

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

**Untersuchung des in vivo Einwachsverhaltens von Zementgranulaten
und -pasten aus resorbierbaren
Calcium-dotierten Magnesiumphosphat-Phasen**

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

vorgelegt von

Dorothea Kreczy
aus Innsbruck, Österreich

Würzburg, November 2019

Referent:

apl. Prof. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck

Korreferent:

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan:

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2020

Die Promovendin ist Zahnärztin

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	II
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Aufgaben von Knochenersatzmaterial	2
1.2 Einteilung und Eigenschaften moderner Knochenersatzmaterialien	3
1.2.1 Autologer Knochenersatz	4
1.2.2 Allogener Knochenersatz	5
1.2.3 Xenogener Knochenersatz	5
1.2.4 Alloplastischer Knochenersatz	6
1.3 Zemente	10
1.3.1 Zementeigenschaften	11
1.3.2 Beispiele für Knochenzemente	14
1.3.3 Calcium Dotierung von Zementen	21
1.3.4 Präfabrizierte Zementpasten	22
1.3.5 Zementgranulate	26
1.4 Problemstellung	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Anfertigung der Röntgenbilder	29
2.1.2 Trenn-Dünnschliff Technik	29
2.1.3 Färbungen der histologischen Schnitte	31
2.1.4 Beurteilung und Untersuchung der histologischen Präparate	32
2.1.5 Datenerfassung und Statistische Auswertung	33
2.2 Methoden	33
2.2.1 Herstellung der zu untersuchenden Materialien	33
2.2.2 Haltung und Operation der Versuchstiere	37
2.2.3 Entwässern und Kunststoffinfiltration	40
2.2.4 Kunststoffeinbettung der entwässerten Präparate	41
2.2.5 Trenn- Dünnschliff Technik zur Herstellung histologischer Präparate	42

VERZEICHNISSE

2.2.6	Färbung der Trenn-Dünnschliffe	44
2.2.7	Auswertung der histologischen Präparate	46
2.2.8	Statistik.....	52
3	Ergebnisse	57
3.1	Verlauf der Tierhaltung	57
3.2	Wahl der Färbetechnik	59
3.3	Ergebnisse der Auswertung der Trenn-Dünnschliffe	60
3.3.1	Zementpasten	60
3.3.2	Analyse der Knochenneubildung an den Zementpasten	65
3.3.3	Analyse des Osteoids im Pasten Kontakt	69
3.3.4	Zementgranulate	74
3.3.5	Analyse der Knochenneubildung an den Zementgranulaten.....	79
3.3.6	Analyse des Osteoids im Granulat Kontakt.....	84
3.3.7	Degradationsverhalten der Granulate	87
4	Diskussion.....	93
4.1	Wahl des Tier- und Defektmodells	93
4.2	Angewandte Methoden	96
4.3	In vivo Verhalten der Materialien	99
4.3.1	Degradation.....	99
4.3.2	Neubildung von mineralisiertem Knochen.....	106
5	Zusammenfassung	110
6	Literaturverzeichnis	112
7	Anhang	124
7.1	Gesamtübersicht Implantate	124
7.2	Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	126
7.3	Röntgenbilder der Femora der Versuchstiere	130
7.4	Übersichtsbilder der Trenn-Dünnschliffe	137
7.5	Tabellarische Darstellung der Mess- und Rechenergebnisse pro Trenn-Dünnschliff.....	170
7.6	Ergebnisse der statistischen Auswertung	177
7.6.1	Knochen-Implantat-Kontakt (K-I-K%).....	177
7.6.2	Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%)	179
7.6.3	Umfänge der Granulatpartikel (Granulae).....	180

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Übersicht der untersuchten Zementmaterialien und deren Abkürzungen.....	34
Abbildung 2	intraoperative Aufnahme eines Kaninchenfemurs in situ mit dem in die Trepanationsöffnung eingebrachten Material.....	39
Abbildung 3	Objekträger-Probenverbund ‚Sandwich D‘	43
Abbildung 4	Makrofoto Dünnschliffpräparat	46
Abbildung 5	Gewebedifferenzierung anhand der Masson-Goldner-Trichromfärbung.....	48
Abbildung 6	Beispiel für die Messung des Pasten Umfangs	49
Abbildung 7	Beispiel für die Messung des Granulat Umfangs,.....	50
Abbildung 8	Beispielbild für Teilstreckenmessungen mit eingezeichneten Messstrecken	51
Abbildung 9	postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere mit 6 Wochen Implantat-Liegedauer	58
Abbildung 10	postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere mit 12 Wochen Implantat-Liegedauer.....	58
Abbildung 11	Ergebnisse der unterschiedlichen Färbetechniken	59
Abbildung 12	Histologische Schnitte der Referenzpaste PV nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt.....	61
Abbildung 13	Histologische Schnitte der Paste P25 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt	62
Abbildung 14	Histologische Schnitte der Paste P75 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt	62
Abbildung 15	Röntgenaufnahmen Zementpasten in den Femora direkt nach Explantation.....	64
Abbildung 16	Pasten mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff	66
Abbildung 17	Pasten mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	67
Abbildung 18	Zementpasten – Mittelwerte der KIK%	68
Abbildung 19	Zementpasten-KIK% in den Gruppen PV, P25 und P75	69
Abbildung 20	Pasten mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	71

VERZEICHNISSE

Abbildung 21	Pasten mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	72
Abbildung 22	Zementpasten – Mittelwerte der OST%	73
Abbildung 23	Zementpasten - OST% in den Gruppen PV, P25 und P75	74
Abbildung 24	Histologische Schnitte des Granulats GV nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt.....	76
Abbildung 25	Histologische Schnitte des Granulats G25 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt.....	76
Abbildung 26	Histologische Schnitte des Granulats G75 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt.....	77
Abbildung 27	Röntgenaufnahmen Zementgranulate in den Femora direkt nach Explantation.....	79
Abbildung 28	Radiologischer Materialnachweis.....	80
Abbildung 29	Granulate mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	81
Abbildung 30	Granulate mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	82
Abbildung 31	Zementgranulate – Mittelwerte der KIK %	83
Abbildung 32	Granulate mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	85
Abbildung 33	Granulate mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff.....	86
Abbildung 34	Zementgranulate – Mittelwerte der OST %	87
Abbildung 35	Umfangänderung der Partikel (Granulae) nach 6 und 12 Wochen.....	88
Abbildung 36	Granulate mit 6 Wochen Liegedauer Umfang der Partikel (Granulae) in μm für jeden Trenn-Dünnschliff.....	89
Abbildung 37	Granulate mit 12 Wochen Liegedauer Umfang der Partikel (Granulae) in μm für jeden Trenn-Dünnschliff.....	90
Abbildung 38	Zementgranulate – Mittelwert des Umfangs der Partikel (Granulae) in μm	91
Abbildung 39	Zementgranulate - Umfang der Partikel (Granulae) in den Gruppen GV, G25 und G75.....	92

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Einteilung der Knochersatzmaterialien nach Herkunft	4
Tabelle 2	Zusammensetzung, Gewinnung und Löslichkeitsprodukte verschiedener Calciumorthophosphate [38, 69]	15
Tabelle 3	Zusammensetzung und Löslichkeitsprodukte verschiedener Magnesiumphosphate [96].....	18
Tabelle 4	Bestandteile der Zement-Rohpulver	35
Tabelle 5	Zusammensetzung und Applikationsform der untersuchten Zementmaterialien	37
Tabelle 6	Implantationsschema	38
Tabelle 7	Protokoll der Entwässerung und anschließenden Kunststoffinfiltration der Gewebeproben	41
Tabelle 8	Mischungsverhältnis Technovit 4000	42
Tabelle 9	Masson-Goldner-Trichrom Färbung (MGT) – Herstellung der Färbelösung	45
Tabelle 10	Untersuchungsgruppen	53
Tabelle 11	Übersicht der gewählten statistischen Tests zur knöchernen Regeneration	54
Tabelle 12	Übersicht der gewählten statistischen Tests zur Degradation:	56
Tabelle 13	Zusammenfassung zitierter in vivo Studien zum Resorptionsverhalten von Knochenzementen	102

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ca	Calcium
CaP	Calciumphosphat
cf.	confer, vergleiche
CMPC	Calciummagnesiumphosphatzement
CPC	Calciumphosphatzement
CSD	Critical Size Defekt
DCPD	Brushit, Calciumhydrogenphosphat Dihydrat
dest.	destilliert
DKK	Doppelkammer-Kartuschensystem
FMZ	Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg
G25	niedrig Ca-dotiertes Granulat $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$
G75	hoch Ca-dotiertes Granulat $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$
GV	Referenzgranulat (Calciumphosphatzement)
HA	Hydroxylapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
KEM	Knochenersatzmaterial
Mg	Magnesium
MgP	Magnesiumphosphat
MGT	Masson-Goldner-Trichrom-Färbung
MPa	Megapascal
MPC	Magnesiumphosphatzement
MV	Materialvaration

VERZEICHNISSE

Mw	Mittelwert
P25	niedrig Ca-dotierte Paste, $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$
P75	hoch Ca-dotierte Paste, $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$
PLR	Pulver-Flüssigkeits Verhältnis (powder-liquid ratio)
PV	Referenzpaste (Calciumphosphatzement)
Sv	Struvit
TCP	Tricalciumphosphat
TDS	Trenn-Dünnschliff
UG	Untersuchungsgruppe

1 EINLEITUNG

Der Knochen ist eines der außergewöhnlichsten Gewebe im menschlichen Körper [1]. Neben seiner Funktion als Stütze dient er dem Schutz der inneren Organe, als wichtigstes Depot für Calcium und Phosphat und als Ort der Bildung neuer Zellen im roten Knochenmark. Er erfüllt damit nicht nur die verschiedensten lebenswichtigen Aufgaben, sondern ist auch eines der wenigen Gewebe, die in der Lage sind, vollständig, im Sinne einer Regeneration, zu heilen. Im Fall der Haut kommt es beispielsweise zu einer Defektheilung mit Bildung von Narbengewebe, ergo einer Reparatur. Der Knochen hingegen wird, nach einer Phase des Auf- und Umbaus durch spezialisierte Zellen (Osteoblasten und Osteoklasten), in seiner vorherigen strukturellen Integrität und Funktion wiederhergestellt. Man spricht von der ‚Restitutio ad integrum‘ [2]. Diese Eigenschaft sorgt dafür, dass Knochenbrüche und -defekte heilen. Außerdem ermöglicht sie dem Knochen sich, gemäß dem Wolff-Transformationsgesetz [3], ständig an geänderte Anforderungen und Belastungen anzupassen. Der Knochen unterliegt einem ständigen Erneuerungsprozess, einem Zusammenspiel aus Knochenaufbau und -abbau, ‚Bone Remodeling‘ genannt [4].

Der Mensch lernte früh diese spezielle Fähigkeit des Knochens zu unterstützen, z.B. durch Schienung von Knochenbrüchen. Die damit verbundene Ruhigstellung ermöglicht eine primäre und damit schnelle Heilung. Diese körpereigenen Regenerationskräfte reichen jedoch unter Umständen nicht, um einen Defekt schnell genug und unter Ausbildung von ausreichend und mechanisch stabilem Ersatzknochen zu füllen [5]. In einem solchen Fall spricht man von einem ‚critical size defect‘ (CSD), einem Defekt also, den der Körper aus eigener Kraft nicht spontan und vollständig knöchern schließen kann [6-8]. Ab welcher Größe ein Defekt als kritisch angesehen werden muss, hängt von Geschlecht, Alter, anatomischer Lage, Form, Defektumgebung und Spezies ab [9]. Unabhängig davon, ob der Volumenverlust unfalls-, alters- oder krankheitsbedingt ist, birgt die dadurch entstehende insuffiziente Überbrückung zahlreiche Probleme. Frakturen,

Wundinfektionen, Nekrosen des Knochens oder der Verlust von inserierten Implantaten können die Folge sein [10]. Daher waren und sind knöcherne Defekte und deren Versorgung seit jeher ein wichtiges Problemfeld der Chirurgie und medizinischen Forschung.

1.1 Aufgaben von Knochenersatzmaterial

Im Laufe der Geschichte wurden zahlreiche Versuche unternommen, ein geeignetes Ersatzmaterial für Knochen zu finden [11, 12]. All diesen Ansätzen ist die Grundidee gemein, dass in den Knochen eingebrachte Materialien dessen Heilung ermöglichen bzw. beschleunigen sollen. Material, das zum Verschluss knöcherner Defekte, ergo zum Ersatz von Knochen zum Einsatz kommt, wird als Knochenersatzmaterial (KEM) bezeichnet.

KEM sorgen nicht nur für mechanische Stabilität, sondern dienen als Stütze für andere eingebrachte Materialien (z.B. Kollagenmembranen) sowie das umliegende Gewebe (Periost). Als Platzhalter für die Knochenneubildung schützt es vor dem Einwachsen von Bindegewebe. Darüber hinaus kann es als Träger für Wachstumsfaktoren oder Antibiotika dienen [13-15]. Das ideale KEM würde noch eine Vielzahl weiterer Eigenschaften in sich vereinen. Theoretisch lassen sich folgende Hauptmerkmale eines solchen idealen KEM formulieren [5, 16, 17]. Es sollte resorbierbar sein und vollständig knöchern ein- und umgebaut werden sowie osteoinduktiv, osteokonduktiv und osteogen wirken. Bei Osteoinduktion handelt es sich um die Fähigkeit eines Materials, die Knochenneubildung anzuregen, indem es Zellen zur Differenzierung zu Osteoblasten (knochenbildenden Zellen) stimuliert. Dadurch kann auch dort Knochen entstehen, wo ursprünglich keiner vorhanden war. Osteokonduktiv ist ein Material dagegen, wenn es als Gerüst und Leitschiene für das Einwachsen von Gefäßen und neuem Knochen, ausgehend von bestehendem vitalen Hartgewebe, dient. Osteogenese bezeichnet die Fähigkeit zur eigenständigen Produktion von Knochensubstanz [18]. Im Idealfall passt sich das KEM auch komplizierten Defektstrukturen durch seine Formbarkeit oder Injizierbarkeit an und füllt sie vollständig aus. Der Knochen weist, aufgrund seines besonderen Aufbaus aus

einer Kombination aus Mineralien und Kollagen, eine hohe Festigkeit auf, durchschnittlich 130- 190 MPa für Kortikalis und 3,6- 9,3 MPa für Spongiosa [19]. Daher müssen die mechanischen Eigenschaften eines KEM stets in Abhängigkeit zur geplanten Anwendung beurteilt werden. Im Defekt muss, angepasst an die jeweiligen Erfordernisse, eine ausreichende, im besten Fall knochenähnliche mechanische Stabilität bis zur vollständigen Regeneration des Knochens gegeben sein. Außerdem sollte das KEM eine Barrierefunktion übernehmen, um das Einwachsen von Bindegewebe oder Muskelgewebe in den Defekt zu verhindern [5]. Weitere Voraussetzungen, die ein ideales KEM erfüllen muss, sind das Fehlen von Toxizität, Teratogenität, Kanzerogenität und immunologischer Angriffsfläche. Abgesehen von diesen biologischen Anforderungen muss ein ideales KEM auch klinischen Anforderungen wie Sterilisierbarkeit, problemloser Lagerung und geringen Kosten gerecht werden. Außerdem sollte es uneingeschränkt zur Verfügung stehen, um Versorgungsengpässe zu vermeiden. Um dem Operateur ein möglichst zügiges intraoperatives Arbeiten zu ermöglichen, muss eine einfache Ver- und Bearbeitung gegeben sein. Die modernen KEM kommen diesen Anforderungen immer näher, jedoch gibt es bisher kein Material, das alle diese Eigenschaften auf sich vereint [20].

1.2 Einteilung und Eigenschaften moderner Knochenersatzmaterialien

Die modernen, heute genutzten KEM werden meistens nach ihrer Herkunft eingeteilt, ergo in autologe, allogene, xenogene und, als neu hinzugekommen Gruppe, alloplastische Materialien [21, 22]. (cf. Tabelle 1)

EINLEITUNG

Tabelle 1 Einteilung der Knochersatzmaterialien nach Herkunft

Ursprung	Bezeichnung	Definition
Human	autogen, autolog	Verpflanzung von Knochen innerhalb desselben Individuums (Spender ist identisch mit Empfänger, Behandlung des Patienten mit eigenem Knochen)
	allogen, homolog	Verpflanzung zwischen Individuen derselben Spezies (menschlicher Spender, Knochen aus Knochenbank)
Tierisch	xenogen, heterolog	Verpflanzung zwischen Individuen verschiedener Spezies (tierischer Spender z.B. Pferd oder Rind)
Synthetisch	alloplastisch	synthetisch hergestelltes Material

Des Weiteren unterscheidet man resorbierbares von nicht resorbierbarem Material. Unterschieden werden kann auch nach biologischer Wertigkeit, also nach der jeweiligen osteokonduktiven, - induktiven und -genen Aktivität [23].

1.2.1 Autologer Knochenersatz

Definiert als Knochen, der in einem Körpergebiet (Spenderregion) entnommen und an anderer Stelle (Empfängerregion oder Implantatlager) wiedereingesetzt wurde [23]. Folgerichtig wäre es im Falle autologen Knochens korrekt nicht von Knochenersatzmaterial sondern Knochentransplantaten zu sprechen [23, 24]. Die Vorteile dieses Vorgehens liegen auf der Hand. Alles Material und damit alle darauf befindlichen Zellen sind dem Patienten selbst zugehörig. Das Risiko einer immunologischen Reaktion oder Infektion ist dadurch minimiert. Außerdem besitzt das Transplantat durch die Überführung lebender Zellen nicht nur osteoinduktive und osteokonduktive, sondern auch osteogene Potenz [25]. Je nachdem wo der entnommene Knochen zur Anwendung kommen soll und je nach Defektgröße kommen als Spenderregion unterschiedliche Teile des Skelettes in Betracht, wie z.B. Rippen, Tibia, Fibula, Radius, Humerus und Femur. Das ergiebigste Knochenlager stellt der Beckenkamm dar. Eine Entnahme ist dort in Form von kortikalen, spongiösen und gestielten Knochentransplantaten möglich. Letztere werden mit zuführenden Gefäßen entnommen und am Bestimmungsort wieder anastomosiert (i.e. an das

Gefäßsystem angeschlossen). Das Transplantat ist damit optimal versorgt. Ein Einheilen selbst bei sehr großen Defekten (>4 cm) und in schlechtem Implantatlagern wird dadurch ermöglicht. Deshalb kommt diese Technik beispielweise bei Unterkieferrekonstruktionen nach Tumorresektion oder Radiatio zum Einsatz [26]. Bei allen Vorteilen haben autologe Transplantate entscheidende Nachteile. Vor allem die Notwendigkeit einer zusätzlichen Operation in der Entnahmeregion birgt mögliche Komplikationen wie Wundinfektionen und bedeutet eine nicht zu unterschätzende Mehrbelastung für den Patienten [27, 28]. Bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand, hohem Alter, Kindern und Schwerverletzten, ist ein solcher Zweiteingriff nicht immer möglich. Außerdem sind Menge, Größe und Form des Transplantates nicht frei wählbar und limitiert [25].

1.2.2 Allogener Knochenersatz

Allogene KEM sind humane Knochenanteile, welche Spendern entnommen und, nach Aufbereitung und Lagerung des Materials, Empfängern eingesetzt werden. Der Vorteil gegenüber dem autologen KEM besteht daher in ihrer Verfügbarkeit, vor allem seit sie bis zu ihrer Verwendung gelagert werden können (Knochenbanking). Nachteilig steht dem eine mögliche Infektionsgefahr und immunologische Reaktion durch die Gewebeübertragung sowie der daraus entstehenden Notwendigkeit einer Aufreinigung des Materials gegenüber [29]. Heute werden meistens Gammasterilisation, Autoklavierungs- und Thermodesinfektionstechniken angewendet. Außerdem wird das Material durch die Aufbereitung in seiner osteogenen Potenz geschwächt. Das äußert sich in einer reduzierten mechanischen Belastbarkeit sowie der Denaturierung von osteoinduktiven Proteinen. Allogener Knochenersatz wirkt daher weitgehend osteokonduktiv [29].

1.2.3 Xenogener Knochenersatz

Bei Xenogenem KEM handelt es sich meist um Knochen von Pferden (equin), Schweinen (porcin) oder Rindern (bovin). Durch die Vielzahl von möglichen

Quellen ergibt sich eine breite Verfügbarkeit. So lassen sich sogar Korallen als Basis für KEM einsetzen [30, 31]. Das gesamte organische Material der Korallen wird dabei extrahiert und das Calciumcarbonat Exoskelett entweder in eine kristalline Hydroxylapatit-Replik überführt, und so die Mikroarchitektur erhalten, oder aber mit Calciumphosphat zu einem Komposit verarbeitet [32]. Da bei xenogenem KEM immer Gewebe vom Tier auf den Menschen übertragen wird, lassen sich Immunreaktionen und die Gefahr von Krankheitsübertragung nicht ausschließen [33]. Bei modernen xenogenen KEM werden daher zelluläre und antigene Bestandteile entfernt, während die mineralisierte Grundsubstanz (Hydroxylapatit) erhalten bleibt. Die Effizienz dieser Aufreinigung durch Thermodesinfektion wird vor allem in Bezug auf das Übertragungsrisiko von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) kontrovers diskutiert. Während Wenz et al. 2001 zum Ergebnis kommen, dass von bovinem Material (in diesem Fall dem Präparat ‚Bio-Oss‘) keine Gefahr ausgeht, lassen neuere Studien darauf schließen, dass es eine Gefahr von Prionen-Übertragung gibt [34]. So sprechen Kim et al. in ihrer Studie von 2013 noch von Hinweisen auf mögliche Übertragung, raten 2016 bereits von der weiteren Verwendung von bovinem Knochen ab. Sie führten die lange Latenzzeit der Erkrankung sowie das Fehlen eines verlässlichen Screenings nach Prionen als Argumente an [35]. Da bovines Material gerade in der dentalen Chirurgie häufig für die Augmentation von Kieferkammern eingesetzt wird, hat diese Entdeckung durchaus klinische Relevanz. Ein weiterer Nachteil von xenogenem Material ist, dass es durch die Zerstörung von osteogenen Proteinen während der Aufbereitung rein osteokonduktiv wirkt.

1.2.4 Alloplastischer Knochenersatz

Durch die allgemein erhöhte Lebenserwartung und die damit verbundenen medizinischen Probleme sowie den Fortschritten im Gebiet der Chirurgie besteht ein ständig wachsender Bedarf an KEM. Angesichts der angesprochenen Nachteile der bisher genannten KEM leuchtet die Attraktivität alloplastischer, also synthetischer KEM ein. Durch die synthetische Herstellung können sterile und damit nicht infektiöse Materialien in theoretisch unbegrenzter Menge hergestellt

werden. Die Materialeigenschaften sind über die Zusammensetzung steuer- und veränderbar. Dadurch sind nicht nur die biologischen Reaktionen in vivo besser abschätzbar, sondern auch die Qualität gleichmäßiger [21]. Dies führte zur Entwicklung einer Vielzahl von alloplastischen KEM, welche sich in ihrer Zusammensetzung, ihren Eigenschaften und ihren möglichen Anwendungsbereichen unterscheiden. Für mechanisch stark belastete Gebiete, wie etwa den Bewegungsapparat, werden vor allem Metalle (Titanium, Nickel-Titanium-Legierungen, CoCr-Legierungen oder Magnesium-Legierungen) genutzt [36]. Des Weiteren werden Polymere (nicht-degradierbare¹ Polymethylmethacrylate und degradierbare Polylaktide/Polyglykoxide) eingesetzt [23]. In funktionell weniger belasteten Bereichen, wie etwa dem Schädel, ist die Nutzung von Materialien mit geringerer mechanischer Stärke, aber dafür vorteilhafterem in vivo Verhalten möglich, wie etwa Biogläsern [37], Keramiken (Tricalciumphosphat, Hydroxylapatit, Glasionomere) [38] und Zementen [39]. Außerdem gibt es die Möglichkeit verschiedene alloplastische Materialien zu Kompositen zu kombinieren. Ein Beispiel dafür ist die Kombination von 2-Hydroxyethylmethacrylat (2-HEMA) und CPC (alpha-Tricalciumphosphat) zu einem dual-härtenden Zement (Polymer-Keramik-Komposit) [40].

In vivo Verhalten alloplastischer Knochenersatzmaterialien

Alloplastische KEM unterscheiden sich nicht nur durch ihre möglichen Anwendungsbereiche, sondern auch in Bezug auf die biologische Reaktion am Anwendungsort. Materialien können generell in biotoxisch, bioinert/biokompatibel, bioaktiv und bioresorbierbar unterteilt werden [38, 41, 42]. Biotoxische Materialien sind als KEM nicht geeignet. Sie verursachen entweder direkt Zell- und Gewebeschäden oder rufen eine Immunantwort hervor, die zu Sensibilisierung, Entzündung und pathologischen Gewebsveränderungen führt. Bioinerte Materialien hingegen rufen wenig oder keine Reaktionen des lebenden Gewebes hervor, sind also verträglich. Allerdings geben sie dem Organismus kaum Möglichkeit zur Interaktion. Sie werden weder ein- noch abgebaut. An der

¹ ‚degradierbar‘ bezieht sich hier auf die Abbaubarkeit des Materials in vivo

EINLEITUNG

Grenzfläche entsteht Narbengewebe, welches das Material vom Körper abschottet [42]. Im Gegensatz dazu hat die Verwendung von bioaktiven Materialien gänzlich andere Ansätze. Bioaktiv ist ein Material dann, wenn es vom Körper nicht nur akzeptiert wird, sondern eine geeignete Reaktion auf Zell- und Gewebeebe hervorrufft und dadurch eine lebende, direkte Verbindung zum Gewebe schafft. Im Falle von KEM bedeutet dies eine vermehrte Differenzierung von unreifen Zellen in Richtung Knochenzellen (Osteoblasten). Es kommt nicht zur Ausbildung einer bindegewebigen Kapsel, sondern zum Anhaften der Zellen und Ablagerung des neu gebildeten Knochens direkt an der Materialoberfläche. Durch die Interaktion mit dem umgebenden Gewebe entsteht eine direkte knöcherne Bindung zwischen Material und Knochen (z.B. Calciumphosphat Zement) [20].

Bioresorbierbares/ biodegradierbares Material wird vom Körper nicht nur akzeptiert, sondern abgebaut. Die entstehenden Abbauprodukte werden in die Stoffwechselforgänge mit einbezogen und für den Gewebeersatz genutzt. Das Material verschwindet also mit der Zeit vom Implantationsort. Das ist insofern von Bedeutung, da so ein Zweiteingriff zur Entfernung entfällt. Bei nicht resorbierbarem Material (z.B. Metallen) sind solche Zweiteingriffe mitunter nötig, um mögliche Langzeitfolgen, wie die Gefahr einer Sensibilisierung, zu umgehen [17]. Ein Beispiel für ein solches abbaubares, bereits klinisch genutztes Material sind Polyester wie Poly(lactid-co-glycolid) (PLGA). Sie werden dort eingesetzt, wo zeitlich begrenzte Aufgaben übernommen werden müssen. Beispiele sind Schrauben zur Fixierung, Netze, Fäden und Gerüste für ‚drug-delivery‘, also das Einbringen von Medikamenten. PLGA wird vom Körper abgebaut, wobei die Abbaugeschwindigkeit über die Anteile von Polyglycolid und Polylactid variiert werden kann. Allerdings senken die beim Abbau frei werdenden Säuren den pH-Wert im umgebenden Gewebe, wodurch es zu Immun- und Fremdkörperreaktionen kommen kann [43, 44].

Für die Geschwindigkeit, mit der KEM vom Körper resorbiert wird, gibt es keinen allgemeingültigen, idealen Wert, da die erwünschte Resorptionsrate immer auch von anderen Faktoren, wie der Lage und Art des Defekts, abhängt [45].

Optimalerweise sollte das KEM durch reifen Knochen ersetzt werden ohne dass es zum vorübergehenden Verlust der mechanischen Stabilität kommt. Die Resorption muss also in der gleichen Geschwindigkeit erfolgen, in der neuer Knochen an- oder aufgebaut wird [16]. Nur so ist eine ausreichende mechanische Stabilität während des gesamten Heilungsprozesses gegeben. Resorbierbare, mechanisch zu instabile KEM werden daher momentan meist in Kombination mit lasttragenden, metall-basierten Fixierungen eingesetzt [46].

Es gibt verschiedene Faktoren, die Einfluss auf die Schnelligkeit der Resorptionsvorgänge nehmen. Dazu gehören physikalisch-chemische Materialeigenschaften sowie die Implantationsumgebung (pH-Wert, Ionenkonzentration, genauer Ort der Implantation und der Gesundheitszustand des Patienten) [47]. Die chemische Zusammensetzung des KEM beeinflusst maßgeblich die Resorption. Der Abbau erfolgt entweder passiv (nicht zellvermittelt) durch chemische Prozesse oder aktiv (zellvermittelt) durch Osteoklasten [48]. Ein passiver Abbau durch einfaches chemisches Lösen tritt auf, wenn die Löslichkeit des Materials um ein Vielfaches höher ist als die entsprechenden Ionenkonzentrationen in der umgebenden Körperflüssigkeit [48, 49]. Ein aktiver Abbau ist durch Osteoklasten, bzw. Makrophagen (bei Partikeln $<10\ \mu\text{m}$), gegeben. Die von Osteoklasten erzeugte lokale saure Umgebung führt bei knochenähnlichen KEM zu einer erhöhten Löslichkeit. Die Schnelligkeit dieses zellulären Abbaus wird durch die osteoklastäre Aktivität an der Grenzfläche zwischen Material und umgebendem Knochen begrenzt [48, 50].

Neben den physikochemischen/mineralogischen Eigenschaften spielen vor allem dreidimensionale strukturelle Aspekte eine entscheidende Rolle für das Verhalten eines Materials in vivo [51]. Das Vorhandensein von Poren, also die Porosität, beeinflusst die Resorptionsrate und Materialintegration [52]. Interkonnektierende Poren mit Größen zwischen $200\ \mu\text{m}$ und $400\ \mu\text{m}$ ermöglichen nicht nur Zelladhäsion und Mobilität, sondern auch eine suffiziente Neovaskularisation und damit Osteokonduktion [53, 54]. Poren sind essenziell für den Transport von Nährstoffen und damit für die optimale Versorgung des Gewebes. Sie dienen als Leitschiene für die Zellmigration und

Gewebeeinsprossung. Materialien mit höherer Porosität werden daher schneller abgebaut [55]. Allerdings hat eine Erhöhung der Porosität negativen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften, wodurch eine obere funktionelle Grenze für Porengröße und Porosität festgelegt ist [56]. Durch Reduktion der Poren ein kompakteres und damit stabileres Material zu erhalten, würde wiederum das biologische Verhalten negativ beeinflussen [57]. Die für die jeweilige Anwendung benötigten Eigenschaften müssen also immer in Hinblick auf eine Balance zwischen Porosität und nötiger Festigkeit gewählt werden.

1.3 Zemente

Zementsysteme finden Anwendung in den unterschiedlichsten medizinischen Bereichen, wobei sie sich in ihrer Zusammensetzung und ihren Eigenschaften unterscheiden. So werden beispielsweise Zinkphosphatzement und Glasionomorzement (GIZ) in der Zahnmedizin als Füllungsmaterial und zum Befestigen von Restaurationen genutzt [58, 59]. In der Endodontie kommen Zinkoxid-Eugenol-Zemente und Mineral-Trioxid-Aggregat (Portland Zement, MTA) als Füllung für Wurzelkanäle zum Einsatz [60]. Als alloplastisches KEM finden Zementsysteme auf Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) für lasttragende Defekte Verwendung. Sie werden beispielsweise im Rahmen von minimalinvasiven Verfahren zur Behandlung von Wirbelkörperkompressionsfrakturen (perkutane Vertebroplastie, Kyphoplastie) eingesetzt [61, 62]. PMMA Zemente sind durch eine radikal-initiierte Polymerisationsreaktion selbsthärtend. Allerdings handelt es sich dabei um eine exotherme Reaktion mit hohen, gewebeunverträglichen Temperaturspitzen bis zu 100 °C, wodurch die Gefahr von Gewebenekrosen besteht. Außerdem sind eventuell zurückbleibende Rückstände von Methylmethacrylat-Monomer toxisch [63]. Dadurch, dass PMMA-Zemente nicht resorbierbar oder bioaktiv sind, kommt es außerdem nicht zum direkten Verbund mit dem Knochen [64].

Im Gegensatz dazu werden mineralische Knochenzemente, wie Calciumphosphatzemente (CPC) [52] oder Magnesiumphosphatzemente (MPC) [65], vom Körper ab- und in neuen Knochen umgebaut. Sie bestehen aus einem

Pulver und einer Flüssigkeit, welche vermischt werden und eine Paste formen. Die so entstandene Paste kann direkt in den Knochendefekt eingebracht werden und härtet durch ihre hydraulische Aktivität vor Ort in vivo aus. Diese Zemente sind leicht zu verarbeiten, teilweise resorbierbar, gewebeverträglich und bioaktiv. Damit haben sie gegenüber anderen KEM entscheidende Vorteile, sie müssen nicht wie Metall entfernt werden, sie sind verträglicher als resorbierbare Kunststoffe und können im Gegensatz zu Keramikblöcken auch unregelmäßig geformte Knochenhöhlen auffüllen [66]. Außerdem wächst der Knochen in direktem Kontakt zur Materialoberfläche [20]. Mineralische Zemente wie CPC kommen, aufgrund ihrer geringen Festigkeit, bei semi- und nicht-lasttragenden Defekten am Schädel zum Einsatz [67].

1.3.1 Zementeigenschaften

Die Eigenschaften eines Zements sowie sein Verhalten in vivo hängen zu einem großen Teil von bestimmten Parametern ab. Dazu gehören die Zusammensetzung, Injizierbarkeit, das Pulver-Flüssigkeit Verhältnis und die Abbindezeit, die Porosität sowie die mechanische Festigkeit des Zements. Die verschiedenen Zementeigenschaften stehen dabei zueinander in Beziehung. Verändert man eine Eigenschaft so beeinflusst dies, unter Umständen unerwünscht, auch andere Eigenschaften des Materials.

Die Porosität kann durch unterschiedliche Methoden beeinflusst, also verringert oder erhöht, werden. Beides wirkt sich auf verschiedene Eigenschaften hinsichtlich Mechanik oder Biologie aus. Erhöht man die Porosität, so wird die Resorption des Materials durch die höhere Oberfläche zwar beschleunigt, allerdings nimmt die mechanische Belastbarkeit unter Umständen zu stark ab. Eine geringe Porosität hingegen führt zwar zu höheren Festigkeiten jedoch auch zu einem langsameren Ab- und Umbau. Eine Möglichkeit, die Porosität von Zementen zu beeinflussen, ist das Einbringen von Stoffen (Partikeln, Öl-Tröpfchen, Luftbläschen, polymeren Platzhaltern oder Fasern). Diese hinterlassen, wenn sie sich beim Abbinden auflösen, diffundieren, beim Sintern ausbrennen oder in vivo abgebaut werden, ein Porengerüst [68-70]. Das

EINLEITUNG

Einbringen solcher Zusätze beeinflusst jedoch nicht nur die Porosität, sondern auch andere Zementeigenschaften wie das Abbindeverhalten, die Injizierbarkeit sowie die mechanische Eigenschaften [71].

Ein weiteres Beispiel für das Zusammenspiel der verschiedenen Zementeigenschaften ist der Einfluss des Pulver-Flüssigkeit Verhältnisses [g/ml] (PLR). In der flüssigen Phase kommt es zum Lösen des Pulvers und anschließend zum Ausfällen des Produkts. Außerdem fördert die flüssige Phase die Bildung einer verarbeitbaren oder sogar injizierbaren Paste. Eine hohe PLR führt zu einer verringerten Abbindezeit [72]. Nicht umgesetzte Flüssigkeit führt zu einer höheren Porosität, aber auch zu einer geringeren mechanischen Stärke.

Auch die Geschwindigkeit, mit der die Abbindereaktion von statten geht, ist entscheidend. Beim Abbinden des Zements muss zwischen initialer Verfestigung (initiale Abbindezeit) und der folgenden Durchhärtung (finale Abbindezeit) unterschieden werden, wobei letztere zur Erlangung der Endfestigkeit führt [73]. Der Zement sollte vor der initialen Abbindezeit in den Defekt appliziert werden, der Wundverschluss erst nach Ablauf der finalen Abbindezeit erfolgen [73]. Beide werden üblicherweise experimentell durch den Gilmore Nadeltest unter Verwendung unterschiedlicher Nadeldurchmesser und Gewichte bestimmt [74, 75]. Die Probe gilt als ausgehärtet, wenn die Gilmore Nadel bei Kontakt keinen Abdruck mehr hinterlässt. Die Verfestigung sollte schnell genug erreicht sein, um eine möglichst hohe primäre Festigkeit und einen schnellen Wundverschluss zu ermöglichen, jedoch gleichzeitig nicht zu schnell, um das notwendige intraoperative Handling zu garantieren. Die Zeit, welche der Chirurg zum Anmischen und Applizieren des Zementes hat, wird Kohäsionszeit genannt und sollte 2 min nicht unterschreiten [52]. Als klinisch zeitlich relevanter Zeitrahmen für die initiale Abbindezeit werden in der Literatur Zeiten um 5-15 min [76], für die finale Abbindezeit 15 min beschrieben [49, 77]. Es ist möglich, die Abbindezeit durch verschiedene Faktoren zu beeinflussen. Beispielsweise führt eine Verkleinerung der Pulverpartikelgröße und Flüssigkeitsmenge zu einer kürzeren Abbindezeit [71], während Reaktionsverzögerer die Abbindezeit verlängern [78].

Kann eine Zementpaste durch eine Injektionsnadel entweder mit der Hand oder einer Kraft von 100 N gedrückt werden, ohne sich zu ‚entmischen‘, so gilt sie als injizierbar [52]. Diese Injizierbarkeit stellt einen entscheidenden Vorteil dar, da so auch sehr unregelmäßig geformte Defekte mit einer schmalen Kanüle mit Zementpaste aufgefüllt werden können und dadurch ein minimal-invasives chirurgisches Vorgehen ermöglicht wird [66]. Da auf einen großflächigen Zugang verzichtet werden kann, entstehen kürzere Krankenhausaufenthalte, geringere Schmerzen und ein vermindertes Risiko einer postoperativen Infektion für den Patienten. Auch der Arbeitsablauf für den Operateur wird erleichtert [55]. Die Viskosität, das Pulver-Flüssigkeitsverhältnis und die Zeit, welche für das Anmischen verbraucht wurde, beeinflussen die Injizierbarkeit der Zementpaste. Die rheologischen Eigenschaften des Zements spielen dabei eine entscheidende Rolle. Sie werden maßgeblich durch die Partikelgröße des Pulvers (je kleiner desto besser injizierbar), dem Verhältnis von Pulver zu Flüssigkeit (je mehr Flüssigkeit desto besser injizierbar) und der Oberflächenladung der Partikel in Kontakt mit der flüssigen Phase beeinflusst [79]. Ist der Zement zu viskös, kommt es durch den vergrößerten Druck bei der Applikation zur Entmischung: Die feste Phase (d.h. das Pulver) bleibt in der Spritze zurück, während die flüssige Komponente herausgedrückt wird, man spricht auch von ‚filter pressing‘ oder Phasentrennung. Eine Möglichkeit, das filter-pressing zu verhindern, ist die Beeinflussung der Partikelladung (Zeta-Potential) durch Zugabe von Milchsäure oder Zitronensäure. Dies führt zu einer gegenseitigen Abstoßung der Partikel und so zu einer Verflüssigung der Paste bei gleichem PLR. Eine andere wirksame Methode, um dem filter-pressing entgegenzuwirken, ist das Einarbeiten von Geliermitteln oder viskosen Medien, was auch weitere Vorteile mit sich bringt. Da die Zemente in der wässrigen Umgebung eines Knochendefekts aushärten, müssen sie eine ausreichende Kohäsion aufweisen. Sie dürfen also nicht bei Kontakt mit Körperflüssigkeiten desintegrieren, sondern sollten während des Abbindevorgangs in einem Stück verbleiben (‚anti-washout‘) [63, 71]. Die Kohäsion kann durch Zugabe von Geliermitteln oder viskosen Medien ebenfalls verbessert werden [80, 81]. Die Auswahl ist jedoch aufgrund teils mangelnder Biokompatibilität begrenzt, außerdem können das Abbindeverhalten und die

mechanischen Eigenschaften negativ beeinflusst werden [55]. In Nutzung befindliche Additive sind beispielsweise Glycerinphosphat, Chitosan, Alginat, Cellulose, Glycerin und Xanthan [63].

1.3.2 Beispiele für Knochenzemente

Calciumphosphat Zemente (CPC)

Calciumphosphat-basierte Materialien werden bereits in großem Umfang für Knochenregeneration verwendet. Aufgrund ihrer Biokompatibilität, ausgezeichneten Osteokonduktivität, guten Verarbeitbarkeit und selbsthärtenden Eigenschaften konnten sich Calciumphosphat-basierte Zemente als Material für viele Anwendungen etablieren [82]. Die am häufigsten als KEM eingesetzten Calciumphosphate enthalten eine Orthophosphatgruppe PO_4^{3-} , sind also Calciumorthophosphate (CaP) (cf. Tabelle 2). Diese können synthetisch durch einen Sinterprozess („high-temperature“ Verfahren) oder das Ausfällen aus einer wässrigen Lösung bei Raumtemperatur („low-temperature“ Verfahren) gewonnen werden [69, 83].

Calciumphosphat-Zemente bestehen aus ein- oder mehrkomponentigen Pulvermischungen verschiedener Calciumorthophosphate, die durch Einmischen einer wässrigen Lösung eine formbare Paste bilden [83]. Ein entscheidender Vorteil von Calciumphosphat Zementen ist ihre knochenähnliche Zusammensetzung. Menschlicher Knochen besteht zu 30 % aus organischem und zu 70% aus anorganischem Material, wobei das Calciumorthophosphat Hydroxylapatit (HA) den Hauptteil einnimmt [84],[85]. Im Gegensatz zu stöchiometrischem HA weist das physiologische HA ein Ca/P Verhältnis von 1,5-1,67 auf (Calcium-defizitärer HA), was sich auf die Einlagerung von Fremdionen in das Kristallgitter zurückführen lässt [85]. Hydroxylapatit kann als KEM in Form von Blöcken, Granulaten, Partikelsuspensionen und eben als Zementkomponente genutzt werden.

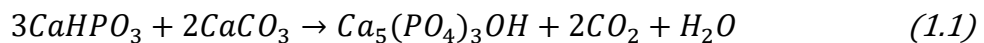
EINLEITUNG

Tabelle 2 Zusammensetzung, Gewinnung und Löslichkeitsprodukte verschiedener Calciumorthophosphate [38, 69]

Die Abkürzungen in den Klammern beziehen sich auf die englischen Trivialnamen (Löslichkeit bei 25 °C).

Calciumphosphat	Summenformel	Löslichkeit -log(K _s)	Löslichkeit [g/l]	Ca/P- Verhältnis
Gewinnung durch Ausfällen aus einer wässrigen Lösung bei Raumtemperatur (low-temperature Verfahren)				
Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Brushit, DCPD)	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	6,59	~0,088	1
Calciumhydrogenphosphat (Monetit, DCPA)	CaHPO ₄	6,90	~0,048	1
Calcium-defizitärer Hydroxylapatit (pHA)	Ca _{10-x} (HPO ₄) _x (PO ₄) _{6-x} (OH) _{2-x} < x < 1)	~85	~0,0094	1,5-1,67
Synthetische Gewinnung durch Sinterprozess (high-temperature Verfahren)				
α-Tricalciumphosphat (α- TCP)	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	25,5	~0,0025	1,5
β-Tricalciumphosphat (β- TCP)	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	28,9	~0,0005	1,5
Hydroxyapatit (HA)	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	116,8	~0,0003	1,67
Tetracalciumphosphat (TTCP)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	38–44	~0,0007	2

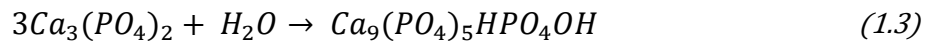
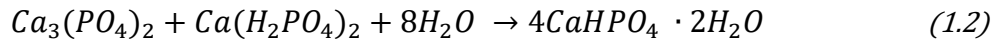
HA kann entweder xenogen hergestellt oder durch Ausfällen aus einer Lösung oder bei Zementabbindevorgängen synthetisiert werden [86]. Eine andere Möglichkeit ist die Sinterung von gefällten Pulvern aus Calciumhydrogenphosphat und Calciumkarbonat bei Temperaturen von 1100-1300 °C (1.1) [21].



CPC Zemente setzen sich aus einem Pulver und einer Flüssigkeit zusammen, welche vermischt werden und so eine formbare Paste bilden, die anschließend mit einer Spritze oder der Hand appliziert werden kann. Abhängig von der Wahl des CaP-Systems kann es sich bei der Flüssigkeit um Wasser, wässrige Zitronensäure oder aber auch eine wässrige Na₂HPO₄ Lösung handeln [87]. In den Knochendefekt eingebracht, kommt es durch Hydratisierungsreaktionen zum Auflösen des Pulvers, der Entstehung einer übersättigten Lösung und, nach Keimbildung, zum Ausfallen von HA-Kristallen und zum Aushärten des Materials

EINLEITUNG

in vivo. Abhängig von der Zusammensetzung und dem pH-Wert der Zementpaste werden verschiedene endgültige Hydratationsprodukte erhalten. Für die meisten CPC Zemente sind das vorwiegend Brushit/ Calciumhydrogenphosphat Dihydrat, (DCPD) (1.2) oder Hydroxylapatit (HA) (1.3) [21].



DCPD Zemente werden bei einem sauren pH-Wert von unter 4,2 durch Umsetzung von β -Tricalciumphosphat (TCP) und Monocalciumphosphat oder Phosphorsäure gebildet [86]. Sie binden sehr schnell ab (innerhalb von 30-60 Sekunden), durch Zugabe von Reaktionsverzögerern kann die Abbindezeit in klinisch relevante Bereiche von 15 min gebracht werden [88]. Außerdem weisen sie eine geringe Festigkeit auf, in der Literatur werden meist Druckfestigkeiten von unter 60 MPa und Zugfestigkeiten von 10 MPa beschrieben [69].

Bei pH-Werten von $\geq 4,2$ wird HA gebildet [52]. HA ist mechanisch stabiler als DCPD, wobei in der Literatur variierende Festigkeitswerte für HA-Zemente angegeben werden (Druckfestigkeiten von bis zu 83 MPa und Zugfestigkeiten von 16 MPa) [69, 89]. Er bindet unter physiologischen pH-Werten ab. Allerdings ist eine wesentlich längere Abbindezeit erforderlich [69].

Sowohl Brushit als auch HA sind prinzipiell resorbierbar, wobei HA unter physiologischen Bedingungen und den damit verbundenen pH-Werten kaum löslich und damit schlecht bzw. kaum abbaubar ist [48, 50, 90]. Aus Lösung abgeschiedener, low temperature-HA (pHA) weist eine hohe spezifischen Oberfläche auf und ist, im Gegensatz zu gesinterter high temperature-HA, noch abbaubar. Allerdings erfolgt dieser Abbau rein osteoklastär und häufig unvollständig [91]. Gesinterter HA hat eine geringe Oberfläche, μm -große Kristallite und wird praktisch überhaupt nicht mehr aufgelöst.

Werkstoffe aus low-temperature Kristallphasen wie Brushit (DCPD) (Löslichkeitsprodukt $2,386 \times 10^{-7} \text{ mol}^2/\text{L}^2$ bei 37°C), sind besser löslich und damit besser abbaubar. Es konnte gezeigt werden, dass Brushit in vivo in 3-6 Monaten

abgebaut wird [92, 93]. Problematisch ist, dass in vivo Phasenänderungen auftreten können [94, 95]. Vor allem bei Vorhandensein freier Ca^{2+} -Ionen kommt es zur Transformation von Brushit in schlecht lösliches HA, wodurch die Resorption verlangsamt wird [48]. Unter physiologischen Bedingungen kann die in vivo Löslichkeit der CaP also wie folgt festgehalten werden: TCP > DCPD > PHA > HA [69].

Knochen weist aufgrund seines besonderen Aufbaus aus einer Kombination von Mineralien und Kollagen hohe Festigkeiten auf (durchschnittlich 130-190 MPa für Kortikalis und 3,6-9,3 MPa für Spongiosa) [19]. Daher müssen die mechanischen Eigenschaften eines KEM stets in Abhängigkeit zur geplanten Anwendung beurteilt werden. Keramik kann zwar hohe Druckbelastungen aushalten, ist jedoch spröde und weist eine schlechte Zug- und Torsionsfestigkeit auf [45]. Daher kommen Keramik-basierte Zemente, wie Calciumphosphatzemente (CPC), eher bei semi- und nicht-lasttragenden Defekten am Schädel zum Einsatz.

Es wäre also erstrebenswert ein KEM zu entwickeln, welches eine bessere Kombination von Eigenschaften aufweist (höhere Festigkeit, kürzere Abbindezeiten, höhere Resorptionsrate) bei gleichzeitiger Biokompatibilität und Injizierbarkeit.

Magnesiumphosphate Zemente (MPC)

Neben den etablierten, Calcium-basierten KEM hat sich das relativ neue Feld der KEM auf Basis von Magnesiumphosphaten (MgP) entwickelt [65]. Dazu zählen Zementformulierungen im binären MgO- P_2O_5 -System, Magnesiumsilikatgläser im binären MgO- SiO_2 -System, sowie Calciummagnesiumphosphate im ternären CaO-MgO- P_2O_5 -System [96-98]. Zemente auf Basis von Magnesiumphosphat (MPC) vereinen viele der wünschenswerten Eigenschaften, die im vorherigen Kapitel angesprochen wurden.

Typischerweise bestehen Magnesiumphosphat Zemente aus einer festen Phase aus Magnesiumphosphat (MgP) (z.B. wasserfreies Magnesiumoxid (MgO) oder

EINLEITUNG

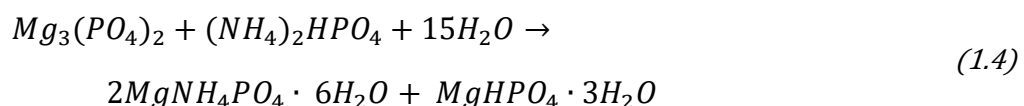
Trimagnesiumphosphat ($Mg_3(PO_4)_2$) in Kombination mit unterschiedlichen Phosphatsalzlösungen (z.B. Phosphorsäure (H_3PO_4), Ammoniumdihydrogenphosphat ($NH_4H_2PO_4$), Diammoniumhydrogenphosphat ($(NH_4)_2HPO_4$), Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) oder Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)) [45]. In Tabelle 3 findet sich eine Zusammenfassung wichtiger MgP-Verbindungen, einschließlich wichtiger Ausgangsstoffe für die MPC-Erzeugung.

Tabelle 3 Zusammensetzung und Löslichkeitsprodukte verschiedener Magnesiumphosphate [96]

Log (K_{sp}) und Löslichkeit bei 25 °C

Magnesiumphosphate	Summenformel	Löslichkeit -log(K_{sp})	Löslichkeit [mg/l]	Mg/P Verhältnis
Magnesiumoxid (Magnesia)	MgO	25.0	$1.27 \cdot 10^{-8}$	/
Magnesiumhydroxid (Brucit)	$Mg(OH)_2$	11.2	6.79	/
Trimagnesiumphosphat (Farringtonit)	$Mg_3(PO_4)_2$	23.4	2.15	1.5
Magnesiumphosphat- Trihydrat (Newberyit)	$Mg(HPO_4) \cdot 3H_2O$	5.51–5.82	$(1.69-2.54) \cdot 10^3$	1
Magnesiumammonium- phosphat Hexahydrat (Struvit, Sv)	$NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$	9.94–13.4	8.38–119	1

Ein sehr vielversprechendes MPC Zementsystem basiert auf der Bildung von Struvit (Magnesiumammoniumphosphat Hexahydrat, $NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$). Struvit ist ein natürliches Mineral, welches in vivo in Nierensteinen vorkommt [99]. Struvit kann, unter anderem, aus Farringtonite ($Mg_3(PO_4)_2$) und Diammoniumhydrogenphosphat ($(NH_4)_2HPO_4$) gebildet werden (1.4) [72].



Da Diammoniumhydrogenphosphat ($(NH_4)_2HPO_4$) als flüssige Phase genutzt wird, haben alle Komponenten in diesem System einen neutralen pH-Wert [72, 76]. Dieser neutrale pH-Wert ist nicht nur in Bezug auf die Biokompatibilität von

Vorteil, sondern auch in Bezug auf die Nutzung des Zements als Trägermaterial für empfindliche Proteine, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren [48]. Struvit (Sv) bindet unter physiologischem pH-Wert (pH-Bereich von 7.01–9.62) ab [72, 86] und ist bei diesem pH-Wert gut löslich (Löslichkeitsprodukt 5.21×10^{-15} bis 2.12×10^{-13}) [48]. Nicht zuletzt dank des neutralen pH-Werts, scheint die Zytokompatibilität von abbaubarem Struvit-Zement vergleichbar oder sogar besser zu sein als die von Brushit [86].

MPC Zemente weisen ein gegenüber CPC überlegenes Abbauprofil auf. MPC resorbiert dreimal schneller als CPC, was vor allem der höheren chemischen Löslichkeit des gebildeten Struvit (Sv) bei physiologischen pH-Werten zuzuschreiben ist [50]. Die Degradation von Struvit erfolgt daher in vivo schneller als jene von Brushit [48]. Außerdem verhindern die Mg^{2+} -Ionen eine Rekristallisation in weniger lösliche Mineralphasen in vivo [100]. Dadurch sind MPC sowohl HA-bildendem CPC als auch Brushit-bildendem CPC in puncto Abbaubarkeit überlegen [45, 48].

Im Vergleich zu CPC zeigten sich in Studien auch höhere primäre Druckfestigkeiten (>50 MPa) [76, 101, 102] sowie eine bessere Stabilität und Frakturresistenz [103]. Für MPC wurde im Vergleich mit HA-bildendem CPC eine 30 mal höhere Druckfestigkeit nach einer Stunde sowie eine 6–10 Mal höhere Druckfestigkeit nach 2 Stunden beschrieben [101]. MPC hat außerdem klinisch angemessene Abbindezeiten von 3 bis 10 Minuten [72, 76]. Allerdings kann die Lösungs-Fällungsreaktion beim Abbinden des Zements sehr schnell verlaufen. Daher wurden geeignete Strategien entwickelt, um die Abbindezeit den jeweiligen Anforderungen anpassen zu können, z.B. durch die Zugabe von Reaktionsverzögerern wie Diammoniumcitrat ($(NH_4)_2C_6H_6O_7$) [72] oder Borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) [78]. Einige MPC-Formulierungen haben einen, im Gegensatz zu den sauren CPC Formulierungen, neutralen bis basischen und damit besser gewebeverträglichen pH-Wert [104]. Mestres et al. konnten für ihre Struvit bildenden MPC-Formulierungen antimikrobielle und bakteriostatische Eigenschaften gegen *Streptococcus sanguinis* nachweisen. Dies hängt mit den synergistischen Effekten der Freisetzung von Mg^{2+} -Ionen und des basischen pH-

Wertes [101, 105]. Dieser Effekt konnte auch für *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* (planktonisch und in Biofilmen) und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, also Bakterien, die im Zusammenhang mit oralen Entzündungsgeschehen stehen, gezeigt werden. Das macht die Zementformulierungen besonders für das Feld der Zahnmedizin, z.B. als Alternative zu MTA für Wurzelkanalfüllung und direkte Überkappungen sowie für die Implantologie (Periimplantitis) interessant [105]. Auch die für den klinischen Einsatz notwendigen Voraussetzungen werden von MPC erfüllt. Eine Sterilisation durch Autoklavieren (flüssige Phase) und Anwendung von γ -Strahlung (feste Phase) ohne nachteilige Effekte auf die Materialeigenschaften ist möglich [48]. Durch Zugabe von biokompatiblen Strontiumcarbonat ist die erwünschte Radioopazität für den klinischen Einsatz gegeben [71, 106]. Yu et al. konnten nachweisen, dass bioresorbierbarer MPC weder toxisch, kanzerogen noch mutagen ist und damit gesundheitlich unbedenklich und vielversprechend für die klinische Anwendung [107].

Die Abgabe von Mg^{2+} -Ionen aus dem Zement kann einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration nehmen und für eine verbesserte Degradation des Zements sorgen. Indem die Mg^{2+} -Ionen gelartige amorphe Calciumphosphatphasen stabilisieren, unterdrücken sie das HA Kristallwachstum und verringern damit die Tendenz, dass sich initial lösliche Phasen in vivo in schwerlösliche Phasen umwandeln (apatitische Umfällung) [108]. Die Auflösung von Magnesiumphosphaten führt nicht, wie beispielsweise bei resorbierbaren Mg-Legierungen, zu einer unerwünschten Änderung des pH-Wertes, sondern zur Freisetzung von biokompatiblen Mg^{2+} - und HPO_4^{2-} -Ionen [109, 110]. In vivo Studien zeigten ebenso vielversprechende Resultate mit verbessertem Einwachs- und Resorptionsverhalten von MPC gegenüber CPC [100, 107].

Zwar hat MPC entscheidende Vorteile gegenüber CPC (besser kontrollierbare und kürzere Abbindezeit, schnellere Resorption und höhere Festigkeit), weist aber immer noch Einschränkungen auf. Die Festigkeit klassifiziert MPC immer noch nicht für die Nutzung in lasttragenden Defekten. Außerdem wären

injizierbare Formulierungen und ein weiteres Spektrum an Darreichungsformen, z.B. Granulate, wünschenswert.

Calcium-dotierter Magnesiumphosphatzement (CMPC), ternäres Ca-Mg-PO₄ System

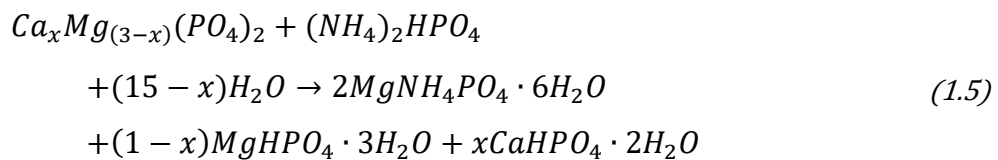
Die Möglichkeit CPC und MPC zu kombinieren, um ihre jeweiligen Nachteile auszugleichen und ein gut kontrollierbares Zement-System zu schaffen, ist vielversprechend. Solche Mischzemente haben dadurch bessere Eigenschaften als reine CPC oder MPC Zemente (kürzere Abbindezeit von 6-9 min und höhere Druckfestigkeit von 68-91 MPa) [111]. Verglichen mit CPC konnten Wue et al. für ihre CMPC Zementformulierung außerdem eine wesentlich bessere Degradierbarkeit sowohl in vitro als auch in vivo nachweisen [111]. Sie konnten durch die Materialkombination die Knochenneubildung steigern, wobei es nach 6 Wochen zu einer 80% Heilung des Defektes kam im Vergleich zu 10% für den CPC Probekörper.

1.3.3 Calcium Dotierung von Zementen

Modifikationen an der Formulierung, wie z.B. die Substituierung mit Calcium (Ca), können die Eigenschaften von Zement weiter verbessern. Der Nutzen von freigesetzten Calciumionen (Ca²⁺) für die Knochenregeneration wurde in vitro [112, 113] und in vivo [114] belegt. Der positive Effekt von extrazellulärem Calcium auf die Knochenregeneration kommt vor allem durch seine verstärkende Wirkung auf Signalwege des Knochenstoffwechsels zustande [114, 115]. Es fördert die Osteoblasten-Differenzierung aus mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks sowie die Angiogenese [116] und damit die Knochenneubildung. Dieser Effekt konnte nicht nur im orthotropen Implantatlager (Knochen), sondern sogar im heterotropen Implantatlager (Muskel) gezeigt werden [114].

Vorndran et al. erreichten durch die Calcium-Substituierung von Struvit-Zement eine Verbesserung der Abbindezeiten sowie mechanischen Festigkeiten [76]. Die Festigkeit von Struvit (> 50MPa) übertrifft jene von Brushit (≤ 35MPa) bereits. Durch die Formulierung Ca_xMg_(3-x)(PO₄)₂ konnten noch höhere Festigkeiten von

bis zu 80 MPa, sowie Abbindezeiträume von 14 min erreicht werden ($x \leq 0,75$, Pulver zu Flüssigkeit Verhältnis 2,5 g/ml, Mahlzeit des Pulvers ≥ 1 h). Um eine Entmischung der kombinierten Zementrohpulver beim Transport zu umgehen, nutzten die Autoren ein einziges Ausgangsrohpulver aus Calciummagnesiumphosphat. Bei den durch Zugabe von Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) entstandenen Abbindeprodukten handelte es sich vor allem um Struvit, geringe Mengen an Newberyit mit hohem Mg-Gehalt sowie Brushit mit hohem Calciumgehalt (1.5) [76].



Die gute Biokompatibilität dieses Calcium-dotierten Magnesiumphosphat Zements (CMPC) konnte in vitro [76] und in vivo [117] gezeigt werden. Klammert et al. implantierten dafür vorgehärtete Probekörper in heterotrope (muskuläre) Implantatlager in Ratten [117]. Auch nach 15 Monaten Liegedauer konnten keine Anzeichen für entzündliche Vorgänge, Implantatabstoßung oder Wundinfektionen beobachtet werden. Der CMPC ist demnach für den klinischen Einsatz vielversprechend.

Auf Basis der bereits gewonnenen Erkenntnisse kam in der vorliegenden Arbeit ein Ca-dotierter Magnesiumphosphat Zement zum Einsatz. Die Basisformulierung ($Ca_xMg_{(3-x)}(PO_4)_2$) wurde in Form einer präfabrizierten, injizierbaren Paste untersucht.

1.3.4 Präfabrizierte Zementpasten

Herkömmliche Zemente beginnen auszuhärten, sobald die flüssige und feste Phase aufeinandertreffen, wobei ein entscheidender Faktor für die finale Qualität des Zements das Verhältnis zwischen Flüssigkeit und Pulver ist. Ein manuelles, intraoperatives Vermischen der Phasen durch den Operateur und der dadurch entstehende Zeitdruck kann daher zu inhomogenen Ergebnissen führen und die Qualität und Festigkeit des Zementes negativ beeinflussen [118]. Eine

Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, stellen vorportionierte, automatisierte Mischpistolen dar [66, 71]. Allerdings ist durch die Vorportionierung die Zementmenge begrenzt und kann dadurch für kraniofaziale Reparaturen zu klein sein [119].

Diese Problematiken führten zur Entwicklung von sogenannten präfabrizierten Pasten. Die Bestandteile dieser Pasten wurden bereits vorab vermengt, sie liegen daher in gebrauchsfertiger, pastöser Form vor. Dadurch wird ein klarer definiertes, homogeneres und vor allem reproduzierbares Mischungsverhältnis und eine längere Lagerfähigkeit ermöglicht. Präfabrizierte Pasten binden durch ihre besondere Zusammensetzung erst *in vivo*, nach dem Einbringen in den Defekt und dem Kontakt zu den dort vorhandenen Körperflüssigkeiten, ab. Dadurch wird die Anwendung stark vereinfacht, da ein *intra-operatives* Anmischen durch den Operateur entfällt und der Zeitdruck beim Einbringen sowie die Operationsdauer verringert werden [66]. Die Injektion der Mischung in den Defekt kann sofort erfolgen und jederzeit unterbrochen bzw. fortgesetzt werden, ohne dass eine neue Zementcharge gemischt werden muss. Als zusätzlicher positiver Aspekt wird dadurch die Kontaminationsgefahr verringert.

Wie bereits erwähnt, binden die präfabrizierten Pasten erst im Defekt ab. Das liegt daran, dass die Pasten auf einer Kombination von Zementpulver und einer nicht-wässrigen Komponente basieren. Diese wird *in vivo* diffusiv mit Körperflüssigkeit ausgetauscht, was den Abbindeprozess einleitet [14]. Hier haben sich zwei verschiedene Systeme etabliert. Die nicht-wässrige Komponente ist entweder mit Wasser mischbar oder nicht-mischbar.

Mit Wasser mischbare Trägerflüssigkeiten für Zementssysteme basieren häufig auf Glycerin oder Polyethylenglykol (PEG) [118, 120]. Tagaki et al. untersuchten die Eigenschaften einer solchen Glykol-basierten CPC Zementpaste [118]. Die Abbindezeit der ersten untersuchten Pasten betrug für den klinischen Gebrauch inakzeptable 62 bis 100 min. Um bessere Abbindezeiten zu erreichen, wurden Weinsäure, Chitosan, Apfelsäure, Malonsäure und Na_2HPO_4 bereits als effektive Reaktionsbeschleuniger eingesetzt, wodurch teilweise Zeiten von < 10 min erreicht wurden [118-120]. Die Pasten haben eine geringe Kohäsion, was sie

während der Aushärtung im Defekt instabil und anfällig für ‚wash out‘ macht. Untersuchungen zeigten, dass sich die Zugabe bestimmter Geliermittel (Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Carboxymethylcellulose (CMC), Chitosan-Acetat, Chitosan-Lactat) positiv auf die Kohäsion der Paste auswirkt [121]. Zemente, welche auf mit Wasser mischbarer Flüssigkeit basieren, sind im trockenen Milieu stabil und lagerfähig. Allerdings kann es beim Einsatz dieser Komponenten durch deren Affinität zu Wasser zum vorzeitigem Einsetzen des Abbindevorgangs und damit zur Reduktion der Lagerfähigkeit kommen [39]. Durch die kontinuierliche Erhöhung des Wassergehalts während des Abbindeprozesses ändern sich die chemischen Bedingungen für die Abbindereaktion fortlaufend. Diese Änderungen erwiesen sich in Bezug auf die Zementqualität als zu unberechenbar [39].

Diese Probleme können umgangen werden, indem für die Herstellung der Paste Trägerflüssigkeiten zum Einsatz kommen, die mit Wasser nicht-mischbar sind (z.B. synthetische Triglyceride). Dadurch muss erst die Trägerflüssigkeit der Paste durch Wasser substituiert werden, um die Abbindereaktion zu ermöglichen [66]. Die Flüssigkeiten sind dabei von einer scharfen Grenzfläche getrennt, wodurch immer entweder Wasser oder die Trägerflüssigkeit im Kontakt mit dem Zementpulver steht. Durch die Zugabe von oberflächenaktiven Mitteln (Tensiden) zur mit Wasser nicht-mischbaren Phase kann gewährleistet werden, dass es bei Kontakt zum wässrigen Umfeld der Wunde zu einem diskontinuierlichen Austausch der Flüssigkeit gegen Wasser kommt. Der Abbindevorgang kann damit unter definierten Wasser-Pulver Verhältnissen stattfinden. Aufgrund dieses Abbindeprofils zeigen sie sich vielversprechend für den Einsatz als ‚drug carrier‘. Die kontrollierte Abgabe von Stoffen aus dem Zement ermöglicht beispielsweise das Einbringen von Antibiotika (Gentamicin und Vancomycin) oder Strontium, was zur minimal-invasiven Behandlung von osteoporotischen Knochendefekten eingesetzt werden könnte [14, 122]. Solche ‚ölbasierten‘ Zementpasten gewährleisten eine reproduzierbare Zementqualität, ohne den Abbindevorgang, die Festigkeit, die Injizierbarkeit und die chemischen Eigenschaften des Endprodukts zu beeinträchtigen [66].

Heinemann et al. erreichten durch die ölbasierte Zementformulierung ihrer Paste eine bessere Kohäsion, verlängerte Lagerfähigkeit und höhere Druckfestigkeit im Vergleich zu herkömmlichen CPC-Pasten bei gleichzeitig guten Abbindezeiten ($t_{\text{initial}} = 2.5 \text{ min}$, $t_{\text{final}} = 16 \text{ min}$) [66]. Die verwendete CPC-Formulierung basierte auf dem von Driessen et al. eingeführten ‚Biocement D‘ (60 wt.% α -TCP (26 wt.% DCPA, 10 wt.% Calciumcarbonat (CaCO_3), 4 wt.% PHA) [123], wobei ein Zementpulver/Öl-Verhältnis von 85 % zu 15 % verwendet wurde. In Kombination mit K_2HPO_4 wurde daraus eine Suspension auf Ölbasis hergestellt. Die Öl-Phase enthielt neben dem synthetischen Triglycerid als Trägerflüssigkeit (Miglyol 812) zwei oberflächenaktive Mittel (4,7 % Rizinusölethoxylat 35, 4,9 % Hexadecylphosphat). Die Tenside unterstützten die Kompatibilität der polaren Mineralpartikel mit der hydrophoben Trägerflüssigkeit, wodurch ein hoher Feststoffgehalt der Paste erreicht wurde. Durch die Kombination eines hydrophilen und eines hydrophoben Tensids wurde außerdem die spontane Phasentrennung der Paste bei Kontakt mit Wasser erleichtert sowie die Kohäsion verbessert.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde von INNOTERE GmbH eine präfabrizierte CPC-Knochenzementpaste als Knochenersatzmaterial auf den Markt gebracht (INNOTERE Paste-CPC, INNOTERE GmbH, Radebeul, Germany), welche in dieser Arbeit als Referenzmaterial dient.

Es konnte gezeigt werden dass sich die in Kapitel 1.3.3 beschriebene CMPC- Zementformulierung ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$) ebenfalls für die Herstellung lagerbarer, ölbasierter Zementpasten eignet [124]. Um die Lagerstabilität der Pasten zu erhöhen wurden primäre Phosphatsalze verwendet. Um dennoch eine vollständige Durchhärtung zu erzielen, machte dies eine aktive Durchmischung mit der wässrigen Phase erforderlich. Die Homogenisierung der Komponenten erfolgte daher durch Extrusion durch einen statischen Mischer und führte innerhalb weniger Minuten zu einer schnellen Aushärtung der Zemente.

Für die vorliegende Arbeit kamen daher solche präfabrizierten, ölbasierten Pasten auf MCPC-Basis ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ mit $x=0,25$ und $x=0,75$) zum Einsatz.

1.3.5 Zementgranulate

Im klinischen Alltag werden nicht nur Pasten, sondern unterschiedliche Darreichungsformen von Zementen genutzt. In der dentalen Chirurgie (z. B. Sinuslifting, Schaftkonservierung, Füllung von Kieferzysten, Augmentation vor Implantation) wird typischerweise Knochenersatz in Granulat-Form angewendet [125]. Die häufigsten verwendeten Materialien sind Keramikgranulate auf der Basis von CPC (Tricalciumphosphat). Meist werden sie durch Zerkleinern eines ausgehärteten Materialblocks hergestellt [126]. Ein Nachteil in der klinischen Anwendung kann die unregelmäßige Form und scharfkantige Beschaffenheit dieser Granulate sein. Sie kann zu Gewebereizungen oder Perforationen an der Implantationsstelle und damit zu Infektionen, Wundheilungsstörungen bis hin zum Teilverlust des Augmentats führen [125]. Granulate aus Tricalciumphosphat resorbieren zwar nahezu vollständig, benötigen dafür aber 12-24 Monate [127, 128]. Die damit verbundene, ebenso langsam ablaufende knöcherne Regeneration ist der Grund, weshalb das Einsetzen von Zahnimplantaten meist erst nach ca. 6 Monaten möglich ist. Dieser Zeitraum könnte durch die Verwendung schneller abbaubarer Knochenersatzmaterialien wie des oben beschriebenen CMPC Zements verkürzt werden [125].

Von Christel et al. wurde daher untersucht, ob eine Granulierung der oben beschriebenen Zementformulierung möglich ist. Durch spezifische Modifikationen an Verfahrens- und Zementparametern konnte die Erzeugung von sphärischen Granulaten mit Durchmessern von $< 1000 \mu\text{m}$ auf Basis einer wasserbasierten Form des Zements mittels Emulsionsverfahren realisiert werden [129]. Bei diesem Verfahren werden die Granulate mittels einer Wasser-in-Öl-Emulsion hergestellt. Bei einer Emulsion handelt es sich um ein Gemisch zweier eigentlich nicht mischbarer Flüssigkeiten wie Wasser und Öl. Eine Phase bildet dabei kleine Tröpfchen (disperse Phase), die in der anderen, umgebenden Phase (kontinuierliche Phase) schwimmen. Um die Grenzflächenspannung an der Phasengrenzfläche zu senken und die Emulsion zu stabilisieren, werden grenzflächenaktive Substanzen (Tenside) benötigt. Tensidmoleküle besitzen einen hydrophilen und einen hydrophoben Anteil. Ihr molekularer Aufbau sorgt

dafür, dass sich die Tenside bei Kontakt mit Wasser/Öl Gemischen mit der hydrophilen Seite in Richtung der Wasserphase und mit der hydrophoben Seite in Richtung der Öl-Phase ausrichten. Das Tensid stabilisiert so die wasserbasierten, also hydrophilen Granulate in der hydrophoben Öl-Phase. Dadurch wird das erneute Zusammenfließen der flüssigen Zementtröpfchen und damit die Bildung eines Agglomerats verhindert [125]. Anschließend wird das ausgehärtete Granulat vom Öl getrennt, gereinigt und getrocknet. Die so entstandenen Granulat-Partikel weisen eine rundere Form und glattere Oberfläche auf als durch Zerkleinern hergestellte Partikel, was eine schnellere Heilung in vivo fördern kann [130].

In der vorliegenden Arbeit wurden daher solche Granulate aus wasserbasiertem Ca-dotierten Magnesiumphosphat Zement untersucht. Die Basisformulierung ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$) war dabei dieselbe wie für die oben beschriebenen CMPC-Pasten.

1.4 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das in vivo Verhalten von Knochenersatzmaterialien aus Ca-dotierten Magnesiumphosphat Zement (CMPC) in Form von Granulaten und injizierbaren Pasten zu untersuchen. Es wurden zwei unterschiedlich hoch Ca-dotierte Zemente auf Basis der Rohpulver ($\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ mit $x=0,25$ und $x=0,75$) genutzt. Die Zemente wurden als präfabrizierte, injizierbare, ölbasierte Pasten und als wässrige Pasten in Granulatform (500-710 μm) appliziert. Es wurden demnach vier verschiedene CMPC-Implantatwerkstoffe verglichen. Als Referenzmaterial kam eine ölbasierte, Hydroxylapatit-bildende Calciumphosphat Zementpaste (CPC) und daraus hergestelltes Granulat zum Einsatz. Die Materialien wurden in orthotrope, potentiell kraftbelastete Femurdefekte in Kaninchen implantiert. Da es sich bei den neuentwickelten CMPC Werkstoffen (Pasten und Granulate) sehr wahrscheinlich um relativ schnell abbauende Materialien handelt, wurden die Gewebeproben nach einer Liegedauer von 6 bzw. 12 Wochen entnommen. Anhand der mittels Trenn-Dünnschliff Technik angefertigten histologischen

EINLEITUNG

Präparate wurden Knochenneubildung, Knochen-Implantatkontakt und Abbau der Materialien analysiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Materialien in Defektsituationen mit Hartgewebekontakt in vivo abgebaut und in Knochen umgebaut werden und inwieweit die Darreichungsform als Paste bzw. Granulat und die Calcium-Dotierung Einfluss darauf nehmen. Dem zugrunde liegt die Hypothese, dass Pasten und Granulate aus CMPC Zement schneller resorbiert und durch Knochen ersetzt werden als die Referenzmaterialien aus CPC und dass das Ausmaß der Calcium-Dotierung der CMPC einen Einfluss auf deren Verhalten in vivo hat.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Anfertigung der Röntgenbilder

- In vivo Xtreme, Bruker Corporation, Rheinstetten

2.1.2 Trenn-Dünnschliff Technik

Geräte

- EXAKT Trennbandsäge, Exakt Apparatebau GmbH & Co.KG, Norderstedt mit Sägeblatt (0,2 mm Diamant D64, Typ 300, Lieferant: Walter Messner GmbH, Oststeinbek)
- EXAKT_HISTOLUX_Lichtpolymerisator, Exakt Apparatenbau GmbH & Co.KG, Norderstedt
- Präzisions-Vakuum-Klebpresse (UV), Exakt Apparatenbau GmbH & Co.KG, Norderstedt
- HISTOLUX-Lichtpolymerisator, Exakt Apparatenbau GmbH & Co.KG, Norderstedt
- Mikrometerschraube, Exakt Apparatenbau GmbH & Co.KG, Norderstedt
- EXAKT-Mikroschleifsystem, EMS, Exakt Apparatenbau GmbH & Co.KG, Norderstedt
- Reinstwasseranlage, USF Pure Lap Plus, Ramsbach-Baumbach GmbH
- Wärme- und Trockenschrank, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim

Hilfsmittel

- Glasgefäße (Rollrandgläser) mit Kunststoffdeckel 15ml, Schott GmbH, Mainz, Lieferant: Hartenstein GmbH, Würzburg

MATERIAL UND METHODEN

- Einbettformen Fa. Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim
- Glasschreiber, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Nassschleifpapier und Polierpapier Durchmesser 300mm SiC: Körnung P 800, Körnung P 1200, Körnung 2400, Körnung 4000, Schmitz Metallographie, GmbH Herzogenaurach
- Objektträger-Plexiglas, plangeschliffen, 50 x 100 x 2 mm, Walter Messner GmbH, Oststeinbek
- Labortücher, Zentrallager Universitätsklinikum Würzburg
- Einmalplastikspatel aus PS 120 mm, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg

Chemikalien

- Formaldehyd 4%, gepuffert pH 6,9 Merck KGaA, Darmstadt, Artikel-Nr.1.00496.5000
- Technovit 7100 VLC (Kaltpolymerisierender Kunststoff für histologische Untersuchungen), Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Lieferant: Morphisto GmbH, Frankfurt, Art.-Nr.: 12227.K05000
- Technovit 7200 VLC (Lichthärtender Einkomponenten Kunststoff zum Einbetten), Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Lieferant: Morphisto GmbH, Frankfurt, Art.-Nr.: 17572
- Technovit 4000 (schnellhärtender kaltpolymerisierender 3-KomponentenKunststoff) Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Lieferant: Morphisto GmbH, Frankfurt, Art.-Nr.: 18111
- Technovit 7210 VLC (Kleber), Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Lieferant: Morphisto GmbH, Frankfurt, Art.-Nr.: 17573
- Ethanol absolut, Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg

2.1.3 Färbungen der histologischen Schnitte

Geräte

- Brutschrank, Fa. Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
- Magnetrührer, Fa. IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen

Hilfsmittel

- Färbeschalen aus Glas, Fa. Schott GmbH, Mainz, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Pinzette, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Labortücher, Zentrallager des Universitätsklinikums Würzburg
- Stoppuhr, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Magnetrührstäbchen, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg
- Parafilm M, Benis, Lieferant: Fa. Hartenstein GmbH, Würzburg

Färbungen

Masson Trichom Goldner-Färbung

- Weigerts Eisenhämatoxylin, Lösung A + Lösung B, Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.:1.15973.002
- Säurefuchsin, Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster, Art.-Nr.:2E030
- Xylidin-Ponceau, Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster, Art.-Nr.:16150
- Azophloxin, Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster, Art.-Nr.:18050
- Orange G, Fa. Chroma GmbH & Co. KG, Münster, Art.-Nr.:16230
- Molybdätophosphorsäure, Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Art.-Nr.:4440.2

- Lichtgrün, gelblich, Fa. Chroma GmbH & Co.KG, Münster, Art.-Nr.:42095
- 100% Essigsäure, SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.: 332091

Hämalaun-Eosin (H&E)

- Mayer's Hämalaunlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Art.-Nr.:1.09249.0500
- Eosin B, SIGMA ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Art.-Nr.:86100G-25G
- 80% Ethanol, Apotheke des Universitätsklinikums Würzburg

2.1.4 Beurteilung und Untersuchung der histologischen Präparate

Mikroskop

- Stereomikroskop Discovery V20 Stereo Zeiss, Lieferant Carl Zeiss AG
- Zeiss Axiocam, Lieferant Carl Zeiss AG

Programme

- Mikroskopie und Imaging Software:
 - Zen 2012 pro blue edition vs.2, Carl Zeiss Microscopy GmbH
- Stitching-Software:
 - Hug in, Version 2017.0.0, Windows 10, 64-bit, Freeware 2017
- Bildbearbeitung:
 - CorelDRAW X8, Version 18.0.0.448
- Bildanalyse:
 - Fiji Is Just ImageJ (v1.51f, 64bit, Freeware 2018)

- Diagrammsoftware:

DRAW.io (v12.1.3, Freeware 2019)

Eingabegerät

- Pen Tablet Wacom Intuos3 A4 (Grafiktablett), Wacom K.K., Japan

2.1.5 Datenerfassung und Statistische Auswertung

Programme

- Office Professional (Office 365), Microsoft Cooperation, Redmond, Washington, Vereinigte Staaten
- SPSS (IBM SPSS Statistics für Windows, Version 25, Armonk, NY, USA: IBM Cor.)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung der zu untersuchenden Materialien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Implantatwerkstoffe (Zementpasten und -granulate) wurden durch die Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (FMZ) des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt bzw. im Falle des Referenzmaterials (INNOTERE Paste-CPC) von INNOTERE GmbH (Radebeul, Deutschland) geliefert².

Es wurden jeweils zwei verschiedene Materialvariationen von Calciummagnesiumphosphat-Zement (CMPC) mit je unterschiedlichem Magnesium- und Calciumgehalt ($\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$) verglichen (**Abbildung 1**). Als Referenzmaterialien wurden eine bereits kommerziell genutzte ölbasierte HA-bildende Calciumphosphat-Zementpaste und daraus hergestelltes Granulat genutzt (CPC Paste, INNOTERE GmbH,

² Die Herstellung der Zemente ist nicht Bestandteil dieser Arbeit und wird der Vollständigkeit halber genannt.

Radebeul, Deutschland) [66]. Die beiden zu untersuchenden CMPC-Formulierungen wurden einmal in Form von Granulaten (auf Basis von wasserbasiertem Zement) und einmal in Form von injizierbarer Paste (ölbasiert) appliziert. Insgesamt wurden demnach 6 verschiedene Materialvariationen miteinander verglichen. Um eine bessere Übersicht während der Laborarbeit und in der Beschreibung der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden den Implantatwerkstoffen Abkürzungen zugewiesen (**Abbildung 1**).

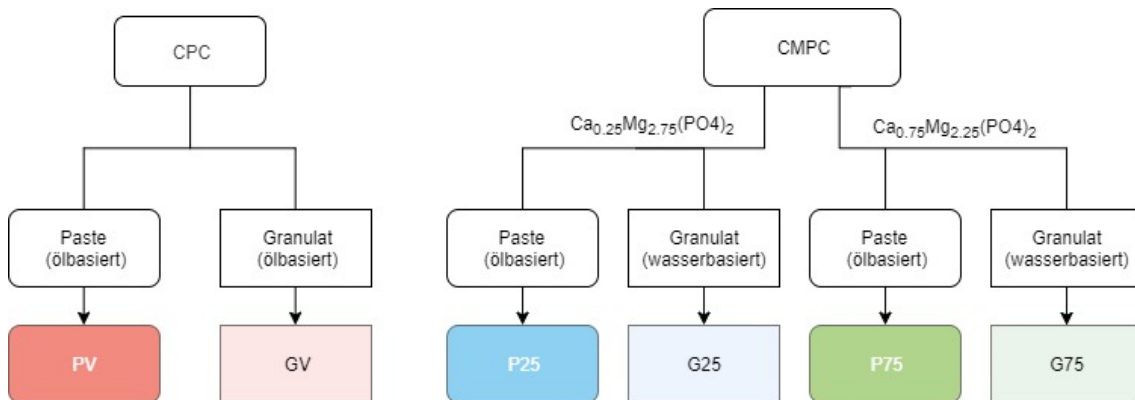


Abbildung 1 Übersicht der untersuchten Zementmaterialien und deren Abkürzungen

Referenzmaterial CPC (Calciumphosphatzement),
 Untersuchungsmaterial CMPC (Calciummagnesiumphosphatzement)

Die Zytokompatibilität der zu untersuchenden Materialien wurde bereits in vitro durch Testung an einer humanen, fetalen Osteoblastenzelllinie (hFOB) überprüft und bestätigt [129]. Das Referenzmaterial befindet sich bereits im klinischen Einsatz [14, 66].

Zur Herstellung der $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ Zementrohpulver wurde ein Gemisch aus $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 , CaCO_3 , $\text{Mg}(\text{OH})_2$ in geeigneten stöchiometrischen Verhältnissen (cf. **Tabelle 4**) bei 1100°C für 5 h gesintert.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 4 Bestandteile der Zement-Rohpulver

Rohpulver	CaHPO ₄	CaCO ₃	MgHPO ₄ ·3H ₂ O	Mg(OH) ₂
Ca _{0,75} Mg _{2,25} (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
Ca _{0,25} Mg _{2,75} (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 so hergestellte Ca-dotierte Magnesiumphosphat bestand vor allem aus Farringtonit (Mg₃(PO₄)₂) und Stanfieldit (Ca₄Mg₅(PO₄)₆). Die ‚Sinter-Kuchen‘ wurden manuell zerkleinert, auf eine Partikelgröße von <355 µm gesiebt und 1 h trocken gemahlen.

Für die ölasierten Zementpasten (P25 und P75) wurden die entstandenen Zementpulver dann mit fein gemahlenem (NH₄)₂HPO₄ als Reaktionspartner gemischt (entsprechend einem Pulver-Flüssigkeits-Ansatz unter Verwendung von 3,5 M (NH₄)₂HPO₄-Lösung und einem Pulver-zu-Flüssigkeits-Verhältnis von 3 zu 1). Anschließend wurde eine Öl-Tensid-Mischung im Verhältnis von 5,25: 1 zugegeben. Für die Applikation der ölasierten Zementpasten kam ein 4: 1 Dispenser mit Doppelkammer-Kartuschensystem (DKK) (Medmix, Risch-Rotkreuz, Schweiz) und angeschlossenem Statik-Mischer mit Mischelement zum Einsatz. Dazu wurden die Zementpasten in den größeren Behälter der Kartuschen überführt, wohingegen der kleinere Behälter mit 0,5 M Dikaliumhydrogenphosphatlösung (K₂HPO₄) gefüllt war. Das volumenbezogene Verhältnis aus Zementpaste zu K₂HPO₄-Lösung lag damit bei 4:1. Durch einen Dispenser mit Mischelement wurde die aktive Vermischung der Paste mit der wässrigen Phase gewährleistet. Bei Verwendung einer derartigen Vorrichtung 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.

Das Referenzmaterial wurde als fertige CPC Zementpaste von INNOTERE GmbH (Radebeul, Deutschland) bezogen. Das Rohpulver enthielt die Hauptphasen α- Tricalciumphosphat (α- Ca₃(PO₄)₂), Monetit (CaHPO₄) und Calcit (CaCO₃). Die Rohpulver wurden im Anschluss an ihre Sinterung über 4 h

gemahlen und die ölbasierten Zement-Pasten hergestellt. Das gelieferte Material wurde wie oben beschrieben ebenfalls mittels Doppelkammerkartuschen appliziert, als flüssige Komponente wurde hier Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) verwendet. Zum Vermischen beider Komponenten und zum Extrudieren der Paste wurde auch hier ein Statik-Mischer mit befestigter Applikationskanüle, allerdings ohne Mischelement, genutzt.

Die Herstellung der Granulate erfolgte mittels Emulsionsverfahrens am FMZ. Durch dieses Verfahren konnten sphärische Partikel³ mit abgerundeten glatten Oberflächen erzeugt werden [129]. Die Basispulver $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ wurden dabei mit einer wässrigen 2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ / 1.5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{P}$ Lösung im Pulver-zu-Flüssigkeits-Verhältnis (PLR) von 2.0 g/mL zu einer Zementpaste verarbeitet. Anschließend wurden sie mittels Emulsionsverfahren mit Tensid (Tween 80; 3,0 wt.%) und einer Ölphase (Paraffinöl, Mygliol 812) zu sphärischen Granulaten mit einheitlichen Durchmessern von 500 bis 710 μm umgesetzt. Die Referenzgranulate wurden, wie die Referenzpasten, durch die Firma INNOTERE GmbH bereitgestellt. Die Herstellung erfolgte dort durch Zerkleinerung von Blöcken, welche aus der Referenzpaste gewonnen wurden. Pro Bohrlochdefekt wurden jeweils 30 g Granulat veranschlagt.

Die Materialien wurden durch γ -Bestrahlung bei 25 kGy sterilisiert.

³ In der vorliegenden Arbeit werden im Folgenden Granulat oder Granulate als Bezeichnung für die Materialvariation genutzt, Partikel hingegen stellvertretend für die einzelnen Körnchen, aus dem sich das Granulat zusammensetzt.

Tabelle 5 Zusammensetzung und Applikationsform der untersuchten Zementmaterialien
(DKK = Doppelkammerkartusche)

Materialvariation		Zusammensetzung		Applikationsform
		Pulver	Flüssige Phase	
Pasten	PV	Calciumphosphat	Öl-Tensid-Mischung	Dispenser mit DKK, (Paste/ Anmachlösung 4:1) 0,9 % NaCl
	P25	$\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Öl-Tensid-Mischung (5,25: 1)	Dispenser mit DKK, (Paste/ Anmachlösung 4:1) K_2HPO_4
	P75	$\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$		
Granulate	GV	Calciumphosphat	Öl-Tensid-Mischung	manuell
	G25	$\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$	2,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,5 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{P}$ (PLR 2.0 g/mL)	manuell
	G75	$\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$		

2.2.2 Haltung und Operation der Versuchstiere

Die Tierstudie wurde von der Regierung Unterfrankens genehmigt (Aktenzeichen Tierversuch: 55.2 2532-2-338) und entsprach den internationalen Richtlinien für die Haltung und Nutzung von Labortieren (ARRIVE Leitlinie und EU Richtlinie 2010/63/EU für Tierexperimente). Die Eignung der Zemente als Knochenersatzmaterial wurde in 32 weiblichen ‚New-Zealand White‘ Kaninchen mit einem Alter von 13 Wochen und einem ungefähren Gewicht von 3 kg überprüft. Haltung und Operation⁴ der Tiere erfolgte durch Mitarbeiter der Abteilungen für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (FMZ) und für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universität Würzburg in Kooperation mit einer Veterinärmedizinerin. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in der Tierhaltung der FMZ in Form einer offenen Tierhaltung. Die Hygieneüberwachung entsprach den FELASA-Richtlinien. Der Tierversuch wurde in Anlehnung an DIN EN ISO 10993-2 [131] und DIN EN ISO 10993-6 [132] durchgeführt. Das Klima der Anlage wurde überwacht, im Haltungsraum für Kaninchen lag die Temperatur bei 18 °C +/- 2 °C und die rel. Luftfeuchte bei

⁴ Die Operation der Versuchstiere war nicht Bestandteil dieser Arbeit. Die explantierten Knochenproben wurden der Autorin zur histologischen Aufarbeitung und Analyse zur Verfügung gestellt. Das Prozedere wird hier der Vollständigkeit halber dargestellt.

MATERIAL UND METHODEN

50 % -65 %. Die Tiere wurden bei einem Hell/Dunkelrhythmus von jeweils 12 Stunden einzeln in Käfigen gehalten. Für jedes Tier standen Wasserflasche, Futterraufe und ein separates Häuschen zur Verfügung. Während der Eingewöhnungsphase wurden die Tiere an den Prozess des Wiegens gewöhnt, wobei sie danach eine Belohnung in Form von Trockenobst erhielten.

In jedem Kaninchen wurden zwei Materialvariationen, eine in den rechten und eine in den linken Femur implantiert und nach einem Zeitraum von 6 oder 12 Wochen explantiert. Eine Übersicht aller Versuchstiere mit zugehörigen Implantaten findet sich im Anhang (cf. Anhang, Kapitel 7.1). Das Implantationsschema ist der nachfolgenden Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6 Implantationsschema

OP Gruppe	Implantate	Liegedauer in Wochen	Anzahl Tiere
1	rechts: Zementpaste aus $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ links: Referenzpaste aus Calciumphosphatzement	6	4
2	rechts: Zementpaste aus $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ links: Referenzpaste aus Calciumphosphatzement	12	5
3	rechts: Zementpaste aus $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ links: Referenzgranulat aus Calciumphosphatzement	6	6
4	rechts: Zementpaste aus $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ links: Referenzgranulat aus Calciumphosphatzement	12	6
5	rechts: Granulat aus $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ links: Granulat aus $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$	6	5
6	rechts: Granulat aus $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$ links: Granulat aus $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$	12	6

Die Operation erfolgte durch einen Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen, die Einleitung und Überwachung der Anästhesie durch eine Veterinärmedizinerin. Nach Wiegen im Wachzustand wurde die Narkose durch Gabe von Ketamin (Ansektin 100 mg/ml, gewichtsadaptiert 0,6 mg/kg) und Xylazin (Sedaxyla 20 mg/ml, gewichtsadaptiert 0,25ml/kg) intramuskulär in die Oberschenkel eingeleitet und mittels gasförmigen Narkotikums (Isofluran) über Maske aufrechterhalten. Es folgten Enthaarung, Desinfektion und steriles Abdecken des OP Bereichs. Es wurde je eine Materialvariation in einen Oberschenkel eingebracht, pro Tier also zwei Materialvariationen. Der Zugang erfolgte von anterolateral durch eine unilaterale Hautinzision im Bereich des Oberschenkels.

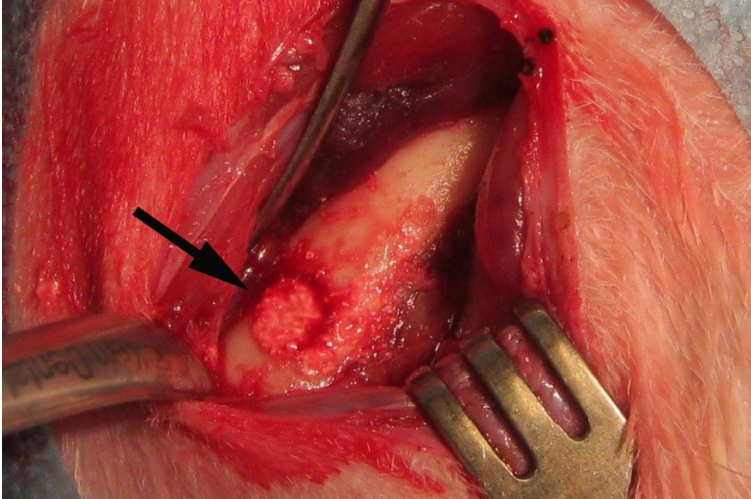


Abbildung 2 intraoperative Aufnahme eines Kaninchenfemurs in situ mit dem in die Trepanationsöffnung eingebrachten Material

Nach spreizender Präparation innerhalb der Muskelsepten bis auf den Femur wurde das Periost inzidiert und ein Bereich von ca. 2 cm freigelegt. Danach wurde ein Bohrloch unter Verwendung eines kieferchirurgischen Trepanbohrers (D=5 mm, L=10 mm) unter Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung gesetzt. Nach Reinigung der Wunde mit Kochsalzspülung wurden die Granulate bzw. Zementpasten mittels Dispenser direkt in den Bohrkanal appliziert. Nach dem Abbinden des Implantatmaterials (3-5 min) erfolgte ein dreischichtiger Wundverschluss der Defektregion mit resorbierbaren Nähten und abschließendes Auftragen von Sprühverband (Hansaplast). Postoperativ wurden die Tiere mit einer einmaligen Gabe von Analgetikum i.m (Metacam 0,35 mg/kg Körpergewicht), danach über eine Woche mit Analgetikum per os (Metacam 0,35 mg/kg Körpergewicht) versorgt. Es wurden regelmäßige Gewichtskontrollen zur Überwachung des Gesundheitszustandes der Kaninchen vorgenommen (cf. Tabelle im Anhang, Kapitel 7.2). Je nach Gruppenzugehörigkeit erfolgte die Euthanasie entweder nach 6 oder 12 Wochen postoperativ durch die Veterinärmedizinerin. Die Euthanasie wurde nach vorheriger Betäubung (Ketamin (Ansektin 100 mg/ml, gewichtsadaptiert 0,6 mg/kg) und Xylazin (Sedaxyla 20 mg/ml, gewichtsadaptiert 0,25ml/kg) intramuskulär in die Oberschenkelmuskulatur) mittels intrakardialer Injektion von Pentobarbital (Euthadorm 500mg/ml, gewichtsadaptiert 1ml/kg) durchgeführt. Danach wurde das Implantationsareal mit umliegendem Knochen- und Bindegewebe

explantiert, Zugang und Präparation erfolgten wie oben beschrieben. Von allen Explantaten wurden danach radiologische Aufnahmen des Implantationsbereiches mit umliegendem Gewebe angefertigt (cf. Kapitel 7.3 im Anhang).

2.2.3 Entwässern und Kunststoffinfiltration

Die explantierten Knochenproben wurden der Autorin zur histologischen Aufarbeitung und Analyse zwecks Anfertigung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden entwässert, in Kunststoff eingebettet und mittels einer etablierten Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben zu mikroskopisch auswertbaren Schnitten verarbeitet.

Dazu wurden überschüssige Gewebeabschnitte (Bindegewebe und Muskulatur) ohne Probenbezug an der EXAKT Trennbandsäge abgetrennt. Als Orientierungshilfe dienten dabei die zuvor angefertigten Röntgenaufnahmen der explantierten Femora. Danach wurden die Proben in Glasgefäßen in 4% gepufferter Formaldehydlösung für mindestens 14 Tage fixiert.

Anschließend erfolgte eine schrittweise Entwässerung der einzelnen, gut bedeckten Proben in Glasgefäßen mittels graduell gesteigertem Kunststoffanteil (Glycolmethacrylat) in einem Technovit 7100 VLC-Wasser Gemisch. Der Verbleib der Proben in jedem Gemisch belief sich aufgrund der Dicke der Proben auf mindestens 2 Tage. Im Anschluss folgte eine Kunststoffinfiltration durch Lagerung in Einbettkunststoff (Technovit 7200 VLC) (cf. Tabelle 7).

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 7 Protokoll der Entwässerung und anschließenden Kunststoffinfiltration der Gewebeproben

Lagerung	Lösung	Ansatz im Volumenverhältnis [%]
Entwässerung		
1. Tag	Technovit 7100 VLC / dest. Wasser	50/50
3. Tag	Technovit 7100 VLC / dest. Wasser	70/30
5. Tag	Technovit 7100 VLC / dest. Wasser	90/10
8. Tag	Technovit 7100 VLC	100
10. Tag	Technovit 7100 VLC/Technovit 7200 VLC	50/50
ab diesem Zeitpunkt Lagerung im Dunkeln		
Kunststoffinfiltration		
13. Tag	Technovit 7200 VLC	100
15. Tag	Technovit 7200 VLC	100
17. Tag	Technovit 7200 VLC	100
20. Tag	Technovit 7200 VLC	100
22. Tag	Technovit 7200 VLC	100

2.2.4 Kunststoffeinföbftung der entwässerten Präparate

Das Freilegen des Implantationsareals und das Einpassen der Proben in die Einbettmulden wurde durch Absägen der Knochenenden an der EXAKT-Trennbandsäge ohne Wasserkühlung erreicht.

Die Einbettmulden wurden mit Proben bestückt und bis zum Rand mit Technovit 7200 VLC gefüllt. Die Polymerisation wurde im EXAKT-HISTOLUX-Lichtpolymerisator bei einem Wellenlängenbereich von 400-500 nm vollautomatisch in zwei Polymerisationssequenzen von insgesamt 10 Stunden Dauer durchgeführt. Um ein langsames Einleiten der Polymerisation als Schutz vor Spannungsrissen zu gewährleisten, erfolgte zuerst eine Vorpolymerisation für 2 Stunden (Zeit 1) mit großem Lampenabstand sowie eine Endpolymerisation mit geringerem Lampenabstand über 8 Stunden (Zeit 2). Die Lampenabstände werden dabei voll-automatisch durch das Programm des Gerätes eingestellt.

2.2.5 Trenn- Dünnschliff Technik zur Herstellung histologischer Präparate

Die polymerisierten Proben wurden mittels der etablierten Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien zu mikroskopisch auswertbaren Schnitten verarbeitet (cf. Donath, 1987) [133]. Mit dem Ziel der Schaffung einer planparallelen Oberfläche wurden die Proben nach dem Entnehmen aus den Einbettmulden auf planparallele Objektträger aufgebracht. Die nicht zu untersuchende Probenseite wurde hierzu mit Nassschleifpapier (Körnung 800) geglättet. Danach wurde je eine Probe mit kaltpolymerisierendem 3-Komponenten-Kunststoff (Technovit 4000) auf einem Objektträger (=Objektträger 1) befestigt.

Tabelle 8 Mischungsverhältnis Technovit 4000

Technovit 4000	Bestandteil	Menge
Sirup I und II mischen Pulver unterrühren ½ min quellen lassen	Sirup I	3,30g
	Sirup II	1,65g
	Pulver	3,25g

Nach dem Aushärten wurde der Träger im EXAKT-Mikroschleifsystem (Oszillation Speed Control 70, Grinding Speed Control 70, Führungsschlitten mit 400 g Gewicht beschwert, Vakuumhalterung bei 680 mbar) mit zuvor gewässertem Nassschleifpapier (Körnung 800) so lange geschliffen bis die histologisch zu untersuchende Fläche sichtbar war. Nach Glättung der Oberfläche (Politur für 2-3 Oszillationsbewegungen mit Schleifpapier Körnung 1200, dann je 10 min erst mit Polierpapier der Körnung 2400, danach Körnung 4000) wurde das so hergestellte ‚Präparat A‘ (= Objektträger 1 und Probenkörper) im Trockenschrank (30 min bei 37 °C) getrocknet.

Nach Überprüfung der gewünschten Planparallelität der Oberfläche des Probenblockes zum Objektträger wurde ein mit Ethanol gereinigter zweiter Objektträger (=Objektträger 2) mit Technovit 7210 VLC unter Verwendung der Präzisions-Vakuum-Klebpresse auf die zu untersuchende Blockoberfläche geklebt. Der dadurch erhaltene Objektträger-Probe-Verbund wird als ‚Sandwich D‘ tituiert (cf. Abbildung 3) Um eine gleichmäßige Verteilung des Klebers im

Klebspalt zu gewährleisten wurde erst nach einer Wartezeit von 3 Minuten mit der 15-minütigen Photopolymerisation begonnen. Im Anschluss erfolgte eine erneute Trocknung im Wärmeschrank (24 h bei 37 °C).

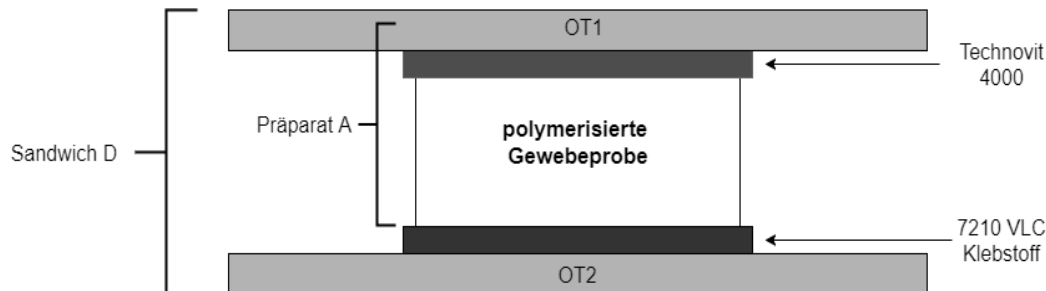


Abbildung 3 Objektträger-Probenverbund ‚Sandwich D‘

OT1= Objektträger 1, OT2=Objektträger 2, Klebstoffe Technovit 4000 und 7210 VLC, Präparat A setzt sich zusammen aus der polymerisierten Gewebeprobe, OT1 und der Klebeschicht aus Technovit 4000

Für die Herstellung des eigentlichen Trennschnittes wurde das Sandwich D mit dem Objektträger 1 an der Vakuumhalterung in die EXAKT Trennbandsäge (Geschwindigkeitseinstellung 7) eingespannt. Durch die gewählte Schnittführung wurde ein etwa 300 µm dicker Probenabschnitt des Gewebeblocks zusammen mit dem Objektträger 2 abgetrennt, im weiteren Dünnschliffpräparat (DS) genannt.

Die Schnittschichtdicke des DS wurde aus der Gesamtdicke des zu schleifenden Schleifpräparates abzüglich der Objektträger und Kleberstärke berechnet. Der so ermittelte Wert stellte den Ausgangswert für das EXAKT-Mikroschleifsystem (EMS) dar. Der gewünschte Endschliffwert und damit eine Präparatschichtdicke von ca. 10-20 µm wurden durch stufenweises Abschleifen und Kontrolle des Abtrages durch die Mikrometerschraube erreicht (Oscillation Speed Control 70, Grinding Speed Control 70, Führungsschlitten mit 400 g Gewicht beschwert, Vakuumhalterung bei 680 mbar). Für die anschließende Politur mit Schleifpapier Körnung 2400 (5 min) und Schleifpapier Körnung 2400 (10 min) wurde das Gewicht auf 100 g reduziert, die sonstigen Einstellungen jedoch beibehalten.

Für die Herstellung weiterer Dünnschliffe desselben Präparats wurde mit dem Objektträger 1 erneut verfahren wie bereits oben beschrieben, d.h. Glättung der

Oberfläche, Aufkleben auf einen neuen Objektträger und Trennschnitt. Auf diese Weise wurden von jedem Präparat zwei Dünnschliffe erstellt, insgesamt also 128 Dünnschliffe.

Um eine bessere Übersicht während der Laborarbeit und in der Beschreibung der Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zu gewährleisten, wurden die Implantate nach folgendem Schema neu durchnummeriert⁵: Vorangestellt ist die Versuchstiernummer, darauf folgend der Buchstabe A oder B (abhängig davon ob es sich um den rechten Femur = A oder den linken Femur = B handelt). Die endständige Zahl steht für die Anzahl der angefertigten Trenn-Dünnschliffe pro Femur (1=erster Schnitt, 2=zweiter Schnitt).

2.2.6 Färbung der Trenn-Dünnschliffe

Es wurden vorab 2 unterschiedliche Färbungen (Hämalaun-Eosin und Masson-Goldner-Trichrom) vorgenommen. Die in dieser Arbeit ausgewerteten Trenn-Dünnschliffe wurden alle mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung gefärbt. Die Färbungen erfolgten in Anlehnung an das Standardwerk ‚Mikroskopische Technik‘ (Romeis) [134].

Hämalaun-Eosin (HE)

Zur Herstellung der Färbelösungen Eosin B (0,1 %) wurde 0,1 g Eosin in 100 ml dest. Wasser gelöst.

Durchführung der Färbung

Die Dünnschliffe wurden für 5 min in Mayer's Hämalaunlösung getaucht und anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte in 0,1% Eosin Lösung für 10 min mäßig überfärbt und in Wasser 5 min ausgewaschen. Zum Abschluss erfolgte eine Differenzierung in 80% Ethanol.

⁵Aufgrund des Arbeitsablaufes sind die Versuchstiere nicht fortlaufend nummeriert.

MATERIAL UND METHODEN

In den so gefärbten Dünnschliffen wurden die Zellkerne bläulich, die übrigen Zellbestandteile sowie Kollagen rot markiert.

Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Tabelle 9 Masson-Goldner-Trichrom Färbung (MGT) – Herstellung der Färbelösung

Substanzen	Herstellung der Färbelösung
Weigerts Eisenhämatoxylin, Lösung A + Lösung B	Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1 mischen
Masson-Lösung (Goldner I)	1 g Säurefuchsin in 100 ml dest. Wasser lösen und 1 ml 100% Essigsäure dazugeben 1 g Xylidin-Ponceau in 100 ml dest. Wasser lösen und 1 ml 100% Essigsäure dazugeben 0,5 g Azophloxin in 100 ml dest. Wasser lösen und 0,2 ml 100% Essigsäure dazugeben 33,5 ml Säurefuchsin-Lösung + 66,5 ml Xylidin-Ponceau-Lösung mischen. Diese Lösung, mit 20 ml Azophloxin-Lösung und 880 ml 0,2% Essigsäure mischen.
Orange G- Lösung	10 g Orange G in 500 ml dest. Wasser lösen, 15 g Molybdatophosphorsäure dazugeben, lösen
Lichtgrün- Lösung	0,5 g Lichtgrün und 1 ml 100% Essigsäure zu 500 ml dest. Wasser lösen

Durchführung der Färbung

Die zu färbenden Dünnschliffe wurden zur Anfärbung der Zellkerne für 15 min in Weigerts Eisenhämatoxylin getaucht und danach 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die zytoplasmatische Färbung mit Masson-Lösung (Goldner I) für 7 min. Danach wurden die Dünnschliffe im Wechsel je kurz mit dest. Wasser, 2% Essigsäure und erneut mit dest. Wasser gespült. Im nächsten Schritt folgte das Tauchen in Orange G Lösung für 5 min und erneutes Spülen erst mit dest. Wasser, 2% Essigsäure und wieder Wasser. Abschließend wurden die Dünnschliffe in vorgewärmter Lichtgrün-Lösung bei 60 °C im Brutschrank gefärbt, erneut nach oben beschriebenen Muster gespült und zum Lufttrocknen aufgestellt. Die Masson Trichom Goldner-Färbung markiert

Osteoid und Muskelfasern rot, verkalkte Knochenmatrix hellgrün, mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen leuchtend grün, Zytoplasma rotbraun und Zellkerne braun-schwarz. Von der Eindeckung vor erfolgter mikroskopischer Auswertung wurde wegen der Gefahr von Luftblasenbildung abgesehen.

Abbildung 4 zeigt exemplarisch eine Übersichtsaufnahme eines fertigen, für die Auswertung bereiten Dünnschliffes.



Abbildung 4 Makrofoto Dünnschliffpräparat

Maßstab rechts (dünne Striche = mm; dicke Striche = cm)

2.2.7 Auswertung der histologischen Präparate

Digitalisierung der Trenn-Dünnschliffe

Um eine spätere Auswertung der Gewebeveränderungen mittels des Bildanalyseprogrammes Fiji [135] (Open source freeware) zu ermöglichen, wurden die Dünnschliffe digitalisiert. Die fertigen histologischen Präparate wurden mittels eines Mikroskopie-Programmes (Zen, Zeiss) am Discovery V20 Zeiss Stereomikroskop beurteilt und fotografiert. Die Schnitte wurden auf den Objektträger aufgelegt und nach manueller Einstellung der Schärfe bei einer 20,5-fachen Vergrößerung mit einem 0,63 Objektiv aufgenommen. Die Belichtungszeit wurde individuell angepasst und pro Schnitt mehrere Bilder

überlappend mit der AxioCam (Software AxioVision, Carl Zeiss Jena GmbH) fotografiert, um ein anschließendes Zusammensetzen zu einem Bild mit Hilfe einer Stitching-Software (Hugin, Open source freeware) zu ermöglichen. Auf diese Art und Weise konnte eine Übersichtsaufnahme der relevanten Bereiche bei gleichzeitig höherer Auflösung erreicht werden, als dies mit einem Einzelbild möglich gewesen wäre. In Hugin wurden die als JPEG exportierten Bilddateien bei einer Einstellung von einer Brennweite von 500 mm bei zylindrischer Projektion ausgerichtet und nach Auswählen des zu untersuchenden Bildausschnittes beschnitten. Anhand der sich überlappenden Bildränder und der damit vorhandenen Kontrollpunkte konnte so eine hochauflösende Panoramaansicht jedes Schnittes errechnet werden. Zwecks einer besseren Übersichtlichkeit wurden die Bilder in CorelDRAW X8 mit einem weißen Hintergrund versehen.

Alle so für die Auswertung vorbereiteten Bilder finden sich im Anhang unter Kapitel 7.4.

Auswertung

Die Präparate wurden in digitalisierter Form anhand des Übersichtsbildes ausgewertet. Bei am Bildschirm schlecht zu beurteilenden Bereichen wurden die Schliffe parallel im Mikroskop beurteilt, um über die Gewebebeschaffenheit zu entscheiden, da es beim Digitalisieren der Dünnschliffe zur verfälschten Darstellung der Färbung kommen kann.

Vermessung

Die digitalisierten Dünnschliffe wurden in der auf ImageJ (Open source freeware) basierenden Bildanalysesoftware Fiji (Open source freeware) vermessen.

Um die Vergleichbarkeit der gemessenen Größen zwischen den verschiedenen Schnitten zu gewährleisten, wurde das digitale Messinstrument mit Hilfe des in dem Gesamtbild eingefügten Eichstrichs von 2000 μm Länge kalibriert.

Aufgrund der Komplexität der Bilder und um mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurde visuell-manuell statt automatisiert durch das

Bildanalyseprogramm vermessen. Da mit Freihandlinien gearbeitet werden musste, wurde zur Erhöhung der Präzession als Eingabegerät ein Pentablet (Wacom Intuos3 A4) statt einer Computermaus genutzt.

Untersuchungsparameter

Unterschieden wurde zwischen dem jeweiligen implantierten Material (dunkelgrün bis schwarz), mineralisiertem Knochen (türkisblau bis grün), sowie Osteoid (orange-rot). Abbildung 5 illustriert Anhand dreier Beispielschnitte die unterschiedlichen Gewebebereiche.

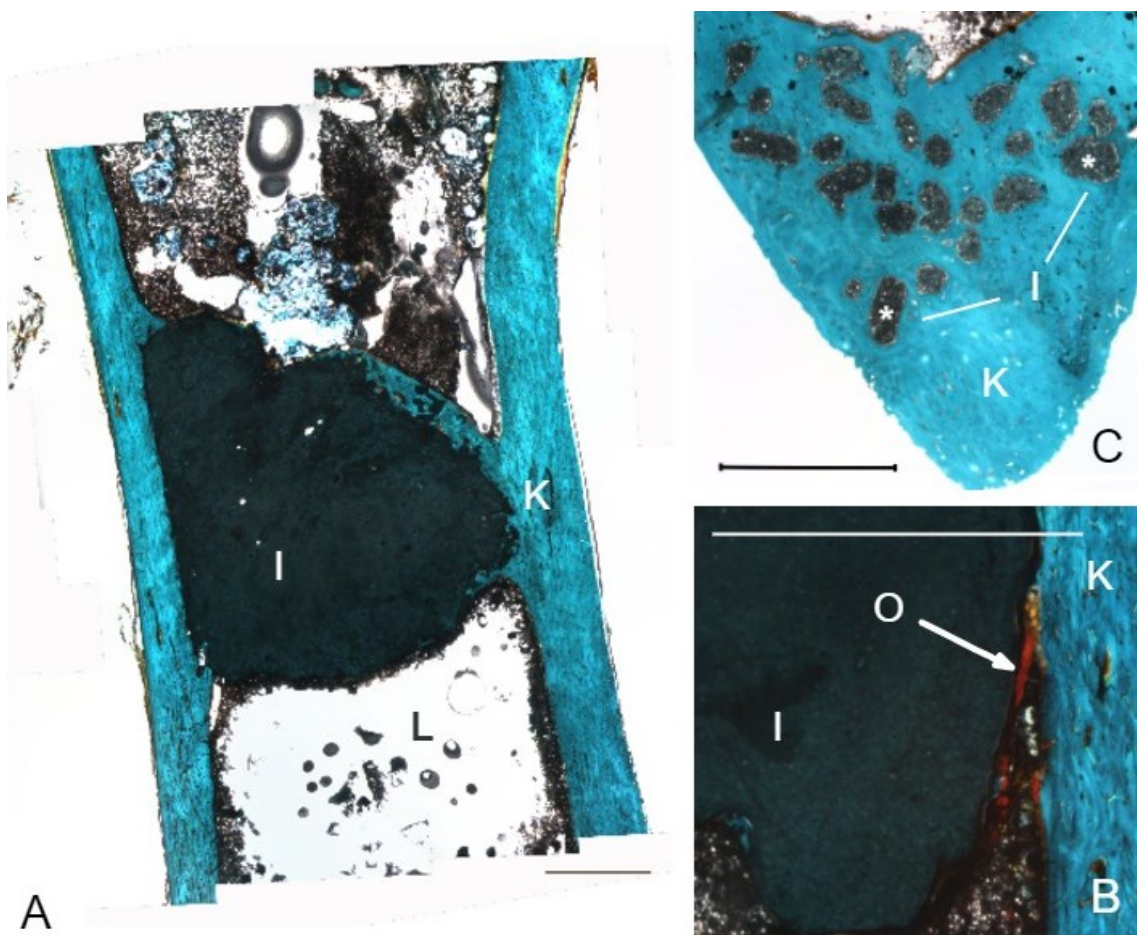


Abbildung 5 Gewebedifferenzierung anhand der Masson-Goldner-Trichromfärbung

Histologische Schnitte der Kaninchenfemora mit implantierten Pasten (A, C) und Granulat (B). Die Implantate erscheinen im Bild dunkelgrün bis schwarz (I), der mineralisierte Knochen türkisblau bis grün (K), nicht mineralisierter Knochen/Osteoid orange-rot (O). Das Knochenmark wurde aufgrund der angewendeten Technik nur schlecht konserviert und stellt sich als Leerfläche dar (L). Eichstrich 2 mm.

Um Aussagen über die Neubildung von Knochen am implantierten Material mit Knochenkontakt sowie über die Resorption desselben treffen zu können, wurden folgende Parameter genutzt:

- Umfang des Implantats (μm)
- Knochen-Implantat-Kontakt (K-I-K):
Strecke des am Implantat angelagerten neugebildeten mineralisierten Knochens (μm)
- Osteoid (OST): Strecke des am Implantat angelagerten Osteoids (μm)
- Anzahl: Anzahl der einzelnen Partikel pro Dünnschliff

Der Umfang wurde als die Strecke an der Grenze zwischen Implantat und umliegenden Strukturen angenommen, die Fläche als Bereich innerhalb dieser Grenzen definiert (cf. Abbildung 6).

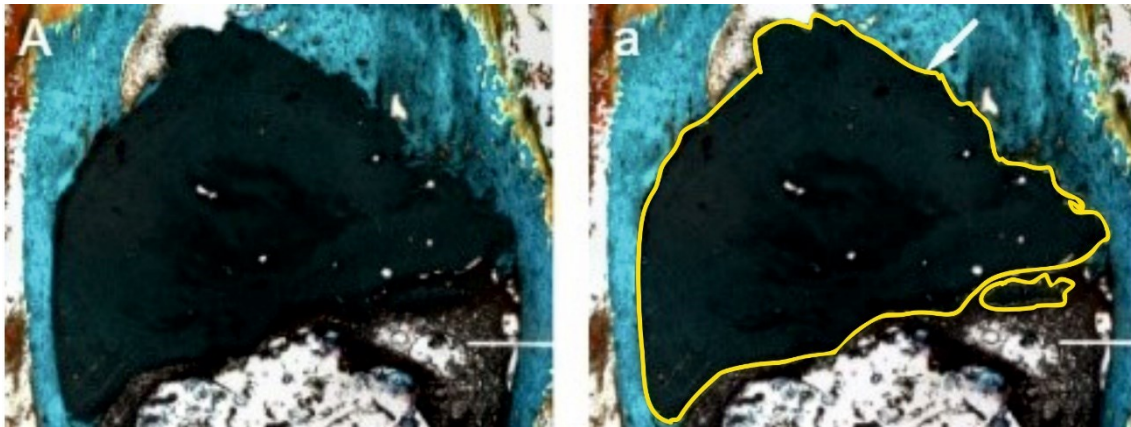


Abbildung 6 Beispiel für die Messung des Pasten Umfangs

A: Histologisches Präparat der Paste P75, Material stellt sich dunkel dar
a: gelb eingezeichneter Umfang (Pfeil), die ursprüngliche Messlinie wurde für eine bessere Darstellung in dieser Grafik stark verbreitert

Im Falle der Messung der Umfänge aller Partikel in einem Dünnschliff ergaben sich so mehrere Umfang-Teilstrecken, d.h. für jeden einzelnen Partikel ein Umfang (cf. Abbildung 7).

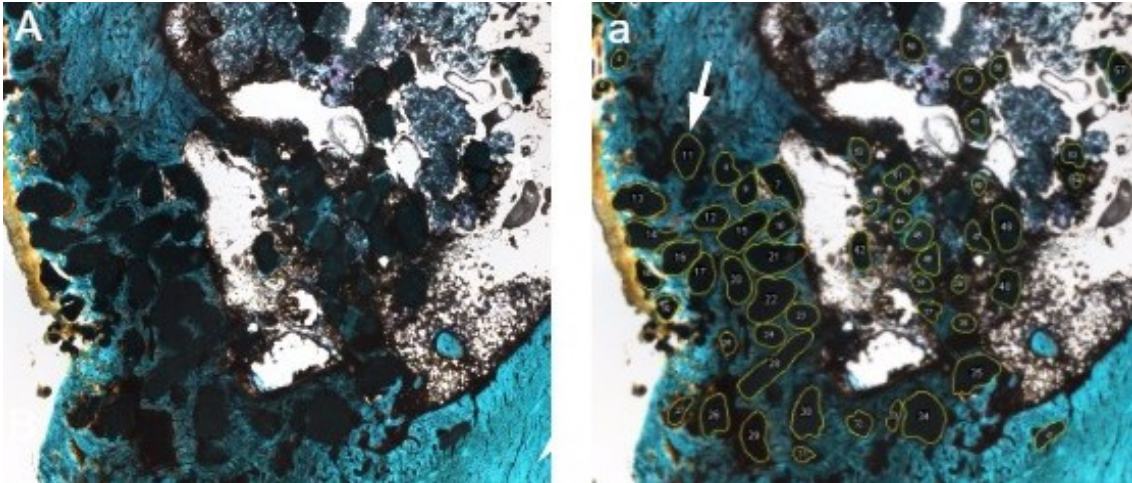


Abbildung 7 Beispiel für die Messung des Granulat Umfangs,

A: Histologisches Präparat des Referenzgranulats GV, a: gelb eingezeichnete Umfänge der einzelnen Granulat Partikel (exemplarisch markiert durch Pfeil), die Nummerierung innerhalb der Partikel dient der Zuordnung der gemessenen Strecken während des Messvorgangs

Es wurde daher für jeden Granulat-Dünnschliff ein Gesamtwert durch Addition der Teilstrecken errechnet, d.h. des Umfangs aller Partikel pro Dünnschliff.

$$Umfang_{ges}(\mu m) = \Sigma \text{ gemessene Umfangteilstrecken je Dünnschliff } \mu m \quad (2.1)$$

Um den durchschnittlichen Umfang der Partikel in einem Dünnschliff zu erhalten, wurde deren Gesamtumfang durch die Anzahl dividiert.

$$dUG = \text{durchschnittlicher Umfang Partikel } (\mu m) = \frac{Umfang_{ges}(\mu m)}{\text{Anzahl}} \quad (2.2)$$

Für den Knochen-Implantat-Kontakt (K-I-K) wurden alle Bereiche definiert und vermessen, bei denen grün gefärbter mineralisierter Knochen im direkten Anschluss an das Implantat zu erkennen ist. Osteoid (OST), noch nicht vollständig kalzifizierter Knochen, stellt sich als orange-rotes Gewebe am Implantat dar. Bereiche, in denen kein direkter Kontakt zwischen dem angrenzenden Gewebe und dem Implantat besteht, wurden nicht vermessen, da nicht klar unterschieden werden konnte, ob sie artifiziell durch die Präparation entstanden waren oder sich tatsächlich kein Gewebe angelagert hatte. Den jeweiligen Teilstrecken für die Messungen wurden, je nach Gewebe im Kontakt

mit dem Knochen, Farben zugeordnet (Blau für K-I-K, Rot für OST) (cf. Abbildung 8).

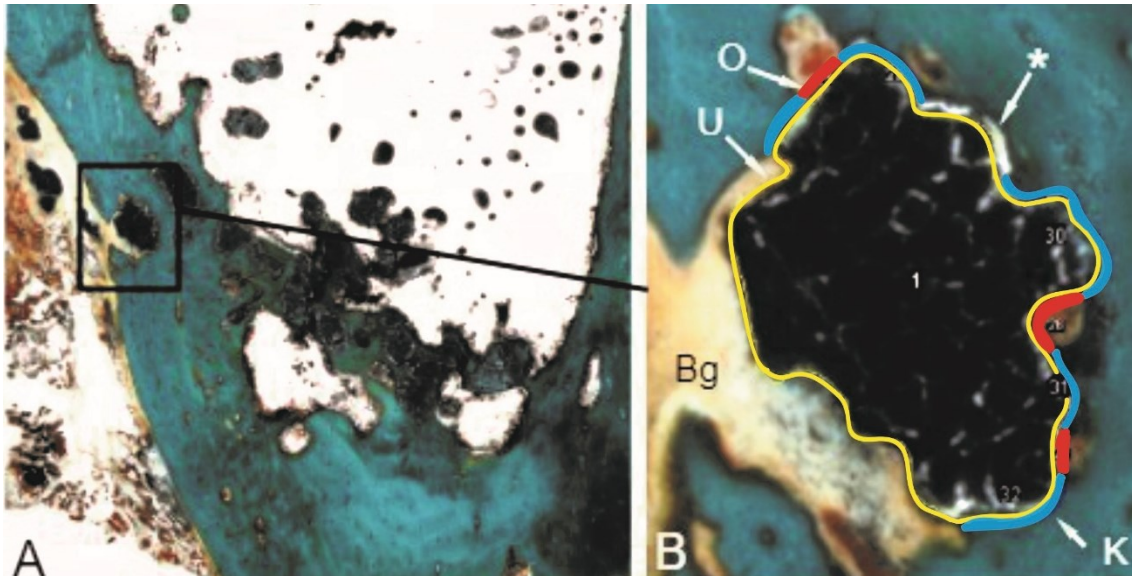


Abbildung 8 Beispielbild für Teilstreckenmessungen mit eingezeichneten Messstrecken

A: Histologisches Präparat von Granulat GV, Partikel (dunkelgrün) größtenteils vollständig von Knochen (türkis) umgeben B: vergrößerter Bildausschnitt eines Granulat-Partikels umgeben von periostalem Bindegewebe (Bg) und Knochen (türkis), die eingezeichnete Messstrecken wurde für eine bessere Darstellung in dieser Grafik stark verbreitert: (U) Umfang in Gelb, (O) Osteoid Teilstrecken in Rot, (K) Knochen-Implantat-Kontakt Teilstrecken in türkis-blau, (*) Strecke ohne Implantatkontakt zum Knochen; die teils noch sichtbaren Zahlen sind Nummerierungen der Teilstrecken

Der prozentuale Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtumfang des Implantats, also der Knochen-Implantat-Kontakt% (KIK%), wurde wie folgt aus der Summe aller Knochen Implantat Kontakt Strecken in einem Dünnschliff und dem Gesamtumfang berechnet:

$$K - I - K\% = \frac{\Sigma (\text{Knochen} - \text{Implantat} - \text{Kontaktstrecken}) \mu\text{m}}{\text{Gesamtumfang} \mu\text{m}} * 100 \quad (2.3)$$

Der Prozentuale Anteil des Osteoids am Gesamtumfang des Implantats, also der Osteoid-Implantat-Kontakt% (OST%), wurde wie folgt aus der Summe aller Osteoid-Implantat-Kontaktstrecken in einem Dünnschliff und dem Gesamtumfang berechnet:

$$OST\% = \frac{\Sigma (\text{Osteoid} - \text{Implantat} - \text{Kontaktstrecken}) \mu\text{m}}{\text{Gesamtumfang } \mu\text{m}} * 100 \quad (2.4)$$

Da von jedem explantierten Kaninchenfemur mehrere Dünnschliffe angefertigt wurden, ergaben sich mehrere Werte für jeden Femur und damit für jedes Implantat. Für alle weiteren Berechnungen wurden diese Einzelwerte für jedes Femurs zusammengefasst. Es liegt also pro Femur und damit pro Implantat ein Wert für jede Kategorie vor. Alle Werte wurden also nach dem folgenden Schema gemittelt:

$$\text{Mittelwert}_{\text{Bein}} = \frac{\Sigma \text{Werte aller Dünnschliffe eines Beines}}{\text{Anzahl Dünnschliffe pro Bein}} \quad (2.5)$$

Da pro Femur stets zwei Dünnschliffe angefertigt wurden, ergab sich also z.B. für die Berechnung des mittleren KIK% für einen Femur folgende Formel:

$$MW (K - I - K\%) = \frac{\Sigma (\text{KIK\% Dünnschliffe pro Bein})}{2} \quad (2.6)$$

Für jedes der Implantate ist somit aus den jeweiligen Einzelschnitten ein Mittelwert bestimmt worden für:

- den Implantat-Umfang im μm
- den Knochen-Implantat-Kontakt in μm (K-I-K)
- den Knochen-Implantat-Kontakt in % (K-I-K%)
- die Osteoid-Strecke in μm (OST)
- die Osteoid-Strecke in % (OST%)

Für alle Granulat-Implantate wurde zusätzlich noch bestimmt:

- der durchschnittliche Umfang der Partikel (dUG)

2.2.8 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software SPSS (IBM SPSS Statistics für Windows, Version 25, Armonk, NY, USA: IBM Cor.) durchgeführt.

MATERIAL UND METHODEN

Da sich die Auswertung als komplex darstellte, war zur Unterstützung der Auswahl des passenden statistischen Modells der Lehrstuhl für Klinische Epidemiologie und Biometrie der Universität Würzburg beratend tätig.

Aus den vorhandenen Daten wurden 12 Untersuchungsgruppen gebildet, 6 den Materialvarianten zugehörige Gruppen (Pasten und Granulate) und innerhalb dieser die den zwei verschiedenen Untersuchungszeiträumen (6 oder 12 Wochen) zugeordneten Untergruppen. (cf. Tabelle 10)

Tabelle 10 Untersuchungsgruppen

Untersuchungsgruppen unterteilt nach verwendeter Materialvariation und Einheilungszeitraum, Femora: Anzahl der präparierten Femora in der jeweiligen Gruppe

Pasten			Granulate		
Präparat	Wochen	Femora	Präparat	Wochen	Femora
PV	6	4	GV	6	6
	12	5		12	6
	Insgesamt	9		Insgesamt	12
P25	6	4	G25	6	5
	12	5		12	6
	Insgesamt	9		Insgesamt	11
P75	6	6	G75	6	5
	12	6		12	6
	Insgesamt	12		Insgesamt	11

Zuerst wurden alle 12 Gruppen jeweils mittels des Kolmogorow-Smirnow-Tests auf ihre Normalverteilung hin untersucht. Waren die Daten laut diesem nicht normalverteilt ($p < 0,05$) so wurde zusätzlich der Shapiro-Wilk-Test herangezogen (nicht normalverteilt bei $p < 0,05$).

Zur Untersuchung der knöchernen Regeneration wurden die Unterschiede der einzelnen Gruppen in Bezug auf die Bildung von mineralisiertem Knochen (Mittelwert KIK%) und Osteoid (Mittelwert OST%) auf ihre Signifikanz überprüft. Aufgrund des Implantationsschemas (cf. Tabelle 6) musste für jeden Gruppenvergleich einzeln der jeweils passende statistische Test bestimmt

MATERIAL UND METHODEN

werden. Bei zwei Materialvariationen in ein und demselben Versuchstier handelt es sich um voneinander abhängige Stichproben. Materialien, die in unterschiedlichen Versuchstieren eingeheilt sind, gehen als unabhängige Stichproben in die Berechnungen mit ein. Eine Übersicht über die jeweils verwendeten statistischen Tests bietet Tabelle 11.

Tabelle 11 Übersicht der gewählten statistischen Tests zur knöchernen Regeneration

Vergleich der Mittelwerte von KIK% bzw. OST% zwischen den Untersuchungsgruppen, sortiert nach Liegedauer von 6 oder 12 Wochen
A = abhängige Variablen, U= unabhängige Variablen

KIK %			
<i>Verglichene Gruppen</i>		Abhängigkeit	statistischer Test
Pasten			
6 Wochen	PV - P25	A	t-test abhängig
	PV - P75	U	t-test unabhängig
	P25 - P75	U	t-test unabhängig
12 Wochen	PV - P25	A	t-test abhängig
	PV - P75	U	t-test unabhängig
	P25 - P75	U	t-test unabhängig
OST %			
<i>Verglichene Gruppen</i>		Abhängigkeit	statistischer Test
Pasten			
6 Wochen	PV - P25	A	t-test abhängig
	PV - P75	U	t-test unabhängig
	P25 - P75	U	t-test unabhängig
12 Wochen	PV - P25	A	t-test abhängig
	PV - P75	U	t-test unabhängig
	P25 - P75	U	t-test unabhängig

Die Degradation der Granulate wurde anhand ihrer veränderten Partikelumfänge untersucht. Als Ausgangswert wurde der durchschnittliche Umfang der Partikel zum Zeitpunkt der Implantation bestimmt. Bei der Herstellung der Granulate wurden diese in die Größenfraktion 500 bis 710 µm gesiebt, wodurch von einem mittleren Durchmesser von 605 µm auszugehen ist. Da die Form der Partikel als

kugelförmig anzunehmen ist, konnte mittels folgender Formel der größte Umfang bei einem Schnitt durch die Partikelmitte berechnet werden:

$$Umfang_{Kugel}(\mu m) = \pi * Durchmesser(\mu m) \quad (2.7)$$

Dadurch wurde der für alle Materialvariationen gleiche, mittlere Ausgangsumfang von 1900,6 μm ermittelt. Dieser einzelne Wert wurde dann innerhalb der Untersuchungsgruppen mit den Mittelwerten der durchschnittlichen Umfänge der Partikel (dUG) zum Zeitpunkt 6 Wochen post OP verglichen. Da nur ein errechneter Ausgangswert vorlag, der mit den Messwerten verglichen wurde, kam hier der Ein-Stichproben t-Test zur Anwendung. Die Unterschiede zwischen den Werten für 6 Wochen und 12 Wochen post OP wurden ebenfalls auf Ihre Signifikanz getestet (cf. **Tabelle 12**). So konnte eine Aussage über das Degradationsverhalten im Zeitverlauf getroffen werden. Außerdem wurden Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Materialvariationen angestellt. Die gefundenen Unterschiede wurden auf ihre Signifikanz untersucht. Auch hier stellt sich die Problematik der unterschiedlichen Abhängigkeiten, wie oben bereits beschrieben, dar, weshalb auch hier die statistischen Testverfahren einzeln ermittelt werden mussten.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 12 Übersicht der gewählten statistischen Tests zur Degradation:

Testung innerhalb der Untersuchungsgruppen, Vergleich des mittleren Umfangs zwischen Zeitpunkt 0 und 6 Wochen, sowie 6 und 12 Wochen. Testung der Unterschiede der mittleren Umfänge zwischen den Untersuchungsgruppen nach 6 und 12 Wochen.

Degradation innerhalb der Untersuchungsgruppen		
Gruppe	Null vs. 6 Wochen	6 vs. 12 Wochen
	Test	Test
GV	t-test bei einer Stichprobe (Testwert 1900,664)	Mann-Whitney-Test
G25		t-test unabhängig
G75		Mann-Whitney-Test
Degradation im Vergleich zwischen den Untersuchungsgruppen		
Vergleiche	6 Wochen	12 Wochen
	Test	Test
GV vs G25	t-test unabhängig	Mann-Whitney-Test
GV vs G75	t-test unabhängig	Mann-Whitney-Test
G25 vs G75	t-test abhängig	Wilcoxon-Test

3 ERGEBNISSE

Für die vorliegende Arbeit wurden 64 Femora von 32 Versuchstieren histologisch aufbereitet und die dadurch gewonnenen 128 Dünnschliffe hinsichtlich der Knochenneubildung und Degradation des Implantatmaterials analysiert. Zielstellung war es, die verschiedenen Materialvariationen in ihrem Einwachsverhalten bezüglich Degradation und Knochenneubildung in vivo zu untersuchen und gegenüberzustellen. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind im folgenden Kapitel dargestellt.

3.1 Verlauf der Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden für die gesamte Dauer des Tierversuchs in ihrem Verhalten überwacht und regelmäßig gewogen, um das Wohlergehen der Tiere sicher zu stellen. Das Gewicht der Kaninchen stieg nach der Operation (Zeitpunkt 0) kontinuierlich an wie Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen. Eine tabellarische Übersicht der Gewichtsentwicklung aller Versuchstiere ist im Anhang Kapitel 7.2 aufgeführt. Zwei Tiere zeigten auch nach Änderung der operativen Technik in den ersten Tagen nach der OP eine Schonhaltung des linken Beines. Nach 7 Tagen belasteten die Tiere das Bein wieder normal, weshalb keine Maßnahmen ergriffen wurden.

ERGEBNISSE

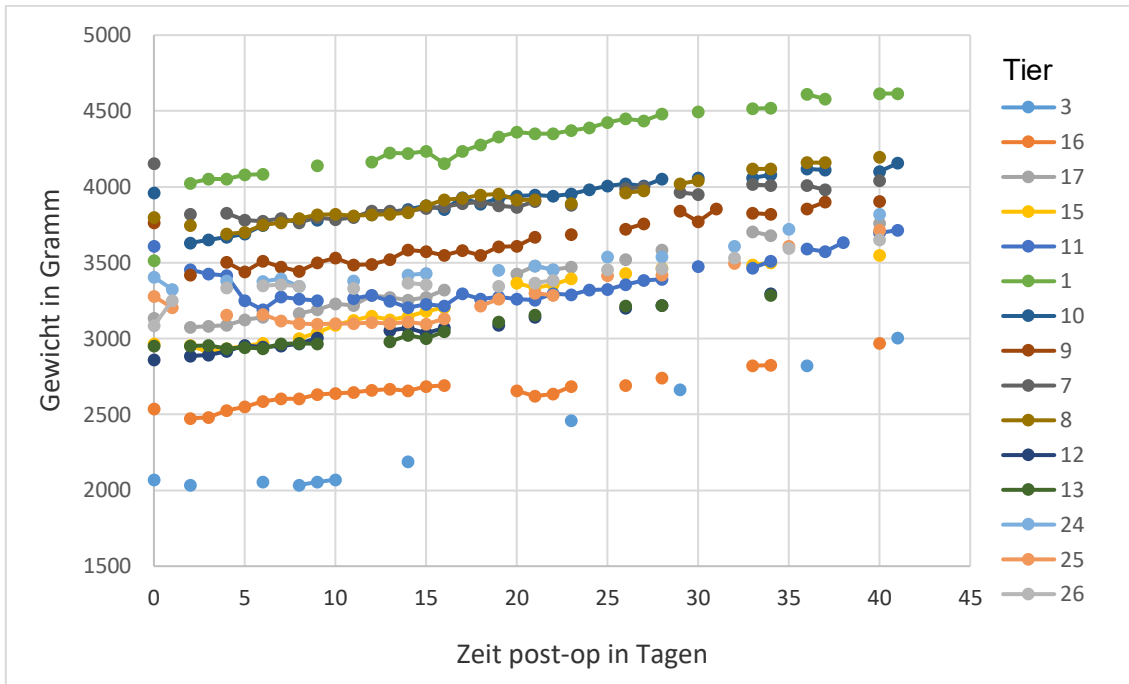


Abbildung 9 postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere mit 6 Wochen Implantat-Liegedauer

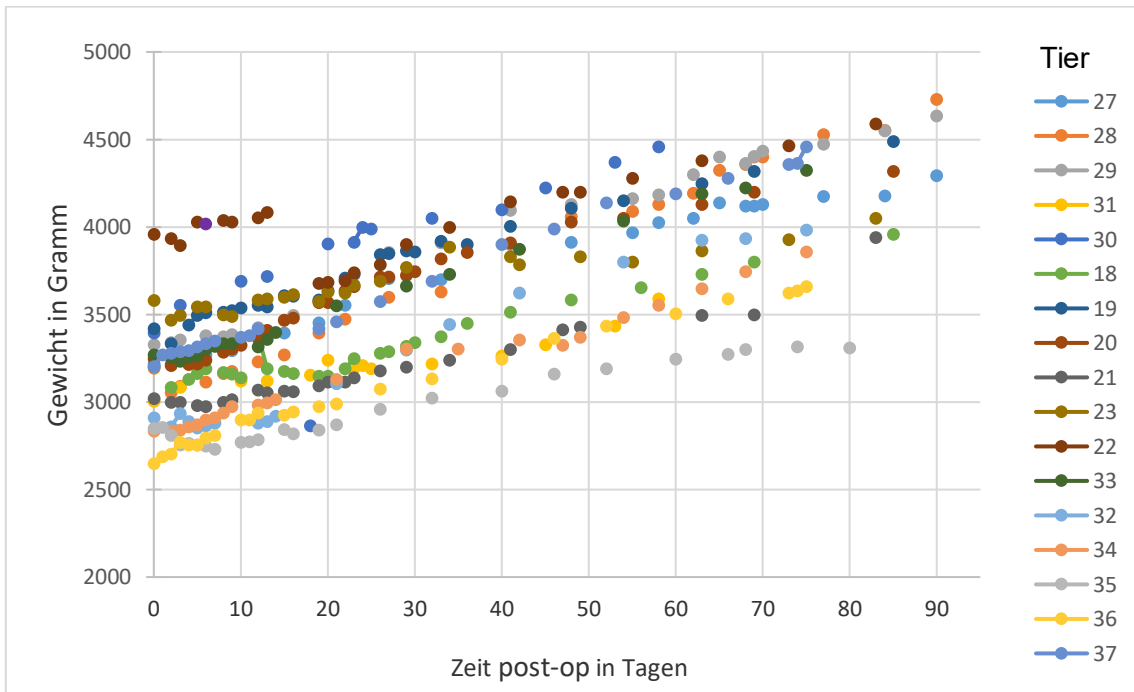


Abbildung 10 postoperative Gewichtsentwicklung der Versuchstiere mit 12 Wochen Implantat-Liegedauer

3.2 Wahl der Färbetechnik

Um die Färbetechnik mit der höchsten Aussagekraft für die vorliegende Fragestellung zu ermitteln, wurden zwei unterschiedliche Probefärbungen vorgenommen. Dazu wurden zwei Schnitte eines Femurs mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) sowie Masson-Goldner-Trichrom-Färbung (MGT) behandelt (cf. Abbildung 11).

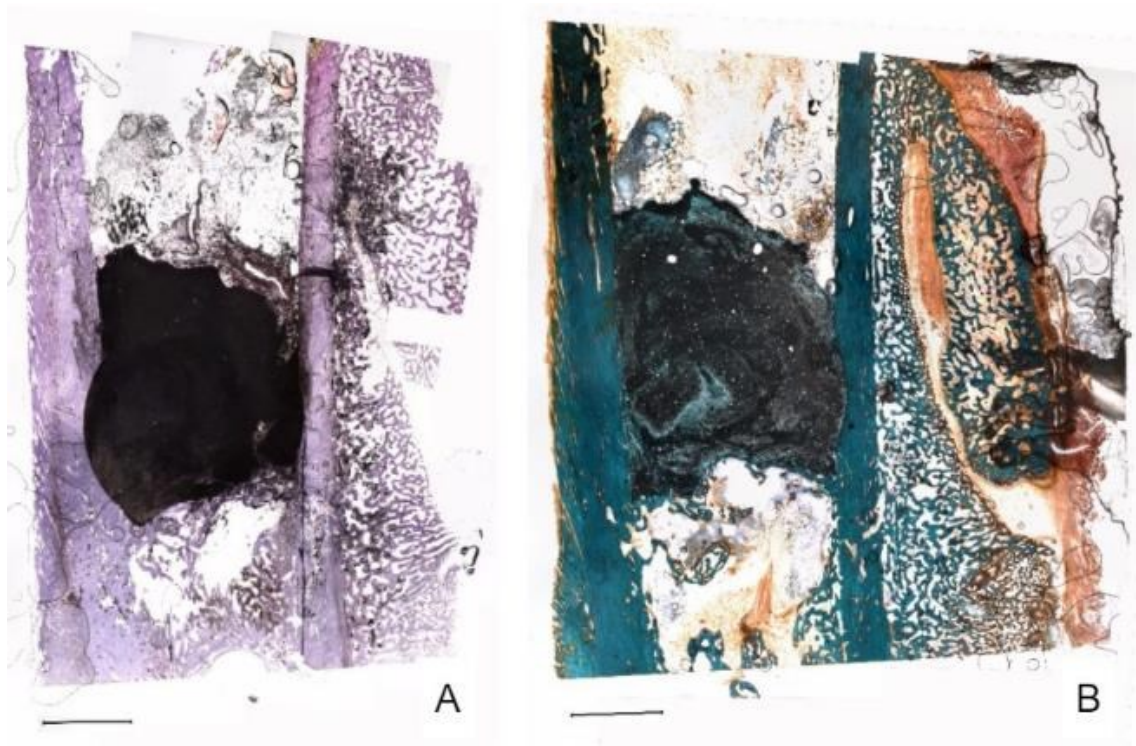


Abbildung 11 Ergebnisse der unterschiedlichen Färbetechniken

HE-Färbung (A): Anfärbung rötlich-violett und schwarz-blau. Die Unterscheidung von Knochen (rötlich) und Implantat (schwarz) ist zwar möglich, jedoch nicht die Differenzierung der zu untersuchenden Gewebe.

MGT-Färbung (B): Anfärbung grünlich, schwarz, orange. Eine Differenzierung der Gewebe ist gut möglich, auch kann zwischen bereits mineralisiertem Knochen (grün) und noch nicht mineralisiertem Knochen (orange-rot) unterschieden werden.

Eichstrich 2 mm

Wie aus Abbildung 11 ersichtlich, konnte durch die MGT-Färbung eine klarere Darstellung der unterschiedlichen Gewebe erreicht werden, weshalb sie für alle in dieser Arbeit ausgewerteten Dünnschliffe verwendet wurde.

3.3 Ergebnisse der Auswertung der Trenn-Dünnschliffe

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auswertung der Trenn-Dünnschliffe dargestellt. Ziel war es herauszufinden, wie sich die Materialien in einer Defektsituation mit Hartgewebekontakt biologisch verhalten, degradieren bzw. in Knochen umbauen und dieses Verhalten zu vergleichen. Bei der Testung auf Signifikanz der gefundenen Unterschiede wurden die Abhängigkeiten von Implantaten im selben Versuchstier berücksichtigt, woraus sich unterschiedliche Testverfahren für die einzelnen Tests ergaben. Eine Übersicht der im Einzelnen genutzten statistischen Verfahren ist dem Kapitel 2.2.8 zu entnehmen. Die ermittelten Rohdaten und Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Anhang Kapitel 7.5 und 7.6 einsehbar.

3.3.1 Zementpasten

Es wurden jeweils alle Pasten-Materialvariationen (MV) mit gleicher Implantat-Liegedauer miteinander verglichen. Das bedeutet eine Gegenüberstellung der 9 Implantate der Referenzgruppe PV (CPC) mit den 9 Implantaten der Gruppe P25 ($\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$) sowie mit den 12 Implantaten der Gruppe P75 ($\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$).

Generell wiesen alle Pasten eine gute Biokompatibilität auf. Es gab keine Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen oder Einwachsen von Bindegewebe. In Bezug auf die Neubildung von mineralisiertem Knochen und Osteoid an den Implantaten zeigte sich folgendes Bild: Für die Referenzpaste PV zeigte sich ein gutes Anwachsen des Knochens, wobei die Paste nach sechs Wochen vergleichsweise wenig resorbiert war (Abbildung 12A). Nach 12 Wochen war das Material immer noch gut zu identifizieren. Im Inneren des Materials zeigten sich, wie in Abbildung 12B zu sehen, Hohlräume, die teilweise mit mineralisiertem Knochen gefüllt waren. Die Bohrlöcher waren, wie auch in den meisten Fällen der anderen Pasten, mit Kompakta verschlossen, wobei die Dicke dieses Verschlusses von 6 zu 12 Wochen zunahm (Abbildung 12A und B rechts). Die Paste P25, daher die CMPC Paste mit dem geringeren Calcium Anteil, war nach 6 Wochen ebenfalls komplett von neuem Knochen umgeben (Abbildung 13A). Im

ERGEBNISSE

Vergleich zur Referenzpaste mit derselben Liegedauer wurde der Randbereich bereits resorbiert, wie deutlich an der nicht länger glatten Implantat-Knochengrenze zu erkennen ist. Nach 12 Wochen sind am Rand sowie auch im Zentrum des Materials Resorptionserscheinungen sichtbar (Abbildung 13B). Auch die CMPC Paste mit höherem Calcium Anteil (P75) induzierte die Neubildung von Knochen, was in Abbildung 14A gut zu erkennen ist. Hier sieht man nach 6 Wochen deutlich die Ränder des Bohrloches, an die neu gebildeter mineralisierter Knochen grenzt. Der Rest des Bohrloches wird von nicht-mineralisiertem Knochen ausgefüllt, die Implantate sind von Knochen umgeben. Auch nach 12 Wochen zeigten sich die Implantate P75, wie in Abbildung 14B, von Knochen umgeben, wobei auch einzelne Knochenstrukturen innerhalb des Materials nachweisbar waren. Entstandene Zementfragmente und -partikel waren in Knochen eingebettet (cf. Abbildung 13A und Abbildung 14A).

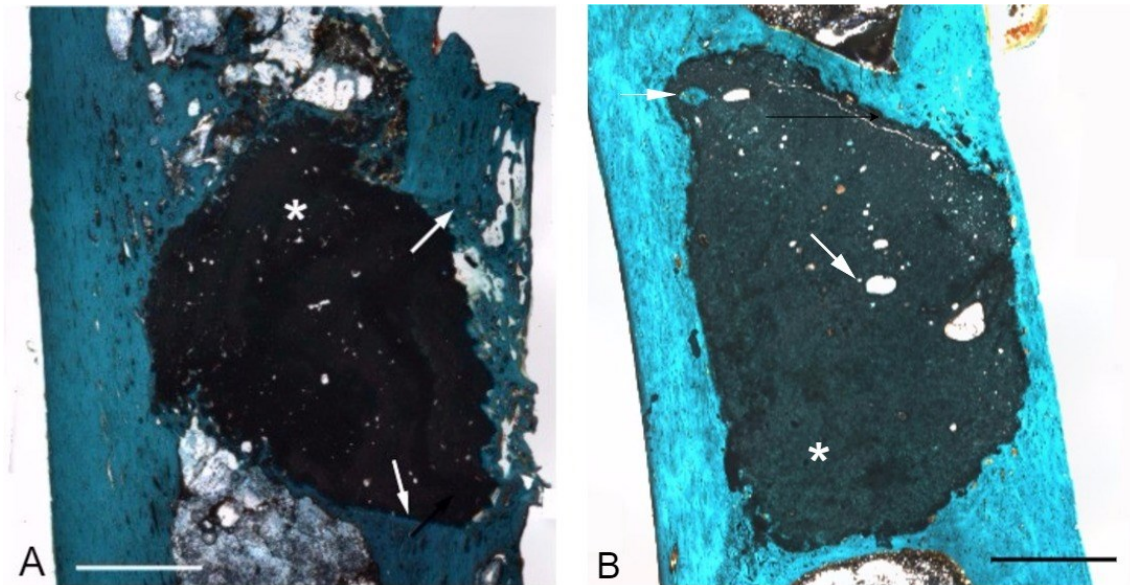


Abbildung 12 Histologische Schnitte der Referenzpaste PV nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt

Die Pasten sind mit (*) markiert und erscheinen dunkelgrün bis schwarz. A: Die Pfeile markieren die sichtbaren Ränder des Bohrloches. B: Die Pfeile markieren Hohlräume im inneren des Materials, im linken oberen Bildrand mit mineralisiertem Knochen ausgefüllt. Eichstrich 2 mm

ERGEBNISSE

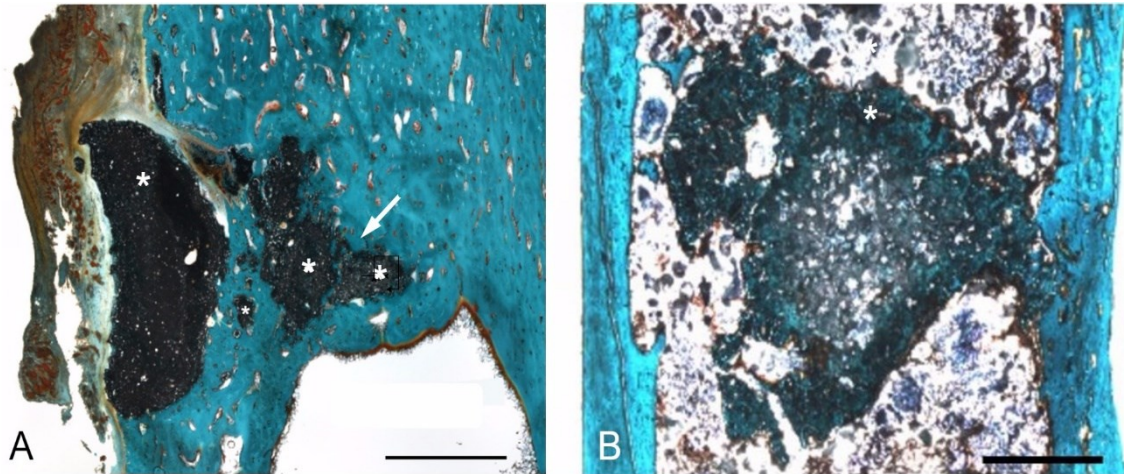


Abbildung 13 Histologische Schnitte der Paste P25 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt

Die Pasten sind mit (*) markiert und erscheinen dunkelgrün bis schwarz. A: Der Pfeil markiert die Resorptionserscheinungen im Randbereich. B: Deutliche Auflösungserscheinungen des Materials im Randbereich sowie zentral, teilweise auch Knochenstrukturen innerhalb des Materials sichtbar. Eichstrich 2 mm

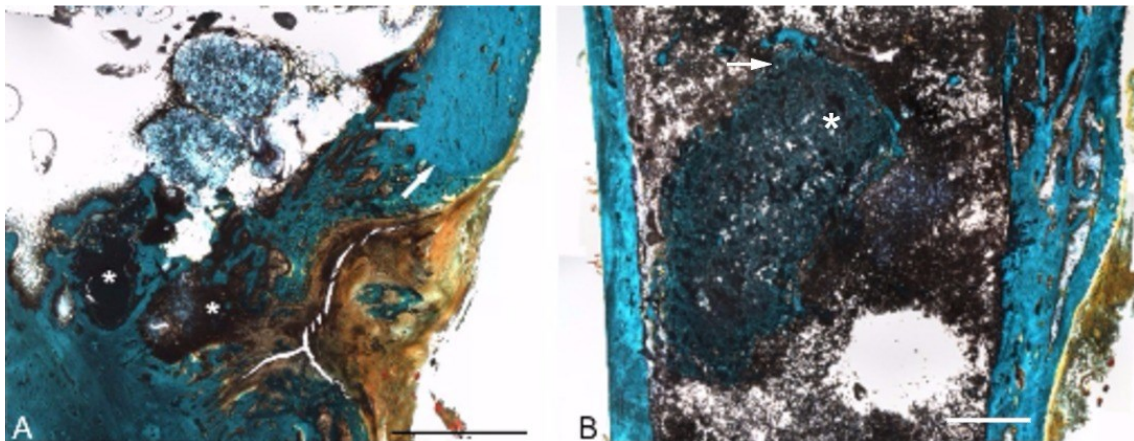


Abbildung 14 Histologische Schnitte der Paste P75 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt

Die Pasten sind mit (*) markiert und erscheinen dunkelgrün bis schwarz. A: Die Pfeile markieren die sichtbaren Ränder des Bohrloches. Sichtbar ist der Übergang zum frisch gebildeten mineralisierten Knochen sowie nicht mineralisierten Knochen, der das restliche Bohrloch ausfüllt. B: Der Pfeil markiert mineralisierten Knochen im Implantatkontakt. Eichstrich 2 mm

Die direkt nach der Explantation der Femora angefertigten Röntgenaufnahmen bestätigen die anhand der histologischen Präparate getätigten Aussagen (**Abbildung 15**). In den Röntgenbildern stellt sich die Paste als helle Struktur innerhalb des Knochens dar. Die Kortikalis des Knochens ist gut als sehr helle Linie an den äußeren Rändern des Knochens zu sehen. Vergleicht man die

Helligkeit des Materials mit jener der Kortikalis in **Abbildung 15A** und B, so fällt für die Referenzpaste auf, dass sie nach 6 wie nach 12 Wochen ähnlich hell wie die Kortikalis und scharf abgegrenzt ist. Die PV Paste zeigt kaum Änderung der Röntgenopazität über die Zeit. Es ist also nicht anzunehmen, dass hier ein Abbau des Materials erfolgt, denn der würde mit einem Verlust an Opazität und damit einer dunkleren und weniger scharf begrenzten Darstellung des Materials im Röntgenbild einhergehen. Anhand der niedrig Ca-dotierten Magnesiumphosphat Paste P25 (Abbildung 15C und D) lässt sich dieser Effekt gut nachvollziehen. Hier kann man nach 6 Wochen klar die helle, der Kortikalis ähnelnde Struktur des Materials sehen. Nach 12 Wochen hat die Opazität stark abgenommen, der verbleibende Materialrest stellt sich hellgrau, weniger gut von seiner Umgebung abgrenzbar und mit unscharfen, unregelmäßigen Randbereichen dar. Hier ist davon auszugehen, dass nach 12 Wochen ein vermehrter Abbau stattgefunden hat, welcher zu einem weniger röntgendichten Material führte. Bei Abbildung 15E lässt sich erkennen, dass die hoch Ca-dotierte Magnesiumphosphat Paste P75 bereits nach 6 Wochen im direkten Vergleich mit der Kortikalis des Knochens dunkler, grauer und weniger scharf abgrenzbar ist. Hier scheint das Material bereits nach 6 Wochen in Auflösung begriffen zu sein. Nach 12 Wochen (F) ist der Effekt noch stärker ausgeprägt, die Ränder des Materials sind nicht mehr klar differenzierbar. Zusammenfassend lässt sich also ein stärkerer Abbau der CMPC Pasten anhand der Röntgenbilder annehmen.

Alle angefertigten Röntgenbilder der Pasten in situ finden sich im Anhang unter 7.3 Röntgenbilder der Femora der Versuchstiere.

ERGEBNISSE

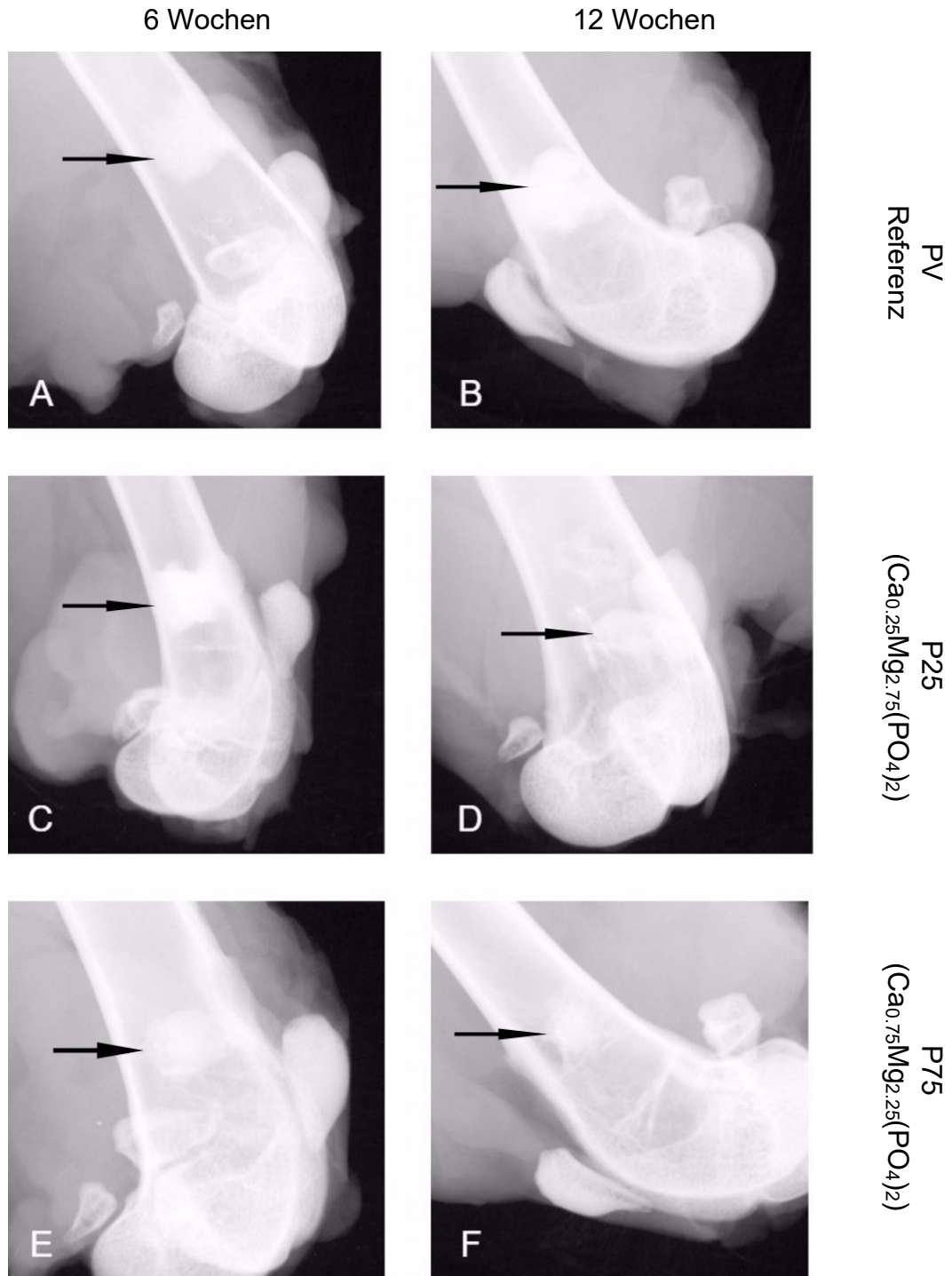


Abbildung 15 Röntgenaufnahmen Zementpasten in den Femora direkt nach Explantation
Material im Knochen durch Pfeile markiert

3.3.2 Analyse der Knochenneubildung an den Zementpasten

Nachfolgend sind die Ergebnisse für den prozentualen Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) der Zementpasten dargestellt, welche durch die in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Verfahren generiert wurden. KIK% ist jener prozentuale Anteil des Implantat-Umfangs, welcher in direktem Kontakt mit mineralisiertem Knochen steht.

Bei allen Materialvariationen kam es zur Bildung von mineralisiertem Knochen im direkten Kontakt zum implantierten Material. Nach einer Liegedauer des Materials von 6 Wochen hatten sich für alle Untersuchungsgruppen (UG) ähnliche prozentuale Anteile von mineralisiertem Knochen an dem Gesamtumfang der Implantate gebildet. 12 Wochen nach Einsetzen des Materials konnte für die Materialvariation P75 mehr mineralisierter Knochen nachgewiesen werden als für P25. Der größte Anteil an mineralisiertem Knochen im direkten Implantatkontakt hatte sich an Implantaten der Gruppe PV gebildet. Da von jedem Femur und damit Implantat 2 Trenn-Dünnschliffe angefertigt wurden ergeben sich als Rohdaten jeweils 2 Werte für KIK%. Diese sind in den Punktediagrammen Abbildung 16, für Implantate mit 6 Wochen Liegedauer, und Abbildung 17, für Implantate mit 12 Wochen Liegedauer, abgebildet. Die genauen Werte sind der Tabelle im Anhang Kapitel 7.5 zu entnehmen.

ERGEBNISSE

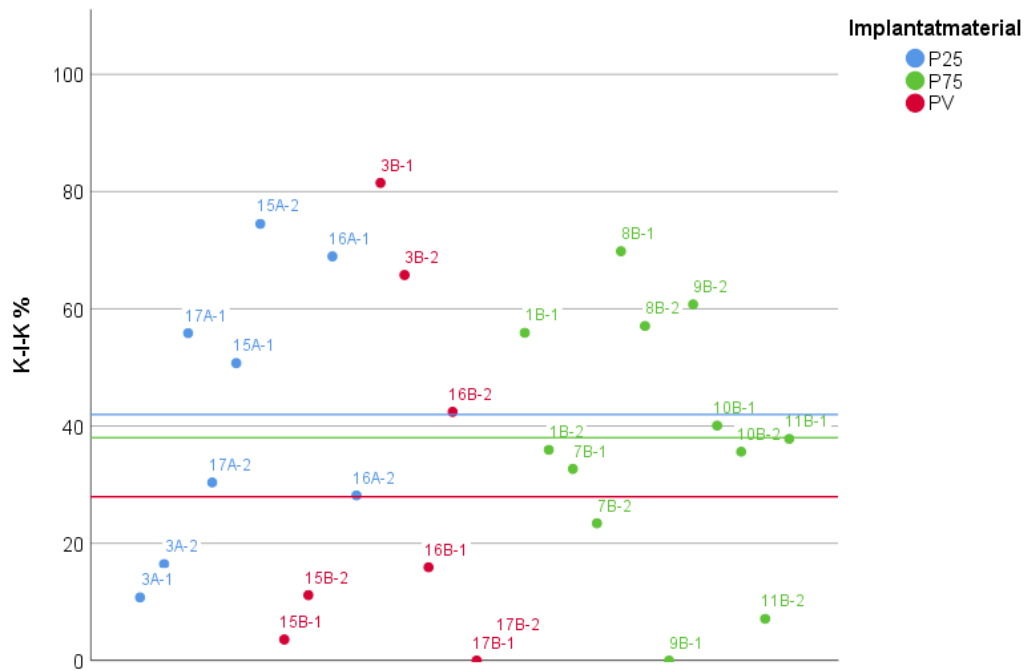


Abbildung 16 Pasten mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des KIK% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (PV), blau (P25) oder grün (P75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert aller Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe (PV=27,9%, P25=42%, P75=38%). Die KIK% Werte sind nach 6 Wochen Liegedauer für alle Materialvariationen recht gleichmäßig verteilt.

ERGEBNISSE

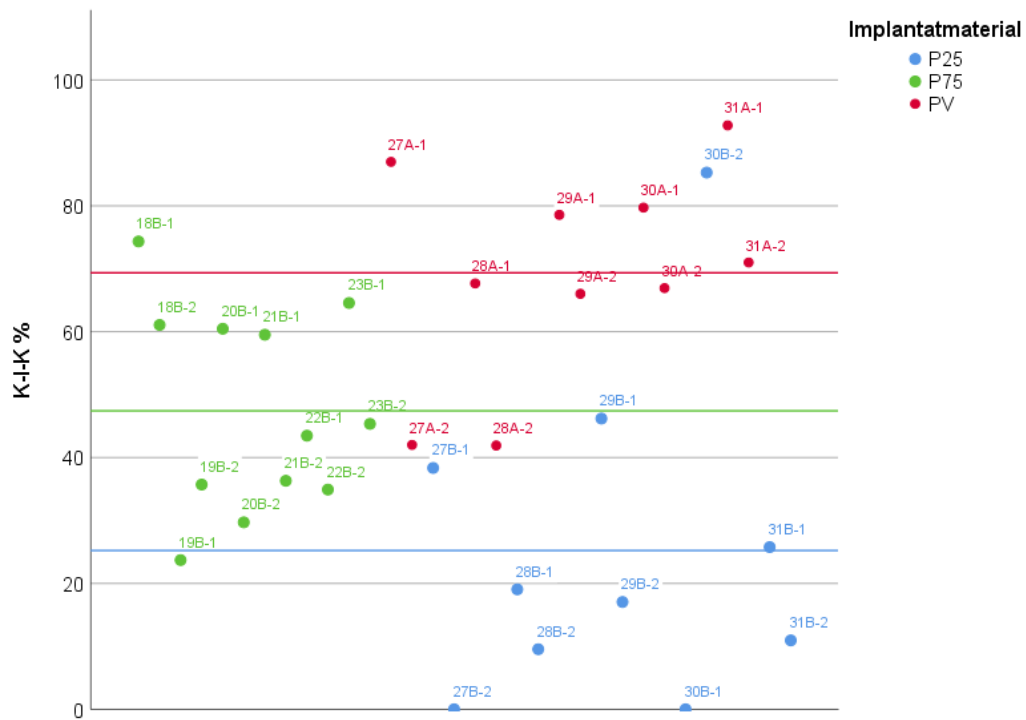


Abbildung 17 Pasten mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des KIK% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (PV), blau (P25) oder grün (P75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert aller Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe (PV=69,4%, P25=25,2%, P75=47,4%). PV hat höhere Werte für KIK% als die anderen Beiden Untersuchungsgruppen.

ERGEBNISSE

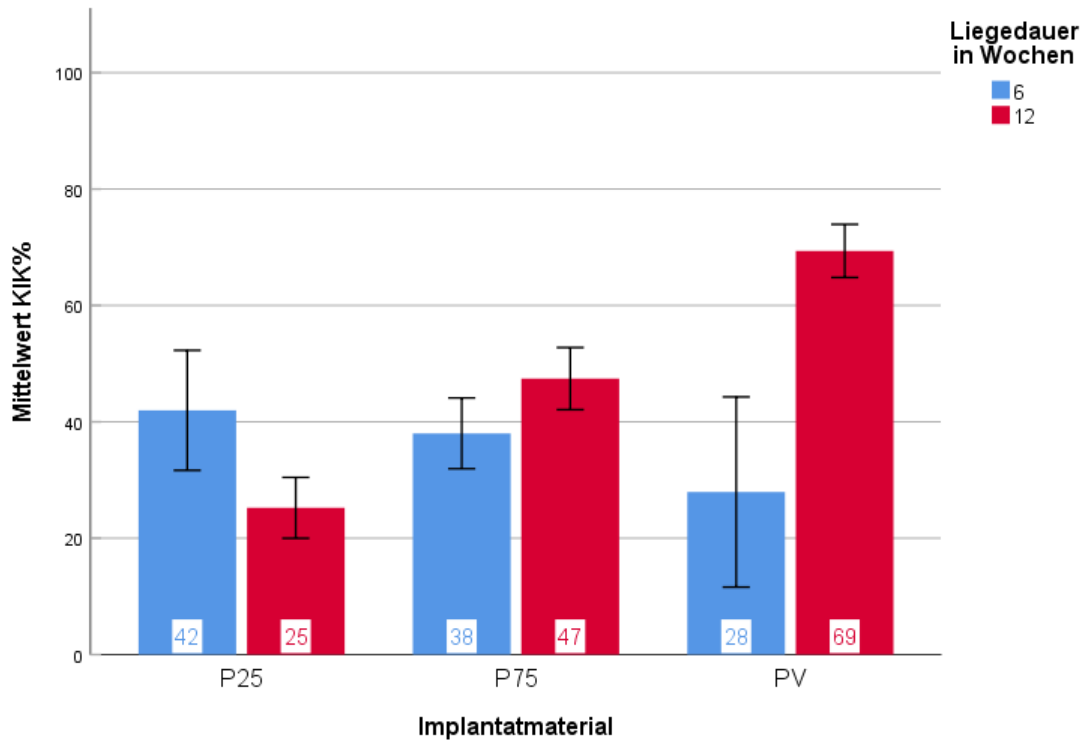


Abbildung 18 Zementpasten – Mittelwerte der KIK%

Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte des KIK% der jeweiligen Untergruppen. Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer sind blau markiert, jene mit 12 Wochen Liegedauer rot. Der Mittelwert der jeweiligen UG ist am unteren Ende der Balken angegeben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler mit einfacher Multiplikation.

Für die Zementpasten waren alle Untersuchungsgruppen (UG) gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt, $p > 0.05$.

Nach 6 Wochen waren die Mittelwerte der UG recht ähnlich (PV=27,9%, P25=42%, P75=38%) (cf. Abbildung 18). Die Unterschiede beim Vergleich der KIK% der Pasten mit 6 Wochen Liegedauer erwiesen sich, wie auch aus Abbildung 19 ersichtlich, dabei als nicht signifikant: PV vs. P25 ($p= 0.624$), PV vs. P75 ($p= 0.520$), P25 vs. P75 ($p= 0.732$). Bei den Pasten mit 12 Wochen Liegedauer ließen sich signifikante Unterschiede nachweisen. So ist der Mittelwert mit 47,4% in der Gruppe P75 signifikant höher ($p= 0.017$) als für P 25 mit 25,2%. Für PV ergaben sich mit einem Mittelwert von 69,4% nach 12 Wochen die signifikant höchsten KIK% Werte, um 44,1% mehr als in P25 ($p= 0.001$) und 21,9% mehr als in P75 ($p=0.014$). Für die Gruppen PV und P75 lässt sich eine

ERGEBNISSE

Tendenz zu höheren KIK% Werten bei längerer Liegedauer erkennen, für die Gruppe P25 ist der Trend genau umgekehrt.

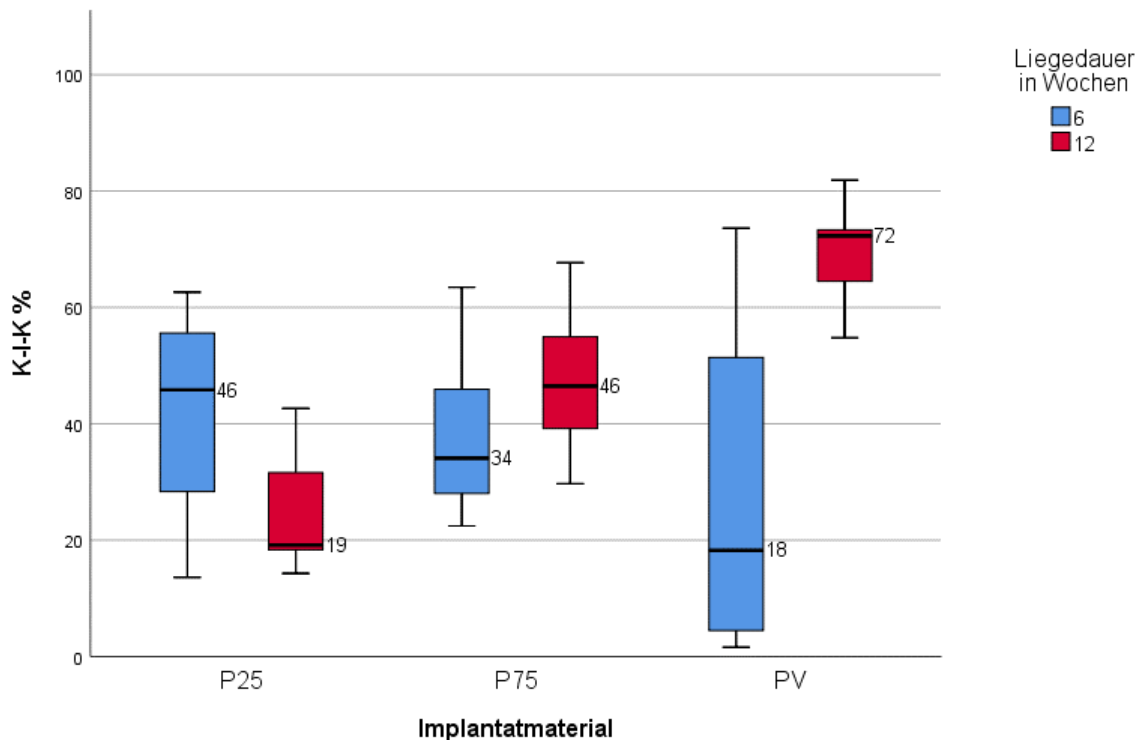


Abbildung 19 Zementpasten-KIK% in den Gruppen PV, P25 und P75

Die Ergebnisse des K-I-K% der Implantate mit 6 Wochen Liegedauer sind blau dargestellt, die der Implantate mit 12 Wochen Liegedauer rot. Das Ergebnis des Medianwerts ist neben dem Median angegeben.

3.3.3 Analyse des Osteoids im Pasten Kontakt

Nachfolgend sind die Ergebnisse für die Zementpasten bezüglich des nicht mineralisierten Knochens (Osteoid) im direkten Kontakt mit dem Implantat beschrieben. Der prozentuale Anteil an Osteoid am Implantat-Umfang findet Ausdruck im Wert ‚Osteoid-Implantat-Kontakt‘ (OST%).

Zwischen den Untersuchungsgruppen waren keine signifikanten Unterschiede in der Menge an Osteoid im Kontakt zum Implantat festzustellen. Im Zeitraum von 6 bis 12 Wochen lässt sich für alle UG eine Abnahme des Osteoid-Anteils am Umfang feststellen (cf. Abbildung 22). Im Vergleich zum mineralisierten Knochen waren deutlich kürzere Strecken an noch nicht mineralisiertem Knochen zu

ERGEBNISSE

beobachten. Das schlägt sich in den Werten für OST% nieder, welche entsprechend kleiner ausfallen. Die Werte aller Trenn-Dünnschliffe sind in den Punktediagrammen Abbildung 20 für Implantate mit 6 Wochen Liegedauer und in Abbildung 21 für Implantate mit 12 Wochen Liegedauer dargestellt. Man erkennt in beiden Diagrammen die eher homogene Verteilung der Daten.

ERGEBNISSE

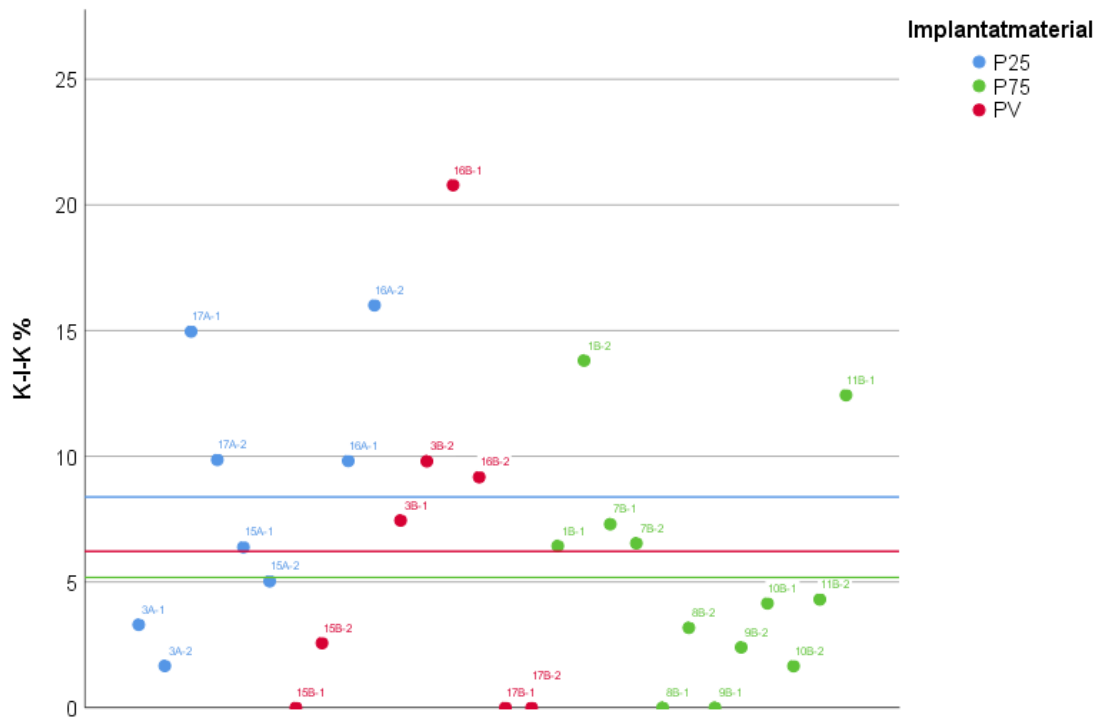


Abbildung 20 Pasten mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des OST% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (PV), blau (P25) oder grün (P75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert aller Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe (PV=6,2%, P25=8,4%, P75=5,2%). Die OST% Mittelwerte liegen für alle UG nah beieinander.

ERGEBNISSE

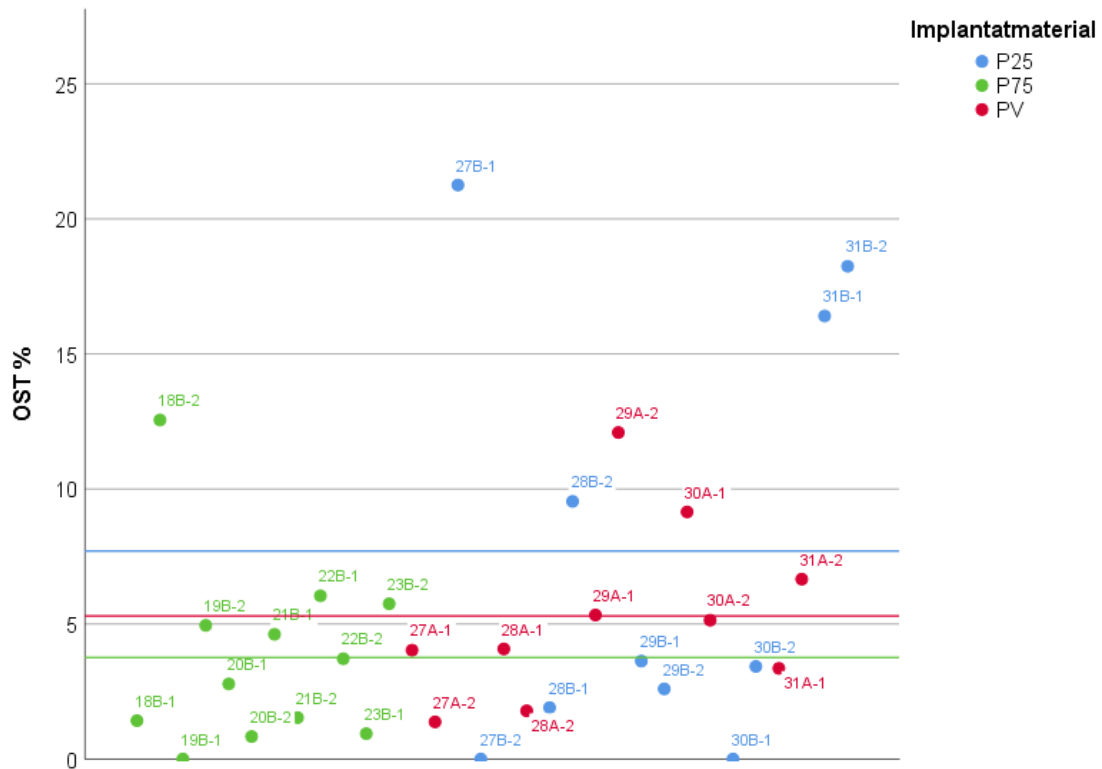


Abbildung 21 Pasten mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des OST% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (PV), blau (P25) oder grün (P75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert aller Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe (PV=5,3%, P25=7,7%, P75=3,8%). Auch hier sind die Mittelwerte ähnlich.

ERGEBNISSE

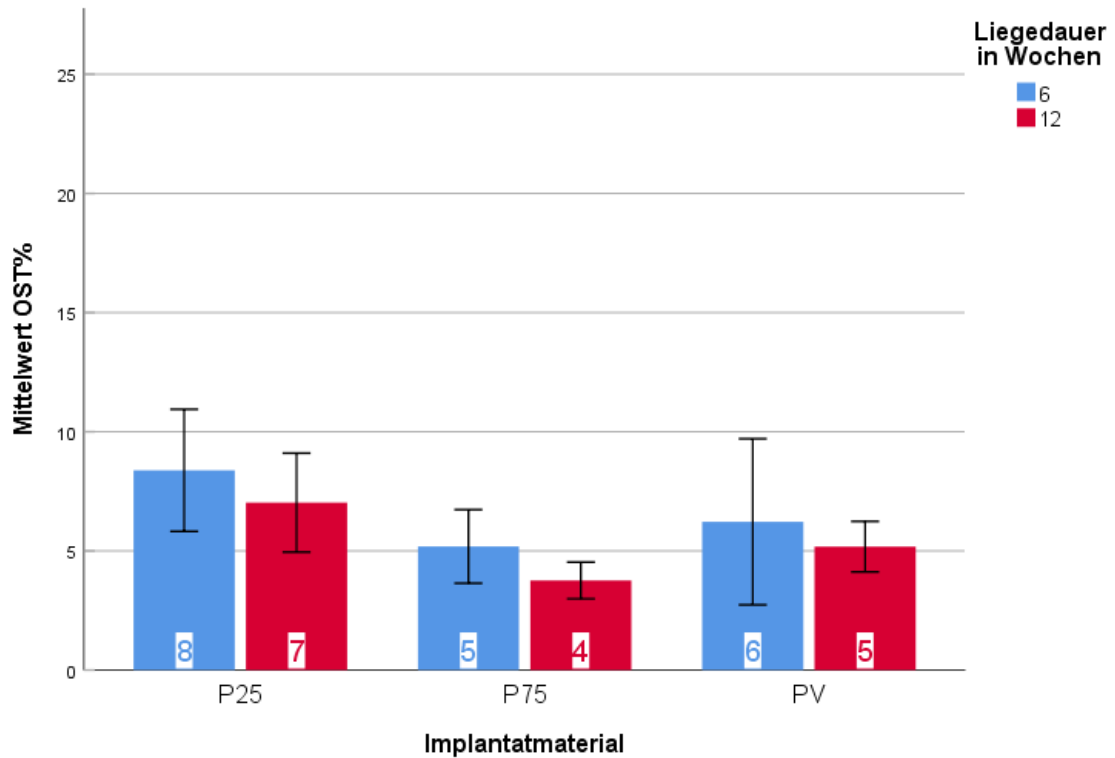


Abbildung 22 Zementpasten – Mittelwerte der OST%

Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte des OST% der jeweiligen Untergruppen. Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer sind blau markiert, jene mit 12 Wochen Liegedauer rot. Der Mittelwert ist am unteren Ende der Balken angegeben. Die Ordinate wurde zur besseren Übersicht bis 25 % skaliert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler mit einfacher Multiplikation. Die Mittelwerte kommen recht ähnlich zu liegen.

Alle Untersuchungsgruppen (PV, P25, P75) waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt, $p > 0.05$.

Wie in Abbildung 23 angedeutet ergaben sich nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Werte für OST% waren in allen Untersuchungsgruppen ähnlich niedrig. Zwar hat PV mit 8,38% nach 6 Wochen und 7,70% nach 12 Wochen die höchsten OST% Werte. Die Unterschiede zu den anderen Untersuchungsgruppen reichten jedoch nicht aus, um als statistisch signifikant in Erscheinung zu treten. Ähnlich verhält es sich mit der Differenz zwischen PV und P75, sie liegt für 6 Wochen bei 1,04% ($t(8) = 0.309$; $p = 0.765$) und für 12 Wochen

ERGEBNISSE

bei 1,54% ($t(9) = 1.113$; $p = 0.286$). In allen Gruppen haben die OST% von 6 nach 12 Wochen Liegedauer tendenziell abgenommen.

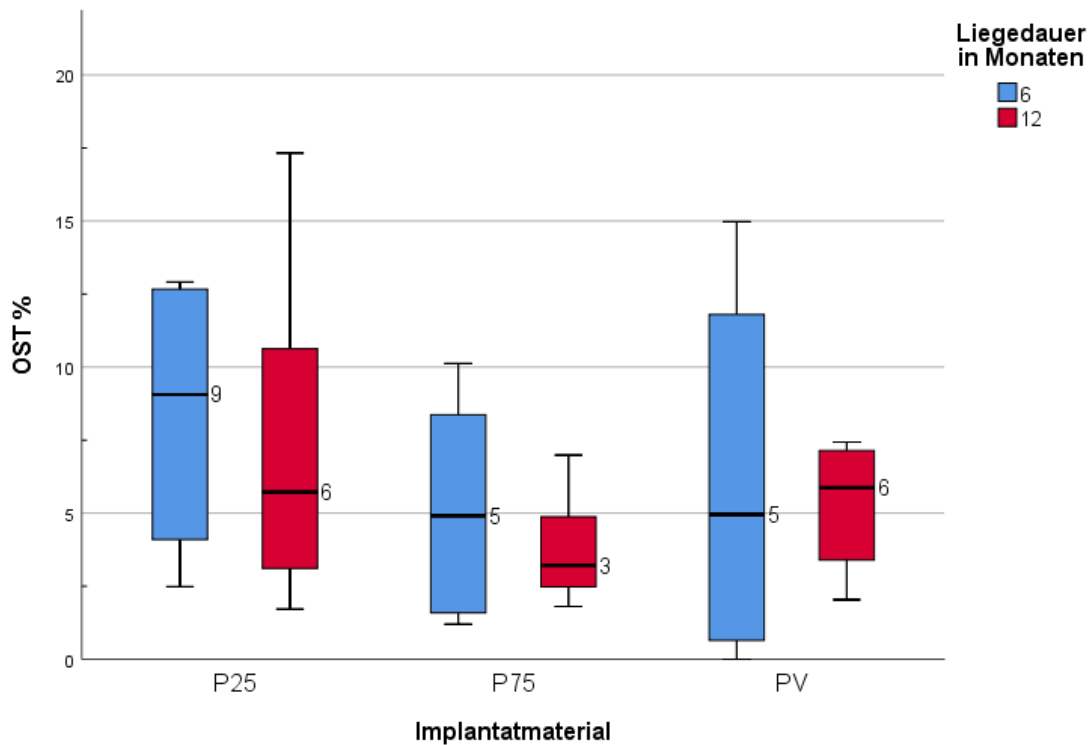


Abbildung 23 Zementpasten - OST% in den Gruppen PV, P25 und P75

Die Ergebnisse des OST% der Implantate mit 6 Wochen Liegedauer sind blau dargestellt, die der Implantate mit 12 Wochen Liegedauer rot. Das Ergebnis des Medianwerts ist neben dem Median angegeben.

Damit ergab sich zwischen keiner der Materialvariationen ein statistisch signifikanter Unterschied, weder nach 6 noch nach 12 Wochen. ($p > 0.050$)

3.3.4 Zementgranulate

Es wurden jeweils alle Materialvariationen mit gleicher Implantat-Liegedauer miteinander verglichen. Das bedeutet für die Zementgranulate eine Gegenüberstellung der 12 Implantate der Referenzgruppe GV (CPC) mit den 11 Implantaten der Gruppe G25 ($\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{2.75}(\text{PO}_4)_2$) sowie mit den 11 Implantaten der Gruppe G75 ($\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$). Es wurde die Neubildung von mineralisiertem Knochen und Osteoid am Implantat untersucht sowie die Degradation des Materials im Zeitverlauf.

ERGEBNISSE

Generell wiesen alle Granulate eine gute Biokompatibilität auf. Es gab keine Anzeichen für ein Entzündungsgeschehen. In Bezug auf die histologischen Schnitte zeichnet sich ein ähnliches Bild ab wie bei den Pasten. Um alle Materialien lässt sich Knochenneubildung nachweisen. Die Referenzgranulate GV sind nach 6 wie 12 Wochen immer noch gut sichtbar, was dafür spricht, dass hier kaum Abbau stattfand (Abbildung 24A und B). Die einzelnen Partikel sind zum Großteil von neu gebildetem mineralisierten Knochen umgeben, wobei es auch zur Knochenbildung kam, wenn die Granulat-Partikel außerhalb des Markraums periostal lagen (siehe mit Pfeil markierte Region, Abbildung 24A).

Auch die Granulate G25 sind komplett von neuem Knochen umgeben, wobei hier bereits nach 6 Wochen eine verringerte Anzahl und Größe der Partikel auffällt (Abbildung 25A). Es zeigen sich Auflösungserscheinungen, die Partikel sind weniger scharf umrissen und kleiner als im Falle von GV. Diese Tendenz ist nach 12 Wochen noch stärker ausgeprägt, hier lassen sich nur noch wenig Granulat nachweisen (Abbildung 25B).

Bei G75 sieht man ebenfalls deutlich eine Knochenneubildung um die Strukturen der Partikel (Abbildung 26A und B). Auch hier fällt auf, dass die Umrisse der Partikel nach 6 und vor allem nach 12 Wochen weniger scharf begrenzt sind, auch die Anzahl an sichtbaren Partikeln ist verringert.

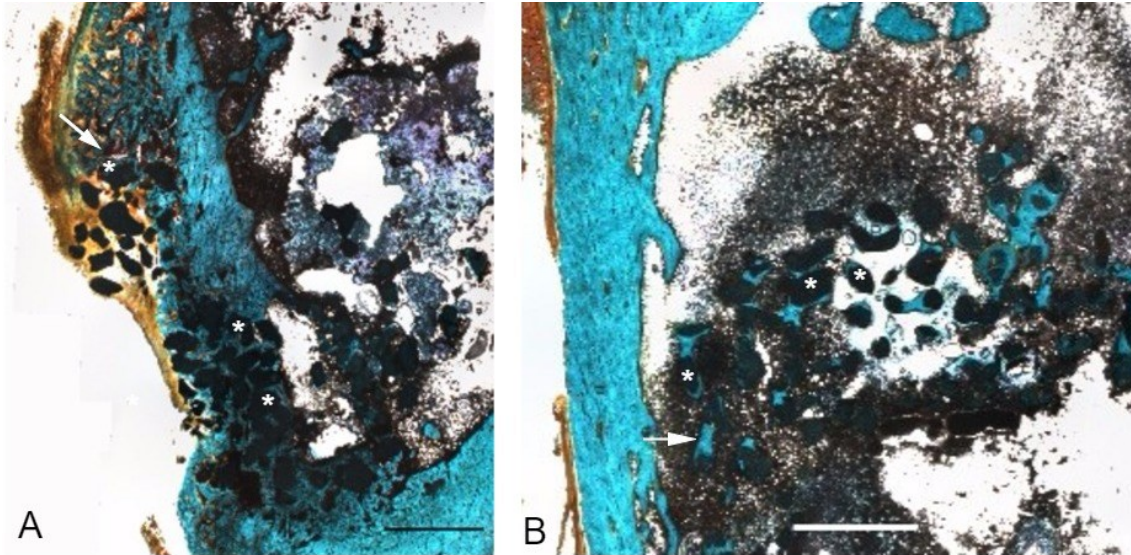


Abbildung 24 Histologische Schnitte des Granulats GV nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt.

Die Granulate sind mit (*) markiert und erscheinen als dunkelgrüne bis schwarze Flecken. Sie sind von neu gebildeten Knochen umgeben. A: Der Pfeil markiert eine Region von Knochenneubildung innerhalb des periostalen Gewebes. B: Der Pfeil markiert neu gebildeten Knochen zwischen den Partikeln. Eichstrich 2 mm

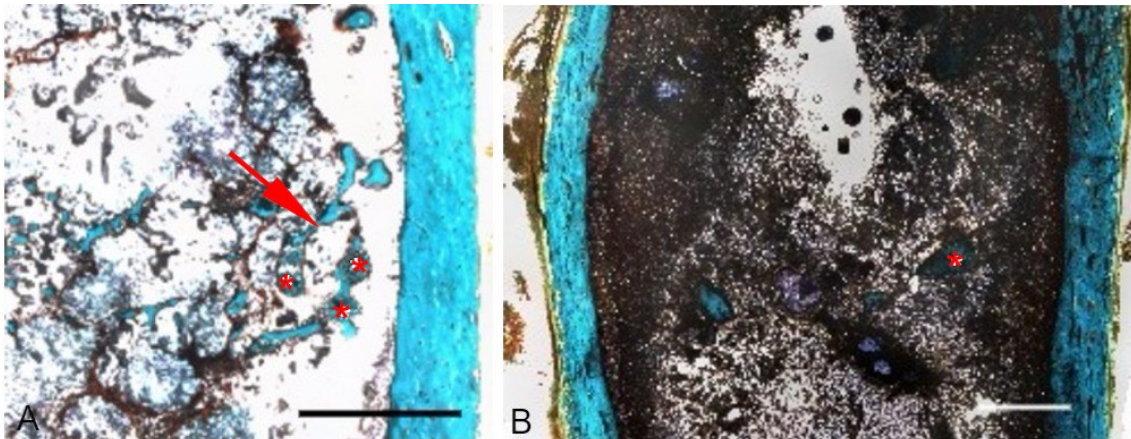


Abbildung 25 Histologische Schnitte des Granulats G25 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt

Die Granulate sind mit (*) markiert und erscheinen als graugrüne Flecken. A: Um die Partikel ist helltürkis deutlich mineralisierter Knochen erkennbar (Pfeil). B: Auch hier findet sich Knochen um den Partikel, dessen unscharfer Umriss auf Abbau des Materials hinweist. Auffällig ist hier auch die geringere Anzahl Granulat-Partikel. Eichstrich 2 mm

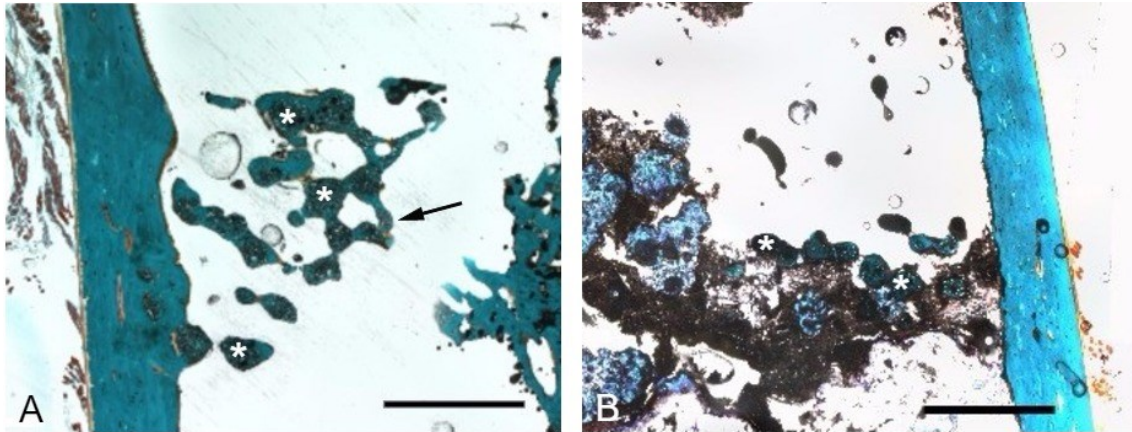


Abbildung 26 Histologische Schnitte des Granulats G75 nach 6 Wochen (A) und 12 Wochen (B) Liegedauer im Femurdefekt

Die Granulate sind mit (*) markiert und erscheinen als graugrüne Flecken. A: Die Strukturen sind von mineralisiertem Knochen umgeben (Pfeil), einige Partikel haben ihren Umfang bereits stark verringert. B: Die Partikel sind von Knochen umgeben und noch unschärfer begrenzt als nach 6 Wochen. Eichstrich 2 mm

Diese Beobachtungen werden durch die Röntgenbilder der Zementgranulate in den Femora direkt nach Explantation gestützt (Abbildung 27). In den Röntgenbildern stellen sich die Granulate als helle, körnige Struktur innerhalb des Knochens dar. Die Kortikalis des Knochens ist gut als sehr helle Linie an den äußeren Rändern des Knochens zu sehen. Das Referenzgranulat GV (A) ist nach 6 Wochen Liegedauer noch scharf begrenzt und ähnlich hell wie die Kompakta des umgebenden Knochens. Im Vergleich dazu sind die Granulate G25 (C) und G75 (E) nach 6 Wochen weniger röntgenopak, also dunkler und grauer, die einzelnen Partikel besser, in Form einer Körnung des Materials, sichtbar. Im Falle des Granulats G75 ist nur noch wenig Material nachweisbar.

Nach 12 Wochen stellt sich das Referenzgranulat GV ähnlich dar wie nach 6 Wochen (B). Das Material ist immer noch recht hell und gut abzugrenzen. Hier hat also kaum Abbau stattgefunden, der Großteil des Materials befindet sich noch im Knochen. Im Gegensatz dazu ist für die CMPC G25 (D) und G75 (F) kaum oder kein Material mehr röntgenologisch nachweisbar. Der Knochen stellt sich hier mit durchgängiger Kortikalis und ohne sichtbares Material dar. Anhand der Röntgenbilder und histologischen Präparate ist davon auszugehen, dass die Strukturen bei G25 und G75 sukzessive abgebaut werden, während bei GV weniger Veränderung in der Röntgenopazität und damit Abbau stattfindet. Im Fall

ERGEBNISSE

von G75 ist in den meisten Röntgenbildern nur noch wenig oder kein Material auszumachen.

Alle Röntgenbilder der Granulate in situ finden sich im Anhang unter 7.3 Röntgenbilder der Femora der Versuchstiere.

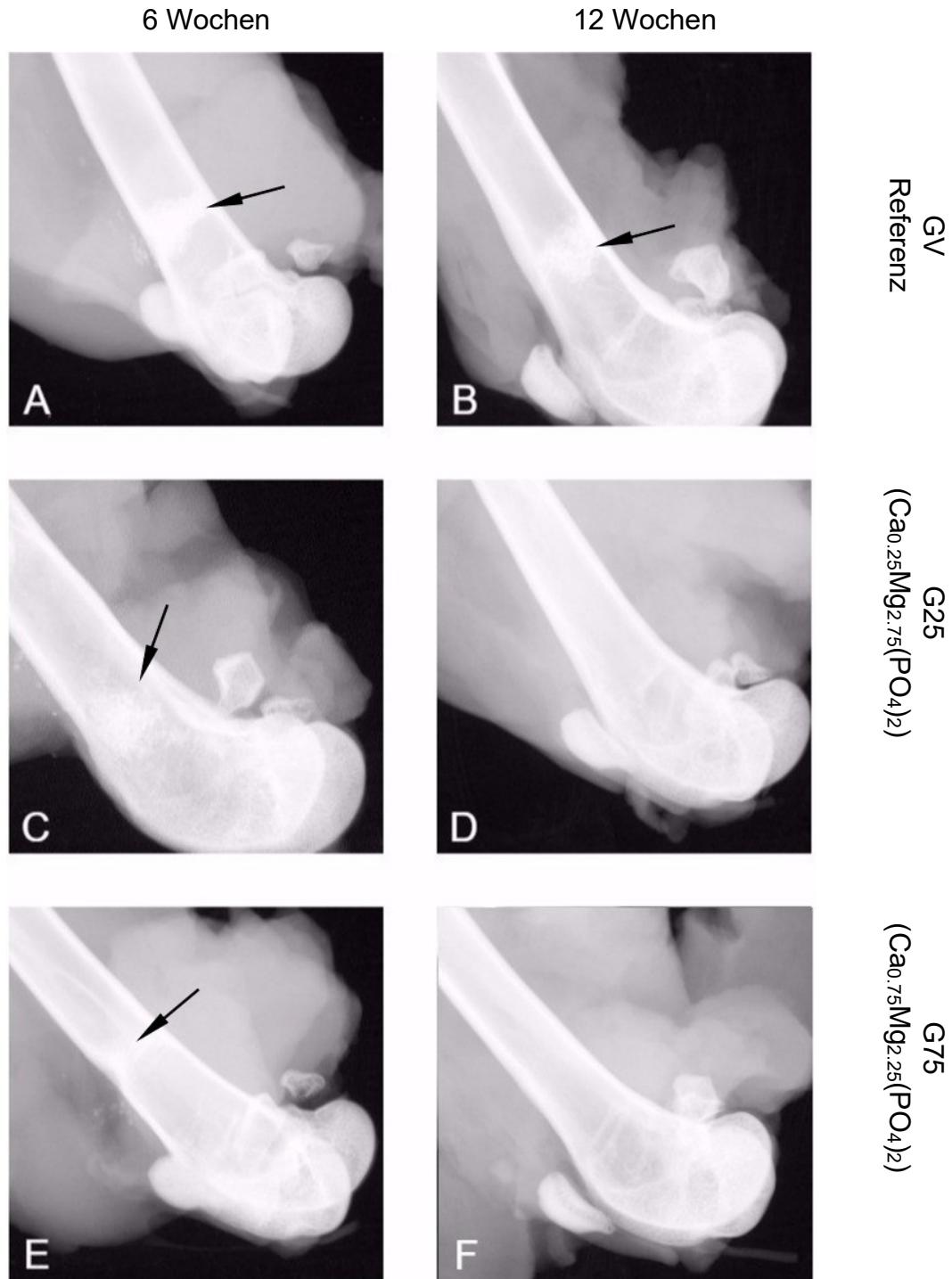


Abbildung 27 Röntgenaufnahmen Zementgranulate in den Femora direkt nach Explantation
Material im Knochen durch Pfeile markiert

3.3.5 Analyse der Knochenneubildung an den Zementgranulaten

Nachfolgend sind die Werte für den prozentualen Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) der Zementgranulate dargestellt, welche durch die in Kapitel 2.2.7

ERGEBNISSE

beschriebenen Verfahren generiert wurden. KIK% ist jener prozentuale Anteil des Implantat-Umfangs, welcher in direktem Kontakt mit mineralisiertem Knochen steht. Nach 6 wie 12 Wochen Liegedauer zeigen sich höhere Anteile mineralisierten Knochens am Umfang für die Untersuchungsgruppe GV. Im Zeitraum von 6 bis 12 Wochen lässt sich für G25 und G75 eine Tendenz zur Abnahme des KIK% feststellen. Für die Gruppe GV lässt sich dieser Trend nicht bestätigen, die Menge an Knochen im Implantatkontakt ist für 6 wie 12 Wochen ähnlich.

Mit den in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Methoden konnte in einigen der Trenn-Dünnschliffe der Gruppen G25 und G75 kein Granulat-Material mehr nachgewiesen werden. Die von diesen Femora angefertigten Röntgenbilder bestätigen das Nicht-Vorhandensein von Implantatmaterial (cf. Abbildung 28).



Abbildung 28 Radiologischer Materialnachweis

Röntgenbilder der Femora 26A (A) und 13A (B) nach 6 Wochen, sowie 33B (C) nach 12 Wochen. (A): Das eingebrachte Granulat G25 ist röntgenologisch als weiße Wolke sichtbar (Pfeil). (B), (C): Im Gegensatz dazu sind im Fall der anderen Femora weder das eingebrachte Granulat G25 (B) noch das Granulat G75 (C) röntgenologisch nachweisbar.

Hier konnten somit keine Werte für einen Knochen-Implantat-Kontakt gemessen werden. In Abbildung 29 und Abbildung 30 fällt für beide Liegedauern auf, dass dadurch die Werte einiger Trenn-Dünnschliffe auf der Abszissenachse zum Liegen kommen. Durch das Fehlen von nachweisbarem Implantatmaterial in diesen Trenn-Dünnschliffen (TDS) konnten hier keine KIK% gemessen werden. Solche TDS ohne Material kamen in den UG unterschiedlich häufig vor. So war für die Gruppe GV in allen TDS Implantatmaterial nachweisbar. Für die

ERGEBNISSE

Materialvariation G25 war teilweise in den TDS kein Material nachweisbar: nach 6 Wochen Liegedauer in 22,2 % der TDS, nach 12 Wochen 16,7% der TDS. Für die Materialvariation G75 waren in allen TDS der UG mit 6 Wochen Liegedauer Material nachweisbar, in der UG mit 12 Wochen Liegedauer hingegen nur teilweise. Hier war in 33.3 % der TDS kein Material zu sehen. Es ist davon auszugehen das hier das Material zum Untersuchungszeitpunkt bereits nicht mehr vorhanden war. Diese Trenn-Dünnschliffe wurden nicht in die Berechnung des Mittelwertes mit einbezogen, da es sonst zu einer Verfälschung des Ergebnisses gekommen wäre. Damit konnten sie auch nicht in eine statistische Auswertung der Unterschiede bezüglich der Knochenneubildung zwischen den Gruppen einfließen.

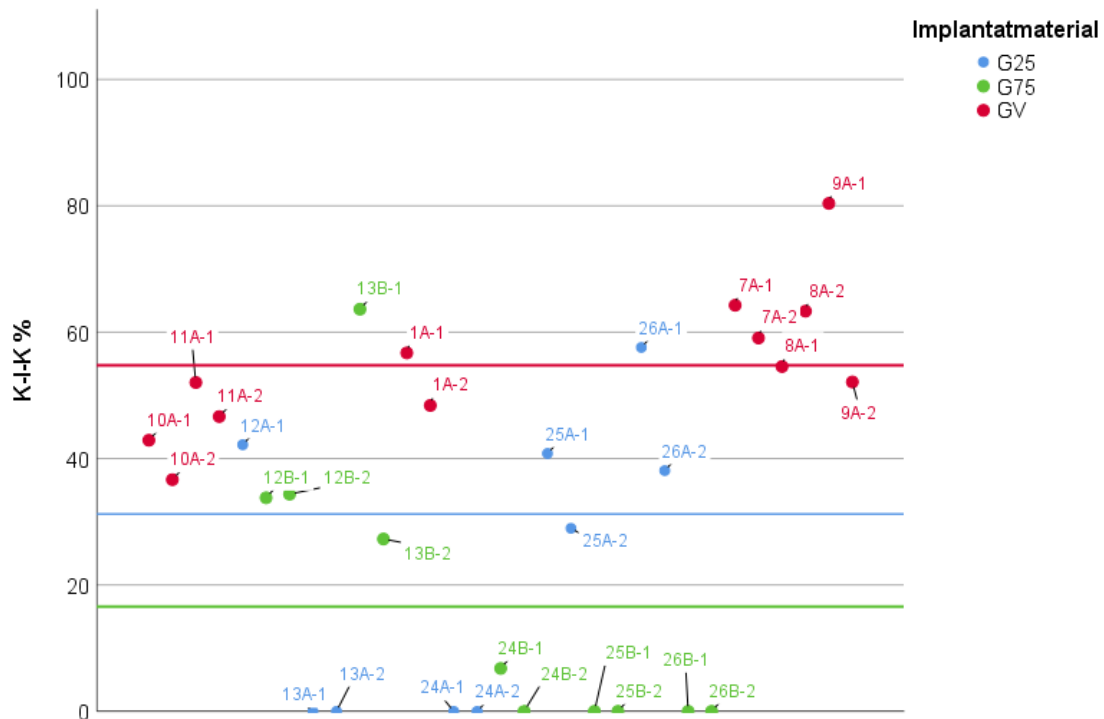


Abbildung 29 Granulate mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des KIK% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (GV), blau (G25) oder grün (G75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert jener Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe, in denen Material nachweisbar war (GV=54,8%, G25=31,2%, G75=16,6%). GV weist höhere KIK% Werte auf als die beiden anderen Gruppen. In den Trenn-Dünnschliffen der Gruppen G25 und G75 waren teils keine Granulate zu finden.

ERGEBNISSE

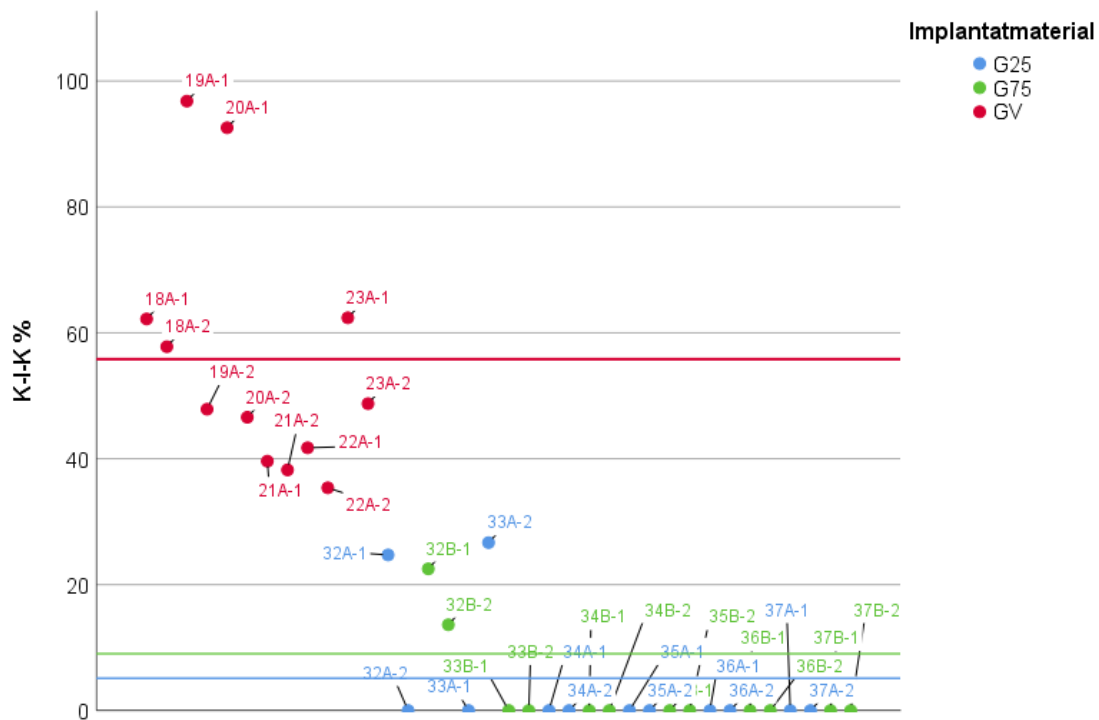


Abbildung 30 Granulate mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Knochen-Implantat-Kontakt (KIK%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des KIK% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (GV), blau (G25) oder grün (G75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert jener Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe, in denen Material nachweisbar war (GV=55,8%, G25=5,14%, G75=9%). GV weist wesentlich höhere KIK% Werte auf als die beiden anderen Gruppen. In den Trenn-Dünnschliffen der Gruppen G25 und G75 waren kaum Granulate zu finden.

ERGEBNISSE

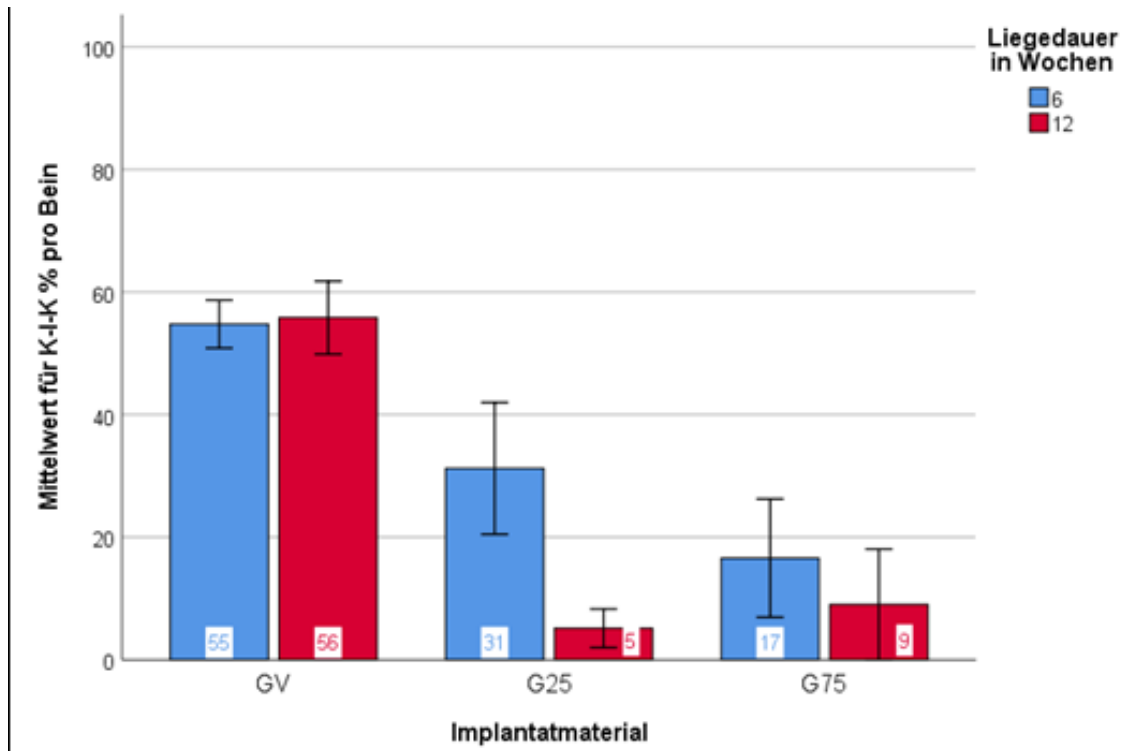


Abbildung 31 Zementgranulate – Mittelwerte der KIK %

Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte des KIK% aller TDS in denen Material nachweisbar war, sortiert nach den jeweiligen Untergruppen. Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer sind blau markiert, jene mit 12 Wochen Liegedauer sind rot. Der Mittelwert ist am unteren Ende der Balken angegeben. GV hat bei weitem die höchsten Mittelwerte, wobei die Differenz zu den anderen UG nach 12 Wochen stärker ausfällt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler mit einfacher Multiplikation.

Es wurden nur Werte der TDS, in denen man Material nachweisen konnte, für die Berechnung des Mittelwertes herangezogen. Die Mittelwerte der KIK% waren in der Gruppe GV für beide Liegedauern, mit 54,8% nach 6 Wochen und 55,9% nach 12 Wochen, am höchsten. Hier hatte sich am meisten mineralisierter Knochen an den Implantaten gebildet. In den Gruppen G25 und G75 war nach 6 Wochen weniger mineralisierter Knochen zu sehen als in GV. Im Zeitraum von 6 bis 12 Wochen lässt sich für alle UG eine Abnahme des Knochen-Anteils am Umfang feststellen, während sich der Mittelwert für die Gruppe GV für beide Zeiträume stark ähnelt.

3.3.6 Analyse des Osteoids im Granulat Kontakt

Auch die Granulate wurden auf den direkten Kontakt von nicht mineralisiertem Knochen (Osteoid) mit dem Implantatmaterial hin untersucht. In der UG G25 findet sich nach 6 Wochen der größte Anteil von Osteoid am Implantat-Umfang, gefolgt von GV. In den Gruppen GV und G75 war der Anteil nach 12 Wochen gestiegen, wobei er für GV am höchsten war. Für die UG G25 ist eine umgekehrte Tendenz zu erkennen, hier ist nach 12 Wochen kein Osteoid im Implantatkontakt mehr nachweisbar.

Wie bei KIK% erfolgte auch für den prozentualen Osteoid-Implantat-Kontakt OST% keine statistische Auswertung. Die Verteilung der Daten gestaltet sich wie die des KIK%. Besonders in den Untersuchungsgruppen mit 12 Wochen Implantat-Liegedauer sind für G25 und G75 teilweise keine Granulate nachweisbar (cf. Abbildung 32 und Abbildung 33). Für die Untersuchung des Osteoid-Implantat-Kontakts wurden TDS ohne Material nicht in die Mittelwert-Berechnungen miteinbezogen. Bei manchen TDS hingegen war zwar Material nachweisbar, aber keinerlei mit ihm in Kontakt stehendes Osteoid. Diese Fälle flossen mit OST% Werten von 0% in die Auswertung mit ein.

ERGEBNISSE

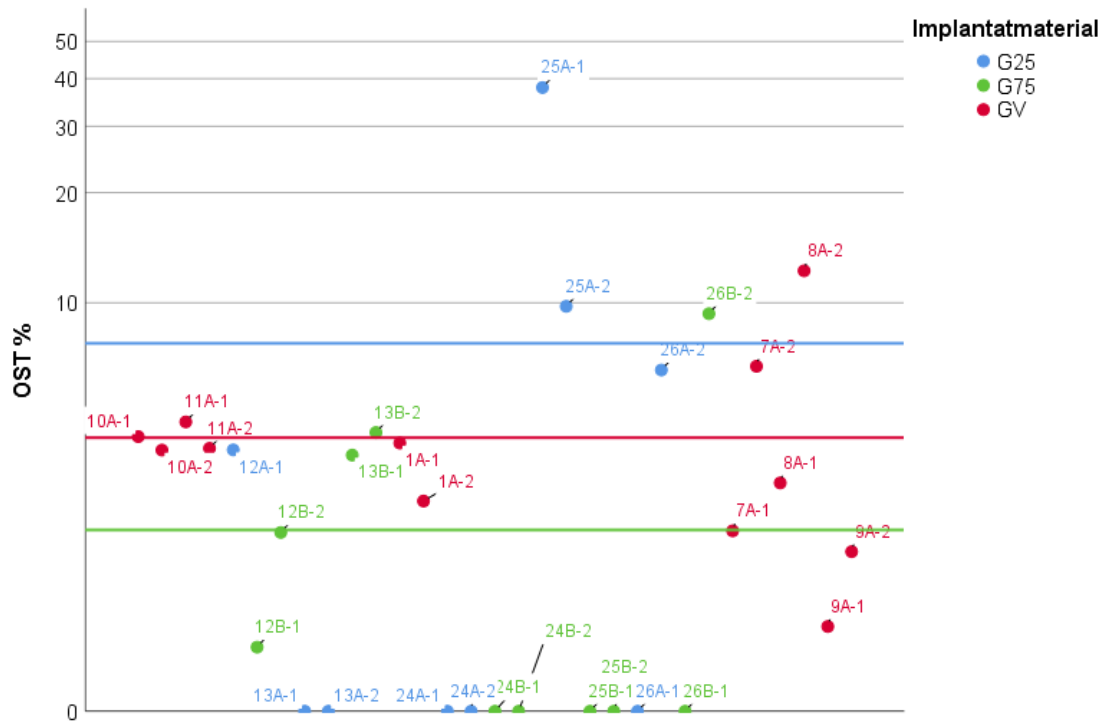


Abbildung 32 Granulate mit 6 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des OST% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (GV), blau (G25) oder grün (G75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert jener Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe in denen Material nachweisbar war (GV=4%, G25=7,7%, G75=1,9%). Die Ordinate wurde zur besseren Übersicht logarithmisch skaliert.

ERGEBNISSE

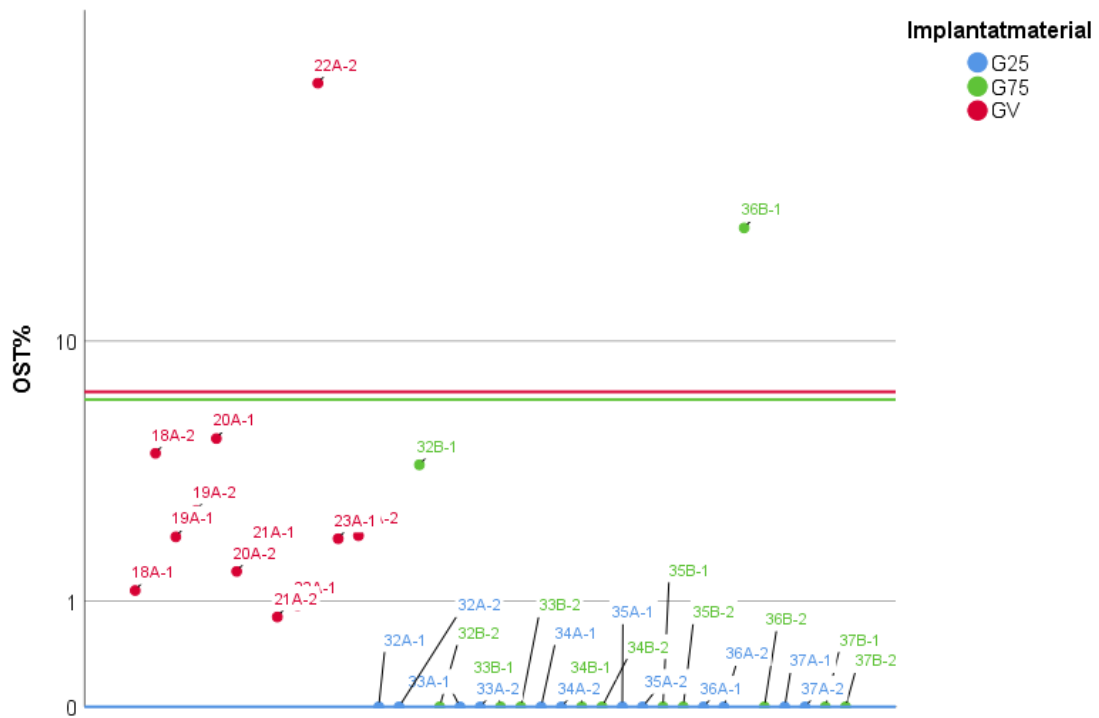


Abbildung 33 Granulate mit 12 Wochen Liegedauer prozentualer Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%) für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des OST% für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (GV), blau (G25) oder grün (G75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert jener Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe in denen Material nachweisbar war (GV=6,9%, G25=0%, G75=6,5%). Die Ordinate wurde zur besseren Übersicht logarithmisch skaliert.

ein OST von 0% ergab.

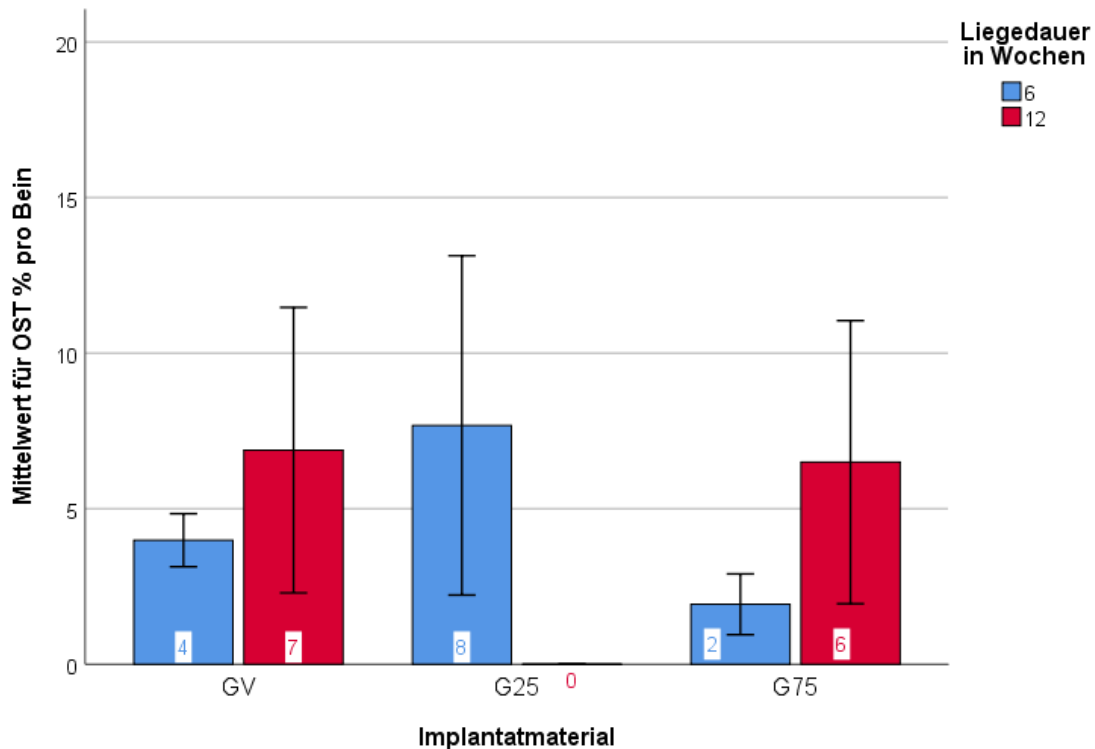


Abbildung 34 Zementgranulate – Mittelwerte der OST %

Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der OST% aller Trenn-Dünnschliffe mit nachweisbarem Material der jeweiligen Untergruppen. Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer sind blau markiert, jene mit 12 Wochen Liegedauer rot. Der Mittelwert ist am unteren Ende der Balken angegeben. Die Ordinate wurde zur besseren Übersicht bis 20 % skaliert. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler mit einfacher Multiplikation.

In die Berechnung der Mittelwerte flossen nur jene TDS mit ein, in denen Granulat nachweisbar war. In der UG G25 findet sich nach 6 Wochen der höchste mittlere Osteoid-Anteil mit 8%, gefolgt von GV mit 4%. In den Gruppen GV und G75 war der Anteil nach 12 Wochen um 4% bzw. 3% gestiegen, wobei er für GV mit 7% am höchsten war. In der UG G25 war nach 12 Wochen kein Osteoid im Implantatkontakt mehr nachweisbar (0%).

3.3.7 Degradationsverhalten der Granulate

Für alle Granulat Trenn-Dünnschliffe wurden, wie in Kapitel 2.2.7 bereits beschrieben, die Anzahl und somit der durchschnittliche Umfang der angeschnittenen Partikel in µm ermittelt. Verglichen wurden der Anfangsumfang

ERGEBNISSE

(Zeitpunkt 0) mit dem Umfang nach 6 bzw. 12 Wochen Liegedauer, mit dem Ziel dadurch Aussagen über die Degradation des Granulat-Materials in vivo treffen zu können. Die gefundenen Unterschiede im Degradationsverhalten zwischen den Materialvariationen wurden auf ihre Signifikanz getestet.

Der mittlere Umfang nahm für alle Materialvariationen vom Einsetzen des Materials bis zur Entnahme nach 6 bzw. 12 Wochen kontinuierlich ab, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. (cf. Abbildung 38 für genaue Mittelwerte). Nach 6 Wochen waren die Umfänge der Partikel aller Gruppen ähnlich stark verringert, wobei G25 einen leichten, nicht signifikanten, Vorsprung aufwies. Wie in Abbildung 35 zu sehen, war die Umfangabnahme von GV nach 12 Wochen nur wenig weiter fortgeschritten als nach 6 Wochen, wohingegen der Umfang der G75 im selben Zeitraum sehr stark zurückgegangen war.

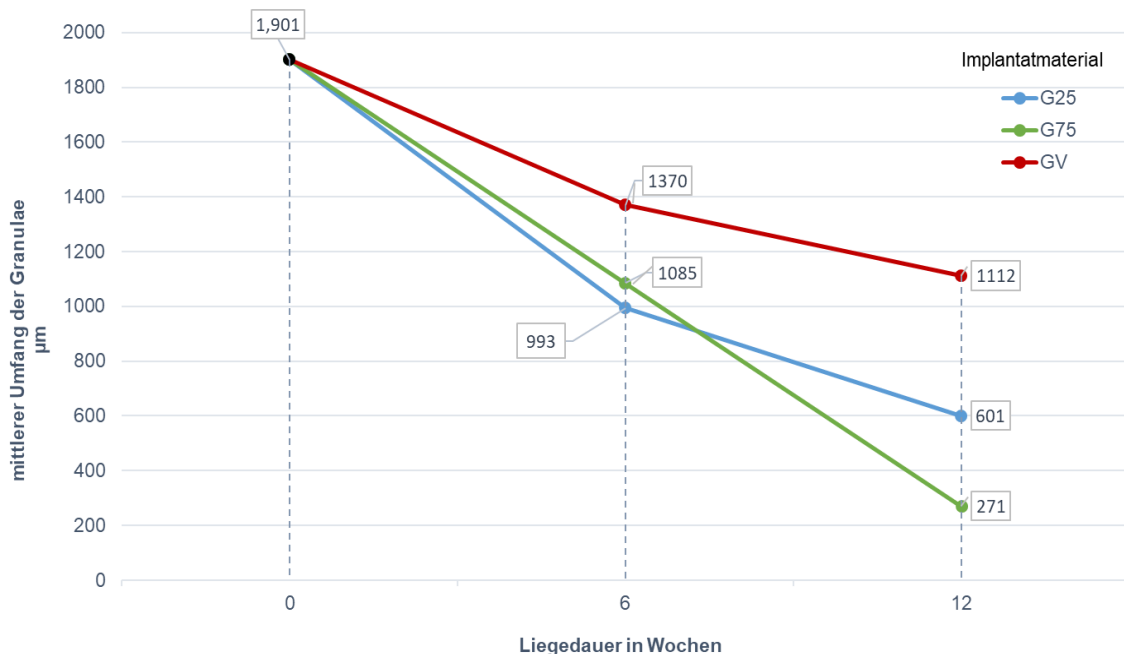


Abbildung 35 Umfangänderung der Partikel (Granulae) nach 6 und 12 Wochen

Dargestellt ist der mittlere Umfang der Partikel jeder Materialvariation (GV, G25, G75) zu verschiedenen Zeitpunkten. Liegedauer 0 entspricht dem Zeitpunkt der Operation, der mittlere Umfang war hier für alle Untersuchungsgruppen noch 1900 µm. Im Verlauf der Zeit (Liegedauer 6 und 12 Wochen) ist zu beobachten, dass der Umfang bei allen UG abnahm, wobei G75 insgesamt am stärksten degradiert war.

ERGEBNISSE

Betrachtet man die Verteilung der Daten in den Punktdiagrammen Abbildung 36 und Abbildung 37 fällt auf, dass nach 6 Wochen eine recht homogene Verteilung der Umfänge vorliegt. Die durchschnittlichen Umfänge der Granula ähneln sich demnach, wobei GV am wenigsten degradiert ist. Nach 12 Wochen zeigt sich ein anderes Bild. Generell sind die Werte für den Umfang kleiner, was sich auch in den kleineren Mittelwerten niederschlägt. Die Werte für den Umfang haben in den Gruppen G25 und G75 stärker abgenommen, was in Abbildung 38 noch deutlicher wird.

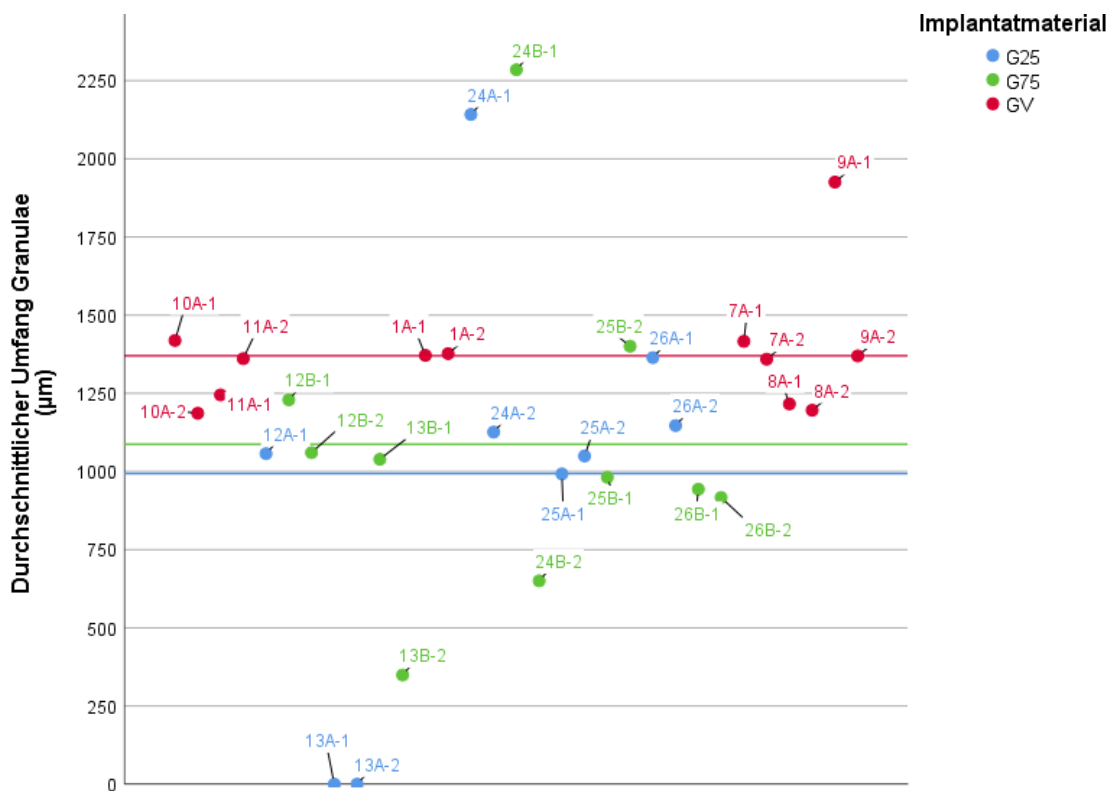


Abbildung 36 Granulate mit 6 Wochen Liegedauer Umfang der Partikel (Granulae) in µm für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des durchschnittlichen Umfangs der Partikel für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (GV), blau (G25) oder grün (G75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert aller Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe (GV=1370,1 µm, G25=993,5 µm, G75=1086,7 µm).

ERGEBNISSE

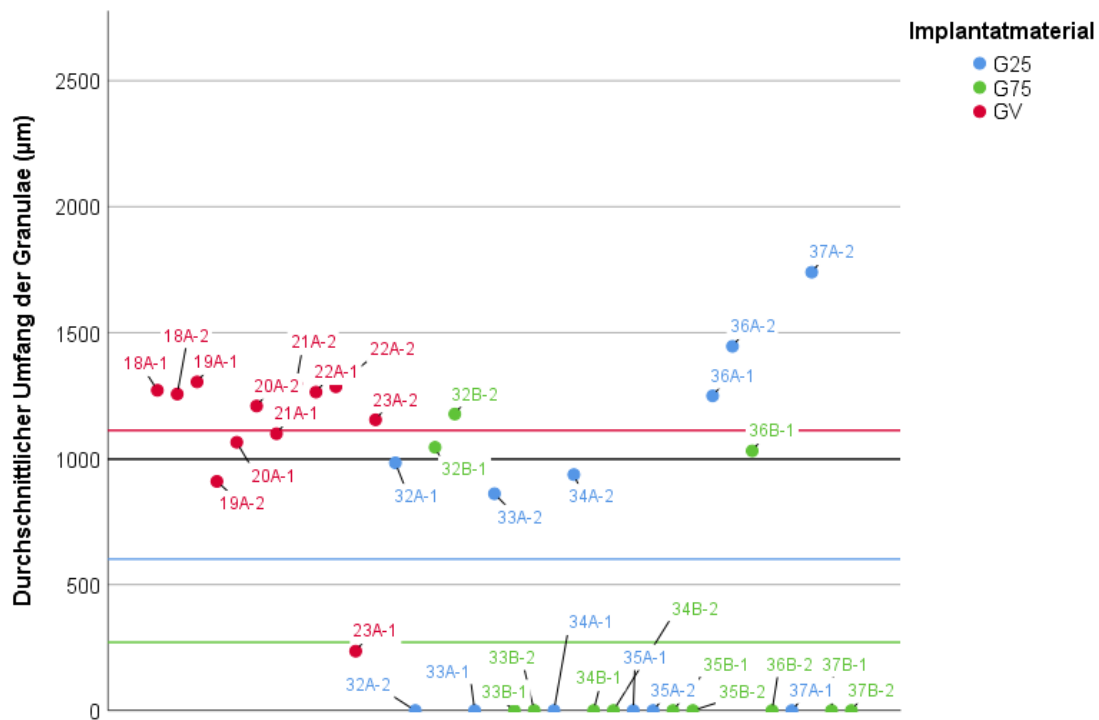


Abbildung 37 Granulate mit 12 Wochen Liegedauer Umfang der Partikel (Granulae) in µm für jeden Trenn-Dünnschliff

Im Diagramm sind die Werte des durchschnittlichen Umfangs der Partikel für jeden angefertigten Trenn-Dünnschliff dargestellt. Die Einzelpunkte sind mit den jeweiligen Implantat-Bezeichnungen beschriftet und je nach Material rot (GV), blau (G25) oder grün (G75) kodiert. Die jeweils farblich korrespondierende Linie markiert den Mittelwert aller Trenn-Dünnschliffe der jeweiligen Untergruppe (GV=1112,4 µm, G25=601,3 µm, G75=271 µm).

Die Daten waren für alle UG mit 6 Wochen Liegedauer laut Shapiro-Wilk-Test normal verteilt, $p > .05$. Nach 12 Wochen war nur G25 normalverteilt ($p > .05$), GV und G75 wiesen mit p -Werten kleiner 0.05 keine Normalverteilung auf, $p < .05$.

ERGEBNISSE

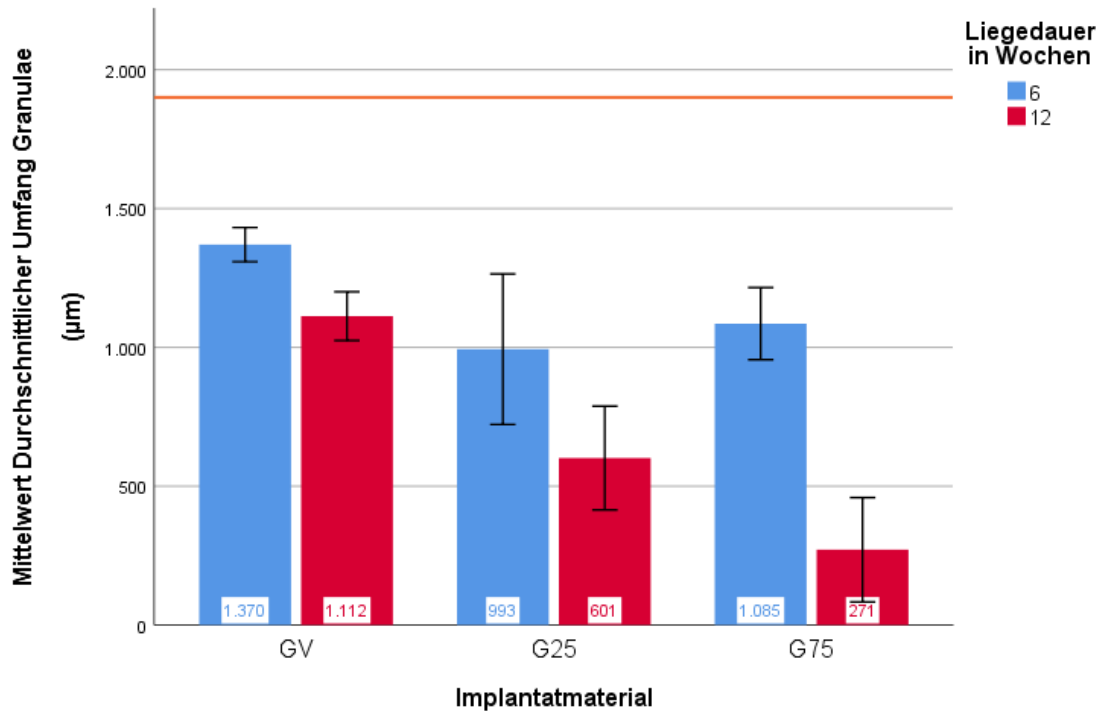


Abbildung 38 Zementgranulate – Mittelwert des Umfangs der Partikel (Granulae) in µm

Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte des Umfangs der Partikel in µm der jeweiligen Untergruppen. Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer sind blau markiert, jene mit 12 Wochen Liegedauer rot. Der Mittelwert ist am unteren Ende der Balken angegeben. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler mit einfacher Multiplikation. Die orange Linie markiert den Ausgangsumfang aller Partikel von 1900 µm. Zwischen den UG mit 6 Wochen Liegedauer ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Nach 12 Wochen ist G75 im Vergleich zu GV signifikant stärker degradiert.

Der mittlere Umfang nahm für alle Materialvariationen vom Einsetzen des Materials zum Zeitpunkt der OP (Liegedauer 0) kontinuierlich ab. Der mittlere Umfang war, fertigungsbedingt, zu Beginn für alle Materialvariationen derselbe (1900 µm). Nach 6 Wochen zeigten sich bei allen eine signifikante Reduktion des Umfangs (Mittelwerte: GV=1370,1 µm, G25=993,5 µm, G75=1086,7 µm): für GV um -530,54 µm ($p < 0.001$), für G25 um -907,21 µm ($p = 0.029$) und für G75 um -813,96 µm ($p = 0.001$). Der Umfang nahm nach 12 Wochen Liegedauer noch weiter ab (GV=1112,4 µm, G25=601,3 µm, G75=271 µm). G75 hatte seinen Umfang damit am stärksten, um 815,7 µm, verringert. Der Unterschied zum Umfang nach 6 Wochen war bei dieser UG sowie bei GV signifikant: GV ($p = 0,009$), G75 ($p = 0,017$). Bei G25 hingegen war die Reduktion des Umfangs von 6 nach 12 Wochen nicht signifikant ($p = 0,252$). Wie in Abbildung 35 gut zu

ERGEBNISSE

sehen ist, war für GV eine geringere Änderung des Umfangs zu verzeichnen, wohingegen der Umfang der Partikel von G75 im selben Zeitraum sehr stark geschrumpft ist.

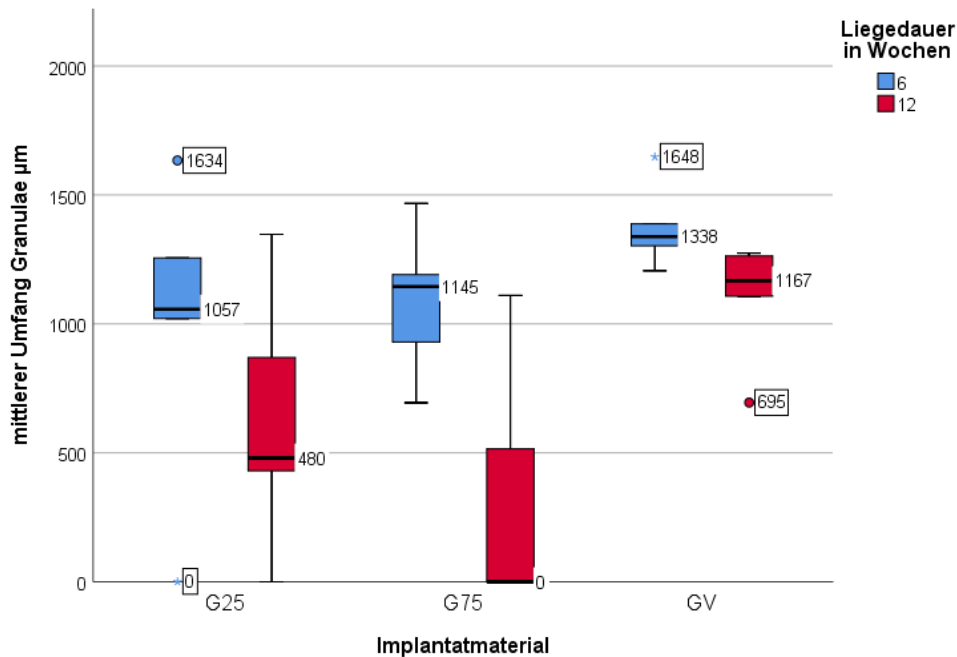


Abbildung 39 Zementgranulate - Umfang der Partikel (Granulae) in den Gruppen GV, G25 und G75

Die Ergebnisse der Messung des Umfangs der Partikel in μm der Implantate mit 6 Wochen Liegedauer sind blau dargestellt, die der Implantate mit 12 Wochen Liegedauer rot. Das Ergebnis des Medianwerts ist neben dem Median angegeben. Extreme Ausreißer sind mit Sternchen markiert, milde Ausreißer mit einem Punkt.

Betrachtet man diese Unterschiede zwischen den Materialvariationen (cf. Abbildung 39), so waren sie nach 6 Wochen Liegedauer zwischen keiner der Materialien signifikant: GV vs. G 25 ($p=0.172$), GV vs. G75 ($p=0.065$), G25 vs. G75 ($p=0.626$).

Nach 12 Wochen war G75, mit einem mittleren Umfang von $271 \mu\text{m}$, am stärksten von allen UG degradiert. Der Unterschied von $330,26 \mu\text{m}$ zu G25 erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p=0,225$). Die Degradation von GV war nach 12 Wochen nur wenig weiter fortgeschritten als nach 6 Wochen. Daher war der Unterschied zu G75, das nach 12 Wochen noch einmal stark degradiert war, signifikant ($p=0,009$).

4 DISKUSSION

Calciumphosphatzement (CPC) wird seit vielen Jahren erfolgreich klinisch als Knochenersatzmaterial (KEM) eingesetzt. Seine nachteiligen Eigenschaften haben zu einem gesteigerten Interesse an geeigneten Alternativen, wie z.B. Magnesiumphosphatzementen (MPC) geführt. Magnesiumphosphate, wie Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) zeichnen sich durch eine hohe Biokompatibilität [107], schnellere Abbindevorgänge [72, 76] unter physiologischen pH-Bedingungen [104] und bessere biomechanische Eigenschaften [103] aus. Durch ihre hohe Löslichkeit in vivo [50] und die Abgabe von Mg^{2+} -Ionen [136-139] werden sie schneller abgebaut und in Knochen umgewandelt [100, 107, 140]. Im klinischen Alltag haben sich präfabrizierte Zementpasten bewährt. Sie ermöglichen ein klarer definiertes, homogeneres und vor allem reproduzierbares Mischungsverhältnis und ein vereinfachtes Handling [66]. In der dentalen Chirurgie kommt meist Knochenersatz in Granulat-Form zu Anwendung. Bereits genutzte, durch Zerkleinern von Materialblöcken hergestellte CPC Granulate weisen jedoch eine suboptimale Oberflächenbeschaffenheit sowie Degradationsverhalten auf [125, 127]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit präfabrizierte, Ca-dotierte Magnesiumphosphat Zementpasten sowie Granulate untersucht.

4.1 Wahl des Tier- und Defektmodells

Die in vivo Testung der Werkstoffe im Rahmen dieser Arbeit erfolgte im Kaninchen (New Zealand White Rabbits). Ergebnisse aus in vitro Studien lassen sich meist nicht direkt auf die in vivo Situation übertragen. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Tiermodellen häufig ein wesentlicher Schritt bei der Prüfung von Werkstoffen und Implantatmaterialien vor der klinischen Anwendung am Menschen. In vitro Testungen ermöglichen die Charakterisierung eines KEM, also das Treffen von Aussagen über seine chemischen und physikalischen Eigenschaften und genaue Zusammensetzung. Außerdem kann so die Zytokompatibilität eines KEM überprüft werden. So wurde die Zytokompatibilität

der in dieser Arbeit verwendeten Zemente bereits bestätigt [141]. Um allerdings die Biokompatibilität des Materials zu überprüfen sind in vivo Studien unabdingbar [142]. Kleintiere werden in der Literatur mit am häufigsten für in vivo Studien genutzt [142-144]. Das hat vor allem praktische Gründe, da sie verglichen mit großen Versuchstieren, wie z.B. Schafen, leichter zu halten und weniger kostenintensiv sind. [143]. Verglichen mit dem Menschen haben Kaninchen einen schnelleren Knochenstoffwechsel; wobei dieser Effekt bei Jungtieren stärker ausgeprägt ist [142, 145, 146]. Da Studien an Kaninchen dadurch relativ schnell und kostengünstig zeitnahe Daten liefern können, bieten sie sich gerade für die ersten in vivo Studien zu neu entwickelten Materialien und als Screening vor Testungen an großen Tieren an [142, 147, 148]. Kritik am Kleintiermodell basiert vor allem auf der Tatsache, dass die Knochenbeschaffenheit, -größe, -form und -qualität eine andere ist als beim Menschen und daher die Vergleichbarkeit nur bedingt gegeben ist [148]. Tiere wie Schweine, Schafe, Ziegen und Hunde sind in ihrer Knochenbiologie und -größe sowie der Geschwindigkeit des Knochenstoffwechsels dem Menschen ähnlicher als Nagetiere oder Kaninchen, auch wenn Kaninchenknochen eine dem Menschenknochen ähnliche Mineraldichte aufweisen [149, 150]. Die Ergebnisse von Studien mit Kaninchen als Versuchstieren lassen sich also nicht direkt auf den Menschen übertragen, bieten aber erste Hinweise auf die Effektivität eines KEM [146]. Durch ihre leichte Verfügbarkeit, handliche Größe und hohe Toleranz gegenüber Haltung in Gefangenschaft haben sich Kaninchen daher als Versuchstiere für Studien zur Testung neuer Knochersatzmaterialien etabliert [107, 140, 142, 148, 151-154]. Gerade ‚New-Zealand White‘ Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) zeichnen sich durch geringe Aggressivität und eine stabilere gesundheitliche Konstitution im Vergleich zu anderen Züchtungen aus [148].

Die endgültige Wahl des Tier- und Defektmodells zur Untersuchung der biologischen Sicherheit und Wirksamkeit eines Knochenersatzmaterials sollte auf wissenschaftlichen, ethischen und praktischen Überlegungen beruhen. Ebenso sollten das zu testende Material und die Rahmenbedingungen seiner geplanten klinischen Anwendung berücksichtigt werden. Das eingesetzte Tiermodell ist also

DISKUSSION

geeignet, wenn es die Bedingungen der später beabsichtigten, klinischen Anwendung nachahmt [143]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein orthotropes, potenziell kraftbelastetes Defektmodell mit einem semi-lasttragenden Bohrlochdefekt in der Femurkondyle (D = 5 mm, L= 10 mm) gewählt. Aufgrund der gewählten Defektgröße und der damit großen eingebrachten Materialmenge ist eine bessere Aussagekraft gegeben als das bei kleineren Mengen der Fall wäre. Außerdem regeneriert ein solcher ‚critical size‘ Defekt (CSD) nicht spontan und ist daher gut geeignet, um den Beitrag des eingebrachten Materials zur Knochenheilung zu untersuchen [143, 155]. Da Implantate dieser Größenordnung für die Untersuchung in Kleinnagern wie Mäusen ungeeignet sind, fiel die Wahl auf ‚New-Zealand White‘ Kaninchen. Das Kaninchenmodell mit distalem Femurdefekt ist zur Testung von KEM bereits gut etabliert [155-158].

Implantationsort war die proximale Femurkondyle. Sie bietet ausreichend Platz für Implantationen und weist ausreichend Spongiosa auf, wodurch die Wahrscheinlichkeit des Zersplitters des kortikalen Knochens reduziert wird. Dadurch können dort auch größere (critical size, CSD) zylindrische Defekte von bis zu 6 mm Durchmesser gesetzt werden im Gegensatz zur empfohlenen Norm für den Femurschaft von 2 mm [142, 148]. Zusätzlich wurden ältere und schwere Tiere (13 Wochen, 3 kg) verwendet, da diese ein stärkeres Knochenlager und eine höhere Widerstandsfähigkeit aufweisen [148]. Hassanein et. al. konnten zeigen, dass das Alter der Kaninchen bei der Heilung von CSD eine Rolle spielt. Bei älteren Kaninchen heilten Defekte besser aus [159].

Trotz dieser Maßnahmen wurde in der vorliegenden Arbeit bei zwei Versuchstieren (22B, GV 12 Wochen; 35B, G75 6 Wochen) im Zuge der Präparation der linken Femora die Bildung eines Kallus im OP-Gebiet festgestellt. Zusammen mit der Verhaltensänderung der betroffenen Tiere (Schonhaltung) spricht dies für eine postoperative Fraktur. Durch die darauffolgende Normalisierung des Fressverhaltens sowie der Gewichtsentwicklung ist davon auszugehen, dass eine Frakturheilung stattfand, was später durch die angefertigten Röntgenbilder bestätigt werden konnte. Ein Zusammenhang mit dem jeweils in den Defekt eingebrachten Implantatmaterial ist eher

unwahrscheinlich, da es sich jeweils um unterschiedliche Materialien sowie Liegedauern handelt (22B: GV, 12 Wochen; 35B: G75, 6 Wochen). Da es in beiden Fällen das linke Bein betraf sind hier eher mechanische Ursachen denkbar. Die Positionierung der Sitzerrhöhung in den Halteboxen und die damit zusammenhängende stärkere Belastung des linken Beines beim Springen könnte eine Rolle gespielt haben. Frakturen nach Operationen am Knochen sind bei Kaninchen keine Seltenheit. Ihre eher leichte und fragile Knochenstruktur und ihr Verhalten als Fluchttiere können bei Sprüngen zur Überbelastung des Knochens im OP-Gebiet führen. Eine frakturlose Heilung kann laut Mapara et. al. prinzipiell durch eine Platz- und damit Bewegungslimitation in den Halteboxen unterstützt werden [148].

Einen Kritikpunkt könnte die vermeintlich geringe Zahl der untersuchten Tiere darstellen. Laut der vorab getätigten 3G Power Berechnungen zur Ermittlung der nötigen Tieranzahl waren ausreichend Tiere vorhanden, um eine statistisch fundierte Aussage treffen zu können. Aufgrund der strengen Richtlinien für Tierversuche und der Berücksichtigung ethischer Überlegungen sowie Leitlinien ist eine beliebige Wahl der Versuchstiergruppengröße nicht möglich.

Die Biokompatibilität des Materials wurde in einer Vorstudie geprüft [124, 141]. Die aufgezeigten pH-Wert-Verläufe waren für die in vivo Anwendung unkritisch und näherten sich am Ende alle einem pH-Wert von 7,8 an. Von Klammert et al. wurde die Langzeit-Unbedenklichkeit des Zementsystems ($\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ und $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ Lösung) für vorgeformte Prüfkörper in vivo nachgewiesen, wobei nach 15 Monaten im Tiermodell keine Hinweise auf Infektionen, Entzündungen oder Abstoßungen zu finden waren [117].

4.2 Angewandte Methoden

Die Wahl der Liegedauer der Zemente basierte auf den Ergebnissen einer Vorstudie, welche die zeitabhängigen Eigenschaften der Zemente während einer Auslagerung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) über einen Zeitraum von 30 Tagen untersuchte [124]. Bereits der Kontakt mit PBS für einen Monat

reichte aus, um nahezu 1/10 des CMPC Zementbulks rein passiv abzubauen. Erfahrungen aus vergangenen Studien zeigten, dass bei in vivo Kontakt von Struvitoberflächen die zellvermittelte gegenüber der passiven Resorption überwiegt, daher waren für den Tierversuch in dieser Arbeit noch stärkere Resorptionsraten zu erwarten [50]. Um eine realistische Einschätzung der Biodegradation treffen zu können, wurden folglich Liegedauern von 6 bzw. 12 Wochen gewählt. Die nach diesen Liegezeiträumen entnommenen Gewebeproben wurden mittels Kunststoffeinfettung aufgearbeitet. Eine nicht-dekalzifizierende Methode wurde gewählt, um den Knochen und dessen Mineralisierung beurteilen zu können. Es handelt sich dabei um eine etablierte Methode zur Untersuchung von Knochenheilungsvorgängen. Peric et al. beschreiben die Anfertigung von nicht-dekalzifizierender Knochenhistologie als integralen Bestandteil von Tierversuchen zur Knochenheilung. Vor allem in Kombination mit einer Differentialfärbung stelle sie eine gute Methode zum Testen der Knochenzellaktivität während der Knochenregeneration und der Quantität des neu gebildeten Knochens dar [160]. Die Herstellung der histologischen Präparate mittels Trenn-Dünnschliff Technik erfolgte in Anlehnung an Donath [133] Die Methode wird routinemäßig in der histologischen Diagnostik für Proben angewendet, die nicht in Paraffin verarbeitet werden können [161]. Sie ermöglicht die Verarbeitung von nicht schneidbaren Materialien wie Knochen oder Implantatwerkstoffen und die gute Beurteilung von Grenzflächen zwischen Hart- und Weichgewebe. Schwachpunkt dieser Methode ist der Materialverlust durch Schleifen der eingebetteten Gewebeproben und der damit verbundene Informationsverlust. Die fertigen Trenn-Dünnschliffe wurden mittels Differenzialverfahrens (Masson-Goldner-Trichrom Färbung) gefärbt. Wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben, wurden vorab zwei unterschiedliche Probefärbungen (Masson-Goldner-Trichrom (MGT) und Hämalaun-Eosin (HE) Färbung) vorgenommen, um die Färbetechnik mit der höchsten Aussagekraft für die vorliegende Fragestellung zu ermitteln. Die HE Färbung führt nicht zu den erwünschten Ergebnissen, da eine Differenzierung von neu gebildetem, noch nicht kalzifizierten Knochen und mineralisierten Knochen nicht möglich war (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu konnten mit der MGT Färbung die

unterschiedlichen Gewebe klar und deutlich herausgearbeitet werden (siehe dazu auch Abbildung 5). Bei der anschließenden Digitalisierung der Schnitte wurde versucht, einen möglichen Informationsverlust durch die Verwendung einer hohen Auflösung und mehrerer Einzelbilder pro Schnitt zu verhindern. Außerdem wurden bei der Auswertung nicht eindeutig zu differenzierende Bildbereiche mittels Lichtmikroskopie des jeweiligen Schnittes überprüft.

Wie in Kapitel 2.1.4 beschrieben wurden zur Untersuchung der Degradation der Granulate die Umfänge der Partikel zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Für die Messung der Umfänge der einzelnen Partikel des Granulatmaterials wurde jeweils der größte Umfang bei einem Schnitt durch die Partikelmitte angenommen. In den histologischen Schnitten ist ein Großteil der Partikel jedoch beliebig und daher außerhalb der Mitte angeschnitten. Daher ergeben sich kleinere Werte als der tatsächlich vorhandene größte Umfang. Um sich dem tatsächlichen Wert möglichst stark anzunähern, wurden daher alle Umfänge der Partikel eines Schnittes gemittelt. Auch der angenommene Ausgangsdurchmesser der Partikel von 605 μm ist ein gemittelter Wert, da die Partikel bei der Herstellung in einem Bereich von 500 bis 710 μm gesiebt wurden. Um daraus den mittleren Wert des Anfangsumfangs zu errechnen, wurde eine Kreisform der Partikel angenommen, was ebenfalls nur eine Annäherung darstellt.

Zur digitalen Auswertung muss gesagt werden, dass das optisch-manuelle Ausmessen einen Schwachpunkt des Auswertungsverfahrens darstellt, da eine völlige Objektivität nicht garantiert werden kann. Durch die Verwendung eines geeigneten und genauen Eingabegerätes (Grafiktablett mit Eingabestift), die Differenzierbarkeit der Gewebe durch die geeignete Färbung sowie die Ausführung der gesamten Messungen durch ein und dieselbe Person wurde versucht, eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Da die gesamte Auswertung durch ein und dieselbe Person erfolgte ist eine Reproduzierbarkeit innerhalb dieses Systems gegeben. Die Möglichkeit, dass bei einer Auswertung durch andere Personen leicht abweichende Ergebnisse

gemessen werden könnten, ist aufgrund der schlussendlich subjektiven Natur der optisch-manuellen Messungen nicht gänzlich auszuschließen.

4.3 In vivo Verhalten der Materialien

4.3.1 Degradation

Bei den Referenzmaterialien handelt es sich um Hydroxylapatit-bildende Zemente. Letztere sind klinisch bewährt und von einer ganzen Reihe von verschiedenen Herstellern als Medizinprodukt erhältlich. Die Materialien sind in vivo nur gering löslich und resorbieren bekanntermaßen nur in langfristigen Zeiträumen von über einem Jahr. Da Struvit im Gegensatz dazu bei physiologischen pH-Werten eine sehr gute Löslichkeit aufweist, konnte man davon ausgehen, dass die Materialien aus Struvit-bildenden Calciummagnesiumphosphaten wesentlich schneller resorbiert (ca. 3 Monate) und dabei durch neuen Knochen ersetzt würden.

Diese Hypothese konnte bestätigt werden, da bei den Pasten wie den Granulaten histologisch wie radiologisch ein schnellerer Abbau als im Fall des Referenzmaterials gegeben war. Im Verlauf der Zeit lässt sich feststellen, dass die äußeren Bereiche der CMPC-Zemente eine körnige, unregelmäßige und geriffelte Randstruktur aufweisen, was dafür spricht, dass sie in Auflösung begriffen sind (Abbildung 13). Zusammen mit dadurch freigesetzten Fragmenten weist das auf einen eher zentripetalen, osteoklastären Abbau hin. Im Gegensatz dazu waren bei dem Referenzmaterial stets glatte, klar abgrenzbare Materialränder sichtbar, was dafür spricht, dass hier deutlich weniger Abbau stattfand.

Zusammenfassend sind dies Hinweise für eine schnellere aktive Degradation der CMPC Zemente im Vergleich zur CPC Referenz. Diese Ergebnisse decken sich mit denen vorangegangener Studien (cf. Tabelle 13). Auch bei Yu. et. al. zeigten MPC Zemente, die in die Femora von Kaninchen eingebracht wurden, ein gutes Einwachs- sowie Resorptionsverhalten bei gleichzeitig kaum oder wenig

DISKUSSION

Fremdkörperreaktion. Die Abgabe von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen durch den Zement hatte dabei keinen Einfluss auf die Ionenspiegel im Blut der Versuchstiere [107]. Kanter et al. beschrieben für MPC eine im Vergleich zu HA-CPC und Brushit stärkere Degradation und Stimulation von Knochenneubildung in den Femora von Schafen [48]. Sie verdeutlichten ein zweistufiges Abbaumodell für MPC, bei dem zuerst innerhalb der ersten 4 Monate die Struvit-Anteile komplett aufgelöst werden. Erst im Anschluss daran wird das schlechter lösliche, noch im Zement enthaltene Ausgangsmaterial Farringtonit (Löslichkeitsprodukt $6.3 \times 10^{-26} \text{ mol}^5/\text{L}^{-5}$, Löslichkeit $2.81 \text{ mg}/\text{L}^{-1}$) aufgelöst.

Das hier in vivo gezeigte aktive Degradationsverhalten entspricht weitestgehend dem rein passiven Degradationsprofil, welches zuvor in einer zellfreien in vitro Vorstudie an der FMZ gezeigt wurde [124]. In dieser Vorstudie wurden zur Untersuchung der rein passiven Degradation die Veränderungen verschiedener Zementeigenschaften im Zuge einer 30-tägigen Auslagerung in PBS (pH=7,4; 5 ml pro Prüfkörper, 37 °C) untersucht, wobei die eingesetzten Prüfkörper die gleiche Zementzusammensetzung hatten wie die Materialien in dieser Arbeit. Es kamen also wasserbasierte CMPC Zemente, welche in dieser Arbeit als Granulate eingesetzt wurden, sowie ölbasierte CMPC Zementpasten zum Einsatz. Auch die hier gefundenen Ergebnisse weisen in die gleiche Richtung wie die zur aktiven Degradation in der vorliegenden Arbeit. In der Vorstudie erfolgte ein stärkerer passiver Abbau aller CMPC (mit einem gesamten Masseverlust um bis zu 9 %), wobei jene mit geringerem Ca Anteil, P25 und G25, die stärkste chemische Auflösung erfuhren. Dieses Ergebnis korrelierte sehr gut mit der untersuchten kumulativen Ionenfreisetzung (Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und PO_4^{2-} -Ionen). Die Freisetzung der höher dotierten Zemente war bezüglich Calcium höher, unabhängig von der Darreichungsform. In Bezug auf die Granulate, also den wasserbasierten CMPC Proben (G25 und G75), wurde insgesamt die stärkste Calciumfreisetzung beobachtet. Das könnte, abgesehen vom dadurch erfolgten Massenverlust, die spätere stärkere in vivo Degradation erklären. Extrazelluläres Calcium hat eine verstärkende Wirkung auf Signalwege des Knochenstoffwechsels [114-116]. Für die Zementpasten, also die ölbasierten CMPC Proben (P25 und P75), wurde ebenfalls ein stärkerer Abbau gegenüber

DISKUSSION

den CPC festgestellt. Diese ölbasierten Zemente enthielten durch die Verwendung einer Ölphase einen intrinsischen Porenbildner. Dieser wurde durch die Auslagerung in wässriger Umgebung schrittweise freigesetzt. Dadurch stieg die initial geringere Porosität bis zum Ende der Studie insgesamt stärker an, für $x=0,25$ sogar um das 10-fache. Da eine höhere Porosität mit einer größeren Kontaktfläche zu Körperflüssigkeiten und osteoklastischen Zellen und damit einem schnelleren Abbau korreliert, erklärt dies unter anderem den schnelleren Abbau der CMPC Pasten im Vergleich zum Referenzmaterial. Im Gegensatz dazu blieb auch in der Vorstudie die Masse der Referenzprüfkörper aus CPC (GV und PV) nach initialer Wasseraufnahme über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg stabil. Es erfolgte hier weniger Ca^{2+} -Ionen und kaum Mg^{2+} -Ionen Abgabe. Auch dieser geringere Massenverlust deckt sich mit der geringen in vivo Degradation der CPC Materialien in der vorliegenden Arbeit.

Dieses verbesserte Abbauverhalten der CMPC Werkstoffe lässt sich durch verschiedene Ansätze erklären und deckt sich mit den Ergebnissen vorangegangener Studien [50, 117, 129, 153]. Alle Systeme auf Basis des verwendeten Ca-dotierten Magnesiumphosphats bildeten durch die Reaktion mit der jeweiligen wässrigen Komponente hauptsächlich Struvit ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) sowie Newberyit ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) als Nebenphase. Struvit resorbiert nahezu 3 mal schneller als der am besten abbaubare CPC (Brushit), was vor allem der höheren chemischen Löslichkeit zuzuschreiben ist [50]. Klammert et. al. evaluierten im Rahmen einer Langzeitstudie (15 Monate) den rein passiven in vivo Abbau von Struvit in heterotropen Defekten (Muskel) in Ratten. Für Struvit Zement konnte die stärkste Erhöhung der aktiven Oberfläche (innere und äußere Implantatoberfläche) und damit der stärkste Abbau auch in diesem heterotropen Implantatlager belegt werden [117].

Allerdings zeigen Erfahrungen aus vergangenen Studien, dass bei Kontakt von Struvit-Oberflächen mit Knochen die zellvermittelte gegenüber der passiven Resorption überwiegt, der Abbau also eher durch osteoklastische Zellaktivität als durch passive Auflösung dominiert [50, 162]. Diese zellvermittelte Resorption wurde von Grossardt et al. vergleichend für verschiedene Biozemente (Calcium-

DISKUSSION

defizitärem Hydroxyapatit, Brushit, Monetit und Struvit) in vitro untersucht. Der Struvit Zement wurde verglichen mit den CPC Zementen mit einer Gesamtauflösung von ca. 4,7% in einem Zeitraum von 13 Tagen stärker abgebaut, wobei die aktive zellvermittelte Resorption durch Osteoklasten überwog [50]. Außerdem fand im Falle des MCP die größte Freisetzung von Mg^{2+} -Ionen statt. Auch Wue et al. konnten für ihre CMPC Zementformulierung im Vergleich mit CPC eine wesentlich stärkere Resorption sowohl in vitro als auch in vivo (Kaninchenfemora) nachweisen. In Bezug auf die Knochenneubildung war der CMPC mit einer Defektheilung zu 80% nach 6 Monaten im Vergleich zu 10% für CPC Probekörper ebenfalls überlegen [111].

Es wurde zwar auch für injizierbaren CPC Zement osteoklastischer Abbau nachgewiesen, dieser erfolgt jedoch wesentlich langsamer. So war beispielsweise nach 24 Wochen Liegedauer im Tibiadefekt in Ziegen der Hauptteil des CPC Zementes noch in situ [163]. Beim direkten Vergleich von solchen Literaturwerten ist jedoch Vorsicht geboten, da sich die genutzten Prüfmethode und -bedingungen, Versuchsaufbauten und Tiermodelle oftmals stark unterscheiden (cf. Tabelle 13) [164]. Wie Lim et al. zeigten, kann bereits die Wahl des Defektmodells das Ergebnis beeinflussen. Sie verglichen einen Tibia mit einem Kalottendefekt, wobei der Tibiadefekt unter den sonst gleichen Bedingungen schneller ausheilte [165]. Daher lassen sich letztlich nur Tendenzen bezüglich der Regenerations- und Degradationsgeschwindigkeit vergleichen. Prinzipiell lässt sich aber festhalten, dass in allen aufgezeigten Studien Struvit stärker und schneller resorbiert wurde als CPC.

Tabelle 13 Zusammenfassung zitierter in vivo Studien zum Resorptionsverhalten von Knochenzementen

Vergleich der Literaturwerte einiger im Text zitierter Studien zur Herausstellung der Unterschiedlichkeit der Prüfmethode und -bedingungen für KEM (Zeitpunkt = Untersuchungszeitpunkte; k.A.: keine Angabe der entsprechenden Werte)

Autor	Zemente	Applikationsform	Tiermodell (Alter, Gewicht)	Defektmodell Defektgröße [mm]	Zeitpunkt (Wochen)
diese Arbeit	CMPC, HA	Pasten	Kaninchen (13 W., 3 kg)	orthotrop im Femur 5 x 10 mm	6, 12
Ergebnisse:					

DISKUSSION

Autor	Zemente	Applikationsform	Tiermodell (Alter, Gewicht)	Defektmodell Defektgröße [mm]	Zeitpunkt (Wochen)
Stärkere Degradation von CMPC, stärkere Knochenneubildung an CPC					
Yu et al. [107]	MPC	Prüfkörper ^b	Kaninchen (k.A., 3 kg)	orthotrop im Femur heterotrop subkutan Ø 3.2 mm × 10 mm ^{3a}	4, 8, 12/ 2, 4, 8, 12, 6, 24
Ergebnisse: histologisch und lichtmikroskopisch validierte Degradation in beiden Implantatlagern, nach 24 W. Bildung von neuem Knochen an den ossären Implantaten, simultane Knochenneubildung, keine Entzündungszeichen					
Klammer et al. [117]	Brushit, Newberyit, HA, Struvit	Prüfkörper ^b	Ratten (3 W., 0,318 kg)	heterotrop in der femoralen Streckmuskulatur; Ø 5 x 10 mm	4, 8, 24, 40, 60
Ergebnisse: nach 60 W. im Vergleich am stärksten (4-fach) vergrößerte aktive Oberfläche für Struvit, d.h. stärkste rein passive Auflösung					
Ooms et al. [163]	CPC (TCP), PMMA Zement	Paste	Ziegen (104-208 W., 50 kg)	orthotrop in der Tibia 5 mm	3 d, 2, 8, 16, 24
Ergebnisse: nach 24 Wochen Hauptteil des CPC (α-TCP) noch in situ, nur ein kleiner Teil des gesamten Zementvolumens resorbiert und durch Knochen ersetzt					
Kanter et al. [100]	HA, Struvit	Paste	Schafe (208-312 W., 94 ± 8 kg)	orthotrop im Femur und in der Tibia 1200 mm ^{3a}	24, 28, 40
Ergebnisse: nach 40 W. keine Entzündungszeichen, MPC stark oder vollständig degradiert und durch Knochen ersetzt (Zement mit kleinerer PLR führte zu schnellerer Degradation), CPC nicht messbar degradiert und kaum Knochenneubildung					
Li et al. [153]	MCPC	Prüfkörper ^b	Kaninchen (8 W., 2.5 kg)	orthotrop im Femur Ø 5 x 5 mm	4, 12, 24
Ergebnisse: nach 24 W. 89% neugebildeter Knochen, vollständig ausgeheilter Defekt					
Kanter et al. [48]	Brushit, Struvit, HA	Paste	Schafe (208-365 W., 94 ± 8 kg)	orthotrop im Femur 10 x 15 mm	12, 28, 40
Ergebnisse: nach 4 W. fast vollständige Degradation Struvit (kleine PLR führte zu stärkerer Degradation)					
Wu et al. [111]	Struvite, HA	Prüfkörper ^b	Kaninchen (k.A., 3kg)	orthotrop im Femur Ø 4 mm x 3 mm	4, 8, 12, 24
Ergebnisse: Keine Entzündungszeichen, stärkere Resorption CMPC, stärkere Knochenneubildung durch CMPC: Defektheilung nach 24 W. CMPC (80%), CPC					

DISKUSSION

Autor	Zemente	Applikationsform	Tiermodell (Alter, Gewicht)	Defektmodell Defektgröße [mm]	Zeitpunkt (Wochen)
	(10%)				
Merten et al. [128]	α TPC β TPC	Granulat	Schafe (k.A., 48 kg)	orthotrop in der Tibia 3,5–4,7 ml	4, 16, 20, 28, 46, 68
	Ergebnisse: nach 68 W. Material fast vollständig abgebaut α TPC (~90%), β TPC (~95%)				

^a Defektvolumen

^b zylindrischer Probekörper

Dieser Trend bestätigte sich auch bei den in dieser Arbeit untersuchten Granulaten. Die durchschnittlichen Umfänge der Partikel nach 6 Wochen waren ähnlich, wobei GV am wenigsten Abbau zeigte. Nach 12 Wochen waren die Werte für die Umfänge generell kleiner, am stärksten hatten sie im Fall der CMPC Granulate abgenommen. Diese Datenverteilung spricht für eine Degradation aller Materialvariationen, wobei die schnellste (nach 6 Wochen am weitesten fortgeschrittene) Degradation (G25) und stärkste (kleinste Umfänge am Ende der Studie) Degradation (G75) für die CMPC Granulate zu beobachten war. Wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben, konnten in einigen der Trenn-Dünnschliffe der Gruppen G25 (nach 6 Wochen bei 22 % und nach 12 Wochen bei 16 % der TDS) und G75 (nach 12 Wochen bei 33% der TDS) gar keine Partikel mehr nachgewiesen werden. Die korrespondierenden Röntgenbilder bestätigen das Nicht-Vorhandensein von Implantatmaterial (cf. Abbildung 28). Daher ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine vollständige Degradation des Materials handelt. Außerdem stimmt die Tendenz mit den Ergebnissen der Umfangmessungen überein, wonach G25 zu Beginn stärker resorbiert wurde, am Ende der Untersuchungen aber G75 insgesamt am stärksten degradiert war. Im Gegensatz dazu waren die CPC Granulate noch nahezu intakt, in der Histologie wie in den Röntgenbildern gut sichtbar. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zu CMPC Granulaten von Christel et. al [129]. Dort zeigte sich im Vergleich mit CPC Granulaten eine stärkere Freisetzung von Mg^{2+} -Ionen und folglich eine stärkere Osteoblastenaktivität auf der Prüfkörperoberfläche [129].

Granulate aus CPC können zwar prinzipiell ebenfalls resorbiert werden, benötigen dafür aber wesentlich längere Zeiträume (12-24 Monate für Tricalciumphosphat Granulate) [127, 128]. Bei Merten et al. waren die TCP Granulate im orthotopen Lager erst nach 68 Wochen zu 80–90% (α -TCP-Granulat) bzw. zu 90–95% (β -TCP-Granulat) abgebaut [128]. Durch den Vergleich der histologischen Schnitte lässt sich feststellen, dass die Granulate schneller und stärker degradiert sind als die Pasten. Diese stärkere Degradation lässt sich vor allem durch die wesentlich größere Gesamtoberfläche und damit Kontaktfläche der Osteoklasten zum Material erklären [48, 50]. In manchen Schnitten der CMPC Granulate war keinerlei Material mehr nachweisbar (cf. Kapitel 3.3.4). Das spricht für eine vollständige Degradation des Materials in diesen Schnitten, da auch in den korrelierenden Röntgenbildern kein Material nachweisbar war. Das Fehlen von Material aufgrund einer ungünstig gewählten Schnittführung bei der Aufarbeitung der Gewebeproben kann damit ausgeschlossen werden. Für die Materialvariation G25 kam es zur schnellsten vollständigen Resorption (bereits nach 6 Wochen), wobei G75 nach 12 Wochen zu einem höheren Anteil vollständig resorbiert war. Hier lässt sich ein Einfluss des Substitutionsgrades mit Ca^{2+} -Ionen vermuten. Der Einfluss des Grades der Substitution mit Ionen auf verschiedene Zementeigenschaften wurde bereits in früheren Studien untersucht [50, 76, 162]. Zusammenhänge zwischen Mechanik und Löslichkeit des Zements wurden festgestellt, außerdem Wirkung in Bezug auf das in vivo Verhalten (Resorption und Zytokompatibilität) [50, 162]. Die Abgabe von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen durch den Zement nahm dabei keinen Einfluss auf die Ionenspiegel im Blut der Versuchstiere [107]. Der Einfluss einer solchen Dotierung mit Ionen auf die Resorption wurde von Blum et al. beschrieben [162]. Ausgangspunkt der in vitro Untersuchungen war die Annahme, dass das Auflösungsprofil von CMPC durch das Mg:Ca Verhältnis im Rohmaterial beeinflusst werden könnte. Sie besiedelten planare Prüfkörper variabler Zusammensetzungen $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x=0,75; 1,0; 1,5$) mit murinen RAW 264.7 Makrophagen. Diese wurden zur Differenzierung in Osteoklasten stimuliert und der Einfluss des Dotiergrads des Rohpulvers mit Calcium auf die passive (zellfreie) sowie aktive (zellvermittelte) Resorption untersucht. Auch in dieser

Studie wurden alle CMPC Zemente insgesamt stärker abgebaut als die CPC Kontrollgruppe, wobei auf allen CMPC im Vergleich zu den CPC eine gesteigerte Zellaktivität und -zahl auftrat. Zwischen den verschiedenen Mg:Ca Verhältnissen konnten hinsichtlich der Zellbesiedelung keine Unterschiede festgestellt werden, allerdings bildeten sich auf dem Zement mit dem höchsten Ca-Anteil (Mg:Ca = 2) wesentlich kleinere, effektivere Osteoklasten. Mit zunehmendem Calciumgehalt trat daher eine gesteigerte zellvermittelte Resorption des Materials auf [162]. Dieser Mechanismus bietet eine Erklärung für das Verhalten der Materialien in dieser Arbeit. Im Falle der Granulate war nach 6 Wochen die Materialvariante G25 mit dem geringeren Ca-Gehalt ($x=0,25$) stärker und damit am schnellsten resorbiert. Wie in der Vorstudie gezeigt werden konnte, kommt es bei Materialvariationen mit geringerem Ca-Gehalt zu einer schnelleren chemischen Auflösung und damit, fürs erste, höheren Ionenkonzentrationen in der Umgebung. Diese wiederum führen zu einer verstärkten Aktivierung von Osteoklasten. Außerdem war die Gesamtfreisetzung von Mg^{2+} -Ionen im Fall der Granulate mit $x=0,25$ im Vergleich mit allen anderen Materialien am höchsten. Insgesamt werden von Materialien mit höherem Ca-Gehalt auch mehr Ca^{2+} -Ionen abgegeben. Die Erhöhung des Ca-Gehalts ($x=0,75$) führte daher zu einer insgesamt (daher nach 12 Wochen) signifikant stärkeren Resorption der Granulate. Das dürfte vor allem der Bildung effektiverer Osteoklasten durch die erhöhte Umgebungskonzentration von Ca^{2+} -Ionen zuzuschreiben sein. Dass der Unterschied zwischen dem mittleren Umfang von G25 nach 6 und 12 Wochen statistisch nicht signifikant war, dürfte daher eher an den drei nach oben ausreißenden Werten liegen; die meisten Umfangwerte waren deutlich niedriger (cf. **Abbildung 36**, **Abbildung 37**).

4.3.2 Neubildung von mineralisiertem Knochen

Bei den Pasten zeigten sich Hohlräume im Inneren des Materials, die teilweise mit mineralisiertem Knochen gefüllt waren. Hier ist davon auszugehen, dass es sich dabei nicht um geschlossene Hohlräume handelt, sondern um mit dem Knochenmark verbundene Einstülpungen, welche beim Einbringen des pastösen

DISKUSSION

Materials entstanden sind. Durch das spätere Anschneiden bei der Herstellung der Schnitte imponieren diese optisch als vermeintliche Hohlräume.

Auch in Bezug auf die Neubildung von mineralisiertem Knochen lässt sich ein möglicher Einfluss der Dotierung und damit der Ionenfreisetzung feststellen. Betrachtet man die Zementpasten, so zeigt sich nach 6 Wochen mehr mineralisierter Knochen an der Materialvariation P25, nach 12 Wochen an P75. Im Fall der Paste mit höherem Ca-Gehalt (P75) kam es zu einem Anstieg des prozentualen Knochenkontakts von Woche 6 zu Woche 12, während sich für die Paste mit geringerem Ca-Gehalt (P25) das gegenteilige Phänomen beobachten ließ. Auch das könnte auf die unterschiedlich schnellere Degradation des Materials zurückzuführen sein. Das Knochenwachstum war unter Umständen nicht in der Lage, mit der Degradation mitzuhalten, weshalb nach 12 Wochen weniger mineralisierter Knochen auf P25 zu finden war. Außerdem konnte für P25 ein leicht höherer Anteil an Osteoid nachgewiesen werden, was eine initial bessere Knochenwachstumsstimulation als im Falle von P75 vermuten lässt. Im Gegensatz zu den Granulatmaterialien konnte für die ölhaltigen Pasten der Trend zur erhöhten Ca-Freisetzung bei $x=0,25$ in der Vorstudie nicht nachgewiesen werden. Allerdings kam es für die ölbasierte Paste mit $x=0,25$ zu Beginn der Vorstudie zu einer stärkeren Freisetzung von Mg^{2+} -Ionen als gegen Ende.

Magnesiumionen sind direkt an zahlreichen biologischen Mechanismen beteiligt. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Ionenkanälen, der DNA-Stabilisierung, der Enzymaktivierung und der Stimulierung des Zellwachstums und der Zellproliferation [166]. In Rahmen des Knochenstoffwechsels nehmen sie Einfluss auf Kalzifizierung, Knochendichte, Mineralmetabolismus und die Formation von HA-Kristallen, wobei mehr als die Hälfte des Magnesiums (Mg) im menschlichen Körper im Knochen selbst gespeichert ist [96, 110, 167]. Darüber hinaus spielt Mg über die Stimulation der Produktion von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) eine direkte und lebenswichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gefäßfunktion und Angiogenese [168]. Auch die positive Wirkung von Mg auf die Zellproliferation von Osteoblasten und deren Attachment ist gut belegt [97, 169-171]. Während hohe Mg^{2+} -Konzentrationen

DISKUSSION

einen positiven Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Proteinsynthese von Osteoblasten haben, zeigt sich für die Osteoklasten das umgekehrte Bild. Hier wird die Bildung von mehrkernigen Osteoklasten gehemmt [136-139]. Resultat ist eine höhere Knochenmasse aufgrund der verstärkten Knochenbildung und der vorübergehend verringerten Knochenresorption [172]. Kanter et al. beobachteten dementsprechend, dass nach 10 Monaten Liegedauer ihrer MPC-Zementproben die Trabekeldichte des neu gebildeten Knochens im Vergleich zu intaktem Knochen aus derselben Region erheblich höher war [100]. Dies deutet darauf hin, dass der Zement die Knochenbildung stimulierte und dass dieser Effekt auch nach 10 Monaten anhielt, zu einem Zeitpunkt also als die Zemente bereits erheblich abgebaut waren. Gleichzeitig konnte eine Abnahme der Trabekelzahl bei Zunahme der Trabekeldichte festgestellt werden, also ein Hinweis auf kontinuierliche Anpassung des Knochens an die physiologische Situation (Remodeling).

Auch im Falle der Pasten in der vorliegenden Arbeit dürfte daher eine frühe (nach 6 Wochen) Aktivierung des Knochenstoffwechsels auf die abgegebenen Ionen zurückzuführen sein. In Bezug auf die Förderung der Knochenregeneration in vivo unterstützten beide CaMgP-Pasten die Neubildung von Knochen. Ein niedriger Calciumgehalt (P25) scheint dabei eine schnellere Resorption und einen höheren Osteoidanteil zu verursachen. Andererseits wurde festgestellt, dass der Knochen-Implantat-Kontakt bei der CaMgP-Paste mit hohem Calciumgehalt (P75) am Ende (nach 12 Wochen) höher war. Dies ist vermutlich auf eine langsamere Resorption verglichen mit P25 zurückzuführen. Neuer mineralisierter Knochen hatte sich insgesamt quantitativ signifikant stärker am Referenzmaterial CPC gebildet. Das mag daran liegen, dass zu diesem Zeitpunkt die CMPC Pasten bereits zu einem höheren Ausmaß abgebaut waren und daher war weniger Implantatmaterial vorhanden war, an dem sich Knochen-Implantat-Kontakt hätte ausbilden können. In diesem Fall muss die Degradationsgeschwindigkeit des Zementes eingestellt werden, was über eine Veränderung der Zusammensetzung gelöst werden könnte.

DISKUSSION

Die Resorptionsgeschwindigkeit der Materialien erwies sich im vorliegenden Versuch als tendenziell zu schnell, allerdings sind die Ergebnisse der Tierstudie nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Hier besteht weiterer Forschungsbedarf, um eine Formulierung zu erhalten, welche der Knochenregeneration die Möglichkeit gibt, in einem ähnlichen Tempo zu erfolgen wie der Abbau des Materials. Da für die Ca-Dotierung $x=0,75$ in früheren Studien die besten Festigkeitswerte erzielt wurden, müssen bezüglich der möglichen Ca-Dotierung hier eventuell Kompromisse eingegangen werden [76].

Durch die vorliegende Arbeit konnte gezeigt werden, dass der in vivo Einsatz von Granulaten aus der Formulierung $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ mit $x=0,25$ und $x=0,75$ möglich ist. Auch die eingesetzten MCPC Pasten zeigten hervorragende Ergebnisse bei der Knochenheilung mit vollständiger Osseointegration der CaMgP-Pasten in die Knochendefekte und sukzessiver Resorption der Materialien in moderater Abhängigkeit vom Calciumgehalt. Die Anwendung als injizierbare, selbsthärtende Paste wie auch als Granulat eröffnet ein weites Feld von Applikationsmöglichkeiten. Als nächster Schritt wäre eine Testung an Großtieren vorstellbar, um noch besser auf den Menschen übertragbare Resultate zu erhalten. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse geben jedoch erste Anhaltspunkte für eine aussichtsreiche klinische Anwendung der getesteten Zementformulierungen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren vier verschiedene Implantatwerkstoffe aus unterschiedlich hoch Calcium-dotiertem Magnesium-Phosphat-Zement (CMPC) mit der Basiszusammensetzung $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x=0,25$ und $x=0,75$). Auf Basis dieser Rohpulver wurden sphärische Granulate (500- 710 μm) mittels Emulsionstechnik sowie injizierbare, ölbasierte Zementpasten hergestellt. Diese wurden mit einem Referenzmaterial aus Calciumphosphat-Zement (CPC) im Tiermodell anhand von orthotopen, potentiell kraftbelasteten Defekten im Kaninchenfemur (New-Zealand White Rabbits) verglichen. Zentrales Ziel hierbei war es herauszufinden, wie sich die Materialien in Defektsituationen mit Hartgewebekontakt biologisch verhalten und degradieren bzw. in Knochen umbauen. Da es sich bei den CMPC um Struvit-bildende Zemente handelt, war davon auszugehen, dass sie wesentlich schneller abgebaut werden als das Hydroxylapatit-bildende Referenzmaterial. Die Implantate wurden daher bereits nach einer Liegedauer von 6 bzw. 12 Wochen entnommen, wobei sich keine Hinweise auf Wundinfektionen, Entzündungen oder Materialunverträglichkeiten zeigten. Mittels Trenn-Dünnschliff Technik wurden histologische Präparate angefertigt und hinsichtlich Knochenneubildung, Knochen-Implantat-Kontakt und Abbau der Materialien analysiert und statistisch ausgewertet.

Bei allen Tieren kam es zu einer vollständigen Osseointegration und sukzessiven Resorption der CMPC Materialien. Die Lichtmikroskopaufnahmen der histologischen Objektträger zeigten, dass die Größe des CPC Referenzgranulats nach 6 und sogar 12 Wochen praktisch unverändert war, was darauf hindeutet, dass in diesem Fall kaum Zementabbau erfolgte. Im Gegensatz dazu hatten sich die Umfänge der CMPC Granulate deutlich verringert, was für eine Degradation des Materials spricht, wobei die Materialvariation mit niedriger Calcium-Dotierung ($x=0,25$) schneller, die mit höherer Calcium-Dotierung ($x=0,75$) insgesamt stärker abgebaut wurde. Das ist wahrscheinlich vor allem der höheren chemischen Löslichkeit der niedrig dotierten Materialvariante zuzuschreiben, während die

ZUSAMMENFASSUNG

höher dotierte insgesamt mehr Ca^{2+} -Ionen abgab, was zu einer insgesamt stärkeren Osteoklastenaktivierung geführt haben dürfte. Es konnte außerdem beobachtet werden, dass sich ein höherer Anteil von neuem Knochen an den CPC Granulaten bildete. Das könnte daran liegen, dass alle CMPC Materialien, Granulate wie Pasten, zum Messzeitpunkt im Vergleich zum Referenzmaterial bereits wesentlich stärker degradiert waren und ergo weniger Oberfläche für Knochen-Implantat-Kontakt zur Verfügung stand. Die Granulate G25 und G75 degradierten teilweise so stark, dass in den Femora histologisch und radiologisch kein Material mehr nachweisbar war. Im Fall der Pasten hatte sich nach 6 Wochen mehr Knochen an CMPC gebildet, wobei auch hier nach 12 Wochen signifikant mehr Knochen im Kontakt mit der CPC Referenz vorhanden war. Auch hierfür könnte die stärkere Abgabe von Ca^{2+} -Ionen am Anfang sowie später die stärkere Resorption des CMPC Materials verantwortlich sein. Die unterschiedliche Calcium-Dotierung hatte bei den Pasten nur einen moderaten Einfluss, wobei ein niedrigerer Calcium-Gehalt zu schnellerer Resorption und einem höheren Osteoidanteil zu führen schien. Am Ende des Untersuchungszeitraums war der Knochen-Implantat-Kontakt der höher dotierten CMPC-Paste größer, was vermutlich vor allem der im Vergleich langsameren Resorption zuzusprechen ist.

Die untersuchten Calcium-dotierten Struvit-bildenden Magnesiumphosphatzemente stellen aufgrund ihrer guten Resorbierbarkeit und ihrer Fähigkeit zur Knochenbildung ein vielversprechendes injizierbares Knochenersatzmaterial dar. Sie resorbieren im Vergleich zu Calciumphosphatzement schneller, binden unter physiologischen pH-Bedingungen ab und können sowohl als präfabrizierte, injizierbare Paste als auch in granulierter Form zur Anwendung kommen, was ein weites Anwendungsspektrum ermöglicht. Die bisher ermittelten Zementformulierungen stellen einen guten Ausgangspunkt für eine spätere klinische Anwendung dar. Zuvor sind tierexperimentelle Studien an Großtieren erforderlich, um besser auf den Menschen übertragbare Ergebnisse zu erhalten, sowie gegebenenfalls eine Anpassung der Degradationsgeschwindigkeit über die Calcium-Dotierung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Hing, K.A., *Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?* Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2004. **362**(1825): p. 2821.
2. Schwenzer, N. and Ehrenfeld, M., *Chirurgische Grundlagen*. Zahn-Mund-Kiefer Heilkunde. Vol. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. 2008, Stuttgart Thieme. p. 177.
3. Wolff, J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen* 1892, Berlin: Hirschwald.
4. Mosekilde, L., Thomsen, J.S. and Mosekilde, E., *Dynamics of Bone Remodelling*, in *Modelling the Dynamics of Biological Systems: Nonlinear Phenomena and Pattern Formation*. 1995, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 186.
5. Schwenzer, N. and Ehrenfeld, M., *Zahnärztliche Chirurgie*. Vol. 4. 2009, Stuttgart: Thieme. p. 215.
6. Schemitsch, E.H., *Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!* J Orthop Trauma, 2017. **31 Suppl 5**: p. S20-S22.
7. Schmitz, J.P. and Hollinger, J.O., *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
8. Schenk, R.K. and Willenegger, H.R., *Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect*. Unfallheilkunde, 1977. **80**(5): p. 155-160.
9. Liebschner, M.A.K., *Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone*. Biomaterials, 2004. **25**(9): p. 1697-1714.
10. Suzuki, H., Takahashi, D., Matsuo, K., Kimoto, A., Matsumoto, K., Hasegawa, T., Akashi, M. and Komori, T., *Clinical Study of 19 Cases Resulting in Dental Implant Removal*. Kobe J Med Sci, 2016. **61**(4): p. 102-108.
11. Sanan, A. and Haines, S.J., *Repairing holes in the head: a history of cranioplasty*. Neurosurgery, 1997. **40**(3): p. 588-603.
12. Harris, D.A., Fong, A.J., Buchanan, E.P., Monson, L., Khechoyan, D. and Lam, S., *History of synthetic materials in alloplastic cranioplasty*. Neurosurg Focus, 2014. **36**(4): p. E20.
13. Schnieders, J., Gbureck, U., Thull, R. and Kissel, T., *Controlled release of gentamicin from calcium phosphate-poly(lactic acid-co-glycolic acid) composite bone cement*. Biomaterials, 2006. **27**(23): p. 4239-4249.
14. Vorndran, E., Geffers, M., Ewald, A., Lemm, M., Nies, B. and Gbureck, U., *Ready-to-use injectable calcium phosphate bone cement paste as drug carrier*. Acta Biomater, 2013. **9**(12): p. 9558-9567.
15. Froum, S.J., Wallace, S., Cho, S.C., Rosenburg, E., Froum, S., Schoor, R., Mascarenhas, P., Tarnow, D.P., Corby, P., Elian, N., Fickl, S., Ricci, J., Hu, B., Bromage, T. and Khouly, I., *A histomorphometric comparison of Bio-Oss alone versus Bio-Oss and platelet-derived growth factor for*

- sinus augmentation: a postsurgical assessment.* Int J Periodontics Restorative Dent, 2013. **33**(3): p. 269-279.
16. Garcia, P., Franz, D. and Raschke, M., *Knochenersatzmaterialien; Grundlagen und klinischer Nutzen.* Z Orthop Unfall, 2014. **152**(02): p. 152-160.
 17. 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.* J Craniomaxillofac Surg, 2012. **40**(8): p. 706-718.
 18. Marx, R.E. and Garg, A.K., *Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology.* Implant Dent, 1998. **7**(4): p. 267-276.
 19. Hing, K.A., *Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?* Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2004. **362**(1825): p. 2821-2850.
 20. Linhart, W., Briem, D., Peters, A., Lehmann, W., Windolf, J. and Rueger, J.M., *Resorbierbare Kalziumphosphatzemente.* Trauma und Berufskrankheit, 2004. **6**(4): p. 277-284.
 21. Rosentritt, M., Ilie, N. and Lohbauer, U., *Werkstoffkunde in der Zahnmedizin.* 2018, Thieme. p. 386-396.
 22. Schwenzer, N. and Ehrenfeld, M., *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie.* 2010, Stuttgart: Thieme. p. 436.
 23. Rentsch, C., Rentsch, B., Scharnweber, D., Zwipp, H. and Rammelt, S., *Knochenersatz Transplantate und Erssatzmaterialien - Ein Update.* Der Unfallchirurg, 2012. **115**(10): p. 938-949.
 24. Kübler, N.R., *Osteoinduction and -reparation.* Mund Kiefer Gesichtschir, 1997. **1**(1): p. 2-25.
 25. Schmidt-Rohlfing, B., Tzioupis, C., Menzel, C.L. and Pape, H.C.J.D.U., *Tissue Engineering von Knochengewebe.* 2009. **112**(9): p. 785-795.
 26. Hierner, R., Täger, G. and Nast-Kolb, D.J.D.U., *Die vaskularisierte Knochen transplantation.* 2009. **112**(4): p. 405-418.
 27. Pitzen, T., Kränzlein, K., Steudel, W.I. and Strowitzki, M., *Postoperative Beschwerden und Befunde im Bereich der Spanentnahmestelle am Becken bei ventraler zervikaler Fusion.* Zentralbl Neurochir, 2004. **65**(01): p. 7-12.
 28. Seiler, J.G., 3rd and Johnson, J., *Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications.* J South Orthop Assoc, 2000. **9**(2): p. 91-97.
 29. v. Garrel, T. and Gotzen, L.J.D.U., *Allogene Knochen transplantation und Knochenbanking.* 1998. **101**(9): p. 713-727.
 30. Roux, F.X., Brasnu, D., Loty, B., George, B. and Guillemin, G., *Madreporic coral: a new bone graft substitute for cranial surgery.* J Neurosurg, 1988. **69**(4): p. 510-513.
 31. Ripamonti, U., Crooks, J., Khoali, L. and Roden, L., *The induction of bone formation by coral-derived calcium carbonate/hydroxyapatite constructs.* Biomaterials, 2009. **30**(7): p. 1428-1439.
 32. Pountos, I. and Giannoudis, P.V., *Is there a role of coral bone substitutes in bone repair?* Injury, 2016. **47**(12): p. 2606-2613.
 33. Laurencin, C.T. and El-Amin, S.F., *Xenotransplantation in orthopaedic surgery.* J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16**(1): p. 4-8.

34. Wenz, B., Oesch, B. and Horst, M., *Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone*. *Biomaterials*, 2001. **22**(12): p. 1599-1606.
35. Kim, Y., Rodriguez, A.E. and Nowzari, H., *The Risk of Prion Infection through Bovine Grafting Materials*. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2016. **18**(6): p. 1095-1102.
36. Long, M. and Rack, H.J., *Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective*. *Biomaterials*, 1998. **19**(18): p. 1621-1639.
37. Gosain, A.K., *Bioactive glass for bone replacement in craniomaxillofacial reconstruction*. *Plast Reconstr Surg*, 2004. **114**(2): p. 590-593.
38. Dorozhkin, S.V., *Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics and Its Clinical Applications*, in *Clinical Applications of Biomaterials: State-of-the-Art Progress, Trends, and Novel Approaches*, G. Kaur, Editor. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 123-226.
39. Ginebra, M.P., Espanol, M., Montufar, E.B., Perez, R.A. and Mestres, G., *New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(8): p. 2863-2873.
40. Christel, T., Kuhlmann, M., Vorndran, E., Groll, J. and Gbureck, U., *Dual setting α -tricalcium phosphate cements*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2013. **24**(3): p. 573-581.
41. Helmus, M.N., Gibbons, D.F. and Cebon, D., *Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices*. *Toxicol Pathol*, 2008. **36**(1): p. 70-80.
42. Heimann, R.B., *Materials science of crystalline bioceramics: a review of basic properties and applications*. *CMU J*, 2002. **1**(1): p. 23-46.
43. Santavirta, S., Konttinen, Y.T., Saito, T., Gronblad, M., Partio, E., Kemppinen, P. and Rokkanen, P., *Immune response to polyglycolic acid implants*. *J Bone Joint Surg Br*, 1990. **72**(4): p. 597-600.
44. Davies, J.E., Matta, R., Mendes, V.C. and Perri de Carvalho, P.S., *Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery*. *Organogenesis*, 2010. **6**(3): p. 161-166.
45. Ostrowski, N., Roy, A. and Kumta, P.N., *Magnesium Phosphate Cement Systems for Hard Tissue Applications: A Review*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2016. **2**(7): p. 1067-1083.
46. Van der Stok, J., Van Lieshout, E.M., El-Massoudi, Y., Van Kralingen, G.H. and Patka, P., *Bone substitutes in the Netherlands - a systematic literature review*. *Acta Biomater*, 2011. **7**(2): p. 739-750.
47. He, H., Qiao, Z. and Liu, C., *Accelerating Biodegradation of Calcium Phosphate Cement*, in *Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cements*, C. Liu and H. He, Editors. 2018, Springer Singapore: Singapore. p. 227-255.
48. Kanter, B., Geffers, M., Ignatius, A. and Gbureck, U., *Control of in vivo mineral bone cement degradation*. *Acta Biomater*, 2014. **10**(7): p. 3279-3287.

49. Grover, L.M., Gbureck, U., Wright, A.J., Tremayne, M. and Barralet, J.E., *Biologically mediated resorption of brushite cement in vitro*. *Biomaterials*, 2006. **27**(10): p. 2178-2185.
50. Grossardt, C., Ewald, A., Grover, L.M., Barralet, J.E. and Gbureck, U., *Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells*. *Tissue Eng Part A*, 2010. **16**(12): p. 3687-3695.
51. Habibovic, P., Yuan, H., van der Valk, C.M., Meijer, G., van Blitterswijk, C.A. and de Groot, K., *3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials*. *Biomaterials*, 2005. **26**(17): p. 3565-3575.
52. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphate cements for biomedical application*. *Journal of Materials Science*, 2008. **43**(9): p. 3028-3057.
53. Ha, S.-W. and Wintermantel, E., *Keramische Werkstoffe, in Medizintechnik Life Science Engineering: Interdisziplinarität · Biokompatibilität · Technologien · Implantate · Diagnostik · Werkstoffe · Business*. 2008, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 269-290.
54. Aghaloo, T.L. and Moy, P.K., *Which hard tissue augmentation techniques are the most successful in furnishing bony support for implant placement?* *Int J Oral Maxillofac Implants*, 2007. **22 Suppl**: p. 49-70.
55. Chen, F., Yu, Y., Ma, X. and Liu, C., *Injectable Calcium Phosphate Cements for Hard Tissue Repair, in Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cements*. 2018, Springer Singapore: Singapore. p. 147-186.
56. Cyster, L.A., Grant, D.M., Howdle, S.M., Rose, F.R., Irvine, D.J., Freeman, D., Scotchford, C.A. and Shakesheff, K.M., *The influence of dispersant concentration on the pore morphology of hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering*. *Biomaterials*, 2005. **26**(7): p. 697-702.
57. Pittet, C. and Lemaître, J., *Mechanical characterization of brushite cements: A Mohr circles' approach*. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. **53**(6): p. 769-780.
58. Kanie, T., Kadokawa, A., Nagata, M. and Arikawa, H., *A comparison of stress relaxation in temporary and permanent luting cements*. *J Prosthodont Res*, 2013. **57**(1): p. 46-50.
59. Wilson, A.D., *The chemistry of dental cements*. *Chemical Society Reviews*, 1978. **7**(2): p. 265-296.
60. Ma, X., Li, C., Jia, L., Wang, Y., Liu, W., Zhou, X., Johnson, T.M. and Huang, D., *Materials for retrograde filling in root canal therapy*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(12).
61. Cao, P., Hao, W., Zhang, L., Zhang, Q., Liu, X. and Li, M., *Safety and Efficacy Studies of Vertebroplasty with Dual Injections for the Treatment of Osteoporotic Vertebral Compression Fractures: Preliminary Report*. *Acad Radiol*, 2019.
62. Grados, F., Depriester, C., Cayrolle, G., Hardy, N., Deramond, H. and Fardellone, P., *Long-term observations of vertebral osteoporotic fractures treated by percutaneous vertebroplasty*. *Rheumatology*, 2000. **39**(12): p. 1410-1414.

63. Chen, F., Song, Z. and Liu, C., *Fast setting and anti-washout injectable calcium-magnesium phosphate cement for minimally invasive treatment of bone defects*. Journal of Materials Chemistry B, 2015. **3**(47): p. 9173-9181.
64. Yang, H. and Zou, J., *Filling Materials Used in Kyphoplasty and Vertebroplasty for Vertebral Compression Fracture: A Literature Review*. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 2011. **39**(2): p. 87-91.
65. Ostrowski, N., R., A. and Kumta, P.N., *Magnesium Phosphate Cement Systems for Hard Tissue Applications A Review*, in *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016. p. 1067-1083.
66. Heinemann, S., Rossler, S., Lemm, M., Ruhnnow, M. and Nies, B., *Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid*. Acta Biomater, 2013. **9**(4): p. 6199-6207.
67. Gbureck, U. and Thull, R., *Mechanische und rheologische Eigenschaften mineralischer Knochenzemente*, in *BIOMaterialien*. 2005. p. 287.
68. Takagi, S. and Chow, L.C., *Formation of macropores in calcium phosphate cement implants*. J Mater Sci Mater Med, 2001. **12**(2): p. 135-139.
69. Bohner, M., *Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements*. Injury, 2000. **31 Suppl 4**: p. 37-47.
70. Sarda, S., Nilsson, M., Balcells, M. and Fernandez, E., *Influence of surfactant molecules as air-entraining agent for bone cement macroporosity*. J Biomed Mater Res A, 2003. **65**(2): p. 215-221.
71. Bohner, M., Gbureck, U. and Barralet, J.E., *Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6423-6429.
72. Moseke, C., Saratsis, V. and Gbureck, U., *Injectability and mechanical properties of magnesium phosphate cements*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(12): p. 2591-2598.
73. Driessens, F.C.M., Planell, J.A., Boltong, M.G., Khairoun, I. and Ginebra, M.P., *Osteotransductive bone cements*. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 1998. **212**(6): p. 427-435.
74. Driessens, F.C.M., Boltong, M.G., Bermudez, O. and Planell, J.A., *Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1993. **4**(5): p. 503-508.
75. ASTM, *Standard test method for time of setting of hydraulicity cement paste by Gillmore needles, ASTM C266-89*. Annual Book of ASTM Standards. Vol. 04.01 Cement, Lime, Gypsum. 1993, Philadelphia. p. 189-191.
76. Vorndran, E., Ewald, A., Muller, F.A., Zorn, K., Kufner, A. and Gbureck, U., *Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(3): p. 429-436.
77. Ginebra, M.P., Fernandez, E., Driessens, F.C.M., Boltong, M.G., Muntasell, J., Font, J. and Planell, J.A., *The effects of temperature on the behaviour*

- of an apatitic calcium phosphate cement.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995. **6**(12): p. 857-860.
78. Mestres, G. and Ginebra, M.P., *Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties.* Acta Biomater, 2011. **7**(4): p. 1853-1861.
79. Bacchi, A. and Pfeifer, C.S., *Rheological and mechanical properties and interfacial stress development of composite cements modified with thio-urethane oligomers.* Dent Mater, 2016. **32**(8): p. 978-986.
80. Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Takechi, M., Toh, T., Kon, M., Nagayama, M. and Asaoka, K., *Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: hydroxyapatite putty containing an increased amount of sodium alginate.* J Biomed Mater Res, 1997. **36**(3): p. 393-399.
81. Lee, H.J., Kim, B., Padalhin, A.R. and Lee, B.T., *Incorporation of chitosan-alginate complex into injectable calcium phosphate cement system as a bone graft material.* Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019. **94**: p. 385-392.
82. Combes, C. and Rey, C., *Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials.* Acta Biomater, 2010. **6**(9): p. 3362-3378.
83. Blank, M., *Entwicklung und materialwissenschaftliche Untersuchungen von Calcium- und Magnesiumphosphat-Biozementen.* unv. Diss., 2009, Universität Würzburg.
84. Felsenberg, D., *Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit.* Pharmazie in unserer Zeit, 2001. **30**(6): p. 488-494.
85. Soldner, E. and Herr, G., *Knochen, Knochentransplantate und Knochenersatzmaterialien.* Trauma und Berufskrankheit, 2001. **3**(4): p. 256-269.
86. Ewald, A., Helmschrott, K., Knebl, G., Mehrban, N., Grover, L.M. and Gbureck, U., *Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein expression in osteoblastic cells.* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011. **96**(2): p. 326-332.
87. Liu, C. and He, H., *Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cements.* Springer Series in Biomaterials Science and Engineering 2018, Singapore: Springer.
88. Bohner, M., *pH Variations of a Solution after Injecting Brushite Cements.* Key Engineering Materials 2001. **192-195**: p. 813-816.
89. Gbureck, U., Barralet, J.E., Grover, L.M., Hofmann, M. and Thull, R., *Mechanische Festigkeit und Porosität von Calciumphosphat-Zementen, in BIOMaterialien.* 2003. p. 258.
90. Rumpel, E., Wolf, E., Kauschke, E., Bienengraber, V., Bayerlein, T., Gedrange, T. and Proff, P., *The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo.* Folia Morphol (Warsz), 2006. **65**(1): p. 43-48.
91. Günther, K.P., Scharf, H.-P., Pesch, H.-J. and Puhl, W., *Osteointegration of different bone substitute materials in an experimental model.* Der Orthopäde, 1998. **27**(2): p. 105-117.
92. Theiss, F., Apelt, D., Brand, B., Kutter, A., Zlinszky, K., Bohner, M., Matter, S., Frei, C., Auer, J.A. and von Rechenberg, B., *Biocompatibility and*

- resorption of a brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2005. **26**(21): p. 4383-4394.
93. Oberle, A., Theiss, F., Bohner, M., Müller, J., Kästner, S., Frei, C., Boecken, I., Zlinszky, K., Wunderlin, S., Auer, J. and von Rechenberg, B., *Investigation about the clinical use of brushite- and hydroxylapatite-cement in sheep*. Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 2005. **147**(11): p. 482-490.
 94. Constantz, B.R., Barr, B.M., Ison, I.C., Fulmer, M.T., Baker, J., McKinney, L., Goodman, S.B., Gunasekaran, S., Delaney, D.C., Ross, J. and Poser, R.D., *Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **43**(4): p. 451-461.
 95. Penel, G., Leroy, N., Van Landuyt, P., Flautre, B., Hardouin, P., Lemaître, J. and Leroy, G., *Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model*. Bone, 1999. **25**(2, Supplement 1): p. 81S-84S.
 96. Nabyouni, M., Bruckner, T., Zhou, H., Gbureck, U. and Bhaduri, S.B., *Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications*. Acta Biomater, 2018. **66**: p. 23-43.
 97. Diba, M., Tapia, F., Boccaccini, A.R. and Strobel, L.A., *Magnesium-Containing Bioactive Glasses for Biomedical Applications*. International Journal of Applied Glass Science, 2012. **3**(3): p. 221-253.
 98. Diba, M., Goudouri, O.-M., Tapia, F. and Boccaccini, A.R., *Magnesium-containing bioactive polycrystalline silicate-based ceramics and glass-ceramics for biomedical applications*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2014. **18**(3): p. 147-167.
 99. Coe, F.L., Evan, A. and Worcester, E., *Kidney stone disease*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2598-2608.
 100. Kanter, B., Vikman, A., Bruckner, T., Schamel, M., Gbureck, U. and Ignatius, A., *Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model*. Acta Biomater, 2018. **69**: p. 352-361.
 101. Mestres, G. and Ginebra, M.-P., *Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(4): p. 1853-1861.
 102. Hall, D.A., Stevens, R. and Jazairi, B.E., *Effect of Water Content on the Structure and Mechanical Properties of Magnesia-Phosphate Cement Mortar*. Journal of the American Ceramic Society, 1998. **81**(6): p. 1550-1556.
 103. Brückner, T., Heilig, P., Cornelius Jordan, M., Marie Paul, M., Blunk, T., Gbureck, U. and Hoelscher-Doht, S., *Biomechanical Evaluation of Promising Different Bone Substitutes in a Clinically Relevant Test Set-Up*. Materials (Basel), 2019. **12**(9): p. 1364.
 104. Jia, J., Zhou, H., Wei, J., Jiang, X., Hua, H., Chen, F., Wei, S., Shin, J.W. and Liu, C., *Development of magnesium calcium phosphate biocement for bone regeneration*. J R Soc Interface, 2010. **7**(49): p. 1171-1180.
 105. Mestres, G., Abdolhosseini, M., Bowles, W., Huang, S.H., Aparicio, C., Gorr, S.U. and Ginebra, M.P., *Antimicrobial properties and dentin bonding*

- strength of magnesium phosphate cements*. Acta Biomater, 2013. **9**(9): p. 8384-8393.
106. Mestres, G., Aguilera, F.S., Manzanares, N., Sauro, S., Osorio, R., Toledano, M. and Ginebra, M.P., *Magnesium phosphate cements for endodontic applications with improved long-term sealing ability*. Int Endod J, 2014. **47**(2): p. 127-139.
107. 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**(2): p. 496-504.
108. Yang, X., Xie, B., Wang, L., Qin, Y., Henneman, Z.J. and Nancollas, G.H., *Influence of magnesium ions and amino acids on the nucleation and growth of hydroxyapatite*. CrystEngComm, 2011. **13**(4): p. 1153-1158.
109. Walker, J., Shadanbaz, S., Woodfield, T.B.F., Staiger, M.P. and Dias, G.J., *Magnesium biomaterials for orthopedic application: A review from a biological perspective*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2014. **102**(6): p. 1316-1331.
110. Staiger, M.P., Pietak, A.M., Huadmai, J. and Dias, G., *Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1728-1734.
111. 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 Biomater, 2008. **4**(6): p. 1873-1884.
112. Aquino-Martinez, R., Artigas, N., Gamez, B., Rosa, J.L. and Ventura, F., *Extracellular calcium promotes bone formation from bone marrow mesenchymal stem cells by amplifying the effects of BMP-2 on SMAD signalling*. Plos One, 2017. **12**(5).
113. Maeno, S., Niki, Y., Matsumoto, H., Morioka, H., Yatabe, T., Funayama, A., Toyama, Y., Taguchi, T. and Tanaka, J., *The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture*. Biomaterials, 2005. **26**(23): p. 4847-4855.
114. Klar, R.M., Duarte, R., Dix-Peek, T., Dickens, C., Ferretti, C. and Ripamonti, U., *Calcium ions and osteoclastogenesis initiate the induction of bone formation by coral-derived macroporous constructs*. J Cell Mol Med, 2013. **17**(11): p. 1444-1457.
115. Hoppe, A., Güldal, N.S. and Boccaccini, A.R., *A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics*. Biomaterials, 2011. **32**(11): p. 2757-2774.
116. Kohn, E.C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R.P. and Liotta, L.A., *Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1307-1311.
117. 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 Biomater, 2011. **7**(9): p. 3469-3475.
118. Takagi, S., Chow, L.C., Hirayama, S. and Sugawara, A., *Premixed calcium-phosphate cement pastes*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2003. **67**(2): p. 689-696.

119. Xu, H.H.K., Carey, L.E., Simon, C.G., Jr., Takagi, S. and Chow, L.C., *Premixed calcium phosphate cements: synthesis, physical properties, and cell cytotoxicity*. Dental materials 2007. **23**(4): p. 433-441.
120. Carey, L.E., Xu, H.H., Simon, C.G., Jr., Takagi, S. and Chow, L.C., *Premixed rapid-setting calcium phosphate composites for bone repair*. Biomaterials, 2005. **26**(24): p. 5002-5014.
121. Cherng, A., Takagi, S. and Chow, L.C., *Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement*. Journal of Biomedical Materials Research, 1997. **35**(3): p. 273-277.
122. Lode, A., Heiss, C., Knapp, G., Thomas, J., Nies, B., Gelinsky, M. and Schumacher, M., *Strontium-modified premixed calcium phosphate cements for the therapy of osteoporotic bone defects*. Acta Biomaterialia, 2018. **65**: p. 475-485.
123. Khairoun, I., Boltong, M.G., Driessens, F.C. and Planell, J.A., *Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement*. J Biomed Mater Res, 1997. **38**(4): p. 356-360.
124. Ewald, A., Kreczy, D., Brückner, T., Gbureck, U., Bengel, M., Hoess, A., Nies, B., Bator, J., Klammert, U. and Fuchs, A., *Development and Bone Regeneration Capacity of Premixed Magnesium Phosphate Cement Pastes*. Materials, 2019. **12**(13): p. 2119.
125. Moseke, C., Bayer, C., Vorndran, E., Barralet, J.E., Groll, J. and Gbureck, U., *Low temperature fabrication of spherical brushite granules by cement paste emulsion*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012. **23**(11): p. 2631-2637.
126. Tamimi, F.M., Torres, J., Tresguerres, I., Clemente, C., López-Cabarcos, E. and Blanco, L.J., *Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate*. Journal of Clinical Periodontology, 2006. **33**(12): p. 922-928.
127. Horch, R, S. and A, K., *Synthetische, phasenreine BetaTricalciumphosphat-Keramik (Cerasorb) zur Knochenregeneration bei der rekonstruktiven Chirurgie der Kiefer - Eine klinische Langzeitstudie mit Literaturübersicht*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift., 2004. **59**(12): p. 680-686.
128. Merten, H.-A., Wiltfang, J., Hönig, J.-F., Funke, M. and Luhr, H.-G., *Intraindividuellem Vergleich von α - und β -TCP-Keramik im Tierexperiment*. Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 2000. **4**(2): p. S509-S515.
129. Christel, T., Geffers, M., Klammert, U., Nies, B., Hoss, A., Groll, J., Kubler, A.C. and Gbureck, U., *Fabrication and cytocompatibility of spherical magnesium ammonium phosphate granules*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2014. **42**: p. 130-136.
130. Misiek, D.J., Kent, J.N. and Carr, R.F., *Soft tissue responses to hydroxylapatite particles of different shapes*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1984. **42**(3): p. 150-160.
131. *DIN EN ISO 10993-2:2006-10, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 2: Tierschutzbestimmungen (ISO 10993-2:2006)*.

132. *DIN EN ISO 10993-6:2017-09, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantationen (ISO 10993-6:2016).*
133. Donath, P.D.D.K., *Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien - Apparate und Methodenbeschreibung*, in *Kulzer-Druckschrift*, I.f.P.d.U. Hamburg, Editor. 1987: Norderstedt.
134. Mulisch, M. and Welsch, U., *Romeis - Mikroskopische Technik*. 19 ed. 2015, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
135. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. and Cardona, A., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-682.
136. Ostrowski, N., Lee, B., Hong, D., Enick, P.N., Roy, A. and Kumta, P.N., *Synthesis, Osteoblast, and Osteoclast Viability of Amorphous and Crystalline Tri-Magnesium Phosphate*. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2015. **1**(1): p. 52-63.
137. Yoshizawa, S., Brown, A., Barchowsky, A. and Sfeir, C., *Role of magnesium ions on osteogenic response in bone marrow stromal cells*. *Connect Tissue Res*, 2014. **55**(1): p. 155-159.
138. Yoshizawa, S., Brown, A., Barchowsky, A. and Sfeir, C., *Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation*. *Acta Biomater*, 2014. **10**(6): p. 2834-2842.
139. Luthringer, B.J.C. and Willumeit-Römer, R., *Effects of magnesium degradation products on mesenchymal stem cell fate and osteoblastogenesis*. *Gene*, 2016. **575**(1): p. 9-20.
140. Zeng, D., Xia, L., Zhang, W., Huang, H., Wei, B., Huang, Q., Wei, J., Liu, C. and Jiang, X., *Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with calcium-magnesium phosphate cement and bone marrow stromal cells in rabbits*. *Tissue Eng Part A*, 2012. **18**(7-8): p. 870-881.
141. Bengel, M., *In-vitro Testung neuer Anwendungsformen kalthärtender Knochenzemente aus resorbierbaren Orthophosphaten*. unv. Diss., 2018, Universität Würzburg.
142. Pearce, A.I., Richards, R.G., Milz, S., Schneider, E. and Pearce, S.G., *Animal models for implant biomaterial research in bone: a review*. *Eur Cell Mater*, 2007. **13**: p. 1-10.
143. Maglione, M., Salvador, E., Ruaro, M.E., Melato, M., Tromba, G., Angerame, D. and Bevilacqua, L., *Bone regeneration with adipose derived stem cells in a rabbit model*. *J Biomed Res*, 2018.
144. Gomes, P.S. and Fernandes, M.H., *Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies*. *Lab Anim*, 2011. **45**(1): p. 14-24.
145. Castaneda, S., Largo, R., Calvo, E., Rodriguez-Salvanes, F., Marcos, M.E., Diaz-Curiel, M. and Herrero-Beaumont, G., *Bone mineral measurements of subchondral and trabecular bone in healthy and osteoporotic rabbits*. *Skeletal Radiol*, 2006. **35**(1): p. 34-41.

146. Wancket, L.M., *Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices: Comparative Bone Structure and Common Model Uses*. Vet Pathol, 2015. **52**(5): p. 842-850.
147. Giannobile, W.V. and Nevins, M., *Osteology guidelines for oral and maxillofacial regeneration : preclinical models for translational research*. 2011, London; Chicago: Quintessence Pub.
148. Mapara, M., Thomas, B.S. and Bhat, K.M., *Rabbit as an animal model for experimental research*. Dental research journal, 2012. **9**(1): p. 111-118.
149. Bagi, C.M., Berryman, E. and Moalli, M.R., *Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery*. Comp Med, 2011. **61**(1): p. 76-85.
150. Wang, X., Mabrey, J.D. and Agrawal, C.M., *An interspecies comparison of bone fracture properties*. Biomed Mater Eng, 1998. **8**(1): p. 1-9.
151. Li, Y., Chen, S.-K., Li, L., Qin, L., Wang, X.-L. and Lai, Y.-X., *Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials*. Journal of Orthopaedic Translation, 2015. **3**(3): p. 95-104.
152. Walsh, W.R., Vizesi, F., Michael, D., Auld, J., Langdown, A., Oliver, R., Yu, Y., Irie, H. and Bruce, W., *β -TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model*. Biomaterials, 2008. **29**(3): p. 266-271.
153. Li, X., Niu, Y., Guo, H., Chen, H., Li, F., Zhang, J., Chen, W., Wu, Z., Deng, Y., Wei, J. and Liu, C., *Preparation and osteogenic properties of magnesium calcium phosphate biocement scaffolds for bone regeneration*. Journal of Instrumentation, 2013. **8**(07): p. C07010-C07010.
154. Stubinger, S. and Dard, M., *The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration*. J Invest Surg, 2013. **26**(5): p. 266-282.
155. Gauthier, O., Müller, R., von Stechow, D., Lamy, B., Weiss, P., Bouler, J.-M., Aguado, E. and Daculsi, G., *In vivo bone regeneration with injectable calcium phosphate biomaterial: A three-dimensional micro-computed tomographic, biomechanical and SEM study*. Biomaterials, 2005. **26**(27): p. 5444-5453.
156. Witte, F., Kaese, V., Haferkamp, H., Switzer, E., Meyer-Lindenberg, A., Wirth, C.J. and Windhagen, H., *In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3557-3563.
157. 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**(6): p. 1260-1269.
158. He, D., Dong, W., Tang, S., Wei, J., Liu, Z., Gu, X., Li, M., Guo, H. and Niu, Y., *Tissue engineering scaffolds of mesoporous magnesium silicate and poly(ϵ -caprolactone)–poly(ethylene glycol)–poly(ϵ -caprolactone) composite*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2014. **25**(6): p. 1415-1424.
159. Hassanein, A.H., Couto, R.A., Nedder, A., Zielins, E.R. and Greene, A.K., *Critical-size defect ossification: effect of leporid age in a cranioplasty model*. J Craniofac Surg, 2011. **22**(6): p. 2341-2343.

160. Peric, M., Dumic-Cule, I., Grcevic, D., Matijasic, M., Verbanac, D., Paul, R., Grgurevic, L., Trkulja, V., Bagi, C.M. and Vukicevic, S., *The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies*. Bone, 2015. **70**: p. 73-86.
161. Rohrer, M.D. and Schubert, C.C., *The cutting-grinding technique for histologic preparation of undecalcified bone and bone-anchored implants. Improvements in instrumentation and procedures*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1992. **74**(1): p. 73-78.
162. Blum, C., Bruckner, T., Ewald, A., Ignatius, A. and Gbureck, U., *Mg:Ca ratio as regulating factor for osteoclastic in vitro resorption of struvite biocements*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **73**: p. 111-119.
163. Ooms, E., Wolke, J., van de Heuvel, M.T., Jeschke, B. and Jansen, J.A., *Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 989-1000.
164. McGovern, J.A., Griffin, M. and Hutmacher, D.W., *Animal models for bone tissue engineering and modelling disease*. Disease models & mechanisms, 2018. **11**(4): p. dmm033084.
165. Lim, J., Lee, J., Yun, H.-S., Shin, H.-I. and Park, E.K., *Comparison of bone regeneration rate in flat and long bone defects: Calvarial and tibial bone*. Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2013. **10**(6): p. 336-340.
166. Wolf, F.I. and Cittadini, A., *Chemistry and biochemistry of magnesium*. Molecular Aspects of Medicine, 2003. **24**(1): p. 3-9.
167. Glasdam, S.-M., Glasdam, S. and Peters, G.H., *Chapter Six - The Importance of Magnesium in the Human Body: A Systematic Literature Review*, in *Advances in Clinical Chemistry*, G.S. Makowski, Editor. 2016, Elsevier. p. 169-193.
168. Maier, J.A.M., Bernardini, D., Rayssiguier, Y. and Mazur, A., *High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 2004. **1689**(1): p. 6-12.
169. He, L.Y., Zhang, X.M., Liu, B., Tian, Y. and Ma, W.H., *Effect of magnesium ion on human osteoblast activity*. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas, 2016. **49**(7): p. e5257.
170. Revell, P.A., Damien, E., Zhang, X.S., Evans, P. and Howlett, C.R., *The Effect of Magnesium Ions on Bone Bonding to Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy Implants*. Key Engineering Materials, 2004. **254-256**: p. 447-450.
171. Wang, W. and Yeung, K.W.K., *Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review*. Bioactive Materials, 2017. **2**(4): p. 224-247.
172. Janning, C., Willbold, E., Vogt, C., Nellesen, J., Meyer-Lindenberg, A., Windhagen, H., Thorey, F. and Witte, F., *Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1861-1868.

7 ANHANG

7.1 Gesamtübersicht Implantate

Die nachfolgende Tabelle gibt eine detaillierte Übersicht der implantierten Materialvariationen in jedem Versuchstier, sowie deren Liegedauer und Zugehörigkeit zu den OP- Gruppen. Die Kennzeichnung der Implantate erfolgte nach dem bereits beschriebenen Schema: Voran steht die Versuchstiernummer, danach ein A für den rechten, B für den linken Femur.

Tabelle: Übersicht der implantierten Materialvariationen je Versuchstier

Implantat		OP Gruppe	Material	Liegedauer in Wochen
Versuchstier Nr.	Femur			
1	B	3	P75	6
1	A	3	GV	6
3	B	1	PV	6
3	A	1	P25	6
7	B	3	P75	6
7	A	3	GV	6
8	B	3	P75	6
8	A	3	GV	6
9	B	3	P75	6
9	A	3	GV	6
10	B	3	P75	6
10	A	3	GV	6
11	B	3	P75	6
11	A	3	GV	6
12	B	5	G75	6
12	A	5	G25	6
13	B	5	G75	6
13	A	5	G25	6
15	B	1	PV	6
15	A	1	P25	6
16	B	1	PV	6
16	A	1	P25	6
17	B	1	PV	6
17	A	1	P25	6
18	B	4	P75	12

Implantat		OP Gruppe	Material	Liegedauer in Wochen
Versuchstier Nr.	Femur			
18	A	4	GV	12
19	B	4	P75	12
19	A	4	GV	12
20	B	4	P75	12
20	A	4	GV	12
21	B	4	P75	12
21	A	4	GV	12
22	B	4	P75	12
22	A	4	GV	12
23	B	4	P75	12
23	A	4	GV	12
24	B	5	G75	6
24	A	5	G25	6
25	B	5	G75	6
25	A	5	G25	6
26	B	5	G75	6
26	A	5	G25	6
27	A	2	PV	12
27	B	2	P25	12
28	A	2	PV	12
28	B	2	P25	12
29	A	2	PV	12
29	B	2	P25	12
30	A	2	PV	12
30	B	2	P25	12
31	A	2	PV	12
31	B	2	P25	12
32	B	6	G75	12
32	A	6	G25	12
33	B	6	G75	12
33	A	6	G25	12
34	B	6	G75	12
34	A	6	G25	12
35	B	6	G75	12
35	A	6	G25	12
36	B	6	G75	12
36	A	6	G25	12
37	B	6	G75	12
37	A	6	G25	12

		Kaninchen Nr. und OP-Gruppe																																	
Zeit	Gruppe 1	Gruppe 3	Gruppe 2	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
3	3005																																		
16																																			
17																																			
15																																			
11	3715																																		
1	4615																																		
10	4156																																		
9																																			
7																																			
8																																			
27	3900																																		
28	3905																																		
29	4095																																		
31																																			
30																																			
18	3515																																		
19	4005																																		
20	3910																																		
21	3300																																		
23	3830																																		
22	4145																																		
12																																			
13																																			
24																																			
25																																			
26																																			
33																																			
32																																			
34																																			
35																																			
36																																			
37																																			

7.3 Röntgenbilder der Femora der Versuchstiere

Nachfolgend sind die Röntgenbilder, welche von den Femora der Kaninchen angefertigt wurden, dargestellt. Die Kennzeichnungen der einzelnen Kaninchenfemora sind in den jeweiligen Beschriftungen unterhalb der Bilder angegeben, A steht dabei für den rechten, B für den linken Femur.

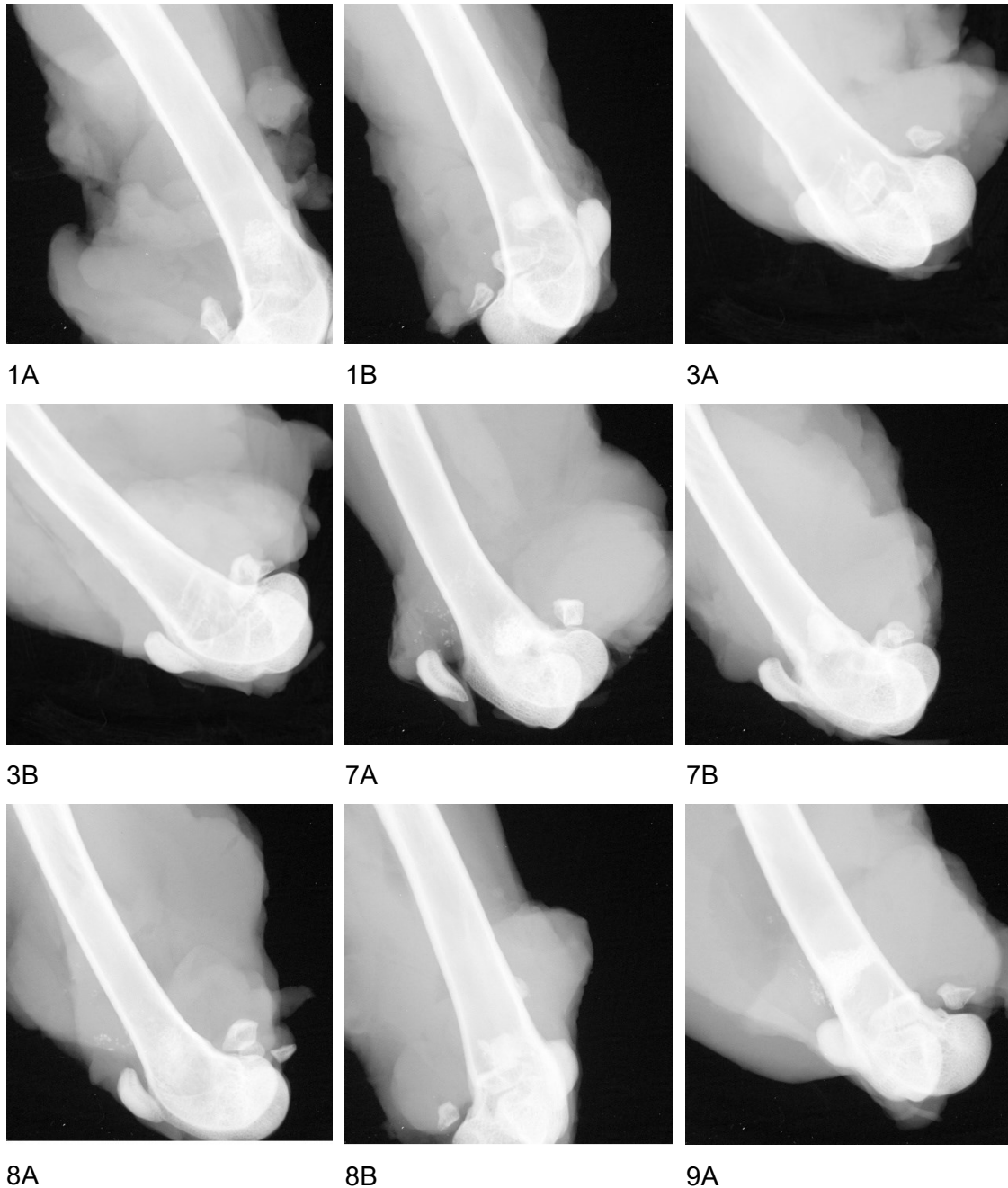


Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.1-9



9B



10A



10B



11A



11B



12A



12B



13A



13B

Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.9-13



15A



15B



16A



16B



17A



17B



18A



18B



19A

Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.15-19



19B



20A



20B



21A



21B



22A



22B



23A



23B

Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.19-23



24A



24B



25A



25B



26A



26B



27A



27B



28A

Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.24-28



28B



29A



29B



30A



30B



31A



31B



32A



33A

Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.28-33



33B



34A



34B



35A



35B



36A



36B



37A



37B

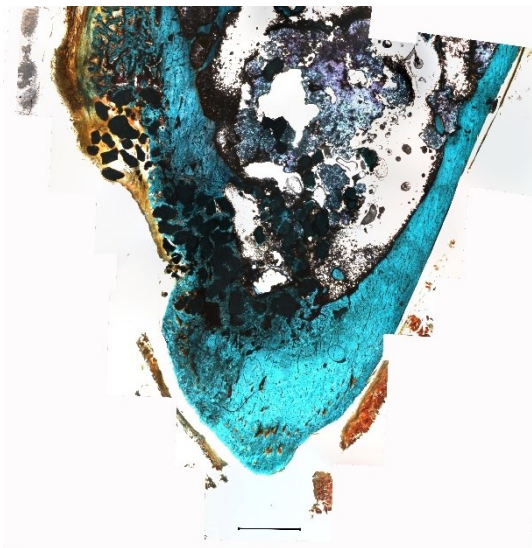
Abbildung: Röntgenbilder der Femora, Versuchstiere Nr.33-37

7.4 Übersichtsbilder der Trenn-Dünnschliffe

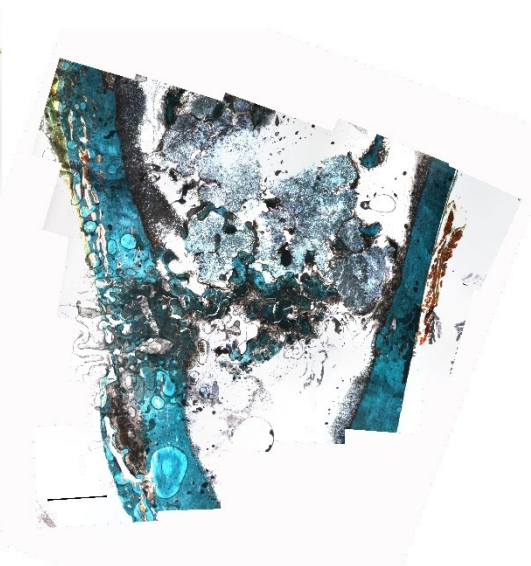
Nachfolgend sind als Ergänzung zu Kapitel 2.2.7 die weiteren Übersichtsbilder aller 128 angefertigten Trenn-Dünnschliffe aufgeführt.

Die Implantate erscheinen im Bild dunkelgrün bis schwarz. Leuchtend grüne bis türkisblaue Bereiche kennzeichnen mineralisierten Knochen, orange-rote nicht mineralisierten Knochen. Der Maßstab entspricht jeweils 2 mm.

Die Kennzeichnung der Implantate erfolgte nach dem bereits beschriebenen Schema: Voran steht die Versuchstiernummer, danach ein A für den rechten, B für den linken Femur. Die endständige Zahl steht für die Anzahl der angefertigten Trenn-Dünnschliffe des jeweiligen Femurs (1=erster Schnitt, 2=zweiter Schnitt). Die Bezeichnung der Trenn-Dünnschliffe und damit die Kennzeichnungen der einzelnen Implantate sind in den jeweiligen Bildbeschriftungen angegeben.



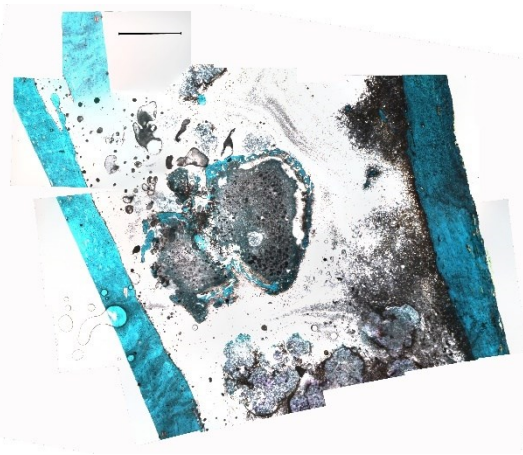
1A-1



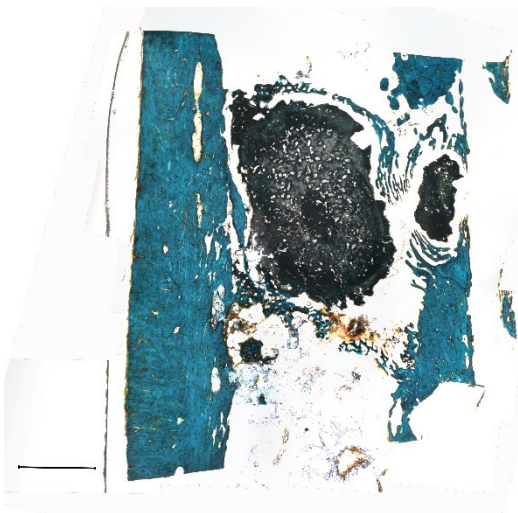
1A-2



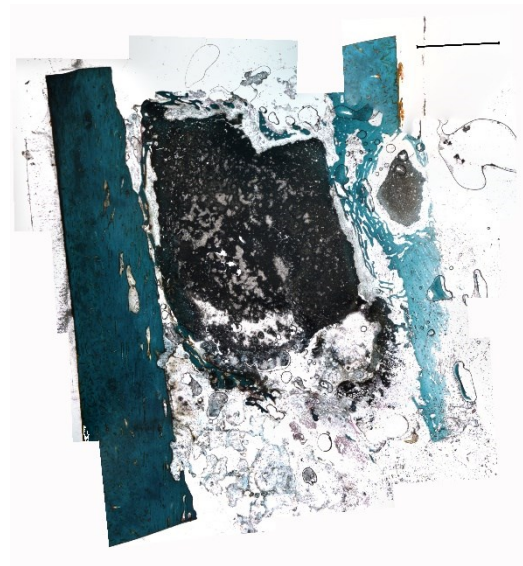
1B-1



1B-2



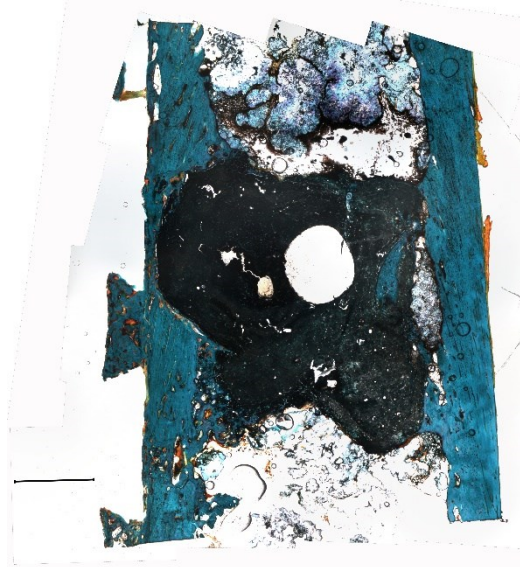
3A-1



3A-2



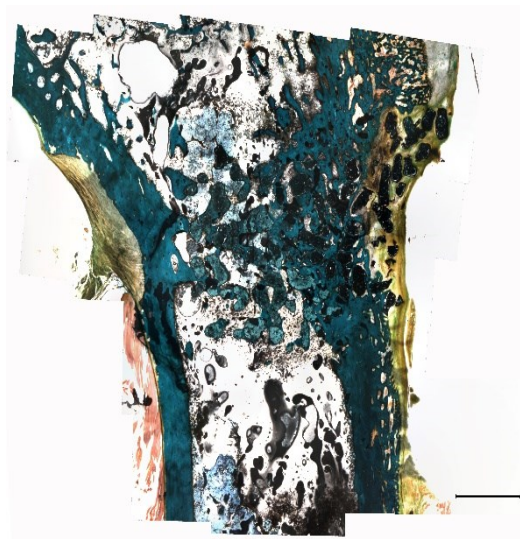
3B-1



3B-2



7A-1



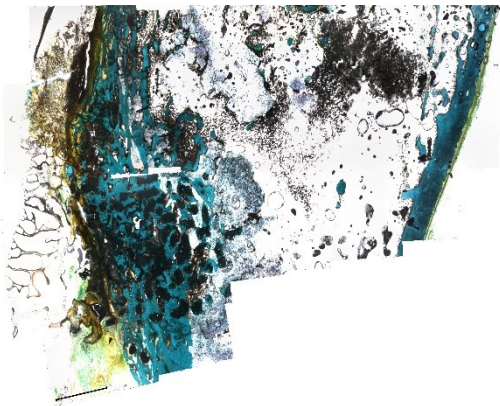
7A-2



7B-1



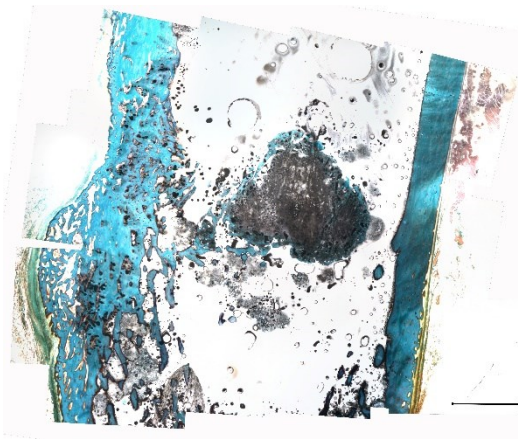
7B-2



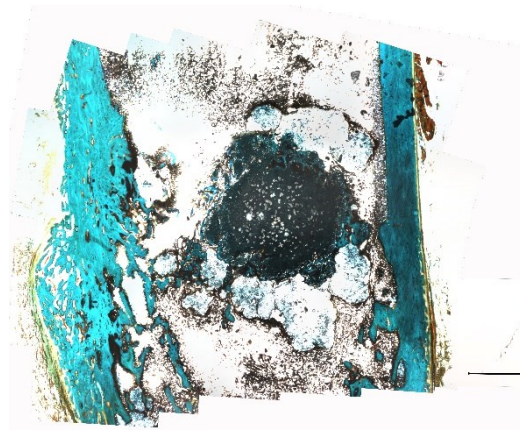
8A-1



8A-2



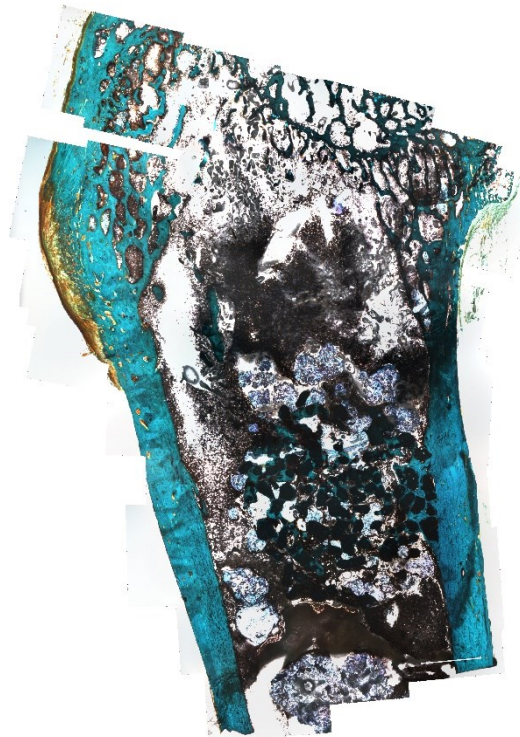
8B-1



8B-2



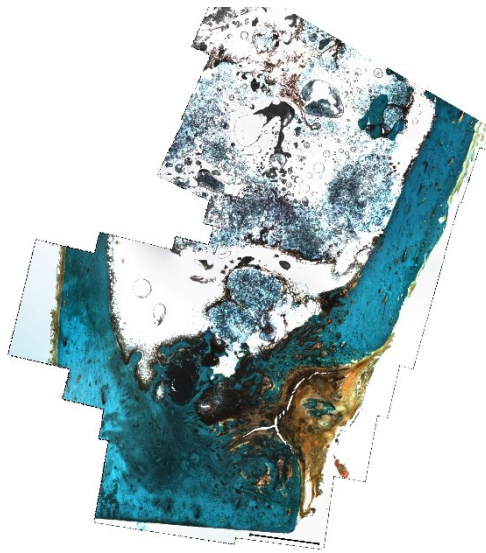
9A-1



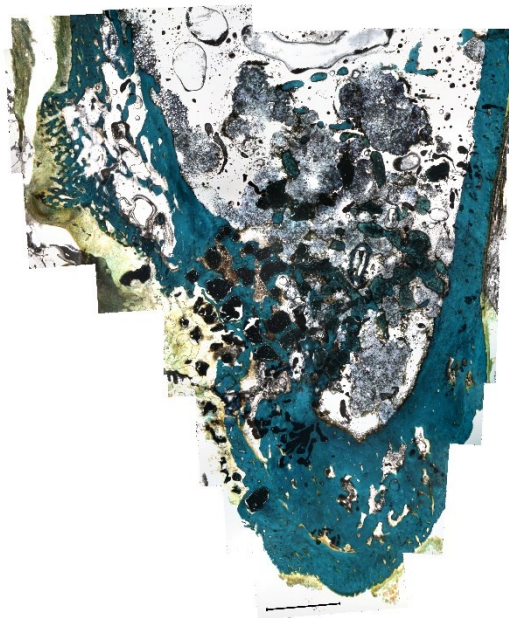
9A-2



9B-1



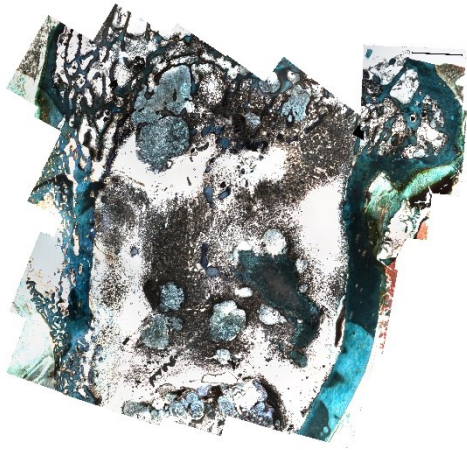
9B-2



10A-1



10A-2



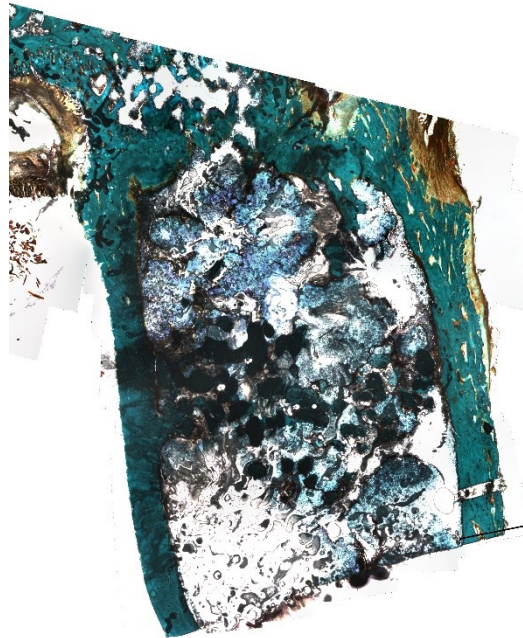
10B-1



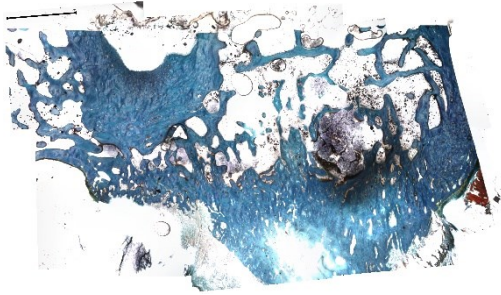
10B-2



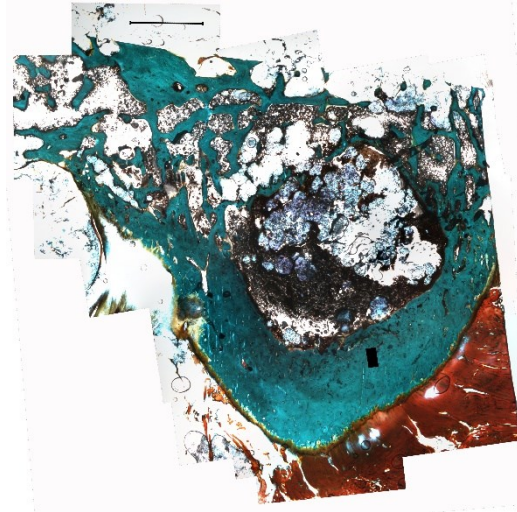
11A-1



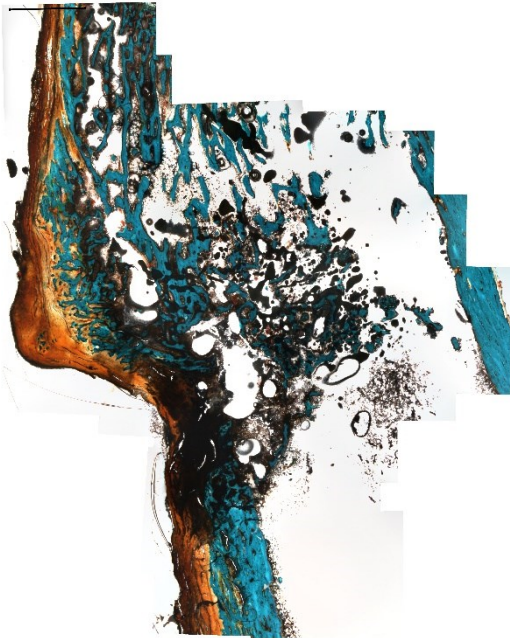
11A-2



11B-1



11B-2



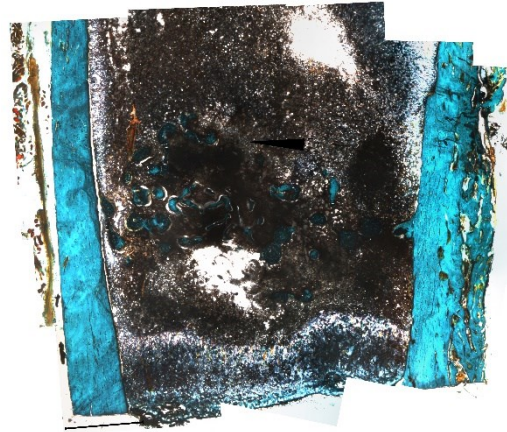
12A-1



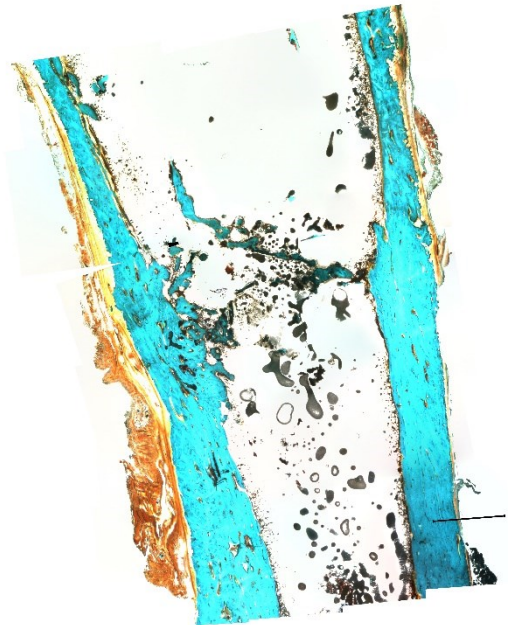
12A-2



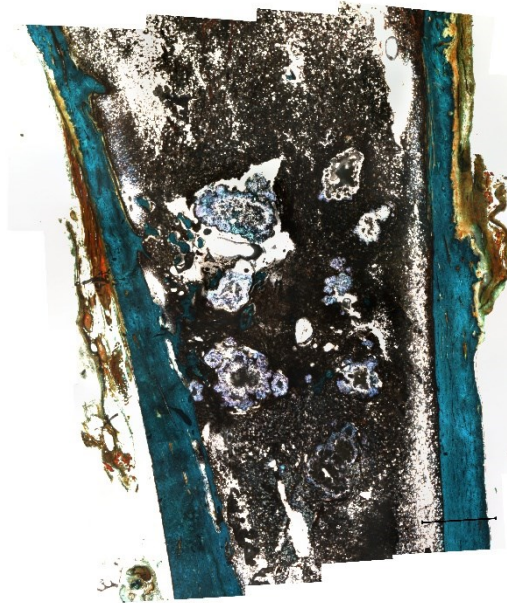
12B-1



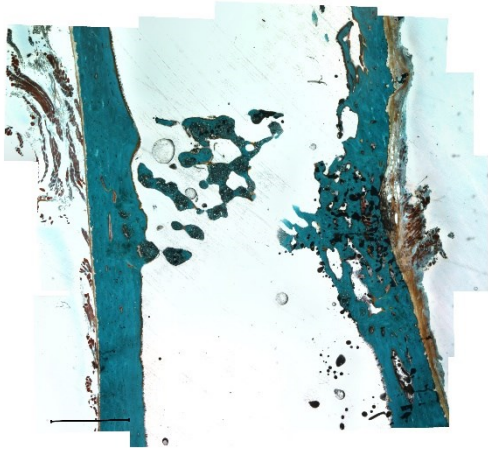
12B-2



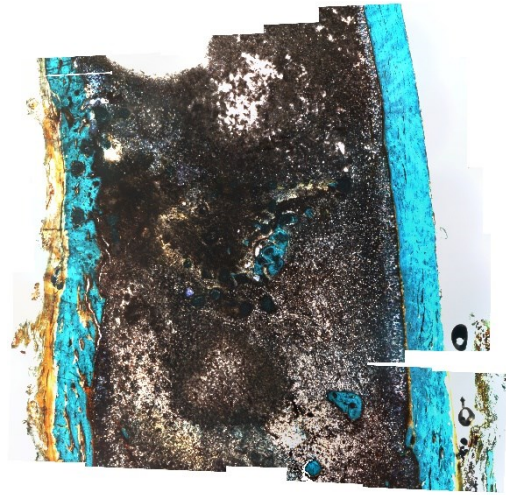
13A-1



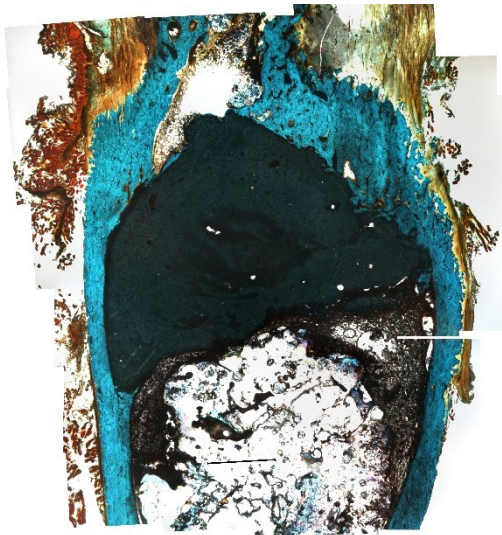
13A-2



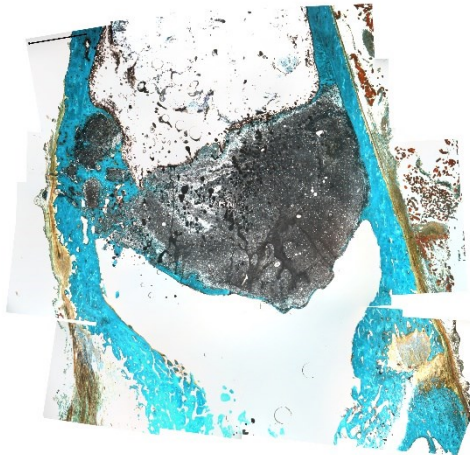
13B-1



13B-2



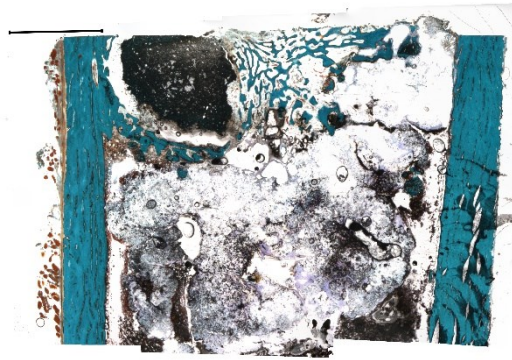
15A-1



15A-2



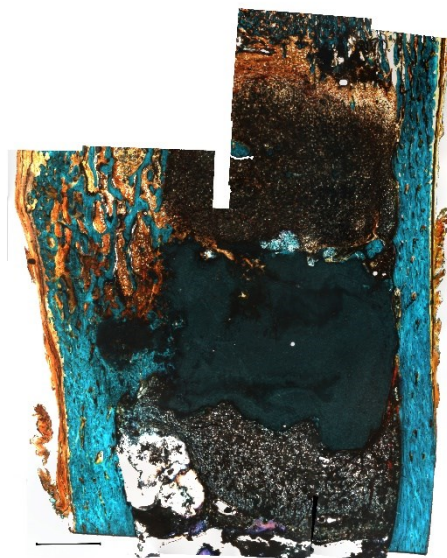
15B-1



15B-2



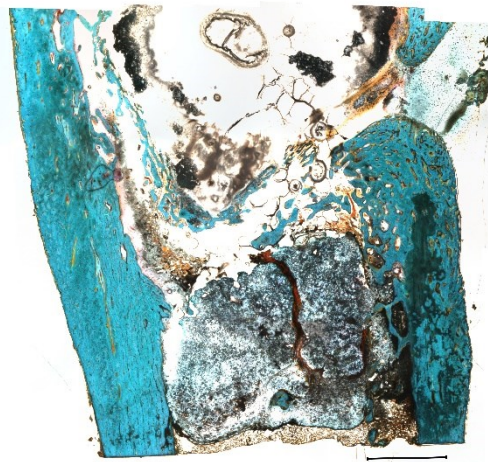
16A-1



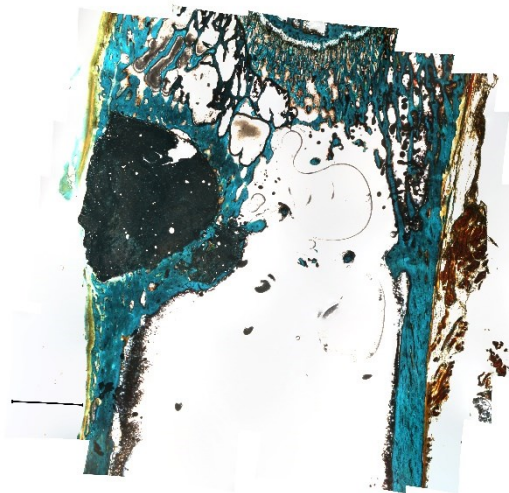
16A-2



16B-1



16B-2



17A-1



17A-2



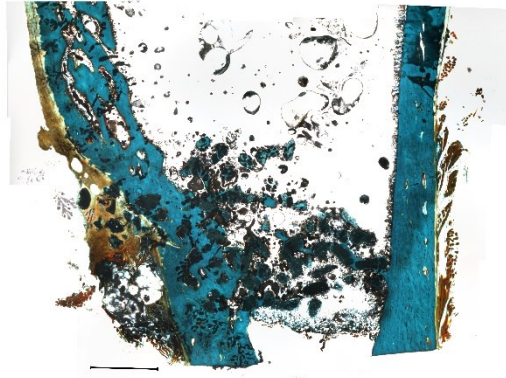
17B-1



17B-2



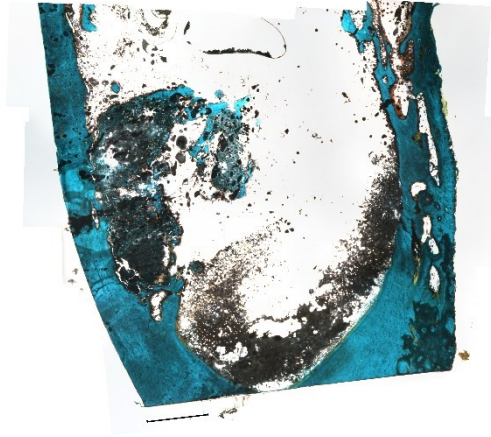
18A-1



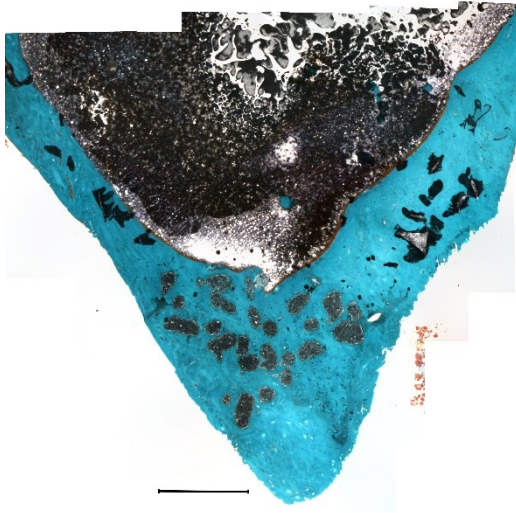
18A-2



18B-1



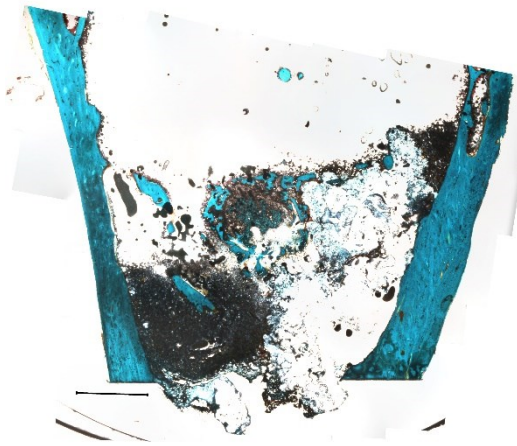
18B-2



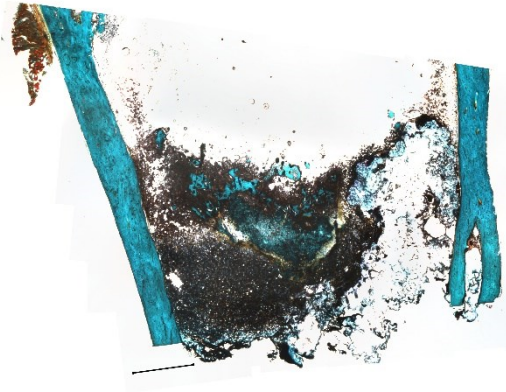
19A-1



19A-2



19B-1



19B-2



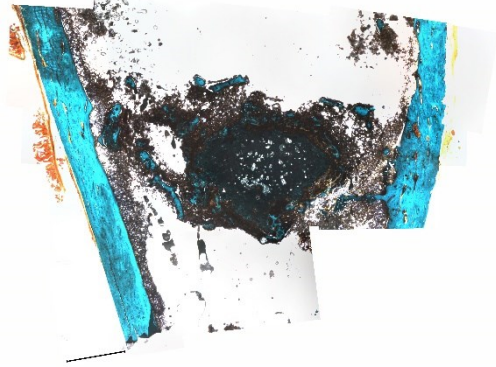
20A-1



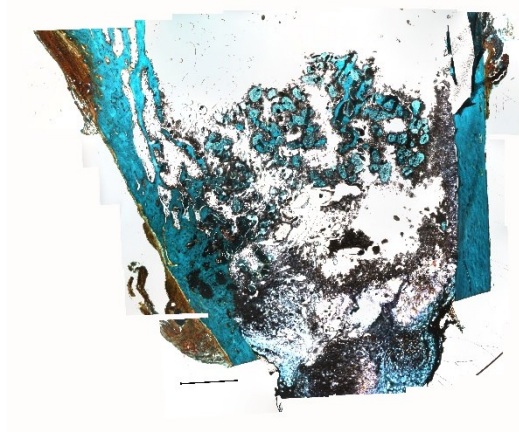
20A-2



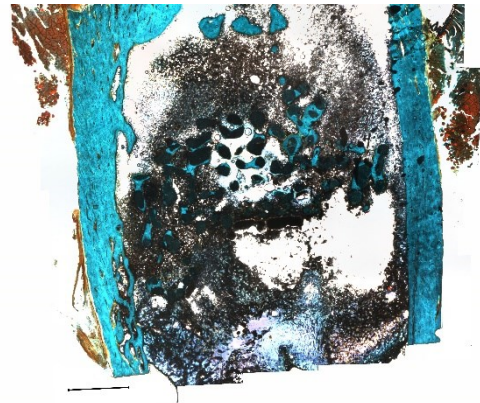
20B-1



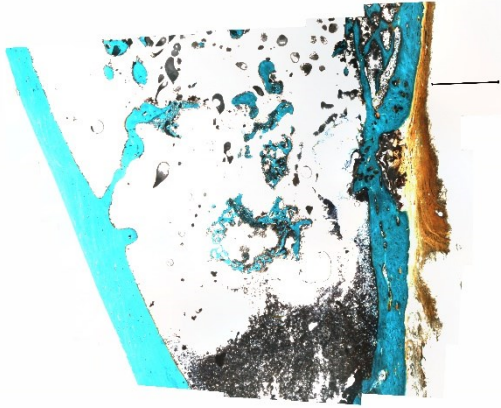
20B-2



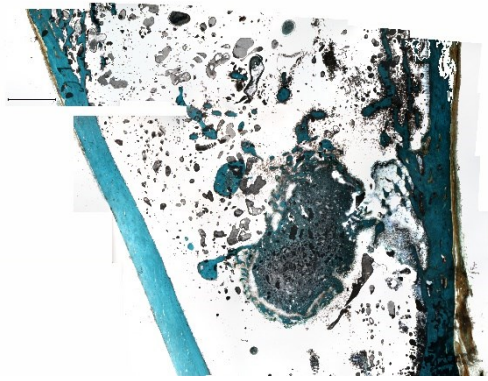
21A-1



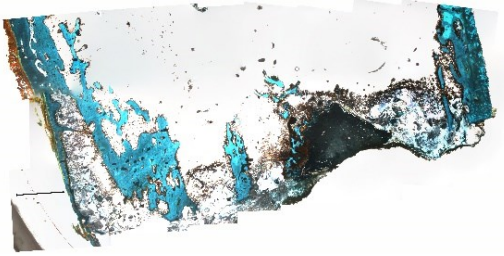
21A-2



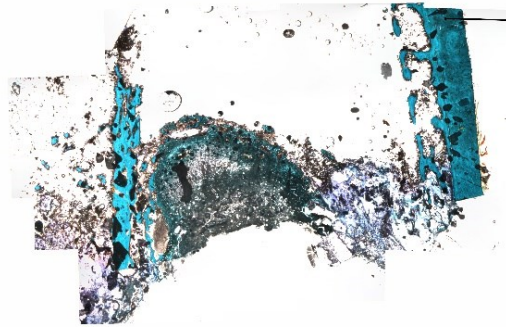
21B-1



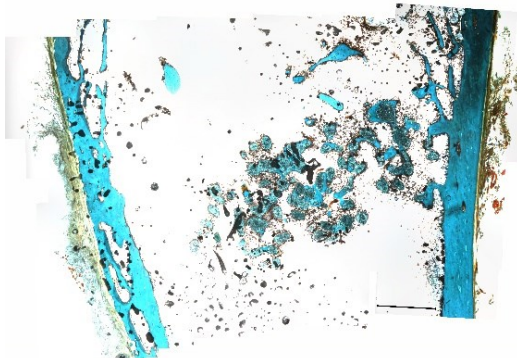
21B-2



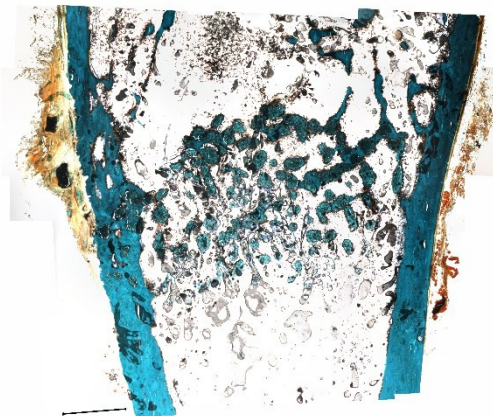
22A-1



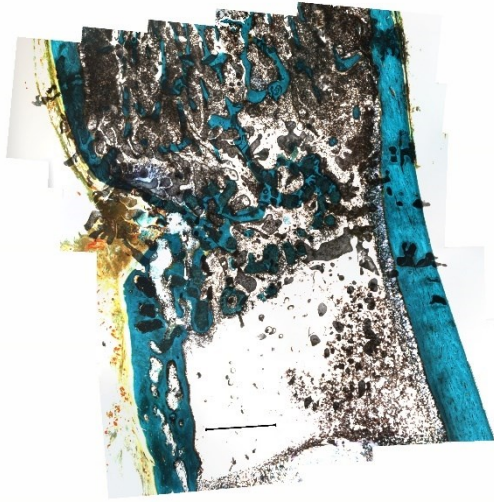
22A-2



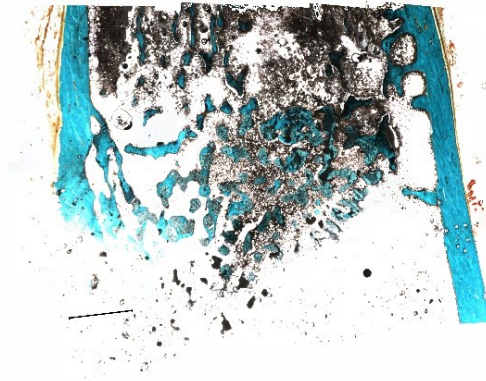
22B-1



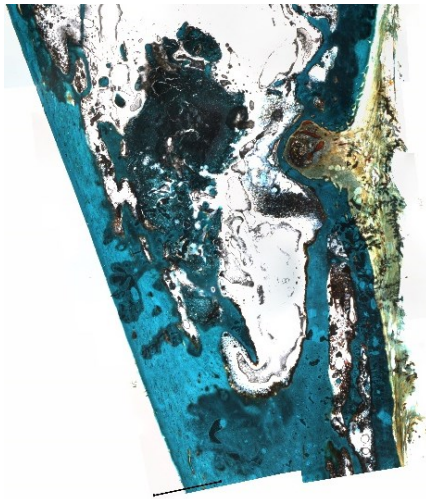
22B-2



23A-1



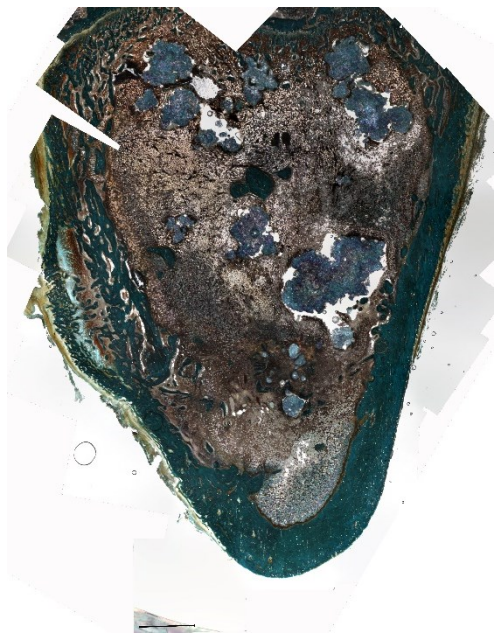
23A-2



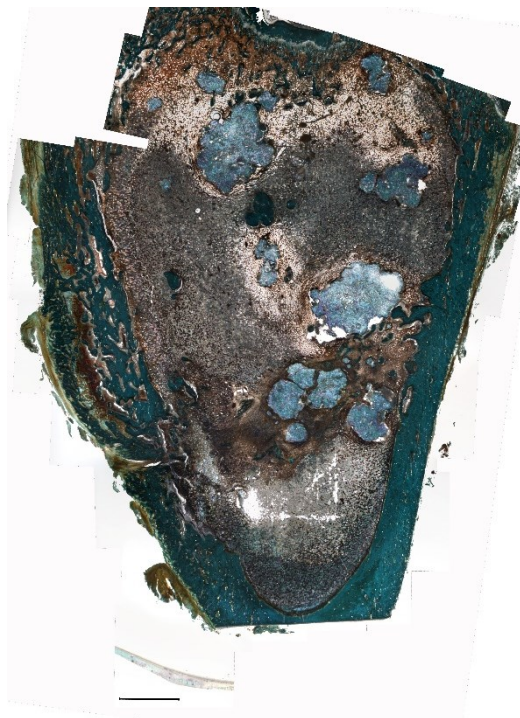
23B-1



23B-2



24A-1



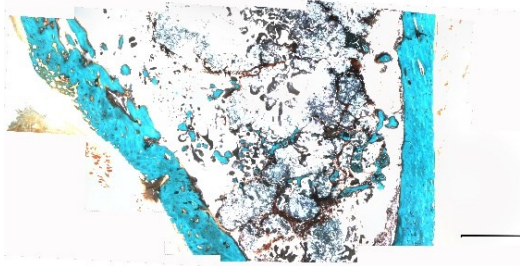
24A-2



24B-1



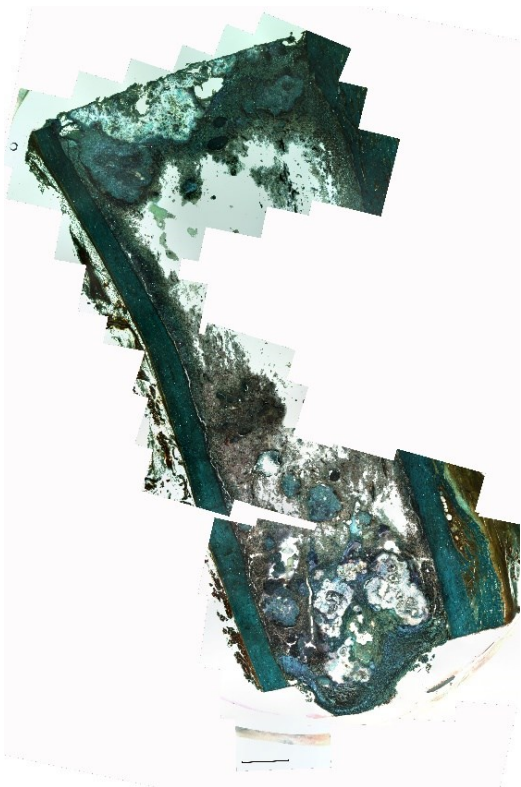
24B-2



25A-1



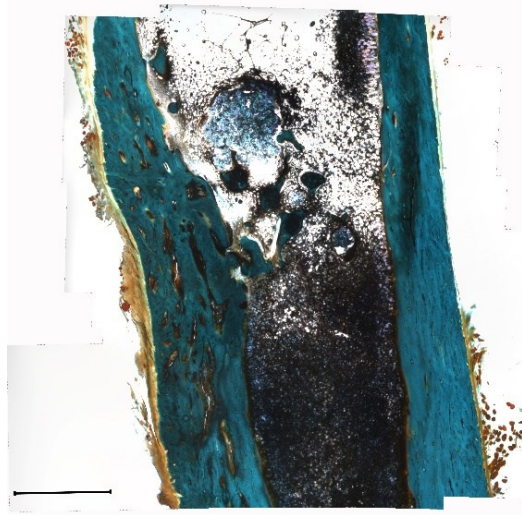
25A-2



25B-1



25B-2



26A-1



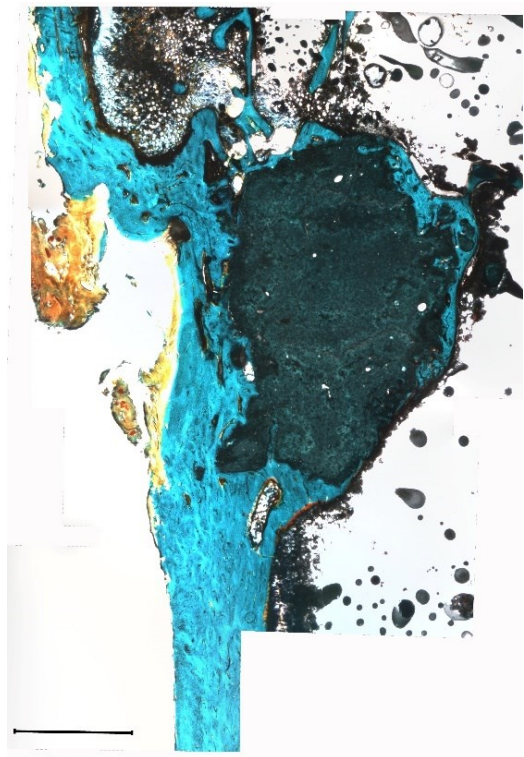
26A-2



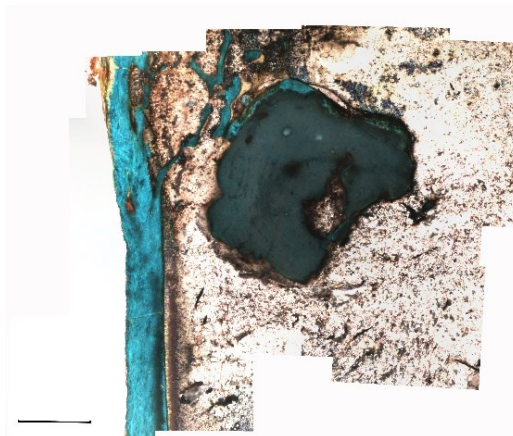
26B-1



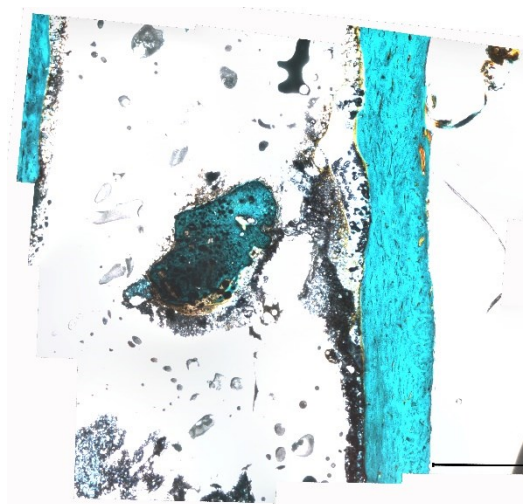
26B-2



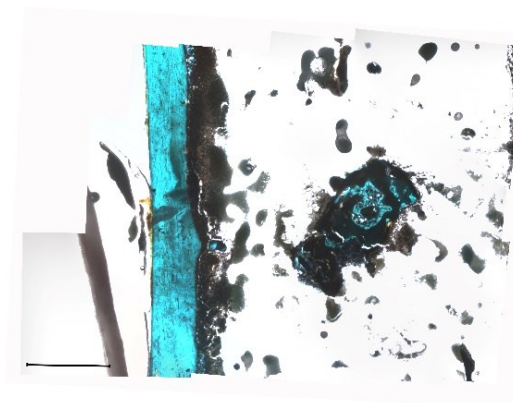
27A-1



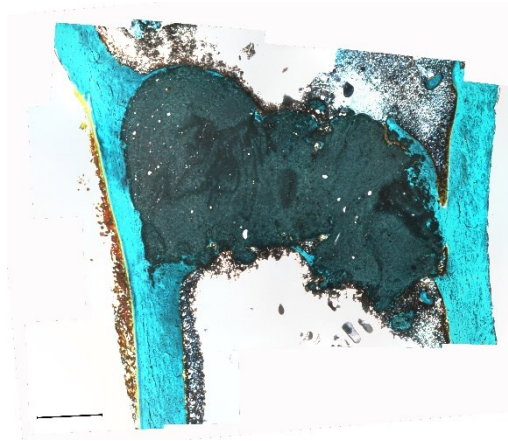
27A-2



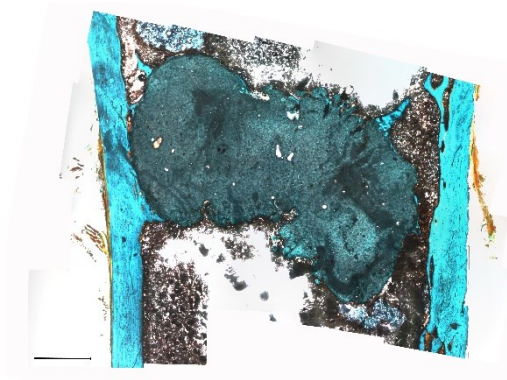
27B-1



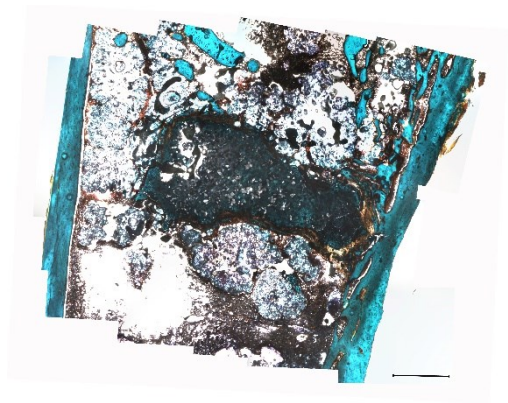
27B-2



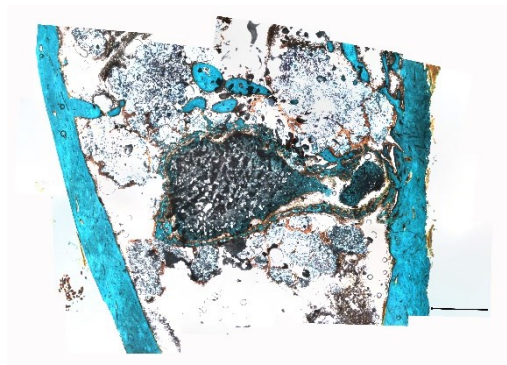
28A-1



28A-2



28B-1



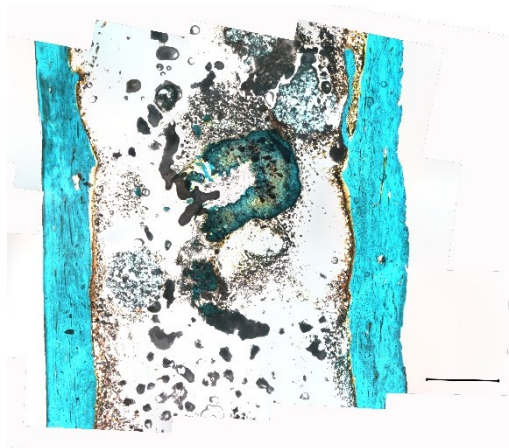
28B-2



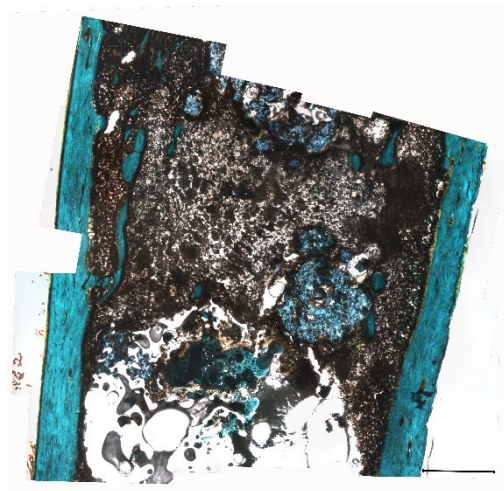
29A-1



29A-2



29B-1



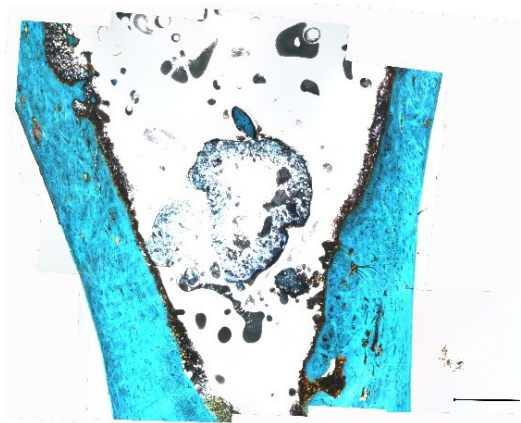
29B-2



30A-1



30A-2



30B-1



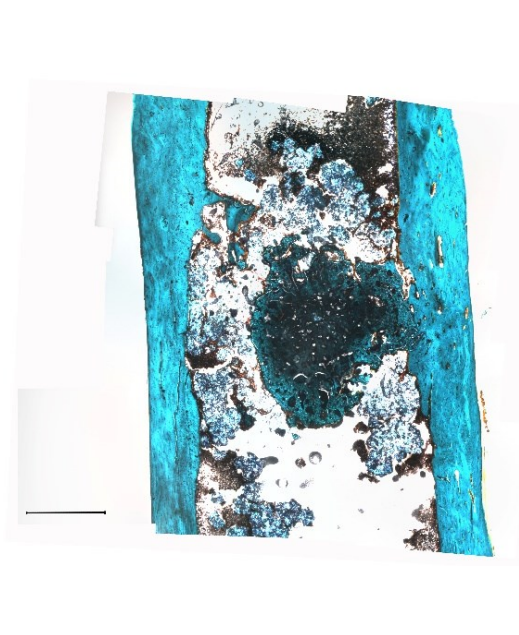
30B-2



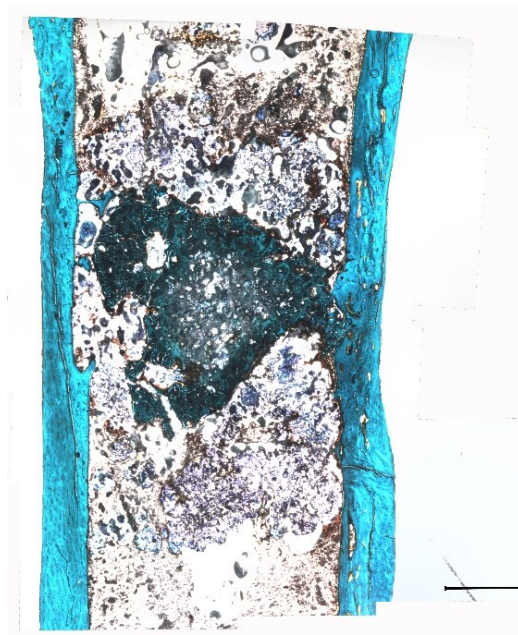
31A-1



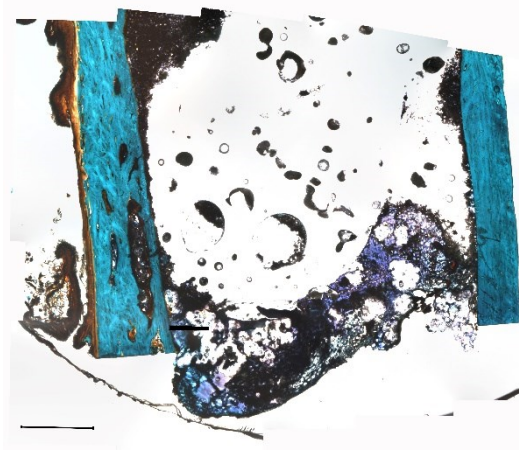
31A-2



31B-1



31B-2



32A-1



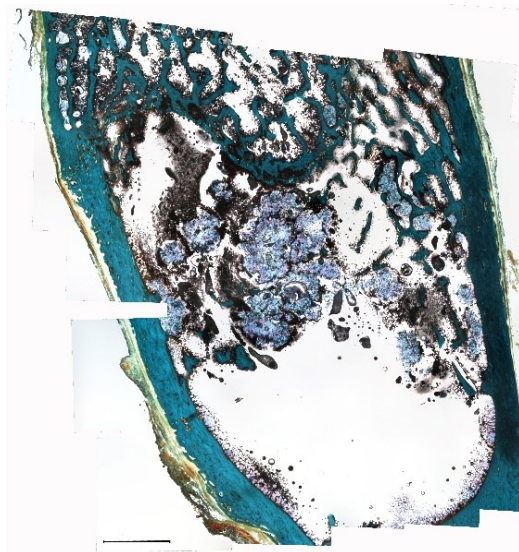
32A-2



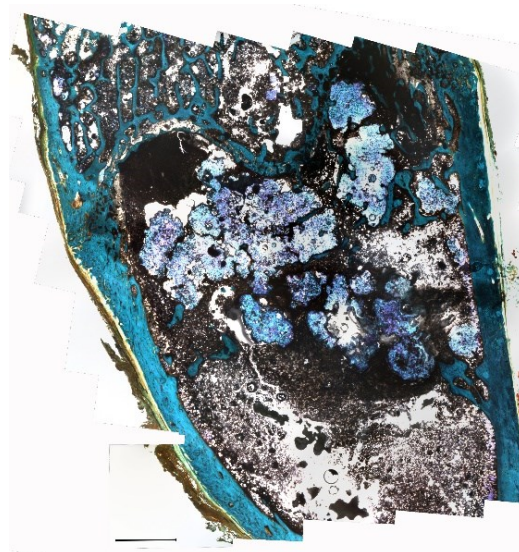
32B-1



32B-2



33A-1



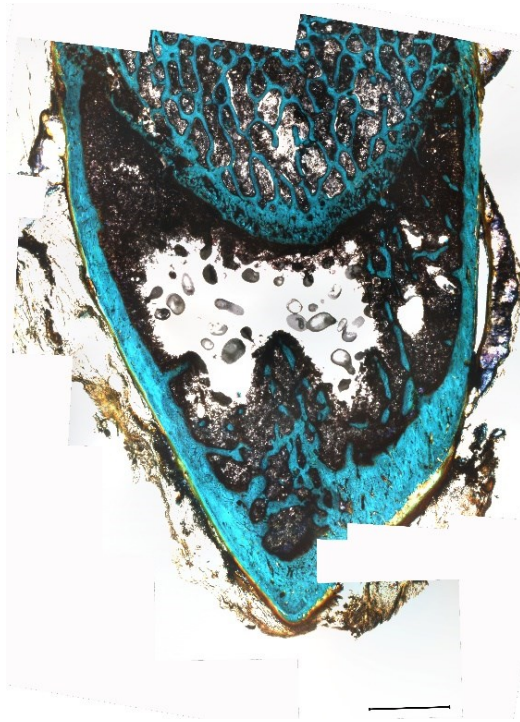
33A-2



33B-1



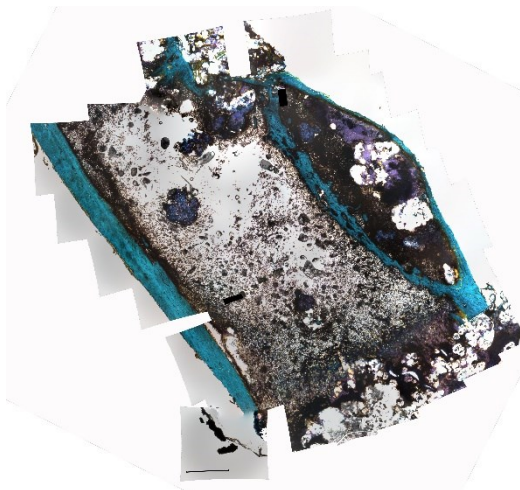
33B-2



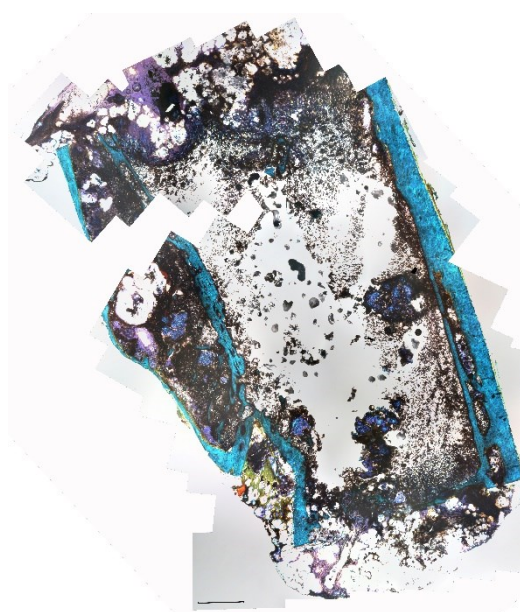
34A-1



34A-2



34B-1



34B-2



35A-1



35A-2



35B-1



35B-2



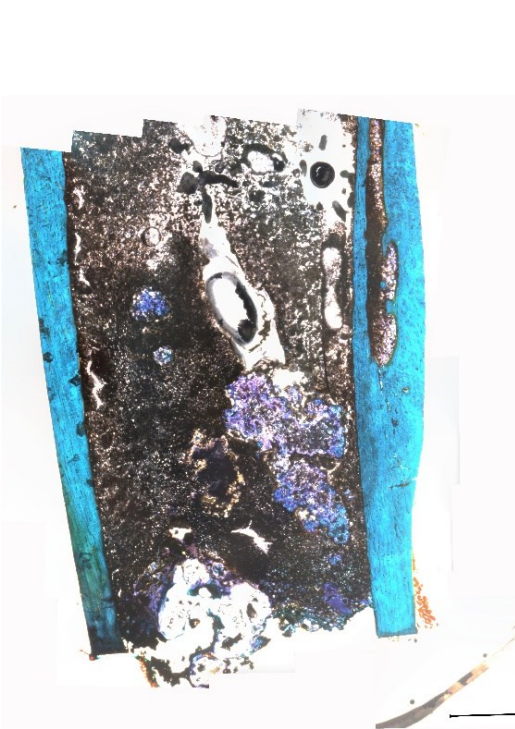
36A-1



36A-2



36B-1



36B-2



37A-1



37A-2



37B-1



37B-2

7.5 Tabellarische Darstellung der Mess- und Rechenergebnisse pro Trenn-Dünnschliff

Die in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Ergebnisse der Einzelmessungen und Berechnungen pro Trenn-Dünnschliff sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst. Die gemittelten Werte sind pro Femur angegeben.

Pasten

Tabelle: Pasten - Tabellarische Darstellung der Mess- und Rechenergebnisse pro Trenn-Dünnschliff

Trenn-Dünnschliff Nummer	Implantat Material	Liegedauer in Wochen	Gesamtumfang Implantat (μm)	Osteoid (μm)	Knochen-Implantat-Kontakt (μm)	Knochen-Implantat-Kontakt Anteil - KIK (%)	Mittelwert für K-I-K %	Osteoid-Implantat-Kontakt Anteil - OST (%)	Mittelwert für OST %
15B-1	PV	6	10049.57	0	360.33	3.59		0	
15B-2	PV	6	11350.76	291.64	1266.37	11.16	7.37	2.57	1.28
16B-1	PV	6	14122.81	2935.79	2245.97	15.90		20.79	
16B-2	PV	6	20954.72	1921.7	8889.7	42.42	29.16	9.17	14.98
17B-1	PV	6	9439.32	0	0	0		0	
17B-2	PV	6	32167.47	0	1036.14	3.22	1.61	0	0
3B-1	PV	6	36679.77	2732.13	29887.35	81.48		7.45	
3B-2	PV	6	48350.14	4738.66	31799.56	65.77	73.63	9.80	8.62
27A-1	PV	12	29461.51	1187.95	25626.94	86.98		4.03	7.14
27A-2	PV	12	19612.65	269.63	8240.13	42.01	64.50	1.37	
28A-1	PV	12	70326.55	2868.54	47588.65	67.67		4.08	2.04
28A-2	PV	12	58999.08	1053.64	24731.15	41.92	54.79	1.79	
29A-1	PV	12	20829.83	1110.54	16365.17	78.57		5.33	7.44
29A-2	PV	12	26889.92	3251.31	17751.21	66.01	72.29	12.09	
30A-1	PV	12	18574.46	1699.18	14806.43	79.71		9.15	5.87
30A-2	PV	12	30491.12	1567.51	20406.25	66.93	73.32	5.14	
31A-1	PV	12	26991.42	905.56	25042.76	92.78		3.35	3.39
31A-2	PV	12	30023.62	1999.78	21315.77	71.00	81.89	6.66	
7B-1	P75	6	15058.54	1099.5	4922.37	32.69		7.30	

Trenn-Dünnschliff Nummer	Implantat Material	Liegedauer in Wochen	Gesamtumfang Implantat (µm)	Osteoid (µm)	Knochen-Implantat-Kontakt (µm)	Knochen-Implantat-Kontakt Anteil - KIK (%)	Mittelwert für K-I-K %	Osteoid-Implantat-Kontakt Anteil - OST (%)	Mittelwert für OST %
7B-2	P75	6	18555.25	1213.93	4344.85	23.42	28.05	6.54	6.92
8B-1	P75	6	22294.29	0	15566.36	69.82		0	
8B-2	P75	6	34539.64	1097.41	19712.61	57.07	63.45	3.18	1.59
9B-1	P75	6	0	0	0	0		0	
9B-2	P75	6	6227.68	149.65	3783.5	60.75	30.38	2.40	1.20
10B-1	P75	6	24208.71	1004.55	9700.99	40.07		4.15	
10B-2	P75	6	23384.4	387.1	8329.71	35.62	37.85	1.66	2.90
11B-1	P75	6	7214.5	896.97	2728.21	37.82		12.43	
11B-2	P75	6	37503.49	1615.15	2670.95	7.12	22.47	4.31	8.37
1B-1	P75	6	27936.72	1797.02	15620.32	55.91		6.43	
1B-2	P75	6	30753.09	4246.75	11054.92	35.95	45.93	13.81	10.12
18B-1	P75	12	70394.87	1000.58	52322.11	74.33		1.42	
18B-2	P75	12	43943.96	5516.41	26832.5	61.06	67.69	12.55	6.99
19B-1	P75	12	10072.88	0	2387.38	23.70		0	
19B-2	P75	12	19980.52	989.35	7135.59	35.71	29.71	4.95	2.48
20B-1	P75	12	8306.64	230.9	5022.07	60.46		2.78	
20B-2	P75	12	31500.22	262.12	9356.84	29.70	45.08	0.83	1.81
21B-1	P75	12	18465.65	852.58	10989.44	59.51		4.62	
21B-2	P75	12	34970.4	536.21	12695.26	36.30	47.91	1.53	3.08
22B-1	P75	12	13437.23	812.02	5841.88	43.48		6.04	
22B-2	P75	12	20773.25	771.78	7250.69	34.90	39.19	3.72	4.88
23B-1	P75	12	38923.93	366.15	25131.55	64.57		0.94	
23B-2	P75	12	6478.69	372.53	2937.86	45.35	54.96	5.75	3.35
15A-1	P25	6	39374.6	2513.79	19977.62	50.74		6.38	
15A-2	P25	6	57910.28	2913.9	43138.51	74.49	62.61	5.03	5.71
16A-1	P25	6	41755.91	4098.85	28787.28	68.94		9.82	
16A-2	P25	6	39667.09	6350.63	11174.4	28.17	48.56	16.01	12.91
17A-1	P25	6	25269.54	3781.47	14114.64	55.86		14.96	
17A-2	P25	6	29378.73	2897.64	8923.7	30.37	43.12	9.86	12.41
3A-1	P25	6	29643.91	978.28	3191.63	10.77		3.30	
3A-2	P25	6	36240.46	603.31	5963.48	16.46	13.61	1.66	2.48
27B-1	P25	12	8727.8	1855	3346.12	38.34		21.25	11.31
27B-2	P25	12	10728.13	0	0	0	19.17	0	

Trenn-Dünnschliff Nummer	Implantat Material	Liegedauer in Wochen	Gesamtumfang Implantat (μm)	Osteoid (μm)	Knochen-Implantat-Kontakt (μm)	Knochen-Implantat-Kontakt Anteil - KIK (%)	Mittelwert für K-I-K %	Osteoid-Implantat-Kontakt Anteil - OST (%)	Mittelwert für OST %
28B-1	P25	12	22927.72	436.8	4369.63	19.06		1.91	1.85
28B-2	P25	12	23762.18	2267.17	2268.42	9.55	14.30	9.54	
29B-1	P25	12	20444.29	741.71	9443.34	46.19		3.63	7.86
29B-2	P25	12	13053.19	339	2224.49	17.04	31.62	2.60	
30B-1	P25	12	18368.68	0	0	0		0	2.57
30B-2	P25	12	33301.82	1141.28	28402.33	85.29	42.64	3.43	
31B-1	P25	12	26832.31	4402.33	6914.59	25.77		16.41	11.53
31B-2	P25	12	33765.42	6160.3	3697.83	10.95	18.36	18.24	

Trenn-Dünnschliff-Nummer	Implantat Material	Liegedauer in Wochen	Gesamtumfang Implantat (µm)	Osteoid (µm)	Knochen-Implantat-Kontakt (µm)	Knochen-Implantat-Kontakt Anteil KIK (%)	Mittelwert für K-I-K % pro Femur	Osteoid-Implantat-Kontakt Anteil OST (%)	Mittelwert für OST% pro Femur	Anzahl Partikel	Durchschnittlicher Umfang Partikel (µm)	Durchschnittlicher Umfang Partikel Mittelwert (µm)
34B-1	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
34B-2	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35B-1	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
35B-2	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36B-1	G75	12	5152.44	1138	0	0	0	22.09	11.04	5	1030.49	
36B-2	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	515.24
37B-1	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
37B-2	G75	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12A-1	G25	6	5285.78	192.42	2230.3	42.19	42.19	3.64	1159.06	5	1057.16	1057.16
13A-1	G25	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
13A-2	G25	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24A-1	G25	6	12850.3	0	0	0	0	0	0	6	2141.72	
24A-2	G25	6	12385.6	0	0	0	0	0	0	11	1125.97	1633.84
25A-1	G25	6	5952.87	2257.5	2428.9	40.80		37.92		6	992.15	
25A-2	G25	6	8396.74	820.87	2432.3	28.97	34.89	9.78	23.85	8	1049.59	1020.87
26A-1	G25	6	6820.3	0	3927.8	57.59		0		5	1364.06	
26A-2	G25	6	11467.4	735.68	4368.7	38.10	47.84	6.42	3.21	10	1146.74	1255.40
32A-1	G25	12	983.37	0	243.07	24.72		0	9.12	1	983.37	
32A-2	G25	12	0	0	0	0	12.36	0	0	0	0	491.69

7.6 Ergebnisse der statistischen Auswertung

In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung angegeben (Kapitel 2.2.8). Die angegebenen Mittelwerte und Standardfehler sind prozentuale Ergebniswerte. Außerdem sind die Ergebnisse der Berechnungen zur Änderung des Partikelumfangs angegeben sowie die der Testung auf Normalverteilung der einzelnen Untergruppen.

7.6.1 Knochen-Implantat-Kontakt (K-I-K%)

Tabelle: KIK%: Tests auf Normalverteilung für alle Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer

		Tests auf Normalverteilung					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Präparat	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
K-I-K in %	PV	,235	4	.	,880	4	,340
	P25	,272	4	.	,938	4	,642
	P75	,196	6	,200 [*]	,925	6	,542
	GV	,169	6	,200 [*]	,972	6	,902
	G25	,265	5	,200 [*]	,814	5	,105
	G75	,329	5	,081	,793	5	,071

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle: KIK%: Tests auf Normalverteilung für alle Untersuchungsgruppen mit Liegedauer 12 Wochen

Tests auf Normalverteilung

	Präparat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
K-I-K in %	PV	,213	5	,200 [*]	,972	5	,890
	P25	,297	5	,170	,887	5	,343
	P75	,152	6	,200 [*]	,990	6	,990
	GV	,210	6	,200 [*]	,887	6	,304
	G25	,407	6	,002	,658	6	,002
	G75	,492	6	,000	,496	6	,000

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle: KIK%: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung

Knochen-Implantat-Kontakt KIK %

K-I-K in %						
Präparat	Liegedauer in Monaten	N	Mittelwert	Median	Std.- Abweichung	
PV	6	4	27,94262	18,26719	32,685308	
	12	5	69,35815	72,29020	10,210927	
	Insgesamt	9	50,95125	64,49942	30,482981	
P25	6	4	41,97431	45,83583	20,616558	
	12	5	25,21844	19,16932	11,697844	
	Insgesamt	9	32,66549	31,61617	17,487120	
P75	6	6	38,02023	34,11152	14,891449	
	12	6	47,42259	46,49457	13,076813	
	Insgesamt	12	42,72141	42,13546	14,235054	
GV	6	6	54,75964	55,75488	9,546754	
	12	6	55,82076	57,77709	14,578921	
	Insgesamt	12	55,29020	57,25183	11,762054	
G25	6	5	24,98449	34,88514	23,265680	
	12	6	4,28237	,00000	6,641391	
	Insgesamt	11	13,69242	,00000	18,853531	
G75	6	5	16,58761	3,39960	21,585178	
	12	6	3,01010	,00000	7,373208	
	Insgesamt	11	9,18170	,00000	16,242752	

7.6.2 Osteoid-Implantat-Kontakt (OST%)

Tabelle: OST%: Tests auf Normalverteilung für alle Untersuchungsgruppen mit Liegedauer 6 Wochen

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Präparat	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Osteoid in %	PV	,261	4	.	,911	4	,488
	P25	,285	4	.	,872	4	,304
	P75	,227	6	,200 [*]	,893	6	,335
	GV	,287	6	,135	,917	6	,487
	G25	,398	5	,009	,693	5	,008
	G75	,238	5	,200 [*]	,847	5	,186

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle: OST%: Tests auf Normalverteilung für alle Untersuchungsgruppen mit Liegedauer 12 Wochen

		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Präparat	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Osteoid in %	PV	,217	5	,200 [*]	,914	5	,489
	P25	,222	5	,200 [*]	,917	5	,512
	P75	,254	6	,200 [*]	,914	6	,461
	GV	,465	6	,000	,551	6	,000
	G25	.	6	.	.	6	.
	G75	,355	6	,018	,599	6	,000

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle: OST%: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung

Osteoid-Implantat-Kontakt OST%

Osteoid in %

Präparat	Liegedauer in Monaten	N	Mittelwert	Median	Std.- Abweichung
PV	6	4	6,22212	4,95467	6,965414
	12	5	5,29989	5,00784	2,620683
	Insgesamt	9	5,70977	5,00784	4,675908
P25	6	4	8,37931	9,06091	5,123171
	12	5	7,70035	5,72310	6,364166
	Insgesamt	9	8,00211	5,72310	5,497449
P75	6	6	5,18417	4,91217	3,782436
	12	6	3,76147	3,21030	1,885560
	Insgesamt	12	4,47282	3,21030	2,944689
GV	6	6	3,98417	3,94854	2,090462
	12	6	6,88027	2,52132	11,237062
	Insgesamt	12	5,43222	3,12374	7,853027
G25	6	5	6,13950	3,20770	10,048274
	12	6	,00000	,00000	,000000
	Insgesamt	11	2,79068	,00000	7,118087
G75	6	5	1,92672	1,15673	2,182925
	12	6	2,16440	,00000	4,418735
	Insgesamt	11	2,05636	,00000	3,418198

7.6.3 Umfänge der Granulatpartikel (Granulae)

Tabelle: Umfänge der Partikel: Tests auf Normalverteilung für alle Untersuchungsgruppen mit 6 Wochen Liegedauer

Tests auf Normalverteilung

	Präparat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
Umfang Granulae	GV	,287	6	,134	,871	6	,229
	G25	,318	5	,109	,888	5	,346
	G75	,177	6	,200*	,979	6	,944

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle: Umfänge der Partikel: Tests auf Normalverteilung für alle Untersuchungsgruppen mit 12 Wochen Liegedauer

Tests auf Normalverteilung

Präparat	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz	
Umfang Granulae	GV	,323	6	,049	,770	6	,031
	G25	,261	6	,200*	,937	6	,639
	G75	,389	6	,005	,697	6	,006

*. Dies ist eine untere Grenze der echten Signifikanz.

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

Tabelle: Partikel: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung

Umfang Granulae

Umfang Granulae

Präparat	Liegedauer in Wochen	N	Mittelwert	Median	Std.- Abweichung
GV	6	6	1370,12744	1338,49450	150,612516
	12	6	1112,43377	1167,24184	215,067679
	Insgesamt	12	1241,28060	1269,05981	222,365235
G25	6	5	993,45365	1057,15600	606,315755
	12	6	601,26267	479,99583	458,111981
	Insgesamt	11	779,53130	869,99600	542,153135
G75	6	6	1086,70472	1118,80070	259,904729
	12	6	270,99942	,00000	460,131154
	Insgesamt	12	678,85207	812,12827	555,344378

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls der Funktionswerkstoffkunde der Medizin und Zahnheilkunde sowie der Universität Würzburg bedanken, die durch ihre fachliche, technische und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, welche mir mein Studium und diese Dissertation durch ihre Unterstützung und Geduld erst ermöglicht haben.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde eine Fachpublikation (Titel siehe unten) über das Knochenregenerationspotenzial und Degradationsverhalten von präfabrizierten Calcium-dotierten Magnesiumphosphat Zementpasten veröffentlicht. Die Autorin vorliegender Arbeit war dabei CoAutorin.

Andrea Ewald, Dorothea Kreczy, Theresa Brückner, Uwe Gbureck, Melanie Bengel, Andreas Hoess, Berthold Nies, Julia Bator, Uwe Klammert, Andreas Fuchs (2019, Juli):

Development and Bone Regeneration Capacity of Premixed Magnesium Phosphate Cement Pastes

In: Materials (Basel) 12(13), 2119, MDPI Verlag