

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kiefergesundheit
Abteilung und Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
der Universität Würzburg

Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Zelluläre Resorption 3D-gedruckter Knochenimplantate auf Basis von Calcium-
magnesiumphosphaten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eugen Gefel

aus Schweinfurt

Würzburg, August 2022

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

Korreferent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2023

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meinen Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Motivation	1
2	Hintergrundwissen und Kenntnisstand	4
2.1	Natürliches Knochengewebe	4
2.1.1	Hierarchieebenen	4
2.1.2	Zellen des Knochens	9
2.1.2.1	Osteoblasten	9
2.1.2.2	Saumzellen (Bone lining cells)	9
2.1.2.3	Osteozyten	9
2.1.2.4	Osteoklasten	10
2.1.3	RANKL/RANK/OPG-System und M-CSF	13
2.2	Knochendefekte kritischer Größe (Critical-sized bone defects)	14
2.2.1	Prädisponierende Faktoren	14
2.2.2	Behandlungsstrategien	15
2.3	Knochenersatzmaterialien	17
2.3.1	Anforderungen	18
2.3.2	Einteilung	20
2.3.2.1	Autogene Knochentransplantate	20
2.3.2.2	Allogene Knochentransplantate	21
2.3.2.3	Xenogene Knochenersatzmaterialien	21
2.3.2.4	Alloplastische Knochenersatzmaterialien	21
2.3.3	Calciumphosphate	23
2.3.3.1	Hydroxylapatit	24
2.3.3.2	Brushit	25
2.3.3.3	α/β -TCP	26
2.3.4	Magnesiumphosphate	27
2.3.5	Calciummagnesiumphosphate	29
2.4	3D-Pulverdruck	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Material- und Geräteliste	32
3.1.1	Chemikalien	32
3.1.2	Technische Geräte	34
3.1.3	Einmalartikel	35
3.2	Methoden	37
3.2.1	Zementrohpulverherstellung	37

3.2.1.1	Tricalciumphosphat	37
3.2.1.2	Calciummagnesiumphosphate und Magnesiumphosphat	37
3.2.2	Scaffoldherstellung und -aufbereitung	38
3.2.2.1	3D-Pulverdruck.....	38
3.2.2.2	Sinterung.....	41
3.2.2.3	Infiltration mit reaktiven Lösungen: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, H_3PO_4	41
3.2.2.4	Waschen und Sterilisation	42
3.2.3	Röntgendiffraktometrie (XRD)	43
3.2.4	Ethikvotum	43
3.2.5	Kultivierung der humanen Osteoklasten	44
3.2.5.1	Nährstoffabsättigung der Scaffolds.....	45
3.2.5.2	Isolation der humanen Monozyten aus Buffy-Coats durch dreifache Dichtegradientenzentrifugation	45
3.2.5.3	Monozytenaussaat auf Polystyrol, Glas und Scaffolds.....	49
3.2.5.4	Stimulation und Differenzierung zu Osteoklasten.....	50
3.2.6	Zytochemische Färbung des Enzyms Tartrat-resistente saure Phosphatase, Durchlicht- und Stereomikroskopie	51
3.2.7	Zellyse.....	52
3.2.8	DNA-Quantifizierung (PicoGreen™-Assay)	52
3.2.9	Photometrische Enzymaktivitätsmessung der Tartrat-resistente saure Phosphatase	54
3.2.10	Fluoreszenzmikroskopie der Aktin-Filamente und der DNA.....	56
3.2.11	Rasterelektronenmikroskopie	58
3.2.12	Induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS)	60
3.2.13	pH-Wertmessung der Kulturmediumüberstände	61
3.2.14	Statistische Auswertung	61
4	Ergebnisse	63
4.1	Volumenreduktion nach Sinterung	63
4.2	Phasenzusammensetzung der Zemente (XRD)	63
4.3	Osteoklastenkultivierung	68
4.4	TRAP-Färbung.....	71
4.5	DNA-Quantifizierung	75
4.6	TRAP-Aktivität.....	77
4.7	Fluoreszenzmarkierung.....	81
4.8	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.....	85
4.9	Bioresorption und Adsorption (ICP-MS)	89
4.10	pH-Werte der Kulturmediumüberstände	96

5	Diskussion.....	98
5.1	Charakterisierung der azellulären Zementproben.....	98
5.1.1	3D-Pulverdruck und Phasenzusammensetzungen	98
5.1.2	Morphologische Veränderungen.....	101
5.1.3	Adsorptions- und Auflösungsverhalten	102
5.1.4	Zusammenhang zwischen Magnesiumionenkonzentration und pH-Wert	105
5.2	Osteoklastennachweise	106
5.2.1	Zellkultivierungsmethoden.....	106
5.2.2	DNA-Quantifizierung	109
5.2.3	TRAP-Färbung und -Aktivität.....	110
5.2.4	Indirekte Zellkultivierung auf Polystyrol (Fluoreszenzmarkierung)	113
5.2.5	Direkte Zellkultivierung (Fluoreszenzmarkierung und REM)	116
5.3	Resorptionsnachweise	117
5.3.1	Resorptionslakunen (REM)	117
5.3.2	Zellvermittelte Ionenfreisetzung (ICP-MS).....	118
5.4	Auswahl vergleichbarer Studien.....	123
5.5	Auswahl von Einflussfaktoren auf die Osteoklastenbildung und -funktion....	126
5.5.1	Oberflächentopographie.....	126
5.5.2	Ionenkonzentrationen im Kulturmedium	128
5.5.2.1	Magnesiumionenkonzentration	128
5.5.2.2	Calciumionenkonzentration	130
5.5.2.3	Phosphationenkonzentration	131
5.5.2.4	Oxoniumionenkonzentration (pH-Wert).....	132
6	Zusammenfassung	135
7	Literaturverzeichnis.....	137
8	Anhang	I
8.1	Ergebnisse der Signifikanz-Analyse	I
8.2	Teilergebnisse der DNA-Konzentrationen und TRAP-Volumenaktivitäten nach Spender.....	V
8.3	Abkürzungsverzeichnis	XIV
8.4	Abbildungsverzeichnis.....	XVII
8.5	Tabellenverzeichnis	XIX
8.6	Ethikvotum	XXI
8.7	Danksagung.....	XXII
8.8	Publikation	XXIII

1 Einleitung und Motivation

Der Knochen ist eines der wenigen Körpergewebe des Menschen, das die inhärente Fähigkeit zur Regeneration im Sinne einer *Restitutio ad integrum* besitzt [1-4]. Diesem Regenerationsvermögen sind jedoch Grenzen gesetzt, sodass der Körper ab einer bestimmten Defektgröße nicht mehr in der Lage ist, die Heilung aus eigener Kraft ohne bleibende Schäden zu bewältigen. In diesem Fall wird von einem Knochendefekt kritischer Größe (*Critical-sized bone defect*, CSD) gesprochen [4-6].

Diese CSDs können als Folge eines Traumas, einer Tumoresektion, einer Fehlbildung sowie eines Débridements nach einer Infektion auftreten und erfordern eine chirurgische Intervention [5, 7]. Für diese Knochendefekte sind heute eine Reihe von Therapieoptionen bekannt, wie z. B. Distractionsosteogenese, induzierte Membran (Masquelet-Technik), biologische und synthetische Knochenersatzmaterialien (KEM), wobei deren Indikation u. a. von der Lokalisation, Belastung und Defektgröße abhängt [5]. Der Goldstandard für die Behandlung von Knochendefekten ist nach wie vor der patienteneigene Knochen (Autotransplantat, autogenes KEM), da er die wichtigen Anforderungen wie Biokompatibilität, -resorbierbarkeit, Osteointegration, -konduktion und -induktion erfüllt [5, 8]. Neben seiner begrenzten Verfügbarkeit ist der zusätzliche Eingriff sowie die Entnahmemorbidität für die Patienten (nachfolgend stellvertretend für alle Geschlechter) belastend und stellt bei reduziertem Allgemeinzustand, Schwerverletzten oder Kindern keine Option dar [4, 5, 8, 9]. Die Verwendung von allogenen (Transplantation innerhalb der gleichen Spezies) und xenogenen (Transplantation zwischen verschiedenen Spezies) KEMs ist zwar gut etabliert und in ausreichender Menge verfügbar, aber das - wenn auch geringe - Risiko eines Pathogentransfers oder einer immunologischen Abstoßungsreaktion macht ihren Einsatz unattraktiv [5, 6, 9, 10]. Die Entwicklung von synthetischen (alloplastischen) KEMs soll die oben erwähnten Problematiken begegnen. Trotz der großen Herausforderungen bei der Umsetzung wurden in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte bei der Erforschung dieser Materialien erzielt [11, 12]. So hat sich eine Reihe von alloplastischen KEMs auf Calciumphosphatbasis (Calciumphosphatzemente, CPCs) etabliert, die zum Teil dem natürlichen Knochen ähneln und als biokompatibel, osteointegrativ und osteokonduktiv gelten [3, 6, 11, 13-16]. Trotz dieser Eigenschaften konnte bislang noch kein dem Autotransplantat gleichwertiges alloplastisches KEM entwickelt werden, da entweder die Bioresorption extrem langsam erfolgt [16-18] oder eine Umwandlung in schwerlösliche Phase *in vivo* stattfindet [16, 19-23]. Diese Residuen

können sich negativ auf die mechanischen Eigenschaften des Knochens auswirken und zu Infektionen führen [5].

Eine vielversprechende Alternative zu CPCs ist das relativ neue Forschungsgebiet der Magnesiumphosphatzemente (MPCs) und Calciummagnesiumphosphatzemente (CMPCs) [6, 24-27], denen oft die kombinierten positiven Eigenschaften von CPCs und MPCs zugeschrieben werden [6, 25, 28]. Zu den MPCs und CMPCs gehören u. a. die Struvit-bildenden und Newberyit-bildenden Zemente, wobei sich die Forschung häufig auf erstere konzentriert [13, 20, 29-33]. So stellten beispielsweise Vorndran et al. eine Reihe von Struvit-bildenden CMPCs mit der allgemeinen stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($0 < x < 1,5$) her und konnten u. a. eine gute Zytokompatibilität und einstellbare Löslichkeit der Zemente in vitro feststellen [31]. Die Idee hinter magnesiumhaltigen Zementen liegt einerseits darin, dass sie in vivo löslicher sind als CPCs [6, 25] und andererseits, dass die Magnesiumionen (Mg^{2+}) die Umwandlung in schwerlösliche Phasen in vivo inhibieren können [6, 34-37]. Außerdem wird Magnesium für die DNA-, RNA- und Proteinsynthese benötigt und ist an über 300 enzymatischen Reaktionen beteiligt [38, 39]. Es spielt unter anderem eine multifunktionale Rolle bei Knochenwachstum und -regeneration [25, 40] und stimuliert die endotheliale Proliferation [41], was für die Knochenheilung u. a. essentiell ist. All diese Eigenschaften sprechen für den Einsatz von magnesiumhaltigen KEMs. Allerdings sind die Studien in diesem Bereich noch sehr limitiert [6, 25, 42] und bislang wurde nur eine magnesiumbasierte Zementformulierung OsteoCrete® (Bone Solutions, Inc., Colleyville, USA) von FDA zugelassen [25]. Um das volle Potenzial der magnesiumhaltigen KEMs zu eruieren, sind weitere Untersuchungen unumgänglich.

Die alloplastischen KEMs werden häufig als Injektions-/Zementpasten [33], Granulate [43] oder als einfache Formkörper [3] verwendet. Um jedoch geometrisch komplexe Knochendefekte zu rekonstruieren, ist die Herstellung von individualisierten Knochenimplantaten erforderlich. So hat in den letzten Jahren der dreidimensionale (3D)-Pulverdruck als additives Fertigungsverfahren zunehmend an Bedeutung gewonnen [44] und es wurden zukunftsweisende Techniken vorgestellt, mit deren Hilfe patientenspezifische Zementimplantate mittels Computertomographie und *Computer-Aided-Design*-(CAD)-Verfahren realisiert werden konnten [45, 46].

Der Knochenumbau (*Bone remodeling*) ist ein dynamischer Prozess und wird von spezialisierten Zellen durchgeführt, darunter den knochenaufbauenden Osteoblasten und

den knochenabbauenden Osteoklasten [47-50]. Die Rolle der Osteoklasten wurde jedoch oft unterschätzt, sodass der Fokus eher auf osteoblastenähnlichen Zellen und ihren Vorläufern lag [3, 51, 52], da einerseits die Osteoblasten als die dominierenden Zellen bei der Osteoklastenregulation angesehen werden [47, 53] und andererseits die schwierigen Isolierungs- und Kultivierungsverfahren der Osteoklasten deren In-vitro-Experimente eingeschränkt haben [52, 54]. Im Rahmen der Bestrebungen, eine KEM zu entwickeln, welches eine Knochenregeneration im Sinne einer *Restitutio ad integrum* ermöglicht, werden jedoch osteoblastische und osteoklastische Zellen vorausgesetzt [3]. Das implantierte KEM soll schließlich in vivo vollständig abbaubar sein, damit es durch den neu gebildeten Knochen ersetzt werden kann [3, 19]. Allerdings lässt eine zu schnelle Abbaurrate nicht genügend Zeit für die Knochenneubildung und eine zu langsame Abbaurrate bremst das Knochenwachstum ab [3]. Die genauen Mechanismen der zellvermittelten Resorption von MPCs und CMPCs sind nahezu unbekannt [6, 30, 32]. Aus diesen Gründen ist es wichtig, die Zell-Zement-Interaktionen und Resorptionsmechanismen von MPC und CMPC zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine In-vitro-Resorptionsuntersuchung von 3D-gedruckten Struvit- und Newberyit-bildenden Zementen der allgemeinen stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x = 0; 0,25; 0,75$) mit humanen osteoklastenähnlichen Zellen durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, inwieweit humane Osteoklasten am Abbauprozess dieser Keramiken beteiligt sind sowie die Einflussfaktoren auf das Differenzierungs- und Resorptionsverhalten der Osteoklasten beurteilt. Die zentrale Hypothese war, ob das Ca/Mg-Verhältnis zur Steuerung der zellulären Resorptionsrate von Struvit- und/oder Newberyit-bildenden Zementen genutzt werden kann.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis der zellulären CMPC- und MPC-Resorption leisten, damit die Untersuchungsmethoden und das Materialdesign der Zemente weiter optimiert sowie das In-vivo-Verhalten besser vorhergesagt werden können. Mittel- bis langfristig soll eine Anwendung von 3D-gedruckten magnesiumhaltigen Zementimplantaten in der Veterinär- und Humanmedizin realisiert werden.

2 Hintergrundwissen und Kenntnisstand

2.1 Natürliches Knochengewebe

Der Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das sich im Laufe des gesamten Lebens ständig umbaut [47]. Es wird geschätzt, dass sich das Skelett eines Erwachsenen alle 10 Jahre vollständig regeneriert [48]. Dieser Prozess wird als *Bone remodeling* bezeichnet. Dieser wiederholte Umbau auf zellulärer Ebene beeinflusst die Formgebung des Skeletts sowohl während des Wachstums als auch danach [49]. Dies ist notwendig, um durch Belastung verursachte Mikrorisse zu beseitigen und den Knochen gemäss des Wolff'schen Transformationsgesetzes an die sich ständig ändernden Anforderungen und Belastungen anzupassen [50]. Der Prozess der Knochenbildung und -resorption findet in einer funktionellen und anatomischen Struktur statt, die als multizelluläre Grundeinheit (*Basic multicellular unit* (BMU) oder *Bone remodeling unit* (BRU)) bezeichnet wird [55]. Dabei erfährt die Knochenmatrix eines BMU einen schnellen Abbau durch die Osteoklasten (< 2 Wochen) und einen deutlich längeren Aufbau des Osteoids (nicht mineralisiertes organisches Knochengewüst) und dessen Mineralisierung durch die Osteoblasten (3–4 Monate) [50].

Als starres Skelett erfüllt der Knochen mehrere Funktionen: Er dient als Stützgerüst für den Körper und schützt gleichzeitig die inneren Organe wie Gehirn, Lunge, Herz und Rückenmark. Die Knochenstrukturen bieten der Skelettmuskulatur Ansatz- und Ursprungspunkte und erleichtern so die Fortbewegung. Zusammen mit den Nebenschilddrüsen, dem Darmsystem und den Nieren ist der Knochenumbau ein wesentlicher Bestandteil der Mineralienhomöostase und dient als Speicher von Calciumionen (Ca^{2+}) und Phosphationen (PO_4^{3-}), aber auch von Natrium- und Magnesiumionen (Mg^{2+}) [47, 49].

2.1.1 Hierarchieebenen

Aus materieller Sicht ist Knochen ein komplexer Verbundwerkstoff, der sowohl anorganische als auch organische Verbindungen enthält und in der lebendige Zellen eingebettete sind [49]. Eine detaillierte chemische Zusammensetzung des Knochens ist in der Tabelle 2.1 enthalten. Bemerkenswert ist, dass Knochen und Zähne fast 99 % des Calciums und etwa 85 % des Phosphors des gesamten Körpers speichern. Dieses entspricht einer Gesamtmasse von ca. 2 kg bei einem durchschnittlichen Menschen [49].

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der anorganischen Komponenten und des organischen Anteils von Knochen erwachsener Menschen. Aufgrund der großen Unterschiede, die bei biologischen Proben festgestellt wurden, werden in diesen Fällen typische Werte angegeben. ^a geaschte Proben; ^b ungeaschte Proben; HA: Hydroxylapatit. Die Verwendung und Modifizierung dieser Tabelle (Copyright ©) aus [56] erfolgt mit freundlicher Genehmigung des MDPI-Verlags.

Zusammensetzung (Gew.-%)	Knochen (Gew.-%)	HA (Gew.-%)
Calcium (Ca) ^a	34,8	39,6
Phosphor (P) ^a	15,2	18,5
Natrium ^a	0,9	–
Magnesium ^a	0,72	–
Kalium ^a	0,03	–
Carbonat (CO ₃ ²⁻) ^b	7,4	–
Fluorid ^a	0,03	–
Chlorid ^a	0,13	–
Pyrophosphat (P ₂ O ₇ ⁴⁻) ^b	0,07	–
Gesamt anorganisch ^b	65	100
Gesamt organisch ^b	25	–
Wasser ^b	10	–

Der Knochenaufbau lässt sich vorzugsweise durch sieben hierarchische Organisations-ebenen nach Weimer und Wagner (1998) [57] beschreiben, die in der Abbildung 1 illustriert sind.

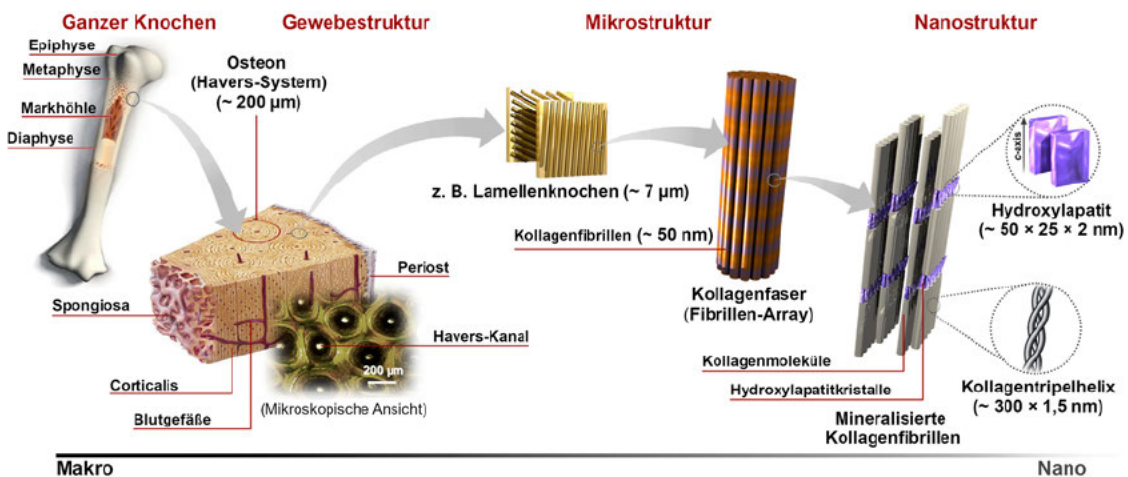


Abbildung 1: Hierarchische Organisationsebenen des Knochens. Ausgehend von den ganzen Knochen werden die Gewebe-, Mikro- und Nanostrukturen des Knochens und ihre ungefähren Dimensionen dargestellt. Die Verwendung und Modifizierung dieser Abbildung (Copyright ©) aus [58] erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ebene 1: Hauptkomponente. Im menschlichen Körper werden die Hartgewebe aus Calciumphosphat (CaP) gebildet und liegen strukturell hauptsächlich in Form von schwach kristallinem, nichtstöchiometrischem *calciumdefizienten Hydroxylapatit* (CDHA) vor, der u. a. Natrium, Kalium, Magnesium und Carbonate enthält. Häufig wird er als *biologischer Apatit*, *Bioapatit* oder *Dahlit* bezeichnet [22]. Zu Beginn der Calcifizierung ist der relative Magnesiumgehalt in den Apatitkristalliten erhöht und nimmt zunehmend ab, was zu erhöhter Kristallinität und Stabilität führt [6, 59]. Die Knochenkristalle sind immer plattenförmig, mit durchschnittlichen Längen und Breiten von 50×25 nm und einer Dicke von 2–4 nm [49, 57, 60].

Weitere Hauptkomponenten sind Kollagenfibrillen vom Typ I. Jede Fibrille besteht aus drei etwa 1000 Aminosäuren langen Polypeptidketten, die zu einer Tripelhelix zusammengewickelt sind und eine zylindrische Form mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 1,5 nm und einer Länge von 300 nm aufweisen [57]. Des Weiteren enthält die Knochenmatrix 200 oder mehr nicht-kollagenartigen Proteinen [61]. Dazu zählen beispielsweise Osteonektin, Osteocalcin und Osteopontin. Ihre Funktionen sind vielschichtig: Sie beeinflussen u. a. die Mineralisierung der Knochenmatrix durch die Hydroxylapatit(HA)-Kristallinität, die Bildung von Kollagenfibrillen und die Zell-Matrix-Interaktionen sowie die Regulation der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, was sich im Umbauprozess des Knochens widerspiegelt (*Bone remodeling*) [62]. Wasser ist ein weiterer Hauptbestandteil des Knochens und befindet sich innerhalb der Fibrillen und in den Zwischenräumen [57]. Seine Bedeutung ist für die mechanischen Knocheneigenschaften nicht zu unterschätzen [63, 64].

Ebene 2 und 3: Mineralisierte Kollagenfibrillen und Kollagenfasern (Fibrillen-Array). Die plättchenförmigen Knochenkristalle sind parallel in die Kollagenfibrillen eingelagert [49]. Diese wachsen weiter und komprimieren die Tripelhelix [57]. Die auf diese Weise mineralisierten Kollagenfibrillen sind fast immer in Kollagenfasern (Fibrillen-Arrays bzw. -Bündeln) organisiert und entlang ihrer Länge ausgerichtet [57].

Ebene 4: Organisationsmuster der Fibrillen-Arrays. Die Anordnung der Fibrillen in dieser vierten Ebene kann in verschiedenen Mustern organisiert sein, sodass je nach funktionellen Anforderungen verschiedene knochenähnliche Strukturen gebildet werden können. Diese Strukturen werden in die Materialfamilien des Knochens eingeordnet [57].

Im ersten Muster sind die Fibrillen-Arrays parallel angeordnet, die eine anisotrope Verlaufsform haben und unter Belastung in bestimmte Richtungen ausgerichtet werden. Sie

bilden somit eine Art mineralisierte Sehnen und finden sich z. B. an der Befestigungszone zwischen der Knochenoberfläche und dem Zahn (Sharpey'sche Fasern) [57, 65].

In einem weiteren Muster sind die Fibrillen-Arrays locker gepackt und willkürlich ausgerichtet, weshalb es auch als *geflochtener Knochen* (Geflechtknochen) bezeichnet wird. Diese räumliche Anordnung wird relativ schnell gebildet und während des Wachstums oder der Reparatur durch andere Knochenarten, meist Lamellenknochen, ersetzt [49, 57].

Das „*sperrholzartige Muster*“ ist gekennzeichnet durch Gruppen von parallelen Fibrillen-Arrays innerhalb einer Schicht. Die einzelnen Schichten liegen getrennt aber parallel zueinander, wobei die Fibrillenbündel in den einzelnen Schichten unterschiedlich orientiert sind. Die einfachsten sperrholzartigen Strukturen sind in abwechselnden orthogonal ausgerichteten Schichten aufgebaut und bilden das grundlegende Strukturmuster des Zahnzements. Ein deutlich komplexeres Muster wird durch den lamellären Knochen (Lamellenknochen) gebildet: Die einzelnen Schichten sind unterschiedlich dick und oft in einer gedrehten Anordnung, wobei sich die Grundeinheiten wiederholen. Dies spiegelt die Anforderung wider, dass Lamellenknochen den Druckkräften in viele Richtungen standhalten muss [49, 57].

Das Muster der *radialen Fibrillenarrays* ist charakteristisch für das Dentin: Die Fibrillen-Arrays befinden sich fast alle in der Ebene parallel zur Oberfläche der Pulpahöhle. Innerhalb dieser Ebene sind die Fibrillenbündel jedoch meist zufällig oder schlecht orientiert. Die Tubuli verlaufen senkrecht zu den Kollagenfibrillenebenen [57].

Ebene 5: Osteone (Havers-System). Im Gegensatz zu anderen mineralisierten Geweben, wie Dentin und Zement, durchläuft der Knochen einen kontinuierlichen Umbauprozess (*Bone remodeling*). Dieser Prozess wird von spezialisierten Zellen durchgeführt: Während die Osteoklasten große Tunnel „bohren“, füllen die Osteoblasten diese mit zwiebelartigen Lamellenschichten wieder auf und verbleiben als Osteozyten im Knochen. Der Aufbauprozess stoppt, sobald der Tunnel fast vollständig gefüllt ist, sodass in der Mitte ein schmaler Kanal (Havers-Kanal) zurückbleibt, der Blutgefäße, Bindegewebsfasern und -zellen sowie gelegentlich Nervenfasern enthält. Diese Einheit wird als Osteon bezeichnet. Die Havers-Kanäle sind durch senkrechte Querverbindungen (Volkmann-Kanäle) miteinander verbunden. Die Zwischenräume der Osteone sind durch die Reste der alten Osteonlamellen ausgefüllt und werden als Schaltlamellen bezeichnet [49, 57, 66].

Ebene 6: Corticalis und Spongiosa. Im Allgemeinen bedeckt die relativ dichte äußere Knochenschicht (Corticalis, Substantia corticalis, Substantia compacta) die inneren trabekulären Knochenstrukturen (Spongiosa, Substantia spongiosa, trabekuläres System). Die trajektorische Anordnung der Spongiosa ist der mechanischen Belastung des Knochens angepasst, sodass bei einer geringen Knochenmasse ein hohes Maß an Stabilität erreicht wird. Dies ist das *Prinzip der Leichtbauweise* des Knochens. Ausgewählte physikalische Eigenschaften der Corticalis und der Spongiosa sind in der Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Ausgewählte physikalische Eigenschaften der Corticalis und der Spongiosa.

	Corticalis	Spongiosa
Druckfestigkeit	133–193 Mpa [67]	0,6–9,3 Mpa [67]
Zugfestigkeit	133–150 Mpa [67]	0,92–5,38 Mpa [68]
Elastizitätsmodul	15–20 Gpa [69]	0,1–2 Gpa [69]
Porosität	10–30 % [69]	30–90 % [69]
Porengröße	1–100 µm [49]	200–400 µm [49]
Porenkonnektivität	–	55–70 % [49]

Ebene 7: Ganze Knochen und Knochenmark. Entsprechend der Form lassen sich die Knochen in *lang*, *kurz*, *platt* und *unregelmäßig* kategorisieren: Lange Knochen (Röhrenknochen) sind von röhrenförmiger Bauweise (z. B. Femur). Der zentrale Schaft wird *Diaphyse* genannt und hat eine Markhöhle, die mit Knochenmark gefüllt ist. Die Knochenenden werden als *Epiphysen* bezeichnet und bestehen in der Regel aus kompakten und spongiösen Knochenstrukturen. Der Abschnitt zwischen der Diaphyse und der Epiphyse wird als *Metaphyse* bezeichnet. Kurze Knochen (z. B. Fingerknochen) ähneln im Aufbau den langen Knochen, haben aber keine Markhöhle. Plattenknochen (z. B. Schädel- und Rippenknochen) bestehen aus zwei kompakten Knochenschichten mit einer spongiösen Zwischenzone. Unregelmäßig geformte Knochen (z. B. Wirbelknochen) passen in keine der oben genannten Kategorien [49].

Die im Inneren des Knochens gebildeten Hohlräume (Spongiosa, Markhöhle) enthalten das weiche Knochenmark, das in rotes und gelbes Mark unterteilt wird. Nur im roten Knochenmark findet die Neubildung der Blutzellen statt (*Hämatopoiese*). Hier ist der Ursprung aller Blutzellen (Lymphozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten) aus einer Population *multipotenter hämatopoetischer Stammzellen* [66].

2.1.2 Zellen des Knochens

Das menschliche Erwachsenenskelett hat etwa 1–2 Millionen aktive BMUs, die zeitlich und räumlich getrennt voneinander funktionieren [55]. Der Umbauprozess umfasst die koordinierte Aktion von vier verschiedenen Arten von Knochenzellen: Osteoblasten, Saumzellen (*Bone lining cells*), Osteozyten und Osteoklasten.

2.1.2.1 Osteoblasten

Die *mesenchymale Stammzellen* kommen normalerweise in Knochenmark, Blut, Dermis und Periost vor und sie sind multipotent, d.h. ihre Nachkommen sind unter anderem in der Lage, Knorpel-, Fett- und Muskelzellen zu bilden. Aus diesen multipotenten mesenchymalen Stammzellen entwickeln sich auch die Osteoblasten (knochenbildende Zellen) [70]. Osteoblasten sind kubische Zellen und machen 4–6 % der gesamten residenten Knochenzellen aus [71]. Als polarisierte Zellen sezernieren die Osteoblasten Osteoid (nicht mineralisierte Grundsubstanz des Knochens) in Richtung der Knochenmatrix. Am Ende eines Knochenaufbauzyklus wird eine Subpopulation von Osteoblasten zu Osteozyten, die in die Knochenmatrix eingebettet werden. Dieser Vorgang geht mit morphologischen Veränderungen der Zellen einher, einschließlich die Verkleinerung von runden Osteoblasten [71]. Darüber hinaus produzieren die Osteoblasten RANKL und OPG, die die Osteoklastendifferenzierung regulieren [47] (siehe Kapitel 2.1.3).

2.1.2.2 Saumzellen (*Bone lining cells*)

Die Saumzellen haben ein dünnes und flaches Profil und sind ruhende Osteoblasten. Sie bedecken die Knochenoberflächen, an denen weder Knochenabbau noch Knochenbildung stattfindet [72]. Dazu verhindern sie eine direkte Interaktion zwischen Osteoklasten und Knochenmatrix, wenn keine Knochenresorption stattfinden soll [71]. Darüber hinaus scheinen sie die Knochenoberfläche für Osteoblasten vorzubereiten, indem sie die von den Osteoklasten in den Howship-Lakunen hinterlassenen Kollagenfibrillen umhüllen und abbauen [73]. Die genauen Funktionen der Saumzellen sind allerdings noch nicht vollständig geklärt [71].

2.1.2.3 Osteozyten

Osteozyten, die 90–95 % aller Knochenzellen ausmachen, sind die häufigsten und mit einer Lebensdauer von bis zu 25 Jahren die langlebigsten Knochenzellen [74]. Die Osteozyten befinden sich in Lakunen, die von mineralisierter Knochenmatrix umgeben sind,

und weisen eine dendritische Morphologie auf [75]. Ihre zytoplasmatischen Fortsätze verlaufen in kleinen Tunneln, den sogenannten *Canaliculi*, und bilden das *lakuno-kanalikuläre System* [71]. Diese zytoplasmatischen Fortsätze sind über *Gap Junctions* mit anderen benachbarten Osteozyten und den Fortsätzen von Osteoblasten und Saumzellen auf der Knochenoberfläche verbunden und ermöglichen den interzellulären Transport von Signalmolekülen zwischen diesen Zellen [76]. Darüber hinaus wirken die Osteozyten über das *lakuno-kanalikuläre System* als Mechanosensoren, da ihr miteinander verbundenes Netzwerk die Fähigkeit besitzt, mechanische Belastungen zu erkennen und so eine Anpassung des Knochens an die Kräfte einzuleiten [75].

2.1.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind polynukleäre Riesenzellen mit der einzigartigen Fähigkeit, Knochengewebe zu resorbieren [55]. Sie werden aus hämatopoetischen Vorläuferzellen gebildet, die im Knochenmark und im peripheren Blut zu finden sind. Die Osteoklastenvorläufer im peripheren Blut sind die CD14⁺/CD16⁻-Monozyten-Untergruppe [77, 78]. Sie differenzieren entlang der Monozyten/Makrophagen-Linie und werden durch Zell-Zell-Fusion der mononukleären Vorläuferzellen zu polynukleären Zellen. Der Haupteffekt der Zellfusion besteht offenbar darin, die Zellgröße der Osteoklasten zu erhöhen, sodass sie größere Bereiche des Knochengewebes resorbieren können. Dazu pumpen sie Säure in spezielle Resorptionsgruben, um Knochenminerale aufzulösen und ein optimales Umfeld für den enzymatischen Abbau der demineralisierten extrazellulären Knochenmatrix zu schaffen [3, 47]. Normale humane Osteoklasten haben eine Größe von 50–100 µm [66] und enthalten zwischen 3 und 20 Kerne pro Zelle [79], in der Regel aber bis zu 10 Kerne [66]. Im Vergleich dazu haben Monozyten einen Durchmesser von 15–20 µm [66] und mononukleäre Makrophagen etwa 21 µm [80].

Wie in der Abbildung 2 dargestellt, kann die Zellmembran des polarisierten Osteoklasten während der Resorptionsphase in drei Domänen unterteilt werden: die basolaterale Membran, apikale Membran mit Faltensaum (*Ruffled boarder*) und die Versiegelungszone (*Sealing zone*). Die *Sealing zone* umfasst die *Clear zone* und die *Sealing membrane*, die in den Podosomen enthalten sind. Die *Sealing membrane* besteht aus den Adhäsionsstrukturen, die ringförmig organisiert sind. Dazu gehören die Transmembranproteine *Integrine*, deren extrazelluläre Komponenten an die Knochenmatrix binden (siehe unten). Im Zytoplasma, das an die *Sealing membrane* angrenzt, kommen nur wenige Zellorganellen vor, weshalb es als *Clear zone* bezeichnet wird [3, 81].

Neben der *Sealing membrane* befindet sich an der apikalen Membran das *Ruffled border*, das eine Anordnung von Plasmamembranfalteln darstellt. In ihrer unmittelbaren Nähe befinden sich viele Mitochondrien, die für den Energieaufwand der Protonenpumpen notwendig sind, sowie Lysosomen und große Vakuolen [66]. Wandernde Osteoklasten hingegen weisen keinen *Ruffled border* auf [82]. Dem *Ruffled border* gegenüberliegende Seite wird als *basolaterale Membran* bezeichnet und beinhaltet die *funktionale sekretorische Domäne* (FSD) [81] (Abbildung 2).

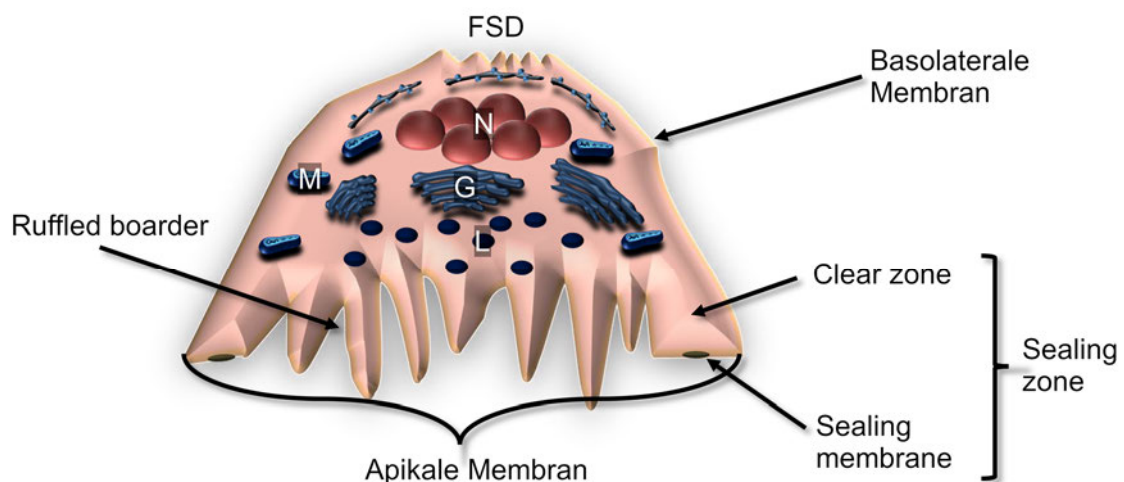


Abbildung 2: Unterteilung des Osteoklasten in drei Domänen und eine Auswahl seiner Zellorganellen. Schematisch dargestellt sind die basolaterale Membran mit *funktionaler sekretorischer Domäne* (FSD), die apikale Membran mit *Ruffled boarder* und die *Sealing zone*, die sich aus *Clear zone* und *Sealing membrane* zusammensetzt. Beispielhaft sind die Golgi-Apparat (G), Lysosomen (L), Mitochondrien (M) und Nuklei (N) dargestellt. Die Verwendung und Modifizierung dieser Abbildung (Copyright ©) aus [81] erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Die Resorption von Knochengewebe findet in einer definierten Kaskade statt: Zunächst wandert der Osteoklast an die Resorptionsstelle, verankert sich an der Knochenoberfläche, löst sowohl anorganische als auch organische Knochenbestandteile auf, trennt sich wieder ab und wandert zur nächsten Resorptionsstelle oder geht in die Apoptose [3].

Über das Transmembranprotein $\alpha_5\beta_3$ -Integrin erzeugen die Osteoklasten eine starke Adhäsion an Arg-Gly-Asp-(RGD)-haltige Proteine (z. B. Osteopontin, Vitronectin, Fibrinogen) und haben eine weniger starke Adhäsion an das Typ-I-Kollagen [83]. Die extrazelluläre Calcium-Konzentration ist u. a. ein wichtiger Faktor für die Bindungsaffinität der Integrine [84, 85]. Sobald das $\alpha_5\beta_3$ -Integrin aktiviert ist, geht seine zytoplasmatische Domäne über weitere Proteine eine funktionelle Verbindung mit dem filamentösen Aktin

(F-Aktin) des Zytoskeletts ein. Dadurch wird ein extrazelluläres Mikromillieu zwischen dem *Ruffled border* und der Knochenoberfläche erzeugt (Abbildung 3).

Der nächste Schritt ist die Einleitung der Säuresekretion. Die intrazellulären Protonen (und Hydrogencarbonationen) werden durch Katalyse von Wasser und Kohlendioxid mit Hilfe des zytosolischen Enzyms *Carboanhydrase II* erzeugt [81, 86]. Die H⁺-ATPasen transportieren die Protonen anschließend in die resorptive Mikroumgebung [87]. Der Cl⁻/HCO₃⁻-Antiporter in der basolateralen Membran verhindert die Alkalisierung des Zytoplasmas und bewirkt den Cl⁻-Zustrom. Der 2Cl⁻/1H⁺-Antiporter am *Ruffled border* sorgt für die Elektronenneutralität in der Zelle [81, 88]. Das Ergebnis dieser Ionentransportereignisse ist die Sekretion von HCl in die resorptive Mikroumgebung, was zu einem pH-Wert unter 3 führt [89]. Dadurch lösen die Osteoklasten die anorganische Komponente des Knochens (Calciumphosphatkristalle) auf und es entsteht eine Resorptionslakune, die sogenannte Howship-Lakune [90] (Abbildung 3).

Die Ansäuerung der Howship-Lakune demineralisiert nicht nur die anorganische Knochenmatrix, sondern legt auch die organischen Bestandteile frei [81]. Die kollagene Knochenmatrix wird durch zwei Gruppen von Enzymen aufgelöst: die Matrix-Metalloproteinasen und lysosomale Kathepsine [91]. Die Protease *Cathepsin K* wird in die Resorptionslakune sezerniert, wo sie bei saurem pH-Wert das Kollagen I abbaut [91]. Die *Tartrate-resistente saure Phosphatase* (TRAP) befindet sich sowohl intrazellulär in transzytotischen Vesikeln als auch in der Resorptionslakune [81, 92]. Es werden zwei Isoformen der TRAP unterschieden, TRAP 5a und TRAP 5b, wobei lediglich die TRAP 5b von Osteoklasten produziert wird [93]. Ihre genaue Rolle ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [81]. Es wird jedoch vermutet, dass während des Resorptionsprozesses die endozytierten Abbauprodukte mit Vesikeln verschmelzen, die die TRAP enthalten. Diese wiederum produzieren reaktive Sauerstoffspezies und degradieren die Matrixabbauprodukte weiter [92] (Abbildung 3).

Wie bereits erwähnt, endozytieren die Osteoklasten die Abbauprodukte aus der Resorptionslakune über den *Ruffled border* und transportieren sie per Tranzytose in die *funktionelle sekretorische Domäne* (FSD) der *basolateralen Membran*, wo sie in den extrazellulären Raum freigesetzt werden [94, 95]. Im letzten Schritt der Resorption wird die Zell-Matrix-Verbindung gelöst, die Zelle bewegt sich an eine andere Stelle und ein neuer Resorptionszyklus beginnt [3].

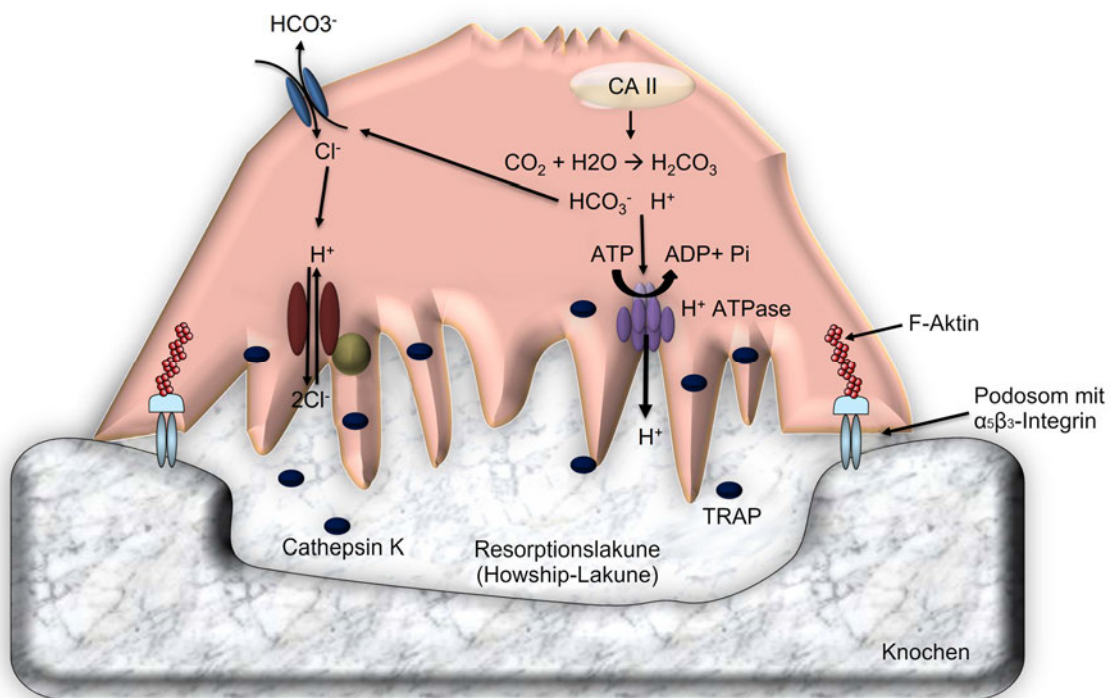


Abbildung 3: Resorbierender Osteoklast und der Mechanismus der Säuresekretion. Schematisch dargestellt sind Teile des Adhäsionskomplexes (F-Aktin und $\alpha_5\beta_3$ -Integrin), die molekularen Wege der Säuresekretion in die Resorptionslakune sowie die Freisetzung der Enzyme Cathepsin K und Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP). CA-II: Carboanhydrase II. Die Verwendung und Modifizierung dieser Abbildung (Copyright ©) aus [81] erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

2.1.3 RANKL/RANK/OPG-System und M-CSF

Die Entdeckung des RANKL/RANK/OPG-Systems Mitte der 1990er Jahre führte zu großen Fortschritten im Verständnis der Regulationsmechanismen des Knochenumbaus (*Bone remodeling*) [96]. Viele proinflammatorische Zytokine und knochenresorbierende Faktoren wie PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $\text{TNF-}\alpha$, PGE_2 und Interleukine ($\text{IL-1}\beta$, $\text{IL-1}\alpha$, IL-11) induzieren die Expression des membrangebundenen Oberflächenproteins *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) in den Osteoblasten [47, 97, 98]. Der ebenfalls von Osteoblasten produzierte *Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor* (M-CSF, CSF-1) [99] oder *Interleukin 34* (IL-34) [100] stimulieren den CSF-1-Rezeptor auf mononukleären Osteoklastenvorläufern, die zur Monozyten/Makrophagen-Linie gehören. Durch diese Stimulation exprimieren die mononukleären Vorläufer das Transmembranprotein *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK) [101], das mit RANKL verwandt ist [97]. Durch die Bindung des osteoblastischen RANKL an RANK werden verschiedene intrazelluläre Transkriptionswege in Osteoklastenvorläufern und reifen Osteoklasten stimuliert. Dies führt u. a.

zur Fusion polynukleärer Riesenzellen, zur Transkription mehrerer osteoklastenspezifischer Gene (z. B. TRAP, Cathepsin K, Calcitonin-Rezeptor), zur Erhöhung der Aktivität reifer Osteoklasten und zur Hemmung der Osteoklasten-Apoptose [47, 53]. Dementsprechend ist M-CSF zusammen mit RANKL ausreichend, um aktive und knochenresorbierende Osteoklasten aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (z. B. Monozyten) *in vitro* zu generieren, auch ohne die Anwesenheit anderer Zellen (z. B. Osteoblasten) [102]. Der Zytokinrezeptor *Osteoprotegerin* (OPG), der ebenfalls von Osteoblasten produziert wird, fungiert als Scheinrezeptor. Er wird in der Literatur oft als „Lockvogel“-Rezeptor bezeichnet [97]. Dies liegt daran, dass OPG auch an RANKL bindet, die RANK-RANKL-Interaktion blockiert und so die Osteoklastogenese hemmt oder verhindert (RANKL-Antagonist) [103]. Für eine gesunde Knochenstruktur ist unter anderem ein ausgewogenes RANKL/OPG-Verhältnis unerlässlich [104, 105].

2.2 Knochendefekte kritischer Größe (Critical-sized bone defects)

Der menschliche Knochen ist zwar in der Lage, sich durch den Prozess der Primär- oder Sekundärheilung selbst zu regenerieren oder zu reparieren, aber er ist nicht fähig, ausgedehnte Defekte, die sogenannten *Knochendefekte kritischer Größe* (*Critical-sized bone defect*, CSD), ohne bleibende Schäden zu heilen [4-6]. Per Definition heilt ein CSD nicht spontan während der Lebenszeit des Patienten [106] oder die Bildung neuen Knochens macht weniger als 10 % der betroffenen Bereiche aus [8]. Die Folge ist häufig das Einwachsen von fibrösem Gewebe, Faserknorpel oder hyalinem Knorpel in den Knochendefekt, was unweigerlich zu einer Pseudarthrose [107] und damit zu biomechanischer Instabilität führt. In der Literatur gibt es jedoch keinen Konsens über die Größe, ab der ein Defekt als kritisch angesehen werden kann [108]. Allerdings scheint ein zirkumferentieller Knochenverlust ab etwa 2,5 cm bei Tibiafrakturen einen schlechten Heilungsverlauf zu haben [109, 110]. Die Knochendefekte können als Folge eines Traumas, einer Infektion mit Débridement, einer Tumorsektion oder von Fehlbildungen in der Entwicklung auftreten [5, 7].

2.2.1 Prädisponierende Faktoren

Der Zustand des Weichgewebes, das den Knochendefekt umgibt, und seine Vaskularität spielen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von CSD [5, 111]. So kann sich beispielsweise Rauchen negativ auf die Osteoblastenfunktion auswirken, und Nikotin kann gefäßverengende und thrombenaktivierende Wirkungen haben. Dies führt zu hypoxiefördernden Effekten und zur Hemmung des Metabolismus [112]. Alkoholmissbrauch

kann toxische Auswirkungen auf die Osteoblastenaktivität haben, was zu einer Hemmung der Zellproliferation und Maldiﬀerenzierung von mesenchymalen Zellen im Reparaturgewebe führt. Dies ist u. a. gekennzeichnet durch eine reduzierte kalzifizierte Knochenmatrix und Reparaturgewebe mit geringerer Festigkeit [113].

Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, *chronisch obstruktiver Lungenerkrankung*, *Diabetes mellitus* und *systemischem Lupus erythematosus* werden viele der proinflammatorischen Zytokine (IL-1, IL-6, TNF) freigesetzt und die Osteoklastogenese durch den RANKL/RANK-System stimuliert [114]. Dies führt daher zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenresorption und -bildung und einer gestörten Knochenheilung.

Weitere Faktoren wie fortgeschrittenes Alter, venöse Stase, Bestrahlung, Adipositas, Mangelernährung, periphere Gefäßerkrankungen und Hypothyreose können die Knochenheilung negativ beeinflussen. Auch bestimmte Medikamente wie NSAR, Steroide, Phenytoin, Ciprofloxacin, Antikoagulantien [5] sowie Antiresorptiva [115] können die Heilungszeit verlängern und sich negativ auf die Knochenheilung auswirken.

2.2.2 Behandlungsstrategien

Bis heute zählen CSD zu den am schwierigsten zu behandelnden Erkrankungen. Große segmentale Defekte hatten in der Vergangenheit eine schlechte Prognose und mussten oft amputiert werden [5]. Gegenwärtig ist eine Vielzahl von therapeutischen Ansätzen zur Behandlung ausgedehnter Defekte bekannt.

Bei Defekten von weniger als 5 cm Größe mit gut vaskularisierten, gesunden Empfängerstellen und ohne strukturelle Instabilität wird derzeit ein spongiöses Autograft empfohlen [5, 116]. Das spongiöse Autograft wird vorzugsweise aus dem Beckenkamm gewonnen, obwohl dies nach der Entnahme eine Komplikationsrate von etwa 19 % verursacht, einschließlich Infektionen, chronischer Schmerzen und sensorischer Störungen [117]. Bei segmentalen Knochendefekten von mehr als 5 cm umfassen die therapeutischen Möglichkeiten spongiöse Allografts, freie mikrovaskuläre Knochentransplantate (z. B. Fibulatransplantat), Distractionsosteogenese und die Technik der induzierten Membran (Masquelet-Technik) [5].

Im Gegensatz zu den nicht vaskularisierten Knochentransplantaten werden vaskularisierte Transplantate sowohl durch die Anastomose der zuführenden Arterie als auch

durch das umgebende Blutgefäßsystem versorgt. Diese Aufrechterhaltung der Blutversorgung liefert den im Transplantat enthaltenen Zellen Nährstoffe und hält die Knochenremodellierungsfähigkeit aufrecht, selbst wenn die Blutversorgung an der Empfängerstelle unzureichend ist [5, 118].

Weitere Informationen über die autogene, allogenen und xenogenen Transplantate sind im Kapitel 2.3.2 aufgeführt.

In den 1950er Jahren begann Ilizarov mit externen Fixationsdesigns zu experimentieren und entdeckte per Zufall die **Distraktionsosteogenese**, als er die Kallusbildung bei einem Patienten beobachtete, der seinen Rahmen irrtümlich distrahiert hatte, anstatt ihn zu komprimieren [119]. Gegenwärtig stehen für die Distraktionsosteogenese sowohl interne als auch externe Distraktoren zur Verfügung [120]. Der grobe Ablauf der Distraktionsosteogenese ist wie folgt: Zunächst wird eine Kortikotomie in gesundem Knochen in einem bestimmten Abstand von der Defektstelle vorgenommen, um ein freies Knochensegment zu schaffen. Anschließend folgt die Latenzperiode von 5–7 Tage. Dies ist die Zeit nach der Kortikotomie bis zur Distraction. Als nächstes folgt die Distraktionsperiode, in der allmähliche Distraction von 1 mm pro Tag erforderlich ist. Die Konsolidierungsphase beginnt, sobald das Knochenfragment den Defekt schließt. Während dieser Zeit überbrückt und mineralisiert der neue Knochen im Distractionsspalt. Der Distraktor wird *in situ* belassen, damit der neu gebildete Knochen sich konsolidieren und stark genug werden kann, um einer Formveränderung oder einer Fraktur standzuhalten [5, 121]. Diese gut etablierte Technik hat jedoch viele Nachteile: Je nach Größe des ursprünglichen Defektes kann die Behandlungszeit Jahre dauern und die Mitarbeit des Patienten ist stark gefordert. Der Distraktor stellt eine Belastung für den Patienten dar und die Eintrittsstellen können sich infizieren. Zudem wird auch das umliegende Gewebe gezogen, was zu erheblichen Schmerzen führen kann [5].

Im Jahr 2000 berichtete Masquelet erstmals über die Ergebnisse einer neuen Technik, die er als „**induzierte Membran**“ bezeichnete und mit der er diaphysäre Röhrenknochendefekte im Bereich von 4 bis 25 cm rekonstruierte [122]. Die Rekonstruktion des Defektes wird in zwei verschiedenen Operationsschritten durchgeführt: Der erste Schritt besteht aus einem Weichteil- und KnochenDébridement und der Implantation eines Polymethylmethacrylat-Zement-Spacers an der Defektstelle sowie gegebenenfalls der Stabilisierung der Knochenfragmente [123]. Der Zement-Spacer bleibt 6 bis 8 Wochen *in*

situ und bietet mehrere mechanische und biologische Vorteile: Er erhält den Knochenraum für das nachfolgende Transplantat sowie die Weichteilspannung. Er verhindert auch die Bildung von Hämatomen und das Einwachsen von fibrösen Geweben in den Knochendefekt. Der entscheidende Punkt ist, dass der Zement-Spacer eine Fremdkörperreaktion auslöst und die Bildung einer fibrösen Membran um den Spacer herum induziert [5]. Diese induzierte Membran ist gut vaskularisiert, enthält geweberenerative Mediatoren (z. B. BMP-2, VEGF, SDF-1) und ähnelt dem Periost [124]. Nachdem die vollständige Heilung des Weichgewebes abgeschlossen ist, wird der Spacer im zweiten Schritt entfernt, wobei die induzierte Membran an ihrer Stelle erhalten bleibt. Die Kavität wird mit einem spongiösen Autotransplantat gefüllt, das aus dem Beckenkamm entnommen wird. Wenn die Menge des Autotransplantats nicht ausreicht, kann xenogenes Knochenersatzmaterial (KEM) beigemischt werden [123]. Obwohl diese Technik eine kurze Behandlungsdauer und insgesamt wenig Komplikationen aufweist und vergleichsweise einfach gilt, wurde über Komplikationen wie Wunddehiszenz, Wundinfektionen, Nekrose, Knochenexposition und Refrakturen berichtet [125, 126]. Darüber hinaus sind zwei Operationen an der Defektstelle und gegebenenfalls eine Operation am Beckenkamm erforderlich. Diese Technik wird hauptsächlich bei Röhrenknochendefekten angewandt, obwohl es vereinzelte Berichte über Unterkieferrekonstruktionen mit vielversprechenden Ergebnissen vorliegen [120, 127].

Es wurden mehrere Techniken beschrieben, von denen jede ihre eigenen Vorteile hat, aber auch Nachteile und mögliche Komplikationen mit sich bringt. Aus diesem Grunde wird in jüngster Zeit viel an **Tissue-Engineering**-Strategien geforscht, um neue Regenerationsmethoden mit den als wichtig erachteten Aspekten wie Osteokonduktion, Osteoinduktion und Zellen mit osteogenem Potenzial zu etablieren [5] (Näheres dazu im Kapitel 2.3.2.4).

2.3 Knochenersatzmaterialien

Die Idee der KEM zielt darauf ab, die Selbstheilungskräfte des Körpers zu unterstützen, bis das Gerüst (Scaffold) abgebaut ist und das neu gebildete Knochengewebe seinen Platz einnimmt [128]. Die Umsetzung dieser Idee mit synthetischen KEMs stellt eine große Herausforderung in der regenerativen Medizin dar [12].

2.3.1 Anforderungen

Der körpereigene Knochen ist nach wie vor das beste und am häufigsten verwendete „Biomaterial“, weshalb er als Goldstandard gilt und als Leitfaden für die Entwicklung von KEMs dient. Allerdings ist seine Verfügbarkeit begrenzt [129]. Ein ideales *Tissue-Engineering*-Konstrukt sollte daher die folgenden Kriterien erfüllen:

Biokompatibilität. Es ist wichtig, dass die KEMs keine toxischen Auswirkungen auf den Organismus haben, wie z. B. karzinogene, mutagene oder teratogene Stoffe. Außerdem sollten sie keine Immunantwort auslösen, um induzierte Entzündungs- oder Abstoßungsreaktionen zu vermeiden [130, 131].

Bioresorption (bR). Die biologische Abbaubarkeit durch chemisch-physikalische Degradation (cD), zelluläre Resorption (zR) oder eine Kombination dieser Mechanismen wird im Allgemeinen als wichtige Voraussetzung für KEMs angesehen [25, 130]. Es gibt jedoch keinen allgemeingültigen Wert für die Abbaurate des Knochenersatzes [25], da sie von der Defektlokalisierung, der Defektgröße, dem Alter, dem Geschlecht und dem Gesundheitszustand des Patienten abhängt [3]. Die Abbaurate sollte jedoch der Osteogenese entsprechen, d. h. das KEM sollte nur so lange im Defekt verbleiben, bis es sukzessiv durch den neu gebildeten Knochen ersetzt wird (*Creeping substitution*) [128, 132]. Eine zu schnelle Abbau lässt nicht genügend Zeit für das Einwachsen von neuem Knochengewebe [3] und kann daher keine ausreichende mechanische Stabilität gewährleisten [133]. Zudem können zu hohe Konzentrationen der Abbauprodukte im Wundbett auftreten, was zu Zellschäden führen kann [134]. Ein zu langsamer Abbau hemmt dagegen die Knochenneubildung [3].

Mechanische Eigenschaften. Das ideale KEM sollte die mechanischen Eigenschaften wie Steifigkeit, Druckfestigkeit und Elastizitätsmodul des natürlichen Knochens imitieren (Tabelle 2.2). Ein zu steifes KEM kann beispielsweise zu einem postoperativen *Stress-Shielding*-Effekt und Implantatkomplikationen führen, während zu niedrige Druckfestigkeitseigenschaften nur in nicht lasttragenden Bereichen eingesetzt werden können oder eine zusätzliche Fixationsvorrichtung erfordern [135-137].

Mikroarchitektur. Das strukturelle Design der KEMs in Bezug auf Porosität, Porengröße, Porenform, Porenkonnektivität und Oberflächenrauheit scheint eine wichtige Schlüsselrolle für die gewünschten Eigenschaften zu spielen [131, 136, 138]: So wird beispielsweise durch eine Erhöhung der Porosität die Druckfestigkeit verringert [5, 139],

während die Bioresorbierbarkeit steigt [140]. Eine hochporöse Mikroarchitektur von etwa 200 µm ist für den Zelltransport und die Zellmigration notwendig und interkonnektierende Poren von 300–500 µm scheinen die Vaskularisierung des KEMs zu gewährleisten [139]. Sie erleichtert zudem das Einwachsen von Knochengewebe und fördert die Osteointegration [136]. Darüber hinaus sollte die Oberflächenporosität die Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung ermöglichen [131, 134].

Angiogenese. Ein ideales KEM soll die Angiogenese um das Material herum oder sogar innerhalb des Materials stimulieren [5]. Denn einer Osteogenese geht eine Angiogenese voraus [139]. Die Vaskularisierung ist somit entscheidend für die Heilung eines Defekts. Diese gewährleistet den Transport von Nährstoffen und Sauerstoff innerhalb des Gerüsts [11] und den Abtransport von Stoffwechselabfällen [139]. Die Aktivität der Endothelzellen und damit die Bildung eines vaskulären Netzwerkes kann z. B. durch die Dotierung des KEM mit angiogenen Substanzen (z. B. VEGF) gefördert werden [141]. Im Gegensatz dazu könnte eine fehlende Vaskularisierung zu Osteonekrose bzw. Sequesterbildung führen [139].

Osteoinduktion. Ein osteoinduktives KEM stimuliert mesenchymale Stammzellen, sodass sie sich zu Osteoblasten differenzieren und zur Knochenneubildung angeregt werden. Viele Wachstumsfaktoren wie BMPs, TGF-β oder IGF sind für diese Stimulation bekannt [70, 138].

Osteokonduktion. Diese Eigenschaft verleiht dem KEM die Funktion eines Gerüsts bzw. einer Leitschiene für das Einwachsen von Stammzellen, Blutgefäßen und Osteoblasten. Sie steht in engem Zusammenhang mit der Porositätseigenschaft und ist eine Voraussetzung für eine kraftschlüssige Verbindung mit dem Wirtsknochen und die Heilung einer CSD [138, 142].

Osteointegration. Diese Fähigkeit ermöglicht es dem KEM, sich ohne eine Zwischenschicht aus Bindegewebe direkt mit dem Wirtsknochen zu verwachsen [143].

Osteogenität. Unter Osteogenese wird die Bildung von neuem Knochen verstanden. Dies ist möglich, wenn das Implantat bzw. Transplantat lebensfähige Osteoblasten oder Osteoblastenvorstufen enthält und an der Implantatstelle neuer Knochen gebildet wird [9, 138].

Darüber hinaus sollte ein KEM sterilisierbar, lagerfähig, kostengünstig, reproduzierbar, skalierbar, einfach zu handhaben und in ausreichender Menge verfügbar sein [6, 9].

Kein heute verfügbares KEM vereinigt alle obengenannten Anforderungen.

2.3.2 Einteilung

Moderne KEMs werden in der Literatur oft nach ihrer Herkunft in autologe, allogene, xenogene und alloplastische Materialien eingeteilt, wobei die drei erstgenannten am häufigsten in der Orthopädie und für die Behandlung von CSD verwendet werden [6].

2.3.2.1 Autogene Knochentransplantate

Beim autogenen (autologen) KEM (Autograft, Autotransplantat) sind Spender und Empfänger dasselbe Individuum. Hierbei wird körpereigenes Knochengewebe mit lebenden Zellen übertragen, weshalb korrekterweise von einem autogenen Knochentransplantat anstelle von KEM oder Knochenimplantat gesprochen werden sollte [138, 144]. Weiterhin kann das autogene Transplantat in strukturelle (z. B. freies mikrovaskuläres Fibulatransplantat) und nicht-strukturelle (z. B. spongiöses Beckenkammtransplantat) Knochentransplantate unterteilt und je nach Indikation verpflanzt werden [5] (siehe Kapitel 2.2.2). Aufgrund seiner osteoinduktiven, osteokonduktiven, osteogenen, bioresorbierbaren und nicht immunogenen Eigenschaften sowie des fehlenden Risikos einer infektiösen Übertragung gilt das Autotransplantat derzeit als der Goldstandard [5, 8]. Jedoch bringt die Notwendigkeit einer zweiten Operation für die Patienten viele Nachteile mit sich: Sie sind zusätzlichen Komplikationsrisiken wie einer fehlgeschlagenen Anastomose, einer mikrovaskulären Thrombose, einer Wundinfektion, einer Wunddehiszenz und chronischen Schmerzen ausgesetzt. Darüber hinaus können nach einer Fibulatransplantation Knocheninstabilitäten, Knochenfrakturen, motorische und sensorische Funktionsstörungen auftreten [5]. Ein weiterer Problempunkt ist die begrenzte Verfügbarkeit des autogenen Knochens [4, 8], sodass bei größeren Defekten, insbesondere bei Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand, Kindern oder Schwerverletzten, eine Erweiterung des chirurgischen Traumas oft keine Option darstellt [9]. Mangels einer echten Alternative bleibt das autogene Transplantat für viele Kliniker die primäre Lösung bei CSD [25].

2.3.2.2 *Allogene Knochentransplantate*

Bei den allogenen KEM handelt es sich um genetisch nicht identischen Spender der gleichen Spezies. Dieses Material steht in gewünschten Mengen zur Verfügung und die Komplikationsrisiken an einer zweiten Operationsstelle sind ausgeschlossen [5]. Um die Übertragung potenzieller Infektionen und Abstoßungsreaktion zu minimieren, werden die allogene KEM einer Wärmebehandlung (z. B. Autoklavieren) oder Bestrahlung unterzogen. Bei diesem Verfahren werden die osteoinduktiven Proteine (z. B. BMP) meist inaktiviert, weshalb das KEM lediglich eine osteokonduktive Wirkung aufweist. Darüber hinaus kann die ursprüngliche Knochenstruktur verloren gehen, was die osteokonduktiven und mechanischen Eigenschaften vermindert [9]. Dennoch besteht ein Restrisiko, pathogene Bakterien (z. B. Staphylokokken, Streptokokken), Viren (z. B. Hepatitis-Viren, HIV) und Prionen zu übertragen sowie eine immunogene Abstoßungsreaktion auszulösen [5, 6, 9].

2.3.2.3 *Xenogene Knochenersatzmaterialien*

Im Fall der xenogenen KEM handelt es sich um eine Transplantation zwischen verschiedenen Spezies. In den meisten Fällen wird das Material von Rindern (*bovin*) oder Schweinen (*porcin*) gewonnen und steht in ausreichender Menge zur Verfügung. Nach der Deproteinisierung besteht das KEM aus natürlichem HA und hat somit eine rein osteokonduktive Funktion. Wie bei allogenen KEM kann das Risiko einer immunologischen Abstoßungsreaktion oder ein Pathogentransfer (z. B. Prionen von Rindern und *porcine endogene Retroviren* von Schweinen) nicht ausgeschlossen werden [10].

2.3.2.4 *Alloplastische Knochenersatzmaterialien*

Die alloplastischen KEMs sind synthetisch hergestellte Biomaterialien und haben in den letzten Jahrzehnten enorme Fortschritte in der Forschung erzielt [11]. Nach *Hench und Polak* (2002) können sie je nach ihren Eigenschaften und medizinischen Zwecken in drei Generationen eingeteilt werden [145].

Die **erste Generation** umfasst bioinerte Materialien, die in der Regel keine Reaktionen in lebendem Gewebe auslösen (inert). Zu diesen Materialien gehören die nicht-resorbierbaren Metalle (z. B. Edelstahl, Kobalt-Chrom-Basislegierungen, Titan und seine Legierungen), nicht-resorbierbare Keramiken (z. B. Aluminiumoxid, Zirkoniumoxid) und nicht-resorbierbare Polymere (z. B. Polymethylmethacrylat, UHMW-Polyethylen). Sie finden derzeit ein breites Anwendungsspektrum [11], da ihre Eigenschaften den Einsatz in

teillasttragenden und sogar in lasttragenden Rekonstruktionen erlauben. Trotz ihres inerten Verhaltens können toxische Verschleißpartikel in das umliegende Gewebe freigesetzt werden. Zudem sind die Elastizitätsmodule metallischer Biomaterialien nicht an den Knochen angepasst, was zu *Stress-Shielding*-Effekt und Implantatinstabilität führen kann [137, 146]. Ein allgemeines Problem von Biomaterialien der ersten Generation ist die Adsorption unspezifischer Proteine auf ihrer Oberfläche und die Stimulation einer fibrösen Gewebeschicht um das Implantat herum. Eine Osteointegration ist daher nicht möglich. Dieses Problem war die Hauptmotivation für die Entwicklung von Biomaterialien der zweiten Generation [11].

Biomaterialien der **zweiten Generation** sind entweder bioaktiv oder bioresorbierbar [145]. Die bioaktiven Materialien haben eine beeinflussende Wirkung auf Zellen, um sie auf ein bestimmtes Verhaltensmuster oder auf bestimmte Reaktionen zu lenken [11]. Biologisch abbaubare Materialien haben den großen Vorteil, dass sie mit der Zeit resorbieren und durch körpereigenes Knochengewebe ersetzt werden. Eine zweite Operation zur Entfernung des Implantats ist daher nicht notwendig und das Risiko einer Implantat-abstoßung wird vermieden bzw. minimiert [25]. Zu diesen Materialien gehören u. a. *bioaktive Keramiken*, die als biokompatibel, osteokonduktiv und osteointegrativ gelten [11]. Eines der am häufigsten verwendeten Keramikmaterialien sind Calciumphosphate, die sowohl als Keramik als auch als Zement klassifiziert werden können und eine Reihe verschiedener Phasen als potenzielles KEM einschließen [11]. Da ihre mechanischen Eigenschaften jedoch nicht für lasttragende Defekte geeignet sind, müssen für lasttragende Anwendungen zusätzlich Fixierungselemente auf metallischer Basis herangezogen werden [25, 49]. Bei nicht-lasttragenden Defekten, adäquatem Débridement und nur bis zu einem begrenzten Defektumfang sind Calciumphosphatzemente (CPC) vielversprechend für dentale, kraniofaziale und orthopädische Anwendungen [13, 25, 131, 147]. Neben Keramiken gehören auch *biologisch abbaubare Polymere* wie Polylactid, Polyglykolid und Polydioxanon zu dieser Generation von Biomaterialien. Ihr Einsatz in der Chirurgie ist vielfältig: So werden sie beispielsweise als bioresorbierbare Nähte, Platten und Schrauben eingesetzt [11].

Neueste Entwicklungen zeigen auch *biologisch abbaubare Metalle* [148], die z. B. auf Magnesium basieren und als potenziell revolutionäre Biomaterialien angesehen werden können [149]. Ihr Elastizitätsmodul kommt dem des natürlichen kortikalen Knochens nahe und sie gelten als biokompatibel, osteoinduktiv und angiogenetisch. Allerdings ist die Abbaurate meistens zu hoch. Dies begünstigt einen hohen pH-Wert-Anstieg und die

Bildung von Wasserstoffgas an den periimplantären Stellen, was zu Entzündungsreaktionen führen kann [8, 40]. Trotz ihrer Schwächen haben sie bioaktive und bioresorbierbare Eigenschaften und können auch als Biomaterialien der dritten Generation eingeordnet werden [148].

Die **dritte Generation** von Biomaterialien zeichnet sich durch eine Kombination von Bioaktivität und Bioresorbierbarkeit aus und ist ein neues Forschungsgebiet der regenerativen Medizin [11, 145]. Für die Rekonstruktion von Defekten werden zwei Wege unterschieden: Beim *Tissue Engineering* werden Stammzellen ausserhalb des Körpers auf ein resorbierbares Trägergerüst gesät und durch gezielte Stimulation in das gewünschte Gewebe differenziert. Schließlich wird der Gerüst-Zell-Hybrid in die Defektstelle verpflanzt [145, 150]. Der zweite Ansatz ist die *In-situ-Geweberegeneration*. Hierbei werden die Biomaterialien direkt in die Läsion eingebracht. Während des Abbauprozesses werden bioaktive Substanzen wie ionische Abbauprodukte oder Wachstumsfaktoren (z. B. BMP, VEGF, NGF) in das umliegende Gewebe freigesetzt und die Zellen stimuliert [141, 145, 151].

Diese Generationeneinteilung ist nicht unbedingt chronologisch zu sehen, denn die höhere Generation ersetzt nicht zwangsläufig die Vorhergehende. Vielmehr stellt jede Generation ein Konzept dar, bei dem die Entwicklung noch fortschreitet, um ihre spezifischen Eigenschaften zu optimieren [11].

2.3.3 Calciumphosphate

Calcium(ortho)phosphate (CaP) setzen sich definitionsgemäß aus den drei Hauptelementen Calcium, Phosphor und Sauerstoff zusammen [49]. CaP spielen für den Menschen eine besondere Rolle, da sie die anorganische Komponente bei physiologischen (z. B. Knochen, Zähne) und pathologischen (z. B. Atherosklerose) Verkalkungen bilden [22]. Bei der Herstellung von alloplastischen KEMs auf CaP-Basis können die Rohstoffe aus natürlichen oder synthetischen Ressourcen gewonnen werden [13]. Dabei werden zwei verschiedene Kategorien von CaP unterschieden: Niedrigtemperatur-CaP (*Low-temperature CaP*) und Hochtemperatur-CaP (*High-temperature CaP*) [16].

Die *Niedertemperatur-CaP* werden durch Fällung aus einer wässrigen Lösung bei etwa Raumtemperatur (RT) erzeugt. Im Gegensatz zu Hochtemperatur-CaP haben Niedertemperatur-CaP eine andere chemische Zusammensetzung und Struktur (mit Aus-

nahme von HA mit einem Ca/P-Molverhältnis von 1,67), eine große spezifische Oberfläche und sind bioaktiver [16]. Alle CPCs gehören zu den Niedertemperatur-CaP [16] und bestehen im Allgemeinen aus zwei Komponenten: mindestens einem CaP-Salz und einer wässrigen Lösung [25, 147]. Wenn sie zusammengemischt werden, findet eine Lösungs-/Fällungsreaktion statt und die Paste bindet ab. Das erzielte Abbindeprodukt hängt zum größten Teil vom pH-Wert und der Temperatur ab. Bei physiologischen Temperaturen und einem pH-Wert $> 4,2$ wird HA und bei einem pH-Wert $< 4,2$ wird Brushit gebildet [147]. In der Praxis ist die Lösungs-/Fällungsreaktion in der Regel unvollständig, sodass die abgebundenen CPCs neben den Abbindeprodukten auch einen Teil der Ausgangsstoffe enthalten [152]. Wie bereits erwähnt, besitzen die CPCs biokompatible, osteokonduktive, osteointegrative und bioaktive Eigenschaften [3, 131]. Sie sind jedoch nicht für tragende Anwendungen geeignet [49] und ihr Abbau im Körper kann extrem langsam erfolgen [42].

Die *Hochtemperatur-CaP* werden typischerweise bei über 1000 °C hergestellt [16]. Zu diesen Phasen gehören HA, Tetracalciumphosphat und die Tricalciumphosphate, wobei die beiden letzteren die höchste Löslichkeit aufweisen [16].

Kommerziell hat sich eine Vielzahl von CaP-Biokeramiken etabliert, wobei HA, β -Tricalciumphosphat (β -TCP) oder die Kombination der beiden Keramiken am häufigsten als Knochenersatz eingesetzt werden [3, 6, 13-16].

2.3.3.1 *Hydroxylapatit*

Wie bereits erwähnt, kann HA durch Präzipitation (*Low-temperature-HA*) oder durch hohe Temperaturen (*High-temperature-HA*) gewonnen werden [16].

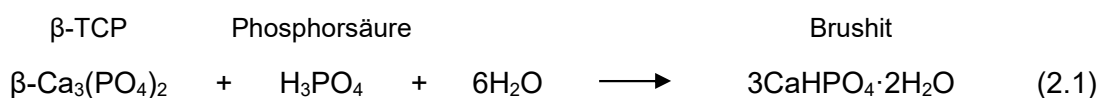
Bei der Herstellung von *Low-temperature-HA* kann das molare Ca/P-Verhältnis im Bereich von 1,50 bis 1,67 liegen. Bei einem Molverhältnis von 1,50 wird der HA als CDHA bezeichnet [16]. Die präzipitierten HAs sind der anorganischen Knochenmatrix in Bezug auf Mikrostruktur und chemische Zusammensetzung sehr ähnlich (Kapitel 2.1.1). Dies erklärt ihre ausgezeichnete Biokompatibilität und Osteointegration [25]. Die Abbaurate ist jedoch sehr gering [16].

Der *High-temperature-HA* wird bei einem Ca/P-Molverhältnis von 1,67 hergestellt und gilt als das stabilste CaP in einer wässrigen Lösung [16]. Der Abbau ist jedoch fast ausschließlich zellvermittelt und nur sehr spärlich [17]. So konnte beispielsweise gezeigt

werden, dass das HA-Implantat bei einem CSD nach sieben Jahren trotz komplikationsloser Osteointegration weitgehend unverändert blieb [18]. Daher können diese Produkte als nicht resorbierbar betrachtet werden [16]. Diese Residuen können zu negativen mechanischen Eigenschaften des neu gebildeten Knochens führen und stellen ein Infektionsrisiko dar [5]. Ein Versuch, diese Probleme zu lösen, ist die Entwicklung von CPCs mit einer höheren Löslichkeit wie beispielsweise Brushit oder Monetit [6].

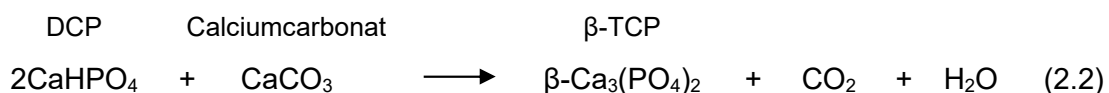
2.3.3.2 *Brushit*

Brushit, auch bekannt als Dicalciumphosphat-Dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DCPD), spielt häufig eine Rolle bei pathologischen Verkalkungen wie Zahnstein und Harnstein [153], kann aber auch die Remineralisierung von Zahnschmelzläsionen fördern [154]. Die Gleichung (2.1) zeigt eine mögliche Abbinde-reaktion von Brushit aus β -TCP [155]. Brushit ist das löslichste biokompatible CaP und gilt als osteokonduktiv [16]. Sein Abbau wird sowohl durch zR als auch durch cD erreicht [25]. Anfangs wird jedoch die Resorption von mononukleären Makrophagen dominiert [156]. Darüber hinaus kann die Abbaurate in den ersten Wochen insgesamt zu schnell erfolgen, sodass die Knochenregeneration nicht nachkommt und ein Spalt zwischen dem Zement und dem neu gebildeten Knochen entsteht. Dieser Spalt wird jedoch durch eingewachsenes Knochengewebe ausgeglichen [19]. Zudem beginnt sich der Brushit-Zement in den ersten zwei Wochen in Apatit umzuwandeln [156], sodass nach etwa acht Wochen vermehrt kristalliner Apatit vorliegt und der Abbau sich verlangsamt [157]. Zu diesem Zeitpunkt scheinen die Osteoklasten die Resorption zu dominieren [156]. Nach 24 Wochen konnte eine vollständige Umwandlung des Brushits in Apatit beobachtet werden und die Resorption erfolgte ausschließlich durch Osteoklasten [19]. Die Zementreste können allerdings auch nach Monaten noch nachgewiesen werden [20, 21]. Obwohl langfristig keine entzündlichen Reaktionen beobachtet wurden [158], kann sich bei zu niedrigem pH-Wert des Zements Bindegewebe zwischen Implantat und Knochengewebe bilden [19].



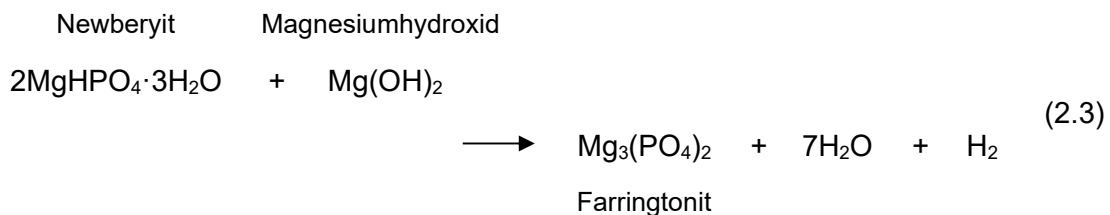
2.3.3.3 α/β -TCP

Das Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) hat drei Polymorphe: α -Tricalciumphosphat (α -TCP), α' -TCP und β -TCP. Das β -TCP ist bei RT stabil [159]. Die Phasenumwandlung zu α -TCP liegt bei 1115–1150 °C und zu α' -TCP bei 1430–1470 °C [23]. Während das α -Polymorph beim Abkühlen auf RT erhalten bleiben kann, existiert das α' -TCP nur bei Temperaturen > 1430 °C [159]. Eine Möglichkeit zur Herstellung von β -TCP besteht in einer Festkörperreaktion aus den Ausgangsstoffen Dicalciumphosphat (DCP) und Calciumcarbonat in einem Molverhältnis von 2:1 bei 1400 °C, wie in der Gleichung (2.2) gezeigt [23]. β -TCP wird wegen seiner Stabilität bei RT, Biokompatibilität und besseren mechanischen Eigenschaften gegenüber α -TCP bevorzugt und als Granulat oder Blöcke für nicht lasttragende Defekte angeboten [90]. Die Löslichkeit von β -TCP liegt nahe am Knochenmineral, weshalb es unter physiologischen Bedingungen unlöslich ist [23]. Die Resorption erfolgt durch Makrophagen und Osteoklasten, die den pH-Wert lokal senken und damit die Löslichkeit von β -TCP erhöhen [23, 90]. Die geätzten β -TCP-Oberflächen haben spitzenartige intrakristalline Säulen, die entlang der c-Achse ausgerichtet sind [23, 90]. Im direkten Vergleich zwischen porösen α -TCP- und β -TCP-Blöcken in vivo (am Schädel von Kaninchen) wurde für α -TCP-Implantate bereits nach 4 Wochen ein signifikant höherer Abbau beobachtet als für β -TCP-Implantate [160]. Sowohl β -TCP als auch α -TCP neigen jedoch dazu, sich in physiologischen Lösungen oder nach der Implantation in HA-Kristalle umzuwandeln [16, 22, 23]. Die Abbaugeschwindigkeit von Tricalciumphosphaten wird in der Literatur kontrovers diskutiert: Einerseits wurde berichtet, dass Tricalciumphosphat nach 7 Jahren ohne Anzeichen eines Abbaus vorliegen kann [161], andererseits wird behauptet, dass sich diese Biokeramik zu schnell auflöst [162]. Dies legt den Verdacht nahe, dass die Tricalciumphosphate ein nicht vorhersehbares Abbaumuster aufweisen [163]. Allerdings könnte dieses scheinbare inkonsistente biologische Verhalten durch viele Einflussfaktoren erklärt werden, wie z. B. zu viel umgewandeltes HA, Keramikporosität, Defektlokalisierung, Patientenzustand sowie chemische Zusammensetzung der Keramik (Verunreinigungen bzw. Ionendotierungen) [23].

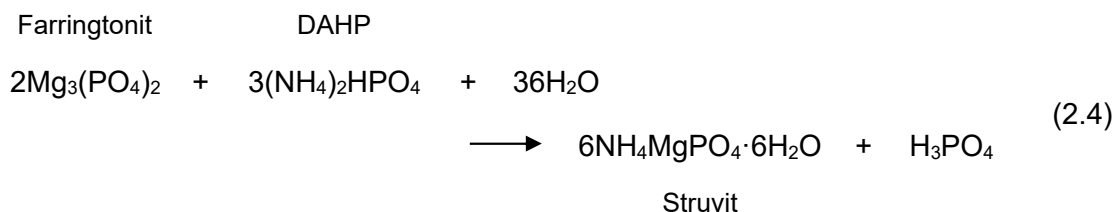


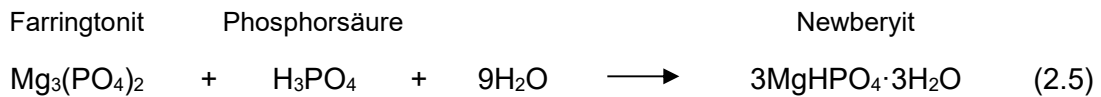
2.3.4 Magnesiumphosphate

Die Substanzen des Magnesiumphosphat(MgP)-Systems haben eine lange Tradition und umfangreiche Untersuchungen in den Bereichen Landwirtschaft, Umwelt und Bauwesen [6, 25]. Für biomedizinische Anwendungen wurden die ersten Studien über Magnesiumphosphatzemente (MPC) jedoch erst in den 1990er Jahren veröffentlicht [24, 26, 27], sodass es sich um ein relativ junges Forschungsfeld handelt [25]. In den letzten Jahren hat das Interesse an diesem Material und seine Bedeutung zugenommen [13], da es in puncto mechanischer Festigkeit und Lösungsverhalten den CaP überlegen zu sein scheint [6]. Allerdings sind die Studien im Vergleich zu seinem CaP-Pendant in Vielfalt und Tiefe noch immer begrenzt [6, 25, 42] und häufig konzentrierten sich die Forschungsarbeiten auf Struvit-bildende Zemente [13, 20, 29-33]. Für die Herstellung der MPCs werden typischerweise Rohpulver wie Magnesiumoxid (MgO, Magnesia, Periclas) oder Farringtonit ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$, Trimagnesiumphosphat) verwendet [25]. Farringtonit wird meist durch eine Festkörperreaktion der Ausgangsstoffe Newberyit ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) mit Magnesiumhydroxid ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) nach der Gleichung (2.3) gewonnen [6].



Abhängig von den Rohpulvern wird z. B. beim Abbinden von Farringtonit mit Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP) das Produkt *Struvit* (Gleichung (2.4) [164]) und mit Phosphorsäure das Produkt *Newberyit* (Gleichung (2.5) angepasst in Anlehnung an [165]) gebildet. Es wurde beobachtet, dass zusätzlich zu den Reaktionsprodukten unterschiedliche Mengen der nicht-reaktiven Rohpulvern (MgO oder $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) in den gebildeten Zementgefügen vorhanden sein können [25].





Struvit ist in der Medizin als Nierenstein bekannt und kann bei einer bakteriellen Infektion 10 % von ihm ausmachen [166]. Als KEM sind Ammoniumionen(NH_4^+)-haltige Verbindungen wie Struvit einzigartig, da es keine vergleichbare Phase bei CPCs gibt [6]. Von Newberyit als KEM ist vergleichsweise noch wenig berichtet worden. Diese Phase scheint ebenfalls vielversprechende Eigenschaften als Biomaterial zu haben [21, 167-169].

Die positiven Merkmale, die in der Literatur oft erwähnt werden, sind folgende: MPCs wurden als Klebstoffe für Knochen-Implantat-Verbindungen und zur Knochen-Sehnen-Einheilung eingesetzt und die erzielten Ergebnisse sind vielversprechend [170, 171]. Darüber hinaus können die Zemente eine hohe Anfangsfestigkeit aufweisen, wobei Struvit-bildende Zemente tendenziell höhere Werte erreichen als Newberyit-bildende Zemente [6, 20, 167, 172]. Trotz der limitierten In-vivo-Experimente wurden die biokompatiblen, osteokonduktiven und osteointegrativen Eigenschaften der MPCs bestätigt, da keine Entzündungs-, Abstoßungs- oder Fremdkörperreaktionen beobachtet wurden und die Einheilung erfolgt ohne Bindegewebsbildung [6]. Wichtig ist, dass auch toxische, mutagene und karzinogene Wirkungen ausgeschlossen werden konnten [173]. Im Vergleich zu CPCs haben MPCs eine höhere Auflösungsrate [6, 25] und die freigesetzten Mg^{2+} stabilisieren die amorphen CaP-Phasen unter physiologischen Bedingungen, was wiederum die Bildung schwerlöslicher HA-Kristalle inhibiert [34]. Des Weiteren haben spezielle natriumhaltige MPCs eine antimikrobielle (bakteriostatische oder bakterizide) Wirkung gegen *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gezeigt. Diese Wirkung wurde auf die hohe Osmolarität und den alkalischen pH-Wert der MPCs zurückgeführt [172, 174]. Angesichts dieser Eigenschaften scheinen die MPCs den CPCs gleichwertig oder sogar überlegen zu sein [6].

Obwohl die MPCs initial eine hohe mechanische Stabilität aufweisen, führt der schnelle Abbau des Materials zu einem raschen Festigkeitsverlust in vitro und in vivo [20, 25]. Inwieweit diese schnelle Festigkeitsabnahme durch die Knochenregeneration kompensiert wird, ist noch nicht geklärt [6]. Zumal ein zu schneller Abbau große Mengen an Mg^{2+}

in das lokale Gewebe freisetzen kann, wodurch das Wachstum der HAs gehemmt werden könnte. Dies wiederum würde möglicherweise zu einer Beeinträchtigung der anorganischen Knochenmatrix führen, die hauptsächlich aus nicht-stöchiometrischen nanokristallinen HAs besteht (Kapitel 2.1.1). Es gilt jedoch als unwahrscheinlich, dass die freigesetzten Mg^{2+} bei gängigen Implantatgrößen zu einer Störung des Elektrolythaushaltes führen könnten [6, 173].

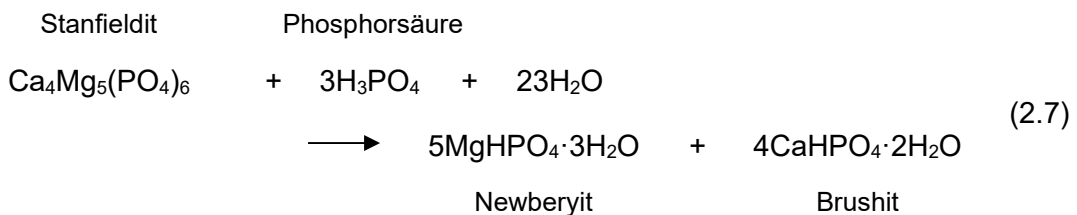
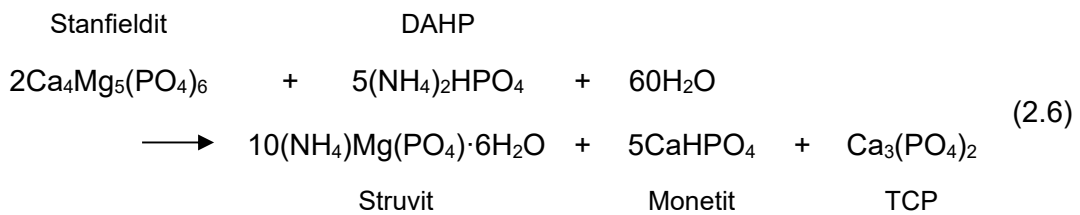
2.3.5 Calciummagnesiumphosphate

Die Kombination von CPC und MPC stellt einen neuartigen Calciummagnesiumphosphatzement (CMPC) dar und scheint die positiven Eigenschaften beider Systeme zu vereinen [6, 25]. Trotz der begrenzten Anzahl von Studien wurde die gute Biokompatibilität von CMPCs sowohl *in vitro* [29, 31, 32, 169] als auch *in vivo* [21, 29, 130] bestätigt: Beispielsweise beobachteten Klammert et al. innerhalb einer 15-monatigen intramuskulären Implantation keine Wundinfektionen, Entzündungszeichen oder Abstoßungsreaktionen [21]. Darüber hinaus wird oft über ein gutes Resorptionsverhalten und eine effiziente Osteogenese *in vivo* berichtet [21, 28, 29, 130]: Zeng et al. beobachteten eine höhere Knochenneubildung bei CMPC im Vergleich zur CPC und MPC bei Sinusbodenelevation im Kaninchenmodell [28]. Wue et al. konnten im Falle von CMPC nach 6 Monaten eine Knochenneubildung von ca. 80 % feststellen [29], während Li et al. im gleichen Zeitraum mehr als 89 % verzeichneten [130].

Bei der Herstellung von CMPCs kann grundsätzlich zwischen zwei Präparationswege unterschieden werden [6]: Bei der einen Methode werden die Rohpulver von CPCs (z. B. HA, Brushit, α/β -TCP) und MPCs (z. B. Magnesiumoxid, Farringtonit, Newberyit) zunächst getrennt voneinander hergestellt, wie bereits in den Kapiteln 2.3.3 und 2.3.4 beschrieben. Anschließend werden zwei bis vier dieser Rohpulverkomponente in unterschiedlichen Verhältnissen mit einer wässrigen Phase (z. B. deionisiertes Wasser) gemischt und abgebunden [6, 24, 29]. Bei der anderen Herstellungsart werden die Ausgangsstoffe der CPCs (z. B. DCP, Calciumcarbonat) und MPCs (z. B. Newberyit, Magnesiumhydroxid) vor der Hochtemperaturbehandlung in einem bestimmten stöchiometrischen Verhältnis miteinander vermischt. Nach dem Sintern bildet sich in Abhängigkeit von den Ausgangsmaterialien ein calciumdotiertes Magnesiumphosphat mit der allgemeinen stöchiometrischen Formel $Ca_xMg_{(3-x)}(PO_4)_2$, wobei $0 < x < 3$ gilt [6, 169]. Der Sinterkuchen kann zu Rohpulver vermahlen werden und unterschiedliche Anteile an Far-

ringtonit ($Mg_3(PO_4)_2$) und Stanfieldit ($Ca_4Mg_5(PO_4)_6$) aufweisen [31]. Abschließend erfolgt eine Abbindung der Rohpulver mit reaktiven Lösungen analog zu den MPCs, wobei im Falle von Farringtonit die Gleichung (2.4) für DAHP und für H_3PO_4 die Gleichung (2.5) gelten.

Im Falle von Stanfieldit gelten die Gleichung (2.6) (angepasst in Anlehnung an [175]) für DAHP und für H_3PO_4 die Gleichung (2.7) [176].



2.4 3D-Pulverdruck

Neben injizierbaren Zementpasten [33], Granulaten [43], einfachen Formkörpern (z. B. Blöcke, Zylinder, Keile) [3] und keramischen Beschichtungen von Metallimplantaten (z. B. Hüftgelenkprothesen, Zahnimplantate) [22] ist der 3D-Pulverdruck eine weitere Technik für medizinische Keramikanwendungen [44]. Insbesondere das letztgenannte additive Fertigungsverfahren hat in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen, da es die Herstellung individueller Keramikimplantate bei simultaner Steuerung der Geometrie, Porosität und Zusammensetzung ermöglicht, wodurch die Rekonstruktion großer und/oder geometrisch komplexer Knochendefekte erleichtert werden kann [44].

Die Prozesskette der präoperativen Implantatherstellung beginnt in der Regel mit einer Computertomographie-Aufnahme der betroffenen Region (z. B. Schädel). Diese wird im DICOM-Format (*Digital Imaging and Communications in Medicine*) gespeichert. Die virtuelle Implantatgeometrie kann mithilfe eines CAD-Spiegelbildverfahrens generiert und

manuell nachbearbeitet werden. Anschließend wird das DICOM- in das STL-Format (*STereoLithography* oder *Standard Tessellation Language*) konvertiert, welches mit der 3D-Druckersoftware kompatibel ist [45, 46]. Die Druckersoftware übersetzt das virtuelle Implantatmodell in einzelne Schichten und sendet es an den 3D-Drucker. Der Drucker baut das virtuelle Modell schichtweise in einem Inkjet-Verfahren auf [177] (Abbildung 4 auf Seite 40) und sorgt so für eine kontrollierte Pulverbindung. Der Aushärtungsprozess kann dabei durch zwei verschiedene Mechanismen erreicht werden [44]: Im ersten Ansatz werden dem Rohpulver zusätzlich Polymerkomponenten (z. B. Zellulose, Gelatine, Stärke) zugesetzt. Die Druckpatrone appliziert eine Binderflüssigkeit (z. B. Wasser), wodurch das Polymer aufquillt und die Zementpartikel physikalisch zusammenkleben. Es entsteht ein Grünkörper, der gesintert wird, sodass die Polymerkomponenten ausbrennen und der Zement sich verfestigt [44, 178]. Beim zweiten Ansatz trägt die Druckpatrone eine reaktive Binderlösungen (z. B. DAHP, H_3PO_4) auf das Rohpulver auf, wodurch eine chemische Reaktion ausgelöst wird und der Zement gezielt abbindet [44]. Bei diesem Verfahren werden die Implantate weitgehend bei RT hergestellt, sodass eine Modifikation mit biologisch aktiven Substanzen möglich ist [44]. Diese Zemente könnten z. B. mit angiogenese- und osteogenesefördernden Faktoren (z. B. VEGF, BMP-2) [179], Antibiotika (z. B. Streptomycin, Vancomycin) [180] und Tumormedikamenten (z. B. cis-Platin) [181] imprägniert werden und so eine lokale Wirkung im Gewebe entfalten. Eine zusätzliche Infiltration durch Eintauchen der Druckobjekte in die Binderlösungen kann die Zementfestigkeit steigern und für eine höhere Umsatzrate der Abbindeprodukte sorgen [44, 182].

Mehrere Studien haben gezeigt, dass 3D-gedruckte Keramiken sowohl in vitro als auch in vivo ein positives biologisches Verhalten aufweisen: So konnten beispielsweise Detsch et al. anhand der monozytären Zelllinie RAW 264.7 zeigen, dass diese Zellen auf 3D-gedruckten HA/ β -TCP-Mischungen eine gute In-vitro-Biokompatibilität aufweisen und in der Lage sind, sich in osteoklastenähnliche Zellen zu differenzieren und dieses Material zu resorbieren [183]. Klammert et al. untersuchten das Verhalten der osteoblastischen Zelllinie MC3T3-E1 auf 3D-gedruckten Brushit- und Monetit-Zementen und fanden eine gute Zellproliferation und -viabilität, was auf eine gute Biokompatibilität hindeutet [184]. In diversen In-vivo-Untersuchungen konnten bei 3D-gedruckten Implantaten nicht nur die Biokompatibilität, sondern auch bR, Osteokonduktion [185], Osteogenese [185-188], Angiogenese [186, 188] und sogar Osteoinduktion [185] beobachtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material- und Geräteliste

Die in den Experimenten verwendeten Materialien, technischen Geräte und Einmalartikel sind in den folgenden Tabellen aufgeführt. Ihre genaue Verwendung wird in den entsprechenden Kapiteln näher erläutert.

3.1.1 Chemikalien

Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Zytokine und Kits.

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Lotnummer	Firma (Firmensitz)
Aceton	32201-M	STBH2992	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Alpha Medium	F 0925	0266Z	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	A2153	SLCB1974	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Calciumcarbonat	1.12120	A1040220817	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Calciumhydrogenphosphat	1430-07	0000169680	J.T. Baker (Griesheim, Deutschland)
Certipur® Calcium ICP Standard	170308	HC99940908	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Certipur® Magnesium ICP Standard	170379	HC99015079	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Certipur® Phosphor ICP Standard	170340	HC98854040	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Diammoniumhydrogenphosphat (DAHP)	101207	A1086007	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	D1408	RNBH5720	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EDTA	ED	BCBQ4662V	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Essigsäure	33209	SZBF1810V	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (FCS)	F7524	BCBV0083	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Formaldehyd, 37 %	104003	K29783803	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glutardialdehydlösung, 25 %	104239	Z0551139	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
HEPES solution	H0887	RNBH4191	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3 Material und Methoden

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Lotnummer	Firma (Firmensitz)
Hoechst 33342	H1399	N/A	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Human M-CSF	130-096-491	5190913053	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Human sRANK Ligand (RANKL)	310-01	0714142-1	PerproTech (Hamburg, Deutschland)
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC)	09963	BCBZ2150	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Leit-C (Kohlekleber)	G3300	1317	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
L-Glutamine	25030024	1978288	Gibco®, Life Technologie (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumhydrogenphosphat für CM2,25, CM2,75	A14279	10222044	Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumhydrogenphosphat für TMPs	FL04260	SZBG2550H	Fluka, Altmann Analytik GmbH & Co. KG (München, Deutschland)
Magnesiumhydroxid für CM2,25, CM2,75	25059.295	17K104105	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumhydroxid für TMPs	25059.295	18K124131	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Minimum Essential Medium Eagle	M4526	RNBH5207	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natrium-Acetat	106281	N/A	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid	746398	SLBQ7800V	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid	30620	STBJ5713	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natrium-Tartrat	71994	1323363	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
ortho-Phosphorsäure 85 % (H ₃ PO ₄)	100573	K21175073	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Pancoll human, Dichte: 1,077 g/ml	P04-601000	8491118	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin	15140122	2041562	Gibco®, Life Technologie GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Percoll	17-0891-02	10266570	GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)
Phalloidin-iFluor 555 Reagent	ab176756	GR3320936-1	Abcam (Berlin, Deutschland)
Phosphatase, Acid Kit (TRAP-Färbung)	387A	SLBZ5562	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Lotnummer	Firma (Firmensitz)
p-Nitrophenol (pNP)	1048	MKCG8809	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
p-Nitrophenylphosphat (pNPP)	4165	299284732	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit	P11496	2015526	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Roripuran®Supra 69 % (Salpetersäure)	HN50.2	1119081	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
ROTI®Histofix 4,5 %	2213.6	258272422	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Seraclot Human AB male (humanes Serum)	P40-3000	P051703	PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland)
Triton™ X-100	T8787	089K01923	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

3.1.2 Technische Geräte

Tabelle 3.2: Technische Geräte.

Bezeichnung	Firma (Firmensitz)
ASM 30/H Spezial (Sinterofen)	Arnold Schröder Industrieöfen GmbH (Flörsheim, Deutschland)
Axio Observer 7 (Fluoreszenzmikroskop)	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
CASY® Cell Counter, Type: CASY TTT	Omni Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
CPD 030 (Kritisch-Punkt-Trockner)	Bal-Tec AG (Balzers, Liechtenstein)
Crossbeam 340 (Rasterelektronenmikroskop)	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
D8 Advance (Röntgendiffraktometer)	Bruker Corporation (Billerica, USA)
Digitaler Messschieber 16 ES	Mahr GmbH (Göttingen, Deutschland)
Heracell™ 150i CO ₂ Incubator (Brutschrank)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Hygopac 6020-02 (Versiegelungsgerät)	DÜRR DENTAL SE (Bietigheim-Bissingen, Deutschland)
Leica EM ACE600 (Sputtergerät)	Leica Mikrosysteme GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Nabertherm-Ofen, Mod. L08/14	Nabertherm GmbH (Lilienthal, Deutschland)

Bezeichnung	Firma (Firmensitz)
Pflugscharmischer M5R	Gebrüder Lödige Maschinenbau GmbH (Paderborn, Deutschland)
Planeten-Kugelmühle PM 400	Retsch GmbH (Haan, Deutschland)
Rocker-Shaker PMR-100 (Wipptisch)	Grant Instruments Ltd (Shepreth, Cambridge, UK)
Rotamax 120 (Schüttler)	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Sonorex Super RK 512 H (Ultraschallbad)	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Spark 20M (Mikroplatten-Lesegerät)	Tecan Deutschland GmbH (Crailsheim, Deutschland)
SteREO Discovery.V20 (Stereomikroskop)	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Thermo Scientific™ iCAP™ RQ ICP-MS	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Vecstar (Sinterofen)	Oyten Thermotechnik GmbH (Oyten, Deutschland)
VisiScope IT 404 (Durchlichtmikroskop)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Vortex Genie 2, Model No. G560E	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, New York, USA)
VWR Mega Star 1.6R (Zentrifuge)	Thermo Electron LED GmbH (Osterode am Harz, Deutschland)
WTW inoLab® pH 730 (pH-Meter)	Xylem Analytics Germany Sales GmbH & Co. KG (Weilheim, Deutschland)
ZPrinter 310 (3D-Pulverdrucker)	Z-Corporation (Burlington, USA)

3.1.3 Einmalartikel

Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel.

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Firma (Firmensitz)
Cellstar® Tubes (15 mL Zentrifugenröhrchen)	188271	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Cellstar® Tubes (50 mL Zentrifugenröhrchen)	227261	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Deckgläser, 10 mm Durchmesser (Glasplättchen)	0111500	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, Deutschland)
HP 10 (Druckpatrone)	C4800A	HP Inc. (Palo Alto, USA)
Nunclon™ Delta Surface, 48-Well-Platte	150687	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)

3 Material und Methoden

Bezeichnung	Kat.-Nr.	Firma (Firmensitz)
Nunclon™ Delta Surface, 96-Well-Platte	167008	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)
Rollrandgläser, 10 mL	RR03	A. Hartenstein GmbH (Würzburg, Deutschland)
SafeSeal Reagiergefäße, 1,5 mL (1,5 mL Eppi)	72.706	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
SafeSeal Reagiergefäße, 2,0 mL (2 mL Eppi)	72.695.500	SARSTEDT AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Schwarze 96-Well Micro-Platte, F-Boden, Kaminform	655209	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Zementrohpulverherstellung

3.2.1.1 *Tricalciumphosphat*

Zur Herstellung des Tricalciumphosphat-Rohpulvers (TCP-Roh) wurden zunächst 2,000 mol Calciumhydrogenphosphat (CaHPO_4) mit 1,000 mol Calciumcarbonat (CaCO_3) (Tabelle 3.4) im *Pflugscharmischer M5R* für 1 h gemischt und in einen Aluminiumoxid-Sintertiegel überführt. Anschließend wurde die Pulvermischung im Sinterofen *Vecstar* bei 500 °C/h auf 1400 °C aufgeheizt und 5 h gesintert. Nach dem Sinterbrand wurde das Produkt an der Luft abgeschreckt. Der abgekühlte und feste Sinterkuchen wurde anschließend mit einem Mörser zerkleinert und auf eine Korngröße < 355 µm gesiebt. Jeweils 125 g der Siebrückstände (Korngröße > 355 µm) wurden zusammen mit 4 Zirkoniumdioxidkugeln ($\varnothing = 30$ mm) in ein 500 mL Zirkoniumdioxidbecher gegeben und für 1 h bei 200 U/min mit Richtungswechsel in *Planeten-Kugelmühle PM 400* gemahlen. Anschließend folgte ein erneutes Sieben der gemahlene Siebrückstände auf eine Korngröße < 355 µm. Um eine physikalische Bindung der Zementpartikel während des Pulverdrucks zu ermöglichen, wurden dem Pulver 4 Gew.-% Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) zugesetzt und mit dem *Pflugscharmischer M5R* für 20 min gemischt.

3.2.1.2 *Calciummagnesiumphosphate und Magnesiumphosphat*

Zur Herstellung der Rohpulver für CMPCs und MPCs der allgemeinen stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x = 0; 0,25; 0,75$) wurden zunächst die Ausgangsstoffe Calciumhydrogenphosphat (CaHPO_4), Calciumcarbonat (CaCO_3), Magnesiumhydrogenphosphat (MgHPO_4) und Magnesiumhydroxid ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) im entsprechenden stöchiometrischen Verhältnis (siehe Tabelle 3.4) 1 h lang mit dem *Pflugscharmischer M5R* vermengt. Die Pulvermischung wurde anschließend in einem Sintertiegel aus Aluminiumoxid im Sinterofen *ASM 30/H Spezial* bei 500 °C/h auf 600 °C erhitzt und 6 h gehalten, bevor mit gleicher Heizrate auf 1100 °C erhitzt und weitere 5 h gesintert wurde. Nach dem Abkühlen wurde der Sinterkuchen mit einem Mörser zerkleinert und auf eine Korngröße < 355 µm gesiebt. Jeweils 125 g der Siebrückstände (Korngröße > 355 µm) wurden zusammen mit 4 Zirkoniumdioxidkugeln ($\varnothing = 30$ mm) in ein 500 mL Zirkoniumdioxidbecher gegeben und für 1 h bei 200 U/min mit Richtungswechsel in *Planeten-Kugelmühle PM 400* gemahlen. Anschließend folgte ein erneutes Sieben der gemahlene

Siebrückstände auf eine Korngröße < 355 µm. Dem Pulver wurden 4 Gew.-% HPMC zugesetzt und im *Pflugscharmischer M5R* für 20 min gemischt.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Ausgangsstoffe für die Biozementsynthese mit der allgemeinen stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x = 0; 0,25; 0,75; 3$).

Abkürzung	$\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$	CaHPO_4 (mol)	CaCO_3 (mol)	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (mol)	$\text{Mg}(\text{OH})_2$ (mol)
TCP-Roh	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,000	1,000	–	–
CM2,25-Roh	$\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$	0,500	0,250	1,500	0,750
CM2,75-Roh	$\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$	0,167	0,083	1,830	0,920
TMP-Roh	$\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$	–	–	2,000	1,000

Alle Rohpulver wurden freundlicherweise von Isabell Biermann vorbereitet und für die Weiterverarbeitung zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Scaffoldherstellung und -aufbereitung

3.2.2.1 3D-Pulverdruck

Basierend auf dem additiven Fertigungsverfahren *Three-Dimensional Printing* (3DP) wurden die Prüfkörper (Scaffolds) für die Versuche mit dem 3D-Drucker *ZPrinter 310* hergestellt. Kernstück war die handelsübliche *HP 10* Druckpatrone, aus der die Tinte vor der Verwendung entfernt wurde. Dazu wurde der Gehäusedeckel geöffnet, die Tinte beseitigt und das Innere der Patrone mehrmals mit destilliertem Wasser durchgespült, so dass keine Tintenreste mehr sichtbar waren. Die Patrone wurde mit Argon-entgastem Wasser als Binderflüssigkeit befüllt und der Deckel wieder verschlossen. Eine weitere vorbereitende Maßnahme vor dem 3D-Druck war die Präparation des Zufuhrbehälters und des Bauraums mit dem entsprechenden Rohpulver (Abbildung 4a). Dazu wurde der Zufuhrbehälter in einer unteren Position manuell mit dem Zementpulver befüllt und leicht verdichtet. Die Oberfläche des Pulverbettes im Zufuhrbehälter wurde bündig an die Höhe des Zufuhrbehälters angepasst. In den Bauraum wurde ca. 1 cm Pulverbett eingefüllt, leicht verdichtet und bündig an die Höhe des Bauraumes angepasst. Die Oberflächen der Pulverbetten im Zufuhrbehälter und im Bauraum lagen somit in der gleichen Ebene.

Für die Versuche wurden plättchenförmige Scaffolds mit einem Durchmesser von ca. 5,5 mm und einer Höhe von ca. 2,0 mm hergestellt. Die druckereigene Software *ZPrint*

V. 7.10 konvertierte die im CAD erstellten Objekte (STL-Format) in 100- μm -Schichten und übermittelte sie an den Drucker.

Das 3DP-Prozedere lief wie folgt ab: Der Pulverspeicher aus dem Zufuhrbehälter wurde um eine Schichtstärke herausgefahren, wodurch ein Pulverüberstand entstand. Der Bauraum wurde um die gleiche Schichtstärke abgesenkt. Eine Walze rollte über den Zufuhrbehälter, sammelte diesen Pulverüberstand und trug ihn auf den abgesenkten Bauraum auf, sodass eine dünne und glatt aufgetragene Pulverschicht entstand (Abbildung 4a–e). Anschließend applizierten die zahlreichen Düsen der Druckpatrone die Binderflüssigkeit (entgastes Wasser) objektspezifisch auf die Pulveroberfläche des Bau-raums (Abbildung 4f). Das Binder/Pulver-Verhältnis betrug dabei 0,275. Mittels des im Pulver enthaltenen Polymers HPMC verklebten die Keramikpartikel miteinander. Dieser automatisierte Prozess wiederholte sich, bis sich die einzelnen Schichten zu einem drei-dimensionalen Objekt zusammenfügten (Abbildung 4g, h). Nach einer Trocknungs- bzw. Aushärtungsphase von 1 h konnten die Scaffold-Grünkörper aus dem Pulverbett entnommen und das lose anhaftende Pulver mit niedriger Druckluft (ca. 0,5–1 bar) entfernt werden. Die Scaffolds trockneten für einige Stunden weiter bei RT und waren nun für das Sintern vorbereitet.

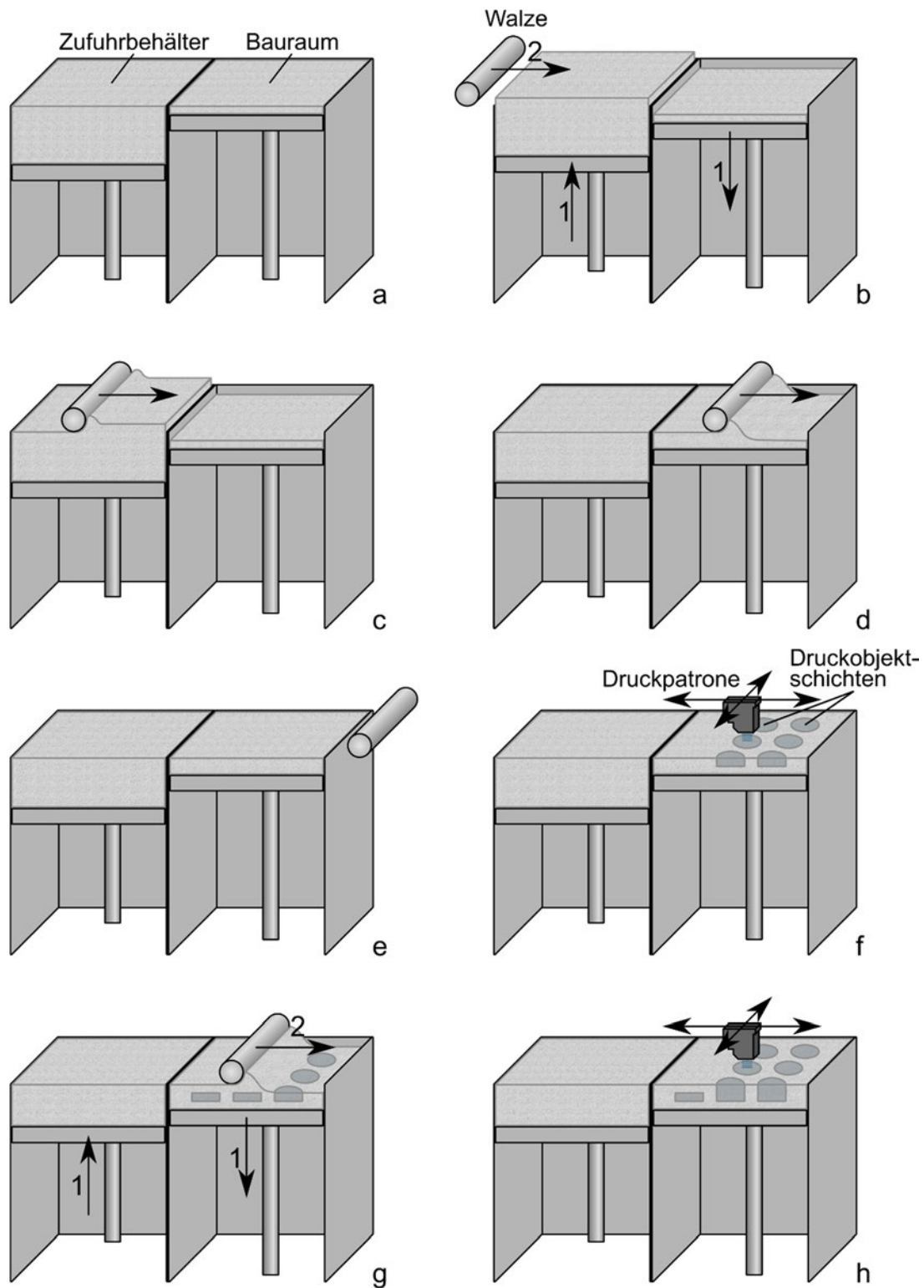


Abbildung 4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte beim 3D-Pulverdruck im Inkjet-Verfahren. Nach der Präparation des Zufuhrbehälters und des Bauraums sind die Rohpulver bündig mit den Behälterhöhen aufgetragen (a). Das ausgefahrene und überstehende Pulver im Zufuhrbehälter wird von der Walze in den abgesenkten Bauraum übertragen (b–e). Die Druckpatrone fährt über den Bauraum und appliziert die Binderflüssigkeit auf die Pulveroberfläche, sodass eine Schicht des Druckobjekts entsteht (f). Das dreidimensionale Objekt wird durch Wiederholung des Pulverauftrags und des Schichtdrucks erzeugt (g, h). Die Zahlen 1 und 2 in b und g geben die Reihenfolge der einzelnen Bewegungen an. Eigene Darstellung.

3.2.2.2 Sinterung

Um die mechanischen Eigenschaften zu verbessern, wurden die Scaffolds nach dem 3D-Pulverdruck bei Temperaturen unterhalb des Schmelzpunktes wärmebehandelt. Dies führte zu einer rückstandslosen Ausbrennung des organischen HPMC-Additivs, einer Sinterung der anorganischen Komponenten und einer Volumenreduktion.

Die verwendeten Sinterparameter für die verschiedenen Scaffold-Grünkörper sind in Tabelle 3.5 aufgelistet und wurden mit dem Nabertherm-Ofen durchgeführt. Dabei wurden die Grünkörper mit einer Aufheizrate von 120 °C/h auf 500 °C aufgeheizt und für 120 min auf dieser Temperatur gehalten, um das HPMC vollständig auszubrennen. Mit der zweiten Heizphase von 300 °C/h wurden die Endtemperaturen erreicht und für 240 min gehalten. Schließlich folgte ein langsames Abkühlen auf RT bei geschlossenem Ofen.

Tabelle 3.5: Sinterparameter für die Scaffold-Grünkörper sowie ihre Abkürzungen nach dem Sinterbrand.

Abkürzungen der Proben	Aufheizphase	Aufheizrate (°C/h)	Haltezeit (°C)	Haltezeit (min)
TCP(-Sin)	I.	120	500	120
	II.	300	1350	240
CM2,25-Sin, CM2,75-Sin	I.	120	500	120
	II.	300	1100	240
TMP-Sin	I.	120	500	120
	II.	300	1200	240

Die Sinterschrumpfung der Scaffolds (n = 40) wurde mit einem handelsüblichen digitalen Messschieber bestimmt.

3.2.2.3 Infiltration mit reaktiven Lösungen: $(NH_4)_2HPO_4$, H_3PO_4

Ein Teil der gesinterten Scaffolds jeder Zementphase, außer TCP, wurde mit 3,5 mol/L DAHP ($(NH_4)_2HPO_4$) und der andere Teil mit 2,0 mol/L Phosphorsäure (H_3PO_4) infiltriert. Der Einfachheit halber werden die verschiedenen Zementphasen mit den Abkürzungen gemäß Tabelle 3.6 benannt.

Tabelle 3.6: Übersicht über die mit reaktiven Lösungen infiltrierten Scaffolds und ihre Abkürzungen.

Abkürzungen	Stöchiometrische Zusammensetzungen der Zementpulver	Reaktive Lösungen
TCP	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	–
TCP-P	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,0 mol/L H_3PO_4
CM2,25	CM2,25-D	3,5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
	CM2,25-P	2,0 mol/L H_3PO_4
CM2,75	CM2,75-D	3,5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
	CM2,75-P	2,0 mol/L H_3PO_4
TMPs	TMP-D	3,5 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
	TMP-P	2x 1,0 mol/L H_3PO_4

Die Infiltration mit DAHP verlief für alle Zementphasen gleich: Die Scaffolds wurden zusammen mit 1 mL 3,5 mol/L DAHP pro Scaffold in eine Kunststoff-Petrischale gegeben, sodass sie vollständig bedeckt waren, und für 24 h bei RT ausgelagert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Scaffolds wurden über Nacht auf einem Papiertuch unter einer Abzugshaube getrocknet.

Die Proben TCP-, CM2,25- und CM2,75-Sin wurden einmal mit 2,0 mol/L H_3PO_4 und TMP-Sin zweimal mit 1,0 mol/L H_3PO_4 infiltriert, da letztere bei 2,0 mol/L H_3PO_4 einen Zerfall bzw. eine Auflösung zeigten. Dazu wurden die Scaffolds in einer Kunststoff-Petrischale mit der entsprechenden H_3PO_4 -Konzentration beträufelt, bis sie eine seidengänzende Oberfläche aufwiesen. Anschließend wurden sie über Nacht bei geöffneter Petrischale unter einer Abzugshaube getrocknet. Am nächsten Tag wurden nur die TMP-Scaffolds erneut mit 1,0 mol/L H_3PO_4 nach dem gleichen Verfahren nachbehandelt und über Nacht unter einer Abzugshaube getrocknet.

3.2.2.4 Waschen und Sterilisation

Um die Scaffolds in einen möglichst neutralen pH-Bereich zu bringen, wurden sie nach dem Trocknen zweimal mit doppelt destilliertem und sterilem Wasser (Bidest) und anschließend zweimal mit *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS) jeweils über Nacht gewaschen. Dazu wurde 1 mL des Waschmediums pro Scaffold in eine Kunststoff-Petrischale gegeben und über Nacht geschlossen auf dem Wipptisch *Rocker-Shaker PMR-100* bei RT belassen. Die Scaffolds waren stets mit dem Waschmedium bedeckt. Zwi-

schen den vier Waschsritten wurden die Scaffolds einmal umgedreht, bevor das Medium gewechselt wurde. Am letzten Tag wurde die PBS-Lösung abgesaugt und die Scaffolds wurden über Nacht bei RT in einer Sicherheitswerkbank getrocknet.

Die trockenen Scaffolds wurden in Zentrifugenröhrchen (Falcons) verpackt und mit dem Versiegelungsgerät *Hygopac 6020-02* versiegelt. Die Sterilisation erfolgte mit Gammastrahlung bei 30 kGy und wurde von der Firma BBF Sterilisationservice GmbH (Kern-Rommelshausen, Deutschland) durchgeführt.

3.2.3 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Die Röntgendiffraktometrie wurde zur qualitativen und quantitativen Analyse der Phasenzusammensetzungen eingesetzt. Dazu wurden die Rohpulver, die gesinterten Scaffolds und die trockenen Scaffolds nach der Sterilisation mit Mörser und Pistill zu Pulver vermahlen und in einem Probenträger glatt verdichtet. Die Messung erfolgte mit dem Röntgendiffraktometer *D8 Advance* mit CuK_α -Strahlung $\lambda = 1,541 \text{ \AA}$ bei einer Beschleunigungsspannung von 40 kV, einem Emissionsstrom von 40 mA in einem Winkelbereich (2θ) von $10\text{--}60^\circ$ mit $0,02^\circ$ -Schritten sowie einer Messgeschwindigkeit von $0,5 \text{ s/Schritt}$. Der Probenträger wurde während der Messung mit 15 U/min gedreht. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *DIFFRAC.EVA V. 5.1.0.5*. (Bruker Corporation, Billerica, USA). Zur Bestimmung der qualitativen Phasenzusammensetzung wurde das Beugungsmuster der Proben mit den folgenden Referenzbeugungsmustern der Datenbank ICDD (*International Centre for Diffraction Data*) verglichen: α -TCP (PDF-Nr. 09-0348), β -TCP (PDF-Nr. 09-0169), Brushit (PDF-Nr. 09-0077), Farringtonit (PDF-Nr. 33-0876), Monetit (PDF-Nr. 09-0080), Newberyit (PDF-Nr. 35-0780), Periklas (PDF-Nr. 04-0829), Magnesiumpyrophosphat (PDF-Nr. 01-0866), Stantfieldit (PDF-Nr. 11-0231) und Struvit (PDF-Nr. 15-0762). Die quantitativen Zementzusammensetzungen wurden mittels der Software *TOPAS V6* (Bruker Corporation, Billerica, USA) nach der Rietveld-Methode bestimmt. Alle Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Elke Vorndran durchgeführt.

3.2.4 Ethikvotum

Ein positives **Ethikvotum mit der Antragsnummer 2019090501** für die Durchführung der nachfolgend beschriebenen Zelleexperimente wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg erteilt und ist im Anhang (Kapitel 8.6) beigefügt.

3.2.5 Kultivierung der humanen Osteoklasten

Die humanen Monozyten (hM) wurden aus Buffy-Coat (BC) isoliert, der von *Bayerischen Roten Kreuz Wiesentheid* bezogen und maximal 24 h nach der Spende aufbereitet wurde. Das Spenderblut stammte von drei verschiedenen und irreversibel anonymisierten Spendern, die alle männlich und zwischen 54 und 56 Jahre alt waren.

Der BC ist ein Nebenprodukt der Vollblutverarbeitung und enthält hauptsächlich Leukozyten (wie Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) und Thrombozyten sowie einen geringen Restanteil an Erythrozyten [133].

Die zur Monozytenkultivierung verwendeten Zellkulturmedien wurden wenige Tage im Voraus hergestellt und sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Damit sich die Monozyten in Osteoklasten differenzieren können, wurden dem Differenzierungsmedium kurz vor jedem Medienwechsel die Zytokine M-CSF (25 ng/mL) und RANKL (50 ng/mL) zugesetzt.

Tabelle 3.7: Zellkulturmedien für die Osteoklastenkultivierung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Absättigungsmedium	100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin in α-MEM
Aussaatmedium	100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 2 mmol/L L-Glutamine 20 mmol/L HEPES 10 % FCS in α-MEM
Differenzierungsmedium	100 U/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 2 mmol/L L-Glutamine 20 mmol/L HEPES 5 % hitzeinaktiviertes FCS 5 % hitzeinaktiviertes humanes Serum 25 ng/mL M-CSF (ab Tag 0/2) 50 ng/mL RANKL (ab Tag 0) in α-MEM

3.2.5.1 Nährstoffabsättigung der Scaffolds

Einen Tag vor der Zellaussaat wurden die Versuchsoberflächen in dem Absättigungsmedium (Tabelle 3.7) ausgelagert, um die Proben mit Nährstoffen anzureichern. Dazu wurden 200 µL pro 96-Well und 400 µL pro 48-Well Absättigungsmedium auf die Versuchsoberflächen gegeben und diese über Nacht im Brutschrank *Heracell™ 150i* bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dieser Tag vor der Zellaussaat wurde als *Tag 0/0* definiert (Tabelle 3.9).

3.2.5.2 Isolation der humanen Monozyten aus Buffy-Coats durch dreifache Dichtegradientenzentrifugation

Die hM wurden mit einer dreifachen Dichtegradientenzentrifugation isoliert, in Anlehnung an die Protokolle von Repnik et al. [189] und Bernhardt et al. (Protokoll „Yellow“) [133]. Die erforderlichen Lösungen sind in der Tabelle 3.8 aufgeführt und wurden einen Tag im Voraus angesetzt. Die Zentrifugation erfolgte ausschließlich mit 50 mL Falcons in der Zentrifuge *VWR Mega Star 1.6R*.

Tabelle 3.8: Lösungen für die Dichtegradientenzentrifugation pro 30 mL BC.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Bidest	
PBS (E/B)	2 mmol/L EDTA in Bidest 0,5 % BSA in Bidest in PBS
Pancoll, Dichte 1,077 g/L	
Hyperosmotische Percoll-Lösung	19,4 mL Percoll (Dichte 1,135 g/mL) 16,6 mL Bidest 4,0 mL 1,6 mol/L Natriumchlorid in Bidest
Isoosmotische Percoll-Lösung	4,15 mL Percoll (Dichte 1,135 g/mL) 4,85 mL Bidest 1,0 mL 1,5 mol/L Natriumchlorid in Bidest
α-MEM	<i>Alpha Medium</i> von Biochrom oder <i>Minimum Essential Medium Eagle</i> von Sigma-Aldrich

Die hM wurden wie folgt in einem 3-Schritt-Verfahren aus dem BC isoliert:

Im **ersten Schritt** wurden die *mononukleären Zellen des peripheren Blutes* (*Peripheral blood mononuclear*, PBMC) von Blutplasma, Granulozyten und Erythrozyten isoliert: Der von *Bayerischen Roten Kreuz Wiesentheid* erhaltene Blutbeutel mit BC wurde unter sterilen Bedingungen an einem der Auslassschläuche möglichst nah am Beutel mit einer Schere durchtrennt und 30 mL des Inhalts in den Falcon 1 überführt. Die Hälfte des 1. Falcons wurde in einen neuen (2.) Falcon geteilt. Beide Falcons wurden 1:2 mit raumtemperierter PBS (E/B) verdünnt (15 mL + 15 mL) und händisch durch Umschwenken gründlich durchmischt (BC-PBS). Anschließend wurden 22,5 mL Pancoll in zwei neue Falcons (3. und 4.) vorgelegt und das BC-PBS-Gemisch aus dem 1. bzw. 2. Falcon in den 3. bzw. 4. Falcon aufgeschichtet. Dabei wurden die Falcons mit Pancoll möglichst schräg gehalten und das BC-PBS-Gemisch mit einer serologischen Pipette bei niedrigster Geschwindigkeit am Rand des Falcons auf das Pancoll aufgeschichtet, sodass sich die beiden Phasen nicht vermischten (Abbildung 5a). Anschließend wurden die Proben bei 20 °C für 15 min mit 1000 × g und ohne Bremse zentrifugiert. Danach waren von oben nach unten fünf Schichten zu erkennen: 1. Blutplasma-PBS-Gemisch (gelblichklar), 2. PBMC (weiß), 3. Pancoll (rötlich-trüb), 4. Granulozyten und 5. Erythrozyten (dunkelrot) (Abbildung 5b). Die PBMC-Schichten wurden vorsichtig mit einer serologischen Pipette aufgenommen und in einen frischen (5.) Falcon gepoolt. Es wurde darauf geachtet, dass so wenig wie möglich von der trüben Pancoll-Schicht und am Falconrand haftende Reste der PBMC-Schicht mitaufgenommen wurde. Die verbleibenden Schichten im 3. und 4. Falcon wurden verworfen. Für den ersten Waschschrift wurde das PBMC-Pellet bzw. der 5. Falcon mit raumtemperierter PBS (E/B) auf 50 mL aufgefüllt, kurz geschwenkt und bei 20 °C für 7 min mit 400 × g und mit maximaler Bremse zentrifugiert. Der obere milchige PBS (E/B)-Überstand wurde abpipettiert und verworfen, sodass ein PBMC-Pellet am Boden des Falcon zurückblieb. Dieses PBMC-Pellet wurde mit 2 mL Bideest für 30 s resuspendiert, um die verbleibenden Erythrozyten zu lysieren. Anschließend wurde der Waschschrift analog zum ersten Schritt noch zweimal wiederholt, mit Ausnahme der Erythrozytenlyse mit Bideest.

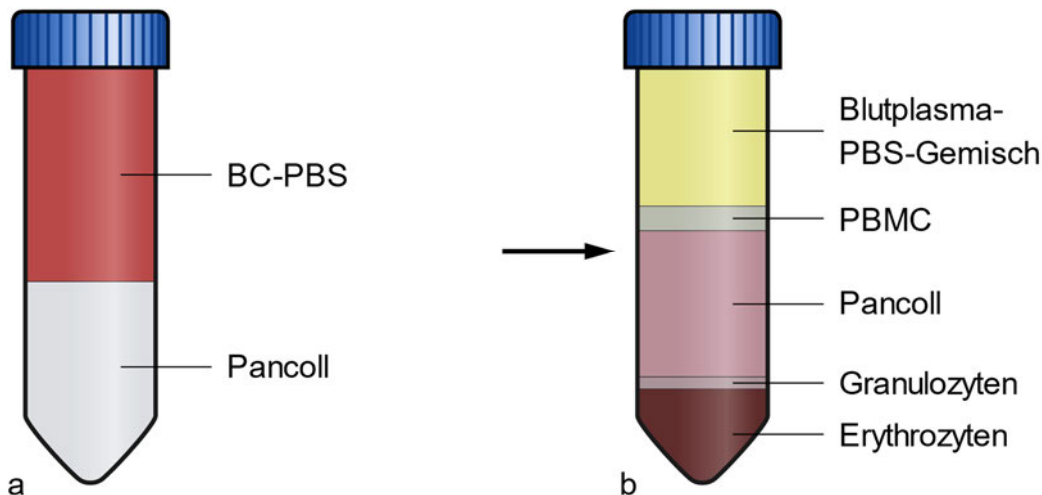


Abbildung 5: PBMC-Isolation aus BC mittels Pancoll. In einem 50 mL Falcon sind 22,5 mL BC-PBS-Gemisch auf 15 mL Pancoll (1,077 g/L) aufgeschichtet (a). Nach Zentrifugation mit $1000 \times g$ für 15 min bei 20°C und ohne Bremse befindet sich die PBMC-Schicht zwischen dem Blutplasma-PBS-Gemisch und dem Pancoll. Die Granulozyten und Erythrozyten befinden sich unterhalb des Pancolls (b). Eigene Darstellung.

Im **zweiten Schritt** erfolgte die Trennung der Lymphozyten-Fraktion aus PBMC: Zunächst wurde das aus dem ersten Schritt isolierte PBMC-Pellet mit 12 mL α -MEM gründlich resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 3 mL dieser Zellsuspension in vier neue Falcons (6.–9.) mit jeweils 10 mL vorgelegter hyperosmotischer Percoll-Lösung in die schräggehaltenen Falcons langsam aufgeschichtet (Abbildung 6a) und bei 20°C für 15 min mit $600 \times g$ und ohne Bremse zentrifugiert. Die vier resultierenden Schichten waren wie folgt angeordnet (von oben nach unten): 1. α -MEM (rosa-klar), 2. kaum erkennbare monozytenangereicherte Schicht (weißlich), 3. Percoll (weißlich-trüb) und 4. Lymphozyten (gelbes Pellet am Falconboden) [189] (Abbildung 6b). Die α -MEM- und monozytenangereicherten Schichten sowie alle bis auf die letzten 4 mL der Percoll-Schichten wurden mit einer serologischen Pipette aufgenommen und in zwei neue Falcons (10. und 11.) gepoolt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Lymphozytenschichten nicht aufgewirbelt wurden. Für den vierten Waschschrift wurden der 10. und 11. Falcon mit je 50 mL PBS (E/B) aufgefüllt, kurz geschwenkt und bei 20°C für 7 min mit $400 \times g$ und mit maximaler Bremse zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen, die monozytenangereicherten Pellets mit 1,5 mL α -MEM pro Falcon resuspendiert und in einem Falcon gepoolt (monozytenangereicherte Suspension).

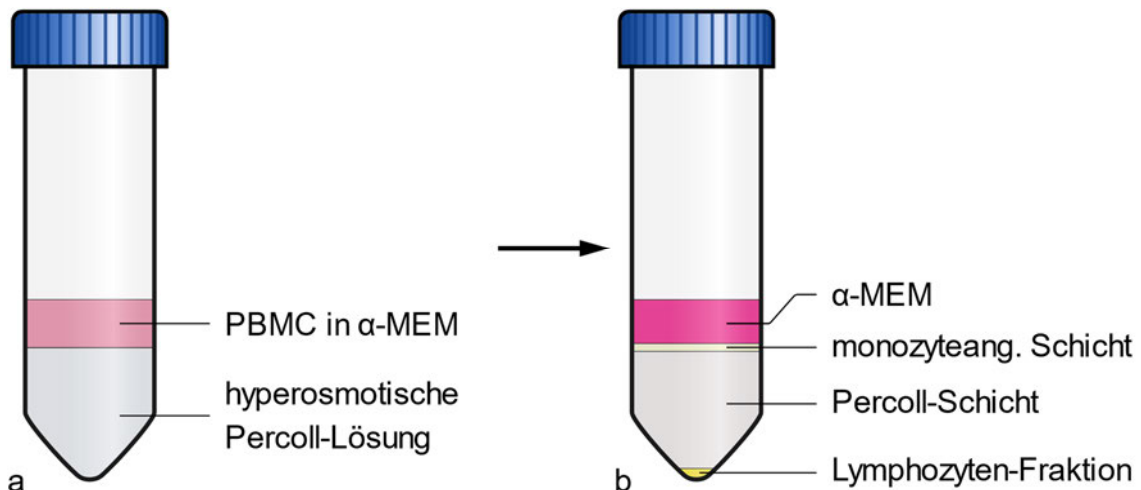


Abbildung 6: Isolation der monozytenangereicherten Suspension aus PBMC mit hyperosmotischer Percoll-Lösung. 3 mL in α -MEM resuspendierte PBMC sind auf 10 mL hyperosmotischer Percoll-Lösung aufgeschichtet (a). Nach Zentrifugation mit $600 \times g$ für 15 min bei 20°C und ohne Bremse ist eine schmale, monozytenangereicherte Schicht zwischen der Percoll-Lösung und dem α -MEM zu erkennen. Die Lymphozytenfraktion befindet sich am Falcon-Boden (b). Eigene Darstellung.

Im **dritten Schritt** wurden die Monozyten von den Thrombozyten getrennt: Dazu wurden die 3 mL monozytenangereicherte Suspension aus dem zweiten Isolationsschritt in einem (12.) Falcon mit 10 mL vorgelegter isoosmotischer Percoll-Lösung aufgeschichtet und bei 20°C für 15 min mit $400 \times g$ und ohne Bremse zentrifugiert (Abbildung 7). Der klare Überstand wurde verworfen. Für den Waschschrift wurde das Pellet mit PBS (E/B) auf 50 mL aufgefüllt, kurz geschwenkt und bei 20°C für 7 min mit $400 \times g$ und mit maximaler Bremse zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 mL α -MEM zu einer Zellstocksuspension resuspendiert.

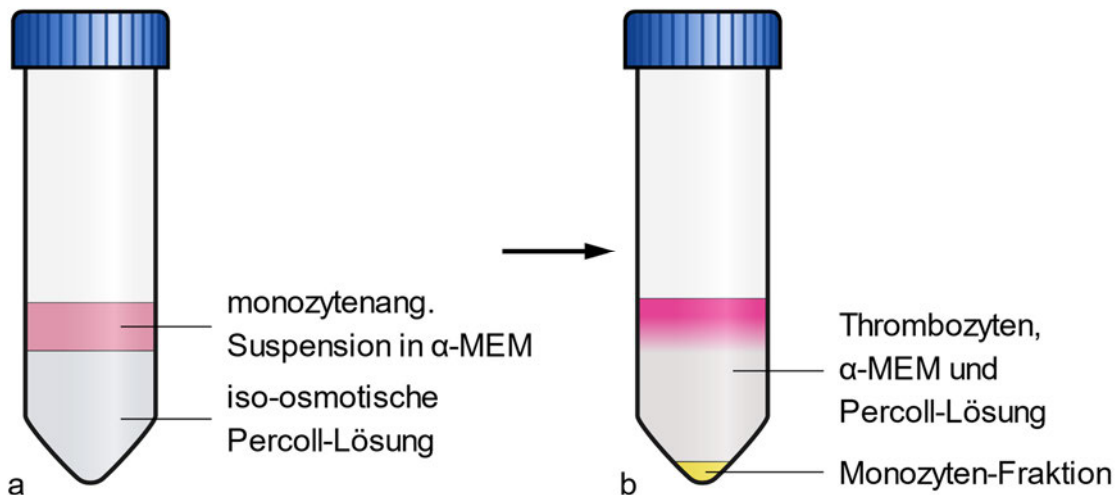


Abbildung 7: Monozytenisolierung aus der monozytenangereicherten Suspension mit isoosmotischer Percoll-Lösung. 3 mL der monozytenangereicherten Suspension in α -MEM sind auf 10 mL der isoosmotischen Percoll-Lösung aufgeschichtet (a). Nach Zentrifugation mit $400 \times g$ für 15 min bei $20 \text{ }^\circ\text{C}$ und ohne Bremse befinden sich die Monozyten am Falcon-Boden. Der α -MEM-Percoll-Überstand enthält die Thrombozyten (b). Eigene Darstellung.

Nach jedem der drei Isolationschritte wurde die Zellfraktionsverteilung mit *CASY® Cell Counter* und der dazugehörigen Software *CASY V. 2.5* evaluiert, wobei ein Durchmesserbereich von $3,00\text{--}12,00 \text{ }\mu\text{m}$ für die Bewertung der Gesamtzellkonzentration und ein Durchmesserbereich von $7,65\text{--}12,00 \text{ }\mu\text{m}$ für die Bestimmung der Monozytenfraktion eingestellt wurde. Die Zellfraktionsverteilung während der drei Isolationschritte wurde exemplarisch an einem Spender (Spender 3) veranschaulicht.

3.2.5.3 Monozytenaussaat auf Polystyrol, Glas und Scaffolds

Für die Kultivierung bzw. Versuchsdurchführung wurden die hM auf Polystyrol (PS) und Scaffolds in 96-Well-Platten *Nunclon™ Delta Surface* ausgesät. Für die Rasterelektronenmikroskopie der Zellen auf einer neutralen Oberfläche wurden die hM auf Deckgläser mit 10 mm Durchmesser in der 48-Well-Platte *Nunclon™ Delta Surface* kultiviert und für die Rasterelektronenmikroskop-(REM)-Aufnahme am Tag 17 vorbereitet (siehe Kapitel 3.2.11).

Ausgehend von der berechneten Monozytenkonzentration in der Zellstocksuspension wurde das Aussaatmedium auf eine Konzentration von $1 \times 10^6 \text{ hM/mL}$ eingestellt. Nach Absaugen des Absättigungsmediums aus den vorbereiteten Wellplatten (siehe Kapitel 3.2.5.1) wurde eine Besiedlungsdichte von $3,3 \times 10^5 \text{ hM/cm}^2$ auf PS und Glas (Deckgläser) angestrebt, was einer Gesamtzellzahl von $1,0 \times 10^5 \text{ hM}$ pro 96-Well und $3,8 \times 10^5 \text{ hM}$ pro 48-Well entspricht. Auf Scaffolds wurden $6,6 \times 10^5 \text{ hM/cm}^2$ bzw.

$2,0 \times 10^5$ hM pro 96-Well ausgesät. Das Gesamtvolumen des Aussaatmediums betrug 200 μ L pro 96-Well und 400 μ L pro 48-Well. Der Zeitpunkt der Zellaussaat wurde als *Tag 0/1* definiert (siehe Tabelle 3.9). Die frisch besiedelten Proben wurden bis zum nächsten Tag im Brutschrank *Heracell™ 150i* bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

3.2.5.4 *Stimulation und Differenzierung zu Osteoklasten*

Wie in Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.3 beschrieben, wurden die Proben über Nacht in Absättigungsmedium ausgelagert (Tag 0/0), bevor die isolierten Zellen auf die Probenoberflächen ausgesät wurden (Tag 0/1).

Einen Tag nach der Zellaussaat wurde das alte Aussaatmedium bis auf ca. 20 μ L abgesaugt und durch frisches Differenzierungsmedium mit 25 ng/mL M-CSF ersetzt (Tag 0/2), wobei 200 μ L Differenzierungsmedium pro Well für die 96-Well-Platten und 400 μ L pro Well für die 48-Well-Platten verwendet wurden.

Zwei Tage später wurde das Differenzierungsmedium erneut ausgetauscht, wobei das frische Differenzierungsmedium nun zusätzlich zu 25 ng/mL M-CSF auch 50 ng/mL RANKL enthielt. Pro 96er-Well wurden 200 μ L des Differenzierungsmediums und pro 48er-Well 400 μ L pipettiert. Ab diesem Zeitpunkt begann die Osteoklastendifferenzierung, weshalb er als *Tag 0* definiert wurde. Das Differenzierungsmedium wurde alle drei Tage bis *Tag 21* gewechselt, wie in Tabelle 3.9 gezeigt.

Tabelle 3.9: Übersicht der Monozyteninkubation mit den verschiedenen Kulturmedien vom Tag 0/0 bis Tag 3.

Tag	Kulturmedium
0/0	Absättigungsmedium für die Vorinkubation
0/1	Aussaatmedium mit Zellen
0/2	Differenzierungsmedium mit 25 ng/mL M-CSF
0/3	–
0	Differenzierungsmedium mit 25 ng/mL M-CSF und 50 ng/mL RANKL
1	–
2	–
3	Differenzierungsmedium mit 25 ng/mL M-CSF und 50 ng/mL RANKL
usw.	

Der Fortschritt der Differenzierung wurde mit dem Durchlichtmikroskop *VisiScope IT 404* und der Software *ZEN 2.3 (blue edition)* der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH auf PS am Tag 0/1, 3, 6, 10, 16 und 22 verfolgt.

3.2.6 Zytochemische Färbung des Enzyms Tartrat-resistente saure Phosphatase, Durchlicht- und Stereomikroskopie

Die TRAP-Färbung von Osteoklasten wurde mit einem kommerziell erhältlichen *sauren Phosphatase-Kit* von Sigma-Aldrich gemäß der mitgelieferten Anleitung [190] durchgeführt. Dabei hydrolysiert TRAP den Phosphorsäureester von Naphthol-AS-BI-Phosphat (N-ASBI-P), was zu einer Spaltung von Naphthol-AS-BI führt. Dieses bindet an das *Fast Garnet GBC* und verursacht eine unlösliche Ablagerung eines kastanienbraunen/violetten Farbstoffs im Zytoplasma von TRAP-aktiven Zellen [190].

Als erstes wurde die Fixier- und Färbelösung am Tag des Versuchs frisch vorbereitet: Die Fixierlösung wurde aus 3,316 mL Aceton, 1,276 mL *Zitrat-Lösung* und 0,408 mL 37%iger Formaldehyd in einem 10 mL *Rollrandglas* hergestellt und bis zur Verwendung bei RT verschlossen gehalten. Zur Herstellung der Färbelösung wurde zunächst die *di-azotierte Fast Garnet GBC-Lösung* in einem *SafeSeal Reagiergefäß* (Eppi) angesetzt, indem 22,22 µL *Fast Garnet GBC* und 22,22 µL *Natriumnitrit* für 30 s resuspendiert und für 2 min stehen gelassen wurden. Diese Lösung wurde anschließend mit 2 mL auf 37 °C vorgewärmtem Bidest vermischt. Die Färbelösung wurde durch die weitere Zugabe von 22,22 µL *Naphthol-AS-BI-Phosphat-Lösung*, 88,89 µL *Azetat-Lösung* und 44,44 µL *Tartrat-Lösung* komplettiert.

Vor der Färbung wurde das Kulturmedium aus den Wells abgesaugt, die Zellen auf den Oberflächen mit 100 µL Fixierlösung pro 96 Well für 30 s fixiert und die Proben zweimal mit 200 µL PBS pro Well gewaschen und abgesaugt. Anschließend wurden 100 µL Färbelösung pro Well pipettiert und für 60 min im Brutschrank *Heracell™ 150i* bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nachdem die Färbelösung abgesaugt, die Oberflächen zweimal mit 200 µL Bidest pro Well gewaschen und über Nacht bei RT getrocknet wurden, konnten die Proben analysiert werden.

Mit dem Durchlichtmikroskop *VisiScope IT 404* und der Software *ZEN 2.3 (blue edition)* der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH wurde die PS-Referenz analysiert. Mit dem Stereomikroskop *SteREO Discovery.V20* und der Software *ZEN 2012 (blue edition)* der Firma Carl Zeiss Microscopy GmbH wurden die Scaffolds analysiert.

Insgesamt wurde die TRAP-Färbung an Zellkulturen aller drei Spender und jeweils am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dazu wurden für jeden Probenotyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) jeweils zwei Proben pro Spender untersucht. Die repräsentativen Scaffolds und Stellen wurden abgebildet und die Ergebnisse qualitativ eingeschätzt.

3.2.7 Zellyse

Die Zellyse wurde zur Bestimmung der DNA-Konzentration (Kapitel 3.2.8) sowie der intrazellulären TRAP-Aktivität (Kapitel 3.2.9) durchgeführt.

An den Versuchstagen 10, 16 und 22 wurde das Kulturmedium aus den Wells abgesaugt und die Proben zweimal mit 200 μ L PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden 300 μ L Lyse-Puffer (1 % *Triton*TM X-100 in PBS) pro Well auf die Proben pipettiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Das resultierende Zellysate wurde dreimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut, um eine gründlichere Zellyse zu erreichen. Die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte ebenfalls bei -80 °C.

Bei zwei Spendern (Spender 1 und 2) wurden die Zellen auf den Scaffolds in demselben Well mit 300 μ L Lyse-Puffer lysiert, in dem sie kultiviert wurden. Bei einem Spender (Spender 3) wurden die Scaffolds nach den Waschschritten in ein frisches Well überführt und die Zellyse sowohl auf den Scaffolds als auch in den entsprechenden Kultivierungswells mit je 300 μ L Lyse-Puffer durchgeführt, um die DNA-Konzentration und Enzymaktivität auf dem PS (Kultivierungswell) und den am Scaffold haftenden Zellen separat zu erfassen.

3.2.8 DNA-Quantifizierung (PicoGreenTM-Assay)

Das *Quant-iT*TM *PicoGreen*TM *dsDNA Assay Kit* ermöglicht die Quantifizierung von doppelsträngiger DNA in einer Lösung durch Bindung des PicoGreenTM-Reagenzes an die Nukleinsäure. Mittels Fluoreszenz kann der dabei entstandene DNA-Farbstoff-Komplex gemessen werden. Die daraus ermittelten DNA-Konzentrationen dienen gleichzeitig zur Bestimmung der DNA-normierten TRAP-Aktivität (Kapitel 3.2.9).

Zunächst wurde das im Kit enthaltene TE-Puffer-Konzentrat 1:20 mit Bdest am Versuchstag verdünnt. Die PicoGreenTM-Arbeitslösung wurde durch Verdünnen des PicoGreenTM-Reagenzes mit dem TE-Puffer im Verhältnis 1:800 am Versuchstag frisch hergestellt und lichtgeschützt bei RT aufbewahrt. Als Nächstes wurden 10 μ L Zellysate (Kapitel 3.2.7) pro Probe und Well in eine schwarze 96-Well-Microplatte von *Greiner Bio-*

One GmbH pipettiert. Anschließend wurden 190 μL PicoGreen™-Arbeitslösung pro Well mit einer Mehrkanalpipette zugegeben, etwaige Luftbläschen mit einer Kanüle beseitigt und die Proben lichtgeschützt bei RT auf dem Schüttler *Rotamax 120* bei 100 U/min für 5 min inkubiert. Danach wurde die Fluoreszenzintensität bei 485 nm Anregungs- und 535 nm Emissionswellenlänge mit dem Mikroplatten-Lesegerät *Spark 20M* und der dazugehörigen Software *SparkControl magellan V. 1.2* gemessen.

Für die Bestimmung der Kalibriergeraden wurde der im Kit enthaltene λ -DNA-Standard in verschiedenen Konzentrationen mit TE-Puffer verdünnt, jeweils 10 μL davon mit 190 μL PicoGreen™-Arbeitslösung vermischt und die Fluoreszenzintensität in den Well-Platten mit den Proben bei jeder Messung neu bestimmt. Für die Referenzleerwerte wurden 10 μL Lyse-Puffer (1 % *Triton™ X-100* in PBS) als Probenleerwert („Zellysateleerwert“) und 10 μL TE-Puffer als Standardleerwert mit jeweils 190 μL PicoGreen™-Arbeitslösung bei jeder Messung in den Well-Platten mit den Proben mitgeführt. Die so bestimmten Hintergrundfluoreszenzen wurden von den entsprechenden Messwerten (Zellysate oder DNA-Standards) subtrahiert. Alle DNA-Standards und Referenzleerwerte wurden als Duplikate gemessen.

Die DNA-Standards und die Zellysate wurden während der Vorbereitungen auf Eis gelagert. Beim Arbeiten mit den PicoGreen™-Arbeitslösungen wurde eine möglichst kurze Verzögerungszeit zwischen den einzelnen Schritten angestrebt.

Die DNA-Quantifizierung wurde an den Tagen 10, 16 und 22 bei drei Spendern durchgeführt. Pro Spender wurden für jeden Probentyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) drei Proben ($n = 9$) in Duplikaten gemessen. Bei zwei Spendern (Spender 1 und 2) wurde die DNA-Konzentration in demselben Well bestimmt, in dem die Zellen kultiviert wurden. Bei einem Spender (Spender 3) wurde die DNA-Konzentration separat auf den Kultivierungs-Scaffolds und den entsprechenden Kultivierungs-Wells erfasst. Diese Teilergebnisse sind im Anhang beigefügt (siehe Kapitel 8.2). Für die Gesamtauswertung wurden die Ergebnisse aller drei Spender herangezogen, indem die DNA-Konzentrationen der Kultivierungs-Scaffolds und der entsprechenden Kultivierungs-Wells bei Spender 3 addiert wurden. Diese Summe wurde analog zu den Ergebnissen von Spender 1 und 2 in die statistische Gesamtauswertung (Kapitel 3.2.14) einbezogen.

3.2.9 Photometrische Enzymaktivitätsmessung der Tartrat-resistente saure Phosphatase

Es ist bekannt, dass das Enzym TRAP in der Lage ist, das nicht-native Substrat *p-Nitrophenylphosphat* (pNPP) zu dem Produkt *p-Nitrophenol* (pNP) zu hydrolysieren [93], das eine gelbe Farbe annimmt. Diese kann photometrisch gemessen werden. Dazu wurden zunächst der Acetat-Tartrat-Puffer, die Stopp-Lösung und der Lyse-Puffer mehrere Tage im Voraus und die TRAP-Substrat-Lösung und pNP-Stock-Lösung am Tag des Versuchs vorbereitet (siehe Tabelle 3.10).

In eine frische 96-Well-Platte *Nunclon™ Delta Surface* wurden 10 µL Zellysate (Kapitel 3.2.7) pro Well pipettiert, gefolgt von 150 µL TRAP-Substrat-Lösung und einer 60-minütigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank *Heracell™ 150i*. Um die enzymatische Reaktion nach 1 h zu beenden, wurden 50 µL Stopp-Lösung pro Well zugegeben. Die Intensität der Gelbfärbung wurde über die Absorption bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm mit dem Mikroplatten-Lesegerät *Spark 20M* und der dazugehörigen Software *SparkControl magellan V. 1.2* gemessen.

Eine Kalibriergerade wurde mit je 150 µL verschiedener pNP-Konzentrationen und je 10 µL Lyse-Puffer pro Well in den Well-Platten mit den Proben bei jeder Messung neu bestimmt (pNP-Standards). Für die Referenzleerwerte wurden 10 µL Lyse-Puffer mit 150 µL TRAP-Substrat-Lösung als Probenleerwert („Zellysateleerwert“) und 10 µL Lyse-Puffer mit 150 µL Acetat-Tartrat-Puffer als Standardleerwert bei jeder Messung in den Well-Platten mit den Proben mitgeführt. Nach der Inkubation der pNP-Standards und der Referenzleerwerte für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank *Heracell™ 150i* wurden 50 µL Stopp-Lösung pro Well zugegeben, analog zu den Proben. Die so bestimmten Hintergrundabsorptionen wurden von den entsprechenden Messwerten (Zellysate oder pNP-Standards) subtrahiert. Alle pNP-Standards und Referenzleerwerte wurden als Duplikate gemessen.

Tabelle 3.10: Lösungen für die Messung der TRAP-Aktivität.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Acetat-Tartrat-Puffer	100 mmol/L Natrium-Acetat 50 mmol/L Natrium-Tartrat pH-Wert auf 6,1 mit 100 mmol/L Essigsäure in Bidest
TRAP-Substrat-Lösung	7,5 mmol/L p-Nitrophenylphosphat (pNPP) in Acetat-Tartrat-Puffer
Stopp-Lösung	0,3 mol/L Natriumhydroxid in Bidest
pNP-Stock-Lösung	5 mmol/L p-Nitrophenol (pNP) in Acetat-Tartrat-Puffer
Lyse-Puffer	1 % Triton™ X-100 in PBS

Die TRAP-Volumenaktivität wurde nach der Formel (3.1) berechnet.

$$v = \frac{\Delta n}{\Delta t \times V} = \frac{\Delta c_{pNP}}{\Delta t} \quad (3.1)$$

- v Volumenaktivität (mU/mL)
- n pNP-Stoffmenge (nmol)
- t Inkubations-Zeit mit der Substrat-Lösung (min)
- V Volumen (mL)
- c_{pNP} pNP-Konzentration (nmol/mL)

Für die Berechnung der TRAP-Aktivität pro DNA-Menge wurden die entsprechenden Ergebnisse der DNA-Quantifizierung (Kapitel 3.2.8) und die Formel (3.2) verwendet.

$$\frac{a}{m_{DNA}} = \frac{\Delta c_{pNP}}{\Delta c_{DNA} \times \Delta t} \quad (3.2)$$

- a Aktivität (mU = nmol/min)
- m_{DNA} DNA-Masse (µg)
- c_{pNP} pNP-Konzentration (nmol/L)
- c_{DNA} DNA-Konzentration (µg/L)
- t Inkubations-Zeit mit der Substrat-Lösung (min)

Die Messungen der TRAP-Aktivitäten (TRAP-Volumenaktivität und TRAP-Aktivität pro DNA-Menge) wurden an den Tagen 10, 16 und 22 bei drei Spendern durchgeführt. Pro Spender wurden für jeden Probentyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) drei Proben ($n = 9$) in Duplikaten gemessen. Bei zwei Spendern (Spender 1 und 2) wurde die TRAP-Volumenaktivität in demselben Well bestimmt, in dem die Zellen kultiviert wurden. Bei einem Spender (Spender 3) wurde die TRAP-Volumenaktivität separat auf den Kultivierungs-Scaffolds und den entsprechenden Kultivierungs-Wells erfasst. Diese Teilergebnisse sind im Anhang beigefügt (siehe Kapitel 8.2). Für die Gesamtauswertung wurden die Ergebnisse aller drei Spender herangezogen, indem die TRAP-Volumenaktivitäten der Kultivierungs-Scaffolds und der entsprechenden Kultivierungs-Wells bei Spender 3 addiert wurden. Zur Bestimmung der TRAP-Aktivität pro DNA-Menge bei Spender 3 wurden die Summen der TRAP-Volumenaktivitäten und der DNA-Konzentrationen (siehe Kapitel 3.2.8) gemäß der Formel (3.2) dividiert (Daten nicht gezeigt). Die so gewonnenen Daten vom Spender 3 wurden analog zu den Ergebnissen von Spender 1 und 2 in die statistische Gesamtauswertung (Kapitel 3.2.14) einbezogen.

3.2.10 Fluoreszenzmikroskopie der Aktin-Filamente und der DNA

Zur Fluoreszenzmarkierung der Zellen wurden pro Präparat zwei Fluoreszenzfarbstoffe eingebracht: *Phalloidin* hat eine hohe Affinität zu F-Aktin und ein daran gebundener Fluoreszenzfarbstoff kann dazu verwendet werden, die Aktinringe der Versiegelungszonen von aktiven Osteoklasten zu visualisieren. *Hoechst* bindet an doppelsträngige DNA und ermöglicht so die Fluoreszenz der Nuklei.

Der Lyse-Puffer und die Block-Lösung wurden mehrere Tage im Voraus und die Phalloidin- und die Hoechst-Färbelösung am Tag des Versuchs vorbereitet (Tabelle 3.11).

Bei jedem der unten genannten Waschschriffe wurden die Proben zweimal mit 200 μL PBS pro Well für 2 min bei RT getränkt. Es wurde darauf geachtet, dass beim Absaugen der Flüssigkeiten die Probenoberflächen stets mit einer Restflüssigkeit bedeckt blieben, bevor die nächste Lösung vorsichtig am Rand des Wells zugegeben wurde, da die fixierten Zellstrukturen sehr fragil waren.

Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Präparate gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurden 100 μL *Roti®-Histofix* pro Well zu den Proben in die Kultivierungs-Wells gegeben, 5 min auf Eis gehalten und erneut gewaschen. Mit 100 μL Lyse-Puffer pro Well und einer 5-minütigen Einwirkzeit bei RT wurden die Zellen permeabilisiert.

Nach einem weiteren Waschschrift wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf den Scaffolds durch Zugabe von 100 μL Block-Lösung pro Well für 30 min bei RT gesättigt. Für die Fluoreszenzfärbung wurden zunächst 200 μL Phalloidin-Färbelösung pro Well pipettiert und 50 min bei RT lichtgeschützt einwirken gelassen. Anschließend wurden 20 μL Hoechst-Färbelösung pro Well dazugegeben und zusammen für weitere 10 min lichtgeschützt gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Scaffolds in frische 96-Wells mit 200 μm PBS überführt, sodass die Zellen auf den Scaffolds und auf den Kultivierungs-Wells separat untersucht werden konnten. Bis zur Analyse am nächsten Tag wurden alle Probenoberflächen (Scaffolds, Kultivierungs-Wells) mit 200 μL überschichtetem PBS pro Well abgedunkelt bei 4 °C aufbewahrt.

Tabelle 3.11: Lösungen für die Fluoreszenzfärbung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	
Roti@-Histofix 4,5 %	
Lyse-Puffer	0,2 % Triton™ X-100 in PBS
Block-Lösung	2,5 % BSA in PBS
Phalloidin-Färbelösung	0,1 % <i>Phalloidin-iFluor 555</i> in Block-Lösung
Hoechst-Färbelösung	133 $\mu\text{g}/\text{mL}$ <i>Hoechst 33342</i> in PBS

Zur Visualisierung der *Phalloidin*-Bindungsstellen wurde eine Anregungs-/Emissionswellenlänge von 556/574 nm eingestellt, sodass das F-Aktin rot fluoreszierte. Die Analyse der Nuklei erfolgte bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 350/461 nm, sodass eine blaue Fluoreszenz von *Hoechst* resultierte. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop *Axio Observer 7* und der Software *ZEN pro V. 2.6* von der Firma Zeiss.

Die Fluoreszenzmarkierung der Zellkulturen wurde an einem Spender am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dazu wurden sowohl die Scaffolds als auch die Kultivierungs-Wells für jeden Probenotyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) untersucht, die repräsentativen Stellen abgebildet und die Ergebnisse qualitativ eingeschätzt.

Bei der Analyse der Kultivierungs-Wellen wurden die von Scaffolds bedeckten und unbedeckten Well- bzw. PS-Stellen getrennt betrachtet. Anhand der folgenden Merkmale wurden die Zelltypen in vier Kategorien eingeteilt, wobei die osteoklastenähnlichen Zellen auf den PS-Referenzen als das maximal zu erreichende Differenzierungsstadium angesehen wurden:

0. Wenig/keine Zellen.
1. Kleine mononukleäre Zellen (ca. 15–25 μm im Durchmesser) mit diversen morphologischen Erscheinungen.
2. Riesenzellen (ca. $\geq 50 \mu\text{m}$ im Durchmesser) mit 1–2 Nuklei und mit runder oder spindelförmiger Morphologie.
3. Riesenzellen ($\geq 50 \mu\text{m}$ im Durchmesser) mit ≥ 3 zentral eingeschlossenen Nuklei und schmalen/dünnen Aktinringen.
4. Riesenzellen ($\geq 50 \mu\text{m}$ im Durchmesser) mit ≥ 3 zentral eingeschlossenen Nuklei und breiten/dicken Aktinringen.

Für eine semiquantitative Bewertung dieser Ergebnisse wurden die einzelnen Kategorien als Punkte betrachtet, sodass pro Oberfläche (unbedeckter PS-Bereich und mit Scaffold bedeckter PS-Bereich) und pro Versuchstag maximal 8 Punkte erreicht werden konnten. Dementsprechend konnten maximal 24 Punkte pro Probe für alle 3 Versuchstage erzielt werden.

3.2.11 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM-Untersuchung wurde insgesamt an Zellkulturen zweier Spender durchgeführt, wobei für jeden Spender die gleichen Versuche erfolgten. Dazu wurden für den gleichen Probentyp zwei Proben pro Spender mit hM kultiviert und am Tag 17 für die Analyse präpariert. Der eine Probensatz („Mit Zellen“) diente zur Darstellung der Zellmorphologie, des Zellzustandes und der Zell-Zement-Interaktion. Die auf Deckgläser kultivierten Zellen fungierten als Referenz. Die Präparation der Proben mit Zellen bestand aus der Fixierung der Zellen auf den Oberflächen, der Entwässerung und der Kritischen-Punkt-Trocknung. Der andere Probensatz („Nach Zellyse“) wurde für die Analyse der Resorptionslakunen verwendet. Hierfür wurden die Zellen mit Lyse-Puffer von den Scaffolds

abgelöst und die Scaffolds vor der mikroskopischen Untersuchung bei 60 °C getrocknet. Um einen Vergleich der ursprünglichen Scaffold-Morphologie („Ohne Zellkontakt“) mit den zellbesiedelten („Mit Zellen“) und zellabgelösten Proben („Nach Zellyse“) zu erhalten, wurden auch die sterilen und azellulären Scaffolds analysiert. Alle Präparate wurden vor der REM-Untersuchung mit Platin besputtert.

Für die Zellpräparation wurden die Aceton-Konzentrationen und der Lyse-Puffer mehrere Tage im Voraus und die Glutaraldehyd-Arbeitslösung am Tag des Versuchs vorbereitet (Tabelle 3.12).

Die Proben, auf denen die Zellen erhalten werden sollten („Mit Zellen“), wurden zunächst viermal mit 200 µL PBS pro Well in ihrer Well-Platte vom Kulturmedium entfernt und in leere 10-mL-Rollrandgläser überführt. Anschließend wurden die Proben mit 2 mL Glutaraldehyd-Arbeitslösung überschichtet und nach 15-minütiger Einwirkzeit auf Eis die Zellen fixiert. Daraufhin wurden die Präparate fünfmal gewaschen, indem 5 mL PBS pro Rollrandglas gegeben, 5 min lang getränkt und bis auf die letzten 2 mL abgesaugt wurden, sodass die Oberflächen stets mit PBS bedeckt blieben. Das Entwässern der Präparate erfolgte bei RT mit aufsteigenden Aceton-Konzentrationen. Dazu wurden 5 mL der neuen Aceton-Konzentration pro Rollrandglas gegeben und nach der unten genannten Einwirkzeit wieder bis auf 2 mL abgesaugt, sodass die Proben, wie bereits erwähnt, stets mit einer Lösung bedeckt blieben. Die Entwässerung erfolgte nach folgendem Schema: 2 × 15 min in 30 % Aceton, 1 × 20 min in 50 % Aceton, 1 × 30 min in 70 % Aceton, 1 × 45 min in 90 % Aceton und 5 × 30 min in 100 % Aceton. Bis zur Kritisch-Punkt-Trocknung wurden die Proben in 100 %igem Aceton in verschlossenen Rollrandgläser für mehrere Tage aufbewahrt.

Tabelle 3.12: Lösungen für die REM-Präparation.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	
Bidest	
Glutaraldehyd-Arbeitslösung	6 % Glutardialdehydlösung in PBS
Aceton-Konzentrationen	jeweils 30 %, 50 %, 70 %, 90 % Aceton in Bidest 100 % Aceton
Lyse-Puffer	1 % Triton™ X-100 in PBS

Die entwässerten Zellpräparate („Mit Zellen“) wurden in die Probendruckkammer des Kritisch-Punkt-Trockners *CPD 030* mit 100 % Aceton überführt, die Kammer dicht verschlossen und auf 8 °C abgekühlt. Anschließend wurde zehnmals flüssiges CO₂ in die Kammer eingeleitet und nach 5 min wieder abgelassen, wobei die Präparate stets mit einer Flüssigkeit bedeckt blieben. Nachdem das Aceton gegen das flüssige CO₂ ausgetauscht wurde, folgte eine Erwärmung der Druckkammer auf 42 °C. Ab 31 °C wurde der kritische Punkt erreicht und das flüssige CO₂ ging in die Gasphase über. Schließlich wurde das Gas mit weniger als 5 bar abgelassen und so die Proben für die Platin-Beschichtung (Sputtern) vorbereitet.

Die Proben, auf denen die Resorptionslakunen analysiert werden sollten („Nach Zelllyse“), wurden zweimal mit 200 µL PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Scaffolds in 2 mL Eppis mit je 300 µL Lyse-Puffer überführt und die Zellen zunächst für 50 min auf Eis, danach für weitere 10 min bei RT in dem Ultraschallbad *Sonorex Super RK 512 H* lysiert. Schließlich wurden die Scaffolds zweimal mit 200 µL Bidest pro Eppi gewaschen und für 12 h bei 60 °C getrocknet. Bis zum Sputtern wurden die Proben in den trockenen und geschlossenen Eppis für mehrere Tage bei RT gelagert.

Die Platin-Beschichtung erfolgte mit dem Sputtergerät *Leica EM ACE600*. Dazu wurden alle Präparate („Ohne Zellkontakt“, „Mit Zellen“, „Nach Zelllyse“) mit dem leitfähigen Kohlekleber *Leit-C* auf die Leittabs geklebt, auf einen Probenhalter gesetzt und eine 4 nm dicke Platinschicht besputtert.

Bei dem Rasterelektronenmikroskop handelt es sich um *Crossbeam 340*. Die Oberflächen wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 2 kV, bei 500-, 1000- und 2000-facher Vergrößerung untersucht und dabei REM-Bilder erstellt. Die REM-Aufnahmen wurden freundlicherweise von Judith Friedlein und Philipp Stahlhut durchgeführt.

3.2.12 Induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS)

Die verbrauchten Kulturmedien der zellbesiedelten Proben wurden alle drei Tage ausgetauscht und die Kulturmediumüberstände vom Tag 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21 für die *induktiv gekoppelte Plasmamassenspektrometrie* (ICP-MS) bei –20 °C aufbewahrt. Insgesamt wurden die Proben von zwei Spendern (Spender 2 und 3) für die ICP-MS-Analyse verwendet, wobei die Kulturmediumüberstände von zwei Proben pro Spender und

Probentyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) gemessen wurden ($n = 4$). Diese Kulturmediumüberstände stellen die bR dar, die sich aus der zR und der cD zusammensetzt.

Um die zR zu bestimmen, musste die Differenz zwischen der bR und der cD gebildet werden. Dazu wurden pro Probentyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) drei sterile und azelluläre Proben ($n = 3$) in 96-Well-Platten *Nunclon™ Delta Surface* analog zu den zellbesiedelten Proben in den Kulturmedien ausgelagert und die Kulturmediumüberstände ebenfalls bei -20 °C für die ICP-MS-Analyse aufbewahrt.

Zur Messung der Ionenkonzentrationen wurden die aufgetauten Kulturmediumüberstände zunächst bei 20 °C für 5 min mit $1000 \times g$ zentrifugiert und nur die oberen Mediensichten zur Analyse abpipettiert, um die Aufnahme von möglichen Zementpartikelresten und Zelltrümmern zu vermeiden. $25\text{ }\mu\text{L}$ pro Medienüberstand wurden mit 0,69%iger Salpetersäure *Roripuran®Supra* auf 2 mL aufgefüllt (1:80 Verdünnung) und vor der Messung auf dem Vortexer *Vortex Genie 2* geschüttelt. Die Analyse fand mit dem ICP-Massenspektroskop *Thermo Scientific™ iCAP™ RQ* und der dazugehörigen Software *Qtegra V. 2.10* in 2 mL Eppis mit $300\text{ }\mu\text{L}$ Schleife und dreifacher Messung pro Eppi statt. Die quantitative Bestimmung der Ionen erfolgte für Calcium, Magnesium und Phosphor und wurde bei jeder Messung gegen die Standardlösungen von *Certipur®* kalibriert.

3.2.13 pH-Wertmessung der Kulturmediumüberstände

Für die Messungen der pH-Werte wurden die verbrauchten Kulturmediumüberstände der Zellkulturen von zwei Spendern (Spender 2 und 3) am Tag 9, 15 und 21 bei -80 °C aufbewahrt. Pro Spender und Probentyp (gleiche Phase und gleicher Zeitpunkt) wurden zunächst $150\text{ }\mu\text{m}$ Kulturmediumüberstände von jeweils drei Proben in ein 1,5 mL-Eppi gepoolt ($n = 2$), sodass ein ausreichendes Volumen für die Messung zur Verfügung stand. Die Messung wurde bei 25 °C außerhalb des Brutschrankes mit dem pH-Meter *WTW inoLab® pH 730* durchgeführt.

3.2.14 Statistische Auswertung

Die Daten der einzelnen Spender, die zu einem Probentyp gehörten, wurden zur Gesamtprobenzahl n zusammengefasst.

Für die DNA- und TRAP-Auswertung wurden die Einzelwerte, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands lagen, als Ausreißer aus der Gesamtauswertung herausgenommen. So variierte n von 8 bis 9 für die Analyse der DNA-Konzentration, von 7 bis 9 für die TRAP-Volumenaktivitäten und von 6 bis 9 für die TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge. Statistische Auswertung dieser Daten und der pH-Ergebnisse erfolgten unter Verwendung der zweifachen Varianzanalyse (Tukey-Test), wobei das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt wurde. Diese statistischen Analysen und die Diagramme wurden mit der Software *OriginPro 2019b* V. 9.6.5.169 (OriginLab, Northampton, USA) durchgeführt bzw. erstellt. Die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Probentypen sind in den Tabellen 8.1 bis 8.4 im Anhang (Kapitel 8.1) aufgeführt. Die Mittelwerte (M) und Standardabweichungen (SD) wurden mit *Excel für Office 365 MSO* V. 16 (Microsoft, Redmond, USA) berechnet. Mit den Teilergebnissen von Spender 1, 2 und 3 (Kultivierungs-Scaffolds und Kultivierungs-Wells) wurde bei den Signifikanztests, M -Berechnungen und SD analog zur Gesamtauswertung verfahren, jedoch ohne die Ausreißer herauszunehmen, die außerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstandes lagen. Diese Teilergebnisse sind im Anhang beigefügt (Kapitel 8.2).

Um die zR anhand der ICP-MS-Daten statistisch zu prüfen, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (Tukey-Test) zwischen der bR und der cD angewandt. Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) sind in der Abbildung 23 mit Sternchen an den entsprechenden Tagen oberhalb der Fehlerbalken gekennzeichnet.

Alle statistischen Analysen, Berechnungen von M und SD sowie aller Diagramme wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt bzw. erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Volumenreduktion nach Sinterung

Die mittlere Volumenreduktion der Scaffolds, die vor und nach der Sinterung gemessen wurde, betrug 5,58 % ($SD = 1,23$) im Durchmesser und 5,45 % ($SD = 1,48$) in der Höhe.

4.2 Phasenzusammensetzung der Zemente (XRD)

Um die Phasenumwandlungen zu verifizieren, wurde eine qualitative und quantitative Analyse der Rohpulver, der gesinterten Scaffolds sowie der mit reaktiven Lösungen infiltrierten Scaffolds mittels Röntgendiffraktometrie durchgeführt.

Nach dem Sintern der Referenzprobe TCP stieg der β -TCP-Anteil von 41 Gew.-% auf 88 Gew.-% und der α -TCP-Anteil sank demnach von 60 Gew.-% auf 12 Gew.-%. Nach der Behandlung dieser Proben mit 2,0 mol/L H_3PO_4 lagen die Produkte Brushit (23 Gew.-%, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$) und Monetit (6 Gew.-%, $CaHPO_4$) vor. Gleichzeitig verringerte sich der β -TCP-Anteil auf 62 Gew.-% und der α -TCP-Anteil auf 9 Gew.-% (Abbildung 8).

Bei allen magnesiumhaltigen Zementen konnte kein relevanter Unterschied in den Phasenzusammensetzungen zwischen den Rohpulvern und den gesinterten Scaffolds festgestellt werden, was für eine Sinterung ohne Phasenumwandlung spricht. Mit steigendem Mengenanteil der Ausgangsstoffe Magnesiumhydrogenphosphat ($MgHPO_4$) und Magnesiumhydroxid ($Mg(OH)_2$) erhöhte sich der Anteil an Farringtonit ($Mg_3(PO_4)_2$) im Rohpulver (Tabelle 3.4), während der Anteil an Stanfieldit ($Ca_4Mg_5(PO_4)_6$) abnahm, so dass das TMP-Rohpulver zu 98 Gew.-% aus Farringtonit und zu 2 Gew.-% aus der Verunreinigung Magnesiumpyrophosphat ($Mg_2P_2O_7$) bestand. Nach der Sinterung setzte sich TMP-Sin aus 100 Gew.-% Farringtonit zusammen (Abbildung 9–11).

Nachdem die gesinterten Scaffolds mit reaktiven Lösungen infiltriert wurden, kam es zur Ausfällung der schnelllöslichen Produkte Struvit ($NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$) nach Infiltration mit DAHP und Newberyit ($MgHPO_4 \cdot 3H_2O$) nach Infiltration mit H_3PO_4 . Dabei wurde beobachtet, dass mit steigendem Gehalt der Ausgangsstoffe $MgHPO_4$ und $Mg(OH)_2$ die Produkte Struvit und Newberyit in den Scaffolds zunahmen, wobei das Produkt Newberyit stets einen fast doppelt so hohen Anteil wie das Produkt Struvit hatte. Die Edukte Stanfieldit und Farringtonit machten jedoch weiterhin den größten Anteil aus. Eine geringe Menge Brushit wurde bei CM2,25-P (3 Gew.-%) sowie Periklas bei CM2,25-P (2 Gew.-%), CM2,75-D (3 Gew.-%) und CM2,75-P (2 Gew.-%) nachgewiesen (Abbildung 9–11).

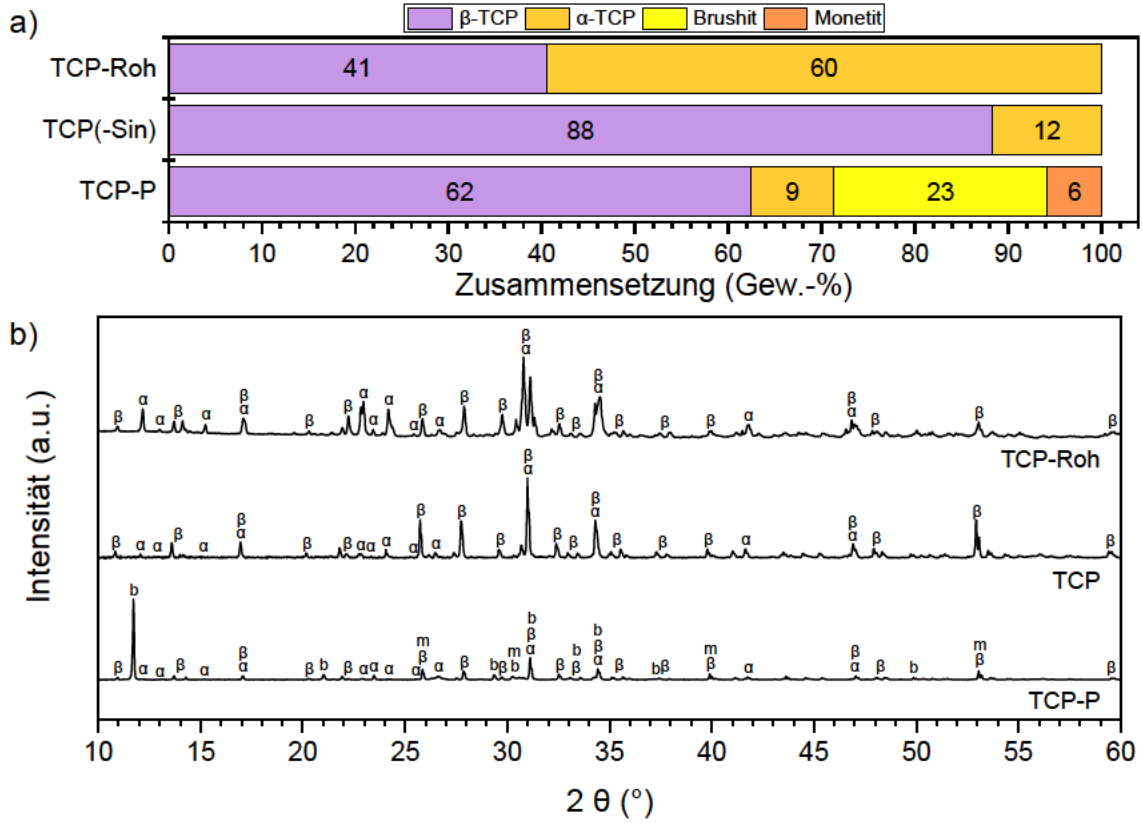


Abbildung 8: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der TCP-Zemente. Ausgehend von den Rohpulvern (Suffix „-Roh“) sind die gesinterten Scaffolds (Suffix „-Sin“) sowie die H_3PO_4 (Suffix „-P“) infiltrierten Scaffolds dargestellt. Die Peaks der Röntgendiffraktogramme markieren α -TCP (α), β -TCP (β), Brushit (b) und Monetit (m). Analyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD).

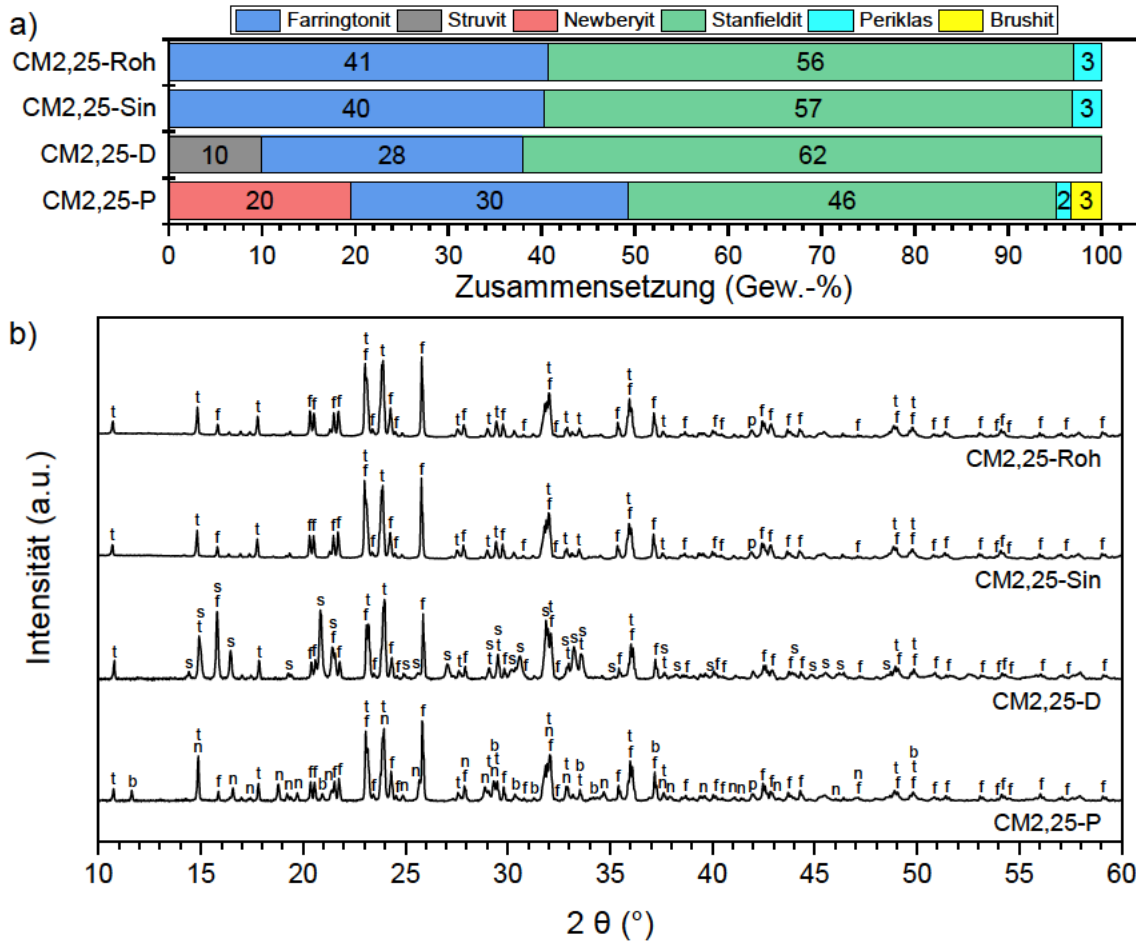


Abbildung 9: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der CM2,25-Zemente. Ausgehend von den Rohpulvern (Suffix „-Roh“) sind die gesinterten Scaffolds (Suffix „-Sin“) sowie die mit DAHP (Suffix „-D“) und H_3PO_4 (Suffix „-P“) infiltrierten Scaffolds dargestellt. Die Peaks der Röntgendiffraktogramme markieren Brushit (b), Farringtonit (f), Newberyit (n), Periklas (p), Stanfieldit (t) und Struvit (s). Analyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD).

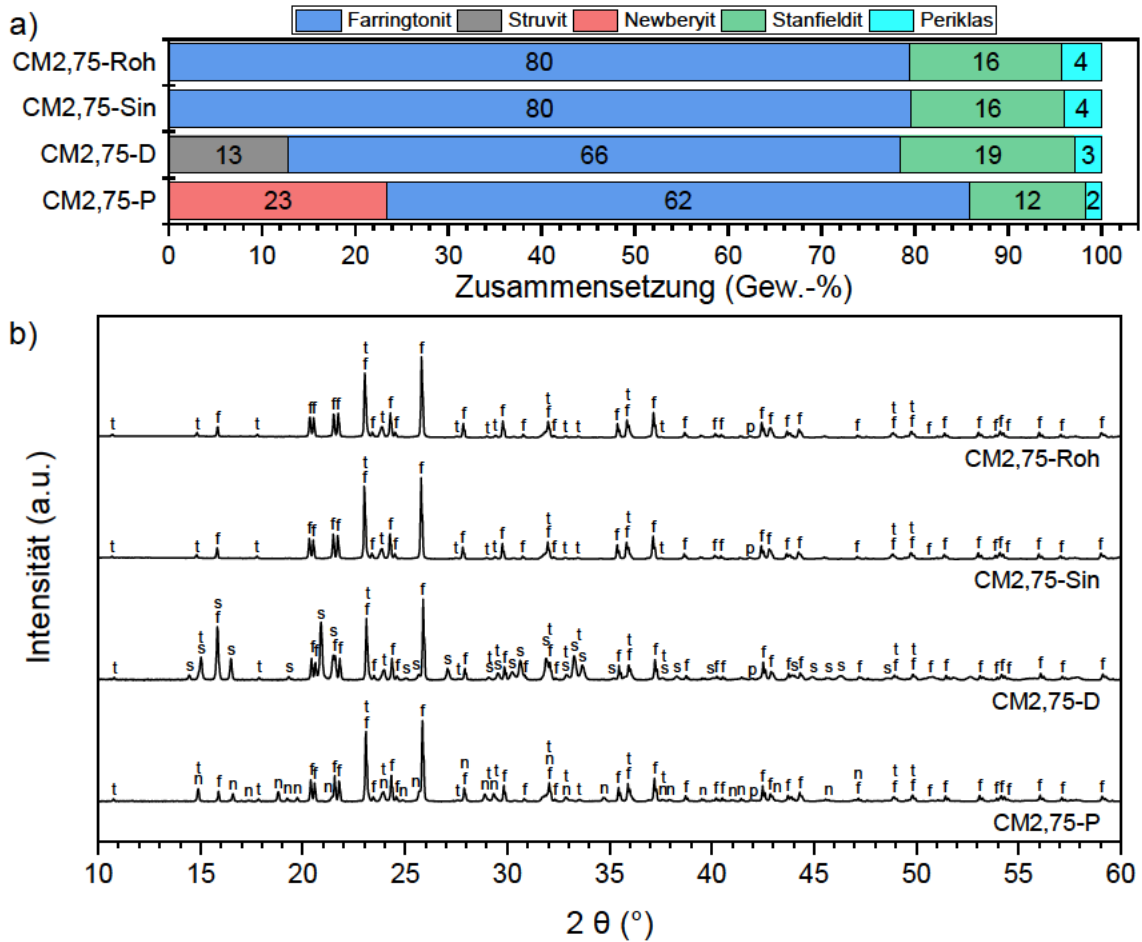


Abbildung 10: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der CM2,75-Zemente. Ausgehend von den Rohpulvern (Suffix „-Roh“) sind die gesinterten Scaffolds (Suffix „-Sin“) sowie die mit DAHP (Suffix „-D“) und H_3PO_4 (Suffix „-P“) infiltrierten Scaffolds dargestellt. Die Peaks der Röntgendiffraktogramme markieren Farringtonit (f), Newberyit (n), Periklas (p), Stanfieldit (t) und Struvit (s). Analyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD).

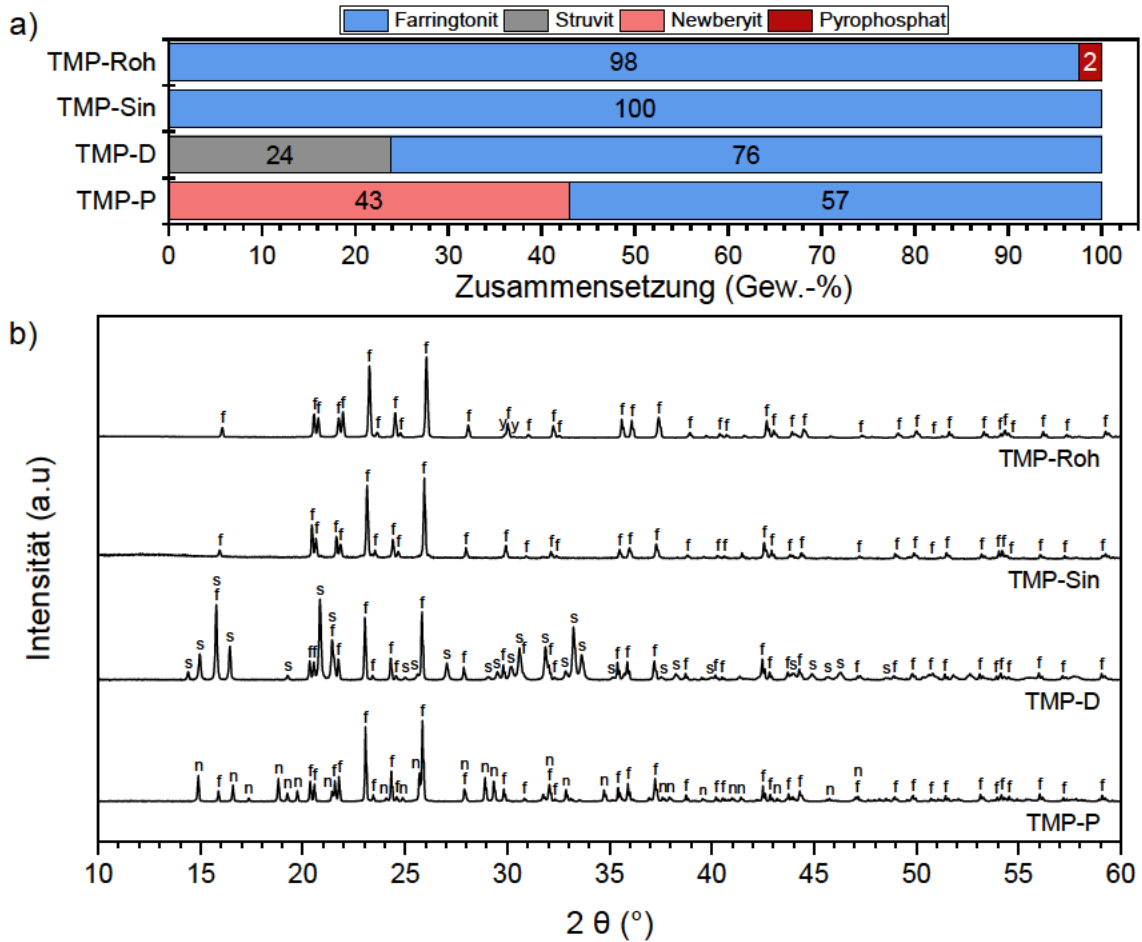


Abbildung 11: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der TMP-Zemente. Ausgehend von den Rohpulvern (Suffix „-Roh“) sind die gesinterten Scaffolds (Suffix „-Sin“) sowie die mit DAHP (Suffix „-D“) und H_3PO_4 (Suffix „-P“) infiltrierten Scaffolds dargestellt. Die Peaks der Röntgendiffraktogramme markieren Farringtonit (f), Newberyit (n), Pyrophosphat (y) und Struvit (s). Analyse mittels Röntgendiffraktometrie (XRD).

4.3 Osteoklastenkultivierung

Mittels der dreifachen Dichtegradientenzentrifugation wurden die hM sukzessive aus dem BC isoliert. Nach jedem Isolationsschritt wurden die Zellfraktionsverteilungen bestimmt. So ist in der Abbildung 12a zu erkennen, dass die Monozytenfraktion in PBMC etwa dem Anteil der Lymphozytenfraktion entsprach, während die Thrombozytenfraktion etwa dreimal höher war. Nach dem nächsten Isolationsschritt mit hyperosmotischer Percoll-Lösung reduzierte sich die Lymphozytenfraktion deutlich und die Thrombozytenfraktion halbierte sich gegenüber der Monozytenfraktion (Abbildung 12b). Nach der Isolierung mit isoosmotischer Percoll-Lösung blieb lediglich ein kleiner Teil der ursprünglichen Thrombozyten übrig, während die Monozyten den Hauptteil der Zellsuspension ausmachten (Abbildung 12c). Damit betrug die mittlere Monozytenreinheit 58,20 % ($SD = 11,21$) (Einzelwerte für Spender 1: 42,92 %; Spender 2: 62,21 %; Spender 3: 69,47 %) und die mittlere Monozytenausbeute entsprach $8,49 \times 10^7$ hM ($SD = 3,35 \times 10^7$) (Einzelwerte für Spender 1: $5,68 \times 10^7$ hM; Spender 2: $6,59 \times 10^7$ hM; Spender 3: $13,2 \times 10^7$ hM) pro 30 mL BC.

Bei einer Besiedlungsdichte von $3,3 \times 10^5$ hM/cm² auf PS und Glas waren 1 h nach der Zellaussaat runde und spindelförmige mononukleäre Zellen zu erkennen, die in den nächsten Tagen an Größe und Adhäsion zunahm (Abbildung 13a, b). Ab Tag 6 konnten unter der Stimulation mit M-CSF und RANKL binukleäre Zellen mit einem Durchmesser von etwa 50 µm auf PS nachgewiesen werden (Abbildung 13c). Ab Tag 10 waren polynukleäre Riesenzellen mit einem Durchmesser von ca. 100 µm nachweisbar (Abbildung 13d–f). Die Monozytenfusion verlief asynchron, sodass zur gleichen Zeit unterschiedliche Zellgrößen und Nukleuszahlen pro Zelle zu beobachten waren. Die Zellfusion nahm mit der Zeit tendenziell zu, sodass am Tag 22 häufig mehr als zehn Nuklei pro Zelle gezählt werden konnten (Abbildung 13f). Zudem zeigten diese polynukleären Riesenzellen im Zentrum ein gestipptes Aussehen und an der Zellperipherie waren glatte Ausläufer zu erkennen (Abbildung 13c–f).

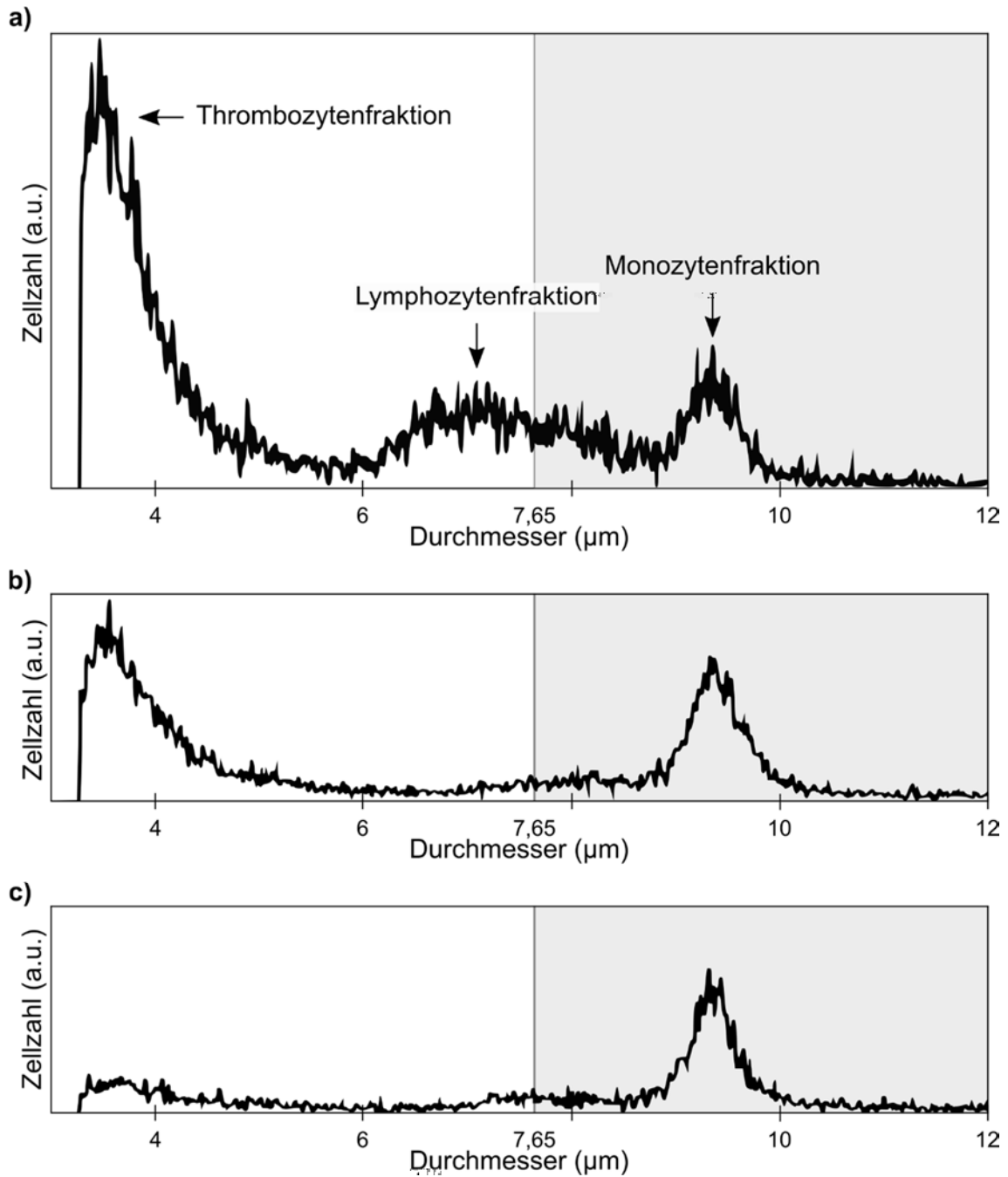


Abbildung 12: Zellfraktionsverteilung während der sukzessiven Monozytenisolation mittels einer dreifachen Dichtegradientenzentrifugation. Die Gesamtzellzahl ist im Durchmesserbereich von 3,00–12,00 µm dargestellt. Die Monozytenfraktion liegt im Durchmesserbereich von 7,65–12 µm (grau hinterlegt). PBMC nach Isolierung mit Pancoll (a). Monozytenangereicherte Suspension nach Isolierung mit hyperosmotischer Percoll-Lösung (b). Isolierte Monozytenfraktion mit isoosmotischer Percoll-Lösung (c). Darstellung der Zellfraktionsverteilung vom Spender 3 nach dem Zellszählsystem CASY® Cell Counter.

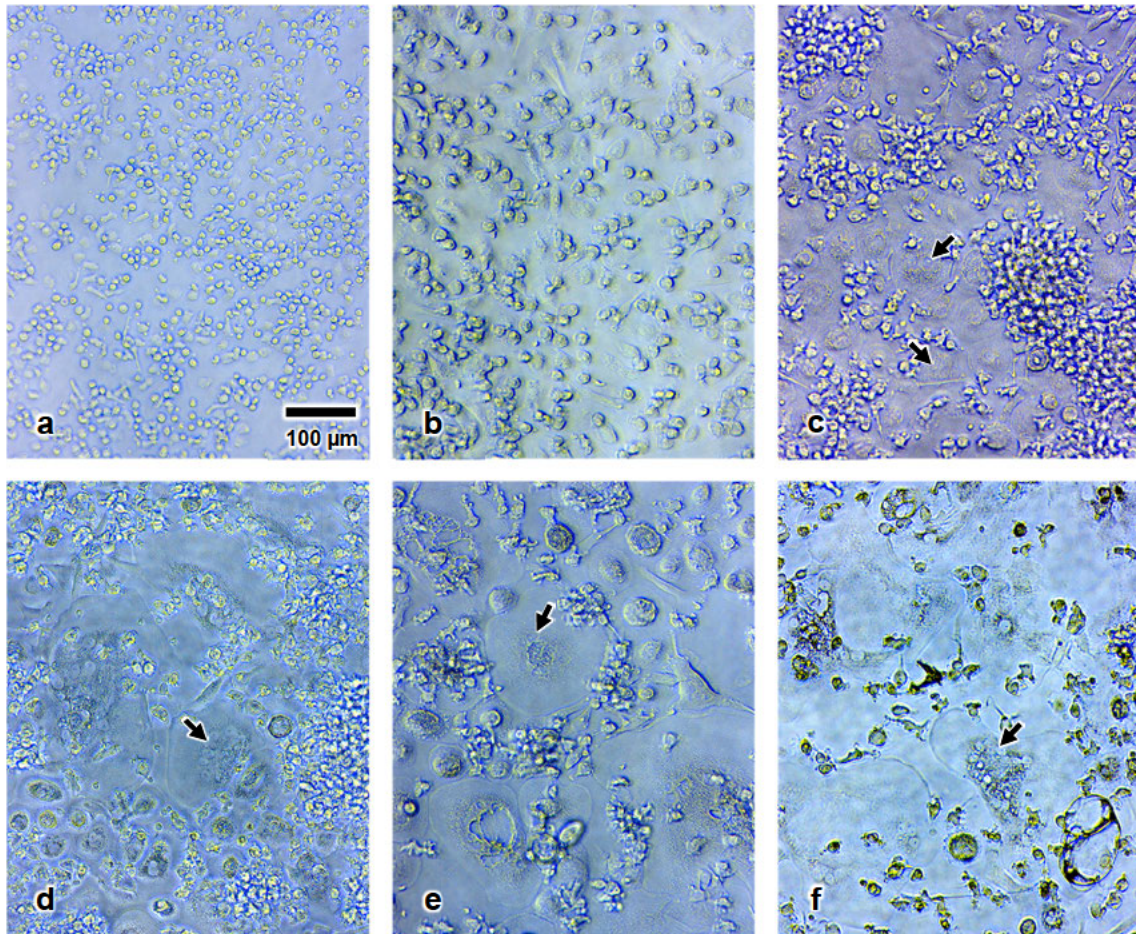


Abbildung 13: Fortschritt der Osteoklastendifferenzierung auf der PS-Referenz. Es wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät und mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Bilder wurden am Tag 0/1 (a), Tag 3 (b), Tag 6 (c), Tag 10 (d), Tag 16 (e) und Tag 22 (f) mit einem Durchlichtmikroskop bei gleicher Vergrößerung aufgenommen. Pfeile zeigen exemplarisch auf Nuklei von bi- oder polynukleären Riesenzellen.

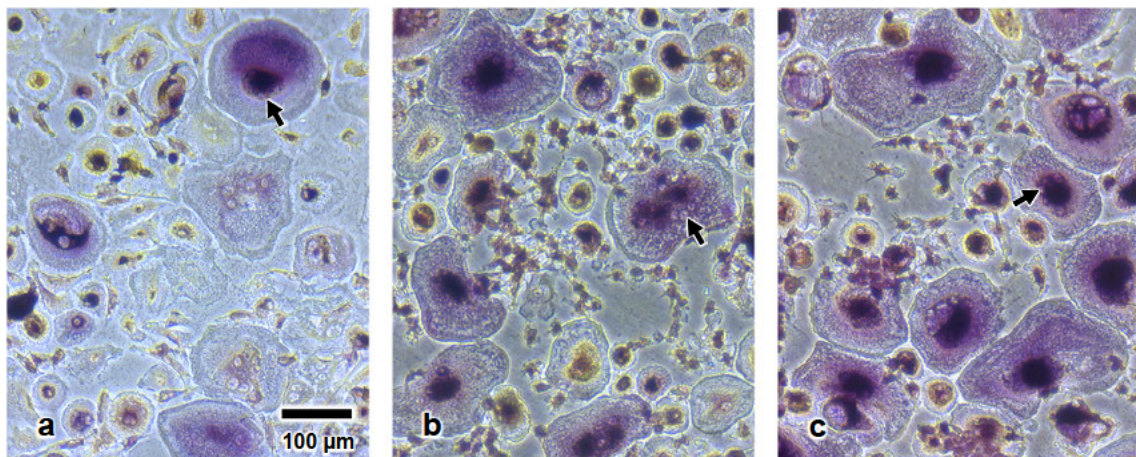


Abbildung 14: TRAP-gefärbte Zellen auf der PS-Referenz. Es wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät und mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die TRAP-Färbung wurde am Tag 10 (a), 16 (b) und 22 (c) durchgeführt. Kastanienbraune oder violette Färbung deutet auf das Vorkommen von TRAP-aktiven Zellen hin. Weißlich-gelbliche Stellen weisen auf TRAP-negative Zellen hin. Pfeile zeigen exemplarisch auf Nuklei von TRAP-aktiven Zellen. Die Bilder wurden mit einem Durchlichtmikroskop bei gleicher Vergrößerung aufgenommen.

4.4 TRAP-Färbung

Da polynukleäre Riesenzellen lediglich ein Indiz für die Osteoklastogenese sind, wurde zum Nachweis von Osteoklasten das osteoklastenspezifische Enzym TRAP angefärbt. Eine kastanienbraune/violette Färbung der Zellen deutet auf TRAP-positive Zellen hin. Eine gelbliche Färbung hingegen weist auf TRAP-negative Zellen hin.

Wie in den Abbildungen 14, 15 und 16 zu sehen ist, wurden ab Tag 10 durchgängig TRAP-positive und polynukleäre Riesenzellen auf PS festgestellt, die im Laufe des Versuchs an Größe und Farbintensität zunahmten, sodass bis Tag 22 einige von ihnen eine Größe von über 100 µm erreicht hatten. Im Zellzentrum wurde eine intensive Violett-färbung mit Nuklei beobachtet, während die Farbintensität zur Zellperipherie hin abnahm und keine Nuklei zu erkennen waren. Darüber hinaus schienen die TRAP-positiven Zellen eine hohe Adhärenz zu PS aufzuweisen.

Auf der Phase TCP wurden am Tag 16 mit ca. 50 µm die größten TRAP-positiven Zellen unter den Zementen gemessen. Obwohl ihre Zellzahlen gering waren, blieben sie über den Versuchszeitraum weitestgehend konstant. Darüber hinaus konnten kleine TRAP-negative Zellen auf den Proben beobachtet werden, die gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt waren (Abbildung 15 und 16).

Auf der Phase TCP-P fielen besonders die weißen und kugelförmigen Ablagerungen auf den Prüfkörpern auf (Abbildung 15 und 16). Diese konnten an jedem der drei Versuchstage beobachtet werden und waren an vereinzelt Stellen zu finden, wie sie in den oberen Bildausschnitten der geteilten Darstellungen zu sehen sind (Abbildung 16). Darüber hinaus bildeten sich vereinzelt gelbe Kristallite auf den Proben (unteres Teilbild der Abbildung 16 am Tag 16). Tendenziell konnten über den Versuchszeitraum nur vereinzelt TRAP-positive Zellen nachgewiesen werden, die ihr zahlenmäßiges Maximum an Tag 16 erreichten und bevorzugt auf den weißen Präzipitaten (kugelförmige Ablagerungen) zu finden waren. Diese Zellen hatten einen Durchmesser von ca. 25 µm. Die kleineren TRAP-negativen Zellen hingegen waren zu jedem Zeitpunkt auf den Präparaten zu beobachten.

Die Zellen auf den Struvit-bildenden Zementen CM2,25-D und CM2,75-D zeigten ein ähnliches Färbeverhalten: Auf deren Oberflächen konnten im Vergleich zu allen getesteten Zementen die meisten TRAP-positiven Zellen detektiert werden, die eine Zellgröße von etwa 25 µm aufwiesen. Ihre Anzahl und Farbintensität bleibt am Tag 10 und Tag 16

nahezu konstant und nahm bis Tag 22 stellenweise deutlich zu. Insgesamt war die Farbbintensität weitgehend gleichmäßig auf den Oberflächen verteilt. Die Phase CM2,75-D wies tendenziell mehr TRAP-positive Zellen auf als die Phase CM2,25-D (Abbildung 15 und 16). Die geringste TRAP-Färbung unter den Struvit-bildenden Zementen wurde auf dem Präparat TMP-D beobachtet, wobei die Anzahl der TRAP-positiven Zellen im Laufe des Versuchs leicht anstieg (Abbildung 15 und 16).

Auf den Newberyit-bildenden Zementoberflächen CM2,25-P, CM2,75-P und TMP-P wurden inselartige kastanienbraune Stellen beobachtet, deren Farbbintensitäten über den Versuchszeitraum zunahm (Abbildung 15 und 16). Insgesamt erreichten diese Zemente innerhalb des Versuchszeitraums die geringste Ausprägung sowohl der TRAP-positiven als auch der TRAP-negativen Zellen, deren Größe bei etwa 20 μm lag (Abbildung 16).

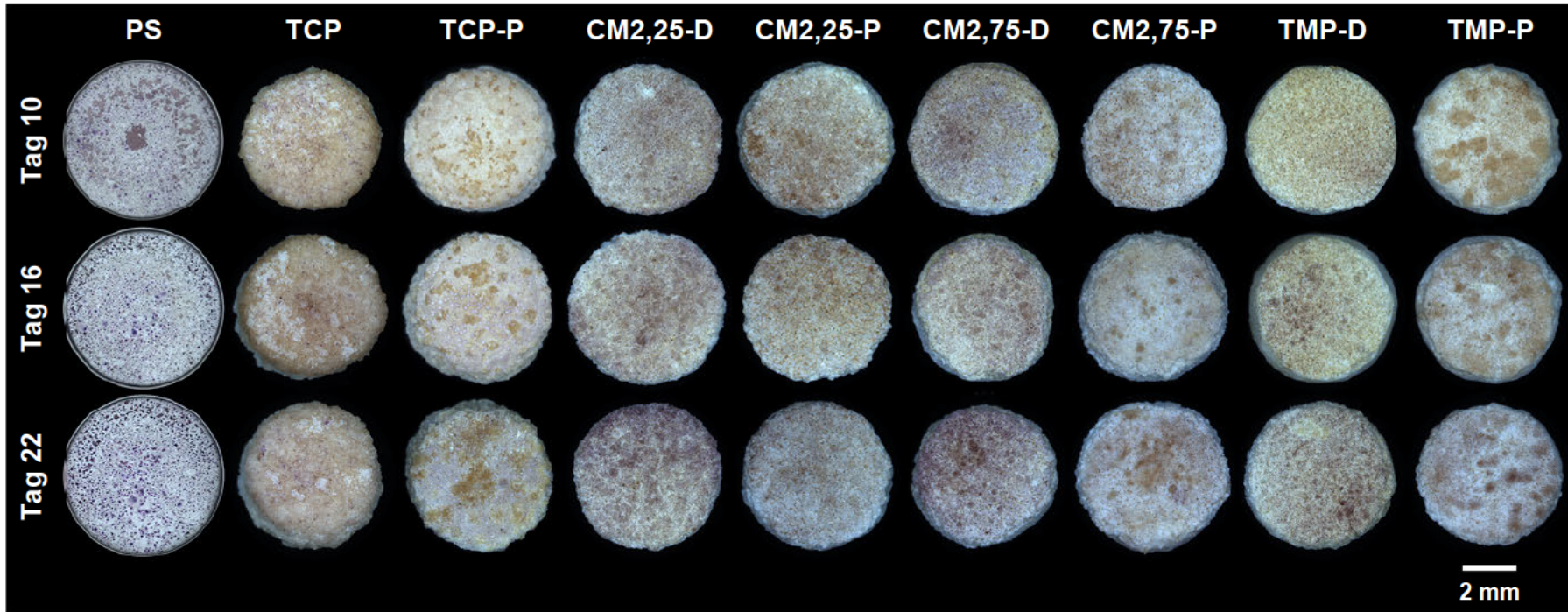


Abbildung 15: Übersicht der TRAP-gefärbten Zellen auf der PS-Referenz und den Scaffolds. Auf die PS-Referenz wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf die Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die TRAP-Färbung wurde am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Kastanienbraune oder violette Färbung deutet auf das Vorkommen von TRAP-aktiven Zellen hin. Weißlich-gelbliche Färbung weisen auf TRAP-negative Zellen hin. Die Bilder der Zementphasen wurden mit einem Stereomikroskop bei gleicher Vergrößerung aufgenommen. Die Bilder von der PS-Referenz wurden mit einem Durchlichtmikroskop aufgenommen und an die Vergrößerung der Zementphasen angepasst.

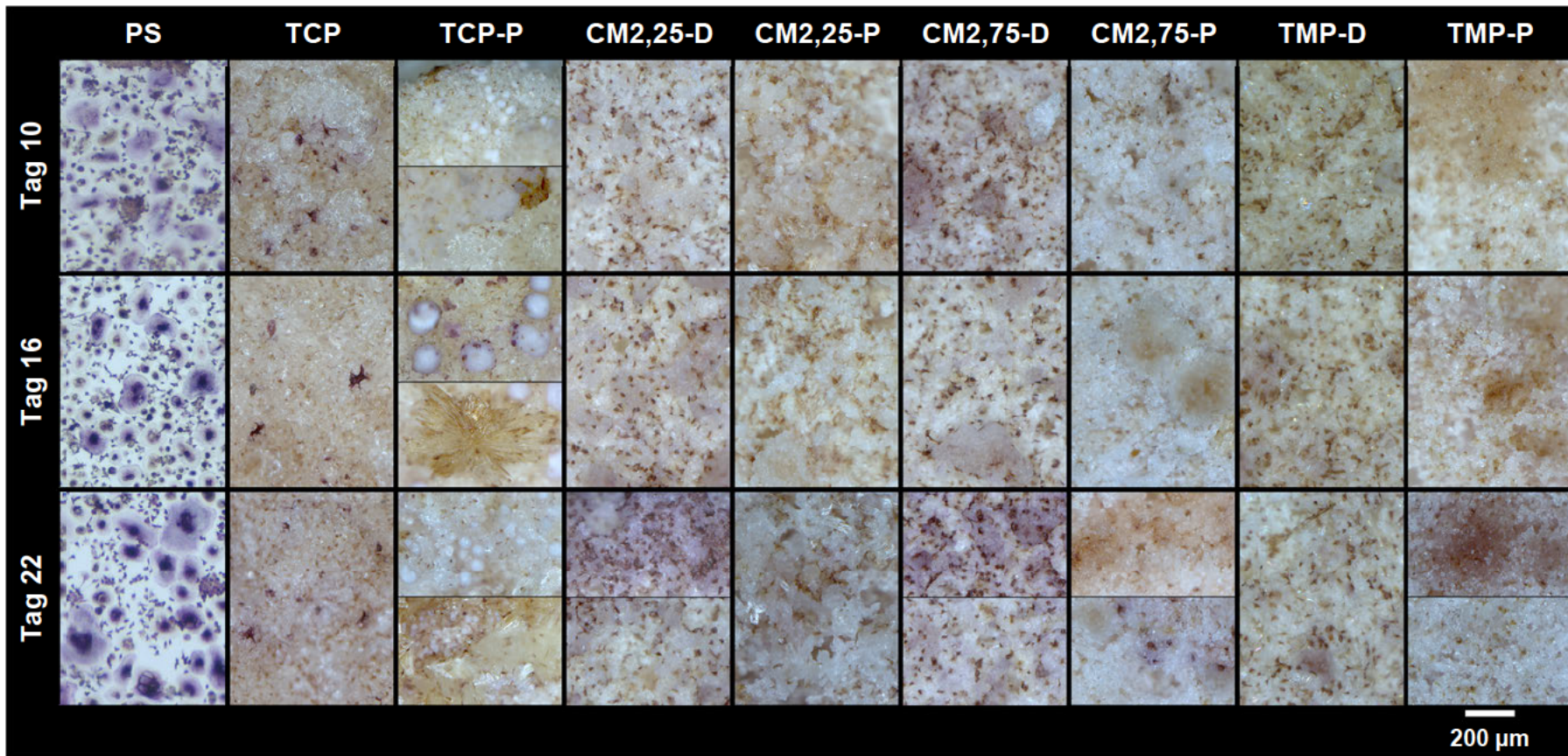


Abbildung 16: Übersicht der TRAP-gefärbten Zellen auf der PS-Referenz und den Scaffolds in vergrößerter Darstellung. Auf die PS-Referenz wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf die Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die TRAP-Färbung wurde am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Kastanienbraune oder violette Färbung deutet auf das Vorkommen von TRAP-aktiven Zellen hin. Weißlich-gelbliche Färbung weisen auf TRAP-negative Zellen hin. Die Bilder der Zementphasen wurden mit einem Stereomikroskop bei gleicher Vergrößerung aufgenommen. Geteilte Bilder zeigen verschiedene repräsentative Stellen eines Probenotyps. Die Bilder von der PS-Referenz wurden mit einem Durchlichtmikroskop aufgenommen und an die Vergrößerung der Zementphasen angepasst.

4.5 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung wurde mit lysierten Zellen und dem kommerziell erhältlichen *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit* durchgeführt.

Während der 22-tägigen Versuchsreihe konnten bei keiner der Proben signifikante Veränderungen der DNA-Konzentration festgestellt werden (Abbildung 17).

Die DNA-Konzentration auf der TCP-Referenz erreichte an allen Tagen maximale Werte und hatte am Tag 10 ($M = 44,04 \text{ ng/mL}$, $SD = 28,83 \text{ ng/mL}$) signifikant höhere Werte im Vergleich zu allen anderen Proben. Tendenziell nahmen die DNA-Konzentrationen auf dieser Phase ab, sodass am Tag 16 ($M = 36,86 \text{ ng/mL}$, $SD = 21,15 \text{ ng/mL}$) lediglich ein signifikant höherer Wert im Vergleich zu der Phase CM2,75-D vorlag. Am Tag 22 ($M = 30,84 \text{ ng/mL}$, $SD = 18,70 \text{ ng/mL}$) konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den anderen Proben festgestellt werden.

Die Proben PS, TCP-P und alle magnesiumhaltigen Zemente hatten vergleichsweise ähnliche DNA-Konzentrationen, die zwischen $16,30 \text{ ng/mL}$ ($SD = 8,93$) auf Mg2,25-D am Tag 22 und $25,94 \text{ ng/mL}$ ($SD = 10,61$) auf TMP-D am Tag 10 lagen. Somit waren zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen diesen Versuchsoberflächen zu verzeichnen, obwohl auf PS im Vergleich zu den Zementoberflächen lediglich die Hälfte an hM ausgesät wurde.

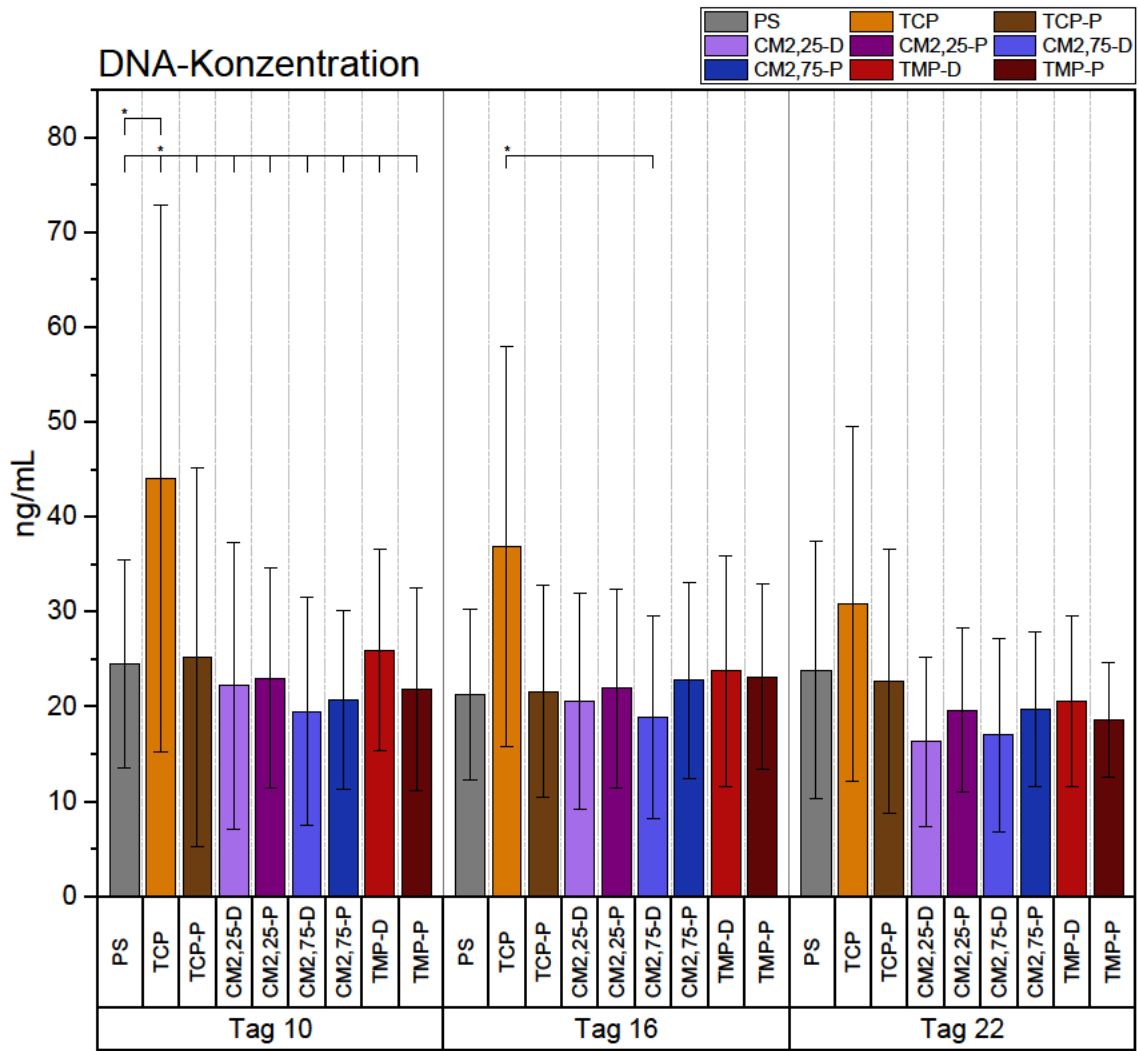


Abbildung 17: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zellysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Spendern. Ein Sternchen über einem Probentyp im oberen Teil der Abbildung kennzeichnet die Phase, von der die Klammer zu signifikant unterschiedlichen Werten ($p < 0,05$) der anderen Probentypen am gleichen Versuchstag führt.

4.6 TRAP-Aktivität

Zusätzlich zur TRAP-Färbung wurde die Aktivität dieses Enzyms photometrisch bestimmt und zu TRAP-Volumenaktivität und TRAP-Aktivität pro DNA-Menge berechnet.

Wie in der Abbildung 18 zu sehen ist, konnten auf allen getesteten Versuchsoberflächen TRAP-aktive Zellen nachgewiesen werden. Besonders auffällig waren die vergleichsweise hohen **TRAP-Volumenaktivitäten** auf den Struvit-bildenden Zementen CM2,25-D, CM2,75-D und TMP-D, die einen steigenden Trend aufwiesen. Die Zellen auf der Phase CM2,75-D erreichten an allen Tagen die signifikant höchsten Werte im Vergleich zu den anderen getesteten Proben, mit Ausnahme zu der Phase CM2,25-D am Tag 10 ($M = 0,23$ mU/mL, $SD = 0,06$ mU/mL). Aufgrund des steigenden Trends wurde auf der Probe CM2,75-D am Tag 16 ($M = 0,35$ mU/mL, $SD = 0,03$ mU/mL) eine signifikant höhere TRAP-Volumenaktivität festgestellt als am Tag 10 ($M = 0,27$ mU/mL, $SD = 0,06$ mU/mL). Ebenfalls signifikant höhere Werte wurden am Tag 22 ($M = 0,40$ mU/mL, $SD = 0,08$ mU/mL) im Vergleich zum Tag 10 und 16 gemessen. Die Zellen auf den beiden Phasen CM2,25-D und TMP-D zeigten ein ähnliches TRAP-Volumenaktivitätsverhalten: Mit $0,23$ mU/mL ($SD = 0,06$) bzw. $0,21$ mU/mL ($SD = 0,07$) am Tag 10, $0,24$ mU/mL ($SD = 0,04$) bzw. $0,21$ mU/mL ($SD = 0,02$) am Tag 16 und mit $0,33$ mU/mL ($SD = 0,09$) bzw. $0,30$ mU/mL ($SD = 0,04$) am Tag 22 hatten sie die signifikant höchsten Werte im Vergleich zu allen anderen Präparaten erreicht, außer zu CM2,75-D. Mit zunehmender TRAP-Volumenaktivität über den Versuchszeitraum hatten die Zellen auf diesen Präparaten (CM2,25-D und TMP-D) am Tag 22 signifikant höhere Werte als am Tag 10 und 16. Auf der PS-Referenz betrug die TRAP-Volumenaktivität am Tag 10 $0,13$ mU/mL ($SD = 0,02$), fiel am Tag 16 auf $0,07$ mU/mL ($SD = 0,03$) und stieg wieder am Tag 22 auf $0,15$ mU/mL ($SD = 0,02$) an, wodurch sich ein signifikanter Unterschied am Tag 10 und 22 im Vergleich zum Tag 16 ergab. Darüber hinaus wurden auf PS am Tag 10 und Tag 22 signifikant höhere Werte im Vergleich zu den TRAP-Volumenaktivitäten auf allen mit H_3PO_4 -infiltrierten Zementen (TCP-P, CM2,25-P, CM2,75-P, TMP-P) beobachtet. Alle TRAP-Volumenaktivitäten der PS-Referenz waren vergleichbar mit den Messwerten der Probe TCP. Auf der Referenz TCP zeigten die Zellen eine nicht-signifikante Zunahme der TRAP-Volumenaktivität bis Tag 22 ($M = 0,14$ mU/mL, $SD = 0,01$ mU/mL). Auf dieser Phase wurde am Tag 10 ($M = 0,10$ mU/mL, $SD = 0,03$ mU/mL) eine signifikant höhere TRAP-Volumenaktivität gemessen als auf der Probe TCP-P ($M = 0,05$ mU/mL, $SD = 0,02$ mU/mL). Am Tag 22 wurde eine signifikant höhere Volumenaktivität im Vergleich zu allen H_3PO_4 -infiltrierten Zementen festgestellt.

Die Zellen auf H_3PO_4 -infiltrierten Zementen (TCP-P, CM2,25-P, CM2,75-P, TMP-P) zeigten über den Versuchszeitraum ein ähnliches Verhalten: Sie hatten mit 0,05 mU/mL bis 0,09 mU/mL die niedrigste TRAP-Volumenaktivität erreicht und es konnten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen diesen Phasen festgestellt werden. Bis zum Tag 22 wurde auf diesen Proben ein leichter Anstieg der Werte verzeichnet.

In der Abbildung 19 sind die **TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge** dargestellt. Dabei stehen die Präparate CM2,25-D und CM2,75-D besonders hervor: Zu jedem Zeitpunkt wurden die höchsten Werte auf diesen Phasen festgestellt und am Tag 10 ($M = 17,68 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 12,63 \text{ mU}/\mu\text{g}$ für CM2,25-D bzw. $M = 19,60 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 9,95 \text{ mU}/\mu\text{g}$ für CM2,75-D) und Tag 22 ($M = 29,94 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 23,21 \text{ mU}/\mu\text{g}$ für CM2,25-D bzw. $M = 30,89 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 18,00 \text{ mU}/\mu\text{g}$ für CM2,75-D) mit einem signifikanten Unterschied zu allen anderen gemessenen Proben, außer zu TMP-D an allen Tagen und CM2,25-D zu PS am Tag 10. Am Tag 16 nahmen die TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge auf CM2,25-D ($M = 12,73 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 7,41 \text{ mU}/\mu\text{g}$) stärker ab als auf CM2,75-D ($M = 16,64 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 7,27 \text{ mU}/\mu\text{g}$), sodass letztere Phase einen signifikant hohen Wert im Vergleich zu allen anderen Versuchsoberflächen hatte, außer zu CM2,25-D und TMP-D. Bis zum Tag 22 wurde bei den Präparaten CM2,25-D und CM2,75-D ein signifikanter Anstieg der TRAP-Aktivität pro DNA-Menge im Vergleich zu den Werten an den Tagen 10 und 16 gemessen. Auf den Prüfkörpern TMP-D wurde ein zunehmender Trend der TRAP-Aktivität pro DNA-Menge beobachtet: An den Tagen 10 ($M = 8,13 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 1,31 \text{ mU}/\mu\text{g}$) und 16 ($M = 11,20 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 4,75 \text{ mU}/\mu\text{g}$) wurde zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Werten und zu den anderen Proben festgestellt, außer zu CM2,75-D und CM2,25-D. Erst am Tag 22 ($M = 19,83 \text{ mU}/\mu\text{g}$, $SD = 7,66 \text{ mU}/\mu\text{g}$) stieg die TRAP-Aktivität pro DNA-Menge im Vergleich zu Tag 10 signifikant an. Zudem wurde am Tag 22 bei TMP-D signifikant höhere Werte gemessen als bei den H_3PO_4 -infiltrierten Zementen (TCP-P, CM2,25-P, CM2,75-P, TMP-P). Auf den Referenzoberflächen PS und TCP sowie auf den mit H_3PO_4 -infiltrierten Zementen wurde eine vergleichsweise geringe TRAP-Aktivität pro DNA-Menge festgestellt, die zwischen $1,98 \text{ mU}/\mu\text{g}$ ($SD = 0,50$) (TCP-P am Tag 22) und $11,43 \text{ mU}/\mu\text{g}$ ($SD = 9,37$) (PS am Tag 22) lag. An den Tagen 10 bis 16 konnten an diesen Proben keine relevanten Veränderungen beobachtet werden. Lediglich bis Tag 22 stiegen die Werte marginal an. Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen Proben konnte über den Versuchszeitraum nicht nachgewiesen werden.

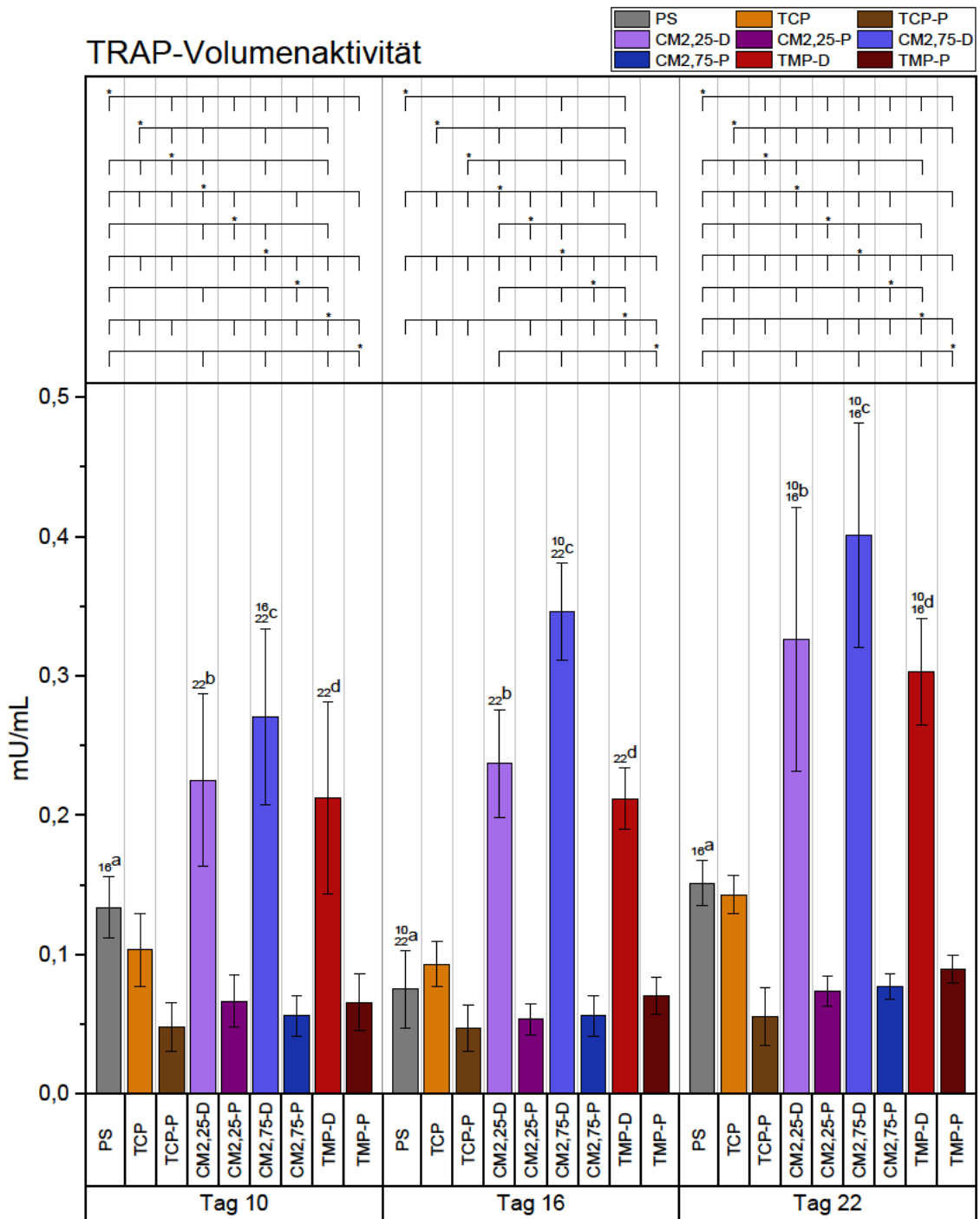


Abbildung 18: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zellysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Spendern. Ein Sternchen über einem Probentyp in der oberen Box kennzeichnet die Phase, von der die Klammer zu signifikant unterschiedlichen Werten ($p < 0,05$) der anderen Probentypen am gleichen Versuchstag führt. Signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen Versuchsoberfläche zu unterschiedlichen Messzeitpunkten sind mit Kleinbuchstaben (a–d) versehen. Die tief- bzw. hochgestellten Zahlen vor diesen Kleinbuchstaben weisen auf die zu beziehenden Versuchstage hin.

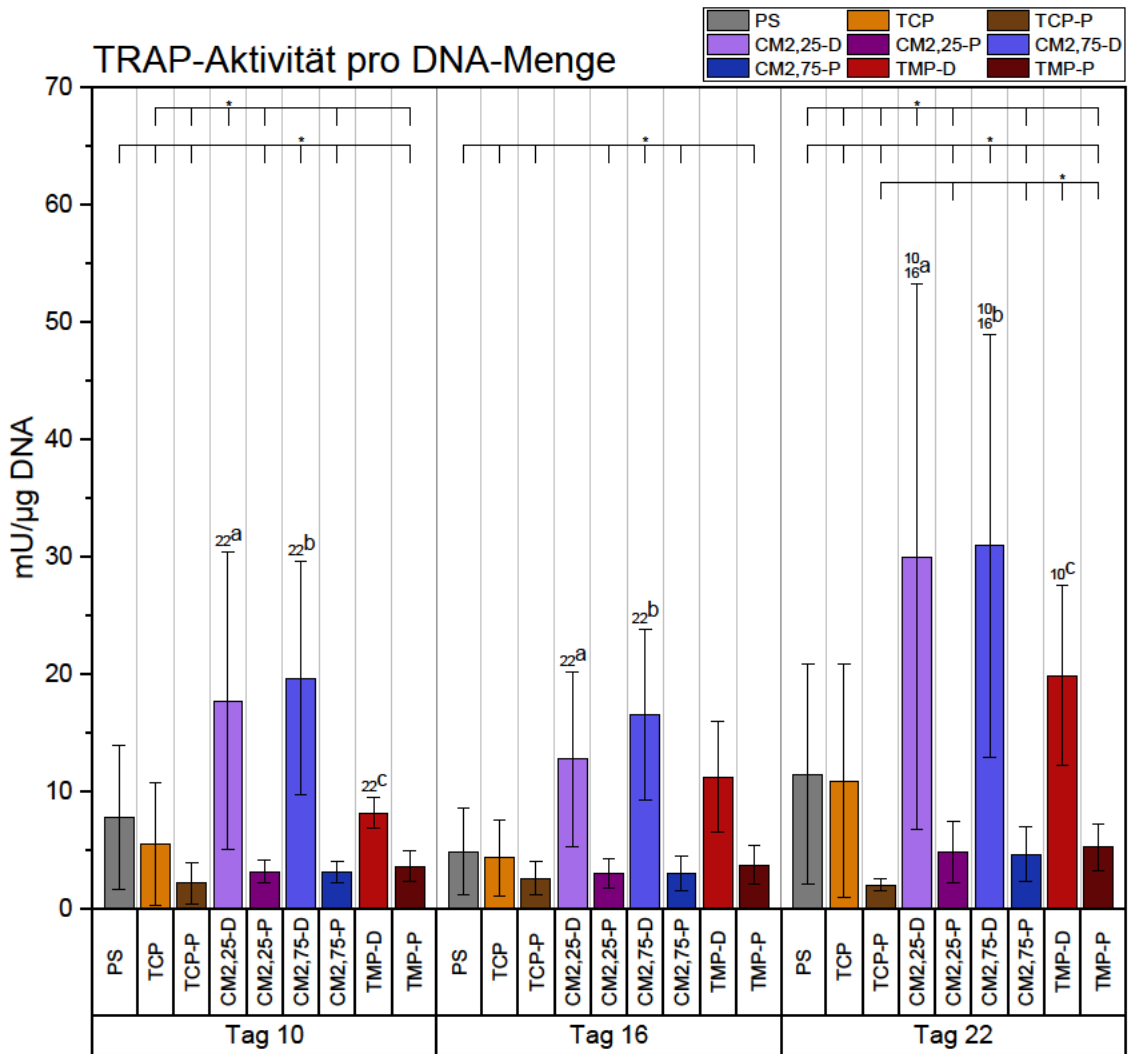


Abbildung 19: Messergebnisse der TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zelllysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Spendern. Ein Sternchen über einem Probentyp im oberen Teil der Abbildung kennzeichnet die Phase, von der die Klammer zu signifikant unterschiedlichen Werten ($p < 0,05$) der anderen Probentypen am gleichen Versuchstag führt. Signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen Versuchsoberfläche zu unterschiedlichen Messzeitpunkten sind mit Kleinbuchstaben (a–c) versehen. Die tief- bzw. hochgestellten Zahlen vor diesen Kleinbuchstaben weisen auf die zu beziehenden Versuchstage hin.

4.7 Fluoreszenzmarkierung

Um die Osteoklastogenese weiter zu verifizieren und die Qualität der Versiegelungszonen zu beurteilen, wurde am Tag 10, 16 und 22 eine Fluoreszenzmarkierung des F-Aktins und der DNA durchgeführt. Dabei fluoresziert das mit Phalloidin markierte F-Aktin rot und repräsentiert die periphere ringförmige Versiegelungszone (Aktinringe). Mit Hoechst markierte Nuklei fluoreszieren blau. Nach der Fluoreszenzmarkierung wurden die Scaffolds (Abbildung 20) und die entsprechenden Kultivierungs-Wells (Abbildung 21) unabhängig voneinander analysiert.

In Abbildung 20 sind die Fluoreszenzmarkierungen der **Zellen auf den Scaffolds** dargestellt. Es konnten jedoch keine eindeutigen Zellen mit einem Durchmesser von 50–100 µm und einem klar definierten Aktinring mit mindestens drei eingeschlossenen Zellkernen identifiziert werden, wie es auf PS ab Tag 10 zu beobachten war (Abbildung 21).

Auf den Struvit-bildenden Zementen (CM2,25-D, CM2,75-D, TMP-D) wurden vereinzelte Aktinringe mit einem Durchmesser von ca. 25 µm detektiert, die lediglich einen Nukleus umschließen. Auf der Phase TMP-D bildeten sich die Aktinkonturen am deutlichsten aus. Im Laufe des Versuchs konnte auf diesen Zementen eine Zunahme des Aktins beobachtet werden, sodass die Phase CM2,75-D am Tag 22 die höchste Aktinfluoreszenz erreichte.

Bei den anderen Zementproben (TCP, TCP-P, CM2,25-P, CM2,75-P und TMP-P) wurden wesentlich häufiger undefinierte und unscharfe Aktinumrisse festgestellt. Lediglich die Phase CM2,25-P bildete am Tag 16 eine Ausnahme: Auch hier wurden deutliche Aktinkonturen beobachtet. Bei den Phasen CM2,75-P und TMP-P waren die wenigsten Aktinmarkierungen zu erkennen.

Die Nukleuszahl blieb bei den Phasen TCP, CM2,25-P, CM2,75-D und TMP-D über die drei Versuchstage weitestgehend konstant, während es auf den Oberflächen von TCP-P, CM2,25-D, CM2,75-P und TMP-P ein Rückgang zu verzeichnen war. Auf der Phase CM2,75-P wurde am Tag 22 die geringste Nukleusdichte beobachtet (Abbildung 20).

Die Ergebnisse der fluoreszenzmarkierten **Zellen auf den Kultivierungs-Wells**, die mit Scaffolds bedeckt und unbedeckt waren, sind in der Abbildung 21 dargestellt. Dabei wur-

den teilweise beachtliche Unterschiede zwischen den Zellen, die sich unter den Scaffolds entwickelten (unteres Teilbild) und den Zellen, die sich am von Scaffolds unbedeckten Wellrand entwickelten (oberes Teilbild), beobachtet.

Die Ergebnisse der Kategorisierung der osteoklastischen Differenzierungsgrade, die in Kapitel 3.2.10 beschrieben wurden, sind in der Tabelle 4.1 aufgeführt.

Die Nukleusdichte schien auf den Kultivierungs-Wells der Phasen TCP und TCP-P höher zu sein als auf den magnesiumhaltigen Zementen, war jedoch auf allen Proben leicht rückläufig (Abbildung 21).

Tabelle 4.1: Kategorisierung der fluoreszenzmarkierten Zellen auf den Kultivierungs-Wells aus der Abbildung 21 entsprechend den osteoklastischen Differenzierungsstadien sowie deren Summe für Tag 22 und für alle Tage. Die Bedeutung der Werte sind im Kapitel 3.2.10 erläutert. Analog zu Abbildung 21 gelten die oberen Werte einer Probe am gleichen Tag für die oberen Teilbilder (Zellen auf unbedecktem PS-Bereich zwischen den Scaffolds und der Wellwand) und die unteren Werte für die unteren Teilbilder (Zellen auf bedecktem PS-Bereich unterhalb der Scaffolds).

Tag	PS	TCP	TCP-P	CM2,25-D	CM2,25-P	CM2,75-D	CM2,75-P	TMP-D	TMP-P
10	4	1	1	2	2	1	2	1	3
	4	1	1	1	2	2	1	2	2
16	4	1	1	2	4	1	2	1	3
	4	3	2	2	2	2	3	2	2
22	4	1	4	2	3	2	2	1	3
	4	2	4	2	2	0	3	2	2
Summe Tag 22	8	3	8	4	5	2	5	3	5
Summe gesamt	24	9	13	11	15	8	13	9	15

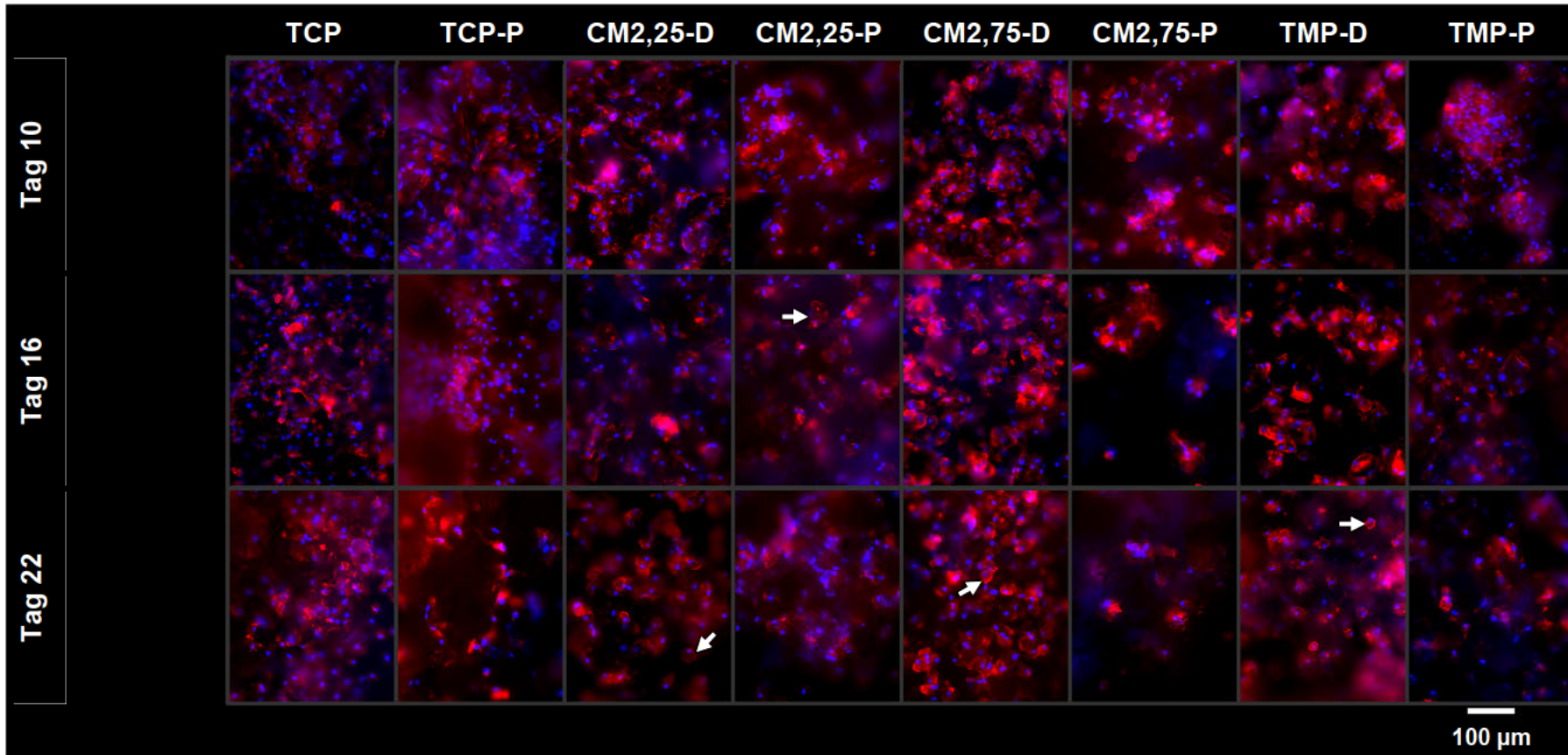


Abbildung 20: Übersicht der Aktin- und Nukleus-markierten Zellen auf den Zementen. Auf den Scaffolds wurden $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät und mittels RANKL und M-CSF zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Fluoreszenzmarkierung wurde am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Mit Phalloidin-iFluor 555 markierte Aktinfilamente wurden bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 556/574 nm (rot fluoreszierend) und die mit Hoechst 33342 markierten Zellkerne wurden bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 350/461 nm (blau fluoreszierend) mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die Pfeile weisen exemplarisch auf mononukleäre Zellen mit rundlichen und klar definierten Aktinkonturen hin.

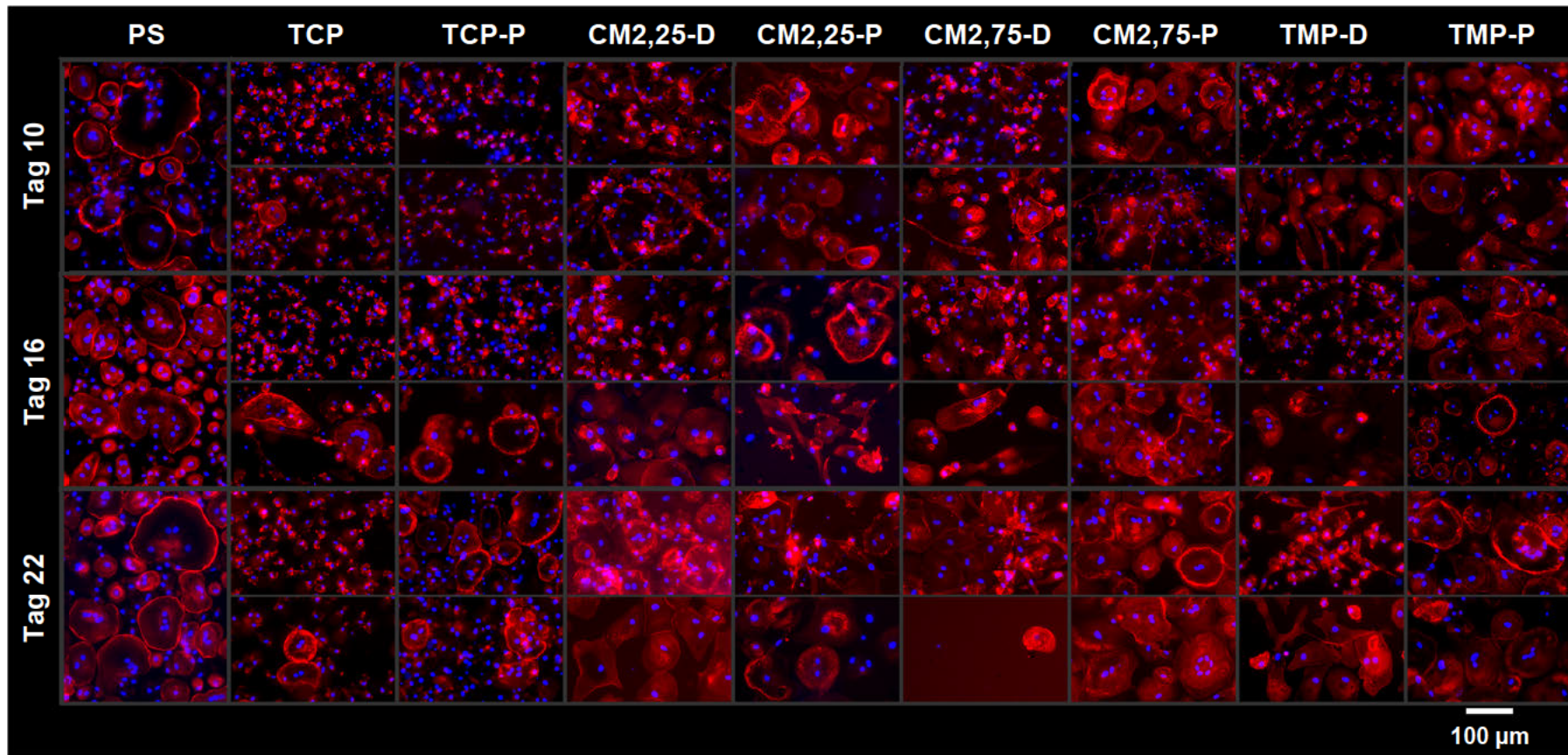


Abbildung 21: Übersicht der Aktin- und Nukleus-markierten Zellen auf der PS-Referenz und den Kultivierungs-Wells. Auf der PS-Referenz wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Fluoreszenzmarkierung wurde am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Vor der Fluoreszenzmikroskopie wurden die Scaffolds entfernt und die Kultivierungs-Wells untersucht. Das untere Teilbild eines Probenotyps wurde an der Stelle unterhalb des Scaffolds aufgenommen. Das obere Teilbild eines Probenotyps wurde im Randbereich zwischen dem Scaffold und der Wellwand abgelichtet. Mit Phalloidin-iFluor 555 markierte Aktinfilamente wurden bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 556/574 nm (rot fluoreszierend) und die mit Hoechst 33342 markierten Zellkerne wurden bei einer Anregungs-/Emissionswellenlänge von 350/461 nm (blau fluoreszierend) mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

4.8 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen wurden die hM auf den verschiedenen Zementoberflächen sowie auf Deckgläser 17 Tage lang mit den Zytokinen RANKL und M-CSF kultiviert, anschließend auf den Oberflächen fixiert, entwässert und eine Kritisch-Punkt-Trocknung durchgeführt („Mit Zellen“). Für die Untersuchung der Resorptionslakunen wurden die Zellen nach der 17-tägigen Kultivierung von den Zementen abgelöst („Nach Zellyse“). Zum besseren Vergleich der Zementmorphologie vor der Zellkultivierung wurden REM-Aufnahmen von den ursprünglichen und sterilen Scaffold-Oberflächen genommen („Ohne Zellkontakt“). Repräsentative Stellen sind in der Abbildung 22 dargestellt.

Auf den Deckgläsern fanden sich häufig runde und ovale Riesenzellen mit einem Durchmesser von über 100 μm . Sie lagen flach auf der Oberfläche und bildeten am Zellrand fadenförmige Fortsätze (Filopodien), die teilweise mit ihren Nachbarzellen in Kontakt standen (Zell-Zell-Verbindungen). Neben diesen flachen Riesenzellen waren kugelförmige Zellen zu erkennen, die einen Durchmesser von ca. 15 bis 20 μm hatten (Abbildung 22q).

Der Zement TCP zeigte eine kompakt verwachsene und abgerundete Oberfläche mit minimalen interkristallinen Zwischenräumen (Interstitialraum, Porenraum) und grobporigen Vertiefungen (ca. 25 μm Durchmesser, Abbildung 22a), sodass meist flache und ausgebreitete Zellen identifiziert werden konnten (Abbildung 22r). Diese hatten oft einen engen Kontakt mit der Zementoberfläche. Allerdings wurden auch einige Zellen beobachtet, die von der Oberfläche abstanden. Mit einem Durchmesser von ca. 30–50 μm waren die Zellen kleiner als die Riesenzellen auf der Glasreferenz. Auf Präparaten mit abgelösten Zellen („Nach Zellyse“) waren mögliche Resorptionslakunen mit einer raueren Oberfläche zu erkennen (Abbildung 22i, ²i).

Auf dem Zement TCP-P veränderten sich die ursprünglichen plattenförmigen Kristallstrukturen mit einer Schichtstärke von ca. 6 μm (Abbildung 22b) nach 17 Tagen Kultivierung zu blattförmigen Strukturen mit einer Schichtstärke von ca. 0,1 μm , die in unterschiedlichen Richtungen angeordnet waren (Abbildung 22j). Die wenigen Zellen auf dieser Oberfläche hatten eine Größe von ca. 10 μm und überspannten mit ihren Ausläufern die blätterförmigen Strukturen (Abbildung 22s). Obwohl eine flächige Anlagerung der

Zellen auf TCP-P nicht nachgewiesen werden konnte, wurden auf glatten Plattenoberflächen mögliche Resorptionsstellen von ca. 10 μm Durchmesser beobachtet (Abbildung 22^{2j}).

Zusammenfassend lässt sich zu den magnesiumhaltigen Präparaten festhalten, dass die interkristallinen Abstände größer und die 5 bis 10 μm großen Partikel im Vergleich zu den Kristallen des Referenz TCP scharfkantiger waren. Zudem wurden intrakristalline Poren von unterschiedlicher Ausprägung beobachtet (Abbildung 22c–h, k–p). Eine orthorhombische Kristallstruktur war insbesondere bei der Probe TMP-D zu erkennen (Abbildung 22g). Einerseits konnte auf den Phasen CM2,25-D, CM2,75-P und TMP-D teilweise ein enger Zellkontakt mit der Zementoberfläche nachgewiesen werden (Abbildung 22t, w, x), andererseits wurden auf allen Präparaten auch Zellen beobachtet, die mit ihren zahlreichen Ausläufern die Zementstrukturen überspannten und somit keine enge Adhäsion zur Oberfläche bilden konnten. Die größten Zellen erreichten auf diesen Zementen einen Durchmesser von ca. 30 μm und hatten eine teils runde und teils spindelförmige Morphologie (Abbildung 22t–y). Obwohl keine eindeutigen Resorptionslakunen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 22k–p), schienen die identifizierten Zellen in einer guten Verfassung zu sein (Abbildung 22t–y).

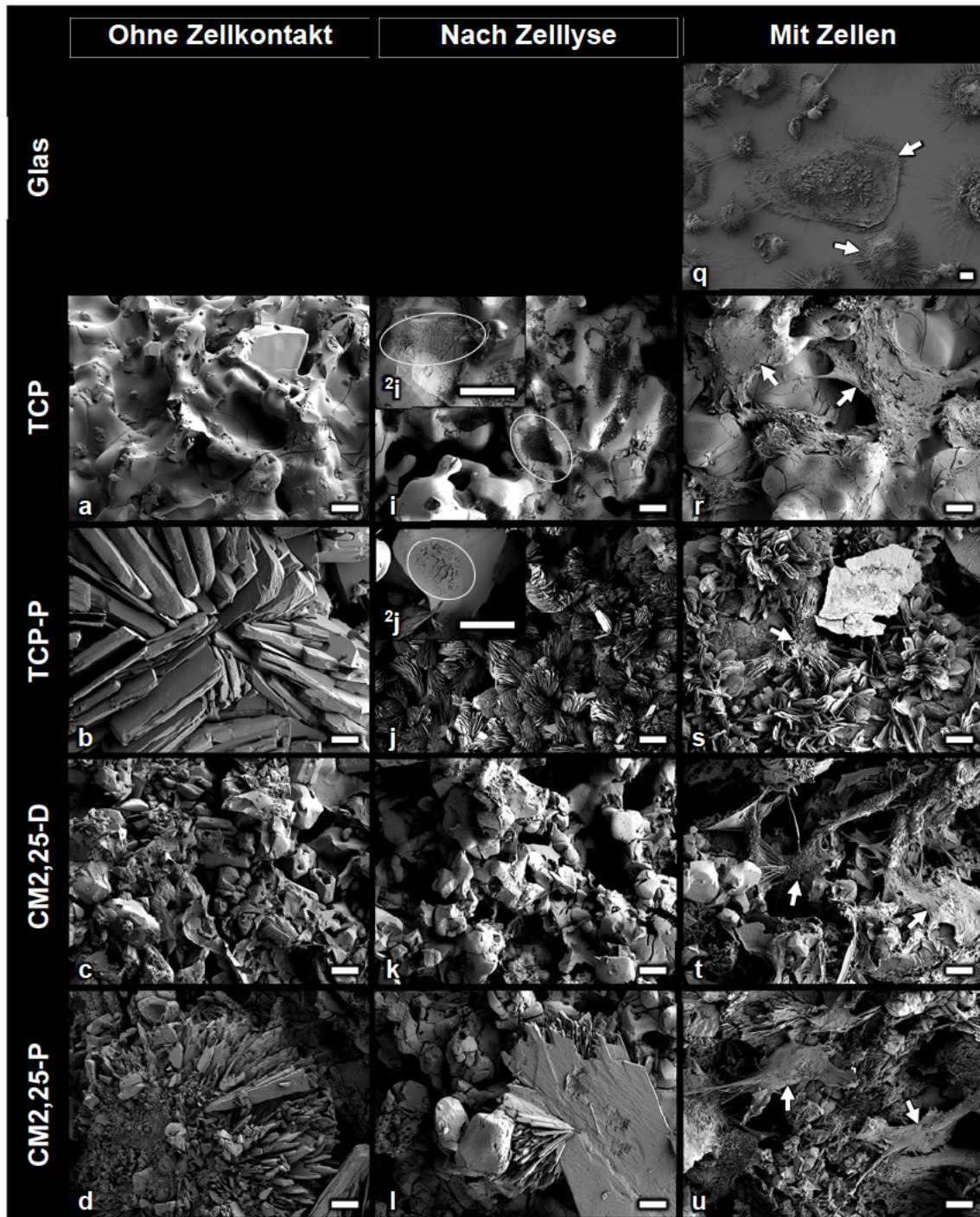
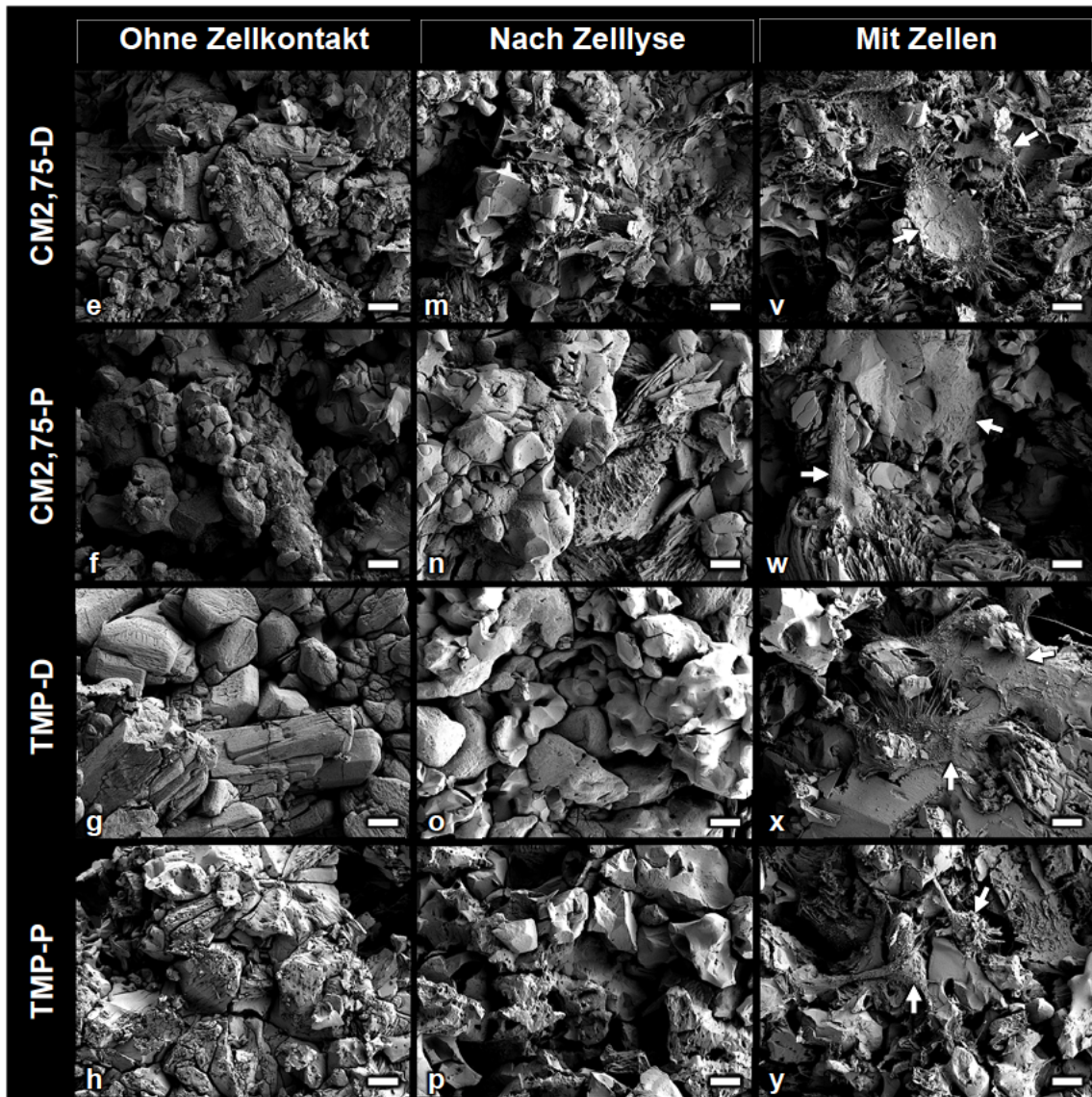


Abbildung 22: Übersicht der REM-Aufnahmen von den Versuchsoberflächen. Für die Probenreihen „Mit Zellen“ und „Nach Zelllyse“ wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² auf der Glas-Referenz und $6,6 \times 10^5$ hM/cm² auf den Scaffolds ausgesät. Anschließend wurden die hM für 17 Tage mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Bei der Probenreihe „Mit Zellen“ sind die Präparate mit erhaltenen Zellen (Pfeile) dargestellt. Bei der Probenreihe „Nach Zelllyse“ sind die Zemente nach abgelösten Zellen dargestellt, um mögliche Resorptionslakunen (weiß eingekreiste Bereiche) zu identifizieren. Bei der Probenreihe „Ohne Zellkontakt“ sind die sterilen und azellulären Zemente abgebildet, um eine Referenz zur ursprünglichen Scaffold-Morphologie zu erhalten. Die Bilder wurden bei 500-facher (q), 1000-facher (a–p, r–y) und 2000-facher (²i, ²j) Vergrößerung mit einem Rasterelektronenmikroskop aufgenommen. Die Messbalken entsprechen 10 µm. Fortsetzung der Abbildung auf der nächsten Seite.



Fortsetzung der Abbildung 22.

4.9 Bioresorption und Adsorption (ICP-MS)

Während der Zellkultivierung wurde das Kulturmedium alle 3 Tage erneuert und die verbrauchten Kulturmediumüberstände für die ICP-MS-Messungen gesammelt. Die daraus festgestellten Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Konzentrationen ergaben die bR, die sowohl die zR als auch die cD einschließt. Um diese Faktoren separat zu betrachten, wurden azelluläre bzw. sterile Scaffolds ebenfalls im gleichen Zellkulturmedium ausgelagert und die Kulturmediumüberstände zur Bestimmung der cD alle 3 Tage erneuert und gesammelt. Zur Veranschaulichung dieser Ergebnisse wurden in der Abbildung 23 die Ionenkonzentrationen der bR und der cD übereinandergelegt, sodass die Differenz zwischen ihnen die zR ergibt (rote Flächen in der Abbildung). Die kumulative zR, cD und Adsorption sowie die daraus folgenden Nettoresultate sind in der Abbildung 24 dargestellt.

Wie in der Abbildung 23d, f, h für die Struvit-bildenden Zemente zu sehen ist, sank die **Ca^{2+} -Konzentration** des Kulturmediums während der azellulären Scaffoldauslagerung von initial 1,61 mmol/L ($SD = 0,02$) auf einen Konzentrationsbereich von 0,55 mmol/L ($SD = 0,01$) (CM2,75-D am Tag 21) bis 0,69 mmol/L ($SD = 0,02$) (CM2,75-D am Tag 0) (gelbe Flächen). An allen anderen Tagen lag die Ca^{2+} -Konzentration der Kulturmediumüberstände bei den Struvit-bildenden Zementen innerhalb dieses Bereichs. Bei den Newberyit-bildenden Zementen lag der Calciumspiegel der Kulturmediumüberstände zwischen 0,61 mmol/L ($SD = 0,11$) (CM2,75-P am Tag 0) und 0,96 mmol/L ($SD = 0,06$) (CM2,25-P am Tag 15) (Abbildung 23e, g, i). Somit wurde an den Struvit-bildenden Zementen tendenziell mehr Calcium adsorbiert als an den Newberyit-bildenden Zementen (Abbildung 24). Auf PS erfolgte eher eine Adsorption bis zu Tag 9 und eine cD ab Tag 15 (Abbildung 23a). Bei der Phase TCP, die während der azellulären Auslagerung eine Ca^{2+} -Konzentration der Kulturmediumüberstände von etwa 1 mmol/L aufwies, war die Adsorption über die 21-tägige Messung im Vergleich zu den anderen Zementen gering (Abbildung 23b). Im Gegensatz dazu wurde bei TCP-P eine Ca^{2+} -Konzentration der Kulturmediumüberstände von ca. 0,25 mmol/L gemessen, sodass an dieser Probe die höchste Calciumadsorption vorlag (Abbildung 23c).

Mit Ausnahme von TCP-P an allen Tagen und CM2,75-P am Tag 0 wurde bei allen Zementen innerhalb der 21-tägigen Versuchsreihe eine signifikante zR von Calcium nachgewiesen. Mit steigendem Struvit-Anteil nahm die zR zu, sodass im Falle von CM2,25-D 2,02 mmol/L Ca^{2+} ($SD = 0,14$), im Falle von CM2,75-D 2,25 mmol/L Ca^{2+} ($SD = 0,16$) und im Falle von TMP-D 2,59 mmol/L Ca^{2+} ($SD = 0,13$) von den Zellen kumulativ resor-

biert wurde (Abbildung 24). Die Newberyit-bildenden Zemente erfuhren eine noch höhere zR als die Struvit-bildenden Zemente, was sich in einer kumulativen Ca^{2+} -Resorption von 3,21 mmol/L ($SD = 0,15$) für *CM2,25-P*, 3,37 mmol/L ($SD = 0,39$) für *CM2,75-P* und 6,01 mmol/L ($SD = 0,18$) für *TMP-P* zeigte (Abbildung 24). Auch hier gaben die Zellen mit steigendem Newberyit-Anteil mehr Ca^{2+} in das Medium ab, sodass auf *TMP-P* vom Tag 3 bis Tag 18 die resorbierten Ca^{2+} -Mengen höher waren als der initiale Calciumspiegel des Kulturmediums (Abbildung 23i). Somit glich die zR von Calcium die Adsorption im Nettoresultat aus. Auf den anderen magnesiumhaltigen Zementen kam es dagegen im Nettoresultat zu einer Adsorption von Calcium (Abbildung 24), da diese die zR überwiegte. Auf der Referenzprobe TCP setzten die Zellen deutlich mehr Ca^{2+} frei ($M = 7,34$ mmol/L, $SD = 0,30$ mmol/L) und erreichten damit im Vergleich zu den anderen Zementen die höchste Calciumresorption im Nettoresultat ($M = 2,26$ mmol/L, $SD = 0,34$ mmol/L). Die höchste kumulative Calciumadsorption wurde auf *TCP-P* gemessen (Ca^{2+} -Nettoresultat: $M = -8,14$ mmol/L, $SD = 0,53$ mmol/L).

Die Entwicklung der **Mg^{2+} -Konzentration** in den Kulturmedien zeigte erwartungsgemäß, dass die magnesiumhaltigen Zemente ein Vielfaches an Mg^{2+} freisetzen als die Referenzen PS, TCP und *TCP-P*. Die Unterschiede im Nettoresultat reichten von 15-fach höherer Mg^{2+} -Freisetzung bei *TMP-P* im Vergleich zu PS bis zu 135-fach höherer Mg^{2+} -Freisetzung bei *CM2,75-D* im Vergleich zu TCP. Die Referenz *TCP-P* hingegen adsorbiert die Mg^{2+} (Abbildung 24).

Mit Ausnahme von *CM2,25-P* am Tag 6 gab es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen der bR und der cD der Zemente, was darauf hindeutet, dass bei keinem der Zemente eine zR von Magnesium stattfand. Im Gegenteil, bei den zellbesiedelten Proben wurden geringere Mg^{2+} -Konzentrationen gemessen als bei den azellulären Proben, was dafür spricht, dass die Zellen – wenn auch meist nicht signifikant – die cD hemmten (hellgrüne Flächen in der Abbildung 23m–r und negative Werte der zR für Mg^{2+} in der Abbildung 24). Dies wurde besonders bei den Proben *CM2,25-D* und *CM2,75-D* deutlich.

Da jedoch die bR der magnesiumhaltigen Zemente weit über dem initialen Mg^{2+} -Spiegel des Kulturmediums lag, konnte eine kontinuierliche Mg^{2+} -Freisetzung festgestellt werden, was die hohe chemische Löslichkeit der Scaffolds widerspiegelt. Die Phasen *CM2,25-P* und *CM2,75-D* zeigten tendenziell eine gleichmäßige Mg^{2+} -Freisetzung ab Tag 3: bei *CM2,25-P* ca. 5 mmol/L und bei *CM2,75-D* ca. 8 mmol/L (cD in Abbildung

23n, o). Bei TMP-D und TMP-P nahm die Mg^{2+} -Freisetzung über die Versuchstage zu: bei TMP-D von 2,70 mmol/L ($SD = 0,19$) am Tag 0 auf 5,84 mmol/L ($SD = 0,99$) am Tag 21 und bei TMP-P von 2,54 mmol/L ($SD = 0,27$) am Tag 0 auf 3,12 mmol/L ($SD = 0,67$) am Tag 21 (cD in Abbildung 23q, r). Bei den Zementen CM2,25-D und CM2,75-P hingegen nahm die Mg^{2+} -Freisetzung ab: bei CM2,25-D von 7,46 mmol/L ($SD = 0,53$) am Tag 3 auf 6,16 mmol/L ($SD = 0,31$) am Tag 21 und bei CM2,75-P von 10,13 mmol/L ($SD = 2,00$) am Tag 3 auf 3,92 mmol/L ($SD = 0,68$) am Tag 21 (cD in Abbildung 23m, p).

Mit einem Nettoresultat von 45,56 mmol/L ($SD = 3,00$) für CM2,25-D, 48,20 mmol/L ($SD = 4,76$) für CM2,75-D und 48,64 mmol/L ($SD = 5,56$) für CM2,75-P wurde für diese Proben die größte Mg^{2+} -Freisetzung festgestellt (Abbildung 24). Eine Korrelation zwischen den Newberyit- und Struvit-Anteilen und der Menge der freigesetzten Mg^{2+} konnte für die verwendeten magnesiumhaltigen Zemente nicht nachgewiesen werden. Bei TCP waren bR und Adsorption ausgeglichen, sodass im Nettoresultat keine wesentliche Änderung der Mg^{2+} -Konzentration auftrat (Abbildung 24).

Bei allen magnesiumhaltigen Zementen wurde über die 21-tägige Kultivierungszeit ein kontinuierlicher Anstieg der **PO_4^{3-} -Konzentration** beobachtet (Abbildung 23v–ß). Wie bereits bei der Analyse der Mg^{2+} -Freisetzung beschrieben, wurde auch für PO_4^{3-} keine zellvermittelte Freisetzung beobachtet. Stattdessen wurde bei CM2,25-P am Tag 3, 9, 12 und 18; bei CM2,75-P am Tag 9, 12 und 21 sowie bei TMP-P am Tag 21 eine signifikant niedrige PO_4^{3-} -Konzentration während der bR-Analyse im Vergleich zur cD-Analyse nachgewiesen. Somit schienen die Zellen auf den Newberyit-bildenden Zementen die PO_4^{3-} -Freisetzung zu hemmen, wie das Nettoresultat dieser Zemente zeigt (Abbildung 24). Diese Inhibition der PO_4^{3-} -Freisetzung nahm mit zunehmendem Newberyit-Anteil tendenziell ab. Bei der Probe CM2,25-D wurde ebenfalls eine „zelluläre Inhibition“ der PO_4^{3-} -Freisetzung beobachtet, jedoch relativiert die ausgeprägte SD diesen Umstand. Obwohl mit zunehmendem Struvit-Anteil kein höherer PO_4^{3-} -Abbau beobachtet wurde, setzten diese Proben (CM2,25-D, CM2,75-D, TMP-D) im Nettoresultat mehr PO_4^{3-} frei als die Newberyit-bildenden Zemente mit der jeweils gleichen stöchiometrischen Zusammensetzung (Abbildung 24).

Mit einem Nettoresultat von 77,69 mmol/L ($SD = 14,90$) wurde die höchste PO_4^{3-} -Freisetzung bei TCP-P gemessen, davon waren 8,10 mmol/L ($SD = 11,74$) auf die zR zurückzuführen. Die ausgeprägte SD der zR bei dieser Probe relativiert jedoch diesen Sachverhalt (Abbildung 23u, Abbildung 24).

Da die PO_4^{3-} -Konzentration der cD von TCP nahe der initialen Kulturmediumskonzentration lag, wurde während des Versuchszeitraums keine chemische Auflösung dieses Zements festgestellt. Allerdings sorgte die zR dieses Präparats für eine kontinuierliche PO_4^{3-} -Freisetzung an das Medium (Abbildung 23t). Im Nettoresultat wurden somit 4,19 mmol/L ($SD = 1,37$) PO_4^{3-} abgebaut (Abbildung 24).

Auffällig war das inverse Verhalten bei CM2,25-D und CM2,75-P in puncto Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Freisetzung: Während die Mg^{2+} -Abgabe mit der Zeit abnahm, stieg gleichzeitig die PO_4^{3-} -Freisetzung an (vgl. Abbildung 23m mit v und Abbildung 23p mit y). Bei den anderen magnesiumhaltigen Zementen trat ein synergistischer Zusammenhang auf: Eine erhöhte Mg^{2+} -Freisetzung ging mit einer gesteigerten PO_4^{3-} -Abgabe einher.

Obwohl die Zellen auf PS kein Material zur Resorption hatten, konnte auf zellbesiedelten Oberflächen eine höhere Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Freisetzung gemessen werden als auf den analogen, aber azellulären Oberflächen (Auslagerung des Kulturmediums in sterilen bzw. azellulären PS-Wells). So konnte an den Tagen 0 bis 9 für Ca^{2+} , 3 bis 12 für Mg^{2+} und an allen Tagen für PO_4^{3-} eine signifikante zR nachgewiesen werden (Abbildung 23a, j, s). Im Nettoresultat wurden somit 2,63 mmol/L ($SD = 0,41$) Ca^{2+} , 1,25 mmol/L ($SD = 0,22$) Mg^{2+} und 2,76 mmol/L ($SD = 0,30$) PO_4^{3-} abgebaut, wobei die gesamte Menge auf die zR zurückzuführen war (Abbildung 24).

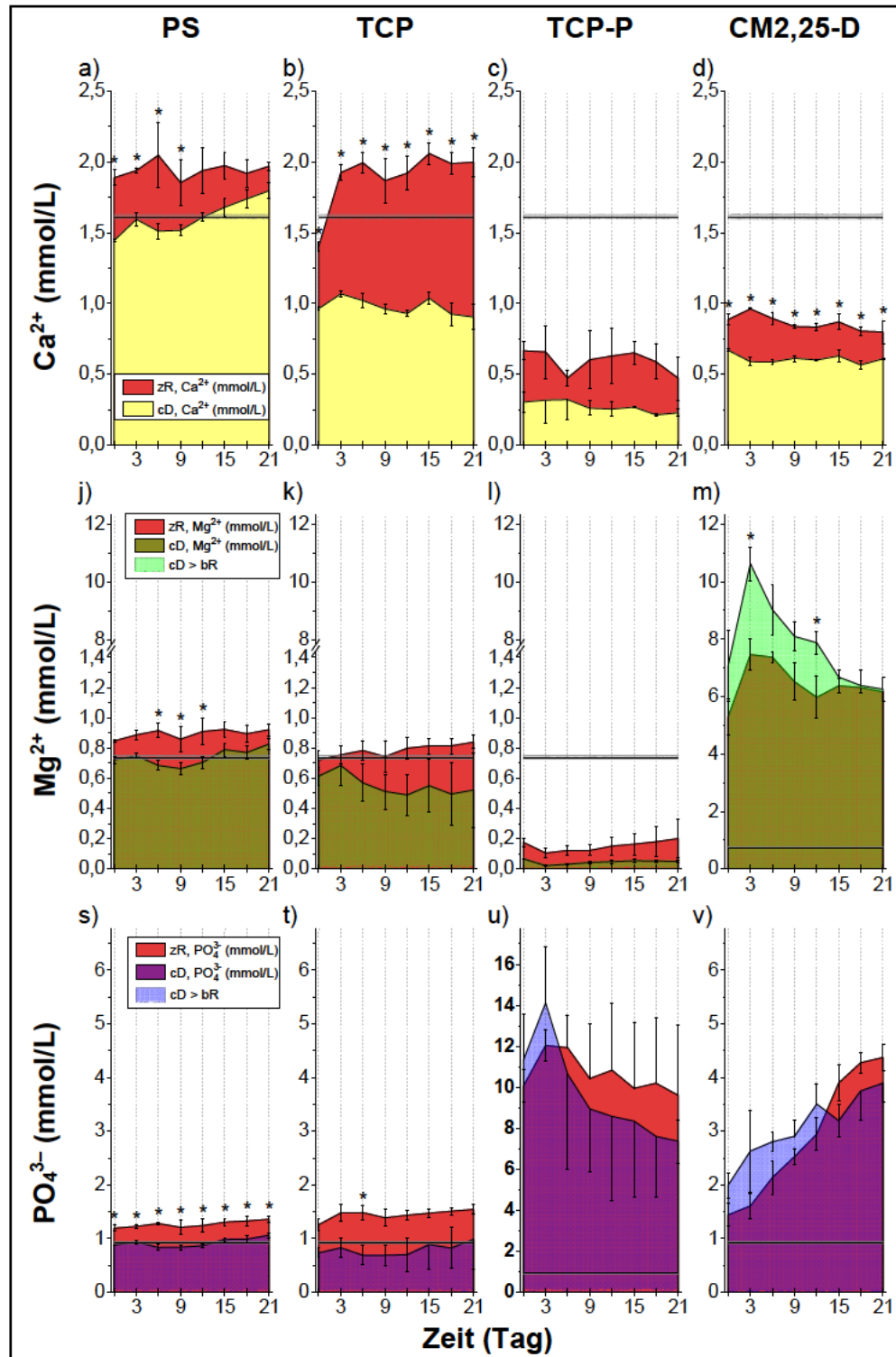
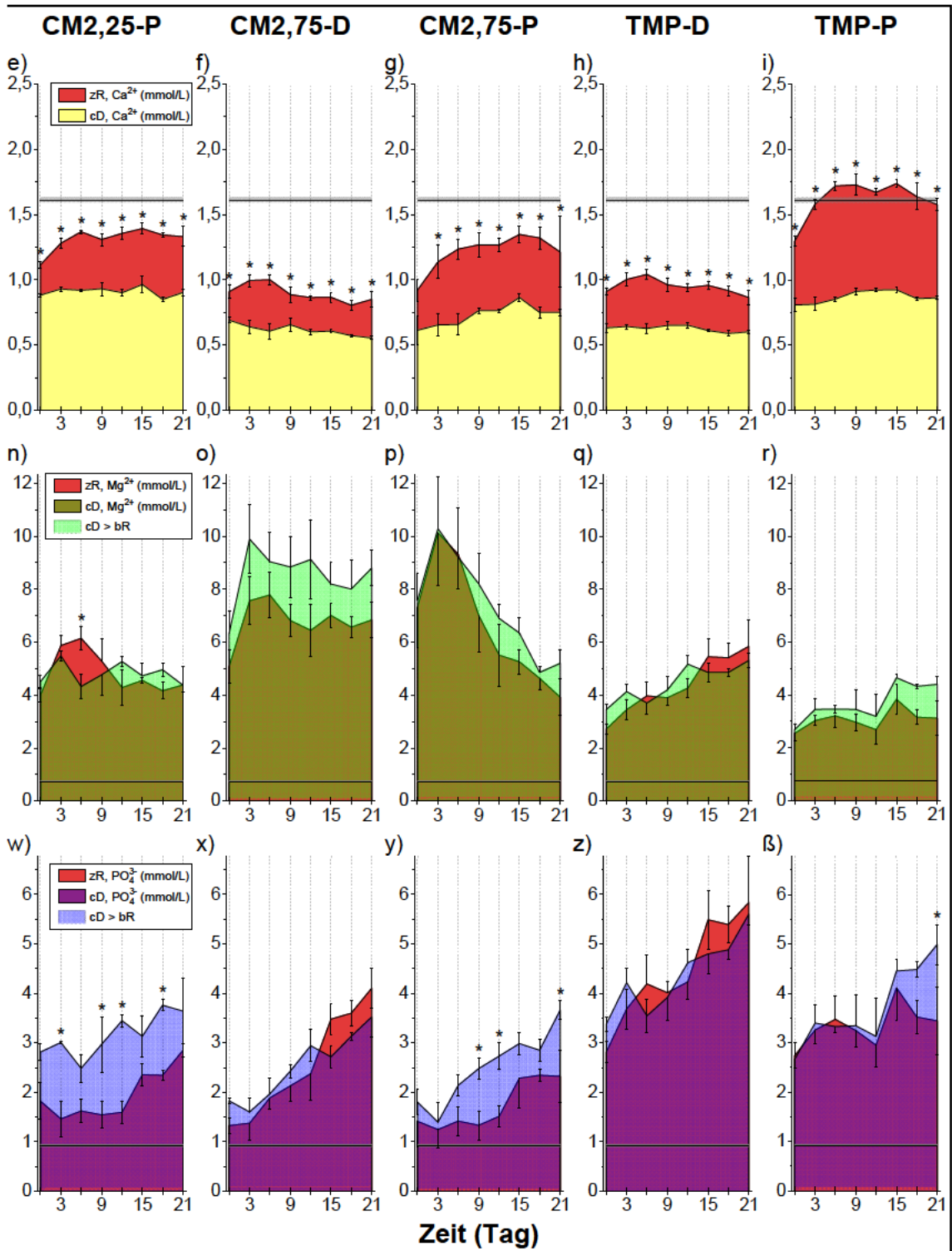


Abbildung 23: Übersicht über das Ionenverhalten infolge der zellulären Resorption (zR), der chemischen Degradation (cD) sowie der Adsorption. Auf den PS-Referenzen wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Die hM wurden ab Tag 0 mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage bis zum Tag 21 erneuert. Die verbrauchten Kulturmediumüberstände von zwei Spendern wurden für die ICP-MS-Messung der Ca²⁺- (a–i), Mg²⁺- (j–r) und PO₄³⁻-Konzentrationen (s–v) gesammelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Fortsetzung der Beschreibung und der Abbildung auf der nächsten Seite.



Fortsetzung der **Abbildung 23**. Die horizontalen Referenzlinien stellen die Ionenkonzentrationen des frischen (initialen) Kulturmediums dar und die grauen Felder um diese Linien sind dessen Standardabweichungen. Die Sternchen über den Fehlerbalken markieren einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen der Bioresorption (bR) und der cD.

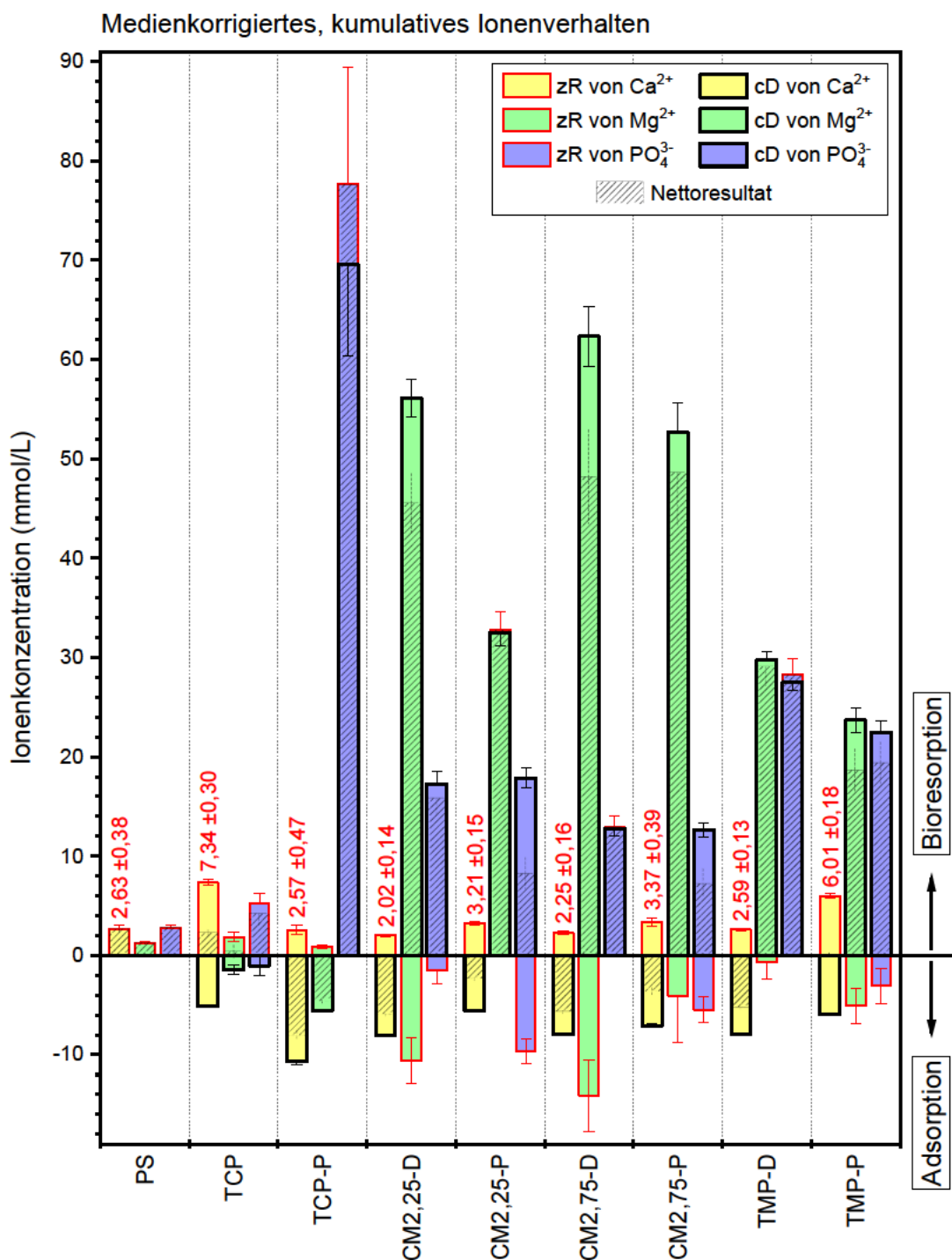


Abbildung 24: Übersicht über das medienkorrigierte, kumulative Ionenverhalten infolge der Bioresorption und der Adsorption sowie die daraus folgenden Nettoresultate. Auf der PS-Referenz wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Die hM wurden ab Tag 0 mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage bis Tag 21 erneuert. Die verbrauchten Kulturmediumüberstände von zwei Spendern wurden für die ICP-MS-Messung der Ca²⁺-, Mg²⁺- und PO₄³⁻-Konzentrationen gesammelt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. zR: zelluläre Resorption, cD: chemisch-physikalische Degradation.

4.10 pH-Werte der Kulturmediumüberstände

Zur Bestimmung des pH-Wertes wurden die verbrauchten Kulturmediumüberstände an den Tagen 9, 15 und 21 gesammelt und mit einem pH-Meter gemessen. Ausgehend vom pH-Wert des frischen (initialen) Kulturmediums ($M = 7,50$, $SD = 0,03$) sind die pH-Werte der Kulturmediumüberstände in der Abbildung 25 dargestellt.

Zunächst fällt auf, dass der pH-Wert der meisten Kulturmediumüberstände von magnesiumhaltigen Zementen im Vergleich zum initialen Kulturmedium erhöht war (Ausnahme: TMP-D). Mit einem maximal gemessenen pH-Wert von 7,85 ($SD = 0,03$) konnte lediglich bei CM2,75-P am Tag 9 ein signifikanter Anstieg festgestellt werden, der zudem signifikant höher ausfiel als die Kulturmediumüberstände der Proben PS, TCP, TCP-P und TMP-D. Die letztgenannte Probe stellte eine Ausnahme unter den magnesiumhaltigen Zementen dar, da der pH-Wert des Kulturmediumüberstandes am Tag 9 auf 7,40 ($SD = 0,02$) abfiel.

Ein signifikant niedriger pH-Wert im Vergleich zum initialen Kulturmedium wurde bei der Probe TCP-P über den gesamten Versuchszeitraum gemessen (am Tag 9: $M = 6,62$, $SD = 0,05$; am Tag 15: $M = 6,89$, $SD = 0,22$; am Tag 21: $M = 7,10$, $SD = 0,07$). Diese Zementvariante hatte zu jedem Zeitpunkt einen signifikant niedrigen pH-Wert im Vergleich zu allen anderen Proben.

Obwohl der pH-Wert der Referenzen PS und TCP am Tag 9 um etwa den gleichen Betrag gesunken war (bei PS: $M = 7,37$, $SD = 0,05$; bei TCP: $M = 7,35$, $SD = 0,07$), wurde im Vergleich zur Probe CM2,25-P nur bei TCP ein signifikant niedrigerer pH-Wert festgestellt.

Im Laufe der Versuchsreihe adaptierten sich die Kulturmediumüberstände an den pH-Wert des initialen Kulturmediums. Dabei wurde eine signifikante Adaption des pH-Wertes bei der Probe TCP-P am Tag 21 im Vergleich zum Tag 9 identifiziert.

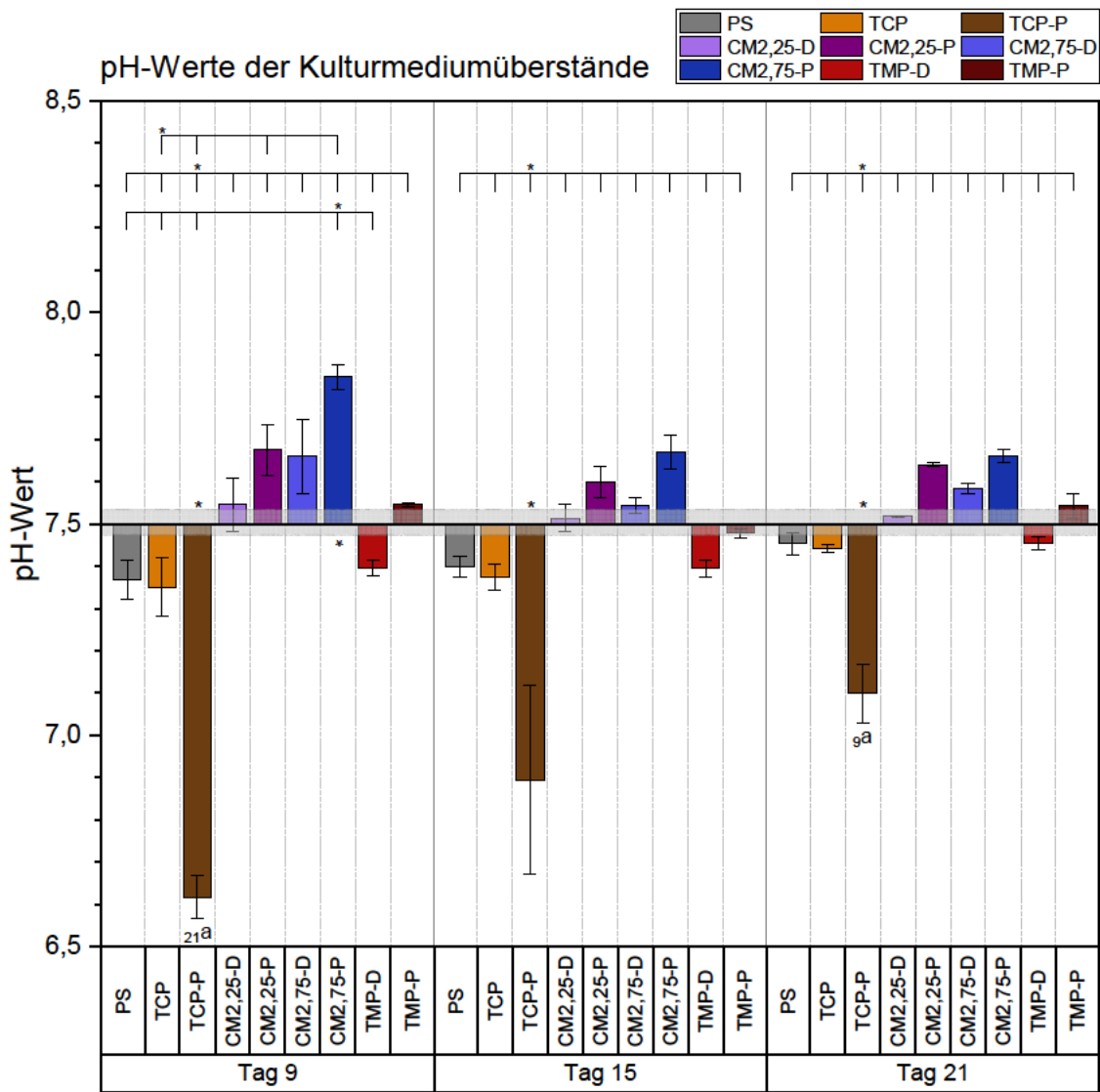


Abbildung 25: pH-Werte der Kulturmediumüberstände. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Das Kulturmedium wurde alle drei Tage bis zum Tag 21 erneuert. Die verbrauchten Kulturmediumüberstände von zwei Spendern wurden für die pH-Messung am Tag 9, 15 und 21 gesammelt. Die Kulturmediumüberstände wurden von drei Proben pro Spender und Probentyp gepoolt und mit einem pH-Meter gemessen. Die horizontale Referenzlinie bei 7,50 entspricht dem pH-Wert des frischen (initialen) Kulturmediums und die grauen Felder um diese Linie sind dessen Standardabweichungen ($SD = 0,03$). Ausgehend von dem pH-Wert des frischen Kulturmediums sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Kulturmediumüberstände dargestellt. Die Sternchen neben der Referenzlinie des frischen Kulturmediums (7,50) markieren eine signifikante pH-Wertveränderung ($p < 0,05$) der Kulturmediumüberstände im Vergleich zum frischen Kulturmedium. Ein Sternchen über einem Probentyp im oberen Teil der Abbildung kennzeichnet die Phase, von der die Klammer zu signifikant unterschiedlichen Werten ($p < 0,05$) der anderen Probentypen am gleichen Versuchstag führt. Signifikante Unterschiede innerhalb der gleichen Probe zu unterschiedlichen Messzeitpunkten sind mit dem Kleinbuchstaben a versehen. Die tiefgestellten Zahlen vor diesen Kleinbuchstaben weisen auf die zu beziehenden Versuchstage hin.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der azellulären Zementproben

5.1.1 3D-Pulverdruck und Phasenzusammensetzungen

In der vorliegenden Arbeit wurden die Prüfkörper (Scaffolds) mittels 3D-Pulverdruck im Inkjet-Verfahren mit einer entsprechenden Rohpulver-HPMC-Mischung und Wasser gedruckt und anschließend gesintert (Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.2.2). Dieses Verfahren erlaubt die Herstellung von individuellen Implantaten mit komplexen geometrischen Formen, die anhand der anatomischen Patienteninformation gewonnen werden können [44, 45]. Darüber hinaus berichteten Vorndran et al., dass beim Drucken mit Pulver-HPMC-Mischung eine Auflösung von etwa 1 mm (minimal erreichbarer Makroporendurchmesser) erzielt werden kann. Mit direkter chemischer Pulver-Binderlösungs-Reaktion während des Druckprozesses erreichten sie sogar eine Auflösung von ca. 0,5 mm [177]. Im Gegensatz dazu kann die Geometrie von Keramikimplantaten mit einfachen Formkörpern (z. B. Blöcke, Zylinder, Keile) nur intraoperativ angepasst werden, was umständlich und kostenintensiv ist und zu einer mangelnden Passgenauigkeit führt [3]. Zu den Schwächen von 3D-gedruckten Biokeramiken gehören u. a. ihre Sprödigkeit und ihre geringe mechanische Leistungsfähigkeit [44]. Außerdem sind individuelle 3D-gedruckte Implantate noch wenig etabliert und erfordern eine umfangreiche Planung sowie einen invasiven chirurgischen Eingriff [42]. Die Herstellung ist sehr geräteintensiv und bedeutet möglicherweise eine zusätzliche Strahlenbelastung für den Patienten durch die erforderliche CT-Aufnahme. Im Gegensatz dazu sind injizierbare Zementpasten gut etabliert und bieten die Möglichkeit eines minimalinvasiven chirurgischen Eingriffs [13, 191]. Die 3D-Implantate sind jedoch gut reproduzierbar und es können keine bzw. weniger Handhabungsfehler, wie z. B. eine Entmischung der injizierbaren Zementkomponenten, auftreten [16]. Die Gefahr einer übermäßigen Wärmeentwicklung, wie sie bei exothermen Abbindereaktionen von Zementpasten und damit einhergehenden iatrogenen Gewebsnekrosen auftreten kann [25, 192], ist bei gedruckten Implantaten ausgeschlossen, da die Abbindeprozesse präoperativ bei der Herstellung erfolgen. Weitere Gefahren von injizierbaren Zementen sind das Eindringen in die intratrabekulären Hohlräume [193] sowie die intravenöse Injektion mit dem Risiko einer pulmonalen Zementembolie und einer schweren kardiovaskulären Dysfunktion [194]. Nach bestem Wissen und Gewissen ist eine solche Passage bei 3D-gedruckten Zementen bisher nicht beobachtet worden. Sie kann

jedoch nicht ausgeschlossen werden, insbesondere bei einer fortgeschrittenen Implantatdegradation, und sollte in vivo untersucht werden. Trotz der verschiedenen Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Techniken ist es wichtig, dass dem Facharzt eine Reihe verschiedener Methoden zur Verfügung steht, da jeder Patient in Bezug auf Knochenstruktur, Art der Verletzung und Erkrankung unterschiedlich ist [128, 129].

Wie die Röntgendiffraktionsdaten (XRD) zeigten, bestand das TCP-Rohpulver zu 60 Gew.-% aus α -TCP und zu 40 Gew.-% aus β -TCP (Abbildung 8a). Während des Sinterprozesses fand eine Phasenumwandlung statt, sodass 80 % von α -TCP in β -TCP umgewandelt wurden. Eine Infiltration der gesinterten TCP-Proben mit 2,0 mol/L H_3PO_4 führte zur Bildung von Brushit und Monetit. Der Mechanismus dahinter lässt sich mit der Reaktionsgleichung (2.1) erklären [155]. Allerdings wandelten sich nur 23 Gew.-% des α/β -TCPs in Brushit um, sodass 71 Gew.-% des nicht reagierten α/β -TCPs im Zement noch enthalten war. Ähnliche Ergebnisse wurden von Gbureck et al. vorgestellt [195]: Mittels 3D-Pulverdruck von α/β -TCP und Phosphorsäure als reaktive Binderlösung erreichten sie je nach Phosphorsäurekonzentration (10–30 %) einen Brushit-Anteil von 14 Gew.-% bis 34 Gew.-%. Mit dreimaligem Eintauchen in 2,04 mol/L H_3PO_4 für 60 s konnten sie den Brushit-Anteil auf 67 Gew.-% erhöhen. Ein geringer Anteil des Nebenproduktes Monetit wurde sowohl in der Arbeit von Gbureck et al. (4–14 Gew.-%) [195] als auch in der vorliegenden Arbeit (6 Gew.-%) nachgewiesen. Diese Phase ist die wasserfreie Form des Brushits und es wurden mehrere Prozesse beschrieben, die zur Bildung von Monetit anstelle von Brushit führen [19]. Eine passende Erklärung dazu könnten die Untersuchungen von Bohner et al. liefern [196]: Sie fanden heraus, dass eine sofortige Trocknung der Abbindeemente zu einer Umwandlung von Brushit in Monetit führt. Der Grund dafür könnte die unterbrochene Abbindereaktion sein, die einen niedrigen pH-Wert hinterlässt und damit die Monetitbildung begünstigt (bei pH-Wert < 6 [16]). Eine 24-stündige Inkubation der abgebundenen Zemente in deionisiertem Wasser vor dem Trocknen könnte diese Umwandlung vermeiden [196].

Im Gegensatz zu TCP kam es bei den magnesiumhaltigen Zementen nach dem Sintern zu keiner Phasenänderung. Die CMPC bestanden je nach den Ausgangsstoffen zu unterschiedlichen Anteilen aus Stanfieldit und Farringtonit. Mit zunehmendem Magnesiumgehalt nahm der Stanfieldit-Anteil ab, während der Farringtonit-Anteil zunahm. Das TMP-Sin bestand aus phasenreinem Farringtonit (Abbildung 11a). Diese Ergebnisse wurden bereits in einer Masterarbeit von Brückner M. (unveröffentlicht) [176] vorgestellt und in der vorliegenden Arbeit bestätigt.

Die Infiltration der gesinterten magnesiumhaltigen Zementen (CM2,25-Sin, CM2,75-Sin, TMP-Sin) mit 3,5 mol/L DAHP führte zur Ausfällung von Struvit. Farringtonit schien jedoch das einzige Edukt von Struvit in diesem Zementensystem zu sein: Je höher der Farringtonit-Anteil in den gesinterten Scaffolds war, desto höher fiel der Struvit-Anteil nach der Reaktion aus (vgl. CM2,25-D mit CM2,25-Sin, CM2,75-D mit CM2,75-Sin und TMP-D mit TMP-Sin in den Abbildungen 9a, 10a, 11a). Die chemische Reaktion dahinter lässt sich mit der Gleichung (2.4) erklären [164]. Überraschenderweise schien der Stanfieldit-Anteil nach der DAHP-Infiltration geringfügig zuzunehmen (vgl. CM2,25-Sin mit CM2,25-D und CM2,75-Sin mit CM2,75-D in den Abbildungen 9a und 10a), obwohl nach der Gleichung (2.6) auch Stanfieldit als Edukt von Struvit zu erwarten gewesen wäre [175]. Die möglichen Ursachen hierfür könnten eine Umwandlung von Farringtonit in Stanfieldit sein oder die Werte liegen im Rahmen der *SD*.

Die Infiltration der gesinterten magnesiumhaltigen Zemente mit 2,0 mol/L bzw. 1,0 mol/L H_3PO_4 führte zur Bildung von Newberyit. Die Edukte hierfür können entweder Farringtonit und/oder Stanfieldit nach den Reaktionsgleichungen (2.5) bzw. (2.7) sein [165, 176]. Ähnlich wie bei den Struvit-bildenden Zementen nahm die Newberyit-Umsetzung mit zunehmendem Farringtonit-Anteil zu (vgl. CM2,25-P mit CM2,25-Sin, CM2,75-P mit CM2,75-Sin und TMP-P und TMP-Sin in den Abbildungen 9a, 10a, 11a). Bei dem Zement CM2,25-P war der Umsatz der Edukte Farringtonit und Stanfieldit mit jeweils etwa 10 Gew.-% ausgeglichen. Dies kann den geringen Brushit-Anteil durch das Edukt Stanfieldit nach der Gleichung (2.7) erklären. Die Umwandlung von Stanfieldit bei dem Zement CM2,75-P war mit 4 Gew.-% vergleichsweise gering, sodass der Brushit-Anteil möglicherweise unter der Nachweisgrenze lag. Das Hauptedukt bei CM2,75-P war daher Farringtonit. Bei der Infiltration von TMP-Sin mit 2,0 mol/L H_3PO_4 wurde eine erhebliche Auflösung bzw. Zerfall des Zements beobachtet. Offensichtlich war für diese Phase die H_3PO_4 -Konzentration zu hoch, weshalb sie gesenkt wurde. Die Scaffolds blieben bei 1,0 mol/L H_3PO_4 stabil und wurden zweimal infiltriert (Kapitel 3.2.2.3). TMP-P erzielte mit 43 Gew.-% Newberyit-Anteil die höchste Umwandlungsrate.

Insgesamt zeigen die quantitativen Rietveld-Analysen, dass das Hauptprodukt für die Struvit- und Newberyit-bildenden Zemente Farringtonit war und dass die Produktausfällung stark von dessen Anteil im Zement abhängig war. Die Umwandlungsrate bei Newberyit-bildenden Zementen war fast doppelt so hoch (20–43 Gew.-%) wie bei Struvit-bildenden Zementen (10–24 Gew.-%). Die geringen Mengen (2–4 Gew.-%) an Periklas und Pyrophosphat waren herstellungsbedingte Nebenprodukte. Es wäre interessant

herauszufinden, wie sich die Zementphasen nach einer längeren Zeit der Zellkultivierung verändern. Es stellte sich jedoch heraus, dass die gebildeten Substanzen in zu geringen Mengen abgeschieden wurden und/oder möglicherweise amorph waren, sodass eine XRD- und Rietveld-Analyse als technisch schwierig galt.

Häufig wird in der Literatur lediglich die qualitative Phasenzusammensetzung angegeben [21, 29-33, 164, 169, 177], was einen quantitativen Vergleich der Zemente und ihrer Umwandlungsrate erschwert. Es scheint jedoch, dass die injizierbaren Zemente eine höhere Umsatzrate aufweisen als die 3D-gedruckten Keramiken, wie beispielsweise die Ergebnisse von Kanter et al. zeigen [20]: Sie erreichten in ihren Struvit-bildenden Zementen einen Struvit-Anteil von 33,6 Gew.-% bei einem Pulver/Flüssigkeits-Verhältnis von 3 (g/mL) und 40,5 Gew.-% bei einem Pulver/Flüssigkeits-Verhältnis von 2 (g/mL). Die restlichen Anteile entfielen auf Farringtonit. Ihre Brushit-bildenden Zemente hatten 99 Gew.-% Brushit und 1 Gew.-% β -TCP-Anteil.

Eine Möglichkeit, die schnelllöslichen Produkte Struvit bzw. Newberyit in den Zementen zu erhöhen, könnte die mehrfache Infiltration der 3D-gedruckten Objekte mit der jeweiligen reaktiven Binderlösung sein, wie die Untersuchung von Gbureck et al. zu den Brushit-bildenden Zementen zeigt [195]. Dies könnte beispielsweise dazu genutzt werden, das Edukt/Produkt-Verhältnis einzustellen und damit die Resorptionsrate des Implantats zu regulieren.

5.1.2 Morphologische Veränderungen

Nach dem Sintern der Phase TCP wiesen die Kristalle eine insgesamt runde und glatte Morphologie auf (Abbildung 22a), was charakteristisch für gesinterte β -TCP-Zemente ist, wie die REM-Bilder in den Arbeiten von Ghanaati et al. [197] und Juhasz et al. [198] zeigen. Nach 17 Tagen Zellkultivierung blieben die TCP-Zemente bis auf die Resorptionslakunen weitgehend unverändert (Abbildung 22i).

Durch die Infiltration von TCP mit H_3PO_4 wurde die *TCP-P*-Oberfläche rauer und bildete plattenförmige Kristalle mit einer Schichtstärke von ca. 6 μm (Abbildung 22b). Eine ähnliche Struktur wurde von Kanter et al. bei den Brushit-bildenden Zementen gezeigt [20]. Nach der 17-tägigen Zellkultivierung veränderten sich die Kristalle von 6 μm auf ca. 0,1 μm Schichtstärke, wobei die plattenförmigen Strukturen in unterschiedliche Richtungen angeordnet waren (Abbildung 22j, s).

Alle magnesiumhaltigen Zemente zeigten eine ähnliche morphologische Tendenz: Die einzelnen Kristalle hatten eine kantige Form und die interkristallinen Abstände waren vergleichsweise groß, was zu einer insgesamt rauen und porösen Oberfläche führte. Eine deutlich erkennbare morphologische Veränderung der Zementoberfläche wurde am Tag 17 nicht beobachtet (vgl. Abbildung 22c–h mit k–p). Wie in vielen Arbeiten mit CMPC- und MPC-Pasten und bei ähnlicher Rohpulverherstellung zu sehen ist, scheint die raue Oberfläche typisch für diese magnesiumhaltigen Zemente zu sein [20, 31, 199, 200]. In der Literatur wird für die Struvit- [201] und Newberyit-bildenden Zemente [168] eine orthorhombische Kristallstruktur beschrieben. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nur selten beobachtet, wie z. B. für TMP-D in der Abbildung 22g.

5.1.3 Adsorptions- und Auflösungsverhalten

Während der azellulären Scaffold-Auslagerung in Kulturmedien wurde eine kontinuierliche Adsorption von Ca^{2+} beobachtet, was auf eine Präzipitation von CaP schließen lässt. Die Struvit-bildenden Zemente neigten dazu, mehr Calcium zu adsorbieren als die Newberyit-bildenden Zemente (Abbildung 24). Während TCP am wenigsten Ca^{2+} adsorbierte, hatte TCP-P die höchste Adsorption unter den Zementen. Bei PS waren die Adsorption und die cD der Präzipitate über die 21-tägige Messreihe ausgewogen.

Das Mg^{2+} hingegen wurde von den magnesiumhaltigen Zementen stetig ins Kulturmedium abgegeben, wobei bei den Proben CM2,25-D, CM2,75-D und CM2,75-P die höchsten Werte erreicht wurden (Abbildung 24). Bei ihren Kulturmedien waren die Mg^{2+} -Konzentrationen in einigen Fällen etwa um den Faktor 10 höher als die initiale Kulturmediumkonzentration ($M = 0,73 \text{ mmol/L}$, $SD = 0,01 \text{ mmol/L}$) (Abbildung 23m, o, p). Bei den Referenzen TCP und PS wurden kaum Mg^{2+} -Veränderungen beobachtet. Eine deutliche Mg^{2+} -Adsorption wurde lediglich bei TCP-P gemessen.

Die Freisetzung von PO_4^{3-} während der azellulären Scaffoldauslagerung im Kulturmedium ging weitestgehend mit einer Mg^{2+} -Freisetzung einher, wobei die TMPs unter den magnesiumhaltigen Zementen die höchsten PO_4^{3-} -Konzentrationen erreichten (Abbildung 23z, β). Der Konzentrationsbereich aller magnesiumhaltigen Zemente lag zwischen etwa 2 mmol/L und etwa 5,5 mmol/L (Abbildung 23v– β). Die höchsten PO_4^{3-} -Konzentrationen wurde bei TCP-P gemessen, wobei sie am Tag 3 bis zu 14,12 mmol/L ($SD = 2,72$) reichte. Die Referenzen TCP und PS zeigten wiederum kaum PO_4^{3-} -Konzentrationsänderungen im Vergleich zum Ausgangsmedium ($M = 0,92 \text{ mmol/L}$, $SD = 0,02 \text{ mmol/L}$).

Es wäre zu erwarten, dass die Auflösungsgeschwindigkeit und die damit verbundene Ionenfreisetzung in den magnesiumhaltigen Zementen mit dem Anteil an schnelllöslichen Phasen (Struvit, Newberyit) korreliert. Dementsprechend sollten TMP-D und/oder TMP-P die meisten Ionen freisetzen. Dies würde auch die Hypothese von Ostrowski et al. stützen, die besagt, dass bei CMPC die cD vom CaP-zu-MgP-Verhältnis abhängt, wobei die Auflösung mit steigendem MgP-Gehalt zunimmt (CPC < CMPC (CaP hoch) < CMPC (MgP hoch) < MPC) [25]. Es konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen einem höheren Newberyit- oder Struvit-Anteil und einer höheren Ionenfreisetzung beobachtet werden (vgl. Abbildungen 9–11 mit 23 und 24). Tatsächlich zeigten die Proben CM2,25-D, CM2,75-D und CM2,75-P das höchste Auflösungsverhalten. Die Struvit-bildenden Zemente wiesen eine höhere cD auf als die Newberyit-bildenden Zemente.

Vergleichbare Ergebnisse zeigten beispielsweise Ewald et al. [33]: So haben sie Zementpasten, die den Proben CM2,25-D und CM2,75-D in der vorliegenden Arbeit gleichen, in PBS ausgelagert und die Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Konzentration alle 2 Tage 30 Tage lang gemessen. Für Ca^{2+} und Mg^{2+} stellten sie einen 7-fachen Anstieg und für PO_4^{3-} einen 3–4-fachen Anstieg fest, wobei der Zement CM2,25-D mehr Ca^{2+} und PO_4^{3-} freisetzte als CM2,75-D. Dies bestätigt erneut, dass ein höherer MgP-Gehalt von den Zementen nicht unbedingt mit einer höheren Auflösung einhergeht. Die beschriebene Auflösung der CMPCs kann jedoch nur bedingt auf physiologische Bedingungen übertragen werden, da die Zementauslagerung in PBS erfolgte, welche keine Ca^{2+} und Mg^{2+} enthielt und somit nicht den physiologischen Konzentrationen von 0,75–0,95 mmol/L für Mg^{2+} [202] und 1,16–1,31 mmol/L für Ca^{2+} [84] entsprach. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass auch die Serumkonzentration in Kulturmedium eine wichtige Rolle für das Degradations- und Rekristallisationsverhalten spielt [42]. Aus diesen Gründen ist es sinnvoll, die In-vitro-Degradationsversuche von Zementen in Lösungen durchzuführen, die die physiologische Umgebung so weit wie möglich simulieren.

In einer Studie von Klammert et al. wurden die Kulturmediumüberstände nach der Kultivierung osteoblastenähnlicher Zelllinien (MC3T3-E1) auf Newberyit-bildenden Zementen (entspricht in etwa den Proben CM2,25-P und CM2,75-P in der vorliegenden Arbeit) auf Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Konzentration analysiert. Sie stellten eine Reduktion der Ca^{2+} von 1,75–2,0 mmol/L auf 1,25–1,5 mmol/L fest. Dagegen stiegen die Konzentrationen von Mg^{2+} und PO_4^{3-} von 1,0 mmol/L auf das 6- bis 8-fache an [169].

Die Gruppe von Ostrowski et al. inkubierte β -TCP sowie kristalline (cTMP, Farringtonit) und amorphe (aTMP) Trimagnesiumphosphate für 125 h in Kulturmedien und beobachtete ebenfalls eine Reduktion des Calciumspiegels in allen Proben von 1,6 mmol/L auf 1,2 mmol/L bei β -TCP, auf 1,0 mmol/L bei cTMP und auf 0,2 mmol/L bei aTMP. Die Mg^{2+} -Konzentration blieb bei β -TCP mit 1 mmol/L unverändert. Bei den magnesiumhaltigen Proben erhöhte sich die Mg^{2+} -Konzentration auf ca. 3 mmol/L (cTMP) und 10 mmol/L (aTMP) [42].

Juhasz et al. beobachteten Oberflächenumwandlungsreaktionen von β -TCP- und Brushit-Keramiken in *simulierter Körperflüssigkeit*. Sie fanden heraus, dass sich die Brushit-Proben mit zunehmender Auslagerungszeit in schwerlösliches Octacalciumphosphat und HA umwandeln und dass sich auf β -TCP-Proben submikroskopische HA-Kristalle bildeten. Auf den REM-Aufnahmen traten die Octacalciumphosphat-Kristalle als plattenförmige Strukturen mit einer Dicke von deutlich unter 1 μm und unterschiedlicher Kristallausrichtung auf, die der Probe TCP-P nach 17 Tagen Inkubation ähnelten (Abbildung 22j). Die Apatitkristalle auf β -TCP waren kugelförmige Ablagerungen mit einem Durchmesser von etwa 1 μm [198]. Da die REM-Aufnahmen in der vorliegenden Arbeit bei geringerer Vergrößerung und mit Zellen bzw. nach der Zellyse analysiert wurden, waren diese submikroskopischen HA-Kristalle auf TCP möglicherweise nicht oder nur sehr schwer nachweisbar, wie bereits von Bohner et al. beschrieben [23].

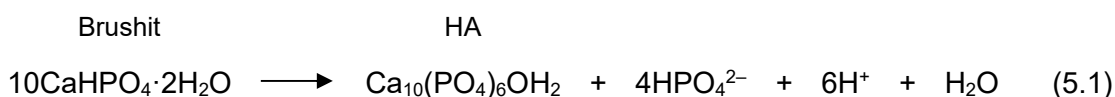
Alle Beobachtungen, die in den oben erwähnten Studien beschrieben wurden, stimmen weitestgehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein und unterstreichen die überlegene Löslichkeit von magnesiumhaltigen Zementen im Vergleich zu CPCs.

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Auflösung und Adsorption könnten wie folgt sein: Eine chemische Auflösung findet prinzipiell nur dann statt, wenn das Löslichkeitsverhalten der Keramik um ein Vielfaches höher ist als die Ionenkonzentration des Umgebungsmediums [21]. Dies äußert sich insbesondere in der Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Freisetzung bei den Struvit- und Newberyit-bildenden Zementen. Da jedoch physiologische Flüssigkeiten bei einem pH-Wert von 7,4 im Vergleich zu HA übersättigt sind, kann ein Fremdkörper die Keimbildung von Apatitkristallen auf der Materialoberfläche verursachen und dadurch die Konzentration von Ca^{2+} und PO_4^{3-} verringern [23], wie in Abbildung 23a–i gezeigt. Dies könnte auch den Zusammenhang zwischen der hohen Ca^{2+} -Reduktion im Kulturmedium der Phase TCP-P (Abbildung 23c) und den weißen kugelförmigen Oberflächenablagerungen erklären (TCP-P in der Abbildung 15 und 16). In der Regel

tritt in einer übersättigten Lösung zuerst eine Ausfällung von amorphem CaP auf [35], das sich umstrukturiert und in den schwerlösliches CDHA umwandelt [22]. Wenn jedoch Mg^{2+} in einer Lösung anwesend sind, kann es während der Kristallisation zu einer Konkurrenz zwischen den chemisch ähnlichen, aber größeren Ca^{2+} und den kleineren Mg^{2+} kommen, wodurch die HA-Keimbildung gehemmt und die Stabilität von amorphem CaP gefördert wird [35-37]. Mit der Zeit nehmen die Magnesiumeinlagerungen in den Präzipitaten ab, sodass sie kristallin werden. So fanden Klammert et al. beispielsweise heraus, dass sich nach 15 Monaten intramuskulärer Implantation in einem Rattenmodell die Struvit- (entspricht etwa CM2,25-D) und Newberyit-Zementproben (entspricht etwa CM2,25-P) in Whitlockit umwandelten. Eine HA-Phase konnte jedoch nicht festgestellt werden [21].

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass eine hohe spezifische Oberfläche (z. B. 18–33 m²/g) für eine ausgeprägte Ca^{2+} -Adsorption sorgt [12], was ein weiterer Grund für die Ca^{2+} -Verluste bei den magnesiumhaltigen Zementen sowie bei TCP-P sein könnte. Für TCP-P ließe sich dieser Zusammenhang möglicherweise auch auf den Mg^{2+} -Verlust übertragen.

Eine mögliche Umwandlung von Brushit in HA kann für TCP-P durch die Gleichung (5.1) erklärt werden [203]. Daraus lässt sich auch die Ursache für die hohe PO_4^{3-} -Konzentration (Abbildung 23u und 24) und den signifikant niedrigen pH-Wert (Abbildung 25) in den Kulturmedien herleiten.



5.1.4 Zusammenhang zwischen Magnesiumionenkonzentration und pH-Wert

Eine Korrelation zwischen der Mg^{2+} -Konzentration und dem pH-Wert in den Kulturmedien wurde in der Literatur bereits häufig beschrieben [204-206]: So zeigten beispielsweise Zhai et al., dass bei der Auslagerung von reinem Magnesium in Kulturmedien sowohl die Mg^{2+} -Konzentration als auch der pH-Wert mit der Zeit ansteigen: Nach 6 h Lagerung maßen sie eine Mg^{2+} -Konzentration von 2 mmol/L und einen pH-Wert von 7,7. Nach 12 h bzw. 24 h stieg die Mg^{2+} -Konzentration auf 10 mmol/L bzw. 16 mmol/L an und die pH-Werte erhöhten sich mit ähnlicher Tendenz auf 8,0 bzw. 8,4 [204]. Während einer 21-tägigen Inkubation der Newberyit-bildenden Zemente (entspricht in der vorliegenden Arbeit etwa CM2,25-P und CM2,75-P) im Kulturmedium gaben Klammert et al. einen pH-

Wert zwischen 7,5 und 8,0 an [169]. Diese Werte ähneln somit den in dieser Arbeit ermittelten pH-Werten der Kulturmedien für die magnesiumhaltigen Zemente (Abbildung 25).

Obwohl höhere Mg^{2+} -Konzentrationen tendenziell auch den pH-Wert erhöhen, wurden keine signifikanten Unterschiede der pH-Werte (außer bei CM2,25-P und CM2,75-P am Tag 9) zwischen den magnesiumhaltigen Zementen und den magnesiumfreien bzw. -armen Referenzen PS und TCP beobachtet (Abbildung 25). Ein möglicher Grund dafür könnten die geringen Unterschiede der Mg^{2+} -Konzentrationen zwischen den Proben sein (Abbildung 23j–r), im Gegensatz zu der oben beschriebenen Arbeit von Zhai et al. (Mg^{2+} -Konzentrationen zwischen 2 mmol/L und 16 mmol/L) [204]. Zudem erfolgten die pH-Messungen der Zellkulturmediumüberstände außerhalb des Brutschanks, sodass der pH-Wert zum einen durch die Zellabbauprodukte gesenkt und zum anderen durch den CO_2 -Verlust erhöht wurde. Die Messungen der pH-Werte waren somit nicht genau und sollten nur als Richtwerte dienen.

Für zukünftige Untersuchungen ist es ratsam, zwischen der azellulären und zellulären Inkubation der Zemente zu unterscheiden und die Messungen innerhalb des Brutschanks durchzuführen.

5.2 Osteoklastennachweise

5.2.1 Zellkultivierungsmethoden

Zellbasierte In-vitro-Resorptionstests sind wichtige Instrumente zur Vorhersage und Bewertung der Resorbierbarkeit von KEMs in vivo. Im Vergleich zu In-vivo-Experimenten sind zellbasierte Untersuchungen einfacher, reproduzierbarer, kostengünstiger und vermeiden das Leiden der Tiere [207].

Für In-vitro-Experimente stehen eine Reihe verschiedener Methoden und Zellarten für die Osteoklastengewinnung zur Verfügung [3]. Neben verschiedenen immortalisierten Zelllinien, wie den murinen makrophagenähnlichen C7-Zelllinien [97, 208], der RAW 264.7-Zelllinie [30, 32, 209] und der humanen monozytären U937-Leukämie-Zelllinie [38, 210], werden auch hM (CD14⁺/CD16⁻-Untergruppe) als osteoklastische Vorläuferzellen in vitro erfolgreich eingesetzt [3, 51, 77, 78, 133, 211].

Da die in dieser Arbeit untersuchten Biokeramiken auf die Implantation beim Menschen ausgerichtet sind, ist es naheliegend, dass hM zur osteoklastischen Differenzierung verwendet wurden. PBMC, das aus BC gewonnen wird, wird häufig als Monozytenquelle verwendet. Die typische Reinheit der CD14⁺/CD16⁻-Monozyten-Untergruppe, die zur Differenzierung in Osteoklasten fähig ist [77, 78], liegt in PBMC jedoch zwischen 10 und 15 % [77, 189, 212]. Um die Reinheit der Monozyten zu erhöhen, wurde in der vorliegenden Arbeit die PBMC-Fraktion zunächst mit Pancoll aus BC isoliert. Danach folgte die Abtrennung der Lymphozyten-Fraktion aus PBMC mit einer hyperosmotischen Percoll-Lösung und schließlich die Isolierung der Monozyten von den Thrombozyten mit einer isoosmotischen Percoll-Lösung (Kapitel 3.2.5.2). Dieses Verfahren basierte weitgehend auf dem Protokoll von Repnik et al. [189]. Um die Kosteneffizienz weiter zu erhöhen, wurden die insgesamt fünf Waschschriffe pro BC mit einer PBS-EDTA-BSA-Lösung anstelle von Kulturmedium nach dem Protokoll von Bernhardt et al. durchgeführt [133].

Wie in der Abbildung 12 zu sehen ist, wurden die Monozyten effektiv von den Thrombozyten- und Lymphozytenfraktionen isoliert, was zu einer durchschnittlichen Monozytenreinheit von 58,20 % ($SD = 11,21$) und einer durchschnittlichen Monozytenausbeute von $8,49 \times 10^7$ hM ($SD = 3,35 \times 10^7$) pro 30 mL BC führte. Mit einer Ausbeute von $7,7 \times 10^7$ hM ($SD = 3,36 \times 10^7$) und einer Monozytenreinheit von 75 % ($SD = 20$) erzielten Repnik et al. ähnliche Ergebnisse, wobei der letztgenannte Wert als Monozyten/Lymphozyten-Verhältnis angegeben wurde [189]. Im Vergleich dazu führten Bernhardt et al. eine 1-fache Dichtegradientenzentrifugation durch, ähnlich dem ersten Isolationschritt in dieser Arbeit (PBMC-Isolation aus BC und ein Erythrozytenlyseschritt), und erhielten eine Monozytenkonzentration von 24–40 % (Protokoll „YELLOW“), wobei die CD14⁺-Monozytenkonzentration bei 19 % lag [133].

Zur weiteren Erhöhung der Reinheit und der Ausbeute von CD14⁺-Monozyten kann die immunomagnetische Separation (positiv oder negativ) eingesetzt werden: So konnten Bernhardt et al. [133] und Abdullah et al. [211] zwar zeigen, dass diese Technik eine CD14⁺-Monozytenkonzentration von bis zu 98 % ermöglicht, allerdings fanden die Autoren keine Vorteile bei der Osteoklastogenese im Vergleich zur einfachen Dichtegradientenzentrifugation (PBMC-Isolierung). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte das Fehlen anderer Monozyten-Subpopulationen (z.B. CD14⁻-Monozyten) sein, die die Osteoklastogenese positiv modulieren [213]. Zudem ist die immunomagnetische Separation kostintensiver [133], sodass sie für osteoklastische In-vitro-Experimente insgesamt weniger attraktiv erscheint.

Wie Quinn et al. berichteten, ist die Kombination von M-CSF und RANKL, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, ausreichend, um Monozyten zu Osteoklasten mit ihren typischen Eigenschaften zu stimulieren [102].

Um nachzuweisen, dass das verwendete Protokoll eine erfolgreiche Osteoklastogenese ermöglicht, wurden die isolierten Zellen auf PS und Glas kultiviert und analysiert. Es konnten Zellfusionen ab Tag 6 (Abbildung 13c) und polynukleäre Riesenzelle mit einer Zellgröße von über 100 µm und mehr als 5 Nuklei ab Tag 10 nach RANKL-Gabe festgestellt werden, wie aus Durchlichtmikroskopie (Abbildung 13d–f, 14 und 16 auf PS), REM-Bildern (Abbildung 22q) und Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 21 auf PS) deutlich zu erkennen war. Diese Beobachtungen werden in der Literatur für Osteoklasten oft beschrieben [47, 51, 66, 84, 133]. Darüber hinaus hatten diese polynukleären Riesenzellen glatte periphere Ausläufer, die mit der *Clear zone* vereinbar sind [81] (vgl. Abbildung 2 mit Abbildung 13d–f und 14). Zudem wurden durch Fluoreszenzmikroskopie Aktinringe nachgewiesen, die Teil des Adhäsionskomplexes (F-Aktin-Zytoskelett) sind und die mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung eines extrazellulären sauren Mikromillieus während der Resorption sind [3, 81] (vgl. Abbildung 3 mit Abbildung 21 PS). Im Durchlichtmikroskop wurde im Zellzentrum eine gestipelt Zone mit Nuklei beobachtet (Abbildung 13d–f), die nach der TRAP-Färbung eine violette Farbstoffablagerung aufwies (Abbildung 14 und Abbildung 16 PS). Diese Zone kann als *Ruffled border* der Osteoklasten angesehen werden (vgl. Abbildung 2), die viele Plasmamembranfaltens und Vesikel mit u. a. dem Enzym TRAP 5b enthalten, und die meisten Zellorganellen, wie z. B. die Nuklei, liegen basal davon [66, 81, 92, 93]. Neben der Färbung von TRAP wurde auch die photometrische Aktivitätsmessung dieses osteoklastentypischen Enzyms [93] untersucht. Dabei zeigte sich eine weitestgehend konstante TRAP-Aktivität auf PS über den 22-tägigen Versuchszeitraum (Ausnahme TRAP-Volumenaktivität am Tag 16) (Abbildungen 18 und 19) bei einer konstanter DNA-Konzentration (Abbildung 17).

Ein Nachteil des Spendermaterials ist die große Variation zwischen den Spendern, so dass mit dem gleichen Vorgehen oft unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden können [51, 133], was sich an den oft ausgeprägten *SD* in den Diagrammen widerspiegelt.

Insgesamt bestätigten die mikroskopischen und enzymatischen Ergebnisse jedoch, dass das verwendete Protokoll eine kostengünstige und effektive Kultivierung von Osteoklasten ermöglicht, weshalb es auch für die zellulären Zementanalysen verwendet wurde.

5.2.2 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Analyse zeigte die höchsten DNA-Konzentrationen auf TCP, jedoch mit abnehmender Tendenz. Zwischen den Referenzen PS, TCP-P und allen magnesiumhaltigen Zementen wurden ähnliche Werte gemessen. Signifikante Veränderungen während der 22-tägigen Messreihe konnten auf keiner Oberfläche festgestellt werden, was auf eine stabile Zellpopulation während dieses Zeitraums hinweist (Abbildung 17). Die ausgeprägten *SD* sind auf hohe Variationen zwischen den Spendern zurückzuführen, wie bereits von Bernhardt et al. beschrieben [133, 214].

Unter idealen Bedingungen wäre bei der PBMC-Kultivierung kein Anstieg der Zellzahl und damit der DNA-Konzentration zu erwarten, im Gegensatz zu der Verwendung der Zelllinie RAW 264.7 als Osteoklasten-Vorläufer [30, 32, 42], da sich die *multipotenten hämatopoetischen Stammzellen* im Knochenmark befinden und ihre Nachkommen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verlieren [66]. Vielmehr sollte im Idealfall über den Versuchszeitraum eine konstante DNA-Konzentration vorliegen, unabhängig davon, ob die DNA-Quelle aus mononukleären Zellen oder fusionierten polynukleären Riesenzellen stammt. Daher sollte bei der Aussaat der doppelten hM-Anzahl auch die DNA-Konzentration doppelt so hoch sein. Dieser Sachverhalt konnte jedoch bei der PS-Referenz und den meisten Zementen nicht beobachtet werden: So wurde auf PS eine ähnliche DNA-Konzentration gemessen wie auf den Zementen, außer im Vergleich zu TCP am Tag 10 (Abbildung 17). Diese vergleichsweise reduzierte DNA-Konzentration auf den Zementen könnte folgende Gründe haben: (1) Die Zellen gingen in die Apoptose. (2) Die nicht-adhärenenten Zellen wurden beim Mediumwechsel aus dem Zellpool entfernt. (3) Bei der Messung konnte nur ein Teil des DNA-Materials erfasst werden, da es zu einer DNA-Adsorption kam.

Beim Vergleich der DNA-Konzentrationen mit den Nukleusdichten in der Fluoreszenzmikroskopie fällt besonders bei den Proben TCP und TCP-P eine deutliche Diskrepanz der Ergebnisse auf: Während die DNA-Konzentration auf TCP am Tag 10 signifikant höher war als auf TCP-P, zeigte die Fluoreszenzmikroskopie in diesem Zeitraum keine relevanten Unterschiede in der Nukleusdichte zwischen diesen Zementen. Ebenso schienen die Unterschiede in der Nukleusdichte zwischen den Proben TCP und CM2,75-D am Tag 16 nicht so ausgeprägt zu sein, als dass es signifikante Unterschiede in der DNA-Konzentration geben könnte (vgl. Abbildung 17 mit den Abbildungen 20 und 21). Ein Grund dafür könnte die raue Oberfläche von TCP-P und den magnesiumhaltigen Zementen sein, die zu einer Retention der DNA führte und somit der Messung entzogen

blieb. Diese Vermutung wird durch die Tatsache untermauert, dass bei der vergleichsweise glatteren Oberfläche der Referenz TCP an den Tagen 10 und 16 bei doppelter hM-Aussaat im Vergleich zu PS auch etwa die doppelte DNA-Konzentration vorlag (Abbildung 17). Im Gegensatz dazu wurde auf den raueren Oberflächen der Phase TCP-P und der magnesiumhaltigen Zemente insbesondere am Tag 10 und 16 eine deutlich geringere DNA-Konzentration gemessen, die allerdings oft nicht mit den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen korrelierte. Eine aussagekräftige Bewertung der DNA-Konzentration für die Analyse der Zellzahl und der zytotoxischen Effekte [214, 215] wäre unter diesen Umständen kaum möglich.

Obwohl die Untersuchungsmethode mit *Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit* für die rauen Zemente möglicherweise nicht optimal war, können die weitestgehend stabilen DNA-Konzentrationen (Abbildung 17) und stabilen Nukleusdichten auf TCP, CM2,25-P, CM2,75-D, TMP-D und die leichte Abnahme der Nukleusdichten auf CM2,25-D und TMP-P (Abbildung 20) während der 22-tägigen Untersuchungszeit als Indiz für eine gute Zellviabilität und damit für das Ausbleiben von zytotoxischen Einflüssen dieser Zemente angesehen werden. Dagegen könnte die ausgeprägt abnehmende Nukleusdichte auf dem Zement CM2,75-P auf ungünstige Zellbedingungen hinweisen (Abbildung 20).

Für zukünftige Versuche ist es empfehlenswert, die initiale DNA-Menge zu erfassen (z. B. einige Stunden oder ein Tag nach der Zellaussaat), um eine bessere Referenz zu erhalten. Zudem sollten die Zellen getrennt von den Kultivierungs-Wells und den Kultivierungs-Scaffolds lysiert werden, wie es für Spender 3 durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.2.7 und die Abbildungen 30 und 32 im Anhang), um eine bessere Differenzierung der DNA-Quelle zu ermöglichen. Des Weiteren sollte der PicoGreen®-Assay mit anderen DNA-Quantifizierungs-Assays verglichen werden, um mögliche DNA-Retentionen, insbesondere auf rauen Zementen, zu erfassen und so eventuell eine optimalere Analyse-methode zu eruieren.

5.2.3 TRAP-Färbung und -Aktivität

Es wird angenommen, dass TRAP 5b ein osteoklastenspezifisches Enzym ist, das sowohl in Resorptionslakunen als auch in intrazellulären Vesikeln vorkommt [81, 92, 93]. Dieses Enzym wird häufig für die quantitative (TRAP-Aktivität) und qualitative (TRAP-Färbung) Analyse von Osteoklasten verwendet und ist daher ein wichtiger Osteoklastenmarker [12, 47, 93, 216-218]. In der vorliegenden Arbeit wurden die TRAP-Färbung und die intrazelluläre TRAP-Aktivität auf allen Probeoberflächen untersucht.

TRAP-aktive Zellen wurden auf allen Proben durch photometrische TRAP-Aktivitätsmessungen nachgewiesen. Obwohl die DNA-Menge nach dem PicoGreen®-Assay auf allen Proben meist vergleichbar war, zeigten die Struvit-bildenden Zemente oft eine signifikant höhere TRAP-Volumenaktivität im Vergleich zu allen anderen Proben mit einem signifikanten Anstieg der Aktivität bis Tag 22. Auf allen Newberyit-bildenden Zementen und TCP-P war die TRAP-Volumenaktivität am geringsten und nahm über den Versuchszeitraum kaum zu. Bei den Referenzen PS und TCP stiegen die Werte bis zum Tag 22 nur leicht an (Abbildung 18). Die Ergebnisse der DNA-normalisierten TRAP-Aktivität (TRAP-Aktivität pro DNA-Menge) waren ähnlich wie die Ergebnisse der TRAP-Volumenaktivität, jedoch zeigte die Phase TMP-D niedrigere Werte im Vergleich zu CM2,25-D und CM2,75-D. Die Referenzen PS, TCP, TCP-P sowie alle Newberyit-bildenden Zemente wiesen vergleichsweise niedrige TRAP-Aktivität pro DNA-Menge auf (Abbildung 19).

Nach der TRAP-Färbung wurde ein deutlicher Unterschied zwischen Struvit- und Newberyit-bildenden Zementen festgestellt: Von den untersuchten Zementen wiesen die Struvit-bildenden Zemente die meisten TRAP-positiven Zellen auf, die bis zum Tag 22 deutlich zunahmten und auf der gesamten Oberfläche weitgehend dispergiert waren. Die gemessene Zellgröße betrug etwa 25 µm. Die Reihenfolge der Farbintensitäten unter den Struvit-bildenden Zementen war wie folgt: CM2,75-D ≥ CM2,25-D > TMP-D. Im Gegensatz dazu wurde auf Newberyit-bildenden Zementen die geringste Dichte an TRAP-positiven und TRAP-negativen Zellen beobachtet, die mit etwa 20 µm die kleinsten Zellgrößen erreichten. Eine marginale Zunahme der Farbintensität wurde auf den inselartigen dunklen Zementbereichen beobachtet, was auf eine leichte Zunahme der TRAP-Aktivität hindeuten könnte. Auf den Referenzen TCP und TCP-P waren zusätzlich zu vielen TRAP-negativen Zellen auch vereinzelte TRAP-positive Zellen zu erkennen, wobei auf TCP mit ca. 50 µm die größten Zellen zu finden waren. Auf TCP-P konzentrierten sich die TRAP-positiven Zellen hauptsächlich auf den weißen kugelförmigen Ablagerungen und waren etwa 25 µm groß (Abbildung 15 und 16).

Bei den Struvit-bildenden Zementen deutete die quantitative und qualitative TRAP-Analyse darauf hin, dass die Differenzierung der Osteoklastenvorläufer am Tag 22 noch nicht vollständig abgeschlossen war und somit bei einem längeren Versuchszeitraum ein weiterer Anstieg der TRAP-Aktivität zu erwarten wäre. Bei den Newberyit-bildenden Zementen und den Referenzen PS, TCP und TCP-P schien das Maximum der TRAP-Aktivität nach der 22-tägigen Inkubation zwar noch nicht erreicht zu sein, aber bei einer längeren Versuchsdauer wäre ein Anstieg nicht zu erwarten gewesen, der den Struvit-bildenden

Zementen ähneln würde. Nach der TRAP-Analyse zu urteilen, fand somit die Osteoklastogenese auf den Struvit-bildenden Zementen deutlicher und signifikant schneller statt als auf den anderen getesteten Zementen.

Es ist bekannt, dass zwei Isoformen von TRAP in menschlichem Serum vorkommen, TRAP 5a und TRAP 5b. Osteoklasten enthalten jedoch nur TRAP 5b. Anhand des Substrats pNPP fanden Hallen et al. heraus, dass bei einem pH-Wert von 6,1 TRAP 5b hochaktiv ist, während die Isoform 5a fast vollständig inaktiv bleibt [93]. Janckila et al. berichteten ebenfalls in einer Studie, dass das Substrat pNPP bevorzugt von der Isoform 5b bei einem pH-Wert von 6,1 hydrolysiert wird. Darüber hinaus zeigten sie, dass das Substrat N-ASBI-P eine höhere Selektivität für TRAP 5b aufweisen kann. In Kombination mit Heparin als Isoform-5a-Inhibitor wurde die Spezifität für TRAP 5b weiter erhöht [219]. In der vorliegenden Arbeit wurde die TRAP-Aktivität mit dem Substrat pNPP bei einem pH-Wert von 6,1 und die TRAP-Färbung mit N-ASBI-P analysiert. Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse von TRAP-Färbung und TRAP-Aktivität kann davon ausgegangen werden, dass die osteoklastische TRAP-Isoform 5b erfasst wurde.

Die genaue Bedeutung bzw. die Aussage der TRAP-Aktivität (zytochemische Färbung und/oder photometrische Aktivitätsmessung) ist in der Literatur umstritten: Einerseits wird postuliert, dass die TRAP-Aktivität ein guter Parameter für die osteoklastische Resorption ist [51, 217], andererseits wird die TRAP-Aktivität lediglich als Marker für die Anzahl der Osteoklasten betrachtet [216, 220]. Falls die TRAP-Aktivität tatsächlich ein Mass für die osteoklastische Resorption sein sollte, dann dürfte es auf nicht resorbierbaren Materialien keine TRAP-Aktivität geben. Allerdings zeigten beispielsweise Alatalo et al. in ihrer Studie, dass zwar den Osteoklasten kein Resorptionsmaterial (Kunststoff) zur Verfügung stand, sie aber dennoch die (extrazelluläre) TRAP-Aktivität messen konnten. Dabei korrelierte die TRAP-Aktivität signifikant mit der Anzahl der Osteoklasten [218]. Es liegt daher auf der Hand, dass das Enzym TRAP 5b die Anzahl der Osteoklasten und nicht die Resorption widerspiegelt, wie bereits in vielen Arbeiten [51, 133, 220] diskutiert.

Des Weiteren wurde berichtet, dass sowohl Makrophagen als auch Osteoklastenvorläufer ebenfalls TRAP exprimieren können [47, 221-224]: So haben beispielsweise Gellenske et al. [222] und Nakamura et al. [223] gezeigt, dass nicht nur polynukleäre Riesenzellen, sondern auch mononukleäre Osteoklastenvorläufer auf PS und CPCs mit runder oder spindelförmiger Morphologie TRAP-positiv sein können. Da in der vorliegenden

Arbeit die für Osteoklasten typische Zellgrösse von 50–100 μm [66, 133] auf keinem magnesiumhaltigen Zement und TCP-P trotz TRAP-Positivität nachgewiesen werden konnte, wie sie auf PS und TCP beobachtet wurden (Abbildung 14 und 16), besteht die Vermutung, dass es sich um Makrophagen oder mononukleäre Osteoklastenvorläufer gehandelt haben könnte (weitere Erläuterungen im Kapitel 5.3.2).

Für zukünftige Untersuchungen ist es ratsam, die Kultivierungs-Wells und die Kultivierungs-Scaffolds getrennt auf die TRAP-Aktivität und die -Färbung zu untersuchen, um festzustellen, welcher Anteil der Aktivität von den Zellen auf den Scaffolds und welcher von den Zellen auf den Kultivierungs-Wells ausgeht, wie bereits in Kapitel 5.2.2 für die DNA-Konzentration beschrieben und bei Spender 3 für die TRAP-Volumenaktivität durchgeführt wurde (siehe Kapitel 3.2.9 und die Abbildungen 31 und 33 im Anhang). Darüber hinaus ist zu erwägen, das Substrat N-ASBI-P nach dem Protokoll von Janckila et al. und ggf. in Kombination mit Heparin für die Aktivitätsanalysen zu verwenden [219], um die Spezifität des Enzyms TRAP 5b weiter zu erhöhen.

5.2.4 Indirekte Zellkultivierung auf Polystyrol (Fluoreszenzmarkierung)

Die Fluoreszenzmarkierung des Aktingerüsts und die Analyse der Aktinringe ist eine wichtige Methode, um eine echte Osteoklastenbildung nachzuweisen [47]. Denn die Bildung einer Versiegelungszone (*Sealing zone*) zur Aufrechterhaltung eines extrazellulären Mikromillieus durch die Adhäsionsstrukturen ist eine entscheidende Voraussetzung für die osteoklastische Resorption: So beschrieben Burgess et al., dass die Aktinringbildung der Knochenresorption vorausgeht [225]. Nach Geblinger et al. ist eine gut definierte und über die Zeit stabil aufrechterhaltene Resorptionslakune eine Schlüsselvoraussetzung für die Resorption [226]. Darüber hinaus haben zahlreiche Studien eine klare Korrelation zwischen Aktinringbildung und resorbierenden Osteoklasten gezeigt [225, 227-230]. Im Gegensatz dazu konnten Nakamura et al. nachweisen, dass die Knochenresorption beeinträchtigt war, wenn die Funktion des Integrins $\alpha_5\beta_3$ als Bestandteil der Adhäsionsstruktur aufgehoben war [231]. Des Weiteren kann die Polynuklearität Hinweise auf Osteoklasten liefern, wobei 3 bis 20 Kerne pro Zelle in normalen menschlichen Osteoklasten vorkommen [47, 66, 79].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fluoreszenzmarkierung der Zellen sowohl mit einem direkten Kontakttest (siehe Kapitel 5.2.5) als auch mit einem indirekten Zementkon-

takt durchgeführt. Dazu wurden die hM in Wells mit Scaffolds darin ausgesät und kultiviert. An den Tagen 10, 16 und 22 wurden die Zellen auf den Scaffolds und auf den Kultivierungs-Wells (PS) gleichzeitig mit den Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Zur Auswertung der indirekten Zellkultivierung wurden die Scaffolds in frische Wells überführt und die Kultivierungs-Wells (PS) separat untersucht. Dadurch wurden adhärente Zellen am Boden der Wellplatten (PS) sichtbar, die von Scaffolds bedeckt und unbedeckt waren (Abbildung 21). Diese Zellen standen also nicht in direktem Kontakt mit den Scaffolds, sondern ihr Zellverhalten wurde durch die gelösten Zementkomponenten im Kulturmedium beeinflusst. Nach bestem Wissen wurden die Osteoklastenkulturen zum ersten Mal in dieser Form des indirekten Kontakttests untersucht. Für gewöhnlich werden die azellulären Proben (z. B. Zemente, Metalle) zunächst für eine bestimmte Zeit in frischem Kulturmedium ausgelagert. Anschließend wird der gewonnene Extrakt entweder unverdünnt oder verdünnt den Zellkulturen zugegeben, die auf einem anderen Material (z. B. PS, Dentinscheiben) angesetzt sind [12, 52, 146, 205, 214].

In der vorliegenden Arbeit haben sich die Zellen auf den Kultivierungs-Wells (PS) in vier Kategorien einordnen lassen (siehe Kapitel 3.2.10). Obwohl die Zellen asynchron differenzierten, sodass oft verschiedene Differenzierungsstadien innerhalb einer Untersuchungsstelle zu beobachten waren, lässt sich mit dem vorgestellten Punktesystem das Differenzierungs- und damit das Resorptionspotenzial der Zellen an einem Untersuchungstag oder über alle Versuchstage vereinfacht vergleichen. Dieser Vergleich soll als grobe Orientierung dienen. Demnach ergab sich für die gesamten Versuchstage die folgende Reihenfolge (erreichte Punkte in Klammern nach Tabelle 4.1):

PS (24) > CM2,25-P (15) ≥ TMP-P (15) > TCP-P (13) ≥ CM2,75-P (13) > CM2,25-D (11) > TCP (9) ≥ TMP-D (9) > CM2,75-D (8).

Für Tag 22 galt die folgende Reihenfolge nach Tabelle 4.1:

PS (8) ≥ TCP-P (8) > CM2,25-P (5) ≥ TMP-P (5) ≥ CM2,75-P (5) > CM2,25-D (4) > TCP (3) ≥ TMP-D (3) > CM2,75-D (2).

Bei Punktgleichheit wurde die Probe mit dem höheren Einzelwert bei Betrachtung aller Versuchstage vorgezogen.

Beim Vergleich der Probenreihenfolge für alle Versuchstage und für Tag 22 wurde ein Unterschied in der Reihenfolge bei den drei Phasen TCP-P, CM2,25-P und TMP-P festgestellt. Der Grund dafür war, dass bei den Proben CM2,25-P und TMP-P bereits von

Tag 10 bis Tag 22 Riesenzellen mit mindestens 1–2 Nuklei vorhanden waren. Infolgedessen erreichten diese Phasen eine hohe Summe (15) für die gesamten Versuchstage. Bei der Referenz TCP-P wurden bis zum Tag 16 nur kleine mononukleäre Zellen beobachtet, die sich bis zum Tag 22 zu polynukleären Riesenzellen mit breiten Aktinringen differenzierten. Diese Zellen ähnelten der PS-Referenz und hatten somit an Tag 22 die gleichen Punkte (8) erreicht. Insgesamt zeigten diese Resultate, dass bei gleichen Oberflächenbedingungen die Newberyit-bildenden Zemente den Struvit-bildenden Zementen in Bezug auf die Osteoklastendifferenzierung überlegen waren und dass bei den magnesiumhaltigen Zementen der Zelltyp 2 dominierte (Riesenzellen mit einem Durchmesser von mehr als 50 μm , mit 1–2 Nuklei und mit runder oder spindelförmiger Morphologie). Zudem war die Osteoklastendifferenzierung bei allen Zementproben im Vergleich zu der PS-Referenz inhibiert. Ein möglicher Grund dafür könnten die freigesetzten Ionen sein (nähere Einzelheiten dazu siehe Kapitel 5.5.2).

Der Vorteil des indirekten Kontakttests ist, dass die Zellen die gleichen Oberflächenbedingungen haben und die zellulären Auswirkungen auf die Substanzen im Kulturmedium besser beurteilt werden können. Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch komplex, da die Zellen in unmittelbarer Nähe des Zements höheren Ionenkonzentrationen ausgesetzt sind als die gemessenen Durchschnittskonzentrationen in Kulturmedien. Außerdem ist die Übertragung auf das In-vivo-Verhalten schwierig, da die kontinuierliche Flüssigkeitszirkulation im Körper die unphysiologischen Ionenschwankungen kompensiert [12].

In dieser Arbeit wurde das zellhaltige Aussaatmedium in die Kultivierungs-Wells mit Scaffolds gegeben. Somit war nicht sichergestellt, dass eine ausreichende Anzahl an Monozyten auch unter die Scaffolds gelangte, wie es bei der Probe CM2,75-D der Fall sein könnte (siehe Abbildung 21 CM2,75-D am Tag 22). Um dieses Problem zu vermeiden, kann z. B. für zukünftige Untersuchungen ein bestimmtes Teilvolumen des Aussaatmediums (evtl. angepasst an die gewünschte Zelldichte für PS) in die leeren Wells vorgelegt werden und eine bestimmte Zeit abgewartet werden, bis sich die Zellen am Boden der Wells abgesetzt haben. Anschließend können die Scaffolds zugegeben und die Wells bis zum gewünschten Endvolumen mit dem restlichen Aussaatmedium aufgefüllt werden.

5.2.5 Direkte Zellkultivierung (Fluoreszenzmarkierung und REM)

In der vorliegenden Arbeit wurden bei der Fluoreszenzmarkierung von Zellen in direktem Zementkontakt keine offensichtlichen Osteoklasten mit einer Zellgröße von 50–100 μm nachgewiesen, die einen eindeutigen Aktinring bildeten und mindestens drei Nuklei enthielten. Stattdessen wurden vorwiegend auf den Struvit-bildenden Zementen vereinzelt Zellen beobachtet, die Aktin(ring)konturen von etwa 25 μm Größe aufwiesen und einen Nukleus einschlossen. Auf den Newberyit-bildenden Zementen und auf den Referenzen TCP und TCP-P waren die Aktinkonturen oft undefiniert und unscharf ausgebildet. Dies hatte einerseits zur Folge, dass die Zellgrößen nicht eindeutig bestimmbar waren und andererseits konnte nicht zugeordnet werden, ob die gruppierten Nuklei zu einer Zelle oder zu akkumulierten Zellen gehörten (Abbildung 20).

Beim Vergleich der fluoreszenzmarkierten Zellen auf den Kultivierungs-Wells (PS) und den Scaffolds zeigten sich konträre Tendenzen: Während auf den Struvit-bildenden Zementen über den Untersuchungszeitraum deutlich mehr Zellen identifiziert werden konnten (Abbildung 20), waren auf den Kultivierungs-Wells dieser Phasen weniger und deutlich schlechter differenzierte Zellen zu erkennen (Abbildung 21). Bei den Newberyit-bildenden Zementen war tendenziell der gegenteilige Effekt zu beobachten: Auf den Scaffolds wurden deutlich weniger Zellen beobachtet, während auf den Kultivierungs-Wells häufig polynukleäre Riesenzellen zu finden waren. Besonders deutlich war dieser Unterschied bei den Proben CM2,75-D und CM2,75-P. Dieses konträre Verhalten ist nicht ganz nachvollziehbar, könnte aber die fehlende Signifikanz der DNA-Konzentration zwischen den magnesiumhaltigen Präparaten trotz der unterschiedlichen Zellzahlen auf den Zementen erklären (vgl. Abbildung 16 und 21 mit Abbildung 17). Somit kann durch diese Kompensation davon ausgegangen werden, dass die untersuchten Zemente während des 22-tägigen Zeitraums keine toxischen Auswirkungen auf die untersuchten Zellen hatten, was ebenfalls für eine gute Zellviabilität sprechen kann.

Beim Vergleich der Aktinfluoreszenz (Abbildung 20) mit der TRAP-Färbung (Abbildung 16) und der TRAP-Aktivität (Abbildung 18 und 19) ist zu erkennen, dass auf den Zementen die TRAP-positiven Zellen weitestgehend mit der Dichte der fluoreszenzmarkierten Zellen übereinstimmten. Dies lässt die folgenden Schlussfolgerungen zu: Die TRAP-Aktivität ging hauptsächlich von den Zellen auf den Scaffolds und weniger von den Zellen auf den Kultivierungs-Wells (PS) aus, was auch durch die Teilergebnisse von Spender 3 bestätigt wurde (vgl. Abbildung 31 und 33). Die Reihenfolge der Zelldichten auf den Zementen könnte wie folgt gewesen sein:

CM2,75-D \geq TCP \geq CM2,25-D \geq TMP-D \geq CM2,25-P \geq TCP-P \geq TMP-P \geq CM2,75-P. Des Weiteren konnte sowohl durch Aktin-Fluoreszenz als auch durch TRAP-Färbung auf den Struvit-bildenden Zementen eine Zellgröße von etwa 25 μm bestätigt werden.

Mit Hilfe der REM-Aufnahmen konnten auf allen magnesiumhaltigen Zementen Zellen mit einer Größe von bis zu ca. 30 μm (Abbildung 22t–y) und auf TCP ca. 50 μm identifiziert werden (Abbildung 22r). Der teilweise enge Zellkontakt mit den Zementoberflächen CM2,25-D und TMP-D manifestierte sich in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 20) als 25 μm große und gut definierte Aktin(ring)konturen. Damit stimmten die REM-Ergebnisse weitestgehend mit der TRAP-Färbung und der Fluoreszenzmarkierung überein.

5.3 Resorptionsnachweise

5.3.1 Resorptionslakunen (REM)

Das Vorliegen von Resorptionslakunen ist im Allgemeinen ein wichtiger Hinweis auf eine osteoklastenvermittelte Resorption. So wurden nach der Zellyse auf der Oberfläche der Probe TCP Tendenzen zu spikeartigen Strukturen beobachtet, die auf Proben ohne Zellkontakt nicht identifiziert werden konnten (vgl. Abbildung 22i und ²i mit a) und typisch für resorbierte β -TCP-Oberflächen zu sein scheinen [23, 90, 232]: So stellten beispielsweise Gallo et al. dichte β -TCP-Proben her und polierten deren Oberflächen. Sowohl durch azelluläres Oberflächenätzen mit einer sauren Lösung (HCl und NaHCO_3 ; pH 4,4) als auch durch osteoklastenvermittelte Resorption (unter Verwendung von Knochenmarkzellen von C57Bl/6J-Mäusen) beobachteten sie intrakristalline spikeartige Strukturen, die entlang der c-Achse der Kristalle ausgerichtet waren [90]. Angesichts dieses für β -TCP typischen Resorptionsmerkmals und der gemessenen Zellgrößen von ca. 50 μm kann eine osteoklastenvermittelte Resorption der Referenz TCP angenommen werden.

Im Gegensatz dazu konnte auf keinem magnesiumhaltigen Zement eine eindeutige Resorptionslakune nachgewiesen werden (Abbildung 22k–p). Auf TCP-P wurden auf glatten Oberflächen mögliche Resorptionslakunen beobachtet, die aber eher kleinen Defekten glichen (Abbildung 22²j). Der Grund dafür war offensichtlich die fehlende Osteoklastogenese auf den magnesiumhaltigen Zementen und TCP-P. Darüber hinaus beschrieben Bernhardt et al., dass es aufgrund der rauen Oberfläche auf Bushit-bildenden CPCs nicht möglich ist, zwischen Resorptionslakunen und strukturellen Unebenheiten zu unterscheiden [214]. Nach Zhang et al. muss die Oberflächenrauheit idealerweise $R_a < 1 \mu\text{m}$ betragen, um zwischen den ursprünglichen Materialunebenheiten und den

neu hinzugekommenen Resorptionslakunen zu unterscheiden [207]. Ohne die Oberflächenrauheiten bestimmt zu haben, lässt sich jedoch abschätzen, dass die R_a -Werte auf den magnesiumhaltigen Zementen und TCP-P deutlich über 1 μm lag. Somit wäre die Analyse der Resorptionslakunen auch bei bestehender osteoklastischer Resorption mit REM erschwert. Der Einfluss der Oberflächeneigenschaften auf die Osteoklastenbildung und -funktion wird im Kapitel 5.5.1 ausführlicher diskutiert.

5.3.2 Zellvermittelte Ionenfreisetzung (ICP-MS)

Die Bestimmung der freigesetzten Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-}) im Kulturmedium wird allgemein als quantitativer Marker für die zR in Anwesenheit von Osteoklasten akzeptiert. Voraussetzung hierfür ist, dass die bR höher ist als die azelluläre Ionenfreisetzung aufgrund der cD [30, 32, 233-235].

Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie als sehr sensitiv gilt (insbesondere ICP-MS) [236], die Durchführung vergleichsweise unkompliziert und die Quantifizierung unabhängig von der notwendigen Mindestrauheit (R_a) von 1 μm ist [207]. Ein mögliches Problem dabei ist, dass die erhöhte zellvermittelte Ionenfreisetzung durch verstärkte Präzipitation kompensiert werden könnte [51]. Dadurch wäre die zelluläre Leistung in verminderter Form reproduziert.

Wie die Ergebnisse in den Abbildungen 23b und 24 zeigen, wurde bei den zellvermittelten Ca^{2+} -Freisetzungen unter allen getesteten Zementen lediglich auf der Probe TCP eine zR gemessen, die im Nettoresultat zum Abbau des Calciums führte. Somit sind die Ergebnisse der Referenz TCP konsistent mit der TRAP-Färbung (50 μm große TRAP-positive Zellen) und den intrakristallinen spikeartigen Resorptionslakunen als Nachweis der osteoklastenvermittelten Resorption [90].

Auf allen magnesiumhaltigen Zementen wurde ebenfalls an fast allen Tagen eine signifikante zR von Calcium nachgewiesen (Ausnahme auf CM2,75-P am Tag 0). Mit zunehmendem Anteil an Struvit bzw. Newberyit in den Zementen nahmen die zellvermittelten Ca^{2+} -Freisetzungen zu, wobei die Werte auf Newberyit-bildenden Zementen stets höher waren als auf den Struvit-bildenden Zementen. Jedoch relativiert das Nettoresultat diesen Sachverhalt, da die Ca^{2+} -Konzentrationen der bR unter dem ursprünglichen Kulturmediumspiegel lagen, sodass auf allen magnesiumhaltigen Zementen im Laufe der Zeit eine Calciumadsorption stattfand (Abbildung 23d-i und 24). Eine Korrelation zwischen erhöhter TRAP-Aktivität und vermehrter zR der Zemente konnte nicht bestätigt werden.

(vgl. Abbildung 23d–i, 24 mit 15, 16 und 18, 19). Im Gegenteil, die Zellen auf den Newberyit-bildenden Zementen setzten mehr Ca^{2+} frei (Abbildung 23e, g, i und 24) als die Zellen auf den Struvit-bildenden Zementen (Abbildung 23d, f, h und 24), obwohl die TRAP-Färbung und -Aktivität auf den Struvit-bildenden Zementen deutlich höher waren als auf den Newberyit-bildenden Zementen (Abbildung 15, 16, 18, 19). Somit untermauern diese Ergebnisse die fehlende Korrelation zwischen der Anzahl der TRAP-aktiven Zellen und der zR, wie bereits in Kapitel 5.2.3 ausgeführt.

Auf TCP-P wurde zwar zR gemessen, die jedoch nicht signifikant war. Insgesamt wurden sowohl Calcium als auch Magnesium auf TCP-P adsorbiert (Abbildung 23c, l und 24). Auf PS wäre eine Ionenkonzentration zu erwarten, die dem Niveau des Kulturmediums entspricht. Es wurde jedoch eine scheinbare zR von Ca^{2+} , Mg^{2+} und PO_4^{3-} beobachtet, da während der Zellkultivierung mehr Ionen an das Kulturmedium abgegeben wurden als auf den azellulären Kontrollen (Abbildung 23a, j, s und 24).

Der Mechanismus hinter der zellvermittelten Ca^{2+} -Freisetzung, die bereits ab Tag 0 gemessen wurde, könnte folgendermaßen aussehen:

Bereits am Tag 0/0, Tag 0/1 sowie Tag 0/2 könnte es beim Pipettieren des frischen Kulturmediums auf die Probenoberflächen (PS und Scaffolds) zu einer Präzipitation von Calcium-(Magnesium-)Phosphat gekommen sein und damit zu einer Abnahme der Ionenkonzentration, wie bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben. Da bis zum Tag 0/2 keine zR zu erwarten wäre, konnte innerhalb dieser zwei Tage und der dreifachen Ionenzufuhr eine fortschreitende Akkumulation von Calcium-(Magnesium-)Phosphat auf den Oberflächen einsetzen. Während bei der azellulären Scaffoldauslagerung die Präzipitation weiter fortschritt und die Ca^{2+} -Konzentration niedrig blieb, differenzierten sich in den Zellkulturen die Monozyten nach der M-CSF-Gabe zu Makrophagen. Diese könnten das präzipitierte Calcium-(Magnesium-)Phosphat endozytieren und bis Tag 0 langsam abbauen und vermehrt Ionen in das Kulturmedium freisetzen (für Details siehe unten). Dadurch könnte die erhöhte Ca^{2+} -Freisetzung insbesondere bei den ursprünglich calciumfreien Proben PS und TMPs bereits am Tag 0 erklärt werden. Da die fortschreitende Präzipitation offensichtlich die zR überwiegte, lagen die Ca^{2+} -Konzentrationen am Tag 0 bei allen Zementen unter dem ursprünglichen Kulturmediumspiegel (Abbildung 23b–i).

Ab Tag 0 wurde dem Kulturmedium zusätzlich zu M-CSF auch RANKL zugesetzt. Dies bewirkte eine fortschreitende Osteoklasten-/Makrophagen-Differenzierung und verstärkte die zR, die sich in einer progressiv gesteigerten Ca^{2+} -Freisetzung manifestierte,

wie sie in fast allen Proben vom Tag 0 bis Tag 6 beobachtet wurde (Abbildung 23a, b, e–i). Nach einer gewissen Zeit stellte sich weitestgehend ein Gleichgewicht zwischen der zR und der Präzipitation ein, sodass die Differenz der Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen den entsprechenden azellulären Scaffoldauslagerungen und den Zellkulturen ab Tag 6 weitgehend konstant blieb (roter Bereich in der Abbildung 23b, d–i). Dies kann auch als ein Ausdruck der bestehenden Zellviabilität gesehen werden, denn im Falle einer toxischen Wirkung der in den Kulturmedien enthaltenen Substanzen würden u. a. die resorbierenden Zellen in die Apoptose gehen und die zR würde ausbleiben.

Da jedoch die Anzahl der Zellen auf den Newberyit- und Brushit-bildenden Zementen im Vergleich zu den Struvit-bildenden Zementen, TCP- und PS-Proben reduziert war (vgl. Abbildung 20 mit 15 und 16), musste ein erheblicher Anteil der zellulären Ca^{2+} -Freisetzung von den Zellen auf den Kultivierungs-Wells stammen: So war sowohl für die magnesiumhaltigen Zemente als auch für TCP-P eine Korrelation zwischen der zellulären Ca^{2+} -Freisetzung und den osteoklastischen Differenzierungsstadien der fluoreszenzmarkierten Zellen auf den Kultivierungs-Wells zu erkennen (vgl. Abbildung 21 bzw. Tabelle 4.1 mit Abbildung 24).

Der Abbau des ausgefällten Calcium-(Magnesium-)Phosphats erfolgte also möglicherweise einerseits durch die osteoklastenähnlichen Zellen auf den Kultivierungs-Wells (vor allem auf PS sowie auf Newberyit- und Brushit-bildenden Zementen) und andererseits durch die kleineren mononukleären Zellen auf den Scaffolds (vor allem auf Struvit-bildenden Zementen), bei denen es sich um Präosteoklasten oder Makrophagen handeln könnte. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass Makrophagen am Resorptionsprozess von KEMs beteiligt sein können [156, 203, 237, 238]:

So wurde beispielsweise beschrieben, dass der Implantatzerfall zur Bildung von kleinen Zementpartikeln führt, die bei einer Größe von $< 10 \mu\text{m}$ von mononukleären Makrophagen phagozytiert werden können. Bei Partikelgrößen zwischen $10 \mu\text{m}$ und $100 \mu\text{m}$ fusionieren die Makrophagen zu *Fremdkörperriesenzellen* und schließen diese Partikel zur Resorption ein [239, 240].

Xia et al. isolierten Makrophagen aus C57BL/6J-Mäusen und kultivierten sie auf zwei HA-Varianten und auf einer TCP-Keramik. Als Kontrolle lagerten sie die Keramiken in Kulturmedium ohne Zellen aus. Bei der Analyse der Ionenkonzentration (Ca^{2+} , P-Zusammensetzung) fanden sie für alle drei Zemente einen signifikanten Anstieg der Werte in den Makrophagenkulturen im Vergleich zur Kontrollgruppe. REM-Aufnahmen zeigten

8–18 µm große Makrophagen, die 1,2–8 µm große Partikel phagozytierten. Pro Makrophage wurden 1–5 endozytäre Partikel nachgewiesen. Da in toten Zellen nicht abgebaute Zementpartikel gefunden wurden, vermuteten sie, dass bei einer großen Menge an phagozytierten Partikeln die Makrophagen nicht in der Lage waren, diese abzubauen und an Energieerschöpfung zugrunde gingen. Des Weiteren beobachteten sie, dass bei festgebundenen Partikeln die Makrophagen imstande waren, die Oberfläche des Materials zu umschließen, wodurch eine extrazelluläre Abdichtung für die Resorption entstand, die der osteoklastischen Resorptionslakunen ähnelte [238].

Theiss et al. implantierten einen zweiphasigen Zement (Brushit und β -TCP) in präparierte Knochendefekte von Schafen und beobachteten die Resorption nach 2, 4, 6 und 8 Wochen. In den 2-Wochen-Proben zeigte die Resorptionszone einen zellreichen Bereich, der Makrophagen mit phagozytierten Zementpartikeln enthielt. Während diese mit Zementpartikeln angereicherten Makrophagen in allen Beobachtungszeiträumen zu finden waren, wurden osteoklastenähnliche Zellen erst nach 8 Wochen beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt begannen die Osteoklasten, den Geflechtknochen in Lamellenknochen umzubauen. Die Autoren schlossen daraus, dass der Zementabbau zum einen durch chemische Auflösung sowie Zementzerfall und zum anderen durch Partikelbildung sowie Phagozytose durch Makrophagen erfolgen musste [237].

Insgesamt untermauern diese Studien die Annahme, dass in der vorliegenden Arbeit die Monozyten auf den magnesiumhaltigen Zementen und TCP-P nicht zu Osteoklasten differenzierten, sondern sich zu mononukleären Makrophagen bildeten, die die calciumhaltigen Zemente bzw. Präzipitate durch Phagozytose abbauten. Die genaue Rolle der Makrophagen und ihre Interaktionen mit Biomaterialien sind jedoch noch nicht vollständig geklärt und erfordern weitere Untersuchungen [240].

Bei der Analyse der Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Konzentrationen konnte dagegen bei keinem Zement (Ausnahme CM2,25-P am Tag 6 für Mg^{2+} und TCP am Tag 6 für PO_4^{3-}) eine signifikante zR von Mg^{2+} und PO_4^{3-} festgestellt werden (Abbildung 23k–r, t–ß). Somit erfolgte die Freisetzung von Mg^{2+} und PO_4^{3-} fast ausschließlich durch die cD (Weiteres im Kapitel 5.1.3).

Ein scheinbar paradoxes Phänomen wurde insbesondere bei den Proben CM2,25-D und CM2,75-D für Mg^{2+} und bei den Newberyit-bildenden Zementen für PO_4^{3-} beobachtet: Statt wie erwartet eine erhöhte Ionenfreisetzung bei den zellbesiedelten Scaffolds zu messen, fand auf diesen Zementen eine Inhibition der Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Freisetzung im

Vergleich zur azellulären Scaffoldauslagerung statt (Abbildung 23m–r, c–β). Ein möglicher Grund für diesen scheinbaren Ionenverlust bei den Zellkulturen könnte ein Messfehler sein, da die signifikanten Unterschiede zur azellulären Scaffoldauslagerung meist nur an einzelnen Tagen festgestellt wurden (Abbildung 23m, w, y, β). So könnten beispielsweise kleine Zementpartikel im Kulturmedium der azellulären Scaffoldauslagerung suspendiert gewesen sein und eine scheinbar höhere Ionenkonzentration ergeben haben, obwohl die Kulturmedien vor der ICP-MS-Analyse gründlich zentrifugiert wurden. Ein weiterer Grund könnte eine flächige Bedeckung der Scaffoldoberfläche mit Zellen sein, sodass die Zellen die cD verhindern. Es ist auch denkbar, dass die Zellen/Makrophagen ein MgP-angereichertes Präzipitat phagozytiert und akkumuliert haben, wie oben erläutert. Anschließend könnte es zu einer erneuten Präzipitation an den Zementoberflächen gekommen sein, was zu einer Abnahme der Ionenkonzentration im Kulturmedium führte.

Die Ursache dafür, dass Ca^{2+} durch zR freigesetzt wurde, Mg^{2+} und PO_4^{3-} dagegen nicht, könnte folgendermaßen erklärt werden: Die calciumhaltigen Präzipitate auf den Zementen waren vermutlich schwerlöslich und blieben über einen längeren Zeitraum bestehen, sodass die Zellen eine dauerhafte Adhäsion aufrechterhalten konnten und somit die Präzipitate resorbierten. Im Gegensatz dazu konnten die Zellen auf den direkten Brushit-, Struvit- und Newberyit-Oberflächen vermutlich keine dauerhafte Adhäsion ausbilden. Ein Grund dafür könnte die hohe Löslichkeit dieser Phasen sein, sodass sie sich unter den Zellen zu schnell auflösten. Dies könnte die undefinierten Aktinkonturen sowie die geringe Zellzahl insbesondere auf Newberyit-bildenden Zementen und TCP-P erklären (Abbildung 20), da die nicht oder schlecht adhärenen Zellen beim Mediumwechsel entfernt wurden. Es ist auch denkbar, dass die magnesiumhaltigen Phasen nicht von Osteoklasten resorbiert werden konnten, da diese physiologischerweise HA in Kombination mit Kollagenfibrillen resorbieren. Die Adhäsion erreichen die Osteoklasten mit ihrem $\alpha_5\beta_3$ -Integrin an RGD-haltige Proteine (siehe Kapitel 2.1.1 und Kapitel 2.1.2.4). Fehlen diese Komponente, konnten die Adhäsionsstrukturen möglicherweise keine oder keine ausreichende Funktionalität erreichen.

Für weitere Versuche ist es ratsam, die Scaffolds vor und nach den zellulären bzw. azellulären Versuchen genau zu wiegen, um die bR und die Adsorption besser mit den Ionenkonzentrationen vergleichen zu können und so eine bessere Prognose für die vollständige Resorption der Scaffolds zu erhalten. Die Scaffolds sollten zu Beginn der Zellkultivierung (z. B. am Tag 0/3) in frische Wells überführt werden, um den Einfluss der

am PS haftenden Zellen auszuschließen und ihre Resorption separat zu beurteilen. Um den Einfluss von Makrophagen besser zu verstehen, könnte zum Beispiel die Resorption von CMPCs und MPCs mit Makrophagen untersucht und mit Osteoklastenkulturen verglichen werden.

5.4 Auswahl vergleichbarer Studien

Die Anzahl der Studien zum osteoklastischen Verhalten auf MPCs und CMPCs ist bislang sehr limitiert. Darüber hinaus gibt es kein einheitliches System oder eine ISO-Norm für die Untersuchung von Osteoklasten und deren Resorption von Biomaterialien. Daher ist es oft schwierig, eine quantitative Vergleichsanalyse der verschiedenen Osteoklastenmodelle und osteoklastenvermittelten Resorptionen durchzuführen [3].

Großardt et al. [30] untersuchten die cD und zR von CDHA-, Monetit-, Brushit- und Struvit-bildenden Zementen, die mit manuell angemischtem Zementpasten und Silikonformen hergestellt wurden. Diese Proben entsprechen in etwa den Phasen TCP-P (Brushit) und TMP-D (Struvit) der vorliegenden Arbeit, wobei die Autoren eine Produktreinheit von > 95 Gew.-% angaben.

Für die Bestimmung der zR und der cD wurden diese Zemente sowohl azellulär in Kulturmedium ausgelagert als auch mit Osteoklasten der Zelllinie RAW 264.7 kultiviert. Sie fanden heraus, dass die zR und die cD des Struvit-bildenden Zements im Vergleich zum Brushit-Zement etwa dreimal so hoch war. Bei der Berechnung der zR zeigte der Struvit-Zement ebenfalls die höchsten Werte, wobei die cD bei dieser Probe dominierte. Sie schätzten die bR-Raten (zR + cD) für alle Proben unter Verwendung der kumulativen Ionenfreisetzung in der folgenden Reihenfolge: Struvit > Brushit > Monetit > CDHA. Für den CDHA-, Brushit- und Monetitzement wurde für diese Einschätzung die Ca^{2+} -Konzentration verwendet. Für Struvit wurde lediglich die Mg^{2+} -Konzentration berücksichtigt und diese für die Bestimmung der Löslichkeit mit den Ca^{2+} gleichgesetzt. Die Ca^{2+} -Konzentration im Kulturmedium für die Struvitproben wurde dabei nicht berücksichtigt [30]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, geben die CMPCs und MPCs kontinuierlich Mg^{2+} ab, während sie gleichzeitig Ca^{2+} adsorbieren. Da damit vermutlich eine Präzipitation eines weniger löslichen Calcium-(Magnesium-)Phosphats verbunden war, kann davon ausgegangen werden, dass dadurch die bR der Proben verzögert war.

An den Tagen 3, 10 und 16 wurde eine TRAP-Färbung (mittels N-ASBI-P) durchgeführt. Auf Glas, CDHA, Brushit und Monetit beobachteten sie bereits nach 3 Tagen TRAP-

positive Zellen, deren Anzahl am Tag 16 auf Brushit und Monetit abnahm. Auf der Stru-
vitoberfläche beobachteten sie jedoch zu keinem Zeitpunkt eine TRAP-Färbung. Im Ge-
gensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit TRAP-positive Zellen auf der Probe
TMP-D am Tag 10 nachgewiesen, die im Verlauf des Experiments zunahm. Sie ver-
muteten, dass während der Waschschriffe eine Desintegration und Entfernung der Zel-
len von der Oberfläche stattfand [30].

Mit Hilfe des REM wurden keine Zellen und keine Resorptionslakunen auf den Zementen
untersucht, sondern lediglich die Morphologie des Zements ohne Zellkontakt beschrie-
ben. Die Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse von Aktinringen und Polynuklearität wurde
lediglich auf Glasoberflächen durchgeführt. Obwohl mit dem osteoklastenspezifischen
Calcitonin-Rezeptor eine Osteoklastogenese nachgewiesen wurde [30], bedeutet dies
nicht zwangsläufig, dass eine osteoklastenvermittelte Resorption der Zemente stattge-
funden hat [12, 241]. Somit ist aufgrund des fehlenden Nachweises von Resorptions-
lakunen und Aktinringbildung an den Zementen kaum nachvollziehbar, ob die mittels
ICP-MS nachgewiesene zR der Struvit- und Brushit-Zemente tatsächlich durch Osteo-
klasten oder osteoklastenähnliche Zellen erfolgte.

Blum et al. [32] stimulierten ebenfalls RAW 264.7-Zellen zur osteoklastischen Differen-
zierung auf CDHA und Struvit-bildenden Zementen mit der allgemeinen Summenformel
 $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ (entspricht in etwa der Phase CM2,25-D), $\text{CaMg}_2(\text{PO}_4)_2$ und
 $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$, die mit Zementpasten und Silikonformen hergestellt wurden.

Sie untersuchten die TRAP-Färbung (mittels N-ASBI-P) und die TRAP-Aktivität (mittels
pNPP) bis Tag 21. Während am Tag 3 auf keiner Oberfläche TRAP-positive Zellen nach-
gewiesen werden konnten, beobachteten sie ab Tag 7 eine Zunahme der TRAP-Aktivität
und TRAP-Färbung. Auf $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$ (\cong CM2,25-D) beobachteten sie konsistente
TRAP-Färbung und -Aktivität vom Tag 10 bis 21. Auf $\text{CaMg}_2(\text{PO}_4)_2$ und $\text{Ca}_{1,5}\text{Mg}_{1,5}(\text{PO}_4)_2$
stellten sie vom Tag 10 bis 21 eine zunehmende TRAP-Färbung und konstante TRAP-
Aktivität fest. Auf dem Referenz CDHA wiesen sie sowohl TRAP-positive Zellen als auch
TRAP-Aktivität zwischen Tag 7 und 21 nach, allerdings in geringerem Ausmaß als auf
den Struvit-bildenden Zementen [32]. Somit stimmen diese Beobachtungen weitestge-
hend mit den hier vorgestellten Ergebnissen überein.

Bei der ICP-MS-Analyse fanden sie bei allen Struvit-bildenden Zementen eine etwa
10-fach höhere Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Freisetzung durch zR im Vergleich zur cD [32]. Diese
Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von Großardt et al. [30] und

den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Die Freisetzung von Ca^{2+} konnten sie nur in Anwesenheit von Zellen nachweisen. In der azellulären Scaffoldauslagerung im Kulturmedium sowie im Nettoresultat stellten sie eine Calciumadsorption bei allen Zementen fest, was mit den Beobachtungen des Calciumverhaltens bei CMPCs, TMP-P und TCP-P in dieser Arbeit übereinstimmt. Des Weiteren zeigten sie, dass die bR der Keramik mit zunehmendem Calciumgehalt anstieg [32]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

Bei der REM-Untersuchung konnten sie Riesenzellen identifizieren, die jedoch nicht in engem Kontakt mit der Zementoberfläche standen. Die Bildung von Resorptionslakunen wurde nicht beschrieben. Darüber hinaus beobachteten die Autoren undifferenzierte RAW 264.7-Zellen und ordneten deren Proliferationszustand den Makrophagen zu [32].

Trotz der detektierten Riesenzellen konnten sie mit der Fluoreszenzmikroskopie keine typischen Aktinringe, Zellfusionen oder Polynuklearität auf den Zementen nachweisen. Sie vermuteten, dass die Riesenzellen keine ausreichende Versiegelungszone bilden konnten, um den pH-Wert zu senken, weil die Zementoberflächen zu rau und uneben waren. Sie schrieben die zR den Makrophagen durch Phagozytose zu [32], wie es auch in dieser Arbeit vorgeschlagen wird.

Ostrowski et al. [42] synthetisierten β -TCP-Zemente sowie amorphe (aTMP) und kristalline Trimagnesiumphosphate (cTMP, Farringtonit) mittels eines Press- und Sinterverfahrens. Darauf kultivierten sie RAW 264.7 Zelllinie zur Osteoklastogenese. Als Kontrolle wurden diese Zellen auch auf Kunststoff kultiviert.

Das cD-Verhalten der Pellets wurde von Ostrowski et al. untersucht [42] und bereits im Kapitel 5.1.3 behandelt.

Mittels REM- und Fluoreszenzanalyse konnten sie vor allem am Tag 11 polynukleäre Riesenzellen mit ausgeprägten Aktrinringen auf der Kunststoffkontrolle feststellen, was auf eine Osteoklastenbildung hinweist. Auf β -TCP wurden ebenfalls polynukleäre Riesenzellen beobachtet, von denen einige über 50 μm groß waren. Eine Aktrinringkontur wurde auf β -TCP jedoch nicht beschrieben. Auf cTMP und aTMP konnte eine deutliche Proliferation und Akkumulation von Zellen beobachtet werden, jedoch gab es keine Hinweise auf eine Fusion zu polynukleären Riesenzellen [42].

Obwohl eine Analyse der zellvermittelten Ionenfreisetzung sowie der Resorptionslaken nicht stattfand, stimmen diese Ergebnisse weitestgehend mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit überein. Die Autoren vermuteten, dass die fehlende Osteoklastendifferenzierung auf die hohe Mg^{2+} -Konzentration von 3 mmol/L (cTMP) und 10 mmol/L (aTMP) zurückzuführen war [42]. Wie im Kapitel 5.5 ausgeführt, sind neben der Mg^{2+} -Konzentration auch weitere Ionen sowie die Oberflächentopographie wichtige Einflussfaktoren auf die Osteoklastenbildung und -funktion.

5.5 Auswahl von Einflussfaktoren auf die Osteoklastenbildung und -funktion

5.5.1 Oberflächentopographie

Die Oberflächentopographie ist einer der wichtigsten Faktoren, die die Zellfusion, die Osteoklastogenese, die Zelladhäsion, die Bildung einer Versiegelungszone und die Resorption durch ein extrazelluläres saures Mikromillieu beeinflussen [12, 242]. Allerdings wird der Einfluss z. B. der Rauheit bei Osteoklastenkulturen auf Biomaterialien nur selten berücksichtigt bzw. untersucht [3].

Die optimale Rauheit (R_a) für die Osteoklastenbildung und -funktion ist in der Literatur umstritten: So fanden Geblinger et al. heraus, dass Osteoklasten auf Calcitkristallen mit einer Rauigkeit (R_a) von 0,530 μm größere und stabilere Aktinringe (ca. 100 μm) bildeten als auf glatteren Oberflächen von 0,012 μm [242]. John et al. konnten dagegen zeigen, dass auf einer transparenten HA-Keramik mit einer Rauheit (R_a) von 0,08 μm die Bildung und Funktion von Osteoklasten (polynukleäre Riesenzellen mit einem Durchmesser von ca. 100 μm) nicht behindert war [243]. Davison et al. wiesen mit zwei unterschiedlichen Rauheiten ihrer β -TCP-Zemente nach, dass die glatteren Oberflächen ($R_a = 0,126 \mu\text{m}$) die Differenzierung, Viabilität und Resorption humaner Osteoklasten förderten, während die raueren Oberflächen ($R_a = 1,597 \mu\text{m}$) dies hemmten [224]. Im Vergleich dazu wurde für den natürlichen und unbehandelten Knochen eine Rauheit (R_a) von etwa 0,05–1 μm (muriner Humerus) [242] und für PS 0,064 μm [243] angegeben.

Es ist zu berücksichtigen, dass neben der Rauheit auch weitere Oberflächeneigenschaften eine wichtige Rolle bei der Osteoklastenbildung und -resorption spielen. Dies wird beispielsweise in den Studien von Nakamaru et al. [223] und Ciapetti et al. [12] deutlich:

So stellten Nakamura et al. Pellets aus HA, carbonisiertem HA (cHA) und β -TCP in einem Press- und Sinterverfahren her. Als Referenz dienten bovine Knochenscheiben und

PS. Für eine einheitliche Oberflächenrauheit polierten sie die Proben auf $R_a = 0,5\text{--}0,6\ \mu\text{m}$. Auf die Proben wurden humane PBMCs ausgesät und zur Osteoklastogenese stimuliert (mittels M-CSF und RANKL). Nach 15 bis 18 Tagen konnten sie auf Knochenscheiben, PS, HA und cHA Aktinringe nachweisen. Auf β -TCP war die Aktinringbildung jedoch undefiniert und vergleichbar mit den Aktinmrisen auf der Probe TCP in der Abbildung 20. Auf HA und PS waren die Aktinringe deutlich größer, aber auch dünner im Vergleich zu denen auf Knochen und cHA. Polynuklearität wurde auf allen Proben nachgewiesen. Deutliche Resorptionslakunen wurden allerdings nur auf cHA und Knochenscheiben beobachtet. Die Autoren schrieben die unterschiedlichen Ergebnisse der Oberflächenenergie und Löslichkeit der Proben zu [223].

Ciapetti et al. zeigten, dass bei äquivalenter HA-Chemie neben der Rauheit auch die spezifische Oberfläche (SSA) eine entscheidende Rolle bei der osteoklastenvermittelten Zementresorption spielt: So konnten sie nachweisen, dass sich auf glatter ($R_a = 0,6\ \mu\text{m}$) HA-Oberfläche mit geringer SSA ($0,54\ \text{m}^2/\text{g}$) große Aktinringe (ca. $100\ \mu\text{m}$) bildeten und die Zellen das Material resorbierten. Im Gegensatz dazu waren auf rauher ($R_a = 1,7\ \mu\text{m}$), plattenförmiger Kristalloberfläche mit einem SSA von $18\ \text{m}^2/\text{g}$ sowie auf „glatter“ ($R_a = 0,7\ \mu\text{m}$), nadelförmiger Kristalloberfläche mit einem SSA von $33\ \text{m}^2/\text{g}$ keine ausgeprägten Aktinringe zu erkennen. Diese Zellen führten nach 21 Tagen zu keiner deutlichen Resorption der Zemente, obwohl Osteoklasten nachgewiesen wurden [12].

Wie bereits erwähnt, ist davon auszugehen, dass die Rauheitswerte der in dieser Arbeit verwendeten Zemente weit über den Rauheiten der oben erwähnten Studien lagen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die rauen Oberflächen der magnesiumhaltigen Zemente und des TCP-P die notwendigen Zell-Zell-Verbindungen sowie die Zellfusion einschränkten und damit die Osteoklastogenese verhinderten [12]. Darüber hinaus verhinderten die plattenartigen Mikrostrukturen, wie sie vor allem auf TCP-P beobachtet wurden, möglicherweise eine stabile Aktinringbildung bzw. Versiegelungszone. Demzufolge wäre vermutlich trotz einer möglichen Osteoklastendifferenzierung kein extrazelluläres saures Mikromillieu zustande gekommen, das eine Voraussetzung für die osteoklastenvermittelte Resorption ist.

Insgesamt ist es wichtig, die einzelnen Parameter, die das Osteoklastenverhalten beeinflussen, eingehend zu untersuchen [242] und für das Design von KEMs einzubeziehen. Für zukünftige Untersuchungen ist es daher ratsam, zumindest die Oberflächenrauheiten der Zemente zu bestimmen und diese ggf. für die Knochenzellen zu optimieren. Als

Positivkontrollen für die osteoklastenvermittelten Resorptionen sind glatte Knochen-scheiben [223] und/oder glatte Dentinscheiben [214] besser geeignet, da Aktinringbil-dung und Resorptionslakunen auf diesen natürlichen Materialien genauer nachweisbar sind.

5.5.2 Ionenkonzentrationen im Kulturmedium

Die Ionenkonzentrationen in der Zellumgebung, wie Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} und H_3O^+ , spielen eine wichtige Rolle bei dem Differenzierungs- und Funktionsverhalten der Osteoklasten.

5.5.2.1 Magnesiumionenkonzentration

Die physiologische Mg^{2+} -Konzentration im Serum liegt zwischen 0,75 mmol/L und 0,95 mmol/L [202]. Bei den Referenzen PS und TCP lagen die Werte durchweg in die-sem physiologischen Bereich. Bei TCP-P wurde eine stark reduzierte Mg^{2+} -Konzentra-tion auf ca. 0,1–0,2 mmol/L beobachtet. Die höchste Mg^{2+} -Konzentration während der bR-Versuche wurde mit 10,13 mmol/L ($SD = 2,00$) bei CM2,75-P am Tag 3 gemessen. An den anderen Tagen und magnesiumhaltigen Phasen lagen die Werte während der bR-Versuche meist zwischen ca. 3 mmol/L (z. B. TMP-P) und 7 mmol/L (z. B. CM2,75-D) (Abbildung 23j–r).

Die beobachteten Auswirkungen von Mg^{2+} auf die Osteoklastenvorläufer und Osteoklas-ten sind in der Literatur kontrovers:

So fanden Janning et al. in ihrem Magnesiumhydroxid-Implantat im Kaninchenmodell (Kniegelenk) nach 2 und 4 Wochen im Vergleich zur Referenz signifikant niedrige Oste-oklastenanzahl. Sie vermuteten, dass die Mg^{2+} -Konzentration oder eine lokale Alkalose der Grund für die Osteoklastenreduktion war. Nach 6 Wochen ähnelte die Osteoklasten-anzahl der Positivkontrolle. Die Morphologie und die Größe der nachgewiesenen Oste-oklasten unterschieden sich jedoch nicht zwischen den Zeitpunkten [244].

Maradze et al. lagerten reines Magnesium im Kulturmedium aus und stellten verschie-dene Verdünnungen der Mg^{2+} -Konzentration her (2,8–15,9 mmol/L Mg^{2+}). Sie fanden heraus, dass bei der Kultivierung der RAW 264.7 Zelllinie (ohne RANKL und ohne M-CSF) die zelluläre Stoffwechselaktivität (bestimmt mittels *alamarBlue*® Assay) mit steigender Mg^{2+} -Konzentration abnahm. Die Zellen waren jedoch in der Lage, sich mit der Zeit an die Umgebung anzupassen. Zellen, die mit RANKL kultiviert wurden, zeigten

keine Veränderungen in der TRAP-Genexpression bei verschiedenen Mg^{2+} -Konzentrationen. Jedoch war bei 9,9 mmol/L Mg^{2+} die Anzahl der TRAP-positiven Zellen deutlich reduziert. Sie vermuteten, dass diese Zellreduktion auf die hohe Mg^{2+} -Konzentration oder das alkalische Medium ($pH > 8$) zurückzuführen war. Reife Osteoklasten, die auf „Dentinknochenscheiben“ („dentin bone slices“ [!]) kultiviert wurden, tolerierten zwar die hohen Konzentrationen, aber die Resorptionsaktivität war bei allen Mg^{2+} -Konzentrationen stark reduziert. Sie schrieben dies eher dem hohen pH-Wert als der hohen Mg^{2+} -Konzentration zu [146]. Insgesamt zeigen diese Studien, dass eine erhöhte Mg^{2+} -Konzentration zwar die Progenitorzellen in der Osteoklastogenese hemmt, aber die Zellviabilität der reifen Osteoklasten nicht beeinträchtigt, wie bereits von Ostrowski et al. diskutiert [42].

Wu et al. (2014) stellten Kulturmedien mit unterschiedlichen Mg^{2+} -Konzentrationen durch zwei Methoden her: zum einen durch Auslagerung von reinem Magnesium (Magnesiumextrakte mit 1,46–26,67 mmol/L) und zum anderen durch $MgCl_2$ -Lösung (2–25 mmol/L). Die Osteoklastogenese wurde durch PBMCs aus humanem BC induziert (mittels M-CSF und RANKL) und über 28 Tage untersucht. Sie fanden u. a. heraus, dass in den Zellkulturen mit $MgCl_2$ -Lösungen mit der Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration bis zu 10 bzw. 15 mmol/L in der Regel ein Anstieg der TRAP-Aktivität, der TRAP-Färbung, der Resorptionsaktivität und des Zellstoffwechsels zu verzeichnen war. In den Zellkulturen mit Magnesiumextrakten nahm lediglich die Resorptionsaktivität mit steigender Mg^{2+} -Konzentration zu (bis 6,08 mmol/L). Bei den oben aufgeführten Untersuchungen wurde meist ein gegenteiliger Effekt beobachtet [205]. Somit scheint die Mg^{2+} -Quelle ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung und -funktion zu spielen.

Wu et al. (2015) inkubierten hM aus BC in Kokultur mit *humanen mesenchymalen Stammzellen* der SCP-1-Linie (ohne RANKL und ohne M-CSF) in verschiedenen Magnesiumextraktverdünnungen (0,93–26,67 mmol/L). Mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration beobachteten sie einerseits eine verstärkte Osteoklastendifferenzierung bis ca. 6 mmol/L, andererseits nahm die Zytotoxizität progressiv zu, wobei am Tag 7 ab inkl. 14,36 mmol/L und am Tag 28 ab inkl. 10,13 mmol/L signifikant hohe Zellschädigungen festgestellt wurden [52].

Mammoli et al. (2019) stimulierten U937-Zelllinie zur Osteoklastogenese (unter Verwendung von *Phorbol-12-myristat-13-acetat* und *Vitamin D3*) in Gegenwart von

1–10 mmol/L Mg^{2+} und analysierten diverse Boten-RNAs (mRNA) von Differenzierungsmarkern und Transkriptionsfaktoren, die an der Osteoklastendifferenzierung mitwirken. Mit der Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration bis zu 10 mmol/L konnte nach fünf Tagen eine signifikante Erhöhung der Osteoklastenzahl im Vergleich zur Referenz (1 mmol/L) sowie eine positive Korrelation für alle untersuchten Differenzierungsmarker und Transkriptionsfaktoren festgestellt werden. Besonders ausgeprägt war diese Hochregulation bei den Differenzierungsmarkern für Cathepsin K (ca. 2-fach erhöht), für DC-STAMP (Zellfusion, ca. 4-fach erhöht) und TRAP (ca. 17-fach erhöht) [38].

Die Auswirkungen der Mg^{2+} -Konzentration auf die Zellaktivität, Viabilität und Osteoklastogenese lassen sich in dieser Arbeit am besten anhand der Probe CM2,75-P folgendermaßen interpretieren: Es wäre denkbar, dass die geringe Anzahl TRAP-positiver Zellen (TRAP-Färbung und -Aktivität) und die geringe Anzahl fluoreszenzmarkierter Zellen auf dem Zement CM2,75-P mit der hohen freigesetzten Mg^{2+} -Konzentration (bis $M = 10,13$ mmol/L, $SD = 2,00$) zusammenhing (vgl. Abbildung 16 und 18 mit 20). Dies könnte daran gelegen haben, dass die Zellen auf CM2,75-P vor allem in den ersten Tagen einer mehr als 10-fachen supraphysiologischen Mg^{2+} -Konzentration ausgesetzt waren (Abbildung 23p) und daher untergingen. Allerdings gab es zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der DNA-Konzentration zwischen CM2,75-P und den Referenzen PS und TCP-P (Abbildung 17). Des Weiteren wurden die Zellen auf den Phasen CM2,25-D und CM2,75-D einer vergleichbar hohen Mg^{2+} -Konzentration (ca. 7 mmol/L) ausgesetzt wie CM2,75-P, dennoch konnten auf CM2,25-D und CM2,75-D mittels TRAP-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie deutlich mehr Zellen festgestellt werden (vgl. Abbildung 16 mit 20). Zusätzlich lässt der Nachweis der überdurchschnittlich vielen osteoklastenähnlichen Zellen auf den Kultivierungs-Wells der Phase CM2,75-P (Abbildung 21) die Schlussfolgerung zu, dass die hohe Mg^{2+} -Konzentration von bis zu 10 mmol/L keinen gravierenden negativen Einfluss auf die untersuchten osteoklastenähnlichen Zellen hatte.

5.5.2.2 Calciumionenkonzentration

Die physiologische Serumcalciumionenkonzentration liegt bei 1,16–1,31 mmol/L [84, 245]. An der Knochenoberfläche schwankt die Konzentration von 0,5 mmol/L während der Knochenbildung bis ≥ 2 mmol/L während der Knochenresorption [245]. In der Resorptionslakune können Ca^{2+} -Konzentrationen bis zu 40 mmol/L auftreten [89].

Bei den Referenzen PS und TCP wurden Ca^{2+} -Konzentrationen in Zellkulturen (bR) zwischen 1,4 mmol/L (Tag 0 bei TCP) und 2,0 mmol/L (Tag 15 bei TCP) gemessen. Bei der

Referenz TCP-P waren die Werte mit ca. 0,5 bis 0,7 mmol/L am niedrigsten. Bei den magnesiumhaltigen Zementen lagen die niedrigsten Werte bei ca. 0,8 mmol/L (CM2,25-D am Tag 21) und die höchsten Werte bei ca. 1,75 mmol/L (TMP-P an den Tagen 6, 9 und 15), wobei die Newberyit-bildenden Zemente vergleichsweise höhere Ca^{2+} -Werte aufwiesen als die Struvit-bildenden Zemente (Abbildung 23a–i). Insgesamt blieben die Ca^{2+} -Konzentrationen der zellhaltigen Kulturmedien jedoch im physiologischen Bereich.

Wie Xiang et al. herausfanden, sorgt eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration von 0,5 mmol/L für eine größere Anheftungsfläche der Osteoklasten sowie eine erhöhte Genexpression und Fluoreszenzintensität von $\alpha_5\beta_3$ -Integrin im Vergleich zu 1,2 mmol/L [84]. Diese Beobachtungen stimmen insbesondere mit der Bildung von mehrkernigen Riesenzellen mit breiten Aktinringen auf den Kultivierungs-Wells der Phase TCP-P am Tag 16 und 22 überein (Abbildung 21). Eine Hemmung der Osteoklastogenese und der osteoklastischen Resorption wäre erst ab einer Ca^{2+} -Konzentration von 5 mmol/L zu erwarten [246, 247]. Daher sollten von dem vorherrschenden Ca^{2+} -Milieu um die Zementimplantate keine negativen Einflüsse auf die Zellen ausgehen.

5.5.2.3 Phosphationenkonzentration

Die physiologische Plasmaphosphatkonzentration liegt zwischen 0,8 mmol/L und 1,4 mmol/L [248, 249]. Während bei PS und TCP die PO_4^{3-} -Konzentration konstant in diesem physiologischen Bereich lag, wurde bei TCP-P eine bis zu ca. 10-fache supraphysiologische PO_4^{3-} -Konzentration gemessen (Abbildung 23s–u). Für Struvit-bildende Zemente lagen die Werte etwa zwischen 1,33 mmol/L (CM2,75-D am Tag 0) und 5,84 mmol/L (TMP-D am Tag 21). Bei den Newberyit-bildenden Zementen reichten die Werte von 1,25 mmol/L (CM2,75-P am Tag 3) bis 4,11 mmol/L (TMP-P am Tag 15). Somit waren die PO_4^{3-} -Konzentrationen auf Struvit-bildenden Zementen tendenziell höher und zeigten ein konträres Verhalten zu den Ca^{2+} -Konzentrationen (siehe Kapitel 5.5.2.2). Insgesamt wurde an den magnesiumhaltigen Zementen über die Versuchstage ein stetiger Anstieg der PO_4^{3-} -Freisetzung beobachtet (Abbildung 23v–ß).

Die genaue Wirkung von Phosphat auf die Osteoklastogenese und Osteoklastenfunktion sowie die dahinter stehenden Mechanismen sind nahezu unbekannt [12, 97]. Kanatani et al. zeigten jedoch, dass eine hohe PO_4^{3-} -Konzentration von 2,5–4 mmol/L auf osteoklastische Vorläuferzellen wirkt und die Osteoklastendifferenzierung hemmt. Außerdem

zeigten sie, dass mit steigender PO_4^{3-} -Konzentration die osteoklastische Knochenresorption durch Induktion der Apoptose reifer Osteoklasten gehemmt wird [97]. Dies könnte teilweise die verzögerte Osteoklastenogenese und die reduzierte Zellanzahl auf den Kultivierungs-Wells und Zementen erklären. Für eine genaue Aussage sind jedoch weitere Untersuchungen wichtig.

Es wäre denkbar, dass in vivo die hohen Phosphatkonzentrationen negative Auswirkungen auf das lokale Gewebe haben könnten. Wie hämatologische Untersuchungen an MPC-Implantaten [173] und Brushit-Zementen [237] zeigten, sind systemische Konzentrationsänderungen (z. B. Hyperphosphatämie) in vivo jedoch nicht zu erwarten.

5.5.2.4 Oxoniumionenkonzentration (pH-Wert)

Der physiologische pH-Wert (negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration) für arterielles Blut liegt nahe bei 7,40 und für venöses Blut bei etwa 7,36. Für die pH-Werte des Knochengewebes liegen keine Daten vor [250]. Der physiologische pH-Wert der interstitiellen Flüssigkeit liegt jedoch in Abhängigkeit vom Blutgefäßabstand bei etwa 7,1 [251].

Bei der pH-Messung der Kulturmedien wurden mit Ausnahme von TMP-D bei allen magnesiumhaltigen Zementen erhöhte Werte im Vergleich zum frischen Kulturmedium und den Referenzen PS, TCP sowie TCP-P festgestellt. Ein signifikanter Anstieg wurde lediglich bei CM2,75-P am Tag 9 gemessen, der an diesem Tag signifikant höher war als bei den Referenzen PS, TCP, TCP-P und TMP-D (Abbildung 25). Wie bereits im Kapitel 5.1.4 ausgeführt, geht ein höherer pH-Wert mit einer erhöhten Mg^{2+} -Konzentration einher. Die signifikante pH-Absenkung sowie der PO_4^{3-} -Anstieg des Referenz TCP-P sind möglicherweise auf die Reaktion nach der Gleichung (5.1) [203] zurückzuführen. Im Laufe der Versuchsreihe näherten sich die pH-Werte aller Proben dem pH-Wert des frischen Kulturmediums an (Abbildung 25).

Der pH-Wert ist allgemein als ein wichtiger Einflussfaktor für die Osteoklastogenese und die osteoklastische Resorption anerkannt und die meisten Autoren sind sich einig, dass das pH-Optimum hierfür im leicht subphysiologischen Bereich liegt [51, 250, 252, 253]:

So zeigten Schilling et al., dass bei der Kultivierung von humanen PBMCs mit M-CSF und RANKL die Anzahl der Osteoklasten bei einem pH-Wert von 6,9 im Vergleich zu pH 7,3 um mehr als das Vierfache anstieg [253]. Beim Vergleich der fluoreszenzmarkierten

Zellen auf den Kultivierungs-Wells (Abbildung 21) mit den pH-Werten (Abbildung 25) schienen die niedrigen pH-Werte bei TCP-P bis Tag 16 jedoch keinen Einfluss auf die Osteoklastenbildung zu haben: So war die Osteoklastogenese bei dieser Probe vergleichbar mit TCP, aber gehemmt im Vergleich zu PS und den magnesiumhaltigen Zementen, wobei bei letzteren der pH-Wert meist im supraphysiologischen Bereich lag. Bis Tag 22 änderte sich dies jedoch, sodass auf den Kultivierungs-Wells von TCP-P mehr polynukleäre Riesenzellen zu beobachten waren als bei TCP und den meisten der magnesiumhaltigen Zementen.

Arnett et al. beobachteten eine nahezu inaktive Resorption von reifen humanen Osteoklasten auf Dentinscheiben bei einem pH-Wert von 7,4. Mit abnehmendem pH-Wert nahm die Anzahl der Resorptionslakunen zu und erreichte eine konstant hohe resorptive Aktivität bei einem pH-Wert von etwa 6,9 bis 6,8 [250]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Korrelation zwischen den pH-Werten der Kulturmedien und der zR nachgewiesen werden, wie insbesondere am Beispiel von TCP-P und CM2,75-P deutlich wird: Während der signifikant hohe pH-Wert von CM2,75-P am Tag 9 ($M = 7,85$, $SD = 0,03$) nicht zu einer verminderten zR von Calcium führte (Abbildung 23g), konnte für die Phase TCP-P trotz der signifikant niedrigen pH-Werte am Tag 9 ($M = 6,62$, $SD = 0,05$), Tag 15 ($M = 6,89$, $SD = 0,22$) und am Tag 21 ($M = 7,10$, $SD = 0,07$) keine signifikante zR nachgewiesen werden (Abbildung 23c, l, u). Da diese Materialien jedoch sehr unterschiedlich waren, muss der Vergleich zwischen dem pH-Wert und der zR kritisch betrachtet werden.

Bei der Kultivierung von humanen Osteoklasten auf Dentinscheiben konnten Bernhardt et al. keine signifikanten Unterschiede der intrazellulären TRAP-Aktivität (bestimmt mittels N-ASBI-P) zwischen verschiedenen pH-Werten (6,8–7,4) nachweisen, obwohl die signifikant größten Resorptionsflächen bei einem pH-Wert von 6,8 bestanden. Wurden die humanen Osteoklasten auf PS und cHA kultiviert, zeigten sie dagegen mit zunehmendem pH-Wert eine höhere intrazelluläre TRAP-Aktivität, sodass die höchsten Aktivitäten bei pH 7,4 oder 7,2 vorlagen. Die meisten TRAP-positiven polynukleären Zellen (TRAP-Färbung) wurden auf PS zwischen pH 7,2 und 7,0 beobachtet. Auf cHA korrelierten die intrazelluläre TRAP-Aktivität mit den resorbierten Flächen. Sie schlussfolgerten einerseits, dass die intrazelluläre TRAP-Aktivität nur für bestimmte Materialien (z. B. cHA) mit der Resorption korreliert und andererseits, dass für verschiedene Materialien unterschiedliche pH-Optima existieren könnten [51], was die Komplexität der Biomaterialoptimierung weiter erhöhen würde.

Analog zu den Ergebnissen von Bernhardt et al. für Dentinscheiben [51] konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der intrazellulären TRAP-Aktivität und dem pH-Wert der Kulturmedien beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, obwohl die untersuchten Ca^{2+} -, Mg^{2+} -, PO_4^{3-} - und H_3O^+ -Konzentrationen der Referenzen PS und TCP im physiologischen Bereich lagen, die Osteoklastogenese auf den Kultivierungs-Wells von TCP im Vergleich zu PS gehemmt war (Abbildung 21). Bei den magnesiumhaltigen Zementen war trotz der erhöhten Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Konzentrationen sowie der erhöhten pH-Werten die Osteoklastogenese auf den Kultivierungs-Wells im Vergleich zu TCP überwiegend stimuliert und im Vergleich zu PS inhibiert (Abbildung 21). Mögliche Gründe hierfür könnten weitere Einflussfaktoren gewesen sein, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, wie z. B. Ammoniumionen (NH_4^+) bei den Struvit-bildenden Zementen. Nach bestem Wissen wurde der Einfluss von Ammoniumionen auf die Osteoklastendifferenzierung und -funktion noch nicht untersucht. Daher sind weitere Forschungsarbeiten erforderlich, um die regulatorischen Faktoren der Osteoklasten weiter aufzudecken und besser zu verstehen und um das Design von Biozementen an diese Faktoren anzupassen.

6 Zusammenfassung

Für die Behandlung von *Knochendefekten kritischer Größe* stehen heute eine Reihe von Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Ein Ansatz zielt darauf ab, die Defekte mit synthetisch hergestellten Biomaterialien zu behandeln, die im Körper abgebaut und durch neu gebildeten Knochen ersetzt werden. Es hat sich gezeigt, dass die etablierten Calciumphosphat-Keramiken, die zum Teil knochenähnlich sind, über Jahre im Körper verbleiben können. Neue Ansätze mit Magnesiumphosphat- (MPC) und Calciummagnesiumphosphatzementen (CMPC) haben sich als vielversprechende Alternativen erwiesen. Um geometrisch komplexe Knochenimplantate herzustellen, hat in den letzten Jahren der individualisierte bzw. patientenspezifische 3D-Pulverdruck an Bedeutung gewonnen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Osteoklastogenese *in vitro* auf 3D-pulvergedruckten CMPC und MPC zu induzieren und das zellvermittelte Resorptionsverhalten zu analysieren. Dabei wurde die Hypothese formuliert, dass das Ca/Mg-Verhältnis zur Steuerung der zellulären Resorption (zR) der Zemente genutzt werden kann. Als Referenzen dienten Polystyrol(PS)- und Glasoberfläche, β -TCP- sowie Brushit-bildender Zement.

Als Proben dienten Zemente der allgemeinen stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_x\text{Mg}_{(3-x)}(\text{PO}_4)_2$ ($x = 0; 0,25; 0,75; 3$), die mit einem 3D-Pulverdrucker zu Scaffolds hergestellt und in einem Ofen gesintert wurden. Die Infiltration mit reaktiven Lösungen ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ oder H_3PO_4) ergab Zemente mit 10–24 Gew.-% Struvit oder mit 20–43 Gew.-% Newberyit, wobei die Produktanteile mit steigendem Mg-Gehalt zunahmen. Für die Zellkultivierung wurden monozytenangereicherte PBMCs aus Buffy-Coat von männlichen Spendern mittels dreifacher Dichtegradientenzentrifugation isoliert, direkt auf die Prüfoberflächen ausgesät und über einen Zeitraum von 22 Tagen mit Zytokinen (M-CSF und RANKL) zu Osteoklasten stimuliert. Die Interaktion der Zellen mit den Zementen bzw. PS/Glas wurde mittels TRAP-Färbung und -Aktivität, DNA- und Ionenkonzentrationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , pH-Werte), Rasterelektronen-, Durchlicht-, Auflicht- und Fluoreszenzmikroskopie (Zellkerne, Aktinringe) analysiert.

Im Gegensatz zu den polynukleären Riesenzellen auf PS konnten auf CMPCs, MPCs und Brushite-bildenden Zementen keine typischen Osteoklasten (Nuklei ≥ 3 ; Zellgröße $\geq 50 \mu\text{m}$; Aktinringe) nachgewiesen werden, trotz der festgestellten TRAP-positiven Zellen. Es wird angenommen, dass die Zementeigenschaften, wie z. B. die rauen Oberflächen, die Osteoklastogenese beeinträchtigen. Beim Vergleich der Kultivierungs-

Scaffolds und der zugehörigen glatten Kultivierungs-Wells hinsichtlich der Zelldichten und osteoklastischen Differenzierungsstadien zeigten sich während der 22-tägigen Inkubation erhebliche Unterschiede: Während auf den Struvit-bildenden Zementen deutlich mehr mononukleäre Zellen nachgewiesen wurden als auf den Newberyit-bildenden Zementen, wurden auf den Kultivierungs-Wells der Newberyit-bildenden Zemente wesentlich mehr polynukleäre Riesenzellen nachgewiesen als auf den Kultivierungs-Wells der Struvit-bildenden Zemente, die jedoch in ihrer Differenzierung im Vergleich zu PS verzögert waren.

Während die Freisetzung von Mg^{2+} und PO_4^{3-} fast ausschließlich durch chemische Degradation erfolgte, wurde Ca^{2+} zunächst adsorbiert und anschließend zellvermittelt freigesetzt. Mit steigendem Mg-Gehalt und damit mit steigendem Struvit- und Newberyit-Anteil wurde eine höhere zR von Calcium in den Zementen beobachtet, wobei die Newberyit-bildenden Zemente stets eine höhere zR aufwiesen als die Struvit-bildenden Zemente. Die erhöhte Ca^{2+} -Adsorption im Vergleich zur Ca^{2+} -Resorption führte jedoch insgesamt zu einer Präzipitation von Calcium auf den magnesiumhaltigen Zementen. Da lediglich auf β -TCP Resorptionslakunen beobachtet werden konnten, wird angenommen, dass auf den CMPCs, MPCs und Brushite-bildenden Zementen die zellvermittelte Ca^{2+} -Freisetzung von den Präzipitaten ausgeht, die von möglichen Makrophagen auf den Zementen und/oder Riesenzellen auf Kultivierungs-Wells resorbiert wurden.

Trotz der supraphysiologischen Mg^{2+} -, PO_4^{3-} -Konzentrationen sowie den erhöhten pH-Werten konnten keine toxischen Effekte der Zemente auf die Zellen festgestellt werden, da die DNA-Konzentrationen, die zR von Ca^{2+} und das Zellvorkommen auf den Zementen bzw. den Kultivierungs-Wells über den Versuchszeitraum weitestgehend konstant blieben.

Insgesamt wird davon ausgegangen, dass die zR nicht unbedingt für den Zementabbau erforderlich ist, da die CMPCs und MPCs eine hohe chemische Degradation aufweisen. Die höchsten Gesamtabbauraten wurden für die Struvit-bildenden Zemente mit der allgemeinen Summenformel $Ca_{0,25}Mg_{2,75}(PO_4)_2$ und $Ca_{0,75}Mg_{2,25}(PO_4)_2$ und für die Newberyit-bildenden Zemente $Ca_{0,25}Mg_{2,75}(PO_4)_2$ bestimmt. Das Ausmaß, in dem der Zementabbau mit der Knochenneubildung einhergeht, bedarf einer Überprüfung in vivo.

7 Literaturverzeichnis

1. Horch, H.H. and C. Pautke, *[Regeneration instead of reparation: a critical review of the autogenous bone transplant as "golden standard" of reconstructive oral surgery]*. Mund Kiefer Gesichtschir, 2006. **10**(4): p. 213-20.
2. Schwenzer, N. and M. Bacher, *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 2011, Stuttgart [u.a.]: Thieme. XIV, 522 S.
3. Detsch, R. and A.R. Boccaccini, *The role of osteoclasts in bone tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(10): p. 1133-49.
4. Diez-Escudero, A., et al., *In vitro degradation of calcium phosphates: Effect of multiscale porosity, textural properties and composition*. Acta Biomater, 2017. **60**: p. 81-92.
5. Roddy, E., et al., *Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives*. European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology, 2018. **28**(3): p. 351-362.
6. Nabiyouni, M., et al., *Magnesium-based bioceramics in orthopedic applications*. Acta Biomater, 2018. **66**: p. 23-43.
7. 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.
8. Qi, T., et al., *Insights into the Role of Magnesium Ions in Affecting Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells*. Biol Trace Elem Res, 2020.
9. v. Garrel, T. and L. Gotzen, *Allogene Knochen transplantation und Knochenbanking*. Der Unfallchirurg, 1998. **101**(9): p. 713-727.
10. Laurencin, C.T. and S.F. El-Amin, *Xenotransplantation in orthopaedic surgery*. J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16**(1): p. 4-8.
11. Navarro, M., et al., *Biomaterials in orthopaedics*. J R Soc Interface, 2008. **5**(27): p. 1137-58.
12. Ciapetti, G., et al., *Osteoclast differentiation from human blood precursors on biomimetic calcium-phosphate substrates*. Acta Biomater, 2017. **50**: p. 102-113.
13. Kanter, B., et al., *Bone regeneration capacity of magnesium phosphate cements in a large animal model*. Acta Biomater, 2018. **69**: p. 352-361.
14. Tadic, D. and M. Epple, *A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone*. Biomaterials, 2004. **25**(6): p. 987-94.
15. LeGeros, R.Z., *Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates*. Clin Orthop Relat Res, 2002(395): p. 81-98.
16. Bohner, M., *Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery*. European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society, 2001. **10 Suppl 2**(Suppl 2): p. S114-S121.
17. Günther, K.P., et al., *Osteointegration of different bone substitute materials in an experimental model*. Der Orthopäde, 1998. **27**(2): p. 105-117.

18. Marcacci, M., et al., *Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study*. Tissue Eng, 2007. **13**(5): p. 947-55.
19. Tamimi, F., Z. Sheikh, and J. Barralet, *Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite*. Acta Biomaterialia, 2012. **8**(2): p. 474-487.
20. Kanter, B., et al., *Control of in vivo mineral bone cement degradation*. Acta Biomater, 2014. **10**(7): p. 3279-87.
21. Klammert, U., et al., *In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(9): p. 3469-3475.
22. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates (CaPO₄): Occurrence and properties*. Morphologie, 2017. **101**(334): p. 125-142.
23. Bohner, M., B.L.G. Santoni, and N. Döbelin, *β-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties*. Acta Biomaterialia, 2020. **113**: p. 23-41.
24. Ginebra, M.P., et al., *Preparation and properties of some magnesium-containing calcium phosphate cements*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1994. **5**(2): p. 103-107.
25. Ostrowski, N., A. Roy, and P.N. Kumta, *Magnesium Phosphate Cement Systems for Hard Tissue Applications: A Review*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2016. **2**(7): p. 1067-1083.
26. Driessens, F.C.M., et al., *In vivo behaviour of three calcium phosphate cements and a magnesium phosphate cement*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1995. **6**(5): p. 272-278.
27. Driessens, F.C.M., et al., *Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 1993. **4**(5): p. 503-508.
28. Zeng, D., et al., *Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone with calcium-magnesium phosphate cement and bone marrow stromal cells in rabbits*. Tissue Eng Part A, 2012. **18**(7-8): p. 870-81.
29. Wu, F., et al., *Self-setting bioactive calcium-magnesium phosphate cement with high strength and degradability for bone regeneration*. Acta Biomater, 2008. **4**(6): p. 1873-84.
30. Grossardt, C., et al., *Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells*. Tissue Eng Part A, 2010. **16**(12): p. 3687-95.
31. Vorndran, E., et al., *Formation and properties of magnesium-ammonium-phosphate hexahydrate biocements in the Ca-Mg-PO₄ system*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(3): p. 429-36.
32. Blum, C., et al., *Mg:Ca ratio as regulating factor for osteoclastic in vitro resorption of struvite biocements*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2017. **73**: p. 111-119.
33. Ewald, A., et al., *Development and Bone Regeneration Capacity of Premixed Magnesium Phosphate Cement Pastes*. Materials (Basel, Switzerland), 2019. **12**(13): p. 2119.
34. Yang, X., et al., *Influence of magnesium ions and amino acids on the nucleation and growth of hydroxyapatite*. CrystEngComm, 2011. **13**(4): p. 1153-1158.

35. Elliott, J.C., *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. 1994, Amsterdam [u.a.]: Elsevier. XIII, 389 S.
36. Ferguson, J.F. and P.L. McCarty, *Effects of carbonate and magnesium on calcium phosphate precipitation*. Environmental Science & Technology, 1971. **5**(6): p. 534-540.
37. Suchanek, W.L., et al., *Mechanochemical-hydrothermal synthesis of calcium phosphate powders with coupled magnesium and carbonate substitution*. Journal of Solid State Chemistry, 2004. **177**(3): p. 793-799.
38. Mammoli, F., et al., *Magnesium Is a Key Regulator of the Balance between Osteoclast and Osteoblast Differentiation in the Presence of Vitamin D₃*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
39. Swaminathan, R., *Magnesium metabolism and its disorders*. Clin Biochem Rev, 2003. **24**(2): p. 47-66.
40. Wang, J.L., et al., *Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics-A General Review and Perspectives*. Adv Sci (Weinh), 2020. **7**(8): p. 1902443.
41. Maier, J.A., et al., *High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1689**(1): p. 6-12.
42. Ostrowski, N., et al., *Synthesis, Osteoblast, and Osteoclast Viability of Amorphous and Crystalline Tri-Magnesium Phosphate*. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2015. **1**(1): p. 52-63.
43. Moseke, C., et al., *Low temperature fabrication of spherical brushite granules by cement paste emulsion*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2012. **23**(11): p. 2631-2637.
44. Vorndran, E., C. Moseke, and U. Gbureck, *3D printing of ceramic implants*. MRS Bulletin, 2015. **40**(2): p. 127-136.
45. Klammert, U., et al., *3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects*. J Craniomaxillofac Surg, 2010. **38**(8): p. 565-70.
46. Peters, F., et al., *Comparative Study of patient individual implants from β -tricalcium phosphate made by different techniques based on CT data*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2006. **37**(6): p. 457-461.
47. Kartsogiannis, V. and K.W. Ng, *Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 79-102.
48. Manolagas, S.C., *Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis**. Endocrine Reviews, 2000. **21**(2): p. 115-137.
49. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates*. Journal of Materials Science, 2007. **42**(4): p. 1061-1095.
50. Felsenberg, D., *Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit*. Pharmazie in unserer Zeit, 2001. **30**(6): p. 488-494.
51. Bernhardt, A., et al., *Relevance of osteoclast-specific enzyme activities in cell-based in vitro resorption assays*. Eur Cell Mater, 2017. **33**: p. 28-42.
52. Wu, L., et al., *Effects of extracellular magnesium extract on the proliferation and differentiation of human osteoblasts and osteoclasts in coculture*. Acta Biomater, 2015. **27**: p. 294-304.

53. Danks, L. and H. Takayanagi, *Immunology and bone*. J Biochem, 2013. **154**(1): p. 29-39.
54. Roodman, G.D., *Cell biology of the osteoclast*. Exp Hematol, 1999. **27**(8): p. 1229-41.
55. Feng, X. and S.L. Teitelbaum, *Osteoclasts: New Insights*. Bone research, 2013. **1**(1): p. 11-26.
56. Dorozhkin, S.V., *Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine*. Materials (Basel), 2009. **2**(2): p. 399-498.
57. Weiner, S. and H.D. Wagner, *THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations*. Annual Review of Materials Science, 1998. **28**(1): p. 271-298.
58. Sadat-Shojai, M., et al., *Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures*. Acta Biomater, 2013. **9**(8): p. 7591-621.
59. Bigi, A., et al., *The role of magnesium on the structure of biological apatites*. Calcif Tissue Int, 1992. **50**(5): p. 439-44.
60. Weiner, S. and P.A. Price, *Disaggregation of bone into crystals*. Calcif Tissue Int, 1986. **39**(6): p. 365-75.
61. Delmas, P.D., et al., *Identification of the noncollagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis*. Calcif Tissue Int, 1984. **36**(3): p. 308-16.
62. Morgan, S., A.A. Poudarik, and D. Vashishth, *Do Non-collagenous Proteins Affect Skeletal Mechanical Properties?* Calcified tissue international, 2015. **97**(3): p. 281-291.
63. Nyman, J.S., et al., *The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone*. Journal of biomechanics, 2006. **39**(5): p. 931-938.
64. Samuel, J., et al., *Effect of water on nanomechanics of bone is different between tension and compression*. Journal of the mechanical behavior of biomedical materials, 2016. **57**: p. 128-138.
65. Aaron, J., *Periosteal Sharpey's fibers: a novel bone matrix regulatory system?* Frontiers in Endocrinology, 2012. **3**(98).
66. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019, Stuttgart: Thieme. 1 Online-Ressource (752 Seiten).
67. Hing, K.A., *Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?* Philos Trans A Math Phys Eng Sci, 2004. **362**(1825): p. 2821-50.
68. Røhl, L., et al., *Tensile and compressive properties of cancellous bone*. J Biomech, 1991. **24**(12): p. 1143-9.
69. Bose, S., M. Roy, and A. Bandyopadhyay, *Recent advances in bone tissue engineering scaffolds*. Trends in Biotechnology, 2012. **30**(10): p. 546-554.
70. Almalki, S.G. and D.K. Agrawal, *Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells*. Differentiation, 2016. **92**(1): p. 41-51.
71. Florencio-Silva, R., et al., *Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells*. BioMed Research International, 2015. **2015**: p. 421746.
72. Miller, S.C., et al., *Bone lining cells: structure and function*. Scanning Microsc, 1989. **3**(3): p. 953-60; discussion 960-1.

73. Everts, V., et al., *The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation*. Journal of Bone and Mineral Research, 2002. **17**(1): p. 77-90.
74. Franz-Odenaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: How osteoblasts become osteocytes*. Developmental Dynamics, 2006. **235**(1): p. 176-190.
75. Rochefort, G.Y., S. Pallu, and C.L. Benhamou, *Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue*. Osteoporos Int, 2010. **21**(9): p. 1457-69.
76. Civitelli, R., *Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage*. Archives of biochemistry and biophysics, 2008. **473**(2): p. 188-192.
77. Nicholson, G.C., et al., *Induction of osteoclasts from CD14-positive human peripheral blood mononuclear cells by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)*. Clin Sci (Lond), 2000. **99**(2): p. 133-40.
78. Komano, Y., et al., *Identification of a human peripheral blood monocyte subset that differentiates into osteoclasts*. Arthritis research & therapy, 2006. **8**(5): p. R152-R152.
79. Roodman, G.D. and J.J. Windle, *Paget disease of bone*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(2): p. 200-208.
80. Krombach, F., et al., *Cell Size of Alveolar Macrophages: An Interspecies Comparison*. Environmental Health Perspectives, 1997. **105**: p. 1261-1263.
81. Cappariello, A., et al., *The Great Beauty of the osteoclast*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2014. **558**: p. 70-78.
82. Domon, T., et al., *Three-dimensional distribution of the clear zone of migrating osteoclasts on dentin slices in vitro*. Tissue Cell, 2002. **34**(5): p. 326-36.
83. Helfrich, M.H., et al., *Rat osteoclasts adhere to a wide range of RGD (Arg-Gly-Asp) peptide-containing proteins, including the bone sialoproteins and fibronectin, via a beta 3 integrin*. J Bone Miner Res, 1992. **7**(3): p. 335-43.
84. Xiang, B., et al., *Extracellular calcium regulates the adhesion and migration of osteoclasts via integrin $\alpha\beta$ 3/Rho A/Cytoskeleton signaling*. Cell Biology International, 2019. **43**(10): p. 1125-1136.
85. Zhang, K. and J. Chen, *The regulation of integrin function by divalent cations*. Cell adhesion & migration, 2012. **6**(1): p. 20-29.
86. Rousselle, A.V. and D. Heymann, *Osteoclastic acidification pathways during bone resorption*. Bone, 2002. **30**(4): p. 533-40.
87. Blair, H., et al., *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump*. Science, 1989. **245**(4920): p. 855-857.
88. Teitelbaum, S.L., *Bone resorption by osteoclasts*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1504-8.
89. Silver, I.A., R.J. Murrills, and D.J. Etherington, *Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*. Exp Cell Res, 1988. **175**(2): p. 266-76.
90. Gallo, M., et al., *Effect of grain orientation and magnesium doping on beta-tricalcium phosphate resorption behavior*. Acta Biomater, 2019. **89**: p. 391-402.
91. Stark, Z. and R. Savarirayan, *Osteopetrosis*. Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 5.

92. Halleen, J.M., et al., *Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 22907-10.
93. Halleen, J.M., et al., *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption*. J Bone Miner Res, 2000. **15**(7): p. 1337-45.
94. Hirvonen, M.J., et al., *Novel perspectives on the transcytotic route in osteoclasts*. BoneKEy reports, 2013. **2**: p. 306-306.
95. Salo, J., et al., *Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis*. Science, 1997. **276**(5310): p. 270-3.
96. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Archives of biochemistry and biophysics, 2008. **473**(2): p. 139-146.
97. Kanatani, M., et al., *Effect of high phosphate concentration on osteoclast differentiation as well as bone-resorbing activity*. Journal of Cellular Physiology, 2003. **196**(1): p. 180-189.
98. Takahashi, N., N. Udagawa, and T. Suda, *A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(3): p. 449-55.
99. Cao, J.J., et al., *Aging Increases Stromal/Osteoblastic Cell-Induced Osteoclastogenesis and Alters the Osteoclast Precursor Pool in the Mouse*. Journal of Bone and Mineral Research, 2005. **20**(9): p. 1659-1668.
100. Wei, S., et al., *Functional overlap but differential expression of CSF-1 and IL-34 in their CSF-1 receptor-mediated regulation of myeloid cells*. Journal of leukocyte biology, 2010. **88**(3): p. 495-505.
101. Arai, F., et al., *Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors*. The Journal of experimental medicine, 1999. **190**(12): p. 1741-1754.
102. Quinn, J.M., et al., *A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4424-7.
103. Simonet, W.S., et al., *Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density*. Cell, 1997. **89**(2): p. 309-319.
104. Kapasa, E.R., et al., *The Effect of RANKL/OPG Balance on Reducing Implant Complications*. Journal of functional biomaterials, 2017. **8**(4): p. 42.
105. Morabito, N., et al., *Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of thalassemia-induced osteoporosis: new pieces of the puzzle*. J Bone Miner Res, 2004. **19**(5): p. 722-7.
106. Schmitz, J.P. and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clin Orthop Relat Res, 1986(205): p. 299-308.
107. Panteli, M., et al., *Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: current insights*. Journal of cellular and molecular medicine, 2015. **19**(4): p. 685-713.
108. Schemitsch, E.H., *Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!* Journal of Orthopaedic Trauma, 2017. **31**: p. S20-S22.

109. Robinson, C.M., et al., *Tibial fractures with bone loss treated by primary reamed intramedullary nailing*. J Bone Joint Surg Br, 1995. **77**(6): p. 906-13.
110. Haines, N.M., et al., *Defining the Lower Limit of a "Critical Bone Defect" in Open Diaphyseal Tibial Fractures*. J Orthop Trauma, 2016. **30**(5): p. e158-63.
111. Stevenson, S., *Enhancement of fracture healing with autogenous and allogeneic bone grafts*. Clin Orthop Relat Res, 1998(355 Suppl): p. S239-46.
112. Campanile, G., G. Hautmann, and T. Lotti, *Cigarette smoking, wound healing, and face-lift*. Clinics in Dermatology, 1998. **16**(5): p. 575-578.
113. Chakkalakal, D.A., *Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair*. Alcohol Clin Exp Res, 2005. **29**(12): p. 2077-90.
114. Claes, L., S. Recknagel, and A. Ignatius, *Fracture healing under healthy and inflammatory conditions*. Nature Reviews Rheumatology, 2012. **8**(3): p. 133-143.
115. Wehrhan, T., P. Stockmann, and F. Wehrhan, *Antiresorptive Therapie – Risiko, Therapie und Prophylaxe von Kieferknochennekrosen*. ZWR - Das Deutsche Zahnärzteblatt, 2015. **124**(05): p. 232-236.
116. Viateau, V., et al., *Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies*. Orthop Clin North Am, 2010. **41**(1): p. 49-56; table of contents.
117. Dimitriou, R., et al., *Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review*. Injury, 2011. **42**: p. S3-S15.
118. Soucacos, P.N., et al., *The free vascularized fibular graft for bridging large skeletal defects of the upper extremity*. Microsurgery, 2011. **31**(3): p. 190-197.
119. Spiegelberg, B., et al., *Ilizarov principles of deformity correction*. Annals of the Royal College of Surgeons of England, 2010. **92**(2): p. 101-105.
120. Zwetyenga, N., et al., *[Induced membrane technique in oral & maxillofacial reconstruction]*. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 2012. **113**(4): p. 231-8.
121. Aronson, J., *Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method*. J Bone Joint Surg Am, 1997. **79**(8): p. 1243-58.
122. Masquelet, A.C., et al., *[Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]*. Ann Chir Plast Esthet, 2000. **45**(3): p. 346-53.
123. Masquelet, A.C. and T. Begue, *The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects*. Orthop Clin North Am, 2010. **41**(1): p. 27-37; table of contents.
124. Cuthbert, R.J., et al., *Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects*. Bone, 2013. **57**(2): p. 484-92.
125. El-Alfy, B.S. and A.M. Ali, *Management of segmental skeletal defects by the induced membrane technique*. Indian journal of orthopaedics, 2015. **49**(6): p. 643-648.
126. Wang, J., et al., *Induced membrane technique in the treatment of infectious bone defect: A clinical analysis*. Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research, 2019. **105**(3): p. 535-539.
127. Zwetyenga, N., et al., *Mandibular reconstruction using induced membranes with autologous cancellous bone graft and HA-betaTCP: animal model study and*

- preliminary results in patients*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2009. **38**(12): p. 1289-97.
128. Winkler, T., et al., *Osteoclastic bioresorption of biomaterials: two- and three-dimensional imaging and quantification*. Int J Artif Organs, 2010. **33**(4): p. 198-203.
129. Schilling, A.F., et al., *Osteoclasts and Biomaterials*. European Journal of Trauma, 2006. **32**(2): p. 107-113.
130. Li, X., et al., *Preparation and osteogenic properties of magnesium calcium phosphate bio cement scaffolds for bone regeneration*. Journal of Instrumentation, 2013. **8**(07): p. C07010-C07010.
131. Lin, Y., et al., *Calcium phosphate cement scaffold with stem cell co-culture and prevascularization for dental and craniofacial bone tissue engineering*. Dent Mater, 2019. **35**(7): p. 1031-1041.
132. 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.
133. Bernhardt, A., M. Schumacher, and M. Gelinsky, *Formation of osteoclasts on calcium phosphate bone cements and polystyrene depends on monocyte isolation conditions*. Tissue Eng Part C Methods, 2015. **21**(2): p. 160-70.
134. Puppi, D., et al., *Polymeric materials for bone and cartilage repair*. Progress in Polymer Science, 2010. **35**(4): p. 403-440.
135. Pilia, M., T. Guda, and M. Appleford, *Development of Composite Scaffolds for Load-Bearing Segmental Bone Defects*. BioMed Research International, 2013. **2013**: p. 458253.
136. Wu, S., et al., *Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2014. **80**: p. 1-36.
137. Nagels, J., M. Stokdijk, and P.M. Rozing, *Stress shielding and bone resorption in shoulder arthroplasty*. J Shoulder Elbow Surg, 2003. **12**(1): p. 35-9.
138. Cypher, T.J. and J.P. Grossman, *Biological principles of bone graft healing*. J Foot Ankle Surg, 1996. **35**(5): p. 413-7.
139. Fernandez de Grado, G., et al., *Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management*. Journal of tissue engineering, 2018. **9**: p. 2041731418776819-2041731418776819.
140. del Real, R.P., et al., *In vivo bone response to porous calcium phosphate cement*. J Biomed Mater Res A, 2003. **65**(1): p. 30-6.
141. Wagner, Q., et al., *Advanced nanostructured medical device combining mesenchymal cells and VEGF nanoparticles for enhanced engineered tissue vascularization*. Nanomedicine, 2016. **11**(18): p. 2419-2430.
142. Schieker, M., C. Heiss, and W. Mutschler, *Knochenersatzmaterialien*. Der Unfallchirurg, 2008. **111**(8): p. 613-620.
143. Moore, W.R., S.E. Graves, and G.I. Bain, *Synthetic bone graft substitutes*. ANZ J Surg, 2001. **71**(6): p. 354-61.
144. Kübler, N.R., *Osteoinduktion und- reparation*. Oral and Maxillofacial Surgery, 1997. **1**(1): p. 2-25.

145. Hench, L.L. and J.M. Polak, *Third-generation biomedical materials*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1014-7.
146. Maradze, D., et al., *High Magnesium Corrosion Rate has an Effect on Osteoclast and Mesenchymal Stem Cell Role During Bone Remodelling*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 10003.
147. Gbureck, U. and R. Thull, *Mechanische und rheologische Eigenschaften mineralischer Knochenzemente*. BIOMaterialien, 2005. **6**.
148. Zheng, Y.F., X.N. Gu, and F. Witte, *Biodegradable metals*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2014. **77**: p. 1-34.
149. Yun, Y., et al., *Revolutionizing biodegradable metals*. Materials Today, 2009. **12**(10): p. 22-32.
150. Hutmacher, D.W., et al., *State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective*. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2007. **1**(4): p. 245-260.
151. Mahoney, M.J. and W.M. Saltzman, *Transplantation of brain cells assembled around a programmable synthetic microenvironment*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(10): p. 934-9.
152. Schnürer, S.M., et al., *Knochenersatzwerkstoffe*. Der Orthopäde, 2003. **32**(1): p. 2-10.
153. LeGeros, R.Z., *Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification*. Zeitschrift für Kardiologie, 2001. **90**(3): p. 116-124.
154. Alania, Y., et al., *In vitro remineralization of artificial enamel caries with resin composites containing calcium phosphate particles*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2019. **107**(5): p. 1542-1550.
155. Mirtchi, A.A., J. Lemaitre, and N. Terao, *Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate — monocalcium phosphate system*. Biomaterials, 1989. **10**(7): p. 475-480.
156. Constantz, B.R., et al., *Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites*. Journal of Biomedical Materials Research, 1998. **43**(4): p. 451-461.
157. Bohner, M., et al., *Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep*. Biomaterials, 2003. **24**(20): p. 3463-74.
158. Apelt, D., et al., *In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements*. Biomaterials, 2004. **25**(7-8): p. 1439-51.
159. Carrodeguas, R.G. and S. De Aza, *α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(10): p. 3536-3546.
160. Yamada, M., et al., *Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate in block grafts*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. **82**(1): p. 139-48.
161. Altermatt, S., M. Schwöbel, and J.P. Pochon, *Operative treatment of solitary bone cysts with tricalcium phosphate ceramic. A 1 to 7 year follow-up*. Eur J Pediatr Surg, 1992. **2**(3): p. 180-2.

162. Kwon, S.-H., et al., *Calcium Phosphate Bioceramics with Various Porosities and Dissolution Rates*. Journal of the American Ceramic Society, 2002. **85**(12): p. 3129-3131.
163. Hollinger, J.O., et al., *Role of bone substitutes*. Clin Orthop Relat Res, 1996(324): p. 55-65.
164. Klammert, U., et al., *Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(11): p. 2947-53.
165. Christel, T., et al., *Chelate Bonding Mechanism in a Novel Magnesium Phosphate Bone Cement*. Journal of the American Ceramic Society, 2015. **98**(3): p. 694-697.
166. Coe, F.L., A. Evan, and E. Worcester, *Kidney stone disease*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(10): p. 2598-2608.
167. Zhou, H., et al., *Microwave assisted preparation of magnesium phosphate cement (MPC) for orthopedic applications: A novel solution to the exothermicity problem*. Materials Science and Engineering: C, 2013. **33**(7): p. 4288-4294.
168. Tamimi, F., et al., *Biocompatibility of magnesium phosphate minerals and their stability under physiological conditions*. Acta Biomater, 2011. **7**(6): p. 2678-85.
169. Klammert, U., et al., *Phase composition, mechanical performance and in vitro biocompatibility of hydraulic setting calcium magnesium phosphate cement*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**(4): p. 1529-1535.
170. Hirvonen, L.J., et al., *Influence of bone cements on bone-screw interfaces in the third metacarpal and third metatarsal bones of horses*. Am J Vet Res, 2009. **70**(8): p. 964-72.
171. Gulotta, L.V., et al., *Augmentation of tendon-to-bone healing with a magnesium-based bone adhesive*. Am J Sports Med, 2008. **36**(7): p. 1290-7.
172. Mestres, G. and M.-P. Ginebra, *Novel magnesium phosphate cements with high early strength and antibacterial properties*. Acta Biomaterialia, 2011. **7**(4): p. 1853-1861.
173. Yu, Y., et al., *Evaluation of inherent toxicology and biocompatibility of magnesium phosphate bone cement*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2010. **76**(2): p. 496-504.
174. Mestres, G., et al., *Antimicrobial properties and dentin bonding strength of magnesium phosphate cements*. Acta Biomaterialia, 2013. **9**(9): p. 8384-8393.
175. Vorndran, E., *Rapid-Prototyping hydraulisch härtender Calcium- und Magnesiumphosphatzemente mit lokaler Wirkstoffmodifikation (Dissertation)*. 2011, Würzburg.
176. Brückner, M., *3D-Druck und Charakterisierung von Calciummagnesiumphosphaten für die Anwendung als regeneratives Knochenimplantat (Masterarbeit, unveröffentlicht)*. 2020, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin, Würzburg.
177. Vorndran, E., et al., *3D Powder Printing of β -Tricalcium Phosphate Ceramics Using Different Strategies*. Advanced Engineering Materials, 2008. **10**(12): p. B67-B71.
178. Seitz, H., et al., *Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **74**(2): p. 782-8.

179. Mistry, A.S. and A.G. Mikos, *Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration*, in *Regenerative Medicine II: Clinical and Preclinical Applications*, I.V. Yannas, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1-22.
180. Sudo, A., et al., *Treatment of infected hip arthroplasty with antibiotic-impregnated calcium hydroxyapatite*. J Arthroplasty, 2008. **23**(1): p. 145-50.
181. Uchida, A., et al., *Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramic*. J Orthop Res, 1992. **10**(3): p. 440-5.
182. Vorndran, E., et al., *Hydraulic setting Mg₃(PO₄)₂ powders for 3D printing technology*. Advances in Applied Ceramics, 2011. **110**(8): p. 476-481.
183. Detsch, R., et al., *In vitro: osteoclastic activity studies on surfaces of 3D printed calcium phosphate scaffolds*. J Biomater Appl, 2011. **26**(3): p. 359-80.
184. Klammert, U., et al., *Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing*. Acta Biomater, 2009. **5**(2): p. 727-34.
185. Habibovic, P., et al., *Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants*. Biomaterials, 2008. **29**(7): p. 944-53.
186. Fielding, G. and S. Bose, *SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensionally printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis in vivo*. Acta Biomater, 2013. **9**(11): p. 9137-48.
187. Tarafder, S., et al., *3D printed tricalcium phosphate scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model*. Biomater Sci, 2013. **1**(12): p. 1250-1259.
188. Tarafder, S., et al., *SrO- and MgO-doped microwave sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds: Mechanical properties and in vivo osteogenesis in a rabbit model*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2015. **103**(3): p. 679-690.
189. Repnik, U., M. Knezevic, and M. Jeras, *Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats*. J Immunol Methods, 2003. **278**(1-2): p. 283-92.
190. *Saure Phosphatase, Leukozyt (Verfahren Nr. 387)*. 2016. Sigma-Aldrich, Inc.
191. Heinemann, S., et al., *Properties of injectable ready-to-use calcium phosphate cement based on water-immiscible liquid*. Acta Biomater, 2013. **9**(4): p. 6199-207.
192. Samali, A., et al., *Thermotolerance and cell death are distinct cellular responses to stress: dependence on heat shock proteins*. FEBS Lett, 1999. **461**(3): p. 306-10.
193. Hannink, G., et al., *In vivo behavior of a novel injectable calcium phosphate cement compared with two other commercially available calcium phosphate cements*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2008. **85**(2): p. 478-88.
194. Krebs, J., et al., *Cardiovascular changes after pulmonary embolism from injecting calcium phosphate cement*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2007. **82**(2): p. 526-32.
195. Gbureck, U., et al., *Resorbable Dicalcium Phosphate Bone Substitutes Prepared by 3D Powder Printing*. Advanced Functional Materials, 2007. **17**(18): p. 3940-3945.

196. Bohner, M., et al., *Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2000. **11**(2): p. 111-116.
197. Ghanaati, S., et al., *Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo*. Acta Biomater, 2010. **6**(12): p. 4476-87.
198. Juhasz, J.A., et al., *Biological control of apatite growth in simulated body fluid and human blood serum*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(4): p. 1823-9.
199. Stengele, A., *Systematische Analyse der Abbindereaktion von Magnesiumphosphat mit Polyacrylsäure im Vergleich zu klassischen wässrigen Zementsystemen (Dissertation)*. 2017, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin, Würzburg.
200. Bengel, M., *In vitro Testung neuer Anwendungsformen kalthärtender Knochenzemente aus resorbierbaren Orthophosphaten (Dissertation)*. 2019, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin, Würzburg.
201. Romero-Güiza, M.S., et al., *Improving anaerobic digestion of pig manure by adding in the same reactor a stabilizing agent formulated with low-grade magnesium oxide*. Biomass and Bioenergy, 2014. **67**: p. 243-251.
202. Weisinger, J.R. and E. Bellorín-Font, *Magnesium and phosphorus*. Lancet, 1998. **352**(9125): p. 391-6.
203. Xia, Z., et al., *In vitro biodegradation of three brushite calcium phosphate cements by a macrophage cell-line*. Biomaterials, 2006. **27**(26): p. 4557-65.
204. Zhai, Z., et al., *The effect of metallic magnesium degradation products on osteoclast-induced osteolysis and attenuation of NF- κ B and NFATc1 signaling*. Biomaterials, 2014. **35**(24): p. 6299-310.
205. Wu, L., et al., *Effects of extracellular magnesium on the differentiation and function of human osteoclasts*. Acta Biomater, 2014. **10**(6): p. 2843-54.
206. Robinson, D.A., et al., *In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1869-77.
207. Zhang, Z., et al., *Cell-based resorption assays for bone graft substitutes*. Acta Biomater, 2012. **8**(1): p. 13-9.
208. Yasuda, H., et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(7): p. 3597-3602.
209. Hsu, H., et al., *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(7): p. 3540-3545.
210. Blotière, H.M., et al., *Utilization of activated U937 monocytic cells as a model to evaluate biocompatibility and biodegradation of synthetic calcium phosphate*. Biomaterials, 1995. **16**(6): p. 497-503.
211. Abdallah, D., et al., *An Optimized Method to Generate Human Active Osteoclasts From Peripheral Blood Monocytes*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 632.

212. Shalhoub, V., et al., *Characterization of osteoclast precursors in human blood*. British Journal of Haematology, 2000. **111**(2): p. 501-512.
213. Costa-Rodrigues, J., A. Fernandes, and M.H. Fernandes, *Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14(+) and CD14(-) cell fractions*. Cell proliferation, 2011. **44**(5): p. 410-419.
214. Bernhardt, A., et al., *Osteoclastic differentiation and resorption is modulated by bioactive metal ions Co²⁺, Cu²⁺ and Cr³⁺ incorporated into calcium phosphate bone cements*. PLoS One, 2017. **12**(8): p. e0182109.
215. Diana, M., et al., *High magnesium corrosion rate has an effect on osteoclast and mesenchymal stem cell role during bone remodelling*. 2018.
216. Detsch, R., et al., *The resorption of nanocrystalline calcium phosphates by osteoclast-like cells*. Acta Biomater, 2010. **6**(8): p. 3223-33.
217. Halleen, J.M., et al., *Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption*. Clin Lab, 2006. **52**(9-10): p. 499-509.
218. Alatalo, S.L., et al., *Rapid Screening Method for Osteoclast Differentiation in Vitro That Measures Tartrate-resistant Acid Phosphatase 5b Activity Secreted into the Culture Medium*. Clinical Chemistry, 2000. **46**(11): p. 1751-1754.
219. Janckila, A.J., et al., *Naphthol-ASBI Phosphate as a Preferred Substrate for Tartrate-Resistant Acid Phosphatase Isoform 5b*. Journal of Bone and Mineral Research, 2001. **16**(4): p. 788-793.
220. Rissanen, J.P., et al., *Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model*. Calcif Tissue Int, 2008. **82**(2): p. 108-15.
221. Kadoya, Y., et al., *The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells*. Bone and Mineral, 1994. **27**(2): p. 85-96.
222. Glenske, K., et al., *Bioactivity of xerogels as modulators of osteoclastogenesis mediated by connexin 43*. Biomaterials, 2014. **35**(5): p. 1487-95.
223. Nakamura, M., et al., *Characterization of bone mineral-resembling biomaterials for optimizing human osteoclast differentiation and resorption*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(11): p. 3141-51.
224. Davison, N.L., et al., *Osteoclast resorption of beta-tricalcium phosphate controlled by surface architecture*. Biomaterials, 2014. **35**(26): p. 7441-51.
225. Burgess, T.L., et al., *The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts*. The Journal of cell biology, 1999. **145**(3): p. 527-538.
226. Geblinger, D., et al., *Effects of surface microtopography on the assembly of the osteoclast resorption apparatus*. Journal of The Royal Society Interface, 2012. **9**(72): p. 1599-1608.
227. Lakkakorpi, P.T. and H.K. Väänänen, *Calcitonin, prostaglandin E₂, and dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate disperse the specific microfilament structure in resorbing osteoclasts*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(10): p. 1487-93.
228. Lakkakorpi, P.T. and H.K. Väänänen, *Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle in vitro*. J Bone Miner Res, 1991. **6**(8): p. 817-26.

229. Lakkakorpi, P.T. and H.K. Väänänen, *Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle*. *Microsc Res Tech*, 1996. **33**(2): p. 171-81.
230. Saltel, F., et al., *Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts*. *Molecular biology of the cell*, 2004. **15**(12): p. 5231-5241.
231. Nakamura, I., et al., *Role of alpha(v)beta(3) integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone*. *J Cell Sci*, 1999. **112 (Pt 22)**: p. 3985-93.
232. Matsunaga, A., et al., *Microscopic study on resorption of β -tricalcium phosphate materials by osteoclasts*. *Cytotechnology*, 2015. **67**(4): p. 727-732.
233. Montazerolghaem, M., et al., *Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2015. **52**: p. 212-8.
234. Neutzsky-Wulff, A.V., et al., *Alterations in osteoclast function and phenotype induced by different inhibitors of bone resorption--implications for osteoclast quality*. *BMC musculoskeletal disorders*, 2010. **11**: p. 109-109.
235. Reichert, C., et al., *Resorption behavior of a nanostructured bone substitute: in vitro investigation and clinical application*. *J Orofac Orthop*, 2013. **74**(2): p. 165-74.
236. Nam, S.H., et al., *A status report on helium inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem*, 1996. **355**(5-6): p. 510-20.
237. Theiss, F., et al., *Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement*. *Biomaterials*, 2005. **26**(21): p. 4383-94.
238. Xia, Z.D., et al., *Macrophages in degradation of calcium phosphate compound artificial bone: an in vitro study*. *J Tongji Med Univ*, 1994. **14**(3): p. 137-41.
239. Xia, Z. and J.T. Triffitt, *A review on macrophage responses to biomaterials*. *Biomed Mater*, 2006. **1**(1): p. R1-9.
240. Sheikh, Z., et al., *Macrophages, Foreign Body Giant Cells and Their Response to Implantable Biomaterials*. *Materials (Basel, Switzerland)*, 2015. **8**(9): p. 5671-5701.
241. Junrui, P., et al., *Relationship between fluoride exposure and osteoclast markers during RANKL-induced osteoclast differentiation*. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016. **46**: p. 241-245.
242. Geblinger, D., L. Addadi, and B. Geiger, *Nano-topography sensing by osteoclasts*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 9): p. 1503-10.
243. John, A., et al., *In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic*. *Biomed Mater*, 2009. **4**(1): p. 015007.
244. Janning, C., et al., *Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(5): p. 1861-8.
245. Cianferotti, L., et al., *The calcium-sensing receptor in bone metabolism: from bench to bedside and back*. *Osteoporos Int*, 2015. **26**(8): p. 2055-71.
246. Zaidi, M., et al., *Divalent cations mimic the inhibitory effect of extracellular ionised calcium on bone resorption by isolated rat osteoclasts: further evidence for a "calcium receptor"*. *J Cell Physiol*, 1991. **149**(3): p. 422-7.

247. Cheng, X., et al., *The role of calcium and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) in human osteoclast formation and resorption*. *Calcif Tissue Int*, 2015. **96**(1): p. 73-9.
248. Centeno, P.P., et al., *Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion*. *Nature Communications*, 2019. **10**(1): p. 4693.
249. Cundy, T., I.R. Reid, and A. Grey, *CHAPTER 31 - Metabolic bone disease*, in *Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects (Third Edition)*, W.J. Marshall, et al., Editors. 2014, Churchill Livingstone. p. 604-635.
250. Arnett, T.R., *Acid–base regulation of bone metabolism*. *International Congress Series*, 2007. **1297**: p. 255-267.
251. Martin, G.R. and R.K. Jain, *Noninvasive Measurement of Interstitial pH Profiles in Normal and Neoplastic Tissue Using Fluorescence Ratio Imaging Microscopy*. *Cancer Research*, 1994. **54**(21): p. 5670-5674.
252. Biskobing, D.M. and D. Fan, *Acid pH increases carbonic anhydrase II and calcitonin receptor mRNA expression in mature osteoclasts*. *Calcif Tissue Int*, 2000. **67**(2): p. 178-83.
253. Schilling, A.F., et al., *Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts*. *Biomaterials*, 2004. **25**(18): p. 3963-72.

8 Anhang

8.1 Ergebnisse der Signifikanz-Analyse

Tabelle 8.1: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** zwischen den einzelnen Probentypen. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 17 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22	
PS, Tag 10				*																								
PS, Tag 16				*																								
PS, Tag 22				*																								
TCP, Tag 10	*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP, Tag 16											*		*			*	*	*		*	*						*	
TCP, Tag 22																												*
TCP-P, Tag 10				*																								
TCP-P, Tag 16				*																								
TCP-P, Tag 22				*																								
CM2,25-D, Tag 10				*																								
CM2,25-D, Tag 16				*																								
CM2,25-D, Tag 22				*	*																							
CM2,25-P, Tag 10				*																								
CM2,25-P, Tag 16				*																								
CM2,25-P, Tag 22				*	*																							
CM2,75-D, Tag 10				*	*																							
CM2,75-D, Tag 16				*	*																							
CM2,75-D, Tag 22				*	*																							
CM2,75-P, Tag 10				*																								
CM2,75-P, Tag 16				*																								
CM2,75-P, Tag 22				*	*																							
TMP-D, Tag 10				*																								
TMP-D, Tag 16				*																								
TMP-D, Tag 22				*																								
TMP-P, Tag 10				*																								
TMP-P, Tag 16				*																								
TMP-P, Tag 22				*	*																							

Tabelle 8.2: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivitäten** zwischen den einzelnen Probentypen. Die Kleinbuchstaben (a–d) kennzeichnen die Probentypen analog zu der Abbildung 18.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22	
PS, Tag 10	a	*					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PS, Tag 16	*	a	*			*				*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
PS, Tag 22		*	a		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP, Tag 10							*	*		*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP, Tag 16			*							*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP, Tag 22		*					*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 10	*		*	*	*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 22	*	*	*							*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*		b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10	*	*			*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*		*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*		*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*			*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 16	*	*			*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*		*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	d	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		d	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	d	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*			*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 16	*	*			*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 22		*			*					*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 8.3: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge** zwischen den einzelnen Probentypen. Die Kleinbuchstaben (a–c) kennzeichnen die Probentypen analog zu der Abbildung 19.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22		
PS, Tag 10																*			*										
PS, Tag 16										*	*					*	*	*							*				
PS, Tag 22												*						*		*									
TCP, Tag 10										*	*					*		*							*				
TCP, Tag 16										*	*					*	*	*						*					
TCP, Tag 22												*						*		*					*				
TCP-P, Tag 10										*	*					*	*	*							*				
TCP-P, Tag 16										*	*					*	*	*						*					
TCP-P, Tag 22										*	*					*	*	*						*					
CM2,25-D, Tag 10		*		*	*		*	*	*	a	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 16											a	*					*	*	*	*	*	*							
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
CM2,25-P, Tag 16										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
CM2,25-P, Tag 22										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
CM2,75-D, Tag 10	*	*		*	*		*	*	*		*	*	*	*	*	b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16		*		*	*		*	*	*		*	*	*	*	*		b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	b	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
CM2,75-P, Tag 16										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
CM2,75-P, Tag 22										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
TMP-D, Tag 10											*					*		*						c	*				
TMP-D, Tag 16											*						*		*						*				
TMP-D, Tag 22	*	*		*	*		*	*	*				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	c	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
TMP-P, Tag 16										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				
TMP-P, Tag 22										*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*			*				

Tabelle 8.4: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **pH-Werte** zwischen den einzelnen Probenotypen sowie dem Kulturmedium (K-Med). Der Kleinbuchstabe **a** kennzeichnet den Probenotyp analog zu der Abbildung 25.

	K-Med	PS, Tag 9	PS, Tag 15	PS, Tag 21	TCP, Tag 9	TCP, Tag 15	TCP, Tag 21	TCP-P, Tag 9	TCP-P, Tag 15	TCP-P, Tag 21	CM2,25-D, Tag 9	CM2,25-D, Tag 15	CM2,25-D, Tag 21	CM2,25-P, Tag 9	CM2,25-P, Tag 15	CM2,25-P, Tag 21	CM2,75-D, Tag 9	CM2,75-D, Tag 15	CM2,75-D, Tag 21	CM2,75-P, Tag 9	CM2,75-P, Tag 15	CM2,75-P, Tag 21	TMP-D, Tag 9	TMP-D, Tag 15	TMP-D, Tag 21	TMP-P, Tag 9	TMP-P, Tag 15	TMP-P, Tag 21
K-Med								*	*	*										*								
PS, Tag 9								*	*	*										*								
PS, Tag 15								*	*	*										*								
PS, Tag 21								*	*	*										*								
TCP, Tag 9								*	*					*						*								
TCP, Tag 15								*	*											*								
TCP, Tag 21								*	*	*										*								
TCP-P, Tag 9	*	*	*	*	*	*	*	a		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 15	*	*	*	*	*	*	*			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 21	*			*			*		a	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 9								*	*	*	*	*	*															
CM2,25-D, Tag 15								*	*	*	*	*	*							*								
CM2,25-D, Tag 21								*	*	*	*	*	*							*								
CM2,25-P, Tag 9					*			*	*	*				*	*	*												
CM2,25-P, Tag 15								*	*	*				*	*	*												
CM2,25-P, Tag 21								*	*	*				*	*	*												
CM2,75-D, Tag 9								*	*	*							*	*	*									
CM2,75-D, Tag 15								*	*	*							*	*	*									
CM2,75-D, Tag 21								*	*	*							*	*	*									
CM2,75-P, Tag 9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 15								*	*	*										*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 21								*	*	*										*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 9								*	*											*			*	*	*			
TMP-D, Tag 15								*	*											*			*	*	*			
TMP-D, Tag 21								*	*	*										*			*	*	*			
TMP-P, Tag 9								*	*	*										*						*	*	*
TMP-P, Tag 15								*	*	*										*						*	*	*
TMP-P, Tag 21								*	*	*										*						*	*	*

8.2 Teilergebnisse der DNA-Konzentrationen und TRAP-Volumenaktivitäten nach Spender

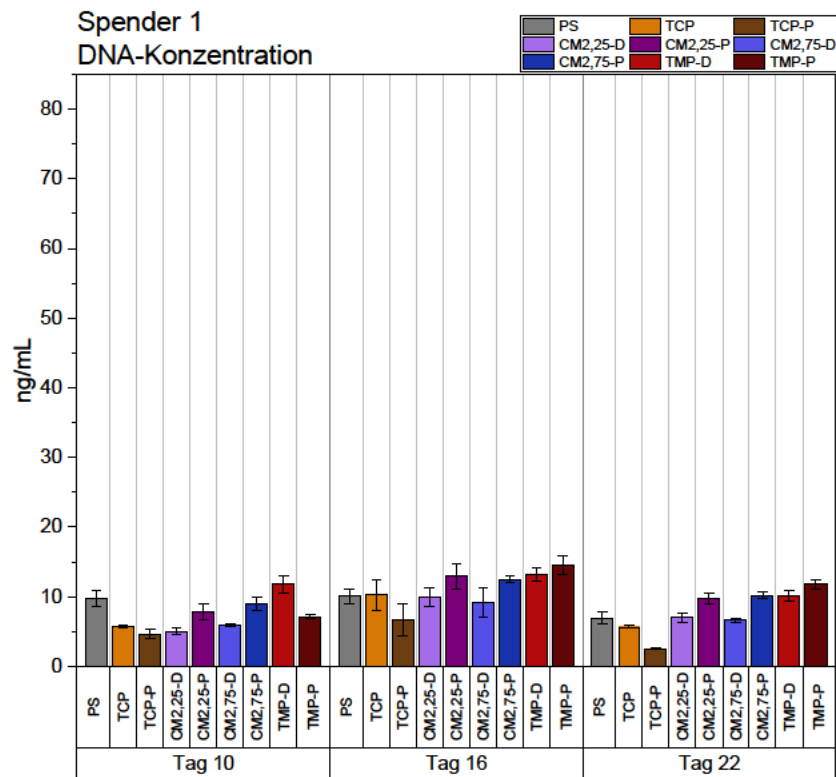


Abbildung 26: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen von Spender 1. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zelllysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.5 zu entnehmen.

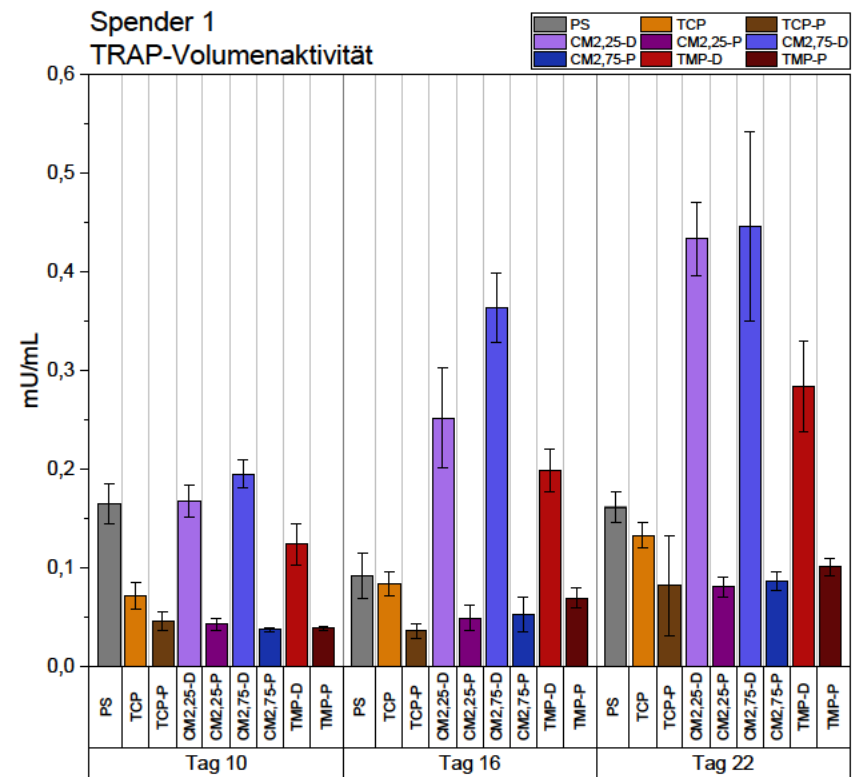


Abbildung 27: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten von Spender 1. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zelllysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.6 zu entnehmen.

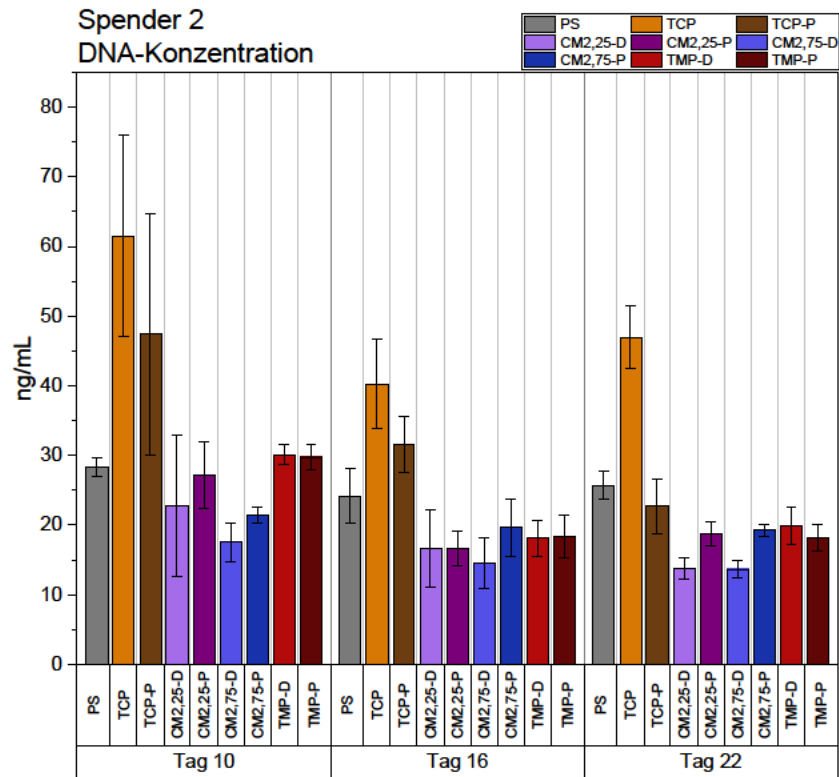


Abbildung 28: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen von Spender 2. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zelllysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.7 zu entnehmen.

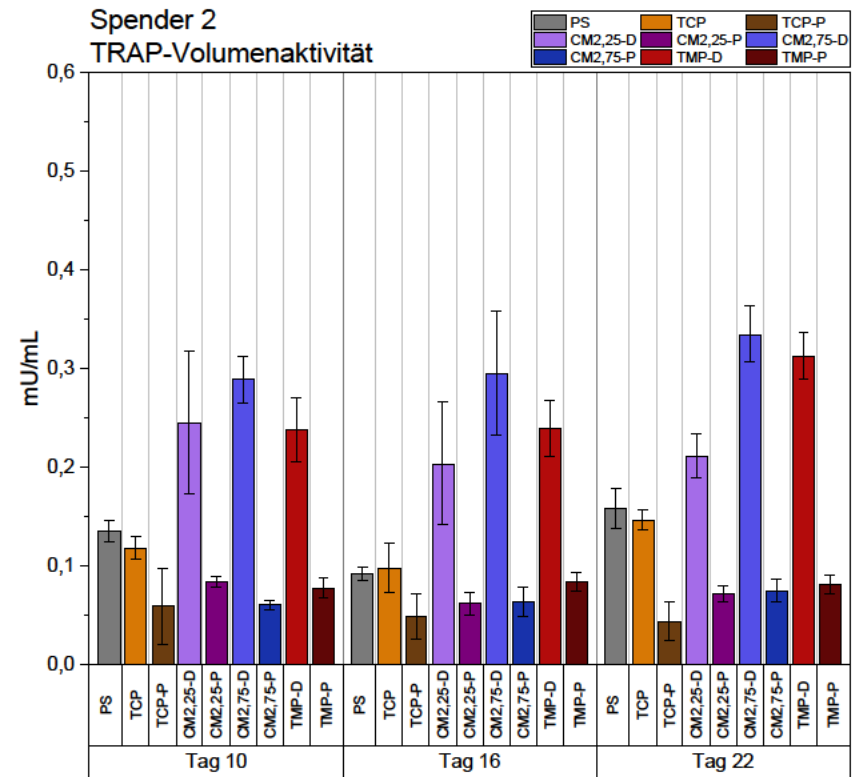


Abbildung 29: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten von Spender 2. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Anschließend wurden die hM mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Die Messungen der aufbereiteten Zelllysate wurden am Tag 10, 16 und 22 durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.8 zu entnehmen.

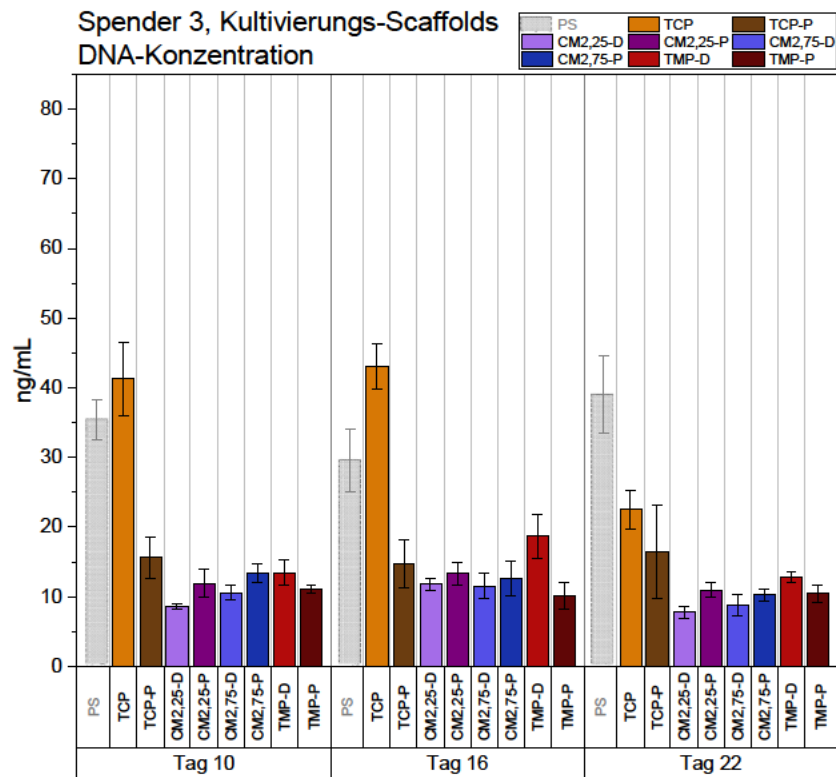


Abbildung 30: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen auf den Kultivierungs-Scaffolds von Spender 3. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds wurden $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Die hM wurden mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Vor der Zellyse wurden die Scaffolds aus ihren Kultivierungs-Wells herausgenommen und in frische Wells überführt. Die Messungen der Zellysate erfolgten am Tag 10, 16 und 22. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.9 zu entnehmen.

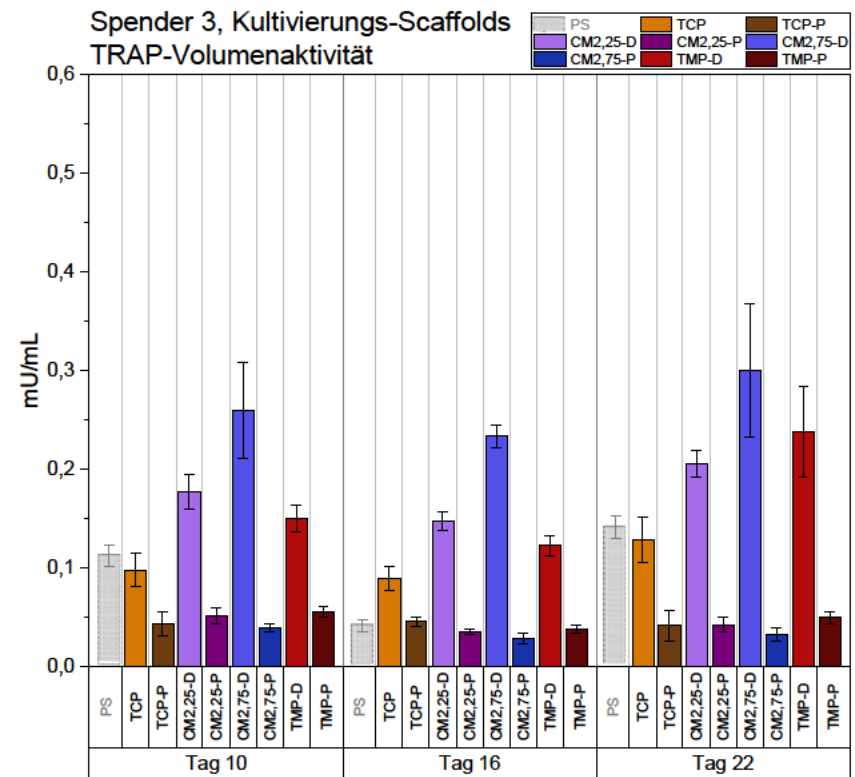


Abbildung 31: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten auf den Kultivierungs-Scaffolds von Spender 3. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds wurden $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Die hM wurden mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Vor der Zellyse wurden die Scaffolds aus ihren Kultivierungs-Wells herausgenommen und in frische Wells überführt. Die Messungen der Zellysate erfolgten am Tag 10, 16 und 22. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.10 zu entnehmen.

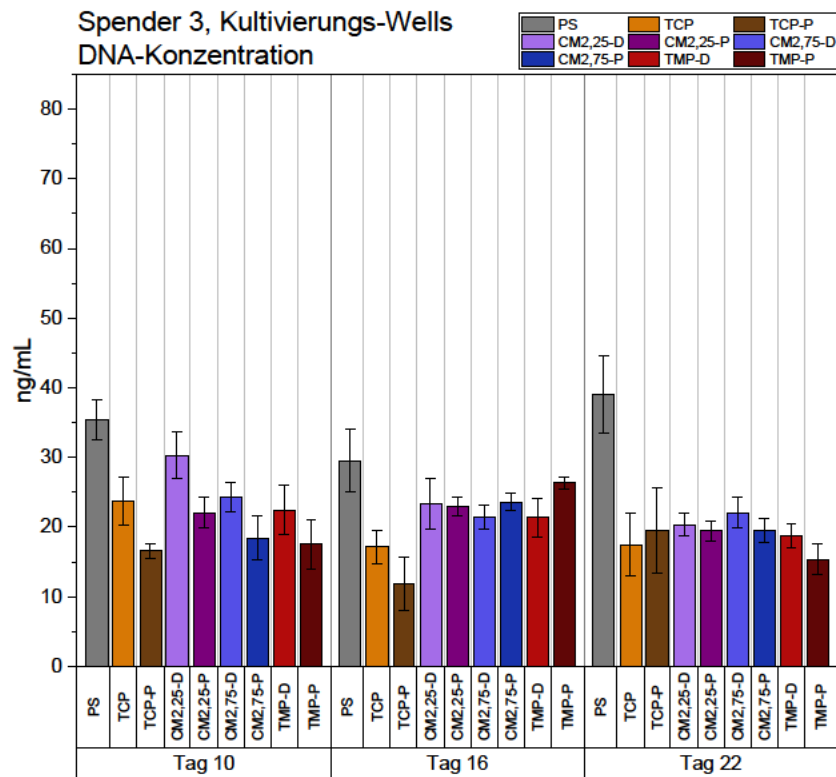


Abbildung 32: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen auf den Kultivierungs-Wells von Spender 3. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Die hM wurden mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Vor der Zellyse wurden die Scaffolds aus ihren Kultivierungs-Wells herausgenommen. Die Messungen der Zellysate erfolgten am Tag 10, 16 und 22. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.11 zu entnehmen.

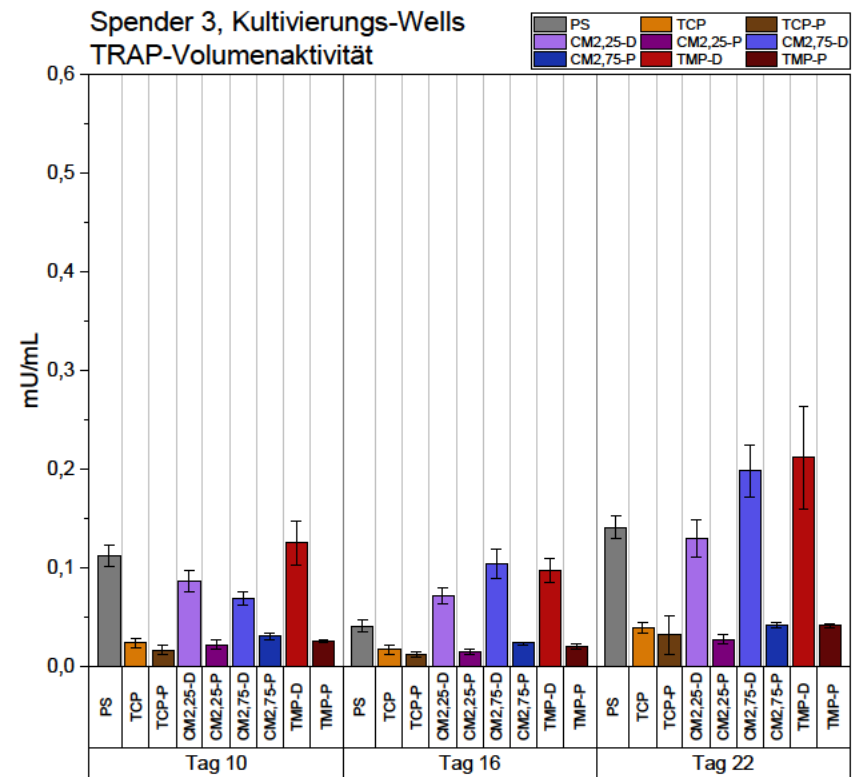


Abbildung 33: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten auf den Kultivierungs-Wells von Spender 3. Auf PS wurden $3,3 \times 10^5$ hM/cm² und auf den Scaffolds $6,6 \times 10^5$ hM/cm² ausgesät. Die hM wurden mit M-CSF und RANKL zur Osteoklastendifferenzierung stimuliert. Vor der Zellyse wurden die Scaffolds aus ihren Kultivierungs-Wells herausgenommen. Die Messungen der Zellysate erfolgten am Tag 10, 16 und 22. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Wechselwirkungen ($p < 0,05$) zwischen den Probenotypen sind der Tabelle 8.12 zu entnehmen.

Tabelle 8.5: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 1. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 26 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22		
PS, Tag 10																													
PS, Tag 16	*																												
PS, Tag 22	*	*	*																										
TCP, Tag 10	*	*	*																										
TCP, Tag 16	*	*	*	*																									
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*																							
TCP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																							
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*																				
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 8.6: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 1. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 27 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22			
PS, Tag 10																														
PS, Tag 16	*																													
PS, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP, Tag 10	*	*	*																											
TCP, Tag 16	*	*	*	*																										
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																								
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 8.7: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 2. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 28 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22
PS, Tag 10																								
PS, Tag 16	*																							
PS, Tag 22	*	*	*																					
TCP, Tag 10	*	*	*																					
TCP, Tag 16	*	*	*	*																				
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*																		
TCP-P, Tag 10	*	*	*																					
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																		
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*																		
CM2,25-D, Tag 10				*	*	*																		
CM2,25-D, Tag 16				*	*	*	*	*																
CM2,25-D, Tag 22	*			*	*	*	*	*	*															
CM2,25-P, Tag 10				*	*	*																		
CM2,25-P, Tag 16				*	*	*	*	*	*															
CM2,25-P, Tag 22				*	*	*	*	*	*	*														
CM2,75-D, Tag 10				*	*	*																		
CM2,75-D, Tag 16	*			*	*	*	*	*	*															
CM2,75-D, Tag 22	*			*	*	*	*	*	*	*														
CM2,75-P, Tag 10				*	*	*																		
CM2,75-P, Tag 16				*	*	*	*	*	*	*														
CM2,75-P, Tag 22				*	*	*	*	*	*	*	*													
TMP-D, Tag 10				*	*	*																		
TMP-D, Tag 16				*	*	*	*	*	*	*														
TMP-D, Tag 22				*	*	*	*	*	*	*	*													
TMP-P, Tag 10				*	*	*																		
TMP-P, Tag 16				*	*	*	*	*	*	*	*													
TMP-P, Tag 22				*	*	*	*	*	*	*	*	*												

Tabelle 8.8: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 2. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 29 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22
PS, Tag 10																								
PS, Tag 16	*																							
PS, Tag 22	*	*	*																					
TCP, Tag 10																								
TCP, Tag 16				*	*	*																		
TCP, Tag 22				*	*	*	*	*	*															
TCP-P, Tag 10	*	*	*																					
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																		
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*															
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*																		
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*															
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*												
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*															
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*												
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 8.9: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** auf den Kultivierungs-Scaffolds zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 3. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 30 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22	
PS, Tag 10																												
PS, Tag 16	*																											
PS, Tag 22	*	*																										
TCP, Tag 10																												
TCP, Tag 16	*	*																										
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*																			
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	

Tabelle 8.10: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** auf den Kultivierungs-Scaffolds zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 3. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 31 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22	
PS, Tag 10																												
PS, Tag 16	*																											
PS, Tag 22	*	*																										
TCP, Tag 10																												
TCP, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*																			
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 8.11: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** auf den Kultivierungs-Wells zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 3. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 32 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22	
PS, Tag 10																												
PS, Tag 16	*																											
PS, Tag 22	*	*	*																									
TCP, Tag 10	*	*	*																									
TCP, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*																			
TCP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Tabelle 8.12: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** auf den Kultivierungs-Wells zwischen den einzelnen Probenotypen von Spender 3. Das entsprechende Diagramm ist in der Abbildung 33 dargestellt.

	PS, Tag 10	PS, Tag 16	PS, Tag 22	TCP, Tag 10	TCP, Tag 16	TCP, Tag 22	TCP-P, Tag 10	TCP-P, Tag 16	TCP-P, Tag 22	CM2,25-D, Tag 10	CM2,25-D, Tag 16	CM2,25-D, Tag 22	CM2,25-P, Tag 10	CM2,25-P, Tag 16	CM2,25-P, Tag 22	CM2,75-D, Tag 10	CM2,75-D, Tag 16	CM2,75-D, Tag 22	CM2,75-P, Tag 10	CM2,75-P, Tag 16	CM2,75-P, Tag 22	TMP-D, Tag 10	TMP-D, Tag 16	TMP-D, Tag 22	TMP-P, Tag 10	TMP-P, Tag 16	TMP-P, Tag 22	
PS, Tag 10																												
PS, Tag 16	*	*	*																									
PS, Tag 22	*	*	*	*	*	*																						
TCP, Tag 10	*	*	*																									
TCP, Tag 16	*	*	*	*	*	*																						
TCP, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*																			
TCP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*																						
TCP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TCP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,25-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CM2,75-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-D, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TMP-P, Tag 22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3D	Dreidimensional, drei Dimensionen
aTMP	Amorphes Trimagnesiumphosphat
BC	Buffy-Coat (Leukozytenfilm)
Bidest	Doppelt destilliertes (bidestilliertes) und steriles Wasser
BMU, BRU	Multizelluläre Grundeinheit (<i>Basic multicellular unit, Bone remodeling unit</i>)
bR	Bioresorption
BRK	Bayerisches Rotes Kreuz
BSA	Bovines Serumalbumin (siehe Tabelle 3.1)
Ca ²⁺	Calciumionen
CAD	Computer Aided Design
CaP	Calciumphosphat
cD	Chemisch-physikalische Degradation
CDHA	Calciumdefizienter Hydroxylapatit
cHA	Carbonisierter Hydroxylapatit
CM2,25	CM2,25-D und CM2,25-P
CM2,25-D	3D-gedrucktes, gesintertes und Diammoniumhydrogenphosphat-infiltriertes Calciummagnesiumphosphat der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$
CM2,25-P	3D-gedrucktes, gesintertes und Phosphorsäure-infiltriertes Calciummagnesiumphosphat der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$
CM2,25-Roh	Calciummagnesiumphosphat-Rohpulver der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$
CM2,25-Sin	3D-gedrucktes und gesintertes Calciummagnesiumphosphat der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,75}\text{Mg}_{2,25}(\text{PO}_4)_2$
CM2,75	CM2,75-D und CM2,75-P
CM2,75-D	3D-gedrucktes, gesintertes und Diammoniumhydrogenphosphat-infiltriertes Calciummagnesiumphosphat der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$
CM2,75-P	3D-gedrucktes, gesintertes und Phosphorsäure-infiltriertes Calciummagnesiumphosphat der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$
CM2,75-Roh	Calciummagnesiumphosphat-Rohpulver der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$
CM2,75-Sin	3D-gedrucktes und gesintertes Calciummagnesiumphosphat der stöchiometrischen Summenformel $\text{Ca}_{0,25}\text{Mg}_{2,75}(\text{PO}_4)_2$

Abkürzung	Bedeutung
CMPC	Calciummagnesiumphosphatzement
CPC	Calciumphosphatzement
CSD	Knochendefekte kritischer Größe (<i>Critical-sized bone defects</i>)
cTMP	Kristallines Trimagnesiumphosphat
DAHP	Diammoniumhydrogenphosphat
DCP	Dicalciumphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (siehe Tabelle 3.1)
Eppi	SafeSeal Reagiergefäße (siehe Tabelle 3.3)
Falcon	Zentrifugenröhrchen (siehe Tabelle 3.3)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum, fetal bovine serum</i>) (siehe Tabelle 3.1)
HA	Hydroxylapatit
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (siehe Tabelle 3.1)
hM	Humane Monozyten
HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose (siehe Tabelle 3.1)
ICP-MS	Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
KEM	Knochenersatzmaterial
<i>M</i>	Mittelwert
M-CSF	Macrophage-colony stimulating factor (siehe Tabelle 3.1)
Mg ²⁺	Magnesiumionen
MgP	Magnesiumphosphat
MPC	Magnesiumphosphatzement
N/A	Nicht verfügbar
N-ASBI-P	Naphthol-AS-BI-Phosphat
PBMC	Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (<i>Peripheral blood mononuclear</i>)
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (siehe Tabelle 3.1)
pNP	p-Nitrophenol (siehe Tabelle 3.1)
pNPP	p-Nitrophenylphosphat (siehe Tabelle 3.1)
PO ₄ ³⁻	Phosphationen
PS	Polystyrol
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand (siehe Tabelle 3.1)

Abkürzung	Bedeutung
REM	Rasterelektronenmikroskop
RGD	Aminosäuresequenz aus Arginin, Glycin und Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SSA	Spezifische Oberfläche
TCP	3D-gedrucktes und gesintertes Tricalciumphosphat (=TCP-Sin)
TCP-P	3D-gedrucktes, gesintertes und Phosphorsäure-infiltriertes Tricalciumphosphat
TCP-Roh	Tricalciumphosphat-Rohpulver
TCP-Sin	3D-gedrucktes und gesintertes Tricalciumphosphat (= TCP)
TMP-D	3D-gedrucktes, gesintertes und Diammoniumhydrogenphosphat-infiltriertes Trimagnesiumphosphat
TMP-P	3D-gedrucktes, gesintertes und Phosphorsäure-infiltriertes Trimagnesiumphosphat
TMP-Roh	Trimagnesiumphosphat-Rohpulver
TMPs	TMP-D und TMP-P
TMP-Sin	3D-gedrucktes und gesintertes Trimagnesiumphosphat
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
V.	Versionsnummer
VEGF	Vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
XRD	Röntgendiffraktometrie (<i>X-ray diffraction</i>)
zR	Zelluläre Resorption
α -TCP	α -Tricalciumphosphat
β -TCP	β -Tricalciumphosphat

8.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hierarchische Organisationsebenen des Knochens	5
Abbildung 2: Unterteilung des Osteoklasten in drei Domänen und eine Auswahl seiner Zellorganellen	11
Abbildung 3: Resorbierender Osteoklast und der Mechanismus der Säuresekretion	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte beim 3D-Pulverdruck im Inkjet-Verfahren	40
Abbildung 5: PBMC-Isolation aus BC mittels Pancoll	47
Abbildung 6: Isolation der monozytenangereicherten Suspension aus PBMC mit hyperosmotischer Percoll-Lösung	48
Abbildung 7: Monozytenisolierung aus der monozytenangereicherten Suspension mit isoosmotischer Percoll-Lösung	49
Abbildung 8: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der TCP-Zemente	64
Abbildung 9: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der CM2,25-Zemente	65
Abbildung 10: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der CM2,75-Zemente	66
Abbildung 11: Quantitative (a) und qualitative (b) Phasenzusammensetzung der TMP-Zemente	67
Abbildung 12: Zellfraktionsverteilung während der sukzessiven Monozytenisolierung mittels einer dreifachen Dichtegradientenzentrifugation	69
Abbildung 13: Fortschritt der Osteoklastendifferenzierung auf der PS-Referenz	70
Abbildung 14: TRAP-gefärbte Zellen auf der PS-Referenz	70
Abbildung 15: Übersicht der TRAP-gefärbten Zellen auf der PS-Referenz und den Scaffolds	73
Abbildung 16: Übersicht der TRAP-gefärbten Zellen auf der PS-Referenz und den Scaffolds in vergrößerter Darstellung	74
Abbildung 17: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen	76
Abbildung 18: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten	79
Abbildung 19: Messergebnisse der TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge	80
Abbildung 20: Übersicht der Aktin- und Nukleus-markierten Zellen auf den Zementen	83
Abbildung 21: Übersicht der Aktin- und Nukleus-markierten Zellen auf der PS-Referenz und den Kultivierungs-Wells	84
Abbildung 22: Übersicht der REM-Aufnahmen von den Versuchsoberflächen	87

Abbildung 23: Übersicht über das Ionenverhalten infolge der zellulären Resorption (zR), der chemischen Degradation (cD) sowie der Adsorption..... 93

Abbildung 24: Übersicht über das medienkorrigierte, kumulative Ionenverhalten infolge der Bioresorption und der Adsorption sowie die daraus folgenden Nettoresultate..... 95

Abbildung 25: pH-Werte der Kulturmediumüberstände 97

Abbildung 26: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen von Spender 1.....VI

Abbildung 27: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten von Spender 1.....VI

Abbildung 28: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen von Spender 2.....VII

Abbildung 29: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten von Spender 2.....VII

Abbildung 30: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen auf den Kultivierungs-Scaffolds von Spender 3.....VIII

Abbildung 31: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten auf den Kultivierungs-Scaffolds von Spender 3.....VIII

Abbildung 32: Messergebnisse der DNA-Konzentrationen auf den Kultivierungs-Wells von Spender 3IX

Abbildung 33: Messergebnisse der TRAP-Volumenaktivitäten auf den Kultivierungs-Wells von Spender 3.....IX

8.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der anorganischen Komponenten und des organischen Anteils von Knochen erwachsener Menschen.....	5
Tabelle 2.2: Ausgewählte physikalische Eigenschaften der Corticalis und der Spongiosa	8
Tabelle 3.1: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Zytokine und Kits	32
Tabelle 3.2: Technische Geräte	34
Tabelle 3.3: Verbrauchsmaterialien und Einmalartikel.....	35
Tabelle 3.4: Zusammensetzung der Ausgangsstoffe für die Biozementsynthese	38
Tabelle 3.5: Sinterparameter für die Scaffold-Grünkörper sowie ihre Abkürzungen nach dem Sinterbrand	41
Tabelle 3.6: Übersicht über die mit reaktiven Lösungen infiltrierten Scaffolds und ihre Abkürzungen	42
Tabelle 3.7: Zellkulturmedien für die Osteoklastenkultivierung.....	44
Tabelle 3.8: Lösungen für die Dichtegradientenzentrifugation pro 30 mL BC	45
Tabelle 3.9: Übersicht der Monozyteninkubation mit den verschiedenen Kulturmedien	50
Tabelle 3.10: Lösungen für die Messung der TRAP-Aktivität.....	55
Tabelle 3.11: Lösungen für die Fluoreszenzfärbung.....	57
Tabelle 3.12: Lösungen für die REM-Präparation.....	59
Tabelle 4.1: Kategorisierung der fluoreszenzmarkierten Zellen auf den Kultivierungs-Wells.....	82
Tabelle 8.1: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der DNA-Konzentrationen zwischen den einzelnen Probentypen	I
Tabelle 8.2: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der TRAP-Volumenaktivitäten zwischen den einzelnen Probentypen.....	II
Tabelle 8.3: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der TRAP-Aktivitäten pro DNA-Menge zwischen den einzelnen Probentypen	III
Tabelle 8.4: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der pH-Werte zwischen den einzelnen Probentypen sowie dem Kulturmedium	IV
Tabelle 8.5: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der DNA-Konzentrationen zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 1	X

Tabelle 8.6: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 1X

Tabelle 8.7: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 2XI

Tabelle 8.8: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 2XI

Tabelle 8.9: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** auf den Kultivierungs-Scaffolds zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 3XII

Tabelle 8.10: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** auf den Kultivierungs-Scaffolds zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 3XII

Tabelle 8.11: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **DNA-Konzentrationen** auf den Kultivierungs-Wells zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 3XIII

Tabelle 8.12: Übersicht über die vollständigen signifikanten Wechselwirkungen (*, $p < 0,05$) der **TRAP-Volumenaktivität** auf den Kultivierungs-Wells zwischen den einzelnen Probentypen von Spender 3XIII

8.6 Ethikvotum



Ethik-Kommission
der Universität Würzburg



Ethik-Kommission • Versbacher Str. 9 • 97078 Würzburg

Dr. Elke Vorndran
Universitätsklinikum Würzburg
Abteilung und Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin
und der Zahnheilkunde
Pleicherwall 2
97070 Würzburg

Ethik-Kommission
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Versbacher Str. 9
97078 Würzburg

Vorsitzende: Prof. Dr. E.-B. Bröcker
Geschäftsführung: K. Reith, Ass. Jur.
Dr. R. Wölfel
Sekretariat: S. Schmidt, A. Meister, A. Metzger
Telefon 0049 (0)931 31 48315
Telefax 0049 (0)931 31 87520
ethikkommission@uni-wuerzburg.de

Würzburg, 04.10.2019/am

bei Schriftwechsel bitte angeben: **20190905 01**

Verwendung anonymisierter Proben

Projekt: Zelluläre Resorption von $\text{CaMg}_3\text{-x}(\text{PO}_4)_2$ / Additive Fertigung personalisierter Knochenimplanate aus $\text{CaMg}_3\text{-x}(\text{PO}_4)_2$ für human- und veterinärmedizinische Anwendungen
DFG-Geschäftszeichen: VO2269/3-1

Sehr geehrte Frau Dr. Vorndran,

zu Ihrer Anfrage vom 05.09.2019 zu o.g. Frage bzw. Projekt nimmt die Ethik-Kommission wie folgt Stellung.

Seitens der Ethik-Kommission bestehen keine grundsätzlichen Einwände gegen die Verwendung von Gewebeproben oder Zellen aus Restmaterialien die im Rahmen von Routineoperationen/-maßnahmen anfallen und zur Entsorgung anstehen.

Bei der Verwendung dieser Materialien zu wissenschaftlichen Untersuchungen ist darauf zu achten, dass nur vollständig und irreversibel anonymisierte Materialien verwendet werden.

Genetische Untersuchungen sind nach Ihren Angaben nicht geplant.

Unter diesen Voraussetzungen bestehen keine Einwände für Ihre o.g. Untersuchungen.

Mit freundlichen Grüßen

Ausgefertigt im Auftrag

Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker
Seniorprofessorin
Vorsitzende der Ethik-Kommission

Ass. jur. Katharina Reith
Geschäftsführerin der Ethik-Kommission

Vorgelegte Unterlagen:

20190905 01 Resorption von neuentwickelten Knochenersatzmaterialien .pdf

8.7 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Frau Dr. Elke Vorndran für die Bereitstellung des Themas und für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde zu promovieren, herzlich bedanken. Auch möchte ich mich für die engagierte Unterstützung und die hervorragende Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit bedanken.

Mein großer Dank geht an die beiden Gutachter dieser Arbeit, Prof. Dr. Uwe Gbureck und Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler.

Bei Frau Dr. Andrea Ewald möchte ich mich für die zahlreichen Tipps und Verbesserungsvorschläge der Experimente bedanken.

Bei Alevtina Rosenthal möchte ich mich für die tolle Einweisungen in die biologische Arbeitsweise sowie die Hilfsbereitschaft bedanken.

Für die Herstellung der Zemente und die Unterstützung bei allen Fragen möchte ich mich bei Isabell Biermann bedanken.

Bei Tina Tylek und Friederike Kaiser möchte ich mich für die ausführlichen Anleitungen und die vielen Tipps bedanken.

Ich danke Judith Friedlein und Philipp Stahlhut für die Einweisungen und die REM-Aufnahmen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da sind und mich unermüdlich bei all meinen Vorhaben unterstützen, sowie Janine, die mich ermutigt und an meiner Seite ist.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) möchte ich für die Förderung des Forschungsprojekts danken.

Abschließend möchte ich mich bei dem tollen Team der FMZ-Abteilung bedanken, das ich stets als zuvorkommend, engagiert und motivierend erleben durfte, sodass ich mit viel Freude an diesem Thema arbeiten konnte.

8.8 Publikation

Eugen, Gefel, Moseke Claus, Schmitt Anna-Maria, Dümmler Niklas, Stahlhut Philipp, Ewald Andrea, Meyer-Lindenberg Andrea, and Vorndran Elke. "*Degradation of 3d-Printed Magnesium Phosphate Ceramics in Vitro and a Prognosis on Their Bone Regeneration Potential.*" *Bioactive Materials* 19 (2023/01/01/ 2023): 376-91. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.04.015>. (Impact Factor = 16.874)