

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

**Modifikation von Calciumphosphat-Biokeramiken
mit biologisch aktiven Metallionen**

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

vorgelegt von
Eva-Maria Carrera
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2015

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

Korreferent: Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.2016

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Kenntnisstand	6
2.1	Calciumphosphate	6
2.1.1	Gefällte Calciumphosphate	6
2.1.2	Gesinterte Calciumphosphate	7
2.2	Calciumphosphatzemente	8
2.2.1	Apatitbildende Zemente	9
2.2.2	Bruschtbildende Zemente	10
2.3	Einfluss von Metallionen auf biologische Prozesse im Körper	11
2.3.1	Überblick über die Wirkung von Metallionen im menschlichen Körper	12
2.3.2	Kobalt	15
2.3.3	Kupfer	17
2.3.4	Mangan	18
2.3.5	Nickel	19
2.3.6	Vanadium	20
2.3.7	Zink	21
3	Material und Methoden	24
3.1	Herstellung der Zementpulver	24
3.1.1	Herstellung von α -Tricalciumphosphat-Pulver	24
3.1.2	Modifikation des α -TCP-Pulvers mit Dinatriumhydrogenphosphat	25
3.1.3	Modifikation des α -TCP-Pulvers mit zugesinterten Metallionen	25
3.2	Herstellung der Probenkörper	26
3.3	Bestimmung der initialen Abbindezeit nach Gilmore	27
3.3.1	Messprinzip	27
3.3.2	Versuchsdurchführung	27
3.4	Bestimmung der Druckfestigkeit	28
3.5	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	29
3.6	Röntgendiffraktometrische Analyse im XRD	29
3.7	Massenspektrometrische Analyse mittels ICP-MS	30
3.7.1	Messprinzip	30
3.7.2	Bestimmung der Metallionenkonzentration in den Probenkörpern	30
3.7.3	Durchführung der Freisetzungsstudie	31

3.7.4	Analyse der Ionenfreisetzung während des Zellversuches	32
3.8	Bestimmung der Zytotoxizität	32
3.8.1	Zellkultivierung und Zellaussaat	32
3.8.2	WST-1 Zellvitalitätstest	33
3.8.3	Zellzahlbestimmung mittels CASY-1	34
3.9	Präparatherstellung für REM-Aufnahmen	35
3.10	Zytochemische Färbung der tartratresistenten sauren Phosphatase	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Initiale Abbindezeit nach Gilmore	38
4.2	Druckfestigkeit der Zemente	39
4.3	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	43
4.4	Röntgendiffraktometrische Analyse im XRD	47
4.5	Massenspektrometrische Analyse mittels ICP-MS	50
4.5.1	Metallionenkonzentration in den Zementplättchen	50
4.5.2	Freisetzungsstudie	52
4.6	Auswertung der Zellversuchsreihe	58
4.6.1	Bestimmung der Zellvitalität und der Zellzahl	59
4.6.2	Massenspektrometrische Analyse	62
4.6.3	Auswertung der Zellmorphologie	63
4.6.4	Auswertung der TRAP-Färbung	64
5	Diskussion	66
5.1	Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung	67
5.2	Analyse und Interpretation der erzielten Ergebnisse	68
5.2.1	Abbindezeit	68
5.2.2	Druckfestigkeit	69
5.2.3	Rasterelektronenmikroskopische Analyse	71
5.2.4	XRD-Analyse	72
5.2.5	ICP-MS-Analyse	73
5.3	Analyse und Interpretation der Zellversuche	74
5.4	Ausblick	76
6	Zusammenfassung	78
7	Literaturverzeichnis	80

Abkürzungen

ALP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone morphogenetic protein
CaP	Calciumphosphat(e)
CC	Calciumcarbonat
CPC	Calciumphosphatzemente
DCPA	Calciumhydrogenphosphat/Monetit
DCPD	Calciumhydrogenphosphatdihydrat/Bruschi
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
FGF	Fibroblast growth factor
HA	Hydroxylapatit
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ICP-MS	Inductively coupled plasma mass spectrometry
IL	Interleukin
INF	Interferon
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MCPM	Monocalciumphosphatmonohydrat
OCP	Octacalciumphosphat
PGE	Prostaglandin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
TCP	Tricalciumphosphat
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TTCP	Tetracalciumphosphat
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
XRD	X-ray diffraction

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

In der klinischen Medizin besteht ein großes Interesse an verschiedensten Knochenersatzmaterialien. Der Knochen ist kein statisches Organ, sondern unterliegt ständigen Umbauprozessen durch die er sich einer erhöhten Belastung anpassen oder auch Mikrorisse ausgleichen kann. Zu 70 % besteht der Knochen aus mineralischen Komponenten. Den größten Anteil daran hat Hydroxylapatit. Zusätzlich sind im natürlichen Knochengewebe auf Calciumphosphat-Basis noch Bruschit und Calciumpyrophosphat nachweisbar [1]. Die restlichen 30 % sind organische Komponenten, bevorzugt Kollagen. Durch den komplexen Verbund zwischen organischen und anorganischen Bestandteilen erhält der Knochen seine besondere mechanische Festigkeit und gleichzeitig Elastizität [2-4]. Durch Unfälle oder auch pathologische Prozesse können im Bereich des Stützapparates Hartgewebsdefekte entstehen, die in der Regel Einschränkungen der natürlichen Funktion zur Folge haben. Bis zu einer gewissen Größe, genannt „Critical-Size-Defect“ [5], kann der Körper eine Selbstheilung durch Aktivierung der körpereigenen Zellen bewirken. Wird diese kritische Defektgröße überschritten, kommt es zum Einwuchs von Bindegewebe in den Defektspace und damit zu einer eingeschränkten Leistungsfähigkeit des betreffenden Bereiches. Um die natürliche Funktion wieder herzustellen, ist es in solch einem Fall notwendig den Defekt mit einem Knochenersatzmaterial zu überbrücken [5-7]. Als Knochenersatzwerkstoffe kommen unterschiedliche Materialien in Frage, seien sie autogen, allogene, xenogene oder alloplastisch. Als Goldstandard gilt immer noch der autogene Knochen als eine der zuverlässigsten Methoden in Hinblick auf die Integration des Implantates und auf die Wiederherstellung der Funktion [8]. Er kann beispielsweise aus der Beckenkammregion oder dem Schulter- und Rippenbereich des Patienten gewonnen werden. Jedoch steht der autogene Knochen nur in begrenzter Menge zur Verfügung und hat den großen Nachteil, dass zur Gewinnung ein zweites Operationsgebiet erforderlich ist, mit zusätzlichen Risiken für den Patienten. Xenogenem, von einer anderen Spezies stammendem Ersatzmaterial, stehen die Patienten häufig ablehnend gegenüber. Zusätzlich muss es, wie auch allogenes Spendermaterial, das von einem

anderen Individuum der gleichen Spezies stammt, aufwändig gereinigt werden, um Infektionen wie beispielsweise mit HIV auszuschließen oder um Antigen-Antikörper-Reaktionen wegen des unterschiedlichen Erbguts zu vermeiden. Eine Defektdeckung durch alloplastische, künstlich hergestellte Knochenersatzmaterialien, ist somit von großem medizinischem Interesse. Besonders die einfache Sterilisierbarkeit, die Lagerung und das unbegrenzte Angebot solcher Materialien machen diese sehr attraktiv. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von synthetisch hergestellten Knochenersatzmaterialien aus Calciumphosphat-Zementen, Keramiken aus Hydroxylapatit über Metalle bis hin zu Kunststoffen [9]. Knochenersatzmaterialien dienen entweder als dauerhafter Ersatz von Knochen oder, falls sie osteokonduktiv wirken, als poröses Leitgerüst in das durch Einwanderung von körpereigenen Zellen neuer Knochen eingebaut wird. Bei Verwendung von resorbierbaren Materialien wird das Spendermaterial nach und nach durch autogenen Knochen ersetzt [10]. Welches Material verwendet wird, hängt vor allem von der Defektgröße und der Defektregion ab. In Regionen, die einer starken mechanischen Belastung ausgesetzt sind, müssen stabile Materialien wie beispielsweise Titan verwendet werden. In nicht lasttragenden Bereichen werden eher Calciumphosphat-Keramiken beziehungsweise -Zemente oder auch resorbierbare Polymere verwendet.

Die Anforderungen an Knochenersatzwerkstoffe sind vielfältig. Sie reichen von Biokompatibilität, guter Sterilisierbarkeit, ausreichender Stabilisierung des Defektes über gute Resorbierbarkeit bis hin zu osteokonduktiven Eigenschaften. Neben diesen grundlegenden Eigenschaften sollen moderne Knochenersatzmaterialien auch bioaktive Eigenschaften besitzen und damit unter anderem das Zellwachstum und die Angiogenese als Grundbedingung für eine knöcherne Integration des Implantates fördern. Zahlreiche Faktoren wie chirurgische Fehler, Infektionen, Implantatmaterial und -design ebenso wie patientenspezifische Faktoren spielen beim Versagen von prothetischen Implantaten eine Rolle. Entscheidend für die Einheilung von Implantaten sind die Topographie, die Zusammensetzung und die chemisch-physikalischen Eigenschaften des eingebrachten Werkstoffes [11]. Beispielsweise konnte in *in-vivo*-Versuchen mit Hunden gezeigt werden, dass sich um poröse

Hydroxylapatit-Granulate neuer Knochen bildet, wohingegen es bei sehr dichten Granulaten zu keiner Knocheneinlagerung kommt. Vermutlich beeinflusst das Mikromilieu innerhalb der porösen Hydroxylapatit-Strukturen die Körperzellen und folglich die Osteogenese [12]. Besonders wichtig für die Langzeitstabilität eines Implantates ist seine Oberflächenbeschaffenheit, da dort die erste Interaktion zwischen implantiertem Material und dem umgebenden Gewebe mit Proteinen und Zellen stattfindet [13, 14]. Dabei ist es wichtig eine Entzündungsreaktion zu vermeiden und im Gegenzug die Geweberegeneration und das Zellwachstum zu fördern. Es gibt zahlreiche Studien zur Verbesserung der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Implantaten unter anderem durch Modifikation des Werkstoffes mit anorganischen Ionen oder mit Proteinen. Verwendung finden im Bereich der Protein-Modifikation beispielsweise VEGF (vascular endothelial growth factor) als wichtiges Signalmolekül für eine schnellere Angiogenese [15-17], Knochenwachstumsfaktoren (bone morphogenetic proteins, BMP), welche die Differenzierung von Mesenchymzellen in Osteoblasten beeinflussen und das Knochenwachstum fördern [14] oder Fibronectin für eine verbesserte Zelladhäsion an Implantaten [18]. Zur Modifikation von Implantatoberflächen mit biologisch wirksamen Proteinen werden diese auf den Oberflächen immobilisiert entweder adsorptiv [15, 19] oder durch kovalente Bindungen [19, 20]. Die biologische Wirksamkeit ist jedoch durch die Menge der verfügbaren Proteine limitiert. Darüber hinaus ist die Handhabung ebenso wie Sterilisation und Lagerung der modifizierten Materialien aufwändig und daher mit hohen Kosten verbunden. Calciumphosphat-Biokeramiken werden seit langer Zeit intensiv als Knochenersatzmaterialien erforscht [21]. Sie sind nicht immunogen, kanzerogen oder teratogen und besitzen eine gute Biokompatibilität. Als Knochenersatzmaterial hat Hydroxylapatit aufgrund seiner Ähnlichkeit zur anorganischen Matrix des Knochens großes Potential [19]. An Implantaten aus porösem Hydroxylapatit kommt es zu einer direkten Anlagerung von neugebildetem Knochen ohne fibröse Zwischenschicht [12, 22, 23]. Allerdings ist die Verwendung von Hydroxylapatit als lasttragender Knochenersatz durch die schwachen mechanischen Eigenschaften des Materials, besonders durch seine

Sprödheit, limitiert. Eine kostengünstige Alternative ist die Modifizierung von Implantaten mit verschiedenen Metallionen [24-26], wie in dieser Arbeit beschrieben. Sie sind nicht nur kostengünstig, sondern zudem nahezu unbegrenzt haltbar, einfach zu handhaben und zu sterilisieren. Kanzerogene und mutagene Einflüsse können durch die Verwendung von Ionendosen unterhalb der toxischen Grenze ausgeschlossen werden [27]. Als Spurenelemente sind Metallionen meist essentiell für verschiedene Vorgänge im menschlichen Körper wie die Beteiligung an Stoffwechselprozessen und Zellfunktionen oder die Aktivierung und Inaktivierung enzymatischer Prozesse [28]. Im Bereich des Hartgewebes können beispielsweise durch verschiedene Metallionen konzentrationsabhängig Osteoklasten stimuliert (Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{2+}) [27, 29] oder gehemmt werden (Zn^{2+} , Sr^{2+}) [30, 31], die Osteoblastendifferenzierung und -adhäsion gesteigert (Mg^{2+} , Si^{2+} , V^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+}) [32-38] oder die Angiogenese gefördert werden (Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) [39-46]. Auch andere Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und Mastzellen, aber auch Tumorzellen können durch Metallionen beeinflusst werden [47-49]. Die Wirkungsweise der Metallionen beruht dabei auf ihrer Funktion als katalytische Co-Faktoren.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen der Modifizierung von Calciumphosphat-Biokeramiken mit biologisch aktiven Metallionen auf unterschiedliche Eigenschaften hin zu untersuchen. Probenkörper aus porösem, calciumdefizitärem, nanokristallinem Hydroxylapatit, der durch eine Zementabbindereaktion von α -Tricalciumphosphat mit wässriger Lösung entsteht, wurden mit verschiedenen Metallionen (Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , V^{3+} , Zn^{2+}) modifiziert. Im Anschluss wurden die Zementplättchen hinsichtlich bestimmter Eigenschaften wie Druckfestigkeit und initiale Abbindezeit untersucht und einer rasterelektronenmikroskopischen, röntgendiffraktometrischen und massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Als Ergänzung wurden Zellversuche bezüglich der Zytokompatibilität der modifizierten Materialien durchgeführt. Da dieser Knochenersatzwerkstoff *in vivo* unter physiologischen Bedingungen nur durch Osteoklasten mittels einer lokalen pH-Wert-Absenkung

resorbiert werden kann, ist es möglich mit diesem Material aussagekräftige Ergebnisse über die Osteoklastenaktivität zu gewinnen.

2 KENNTNISSTAND

2.1 Calciumphosphate

Calciumphosphate kommen in den verschiedensten Formen vor und erlangen besonders im Bereich der Knochenersatzmaterialien immer größeres medizinisches Interesse. Bereits 1920 wurden die ersten *in-vivo*-Versuche von Albee und Morrison durchgeführt [50]. Außer im medizinischen Bereich werden Calciumphosphate beispielsweise in der Landwirtschaft als Dünger eingesetzt oder in der Pharmazie Zahnpasten beigemischt [51]. Grundsubstanz bei der Bildung von Calciumphosphaten ist die Orthophosphorsäure H_3PO_4 . Durch Abspaltung von Wasserstoff entstehen primäre (Dihydrogenphosphat), sekundäre (Hydrogenphosphat) und tertiäre Phosphate (PO_4^{3-}), die in Verbindung mit Calcium die verschiedenen Calciumphosphate ergeben. Medizinisch zu beachten ist dabei, dass diese umso löslicher sind, je kleiner das Ca-P-Verhältnis und je saurer das Milieu ist.

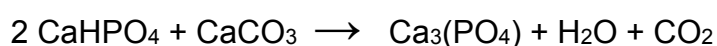
2.1.1 Gefällte Calciumphosphate

Die meisten gefällten Calciumphosphate sind natürlicherweise im menschlichen Gewebe enthalten [52]. Man gewinnt sie bei Raumtemperatur als Präzipitate aus einer wässrigen Lösung durch eine Lösungs-Fällungs-Reaktion. Medizinisch sind diese low-temperature Calciumphosphate hauptsächlich zur Herstellung von gesinterten Calciumphosphaten (high-temperature CaP) von Interesse [51]. Monocalciumphosphatmonohydrat mit der Summenformel $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ist mit dem kleinsten Calcium-Phosphat-Verhältnis das sauerste und löslichste der Calciumphosphate und kann wegen seiner fehlenden Biokompatibilität nur in Kombination mit basischen Calciumphosphaten wie α -TCP für die Herstellung von Knochenersatzmaterialien verwendet werden [53]. Es wandelt sich bei Temperaturen über 100 °C unter Abspaltung von Wasser in Monocalciumphosphat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$) um, das jedoch wegen seiner Acidität ebenfalls nicht biokompatibel ist. In der Nahrungsmittelindustrie wird Monocalciumphosphatmonohydrat als Säuerungsmittel verwendet. Calciumhydrogenphosphatdihydrat (Bruskit, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) werden osteokonduktive Eigenschaften zugesprochen [51]. Es ist biokompatibel und kann *in vivo* entweder abgebaut und durch Knochen ersetzt [54] oder zu calciummarmem Hydroxylapatit umgewandelt werden [55]. Allerdings kann es dabei zu

Entzündungsreaktionen kommen, da bei der Umwandlungsreaktion eine größere Menge an Säure freigesetzt wird [51]. Calciumhydrogenphosphatdihydrat kann sehr einfach synthetisch hergestellt werden. Da es metastabil ist, kann es je nach pH-Wert entweder in Dicalciumphosphat ($\text{pH} < 6$), Octocalciumphosphat ($\text{pH} = 6-7$) oder Hydroxylapatit ($\text{pH} > 7$) umgewandelt werden [51]. Natürlicherweise kommt Brushit in kleinen Mengen unter anderem im menschlichen Knochen und im Rahmen der Knochenheilung im Fraktur-Kallus vor [56]. Ein weiteres gefällttes Calciumphosphat ist Calciumhydrogenphosphat (Monetit, CaHPO_4). Es entsteht normalerweise durch Rekristallisation aus Brushit bei niedrigem pH-Wert [57]. Es ist wie dieses biokompatibel, *in vivo* degradierbar und wird gleichfalls für die Herstellung von Calciumphosphatzementen verwendet [51]. Monetit kommt ebenfalls im Fraktur-Kallus [56] und vermutlich auch im Knochen vor [58]. Außerhalb des medizinischen Anwendungsbereiches wird Calciumhydrogenphosphat in der Lebensmittelindustrie als Phosphatbeimengung verwendet. Von medizinischer Bedeutung ist auch gefällter Hydroxylapatit. Er entsteht durch Ausfällung aus einer wässrigen Lösung bei einem pH-Wert über 7 und ähnelt dem Apatit des Knochens. Mit Ausnahme der brushitbildenden Zemente haben alle kommerziell erhältlichen Calciumphosphatzemente als Hauptkomponente des Endprodukts gefällten (carbonisierten) Hydroxylapatit mit unterschiedlichen Ca-P-Verhältnissen, unterschiedlichen Kristallinitäten und Porositäten [51]. Octocalciumphosphat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), ein weiteres Calciumphosphat, ist biokompatibel, biodegradierbar und osteokonduktiv. Allerdings ist es bislang noch nicht gelungen dieses Calciumphosphat über eine Zementreaktion zu gewinnen [51]. Es kristallisiert sehr langsam und ist metastabil. Wahrscheinlich ist es ein Vorprodukt in der Mineralisation in Zähnen, Knochen und anderen Biomineralien [1, 59].

2.1.2 Gesinterte Calciumphosphate

Die medizinisch genutzten Calciumphosphate sind sogenannte „high-temperature“ Calciumphosphate, die durch Sinterung von Pulvergemischen aus Calciumhydrogenphosphat und Calciumcarbonat bei hohen Temperaturen nach folgender Reaktion entstehen [51, 60]:



DCPA CC TCP

Medizinisch wichtig sind vor allem α - und β -TCP sowie Hydroxylapatit. Die beiden Varianten der Tricalciumphosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), α - und β -TCP, können durch Modifizierung der Sinter Temperatur reversibel ineinander umgewandelt werden. Sie haben die gleiche Summenformel, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer Biodegradation, Biokompatibilität, ihrer Kristallstruktur und somit ihrer Löslichkeit in wässriger Lösung. β -Tricalciumphosphat ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) erhält man beispielsweise durch Sinterung äquimolarer Mengen von DCPD und gefällttem HA bei Temperaturen über $650\text{ }^\circ\text{C}$ und unter $1125\text{ }^\circ\text{C}$. Es ist weniger löslich als α -TCP, biologisch abbaubar und stellt die Hauptkomponente von bruschitbildenden Calciumphosphatzementen dar. Auch Kombinationen aus β -TCP und Hydroxylapatit, sogenannte biphasische Calciumphosphate, finden als Knochenersatzmaterialien Verwendung [51]. Bei Sinterung von β -TCP über $1125\text{ }^\circ\text{C}$ [61] und anschließender Abschreckung des Pulvers erhält man die Hochtemperaturvariante α -Tricalciumphosphat ($\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). Es ist im Gegensatz zu β -TCP gut löslich und kann in wässriger Lösung leicht in gefällten Hydroxylapatit umgewandelt werden. Vorwiegend wird es deshalb für die Herstellung von apatitbildenden Zementen herangezogen. α -TCP ist biokompatibel und im Vergleich zu β -TCP biologisch leichter abbaubar [51]. α - und β -TCP-Keramiken wirken osteokonduktiv, werden hydrolytisch und zellulär abgebaut und durch körpereigenen Knochen ersetzt [62]. Außer durch Fällungsreaktionen kann Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) durch Sinterung verschiedener Calciumphosphat-Gemische bei Temperaturen über $700\text{ }^\circ\text{C}$ gewonnen werden. Durch den Sinterprozess entsteht ein festerer Verbund der Kristalle. Es besitzt von den Calciumphosphaten die höchste Biokompatibilität und ist aufgrund seiner sehr festen Kristallstruktur im physiologischen Umfeld praktisch nicht löslich [51, 63]. Knochen kann sich direkt an Hydroxylapatit anlagern [64], weswegen das Material als Knochenersatzwerkstoff von großem medizinischen Interesse ist. Wegen seiner geringen mechanischen Werte ist die Verwendung als alleiniger Knochenersatz jedoch limitiert. In der Zahnmedizin haben Hydroxylapatit-beschichtete Titanimplantate Bedeutung erlangt [63]. Auch im Bereich der Augmentation findet Hydroxylapatit Verwendung. Er stellt in Knochen und Zähnen die größte mineralische Komponente dar [52, 63].

2.2 Calciumphosphatzemente

Per definitionem sind Zemente Stoffe oder Stoffgemische, die in Pulverform vorliegen. Sie werden mit einer wässrigen Lösung zu einer pastösen Masse angemischt, die anschließend erhärtet. Calciumphosphatzemente wurden in den 1980ern von Brown und Chow entdeckt und seitdem intensiv erforscht. Brown und Chow mischten Tetracalcium-Phosphat mit Dicalcium-Phosphat und erhielten ausgefällten Hydroxylapatit [65]. Im Hinblick auf das Endprodukt sind nur zwei Zemente klinisch relevant, apatit- und bruschitbildende Calciumphosphatzemente. Eines oder mehrere Calciumphosphate werden mit einer wässrigen Lösung vermengt, lösen sich und fallen aus der gesättigten Lösung als ein weniger lösliches Calciumphosphat aus. Während der Abbindereaktion wachsen die Calciumphosphat-Kristalle, verdichten sich und geben dem Zement seine mechanische Stabilität [51]. Während der Reaktion bleibt das Volumen relativ stabil und es entsteht kaum Wärme. Dies wiederum stellt für die medizinische Nutzung einen großen Vorteil dar. Die Zugbelastungsgrenze der Zemente ist sehr viel geringer (1 - 10 MPa) als die Druckbelastungsgrenze (10 - 100 MPa). Wegen der relativ geringen mechanischen Stabilität können Calciumphosphatzemente nur in Kombination mit metallischen Knochenersatzwerkstoffen oder bei kleinen nicht lasttragenden Defekten verwendet werden [51]. Anwendung finden Calciumphosphatzemente vor allem in der maxillo-facialen Chirurgie [66] und bei der Behandlung von distalen Radius-Frakturen [53]. Sie sind biokompatibel, bioaktiv [64] und osteokonduktiv [67].

2.2.1 Apatitbildende Zemente

Apatitbildende Zemente reagieren mit wässriger Lösung zu gefällttem Hydroxylapatit. Brown und Chow stellten 1983 erstmals aus equimolaren Mengen relativ basischen Tetracalciumphosphats und aus relativ saurem Calciumhydrogenphosphat oder Calciumhydrogenphosphatdihydrat einen selbsthärtenden Calciumphosphatzement her. Zusammen mit Wasser als flüssige Phase entstand als Endprodukt neutrales Hydroxylapatit nach folgender Reaktionsgleichung [68]:



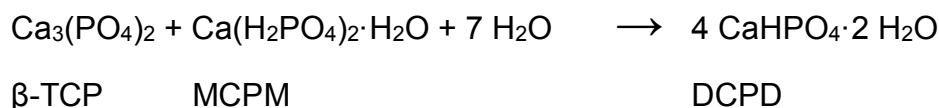
TTCP DCPA HA

Da diese Zemente wegen ihrer langen Abbindezeiten meist mit wenig Flüssigkeit angemischt werden, sind sie sehr viskos und leicht formbar. Um die Abbindezeit zu verkürzen, können dem Zement Zusätze wie Phosphorsäure oder

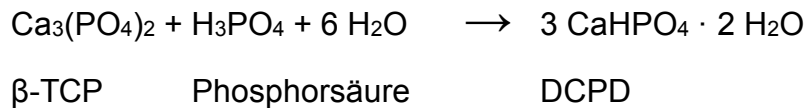
Monocalciumphosphatmonohydrat, ein saures Calciumphosphat, beigefügt werden [51]. Apatit-Zemente sind biokompatibel. Die Bildung von Hydroxylapatit verläuft ohne die Entstehung von basischen oder sauren Nebenprodukten. Wichtig ist es sicherzustellen, dass der Zement richtig aushärtet, da es sonst zu inflammatorischen Reaktionen kommen kann, vor allem durch lose Krümel der Zementpaste oder wegen mangelhafter Umwandlung in gefällten Hydroxylapatit [69]. Die Umwandlung zu Hydroxylapatit ist bei 37 °C innerhalb von vier Stunden nahezu vollendet [70] und findet ohne makroskopische Änderungen von Volumen und Form nahezu isotherm statt [71]. Biologisch werden diese Zemente nur sehr langsam durch Osteoklasten abgebaut. Dabei ist der Abbau umso langsamer, je fester die Zementkristalle ineinander verwoben und je kleiner die Porositäten sind [51]. Auf die mechanischen Eigenschaften hat besonders das Verhältnis der Menge des Zementpulvers zur Menge der Anmischflüssigkeit Einfluss. Je größer das Verhältnis von Zementpulver zu Flüssigkeit ist, desto geringer sind die Porositäten und mit deren Ansteigen wiederum verringern sich die Grenzen für Zug- und Druckbelastungen exponentiell. Im Gegensatz zu bruschitbildenden Zementen steigen die mechanischen Werte von Apatit-Zementen mit zunehmender Implantatliegedauer kontinuierlich an [72].

2.2.2 Bruschitbildende Zemente

Man erhält Bruschit-Zemente durch eine Säure-Base-Reaktion. Als Produkt entsteht Calciumhydrogenphosphatdihydrat, wobei Bruschit nur unter sauren Umgebungsbedingungen bei einem pH-Wert unter 6 ausfällt [1]. Um dies zu gewährleisten, wird beispielsweise β -TCP mit saurem Monocalciumphosphatmonohydrat angemischt [73]. Die Reaktion ist in nachfolgender Gleichung dargestellt:



Wird Phosphorsäure zum Anmischen verwendet, kann aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Anmischflüssigkeit auf die Verwendung von Monocalciumphosphatmonohydrat verzichtet werden [74]. Die Bildung von Bruschit erfolgt dann nach folgender Reaktionsgleichung:



Die Abbindezeit hängt dabei stark von der Löslichkeit der basischen Komponente ab und sie verläuft umso schneller, je höher die Löslichkeit der basischen Komponente ist. Wird Monocalciumphosphatmonohydrat mit Hydroxylapatit gemischt, beträgt die Abbindezeit mehrere Minuten [51], mit β -TCP 30-60 Sekunden und mit α -TCP nur wenige Sekunden [75]. Bruschi-Calciumphosphatzemente können anfänglich sehr flüssig sein und trotzdem innerhalb kürzester Zeit aushärten. Um klinisch praktikable Abbindezeiten zu erzielen, werden Abbindeverzögerer wie Pyrophosphat, Citrat- oder Sulfationen verwendet [75, 76]. Knochenersatzwerkstoffe aus Bruschi-Zementen haben eine hohe Biokompatibilität, wirken osteokonduktiv [51] und sind biologisch abbaubar [75]. Wenn große Mengen an Bruschi-Calciumphosphatzementen verwendet werden, kann es jedoch, vermutlich durch die bei der Umwandlung von Calciumhydrogenphosphatdihydrat in gefällten Hydroxylapatit freigesetzte Säure, zu inflammatorischen Reaktionen kommen [77, 78]. Durch Zugabe von Magnesiumionen zur Zementpaste kann die Umwandlung von DCPD in gefällten Hydroxylapatit unterdrückt werden [79]. Im Gegensatz zu Apatit-Zementen werden Bruschi-Zemente schneller abgebaut, da sie nicht nur durch Osteoklasten resorbiert werden, sondern sich zudem auch chemisch auflösen [51]. Die schnelle Auflösung des Zementes kann zur Bildung von unreifem Geflechtknochen führen. Durch Zugabe von nicht-resorbierbaren β -TCP-Granulaten, die als Halt für die Knochenbildung dienen, entsteht gut ausgereifter lamellärer Knochen [80]. Im Vergleich zu Apatit-Calciumphosphatzementen besitzen Bruschi-Calciumphosphatzemente schwächere mechanische Eigenschaften. Die Zugbelastungsgrenze liegt bei circa 10 Mpa [81] und die Grenze für Druckbelastungen bei circa 60 MPa [51]. Wegen der höheren Löslichkeit von Bruschi-Calciumphosphatzementen sinken *in vivo* die Grenzen für Zug- und Druckbelastung nach der Implantation, steigen jedoch mit zunehmender Knochenanlagerung wieder an [82].

2.3 Einfluss von Metallionen auf biologische Prozesse im Körper

2.3.1 Überblick über die Wirkung von Metallionen im menschlichen Körper

Metalle sind meist essentielle Spurenelemente für verschiedene Vorgänge im menschlichen Körper wie die Aktivierung und Inaktivierung enzymatischer Prozesse und die Beteiligung an Stoffwechselfvorgängen [28]. Mangan ist unter anderem an der Regulierung des „Knochenremodelings“ beteiligt [83, 84]. Ein Mangel führt zu Abnormitäten des Skeletts [85]. Nickel ist eines der bekanntesten Kontaktallergene. Vanadium kann antitumoral wirken [86-88] und wirkt ähnlich dem Insulin antidiabetisch [89-91]. Bei einer zinkarmen Ernährung kommt es unter anderem zu Fehlregulationen des Immunsystems, kognitiven Beeinträchtigungen und Wachstumsverzögerungen [92]. Metallionen oder Metalldebris können aus Implantaten freigesetzt werden und Zellen im periimplantären Gewebe beeinflussen. Dazu gehören unter anderem Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Osteoklasten und Osteoblasten [27, 33, 93-95]. Beispielsweise werden Makrophagen nach Phagozytose von metallischem Debris (Nickel, Kobalt, Chrom oder Eisen) zur erhöhten Freisetzung von knochenabbauenden Zytokinen wie Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α oder Interleukin-1 β angeregt. Als Folge kann es zur Osteolyse durch Osteoklastenstimulation und zum Verlust des Implantates kommen [27, 94, 96]. In verschiedenen Studien konnten bei Patienten mit aszeptisch gelockerten Prothesen erhöhte Mengen an Metallen in Serum oder Urin nachgewiesen werden [97]. Beim Versagen von prothetischen Implantaten spielen zahlreiche Faktoren wie chirurgische Fehler, Infektionen, Implantatmaterial und -design ebenso wie patientenspezifische Faktoren eine Rolle. Die Einheilung und Langzeitstabilität eines Implantates hängt entscheidend von der Oberflächenbeschaffenheit des Werkstoffes ab [11, 13, 14]. Von divalenten Kationen ist bekannt, dass sie die Affinität von Integrinen zu Liganden und damit die Zelladhäsion, unter anderem von Osteoblasten an eingebrachtem Biomaterial, erhöhen [98-100]. Durch modifizierte Knochenersatzmaterialien mit divalenten Kationen könnten so die Osteogenese, das Einheilen eines Implantates und die Differenzierung verschiedener Zellen positiv beeinflusst werden [83]. Besonders wichtig für das Einheilen eines Implantates ist die Angiogenese. Sie ist essentiell für die Knochenheilung, um den erhöhten Sauerstoff- und Nährstoffbedarf für die Reparatur gewährleisten zu können [45]. Nach traumatischen Knochenverletzungen oder chirurgischen Eingriffen am Knochen kommt es neben dem Auftreten von inflammatorischen Prozessen zur Ausbildung einer hypoxischen Zone [101-103]. Diese scheint die Angiogenese zu fördern und

reparative Prozesse zu induzieren [104-107]. Unter anderem wurde für Kobalt und Nickel gezeigt, dass sie diesen hypoxischen Zustand imitieren können und die Angiogenese fördern [29, 45]. So könnten Materialien, die mit diesen Metallionen modifiziert werden, zu einer Verbesserung der Angiogenese und Knochenheilung führen und damit folglich eine verbesserte Integration des Implantates in seine Umgebung erreicht werden. Je nach Erscheinungsform kann ein und dasselbe Metall verschiedene Effekte auf die Knochenzellen ausüben. So reduziert Titan in Ionenform die Osteoklastenzahl [32], wohingegen phagozytierte Titanpartikel zu einer erhöhten Freisetzung von osteoklastenaktivierenden Zytokinen und dadurch zu einer Erhöhung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität führen [108]. Die folgende Tabelle bietet einen Überblick über die Wirkung von Metallen im menschlichen Körper, insbesondere deren Auswirkung auf die Knochenzellen. Bei hohen Konzentrationen wirken die Metalle toxisch [109]. Unterhalb von 0,01 mM pro Liter konnte jedoch keine Toxizität von Metallionen nachgewiesen werden [110].

Tabelle 1 Überblick über die Wirkung verschiedener Metalle im menschlichen Körper

Metall(ion)	Wirkung	Wirkmechanismus
Calcium	Konzentrationsabhängige Hemmung oder Aktivierung der Osteoklastenaktivität [83, 111] Osteoblastenproliferation (2-4mM) und -differenzierung (6-8mM) [36] Matrixmineralisation (6-8 mM) [36]	Durch Erhöhung der extrazellulären Calciumkonzentration Hemmung der calciumsensitiven Osteoklasten unter anderem über Ca ²⁺ -Kanäle [111]
Chrom	Osteoklastenstimulation (0,01-1 µM) [27, 112] Stimuliert das Knochenremodeling [83]	Über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (eventuell durch Sauerstoffradikale) erhöhte Freisetzung von knochenabbauenden Zytokinen (IL 1-β, IL-6, TNF-α) aus Makrophagen bzw. Fibroblasten [27, 112] und Hemmung der Freisetzung von TGF-β1 aus Makrophagen/Monozyten [112]
Eisen	Osteoklastenstimulation (0,01-5 µM) [27] Dosisabhängige Reduzierung der Osteoklastenzahl durch Fe ²⁺ [32]	Bildung von Sauerstoffradikalen führt über NF-κB-Aktivierung zu erhöhter Freisetzung von osteoklastenstimulierenden Zytokinen (IL 1-β, IL-6, TNF-α) [27]
Kobalt	Osteoklastenstimulation (0,01-1 µM) [27, 29] Förderung der Angiogenese [44-46]	Bildung von Sauerstoffradikalen führt über NF-κB-Aktivierung zu erhöhter Freisetzung von osteoklastenstimulierenden Zytokinen (IL 1-β, IL-6, TNF-α) [27, 94] und Hemmung der Freisetzung von TGF-β1 [112] Direkte Osteoklastenstimulation über Imitierung eines hypoxischen Zustandes [29]

2. Kenntnisstand

Metall(ion)	Wirkung	Wirkmechanismus
	Hemmung der Osteoblastenproliferation und -aktivität [113]	Durch Erhöhung des HIF-1-Levels Förderung der VEGF-Genexpression in Osteoblasten [44-46]
Kupfer	Förderung der Angiogenese [43, 114]	Aktivierung von proangiogenen Faktoren wie Fibronectin [115], VEGF [116], FGF 1[117], FGF 2 [118], IL 1 α [119], Angiogenin [120]
Magnesium	Osteoblastenadhäsion [37] Knochenwachstum [121] vorübergehende Reduzierung der Osteoklastenzahl (circa 4 Wochen) [121]	Mg ²⁺ vermittelte Signalübertragung zur Adhäsion über Integrine [122] Erhöhung der Calciumkonzentration und Anhebung des pH-Werts führt zu gesteigerter Apatitbildung [38, 123]
Mangan	Förderung der Osteogenese [83] Radikalfänger [124] Antiinflammatorisch [125]	Erhöhte Affinität von Integrinen zu bestimmten Liganden erhöhen die Zelladhäsion [98]
Nickel	Osteoklastenstimulation (0,05-10 μ M) [27] Stimulierung der Angiogenese [45]	Bildung von Sauerstoffradikalen führt über NF- κ B-Aktivierung zu erhöhter Freisetzung von knochenabbauenden Zytokinen (IL 1- β , IL-6, TNF- α) [27, 94] Vermehrte Synthese von VEGF mRNA in Osteoblasten [45]
Silicium	Knochenmineralisation [126-128] Kollagensynthese [129, 130] Osteogenese [35, 131] Osteoblastendifferenzierung [129, 132] Vaskularisierung [35]	Beeinflussung des Knochenmetabolismus durch balancierte Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten [35]
Strontium	Steigerung der Knochenmasse durch reduzierte Knochenresorption und erhöhte Knochenbildung [133-135] Osteoklastenhemmung [135] Stimulierung von Knochenvorläuferzellen mit gesteigerter Proliferation und Zelldifferenzierung [31, 136] Vermehrte Bildung von extrazellulärer Matrix [31]	Hemmung der Osteoklastenaktivität [135] und Stimulierung von Knochenvorläuferzellen [31] Gesteigerte ALP-Aktivität und Sekretion von Osteoponin [31]
Titan	Steigerung der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität [108, 112] Gesteigerte Knochenresorption [108] Titan in Ionenform führt zur dosisabhängigen Reduzierung der Osteoklastenzahl (max. bei 10 μ g/ml) [32]	Phagozytose von Titanpartikeln durch Monozyten/Makrophagen führt über erhöhte Freisetzung von IL-1 β , TNF- α , IL-6 zur Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung [108, 112] Verminderte Freisetzung von TGF- β 1 [112]
Vanadium	Mitogene Wirkung auf Osteoblasten und Förderung der Osteogenese [33, 49] Hemmung der Osteoklastenbildung [32] Antitumorale Eigenschaften [49, 86]	Phosphorylierung und Aktivierung von ERK (extracellular signal regulated kinases) [33, 49]
Zink	Förderung der Knochenbildung [137] Stimulierung der Osteoblastenproliferation und -differentzierung [34, 138, 139]	Erhöhte ALP Aktivität und Kollagengehalt [34] Gesteigerte Proteinsynthese in Osteoblasten, vermutlich auf Ebene der Translation, führt zu gesteigerter

Metall(ion)	Wirkung	Wirkmechanismus
	Osteoklastenhemmung [30, 140] Antioxidant [141] Entzündungshemmend [30]	DNA-Synthese und erhöhter Proliferation von Osteoblasten [34] Modulierung des mRNA-Levels von Zytokinen [142]

Im Folgenden wird auf die Metalle, mit denen in den nachfolgenden Versuchen gearbeitet wurde, näher eingegangen. Besonderes Augenmerk wird dabei auf ihre Wirkung bezüglich des Knochenmetabolismus gelegt.

2.3.2 Kobalt

Kobalt ist ein Übergangsmetall der Gruppe VII und häufig ein Bestandteil von orthopädischen Implantaten. Da es relativ gut löslich ist, können leicht Gewebe oder Körperflüssigkeiten kontaminiert und Einfluss auf verschiedene Zellen im menschlichen Körper genommen werden [143, 144].

Indirekte und direkte Aktivierung von Osteoklasten

Kobaltionen und Kobaltpartikel aus orthopädischen Implantaten erhöhen die Osteoklastenaktivität und sind an der Initiierung von proinflammatorischen Vorgängen beteiligt [27, 94]. Niki et al. zeigten in *in-vitro*-Versuchen mit Makrophagen und synovialen Fibroblasten, dass es durch den Einfluss von Kobaltionen, aber auch durch Nickel-, Eisen- und Chromionen zu einer erhöhten Freisetzung von osteoklastenstimulierenden und somit den Knochenabbau fördernden Zytokinen kommt. Zelltypabhängig kommt es zu einer vermehrten Produktion beziehungsweise Freisetzung von Interleukin-6, Interleukin-1 β oder des Tumornekrosefaktors- α [27]. Die Metallionen induzieren dabei die Bildung von Sauerstoffradikalen, vor allem von Hydroxylradikalen (OH). Diese Radikale scheinen über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der Produktion von NF- κ B-abhängigen Zytokinen wie IL-6 in bestimmten Zielzellen beteiligt zu sein [27, 94]. Durch die Bildung von Sauerstoffradikalen induzieren Kobalt- und Nickelionen dosisabhängig über NF- κ B-Aktivierung auch die Gen-Transkription von Adhäsions-Molekülen wie ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in bestimmten Zielzellen und fördern somit proinflammatorische Vorgänge im Körper [94]. Zusätzlich wird die Freisetzung von TGF- β 1 aus Makrophagen/Monozyten nach Phagozytose von Kobaltpartikeln gehemmt [112]. Das Zytokin hat eine antiinflammatorische Wirkung und regt unter anderem Osteoblasten zur Knochenbildung an. Zusätzlich zur Stimulation von knochenabbauenden Zellen durch Zytokine können Osteoklasten durch gelöste

Kobaltionen auch direkt stimuliert werden. Durch diese Ionen werden hypoxische Zustände in Zellen imitiert, was eine Anregung der Osteoklasten zur Folge hat [29]. Im katalytischen Zentrum der HIF Prolyl-Hydroxylasen kann Fe^{2+} durch Co^{2+} ersetzt werden, was zu einer Inaktivierung dieses Enzyms und folglich zu einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors HIF- α führt [145-146]. Als Folge wird die Genexpression von HIF-ansprechenden Genen gesteigert [29, 146]. Der Transkriptionsfaktor HIF ist unter anderem bei der Regulierung der Angiogenese und der Erythropoese oder bei der Kontrolle von Zellwachstum und -migration beteiligt [145, 146]. Somit können schon geringe Mengen von Kobaltionen (0,1-1 μM) über die Imitierung eines hypoxischen Zustandes direkt eine Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten induzieren [29].

Hemmender Einfluss auf Osteoblasten

Zusätzlich zur Osteoklastenstimulation übt Kobalt einen hemmenden Effekt auf Osteoblasten aus. *In-vitro*-Versuche mit osteoblastenähnlichen Zellen zeigten, dass Kobalt ab einer Konzentration höher als 10 $\mu\text{g/ml}$ die Osteoblastenproliferation und -aktivität senkt. Zudem werden mit zunehmender Konzentration von Kobaltionen Osteoblasten zur Produktion von Interleukin-6 angeregt. Dieses Zytokin ist an Entzündungsreaktionen im Körper beteiligt und erhöht die Knochenresorption [113]. Außerdem wird nach Phagozytose von Kobaltpartikeln durch Osteoblasten vermehrt das entzündungsfördernde PGE2 ausgeschüttet [147].

Förderung der Angiogenese

Als weitere Eigenschaft fördert Kobalt die Angiogenese [44-46]. Sie ist Voraussetzung für eine gute Blutversorgung und folglich einer effizienten Osteogenese. In vielen Versuchen wurde gezeigt, dass VEGF, ein wichtiger Faktor in der Angiogenese, durch Hypoxie ebenso wie durch den Einfluss von Kobalt- und auch Nickelionen vermehrt gebildet wird. Beides sind Metalle, die den Zustand der Hypoxie in Zellen imitieren können [44, 45]. Kim et al. berichten, dass Kobalt in Osteoblasten, eventuell vermittelt über Sauerstoffradikale, eine Erhöhung des Proteinlevels von HIF-1 α bewirkt. Als Transkriptionsfaktor reguliert HIF-1 die Sauerstoffversorgung von Zellen und reguliert unter anderem das VEGF-Gen. Es kommt zu einer vermehrten Genexpression von VEGF [44] und folglich zu einer gesteigerten Angiogenese. Auch in anderen Organen können durch Kobalt positive Effekte ausgelöst werden. Tanaka et al. berichten beispielsweise über eine gesteigerte Angiogenese und reduzierte Apoptose von Zellen in der Niere während einer Kobaltsubstitution [46].

2.3.3 Kupfer

Als essentielles Spurenelement kommt Kupfer ubiquitär in der menschlichen Nahrung vor. Es ist intrazellulär in Nucleus und Zytosol menschlicher Zellen vorhanden [148] und übt einen großen Einfluss auf Endothelzellen aus. Es stimuliert diese Zellen *in vitro* [39] und fördert die Angiogenese *in vivo* [114].

Förderung der Angiogenese

Die Proliferation, Differenzierung und Migration von Endothelzellen ist wichtig für die während der Angiogenese aus bereits existierenden Blutgefäßen entstehenden neuen Gefäße [39]. Von Kupfer ist schon seit längerem bekannt, dass es ein wichtiger Co-Faktor für die Neubildung von Gefäßen ist [43, 114, 118]. Beispielsweise wurde in Versuchen mit Kaninchen gezeigt, dass eine kupferarme Ernährung die Blutgefäßbildung unterdrückt [114]. Das Metall gilt als Wachstumsfaktor von Endothelzellen, seit entdeckt wurde, dass durch eine 48-stündige Kupferexposition von Endothelzellen in einem Medium ihre Anzahl verdoppelt wurde [149]. Endothelzellen reagieren als erste Zellen auf proangiogenetische Reize. Die Proliferation und Zellmigration von Endothelzellen wird durch Kupfer gefördert [39, 43, 115, 149]. Durch das Metall werden proangiogene Faktoren stimuliert und somit die Angiogenese gefördert [115-120]. Für Kupferionen noch im mikromolaren Bereich (10^{-6} M) wurde gezeigt, dass die Fibronektinsynthese in Endothelzellen evoziert wird [115]. Fibronektin ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, das unter anderem in der Zelladhäsion und -migration eine wichtige Rolle spielt. Die Bildung von kleinsten Gefäßen wird angeregt und die Angiogenese gefördert [43, 114, 150]. Auch weitere proangiogene Faktoren wie VEGF [116], FGF 1 [117], FGF 2 [118], Il-1 α [119], Nuclear factor- κ B [118] oder Angiogenin [120] werden stimuliert. Wie genau Kupferionen die einzelnen Faktoren beeinflussen ist noch nicht geklärt.

Tumorwachstum

Kupfer scheint durch seine angiogene Wirkung auch eine stimulierende Wirkung auf das Wachstum bestimmter Tumore zu haben [43, 118, 151]. Sobald Tumore eine suffiziente Blutversorgung entwickelt haben, steigen Wachstum und Metastasierung

rapide an [118]. Das Wachstum bestimmter Tumore und die Angiogenese kann durch die Gabe von Kupfer-Chelatoren gehemmt werden [118, 151].

2.3.4 Mangan

Natürlicherweise kommt Mangan in kleinsten Mengen in Knochen und Zähnen vor [83, 152]. Es ist im menschlichen Körper neben vielen weiteren Funktionen unter anderem an der Regulierung des Knochenremodelings beteiligt [83, 84]. Als essentieller Co-Faktor für Glycosyltransferasen ist es wichtig für die Proteoglykansynthese [153]. Ein Mangel an Mangan beeinflusst die Bildung von knorpeliger Matrix und hemmt die enchondrale Osteogenese, was zu Abnormitäten des Skeletts führt [85]. Auch viele weitere Enzyme, unter anderem Metalloenzyme (Oxidasen, Dehydrogenasen) ebenso wie DNA- und RNA-Polymerasen und Kinasen benötigen das Spurenelement für ihre regelrechte Funktion [154]. Zu hohe Mangandosen sind jedoch toxisch und können neurologische Schäden hervorrufen, die einer Parkinson-Erkrankung ähneln [155, 156]. Deswegen gibt es für Mangan sehr komplexe Transportwege in und aus den Zellen des menschlichen Körpers, die bis dato noch nicht vollständig verstanden sind [154].

Förderung der Osteogenese

Mangan fördert die Osteogenese [83]. In Versuchen mit Ratten wurde gezeigt, dass es bei einer manganarmen Ernährung zu einer Hemmung sowohl von Osteoblasten als auch von Osteoklasten und damit zu einer verringerten Osteogenese kommt [157]. Bei suffizienter Manganaufnahme hingegen werden die Knochendichte und Knochenbildung erhöht [152] sowie der Knochenabbau verhindert [158]. In *in-vivo*-Versuchen mit Ratten hatte Mangan eine antiinflammatorische Wirkung und beugte Knochenabbau vor [125].

Aktivierung von Integrinen

Divalente Kationen wie Mn^{2+} beeinflussen die Affinität von Integrinen zu Liganden und somit die Zelladhäsion, unter anderem von Osteoblasten [98-100]. Integrine sind Transmembranproteine, auch als Adhäsionsmoleküle bezeichnet und wichtig für die Signalübermittlung zwischen Zellen und ihrer Umgebung. Für die zelluläre Interaktion zwischen Osteoblasten und der Implantatoberfläche sind diese Transmembranproteine von großer Bedeutung [159, 160]. Dabei hängt es vom Implantatmaterial ab, welche Integrine und extrazellulären Matrixproteine von den Zellen gebildet werden [159]. Die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit der

Integrine kann divalente Kationen wie Ca^{2+} , Mn^{2+} oder Mg^{2+} binden, wodurch die Affinität des Integrins zu Liganden verändert wird [100, 161, 162]. Byzova et al. zeigten in *in-vitro*-Versuchen, dass Mn^{2+} in Osteoblasten vorkommende Integrine aktivierte und es in Folge zu einer vermehrten Migration sowie schnelleren Zelladhäsion kam [98]. Mangan könnte somit die Integration von Knochenersatzmaterialien fördern. Allerdings wird bei zu hohen Konzentrationen die Proliferation der Osteoblasten gehemmt [163]. Werden Knochenersatzmaterialien mit Mangan modifiziert, beeinflusst das Metall die Gewebe- und Zellreaktion an der Grenzfläche zwischen Gewebe und Implantat [83].

Radikalfänger

Osteoklasten produzieren während der Knochenresorption freie Radikale. Ries et al. zeigten *in vitro*, dass Komplexe mit Mangan (Desferal-manganese complex) die Konzentration freier Radikale senken und somit die Knochenresorption hemmen können, ohne jedoch die Zellviabilität zu beeinträchtigen. Mn^{3+} -Ionen werden dabei zu Mangan-Dioxid umgewandelt [124].

2.3.5 Nickel

Nickel ist wie Kobalt ein Übergangsmetall der Gruppe VII und eines der bekanntesten Kontaktallergene.

Osteoklastenstimulation

Nickelionen sind in der Lage Osteoklasten über knochenabbauende Zytokine zu aktivieren [27]. Unter anderem wird durch Nickelionen in bestimmten Zellen wie Monozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erhöht [27, 94]. Dies führt zu einer erhöhten Produktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 oder E-Selektin [94] oder von knochenabbauenden Zytokinen wie IL-6, TNF- α oder IL-1 β [27] und folglich zu einer Aktivierung von Osteoklasten. Proinflammatorische Vorgänge im Körper werden somit durch Nickelionen gefördert.

Stimulierung der Angiogenese

Vergleichbar mit Kobalt kann durch Nickel der Zustand der Hypoxie in verschiedenen auf Sauerstoffmangel ansprechenden Genen imitiert werden. Dazu gehören beispielsweise das VEGF- oder das Erythropoetin-Gen [45, 164-166]. Unter

Sauerstoffmangel kommt es in verschiedenen Zellen wie Osteoblasten, Endothelzellen und Myokardzellen zu einer erhöhten Bildung von VEGF [45, 166-168]. Es wird vermutet, dass Eisen im Porphyrin-Ring der Proteinmoleküle durch Nickel ersetzt wird, sodass Sauerstoff mit geringerer Affinität gebunden wird [164]. Douglas et al. zeigten, dass *in vitro* unter Nickelsubstitution als wichtiger proangiogener Faktor vermehrt VEGF-mRNA in Osteoblasten gebildet wird [45].

2.3.6 Vanadium

In fast allen pflanzlichen und tierischen Zellen ist Vanadium als Spurenelement enthalten [33, 49]. Das Element besitzt komplexe chemische Eigenschaften. Es existieren verschiedene Oxidationsstufen von -1 bis +5. Dabei sind die am häufigsten auftretenden Wertigkeiten 2, 3 und 4 [169]. Im Blutplasma kommt es überwiegend als Metavanadat (VO_3^-) vor und wird über ein Anionentransportsystem in die Zellen gebracht und zur intrazellulär dominanten Form VO^{2+} reduziert [169, 170]. Nach oraler Gabe reichert es sich bevorzugt in Knochen, Niere, Milz und Leber an [33, 171, 172]. Vanadium übt im Körper viele relevante Funktionen aus. Manche Vanadiumverbindungen imitieren Wachstumsfaktoren [49, 173], andere wirken antitumoral [86-88]. Andere wiederum haben Effekte ähnlich dem Insulin und wirken antidiabetisch [89-91]. So stimulieren Vanadiumsalze die Glucose-Aufnahme und senken den Blutglucosespiegel [33, 95].

Förderung der Osteogenese

Vanadium sammelt sich in großen Mengen im Knochen an und scheint einen großen Einfluss auf die Knochenzellen zu haben [33, 171, 172]. Die Osteogenese wird gefördert [33, 95] und die Knochenresorption durch Senkung der Osteoklastenzahl gemindert [32]. In Tierversuchen mit Ziegen wurde gezeigt, dass es bei einer vanadiumarmen Diät zu Knochendefiziten kommt [174].

Mitogene Wirkung auf Osteoblasten

Für verschiedene Vanadiumverbindungen (unter anderem mit Ascorbinsäure, Trehalose oder anderen antiinflammatorischen Komponenten) wurde für geringe Konzentrationen ($< 25 \mu\text{M}$) gezeigt, dass sie eine mitogene Wirkung auf Osteoblasten haben. In diesen Konzentrationen wirken sie stimulierend auf die Osteoblastendifferenzierung und -proliferation [33, 95]. In größeren Mengen ($> 50-100 \mu\text{M}$) erhöhen sie hingegen die Apoptoserate und verursachen zytotoxische Effekte durch Inhibierung der Zellproliferation und der Aktivität der alkalischen

Phosphatase [33, 49, 95, 173, 175, 176]. Die alkalische Phosphatase ist ein Marker für die Osteoblastendifferenzierung und unter anderem wichtig für die Produktion der mineralischen Matrix [49]. Die verschiedenen Vanadiumverbindungen unterscheiden sich in ihrer Zytotoxizität [95, 176]. Im Allgemeinen sind Vanadium(V)-Komplexe stärker toxisch als Vanadium(IV)-Verbindungen [49]. Teilweise wird durch bestimmte Vanadiumkomplexe zudem die Produktion von Kollagen Typ-I, einem wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix, stimuliert und die Mineralisation der Matrix gefördert [33]. Vanadiumverbindungen wirken über verschiedene komplexe intrazelluläre Mechanismen. Ein wichtiger Weg über den Vanadium seine biologische Wirkung entfaltet, scheint die MAPK-Kaskade zu sein [95]. Vanadiumverbindungen verhalten sich wie Phosphatanalogue und inhibieren Phosphatasen (Protein-Tyrosine-Phosphatasen), was zur Phosphorylierung von Proteinen führt [177]. Als Folge werden Phosphorylierungskaskaden getriggert oder Kinasen direkt stimuliert [178]. ERKs in Osteoblasten werden phosphoryliert und damit aktiviert [95, 179, 180]. ERKs regulieren unter anderem die osteoblastenspezifische Genexpression, ihre Proliferation und Adhäsion und die Matrix-Mineralisation [181]. Auch scheinen Vanadiumkomplexe teilweise durch die Bildung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffradikalen (oxidativer Stress) zu wirken [180, 182]. Die erhöhte Apoptoserate von Zellen bei höheren Vanadiumkonzentrationen scheint teilweise mit der Bildung von Radikalen assoziiert zu sein [86, 180].

2.3.7 Zink

Zink ist ein essentielles Spurenelement und wichtig für das menschliche Wachstum [183]. Es ist unter anderem im Knochen enthalten, fördert sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Knochenwachstum [34, 137, 138, 184, 185] und hemmt die Knochenresorption [30, 140]. Als Co-Faktor für mehr als 300 Enzyme ist Zink an Zellfunktionen wie der Signaltransduktion, Transkription und Replikation beteiligt. Unter einer zinkarmen Ernährung kommt es unter anderem zu Fehlregulationen des Immunsystems, kognitiven Beeinträchtigungen und Wachstumsverzögerungen. Dieser Mangel kann jedoch durch eine vermehrte Aufnahme von Zink wieder ausgeglichen werden. Ebenso sind verschiedene Erkrankungen mit einem Mangel an Zink assoziiert wie das Malabsorptionssyndrom und chronische Erkrankungen von Niere und Leber [92].

Osteoblastenstimulation

In-vitro-Versuche mit Zink enthaltenden Tricalciumphosphaten zeigten, dass mit zunehmender Freisetzungsrates von Zink aus der Keramik die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten gegenüber der Kontrollgruppe mit reinen Tricalciumphosphaten deutlich gesteigert wurde [34, 138]. Das Maximum der Wachstumsrate wurde dabei bei einem Zinkgehalt von 1,26 wt. % Zn erreicht und zwar um 35 % höher als bei der Kontrollgruppe. Bei höherem Zinkgehalt kommt es hingegen zu zytotoxischen Effekten [34]. *In vitro* führt die Anwesenheit von Zink zu einer Erhöhung der Aktivität der alkalischen Phosphatase, die eine wichtige Rolle in der Knochenkalzifizierung spielt und zu einer Erhöhung des Calcium- und Kollagengehaltes im Knochen. All dies sind biochemische Parameter für die Knochenmineralisation und Knochenformation [34, 185]. Durch Zink wird *in vitro* vermutlich die Proteinsynthese in Osteoblasten auf der Ebene der Translation stimuliert. Dies führt zu einer gesteigerten DNA-Synthese und folglich zur Proliferation der knochenbildenden Zellen [139, 186].

Knochenwachstum

Eine Studie an Hasen von Kawamura et al. zeigte, dass zinkhaltige TCP-Keramik *in vivo* einen stimulierenden Effekt auf die Knochenbildung hat. ZnTCP-Implantate wurden in den Oberschenkelknochen implantiert und nach vier Wochen nachuntersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Anstieg der Knochenapposition um das Implantat nachgewiesen werden. Der optimale Zinkgehalt der Keramik lag bei 0,316 wt %, was dem 25-fachen Gehalt an Zink im menschlichen Knochen entspricht. Die Konzentration von Zink im Plasma blieb dabei unverändert, so dass Zink vermutlich nur in die nähere Umgebung des Implantates abgegeben wurde und keine systemischen Effekte hervorgerufen werden konnten. Zudem nahm die Löslichkeit von ZnTCP mit zunehmendem Zinkgehalt ab [137]. Mit Zink modifizierte Knochenersatzmaterialien könnten die Knochenapposition in der Implantatregion und somit die Einheilung fördern. Das Metall muss jedoch langsam aus den Materialien abgegeben werden, da es bei zu hohem Zinklevel zu nachteiligen Reaktionen kommt. Materialien aus TCP sind hierfür gut geeignet, da sie inkorporiertes Zink nur langsam freisetzen [34].

Osteoklastenhemmung

Zink hat *in vitro* einen hemmenden Effekt auf die durch Osteoklasten vermittelte Knochenresorption [30, 140]. Osteoklasten reagieren sehr sensibel auf Zinkkontakt. Er führt zu einer Hemmung der knochenabbauenden Zellen und zu einer signifikanten

Abnahme der Knochenresorption noch bei sehr geringer Konzentration von 10^{-14} M. Das Vorhandensein von Osteoblasten hat keinen Einfluss auf den inhibierenden Effekt von Zink. Dies legt die Vermutung nahe, dass Zink einen direkten Einfluss auf Osteoklasten hat. Zusätzlich hebt Zink *in vitro* die osteolyseinduzierende Wirkung von Parathormon, das in der Nebenschilddrüse gebildet wird, komplett auf [140].

Beeinflussung der Zytokinausschüttung

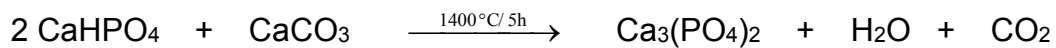
Zink beeinflusst die zellvermittelte Immunreaktion [142, 187]. Partikel, die sich von eingebrachten Knochenersatzmaterialien lösen, werden von Monozyten als erste Abwehrreaktion des Körpers phagozytiert und Zytokine werden ausgeschüttet. Diese wiederum aktivieren Osteoklasten, welche den Knochenabbau induzieren. Die Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen wird durch Zink positiv beeinflusst, die Expression proinflammatorischer Zytokine hingegen negativ. Die Freisetzung von TNF- α aus unstimulierten humanen Monozyten wird herabgesetzt. TNF- α ist an lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen beteiligt. Die Produktion von IL-8, einem chemotaktisch wirksamen Zytokin, wird mit zunehmender Zinkkonzentration gefördert. Monozyten, durch LPS stimuliert, schütten weniger proinflammatorische Zytokine aus (IL-1 β , IL-6) und produzieren mit zunehmender Zinkkonzentration mehr IL-10, eines der wichtigsten antiinflammatorischen Zytokine [187]. Die Entzündungsreaktion wird gehemmt, die Chemotaxis gefördert. Die Zytokinbildung wird abhängig von der Zelllinie auf Ebene der mRNA-Genexpression beeinflusst. Bao et al. zeigten in einer *in-vitro*-Studie, dass Zinkmangel in Th0- und Th1-Zellen zu einer verringerten Aktivierung von zinkabhängigen Transkriptionsfaktoren führt. Weniger IL-2-mRNA und INF- γ -mRNA werden gebildet und folglich weniger IL-2 und INF- γ exprimiert. Ein Mangel an IL-2, ein Wachstumsfaktor für T-Zellen, und INF- γ wiederum führen zu einer reduzierten Immunantwort. In der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie kommt es durch einen Mangel an Zink zu einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine. Mehr TNF- α , IL-1 β - und IL-8-mRNA wird gebildet [142]. An der antioxidativen Wirkung von Zink ist auch die negative Beeinflussung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- α , IL-1 β) beteiligt, die freie Sauerstoffradikale erzeugen können [141].

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Herstellung der Zementpulver

3.1.1 Herstellung von α -Tricalciumphosphat-Pulver

Als Ausgangsstoffe wurden Calciumhydrogenphosphat (CaHPO_4 ; $M = 136,06 \text{ g/mol}$) (Fa. J.T. Baker, Griesheim, Bestell-Nr. 1430-07) und Calciumcarbonat (CaCO_3 ; $M = 100,09 \text{ g/mol}$) (Fa. Merck KGaA, Darmstadt, Bestell-Nr. 102144.9029) im Verhältnis 2:1 verwendet. Die Herstellung von α -Tricalciumphosphatpulver erfolgte durch Sinterung der beiden Edukte nach der Reaktion:



272,12 g Calciumhydrogenphosphat und 100,09 g Calciumcarbonat wurden in einem 500 ml Achatmahlbecher mit zusätzlich 4 Achatkugeln (Durchmesser $d = 30 \text{ mm}$) für 1 Stunde in einer Planetenkugelmühle (PM 400, Fa. Retsch GmbH, Haan) gemahlen. Dabei betrug die Rotationsgeschwindigkeit 200 U/min mit minütlichem Wechsel der Rotationsrichtung. Das Pulver wurde anschließend in einem Sintertiegel bei einer Temperatur von 1400°C 5 Stunden lang im Sinterofen (System vecstar, Fa. Oyten Thermotechnik GmbH, Oyten) gesintert. Die Temperatursteigerung betrug hierbei $99^\circ\text{C}/\text{min}$. Um die metastabile Hochtemperaturmodifikation α -TCP zu erhalten, wurde das Gemisch an der Luft abgeschreckt, d. h. die Sinterebene wurde ab circa 1300°C innerhalb von 15 Minuten manuell schnell heruntergefahren. Ansonsten wäre die Niedrigtemperaturmodifikation β -TCP entstanden. Nach Abkühlen des Gemisches auf Raumtemperatur wurde der Sinterkuchen manuell mit einem Porzellanmörser zerstoßen und auf eine Korngröße $< 355 \mu\text{m}$ gesiebt. Um die notwendige Reaktivität des Pulvers für die Abbindereaktion bei der Probenkörperherstellung zu erhöhen, wurden jeweils 125 g des Pulvers mit Achatmahlwerkzeugen (500 ml Achatmahlbecher, 4 Achatkugeln ($d = 30 \text{ mm}$)) in der Planetenkugelmühle durch einen mehrstündigen Mahlprozess mechanisch aktiviert. Mahlparameter waren eine Rotationsgeschwindigkeit von 200 U/min mit minütlichem Wechsel der Rotationsrichtung und einer Mahldauer von 2 Stunden. Auf diese Weise wurde das α -TCP-Pulver produziert, welches für die Herstellung der Probenkörper verwendet

wurde. Diese dienten als metallfreie Referenz. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pulver feuchtigkeitsdicht in Glasbehältern aufbewahrt.

3.1.2 Modifikation des α -TCP-Pulvers mit Dinatriumhydrogenphosphat

Während der Herstellung der metallionenbeladenen Zementproben wurde festgestellt, dass sich Nickelchlorid, Manganchlorid und Kupfersulfat nicht in 2,5 %iger Na_2HPO_4 -Lösung lösen. Dinatriumhydrogenphosphat wurde als Beschleuniger für eine schnellere Umwandlung des α -TCP-Pulvers zu Hydroxylapatit benötigt. Aus diesem Grund wurde ein modifiziertes Zementpulver hergestellt, das bereits Na_2HPO_4 enthielt. Dazu wurden 123,5 g α -TCP-Pulver und 1,25 g Na_2HPO_4 zusammen in der Planetenkugelmühle für 2 Stunden bei 200 U/min gemahlen. Somit war es möglich die Metallsalze bei der Herstellung der Anmischflüssigkeit in destilliertem Wasser anstatt in Na_2HPO_4 zu lösen. Das auf diese Art gewonnene Pulver wurde bei der Herstellung der metallionendotierten Probenkörper mit unterschiedlichen Metallsalzlösungen als Anmischflüssigkeit verwendet.

3.1.3 Modifikation des α -TCP-Pulvers mit zugesinterten Metallionen

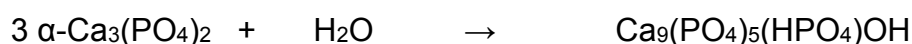
146,26 g CaHPO_4 und 50,05 g CaCO_3 wurden abgewogen und in der Planetenkugelmühle mit den entsprechenden Mengen der Salze (siehe Tabelle 2) für 1 Stunde bei 200 U/min mit minütlichem Wechsel der Rotationsrichtung und Achatmahlwerkzeug gemischt. Die Pulvermischung wurde 5 Stunden bei 1400 °C gesintert, der Sinterkuchen abgeschreckt, gemörsert, auf $< 355 \mu\text{m}$ gesiebt und durch erneutes Mahlen mechanisch aktiviert.

Tabelle 2: Benötigte Mengen der Salze zur Herstellung der metallmodifizierten α -TCP-Pulver

	Summenformel	Molare Masse in g/mol	Benötigte Menge in mg
Kupfersulfat	CuSO_4	159,60	239,4
Kobaltnitrat	$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	291,04	436,56
Manganchlorid	MnCl_2	125,84	188,77
Zinkacetat	$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	658,47	329,24
Vanadiumchlorid	VCl_3	157,30	235,95
Nickelchlorid	NiCl_2	129,62	194,43

3.2 Herstellung der Probenkörper

In wässriger Lösung entsteht während der Zementabbindereaktion aus α -TCP nanokristalliner, calciumdefizitärer Hydroxylapatit. Die Reaktion wird durch Zugabe von Dinatriumhydrogenphosphat beschleunigt. Durch zwei verschiedene Verfahren wurden die Metallionen in die Probenkörper eingebracht. Einmal waren die entsprechenden Metallsalze dem α -TCP-Pulver schon während der Herstellung zugefügt worden (siehe Punkt 3.1.3). Beim Anmischen der Pulver mit eingesinterten Metallsalzen wurde eine 2,5 %ige Na_2HPO_4 -Lösung als Beschleunigerflüssigkeit verwendet. In einem anderen Verfahren der Metallionendotierung wurden Metallsalzlösungen hergestellt, die mit α -TCP-Pulver vermengt wurden, das vorher bereits mit Dinatriumhydrogenphosphat modifiziert worden war. Die Herstellung der Binderlösungen wird nun beispielhaft für die Lösung mit Kupfersulfat erklärt. 159,6 mg Kupfer(II)sulfat (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) wurden in einen 100 ml Messkolben überführt und dieser mit Reinstwasser aufgefüllt. Aus dieser 1 mmolaren Lösung wurden durch Verdünnung eine 100 $\mu\text{mol/l}$ und eine 10 $\mu\text{mol/l}$ Kupfer(II)sulfatlösung hergestellt. Um die 100 μmolare Konzentration zu erhalten, wurden 10 ml der Stammlösung mit 90 ml Reinstwasser verdünnt. Für die 10 μmolar konzentrierte Lösung wurde zu 1 ml der Stammlösung 99 ml Reinstwasser hinzugefügt. Analog wurde für die verschiedenen Konzentrationen von Nickelchlorid, Manganchlorid, Zinkacetatdihydrat, Vanadiumchlorid und Kobaltnitrat verfahren, sodass für jedes Metallion Anmischflüssigkeiten in einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l gewonnen wurden. Zur Herstellung der Probenkörper wurden jeweils 3 g Pulver auf einer Analysewaage abgewogen, 1 ml Anmischflüssigkeit mit einer Pipette aufgezogen und die beiden Komponenten auf einer sauberen, trockenen Glasplatte mit einem Anrührspatel möglichst homogen vermischt und in Silikonformen gegeben. In diesen befanden sich zylindrische Aussparungen mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Tiefe von 2 mm. Um Luft einschließen in den Probenkörpern zu vermeiden, wurde der Zement unter manuellem Druck in die Hohlräume gepresst. Die Zemente härteten in einem Wasserbad (Fa. Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach) bei 37 °C und nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit 24 Stunden aus. Die Reaktion erfolgte gemäß der folgenden Reaktionsgleichung:



Um eine Ausschwemmung der Ionen zu vermeiden, musste darauf geachtet werden, dass die Proben nicht mit dem destillierten Wasser, das den Boden der Feuchtigkeitskammer bedeckte, in Berührung kamen. Um die Flüssigkeit komplett aus den Probenkörpern zu entfernen, wurden sie im Trockenofen (Fa. Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach) bei 40 °C circa 8 Stunden lang getrocknet, mit Sandpapier (Siliciumcarbit, Körnung 800 C) geglättet und in sauberen, trockenen Glasbehältern feuchtigkeitsdicht bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3 Bestimmung der initialen Abbindezeit nach Gilmore

3.3.1 Messprinzip

Als Abbindezeit eines Zementes gilt die Zeitspanne zwischen Anmischung und Aushärtung. Sie wurde mit dem Gilmore-Nadel-Test in Anlehnung an die amerikanische Norm ASTM-Standard C 266 [188] bestimmt. Die Durchführung der Messung erfolgte in einer Feuchtigkeitskammer bei einer Luftfeuchtigkeit von mehr als 90 % und einer Kammertemperatur von 37 °C ± 1 °C. Durch die hohe Luftfeuchtigkeit wurde vermieden, dass während der Abbindereaktion die flüssige Phase des Zementes verdampfte und die Zementpaste dadurch aushärtete. Zum Umwälzen der Luft war an der Decke der Kammer ein Ventilator angebracht. Die angemischte Zementpaste wurde in die mittige Bohrung (Durchmesser 12 × 3 mm) des Probentellers eingefüllt, der sich am Boden der Kammer befand. Die zur Messung verwendete Gilmore-Nadel hatte einen Durchmesser von 2,117 mm und ein Gewicht von 113,389 g. Die Nadel wurde während des Versuches langsam manuell auf die Probenoberfläche herabgesenkt, sodass diese nur durch das Eigengewicht der Nadel belastet wurde. Sowohl der Probenteller als auch die Gilmore-Nadel wurden auf 37 °C erwärmt, um darauf die Bildung von Kondenswasser zu vermeiden. Die Prüfapparatur musste mindestens eine Stunde vor Versuchsbeginn eingeschaltet werden, um die erforderlichen Versuchsbedingungen herzustellen. Der Zeitpunkt an dem die Nadel die Oberfläche nicht mehr durchdringt, gilt als die primäre oder initiale Abbindezeit. Sie entspricht der Verarbeitungsdauer des Zementes.

3.3.2 Versuchsdurchführung

1 g Zementpulver wurde mit 0,333 ml 2,5 %igem Na₂HPO₄ beziehungsweise mit 1 mmolarer Metallionen-Lösung auf einer Glasplatte angemischt, in den Probenteller

gefüllt, mit einem Objektträger glatt gestrichen und unverzüglich in die Feuchtigkeitskammer gestellt. Die Zeit wurde ab Anmischbeginn gestoppt. Um das Zeitfenster der Abbindezeit einzugrenzen, wurde in einem ersten Versuchsdurchlauf alle 8 Minuten die Nadel für 5 Sekunden auf die Probe gesetzt und der Probenteller weitergedreht. Sobald kein Abdruck mehr sichtbar war, wurde für einen zweiten Versuchsdurchlauf Zement angemischt, in dessen Verlauf im vorher bestimmten Zeitfenster, alle 2 Minuten die Aushärtung des Zementes überprüft wurde. Nach Ende des Versuches wurden die entstandenen Vertiefungen mit einer Lupe bei zehnfacher Vergrößerung betrachtet. Der Zement galt als abgebunden, wenn keine Eindrücke mehr sichtbar waren. Zur Verifizierung der Ergebnisse wurde der Versuch ein weiteres Mal wiederholt.

3.4 Bestimmung der Druckfestigkeit

Als Druckfestigkeit bezeichnet man die Widerstandsfähigkeit eines Werkstoffes gegen Druckkräfte. Sie ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$f_c = \frac{F}{A_c}$$

Mit

f_c = Druckfestigkeit [MPa] oder [N/mm²]

F = Höchstkraft beim Bruch [N]

A_c = Fläche des Probenquerschnitts [mm²]

Die Druckfestigkeit wird ermittelt, indem der Prüfkörper bis zum Bruch mit Druck belastet wird und die benötigte Kraft im Moment des Bruches gemessen wird. Mit Hilfe von Silikonformen wurden jeweils 10 Prüfkörper pro Probenart mit den Maßen 6 mm × 6 mm × 12 mm hergestellt. Die Proben härteten 24 Stunden im Wasserbad bei 37 °C und nahezu 100 %iger Luftfeuchtigkeit aus. Nach 24 Stunden erfolgte die Versuchsdurchführung. Zur Messung wurde eine statische Universalprüfmaschine Zwick Z010 (Fa. Zwick GmbH und Co. KG, Ulm) verwendet. Breite und Dicke der Proben wurden mittels einer digitalen Schieblehre auf ± 0,01 mm bestimmt und im Prüfprotokoll festgehalten. Die einzelnen Prüfkörper wurden aufrecht stehend mittig zwischen zwei Edelstahlstempel positioniert und in Richtung ihrer Längsachse bis zum Bruch belastet. Der Vorschub betrug 1 mm/min. Die auftretenden Druckbelastungen

wurden in einem Diagramm aufgezeichnet. Zu dem Zeitpunkt an dem es zum Bruch der Probe kam, war die Belastungsgrenze erreicht. Die dafür benötigte Kraft stellt F_{\max} dar. Die Werte wurden mittels der OriginPro7G Software (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA) graphisch dargestellt.

3.5 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Um die Oberflächenstruktur optisch beurteilen zu können, wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops (DSM 940, Fa. Zeiss GmbH, Oberkochen) Aufnahmen aus dem Inneren der Matrix der ausgehärteten Zemente gemacht. Dafür wurden die bei der Druckfestigkeitsprüfung zerbrochenen Probenkörper verwendet. Die Bruchstücke wurden mittels Leit-C nach Glöcke (Fa. Plano GmbH, Wetzlar), ein Spezialkleber für die Rasterelektronenmikroskopie, auf Aluminiumträgern fixiert. Um Oberflächenauf Ladungen zu vermeiden, wurden die Prüfkörper durch den Sputter Coater K550 (Fa. Emitech Ltd, Ashford, England) in Argon mit niedrigem Druck mit Gold bedampft und so leitfähig gemacht. Anschließend konnten sie betrachtet, fotografiert und ausgewertet werden. Es wurden Aufnahmen mit 500-, 1000-, 3000- und 5000-facher Vergrößerung gemacht.

3.6 Röntgendiffraktometrische Analyse im XRD

Mittels des Röntgendiffraktometers (Siemens D5005, Fa. Siemens AG, Karlsruhe) wurden Röntgendiffraktogramme der verschiedenen Probenkörper aufgenommen und auf ihre Phasenzusammensetzung hin untersucht. Die Zemente härteten 24 Stunden lang bei 37 °C aus. Die Röntgendiffraktometrie macht sich die unterschiedlichen Beugungsmuster von Röntgenstrahlen zu Nutze und kann zur Beurteilung von Kristallstrukturen verwendet werden. Die Zementplättchen wurden mit einem Porzellanmörser zerkleinert und das Pulver in einer Mulde auf dem Probenteller mit einem Objektträger glatt gestrichen, sodass die Probenoberfläche exakt mit dem Probenteller in der Höhe abschloss. Der Probenträger wurde in die Haltevorrichtung des XRDs eingespannt und im Anschluss mit den Messungen begonnen. Die Prüfungen wurden im Winkelbereich zwischen 20 ° und 40 ° schrittweise mit 0,02 ° aufgenommen. In diesem Bereich befindet sich ein großer Teil der typischen

Beugungsreflexe von Calciumphosphaten. In der folgenden Tabelle (Tabelle 3) sind die Parameter der durchgeführten Messungen aufgeführt.

Tabelle 3: Parameter für die XRD-Messung

Messbereich	2 Theta = 20 ° - 40 °
Emissionsstrom	40 mA
Beschleunigungsspannung	40 kV
Anregungswellenlänge	1,5405 nm = Cu K α
Increment	0,02 °
Scanspeed	1 sec/step
Mode	Locked coupled
Filter	Nickel
Aperturblende	2 mm
Streustrahlblende	2 mm
Detektorblende	0,2 mm

Für einen qualitativen Vergleich wurden Referenzbeugungsmuster von α -TCP (PDF-Nr. 09-0348), β -TCP (PDF-Nr. 09-0169) und HA (PDF-Nr. 09-0432) herangezogen.

3.7 Massenspektrometrische Analyse mittels ICP-MS

3.7.1 Messprinzip

ICP-MS ist die Abkürzung für inductively-coupled-plasma mass-spectrometry (Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma). Sie ist eine der nachweisstärksten Methoden in der Elementspurenanalytik. Die Ionen werden in einem Massenspektrometer nach dem Masse/Ladungsverhältnis getrennt. Da mindestens ein Isotop vorhanden ist, das nur bei einem einzigen Element auftritt, ist die Masse charakteristisch für die einzelnen Elemente. Somit können mit diesem Verfahren sehr geringe Mengen eines Elementes nachgewiesen werden.

3.7.2 Bestimmung der Metallionenkonzentration in den Probenkörpern

Um festzustellen, welche Konzentration von Metallionen in den verschiedenen Variationen der Probenkörper enthalten war, wurden die Plättchen einzeln in 3 ml

65 %iger Salpetersäure (Suprapur, Fa. Merck KGaA, Darmstadt) gelöst und anschließend mit 7 ml Reinstwasser verdünnt. Mittels der massenspektrometrischen Analyse durch die ICP-MS (Fa. Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) erhielt man die Konzentration in $\mu\text{g/l}$, die anschließend in ppm umgerechnet wurde. Getestet wurden jeweils drei Proben einer Art.

3.7.3 Durchführung der Freisetzungsstudie

In dieser Versuchsreihe wurde mittels des Analyseverfahrens der ICP-MS untersucht, welche Mengen aus den verschiedenen Zementproben in ein Auslagerungsmedium über eine Woche freigesetzt wurden. Verwendet wurde als Freisetzungsmedium Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (ATCC Order-Nr. 30-2002, Fa. LGC Standards GmbH, Wesel) kombiniert mit 10 % FCS (fetal bovine serum), 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (Fa. Invitrogen Life Technologies GmbH, Eggstein). Vor Versuchsbeginn wurden die Prüfkörper unter der Sterilbank in 70 %igem Alkohol sterilisiert. Um ein Ausschwemmen der Ionen und damit eine Verfälschung der Messergebnisse zu vermeiden, wurden sie nur für 5 Sekunden in Alkohol geschwenkt und anschließend auf einer Glasplatte beidseits für jeweils 15 Minuten getrocknet, damit das Ethanol sich verflüchtigen konnte. Die Zementplättchen wurden in 24-Well-Platten gelegt, mit 2 ml Kulturmedium bedeckt und im Trockenschrank bei 37 °C auf einem Rüttler gelagert. Da sich die Flüssigkeit nach einer gewissen Zeit mit den Ionen sättigte, wurden die Plättchen nach 24 Stunden auf einen neuen Wellplatz überführt und mit 2 ml neuem Medium bedeckt. Dieses Vorgehen wurde 7 Tage lang fortgeführt, um Aussagen über das Freisetzungsverhalten der Metallionen aus den Plättchen in das Eluat zu erhalten. Da sich kleine Partikel aus den Plättchen lösen und die feinen Kapillaren der ICP-MS verstopfen würden, musste die Flüssigkeit vor der Messung gefiltert werden. Die gefilterte Probenflüssigkeit wurde auf 1:10 mit einer leicht sauren Lösung verdünnt. Diese wurde vorher durch Mischen von 3 ml 65 %iger Salpetersäure mit 7 ml Reinstwasser hergestellt. Ein leicht saures Milieu wurde bei diesem Versuch benötigt, damit die gelösten Stoffe nicht wieder ausfallen und dadurch die Messwerte verfälscht werden konnten. Das Eluat wurde mittels der ICP-MS hinsichtlich der darin gelösten Konzentration an Metallionen analysiert. Getestet wurden jeweils 3 Proben einer Variation. Die Mittelwerte wurden berechnet und die akkumulierten Werte mittels der OriginPro7G Software in einem Punkt-Diagramm dargestellt. Die

Standardabweichungen wurden durch die Gaußsche Fehlerfortpflanzung der Fehler der Einzelwerte errechnet und in der Grafik mittels Fehlerbalken dargestellt.

3.7.4 Analyse der Ionenfreisetzung während des Zellversuches

Um festzustellen, welche Menge an Metallionen während des Zellversuches aus den Plättchen freigesetzt wurde, wurden bei jedem Mediumwechsel die Überstände gesammelt und mittels der ICP-MS die freigesetzte Metallionenkonzentration bestimmt. Untersucht wurde das Medium auf die Co^{2+} -Freisetzung aus den Kobaltplättchen, die Zinkproben hinsichtlich der Zn^{2+} -Konzentration und als Vergleich das Eluat des metallfreien Referenzementes bezüglich der Konzentration beider Ionen.

3.8 Bestimmung der Zytotoxizität

3.8.1 Zellkultivierung und Zellaussaat

Für die Zellversuche wurde die immortalisierte Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 (American Type Culture Collection, ATCC[®] Catalog Nr. TIB-71TM, Manassas, USA) verwendet. Die Zellen entstammen dem Tumorgewebe aus dem Aszites einer Maus, induziert durch das „Abelson murine leukemia virus“. Die für die Versuche verwendeten Zellen entstammten der Passage 11. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte in 75 cm³ großen Zellkulturflaschen (Fa. Falcon, Vertrieb Becton Dickinson, Heidelberg) mit 20 ml DMEM-Kulturmedium (Dulbecco`s Modified Eagle Medium, ATCC, Teddington, England) kombiniert mit 10 % FCS (fetal bovine serum) und 1 % Pen-Strep (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) (Fa. Invitrogen Life Technologies GmbH, Eggstein) im Brutschrank (Heracell 150i, Fa. Heraeus, Hanau) bei einer Temperatur von 37 °C und 5 %iger CO₂ Atmosphäre. Für die folgenden Versuchsansätze wurde eine Zellsuspension von circa 40 000 Zellen/ml benötigt. Dafür wurden 10 ml des Mediums mit einer sterilen Pasteurpipette aus einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche abgezogen und verworfen. In den verbliebenen 10 ml wurden die adhärenen Zellen vom Boden mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig abgelöst. Um die gewünschte Zellzahl zu erhalten, wurde die Zellsuspension mit dem entsprechenden Kulturmedium so lange verdünnt, bis circa 40`000 Zellen/ml mit dem CASY-1 Zellzähler gemessen wurden. Pro Messtag wurden jeweils eine 48-Wellplatte (Fa. Nunc TM, Roskilde, Dänemark) für den WST-1 Zellvitalitätstest und die

Zellzahlbestimmung sowie eine für die TRAP-Färbung benötigt. Zusätzlich wurde eine Wellplatte für die elektronenmikroskopische Analyse vorbereitet. WST/Zellzahl wurden an Tag 7, 11 und 15 nach Aussaat bestimmt. Die Fixierung für die Elektronenmikroskopie wurde an Tag 8 durchgeführt. Bei den Zellversuchen wurden drei verschiedene Arten von Zementproben untersucht. Zum einen wurden Plättchen getestet, die mit der maximal konzentrierten Zinkionenlösung (1 mmol/l) als Anmischflüssigkeit hergestellt wurden, zum anderen Proben, angemischt mit 10 μ molarer Kobaltionenlösung. Als metallfreie Referenz dienten Probenkörper aus α -TCP-Pulver angemischt mit Na_2HPO_4 . Pro Messtag wurden für den WST-1 Zellvitalitätstest und die Zellzahlmessung je 4, für die TRAP-Färbung je 2 Plättchen der verschiedenen Zementarten vorbereitet. Zusätzlich wurden für die Analyse im Elektronenmikroskop jeweils 2 Proben jeder Art bereitgestellt. Die Prüfkörper wurden 15 Minuten in 70 %igen Alkohol eingelegt und anschließend beidseits für je 15 Minuten getrocknet, damit das Ethanol verdampfen konnte. Die so vorbehandelten Zementplättchen wurden in 48-Well-Platten überführt, mit jeweils 500 μ l des Zellmedium-Zellsuspension-Gemisches beschichtet und bei 37 °C im Inkubator gelagert. Am folgenden Tag wurden 200 μ l Medium abpipettiert und 300 μ l DMEM-Medium kombiniert mit 10 % FCS und 1 % Pen-Strep gemischt mit murinem sRANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) (Fa. R&D Systems, Wiesbaden) auf die Wellplätze gegeben (0,5 μ l Rankl auf 1 ml Medium). RANKL ist ein Faktor, der die Differenzierung der RAW-Zellen zu Osteoklasten initiiert. Ein Austausch des Medium-RANKL-Gemisches erfolgte an Tag 4, 6, 7, 8, 11 und 13 nach Aussaat. Die Überstände wurden in Eppendorfcups für eine ICP-Analyse gesammelt. Das Zellkultur-Polystyrol diente als Kontrolle. Die Zellen wurden dazu direkt auf die Oberfläche der Zellkulturplatten aufgebracht. Auf dieser Oberfläche konnte während der Zellversuchsreihe das Verhalten und Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Für die elektronenmikroskopische Analyse wurde als Kontrollmaterial Glas verwendet.

3.8.2 WST-1 Zellvitalitätstest

Dieser Test dient der Untersuchung der Vitalität von Zellen auf verschiedenen Oberflächen. Zu Grunde liegt diesem Verfahren die Messung der Stoffwechselaktivität, in der die Aktivität der Succinatdehydrogenase in den Mitochondrien bestimmt wird. Der Farbstoff WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-

Benzendisulfonat), ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, wird durch dieses Enzym zum farbigen Formazan umgesetzt. Dabei erfolgt der Umsatz nur in den Mitochondrien vitaler Zellen. Die Extinktion wird im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt und verhält sich proportional zur Stoffwechselaktivität der Zellen. Der Farbumschlag ist dabei umso intensiver beziehungsweise die Extinktion umso größer, je mehr vitale Zellen vorhanden sind.

Bei der Versuchsdurchführung wurde aus den Kavitäten das Medium gründlich abgesaugt, die Zementplättchen mit jeweils 500 µl DMEM-Medium und 50 µl Proliferationsreagenz (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) beschichtet und bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre für 30 Minuten inkubiert. Als Leerwert wurde gleichzeitig ein Gemisch aus 500 µl Medium und 50 µl des Proliferationsreagenz WST-1 auf einen leeren Wellplatz gegeben. Anschließend wurden aus jeder Kavität jeweils zweimal 200 µl des Gemisches abpipettiert und auf 2 Wellplätze einer 96-Well-Platte (Fa. Costar GmbH, Bodenheim) zur Doppelbestimmung überführt. Das entnommene DMEM/WST-Gemisch wurde durch den PBS-Puffer (Ad 1000 ml Reinstwasser 8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat, 2,8 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,2 g Kaliumchlorid (Fa. Merck KGaA, Darmstadt), autoklaviert bei 121 °C für 20 Minuten) ersetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilarbeitsbank (Fa. Heraeus GmbH & Co KG, Hanau). Die Messwerte wurden im ELISA-Reader (Spectrafluor Plus, Fa. Tecan GmbH, Crailsheim), gesteuert über die Magellan-3 Bedienungssoftware, anhand des Farbumschlages mit einem Messfilter von 450 nm und einem Referenzfilter von 620 nm ermittelt. Die Ergebnisse wurden mittels der Microsoft Excel-Tabellenkalkulation (Fa. Microsoft Corporation, Redmond, USA) ausgewertet und unter Verwendung der OriginPro7G Software graphisch dargestellt. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte an den Tagen 7, 11 und 15 nach Aussaat.

3.8.3 Zellzahlbestimmung mittels CASY-1

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der elektronische Zellzähler CASY-1, Modell TTC Cell Counter und Analyser (Fa. Schärfe System GmbH, Reutlingen) verwendet.

Das Messprinzip besteht in einer Widerstandsmessung, wobei die Pulsflächenanalyse der Signalauswertung dient. Die Zellen werden zur Messung in ein Röhrchen mit einer isotonischen Elektrolytlösung gegeben und diese Suspension mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt. Über zwei

Platinelektroden wird eine konstante elektrische Spannung angelegt, die einen bestimmten elektrischen Widerstand ergibt. Werden die Zellen durch die Kapillare gesaugt, verdrängen sie entsprechend ihrem Volumen eine gewisse Menge der Elektrolytlösung. Da der Strom nicht durch die intakte Membran vitaler Zellen dringen kann, wirken diese als eine Art elektrischer Isolator. Anhand der Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke kann über den Zellzähler die Zellzahl und deren Volumen ermittelt werden. Nach Vollendung der Messung wird das Integral des Messsignals berechnet (Pulsflächenanalyse).

Für diesen Versuch wurde mit den Wellplatten, die vorher für den WST-1-Versuch verwendet worden waren, weitergearbeitet. Zur Bestimmung der Zellzahl mussten die Zellen von den Oberflächen gelöst werden. Dies wurde mit Hilfe eines Enzymgemisches, der Accutase (Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe) bewerkstelligt. Um die Wirkung der Enzyme nicht durch das Kulturmedium zu inhibieren, wurde die komplette Flüssigkeit aus den Wellplatten gründlich abgezogen und die Zementplättchen mit jeweils 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt, um ein möglichst optimales Wirken der Accutase zu ermöglichen. Nachdem die PBS-Flüssigkeit gut abgesaugt worden war, wurde auf jeden Wellplatz jeweils 500 µl Accutase zum Ablösen der Zellen pipettiert und die Proben für 15 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 500 µl Kulturmedium gestoppt. Nach 20-maligem Aufziehen der Suspension mittels einer Pipette zur Durchmischung und sicherem Ablösen der Zellen wurden jeweils 100 µl des Gemisches in ein mit 10 ml Isoton (steril gefiltert; Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) gefülltes Röhrchen gegeben. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss wurde die Zellzahl im Zellzähler bestimmt. Damit die Zellen sich nicht wieder absetzen konnten, erfolgte die Zwischenlagerung auf einem Rollenmischer. Die Zellzahl wurde parallel zum WST-Test erstmals am 7ten Tag nach Aussaat bestimmt und die Messung am 11ten und 15ten Tag wiederholt.

Die ermittelten Ergebnisse wurden mit der Microsoft Excel-Tabellenkalkulation ausgewertet. Die graphische Darstellung erfolgte mit der OriginPro7G Software.

3.9 Präparatherstellung für REM-Aufnahmen

Um Aussagen über die Morphologie und das Wachstum der Zellen auf den unterschiedlichen Oberflächen machen zu können, wurden Präparate für elektronenmikroskopische Aufnahmen hergestellt. Der Versuch fand an Tag 8 nach Aussaat statt. Die Zementplättchen wurden in Glasbehälter überführt und viermal gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Gefäße auf Eis gelegt und für 15 Minuten mit 6 %igem Glutaraldehyd (2,4 ml 25 %ige Glutaraldehyd-Lösung (Fa. Merck KGaA, Darmstadt) verdünnt mit 7,6 ml PBS) beschichtet, um die Zellen auf den Präparaten zu fixieren. Als nächste Schritte erfolgten das Waschen der Präparate mit PBS und die Entwässerung in einer aufsteigenden Acetonreihe. Dabei war darauf zu achten, dass die Proben stets mit Flüssigkeit bedeckt waren, um die Zerstörung der Zellstrukturen zu verhindern. Das Waschen mit PBS erfolgte fünfmal für 5 Minuten auf Eis. Dann wurde das Präparat bei Raumtemperatur nacheinander zuerst für 15 Minuten mit 30 %igem Aceton bedeckt, für 20 Minuten mit 50 %igem, für 30 Minuten mit 75 %igem und zum Schluss fünfmal hintereinander für 30 Minuten mit 100 %igem Aceton. Die Aufbewahrung bis zur weiteren Verwendung erfolgte in 100 %igem Aceton. Um die Präparate unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachten zu können, wurden sie nach der Entwässerung zunächst mit Hilfe des Critical Point Dryer CPD 030 (Fa. Bal-Tec (Leica GmbH), Wetzlar) getrocknet. Nach Überführung der fixierten und entwässerten Präparate in eine mit 100 %igem Aceton gefüllte Druckkammer wurde so lange flüssiges CO₂ eingeleitet bis die Kammer vollständig gefüllt war. Nach 5 Minuten ließ man das Gas entweichen, bis die Prüfkörper gerade noch mit Flüssigkeit bedeckt waren. Dieser Vorgang wurde zehnmal wiederholt, bis das Aceton komplett gegen CO₂ ausgetauscht war. Abschließend wurde die Flüssigkeit so weit abgelassen bis die Proben gerade noch mit Flüssigkeit bedeckt waren und die Temperatur auf 40 - 42 °C erhöht. Am kritischen Punkt bei circa 31 °C und circa 80 bar Druck ging die Flüssigkeit in die Gasphase über. Das Gas wurde langsam abgelassen, die Präparate mit Gold bedampft und unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet. Das weitere Vorgehen entsprach der Beschreibung in Punkt 3.5.

3.10 Zytochemische Färbung der tartratresistenten sauren Phosphatase

Mit Hilfe der TRAP-Färbung sollte die Zelldifferenzierung der RAW-Zellen in Osteoklasten nachgewiesen werden. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Kit

(Nr. 387, Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verwendet. Die aktive iso-5b-Form der tartratresistenten sauren Phosphatase (TRAP) wird spezifisch nur von Osteoklasten abgesondert. Durch enzymatische Hydrolyse von TRAP wird Naphtol AS-BI freigesetzt, das an Fast Garnet GBC bindet und unlösliche violette Farbkomplexe bildet. Für eine Probe wurde 1 ml Färbelösung angesetzt. Dazu wurden 10 µl Fast Garnet Standardlösung und 10 µl Natriumnitrit in einem Eppendorfcup gemischt, für 3 Sekunden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und für 2 Minuten stehen gelassen. Es wurden 0,9 ml auf 37 °C erwärmtes destilliertes Wasser, 20 µl Fast Garnet/Natriumnitrit-Lösung, 10 µl Naphtol-Lösung, 80 µl Acetat-Lösung und 20 µl Tartrat-Lösung miteinander gemischt und im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Präparate wurden mit PBS gewaschen, für 30 Sekunden in TRAP-Fixierlösung (18 - 26 °C) fixiert und mit destilliertem Wasser viermal gewaschen. Die Zementplättchen wurden mit jeweils 1 ml Färbelösung beschichtet und für 1 Stunde bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Atmosphäre lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden sie gründlich in destilliertem Wasser (37 °C) gesäubert und an der Luft getrocknet. Nach circa 2 Stunden konnten die Proben im Auflichtmikroskop betrachtet werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Initiale Abbindezeit nach Gilmore

Mittels des Gilmore-Nadel-Tests wurden die Auswirkungen der Metallionendotierung auf die initiale Abbindezeit überprüft. Sie beschreibt die Zeitspanne zwischen Anmischen des Zementpulvers mit einer flüssigen Phase und der Aushärtung der pastösen Masse. Die primäre Abbindezeit war erreicht, wenn die Nadel die Oberfläche des Zementplättchens nicht mehr durchdringen konnte. Untersucht wurden α -TCP-basierende Zemente mit Metallionendotierung durch Zusinterung oder durch Zugabe von jeweils 1 mmol/l des entsprechenden Metallsalzes zur Binderflüssigkeit. Als metallfreie Referenz diente α -TCP-Pulver angemischt mit 2,5 %iger Na_2HPO_4 -Lösung. Der Versuch wurde zweimal wiederholt, die Mittelwerte berechnet und die Ergebnisse in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Die initiale Abbindezeit des metallfreien Referenzzementes betrug 24 Minuten.

Tabelle 4: Mit dem Gilmore-Nadel-Test ermittelte initiale Abbindezeit (in Minuten) der α -TCP-basierenden Zemente mit Metallionendotierung durch Zusinterung oder durch Zugabe von jeweils 1 mmol/l des entsprechenden Metallsalzes zur Binderflüssigkeit.

Metallion	Zusinterung zu α-TCP-Pulver Abbindezeit in Min (+/- 1)	Zusatz von 1 mmol/l zur Binderflüssigkeit Abbindezeit in Min (+/- 1)
Kobalt(II)	22	> 60
Vanadium(III)	> 60	> 60
Kupfer(II)	27	18
Nickel(II)	57	> 60
Zink(II)	> 60	28
Mangan(II)	18	57

Tabelle 4 zeigt die deutlichen Schwankungen der initialen Abbindezeiten. Es stellte sich heraus, dass einige Metallionen die Abbindezeit erheblich verzögerten. Unabhängig von der Methode der Metallionendotierung hatten Nickel und Vanadium einen stark inhibierenden Effekt. Bei Verwendung des gesinterten Nickelpulvers war die Abbindezeit mit 57 Minuten gegenüber dem metallfreien Referenzzement fast um das Dreifache erhöht. Mit 1 mmolar konzentrierter Nickellösung konnte auch nach über 60 Minuten kein Aushärten des Zementpulvers festgestellt werden. Ebenso waren die

Zementplättchen bei Verwendung von Vanadium auch nach über einer Stunde nicht ausgehärtet. Auch die Art und Weise wie die Metalle dem α -TCP-Pulver zugefügt wurden, schien eine große Rolle zu spielen. Zum Teil waren deutliche Unterschiede zwischen der Dotierung der Zementplättchen mit Metallionen durch Zusinterung oder durch Zugabe von 1 mmolar konzentrierter Metallsalzlösung als Binderflüssigkeit zu beobachten. Der größte Unterschied war bei Verwendung von Kobalt, Zink und Mangan zu erkennen. Mit Mangan in 1 mmolar konzentrierter Anmischlösung konnte ein Aushärten erst nach 57 Minuten festgestellt werden, wohingegen die Verarbeitungszeit beim gesinterten Manganpulver im Vergleich zum metallfreien Referenzzement um 6 Minuten reduziert war. Im Gegensatz dazu band das mit Kobaltionen gesinterte Pulver in etwa so schnell ab wie die Referenz. Allerdings war die initiale Abbindezeit bei Verwendung von 1 mmolarer Kobaltionenlösung als Anmischflüssigkeit erheblich verlängert. Auch nach 60 Minuten war der Zement in der Feuchtigkeitskammer noch nicht ausgehärtet. Für Zink zeigte sich ein gegenteiliger Effekt. Die Aushärtung des gesinterten Pulvers war nach 60 Minuten noch nicht abgeschlossen, wohingegen die Zeitspanne mit Zusatz von 1 mmolar konzentrierter Zinkionenlösung zum α -TCP-Pulver nur um wenige Minuten im Vergleich zur Referenz erhöht war. Unter dem Einfluss von Kupferionen zeigten sich im Vergleich zur Referenz die geringsten Schwankungen. Bei dem gesinterten Pulver war die initiale Abbindezeit mit 3 Minuten minimal erhöht, bei 1 mmolarer Kupferionenlösung um 6 Minuten reduziert.

4.2 Druckfestigkeit der Zemente

Mittels einer statischen Universalprüfmaschine sollte festgestellt werden wie groß der Einfluss der verschiedenen Metallionen und die Art, wie sie dem Zementpulver beigefügt wurden, auf die Druckfestigkeit war. Jeweils 10 quaderförmige Prüfkörper jeder Art wurden nach 24-stündiger Lagerung im Wasserbad bei 37 °C in Längsrichtung belastet und die im Moment des Bruchs auftretenden Kräfte in einem Diagramm aufgezeichnet (Abbildung 1). Untersucht wurden Zementproben, die zum einen mit einer 1 mmolaren Metallionenlösung der entsprechenden Metalle als Anmischflüssigkeit hergestellt und zum anderen aus Pulvern mit zugesinterten Metallionen angefertigt wurden. Für die metallfreien Referenzproben wurde reines

α -TCP-Pulver mit Na_2HPO_4 angemischt. Die Druckfestigkeit der Referenzquader betrug dabei im Durchschnitt 18,96 MPa.

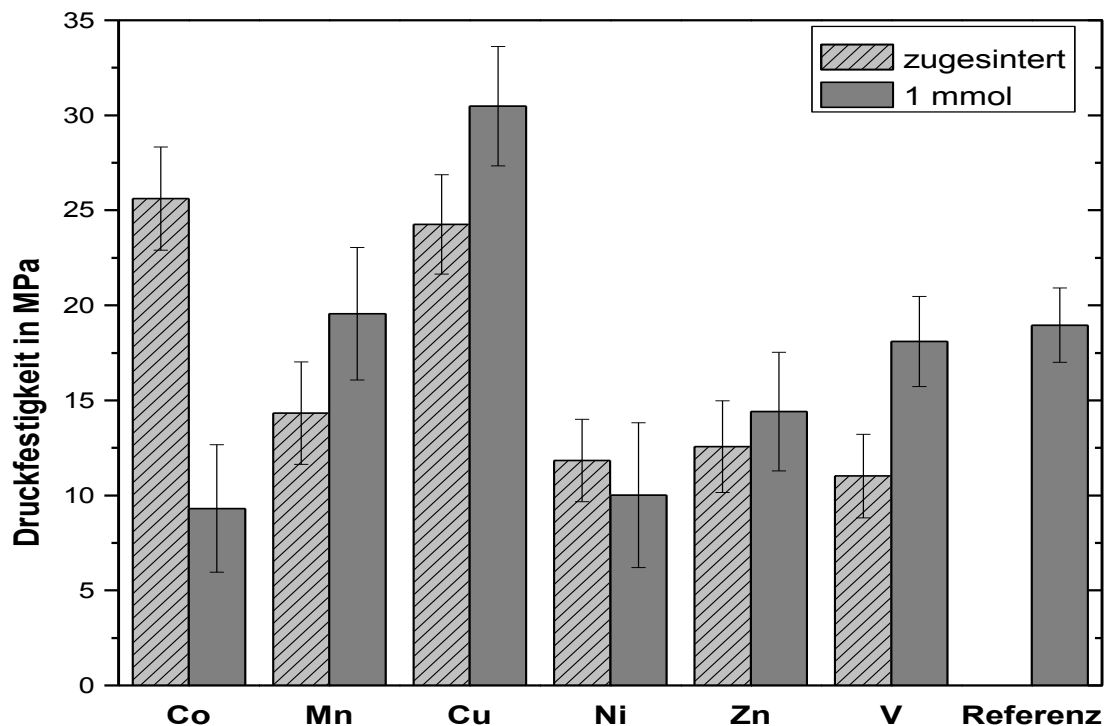


Abbildung 1: Vergleich der Druckfestigkeiten (in MPa) der α -TCP-basierenden Zemente mit Metallionendotierung durch Zusinterung oder durch Zugabe von jeweils 1 mmol/l des entsprechenden Metallsalzes zur Binderflüssigkeit. Auf der Ordinate ist die Druckfestigkeit in MPa angegeben, auf der Abszisse die verschiedenen Metalle

Aus Abbildung 1 wird ersichtlich, dass sich auch bei der Druckfestigkeit die Dotierungsart, ob Zugabe der Metallionen durch Zusinterung oder bereits in der Binderflüssigkeit enthalten, durch die verschiedenen Metalle unterschiedlich auswirkte. Lediglich die Prüfkörper mit Kupferionendotierung, unabhängig davon, ob die Dotierung durch Zusinterung oder durch die Binderflüssigkeit erfolgte, zeigten gegenüber der metallfreien Referenz eine signifikante Erhöhung der Druckfestigkeit. Derselbe Effekt wurde für die Zementproben mit zugesinterten Kobalt(II)ionen festgestellt. Für Kobalt war der Einfluss der Dotierungsmethode auf die Druckfestigkeit zusätzlich am stärksten ausgeprägt. Bei Probenkörpern, die aus Zementpulver mit zugesinterten Kobaltionen hergestellt wurden, zeigte sich eine Erhöhung der Druckfestigkeit gegenüber der Referenz auf circa 25,61 MPa. Wurde jedoch das Metall dem Pulver als 1 mmolare Anmischflüssigkeit zugesetzt, fiel die Druckfestigkeit im Vergleich zur Referenzprobe signifikant auf 9,31 MPa ab. Der deutlichste Anstieg gegenüber der Referenz war mit Kupfer zu verzeichnen. Mit zugesinterten

Kupfer(II)ionen betrug der Höchstwert im Mittel 24,25 MPa, mit 1 mmolarer Kupferlösung als flüssige Phase sogar 30,48 MPa. Für Mangan entsprach die Druckfestigkeit bei mit 1 mmolarer Manganionenlösung hergestellten Probenkörpern in etwa der Druckfestigkeit der metallfreien Referenz (19,56 MPa). Bei den Zugesinterten sank sie leicht auf 14,33 MPa ab. Mit Nickel und Zink war die Druckfestigkeit deutlich reduziert, wobei es nur geringfügige Unterschiede zwischen den beiden Dotierungsarten gab. Mit Nickel war die Druckfestigkeit der gesinterten Proben mit 11,83 MPa um circa 2 MPa höher als bei den mit 1 mmolarer Nickelionenlösung hergestellten Quadern mit circa 10,01 MPa. Für Zink betrug der Unterschied zwischen den zwei Dotierungsarten nur etwa 1 MPa mit 14,41 MPa bei den Proben, die mit der 1 mmolaren Zinkionenlösung hergestellt wurden und 12,57 MPa bei den zugesinterten Proben. Deutlicher war der Unterschied der Druckfestigkeit zwischen den mit 1 mmolarer Vanadiumionenlösung hergestellten Prüfkörpern, die mit 18,1 MPa in etwa der Referenz entsprach. Bei den Proben aus gesintertem Vanadiumpulver lag die Druckfestigkeit mit 11,02 MPa deutlich unter der metallfreien Referenzprobe. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Druckfestigkeit im direkten Vergleich mit der Abbindezeit.

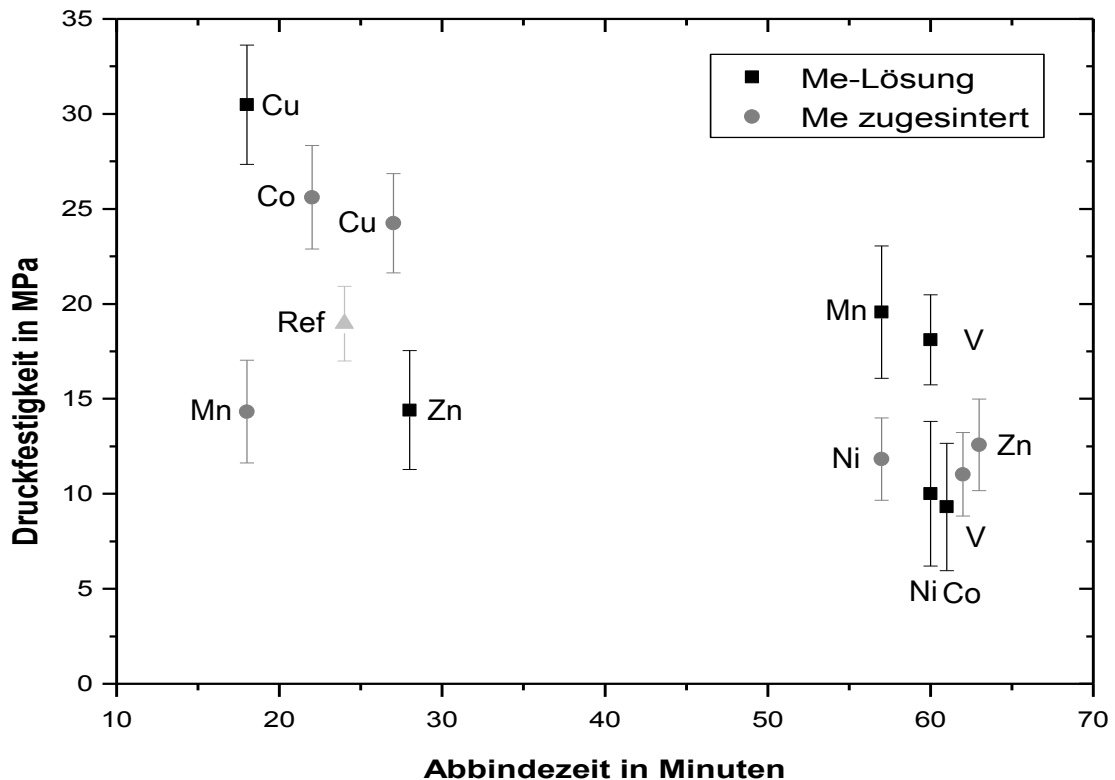


Abbildung 2: Abbindezeit im Vergleich mit der Druckfestigkeit von α -TCP-basierenden Zementen mit Metallionendotierung durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver (im Diagramm mit Me zugesintert bezeichnet) bzw. durch Zusatz von jeweils 1 mmol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung (im Diagramm mit Me-Lösung bezeichnet). Abbindezeiten über 60 Minuten wurden gleich 60 Minuten gesetzt, allerdings wegen der besseren Darstellbarkeit leicht versetzt dargestellt. Auf der Ordinate ist die Druckfestigkeit in MPa angegeben, auf der Abszisse die Abbindezeit in Minuten.

Aus Abbildung 2 wird ersichtlich, dass die Zementpulver, die am langsamsten abgebunden haben, im Vergleich zum metallfreien Referenzzement auch eine deutlich schlechtere Druckfestigkeit aufwiesen. Eine Ausnahme bildeten die Probenkörper, die mit der 1 mmolaren Mangan- beziehungsweise Vanadiumionenlösung hergestellt worden waren. Ihre Druckfestigkeit entsprach in etwa der der Referenz, obwohl die Abbindezeit durch die Ionen erheblich verlängert wurde. Im Bereich der kürzeren Abbindezeiten ergab sich ein eher inhomogenes Bild. Durch die Metallionendotierung mit Kupferionen durch die Binderlösung sowie Kobaltionen durch Zusinterung zum Ausgangspulver wurde die Abbindezeit gegenüber dem Kontrollpulver reduziert. Die Druckfestigkeit war gegenüber der metallfreien Referenz deutlich erhöht. Bei den Proben mit zugesinterten Manganionen wurde hingegen ersichtlich, dass, obwohl die Abbindezeit gegenüber der metallfreien Referenz verkürzt war, die Druckfestigkeit reduziert war. Gegenteiliges zeigte sich für die Metallmodifizierung mit Kupferionen durch Zusinterung. Die Abbindezeit war gegenüber dem metallfreien Kontrollzement

leicht erhöht, aber zugleich wiesen diese Zementprobenkörper auch eine größere Druckfestigkeit auf. Hingegen war die Druckfestigkeit der Zementplättchen, angemischt mit der 1 mmolaren Zinkionenlösung, gegenüber dem Kontrollzement reduziert, obwohl die Abbindezeit in etwa der der Proben mit den zugesinterten Kupferionen entsprach.

4.3 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung

Für die optische Beurteilung der verschiedenen Zementpräparate wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen vom Inneren der Matrix der ausgehärteten Plättchen angefertigt. Verwendet wurden die bei der Druckfestigkeitsprüfung entstandenen Bruchkörper. Die mikrostrukturelle Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskop wurde mit den Zugesinterten sowie mit 1 mmolarer Metallionenlösung hergestellten Probenkörpern bei 500-, 1000-, 3000- und 5000-facher Vergrößerung durchgeführt.

Die Bruchflächen der metallfreien Referenz wiesen keine homogene Oberflächenbeschaffenheit auf, sondern bestanden aus einzelnen, unterschiedlich großen ($10\ \mu\text{m}$ – $20\ \mu\text{m}$) kieselsteinähnlichen Partikeln, die lose und unregelmäßig nebeneinander lagen. Das inhomogene Erscheinungsbild wurde durch einzelne und lose verstreut liegende kleinere Partikel mit einer Größe von 1 – $2\ \mu\text{m}$ verstärkt (Abbildung 3). Bei stärkerer Vergrößerung zeigte sich, dass die Oberflächenbeschaffenheit der einzelnen Partikel nicht glatt war, sondern dass die Gebilde von einer filigranen, kristallinen Struktur aus einzelnen nadelförmigen Kristalliten umgeben waren (Abbildung 4).

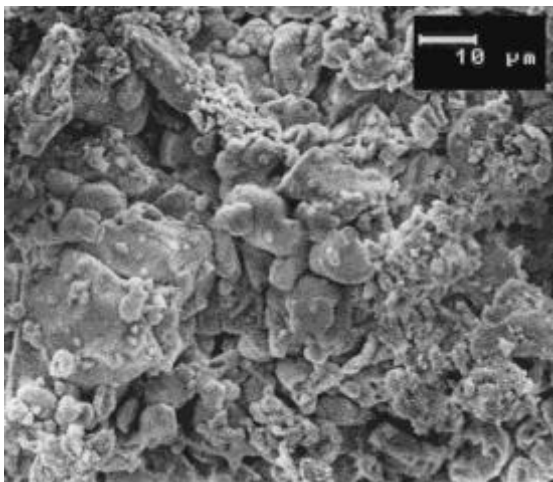


Abbildung 3: REM-Aufnahme der Bruchfläche der metallfreien Referenz (10 KV, Vergrößerung 1000fach)

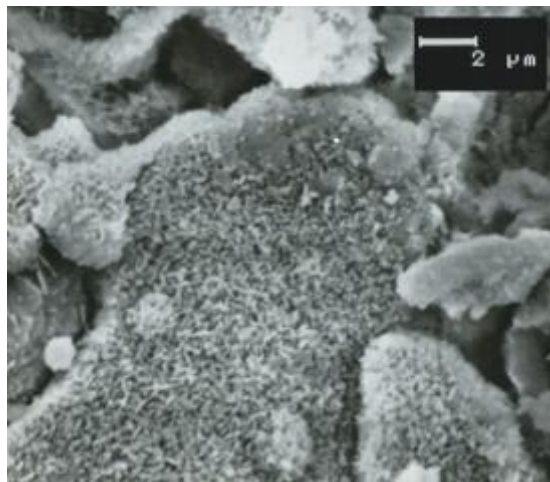


Abbildung 4: REM-Aufnahme der Bruchfläche der metallfreien Referenz (10 KV, Vergrößerung 5000fach)

Im Allgemeinen zeigten die Bruchflächen der mit Metallionen modifizierten Zementplättchen bei niedriger Vergrößerung ein inhomogenes Erscheinungsbild, ähnlich dem der Referenz, mit unterschiedlich großen Partikeln, die lose nebeneinander lagen und keinen festen Verbund aufwiesen. Die Oberflächenbeschaffenheit der Proben mit den zugesinterten Metallionen wirkte im Erscheinungsbild insgesamt glatter als die Oberfläche der Plättchen, die mit 1 mmolarer Metallionenlösung angemischt wurden. Der deutlichste Unterschied zur metallfreien Referenz war bei den Bruchflächen der Zementplättchen erkennbar, die mit der 1 mmolaren Kobaltionenlösung hergestellt wurden. Bei höherer Vergrößerung wurde die glatte, porenfreie Oberfläche der Partikel erkennbar, der die Besetzung mit nadelförmigen Kristalliten fehlte (Abbildung 5). Dieses Erscheinungsbild konnte ansonsten bei keiner der anderen Zementprobenarten beobachtet werden. Ganz anders stellte sich die Bruchfläche der mit Kobaltionen gesinterten Probe dar. Bei stärkerer Vergrößerung wurden als Feinstruktur poröse, eierschalenförmige Gebilde sichtbar, die gleichmäßige Mikroporositäten deutlich unter $0,5\ \mu\text{m}$ aufwiesen (Abbildung 6). Als Besonderheit, die bei keinem anderen Metall aufzufinden war, wiesen die Bruchflächen bei beiden Arten der Metallionendotierung mit Mangan teilweise Gebilde auf, die einen glatten, sehr kompakten Kern besaßen. Dieser Kern war umgeben von einer Hülle nadelartiger, miteinander verwobener Kristalle (Abbildung 7). Bei den mit der 1 mmolaren Manganionenlösung hergestellten Proben fanden sich zusätzlich partiell glatte Bereiche, denen die Kristallite nur locker

aufzuliegen schienen (Abbildung 8). Bei den 1 mmolaren Nickelproben fanden sich unterschiedlich große und unterschiedlich stark miteinander verbundene Gebilde. Neben porös erscheinenden Partikeln, waren teilweise stegartig zusammenhängende Gefüge zu erkennen, deren Oberfläche eine eher glatte Struktur aufwies (Abbildung 9). Bei den gesinterten Nickelproben hingegen konnten keine glatten Areale aufgefunden werden. Die Bruchflächen besaßen eine eher schwammartige Oberflächenbeschaffenheit, zusammengesetzt aus nadelförmigen Kristalliten (nicht dargestellt). Mit Zink als Metallzusatz befanden sich zwischen den nadelartigen Kristallen stellenweise scheibenartig miteinander verbundene Plättchen, die bei der Referenz deutlich seltener aufzufinden waren (Abbildung 10). Das Erscheinungsbild der Bruchflächen der Kupferproben wirkte im Vergleich zur Referenz noch inhomogener. Unterschiedlich große (1 – 20 μm) und unterschiedlich geformte Partikel lagen lose neben- und aufeinander. Besonders bei den Proben mit zugesinterten Kupferionen waren neben den kieselartigen Partikeln zusätzlich viele hohle eierschalenförmige Gebilde sichtbar (Abbildung 11). Modifiziert mit Vanadium wiesen die Bruchflächen der Zementplättchen, im Vergleich zur Referenz, keine auffälligen Besonderheiten auf. Die Oberfläche der einzelnen Partikel bestand hier aus nadelartigen, ineinander verwobenen Kristalliten mit partiell glatten Bereichen (Abbildung 12).

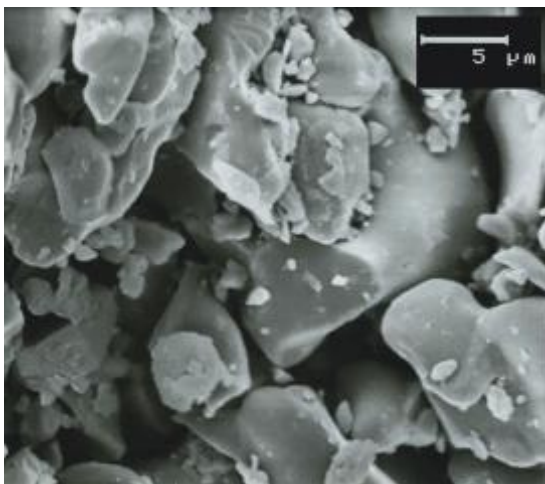


Abbildung 5: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers, gemischt mit 1 mmolarem Kobaltlösung (10 KV, Vergrößerung 3000fach)

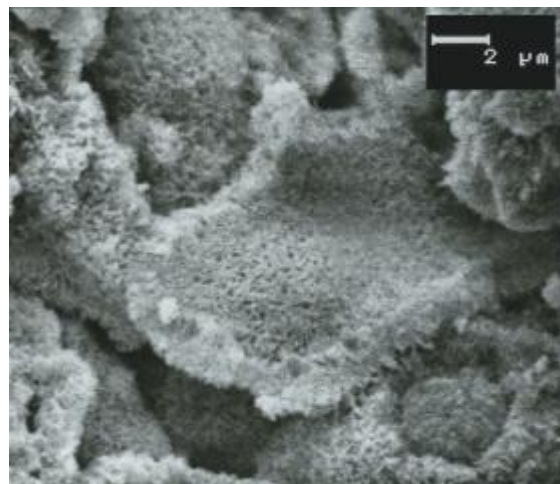


Abbildung 6: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers mit zugesintertem Kobalt (10 KV, Vergrößerung 5000fach)

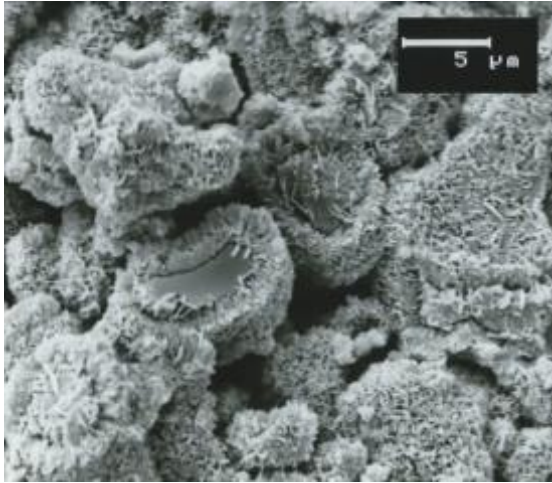


Abbildung 7: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers angemischt mit 1mmolarer Manganlösung (10 KV, Vergrößerung 3000fach)

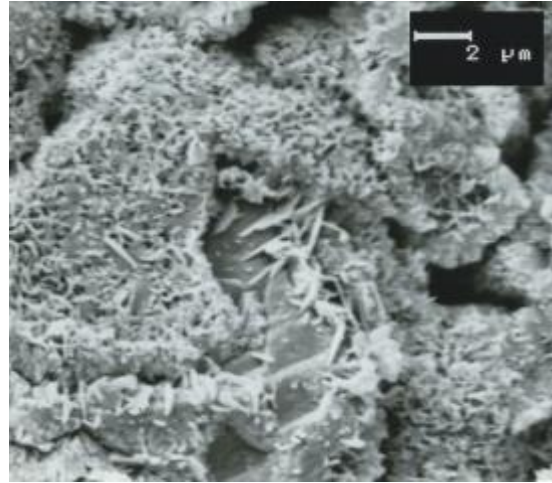


Abbildung 8: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers angemischt mit 1mmolarer Manganlösung (10 KV, Vergrößerung 5000fach)

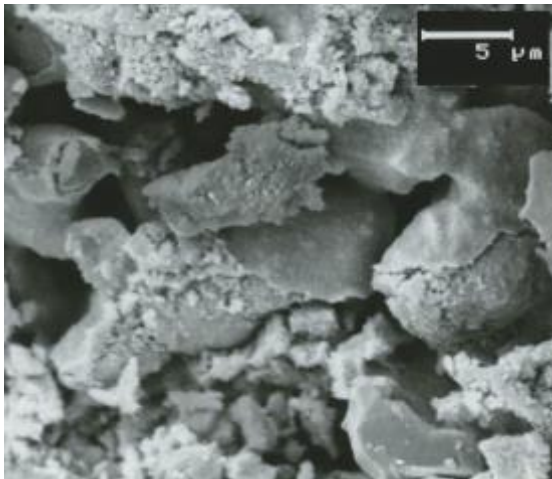


Abbildung 9: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers angemischt mit 1 mmolarer Nickellösung (10 KV, Vergrößerung 3000fach)

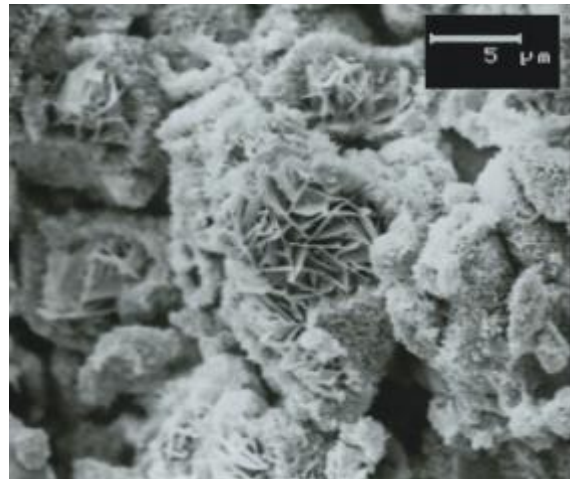


Abbildung 10: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers angemischt mit 1 mmolarer Zinklösung (10 KV, Vergrößerung 3000fach)

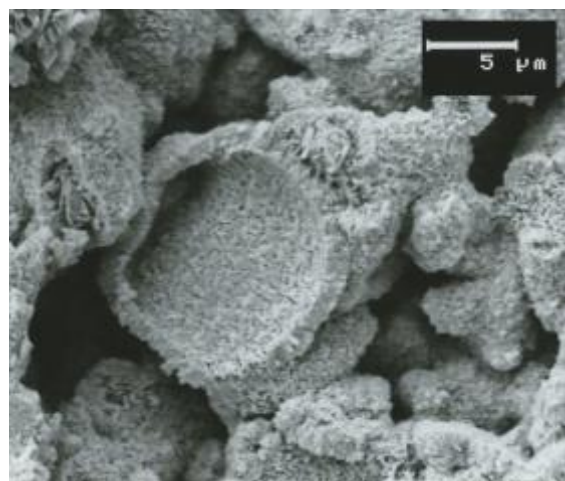
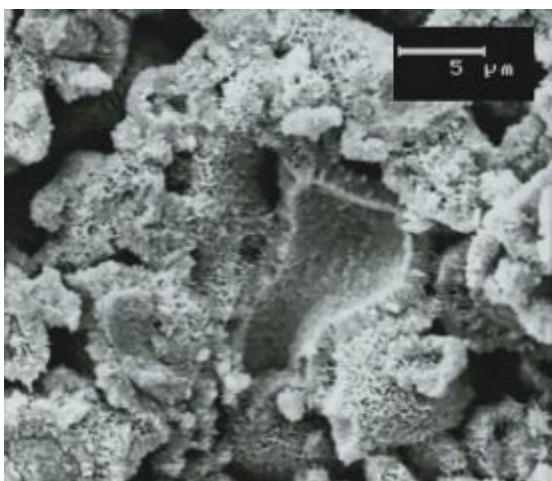


Abbildung 11: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers mit zugesintertem Kupfer (10 KV, Vergrößerung 3000fach)

Abbildung 12: REM-Aufnahme der Bruchfläche eines CaP-Körpers mit zugesintertem Vanadium (10 KV, Vergrößerung 3000fach)

4.4 Röntgendiffraktometrische Analyse im XRD

Mit Hilfe eines Röntgendiffraktometers wurden verschiedene Röntgendiffraktogramme der 24 Stunden ausgehärteten, metalldotierten Probenkörper angefertigt. Durch die unterschiedlichen Beugungsmuster der Röntgenstrahlen an den verschiedenen Kristallen konnten Aussagen über die Umsetzung des Edukts α -TCP zu Hydroxylapatit gemacht werden. Untersucht wurden α -TCP-basierende Zementproben mit Metallionendotierung durch Zusinterung und durch Zugabe von 1 mmol/l des entsprechenden Metallsalzes zur Binderflüssigkeit. Da sich typische Beugungsreflexe von Calciumphosphaten in einem Winkelbereich zwischen 20° und 40° befinden, wurden die Messungen in diesem Bereich schrittweise mit $0,02^\circ$ aufgenommen.

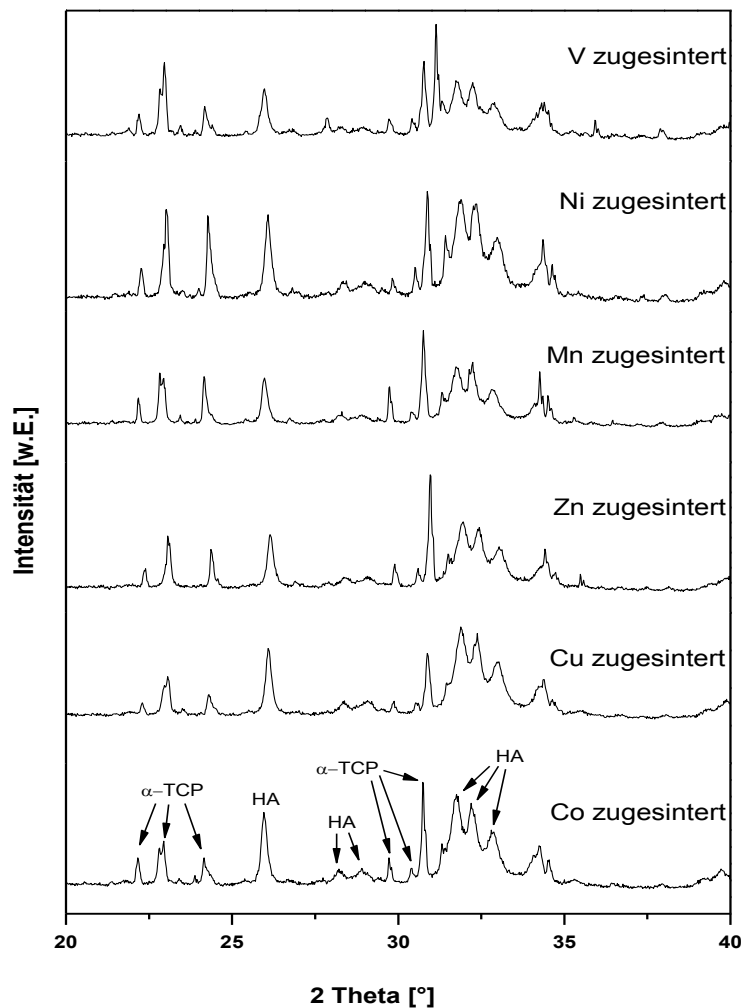


Abbildung 13: Röntgendiffraktogramme von α -TCP-basierenden Zementplättchen mit Metallionendotierung durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver nach 24 Stunden Aushärtung bei 37° C. Auf der Ordinate ist die Intensität angegeben, auf der Abszisse der Beugungswinkel 2 Theta.

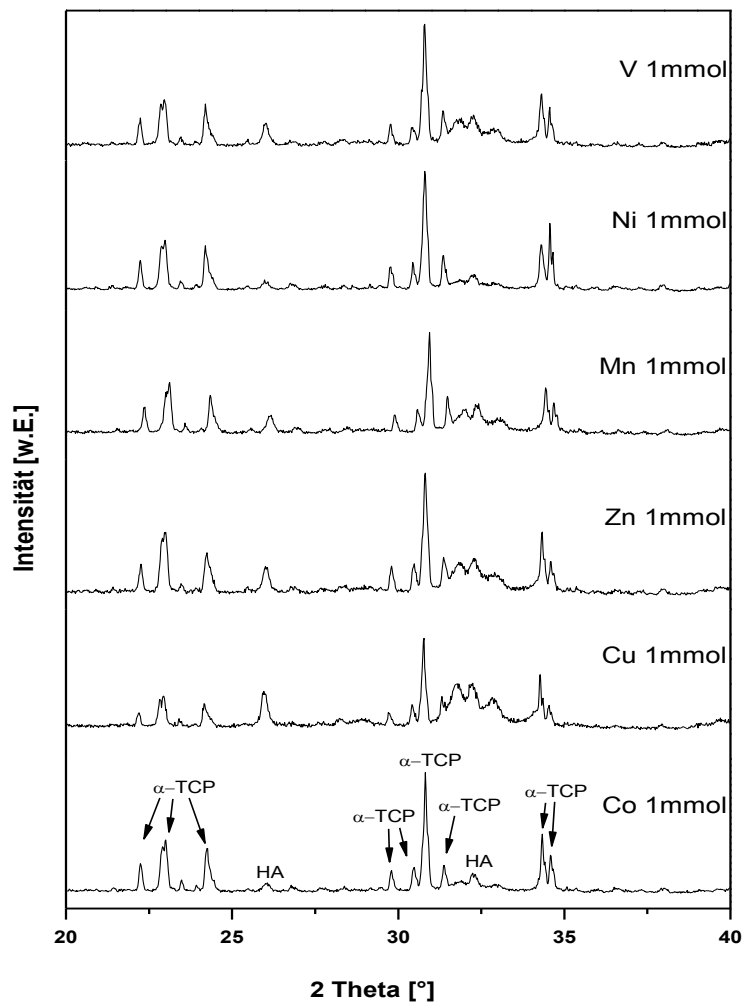


Abbildung 14: Röntgendiffraktogramme von α -TCP-basierenden Zementplättchen mit Metallionendotierung durch Zusatz von jeweils 1 mmol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung nach 24 Stunden Aushärtung bei 37° C. Auf der Ordinate ist die Intensität angegeben, auf der Abszisse der Beugungswinkel 2 Theta.

Aus den Diagrammen wird ersichtlich, dass bei allen metallionendotierten Zementproben noch ein hoher Anteil an α -TCP vorhanden war. Es kam zu einer unvollständigen Umsetzung von α -TCP zu Hydroxylapatit, wobei sich alle Metallionen als inhibierender Faktor für die Umsetzung erwiesen. Ein Vergleich zwischen den verschiedenen Dotierungsarten ergab im Bereich der typischen Beugungsreflexe von Hydroxylapatit zwischen 30 °- 35 ° eine etwas bessere Umsetzungsrate des Edukts α -TCP zu Hydroxylapatit bei den durch Zusinterung dotierten Proben. Der entsprechende HA-Gehalt wird aus dem nachfolgenden Diagramm der Rietveld-Analyse ersichtlich.

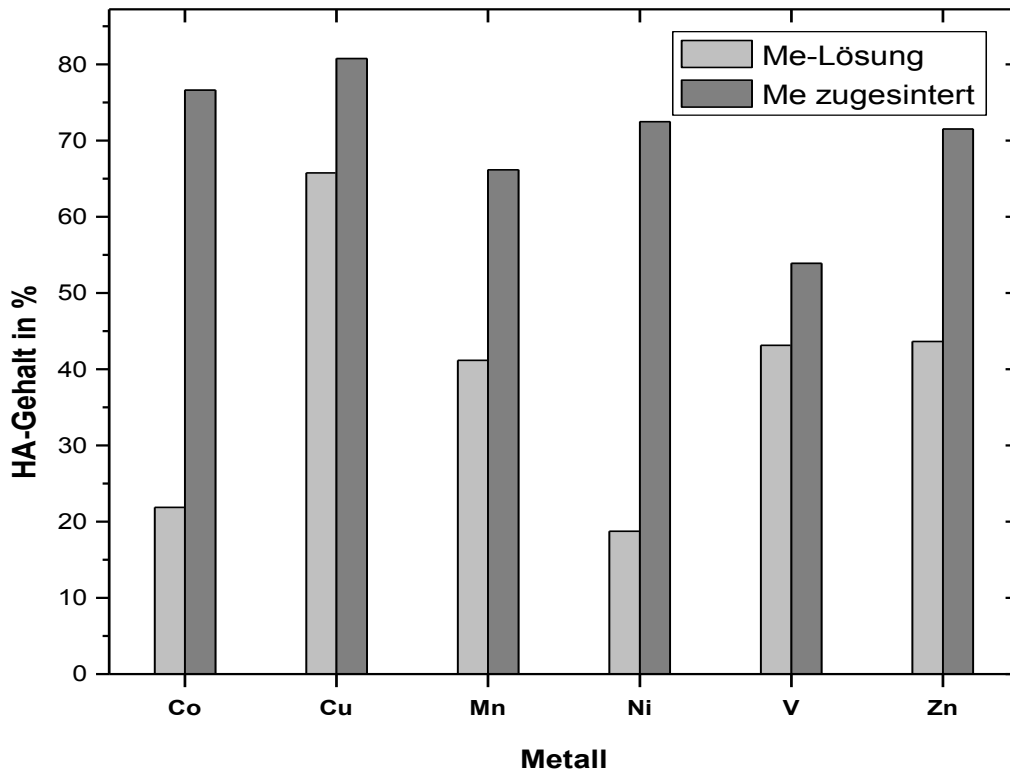


Abbildung 15: HA-Gehalt in α -TCP-basierenden Zementplättchen mit Metallionendotierung durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver (im Diagramm als Me zugesintert bezeichnet) bzw. durch Zugabe von jeweils 1 mmol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung (im Diagramm als Me-Lösung bezeichnet) nach 24 Stunden Aushärtung bei 37° C. Auf der Ordinate ist der HA-Gehalt in % angegeben, auf der Abszisse die verschiedenen Metalle.

Aus dem obigen Diagramm wird deutlich, dass alle Zementproben, die mit Metallionendotierung durch Zusinterung hergestellt worden waren, einen deutlich erhöhten HA-Gehalt aufwiesen. Im Vergleich der zugesinterten Proben untereinander waren weniger Schwankungen im HA-Gehalt nachweisbar als bei den mit der 1 mmolar konzentrierten Anmischflüssigkeit hergestellten Zementplättchen. Der höchste HA-Gehalt bei den zugesinterten Proben wurde mit 80,8 % für die Kupferplättchen festgestellt, der niedrigste für Vanadium mit 53,9 %. Unter den mit der maximal konzentrierten Metallionenlösung hergestellten Proben wiesen die Kupferplättchen mit 65,8 % die höchste HA-Konzentration auf, die Nickelproben mit nur 18,7 % den bei weitem geringsten Wert für Hydroxylapatit.

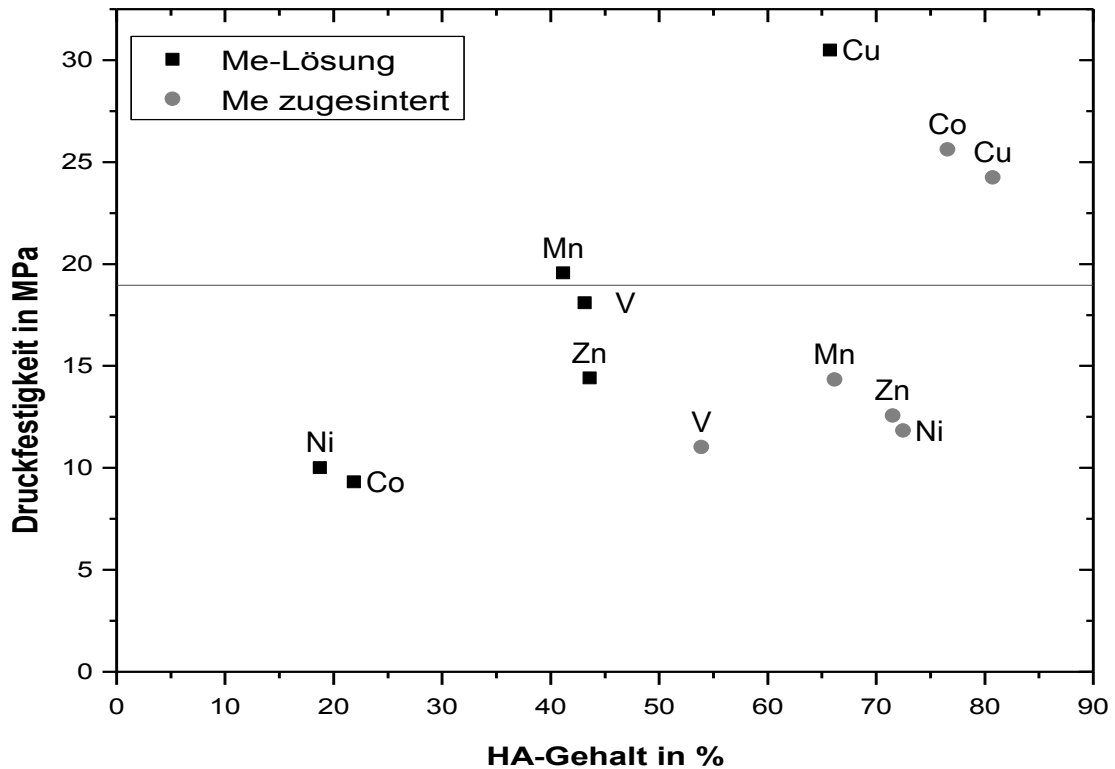


Abbildung 16: Vergleich der Druckfestigkeit und des HA-Gehalts in α -TCP-basierenden Zementplättchen mit Metallionendotierung durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver (im Diagramm als Me zugesintert bezeichnet) bzw. durch Zugabe von jeweils 1 mmol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung (im Diagramm als Me-Lösung bezeichnet) nach 24 Stunden Aushärtung bei 37° C. Auf der Ordinate ist die Druckfestigkeit in MPa angegeben, auf der Abszisse der HA-Gehalt in Prozent. Die durchgezogene, horizontale Linie gibt die Druckfestigkeit der metallfreien Referenz von 18,96 MPa wieder.

Aus dem Vergleich des HA-Gehalts mit der Druckfestigkeit ist kein einheitliches Bild erkennbar. Tendenziell wiesen aber die Proben mit einem niedrigeren Anteil an Hydroxylapatit wie beispielsweise bei den Zementplättchen, denen Nickel- und Kobaltionen durch die Binderlösung hinzugefügt worden waren, auch eine gegenüber der metallfreien Referenz reduzierte Druckfestigkeit auf.

4.5 Massenspektrometrische Analyse mittels ICP-MS

4.5.1 Metallionenkonzentration in den Zementplättchen

Die metallmodifizierten Zementplättchen wurden in 65 %iger Salpetersäure aufgelöst und mit Reinstwasser verdünnt, um mittels der Analysemethode der ICP-MS Aussagen über den Metallgehalt in den verschiedenen Plättchen zu erhalten. Es wurden jeweils drei Plättchen einer Art getestet. Die ermittelten Mittelwerte sind in Abbildung 17 grafisch dargestellt.

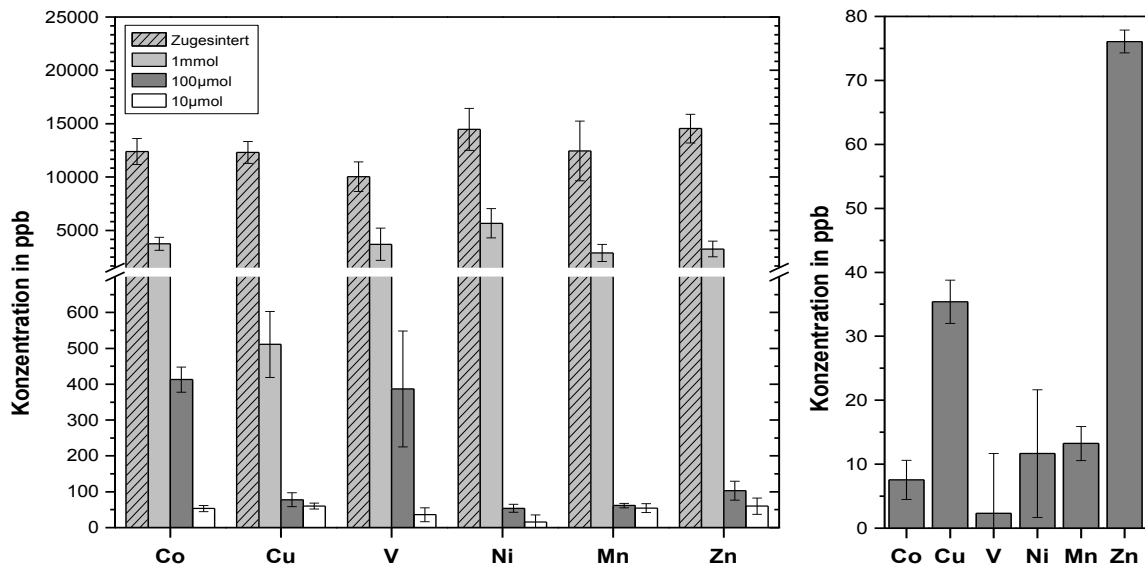


Abbildung 17: (A) Gehalt an Metallionen von α -TCP-basierenden Zementplättchen mit Metallionendotierung durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von jeweils 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate ist die Konzentration der Metalle in ppb angegeben, auf der Abszisse die jeweiligen Metalle mit der entsprechenden Dotierungsmethode. (B) Gehalt an Metallionen im metallfreien α -TCP-Referenzzement. Auf der Ordinate ist die Konzentration der Metalle in ppb angegeben, auf der Abszisse die verschiedenen Metalle.

Entsprechend der zugeführten Konzentration ließen die modifizierten Zementplättchen einen unterschiedlichen Metallgehalt erkennen. Die meisten Proben wiesen einen der Konzentration der Metallionendotierung entsprechenden Gehalt der verschiedenen Metalle auf, jedoch waren einige Abweichungen in der Ionenbeladung erkennbar. Die Zementplättchen mit zugesinterten Metallionen enthielten bei allen Modifizierungen den größten Anteil an Metallionen. Der Gehalt in den verschiedenen mit 1 mmolar konzentrierter Anmischlösung der Metalle hergestellten Plättchen zeigte ein annähernd einheitliches Niveau bei den jeweiligen Metallen. Eine Ausnahme bildeten die Kupferplättchen. Der Kupfergehalt war gegenüber den anderen mit 1 mmolarer Lösung hergestellten Proben deutlich reduziert. Mit 100 μ molar konzentrierter Anmischflüssigkeit war der Ionengehalt von Kobalt und Vanadium gegenüber den anderen Metallen signifikant erhöht. Auch in den metallfreien α -TCP-Probenkörpern waren Metallionen detektierbar. Von Vanadium, Kobalt, Nickel und Mangan waren nur geringe Mengen nachweisbar, wohingegen die Referenzplättchen einen verhältnismäßig hohen Wert an Kupfer- und vor allem an Zinkionen aufwiesen.

4.5.2 Freisetzungsstudie

Das Freisetzungsverhalten der Metallionen aus den verschiedenen Probenkörpern wurde über einen Zeitraum von 7 Tagen in Auslagerungsexperimenten analysiert. Es wurden jeweils 3 Proben der unterschiedlichen Dotierungsmethoden und unterschiedlich konzentrierten Binderlösungen untersucht. Die Zementplättchen wurden einzeln mit 2 ml des vorbereiteten Zellkulturmediums bedeckt und 24 Stunden im Trockenschrank bei 37 °C auf einem Rüttler gelagert. Nach jeweils einem Tag wurde das Auslagerungsmedium erneuert und das gewonnene Eluat auf die darin gelöste Metallionenkonzentration mittels der ICP-MS analysiert. Die akkumulierten Mittelwerte mit den dazugehörigen Fehlerbalken sind in den folgenden Diagrammen graphisch dargestellt. Die Fehlerwerte wurden mittels der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung ermittelt. Aus diesen wird ersichtlich, dass sich die Freisetzungskinetiken von Metall zu Metall sowohl untereinander als auch bezüglich der verschiedenen Formen der Dotierung mit Metallionen deutlich unterscheiden. Eine erwartungsgemäße, der Dotierungskonzentration entsprechende Freisetzung der verschiedenen Metallionen konnte nur für Vanadium und Mangan festgestellt werden, wobei die freigesetzte Menge an Vanadiumionen im Vergleich zu Mangan deutlich höher ausfiel. Teilweise erschien die Freisetzungskinetik der Metalle wie beispielsweise bei Vanadium vorwiegend diffusionsgesteuert mit einer sehr hohen initialen Ionenausschüttung oder sie folgte einer eher konstanten Freisetzung durch Degradation wie beispielsweise bei Zink. Im Folgenden werden die einzelnen Diagramme kurz erläutert.

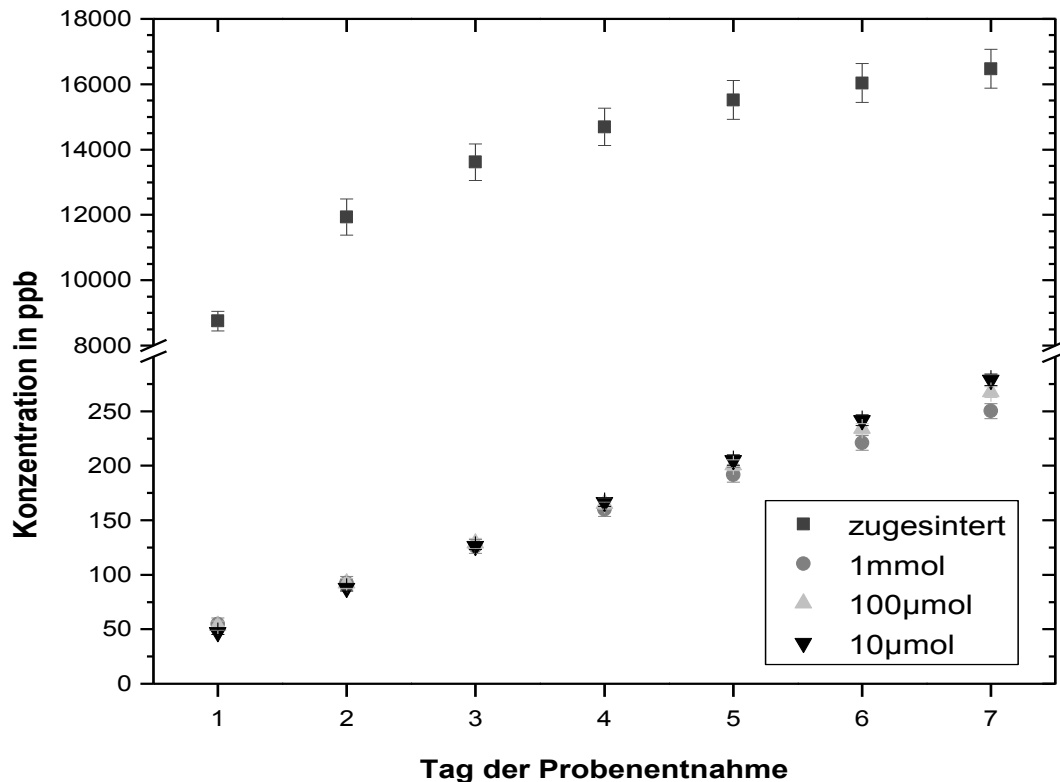


Abbildung 18: Mittels der ICP-MS bestimmte Freisetzungskinetik von Kupfer (65) aus mit Kupferionen dotierten α -TCP-Proben durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate sind die akkumulierten Werte der pro Messtag freigesetzten Metallionenkonzentration in ppb angegeben, auf der Abszisse die Messtage.

Aus den verschiedenen Kupferproben, wurden die Kupfer(II)ionen fast ausschließlich aus den durch Zusinterung der Ionen hergestellten Proben in einer diffusionsähnlichen Kurve mit einem extrem hohen initialen Burst freigesetzt. In diesem Fall war die freigesetzte Ionenmenge sehr viel höher als bei allen anderen untersuchten Metallionen. War das Metall durch die Anmischflüssigkeit der Zementmatrix hinzugefügt worden, wurden extrem wenige Ionen, eher durch Degradation, in das umgebende Medium gelöst.

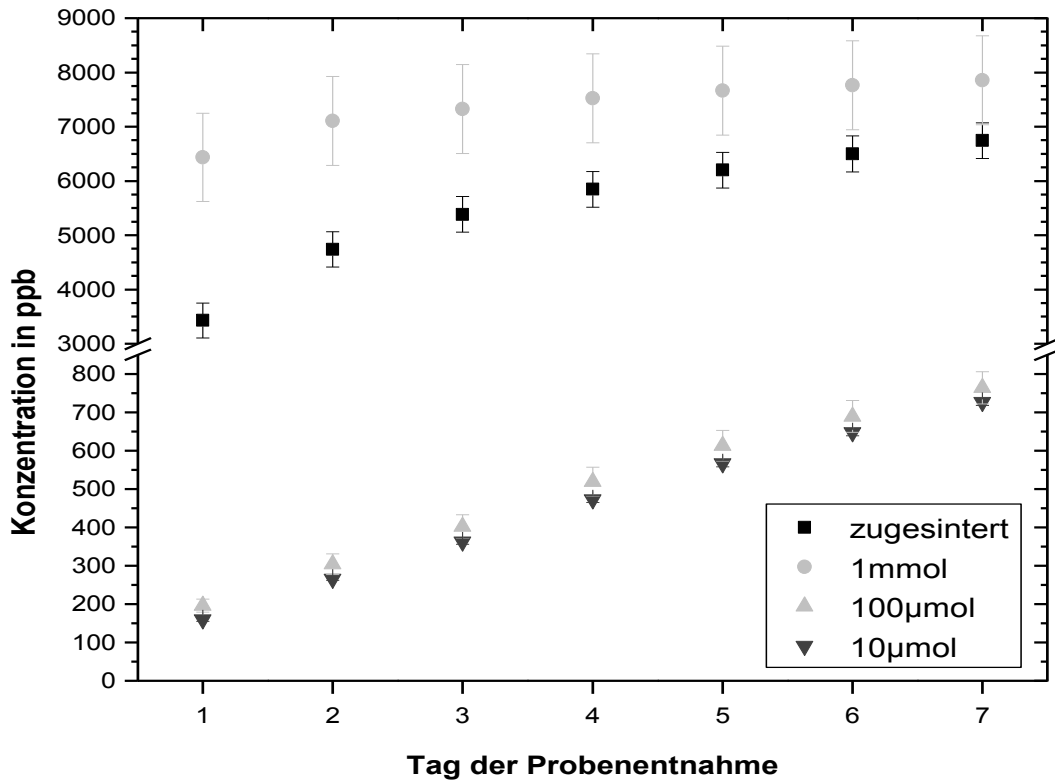


Abbildung 19: Mittels der ICP-MS bestimmte Freisetzungskinetik von Nickel (62) aus mit Nickelionen dotierten α -TCP-Proben durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate sind die akkumulierten Werte der pro Messtag freigesetzten Metallionenkonzentration in ppb angegeben, auf der Abszisse die Messtage.

Ein anderes Erscheinungsbild ergab sich für Nickel(II)-Ionen. Die höchste Konzentration an Nickelionen wurde aus den mit der 1 mmolaren Binderlösung hergestellten Proben freigesetzt, mit einem hohen initialen Burst. Ab dem zweiten Tag war nur noch ein geringer Anstieg der Ionenkonzentration zu verzeichnen. Eine ähnliche Kurve ergab sich für die zugesinterten Proben, allerdings mit einer etwas weniger starken Sättigung und damit einem höheren Anstieg der Kurve. Bei den mit niedrig konzentrierter Anmischung hergestellten Proben (10 μ mol und 100 μ mol) wurden extrem wenige Metallionen, eher in einer konstant ansteigenden Kurve, freigesetzt.

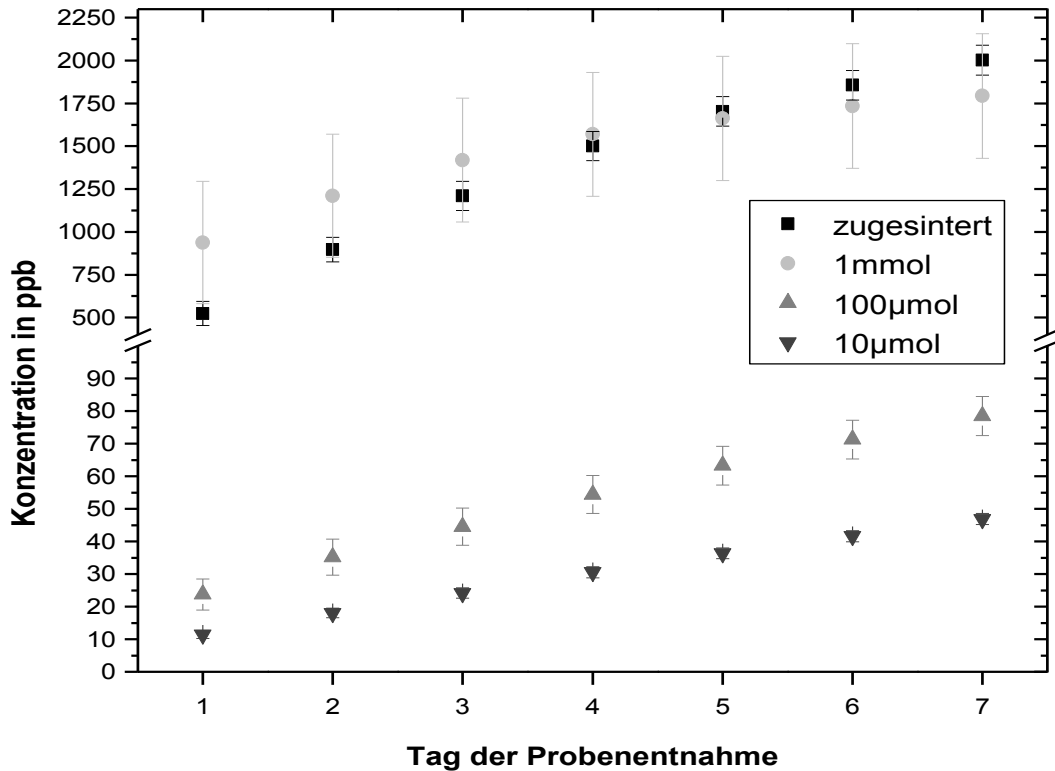


Abbildung 20: Mittels der ICP-MS bestimmte Freisetzungskinetik von Vanadium aus mit Vanadiumionen dotierten α -TCP-Proben durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate sind die akkumulierten Werte der pro Messtag freigesetzten Metallionenkonzentration in ppb angegeben, auf der Abszisse die Messtage.

Auch bei den Vanadiumproben wurden aus den Zementplättchen, die mit den beiden niedrig konzentrierten Anmischflüssigkeiten hergestellt worden waren, sehr wenig Ionen in das Medium vorwiegend durch Degradation freigesetzt. Für die Proben, denen Vanadium durch Zusinterung hinzugefügt worden war oder die mit der 1 mmolar konzentrierten Binderlösung angemischt worden waren, konnte ein initialer Burst mit anschließender Sättigung aufgezeichnet werden, wobei die Sättigung bei den zugesinterten Proben etwas geringer ausfiel.

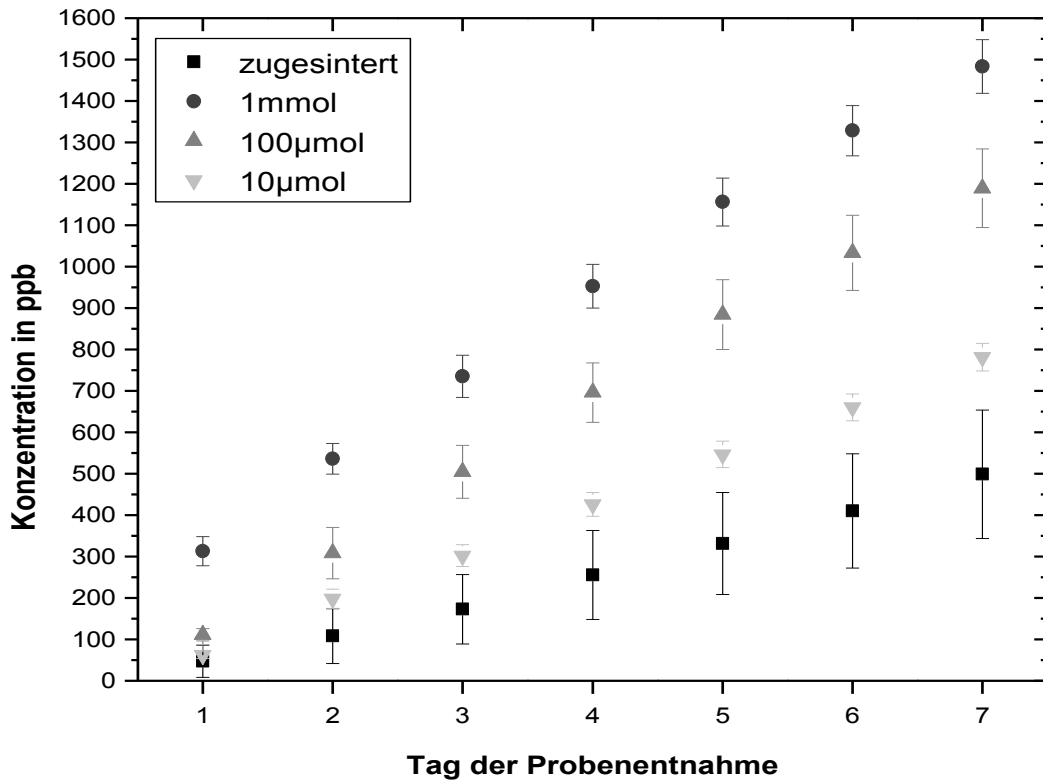


Abbildung 21: Mittels der ICP-MS bestimmte Freisetzungskinetik von Zink (68) aus mit Zinkionen dotierten α -TCP-Proben durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate sind die akkumulierten Werte der pro Messtag freigesetzten Metallionenkonzentration in ppb angegeben, auf der Abszisse die Messtage.

Die Freisetzungskurven von Zink zeigten bei allen Plättchenarten eine eher degradationsgesteuerte konstante Freisetzungsrage, wobei aus den mit der maximal konzentrierten Anmischlösung hergestellten Proben die meisten Ionen freigesetzt wurden. Aus den durch Zusinterung von Zink gewonnenen Proben wurde hingegen die geringste Menge an Ionen abgegeben.

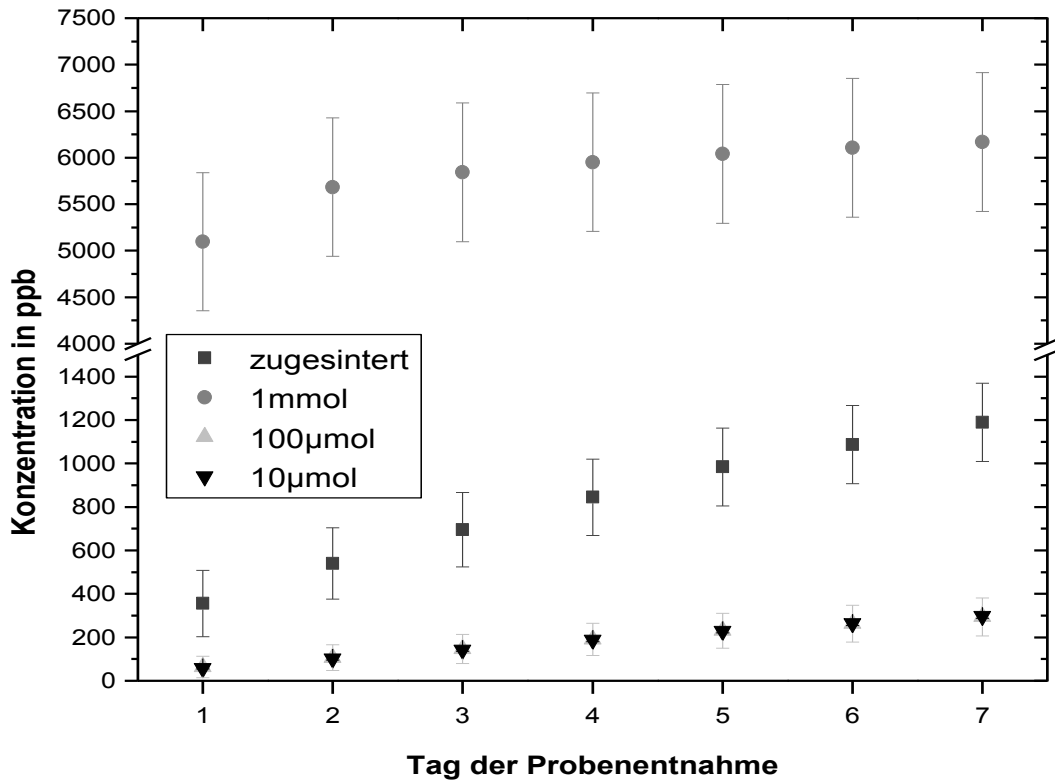


Abbildung 22: Mittels der ICP-MS bestimmte Freisetzungskinetik von Kobalt aus mit Kobaltionen dotierten α -TCP-Proben durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate sind die akkumulierten Werte der pro Messtag freigesetzten Metallionenkonzentration in ppb angegeben, auf der Abszisse die Messtage.

Aus den mit der maximal konzentrierten Lösung hergestellten Proben wurden die Kobaltionen am stärksten eher durch Diffusion freigesetzt, mit einem sehr hohen initialen Burst. Bei den anderen Kobaltplättchen war die Freisetzung deutlich geringer und erschien eher degradationsgesteuert.

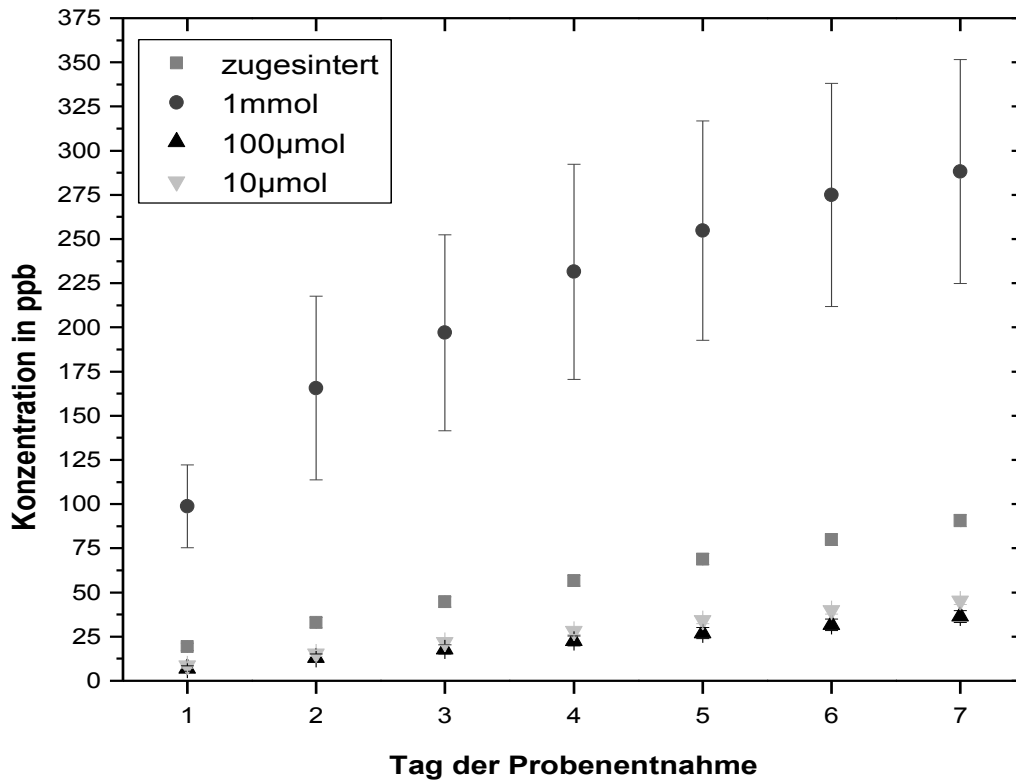


Abbildung 23: Mittels der ICP-MS bestimmte Freisetzungskinetik von Mangan aus mit Manganionen dotierten α -TCP-Proben durch Zusinterung der Ionen zum Ausgangspulver bzw. durch Zusatz von 1 mmol, 100 μ mol und 10 μ mol des entsprechenden Metallions zur Binderlösung. Auf der Ordinate sind die akkumulierten Werte der pro Messtag freigesetzten Metallionenkonzentration in ppb angegeben, auf der Abszisse die Messtage.

Im Vergleich mit allen untersuchten Metallen wurden aus den Manganproben in geringstem Umfang Ionen freigesetzt. Die meisten Manganionen wurden aus den mit der maximal konzentrierten Lösung hergestellten Plättchen abgegeben.

4.6 Auswertung der Zellversuchsreihe

Für die folgenden Zellversuche wurden Zementplättchen verwendet, die aus α -TCP-Pulver angemischt mit 10 μ molarer Kobaltionenlösung, 1 mmolarer Zinkionenlösung und als metallfreie Referenz mit Dinatriumhydrogenphosphat hergestellt wurden. Kobalt wurde als Vertreter der Metalle die Osteoklasten stimulieren gewählt, Zink als Vertreter der osteoklastenhemmenden Metalle. Die Zementproben wurden für 15 Minuten in 70 %igen Alkohol eingelegt und anschließend beidseitig für je 15 Minuten getrocknet, damit das Ethanol verdampfen konnte. Zu den so vorbereiteten Plättchen wurde eine Zellsuspension gegeben und bei 37 °C im Inkubator kultiviert, so dass die Zellen auf den Oberflächen anhaften konnten. Der

Mediumwechsel erfolgte an Tag 4, 6, 7, 8, 11 und 13 nach Aussaat. Bei der Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität diente das Zellkultur-Polystyrol als Vergleich, bei den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen Glas.

4.6.1 Bestimmung der Zellvitalität und der Zellzahl

In diesem Versuchsteil sollte die Aktivität und das Wachstum der zu Osteoklasten differenzierten Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 auf verschiedenen mit Metallionen dotierten Zementplättchen untersucht und ausgewertet werden. Die Bestimmung der Zellvitalität und Zellzahl wurde an Tag 7, 11 und 15 nach Aussaat durchgeführt. Von jeder Zementart wurden pro Versuchstag jeweils vier Prüfkörper verwendet und aus den Ergebnissen der jeweilige Mittelwert berechnet. Die Standardabweichungen wurden in den Tabellen durch Fehlerbalken graphisch dargestellt.

Mittels des WST-1-Zellvitalitätstests wurde über die Succinatdehydrogenase, die den Farbstoff WST-1 zum farbigen Formazan umsetzt, die Vitalität der Zellen auf den verschiedenen Zementplättchen bestimmt. Als Vergleich diente das Zellkultur-Polystyrol. Die Messwerte wurden im ELISA-Reader anhand des Farbumschlages ermittelt und die Ergebnisse bezogen auf den höchsten Mittelwert der Referenzoberfläche Polystyrol am Tag des besten Wachstums (100 %-Wert) mit der Excel-Tabellenkalkulation errechnet und mittels der OriginPro 7G Software graphisch dargestellt.

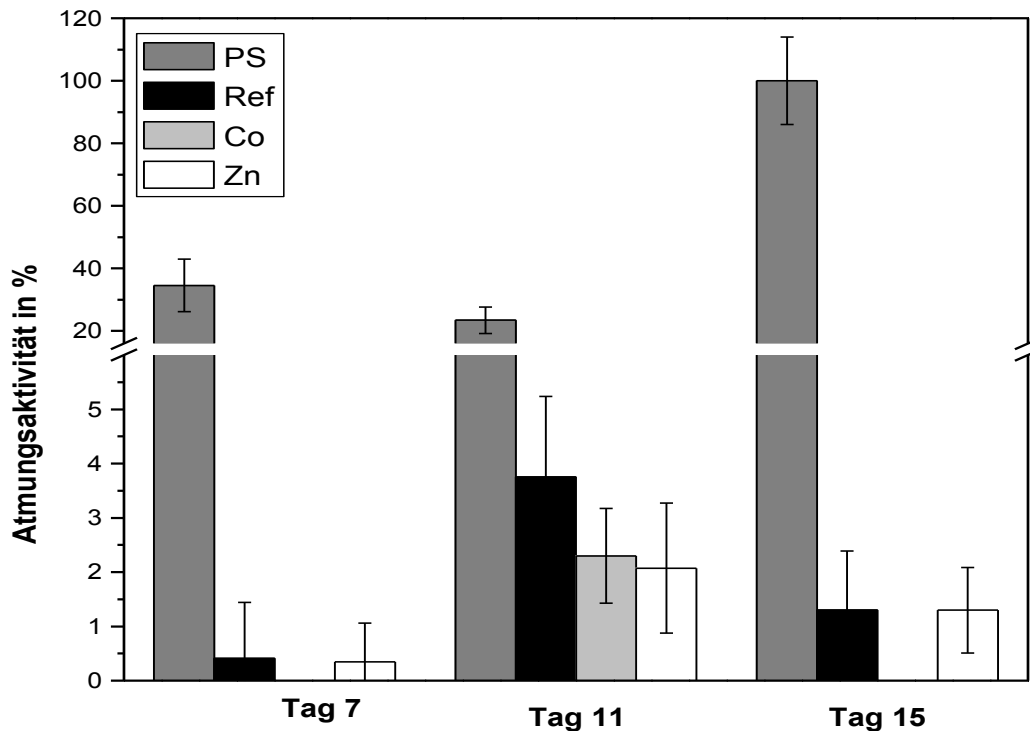


Abbildung 24: Relative Zellaktivität der zu Osteoklasten differenzierten Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 auf Zementplättchen aus α -TCP-basierendem Pulver angemischt mit 10 μ molarer Kobaltlösung (als Co bezeichnet), 1 mmolarer Zinklösung (als Zn bezeichnet), Na_2HPO_4 als metallfreie Referenz (als Ref bezeichnet) und Polystyrol (als PS bezeichnet) als Kontrollfläche ($n = 4$ pro Oberfläche), ermittelt durch den WST-1-Zellvitalitätstest. Auf der Ordinate ist die relative Zellaktivität in % dargestellt bezogen auf die Referenzoberfläche des Polystyrols am Tag der höchsten Aktivität (Tag 15). Auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Nur für die Kontrolloberfläche Polystyrol konnte ein signifikanter Anstieg der mitochondrialen Zellaktivität verzeichnet werden. Die Aktivität fiel an Tag 11 nach Aussaat leicht ab, um dann an Tag 15 den höchsten Wert zu erreichen (100 %-Wert). An Tag 7 konnte für die metallfreien Referenzplättchen kaum eine mitochondriale Zellaktivität ermittelt werden. Bis zu Tag 11 stieg sie auf knapp 3,8 % an, um dann an Tag 15 wieder auf 1,3 % abzufallen. Auffallend war die extrem geringe mitochondriale Aktivität auf den metalldotierten Zementproben. Die maximale Aktivität für die mit Kobaltionen modifizierten Plättchen war an Tag 11 mit nur circa 2 % zu verzeichnen. An den beiden anderen Messtagen konnte sie überhaupt nicht nachgewiesen werden. Ebenso verhielt es sich mit den zinkmodifizierten Zementproben, wobei der Höchstwert an Tag 11 nur 0,9 % betrug.

Die relative Anzahl der auf den verschiedenen Zementplättchen gewachsenen Zellen wurde mit Hilfe des CASY-1 Zellanalysesystems ermittelt. Die gewonnenen Werte wurden auch hier mittels der Excel-Tabellenkalkulation bezogen auf die

Referenzfläche Polystyrol am Tag des größten Wachstums (100 %-Wert) berechnet und durch die OriginPro 7G Software graphisch dargestellt.

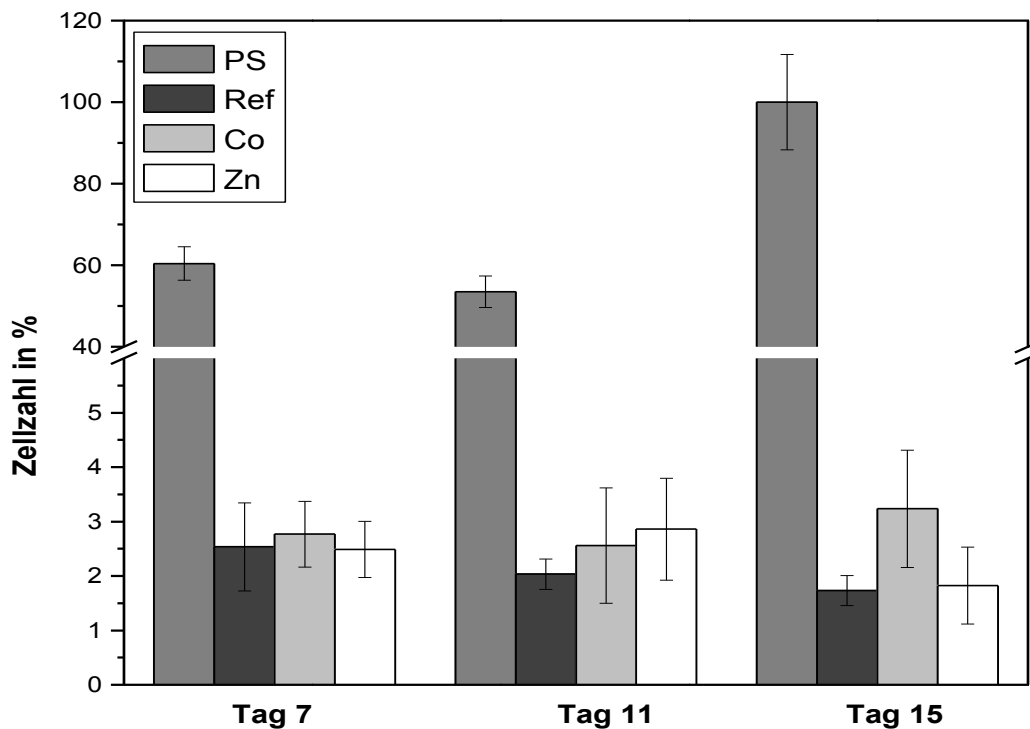


Abbildung 25: Relative Zellzahl der zu Osteoklasten differenzierten Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 auf Zementplättchen aus α -TCP-basierendem Pulver angemischt mit 10 μ molarer Kobaltlösung (als Co bezeichnet), 1 mmolarer Zinklösung (als Zn bezeichnet), Na_2HPO_4 als metallfreie Referenz (als Ref bezeichnet) und Polystyrol (als PS bezeichnet) als Kontrollfläche (n = 4 pro Oberfläche), ermittelt durch elektronische Zellzählung mittels CASY-1. Auf der Ordinate ist die relative Zellzahl in % dargestellt bezogen auf die Referenzoberfläche des Polystyrols am Tag des größten Wachstums (Tag 15). Auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Das Wachstum der Zellzahl zeigte ein ähnliches Erscheinungsbild wie die Ergebnisse des WST-Versuches. Der Maximalwert (100 %-Wert) wurde für die Oberfläche Polystyrol an Tag 15 nach Aussaat ermittelt. An Tag 7 betrug sie circa 60 % und fiel dann auf circa 53 % an Tag 11 ab. Das beste Zellwachstum auf den metallfreien Zementoberflächen wurde mit 2,5 % 7 Tage nach Aussaat verzeichnet. Danach fiel die Zellzahl auf 1,7 % ab. Für die kobaltdotierten Zementproben konnte ein äußerst geringer Anstieg der Zellzahl bis zu Tag 15 nach Aussaat mit 3,2 % ermittelt werden. Für die zinkmodifizierten Prüfkörper lag der Maximalwert bei nur 2,9 % an Tag 11 nach Aussaat.

4.6.2 Massenspektrometrische Analyse

Innerhalb der fünfzehntägigen Zellversuchsreihe wurden während des Mediumwechsels die Überstände in Epicups gesammelt, um mittels der Analysemethode der ICP-MS zu untersuchen, welche Konzentrationen von Metallionen aus den Prüfkörpern über den gesamten Versuchszeitraum in das bedeckende Medium freigesetzt wurden. Bei den Kobaltplättchen wurde die Freisetzung von Co^{2+} , bei den Zinkproben von Zn^{2+} bestimmt. Als Vergleich wurde das bedeckende Medium des metallfreien Referenzzements hinsichtlich der Freisetzung beider Ionenarten bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen sind in der nachfolgenden Grafik anhand eines Säulen-Diagramms dargestellt.

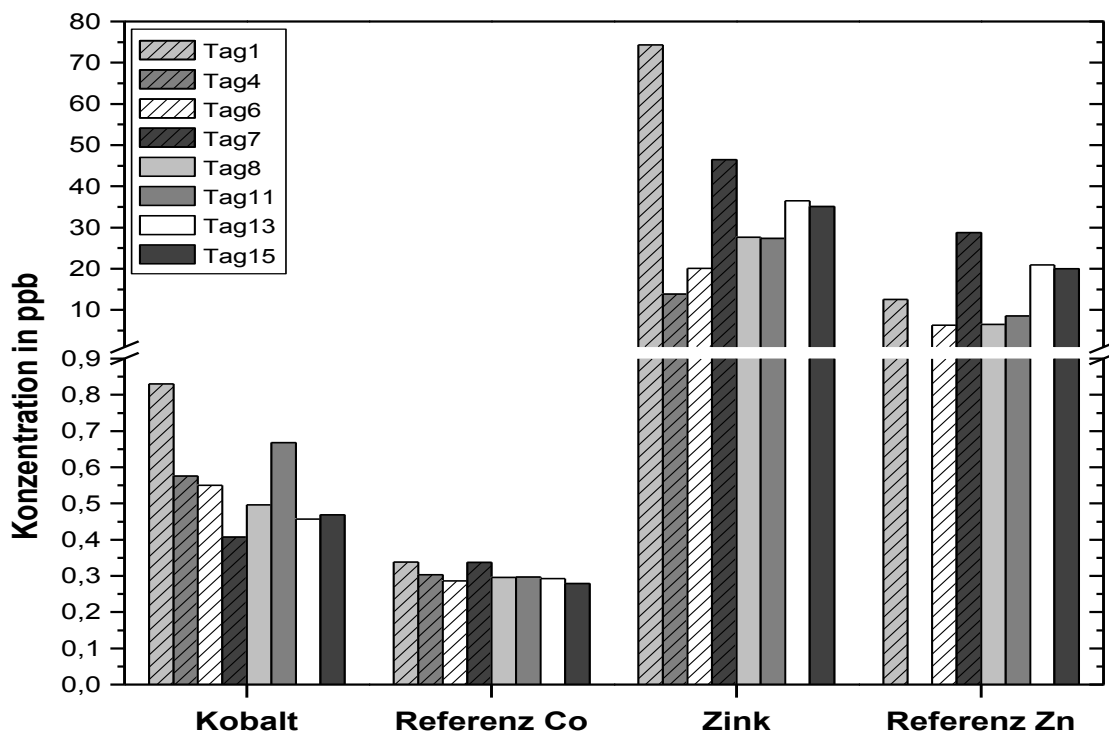


Abbildung 26: Massenspektrometrischer Nachweis der Freisetzung von Co^{2+} -Ionen aus 10 $\mu\text{molaren}$ Kobaltplättchen (in der Abbildung als Kobalt bezeichnet) und Zn^{2+} -Ionen aus 1 mmolaren Zinkplättchen (in der Abbildung als Zink bezeichnet) in das DMEM-Medium. Als Vergleich wurde die Freisetzung beider Ionen aus den metallfreien Referenzzementproben ermittelt (als Referenz Co und Referenz Zn bezeichnet). Auf der Ordinate ist die Menge der jeweils freigesetzten Ionen in ppb aufgetragen, auf der Abszisse die jeweiligen Probenkörper.

Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, dass sich das Freisetzungsmuster der Ionen aus den Referenzproben annähernd mit der Freisetzung aus den metallmodifizierten Plättchen deckte. Am ersten Tag wurde eine große Menge Zink- und Kobaltionen in das Medium abgegeben. Im weiteren Verlauf der Versuchsreihe sank die Freisetzung,

um bei den zinkdotierten Proben an Tag 7 wieder anzusteigen. Bei den kobaltdotierten Plättchen stieg der Wert erst an Tag 11 wieder an. Danach pendelte sich die Freisetzungsrates auf ein relativ konstantes Niveau ein. Gegen Ende der Versuchsreihe war wieder ein leichter Anstieg der Freisetzungsrates zu verzeichnen.

4.6.3 Auswertung der Zellmorphologie

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurden von den verschiedenen Oberflächen mit den kultivierten Zellen der zu Osteoklasten differenzierten Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 gemacht, um Aussagen über Morphologie und Wachstum treffen zu können. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von acht Tagen auf den verschiedenen Präparaten kultiviert, in einer Acetonreihe entwässert und fixiert, mit Gold bedampft und unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet.

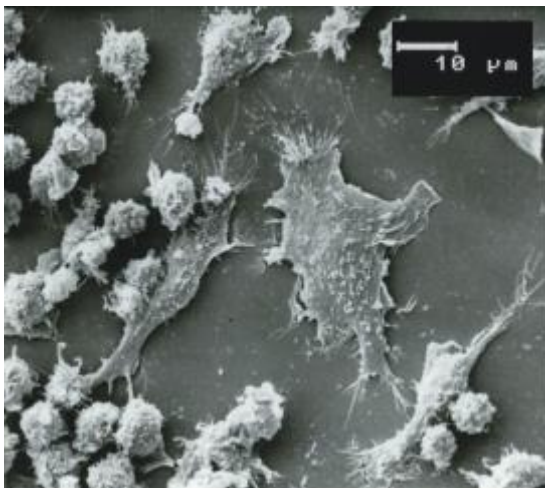


Abbildung 27: REM-Aufnahme von RAW 264.7 Zellen kultiviert auf Glas in Anwesenheit von RANKL acht Tage nach Aussaat (10 KV, Vergrößerung 1000fach)

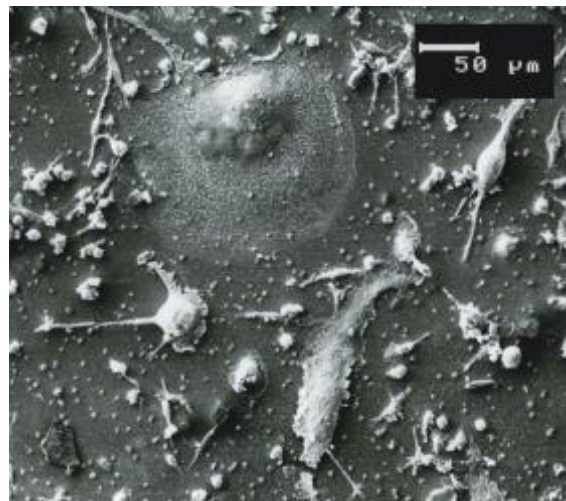


Abbildung 28: REM-Aufnahme von RAW 264.7 Zellen kultiviert auf Glas in Anwesenheit von RANKL acht Tage nach Aussaat (10 KV, Vergrößerung 200fach)

Auf gläserner Unterlage fusionierten die einkernigen Vorläuferzellen in Gegenwart von RANKL zu multinukleären Riesenzellen (Abbildung 27). Es konnte auf Glas eine dichte Besiedelung der flächig ausgebreiteten, mehrkernigen Zellen aufgefunden werden. Sie wiesen teilweise eine beachtliche Größe von weit über 100 µm auf (Abbildung 28). Auf den Zink- und Kobaltplättchen konnten hingegen keine Osteoklasten detektiert werden. Bei der Suche nach Unregelmäßigkeiten, die durch Degradation der Oberfläche durch Osteoklasten entstanden sein könnten, wurden extrem vereinzelt

vermutliche Impressions- beziehungsweise Freißpuren der Riesenzellen aufgefunden (Abbildung 29-A). Eindeutige Aussagen waren jedoch aufgrund der Unebenheiten der Zementoberflächen schwierig zu treffen. Nach langer Suche wurden auf den Kobaltplättchen Strukturen gefunden, die eventuell Osteoklasten darstellen könnten (nicht gezeigt). Was jedoch auf den Kobaltproben stärker als auf den Zinkproben beobachtet werden konnte, waren unfusionierte mononukleäre Vorläuferzellen (Abbildung 29-B und 27-C).

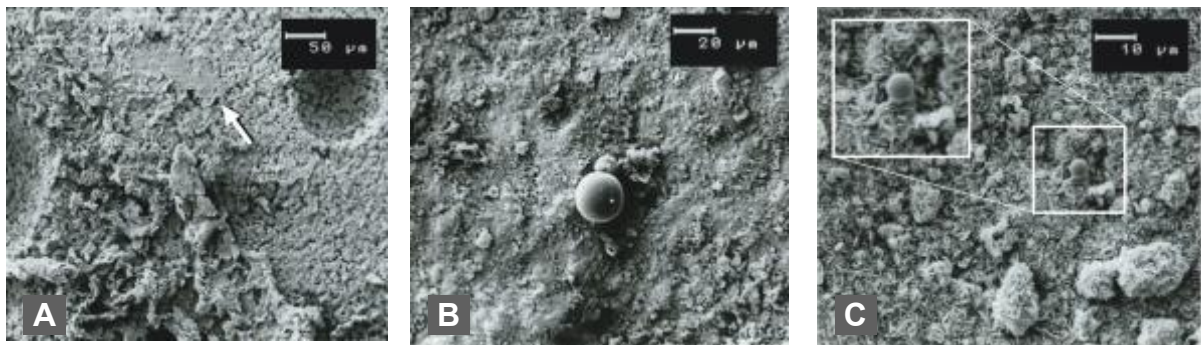


Abbildung 29: REM-Aufnahme von RAW 264-7 Zellen, in Gegenwart von RANKL kultiviert, auf α -TCP-basierenden Zementproben 8 Tage nach Versuchansatz angemischt mit (A) und (B) 10 μ molarer Kobaltionenlösung (10 KV, Vergrößerung 200fach (A) und 500fach (B)), (C) mit 1 mmolarer Zinkionenlösung (10KV, Vergrößerung 1000fach).

4.6.4 Auswertung der TRAP-Färbung

Da die Fusion von RAW 264.7 kein eindeutiger Beweis für die Osteoklastogenese ist, sollte mittels Färbung der tartratresistenten sauren Phosphatase die Zelldifferenzierung der RAW-Zellen zu Osteoklasten nachgewiesen werden. Die aktive iso 5b-Form dieses Enzyms wird spezifisch nur von Osteoklasten abgesondert. Durch die enzymatische Hydrolyse von TRAP wird Naphtol AS-BI freigesetzt, das an Fast Garnet GBC bindet und unlösliche violette Farbkomplexe bildet. Durch diese rötliche Färbung können TRAP-positive Zellen und somit die Differenzierung von RAW-Zellen in Osteoklasten nachgewiesen werden.

Bei der TRAP-Färbung zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den vorherigen Zellversuchen. Auf Glas konnten an allen Versuchstagen Osteoklasten nachgewiesen werden, wobei die Intensität der Färbung bis zu Tag 15 nach Aussaat zunahm. Unter dem Lichtmikroskop ließen die Größe der Zellen und die deutliche Rotfärbung auf eine erfolgreiche Osteoklastogenese schließen (Abbildung 30-A). Die verschiedenen

Zementplättchen hingegen waren alle eher gelblich angefärbt, was auf TRAP-negative Proben hindeutete. Auf den verschiedenen Zementarten konnten keine multinukleären Riesenzellen aufgefunden werden. Es waren lediglich vereinzelt rotgefärbte, mutmaßliche Zellfragmente beziehungsweise Osteoklasten-impressionsspuren zu detektieren (Abbildung 30-B und 30-C).

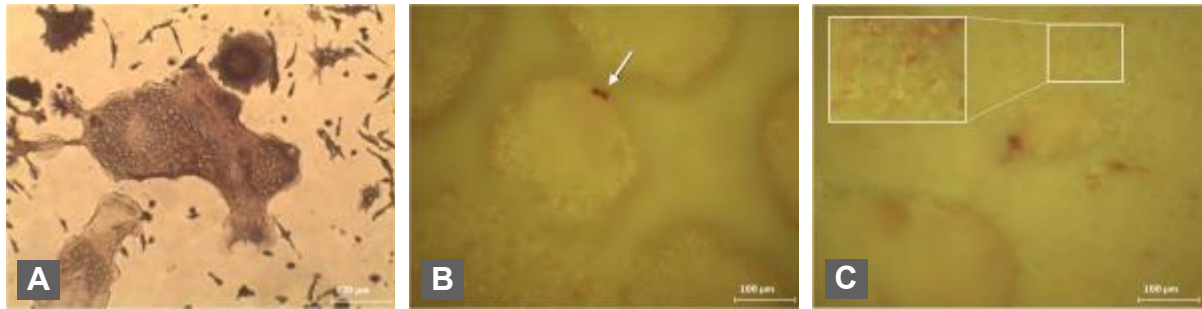


Abbildung 30: Zytochemischer Nachweis von TRAP 15 Tage nach Versuchansatz auf Glas (A), auf α -TCP-basierenden Zementproben angemischt mit 1 mmolarer Zinkionenlösung (B) bzw. 10 μ molarer Kobaltionenlösung (C).

5 DISKUSSION

Ein wichtiges Ziel der wissenschaftlichen Forschung im Bereich der Knochenersatzmaterialien ist es Materialien zu entwickeln, die zum einen keinerlei negative Auswirkungen auf den Körper besitzen, zum anderen jedoch die körpereigenen Zellen positiv beeinflussen können. Eine Grundvoraussetzung für diese Werkstoffe ist die Biokompatibilität, um negative Entzündungsreaktionen zu vermeiden und toxische oder kanzerogene Wirkungen auszuschließen. Bei der Rekonstruktion von Knochendefekten ist es erforderlich Materialien zu verwenden, die bis zur vollständigen Regeneration des Knochens die körpereigenen Funktionen übernehmen. In der Idealvorstellung halten sich Resorption des Implantates und Produktion von körpereigenem Knochen die Waage, sodass sukzessive das Implantat durch körpereigenen Knochen ersetzt wird. Knochenersatzmaterialien auf Basis der Calciumphosphatzemente sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur mineralischen Phase des Knochens von großem medizinischem Interesse [189]. Allerdings sind sie wegen ihrer niedrigen mechanischen Stabilität nur in Regionen einsetzbar, die geringen Belastungen ausgesetzt sind beispielsweise in der Zahnheilkunde oder der craniofacialen Chirurgie. Bestimmte Zementeigenschaften wie Abbindezeit und mechanische Festigkeit können durch Additive positiv verändert werden [190-194]. Calciumphosphatzemente, wie in dieser Arbeit beschrieben, eignen sich hervorragend als Knochenersatzwerkstoffe. Sie sind biokompatibel, können injiziert und sehr gut an den individuellen Knochendefekt angepasst werden. Darüber hinaus binden sie *in vivo* mittels einer isothermen Abbindereaktion selbstständig ab. Außerdem können diese osteokonduktiven Werkstoffe sehr gut als Trägermaterial beispielsweise für Antibiotika, Analgetika oder Proteinen wie Knochenwachstumsfaktoren verwendet werden [195, 196]. Es ist erstrebenswert Calciumphosphatbiokeramiken derart modifizieren zu können, dass es zu einer schnelleren und verbesserten knöchernen Integration des Implantates in den Körper des Patienten kommt. Da Metallionen im menschlichen Körper zahlreiche und essentielle Funktionen ausüben, könnte dies durch eine Modifizierung der Keramiken durch Metallionen, wie in dieser Arbeit beschrieben, bewerkstelligt werden. Metalle sind kostengünstig, einfach zu handhaben, einfach zu sterilisieren und nahezu unbegrenzt haltbar und daher von großem medizinischen und wirtschaftlichen Interesse. Bislang wurden keramische Werkstoffe aus Calciumphosphaten in Untersuchungen vorwiegend mit Silicium-,

Strontium-, Magnesium-, Calcium-, Kupfer- und auch Zink-Ionen modifiziert [31, 34, 37, 197-201]. Der Ansatz der vorliegenden Arbeit lag in der Modifizierung eines schon lange in der Medizin erfolgreich eingesetzten mineralischen Knochenzementes aus Calciumphosphat durch verschiedene Metallionen (Mangan, Vanadium, Nickel, Kupfer, Zink und Kobalt).

5.1 Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung

Anhand mechanischer, optischer und massenspektrometrischer Versuche sollten in der vorliegenden Arbeit die Eigenschaften von verschiedenen metallionendotierten Calciumphosphat-Keramiken getestet werden. Als metallfreie Referenz diente calciumdefizitärer Hydroxylapatit, der in wässriger Lösung durch eine Zementabbindereaktion von α -Tricalciumphosphat entsteht. Zusätzlich wurde in einer *in-vitro*-Versuchsreihe mit einer Makrophagen-Zelllinie die Biokompatibilität überprüft. Die Resorption von Hydroxylapatit ist unter physiologischen Bedingungen praktisch nur durch Osteoklasten mittels einer lokalen pH-Wert-Absenkung möglich, sodass durch dieses Material aussagekräftige Ergebnisse über die Osteoklastenstimulation gewonnen werden können. Durch eine Zementabbindereaktion in wässriger Lösung wird aus α -Tricalciumphosphat der nanokristalline, poröse, calciumdefizitäre Hydroxylapatit-Zement gewonnen. Die Metalldotierung erfolgte auf zwei verschiedene Arten. Zum einen wurden ausgewählte Metallsalze (Vanadiumchlorid, Manganchlorid, Nickelchlorid, Kupfersulfat, Zinkacetat und Kobaltnitrat) direkt dem α -TCP-Pulver durch Zusinterung zugefügt. Die zweite Art der Metallionendotierung der Zementproben erfolgte während des Anmischvorgangs durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen der Metallsalze zur Binderflüssigkeit. Da während des Versuchsablaufes festgestellt wurde, dass sich Kupfersulfat, Nickelchlorid und Manganchlorid nicht in der Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung, die als Beschleunigerlösung benötigt wurde, gelöst haben, sondern ausfielen, wurde ein modifiziertes α -TCP-Pulver hergestellt, dem Na_2HPO_4 direkt beigemischt wurde. Die unterschiedlich konzentrierten Metallsalzlösungen konnten dann mit destilliertem Wasser als Anmischflüssigkeit hergestellt werden. Für die Versuchsreihen wurden zunächst die verschieden modifizierten Zementplättchen als Ausgangsprodukte hergestellt und in einem Glasbehälter bis zur weiteren Verwendung feuchtigkeitsdicht aufbewahrt.

5.2 Analyse und Interpretation der erzielten Ergebnisse

5.2.1 Abbindezeit

Die initiale Abbindezeit wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Gilmore-Nadel-Test ermittelt. Diese Methode wird häufig in Calciumphosphatzement-Studien zur Ermittlung der initialen Abbindezeit herangezogen [202]. Sie ist angelehnt an die amerikanische Norm ASTM-Standard C266 [188]. Die Methode ist kostengünstig und einfach durchzuführen. Darüber hinaus sind die Versuchsbedingungen durch wenige Wahlparameter reproduzierbar und eine gute Vergleichbarkeit der ermittelten Zeiten mit denen anderer Studien ist gegeben. Ein qualitativer Vergleich ist jedoch durch die subjektive, optische Beurteilung der Eindringtiefe der Nadel in die Zementplättchen eher limitiert. Es ist erforderlich die Abbindezeiten von Werkstoffen in einem medizinisch und auch wirtschaftlich sinnvollen Rahmen einzustellen. Eine zu lange Wartezeit verzögert den Operationsablauf unnötig, verursacht hohe Kosten und bedeutet eine unverhältnismäßig lange Narkose, mit zusätzlichen Risiken für den Patienten. Auf der anderen Seite führt eine zu kurze Verarbeitungszeit dazu, dass der Knochenersatzwerkstoff nicht zügig genug in den Defekt eingebracht werden kann, sodass möglicherweise Schwachstellen aus der schlechten Verarbeitung resultieren oder das Material schon vorher aushärten würde. Um Abbindezeiten von Hydroxylapatitzementen in einem medizinisch tolerablen Bereich zu erlangen, werden in der aktuellen Forschung Abbindebeschleuniger wie Natriumphosphate oder Phosphorsäure eingesetzt. Um in der vorliegenden Arbeit akzeptable Abbindezeiten zu erreichen, wurden die verschiedenen Pulver durch einen mehrstündigen Mahlprozess mechanisch aktiviert und der Abbindebeschleuniger Dinatriumhydrogenphosphat entweder als wässrige Phase verwendet oder, falls Metallsalzlösungen zum Anmischen verwendet wurden, dem Pulver schon während des Herstellungsvorgangs zugesetzt.

Durch die Modifikation mit den Metallionen zeigten sich deutliche Schwankungen der Abbindezeiten von 18 Minuten bis über 60 Minuten. Für einige Metalle spielt die Art der Metallionenzugabe, ob in der Binderflüssigkeit enthalten oder dem Pulver schon vorher zugesintert, eine erhebliche Rolle. Lediglich für Kupfer, Vanadium und Nickel zeigten sich nur geringe Schwankungen zwischen den beiden Dotierungsarten, wobei Vanadium und Nickel die Abbindereaktion auf ein medizinisch nicht tolerierbares Maß

von teilweise über 60 Minuten anhaben. Die Zugabe von Kupferionen zeigte hingegen nur einen geringen Einfluss auf die Abbindezeit bezogen auf das Referenzpulver. Im Vergleich zum Referenzzement wurde die Abbindereaktion durch zugesintertes Mangan und Kobalt leicht reduziert. Waren diese Metalle hingegen in der Anmischflüssigkeit enthalten, wurde sie erheblich verlängert. Nur Kupferionen, gelöst in der wässrigen Phase sowie dem Pulver hinzugesinterte Mangan- und Kobaltionen konnten die Abbindezeit gegenüber der metallfreien Referenz leicht reduzieren. Die initiale Abbindezeit sollte bei klinischer Verwendung im Bereich zwischen 3 - 8 Minuten liegen [202]. Alle getesteten Modifikationen wiesen eine zu lange initiale Abbindezeit auf. Ob eine geringere Löslichkeit der modifizierten Materialien die Abbindereaktion verlangsamt, muss in weiterführenden Versuchen geklärt werden. Eine Verkürzung der Verarbeitungszeit durch eine Verkleinerung des Pulver/Flüssigkeits-Verhältnisses sollte allerdings nicht zur Anwendung kommen, da das Gemisch nicht homogen vermengt werden kann und sich das daraus resultierende vergrößerte Porenvolumen negativ auf die zu erwartende Druckfestigkeit auswirken würde.

5.2.2 Druckfestigkeit

Die Festigkeit der Calciumphosphatzemente entsteht während der Abbindereaktion durch das Wachsen und Verdichten der CaP-Kristalle [51]. Je mehr Bestandteile umgesetzt werden und je geringer die Porositäten sind, desto höher ist die Druckfestigkeit. Da Calciumphosphatzemente eher eine niedrige Festigkeit aufweisen, ist die medizinische Anwendbarkeit in lasttragenden und großen Knochendefekten limitiert. In dieser Arbeit wurde die Festigkeitsprüfung standardmäßig, mit einem in der Literatur beschriebenen Verfahren, gut reproduzierbar mittels einer Universalprüfmaschine durchgeführt [203]. Allerdings besteht durch die manuelle Herstellung der Prüfkörper eine variable Größe. Somit gestaltet sich ein direkter Vergleich der Druckfestigkeiten in der Literatur als schwierig. Durch den unterschiedlichen Druck mit dem die Zementpaste in die Aussparungen der Silikonformen eingebracht wird, ergibt sich eine unterschiedliche Verdichtung der Masse, ein unterschiedliches Porenvolumen und damit eine unterschiedliche Festigkeit der Prüfkörper durch das nicht maschinelle Herstellungsverfahren [204, 205]. Bei der Beurteilung der Druckfestigkeiten muss zusätzlich beachtet werden, dass die erzielten Werte *in vivo* geringer ausfallen können, da im Labor unter optimalen, trockenen Bedingungen die Zementpaste mit viel Druck in die Silikonformen

gepresst werden kann. Porositäten werden dadurch verringert und es können höhere Druckfestigkeitswerte erzielt werden.

In Kombination mit einem bestimmten Metallzusatz wäre eine simultane Verbesserung beziehungsweise Verschlechterung der Druckfestigkeitswerte zu erwarten gewesen. Es wurde jedoch festgestellt, dass nicht das Metall alleine, sondern auch die Art der Metallionenzugabe unterschiedliche Auswirkungen hatte. Nur mit Kupfer(II)ionen kam es bei beiden Arten der Metalldotierung zu einer signifikanten Steigerung der Festigkeit gegenüber dem metallfreien Referenzzement, was der Voraussetzung für eine höhere Stabilität der Knochenersatzzemente nachkommt. Außer für Kupfer ergaben sich noch für Nickel- und Zinkionendotierung geringe Unterschiede zwischen den beiden Modifizierungsarten. Bei beiden führte die Ionenzugabe zu einer leichten Reduktion der Druckfestigkeit gegenüber dem metallfreien Referenzzement. Hierbei bestanden nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Dotierungsarten, wodurch der Messfehler an Bedeutung gewinnt. Zugesinterte Kobaltionen ergaben, als einziges weiteres Metall außer Kupfer, eine signifikante Erhöhung der mechanischen Werte, wohingegen Kobaltionen, in der Binderlösung enthalten, eine deutliche Abnahme der Druckfestigkeit zur Folge hatten. Der Unterschied zwischen den Dotierungsarten fiel für Kobalt zudem am größten aus. Auch für Vanadium ergab sich ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Verfahrensweisen. Zugesintertes Vanadium führte zu einer erheblichen Schwächung der Druckfestigkeit. Vanadiumsalze in der Anmischflüssigkeit ergaben in etwa die Werte des metallfreien Referenzzementes. Eine Erklärung besteht darin, dass die Kombination mit bestimmten Metallionen durch einen inhibierenden Einfluss zu einer mangelhaften Umsetzung von α -TCP zu Hydroxylapatit und zu einer Reduzierung der Druckfestigkeit geführt haben könnte. Auch sollte in weiteren Studien noch die Dichte der Porositäten in den Werkstoffen ermittelt werden, als weiterer Einflussfaktor für eine Reduzierung der Druckfestigkeit. In diesem Zusammenhang ergeben sich weiterführende Fragen beispielsweise wie fest die einzelnen Metallionen in das Strukturgitter, möglicherweise durch Substitution von Calciumionen, eingebaut waren oder ob sie eher lose, ohne chemische Bindung, adsorptiv der Oberfläche auflagen. Des Weiteren können Nebenphasen, zum Beispiel als Phosphate, gebildet worden sein, die nicht unbedingt im XRD sichtbar waren. All diese aufgeworfenen Fragen sollten in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Werden Abbindezeit und Druckfestigkeit miteinander verglichen, wird ersichtlich, dass keine allgemeingültigen Rückschlüsse von der Abbindezeit auf die Druckfestigkeit

möglich sind. Zwar wiesen die meisten metallmodifizierten Zementproben mit einer erheblich verlängerten Abbindezeit auch eine deutlich reduzierte Druckfestigkeit auf, allerdings bildeten hier die beiden Zementpulver, die mit der maximal konzentrierten Mangan- beziehungsweise Vanadiumionenlösung angemischt worden waren, eine Ausnahme. Obwohl die Abbindezeit gegenüber der metallfreien Referenz erheblich verlängert war, wiesen sie doch in etwa die Druckfestigkeit der metallfreien Kontrollproben auf. Im Bereich der kürzeren Abbindezeiten waren mehr Auffälligkeiten zu beobachten. Die beiden Probenarten mit der kürzesten Abbindezeit, die Metallionendotierung mit Kupferionen durch die Binderlösung sowie die Modifizierung mit Kobaltionen durch Zusinterung, wiesen zugleich auch die größte Druckfestigkeit auf. Ebenfalls gegenüber der metallfreien Referenz war die Abbindezeit mit zugesintertem Mangan erhöht, die Druckfestigkeit hingegen war deutlich reduziert. Ähnliches wurde für die Metallionendotierung mit Zink durch die maximal konzentrierte Binderlösung erkennbar. Ein gegenteiliges Bild war für die Metallmodifizierung mit Kupferionen durch Zusinterung erkennbar. Die Abbindezeit war gegenüber dem metallfreien Kontrollzement leicht erhöht und zugleich wiesen diese Zementprobenkörper auch eine größere Druckfestigkeit auf. Da Zemente durch eine Lösungs-Fällungs-Reaktion aus einer wässrigen Lösung ausfallen, ist eine mögliche Erklärung, dass bei einem weniger reaktiven Sättigungsverhalten mit deutlich erhöhten Abbindezeiten zugleich die Kristallverfilzungen weniger fest sind und somit die Druckfestigkeit herabgesetzt wird. Bei einer schnelleren Abbindezeit haben die beteiligten Komponenten eine größere Affinität zueinander und bilden ein festeres Kristallgitter. Warum jedoch manche Metalldotierungen ein anderes Bild aufweisen und einen inhibierenden Einfluss auf die Abbindezeit aufweisen, aber dennoch die Druckfestigkeit nicht reduziert ist, bleibt noch in weiterführenden Versuchen zu klären.

5.2.3 Rasterelektronenmikroskopische Analyse

Bei der optischen Beurteilung der Festigkeitsprüfkörper wurde nach mikrostrukturellen Besonderheiten gesucht, die über die reduzierten beziehungsweise erhöhten Werte der Druckfestigkeiten und Abbindezeiten Aufschluss geben könnten. Durch die REM-Bilder wurde deutlich, dass sowohl die Metallzusätze als auch die Dotierungsmethode Änderungen im mikrostrukturellen Aufbau der Proben ergaben. Bei Zugabe von Kobalt durch Zusinterung konnte eine deutliche Erhöhung der Druckfestigkeitswerte gegenüber stark reduzierten Werten bei Zugabe mit der

Anmischflüssigkeit festgestellt werden. Ebenso war der unterschiedliche Aufbau bei der Betrachtung der Bruchflächen der Zementproben für Kobalt am deutlichsten ausgeprägt. Die Proben mit zugesinterten Kobaltionen zeigten eine relativ engmaschige Verfilzung der Partikel. Dies könnte zu einer Erhöhung der Druckfestigkeitswerte beigetragen haben. Die Bruchflächen der Probenkörper mit 1 mmolärer Anmischflüssigkeit wiesen hingegen eine eher glatte Oberfläche auf. Die niedrigsten Druckfestigkeitswerte wurden für Nickel und Zink festgestellt. Im Rahmen des Fehlers beim optischen Vergleich der Bruchkanten fielen die relativ kleinen Bruchstücke und die inhomogene Verfilzung der Komponenten auf. Allerdings ließ sich durch die rasterelektronenmikroskopische Betrachtungsweise kein allgemeiner, direkter Zusammenhang zwischen der Verfilzung und der Druckfestigkeit der Zemente herstellen.

5.2.4 XRD-Analyse

Die XRD-Analyse wurde als gut reproduzierbares, standardisiertes Messverfahren [198, 206-208] gewählt, um den Einfluss der Metallionen auf die Umsetzungsrate des Edukts α -TCP zu Hydroxylapatit untersuchen zu können. In der vorliegenden Arbeit konnte anhand dieser Röntgendiffraktogramme die unvollständige Umsetzung von α -TCP zu Hydroxylapatit durch die Metallionendotierung der Zementplättchen aufgezeigt werden. Bei allen Proben war noch ein relativ hoher Anteil an α -TCP zu detektieren. Die Beugungsmuster der auf die zwei verschiedenen Arten hergestellten Zementplättchen wiesen innerhalb des Dotierungsverfahrens ein einheitliches Beugungsprofil auf. Waren die Metallionen in der Binderlösung enthalten, so war die Umsetzungsrate im Vergleich zu den gesinterten Proben stärker reduziert. Zemente binden durch eine Lösungs-Fällungs-Reaktion ab. Die in der Anmischflüssigkeit frei gelösten Metallionen konnten vermehrt an der Abbindereaktion teilnehmen und somit eine stärker inhibierende Wirkung ausüben als die Ionen, die dem α -TCP-Pulver zugesintert worden waren. Waren die Metallionen durch den Sintervorgang dem Pulver hinzugefügt worden, konnte für alle Proben ein insgesamt höherer HA-Gehalt aufgezeigt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Ionen durch diesen Vorgang stärker in die Zementmatrix eingebunden wurden und während des Abbindevorganges nicht so stark mit anderen Reaktionspartnern reagieren konnten wie die frei zur Verfügung stehenden, in der Binderlösung gelösten, Metallionen.

5.2.5 ICP-MS-Analyse

Das Freisetzungsverhalten der Ionen aus den Zementplättchen wurde in Auslagerungsexperimenten über eine Woche untersucht. Es wurden von jeder Metallionensorte und Konzentration (10 μ molar, 100 μ molar, 1 mmolar und Zugabe durch Zusinterung) jeweils drei Probenkörper angefertigt. Diese wurden einzeln mit einem Auslagerungsmedium bedeckt, das täglich gewechselt wurde. Das gewonnene Eluat wurde hinsichtlich der freigesetzten Ionen mittels des ICP-MS-Analyseverfahrens getestet. Dies ist eine der nachweisstärksten Methoden in der Elementspurenanalytik [209].

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde festgestellt, dass die Freisetzungskinetiken nicht nur von Metall zu Metall extrem unterschiedlich waren, sondern auch in Bezug auf die verschiedenen Formen der Metalldotierung. Auch eine zu erwartende Abhängigkeit von der Ionenbeladung ließ sich nicht für alle Metalle bestätigen. Eine der Dotierungskonzentration entsprechende Freisetzung der verschiedenen Metallionen konnte nur für Vanadium und Mangan festgestellt werden, wobei die freigesetzte Menge an Vanadiumionen im Vergleich zu Mangan deutlich höher ausfiel. Teilweise erschien die Freisetzungskinetik der Metalle, wie beispielsweise bei Vanadium, vorwiegend diffusionsgesteuert mit einem hohen initialen Burst und anschließender Sättigung der Kurve oder sie folgte einer eher konstanten Freisetzung durch Degradation, wie beispielsweise bei Zink. Die Freisetzungskinetik schien jedoch bei den verschiedenen Metallen meist eine Mischung aus beiden Arten zu sein. Im Vergleich der verschiedenen Metalle verhielt sich Kobalt beim Freisetzungsverhalten sehr komplex. Die Freisetzung aus den niedrig konzentrierten (10 μ molar) Plättchen erschien vorwiegend degradationsgesteuert. Die Ionenabgabe für die höchste Konzentration (1 mmolar) hingegen entsprach eher einer diffusionsgesteuerten Abgabe mit einer sehr hohen initialen Ionenausschüttung. Kupferionen wurden fast ausschließlich nur aus den Plättchen freigesetzt, die durch Zusinterung des Metalls hergestellt worden waren, aus diesen jedoch in deutlich größerer Konzentration als aus allen anderen Probenkörpern. Auch in anderen Studien wurde der bei niedriger Ionenkonzentration eher geringe Einfluss von Kupferionen festgestellt [210]. Für die unterschiedliche Freisetzung der Metallionen aus den Zementproben kommen die unterschiedlichen Löslichkeitsprodukte der verschiedenen Metallphosphate in Frage. Je löslicher die einzelnen Stoffe, desto schneller werden sie in das umgebende Eluat abgegeben. Bei den Freisetzungskurven, die vorwiegend durch Diffusion mit einem

initialen Burst gekennzeichnet waren, könnte es sein, dass die Metalle nur adsorptiv der Oberfläche auflagen und nicht, wie beispielsweise durch Substitution, fest in die Zementstruktur eingebunden waren, wie bei den Probenkörpern, bei denen die Freisetzung vorwiegend durch Degradation bestimmt war. Es wurden bereits in weiterführenden Versuchen mit Vanadium-, Kobalt- und Kupferionen, enthalten in der Anmischflüssigkeit, Metalloxide in XRD-Analysen nachgewiesen, die darauf hindeuteten, dass diese Metallionen fest in die Apatitkristalle integriert wurden [210]. Bei der Verwendung von metallionenmodifizierten Zementen darf der Einfluss der Metallionen auf die Bildung von neuem Knochen nicht außer Acht gelassen werden. Hierzu müssen jedoch noch genauere Analysen durchgeführt werden wie sich die Anwesenheit von Metallionen auf die Kristallisation von Hydroxylapatit auswirkt und auch um die Einbindung der Metallionen in die Kristallstruktur genauer beurteilen zu können.

5.3 Analyse und Interpretation der Zellversuche

Für die Beurteilung der *in-vitro*-Zytotoxizität von Medizinprodukten werden in Deutschland die Richtlinien nach DIN-Norm ISO 10993-5 herangezogen [211]. Zur Vermeidung unnötiger Tierversuche werden nach dieser Vorschrift bestimmte Zellen tierischen oder menschlichen Ursprungs mit den zu untersuchenden Materialien direkt oder indirekt in Kontakt gebracht und, wie in dieser Arbeit geschehen, die Anzahl und Vitalität der Zellen überprüft. In den Zellversuchen wurde die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 in Zellkulturplatten auf verschiedenen Zementoberflächen kultiviert, um die Biokompatibilität der metalldotierten Zementproben zu testen. Verwendet wurden Hydroxylapatit-Plättchen als metallfreie Referenz und zwei verschiedenen modifizierte Calciumphosphatprüfkörper. Zur Metalldotierung wurde zum einen eine 1 mmolare Zinkionenlösung verwendet, zum anderen eine 10 μ molare Kobaltionenlösung. Als bereits in der medizinischen Forschung bewährte Kontrollfläche diente das Zellkultur-Polystyrol beziehungsweise Glas. Die aufgebrachte Zellkonzentration betrug circa 40 000 Zellen pro Milliliter. Bei der *in-vitro*-Versuchsreihe wurde über den 15-tägigen Versuchszeitraum das bedeckende Nährmedium an Tag 4, 6, 7, 8, 11 und 13 erneuert, um zum einen ein Ansammeln von schädlichen Stoffwechselmetaboliten und zum anderen eine mangelnde Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu vermeiden. Während des

Versuchsablaufes wurden Untersuchungen der verschiedenen Oberflächen hinsichtlich der Zellvitalität mittels WST-1-Test und hinsichtlich der Zellproliferation mittels Zellzählung durchgeführt. Zusätzlich wurde bei jedem Mediumwechsel der Überstand gesammelt und bezüglich der Metallionenfreisetzung einer ICP-Analyse unterworfen. Zur optischen Beurteilung der Zellmorphologie wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Als Nachweis für die Osteoklastendifferenzierung wurde eine Färbung der tartratresistenten sauren Phosphatase, ein osteoklastenspezifisches Enzym, vorgenommen.

Bei der Auswertung des WST-1-Zellvitalitätstests wurde festgestellt, dass nur für die Kontrolloberfläche Polystyrol ein hoher Anstieg der Zellaktivität verzeichnet werden konnte. Auch bei der Zellzählung konnte ein starkes Proliferationsverhalten nur auf dieser Kontrolloberfläche beobachtet werden, während die Zellzahl auf den Zementproben lediglich minimal anstieg. Der Rückgang auf Polystyrol im mittleren Teil der Versuchsreihe lässt sich durch die Fusion der einkernigen Vorläuferzellen zu den multinukleären Osteoklasten erklären. Auffallend war die extrem niedrige, teilweise nicht detektierbare, mitochondriale Aktivität auf den Zementplättchen, insbesondere auf den metallionendotierten Proben. Auf den kobaltdotierten Plättchen konnte bis zu Tag 15 nur ein sehr schwacher, aber kontinuierlicher Anstieg der Zellzahl verzeichnet werden. Das schlechte Wachstum auf den Zementoberflächen wurde durch die optische Beurteilung mittels REM und TRAP-Färbung bestätigt. Auf Glas konnten multinukleäre Riesenzellen gesichtet werden, die durch Fusion aus Vorläuferzellen entstanden sind. Auf den Zementplättchen hingegen konnten keine osteoklastenartigen Zellen detektiert werden. Lediglich eventuelle Osteoklastenimpressionsspuren beziehungsweise angefärbte Zellfragmente wurden aufgefunden. Allerdings konnten bei der rasterelektronenmikroskopischen Analyse teilweise unfusionierte, mononukleäre Vorläuferzellen betrachtet werden. Eine Erklärung dafür ist, dass durch die Metallionen für die Proliferation und Differenzierung der Zellen ein zu saures Mikromilieu entstanden sein könnte. Zusätzlich schien *in vitro* auch der verwendete Hydroxylapatit-Zement per se, eventuell durch eine Senkung des pH-Wertes, zur Minimierung des Wachstums beigetragen zu haben. Auch durch die raue und sehr poröse Oberfläche könnte die Ausbreitung der Zellen erschwert worden sein. Dabei darf allerdings nicht außer Betracht gelassen werden, dass die verschiedenen Zelltypen auf die unterschiedliche Rauigkeit von Oberflächen anders reagieren [212].

Letztendlich kann die Frage nach der Biokompatibilität der untersuchten metalldotierten Calciumphosphatzemente nicht eindeutig beantwortet werden. In der *in-vitro*-Versuchsreihe zeigten die Zellen auf den modifizierten Materialien ein eher schlechtes Wachstum. Die beiden Metalle sind jedoch nicht per se zytotoxisch [110]. Zum Testen neuer Biomaterialien bilden nach wie vor oft zweidimensionale Zellkultursysteme die Grundlage für *in-vitro*-Versuche, in denen sich die Zellen nur flächig auf dem zu untersuchenden Material ausbreiten können. Im Körper jedoch existieren die Zellen meist in dreidimensionalen, komplexen Strukturen aus Zellen und extrazellulärer Matrix. Durch eine Optimierung der Zellversuchsreihe, die über einen längeren Versuchszeitraum in makroporösen, dreidimensionalen Strukturen mit mehr Probenkörpern erfolgen könnte, ließen sich aussagekräftigere Ergebnisse über die Biokompatibilität der metallbeladenen Calciumphosphatzemente erzielen [213-215]. Das Verhalten und der Differenzierungsgrad der Osteoklasten sollte zusätzlich durch komplexere, immunzytochemische Experimente differenzierter aufgezeigt werden. Vor der Einführung neuer Materialien für den medizinischen Gebrauch müssen außerdem *in-vivo*-Versuche durchgeführt werden, da nicht eindeutig von den Zelleigenschaften, die in *in-vitro*-Versuchsreihen auftreten, auf das *in-vivo*-Verhalten der Zellen geschlossen werden kann [216].

5.4 Ausblick

Calciumphosphatzemente wurden Mitte der 90er in den klinischen Gebrauch eingeführt und spielen in der Medizin im Bereich des nicht lasttragenden Hartgewebersatzes eine große Rolle. Hydroxylapatitzemente weisen gegenüber Bruschitzementen den Vorteil auf, dass sie im physiologischen Milieu praktisch nicht degradierbar sind und nur durch Osteoklasten mittels einer lokalen pH-Wert-Absenkung abgebaut werden und so den Defekt länger stabilisieren können. Diese Arbeit zeigt, dass es möglich ist, einfach, schnell und kostengünstig modifizierte Keramiken aus nanokristallinem, calciumdefizitärem Hydroxylapatit herzustellen. Da es jedoch nicht möglich ist durch *in-vitro*-Versuchsreihen Rückschlüsse auf das *in-vivo*-Verhalten von Zellen zu ziehen, müssen weitere Studien folgen. Auch sollten die Materialeigenschaften der getesteten Materialien verbessert werden. Die modifizierten Hydroxylapatitzemente weisen weder einheitliche Druckfestigkeiten noch einheitliche Abbindezeiten auf. Durch die gemessenen, relativ langen Abbindezeiten

können die Zemente während des klinischen Einsatzes leicht durch Blut oder Exsudat verunreinigt werden, da eine absolute Trockenlegung über eine solch lange Dauer nicht möglich ist. Somit würden die mechanisch-physikalischen Eigenschaften des Materials geschwächt werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der einfachen Herstellung, der freien Formbarkeit und auch der Verarbeitungsqualität ein klinischer Einsatz der getesteten Materialien denkbar wäre. Vor der Verwendung im klinischen Tätigkeitsfeld sollten noch Verbesserungen der Abbindezeiten und der Druckfestigkeiten vorgenommen, weitere materialwissenschaftliche Aspekte der Zementmatrizes untersucht werden und sowohl *in-vitro*-, als auch *in-vivo*-Versuche bezüglich der Biokompatibilität der modifizierten Materialien durchgeführt werden. Mit dem Ziel weiterer Verbesserungen der mechanischen Eigenschaften stellen mit Metallionen modifizierte Hydroxylapatitkeramiken, wie in dieser Arbeit beschrieben, einen klinisch sehr interessanten Ausgangspunkt für den Einzug in die medizinische Anwendung dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Knochenersatzmaterialien mit verschiedenen Materialien zu modifizieren ist eine Möglichkeit, die körpereigenen Zellen positiv zu beeinflussen und die Integration von Implantaten zu fördern. Die Verwendung von Metallionen eröffnet hierfür eine viel versprechende Option. Eine große Zahl von ihnen ist im menschlichen Körper als Spurenelemente Bestandteil von essentiellen Vorgängen und besitzt bioaktive Eigenschaften [28]. Auch sind sie aus wirtschaftlicher Sicht interessant, da sie wegen der einfachen Sterilisierbarkeit und nahezu unbegrenzten Haltbarkeit, im Vergleich zu beispielsweise Proteinen, sehr kostengünstig sind.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Modifizierung von porösem, calciumdefizitärem, nanokristallinem Hydroxylapatit mit verschiedenen Metallionen zu testen. Es wurden α -TCP-basierende Zementproben hergestellt, die durch zwei verschiedene Dotierungsmethoden mit bestimmten Metallionen (Cu^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , V^{3+} , Zn^{2+}) modifiziert wurden. Die eine Methode bestand in der Zusinterung der entsprechenden Metallionen zum α -TCP-Pulver. Bei der anderen Methode waren die Ionen in unterschiedlicher Konzentration (1 mmolar, 100 μ molar, 10 μ molar) in der Binderlösung enthalten. Die hergestellten Zementproben wurden hinsichtlich bestimmter Eigenschaften wie der initialen Abbindezeit und Druckfestigkeit untersucht und zusätzlich rasterelektronenmikroskopischen, röntgen-diffraktometrischen und massenspektrometrischen Analysen unterzogen. Als Referenz diente ein bereits am Menschen erfolgreich als Knochenersatzmaterial eingesetzter nanokristalliner, calciumarmer Hydroxylapatit-Zement. Da Hydroxylapatit nahezu nur durch Osteoklasten mittels einer lokalen pH-Wert-Absenkung resorbiert werden kann, wurden *in-vitro*-Versuche mit einer immortalisierten Makrophagen-Zelllinie durchgeführt. Über einen 15-tägigen Versuchszeitraum wurde die Zytokompatibilität mittels bestimmter Zellproliferations- und Zellaktivitätsmessungen überprüft. Zusätzlich wurden die mit Zellen besiedelten Proben unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet und eine TRAP-Färbung durchgeführt, um die Differenzierung zu osteoklastenähnlichen Zellen beurteilen zu können. Bei der Auswertung der Versuche wurde deutlich, dass nicht das Metall alleine maßgeblich für Veränderungen der physikalischen Eigenschaften im Vergleich zum metallfreien Referenzzement war. Auch die Art der Metallionendotierung, ob durch Zugabe mit der Binderlösung oder durch Zusinterung, hatte bei den Metallen unterschiedliche

Auswirkungen auf die Zementeigenschaften. So führte die Zusinterung von Kobaltionen zum Zementpulver zu einer geringfügigen Reduzierung der Abbindezeit von 24 Minuten bei der metallfreien Referenz auf 22 Minuten. War das Metall jedoch in der Anmischflüssigkeit enthalten, wurde sie deutlich auf über 60 Minuten verlängert. Während der Versuche wurden Abbindezeiten von 18 Minuten bis über 60 Minuten gemessen und Druckfestigkeiten zwischen 9,3 MPa und 30,5 MPa festgestellt. Die große Spanne zwischen den Messwerten zeigt, dass jede Art der Metallionendotierung von Knochenzementen bezüglich der chemisch-physikalischen Eigenschaften einzeln geprüft werden muss. Bei der Auswertung der Zellversuchsreihe wurde festgestellt, dass die Zellen auf den mit Metallionen modifizierten Zementplättchen tendenziell eine niedrigere Aktivität bei gleich bleibender Proliferation aufwiesen als auf den metallfreien Referenzproben. Dieses Ergebnis konnte mikroskopisch bestätigt werden. Trotz der in dieser Arbeit festgestellten niedrigeren Zellvitalität und Zellzahl stellt die Modifizierung von Zementen durch Metallionen in der Zukunft für den medizinischen Gebrauch eine interessante Möglichkeit dar, um relativ einfach die bioaktiven Eigenschaften von Knochenersatzwerkstoffen positiv zu verändern. Für die letztendliche Beurteilung müssen noch verfeinerte Versuche durchgeführt und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der modifizierten Zemente verbessert werden. Zusätzlich muss in differenzierteren *in-vitro*- beziehungsweise in *in-vivo*-Versuchen die Biokompatibilität erfolgreich getestet werden. Hier ist zu überprüfen, ob ein längerer Kultivierungszeitraum den Differenzierungsvorgängen förderlich wäre. Die Methode der Metallionendotierung von Knochenersatzmaterialien erscheint als sehr aussichtsreich und gilt es daher weiter zu erforschen, um Einzug in den medizinischen Alltag zu erhalten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Elliott J. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Elsevier, Amsterdam 1994
- [2] Beaupied H, Lespessailles E, Benhamou CL. Evaluation of macrostructural bone biomechanics. *Joint Bone Spine* 2007; 74 (3): 233-239
- [3] Keaveny TM, Hayes WC. Mechanical properties of cortical and trabecular bone. *Bone* 1993; 7: 285-344
- [4] Ashman RB, Van Buskirk WC. The elastic properties of a human mandible. *Adv Dent Res* 1987; 1 (1): 64-67
- [5] Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Rel Res* 1986; 205: 299-308
- [6] Aaboe M, Pinholt EM, Hjørtting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1995; 33 (5): 312-318
- [7] Hollinger JO, Kleinschmidt J. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg* 1990; 1 (1): 60-68
- [8] Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury* 2005; 36 (3): 20-27
- [9] Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14 (1): 15-56
- [10] Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4 (8): 743-765
- [11] Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials* 2000; 21 (7): 667-681
- [12] Yamasaki H, Sakai H. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* 1992; 13 (5): 308-312
- [13] Textor M, Tosatti S, Wieland M, Brunette DM. Bio-implant interface: improving biomaterials and tissue reactions. CRC Press 2003; 341
- [14] Adden N, Gamble LJ, Castner DG, Hoffmann A, Gross G, Menzel H. Phosphonic acid monolayers for binding of bioactive molecules to titanium surfaces. *Langmuir* 2006; 22 (19): 8197-8204
- [15] Li H, Chang J. Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect. *Acta Biomater* 2013; 9 (6): 6981-6991
- [16] Lode A, Wolf-Brandstetter C, Reinstorf A, Bernhardt A, König U, Pompe W, Gelinsky M. Calcium phosphate bone cements, functionalized with VEGF: release kinetics and biological activity. *J Biomed Mater Res* 2007; 81 (2): 474-483
- [17] Gu F, Amsden B, Neufeld R. Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *J Contr Release* 2004; 96 (3): 463-472
- [18] Erli HJ, Rüger M, Ragoß C, Jahnen-Dechent W, Hollander DA, Paar O, von Walter M. The effect of surface modification of a porous TiO₂/perlite composite on the ingrowth of bone tissue in vivo. *Biomaterials* 2006; 27 (8): 1270-1276
- [19] Zurlinden K, Laub M, Jennissen HP. Chemical functionalization of a hydroxyapatite based bone replacement material for the immobilization of proteins. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2005; 36 (12): 820-827

- [20] Williams SK, Kleinert LB, Hagen KM, Clapper DL. Covalent modification of porous implants using extracellular matrix proteins to accelerate neovascularization. *J Biomed Mater Res* 2006; 78 (1): 59-65
- [21] Sugawara A, Asaoka K, Ding SJ. Calcium phosphate-based cements: clinical needs and recent progress. *J Mater Chem B* 2013; 1 (8): 1081-1089
- [22] De Lange GL, Donath K. Interface between bone tissue and implants of solid hydroxyapatite or hydroxyapatite-coated titanium implants. *Biomaterials* 1989; 10 (2): 121-125
- [23] Oguchi H, Ishikawa K, Mizoue K, Seto K, Eguchi G. Long-term histological evaluation of hydroxyapatite ceramics in humans. *Biomaterials* 1995; 16 (1): 33-38
- [24] Mourin V, Cattalini J, Boccaccini A. Metallic ions as therapeutic agents in tissue engineering scaffolds: an overview of their biological applications and strategies for new developments. *J R Soc Interface* (2012); 9: 401-419
- [25] Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends in Biotechnology* 2013; 31 (10): 594-605
- [26] Goudouri OM, Kontonasaki E, Lohbauer U, Boccaccini AR. Antibacterial properties of metal and metalloid ions in chronic periodontitis and peri-implantitis therapy. *Acta Biomater* 2014; 10 (8): 3795-3810
- [27] Niki Y, Matsumoto H, Suda Y, Otani T, Fujikawa K, Toyama Y, Hisamori N, Nozue A. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages. *Biomaterials* 2003; 24 (8): 1447-1457
- [28] Vahrenkamp H. Metalle in Lebensprozessen. *Chemie in unserer Zeit* 1973; 4
- [29] Patntirapong S, Habibovic P, Hauschka PV. Effects of soluble cobalt and cobalt incorporated into calcium phosphate layers on osteoclast differentiation and activation. *Biomaterials* 2009; 30 (4): 548-555
- [30] Kishi S, Yamaguchi M. Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem Pharmacol* 1994; 48 (6): 1225-1230
- [31] Xue W, Moore JL, Hosick HL, Bose S, Bandyopadhyay A, Lu WW, Cheung KMC, Luk KDK. Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics. *J Biomed Mater Res* 2006; 79A (4): 804-814
- [32] Rousselle AV, Heymann D, Demais V, Charrier C, Passuti N, Baslé MF. Influence of metal ion solutions on rabbit osteoclast activities in vitro. *Histol Histopathol* 2002; 17 (4): 1025-1032
- [33] Cortizo AM, Molinuevo MS, Barrio DA, Bruzzone L. Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38 (7): 1171-1180
- [34] Ito A, Kawamura H, Otsuka M, Ikeuchi M, Ohgushi H, Ishikawa K, Onuma K, Kanzaki N, Sogo Y, Ichinose N. Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. *Mater Sci Eng C* 2002; 22 (1): 21-25
- [35] Hing KA, Revell PA, Smith N, Buckland T. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27 (29): 5014-5026
- [36] Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, Morioka H, Yatabe T, Funayama A, Toyama Y, Taguchi T, Tanaka J. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials* 2005; 26 (23): 4847-4855

- [37] Paul W, Sharma CP. Effect of calcium, zinc and magnesium on the attachment and spreading of osteoblast like cells onto ceramic matrices. *J Mater Sci: Mater Med* 2007; 18: 699-703
- [38] Wan YZ, Huang Y, He F, Wang YL, Zhao ZG, Ding HF. Effect of Mg ion implantation on calcium phosphate formation on titanium. *Surf & Coat Tec* 2006; 201 (6): 2904-2909
- [39] Wu C, Zhou Y, Xu M, Han P, Chen L, Chang J, Xiao Y. Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity. *Biomaterials* 2013; 34 (2): 422-433
- [40] Wu Q, Li J, Zhang W, Qian H, She W, Pan H, Wen J, Zhang X, Liu X, Jiang X. Antibacterial property, angiogenic and osteogenic activity of Cu-incorporated TiO₂ coating. *J Mater Chem B* 2014; 2 (39): 6738-6748
- [41] Zhao S, Wang H, Zhang Y, Huang W, Rahaman MN, Liu Z, Wang D, Zhang C. Copper-doped borosilicate glass scaffolds with improved angiogenic and osteogenic capacity for repairing osseous defects. *Acta Biomater* 2015; 14: 185-196
- [42] Barbucci R, Magnani A. Metal-ion complexes in the angiogenetic effect. *Macromol Symp* 2000; 156 (1): 239-252
- [43] Harris ED. A requirement for copper in angiogenesis. *Nutr Rev* 2004; 62 (2): 60-64
- [44] Kim HH, Lee SE, Chung WJ, Choi Y, Kwack K, Kim SW, Kim MS, Park H, Lee ZH. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha is involved in the hypoxic stimuli-induced expression of vascular endothelial growth factor in osteoblastic cells. *Cytokine* 2002; 17 (1): 14-27
- [45] Steinbrech DS, Mehrara BJ, Saadeh PB, Greenwald JA, Spector JA, Gittes GK, Longaker MT. VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278 (4): C 853-C860
- [46] Tanaka T, Kojima I, Ohse T, Ingelfinger JR, Adler S, Fujita T, Nangaku M. Cobalt promotes angiogenesis via hypoxia-inducible factor and protects tubulointerstitium in the remnant kidney model. *Lab Invest* 2005; 85 (10): 1292-1307
- [47] Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res* 1995; 74 (8): 1521-1527
- [48] Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Füreder W, Sperr WR, Sperr W, Ellinger A, Slavicek R, Boltz-Nitulescu G, Valent P. Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res* 1995; 74 (8): 1513-1520
- [49] Barrio DA, Etcheverry SB. Vanadium and bone development: putative signalling pathways. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84 (7): 677-686
- [50] Albee FH, Morrison H. Studies in bone growth. *Ann Surg* 1920; 71: 32-38
- [51] Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury, Int J Care Injured* 2000; 31: 37-47
- [52] LeGeros RZ, LeGeros JP. Phosphate minerals in human tissues. In: Nriagu JO, Moore PB (Eds) *Phosphate Minerals* Springer, Berlin 1984; 351-385
- [53] Constantz BR, Ison IC, Fulmer MT, Poser RD, Smith ST, VanWagoner M, Ross J, Goldstein SA, Jupiter JB, Rosenthal DI. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 1995; 267: 1796-1799
- [54] Munting E, Mirtchi A, Lemaître J. Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *J Mater Sci: Mater Med* 1993; 4: 337-344

- [55] Constantz BR, Barr MB, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney LA, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Poser RD. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res* 1998; 43 (4): 451-461
- [56] Lénárt G, Bidló G, Pintér J. Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates of bone. *Clin Orthop Rel Res* 1972; 83: 263-272
- [57] Martin RI, Brown PW. Phase equilibria among acid calcium phosphates. *J Am Ceram Soc* 1997; 80 (5): 1263-1266
- [58] Muenzenberg KJ, Gebhardt M. Brushite, octocalcium phosphate, and carbonate-containing apatite in bone. *Clin Orthop Rel Res* 1973; 90: 271-273
- [59] Brown WE, Smith JP, Lehr JR, Frazier AW. Octocalcium phosphate and hydroxyapatite: crystallographic and chemical relations between octocalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 1962; 196: 1050-1055
- [60] Gbureck U. Injizierbare Calciumphosphat-Zemente als Knochenersatzwerkstoff in niedrig belasteten Bereichen des Skelettsystems. Habilitationsschrift, Würzburg 2004
- [61] Welch JH, Gutt W. High-temperature studies of the system calcium oxide-phosphorus pentoxide. *J Chem Soc* 1961; 4442-4444
- [62] Merten HA, Wiltfang J, Hönig JF, Funke M, Luhr HG. Intraindividuelle Vergleich von α - und β -TCP-Keramik im Tierexperiment. *Mund Kiefer GesichtsChir* 2000; 4 (Suppl 2): S509-S515
- [63] Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res* 1998; 13 (1): 94-112
- [64] Cao W, Hench LL. Bioactive Materials. *Ceramics International* 1996; 22 (6): 493-507
- [65] Brown W, Chow L. Dental restorative cement pastes. US patent No. 4518430, 1985
- [66] Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC. Bonesource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J Biomed Mater Res* 1998; 43 (4): 428-432
- [67] Jansen JA, de Ruijter JE, Schaeken HG, van der Waerden JPCM, Planell JA, Driessens FCM. Evaluation of tricalciumphosphate/hydroxyapatite cement for tooth replacement: an experimental animal study. *J Mater Sci: Mater Med* 1995; 6: 653-657
- [68] Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate, water-setting cement. In: *Cements Research Progress*, Brown PW (ed). Am Ceram Soc 1986; 352-379
- [69] Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Toh T, Yuasa T, Nagayama M, Suzuki K. Histological and compositional evaluations of three types of calcium phosphate cements when implanted in subcutaneous tissue immediately after mixing. *J Biomed Mater Res* 1999; 48 (1): 36-42
- [70] Fukase Y, Eanes ED, Takagi S, Chow LC, Brown WE. Setting reactions and compressive strength of calcium phosphate cements. *J Dent Res* 1990; 69 (12): 1852-1856
- [71] Gbureck U, Radu L, Klinger HG, Thull R. Mechanische Aktivierung von α -Tricalciumphosphat. *Biomaterialien* 2003; 4: 19-25
- [72] Miyamoto Y, Ishikawa K, Fukao H, Sawada M, Nagayama M, Kon M, Asaoka K. In vivo setting behaviour of fast-setting calcium phosphate cement. *Biomaterials* 1995; 16 (11): 855-860
- [73] Lemaître J, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Ind* 1987; 9-10: 141-146

- [74] Bajpai PK, Fuchs CM, McCullum DE. Development of tricalcium phosphate ceramic cement. In: Quantitative characterization and performance of porous implants for hard tissue application, Lemons JE (ed). ASTM International 1987: 377-388
- [75] Bohner M. Propriétés physico-chimiques et ostéogéniques d'un biociment hydraulique à base de phosphates de calcium. EPFL 1993; 1171
- [76] Bohner M, Merkle HP, Van Landuyt P, Lemaître J. Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *J Mater Sci: Mater Med* 2000; 11: 111-116
- [77] Flautre B, Delecourt C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaître J, Hardouin P. Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep. *Bone* 1999; 25 (2): 35-39
- [78] Von Rechenberg B, Auer J, Bohner M. Internal report, Mathys AG, CH-2544 Bettlach, 2000
- [79] Bohner M, Matter S. Brushite hydraulic cement stabilized with a magnesium salt. US Patent 6733582, 2004
- [80] Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaître J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996; 30 (2): 193-200
- [81] Andrianjatovo H, Jose F, Lemaître J. Effect of β -TCP granularity on setting time and strength of calcium phosphate hydraulic cements. *J Mater Sci: Mater Med* 1996; 7: 34-39
- [82] Ikenaga M, Hardouin P, Lemaître J, Andrianjatovo H, Flautre B. Biochemical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1998; 40 (1): 139-144
- [83] Pabbruwe MB, Standard OC, Sorrell CC, Howlett CR. Bone formation within alumina tubes: effect of calcium, manganese, and chromium dopants. *Biomaterials* 2004; 25 (20): 4901-4910
- [84] Friedman BJ, Freeland-Graves JH, Bales CW, Behmardi F, Shorey-Kutschke RL, Willis RA, Crosby JB, Trickett PC, Houston SD. Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet. *J Nutr* 1987; 117 (1): 133-143
- [85] Cashman K, Flynn A. Trace elements and bone metabolism. *Bibl Nutr Dieta* 1998; 54: 150-164
- [86] Molinuevo MS, Barrio DA, Cortizo AM, Etcheverry SB. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 163-172
- [87] Djordjevic C, Wampler GL. Antitumor activity and toxicity of peroxo heteroligand vanadates(V) in relation to biochemistry of vanadium. *J Inorg Biochem* 1985; 25 (1): 51-55
- [88] Evangelou AM. Vanadium in cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 24 (3): 249-265
- [89] Srivastava AK, Mehdi MZ. Insulino-mimetic and anti-diabetic effects of vanadium compounds. *Diabet Med* 2004; 22 (1): 2-13
- [90] Thompson KH, Orvig C. Vanadium compounds in the treatment of Diabetes. *Met Ions Biol Syst* 2004; 41: 221-252
- [91] Thompson KH, Liboiron BD, Sun Y, Bellman KDD, Setyawati IA, Patrick BO, Karunaratne V, Rawji G, Wheeler J, Sutton K, Bhanot S, Cassidy C, McNeill JH, Yuen VG, Orvig C. Preparation and characterization of vanadyl complexes with bidentate maltol-type ligands; in vivo comparisons of anti-diabetic therapeutic potential. *J Biol Inorg Chem* 2003; 8: 66-74
- [92] Prasad AS. Zinc in human health: an update. *J Trace Elem Exp Med* 1998; 11 (2-3): 63-87

- [93] Bumgardner JD, Lucas LC. Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res* 1995; 74 (8): 1521-1527
- [94] Goebeler M, Roth J, Bröcker EB, Sorg C, Schulze-Osthoff K. Activation of nuclear factor- κ B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J Immunol* 1995; 155 (5): 2459-2467
- [95] Barrio DA, Williams PAM, Cortizo AM, Etcheverry SB. Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): insulin-mimetic activities in osteoblast-like cell in culture. *J Biol Inorg Chem* 2003; 8: 459-468
- [96] Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH. Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. *J Bone Joint Surg Am* 1993; 75 (6): 863-79
- [97] Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Stea S, Savarino L, Sudanese A, Mieti M, Rotini R, Dallari D, Zinghi G, Montanaro L. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80 (5): 912-917
- [98] Byzova TV, Kim W, Midura RJ, Plow EF. Activation of integrin $\alpha_v\beta_3$ regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein. *Exp Cell Res* 2000; 254 (2): 299-308
- [99] Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002; 62 (2): 175-184
- [100] Luo B-H, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signalling. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 619-647
- [101] Heppenstall RB, Grislis G, Hunt TK. Tissue gas tension and oxygen consumption in healing bone defects. *Clin Orthop Relat Res* 1975; 106: 357-365
- [102] Knighton DR, Hunt TK, Scheuenstuhl H, Halliday BJ, Werb Z, Banda MJ. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. *Science* 1983; 221: 1283-1285
- [103] Grundnes O, Reikeras O. Blood flow and mechanical properties of healing bone. *Acta Orthop Scand* 1992; 63 (5): 487-491
- [104] Brighton CT. Structure and function of the growth plate. *Clin Orthop Relat Res* 1978; 136: 22-32
- [105] Rhinelander FW, Baragry RA. Microangiography in bone healing: I. Undisplaced closed fractures. *J Bone Joint Surg Am* 1962; 44: 1273-1298
- [106] Rhinelander FW, Phillips RS, Steel WM, Beer JC. Microangiography and bone healing: II. Displaced closed fractures. *J Bone Joint Surg Am* 1968; 50: 643-662
- [107] Wray JB, Goodman HO. Post fracture vascular changes and healing process. *Arch Surg* 1963; 87 (5): 801-804
- [108] Bi Y, VanDeMotte RR, Ragab AA, Goldberg VM, Anderson JM, Greenfield EM. Titanium particles stimulate bone resorption by inducing differentiation of murine osteoclasts. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83 (4): 501-508
- [109] Hallab NJ, Vermes C, Messina C, Roebuck KA, Glant TT, Jacobs JJ. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 2002; 60 (3): 420-433
- [110] Hallab NJ, Anderson S, Caicedo M, Brasher A, Mikecz K, Jacobs JJ. Effects of soluble metals on human peri-implant cells. *J Biomed Mater Res* 2005; 74 A (1): 124-140

- [111] Zaidi M, Adebajo OA, Moonga BS, Sun L, Huang CLH. Emerging insights into the role of calcium ions on osteoclast regulation. *J Bone Miner Res* 1999; 14 (5): 669-674
- [112] Wang JY, Wicklund BH, Gustilo RB, Tsukayama DT. Titanium, chromium and cobalt ions modulate the release of bone-associated cytokines by human monocytes/macrophages in vitro. *Biomaterials* 1996; 17 (23): 2233-2240
- [113] Anissian L, Stark A, Dahlstrand H, Granberg B, Good V, Bucht E. Cobalt ions influence proliferation and function of human osteoblast-like cells. *Acta Orthop Scand* 2002; 73 (3): 369-374
- [114] Ziche M, Jones J, Gullino PM. Role of prostaglandine E₁ and copper in angiogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 1982; 69 (2): 475-482
- [115] Hannan GN, McAuslan BR. Modulation of synthesis of specific proteins in endothelial cell by copper, cadmium, and disulfiram: an early response to an angiogenic inducer of cell migration. *J Cell Physiol* 1982; 111 (2): 207-212
- [116] Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison EC, Hunt TK, Roy S. Copper-induced vascular endothelial growth factor expression and wound healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282 (5): H1821-H1827
- [117] Landriscina M, Bagalá C, Mandinova A, Soldi R, Micucci I, Bellum S, Prudovsky I, Maciag T. Copper induces the assembly of a multiprotein aggregate implicated in the release of fibroblast growth factor 1 in response to stress. *J Biol Chem* 2001; 276: 25549-25557
- [118] Pan Q, Kleer CG, van Golen KL, Irani J, Bottema KM, Bias C, De Carvalho K, Mesri EA, Robins DM, Dick RD, Brewer GJ, Merajver SD. Copper deficiency induced by tetrathiomolybdate suppresses tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res* 2002; 62: 4854-4859
- [119] Mandinov L, Mandinova A, Kyurkchiev S, Kyurkchiev D, Kehayov I, Kolev V, Soldi R, Bagala C, de Muinck ED, Lindner V, Post MJ, Simons M, Bellum S, Prudovsky I, Maciag T. Copper chelation represses the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100 (11): 6700-6705
- [120] Soncin F, Guitton JD, Cartwright T, Badet J. Interaction of human angiogenin with copper modulates angiogenin binding to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236 (3): 604-610
- [121] Janning C, Willbold E, Vogt C, Nellesen J, Meyer-Lindenberg A, Windhagen H, Thorey F, Witte F. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomater* 2010; 6 (5): 1861-1868
- [122] Zreiqat H, Howlett CR, Zannettino A, Evans P, Schulze-Tanzil G, Knabe C, Shakibaei M. Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res* 2002; 62 (2): 175-184
- [123] Serre CM, Papillard M, Chavassieux P, Voegel JC, Boivin G. Influence of magnesium substitution on a collagen-apatite biomaterial on the production of a calcifying matrix by human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1998; 42 (4): 626-633
- [124] Ries WL, Key Jr LL, Rodriguiz RM. Nitroblue tetrazolium reduction and bone resorption by osteoclasts in vitro inhibited by a manganese-based superoxide dismutase mimic. *J Bone Miner Res* 1992; 7 (8): 931-939
- [125] Shingu M, Takahashi S, Ito M, Hamamatu N, Suenaga Y, Ichibangase Y, Nobunaga M. Anti-inflammatory effect of recombinant human manganese superoxide dismutase on adjuvant arthritis in rats. *Rheumatol Int* 1994; 14: 77-81
- [126] Carlisle EM. Silicon: a possible factor in bone calcification. *Science* 1970; 167 (3916): 279-280
- [127] Le Vier RR. Distribution of silicon in the adult rat and rhesus monkey. *Bioinorg Chem* 1975; 4 (2): 109-15

- [128] Najda J, Gminski J, Drozd M, Danch A. The action of excessive, inorganic silicon (Si) on the mineral metabolism of calcium (Ca) and magnesium (Mg). *Biol Trace Elem Res* 1993; 37 (2-3): 107-114
- [129] Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, Powell JJ, Hampson GN. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. *Bone* 2000; 32 (2): 127-135
- [130] Seaborn CD, Nielsen FH. Silicon deprivation decreases collagen formation in wounds and bone, and ornithine transaminase enzyme activity in liver. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89 (3): 251-61
- [131] Pabbruwe MB, Standart OC, Sorrell CC, Howlett CR. Effect of silicon doping on bone formation within alumina porous domains. *J Biomed Mater Res A* 2004; 71A (2): 250-275
- [132] Keeting PE, Oursler MJ, Wiegand KE, Bonde SK, Spelsberg TC, Riggs BL. Zeolite a increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor beta production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Miner Res* 1992; 7 (11): 1281-1289
- [133] Ammann P, Shen V, Robin B, Mauras Y, Bonjour JP, Rizzoli R. Strontium ranelate improves bone resistance by increasing bone mass and improving architecture in intact female rats. *J Bone Miner Res* 2004; 19 (12): 2012-2020
- [134] Grynblas MD, Hamilton E, Cheung R, Tsouderos Y, Deloffre P, Hott M, Marie PJ. Strontium increases vertebral bone volume in rats at low dose that does not induce detectable mineralization defect. *Bone* 1996; 18 (3): 253-259
- [135] Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T. S 12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 2003; 18 (6): 1082-1087
- [136] Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone* 1996; 18 (6): 517-523
- [137] Kawamura H, Ito A, Miyakawa S, Layrolle P, Ojima K, Ichinose N, Tateishi T. Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate on bone formation in rabbit femora. *J Biomed Mater Res* 2000; 50 (2): 184-190
- [138] Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 2000; 50 (2): 178-183
- [139] Hashizume M, Yamaguchi M. Stimulatory effect of β -alanyl-L-histidinato zinc on cell proliferation is dependent on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Mol Cell Biochem* 1993; 122 (1): 59-64
- [140] Moonga BS, Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res* 1995; 10 (3): 453-457
- [141] Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Rad Biol Med* 2004; 37 (8): 1182-1190
- [142] Bao B, Prasad AS, Beck FWJ, Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *A J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E1095-E1102
- [143] Dorr LD, Bloebaum R, Emmanuel J, Meldrum R. Histological, biochemical, and ion analysis of tissue and fluids retrieved during total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 261: 82-95
- [144] Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B. In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles. *J Bone Joint Surg Br* 1995; 77 (6): 962-966
- [145] Epstein ACR, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian

- homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 2001; 107 (1): 43-54
- [146] Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5 (5): 343–354
- [147] Lohmann CH, Schwartz Z, Köster G, Jahn U, Buchhorn GH, MacDougall MJ, Casassola D, Liu Y, Sylvia VL, Dean DD, Boyan BD. Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials* 2000; 21 (6): 551-561
- [148] Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89 (21): 10405-10409
- [149] Hu GF. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem* 1998; 69 (3): 326-335
- [150] Raju KS, Alessandri G, Ziche M, Gullino PM. Ceruloplasmin, copper ions, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69 (5): 1183- 1188
- [151] Brem SS, Zagzag D, Tsanaclis AM, Gately S, Elkouby MP, Brien SE. Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. *Am J Pathol* 1990; 137 (5): 1121-1142
- [152] Bae YJ, Kim MH. Manganese supplementation improves mineral density of the spine and femur and serum osteocalcin in rats. *Biol Trace Elem Res* 2008; 124: 28-34
- [153] Leach RM Jr, Gay CV. Role of epiphyseal cartilage in endochondral bone formation. *J Nutr* 1987; 117 (4): 784-790
- [154] Culotta VC, Yang M, Hall MD. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2005; 4 (7): 1159-1165
- [155] Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicology* 1984; 5 (1): 13-35
- [156] Pal PK, Samii A, Calne DB. Manganese neurotoxicity: a review of clinical features, imaging and pathology. *Neurotoxicology* 1999; 20 (2): 227-238
- [157] Strause L, Saltman P, Glowacki J. The effect of deficiencies of manganese and copper on osteoinduction and on resorption of bone particles in rats. *Calcif Tissue Int* 1987; 41: 145-150
- [158] Rico H, Gómez-Raso N, Revilla M, Hernández ER, Seco C, Páez E, Crespo E. Effect on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitometric study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 90 (1): 97-101
- [159] Gronowicz G, McCarthy MB. Response of human osteoblasts to implant materials: integrin-mediated adhesion. *J Orthop Res* 1996; 14 (6): 878-887
- [160] Rezanian A, Healy KE. Integrin subunits responsible for adhesion of human osteoblast-like cells to biomimetic peptid surfaces. *J Orthop Res* 1999; 17 (4): 615-623
- [161] Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990; 4 (11): 2868-2880
- [162] Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69 (1): 11-25
- [163] Lüthen F, Bulnheim U, Müller PD, Rychly J, Jesswein H, Nebe JGB. Influence of manganese ions on cellular behavior of human osteoblasts in vitro. *Biomol Eng* 2007; 24 (5): 531-536
- [164] Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242 (4884): 1412-1415

- [165] Goldberg MA, Gaut CC, Bunn HF. Erythropoetin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events. *Blood* 1991; 77 (2): 271-277
- [166] Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994; 71 (3): 374-379
- [167] Li G, Simpson AHRW, Kenwright J, Triffitt JT. Effect of lengthening rate on angiogenesis during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1999; 17 (3): 362-367
- [168] Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 31189-31195
- [169] Barceloux DG. Vanadium. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999; 37 (2): 265-278
- [170] Nechay BR. Mechanisms of action of vanadium. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1984; 24: 501-524
- [171] Dai S, Thompson KH, Vera E, McNeill JH. Toxicity Studies on one-year treatment of non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol* 1994; 75 (3-4): 265-273
- [172] Mongold JJ, Cros GH, Vian L, Tep A, Ramanadham S, Siou G, Diaz J, McNeill JH, Serrano JJ. Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on Vanadium levels and pancreatic b-cell morphology. *Pharmacol Toxicol* 1990; 67 (3): 192-198
- [173] Cortizo AM, Etcheverry SB. Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol Cell Biochem* 1995; 145: 97-102
- [174] Anke M, Groppe B, Gruhn K, Langer M, Arnhold W. The essentiality of vanadium for animals. *Sixth International Trace Elements Symposium* 1989; 1: 17-27
- [175] Etcheverry SB, Barrio DA, Cortizo AM, Williams PAM. Three new vanadyl(IV) complexes with non-steroidal anti-inflammatory drugs (Ibuprofen, Naproxen and Tolmetin). Bioactivity on osteoblast-like cells in culture. *J Inorg Biochem* 2002; 88 (1): 94-100
- [176] Etcheverry SB, Williams PAM, Sálce VC, Barrio DA, Ferrer EG, Cortizo AM. Biochemical properties and mechanism of action of vanadyl(IV)-aspirin complex on bone cell lines in culture. *Biometals* 2002; 15: 37-49
- [177] Tracey AS, Gresser MJ. Interaction of vanadate with phenol and tyrosine: Implications for the effect of vanadate on systems regulated by tyrosine phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 (3): 609-613
- [178] Shisheva A, Shechter Y. A cytosolic protein tyrosine kinase in rat adipocytes. *FEBS Lett* 1992; 300 (1): 93-96
- [179] Shechter Y, Li J, Meyerovitch J, Gefel D, Bruck R, Elberg G, Miller DS, Shisheva A. Insulin-like actions of vanadate are mediated in an insulin-receptor-independent manner via non-receptor protein tyrosine kinases and protein phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 1995; 153: 39-47
- [180] Rivadeneira J, Barrio DA, Arrambide G, Gambino D, Bruzzone L, Etcheverry SB. Biological effects of a complex of Vanadium(V) with salicylaldehyde semicarbazone in osteoblasts in culture: Mechanism of action. *J Inorg Biochem* 2009; 103 (4): 633-642
- [181] Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, Halstead LR, Ory DS, Avioli LV, Cheng SL. Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2001; 276 (17): 14443-14450

- [182] Zhang Z, Huang C, Li J, Leonard SS, Lanciotti R, Butterworth L, Shi X. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 2001; 392 (2): 311-320
- [183] Burch RE, Hahn HKJ, Sullivan JF. Newer aspects of the roles of zinc, manganese, and copper in human nutrition. *Clin Chem* 1975; 21 (4): 501-520
- [184] Yamaguchi M, Inamoto K, Suketa Y. Effect of essential trace metals on bone metabolism in weanling rats: comparison with zinc and other metals actions. *Res Exp Med* 1986; 186: 337-342
- [185] Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. *Biochem Pharmacol* 1987; 36 (22): 4007-4012
- [186] Yamaguchi M, Oishi H, Suketa Y. Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl-t-RNA synthetase. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 (21): 4075-4080
- [187] Grandjean-Laquerriere A, Laquerriere P, Jallot E, Nedelec JM, Guenounou M, Laurent-Maquin D, Phillips TM. Influence of zinc concentration of sol-gel derived zinc substituted hydroxyapatite on cytokine production by human monocytes in vitro. *Biomaterials* 2006; 27 (17): 3195-3200
- [188] ASTM-Standard C266-99: Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gilmore needles, ASTM International 2002.
- [189] Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. *Acta Biomater* 2012; 8: 1401-1421
- [190] Bohner M, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment. *Biomaterials* 2005; 26: 6423-6429
- [191] Gbureck U, Barralet JE, Spatz K, Grover LM, Thull R. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials* 2004; 25: 2187-2195
- [192] Barralet JE, Grover LM, Gbureck U: Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. *Biomaterials* 2004; 25: 2197-2203
- [193] Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R. Mechanical activation and cement formation of β -tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2003; 4123-4131
- [194] Leroux L, Hatim Z, Frèche M, Lacout JL. Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 1999; 25 (2): 31S-34S
- [195] Verron E, Khairoun I, Guicheux J, Bouler JM. Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review. *Drug Discovery Today* 2010; 15 (13/14): 547-552
- [196] Ginebra MP, Traykova T, Planell JA. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *J Control Release* 2006; 113 (2): 102-110
- [197] Bandyopadhyay A, Bernard S, Xue WC, Bose S. Calcium phosphate-based resorbable ceramics: Influence of MgO, ZnO, SiO₂ dopants. *J Am Ceram Soc* 2006; 89: 2675-2688
- [198] Singh RK, Kannan S. Synthesis, structural analysis, mechanical, antibacterial and hemolytic activity of Mg²⁺ and Cu²⁺ co-substitutions in β -Ca₃(PO₄)₂. *Mater Sci Eng C* 2014; 45: 530-538
- [199] Hoppe A, Meszaros R, Stähli C, Romeis S, Schmidt J, Peukert W, Marelli B, Nazhat SN, Wondraczek L, Lao J, Jallot E, Boccaccini AR. In vitro reactivity of Cu doped 45S5 bioglass® derived scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B* 2013; 1 (41): 5659-5674

- [200] Huang Y, Zhang X, Mao H, Li T, Zhao R, Yan Y, Pang X. Osteoblastic cell responses and antibacterial efficacy of Cu/Zn co-substituted hydroxyapatite coatings on pure titanium using electrodeposition method. *RSC Adv* 2015; 5 (22): 17076-17086
- [201] Kalaivani S, Singh RK, Ganesan V, Kannan S. Effect of copper (Cu²⁺) inclusion on the bioactivity and antibacterial behaviour of calcium silicate coatings on titanium metal. *J Mater Chem B* 2014; 2 (7): 846-858
- [202] Dorozhkin SV. Calcium orthophosphat cements for biomedical application. *J Mater Sci* 2008; 43: 3028-3057
- [203] Chow LC, Hirayama S, Takagi S, Parry E. Diametral tensile strength and compressive strength of a calcium phosphate cement: effect of applied pressure. *J Biomed Mater Res* 2000; 53 (5): 511-517
- [204] Barralet JE, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR, Knowles JC. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 2002; 63 (1): 1-9
- [205] Ishikawa K, Asaoka K. Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1995; 29: 1537-1543
- [206] Kramer E, Itzkowitz E, Wei M. Synthesis and characterization of cobalt-substituted hydroxyapatite powders. *Ceramics International* 2014; 40 (8): 13471-13480
- [207] Gbureck U, Spatz K, Thull R. Improvemenet of mechanical properties of self setting calcium phosphate bone cements mixed with different metal oxides. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* 2003; 12:1036-1040
- [208] Alkhraisat MH, Moseke C, Blanco L, Barralet JE, Lopez-Carbacos E, Gbureck U. Strontium modified biocements with zero order release kinetics. *Biomaterials* 2008; 29 : 4691-4697
- [209] Jenner GA, Longerich HP, Jackson SE, Fryer BJ. ICP-MS- a powerful tool for high-precision trace-element analysis in earth sciences : evidence from analysis of selected U.S.G.S. reference samples. *Chemical geology* 1990; 83: 133-148
- [210] Moseke C, Gelinsky M, Groll J, Gbureck U. Chemical characterization of hydroxyapatite obtaines by wet chemistry in the presence of V, Co, and Cu ions. *Mater Sci Eng C* 2013; 33 (3): 1654-1661
- [211] ISO 10993-5: 2009: Biological evaluation of medical devices -- part 5: tests for in vitro cytotoxicity.
- [212] Kunzler TP, Drobek T, Schuler M, Spencer ND. Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients. *Biomaterials* 2007; 28: 2175-2182
- [213] Volkmer E, Drosse I, Otto S, Stangelmayer A, Stengele M, Kallukalam BC, Mutschler W, Schieker M. Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Engineering: Part A* 2008; 14 (8): 1331-1340
- [214] Cartmell SH, Porter BD, Garcia AJ, Guldberg RE. Effects of medium perfusion rate on cell-seeded three-dimensional bone constructs in vitro. *Tissue Engineering* 2003; 9 (6): 1197-1203
- [215] Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H, Saito T, Iejima D, Kikuchi M, Tanaka J, Tateishi T. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials* 2003; 42 (13): 2277-2286
- [216] Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 1998; 21: 89-99