer Calciumkonzentration auf Grund der verschwindend geringen

Zellzahl als stark zytotoxisch. Auch bei dem $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ -basierten Zement waren initial nur niedrige Werte im Vergleich zur Negativkontrolle zu verzeichnen, die Zellen schienen sich jedoch im Verlauf der Studie zu regenerieren.

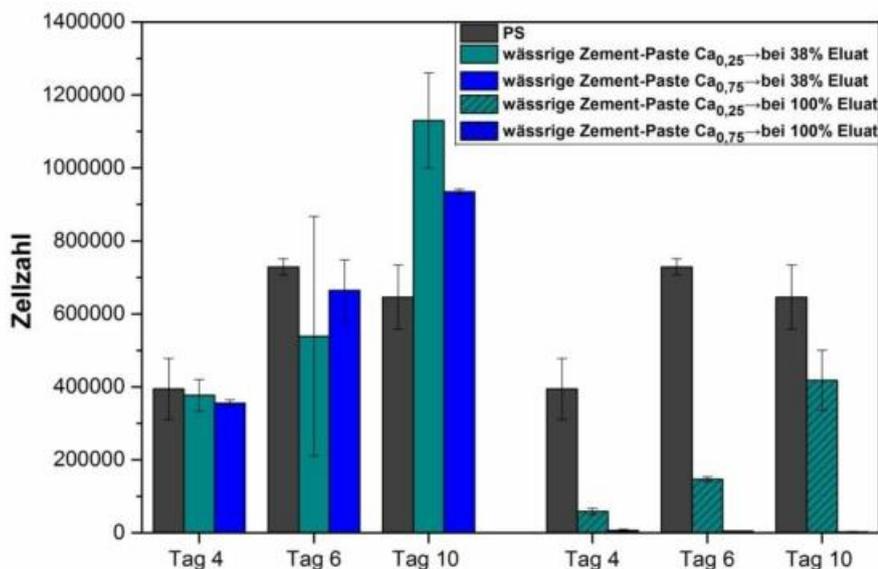


Abbildung 17: Zellzahl humaner fetaler Osteoblasten (hFOB) nach 4, 6 und 10 Tagen; ermittelt mit Hilfe des Casy Cell Counters; nach Kultivierung mit 38% und mit 100 % des Eluats der PK der wässrigen Zement-Pasten mit $\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$; PS diente als Kontrolle.

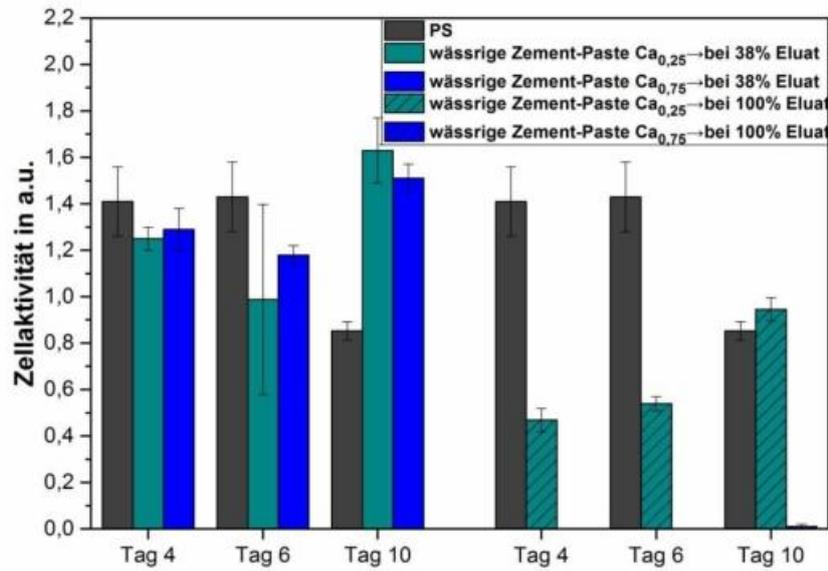
4.5.2 Bestimmung der Zellaktivität

In **Abbildung 18 a)** ist die Zellaktivität, welche mit Hilfe des WST-Tests ermittelt wurde, dargestellt.

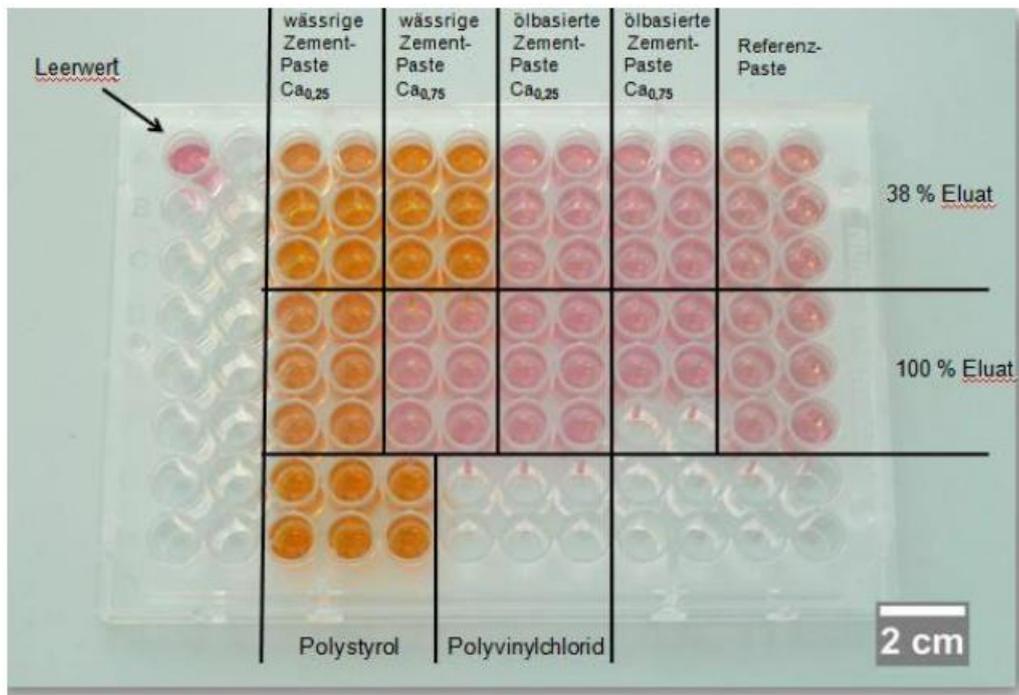
Abbildung 18 b) zeigt repräsentativ mögliche auftretende Farbveränderungen des Zellkulturüberstands durch Formazan-Umsetzung bei Anwendung des WST-Tests. Dabei weisen die orange eingefärbten Überstände einen deutlichen Farbunterschied zum Leer-Wert auf, welcher die Farbe der WST-1-Verdünnung ohne Zellkontakt darstellt. Diese Überstände sind somit ein Beleg für die hohe Zellviabilität der Osteoblasten, welche mit entsprechenden Eluaten kultiviert wurden. Besitzen die Überstände eine mit dem Leerwert vergleichbare

Farbnuance, so ist von einem zytotoxischen Effekt der entsprechenden Eluate auszugehen.

Auch bei der Zellaktivität ließ sich nach 10 Tagen die höchste Aktivität bei 38 %iger Eluat-Konzentration durch den $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ Zement feststellen. Zwar zeigte sich bei beiden Zementformulierungen von Tag 4 auf Tag 6 ein leichter Abfall der Zellaktivität, im Folgenden erfuhr diese jedoch einen deutlichen Anstieg um 65% auf $1,63 \pm 0,14$ a.u. ($\text{Ca}_{0,25}$) bzw. um 28 % auf $1,51 \pm 0,06$ a.u. ($\text{Ca}_{0,75}$). Diese Werte korrelierten demnach sehr gut mit dem Zellwachstum (**Abbildung 17**). Entsprechend den Beobachtungen aus der Zellzahlbestimmung wurden durch das 100%ige Eluat nicht mehr derart hohe Aktivitäten wie bei Verwendung der 38%igen Konzentration erreicht. Die Zellen, die mit dem Eluat des $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ -Zements kultiviert wurden, zeigten bereits an Tag 4 keine Zellaktivität mehr. Deutlich höhere Aktivitäten waren im Vergleich dazu bei den Zellen auf $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ -Zement zu sehen. Hier trat eine stetige Zunahme der Aktivität auf bis zu $0,945 \pm 0,05$ a.u. auf und war schließlich mit der Aktivität der Zellen auf Zellkulturplastik und reinem Zellkulturmedium vergleichbar. Somit lag die Aktivität der Zellen der Kontrollgruppe an Tag 10 auch weit unterhalb der Aktivität der Zellen, welche mit 38 %igem Eluat beider Zementformulierungen behandelt worden waren.



a)



b)

Abbildung 18: a) Zellaktivität humaner fetaler Osteoblasten (hFOB) nach 4, 6 und 10 Tagen; ermittelt mit Hilfe des WST-Test's; nach Kultivierung mit 38% und mit 100 % des Eluats der PK der wässrigen Zement-Pasten mit $Mg_{2,25}Ca_{0,75}(PO_4)_2$ und $Mg_{2,75}Ca_{0,25}(PO_4)_2$; PS diente als Kontrolle. b) 96-Wellplatte mit den Ergebnissen des WST-Tests; die Wellplatte zeigt die Farbveränderung des Zellkulturüberstandes durch Formazan-Umsetzung.

4.5.3 Normierung der Zellaktivität

Bei der Analyse der normierten Zellaktivität (Aktivität pro Zelle, **Abbildung 19**) lagen im Falle des 38 %igen Eluats im Rahmen der Messgenauigkeit von der Zementsorte unabhängige Aktivitäten vor, welche auch keinen Unterschied zur Negativkontrolle aufwiesen. Insgesamt zeigte sich so ein Abfall der normierten Zellaktivität um 57 % von ca. $3.5 \cdot 10^{-6}$ auf ca. $1.5 \cdot 10^{-6}$ a.u./Zelle. Im Falle der 100 %igen Eluate waren die Zellzahlen zum Teil so niedrig, dass im Umkehrschluss die ermittelten normierten Aktivitäten ungewöhnlich hohe Werte aufwiesen (z.B. $\text{Ca}_{0,25}$ an Tag 4 und $\text{Ca}_{0,75}$ an Tag 10), die als nicht wirklichkeitsgetreu angesehen werden.

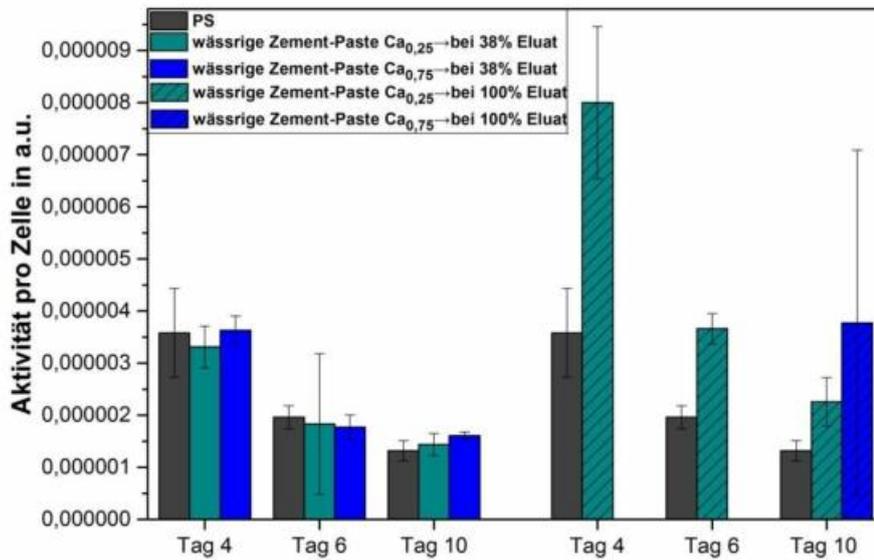


Abbildung 19: Aktivität pro Zelle humaner fetaler Osteoblasten (hFOB) nach 4, 6 und 10 Tagen; ermittelt durch den Quotienten WST/Zellzahl; nach Kultivierung mit 38% und mit 100 % des Eluats der PK der wässrigen Zement-Pasten mit $\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$; PS diente als Kontrolle.

5. Diskussion

Gegenstand dieser experimentellen Arbeit waren mineralische Knochenzemente, welche nicht zuletzt wegen ihrer vielen positiven Eigenschaften in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewannen. Beispiele hierfür sind calcium-,²⁸ oder magnesiumhaltige²⁹ Phosphatverbindungen, die nach Vermengung mit einer wässrigen Lösung eine formbare Paste bilden (CPC bzw. MPC).²⁸ Eine Studie von Vorndran et al.³⁰ beschäftigte sich mit Zementformulierungen auf Basis eines mit Calcium substituierten Magnesiumphosphatzements. Einstellbare *in vitro* Resorbierbarkeit, gute Löslichkeit und Verträglichkeit sind nur einige der vielversprechenden Eigenschaften.³⁰ Für die hier vorliegende Arbeit wurden eben genannte Calcium-Magnesium-Phosphat-Zemente verwendet und speziell die beiden Verbindungen $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ ausgewählt.

Im Folgenden war die Herstellung und Untersuchung von Knochenersatzmaterialien aus eben genannten sekundären Calcium-, und Magnesiumphosphatverbindungen erfolgt. Der weitere Ansatz bestand darin, andere Anwendungsformen vergleichbarer Zusammensetzung, d.h. sphärische Granulate sowie präfabrizierte, lagerstabile Zement-Pasten hinsichtlich ihres Potentials zur Behandlung knöcherner Defekte *in vitro* zu testen. In vorangegangenen Projekten wurden Granulate auf Basis Struvit-bildender Calcium-Magnesiumphosphate entsprechender Zusammensetzung bereits erfolgreich entwickelt worden. Die anwendungsbereiten, ölbasierten Pasten - von der Firma INNOTERE GmbH (Radebeul) auf Basis des gleichen Rohpulvers hergestellt - können aus den vorgefertigten Doppelkammerkartuschen direkt in den Defekt eingebracht werden und erhärten erst nach Kontakt mit dem wässrigen Umgebungsmilieu. Im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit sollten in der vorliegenden Studie die Zement-Pasten als auch die Granulate vorgreifend auf die tierexperimentelle Studie hinsichtlich ihrer Bulkeigenschaften *in vitro* getestet werden.

5.1 Materialeigenschaften der wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten

Im Folgenden werden die mechanischen Eigenschaften, die Porosität sowie die Morphologie der unterschiedlichen Zement-Pasten diskutiert. Diese Werte sind von großer Relevanz, da sie Einfluss auf das Degradationsverhalten als auch auf die Stabilität der Zemente *in vivo* nehmen. Bei der Diskussion, der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse und deren Vergleich mit anderen Studien, darf die Rolle der jeweilig unterschiedlichen Testmethoden und Bedingungen nicht außer Acht gelassen werden. Daher ergeben sich große Variationen innerhalb der Ergebnisse der unterschiedlichen Studien.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Festigkeitswerte der Prüfkörper - nach der jeweiligen Lagerungsdauer in PBS bei physiologischer Temperatur - ohne vorherige Trocknung gewonnen. So erhaltene Festigkeiten sind folglich eher mit den in der klinischen Situation erreichbaren Werten vergleichbar. Von einer Gegenüberstellung mit den Druckfestigkeitswerten vorher getrockneter Prüfkörper sollte Abstand genommen werden. Bereits Pittet et al.¹¹⁵ bewiesen, dass die Festigkeitswerte der getrockneten Proben fast doppelt so hoch waren wie diejenigen von feucht gelagerten Prüfkörpern identischer Zusammensetzung.¹¹⁵

Die wässrigen Zement-Pasten erreichten weitaus höhere Festigkeiten (~ 59 MPa ($\text{Ca}_{0,75}$), ~ 46,5 MPa ($\text{Ca}_{0,25}$)) als die ölbasierten Zement-Pasten (**Abbildung 3**). Somit konnten für die Zementformulierung auf Basis von $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ ähnliche Werte wie in der Studie von Vorndran et al.³⁰ nach 1 h Mahlung (~45 MPa) mit einer reinen DAHP-Lösung erreicht werden.³⁰ Klammert et al.¹¹⁶ erzielten für Zemente auf Basis von $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ Werte von ~ 40 MPa.¹¹⁶ Im Vergleich dazu liegt die (axiale) Druckfestigkeit von humanem Knochen bei 15 kg/mm².¹¹⁷

Für wässrige Struvitzemente sind in der Literatur im Vergleich zu anderen Phasen bereits sehr hohe Festigkeitswerte (~70 MPa) bekannt.^{26,107} Andere Phasen, wie zum Beispiel Bruschit, erreichen lediglich Werte bis zu 52 MPa.³⁷ Der höhere Anteil an umgesetztem Struvit kann daher eine mögliche Ursache

für die gegenüber den Öl-Pasten ermittelten höheren Festigkeitswerte sein. Bei der Analyse der Phasenzusammensetzung mittels XRD konnte diese stärkere Struvitbildung nachgewiesen werden (**Abbildung 8,9**).

Die geringeren Werte der Öl-Pasten sind vermutlich durch die Auswaschung der Öl-Phase im Laufe der Lagerung und der damit verbundenen größeren Porosität zu erklären (**Abbildung 5 b**). Beispielsweise brachte Bohner et al.¹¹⁸ gezielt Öl in CPC ein, um makroporöse Formkörper zu erhalten.¹¹⁸ Des Weiteren ist auch zu vermuten, dass durch das aktive Einmischen der Flüssigkeit mit Hilfe des Applikationssystems eine zusätzliche Porosität erzeugt wird, welche zu geringeren Festigkeiten führt. Die ölbasierten Zement-Pasten auf Basis des CMPC-Mischsystems zeigten maximale Festigkeiten von ~10,4 MPa ($\text{Ca}_{0,75}$) und ~10,9 MPa ($\text{Ca}_{0,25}$). Während die Festigkeiten dieser Pasten in Abhängigkeit der Calciumdotierung im Verlaufe der Lagerungsdauer - bedingt durch Degradationsprozesse und die damit verbundene Porositätszunahme - abnahmen, so erreichte die Referenzpaste (CPC) erst am Ende der Studie ihr Maximum (14 MPa). Diese Nachhärtung und der damit bedingte Festigkeitsanstieg ist für diese ölbasierte CPC-Paste kennzeichnend und wurde bereits bei Heinemann et al.⁹³ beobachtet, ist jedoch auch für wässrige HA-bildende CPC gültig.⁹³

Stellt man den CMPC die literaturbekannten Festigkeiten reiner CPC ($39 \pm 4,7$ MPa)⁷⁷ als auch MPC ($58 \pm 4,9$)⁷⁷ gegenüber wird deutlich, dass sich die positiven Eigenschaften der MPC hinsichtlich der Druckfestigkeit auf das Mischsystem übertragen. So zeigten die Mischsysteme von Wu et al.⁷⁷ je nach Mischungsverhältnis Werte zwischen $68 \pm 6,3$ und $91 \pm 5,5$ MPa.⁷⁷

Wie bereits angedeutet, ist die Porosität der vorwiegend festigkeitsbestimmende Parameter, wie es beispielsweise durch Barralet et al.¹¹⁹ deklariert wurde. Diese steht über eine Exponentialfunktion mit den mechanischen Eigenschaften in Relation.^{59, 119} Je geringer die Porosität ist, desto höher sind die erreichten Festigkeiten.^{59, 120} Eine Beeinflussung der Porosität ist durch Kompression während der Abbindereaktion^{59, 121,}

Abbindeverzögerer ¹²², Variation des Pulver-Flüssigkeits-Verhältnisses ¹²¹ oder die Zugabe von Porenbildnern möglich. ¹²³

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich für die ölbasierten Zement-Pasten deutlich höhere Porositäten als bei den wässrigen Pasten (**Abbildung 5**). Passend hierzu konnten - wie bereits beschrieben - geringere Druckfestigkeitswerte der Öl-Pasten und deutlich höhere Druckfestigkeitswerte der wässrigen Zemente festgestellt werden (**Abbildung 3**). Die Porositätswerte der wässrigen Pasten waren vergleichbar hoch wie die der Struvitzemente in dem Tierversuch von Kanter et al.⁶¹ (5-7% vor Implantation, 19- 26% nach 10 Monaten).⁶¹ Im Falle der Öl-Pasten wirkte das Öl als Porenbildner, was zwar negative Auswirkungen auf die Festigkeit bedingte, derartige Zemente auf Grunde der großen Porosität aber zu einem guten Wirkstoffträger beispielsweise für Antibiotika macht. In einigen Studien wie von Vorndran et al.⁹³, Schnieders et al. ¹²⁴ und Bohner et al. ⁴⁰ konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Porosität eine erhöhte Freisetzungsrates des Antibiotikums zur Folge hat.

Die Referenzpaste (CPC) wies im Vergleich dazu noch höhere Porositäten auf (**Abbildung 5 b**). Trotz der geringeren Porosität der Mischzemente waren die Festigkeiten verglichen mit der Referenz nicht höher. Da es sich bei Struvit um ein sehr dichtes Material handelt und ein Eindringen der wässrigen Phase ins Innere der Paste und folgliches Nachhärten nur im Falle von HA möglich ist.

Qualitativ lassen sich die unterschiedlichen Porositäten der getesteten Pasten ebenfalls in den REM-Aufnahmen erkennen (**Abbildung 10**). Für eine Quantifizierung wäre jedoch eine weitere Versuchsanordnung zum Beispiel Gasadsorption auf Basis der BET-Methode sinnvoll. ¹²⁵

5.2 Freisetzungsrates der Ionen , Massenverlust und die jeweilige pH-Wert-Änderung

Die chemische Zusammensetzung von Zementen hat einen großen Einfluss sowohl auf die mechanischen Eigenschaften, die Löslichkeit als auch auf die Zytokompatibilität. ^{126, 127} Es ist bereits bekannt, dass KEM aus sekundären Calcium-, und Magnesiumphosphatverbindungen (wie z.B. Bruschit, Struvit) eine wesentlich höhere chemische Löslichkeit besitzen als beispielsweise β -TCP und HA, was eine deutlich schnellere knöchernen Regeneration zur Folge hat.¹²⁸ Da nanokristallines HA - bedingt durch die geringere Dichtigkeit des Kristallgitters als auch aufgrund der hohen spezifischen Oberfläche ¹²⁹ - nur durch Osteoklasten resorbiert werden kann, werden KEM's auf HA-Basis nicht oder nur unvollständig durch einwachsenden Knochen ersetzt. Eine deutlich bessere Resorbierbarkeit von Struvit-Zementen basiert auf deren Löslichkeitsprodukt von 5.21×10^{-15} ($pK(Lp) = 14.28$) bis 2.12×10^{-13} ($pK(Lp) = 12.67$) in einem pH-Bereich von 7.01 bis 9.62. ¹³⁰

Die Löslichkeit bzw. Ionenfreisetzung der einzelnen Zement-Pasten wurde in der vorliegenden Arbeit anhand einer Massenverluststudie und ICP-MS analysiert (**Abbildung 6**). Die Ergebnisse sollten die im ersten Teil der Diskussion beschriebenen Porositätszunahmen im Laufe der Studie untermauern. Allgemein betrachtet, konnten erhöhte Freisetzungsrates der Magnesium-, und Phosphationen, und eine sehr geringe Freisetzung von Calciumionen verzeichnet werden. Die wässrige Zement-Paste mit $Ca_{0,25}$ verlor mit $24 \pm 3,1$ mg/g am meisten Phosphat als auch mit $20 \pm 2,2$ mg/g am meisten Magnesium. Eine Erklärung hierfür wäre der höhere Magnesiumgehalt der Paste. Insgesamt betrachtet verloren die drei anderen Pastenformulierungen eine vergleichbar hohe Menge an Magnesium ($\sim 14,3$ mg/g). Bei der Phosphat-Freisetzung erreichten sowohl die ölbasierte als auch die wässrige Zement-Paste mit $Ca_{0,75}$ ähnliche Werte ($\sim 20,9$ mg/g). Zwischen den beiden Pasten mit $Ca_{0,25}$ war ein deutlicher Unterschied zu sehen: die ölbasierte Paste verlor $15,6 \pm 1,4$ mg/g und die wässrige Paste $24 \pm 3,1$ mg/g. Die Calcium-Freisetzung der Zementformulierungen zeigten deutliche

Differenzen. So wurden die geringsten Mengen dieses Ions von den ölbasierten Pasten ($\text{Ca}_{0,25}$: $1,5 \pm 0,1$ mg/g ; $\text{Ca}_{0,75}$: $2,4 \pm 0,1$ mg/g) und die geringfügig höheren Mengen von den wässrigen Pasten ($\text{Ca}_{0,25}$: $3,4 \pm 0,4$ mg/g ; $\text{Ca}_{0,75}$: $5 \pm 0,7$ mg/g) freigesetzt. Die deutlich niedrigere Freisetzungskinetik von Calcium war durch die deutlich geringere Molarität des Ions in der Zementmischung bedingt (**Tabelle 9**). Die Freisetzung der einzelnen Ionen war insgesamt bei den wässrigen Zement-Pasten höher als bei den ölbasierten Pasten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Wirkung des Öls in den Öl-Pasten als ein Porenbildner - was auch die deutlich höhere Porosität erklärt. Bedingt durch die vermehrten Poren bzw. die höhere Porosität enthielten die ölbasierten Pasten somit deutlich weniger Zementformulierung und dadurch weniger Ionen, die freigesetzt werden konnten.

Die Freisetzung der Ionen aus den entsprechenden Prüfkörpern führte zu einem entsprechenden Massenverlust (**Abbildung 4, Tabelle 8**). Vergleicht man die Werte des gesamten Massenverlustes der einzelnen Prüfkörper (**Tabelle 8**) mit den Werten der freigesetzten Ionen bezogen auf die Stoffmenge des Ions im Rohpulver (**Tabelle 9**), so wird der Zusammenhang zwischen freigesetzter Ionenmenge und gesamtem Massenverlust deutlich. Die wässrige Zement-Paste auf Basis der Formulierung $\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$ erfuhr mit $8,41 \pm 0,35$ % den größten Massenverlust sowie die höchste Ionenfreisetzungsrates. Im Gegensatz dazu setzte die Referenzpaste nur geringe Mengen der entsprechenden Ionen frei, was sich auch in dem minimalen Massenverlust widerspiegelte. Somit bestätigte sich die literaturbekannte geringe chemische Löslichkeit von HA-bildenden Zementen auch im Verhalten der Kontrollgruppe in dieser Studie. Das Degradationsverhalten der Pasten wurde - wie bereits durch Blum et al. ¹²⁶ postuliert - durch das Verhältnis von Magnesium zu Calcium stark beeinflusst. Sie beschäftigten sich mit dem *in vitro* Verhalten von Calcium-Magnesium-Phosphat-Zementen mit der Zusammensetzung $\text{Ca}_x\text{Mg}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$ ($0 \leq x \leq 1.5$) vermengt mit einer $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4/\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ Lösung. Sie untersuchten das passive Resorptionsverhalten der Prüfkörper in Zellkulturmedium ohne Zellen als auch das aktive Resorptionsverhalten, wobei

RAW 264.7 Zellen 21 Tage lang auf der Oberfläche der PK mit verschiedenen Mg:Ca Verhältnissen kultiviert wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass die aktive Resorption den überwiegenden Abbaumechanismus von Struvit darstellt als auch dass die Höhe der freigesetzten Magnesium-, und Phosphationen durch Erhöhung von Calciumionen im Rohpulver verbessert werden kann. Durch die erhöhte Freisetzung dieser Ionen wird vermutlich das Differenzierungsverhalten der Osteoklasten - abhängig von dem Mg:Ca Verhältnis im Rohpulver - beeinflusst, und somit auch die aktive Resorption. ¹²⁶

Zuletzt wurde der pH-Wert-Verlauf des Mediums bestimmt, in welchem die Prüfkörper über die Auslagerungsdauer hin gelagert wurden, um die Verträglichkeit *in vivo* abzuschätzen. Insgesamt stellte sich über den Verlauf hinweg sowohl für die ölbasierten als auch wässrigen CMPC ein eher neutraler bis leicht alkalischer pH-Wert ein (**Abbildung 7**), so dass dieser durch die oben beschriebenen Ionenfreisetzungen nicht maßgeblich beeinflusst wurde. Demnach stellen CMPC eine gute Alternative zu bereits in der Literatur bekannten Zementsystemen dar - unter anderem sind hier Bruschit-Zemente zu nennen, welche beim Abbinden einen sauren pH-Wert aufweisen.¹³¹ Calciumdotierte MPC ähneln demnach in ihrem Einfluss auf den pH-Wert der Umgebungsflüssigkeit eher reinen struvitbildenden als bruschitbildenden Zementen. Jedoch wurde in der vorliegenden Studie der pH-Wert der verschiedenen Zementsysteme während der Abbindereaktion nicht weiter untersucht. Bruschit-Zemente weisen wie bereits beschrieben einen stark sauren pH-Wert während des Abbindevorgangs auf. Dies führt zur unerwünschten Säurefreigaben in das Gewebe um das Implantat. ¹³² Dagegen binden Struvit-Zemente eher neutral ab und besitzen einen gut einstellbaren pH-Wert. So reagiert Farringtonit mit DAHP unter neutralen pH-Wert-Bedingungen. ^{30, 70, 133} Die Referenzpaste zeigte im wässrigen Milieu einen für HA typischen pH-Wert Verlauf. HA wird nicht sofort umgesetzt, da die Abbindereaktion über einen größeren Zeitraum hinweg verläuft. Vergleichsweise verhielt sich auch der pH-Wert. Er startete im Alkalischen und fiel über einen längeren Zeitraum hin ab und blieb nach Ende der Reaktion

stabil im neutralen Bereich. ^{28 56} Diese langsame Umsetzung zu HA ließ sich auch gut in den XRD-Messungen (**Abbildung 9 c**) als auch REM-Aufnahmen (**Abbildung 10**) nachverfolgen.

5.3 Zytokompatibilität

Bei der Analyse und Diskussion der Ergebnisse von Zellversuchen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass diese sehr stark von den Versuchsbedingungen abhängen. Demnach sollte immer eine Kontrollgruppe mit hoher Zellverträglichkeit, in diesem Fall PS, in die Versuchsreihe miteinbezogen werden. Zudem ist bekannt, dass eine wässrige Paste auf Basis von $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ mit ähnlicher Zusammensetzung bereits erfolgreich durch Vorndran et al.³⁰ *in vitro*, als auch durch Klammert et al.⁷³ *in vivo* getestet wurde.

Die wesentlich problematischere Frage, die sich bei solchen Versuchen stellt, ist die Übertragbarkeit der *in vitro* erhaltenen Ergebnisse auf *in vivo* Situationen. Es gibt jedoch bereits Arbeiten, die zu dem Fazit kamen, dass sich humane Osteoblasten, welche für die vorliegende Versuchsreihe herangezogen wurden, *in vitro* als auch *in vivo* ähnlich verhielten. ¹³⁴ Jedoch setzt dies voraus, dass die Untersuchungen anhand primärer Zellen durchgeführt werden.

In den Zellversuchen der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Kultivierung der Zelllinie humane fetale Osteoblasten (hFOB) ^{1.19} indirekt in einer Eluationsstudie von den zu analysierenden wässrigen und ölbasierten Zement-Pasten. Bei den ölbasierten Pasten waren die Durchführung der Eluationsstudie sowie die erhaltenen Ergebnisse aufgrund einer starken Eintrübung des Zellkulturmediums durch ein Auswaschen der Öl-Tensid-Mischung aus den Prüfkörpern nicht zuverlässig. Um mögliche Fehler bei der Versuchsdurchführung auszuschließen wäre eine erneute Versuchsreihe - eventuell unter Verwendung eines kontrollierten Waschprotokolls - anzuraten.

In dieser sollten ebenfalls genauere Untersuchungen der freigesetzten Substanz als auch deren Auswirkung auf die Zellen gemacht werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse auf Basis der wässrigen Pasten fällt auf, dass die Aktivität der Zellen sowie zum Teil auch die entsprechende normierte Zellaktivität durch 38-%ige Eluat beider Struvitoberflächen nach 10 Tagen ca. doppelt so hoch waren wie auf der Negativkontrolle PS (**Abbildung 18,19**). Dies lässt sich möglicherweise durch den positiven Effekt der aus den beiden Pasten freigesetzten Magnesiumionen erklären. Magnesium ist mit ca. 1 mol (Mensch mit 70 kg) das viert häufigste Kation im Körper, wovon ungefähr die Hälfte im Knochen enthalten ist.¹³⁵ Einige Studien bewiesen bereits die wichtige Rolle des Magnesiumions im Knochenmetabolismus. Biomaterialien, welche mit Magnesiumionen modifiziert wurden, konnte ein Anstieg der Osteoblasten-Adhäsion nachgewiesen werden.¹³⁶ Auch spielt Magnesium eine wichtige Rolle als Kofaktor und Katalysator von vielen Enzymen als auch als Stabilisator von DNA und RNA.^{135, 137}

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten bereits, dass die Effekte der verschiedenen Zemente auf den pH-Wert der Umgebungslösung marginal waren und somit als Ursachen für mögliche zytotoxische Reaktionen ausgeschlossen werden können. Unter Verwendung des reinen Eluats war jedoch ein deutlicher Einbruch sowohl der Zellzahl als auch der Aktivität von hFOB zu verzeichnen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die steigende Menge an freigesetztem Phosphat aus den Zement-Prüfkörpern (ICP-MS Messungen). Es ist bereits bekannt, dass anorganisches Phosphat, ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix des Knochens, Apoptose der Osteoblasten induzieren kann.¹³⁸ Meleti et al.¹³⁸ zeigten in einer Studie mit Osteoblasten ähnlichen Zellen, dass nach einer 96-stündigen Behandlung mit 5 mmol/L an anorganischem Phosphat nur noch 30 % vitale Zellen nachgewiesen werden konnten. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 7 mmol/L war keine Zelle mehr lebensfähig.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Herstellung und Erprobung von innovativen Anwendungsformen kalthärtender Knochenersatzmaterialien aus Calcium-, und Magnesiumphosphaten, die nach dem Abbindevorgang vorzugsweise aus dem Mineral Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) bestehen. Diese neuartigen Knochenzemente versprechen im Vergleich zu den herkömmlichen Knochenersatzmaterialien eine deutlich schnellere knöcherne Regeneration und Abbaubarkeit. Damit wird das Ziel verfolgt schneller Implantate setzen zu können und dem Patienten somit eine lange Wartezeit und dementsprechenden Leidensdruck ersparen zu können. Ebenso müssen konventionelle Produkte erst im OP angerührt und hiernach in einem schmalen Zeitfenster verarbeitet werden. Die präfabrizierten Zement-Pasten sind dagegen direkt applikationsbereit und härten erst nach Kontakt mit dem feuchten Milieu aus. In vorangegangenen Projekten wurden sowohl präfabrizierte Pasten als auch Granulate auf Basis Struvit-bildender Calcium-Magnesiumphosphate erfolgreich entwickelt. Vorteil dieser Granulate ist ihre sphärische Form. Im Hinblick auf die klinische Anwendbarkeit sollten in der vorliegenden Studie beide Anwendungsformen vorgreifend auf eine tierexperimentelle Studie hinsichtlich ihrer Materialeigenschaften *in vitro* getestet werden.

Die hier verwendeten Zemente bestanden aus einem Rohpulver mit der Zusammensetzung $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$. Die wässrigen Zemente härteten nach Zugabe einer Ammoniumphosphat-Lösung aus. Die anwendungsbereiten Öl-Pasten wurden von der Firma INNOTERE GmbH (Radebeul) auf Basis des gleichen Rohpulvers hergestellt. Als flüssige Phase diente hier Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (K_2HPO_4). Die Granulate wurden über Emulgierung der wässrigen Zement-Paste in Öl hergestellt.

Analysiert wurden die Werkstoffe hinsichtlich ihrer Druckfestigkeit, Porosität, Massenverlust, pH-Wert-Verlauf und Ionenzusammensetzung der umgebenden Flüssigkeit sowie mittels Röntgendiffraktometrie und Rasterelektronenmikroskopie bezüglich ihrer Phasenzusammensetzung und

Oberflächenmorphologie. Auch wurde deren Zytokompatibilität indirekt anhand einer humanen fetalen Osteoblastenzelllinie untersucht.

Die Ergebnisse zeigten für die wässrigen Zement-Pasten Druckfestigkeiten von 59 MPa ($\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$) und 41,7 MPa ($\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$), wohingegen die ölbasierten Pasten aufgrund ihrer höheren Porosität lediglich Festigkeiten von 10,4 MPa ($\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$) und 10,9 MPa ($\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$) erreichten. Bezüglich des pH-Wertes der Umgebungslösung zeigte sich bei beiden Zementsorten über die gesamte Auslagerungsdauer hin ein annähernd neutraler pH-Wert, womit eine Grundvoraussetzung für die klinische Anwendbarkeit erfüllt wurde. Für die Granulate konnte nachgewiesen werden, dass die γ -Sterilisation keine Auswirkung auf die Phasenzusammensetzung sowie auf die Mikrostruktur ausübte.

In den Zellkulturversuchen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zement-Pasten. Während die ölbasierten Pasten aufgrund einer Eintrübung des Zellkulturmediums zu Problemen bei der Realisierbarkeit der Zellversuche führten, zeigte sich bei den wässrigen Zement-Pasten die folgende Tendenz: Bei der Zellaktivität als auch der Zellzahl erreichte die Zementformulierung auf Basis von $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ durch die Verwendung des verdünnten Eluats die besten Ergebnisse, während das reine Eluat in beiden Fällen durch die hohe Phosphatfreisetzung stark zytotoxisch wirkte. Folglich der ICP-MS Messungen wurden nach 10 Tagen bereits $8,2 \pm 1,9$ mg/g ($\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$) und $7,7 \pm 1,1$ mg/g ($\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$) des Ions freigesetzt.

Die hier verwendeten Anwendungsformen sind aufgrund ihrer guten Werte hinsichtlich Festigkeit, pH-Wert und der *in vitro* Zytokompatibilität für den Einsatz als Knochenersatzmaterialien indiziert und eine sinnvolle Ergänzung zu den bisher angewendeten Formulierungen. Die im Anschluss an dieses Projekt stattfindende Tierstudie wird zeigen, ob die neuen Anwendungsformen tatsächlich in Bezug auf Degradationsverhalten und vor allem die Bildung neuer Knochensubstanz den klassischen Zementformulierungen überlegen sind

7. Literaturverzeichnis

1. Heiß C, Maier G, Gelinsky M, Hose D and Schnettler R. Klinische Verwendung osteologischer Biomaterialien. *Osteologie*. 2013;22:173-178.
2. Sailer H and Weber F. Knochenersatzmaterialien. *Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie*. 2000;4:S384-S391.
3. de Boer HH. The history of bone grafts. *Clinical orthopaedics and related research*. 1988:292-8.
4. F Sailer H and Weber F. *Knochenersatzmaterialien*; 2000.
5. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff K-D and Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40:706-718.
6. Smeets R, Hanken H, Jung O, Rothamel D, Handschel J, Al-Dam A, Blessmann M, Heiland M and Kolk A. Knochenersatzmaterialien. *Der MKG-Chirurg*. 2014;7:53-67.
7. Giannoudis PV, Dinopoulos H and Tsiridis E. Bone substitutes: An update. *Injury*. 2005;36:S20-S27.
8. Smeets R and Kolk A. Osteokonduktive und-induktive Knochenersatzmaterialien. *ZMK*. 2010;27:328-340.
9. Wirth CJ, Mutschler W-E, Kohn D and Pohlemann T. *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*: Georg Thieme Verlag; 2013.
10. Albrektsson T and Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*. 2001;10:S96-S101.
11. Moore WR, Graves SE and Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery*. 2001;71:354-361.
12. Adell R, Lekholm U, Rockler B and Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *International Journal of Oral Surgery*. 1981;10:387-416.
13. Ziebart T. Knochenaufbau in der Zahnmedizin. *der junge zahnarzt*. 2014;5:12-20.
14. Barth A. *Histologische untersuchungen über knochenimplantationen*: Fischer; 1895.
15. Schlegel K. Knochenersatzmaterialien für die Implantologie. *ZWR-Das Deutsche Zahnärzteblatt*. 2008;117:638-647.
16. Simion M and Fontana F. Autogenous and xenogeneic bone grafts for the bone regeneration. A literature review. *Minerva stomatologica*. 2004;53:191-206.
17. Mahato NK. Characterization of cortico-cancellous bone along the iliac crest: focus on graft harvesting. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 2011;33:433-437.
18. Pape HC, Evans A and Kobbe P. Autologous bone graft: properties and techniques. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24 Suppl 1:S36-40.
19. Younger EM and Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*. 1989;3:192-5.
20. Damien CJ and Parsons JR. Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *Journal of Applied Biomaterials*. 1991;2:187-208.
21. Yuan H, Fernandes H, Habibovic P, de Boer J, Barradas AM, de Ruiter A, Walsh WR, van Blitterswijk CA and de Bruijn JD. Osteoinductive ceramics as a synthetic alternative to autologous bone grafting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107:13614-13619.
22. Soldner E and Herr G. Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien. *Trauma und Berufskrankheit*. 2001;3:256-269.

23. Bostrom MPG and Seigerman DA. The Clinical Use of Allografts, Demineralized Bone Matrices, Synthetic Bone Graft Substitutes and Osteoinductive Growth Factors: A Survey Study. *HSS Journal*. 2005;1:9-18.
24. Schieker M, Heiss C and Mutschler W. Knochenersatzmaterialien. *Der Unfallchirurg*. 2008;111:613-620.
25. Schnürer SM, Gopp U, Kühn K-D and Breusch SJ. Knochenersatzwerkstoffe. *Der Orthopäde*. 2003;32:2-10.
26. Epple M. Biomimetic bone substitution materials. *Handbook of biomineralization: biological aspects and structure formation*. 2008:81-95.
27. Rueger J. Bone substitutes. State of the art and: what lies ahead? *Der Unfallchirurg*. 1996;99:228-236.
28. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31 Suppl 4:37-47.
29. Ostrowski N, Roy A and Kumta PN. Magnesium phosphate cement systems for hard tissue applications: A review. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016;2:1067-1083.
30. Vorndran E, Ewald A, Müller FA, Zorn K, Kufner A and Gbureck U. Formation and properties of magnesium–ammonium–phosphate hexahydrate biocements in the Ca–Mg–PO₄ system. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22:429-436.
31. Bohner M, Gbureck U and Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials*. 2005;26:6423-6429.
32. Kowalczyk K and Palavit G. Chemical composition of mortars made from the magnesia amidoimidophosphates system. *Journal of Materials Science Letters*. 1993;12:1276-1278.
33. Mestres G and Ginebra M-P. Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties. *Acta biomaterialia*. 2011;7:1853-1861.
34. Gbureck U and Thull R. Mechanische und rheologische Eigenschaften mineralischer Knochenzemente. *BIOMaterialien*. 2005;6:287-296.
35. Dorozhkin SV and Epple M. Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten. *Angewandte Chemie*. 2002;114:3260-3277.
36. Brown WE and Chow LC. Dental restorative cement pastes. 1990.
37. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA and Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta biomaterialia*. 2010;6:2863-2873.
38. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31:D37-D47.
39. Chow LC. Calcium-Phosphat-Zemente: Eigenschaften und Verwendungen. *Biomaterialien*. 2001;2:11-18.
40. Bohner M, Lemaître J, Landuyt PV, Zambelli P-Y, Merkle HP and Gander B. Gentamicin-Loaded Hydraulic Calcium Phosphate Bone Cement as Antibiotic Delivery System. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1997;86:565-572.
41. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31:D37-D47.
42. Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM and Thull R. Mechanical activation and cement formation of β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2003;24:4123-4131.
43. Gbureck U, Dembski S, Barralet JE and Thull R. Bruschi-Knochenzemente aus biphasigen β -Tricalciumphosphat/Calciumpyrophosphat Keramiken.
44. Hofmann MP, Mohammed AR, Perrie Y, Gbureck U and Barralet JE. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. *Acta biomaterialia*. 2009;5:43-49.

45. Deb S. *Orthopedic bone cement*: Wiley Online Library; 2008.
46. BOHNER M, VAN LANDUYT P, MERKLE HP and LEMAITRE J. Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1997;8:675-681.
47. Bohner M, Theiss F, Apelt D, Hirsiger W, Houriet R, Rizzoli G, Gnos E, Frei C, Auer JA and von Rechenberg B. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials*. 2003;24:3463-3474.
48. Chow L. Next generation calcium phosphate-based biomaterials. *Dent Mater J*. 2009;28:1-10.
49. Bohner M, Merkle HP, Landuyt PV, Trophard G and Lemaitre J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2000;11:111-116.
50. Bohner M, Lemaitre J and Ring TA. Effects of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cements made of β - tricalcium phosphate - phosphoric acid - water mixtures. *Journal of the American Ceramic Society*. 1996;79:1427-1434.
51. Klement R. Der Fluorgehalt der Knochen und Zähne. *Naturwissenschaften*. 1933;21:662-663.
52. Wintermantel E and Ha S. Biokompatible Werkstoffe und Bauweisen. Implantate für Medizin und Umwelt [Biocompatible Materials and Designs. Implants for Medicine and Environment]. 1996.
53. Durucan C and Brown PW. α -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2000;11:365-371.
54. Ferná'ndez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens FCM, Planell JA and Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999;10:177-183.
55. Ishikawa K, Putri TS, Tsuchiya A, Tanaka K and Tsuru K. Fabrication of interconnected porous beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) based on a setting reaction of beta-TCP granules with HNO₃ followed by heat treatment. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2018;106:797-804.
56. Liu C, Shen W, Gu Y and Hu L. Mechanism of the hardening process for a hydroxyapatite cement. *Journal of biomedical materials research*. 1997;35:75-80.
57. Kouassi M, Michaïlesco P, Lacoste-Armynot A and Boudeville P. Antibacterial effect of a hydraulic calcium phosphate cement for dental applications. *Journal of endodontics*. 2003;29:100-103.
58. Yeong K, Wang J and Ng S. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄. *Biomaterials*. 2001;22:2705-2712.
59. Gbureck U, Barralet J, Grover L, Hofmann M and Thull R. Mechanische Festigkeit und Porosität von Calciumphosphat-Zementen. *Biomaterialien*. 2003;4:258-263.
60. Grover LM, Knowles JC, Fleming GJP and Barralet JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. 2003;24:4133-4141.
61. Kanter B, Geffers M, Ignatius A and Gbureck U. Control of in vivo mineral bone cement degradation. *Acta biomaterialia*. 2014;10:3279-3287.
62. Bichler KH, Eipper E and Naber K. Infektinduzierte Harnsteine. *Der Urologe, Ausgabe A*. 2003;42:47-55.

63. Sugama T and Kukacka LE. Characteristics of magnesium polyphosphate cements derived from ammonium polyphosphate solutions. *Cement and Concrete Research*. 1983;13:499-506.
64. Hall DA, Stevens R and Jazairi BE. Effect of Water Content on the Structure and Mechanical Properties of Magnesia-Phosphate Cement Mortar. *Journal of the American Ceramic Society*. 1998;81:1550-1556.
65. Walling SA and Provis JL. Magnesia-Based Cements: A Journey of 150 Years, and Cements for the Future? *Chemical reviews*. 2016;116:4170-204.
66. Ribeiro DV and Morelli MR. Performance analysis of magnesium phosphate cement mortar containing grinding dust. *Materials Research*. 2009;12:51-56.
67. Klammert U, Vorndran E, Reuther T, Muller FA, Zorn K and Gbureck U. Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2010;21:2947-53.
68. Seehra SS, Gupta S and Kumar S. Rapid setting magnesium phosphate cement for quick repair of concrete pavements — characterisation and durability aspects. *Cement and Concrete Research*. 1993;23:254-266.
69. Driessens FCM, Boltong MG, Zapatero MI, Verbeeck RMH, Bonfield W, Bértmúdez O, Fernández E, Ginebra MP and Planell JA. In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1995;6:272-278.
70. Moseke C, Saratsis V and Gbureck U. Injectability and mechanical properties of magnesium phosphate cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22:2591-2598.
71. Yu Y, Wang J, Liu C, Zhang B, Chen H, Guo H, Zhong G, Qu W, Jiang S and Huang H. Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010;76:496-504.
72. Großardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE and Gbureck U. Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16:3687-3695.
73. Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T and Gbureck U. In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model. *Acta biomaterialia*. 2011;7:3469-3475.
74. Mestres G, Abdolhosseini M, Bowles W, Huang SH, Aparicio C, Gorr SU and Ginebra MP. Antimicrobial properties and dentin bonding strength of magnesium phosphate cements. *Acta biomaterialia*. 2013;9:8384-8393.
75. Wu F, Su J, Wei J, Guo H and Liu C. Injectable bioactive calcium–magnesium phosphate cement for bone regeneration. *Biomedical Materials*. 2008;3:044105.
76. Wei J, Jia J, Wu F, Wei S, Zhou H, Zhang H, Shin J-W and Liu C. Hierarchically microporous/macroporous scaffold of magnesium–calcium phosphate for bone tissue regeneration. *Biomaterials*. 2010;31:1260-1269.
77. Wu F, Wei J, Guo H, Chen F, Hong H and Liu C. Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration. *Acta biomaterialia*. 2008;4:1873-1884.
78. Del Fabbro M, Rosano G and Taschieri S. Implant survival rates after maxillary sinus augmentation. *European Journal of Oral Sciences*. 2008;116:497-506.
79. Ruffieux K, Köhli M and Degradable Solutions A. Knochenaufbauwerkstoffe in der Zahnmedizin.

80. Christel T, Geffers M, Klammert U, Nies B, Höß A, Groll J, Kübler AC and Gbureck U. Fabrication and cytocompatibility of spherical magnesium ammonium phosphate granules. *Materials Science and Engineering: C*. 2014;42:130-136.
81. Bohner M, Tadier S, van Garderen N, de Gasparo A, Döbelin N and Baroud G. Synthesis of spherical calcium phosphate particles for dental and orthopedic applications. *Biomater*. 2013;3:e25103.
82. Tamimi F, Torres J, Bassett D, Barralet J and Cabarcos EL. Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. *Biomaterials*. 2010;31:2762-2769.
83. Kawai N, Niwa S, Sato M, Sato Y, Suwa Y and Ichihara I. Bone formation by cells from femurs cultured among three-dimensionally arranged hydroxyapatite granules. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;37:1-8.
84. Liu D-M. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite granules. *Biomaterials*. 1996;17:1955-1957.
85. Lagaly G, Schulz O and Zimehl R. *Dispersionen und Emulsionen: eine Einführung in die Kolloidik feinverteilter Stoffe einschließlich der Tonminerale*: Springer-Verlag; 2013.
86. Köhler K and Schuchmann IHP. *Emulgiertechnik: Grundlagen, Verfahren und Anwendungen*: Behr's Verlag DE; 2012.
87. Fabry B. Tenside. Eigenschaften, Rohstoffe, Produktion, Anwendungen. *Chemie in unserer Zeit*. 1991;25:214-222.
88. Paul W and Sharma C. Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1999;10:383-388.
89. Komlev VS, Barinov SM and Koplík EV. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. *Biomaterials*. 2002;23:3449-3454.
90. Xu HHK, Carey LE, Simon Jr CG, Takagi S and Chow LC. Premixed calcium phosphate cements: Synthesis, physical properties, and cell cytotoxicity. *Dental Materials*. 2007;23:433-441.
91. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA and Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *Acta biomaterialia*. 2010;6:2863-73.
92. Engstrand J, Aberg J and Engqvist H. Influence of water content on hardening and handling of a premixed calcium phosphate cement. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33:527-531.
93. Heinemann S, Rössler S, Lemm M, Ruhnnow M and Nies B. Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid. *Acta biomaterialia*. 2013;9:6199-6207.
94. Takagi S, Chow LC, Hirayama S and Sugawara A. Premixed calcium-phosphate cement pastes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2003;67:689-696.
95. Aberg J, Brisby H, Henriksson HB, Lindahl A, Thomsen P and Engqvist H. Premixed acidic calcium phosphate cement: Characterization of strength and microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010;93B:436-441.
96. Cherng A, Takagi S and Chow LC. Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;35:273-277.
97. Takagi S, Chow LC, Hirayama S and Sugawara A. Premixed calcium-phosphate cement pastes. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2003;67B:689-696.

98. Khairoun I, Boltong MG, Driessens FC and Planell JA. Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *J Biomed Mater Res.* 1997;38:356-60.
99. Khairoun I, Boltong M, Driessens F and Planell J. Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement. *Journal of biomedical materials research.* 1997;38:356-360.
100. <https://www.innotere.de/paste-cpc>.
101. Schröder E. *Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen*: Springer-Verlag; 2013.
102. Matissek R, Steiner G and Fischer M. *Lebensmittelanalytik*: Springer-Verlag; 2013.
103. Scapozza I. *Untersuchungen zum Verhalten einer Kombinationsbarriere aus Asphalt auf mineralischer Trag- und Dichtungsschicht*: vdf Hochschulverlag AG; 2002.
104. Kurzweil P and Scheipers P. *Chemie: Grundlagen, Aufbauwissen, Anwendungen und Experimente. 4. Auflage, S.* 2009;304.
105. Sepeur S. *Nanotechnology: technical basics and applications*: Vincentz Network GmbH & Co KG; 2008.
106. Giancoli DC. *Physik: Gymnasiale Oberstufe*: Pearson Deutschland GmbH; 2011.
107. Hiltmann W and Stribrny B. *Handbuch zur Erkundung des Untergrundes von Deponien und Altlasten: Band 5: Tonmineralogie und Bodenphysik*: Springer-Verlag; 2013.
108. Wenisch T. *mediscript Kurzlehrbuch Physik: mit Zugang zur mediscript Lernwelt*: Elsevier Health Sciences; 2013.
109. Harris SA, Enger RJ, Riggs LB and Spelsberg TC. Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *Journal of Bone and Mineral Research.* 1995;10:178-186.
110. Yen MI, Chien CC, Chiu Im, Huang HI, Chen YC, Hu HI and Yen BL. Multilineage differentiation and characterization of the human fetal osteoblastic 1.19 cell line: a possible in vitro model of human mesenchymal progenitors. *Stem Cells.* 2007;25:125-131.
111. Subramaniam M, Jalal SM, Rickard DJ, Harris SA, Bolander ME and Spelsberg TC. Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER α cells: Bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. *Journal of cellular biochemistry.* 2002;87:9-15.
112. Sticher O, Steinegger E and Hänsel R. *Pharmakognosie phytopharmazie*: Springer; 2015.
113. Weir L, Robertson D, Leigh IM and Panteleyev AA. The reduction of water-soluble tetrazolium salt reagent on the plasma membrane of epidermal keratinocytes is oxygen dependent. *Analytical Biochemistry.* 2011;414:31-37.
114. Mathur S, Shen H and Singh M. *Nanostructured Materials and Systems*: John Wiley & Sons; 2010.
115. Pittet C and Lemaitre J. Mechanical characterization of brushite cements: A Mohr circles' approach. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 2000;53:769-780.
116. Klammert U, Reuther T, Blank M, Reske I, Barralet JE, Grover LM, Kübler AC and Gbureck U. Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement. *Acta biomaterialia.* 2010;6:1529-1535.
117. Möhler E. *Das Widerstandsvermögen des Fußes: eine qualitative Untersuchung unter besonderer Berücksichtigung der Fußbekleidung*: Springer-Verlag; 2013.
118. Bohner M. Calcium phosphate emulsions: possible applications. *Key Engineering Materials.* 2001;192:765-768.

119. Barralet J, Gaunt T, Wright A, Gibson IR and Knowles J. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2002;63:1-9.
120. Hofmann MP, Mohammed AR, Perrie Y, Gbureck U and Barralet JE. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities. *Acta biomaterialia*. 2009;5:43-9.
121. Böhner M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *European Spine Journal*. 2001;10:S114-S121.
122. Barralet JE, Grover LM and Gbureck U. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. *Biomaterials*. 2004;25:2197-2203.
123. Dorozhkin SV. Self-setting calcium orthophosphate formulations: cements, concretes, pastes and putties. *International Journal of Materials and Chemistry*. 2011;1:1-48.
124. Schnieders J, Gbureck U, Vorndran E, Schossig M and Kissel T. The effect of porosity on drug release kinetics from vancomycin microsphere/calcium phosphate cement composites. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011;99B:391-398.
125. Haul R and Dümbgen G. Vereinfachte Methode zur Messung von Oberflächengrößen durch Gasadsorption. *Chemie Ingenieur Technik*. 1960;32:349-354.
126. Blum C, Brückner T, Ewald A, Ignatius A and Gbureck U. Mg:Ca ratio as regulating factor for osteoclastic in vitro resorption of struvite biocements. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;73:111-119.
127. Boanini E, Gazzano M and Bigi A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta biomaterialia*. 2010;6:1882-1894.
128. Mangano C, Piattelli A, Perrotti V and Iezzi G. Dense hydroxyapatite inserted into postextraction sockets: a histologic and histomorphometric 20-year case report. *Journal of periodontology*. 2008;79:929-933.
129. Ooms EM, Wolke JGC, van de Heuvel MT, Jeschke B and Jansen JA. Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone. *Biomaterials*. 2003;24:989-1000.
130. Sillen LG, Martell AE and Bjerrum J. Stability constants of metal-ion complexes. 1964.
131. Böhner M. pH variations of a solution after injecting brushite cements. *Key Engineering Materials*. 2001;813-816.
132. Böhner M. pH variations of a solution after injecting brushite cements. *Key Engineering Materials*. 2001;192:813-816.
133. Vorndran E, Ewald A, Müller FA, Zorn K, Kufner A and Gbureck U. Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2011;22:429-36.
134. Dodds R, Merry K, Littlewood A and Gowen M. Expression of mRNA for IL1 beta, IL6 and TGF beta 1 in developing human bone and cartilage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1994;42:733-744.
135. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J and Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*. 2006;27:1728-1734.
136. Zreiqat H, Howlett C, Zannettino A, Evans P, Schulze - Tanzil G, Knabe C and Shakibaei M. Mechanisms of magnesium - stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2002;62:175-184.
137. Wolf FI and Cittadini A. Chemistry and biochemistry of magnesium. *Molecular Aspects of Medicine*. 2003;24:3-9.

138. Meleti Z, Shapiro IM and Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone*. 2000;27:359-366.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen nachfolgenden Personen herzlich bedanken, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. U. Gbureck für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas und für die professionelle, immer freundliche Betreuung bedanken.

Bei der Firma INNOTERE GmbH möchte ich mich für die Bereitstellung der präfabrizierten Zement-Pasten bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnmedizin der Klinik für Zahn- Mund und Kieferkrankheiten, die mich bei meiner Arbeit unterstützt und mir eine schöne Zeit im Labor ermöglicht haben.

Besonderer Dank gilt vor allem meiner Betreuerin Theresa Brückner, die mir jederzeit bei all meinen Problemen und Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand und deren organisierte, kompetente Art wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Auch danken möchte ich Isabell Biermann für die immer hilfsbereite und nette Unterstützung im Labor.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir sowohl mein Studium als auch diese Doktorarbeit erst ermöglicht haben.

Auch danken möchte ich meinen Großeltern, die immer an mich geglaubt haben.