

Aus dem Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde  
der Universität Würzburg  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Osteogenes Potential additiv gefertigter Calciummagnesiumphosphat-  
Keramiken**

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

vorgelegt von  
Christian Thomas Siegfried Schaufler  
aus Friedrichshafen

Würzburg im August 2022

Referent: Prof. Dr. Uwe Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2023

Der Promovend ist Zahnarzt.

**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Knochen.....	1
1.2 Knochenersatzmaterialien.....	3
1.3 Calciumphosphate.....	5
1.4 Magnesiumphosphate.....	7
1.5 Calciummagnesiumphosphate.....	9
1.6 Herstellung individualisierter Implantate.....	11
1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Materialien und Geräte.....	13
2.1.1 Laborgeräte.....	13
2.1.2 Software.....	15
2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.4 Herstellung verwendeter Lösungen und Medien.....	18
2.1.5 Herstellung der Zementpulver.....	20
2.2 Methoden.....	22
2.2.1 3D - Drucker ZPrint 310.....	22
2.2.2 Herstellung der Prüfkörper.....	23
2.2.3 Überprüfung der Phasenzusammensetzung.....	28
2.2.4 Zellkultur der Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19.....	29
2.2.5 Vorbereitung der Zellversuche.....	30
2.2.6 Durchführung der Zellversuche.....	31
2.2.7 Bestimmung der Zellaktivität.....	32
2.2.8 Bestimmung des DNA - Gehalts.....	33
2.2.9 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase.....	34
2.2.10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen.....	36
2.2.11 Statistische Auswertung.....	37
3. Ergebnisse.....	38
3.1 Analyse der Phasenzusammensetzung der Prüfkörper.....	38
3.2 Biologische Testung.....	43
3.2.1 Vorversuch.....	43
3.2.2 Proliferationsversuch.....	46

3.2.3	Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze .....	48
3.2.4	Differenzierungsversuch mit Differenzierungszusätzen .....	51
3.2.5	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen .....	54
4.	Diskussion .....	58
4.1	Bio- und Zytokompatibilität .....	58
4.2	Osteogenes Potential .....	62
5.	Zusammenfassung .....	66
6.	Literaturverzeichnis .....	68
	Anhang .....	
	Abkürzungsverzeichnis .....	
	Abbildungsverzeichnis .....	
	Tabellenverzeichnis .....	
	Danksagung .....	
	Lebenslauf .....	
	Eigene Publikation .....	
	Eidesstattliche Erklärung .....	

# 1. Einleitung

## 1.1 Knochen

Knochen zählt zum Binde- und Stützgewebe des menschlichen Körpers. Entwicklungsgeschichtlich geht dieser, wie auch Knorpelgewebe, aus embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym hervor. Knochen setzt sich aus mineralisierter extrazellulärer Matrix, welche hauptsächlich aus anorganischer Substanz und Kollagenfibrillen besteht, sowie den Zellen des Knochens zusammen. Der Anteil anorganischer Substanz beträgt 65 wt%, 20 wt% organische Substanz und 15 wt% Wasser [1, 2]. Makroskopisch kann bei Knochen zwischen Röhrenknochen, z.B. Femur und Humerus, und platten Knochen, z.B. Knochen des Gesichtsschädels wie dem Os temporale und dem os parientale, sowie Sternum und Scapula unterschieden werden. Beide Knochentypen haben gemeinsam, dass diese aus einer äußeren, sehr dichten, Substantia compacta und einer inneren, wabenartigen Substantia spongiosa, in welcher das Knochenmark kleine Knochenbälkchen umgibt, bestehen. Nach außen ist der Knochen mit Periost bedeckt, welches als Ansatz für Sehnen sowie Muskeln dient und nach innen mit Endost ausgekleidet. Unter beiden Schichten befinden sich dem Knochen zugewandt, osteogene Progenitorzellen und ruhende Osteoblasten welche Reparaturen ermöglichen [1, 3, 4]. Menschlicher Knochen ist druck- und biegefest, kortikaler Knochen erreicht in horizontaler Richtung Druckfestigkeiten von 90 bis 211 MPa [5-7]. Zu den Zellen des Knochens zählen Osteoblasten, Osteozyten, sowie Osteoklasten. Osteoblasten gehen durch Differenzierung aus osteogenen Progenitorzellen hervor, welche wiederum von mesenchymalen Stammzellen abstammen. Aufgabe der Osteoblasten ist die Bildung von neuem Knochen durch die Sezernierung von zunächst unmineralisiertem Osteoid, welches nach und nach durch das von ihnen gebildete Enzym alkalische Phosphatase (ALP) zu unreifem Geflechtknochen mineralisiert wird. Dieser unreife Geflechtknochen wird durch bone modelling im Laufe der Zeit in reifen Lamellenknochen umgebaut. Hierfür schnüren die Osteoblasten Matrixvesikel ab, welche neben ALP, unter anderem Calciumionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) enthalten. Nach initialer Kristallisation bildet sich ein Kristall

aus Hydroxylapatit (HA), einer Calciumphosphatverbindung ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ ). Die ALP stellt durch enzymatische Spaltung von organischen Phosphaten und Pyrophosphaten anorganisches Phosphat für das weitere Kristallwachstum zur Verfügung bis die Matrixvesikel platzen und der Kristall im Extrazellularraum weiter wächst und sich den Kollagenfibrillen anlagert. Nach dieser initialen Knochenbildung gehen etwa 65 % der Osteoblasten durch Apoptose zugrunde, ein weiterer Teil kehrt in einen inaktiven Zustand zurück und etwa 5 - 10 % differenzieren sich zu Osteozyten weiter, welche im Osteoid eingemauert werden und durch dendritische Fortsätze untereinander verbunden bleiben [8, 9]. Aufgabe der Osteozyten ist die Regulation des Mineralhaushalts und des Knochenumbaus (bone remodelling), außerdem wird vermutet, dass diese durch die Verarbeitung mechanischer Reize einen funktionellen Umbau des Knochens im Rahmen des bone modelling bewirken können [10]. Durch bone remodelling werden beim erwachsenen Menschen pro Jahr circa 2-3 % des Skeletts abgebaut und wieder erneuert. Dies dient hauptsächlich der Reparatur von Mikroverletzungen und der funktionellen Anpassung an wechselnde Belastungen, ein Beispiel hierfür ist der Abbau der Alveolarfortsätze nach Zahnverlust [1]. An diesem Vorgang sind die Zellen der dritten Zellart des Knochens, die Osteoklasten, wesentlich beteiligt. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen der Makrophagen-/Monozytenlinie hervorgehen. Ihre Aufgabe ist der Abbau von Knochengewebe. Hierfür lösen Osteoklasten Hydroxylapatit - Kristalle durch Sezernierung von Säure auf, die verbleibende organische Substanz wird durch lysosomale Enzyme, z.B. Cathepsin K, abgebaut und verbleibende Fragmente werden durch Endozytose aufgenommen [8, 11].

## 1.2 Knochenersatzmaterialien

Die Versorgung von Taumata, Zuständen nach Tumorresektion und Entzündungen, sowie angeborener Fehlbildungen erfordert oftmals zur Wiederherstellung von Funktion und auch Ästhetik, den Einsatz von Knochenersatz. Dies ist vor allem dann der Fall wenn der Defekt ein gewisse Größe überschreitet, sodass eine Ausheilung ohne zusätzliche Maßnahmen unwahrscheinlich ist. Derartige Defekte werden auch als critical size defects bezeichnet. Zur genauen Größe eines critical size defects besteht keine standardisierte Definition, die Größe ist auch von der Lage des Defekts und vom umliegenden Weichgewebe abhängig [12-14].

Die Transplantation von körpereigenem (autogenem) und vitalem Knochengewebe stellt hierfür die beste Therapiemöglichkeit dar, da keine immunologisch bedingten Abstoßungsreaktionen zu erwarten sind [15]. Im Bereich der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bieten sich hierfür Schulterblatt, Beckenkamm und Wadenbein an. Der Spenderknochen wird an der Entnahmestelle samt Gefäßstiel entnommen und im Transplantatbett wieder mikrochirurgisch reanastomosiert [16]. Nachteile dieser Technik sind die Notwendigkeit der Eröffnung eines weiteren OP-Gebiets, oftmals nur begrenztes Knochenangebot in der Spenderregion, sowie Komplikationen an der Entnahmestelle wie z.B. postoperative Schmerzen, Schwellungen und Narben. Außerdem besteht die Gefahr der Verletzung von Nachbarstrukturen [15, 17]. Eine Möglichkeit dies zu umgehen stellt die Verwendung von menschlichem, aber körperfremden Knochen als Implantat (allogen) dar. Nachteile dieser Methode sind sowohl humoral bedingte Abstoßungsreaktionen als auch die Gefahr der Infektion mit übertragbaren Krankheiten. Dies verdeutlicht den Bedarf der Entwicklung weiterer Knochenersatzmaterialien (KEM) [15].

Das optimale KEM soll biokompatibel, also absolut gewebeverträglich sein und keine zellulären Abstoßungsreaktionen hervorrufen [18]. Außerdem soll es osteokonduktiv, osteoinduktiv, osteogenetisch und osteointegrativ sein. Osteokonduktion bedeutet, dass das Material als Leitschiene für umliegendes Knochengewebe gilt. Osteoinduktive Materialien ziehen direkt pluripotente mesenchymale Stammzellen an und regen deren Differenzierung zu

Osteoblasten an, welche vor Ort neuen Knochen bilden. Osteogenese meint in diesem Fall, dass knochenbildende Zellen des Empfängers in das Implantat einwachsen und es nach und nach zu Knochen umsetzen, diese Bedingung erfüllen aber nur autologe Transplantate [19, 20]. Osteointegration bedeutet, dass das Implantat in direktem Kontakt zu vitalem Gewebe, ohne zwischengelagertes Bindegewebe, einheilt [21].

Verschiedene KEM können, wie Tabelle 1 veranschaulicht, klassifiziert werden [22].

**Tabelle 1:** Klassifizierung von Knochenersatzmaterialien.

autolog	körpereigenes Material
allogen	humanes Material, aber von einem anderen Individuum
xenogen	Material einer anderen Spezies z.B. Rind, Schwein, Pferd
alloplastisch	synthetisches Material

Generelle Vorteile alloplastischer, also körperfremder KEM sind die ubiquitäre Verfügbarkeit, die fehlende Donormorbidität und das fehlende Infektionsrisiko [20].

Alloplastische KEM können weiter unterschieden werden in degradierbar und permant. Permanente alloplastische KEM können osteokonduktiv und osteointegrativ sein, werden aber nicht abgebaut und durch körpereigenen Knochen im Rahmen des Knochenstoffwechsels ersetzt. Damit erfüllen diese nur zwei, der o.g. Bedingungen für optimale KEM. Implantate aus dieser Gruppe sind dauerhaft formstabil und werden kaum resorbiert, es kommt zu keiner Abstoßungsreaktion, jedoch immer wieder zu chronischen Fremdkörperreaktionen. Vertreter dieser Gruppe sind Metalle wie Titan oder Edelstähle, verschiedene Keramiken aus Hydroxylapatit oder Zirkoniumdioxid und Kunststoffe, zum Beispiel Polymethylmethacrylate. Degradierbare alloplastische Knochenersatzmaterialien werden nach und nach resorbiert und ermöglichen die Bildung neuen Knochens [22].

Die in dieser Arbeit verwendeten Calciummagnesiumphosphatkeramiken sind der zweiten Gruppe, den degradierbaren alloplastischen KEM zuzuordnen [20, 23].

Degradierbare alloplastische KEM sollten die Anhaftung von osteogenen Progenitorzellen ermöglichen, welche sich zu Osteoblasten ausdifferenzieren und wie in 1.1 beschrieben, Knochen bilden [24] und optimalerweise wird das KEM im Rahmen des zuvor beschriebenen bone remodellings im Laufe der Zeit vollständig in körpereigenen Knochen umgesetzt.

### **1.3 Calciumphosphate**

Der Großteil biologischer Hartgewebe von Säugern und damit auch des Menschen besteht aus verschiedenen Calciumphosphatverbindungen. So besteht z.B. Knochen in der anorganischen Substanz zu etwa 60 wt% und Zahnschmelz zu 90 wt% aus Calciumphosphaten, in diesem Falle Hydroxylapatit [25, 26]. Auch an vielen pathologischen Prozessen im menschlichen Körper sind Calciumphosphatverbindungen beteiligt. Artherosklerotische Plaques bestehen zu 60-70 wt% aus Calciumphosphatverbindungen [27]. Zahnstein besteht in seiner anorganischen Matrix ebenfalls zu größten Teilen aus verschiedenen Calciumphosphatverbindungen, so beträgt der Gehalt an Calcium in der Trockenmasse 23 - 35 wt% und der Phosphatgehalt 11 - 18 wt% [28, 29]. Speichelsteine bestehen in ihrer anorganischen Matrix ebenfalls zu großen Teilen aus Hydroxylapatit, Whitlockit und seltener Bruschit [30, 31].

Aufgrund des großen Vorkommens von Calciumphosphatverbindungen im menschlichen Körper bieten sich diese zur Verwendung im menschlichen Körper beispielsweise als alloplastischer Knochenersatz an. In vielen Studien konnte nachgewiesen werden, dass diese biokompatibel, osteointegrativ und osteokonduktiv sind [26].

Eine Möglichkeit zum medizinischen Einsatz von Calciumphosphatverbindungen stellen Calciumphosphatzemente (CPC) dar. Der wahrscheinlich erste geschichtlich dokumentierte Einsatz eines CPCs zur Heilbehandlung erfolgte in den 1870er Jahren durch den amerikanischen Zahnarzt Dr. Justinus E. Cravens.

Er verwendete eine Mischung aus Calciumorthophosphat und Milchsäure zum Abdecken bei der Kariesexkavation freigelegter Zahnpulpa zur Vitalerhaltung des Zahnes [32]. Nachteilig ist, dass ausgehärtete CPCs mechanisch nicht stark belastbar sind, weswegen diese vor allem in wenig belasteten Bereichen als Knochenersatz verwendbar sind. Beispiele im Bereich der Zahnmedizin sind Augmentationen von Knochendefekten im Kieferbereich [24, 33].

CPCs werden durch Vermischung von Calciumphosphatpulver mit einer wässrigen Phase hergestellt. Es entsteht eine Zementpaste, die nach und nach aushärtet [18, 34]. Als calciumhaltiges Ausgangspulver dient zum Beispiel Tricalciumphosphat (TCP,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), als wässrige Lösung kann Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) oder Wasser verwendet werden. Die Reaktionsgleichungen (1) und (2) veranschaulichen die möglichen Reaktionen [35, 36].

Bei TCP als Edukt werden zwei verschiedene Kristallmodifikationen unterschieden, die Niedrigtemperaturphase  $\beta$ -TCP und die Hochtemperaturphase  $\alpha$ -TCP. Die letztere kann durch Erhitzen auf über  $1125\text{ }^\circ\text{C}$  gewonnen werden und ist auch nach Abkühlung auf Raumtemperatur stabil [37]. Je nach Umgebungsbedingungen bei der Abbindereaktion von Calciumphosphatzementen entstehen zwei verschiedene Endprodukte. Bei einem neutralen oder basischen pH-Wert entsteht durch Hydrolyse Hydroxylapatit dargestellt in Reaktionsgleichung (1), bei saurem pH-Wert  $< 4$  entsteht das Mineral Brushit ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) [38], dargestellt in Reaktionsgleichung (2). Brushit-bildende Zemente sind im Vergleich zu HA-bildenden Zementen in vivo leichter löslich und resorbierbar [39].



Alternativ zu CPCs können Calciumphosphate auch in Form von Calciumphosphatkeramiken eingesetzt werden, diese werden durch Hochtemperaturesinterung von pulverförmigen Calciumphosphatverbindungen hergestellt. Ausgangsstoffe sind beispielsweise TCP oder Hydroxylapatit. Calciumphosphatkeramiken werden in Form von vorgefertigten Blöcken, Zylindern oder Granulaten verwendet [18]. Beim Sintern kommt es bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes, des jeweiligen Ausgangsstoffes, zum Verschmelzen von Partikeln an den Korngrenzen. Dies ist mit einer Volumenschrumpfung und Festigkeitszunahme durch Verringerung der Porosität verbunden [40, 41]. Gesintertes TCP kann analog zu den CPCs mit Phosphorsäure zu Brushit umgesetzt werden, die Reaktion entspricht der Reaktionsgleichung (2).

#### **1.4 Magnesiumphosphate**

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ist ebenfalls essentieller Bestandteil des menschlichen Körpers, so ist es das vierthäufigste Mineral im Organismus [42], rund 67 % des Magnesiums im menschlichen Körper sind im Knochen gebunden [43]. Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen Magnesiummangel und der Volkskrankheit Osteoporose, da Magnesiummangel zu einer Abnahme der Festigkeit von Knochen führt [44]. Deshalb ist auch hier die Verwendung von Magnesiumverbindungen als Ausgangsstoff für KEM naheliegend.

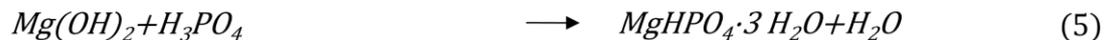
Magnesiumphosphate werden meist in Form von Zementen eingesetzt, deren Abbindereaktion vergleichbar mit der, der oben beschriebenen CPCs ist. Magnesiumphosphatzemente (MPC) zeichnen sich durch eine kurze Abbindungszeit und eine frühe Belastbarkeit aus [45]. Deswegen werden MPCs im Bau- und Verkehrswesen schon lange beim Bau von Brücken sowie Start- und Landebahnen und für Straßenausbesserungsmaßnahmen verwendet [46, 47]. Außerdem können MPCs als KEM verwendet werden [48].

Als magnesiumhaltige Ausgangspulver zur Herstellung von Zementen dienen Farringtonit (Trimagnesiumphosphat,  $Mg_3(PO_4)_2$ ), Magnesiumoxid ( $MgO$ ) oder Brushit (Magnesiumhydroxid,  $Mg(OH)_2$ ) die nach Vermischen mit einer wässrigen Phosphatquelle zum MPC abbinden. Wird eine basische Phosphatquelle, z.B.

Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) verwendet, entsteht unter Abspaltung von Ammoniak (NH<sub>3</sub>) Struvit (NH<sub>4</sub>MgPO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O), veranschaulicht in Reaktionsgleichung (3). Reaktionsgleichung (4) zeigt die Bildung von Struvit aus Trimagnesiumphosphat und DAHP, ohne die Abspaltung von NH<sub>3</sub> [49].



Bei Verwendung einer sauren Phosphatquelle (Phosphorsäure, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) entsteht Newberyit (MgHPO<sub>4</sub> · 3 H<sub>2</sub>O). Reaktionsgleichung (5) zeigt die Bildung von Newberyit aus Brucit durch Reaktion mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> [49]. Reaktionsgleichung (6) bildet dieselbe Reaktion mit Trimagnesiumphosphat als Edukt ab.



Sowohl Struvit als auch Newberyit kommen im menschlichen Körper in pathologischen, infektbedingten Harnsteinen vor. Durch Infektion mit ureasebildenden Bakterien steigt der pH - Wert des Urins an, was zur Ausfällung der steinbildenden Minerale führt [50].

Magnesiumphosphatzemente sind biokompatibel und sowohl aktiv durch Osteoklasten resorbierbar, als auch passiv durch chemische Lösungsprozesse degradierbar [51, 52]. Struvit ist besser durch Osteoklasten resorbierbar als HA, da diese in den Resorptionslakunen einen pH - Wert um 4,5 erzeugen und HA bei pH - Werten >4,2 stabil ist [52]. Zudem setzt Struvit beim Abbau zweiwertige Magnesiumionen (Mg<sup>2+</sup>) frei, welche eine wichtige Rolle bei der Bildung neuen Knochens spielen. Magnesiumionen erleichtern die Adhäsion von Osteoblasten, fördern intrazelluläre Signalwege zur Knochenbildung und dienen bei der Mineralisation von Osteoid als Kristallisationskeim [53-55]. Vorteilhaft ist auch,

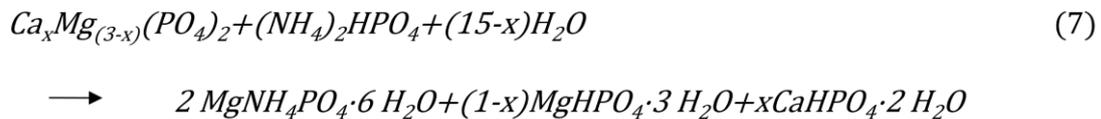
dass aus Magnesiumphosphaten durch Sinterung Magnesiumphosphatkeramiken hergestellt werden können.

## 1.5 Calciummagnesiumphosphate

Zemente auf Basis von Calciummagnesiumphosphaten sollen die positiven Eigenschaften von CPCs und MPCs verbinden. Wu et al. [23] stellten einen Calciummagnesiumphosphatzement (CMPC) durch Vermischung von Calcium- und Magnesiumphosphatpulvern her, welcher mit einer wässrigen Phase zur Abbindung gebracht wurde. Dieser CMPC wies bessere mechanische Eigenschaften als die bis dato bekannten CPCs auf. Im in vitro Zellversuch mit der osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG 63 förderte der CMPC die Zelladhäsion und Proliferationsrate, woraus auf eine gute Biokompatibilität geschlossen wurde. Im anschließenden Tierversuch an Kaninchen wurden Implantate aus CMPC in künstliche Defekte in den Oberschenkelknochen eingebracht. Es zeigten nach sich histologischer Aufarbeitung keine Entzündungen, Fremdkörperreaktionen oder Nekrosen. Nach sechs Monaten war der Defekt zu großen Teilen mit neuem Knochen aufgefüllt, was auf eine gute Abbaubarkeit; sowie osteokonduktive Eigenschaften hindeutet. [23].

Für die Verwendung als Knochenersatzmaterial sollte ein CMPC immer gleichbleibende Eigenschaften haben und reproduzierbare Ergebnisse erzielen, dies ist aber bei einem Ausgangspulver aus verschiedenen Komponenten nicht immer gegeben, da beispielsweise bei Lagerung und Transport die Gefahr der Entmischung der Einzelkomponenten und damit der Veränderung der Eigenschaften besteht. Vorndran et al. [56] gelang es dieses Problem durch Entwicklung eines CMPC mit einem vorgesinterten Ausgangspulver zu umgehen. Durch Sinterung von calcium- und magnesiumhaltigen Verbindungen, Calciumhydrogenphosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ), Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), Magnesiumhydrogenphosphat ( $\text{MgHPO}_4$ ) und Magnesiumhydroxid ( $\text{Mg(OH)}_2$ ) konnte eine calciumdotiertes Magnesiumphosphat mit der allgemeinen Summenformel  $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$  mit  $x = 0; 0,25; 0,75; 1,5; 3$ ) hergestellt werden. Als wässrige Phosphatquelle zur Abbindung wurde 3,5 M DAHP verwendet, als

Reaktionsprodukte entstanden Struvit, geringe Mengen Newberyit und Bruschit ähnlich wie bei den in 1.4 beschriebenen MPC.



In vitro Zellversuche mit der osteoblasten-ähnlichen Zelllinie MG 63 zeigten eine gute Biokompatibilität [56]. Die in dieser Arbeit verwendeten Calciummagnesiumphosphatkeramiken basieren auf dem von Vorndran et al. [56] entwickelten CMPC und werden durch Sinterung von calciummagnesiumphosphathaltigen Ausgangspulvern hergestellt. Diese Keramiken können analog zu den o.g. CMPCs mit basischen wässrigen Phosphatquellen nachbehandelt werden, hierbei entsteht, wie in Reaktionsgleichung (7) veranschaulicht, ebenfalls Struvit, Newberyit und Bruschit. In dieser Arbeit wurden die CMPCs auch mit sauren wässrigen Phosphatquellen ( $H_3PO_4$ ) nachbehandelt. Die Reaktionsprodukte sind, wie in Reaktionsgleichung (8) dargestellt, Newberyit und Bruschit.



## 1.6 Herstellung individualisierter Implantate

Große dreidimensionale Knochendefekte im Bereich der kraniofazialen Chirurgie erfordern oft den Einsatz patienten- und defektspezifischer Implantate. Diese können grundsätzlich intraoperativ angepasst oder präoperativ hergestellt werden. Intraoperativ angepasst werden können verschiedene aushärtende Zemente, vorgefertigte Formkörper und Granulate. Oben genannte Defekte sind auf diese Weise oft nur schwer versorgbar, zusätzlich besteht bei Formkörpern die Schwierigkeit der Verbindung mit der bestehenden Knochensubstanz und bei Granulaten die Gefahr der Verschleppung von Partikeln aus dem Operationsgebiet [18, 57]. Präoperativ können Implantate entweder an dimensionstreu Modellen des OP Gebiets angepasst werden oder auf Basis von computertomographischen (CT) Datensätzen mittels computer aided design (CAD) geplant und anschließend durch additive Fertigungstechnik hergestellt werden. Grundlage additiver Fertigungstechniken, wie beispielsweise 3D - Pulverdruck, Stereolithografie oder Lasersinterung ist, dass dreidimensionale Objekte schichtweise aufgebaut werden. Hierfür werden zunächst CT - Aufnahmen des Defekts erstellt und anschließend das Implantat mit CAD modelliert. Das virtuell geplante Implantat kann dann mit additiver Fertigungstechnik, beispielsweise 3D - Druck hergestellt werden [40, 57]. Der 3D - Druck ist in der MKG-Chirurgie bereits etabliert, Klammert et al. [58] stellten mittels 3D - Druck auf Basis von CT - Datensätzen Modelle zur Planung aufwändiger kieferchirurgischer Operationen her, so können beispielsweise Osteotomielinien bei Dysgnathieoperation präoperativ simuliert werden [58]. Zur Herstellung keramischer Implantate wird der 3D - Pulverdruck, welcher in 2.2.1 näher beschrieben wird, angewendet. Bei diesem Verfahren wird Schicht für Schicht ein Grünkörper aus dem keramischen Ausgangspulver, welches mit einem Bindemittel versetzt wurde, mit einer Binderlösung aufgebaut. Dieser Grünkörper wird anschließend durch Hochtemperaturesinterung verfestigt. Grünkörper sind Formkörper aus keramischen Grundmassen, die erst durch Sinterung ihre endgültigen Eigenschaften bekommen [40, 41].

## 1.7 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluation des osteogenen Potentials, also einerseits der Bio- und Zytokompatibilität und andererseits der Ausdifferenzierung osteogener Progenitorzellen von bzw. auf Calciummagnesiumphosphatkeramiken mit der allgemeinen Strukturformel  $\text{Ca}_x\text{Mg}_{3-x}(\text{PO}_4)_2$  mit  $x = 0; 0,25; 0,75; 1,5; 3$ .

Aus diesen Zementphasen wurden durch additive Fertigung mittels 3D - Pulverdruck Prüfkörper hergestellt. Diese Fertigungstechnik ermöglicht die in 1.6 beschriebene Herstellung patientenspezifischer Implantate mit den o.g. Vorteilen. Die mittels 3D -Druck hergestellten Prüfkörper wurden anschließend, wie in 2.2.2 beschrieben, gesintert und nachbehandelt. An diesen Prüfkörpern wird im biologischen in vitro Zellversuch die Zellaktivität, die Zellzahl sowie die osteogene Differenzierung unter Verwendung der humanen Zelllinie hFOB 1.19 bestimmt. Eine qualitative Analyse des Zellwachstums auf den Prüfkörpern erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskopie. Die chemische Zusammensetzung der prozessierten Prüfkörper wurde durch Röntgendiafraktometrie bestimmt. Die Ergebnisse dieser in vitro Untersuchungen sollen als Grundlage für weitere in vivo Studien zur Etablierung von additiv gefertigten CMPC - Keramiken als KEM dienen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Laborgeräte

**Tabelle 2:** In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte.

Gerät	Hersteller
3D - Pulverdrucker ZPrinter 310	Z Corporation (USA - Rock Hill South Carolina)
Analysewaage	Scaltec Instruments GmbH (D - Heiligenstadt)
Critical Point Dryer CPD 030	BAL - TEC AG (FL - Balzers)
Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH (D - Oberschleißheim)
Destillierapparat für Reinstwasser	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (D - Burgwedel)
ENVAIR SCS Evo 2-5-155 Sterilbank	ENVAIR Deutschland GmbH (D - Emmendingen)
Eppendorfpipetten	Eppendorf AG (D - Hamburg)
Exsikkator	A. Hartenstein GmbH (D - Würzburg)
Glühschalen (Aluminiumoxidkeramik)	Porzellanfabrik Hermsdorf GmbH (D - Hermsdorf)
Heracell 150i CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc. (USA - Waltham)
Hochvakuum - Coater EM ACE 600	Leica Microsystems GmbH (D - Wetzlar)
Innovatis Casy TTT Zellzähler	OLS OMNI Life Science (D - Bremen)
Kammerofen ASM 30 H Spezial	Schröder Öfen (D - Flörsheim am Main)
Kammerofen L08/14	Nabertherm (D - Lilienthal)
Magnetrührer MH20	Carl Roth GmbH (D - Karlsruhe)

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Magnetrührfisch	A. Hartenstein GmbH (D - Würzburg)
Mikroskop Leitz DM IL	Leica Microsystems GmbH (D - Wetzlar)
NUAIRE Labguard Class II	NuAire (USA - Plymouth)
Pflugscharmischer	Gebr. Loedige Maschinenbau GmbH (D - Paderborn)
pH-Meter inoLab Level 1	WTW (D - Weilheim)
Planeten-Kugelmühle PM 400	Retsch (D - Haan)
Plattformschüttler Rotaxmax 120	Heidolph Instruments (D - Schwabach)
Rasterelektronenmikroskop CB 340	Carl Zeiss Microscopy GmbH (D - Oberkochen)
Röntgendiffraktometer D8 Advance	Bruker Corporation (USA - Billerica)
Sonifier W-250 D	BRANSON Ultrasonics Corporation (USA - Danbury)
TECAN Spark 20M Photometer	Tecan Trading AG (CH - Männedorf)
Tiegel (Aluminiumoxidkeramik)	Porzellanfabrik Hermsdorf GmbH (D - Hermsdorf)
Vortex Mixer	Scientific Industries Inc. (USA - Bohemia/New York)
Waage	Sartorius AG (D - Göttingen)
Wasserbad	Memmert (D - Schwabach)
Wipptisch	Keison Products (UK - Essex)

## 2.1.2 Software

**Tabelle 3:** In dieser Arbeit verwendete Software.

<b>Anwendung</b>	<b>Produktname</b>	<b>Herausgeber</b>
3D - Planung	SolidWorks	Dassault Systèmes SolidWorks Corporation
3D - Visualisierung	Paint 3D	Microsoft Corporation
Datenauswertung	Exel 2016	Microsoft Corporation
Diagramme	Origin 2019b PowerPoint	OriginLab Microsoft Corporation
Druckersteuerung	Z Print 7.10	Z Corporation (USA- Rock Hill South Carolina)
Rietveld-Analyse	TOPAS V6	Bruker Corporation
Statistische Auswertung	Origin 2019b	OriginLab
XRD-Auswertung	Diffac EVA	Bruker Corporation
Röntgendiffraktometrie	Diffac Plus XRD Commander	Bruker Corporation
Textverarbeitung	Word 2016	Microsoft Corporation

### 2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4:** Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.

<b>Chemikalie/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
4-Nitrophenol (pNP)	Merck (D - Darmstadt)
Accutase Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Aceton	Carl Roth GmbH + Co. KG (D - Karlsruhe)
Calciumcarbonat (CaCO <sub>3</sub> )	Merck (D - Darmstadt)
Calciumhydrogenphosphat (CaHPO <sub>4</sub> )	J.T. Baker (US - Phillipsburg)
Cell Proliferation Reagent WST - 1	Roche Diagnostics GmbH (D - Mannheim)
Dexamethason	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Schnelldorf)
Diammoniumhydrogenphosphat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (D - Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium -high glucose	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Taufkirchen)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Ethanol	Carl Roth GmbH (D - Karlsruhe)
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Geneticin G 418 Sulphate 721 µg/mg	Life Technologies Limited (UK - Paisley)
Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM/F12 (1:1) (1X) + GlutaMax™ F12 Nutrient Mixture (Ham)	Life Technologies Limited (UK - Paisley)

<b>Chemikalie/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Gibco Penicillin Streptomycin (P+S)	Life Technologies Corporation (US - Grand Island)
Glutardialdehyd 25%	Merck (D - Darmstadt)
HEPES buffer solution 1M N-(2-Hydroxyethyl)piperazin N'- (2ethansulfonsäure)	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Hydroxypropylmethylcellulose	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Laborglasflaschen	Schott AG (D - Mainz)
L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesiumsalt	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck (D - Darmstadt)
Magnesiumhydrogenphosphat (MgHPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	Alfa Aesar (D - Kandel)
Magnesiumhydroxid (Mg(OH) <sub>2</sub> )	VWR International GmbH (D - Darmstadt)
Natriumcarbonat wasserfrei (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck (D - Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck (D - Darmstadt)
Petrischale Glas	A. Hartenstein GmbH (D - Würzburg)
Petrischale Kunststoff	Sarstedt (D - Nimbrecht)
Phosphorsäure 85% (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (D - Darmstadt)
Plano Leit-C	Plano GmbH (D - Wetzlar)
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Merck (D - Darmstadt)
Prozesstemperaturkontrollringe (PCTR)	M.E. Schupp Industriekeramik GmbH (D - Aachen)
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	ThermoFisher Scientific Inc., (US - Waltham)
Reaktionsgefäß mit Deckel (1,5/2 ml)	Sarstedt (D - Nimbrecht)
Spritze Luerlock (5 ml)	B. Braun Melsungen AG (D - Melsungen)

<b>Chemikalie/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Sterilfilter Filtropure S 0,2 0,2µm	Sarstedt (D - Nimbrecht)
Triton X 100 4-(1,1,3,3 – tetramethylbutyl)cyclohexyl-polyethylenglykol	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)
Tintenpatrone HP 10	HP GmbH (D - Böblingen)
Waageschälchen	A. Hartenstein GmbH (D - Würzburg)
Wellplatte Microplate 96 well PP F-Bottom black	Greiner Bio One (D - Frickenhausen)
Wellplatte Nunclon™ Delta Surface 6/48/96 well	Thermo Scientific (DK - Roskilde)
Zellkulturflasche Cellstar T75	Greiner Bio One (D - Frickenhausen)
Zelllinie hFOB 1.19	LGC Standards GmbH (D - Wesel)
Zentrifugenröhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio One (D - Frickenhausen)
β-Glycerophosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D - Steinheim)

#### **2.1.4 Herstellung verwendeter Lösungen und Medien**

##### **PBS**

Zur Herstellung einfach konzentrierter PBS Lösung wurde ein Teil steriler zehnfach PBS Lösung mit 9 Teilen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gemischt und anschließend zur Verwendung in der Zellkultur in Laborglasflaschen autoklaviert.

##### **2 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>**

Die 2 M Phosphorsäure wurde durch Mischung von 2 Mol (0,135 ml) 85 %iger H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und anschließendem Auffüllen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> im 1 l Messkolben hergestellt.

##### **3,5 M DAHP**

Zur Herstellung der 3,5 M DAHP Lösung wurden 3,5 Mol (462,2 g) DAHP im Messkolben mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf 1 l aufgefüllt. Da sich DAHP nur schlecht in Wasser

löst wurde ein Magnetrührfisch zugegeben und die Lösung bei 38 °C auf dem Magnetrührer durchmischt.

### ***0,2 M Carbonatpuffer***

Der 0,2 M Carbonatpuffer wurde aus zwei Teilen 0,2 M Natriumcarbonatlösung ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) und einem Teil 0,2 M Natriumhydrogencarbonatlösung ( $\text{NaHCO}_3$ ) hergestellt. Hierfür wurden zunächst 0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (4,2 g) in 200 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  und 0,2 M  $\text{NaHCO}_3$  (1,7 g) in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  mit Hilfe eines Magnetrührers gelöst. Anschließend wurden diese beiden Lösungen zusammengeführt und auf den Ziel pH - Wert 10,2 hin überprüft. Die Pufferlösung wurde bei 4 °C gelagert.

### ***Proliferationsmedium***

Als Proliferationsmedium für die biologische Testung wurde gemäß Protokoll der ATCC Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) F-12 + GlutaMax™ verwendet. Zugesetzt wurden 10 % FCS, 1 % P+S, 2 % HEPES und 171 mg Geneticin [59]. Das FCS wurde zuvor für 30 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert. Geneticin wurde in P+S eingewogen, durch kräftiges vortexen gelöst, sterilfiltriert (Spritzenvorsatzfilter mit 0,2 µm Maschenweite) und anschließend dem Zellkulturmedium zugegeben. Zur Kontrolle der Sterilität wurden 5 ml Zellkulturmedium in einen sterilen Falcon überführt, bei 34 °C im Inkubator inkubiert und nach 24 h und 48 h auf Trübungen untersucht.

### ***Differenzierungsmedium***

Als Medium für die osteogene Differenzierung wurde Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose mit einem Glucosegehalt von 4500 mg/l verwendet. Diesem wurden wie zuvor beschrieben, 10 % inaktiviertes FCS sowie 1 % P + S zugesetzt und anschließend eine Sterilkontrolle durchgeführt. An den Tagen des Medienwechsels wurden diesem Grundstock 50 µl/ml L - Ascorbinsäure - 2 - Phosphat, 10 mM β - Glycerophosphat und 100 nM Dexamethason als Differenzierungszusätze zugegeben, diese Stoffe fördern die Differenzierung osteogener Zellen [60-62].

### 2.1.5 Herstellung der Zementpulver

Sämtliche Zementpulver wurden von der technischen Angestellten I. Biermann hergestellt.

#### ***Tricalciumphosphatzement ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )***

Durch Mischen von 2,00 mol Calciumhydrogenphosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ) und 1,00 mol Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ) im Plugschermischer und anschließendem Sintern wurde Tricalciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) gewonnen. Der Sinterprozess erfolgte in Aluminiumoxidkeramiktigeln, bei 1400 °C für 5 h. Die hierbei entstandenen Sinterkuchen wurden zunächst im Mörser händisch zerkleinert und auf die Zielkorngroße von <355 µm gesiebt. Zu große Konglomerate wurden durch Mahlen in der Planetenkugelmühle für 1 h bei 200 U / min weiter zerkleinert und mit dem bereits gesiebt Pulver vermischt. Um Verunreinigungen beim Mahlprozess zu vermeiden wurden Mahlbecher und -kugeln aus Zirkoniumdioxidkeramik verwendet. Für die spätere Verarbeitung mittels 3D - Druck wurde das so gewonnene Pulver anschließend mit 4 wt% Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) im Plugschermischer für 20 min durchmischt.

#### ***Calciummagnesiumphosphatzemente ( $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ )***

Zur Gewinnung der CMPCs mit der allgemeinen Strukturformel ( $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ). wurden Mischungen in veränderlicher Zusammensetzung aus Calciumhydrogenphosphat ( $\text{CaHPO}_4$ ), Calciumcarbonat ( $\text{CaCO}_3$ ), Magnesiumhydrogenphosphat ( $\text{MgHPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ ) und Magnesiumhydroxid ( $\text{Mg}(\text{OH})_2$ ) gesintert. Tabelle 5 zeigt die Rezepturen der unterschiedlichen CMPC.

**Tabelle 5:** Rezepturen CMPC ( $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ).

<b>Zement</b>	<b>Ausgangsstoffe (mol)</b>			
	$\text{CaHPO}_4$	$\text{CaCO}_3$	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	$\text{Mg}(\text{OH})_2$
$\text{Mg}_{1,5}\text{Ca}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$	1,000	0,500	1,000	0,500
$\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$	0,500	0,250	1,500	0,750
$\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$	0,167	0,083	1,830	0,920
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	-	-	2,000	1,000

Zur Gewinnung der jeweiligen Zementphase wurden die Ausgangsstoffe, siehe Tabelle 5, für 1 h im Plugschermischer durchmischt und anschließend in Aluminiumoxidkeramiktiegeln für 5 h bei 1100 °C gesinert. Vor Beginn des eigentlichen Sinterprozesses wurden die befüllten Tiegel zunächst für 1 h auf 600 °C erhitzt, damit das enthaltene Wasser langsam verdampfen kann. Werden die Tiegel zu schnell erhitzt, führt das verdampfende Wasser zum Aufblähen des Sinterkuchens mit Überlaufen der Tiegel und damit zu einer starken Verschmutzung der Sinteröfen.

Die hierbei entstanden Sinterkuchen wurden wie zuvor beschrieben weiterverarbeitet, wobei für diese Zementpulver eine Zielkorngöße von <350 µm angestrebt wurde, ebenso wurden 4 wt% HPMC zugesetzt.

## 2.2 Methoden

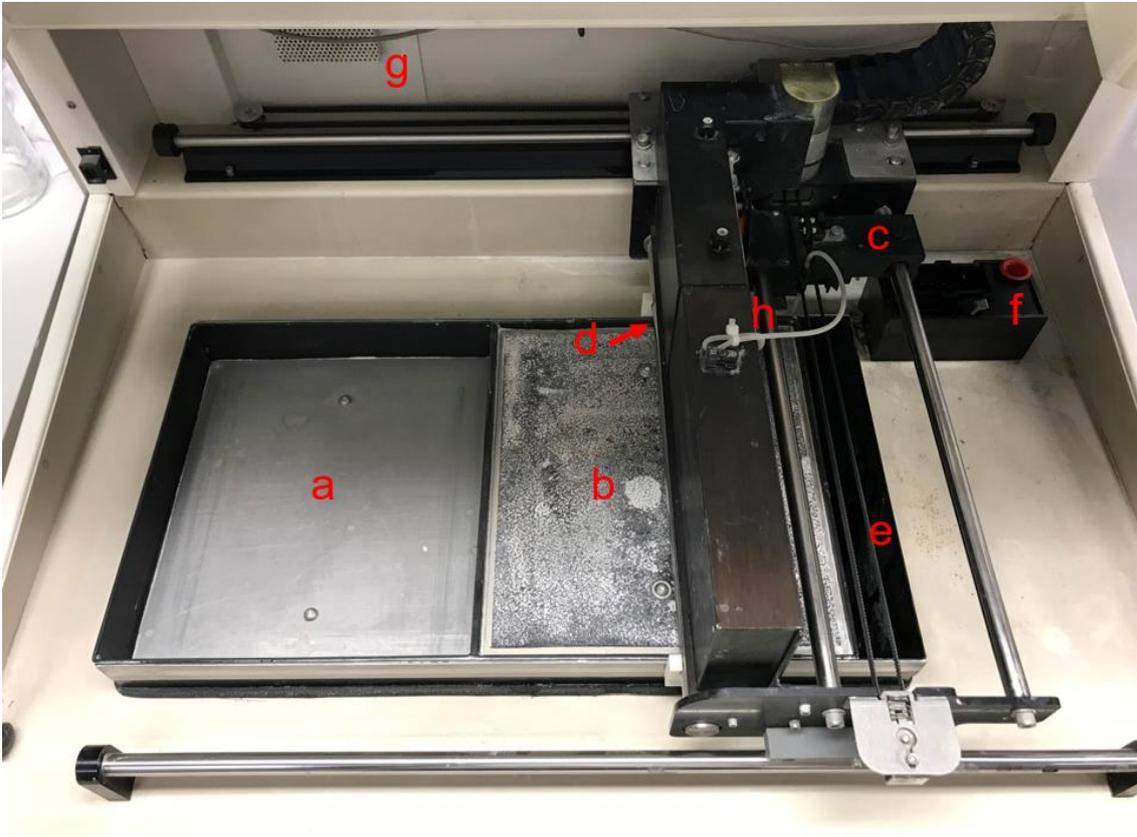
### 2.2.1 3D - Drucker ZPrint 310

Der Arbeitsbereich des verwendeten 3D - Pulverdruckers, dargestellt in Abbildung 1, besteht aus zwei gleichgroßen aneinanderliegenden Becken mit höhenverstellbarem Boden (a,b), einer Walze (d) zum Ausstreichen der Pulverschichten, einem Pulverüberlauf (e) sowie einem in X- und Y- Richtung bewegbaren Druckkopf (c) mit Zulauf (h) und zugehörigem Tank für die Binderflüssigkeit. An einer Reinigungsstation (f) kann der Druckkopf mit Binderflüssigkeit gespült werden. Als Druckkopf wurden herkömmliche Tintenpatronen der Marke HP (HP10 - schwarz) verwendet, diese werden aus dem Tank stetig mit Binderlösung aufgefüllt. Die Tintenpatronen altern dennoch bei Verwendung und mussten daher regelmäßig ersetzt werden. Hierfür mussten die handelsüblichen Patronen zunächst entleert, mit Spülmittellösung und anschließend mit destillierten Wasser gereinigt werden.

Für den Druckprozess werden beide Becken, eines dient als Pulverraum (a) und das andere als Bauraum (b), mit Pulver befüllt und manuell leicht verdichtet.

Die Böden der beiden Becken bewegen sich gegensinnig, der Boden des Reservoirs wird um den gleichen Weg angehoben, um den der Boden des Bauraums abgesenkt wird. Die Walze (d) streicht dann den Überschuss im Reservoir (a) gleichmäßig über die Pulverfläche im Bauraum (b), überflüssiges Pulver fällt in den Pulverüberschuss (e). Mit jeder Bewegung der Böden und dem Ausstreichen der Walze entsteht eine neue Schicht, auf die dann mit dem Druckkopf (c) Binderlösung aufgesprüht wird. Diese verursacht lokal eine Abbindereaktion, anschließend wird eine neue Schicht Pulver ausgestrichen und wieder Binderlösung aufgesprüht. So werden dreidimensionale Objekte Schicht für Schicht aufgebaut. Nach Abschluss des Druckprozesses kann das Objekt entnommen und mittels Druckluft in einer dafür vorgesehenen Kammer mit Staubabsaugung von überflüssigem Pulver befreit werden. Der Arbeitsraum kann mittels eines Heizelements (g) beheizt werden, um die Abbindezeit zu verkürzen.

Für den Druck wird das dreidimensionale Objekt mit der Software SolidWorks als STL Datensatz erzeugt und dann von der Software des Druckers (ZPrint 7.10) in die zu druckenden Schichten zerlegt.



**Abbildung 1:** 3D - Drucker ZPrint 310.

Arbeitsbereich des 3D - Drucker ZPrint 310: a) Pulverraum, b) Bauraum, c) Halterung für Druckkopf (Tintenpatrone), d) Walze, e) Pulverüberlauf, f) Reinigungsstation für den Druckkopf, g) Heizelement, h) Zulauf für Binderlösung aus dem Tank.

### 2.2.2 Herstellung der Prüfkörper

Für die vorliegende Arbeit wurde mit dem 3D - Pulverdrucker ZPrint 310 wie in 2.2.2 beschrieben mit entgastem milliQ Wasser als Binderlösung und den in 2.1.5 genannten Zementpulvern gearbeitet. Das entgaste milliQ Wasser wurde durch Einleiten des Edelgases Argon für 20 min hergestellt. Dies verhindert Beschädigungen des Druckkopfes durch die Bildung von Luftbläschen. Die Binderlösung Wasser löst in diesem Fall nach Aufsprühen auf die Pulverschicht lokal ein Abbinden durch Quellen der HPMC aus.

Für die biologische Testung der jeweiligen Zementphasen in 48er Wellplatten wurden zylinderförmige Prüfkörper in einem Durchmesser von 11,97 mm und einer Höhe von 2,00 mm benötigt. Für die Aufnahme der REM-Bilder wurden ebenfalls zylinderförmige Prüfkörper mit einem Durchmesser von 11,00 mm, einer Höhe von 2,00 mm benötigt. Eine trichterförmigen Mulde auf einer Seite dient der Seitenunterscheidung und zwei gegenüberliegenden Mulden am Rand erleichtern die Entnahme Prüfkörper mittels Pinzette aus der Wellplatte.



**Abbildung 2:** Prüfkörper.

Prüfkörper für die biologische Testung (links) und für REM-Aufnahmen (rechts).

Hierbei mussten sowohl die leichten Abweichungen beim 3D - Druck als auch die zementphasenabhängige Sinterschrumpfungen, welche in Vorversuchen ermittelt wurden, beachtet werden. Beide Prüfkörper Designs wurden mit SolidWorks erstellt und anschließend gedruckt. Nach einer Trocknungszeit von etwa 20 min konnten die Prüfkörper vorsichtig aus dem Pulverbett entnommen und mit Druckluft entstaubt werden. Anschließend wurden die Prüfkörper in Petrischalen ausgelegt und weitere 24 h bei Raumtemperatur getrocknet.

### ***Sintern der Prüfkörper***

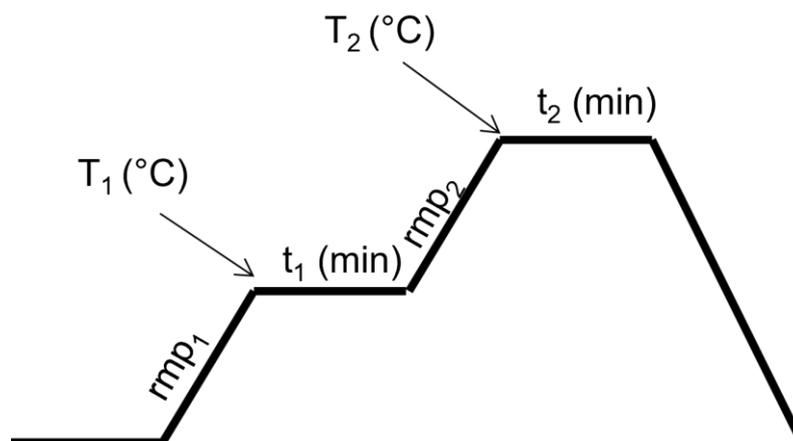
Nach Trocknung wurden die Prüfkörper zur Sinterung auf Glühschalen aus Aluminiumoxidkeramik ausgelegt und anschließend im Ofen gesintert (Abbildung 4).

Für die unterschiedlichen Zementphasen müssen unterschiedliche Sintertemperaturen verwendet werden. Die Sintertemperaturen wurden von Brückner [63] ermittelt und sind in Tabelle 6 veranschaulicht.

**Tabelle 6:** Sintertemperaturen der jeweiligen Zementphasen [63].

Zementphase	Sintertemperatur $T_2$ (°C)
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1350
$\text{Mg}_{1,5}\text{Ca}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$	1100
$\text{Mg}_{2,25}\text{Ca}_{0,75}(\text{PO}_4)_2$	1100
$\text{Mg}_{2,75}\text{Ca}_{0,25}(\text{PO}_4)_2$	1100
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	1200

Die Brennkurve zur Sinterung besteht aus zwei Aufheizrampen und zwei Halteperioden, sowie der abschließenden Abkühlphase. Die erste Aufheizrampe erfolgt mit einer Aufheizrate von 120 °C/h bis zum Erreichen von Temperatur 1 ( $T_1 = 500$  °C) und dient zusammen mit der Halteperiode 1 ( $t_1 = 120$  min) dem Ausbrennen der enthaltenen Cellulose. Es folgt Aufheizrampe 2 mit einer Aufheizrate von 300 °C/h bis zum Erreichen von Temperatur 2 ( $T_2 = x$  °C), abhängig von der jeweiligen Zementphase. Die eigentliche Sinterung erfolgt dann während der zweiten Halteperiode ( $t_2 = 240$  min). Die anschließende Abkühlung erfolgt mit einer Abkühlrate von circa 600 °C/h bis auf Raumtemperatur. Abbildung 3 veranschaulicht die beschriebene Sinterkurve.



**Abbildung 3:** Sinterkurve.

rmp<sub>1</sub>: Aufheizrampe 1, rmp<sub>2</sub>: Aufheizrampe 2, t<sub>1</sub>: Halteperiode 1 in (min),

t<sub>2</sub>: Halteperiode 2 in (min), T<sub>1</sub>: Temperatur Stufe 1 in (°C), T<sub>2</sub>: Temperatur Stufe 2 in (°C).

Zur Brennprozesskontrolle wurde ein Prozesstemperaturkontrollring (process temperature control ring - PCTR) pro Sinterung mit auf eine Glühschale gelegt. Diese Ringe schrumpfen während der Sinterung im Ofen und nach Abkühlen kann die Temperatur während des Sintervorgangs durch Vermessen des Rings und Vergleichen mit Tabellen des Herstellers kontrolliert werden.



**Abbildung 4:** Sinterofen mit Scaffolds.

Gedruckte und entstaubte Scaffold im Sinterofen, ausgelegt auf Glühschalen aus Aluminiumoxid. Der rote Pfeil markiert den, beim jedem Brennvorgang beigelegten PCTR Ring. Beim Vergleich der Größe der Scaffolds in der Glühschale vorne rechts und hinten links ist auch der Größenunterschied der Scaffolds, angepasst an die jeweilige Sinterschrumpfung der unterschiedlichen Zementphasen, erkennbar.

Minimale Formabweichungen bedingt durch den Druck und die Sinterung wurden mit einer handelsüblichen Werkzeugfeile aus Hartmetall korrigiert, um zu gewährleisten, dass die Prüfkörper in die 48er Wellplatte passen.

### ***Nachbehandlung der Prüfkörper***

Nach der Sinterung wurden die Proben chemisch nachgehärtet um die in 1.5 näher beschriebene Phasenumwandlung zu erreichen. Die Nachhärtung erfolgte entweder mit 2 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  oder mit 3,5 M DAHP. Für die Nachhärtung mit DAHP wurden die gesinterten Prüfkörper in einer Plastikpetrischale ausgelegt und mit 2 ml 3,5 M DAHP Lösung pro Prüfkörper für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die so behandelten Proben auf Küchenpapier ausgelegt und für mindestens 6 h bei Raumtemperatur getrocknet. Dies erfolgte unter dem Abzug.

Für die Nachhärtung mit Säure wurden die gesinterten Prüfkörper auf einer Glaspetrischale ausgelegt und mit der Mikropipette bis zur vollständigen Durchtränkung mit 2 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$  beträufelt und anschließend für mindestens 6 h bei Raumtemperatur im Abzug getrocknet.

### ***Waschen der nachbehandelten Prüfkörper***

Nach der Nachhärtung und Trocknung wurden die Prüfkörper gewaschen um nicht reagierte Edukte und Zementreste zu entfernen. Um mikrobiologischen Kontaminationen vorzubeugen, erfolgte der Waschvorgang in der Sterilbank mit ausreichenden Mengen an sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und PBS als Waschmedium, in autoklavierten Glaspetrischalen.

Der Waschvorgang dauerte vier Tage, an Tag 1 und 2 wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen, an Tag 3 und Tag 4 mit PBS. An Tag 1 wurde das Waschmedium bereits nach 15 min gewechselt, danach immer nach 24 h. Zusätzlich wurde an Tag 2, 3 und 4 der pH-Wert gemessen. Zwischenzeitlich wurden die verschlossenen Petrischalen auf dem Wipptisch zur Durchmischung abgestellt.

An Tag 4 wurde das Waschmedium abgesaugt und die Prüfkörper in den offenen Petrischalen in der geschlossenen Sterilbank über Nacht getrocknet.

### ***Gammasterilisation der Prüfkörper***

Um die, für die Zellversuche nötige Sterilität zu erreichen, ohne die Prüfkörper in ihren Eigenschaften zu verändern, wurden die Prüfkörper mittels 31 kGy Gammastrahlung sterilisiert. Hierfür wurden die gewaschenen und getrockneten Prüfkörper in sterile Falcons verpackt und in Sterilisationsfolie eingeschweißt. Die Gammasterilisation erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Tissue

Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg durch die Firma BBF Sterilisationsservice GmbH (D-Kernen-Rommelshausen).

### 2.2.3 Überprüfung der Phasenzusammensetzung

Die Phasenzusammensetzung der Prüfkörper wurde mittels Röntgendiffraktometrie mit monochromatischen Strahlen (1,541 Å) analysiert. Es wurden die Rohpulver und die gesinterten bzw. nachbehandelten Prüfkörper untersucht. Hierfür wurden die getrockneten Prüfkörper fein gemörsert und mit einer Glasplatte flach auf den Proben Tellern ausgestrichen. Die Messungen erfolgten mit dem Scantyp locked coupled in einem  $2\theta$  - Winkelbereich von  $10 - 40^\circ$  und einer Schrittweite von  $0,02^\circ$  bei einer Messgeschwindigkeit von 0,5 s/step und 15 rpm. Diese Einstellungen erfolgten durch die Gerätesoftware Diffrac plus XRD Commander. Die Ergebnisse wurden mit der Software EVA ausgewertet und durch Vergleich mit PDF - Referenzen (powder diffraction file) aus der JCPDS - Datenbank (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) konnten die einzelnen Phasen identifiziert werden [64]. Die für diese Arbeit verwendeten PDF - Referenzen sind in Tabelle 7 aufgezählt.

**Tabelle 7:** In dieser Arbeit verwendete PDF - Referenzen.

Phase	Summenformel	PDF - Nummer
$\alpha$ - TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	06-0200
$\beta$ - TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	09-0169
Bruschat	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	02-0085
Farringtonit	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	33-0876/25-1373
Magnesiumpyrophosphat	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 22\text{H}_2\text{O}$	44-0775
Monetit	$\text{CaHPO}_4$	09-0080
Newberyit	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	20-0153
Stanfieldit	$\text{Ca}_4\text{Mg}_5(\text{PO}_4)_6$	11-0231
Struvit	$\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15-0762

Mit Hilfe der Rietveld - Analyse durch die Software TOPAS V6 wurde die quantitative Phasenzusammensetzung der Prüfkörper bestimmt [65].

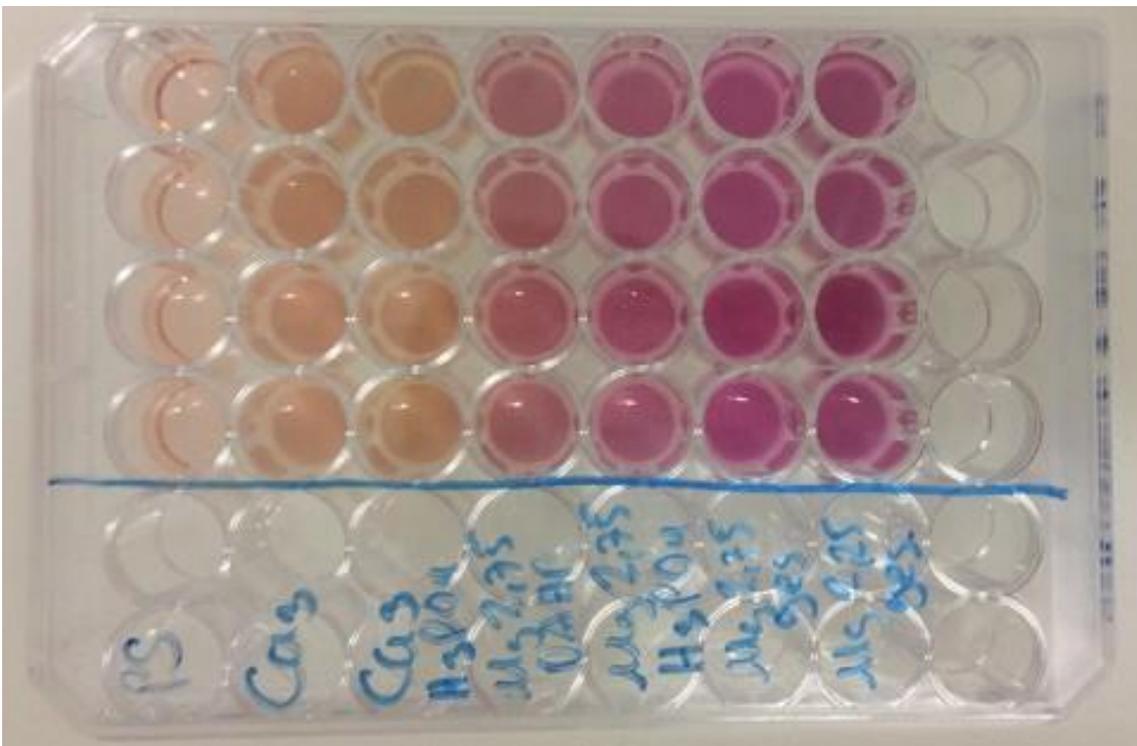
#### **2.2.4 Zellkultur der Osteoblastenzelllinie hFOB 1.19**

Bei hFOB 1.19 handelt es um eine von Harris et al. [59] etablierte, humane Zelllinie osteogener Progenitorzellen. Durch Einschleußung eines Gens, für eine temperaturabhängige Mutante des SV 40 large T Antigens wurde die Zelllinie immortalisiert. Bei einer Temperatur von 34° C ist das T Antigen aktiv und kommt zu einer raschen Proliferation mit einer Verdopplungszeit von etwa 36 h. Eine Temperaturerhöhung bis 39° C führt zur Inaktivierung des T Antigens und damit zu einer Reduktion der Proliferationsrate und Ausdifferenzierung der osteogenen Progenitoren zu reifen Osteoblasten, welche u.a. alkalische Phosphatase sezernieren [59, 66].

Nach dem Auftauen aus flüssigem Stickstoff wurden die hFOB - Zellen in Zellkulturflaschen aus Polystyrol mit einer Oberfläche von 75 cm<sup>2</sup> mit 20 ml Zellkulturmedium kultiviert. Zweimal wöchentlich erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellkultur. War diese konfluent, wurden die Zellen gesplittet. Bei gelblichem, also verbrauchtem Zellkulturmedium wurde dieses ausgetauscht. Zum Splitten wurde die Zellkultur mit PBS gewaschen, um Zellkulturmediumreste und abgestorbene Zellen zu entfernen und anschließend mit 1 ml Accutase Solution im Inkubator bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Die Dissoziationsreaktion wurde mit 1 ml Zellkulturmedium abgestoppt und nach gründlichem Resuspendieren wurden 0,2 ml der Zellsuspension in eine neue T75 Zellkulturflasche überführt. Nach Zugabe von 20 ml Zellkulturmedium erfolgt die Inkubation im Inkubator (34 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Auftauen und Kultur der hFOB 1.19 Zellen, wie zuvor beschrieben, erfolgte nach ATCC Protokoll.

### 2.2.5 Vorbereitung der Zellversuche

Zu Beginn der Zellversuche wurden 48er Wellplatten mit je vier Prüfkörpern pro Zementphase im Vorversuch oder drei Prüfkörpern im Hauptversuch bestückt und für 24 h mit je 500 µl Zellkulturmedium bei RT inkubiert. Lediglich die rein gesinterten Zementphasen mit Ausnahme von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  wurden aufgrund des zu erwartenden stark basischen Verhaltens für 24 h in 6 Wellplatten mit 3 ml Zellkulturmedium inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde nach frühestens 6 h einmal gewechselt.



**Abbildung 5:** Mit Prüfkörpern bestückte Wellplatte in der Zellkultur.

Auf jeder Wellplatte wurden je vier Wells ohne Prüfkörper, also Polystyrol und eine Reihe  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , ( $\text{Ca}_3$ ), Prüfkörper mitgeführt.  $\text{Mg}_{2.75}$  für  $\text{Ca}_{0.25}\text{Mg}_{0.75}(\text{PO}_4)_2$  und  $\text{Mg}_{2.25}$  für  $\text{Ca}_{0.75}\text{Mg}_{2.25}(\text{PO}_4)_2$ .  $\text{H}_3\text{PO}_4$  beschreibt die Nachbehandlung mit Säure, DAHP die Nachbehandlung mit Base. Bei ges. handelt es sich um gesinterte, nicht weiter nachbehandelte Prüfkörper. Polystyrol diente zur Kontrolle des Zellwachstums,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  als Referenz für die anderen Zementphasen.

Für die Aussaat wurden die Zellen in einer dichten Zellkulturflasche wie in 2.2.4 beschrieben, abgelöst, lediglich das Waschen mit PBS wurde 2 mal wiederholt und das Abstoppen der Dissoziationsreaktion erfolgte mit 10 ml Zellkulturmedium.

Die Zellzahl wurde mit dem Zellzähler Casy TTT bestimmt. Hierfür werden 100 µl Zellsuspension auf 10 ml Isoton gegeben und gemessen. So konnte durch Verdünnung mit Zellkulturmedium eine Zellsuspension mit einem Zellgehalt von 100000 Zellen pro ml vorbereitet werden. Der Zellgehalt wurde vor Aussaat nochmals mit dem Zellzähler Casy TTT bestimmt. Anschließend wurden pro Well 50000 Zellen also 500 µl Zellsuspension mit der Multipette ausgesät. Der Tag der Aussaat dient der Vorkultivierung auf den Prüfkörpern und ist daher Tag 0 des jeweiligen Zellsversuchs.

Da sich im Laufe des ersten Zellversuchs zeigte, dass die Oberfläche eines Wells Polystyrol zu klein für 50000 Zellen ist und sich diese nach 5 - 6 Tagen aufgrund von Raummangels ablösten, wurden in den folgenden Versuchen nur noch 25000 Zellen pro Well Zement ausgesät. Es wurden 250 µl der Zellsuspension mit der Multipette in die Wells gefüllt und anschließend mit je 250 µl Zellkulturmedium verdünnt. Der Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage, hierfür wurde das verbrauchte Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und durch im Wasserbad auf 34 °C vorgewärmtes frisches Zellkulturmedium ersetzt.

## **2.2.6 Durchführung der Zellversuche**

### ***Proliferationsversuch***

Die Wellplatten mit den, wie in 2.2.5, ausgesäten Zellen wurden bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit den zu testenden Zementen zunächst als Vorversuch durchgeführt. In den folgenden Versuchen wurden alle drei in 2.2.5 beschriebenen Versuchsansätze parallel durchgeführt.

### ***Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze***

Die Wellplatten mit den, wie in 2.2.5, ausgesäten Zellen wurden zunächst für sieben Tage bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Proliferationsmedium inkubiert. Ab dem siebten Tag wurden die Wellplatten zwar weiterhin mit Proliferationsmedium, aber bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der siebte Tag des Versuchs entspricht dem ersten Tag der Differenzierung.

### ***Differenzierungsversuch mit Differenzierungszusätzen***

Die Wellplatten mit den, wie in 2.2.5, ausgesäten Zellen wurden wieder zunächst für sieben Tage bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Proliferationsmedium inkubiert. Ab dem siebtem Tag wurden die Wellplatten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Differenzierungsmedium inkubiert. Der siebte Tag des Versuchs entspricht dem ersten Tag der Differenzierung.

#### **2.2.7 Bestimmung der Zellaktivität**

Der Bestimmung der Zellaktivität mittels WST-Test liegt die Umsetzung der WST - 1 Reagenz ((4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzol-Disulfonat), durch die mitochondriale Succinatdehydrogenase in der Atmungskette vitaler menschlicher Zellen zugrunde. Die WST - 1 Reagenz, ein Tetrazoliumsalz, wird hierbei zu Formazan, dies ist mit einem Farbumschlag zu dunkelrot verbunden. [67]. Dieser Farbumschlag kann mit dem Photometer bestimmt werden.

Der WST-Test erfolgte an vier Tagen (3, 6, 10 und 14) in den Vorversuchen und an drei Tagen (3, 6 und 10) in den Differenzierungsversuchen. Hierfür wurde zunächst eine 1:10 Verdünnung der WST - 1 Lösung mit Zellkulturmedium hergestellt. Der Überstand über den Prüfkörpern in der Wellplatte wurde abgesaugt und anschließend wurden die Prüfkörper mit exakt 500 µl der zuvor vorbereiteten Lösung im Inkubator bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 30 min inkubiert. Nach Ablauf der 30 min wurde der komplette Überstand über den Prüfkörpern in eine neue 48er Wellplatte überführt, um die Reaktion zu beenden. Von diesem Überstand wurden anschließend Duplikate zu je 200 µl in eine 96er Wellplatte pipettiert. An dieser Wellplatte wurde dann im Spark® 20 M Microplate Reader die Absorption bei 405 nm gemessen. Die Software Sparkcontrol zieht automatisch die bei 620 nm gemessene Absorption der Wellplatte ab. Zur abschließenden Auswertung wurde von den Ergebniswerten noch die Absorption von Zellkulturmedium ohne WST - Reagenz abgezogen, diese Absorptionswerte entsprechen der WST - Aktivität der Zellen auf den jeweiligen Prüfkörpern. Diese Werte wurden anschließend gemittelt und pro Zementphase angegeben Die

Prüfkörper wurden mit je 1 ml PBS überschichtet, um Austrocknung bis zur Gewinnung des Zelllysats, wie in 2.2.8 beschrieben, zu vermeiden.

### **2.2.8 Bestimmung des DNA - Gehalts**

Der DNA - Gehalt im Zelllysate der Proben wurde mittels Quant - iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay ermittelt. Die PicoGreen - Reagenz ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige Nukleinsäuren (dsDNA) bindet. Nach Anregung kann die Fluoreszenz gemessen werden [68, 69]. Mit Hilfe vom Hersteller mitgelieferter DNA - Standardreihen kann aus der gemessenen Fluoreszenz der DNA - Gehalt bestimmt werden.

Die Bestimmung des DNA - Gehalts erfolgte ebenfalls an vier Tagen (3, 6, 10, 14) in den Vorversuchen und an drei Tagen (3, 6 und 10) in den Differenzierungsversuchen an den gleichen Prüfkörpern, wie der in 2.2.7 beschriebene WST - Test.

Um Reste von Zellkulturmedium und WST - Reagenz zu entfernen, wurden die Prüfkörper in der Wellplatte dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen wurden die Prüfkörper mit je 500 µl einer Lösung aus 0,1 % Triton X - 100 (Lysepuffer) in PBS überschichtet und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz bei -80 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt noch zwei weitere Male aufgetaut und wieder eingefroren, um die Lyse zu verbessern. Das so gewonnene Zelllysate wurde zusätzlich mit dem Ultraschallstab sonifiziert, um sowohl um die Zellmembran als auch die Kernmembran aufzubrechen [70]. Sonifiziert wurde auf Eis mit zehn Pulsen zu je 0,2 s mit einer Pause von je einer Sekunde.

Zur Messung wurden Duplikate zu je 100 µl der DNA - Standardreihe und der Zelllysate in eine schwarze 96er Wellplatte für Fluoreszenzmessungen pipettiert. In jedes Well wurden 100 µl der PicoGreen Gebrauchslösung hinzu pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubation unter Lichtabschluss auf dem Plattformschüttler erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität bei 535 nm bei einer Anregung von 485 nm im Spark® 20 M Microplate Reader. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden Standardkurven erstellt, anhand derer die DNA - Menge in den

Zelllysaten der jeweiligen Zementproben berechnet werden konnte. Diese Werte wurden ebenfalls pro Zementphase gemittelt.

### **2.2.9 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase**

Ausdifferenzierte, reife hFOB - Osteoblasten sezernieren alkalische Phosphatase (ALP) [71]. Um die Ausdifferenzierung der hFOB - Osteoblasten nachzuweisen wurde die Aktivität der ALP mittels ALP - Assay bestimmt. Grundlage des ALP-Assays ist die enzymatische Hydrolyse der Phosphatreste des farblosen Substrats p - Nitrophenolphosphat (pNPP) zum gelben Produkt p - Nitrophenol (pNp) durch die ALP [72].

Die Zellen wurden an den jeweiligen Messtagen, wie in 2.2.8 beschrieben, geerntet und prozessiert, allerdings wurde für die Lyse der Zellen im Versuchsansatz zur Bestimmung der ALP -Aktivität ein Lysepuffer aus 0,1% Triton X 100 in 0,2 M Carbonatpuffer verwendet. Für den ALP - Assay wurden zunächst die benötigten Versuchsreagenzien hergestellt:

#### ***Carbonatpuffer***

Siehe 2.1.4.

#### ***Magnesiumchlorid-Lösung***

Zur Herstellung der 100 mM Magnesiumchloridlösung ( $MgCl_2$ ) wurde 1 g in 50 ml  $H_2O_{bidest}$  gelöst und anschließend bei 4° C gelagert.

#### ***pNPP - Substrat - Stammlösung***

Zur Herstellung der pNPP - Substrat - Stammlösung (1 mg/ml) wurden 10 mg pNPP in 9 ml 0,2 M Carbonatpuffer gelöst und anschließend 1 ml der 100 mM  $MgCl_2$  Lösung zugesetzt. Die pNPP - Substrat - Stammlösung wurde bei 4 °C dunkel gelagert.

### ***pNPP - Substrat - Arbeitslösung***

Die pNPP - Substrat - Arbeitslösung (0,33 mg/ml) wurde durch Mischen von einem Teil pNPP - Substrat - Stammlösung mit zwei Teilen H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> hergestellt und ebenfalls bei 4° C gelagert.

### ***pNP - Standardlösung***

Zur Herstellung der 10 mM pNP - Standardlösung wurden 13,91 mg p - Nitrophenol in 10 ml 0,2 M Carbonatpuffer gelöst.

Um die Aktivität der ALP in den jeweiligen Zelllysaten zu bestimmen, wurden zunächst Duplikate zu je 100 µl der pNp - Standardlösung in absteigender Konzentration in eine 96er Wellplatte pipettiert. Die Zelllysate wurden ebenfalls in Duplikaten zu je 50 µl in die gleiche 96er Wellplatte pipettiert. Nach Zugabe von je 50 µl der pNPP - Substrat - Arbeitslösung zu den Zelllysaten wurde die Wellplatte für 2 h bei 37° C inkubiert und anschließend die Absorption bei 405 nm im Spark® 20 M Microplate Reader gemessen. Die Software Sparkcontrol zieht automatisch die bei 620 nm gemessene Absorption der Wellplatte ab. Mit Hilfe von Microsoft Excel wurden Standardkurven erstellt und dann die Aktivität der alkalischen Phosphatase in nmol/min/µg DNA pro Prüfkörper bestimmt und anschließend gemittelt. Der DNA - Gehalt hierfür wurde mittels Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay an den gleichen Zelllysaten bestimmt.

### 2.2.10 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Zur Anfertigung rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (REM - Aufnahmen) wurden hFOB - Osteoblasten, wie in 2.2.5 beschrieben, auf Prüfkörpern ausgesät und für insgesamt 6 Tage bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Proliferationsmedium kultiviert. An Tag 6 wurde das Zellkulturmedium aus der Wellplatte abgesaugt und die Zellen insgesamt viermal mit PBS gewaschen. Die Prüfkörper wurden in der Wellplatte mit einer Lösung aus 25 % Glutaraldehyd in PBS überschichtet und für 15 min auf Eis inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Um Reste des Glutaraldehyds zu entfernen wurden die Prüfkörper anschließend mit PBS überschichtet, viermal für 10 min auf Eis inkubiert und der Flüssigkeitsüberstand über dem Prüfkörper wieder abgesaugt. Die Entwässerung der Zellen auf den Prüfkörpern wurde mittels aufsteigender Acetonreihe, siehe Tabelle 8, in Rollrandgläsern durchgeführt. Beim Wechsel der Lösung in den Gläsern muss immer ein kleiner Rest Aceton über den Prüfkörpern verbleiben um ein Austrocknen und damit die Zerstörung der Zellen zu vermeiden.

**Tabelle 8:** Entwässerung mittels Acetonreihe.

Medium	Dauer
30 %ige Acetonlösung	15 min, RT
70 %ige Acetonlösung	20 min, RT
70 %ige Acetonlösung	20 min, RT
90 %ige Acetonlösung	20 min, RT
90 %ige Acetonlösung	20 min, RT
100 %ige Acetonlösung	20 min, RT
100 %ige Acetonlösung	20 min, RT
100 %ige Acetonlösung	20 min, RT
100 %ige Acetonlösung	20 min, RT
100 %ige Acetonlösung	20 min, RT

Die entwässerten Proben wurden anschließend mittels kritisch Punkt Trocknung weiterverarbeitet. Hierfür wurden jeweils vier Prüfkörper in einem Drahtnetz in die Druckkammer des Critical Point Dryer CPD 030 eingebracht und die Kammer dann komplett mit Aceton befüllt. In der Druckkammer erfolgte dann schrittweise die Verdrängung von Aceton durch flüssiges CO<sub>2</sub> und durch folgendes Erwärmen und Ablassen des Drucks, die kritisch Punkt Trocknung. Die getrockneten Prüfkörper wurden anschließend mit Leit C Kohlenstoffpaste auf Probentellern fixiert und im Sputtercoater EM ACE600 mit einer 2 nm dicken Platinschicht beschichtet. Bis zur Anfertigung im REM - Aufnahmen im REM - Mikroskop CB 340 bei verschiedenen Vergrößerungen wurden die Prüfkörper im Exsikator unter Vakuum aufbewahrt.

### **2.2.11 Statistische Auswertung**

Die statische Auswertung der Ergebnisse der Versuche zur biologischen Testung wurde mittels one way anova mit Tukey Test bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  mit OriginPro durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Referenz Ca<sub>3</sub> an den jeweiligen Tagen ist in den Diagrammen dargestellt. Die vollständigen Ergebnisse des Tukey Tests für den Hauptversuch sind im Anhang in Tabelle 12 - 14 dargestellt. Für den Vorversuch wurden nur die signifikanten Unterschiede zur Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> an den jeweiligen Tagen ermittelt, da dieser Versuch darauf abzielte, die geeignetsten Zementphasen im Vergleich zur Referenz für den Hauptversuch zu ermitteln.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Analyse der Phasenzusammensetzung der Prüfkörper

Die XRD - Diagramme, dargestellt in Abbildung 6, zeigen die Ergebnisse der qualitativen Phasenanalyse mittels Röntgendiffraktometrie. Zusätzlich wurde anhand der XRD - Diagramme mittels Rietveld - Analyse eine quantitative Phasenanalyse durchgeführt, deren Ergebnisse in Tabelle 9 - Tabelle 11 zusammengefasst sind. Zur besseren Lesbarkeit im Text wird die Nachbehandlung der Prüfkörper abgekürzt. Die Großbuchstaben B und S stehen für die Nachbehandlung der Phase mit Base oder Säure. G steht für gesintert ohne Nachbehandlung, R für Rohpulver.

Abbildung 6 - Diagramm A zeigt Peaks für  $\alpha$  - TCP und  $\beta$  - TCP im Rohpulver von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Durch die Sinterung kommt es zur Phasenumwandlung von  $\alpha$  - TCP zu  $\beta$  - TCP. Das Rohpulver besteht zu 59 % aus  $\alpha$  - TCP und 41 % aus  $\beta$  - TCP. Nach der Sinterung besteht der Prüfkörper noch zu 5 % aus  $\alpha$  - TCP und zu 95 % aus  $\beta$  - TCP. Durch die Nachbehandlung mit Säure wandelt sich  $\beta$  - TCP teilweise in Monetit (4 %) und Bruschit (5 %) um. Der Anteil an  $\beta$  - TCP liegt bei 84 %.

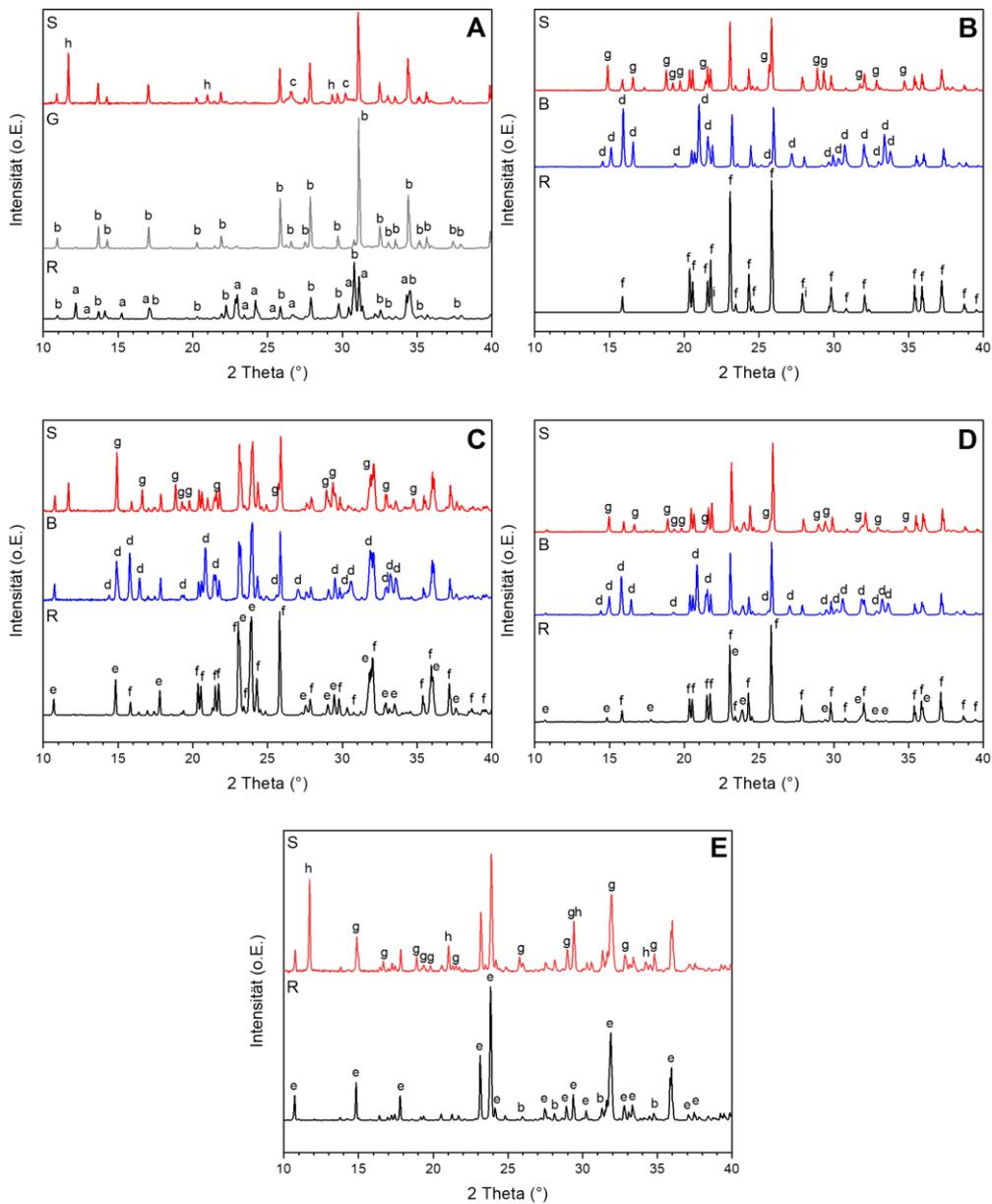
Im Gegensatz zu TCP führt die Sinterung bei den magnesiumhaltigen Zementphasen zu keiner Phasenumwandlung. Das Rohpulver von  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  (Abbildung 6 - Diagramm B) besteht aus 98 % Farringtonit und 2 % unreaktiven Magnesiumpyrophosphat. Bei Nachbehandlung mit Säure wird Farringtonit zu 45 % Newberyit umgesetzt, was dem höchsten Anteil an Newberyit der sauer nachbehandelten, magnesiumhaltigen Zementphasen entspricht. Die Nachbehandlung mit Base führt zu einer Umsetzung zu 19 % Struvit, was verglichen mit den anderen Zementphasen ebenfalls der höchste Anteil an Struvit ist.

Bei  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  (Abbildung 6 - Diagramm C) kommt es durch die Nachbehandlung mit Säure ebenfalls zur Bildung von Newberyit. So bestehen die mit Säure nachbehandelten Prüfkörper neben 42 % Stanfieldit und 27 % Farringtonit zu 26 % aus Newberyit. Durch die Nachbehandlung mit Base werden weniger Stanfieldit und Farringtonit umgewandelt und es entstehen 7 % Struvit.

Das Rohpulver  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  besteht zu 57 % aus Stanfieldit und zu 40 % aus Farringtonit.

Das Rohpulver von  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  (Abbildung 6 - Diagramm D) weist verglichen mit  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  einen höheren Gehalt an Farringtonit (80 %) und einen geringeren Anteil Stanfieldit (16 %) auf, allerdings wird bei der Nachbehandlung mit Säure nur ein geringerer Teil zu Newberyit (23 %) umgesetzt. Bei der Nachbehandlung mit Base entstehen 12 % Struvit.

Bei der Nachbehandlung von  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  (Abbildung 6 - Diagramm E) mit Säure entstehen neben 15 % Newberyit noch 9 % Bruschat. Im Rohpulver sind 88 % Stanfieldit und 10 %  $\beta$ -TCP enthalten.



**Abbildung 6:** XRD - Diagramme der Zementphasen.

A:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , B:  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ , C:  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ , D:  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  E:  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$ .  
 Beschriftungen der Peaks: a)  $\alpha$ -TCP, b)  $\beta$ -TCP, c) Monetit, d) Struvit e) Stanfieldit, f) Farringtonit, g) Newberyit, h) Bruschit, i) Magnesiumpyrophosphat. Die Großbuchstaben am jeweils linken Bildrand R: Rohpulver, G: gesintert, S: Säure, B: Base, bezeichnen den Zustand, bzw. die Nachbehandlung der Zementphase.

**Tabelle 9:** Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse mittels Rietveldanalyse 1.

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung der Phasenanteile in wt% in den Rohpulvern (R). Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>1,5</sub>: Ca<sub>1,5</sub>Mg<sub>1,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

		<b>Ca<sub>3</sub>R</b>	<b>Mg<sub>3</sub>R</b>	<b>Mg<sub>2,25</sub>R</b>	<b>Mg<sub>2,75</sub>R</b>	<b>Mg<sub>1,5</sub>R</b>
<b>Phasenanteil in wt%</b>	<b>α - TCP</b>	58,58 ±0,23	/	/	/	/
	<b>β - TCP</b>	41,42 ±0,23	/	/	/	3,19 ±0,04
	<b>Stanfieldit</b>	/	/	56,67 ±0,19	15,98 ±0,24	96,81 ±0,04
	<b>Farringtonit</b>	/	97,63 ±0,28	40,29 ±0,16	79,77 ±0,38	/
	<b>Periclas (MgO)</b>	/	/	3,04 ±0,06	4,25 0,15	/
	<b>Magnesiumpyrophosphat</b>	/	2,37 ±0,28	/	/	/

**Tabelle 10:** Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse mittels Rietveldanalyse 2.

Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung der Phasenanteile in wt% in den mit Säure (S) nachbehandelten Zementphasen. Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>1,5</sub>: Ca<sub>1,5</sub>Mg<sub>1,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

		<b>Ca<sub>3</sub>S</b>	<b>Mg<sub>3</sub>S</b>	<b>Mg<sub>2,25</sub>S</b>	<b>Mg<sub>2,75</sub>S</b>	<b>Mg<sub>1,5</sub>S</b>
<b>Phasenanteil in wt%</b>	<b>α - TCP</b>	6,51 ±0,84	/	/	/	1,60 ±0,86
	<b>β - TCP</b>	84,26 ±3,41	/	/	/	8,82 ±0,25
	<b>Monetit</b>	3,97 ±0,30	/	/	/	/
	<b>Stanfieldit</b>	/	/	42,18 ±0,40	12,09 ±0,29	65,64 ±2,21
	<b>Farringtonit</b>	/	55,44 ±0,89	26,64 ±0,48	65,36 ±1,10	/
	<b>Newberyite</b>	/	44,56 ±0,89	25,55 ±0,28	22,55 ±0,89	14,85 ±0,71
	<b>Bruschit</b>	5,26 ±4,22	/	4,56 ±0,16	/	9,09 ±1,00
	<b>Periclas (MgO)</b>	/	/	1,07 ±0,14	/	/

**Tabelle 11:** Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse mittels Rietveldanalyse 3.

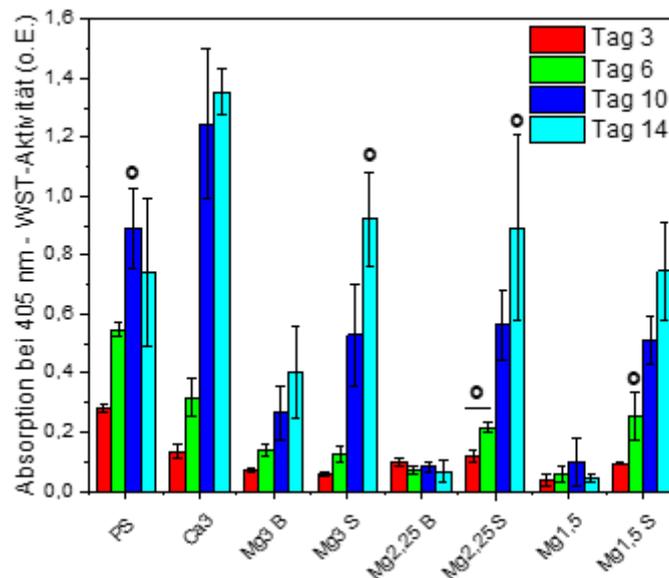
Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung der Phasenanteile in wt% in den mit Base (B) nachbehandelten Zementphasen sowie der Ca<sub>3</sub> gesintert (G). Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

		<b>Ca<sub>3</sub>G</b>	<b>Mg<sub>3</sub>B</b>	<b>Mg<sub>2,25</sub>B</b>	<b>Mg<sub>2,75</sub>B</b>
<b>Phasenanteil in wt%</b>	<b>α - TCP</b>	4,79 ±0,73	/	/	/
	<b>β - TCP</b>	95,21 ±0,73	/	/	/
	<b>Struvit</b>	/	19,13 ±0,05	7,11 ±0,11	12,01 ±0,21
	<b>Stanfieldit</b>	/	/	61,07 ±0,31	18,36 ±0,69
	<b>Farringtonit</b>	/	80,87 ±0,05	29,92 ±0,45	69,63 ±0,76
	<b>Periclas (MgO)</b>	/	/	1,90 ±0,12	/

## 3.2 Biologische Testung

### 3.2.1 Vorversuch

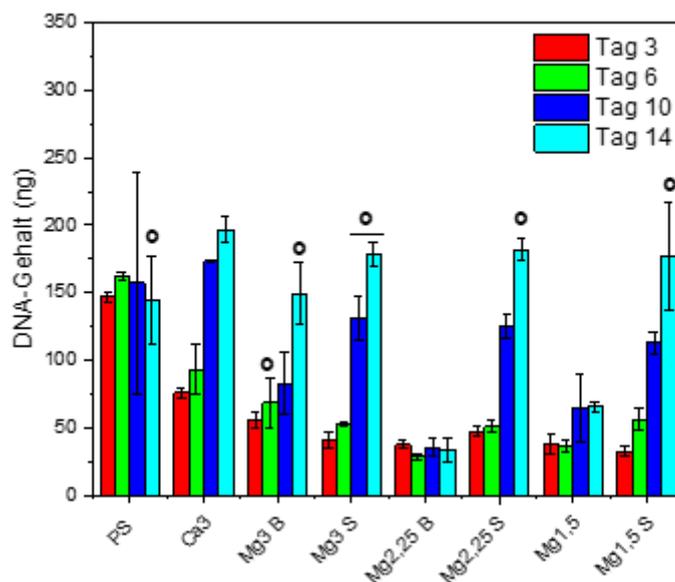
Der Vorversuch wurde wie in 2.2.6 beschrieben, als Proliferationsversuch durchgeführt. Ziel war es die geeignetsten Zusammensetzungen der zu testenden Calciummagnesiumphosphatzemente mit der allgemeinen Strukturformel  $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$  mit  $x = 0; 0,25; 0,75; 1,5; 3$  für die weiteren Untersuchungen zu bestimmen. An den jeweiligen Messtagen wurde, wie in den Kapiteln 2.2.7 und 2.2.8, beschrieben, die Zellaktivität und die DNA - Menge der Proben bestimmt und daraus die Zellaktivität pro DNA - Menge berechnet.



**Abbildung 7:** Gemittelte WST-Aktivität (o.E.) Proliferationsversuch.

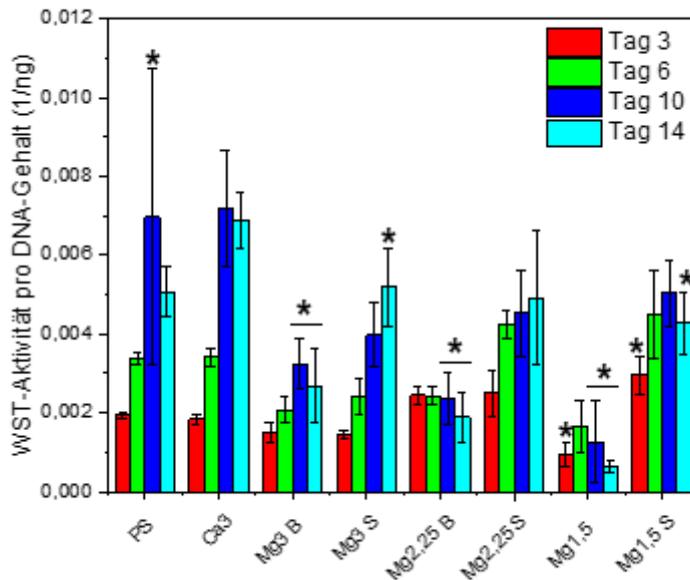
Die bei 405 nm gemessene Absorption entspricht der WST - Aktivität. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der Messergebnisse von drei Prüfkörpern je Zementphase bzw. je Well PS. Die Kultivierung erfolgte mit Proliferationsmedium bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Mit ° gekennzeichnete Zementphasen sind an den jeweiligen Messtagen bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nicht signifikant unterschiedlich zur Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Abkürzungen: PS: Polystyrol; Ca<sub>3</sub>:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Mg<sub>3</sub>:  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Mg<sub>2,25</sub>:  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ ; Mg<sub>1,5</sub>:  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$ . Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

Sowohl die in Abbildung 7 dargestellte WST - Aktivität als auch der in Abbildung 8 dargestellte DNA - Gehalt nehmen von Tag 3 bis Tag 14 zu, wobei  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S bei der WST - Aktivität Werte erzielen, die nicht signifikant schlechter sind als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  präsentieren sich beim DNA - Gehalt ebenfalls nicht signifikant schlechter als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S weisen die höchsten Zellzuwachsrate mit 18,15, 17,10 und 16,83 ng DNA/d auf, welche außerdem oberhalb derer von  $\text{Ca}_3$  mit 15,11 ng DNA/d liegen. Lediglich die Messwerte von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  stagnieren und sind signifikant schlechter als die Referenz.



**Abbildung 8:** Gemittelter DNA-Gehalt (ng) pro Prüfkörper Proliferationsversuch.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte des DNA - Gehalts von drei Prüfkörpern je Zementphase bzw. je Well PS. Die Kultivierung erfolgte mit Proliferationsmedium bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die mit ° gekennzeichneten Zementphasen sind an den jeweiligen Messtagen bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  nicht signifikant unterschiedlich zur Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Abkürzungen: PS: Polystyrol; Ca<sub>3</sub>:  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Mg<sub>3</sub>:  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ; Mg<sub>2,25</sub>:  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ ; Mg<sub>1,5</sub>:  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$ . Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.



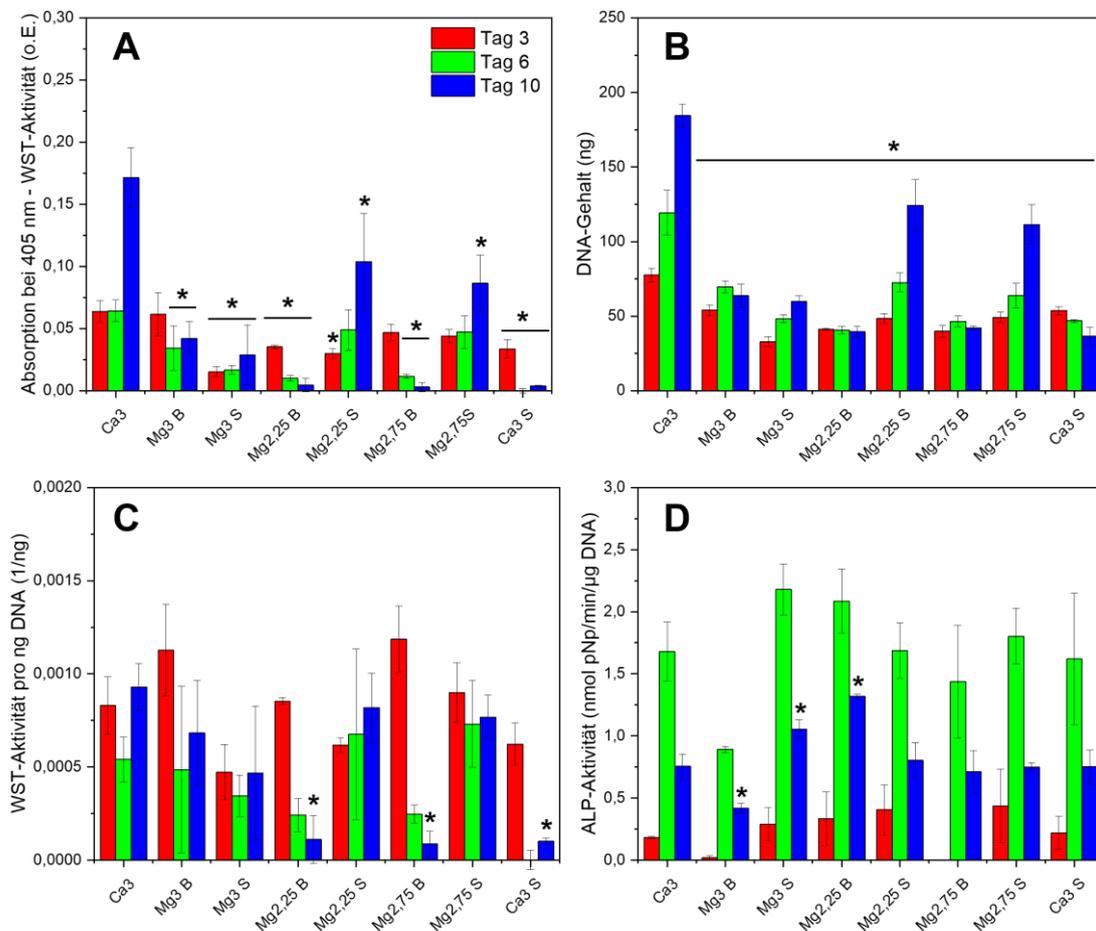
**Abbildung 9:** Gemittelte WST-Aktivität pro ng DNA (1/ng) im Proliferationsversuch.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der Messergebnisse von drei Prüfkörpern je Zementphase bzw. je Well PS. Die Kultivierung erfolgte mit Proliferationsmedium bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die mit \* gekennzeichneten Zementphasen sind an den jeweiligen Messtagen bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  signifikant unterschiedlich zur Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Abkürzungen: PS: Polystyrol; Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>1,5</sub>: Ca<sub>1,5</sub>Mg<sub>1,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

Die Auswertung der WST - Aktivität pro ng DNA zeigt für alle Zementphasen mit Ausnahme von Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> B einen Anstieg von Tag 1 bis Tag 14, Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S und Ca<sub>1,5</sub>Mg<sub>1,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S erzielen an Tag 3 und 6 Aktivitätswerte, welche durchschnittlich 30,06 % bzw. 46,41 % über Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> liegen. Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S, Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S und Ca<sub>1,5</sub>Mg<sub>1,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S präsentieren sich vielversprechend, da diese Phasen bei der WST - Aktivität pro ng DNA durchschnittlich Werte von 70,10 % bzw. 98,62 % von Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> erreichen und im Falle von Ca<sub>1,5</sub>Mg<sub>1,5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S, die Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> um 6,18 % übertreffen.

### 3.2.2 Proliferationsversuch

Der Proliferationsversuch wurde wie in 2.2.6 beschrieben durchgeführt. Die Messwerte der Zellwachstumskontrolle PS werden in den Ergebnissen nicht dargestellt, da ab dem fünften Tag eine sichtbare Ablösung des Zellfilms aufgrund von Zellkontakthemmung [66] beobachtet werden konnte und die Messwerte aufgrund hoher Standardabweichungen nicht mehr aussagekräftig sind.



**Abbildung 10:** Ergebnisse Proliferationsversuch im Hauptversuch.

Diagramm A zeigt die WST - Aktivität (o.E.), B den DNA - Gehalt (ng), C die WST - Aktivität pro ng DNA (1/ng) und D die ALP - Aktivität (nmol pNp/min/µg DNA). Angeben sind jeweils die Mittelwerte der Messergebnisse von drei Prüfkörpern je Zementphase. Die Kultivierung erfolgte mit Proliferationsmedium bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die mit \* gekennzeichneten Zementphasen sind an den jeweiligen Messtagen bei einem Signifikanzniveau von p≤0,05 signifikant unterschiedlich zur Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

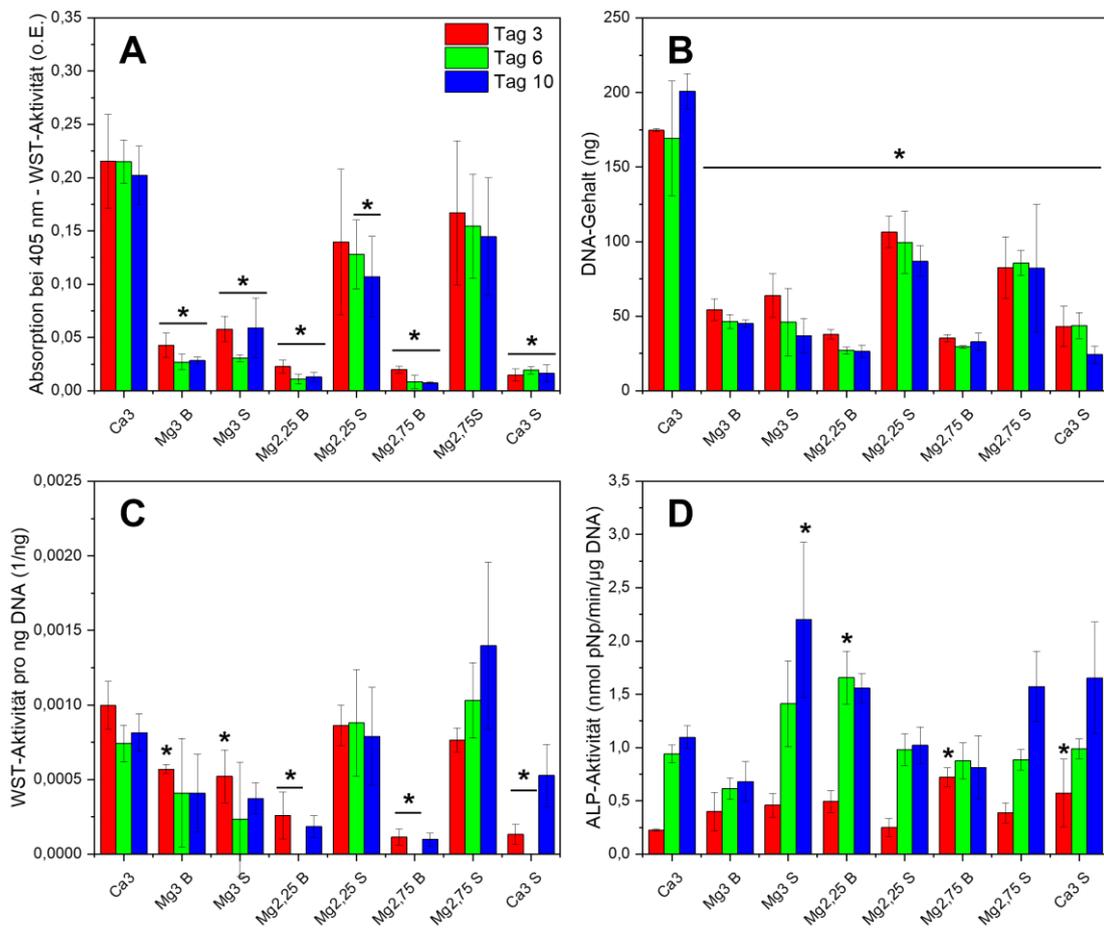
Die WST - Aktivität, dargestellt in Abbildung 10 - Diagramm A , nimmt bei  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S von Tag 3 zu Tag 10 zu, wobei die Werte signifikant schlechter als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bleiben.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erreichen an Tag 10 60,63% bzw. 50,46% der WST - Aktivität von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , unterscheiden sich aber nicht signifikant voneinander. Bei den basisch nachbehandelten Phasen  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B ist die WST - Aktivität an Tag 3 vergleichbar mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , nimmt allerdings bei beiden Phasen bis Tag 10 ab und liegt bei  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B dann noch bei 0,30. Der DNA - Gehalt, dargestellt in Abbildung 10 - Diagramm B, nimmt bei  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S von Tag 3 bis Tag 10 zu, bei den basisch nachbehandelten Phasen und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S bleibt dieser nahezu konstant bzw. stagniert leicht.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S weisen mit durchschnittlich 9,49 bzw. 7,78 ng DNA/d die größte Zellzuwachsrate auf und erreichen 67,40 % bzw. 60,44 % des DNA - Gehalts von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , beide Zementphasen unterscheiden sich nicht signifikant. Die WST - Aktivität pro ng DNA, dargestellt in Abbildung 10 - Diagramm C, ist bei den basisch nachbehandelten Phasen und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S an Tag 3 am größten und nimmt bis Tag 10 ab. Im Durchschnitt der drei Messtage beträgt die WST - Aktivität pro ng DNA von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S 91,82 % von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S überschreitet im Durchschnitt der drei Messtage die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  um 4,30 %. Somit sind beide Phasen,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S, in Bezug auf die WST - Aktivität pro ng DNA nicht signifikant schlechter als die Referenz.

Bei Betrachtung der ALP - Aktivität, Abbildung 10 - Diagramm D, fällt auf, dass die ALP-Aktivitäten von Tag 3 zu Tag 6 bei allen Zementphasen stark ansteigen und bis Tag 10 wieder abnehmen,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S erreicht einen Maximalwert von 2,18 nmol pNp/min/ $\mu\text{g}$  DNA und überschreitet die Referenz um 29,76 % an Tag 6, um 39,74 % an Tag 10 und ist somit signifikant besser als die Referenz.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erreichen im Durchschnitt über die drei Messtage Werte, welche die Referenz um 10,65 % bzw. 14,19 % überschreiten, wenngleich nicht signifikant.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B überschreitet die Referenz an Tag 10 um 74,97 % und ist signifikant besser als die Referenz

sowie  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S. Bei  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B kann an Tag 3 nur eine geringe bzw. keine ALP - Aktivität nachgewiesen werden, es kommt aber bei beiden Phasen zu einem deutlich Anstieg bis Tag 6.

### **3.2.3 Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze**

Der Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze (o. Dz.) wurde parallel zum Proliferationsversuch mit hFOB - Osteoblasten aus der gleichen Passage durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst auf den Prüfkörpern bei 34 °C und 5 % CO<sub>2</sub> vorkultiviert und ab dem siebten Tag, wie in 2.2.6 beschrieben, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> weiterkultiviert. Die Erhöhung der Temperatur stellte den Beginn des Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze dar.



**Abbildung 11:** Ergebnisse Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze.

Diagramm A zeigt die WST - Aktivität (o.E.), B den DNA - Gehalt (ng), C die WST - Aktivität pro ng DNA (1/ng) und D die ALP - Aktivität (nmol pNp/min/µg DNA). Angeben sind jeweils die Mittelwerte der Messergebnisse von drei Prüfkörpern je Zementphase. Die Kultivierung erfolgte mit Proliferationsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die mit \* gekennzeichneten Zementphasen sind an den jeweiligen Messtagen bei einem Signifikanzniveau von p≤0,05 signifikant unterschiedlich zur Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

Die WST - Aktivität, dargestellt in Abbildung 11 - Diagramm A, liegt für die Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> mit Werten von 17,41 % bzw. 12,87 % an Tag 3 und 6, über denen von Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> aus dem Proliferationsversuch, mit 6,38 % bzw. 6,42 %. An Tag 10 sind die Werte wieder annähernd gleich mit 0,17 im Proliferationsversuch und 0,16 im Differenzierungsversuch (o.Dz.). Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S verhält sich mit einem Wert von 0,09 an Tag 3 und 6 im Differenzierungsversuch (o. Dz.) verglichen mit Werten von 0,02 und 0,04 im Proliferationsversuch ähnlich, ab Tag

10 nimmt die WST - Aktivität allerdings wieder ab, während im Proliferationsversuch ein weiterer Anstieg zu beobachten ist.

An Tag 3 bleiben alle Zementphasen signifikant schlechter als die Referenz, lediglich  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erreichen an Tag 6 71,82 % bzw. 67,53 % und an Tag 10 43,42 % bzw. 80,29 % der Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , wobei sich beide Phasen nicht signifikant voneinander unterscheiden.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S erzielen insgesamt nur sehr geringe Werte von unter 0,01.

An Tag 6 ist bei allen drei Zementphasen keine Aktivität nachweisbar, bis Tag 10 kommt es aber zu einem leichten Anstieg. Beim DNA - Gehalt, dargestellt in Abbildung 11 - Diagramm B, erreicht die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  im Durchschnitt der drei Messtage mit 181,62 ng DNA höhere Werte als im Proliferationsversuch mit durchschnittlich 127,06 ng DNA. Die Zellzuwachsrate für  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  liegt bei 3,27 ng DNA/d, bei allen anderen Zementphasen stagnieren die Werte, bzw. nehmen leicht ab.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erreichen im Durchschnitt 53,74 % bzw. 45,95 % von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Die WST - Aktivität pro ng DNA fällt vor allem bei den basisch nachbehandelten Phasen geringer aus, als im Proliferationsversuch, so erreichen  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B dort Werte von 0,0011, 0,0009 und 0,0012 (1/ng) an Tag 3 während diese Zementphasen im Differenzierungsversuch (o. Dz.) nur geringere Werte von 0,0006, 0,0003 und 0,0001 (1/ng) erzielen. Analog zur vorherigen Beschreibung bei der WST - Aktivität kann bei  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S an Tag 6 keine Aktivität gemessen werden, es kommt aber zur Erholung bis Tag 10.

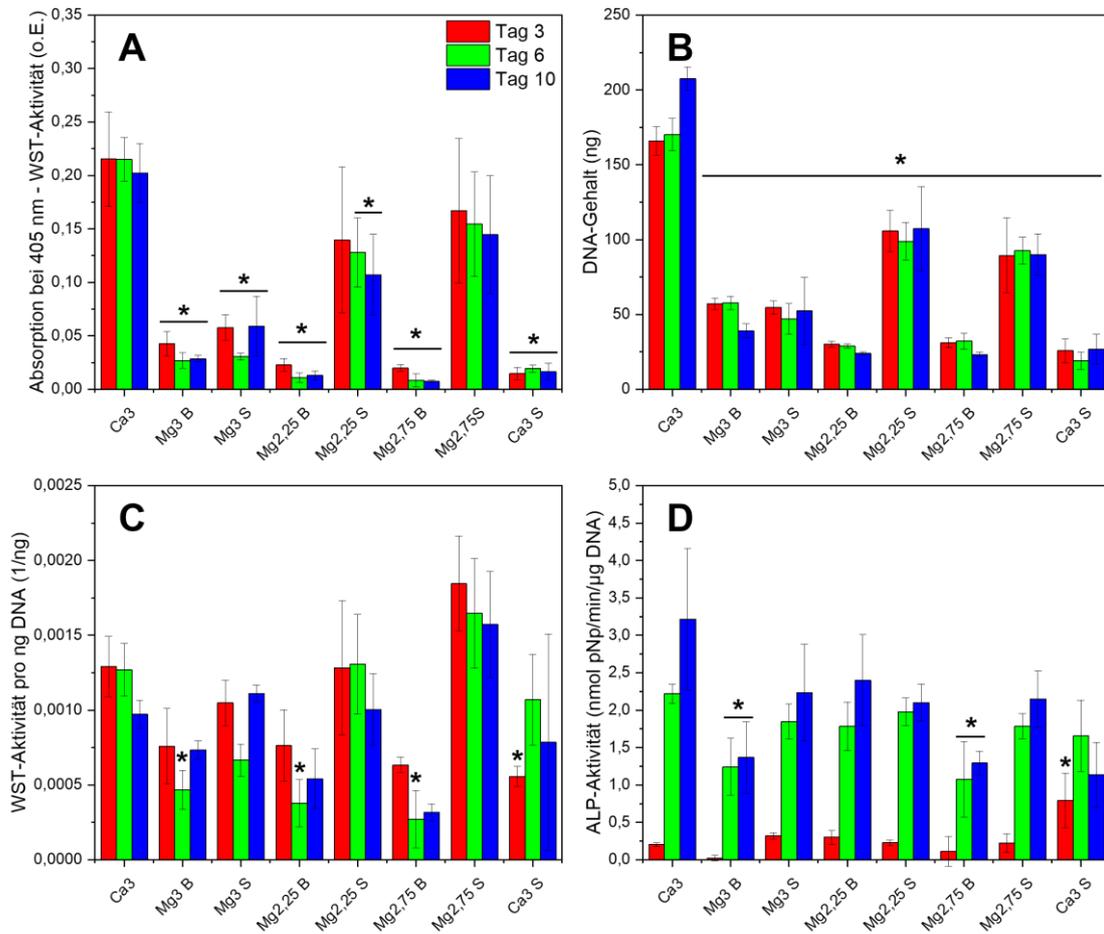
Die besten WST - Aktivitätswerte pro ng DNA (Abbildung 11 - Diagramm C) erreichen  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S mit durchschnittlich 0,0008 und 0,0014 (1/ng), welche die Referenz um 3,18 % bzw. 71,47 % überschreiten. Bei  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S stagnieren die Werte von Tag 3 bis 10, während es bei  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S zu einem Aktivitätszuwachs von 0,006 pro ng DNA im selben Zeitraum kommt.

Die höchsten Werte bei der ALP - Aktivität, dargestellt in Abbildung 11 - Diagramm D, werden im Vergleich zum Proliferationsversuch (Tag 6), an Tag 10 erreicht.

Es kommt bei allen Zementphasen zu einem Anstieg von Tag 3 - 10, wobei  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S den höchsten ALP - Aktivitätszuwachs aufweist und mit 2,2010 nmol pNp/min/ $\mu\text{g}$  DNA signifikant oberhalb der Referenz liegt.  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S liegen im Durchschnitt 79,75 %, 63,75 %, 25,65 % und 42,04 % oberhalb von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erreicht 99,39 % der Referenz und ist somit nicht signifikant schlechter als diese.

### **3.2.4 Differenzierungsversuch mit Differenzierungszusätzen**

Der Differenzierungsversuch mit Differenzierungszusätzen (m.Dz.) wurde parallel zum Differenzierungsversuch (o.Dz.) und zum Proliferationsversuch mit hFOB - Zellen aus der gleichen Passage durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst auf den Prüfkörpern bei 34 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  vorkultiviert und ab dem siebten Tag, wie in 2.2.6 beschrieben, bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$  mit Differenzierungsmedium weiterkultiviert. Dies stellte den Beginn des Differenzierungsversuchs mit Differenzierungszusätzen dar.



**Abbildung 12:** Ergebnisse Differenzierungsversuch mit Differenzierungszusätzen.

Diagramm A zeigt die WST - Aktivität (o.E.), B den DNA - Gehalt (ng), C die WST - Aktivität pro ng DNA (1/ng) und D die ALP - Aktivität (nmol pNp/min/μg DNA). Angeben sind jeweils die Mittelwerte der Messergebnisse von drei Prüfkörpern je Zementphase. Die Kultivierung erfolgte mit Differenzierungsmedium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Die mit \* gekennzeichneten Zementphasen sind an den jeweiligen Messtagen bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  signifikant unterschiedlich zur Referenz Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

Im Vergleich zum Differenzierungsversuch (o. Dz.) ist die WST - Aktivität, dargestellt in Abbildung 12 - Diagramm A, im Differenzierungsversuch (m. Dz.) etwas höher. Diese stagniert bei allen Zementphasen bis auf Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S und Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S. Die höchsten Aktivitätswerte im Durchschnitt der drei Messtage erreichen Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>2,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S und Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> S mit 0,12 bzw. 0,15, das entspricht jeweils 59,22 % bzw. 73,65 % der Referenz. Im Unterschied zum Differenzierungsversuch (o. Dz.)

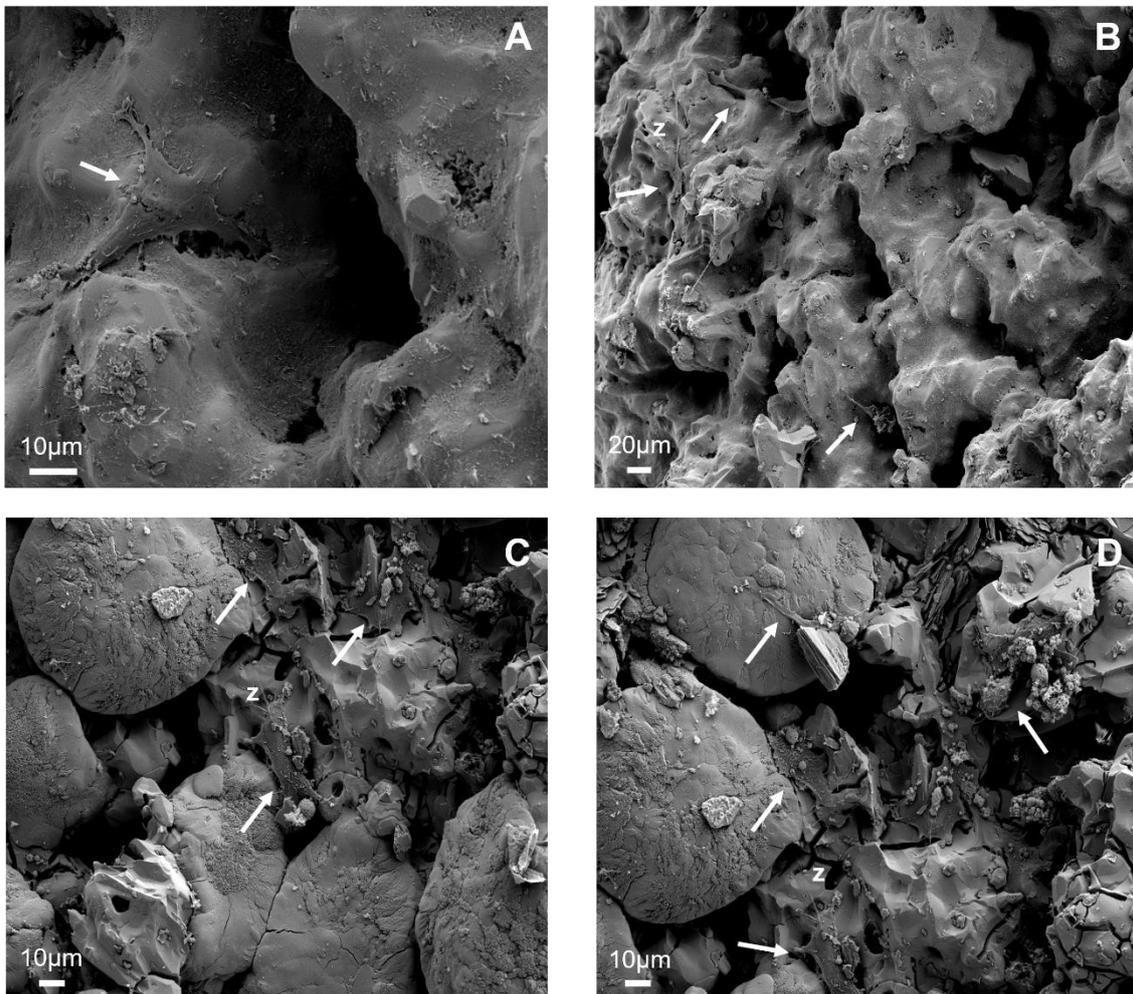
kann bei  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S an Tag 6 eine Aktivität gemessen werden. Der DNA - Gehalt, dargestellt in Abbildung 12 - Diagramm B, bleibt bei allen Zementphasen, vergleichbar mit dem Differenzierungsversuch (o. Dz.), signifikant unter der Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Zudem stagnieren die Werte. Nur bei  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  gibt es eine Zuwachsrate von durchschnittlich 5,20 ng DNA/d.  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erzielen im Durchschnitt Werte von 103,94ng und 90,66ng DNA was 57,36 % bzw. 50,03 % von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  entspricht.

Analog zur obigen Beschreibung der WST - Aktivität verhält sich die WST - Aktivität pro ng DNA, dargestellt in Abbildung 12 - Diagramm C, sehr ähnlich wie im Differenzierungsversuch (o. Dz.). Die höchsten WST - Aktivitätswerte pro ng DNA erreichen,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S mit 0,0012 und 0,0017 (1/ng) und übertreffen damit die Referenz um 1,71 % bzw. 43,31 % wenngleich nicht signifikant. Verglichen mit dem Differenzierungsversuch (o. Dz.) zeigen  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S insgesamt und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S an Tag 6 und 10 eine WST - Aktivität pro ng DNA, die nicht signifikant schlechter als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ist.

Bei der ALP - Aktivität, dargestellt in Abbildung 12 - Diagramm D, können bei allen Zementphasen an Tag 3 nur geringe Aktivitätswerte, welche unter denen des Differenzierungsversuchs (o. Dz.) liegen, gemessen werden. Es kommt bei allen Zementphasen zu einer starken Aktivitätszunahme bis Tag 6 und einem weiteren Zuwachs bis Tag 10, ausgenommen  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S.  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S erreichen an Tag 6 und 10 Werte, die nicht signifikant schlechter als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sind.

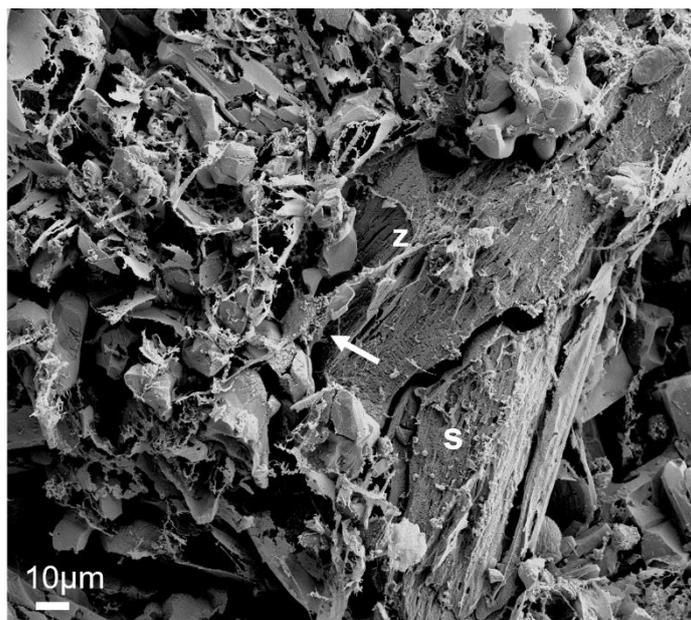
### 3.2.5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Durch die Sinterung der Prüfkörper aus  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  entsteht eine recht homogene und abgerundete Oberfläche, wie in Abbildung 13 - Aufnahme A und Aufnahme B zu erkennen ist. Auf diesen Bildern sind auch adhärenente, spindelförmige hFOB - Zellen sichtbar. In Abbildung 13 - Aufnahme C und Aufnahme D ist unterhalb, der mit Pfeilen markierten hFOB - Zellen, ebenfalls ein Teil homogene Oberfläche zu erkennen, während ringsum knollenförmige Kristalle mit moosartigen Auflagerungen angeordnet sind. Die hFOB - Zellen sind ebenfalls langgestreckt, spindelförmig und weisen deutlich ausgeprägte Zytoplasmaausläufer auf, welche diese mit weiteren hFOB - Zellen verbinden.



**Abbildung 13:** REM - Aufnahmen von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (A), (B) und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S (C) und (D).

Aufnahmen bei 5 kV und 1000- (A), 500- (C) und (D) bzw. 250facher (B) Vergrößerung. Pfeile markieren hFOB - Zellen, z markiert Zytoplasmaausläufer. Der Zusatz S bedeutet Nachbehandlung mit Säure.

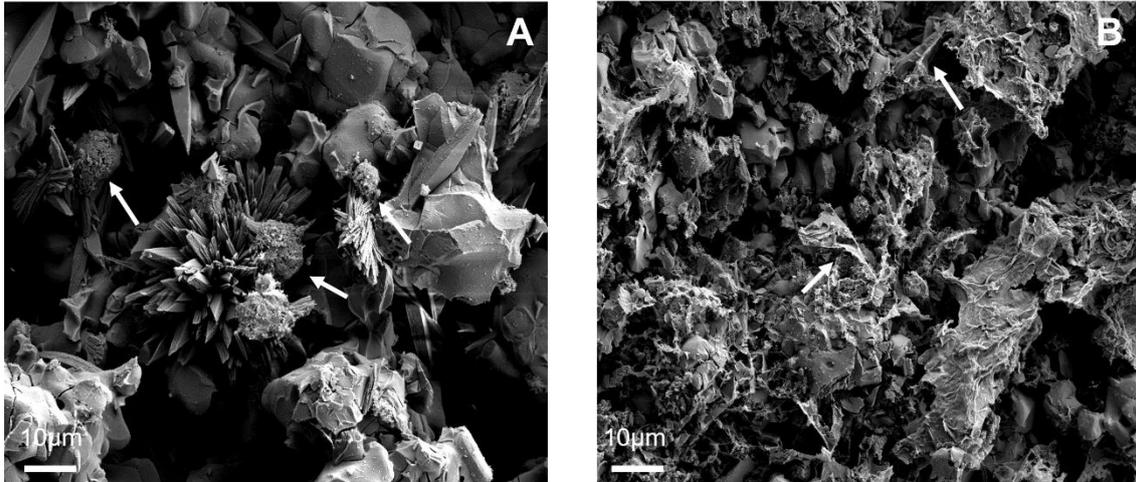


**Abbildung 14:** REM - Aufnahme von  $Mg_3(PO_4)_2$  B.

Aufnahme bei 5 kV und 500facher Vergrößerung. Der Pfeil markiert hFOB - Zellen, z markiert Zytoplasmaausläufer, s zeigt Struvit. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base.

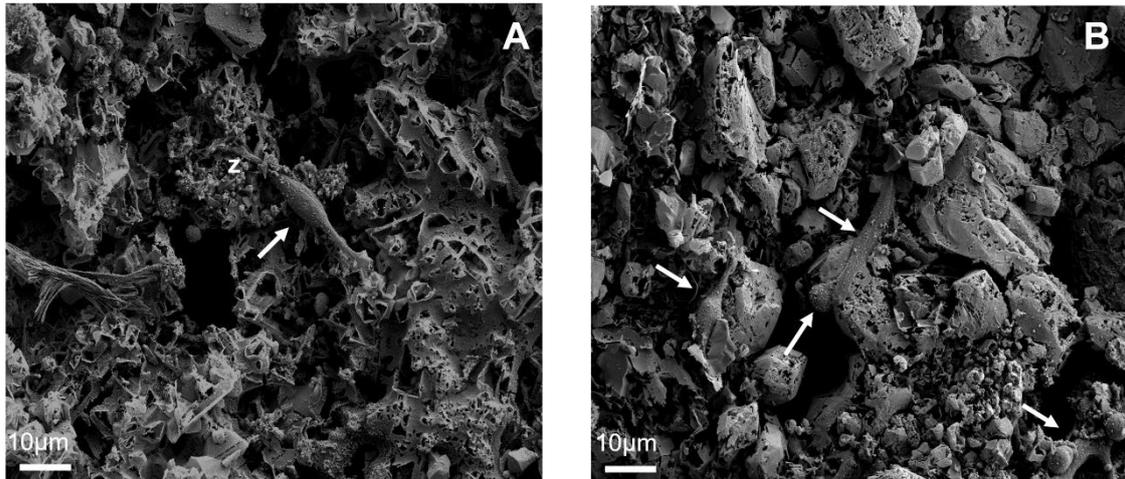
Die Nachbehandlung von  $Mg_3(PO_4)_2$  mit Base, Abbildung 14, erzeugt eine deutliche zerklüftete Oberfläche als in Abbildung 13 - Aufnahme A und Aufnahme B. Die mit (s) markierte dichtere und rissige Struktur kann Struvit zugeordnet werden [51]. Auch auf diesem Bild ist eine spindelförmige hFOB - Zelle mit langen Zytoplasmaausläufern zu erkennen.

Bei  $Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO_4)_2$  B, Abbildung 15 - Aufnahme A, sind im Hintergrund ebenfalls recht homogene, durch die Sinterung verschmolzene, Kristalle zu erkennen. Auf diesen aufgelagert befinden sich stäbchenförmige Kristalle, die teils distelblütenartig angeordnet sind. Auf der REM - Aufnahme von  $Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO_4)_2$  B, Abbildung 15 - Aufnahme A, befindet sich eine, nur teilweise adhärente und mehrere abgekugelte hFOB - Zellen mit einer rauen Oberfläche. In Abbildung 15 - Aufnahme B, bei  $Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO_4)_2$  S präsentiert sich eine raue Oberfläche aus verschiedenen großen Kristallen. Auf dieser Oberfläche sind mehrere teilweise noch adhärente hFOB - Zellen erkennbar, welche vermutlich durch die REM - Präparation beschädigt worden sind.



**Abbildung 15:** REM - Aufnahmen von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2 \text{ B}$  (A) und  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2 \text{ S}$  (B).  
 Aufnahmen bei 5 kV und 500facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren hFOB - Zellen. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

Bei  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2 \text{ B}$ , dargestellt in Abbildung 16 - Aufnahme A, zeigt sich eine unregelmäßige und zerklüftete Oberfläche. Am rechten Bildrand ist die Oberfläche an sich glatter, aber mit vielen kantigen Poren durchsetzt. Diese Struktur ist vermutlich durch initiale Auflösung der obersten Kristallschicht entstanden. Um die adhärenzte hFOB - Zelle zentral im Bild befinden sich einige kugelförmige Auflagerungen auf der zuvor beschriebenen Oberfläche. Die hFOB - Zelle ist spindelförmig, langgestreckt und hat deutlich ausgeprägte Zytoplasmafortsätze. Die Oberfläche des Prüfkörpers aus  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2 \text{ S}$  Abbildung 16 - Aufnahme B besteht aus verschiedenförmigen Kristallen, welche Poren aufweisen. Diese sind vermutlich auch durch beginnende Auflösung entstanden. Am linken unteren Bildrand sind außerdem plättchenartige Auflagerungen erkennbar. Es sind mehrere adhärenzte hFOB - Zellen erkennbar, diese sind ebenfalls spindelförmig und langgestreckt. Links neben der Zelle zentral im Bild befindet sich eine weitere eher kugelige hFOB - Zellen mit einem kleinen Ausläufer, welche sich vermutlich erst angeheftet hat.



**Abbildung 16:** REM - Aufnahmen von  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B (A) und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S (B).

Aufnahmen bei 5 kV und 500facher Vergrößerung. Pfeile markieren hFOB - Zellen, z markiert Zytoplasmaausläufer. Der Zusatz B bedeutet Nachbehandlung mit Base, S Nachbehandlung mit Säure.

## 4. Diskussion

### 4.1 Bio- und Zytokompatibilität

Im Versuch und im Proliferationsversuch des Hauptversuchs wurde die Bio- und Zytokompatibilität der zu testenden Calciummagnesiumphosphatezemente mit der allgemeinen Strukturformel  $(Ca_xMg_{(3-x)}(PO_4)_2)$  mit  $x=0; 0,25; 0,75; 1,5; 3$  untersucht. Hierfür wurden als Kennzeichen der Proliferation die WST - Aktivität und der der DNA - Gehalt, wie in 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben, bestimmt und daraus die WST - Aktivität pro DNA - Menge berechnet. Da aufgrund von Lieferschwierigkeiten bei den Rohpulvern zunächst keine Prüfkörper der Phasen  $Ca_3(PO_4)_2$  S,  $Ca_{0,25}Mg_{2,75}(PO_4)_2$  B und  $Ca_{0,25}Mg_{2,75}(PO_4)_2$  S hergestellt werden konnten, wurden diese erst anschließend im Proliferationsversuch des Hauptversuchs auf ihre Biokompatibilität hin untersucht. Gesintertes  $Ca_3(PO_4)_2$  als etabliertes Knochenersatzmaterial [18] diente als Referenz.

Grundsätzlich sind alle getesteten Zementphasen als biokompatibel anzusehen, da bei allen Zementphasen, mit Ausnahme von  $Ca_3(PO_4)_2$  S, an den jeweiligen Messtagen WST - Aktivität messbar ist und somit vitale Zellen auf den Prüfkörpern vorhanden sind [67]. Im Falle von  $Ca_3(PO_4)_2$  S ist in dieser Versuchsreihe von eingeschränkter Biokompatibilität auszugehen, da bei stagnierendem DNA - Gehalt im weiteren Versuchsverlauf nur noch abnehmende und sehr geringe WST - Aktivität nachweisbar ist. Ursache könnte das stark saure Verhalten  $Ca_3(PO_4)_2$  S sein, so konnte im Versuchsverlauf eine gelbliche Verfärbungen des Zellkulturmediums beobachtet werden, welche auf den Farbumschlag des Phenolrotindikators im Zellkulturmedium beim Umschlagen des pH - Werts in den sauren Bereich zurückzuführen ist [73]. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre eine rasche Degradation des Prüfkörpers, was mit einer Freisetzung von Phosphat und dementsprechend hohen Konzentrationen an  $(PO_4)^{3-}$  im Zellkulturmedium einhergeht. Erhöhte Phosphat Konzentrationen wiederum können die Apoptose von Osteoblasten auslösen [74].

Die basisch nachbehandelten und somit struvithaltigen Phasen  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B zeigen sich ebenfalls weniger biokompatibel, als die Referenz und die sauer nachbehandelten Phasen, da diese eine abnehmende WST - Aktivität bei stagnierendem DNA - Gehalt verzeichnen. Dieser Trend setzt sich auch im Differenzierungsversuch m. Dz. und o. Dz. fort, in welchen die Zellen aufgrund der Vorkultivierung länger kultiviert wurden.

Eine Erklärung hierfür könnten basische pH - Werte im Zellkulturmedium der Prüfkörper sein, da stark violette Verfärbungen des Phenolrotindikators im Medium festgestellt werden konnten, was für eine Verschiebung des pH - Werts in den basischen Bereich spricht [73]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen einer Studie von Cao et. al [48] in welcher die Autoren eine leichte Zytotoxizität für Struvit, in vitro bei direktem Kontakt mit Zellen aufgrund von stark basischen pH - Werten um 10,7 nach sieben Tagen im Zellkulturmedium über struvithaltigen Zementprüfkörpern, festgestellt haben.

Die basisch nachbehandelten Phasen weisen einen recht ähnlichen Struvitgehalt im Bereich von 7 - 12 % auf. Da sich struvithaltige Zemente in Studien von Klammert et al. [51] und Grossardt et al. [52] als biokompatibel erwiesen haben bleiben an dieser Stelle die Ergebnisse der in vivo Untersuchungen von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B abzuwarten, da die pH - Werte im durchbluteten Implantationsgebiet mit physiologischen Puffersystemen in vivo eventuell weniger stark zum tragen kommen [75].

Die sauer nachbehandelten Phasen  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S weisen die positivsten proliferativen Eigenschaften in allen Versuchsteilen auf, so zeigen diese ähnlich wie die Referenz fast eine Verdopplung des DNA - Gehalts im Versuchsverlauf des Proliferationsversuchs und sind dementsprechend bei der WST - Aktivität pro DNA Menge nicht signifikant schlechter als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Die beiden Phasen unterscheiden sich untereinander nicht signifikant. Dies kann vermutlich durch den Gehalt von Newberyit beider Phasen erklärt werden. Dieser beträgt für  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S

26 bzw. 23% und unterscheidet sich nur gering. Sowohl Cao et al. [48] als auch Klammert et al. [76] konnten in ihren Studien ebenfalls eine gute Bio- und Zytokompatibilität von newberyithaltigen CMPCs belegen.

Dass  $Mg_3(PO_4)_2$  S mit dem höchsten Gehalt an Newberyit weniger hohe Werte bei der WST - Aktivität und dem DNA - Gehalt erzielt, bei der WST - Aktivität pro DNA - Menge aber keinen signifikanten Unterschied zu  $Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO_4)_2$  S aufweist ist vermutlich auf die Oberflächenbeschaffenheit der  $Mg_3(PO_4)_2$  S Prüfkörper zurückzuführen. Verschiedene, an Metallen durchgeführte Studien zeigen, dass Osteoblasten weniger raue Oberfläche bevorzugen [77, 78]. Die Oberfläche der  $Mg_3(PO_4)_2$  S Prüfkörper präsentiert sich auf den REM - Aufnahmen als sehr aufgerauht und zerklüftet und ist makroskopisch weniger stabil als bei den anderen Prüfkörpern. Es lösten sich beim Wechsel des Zellkulturmediums sichtbar Partikel ab, sodass auch oberflächlich adhärenente Zellen beim Austausch des verbrauchten Zellkulturmediums mit abgesaugt wurden, was die DNA - Menge immer wieder reduziert haben könnte. Zudem stören trübende Partikel die Absorptions- und Fluoreszenzmessungen beim WST - Test und dem Picogreen - Assay [79]. Außerdem führt die weitere Erhöhung des Newberyitgehalts ( $Mg_3(PO_4)_2$  S, 45%) auch zur Abnahme der Festigkeit und schnelleren Auflösung der Prüfkörper, wie zuvor beschrieben. Dies belegt das Löslichkeitsprodukt von Newberyit, welches mit  $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol}^3/\text{l}^3$  höher ist als das Löslichkeitsprodukt von Farringtonit mit  $6,3 \times 10^{-26} \text{ mol}^5/\text{l}^5$ . Newberyit ist somit leichter löslich als Farringtonit [80]. Die schnellere Auflösung der Prüfkörper führt zu einer erhöhten Freisetzung von  $Mg^{2+}$  und  $(PO_4)^{3-}$  Ionen.  $Mg^{2+}$  Ionen dienen zwar als Kristallisationskeim bei der initialen Bildung von Knochenmatrix und spielen eine wichtige Rolle bei intrazellulären Signalwegen während der osteogenen Differenzierung [53-55], aber das Konzentrationsfenster in dem  $Mg^{2+}$  - Ionen positiv auf Osteoblasten einwirkt scheint nach derzeitigem Wissensstand eingeschränkt zu sein. Leidi et al. [81] konnten in einer Studie an humanen Osteoblasten zeigen, dass die Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 5 mmol/l die Differenzierung, gemessen an der ALP - Aktivität, der Osteoblasten hemmt. Die physiologische Magnesiumkonzentration liegt bei etwa 1 mmol/l [81].

Ebenso können hohe  $(\text{PO}_4)^{3-}$  Ionenkonzentration zur Apoptose von Osteoblasten führen. Dies belegten Meleti et. al [74] in einer Studie mit humanen Osteoblasten. Die Phosphatkonzentration im zytokompatiblen Zellkulturmedium betrug 1,00 mmol/l, eine Erhöhung der Phosphatkonzentration auf 5,00 mmol/l führte zu einer Abnahme der Anzahl vitaler Zellen um 25 % innerhalb 48 h. Bei einer Phosphatkonzentrationen von 7,00 mmol/l sank die Anzahl vitaler Zellen um 60 % [74]. Desweiteren führt die Freisetzung von  $\text{Mg}^{2+}$  - Ionen auch zur Freisetzung von Hydroxidionen, was zu einer Verschiebung des pH - Werts in den basischen Bereich führt. Ein Abweichen des pH - Werts in den negativen Bereich hat, wie zuvor beschrieben, einem negativen Einfluss auf das Zellwachstum bis hin zur Apoptose [82].

Die Zementphase  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  kann nur schlecht beurteilt werden, da die Prüfkörper bereits im Versuchszeitraum zerfallen sind. Die Messwerte sind deshalb aufgrund der auch für  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S zuvor beschriebenen Gründe nur wenig aussagekräftig. Über den Vorversuch hinausgehende Untersuchungen mit  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  wurden nicht durchgeführt, da es aufgrund der geringen Druckfestigkeit von unter 3 MPa [63] nicht als formstabiles Knochenersatzmaterial in Frage kommt.  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  S weist, wie Brückner gezeigt hat, ebenso nur Druckfestigkeiten von unter 3 MPa auf [63], weswegen es ebenfalls nicht als formstabiles Knochenersatzmaterial aus additiver Fertigung in Frage kommt. Aufgrund der positiven Ergebnisse zur Biokompatibilität in diesem Versuch, wäre aber eine Verwendung von  $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$  S beispielsweise als Granulat zum Auffüllen von Knochendefekten in nicht lasttragenden Bereichen denkbar und sollte in einer weiteren Studie näher untersucht werden.

Neben der Zellaktivität ist auch die Adhäsion der hFOB - Zellen auf den Oberflächen der Prüfkörper von Bedeutung für die Verwendung als Implantatmaterial [83] und die Beurteilung der Zytokompatibilität. Die REM - Aufnahmen zeigen auf  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S intakte spindelförmige und

adhärente hFOB - Zellen, die teilweise über lange Zytoplasmaausläufer mit den Zementoberflächen verbunden sind.

Auf dem Prüfkörper von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S befinden sich abgelöste und teilweise beschädigte hFOB - Zellen. Da allerdings auch für diese Zementphase eine WST - Aktivität gemessen werden konnte und somit vitale Zellen vorhanden waren, sind die Beschädigungen der Zellen vermutlich auf die Präparation für die REM - Aufnahmen zurückzuführen. Die Beschädigung der Zellen auf  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B ist vermutlich ebenfalls hierauf zurückzuführen. Zudem spricht die geringe Adhärenz ebenfalls, wie zuvor beschrieben, für eine verminderte Biokompatibilität aufgrund der basischen Umgebungsbedingungen.

## 4.2 Osteogenes Potential

Neben der Bio- und Zytokompatibilität spielt auch die Osteoinduktion, also die Eigenschaft des KEM Zellen die Bildung neuen Knochens zu ermöglichen eine Rolle zur Beurteilung des osteogenen Potentials in vitro. Voraussetzung hierfür ist die Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen zu Osteoblasten [19, 20]. Bei den verwendeten hFOB - Zellen handelt es sich um eine Zelllinie humaner osteogener Progenitorzellen, welche die Fähigkeit zur Differenzierung zu reifen Osteoblasten besitzen und damit extrazelluläre Matrix für die initiale Knochenbildung sezernieren können [59, 66]. Als Marker für die osteogene Differenzierung diente in dieser Studie die ALP [84], welche auch von hFOB - Zellen exprimiert wird.

Voraussetzung für die Differenzierung der hFOB - Zellen ist die Inaktivierung der temperaturabhängigen Mutante des T Antigens, welches eigentlich der Immortalisierung der Zelllinie dient. Dies wird durch Anhebung der Temperatur auf 37 °C erreicht [59, 85] und wurde im Differenzierungsversuch o. Dz. so durchgeführt. Außerdem ist eine Anregung zur Differenzierung durch Verwendung eines Zellkulturmediums mit Differenzierungszusätzen möglich [86], was wiederum dem Differenzierungsversuch o. Dz. entspricht.

Da die Versuche parallel geführt wurden und die hFOB - Zellen für die Differenzierungsversuche auf den Prüfkörpern mit Differenzierungsmedium bzw.

Proliferationsmedium vorkultiviert wurden und der siebte Tag mit Erhöhung der Temperatur bzw. Wechsel des Mediums als Beginn der Differenzierungsversuche gesetzt wurde, kann Tag 3 im Differenzierungsversuch mit Tag 10 im Proliferationsversuch verglichen werden. Tag 6 und 10 in den Differenzierungsversuchen stellen demnach Tag 13 und 17 nach Aussaat der Zellen dar.

Osteogenes Potential kann bereits im Proliferationsversuch für alle Zemente nachgewiesen werden, da eine ansteigende ALP - Aktivität messbar ist, welche an Tag 6 das Maximum erreicht und anschließend bis Tag 10 wieder abfällt. Es bestehen kaum signifikante Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  zur Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Die Maximalwerte der ALP - Aktivität der getesteten Zementphasen liegen an Tag 6 im Proliferationsversuch auf dem Niveau der Werte, welche im Differenzierungsversuch o. Dz. und m. Dz jeweils an Tag 10 erreicht werden. Dies ist in sofern unerwartet, als dass eine Differenzierung mit ausgeprägter ALP - Aktivität erst in den Differenzierungsversuchen zu erwarten gewesen wäre. Auffällig ist außerdem, dass es sowohl bei  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  als auch bei den sauer nachbehandelten CMPC Phasen  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S,  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S zu einem weiteren, deutlichen Anstieg der WST - Aktivität und der DNA - Menge kommt, da mit Ausdifferenzierung das Proliferationspotential abnimmt. Diese Ergebnisse sind allerdings in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Fargali [87], die in ihrer Studie mit osteogenen Kaninchenzellen auf CPC Prüfkörpern das Maximum der ALP - Aktivität nach fünf Tagen und die maximale Zellzahl nach 10 Tagen nachweisen konnte. Auch in dieser Studie wird der maximale DNA - Gehalt an Tag 10 erreicht. Sowohl im Differenzierungsversuch o. Dz. als auch im Differenzierungsversuch m. Dz. bleibt der DNA - Gehalt aller Zementphasen nahezu konstant auf dem Niveau, das im Proliferationsversuch an Tag 10 erreicht wird. Die WST - Aktivität und die DNA - Menge bleiben in den Differenzierungsversuchen ebenfalls konstant mit kleineren Schwankungen. Die Abnahme der WST - Aktivität von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S im Differenzierungsversuch o. Dz. und von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S sowie

$\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S im Differenzierungsversuch m. Dz. deutet auf den programmierten Zelltod (Apoptose) von Osteoblasten hin, welcher physiologisch ist, wenn Osteoblasten nicht als Osteozyten in mineralisierter extrazellulärer Matrix verbleiben [88]. Der Anstieg der WST - Aktivität von  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S im Differenzierungsversuch o. Dz. von Tag 6 auf 10 ist aufgrund der großen Standardabweichung an Tag 10 nicht nicht aussagekräftig.

Die zuvor beschriebene Konstanz von WST- Aktivität und DNA - Menge sprechen dafür, dass es bei den getesteten CMPCs auch ohne Temperaturerhöhung oder die Zugabe von Differenzierungsfaktoren zu einer weiteren Differenzierung der hFOB - Zellen kommt, spricht für ausgeprägtes osteogenes Potential.

Bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass die Werte der ALP - Aktivität insgesamt für alle Zementphasen näher beieinander liegen und auf höherem Niveau im Vergleich zur Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sind.  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}$  S und  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S überschreiten diese,  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  S sogar signifikant.

Der Trend bei Zellzuwachs und -proliferation, dass sich die sauer nachbehandelten Zementphasen vielversprechender verhalten, setzt sich also auch bei der osteogenen Differenzierung fort. Auffällig ist, dass sich die basisch nachbehandelten Zementphasen, sowie  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  S, welche sich als weniger biokompatibel präsentiert haben, ebenfalls mit der Referenz vergleichbare Werte bei der ALP - Aktivität erzielen und diese im Falle von  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B teilweise sogar signifikant überschreiten.

Die Ursachen hierfür sind vermutlich auch auf die Umgebungsbedingungen in der Zellkultur zurückzuführen und es bleiben die in vivo Ergebnisse zur weiteren Beurteilung abzuwarten. In einer ersten in vitro Studie an Kaninchen von Kowalewicz et al. [89] zeigten sich histologisch keine Entzündungszeichen im Umfeld von implantierten Zylindern aus  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B, was für eine gute Biokompatibilität spricht. Außerdem war bereits eine Woche nach Implantation an über 50 % des Umfang des Prüfkörper im histologischen Schnitt Kontakt zum umgebenden Knochen durch feine neugebildete Knochenbälkchen sichtbar. Dies spricht für positive osteointegrative und osteogenetische Eigenschaften [89].

Unter den o.g. Voraussetzungen können den getesteten Zementphasen neben der gegebenen Biokompatibilität auch osteoinduktive Eigenschaften in vitro im Sinne der Förderung der weiteren Differenzierung der hFOB - Zellen zugesprochen werden. Somit eignen sich vor allem die sauer nachbehandelten Zementphasen  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S sowie  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B zur weiteren Untersuchung im Tierversuch. Aufgrund der positiven Ergebnisse von Kowalewicz et al. für  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B können auch die basisch nachbehandelten Zementphasen  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B in vivo näher untersucht werden.

## 5. Zusammenfassung

In vielen Bereichen der Humanmedizin werden mittlerweile KEMs eingesetzt. Die Technik der additiven Fertigung eröffnet vor allem für komplexe Knochendefekte, entstanden durch Traumata und Fehlbildungen, die Möglichkeit der Herstellung patientenspezifischer Implantate. Hierfür werden Implantate digital mit Hilfe von CT - Datensätzen der Defekte konstruiert (CAD) und anschließend durch verschiedene Methoden der additiven Fertigung hergestellt. Eine Möglichkeit zur additiven Fertigung patientenspezifischer Implantate ist das in dieser Arbeit verwendete Verfahren des 3D - Pulverdrucks.

Die zylindrischen Prüfkörper für biologischen Testungen wurden aus CMPC Pulvern mit der allgemeinen Strukturformel  $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$  mit  $x = 0; 0,25; 0,75; 1,5; 3$  gedruckt. Um Beschädigungen am Druckkopf zu vermeiden wurde Wasser als Binderlösung verwendet. Den Zementpulvern wurde HPMC zugesetzt, diese quillt nach Wasserkontakt auf und verklebt die Zementpartikel. Die HPMC wird später während der Sinterung ausgebrannt. Die partielle Phasenumwandlung der CMPCs wurde erst nach Sinterung der Prüfkörper durch Behandlung mit den reaktiven Lösungen DAHP und  $\text{H}_3\text{PO}_4$  herbeigeführt. Nachbehandlung mit der Base DAHP führte in den CMPC Prüfkörpern zu einer teilweisen Phasenumwandlung zu Struvit. Bei Nachbehandlung mit der Säure  $\text{H}_3\text{PO}_4$  entstanden Newberyit und Bruschit. Die Phasenzusammensetzungen der Rohpulver sowie der fertig nachbehandelten Prüfkörper wurden mittels Röntgendiffraktometrie und quantitativer Rietveldanalyse untersucht.

Die o.g. Zementphasen wurden anschließend mit hFOB - Osteoblasten auf ihre Bio- und Zytokompatibilität sowie ihr osteogenes Potential hin untersucht. Zur Beurteilung der Bio- und Zytokompatibilität wurden WST - Aktivität und DNA - Gehalt als Kennzeichen der Proliferation bestimmt. Zur weiteren Bewertung des osteogenen Potentials wurde die ALP - Aktivität als Zeichen der Proliferation bestimmt.

Die mit Säure nachbehandelten und somit newberyithaltigen Phasen  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S erzielten die positivsten Ergebnisse bei der Zellproliferation, so zeigen diese in allen Versuchsteilen eine

starke Zunahme des DNA - Gehalts und verhalten sich dementsprechend bei der WST - Aktivität pro DNA - Gehalt nicht signifikant schlechter als die Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bei einem Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$ . Diese Ergebnisse sprechen für eine gute Biokompatibilität von Newberyit.

Die basisch nachbehandelten Phasen bleiben im Vergleich dazu etwas zurück, was allerdings wahrscheinlich auf die stark basischen Umgebungsbedingungen in der Zellkultur, bedingt durch initiale Auflösung der Zementmatrix, zurückzuführen ist.

Auch bei der Beurteilung des osteogenen Potentials erreichen die newberyithaltigen Phasen tendenziell bessere Ergebnisse bei der Ausdifferenzierung, gemessen an der ALP - Aktivität. Allerdings erzielen die basisch nachbehandelten, struvithaltigen, Phasen hier auch sehr gute Werte, welche teilweise signifikant oberhalb der Referenz  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  liegen. Aufgrund dieser positiven in vitro Ergebnisse sollten  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  S und  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  S sowie  $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$  B,  $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$  B und  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$  B weiter auf ihre Eignung als resorbierbares KEM, mit der Möglichkeit der Fertigung patientenspezifischer Implantate, hin untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Buck, D.W., 2nd and G.A. Dumanian, *Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals*. *Plast Reconstr Surg*, 2012. **129**(6): p. 1314-1320.
2. Olsen, B.R., A.M. Reginato, and W. Wang, *Bone development*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 191-220.
3. Buckwalter, J.A. and R.R. Cooper, *Bone structure and function*. *Instr Course Lect*, 1987. **36**: p. 27-48.
4. Chow, J.W., A.J. Wilson, T.J. Chambers, and S.W. Fox, *Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats*. *J Bone Miner Res*, 1998. **13**(11): p. 1760-7.
5. Ontañón, M., C. Aparicio, M.P. Ginebra, and J.A. Planell, *Chapter 3 - Structure and Mechanical Properties of Cortical Bone*, in *Pergamon Materials Series*, M. Elices, Editor. 2000, Pergamon. p. 33-71.
6. Burstein, A.H., D.T. Reilly, and M. Martens, *Aging of bone tissue: mechanical properties*. *J Bone Joint Surg Am*, 1976. **58**(1): p. 82-6.
7. Reilly, D.T. and A.H. Burstein, *The elastic and ultimate properties of compact bone tissue*. *J Biomech*, 1975. **8**(6): p. 393-405.
8. Lüllmann-Rauch, R., E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2015. 5. vollständig überarbeitet Auflage, S. 150-167.
9. Jilka, R.L., R.S. Weinstein, T. Bellido, A.M. Parfitt, and S.C. Manolagas, *Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines*. *J Bone Miner Res*, 1998. **13**(5): p. 793-802.
10. Tresguerres, F.G.F., J. Torres, J. López-Quiles, G. Hernández, J.A. Vega, and I.F. Tresguerres, *The osteocyte: A multifunctional cell within the bone*. *Ann Anat*, 2020. **227**: p. 151422.
11. Boyle, W.J., W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, 2003. **423**(6937): p. 337-42.
12. Keating, J.F., A.H. Simpson, and C.M. Robinson, *The management of fractures with bone loss*. *J Bone Joint Surg Br*, 2005. **87**(2): p. 142-50.
13. Nauth, A., E. Schemitsch, B. Norris, Z. Nollin, and J.T. Watson, *Critical-Size Bone Defects: Is There a Consensus for Diagnosis and Treatment?* *J Orthop Trauma*, 2018. **32 Suppl 1**: p. S7-s11.
14. Obrebsky, W., C. Molina, C. Collinge, P. Tornetta, 3rd, C. Sagi, A. Schmidt, R. Probe, J. Ahn, and A. Nana, *Current Practice in the Management of Open Fractures Among Orthopaedic Trauma Surgeons. Part B: Management of Segmental Long Bone Defects. A Survey of Orthopaedic Trauma Association Members*. *J Orthop Trauma*, 2014. **28**(8): p. e203-7.
15. Schweiberer, L., H. Stützel, and H.K. Mandelkow, *Bone transplantation*. *Arch Orthop Trauma Surg*, 1989. **109**(1): p. 1-8.
16. Kärcher, H., *Mikrochirurgischer Knochenersatz*. *Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie*, 2000. **4**(1): p. S322-S330.
17. Asmus, A., K. Vogel, A. Vogel, F. Eichenauer, S. Kim, and A. Eisenschenk, *Gefäßgestieltes Beckenkammtransplantat zur Behandlung der Femurkopfnekrose*. *Operative Orthopädie und Traumatologie*, 2020. **32**(2): p. 127-138.
18. Schnürer, S.M., U. Gopp, K.D. Kühn, and S.J. Breusch, *Knochenersatzwerkstoffe*. *Der Orthopäde*, 2003. **32**(1): p. 2-10.
19. Bauer, T.W. and G.F. Muschler, *Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science*. *Clin Orthop Relat Res*, 2000. **371**: p. 10-27.

20. Roberts, T.T. and A.J. Rosenbaum, *Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing*. Organogenesis, 2012. **8**(4): p. 114-124.
21. Albrektsson, T., P.I. Brånemark, H.A. Hansson, and J. Lindström, *Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man*. Acta Orthop Scand, 1981. **52**(2): p. 155-70.
22. Neukam, F.W., M. Wichmann, J. Wiltfang, *Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen*. 2007, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
23. Wu, F., J. Wei, H. Guo, F. Chen, H. Hong, and C. Liu, *Self-setting bioactive calcium–magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration*. Acta Biomater, 2008. **4**(6): p. 1873-1884.
24. Sheikh, Z., M.N. Abdallah, A.A. Hanafi, S. Misbahuddin, H. Rashid, and M. Glogauer, *Mechanisms of in Vivo Degradation and Resorption of Calcium Phosphate Based Biomaterials*. Materials (Basel), 2015. **8**(11): p. 7913-7925.
25. Dorozhkin, S.V. and M. Epple, *Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates*. Chem Int Ed, 2002. **41**(17): p. 3130-3146.
26. Eliaz, N. and N. Metoki, *Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications*. Materials (Basel), 2017. **10**(4).
27. Becker, A., M. Epple, K.M. Müller, and I. Schmitz, *A comparative study of clinically well-characterized human atherosclerotic plaques with histological, chemical, and ultrastructural methods*. J Inorg Biochem, 2004. **98**(12): p. 2032-2038.
28. Roberts-Harry, E.A. and V. Clerehugh, *Subgingival calculus: where are we now? A comparative review*. J Dent, 2000. **28**(2): p. 93-102.
29. Little, M.F. and S.P. Hazen, *Dental calculus composition. 2. Subgingival calculus: Ash, calcium, phosphorus and sodium*. J Dent Res, 1964. **43**: p. 645-51.
30. Kraaij, S., K.H. Karagozoglu, T. Forouzanfar, E.C. Veerman, and H.S. Brand, *Salivary stones: symptoms, aetiology, biochemical composition and treatment*. Br Dent J, 2014. **217**(11): p. E23.
31. Burnstein, L.S., A.L. Boskey, P.J. Tannenbaum, A.S. Posner, and I.D. Mandel, *The crystal chemistry of submandibular and parotid salivary gland stones*. J Oral Pathol, 1979. **8**(5): p. 284-91.
32. Dorozhkin, S.V., *A detailed history of calcium orthophosphates from 1770s till 1950*. Mater Sci Eng C, 2013. **33**(6): p. 3085-3110.
33. Ambard, A.J. and L. Mueninghoff, *Calcium Phosphate Cement: Review of Mechanical and Biological Properties*. J Prosthodont, 2006. **15**(5): p. 321-328.
34. Ginebra, M.P., M. Espanol, E.B. Montufar, R.A. Perez, and G. Mestres, *New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine*. Acta Biomater, 2010. **6**(8): p. 2863-73.
35. Bohner, M., P. Van Landuyt, H.P. Merkle, and J. Lemaitre, *Composition effects on the pH of a hydraulic calcium phosphate cement*. J Mater Sci Mater Med, 1997. **8**(11): p. 675-681.
36. Durucan, C. and P.W. Brown,  *$\alpha$ -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature*. J Mater Sci Mater Med, 2000. **11**(6): p. 365-371.
37. Carrodegua, R.G. and S. De Aza,  *$\alpha$ -Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications*. Acta Biomater, 2011. **7**(10): p. 3536-46.
38. Hofmann, M.P., S.N. Nazhat, U. Gbureck, and J.E. Barralet, *Real-time monitoring of the setting reaction of brushite-forming cement using isothermal*

- differential scanning calorimetry*. J Biomed Mater Res - B Appl Biomater, 2006. **79B**(2): p. 360-364.
39. Grover, L.M., J.C. Knowles, G.J. Fleming, and J.E. Barralet, *In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement*. Biomaterials, 2003. **24**(23): p. 4133-41.
  40. Seitz, H., W. Rieder, S. Irsen, B. Leukers, and C. Tille, *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **74**(2): p. 782-8.
  41. Chugunov, S., N.A. Adams, and I. Akhatov, *Evolution of SLA-Based Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Microstructure During Additive Manufacturing Process*. Materials, 2020. **13**(18).
  42. Vormann, J., *Magnesium: nutrition and metabolism*. Mol Aspects Med, 2003. **24**(1-3): p. 27-37.
  43. Moe, S.M., *Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium*. Prim Care, 2008. **35**(2): p. 215-37, v-vi.
  44. Rude, R.K., F.R. Singer, and H.E. Gruber, *Skeletal and hormonal effects of magnesium deficiency*. J Am Coll Nutr, 2009. **28**(2): p. 131-41.
  45. Jia, L., F. Zhao, J. Guo, and K. Yao, *Properties and Reaction Mechanisms of Magnesium Phosphate Cement Mixed with Ferroaluminate Cement*. Materials (Basel), 2019. **12**(16): p. 2561.
  46. Yang, Q., B. Zhu, S. Zhang, and X. Wu, *Properties and applications of magnesia-phosphate cement mortar for rapid repair of concrete*. Cem Concr Res, 2000. **30**(11): p. 1807-1813.
  47. Sandor Popovics, N.R. and P. Michael, *Rapid Hardening Cements for Repair of Concrete*. ACI Mater J. **84**(1).
  48. Cao, X., H. Lu, J. Liu, W. Lu, L. Guo, M. Ma, B. Zhang, and Y. Guo, *3D plotting in the preparation of newberyite, struvite, and brushite porous scaffolds: using magnesium oxide as a starting material*. J Mater Sci Mater Med, 2019. **30**(8): p. 88.
  49. Nabiyouni, M., T. Brückner, H. Zhou, U. Gbureck, and S.B. Bhaduri, *Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications*. Acta Biomater, 2018. **66**: p. 23-43.
  50. Meißner, A., C. Mamoulakis, and N. Laube, *Harnwegsinfektionen und Urolithiasis*. Der Urologe, 2010. **49**(5): p. 623-628.
  51. Klammert, U., A. Ignatius, U. Wolfram, T. Reuther, and U. Gbureck, *In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model*. Acta Biomater, 2011. **7**(9): p. 3469-3475.
  52. Großardt, C., A. Ewald, L.M. Grover, J.E. Barralet, and U. Gbureck, *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.
  53. Zreiqat, H., C.R. Howlett, A. Zannettino, P. Evans, G. Schulze-Tanzil, C. Knabe, and M. Shakibaei, *Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants*. J Biomed Mater Res, 2002. **62**(2): p. 175-84.
  54. Yoshizawa, S., A. Brown, A. Barchowsky, and C. Sfeir, *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.
  55. Salimi, M.H., J.C. Heughebaert, and G.H. Nancollas, *Crystal growth of calcium phosphates in the presence of magnesium ions*. Langmuir, 1985. **1**(1): p. 119-122.
  56. Vorndran, E., A. Ewald, F.A. Müller, K. Zorn, A. Kufner, and U. Gbureck, *Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO<sub>4</sub> system*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(3): p. 429-36.

57. Klammert, U., U. Gbureck, E. Vorndran, J. Rödiger, P. Meyer-Marcotty, and A.C. Kübler, *3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects*. J Craniomaxillofac Surg, 2010. **38**(8): p. 565-570.
58. Klammert, U., H. Böhm, T. Schweitzer, K. Würzler, U. Gbureck, J. Reuther, and A. Kübler, *Multi-directional Le Fort III midfacial distraction using an individual prefabricated device*. J Craniomaxillofac Surg, 2009. **37**(4): p. 210-215.
59. Harris, S.A., R.J. Enger, B.L. Riggs, and T.C. Spelsberg, *Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line*. J Bone Miner Res, 1995. **10**(2): p. 178-86.
60. Franceschi, R.T., B.S. Iyer, and Y. Cui, *Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells*. J Bone Miner Res, 1994. **9**(6): p. 843-54.
61. Buckwalter, J.A., M.J. Glimcher, R.R. Cooper, and R. Recker, *Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. Instr Course Lect, 1996. **45**: p. 371-86.
62. Bellows, C.G., J.N. Heersche, and J.E. Aubin, *Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro*. Bone Miner, 1992. **17**(1): p. 15-29.
63. Brückner, M., *3D-Druck und Charakterisierung von Calciummagnesiumphosphaten für die Anwendung als regeneratives Knochenimplantat*, Fakultät für Chemie und Pharmazie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2020. S. 36;40.
64. Wong-Ng, W., H.F. McMurdie, C.R. Hubbard, and A.D. Mighell, *JCPDS-ICDD Research Associateship (Cooperative Program with NBS/NIST)*. J Res Natl Inst Stand Technol, 2001. **106**(6): p. 1013-28.
65. Gualtieri, A., g. gatta, R. Arletti, G. Artioli, P. Ballirano, G. Cruciani, A. Guagliardi, d. malferrari, N. Masciocchi, and P. Scardi, *Quantitative phase analysis using the Rietveld method: towards a procedure for checking the reliability and quality of the results*. Period di Mineral, 2019. **88**: p. 147-151.
66. Subramaniam, M., S.M. Jalal, D.J. Rickard, S.A. Harris, M.E. Bolander, and T.C. Spelsberg, *Further characterization of human fetal osteoblastic hFOB 1.19 and hFOB/ER alpha cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization*. J Cell Biochem, 2002. **87**(1): p. 9-15.
67. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction*, in *Biotechnology Annual Review*. 2005, Elsevier. p. 127-152.
68. Singer, V.L., L.J. Jones, S.T. Yue, and R.P. Haugland, *Characterization of PicoGreen Reagent and Development of a Fluorescence-Based Solution Assay for Double-Stranded DNA Quantitation*. Anal Biochem, 1997. **249**(2): p. 228-238.
69. Dragan, A.I., J.R. Casas-Finet, E.S. Bishop, R.J. Strouse, M.A. Schenerman, and C.D. Geddes, *Characterization of PicoGreen interaction with dsDNA and the origin of its fluorescence enhancement upon binding*. Biophys J, 2010. **99**(9): p. 3010-9.
70. Wiehlmann, L., K. Pienkowska, S. Hedtfeld, M. Dorda, and B. Tümmler, *Impact of sample processing on human airways microbial metagenomes*. J Biotechnol, 2017. **250**: p. 51-55.
71. Yen, M.-I., C.-C. Chien, I.-m. Chiu, H.-I. Huang, Y.-C. Chen, H.-I. Hu, and B.L. Yen, *Multilineage Differentiation and Characterization of the Human Fetal Osteoblastic 1.19 Cell Line: A Possible In Vitro Model of Human Mesenchymal Progenitors*. Stem cells, 2007. **25**(1): p. 125-131.

72. Verrier Jones, J., M. Mansour, H. James, D. Sadi, and R.I. Carr, *A substrate amplification system for enzyme-linked immunoassays: II. Demonstration of its applicability for measuring anti-DNA antibodies*. J Immunol Methods, 1989. **118**(1): p. 79-84.
73. Kattiparambil Rajan, D., M. Patrikoski, J. Verho, J. Sivula, H. Ihalainen, S. Miettinen, and J. Lekkala, *Optical non-contact pH measurement in cell culture with sterilizable, modular parts*. Talanta, 2016. **161**: p. 755-761.
74. Meleti, Z., I.M. Shapiro, and C.S. Adams, *Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture*. Bone, 2000. **27**(3): p. 359-366.
75. Barradas, A.M., H. Yuan, C.A. van Blitterswijk, and P. Habibovic, *Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms*. Eur Cell Mater, 2011. **21**: p. 407-29; discussion 429.
76. Klammert, U., T. Reuther, M. Blank, I. Reske, J.E. Barralet, L.M. Grover, A.C. Kübler, and U. Gbureck, *Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement*. Acta Biomater, 2010. **6**(4): p. 1529-35.
77. Anselme, K., M. Bigerelle, B. Noel, E. Dufresne, D. Judas, A. Iost, and P. Hardouin, *Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses*. J Biomed Mater Res, 2000. **49**(2): p. 155-166.
78. Naji, A. and M.F. Harmand, *Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloy using human osteoblasts and fibroblasts*. J Biomed Mater Res, 1990. **24**(7): p. 861-71.
79. Reule, A.G., *Errors in Spectrophotometry and Calibration Procedures to Avoid Them*. J Res Natl Bur Stand (U.S.), 1976. **80A**(4): p. 609-624.
80. Taylor, A.W., A.W. Frazier, E.L. Gurney, and J.P. Smith, *Solubility products of di- and trimagnesium phosphates and the dissociation of magnesium phosphate solutions*. J Chem Soc Faraday Trans, 1963. **59**(0): p. 1585-1589.
81. Leidi, M., F. Dellera, M. Mariotti, and J.A. Maier, *High magnesium inhibits human osteoblast differentiation in vitro*. Magnes Res, 2011. **24**(1): p. 1-6.
82. Zhang, X., H. Zu, D. Zhao, K. Yang, S. Tian, X. Yu, F. Lu, B. Liu, X. Yu, B. Wang, W. Wang, S. Huang, Y. Wang, Z. Wang, and Z. Zhang, *Ion channel functional protein kinase TRPM7 regulates Mg ions to promote the osteoinduction of human osteoblast via PI3K pathway: In vitro simulation of the bone-repairing effect of Mg-based alloy implant*. Acta Biomater, 2017. **63**: p. 369-382.
83. Trentz, O.A., R. Zellweger, M.G. Amgwerd, and G.K. Uhlschmid, *[Testing bone implants in cell lines and human osteoblasts]*. Unfallchirurg, 1997. **100**(1): p. 39-43.
84. Aubin, J.E., *Regulation of osteoblast formation and function*. Rev Endocr Metab Disord, 2001. **2**(1): p. 81-94.
85. Nöth, U., C. Hendrich, D. Scheddin, T. Altvater, J. Eulert, and R. Thull, *Der Effekt von Titanoberflächen unterschiedlicher Rauigkeit auf Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Proteinsynthese humaner fetaler Osteoblasten (hFOB 1.19)*. Biomedizinische Technik, 1997. **42**(s2): p. 367-368.
86. Altvater, T., C. Hendrich, U. Noth, C.P. Rader, R. Stach, N. Schütze, J. Eulert, and R. Thull, *Zytotoxizitätsuntersuchung von hochgoldhaltigen Degutan-Oberflächen unterschiedlicher Rauigkeit mit Fibroblasten (BALB 3T3) und Osteoblasten (hFOB 1.19) - Cytotoxicity of Degutan Surfaces of Different Roughness Using Fibroblast (BALB 3T3) and Osteoblast (hFOB 1.19) Cell Cultures*. Biomedizinische Technik, 2000. **45**(9): p. 238-242.

87. Fargali, S., *In vitro* Etablierung eines Kaninchenmodells zur Herstellung von hochvitalen Knochenimplantaten auf Basis osteogener Zellen und bioresorbierbarer Trägergerüste, Fakultät für Lebenswissenschaften, Technische Universität Carolo-Wilhelmina Braunschweig, 2006. S.94.
88. Lynch, M.P., C. Capparelli, J.L. Stein, G.S. Stein, and J.B. Lian, *Apoptosis during bone-like tissue development in vitro*. J Cell Biochem, 1998. **68**(1): p. 31-49.
89. Kowalewicz, K., E. Vorndran, F. Feichtner, A.-C. Waselau, M. Brueckner, and A. Meyer-Lindenberg, *In-Vivo Degradation Behavior and Osseointegration of 3D Powder-Printed Calcium Magnesium Phosphate Cement Scaffolds*. Materials, 2021. **14**(4).

# Anhang

**Tabelle 12:** Statistische Auswertung mittels one way ANOVA Proliferationsversuch.

Die mit 1 gekennzeichneten Zementphasen unterscheiden sich bei Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  signifikant, 0 bedeutet kein signifikanter Unterschied. Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>0,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B: Nachbehandlung mit Base; S: Nachbehandlung mit Säure.

Verglichene Proben	WST-Aktivität			DNA-Gehalt			WST-Aktivität/ DNA-Menge			ALP-Aktivität		
	3	6	10	3	6	10	3	6	10	3	6	10
	Tag											
	3	6	10	3	6	10	3	6	10	3	6	10
Mg <sub>3</sub> B;Ca <sub>3</sub>	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Mg <sub>3</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Mg <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1
Mg <sub>2,25</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1
Mg <sub>2,25</sub> B;Mg <sub>3</sub> B	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
Mg <sub>2,25</sub> B;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> B;Ca <sub>3</sub>	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>3</sub> S	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>2,25</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>2,25</sub> S	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Ca <sub>3</sub>	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> B	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> S	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> B	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> S	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0

**Tabelle 13:** Statistische Auswertung mittels one way ANOVA Differenzierungsversuch (o.Dz.).

Die mit 1 gekennzeichneten Zementphasen unterscheiden sich bei Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  signifikant, 0 bedeutet kein signifikanter Unterschied. Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>0,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B: Nachbehandlung mit Base; S: Nachbehandlung mit Säure.

Verglichene Proben	WST-Aktivität			DNA-Gehalt			WST-Aktivität/ DNA-Menge			ALP-Aktivität		
	Tag											
	3	6	10	3	6	10	3	6	10	3	6	10
Mg <sub>3</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Mg <sub>3</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Mg <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Mg <sub>2,25</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0
Mg <sub>2,25</sub> B;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mg <sub>2,25</sub> B;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>2,25</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>2,25</sub> S	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> S	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> S	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0

**Tabelle 14:** Statistische Auswertung mittels one way ANOVA Differenzierungsversuch (m.Dz.).

Die mit 1 gekennzeichneten Zementphasen unterscheiden sich bei Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  signifikant, 0 bedeutet kein signifikanter Unterschied. Abkürzungen: Ca<sub>3</sub>: Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>3</sub>: Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,25</sub>: Ca<sub>0,75</sub>Mg<sub>0,25</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; Mg<sub>2,75</sub>: Ca<sub>0,25</sub>Mg<sub>2,75</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>; B: Nachbehandlung mit Base; S: Nachbehandlung mit Säure.

Verglichene Proben	WST-Aktivität			DNA-Gehalt			WST-Aktivität/ DNA-Menge			ALP-Aktivität		
	Tag											
	3	6	10	3	6	10	3	6	10	3	6	10
Mg <sub>3</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
Mg <sub>3</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> B;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> B;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Ca <sub>3</sub>	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,25</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>2,25</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> B;Mg <sub>2,25</sub> S	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Ca <sub>3</sub>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mg <sub>2,75</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Ca <sub>3</sub>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> B	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>3</sub> S	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,25</sub> S	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Ca <sub>3</sub> S;Mg <sub>2,75</sub> S	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0

## Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ATCC	American Type Culture Collection
B	Nachbehandlung mit Base
$\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Mg}_{2,75}$
$\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Mg}_{2,25}$
$\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$	$\text{Mg}_{1,5}$
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Ca}_3$
CAD	Computer Aided Design
CH	Confoederatio Helvetica - Schweiz
CMPC	Calciummagnesiumphosphatzement
CPC	Calciumphosphatzement
CT	Computertomographie
D	Deutschland
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FL	Fürstentum Liechtenstein
G	gesintert
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	doppelt destilliertes $\text{H}_2\text{O}$
HA	Hydroxylapatit
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
JCPDS	Joint Committe On Powder Diffraction Standards
KEM	Knochenersatzmaterial
$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	$\text{Mg}_3$
milliQ	Reinstwasser
MPC	Magnesiumphosphatzement
o.E.	ohne Einheit
o.g.	oben genannt
P+S	Penicillin + Streptomycin
PBS	phosphate buffered saline

PDF	Powder Diffraction File
pNP	p-Nitrophenol
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PTCR	Process temperature control ring
R	Rohpulver
Rpm	rounds per minute
U/min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Nachbehandlung mit Säure
TCP	Tricalciumphosphat
u.a.	unter anderem
UK	United Kingdom
USA	United States of America
XRD	X-Ray Diffraction
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	3D - Drucker ZPrint 310. ....	23
<b>Abbildung 2:</b>	Prüfkörper. ....	24
<b>Abbildung 3:</b>	Sinterkurve. ....	25
<b>Abbildung 4:</b>	Sinterofen mit Scaffolds. ....	26
<b>Abbildung 5:</b>	Mit Prüfkörpern bestückte Wellplatte in der Zellkultur. ....	30
<b>Abbildung 6:</b>	XRD - Diagramme der Zementphasen. ....	40
<b>Abbildung 7:</b>	Gemittelte WST-Aktivität (o.E.) Proliferationsversuch. ....	43
<b>Abbildung 8:</b>	Gemittelter DNA-Gehalt (ng) pro Prüfkörper Proliferationsversuch. ....	44
<b>Abbildung 9:</b>	Gemittelte WST-Aktivität pro ng DNA (1/ng) im Proliferationsversuch. ....	45
<b>Abbildung 10:</b>	Ergebnisse Proliferationsversuch im Hauptversuch. ....	46
<b>Abbildung 11:</b>	Ergebnisse Differenzierungsversuch ohne Differenzierungszusätze. ....	49
<b>Abbildung 12:</b>	Ergebnisse Differenzierungsversuch mit Differenzierungszusätzen. ....	52
<b>Abbildung 13:</b>	REM - Aufnahmen von $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (A), (B) und $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ S (C) und (D). ....	54
<b>Abbildung 14:</b>	REM - Aufnahme von $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ B. ....	55
<b>Abbildung 15:</b>	REM - Aufnahmen von $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ B (A) und $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ S (B). ....	56
<b>Abbildung 16:</b>	REM - Aufnahmen von $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ B (A) und $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$ S (B). ....	57

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Klassifizierung von Knochenersatzmaterialien. ....	4
<b>Tabelle 2:</b>	In dieser Arbeit verwendete Laborgeräte.....	13
<b>Tabelle 3:</b>	In dieser Arbeit verwendete Software.....	15
<b>Tabelle 4:</b>	Verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
<b>Tabelle 5:</b>	Rezepturen CMPC ( $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ).....	21
<b>Tabelle 6:</b>	Sintertemperaturen der jeweiligen Zementphasen [63].....	25
<b>Tabelle 7:</b>	In dieser Arbeit verwendete PDF - Referenzen. ....	28
<b>Tabelle 8:</b>	Entwässerung mittels Acetonreihe. ....	36
<b>Tabelle 9:</b>	Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse mittels Rietveldanalyse 1. ....	41
<b>Tabelle 10:</b>	Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse mittels Rietveldanalyse 2. ....	41
<b>Tabelle 11:</b>	Ergebnisse der quantitativen Phasenanalyse mittels Rietveldanalyse 3. ....	42
<b>Tabelle 12:</b>	Statistische Auswertung mittels one way ANOVA Proliferationsversuch. ....	
<b>Tabelle 13:</b>	Statistische Auswertung mittels one way ANOVA Differenzierungsversuch (o.Dz.). ....	
<b>Tabelle 14:</b>	Statistische Auswertung mittels one way ANOVA Differenzierungsversuch (m.Dz.). ....	

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Gbureck für Betreuung der vorliegenden Arbeit, die Aufnahme in die Zementarbeitsgruppe und die Einführung in die manchmal etwas zermürende Arbeit mit dem 3D - Drucker bedanken.

Ebenso danke ich dem Direktor des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg Prof. Dr. Jürgen Groll für die Ermöglichung dieser Arbeit an seinem Lehrstuhl.

Ich danke ganz besonders meiner Betreuerin Dr. Elke Vordran für die hervorragende Betreuung, die Unterstützung und die ausführlichen Antworten auf meine zahlreichen Fragen.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Andrea Ewald, Dr. Tatjana Schilling und Dr. Carina Blum für die Hilfe und die Unterstützung bei allen Fragen, die den biologischen Anteil dieser Arbeit betreffen. Alevtina Rosenthal danke ich herzlichst für die Einführung in das gründliche Arbeiten an der Sterilbank, und Ihr und Alice Schaaf für die Antworten auf alle Fragen im Biolaborbetrieb.

Judith Friedlein danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung der REM Bilder.

Besonderer Dank gilt Isabell Biermann für die sehr aufwändige Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten Zementpulver. Harald Hümpfer sowie Anton Hofmann danke ich für die Wartung der Sinteröfen.

Last but not least danke ich meinen Eltern und meiner Freundin Lena für die vielseitige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit an sich und darüber hinaus auch für die Aufmunterung und Motivation.

## **Publikation**

**Physicochemical degradation of calcium magnesium phosphate (stanfieldite) based bone replacement materials and the effect on their cytocompatibility.**

Christian Schaufler<sup>1</sup>, Anna-Maria Schmitt<sup>1</sup>, Claus Moseke<sup>2</sup>, Isabell Geroneit<sup>1</sup>, Manuel Brückner<sup>1</sup>, Andrea Meyer-Lindenberg<sup>3</sup>, Elke Vorndran<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg

<sup>2</sup> Institut für Biomedizinische Technik (IBMT), Technische Hochschule Mittelhessen (THM) Gießen

<sup>3</sup> Zentrum für klinische Tiermedizin, Chirurgische und Gynäkologische Kleintierklinik der Ludwig - Maximilians - Universität München

Manuskript wird zur Publikation in Biomedical Materials eingereicht.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Christian Schaufler, geboren am 06.09.1995 in Friedrichshafen, an Eides statt, die Dissertation „Osteogenes Potential additiv gefertigter Calciummagnesiumphosphat-Keramiken“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet haben.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Würzburg, den 21.04.2023

\_\_\_\_\_  
Christian Schaufler