

Aus der Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten

der Universität Würzburg

Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde

Direktor: Professor Dr. R. Thull

**Einfluss von Aminosäuren und Proteinen
auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften
von Calcium-Phosphat-Zementen**

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

vorgelegt

von

Philipp A. Rösch

aus Ulm

Würzburg, Februar, 2006

Referent: Prof. Dr.-Ing. R. Thull

Korreferent: Prof. Dr. T. Holste

Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der Mündlichen Prüfung:

30.06.2006

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung.....	1
2	Kenntnisstand	5
2.1	Werkstoffe auf Calcium-Phosphat Basis.....	5
2.1.1	Calcium-Phosphat-Keramik.....	5
2.1.2	Zemente	6
2.1.3	Herstellung der Zementausgangsstoffe.....	7
2.2	Chemie der Calcium-Phosphat-Zemente (CPC).....	9
2.2.1	Löslichkeit und Abbindezeit	9
2.2.2	Abbindezeiten und mechanische Festigkeit.....	13
2.3	Biologische Aspekte	17
2.3.1	Einfluss physiologischer Bedingungen auf CPC.....	17
2.3.2	Biokompatibilität	17
2.3.3	Resorbierbarkeit	18
2.3.4	Anwendungsbereich	20
2.4	Funktionelle Zusätze.....	21
2.4.1	Zeta-Potential	23
2.4.2	Kohäsion.....	24
2.4.3	CPC als Drug delivery Systeme	25
2.4.4	Funktionelle Proteine.....	25
3	Material und Methode	28
3.1	Material.....	28
3.1.1	Zemente	28
3.1.2	Flüssige Phase	29
3.1.3	Pastenformung	31
3.2	Charakterisierungsmethoden.....	32
3.2.1	Initiale Abbindezeit	32
3.2.2	Druck- / und Zugfestigkeit.....	32
3.2.3	Zetapotential.....	34
3.2.4	pH-Wert Messung.....	35
3.2.5	Mikrostrukturelle Untersuchung	35
3.2.6	Infrarot-Spektrometrie.....	35
3.2.7	Röntgendiffraktometrie	36

3.2.8	Bestimmung der Dichte	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Initiale Abbindezeiten	37
4.2	Druck- und Zugfestigkeiten	39
4.3	Zetapotentiale	43
4.4	pH Werte	43
4.5	Mikrostruktur	44
4.6	Infrarotspektroskopie	50
4.7	Phasenanalyse durch Röntgendiffraktometrie	53
4.8	Dichte	54
5	Diskussion	55
5.1	Abbindezeiten	56
5.2	Festigkeit	58
5.3	Wechselwirkung Aminosäuren - Zementpartikel	60
5.4	Mikrostruktur	63
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungen

AS	Aminosäuren
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSP	Bone Sialoprotein
CaPs	Calciumphosphate
CaP	Calciumphosphat
CC	Calciumcarbonat
CPC	Calciumphosphat Zement (engl. Calcium Phosphate Cement)
CS	Druckfestigkeit (engl. compressive strength)
DCPA	Di-Calcium-Phosphat-Anhydrid (Monetit)
DCPD	Di-Calcium-Phosphat-Dihydrat (Bruschit)
DPP	Dentinphosphophoryn
DTS	diametrale Zugfestigkeit (engl. diametral tensile strength)
HA	Hydroxylapatit
IP	Isoelektrischer Punkt
IR	Infrarot-Spektrometrie
LP	Löslichkeitsprodukt
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
PMMA	Polymethylmetacrylat
REM	Rasterelektronenmikroskop
RW	Reinstwasser
ST	Abbindezeit (engl. setting time)
TCP	Tricalciumphosphat (Whitlockit)
TGF	Transforming Growth Factor
TTCP	Tetracalciumphosphat
WSR	Wurzelspitzenresektion
XRD	Röntgendiffraktometrie (engl. X-Ray diffraction)
α -TCP	Alpha-Tricalciumphosphat
β -TCP	Beta-Tricalciumphosphat

1 Einleitung und Problemstellung

Knochenersatzwerkstoffe sind nicht körpereigene Substanzen, die alleine oder im Zusammenwirken mit anderen Materialien den Knochenheilungsprozess fördern [1], indem sie knöchernen Läsionen und Defekte füllen oder überbrücken, die allein durch körpereigene Regenerationsfähigkeit nicht behoben werden können [2]. Sie ersetzen nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren (Teil-) Funktionen [3]. Klinisch kommen organische und anorganische Knochenersatzwerkstoffe beispielsweise in Form von Xenografts, resorbierbaren Polymeren (Polyglycolide, Polyester), Polymethyl-metacrylat (PMMA) - Zementen, autogenen und allogenen Transplantaten, Metallen (z. B. Titan), bioaktiven Gläsern, oder Calcium-Phosphat-Keramiken zur Anwendung. Die einzelnen Werkstoffe können sich hierbei biotolerant, bioinert (z.B. Titan, Carbonfasern, Keramik) oder bioaktiv (z. B. Tricalciumphosphat) verhalten.

Grundvoraussetzung für diese Funktionswerkstoffe ist die Biokompatibilität (absolute Gewebeverträglichkeit und Ausbleiben von Abstoßungsreaktionen) sowie die Förderung des Knochenheilungsprozesses. Hierbei sind Korrosions- und chemische Stabilität [4], zelluläre Toxizität mit Bildung von Gewebnekrosen [5], kanzerogene Wirkung, oder Antigenität [6] mit Fremdkörperreaktion von zentraler Bedeutung.

Einige Knochenersatzwerkstoffe können den Heilungsprozess fördern, indem sie osteokonduktiv bzw. osteotransduktiv [7] wirken. Hierbei wird dem einwachsenden Knochen durch die Mikrostruktur des Materials eine Leitschiene geboten, die eine gezielte Lenkung der Knochenneubildung bewirkt. Bei der Osteoinduktion wird die Entstehung von neuem Knochen durch Umwandlung ortständiger kompetenter Zellen in knochenbildende Zellen (osteogenetische Zellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten) herbeigeführt [1, 3]. Das bewirkt eine Beschleunigung der Knochenheilung und ist bei von verschiedenen Geweben (z. B. Muskel, Narbengewebe) begrenzten Defekten von

entscheidendem Nutzen. Dies kann zum einen durch das Knochenersatzmaterial selbst oder auch durch funktionelle Zusätze erreicht werden.

Die Ziele, die mit Biomaterialien als Knochenersatz erreicht werden sollen, gehen über den einfachen Ersatz körpereigener Gewebe mit einem Implantat hinaus. Es wird angestrebt die Knochenheilung in Bezug auf die Menge und Qualität des neu gebildeten Knochens, die Dauer der Knochenheilung bzw. Neubildung und die mechanische Belastbarkeit [7] zu verbessern [3]. Das Material soll über Bioaktivität [8] verfügen und der mechanischen Stabilität dem Implantationsgebiet [9] angepasst sein, um lokalen Belastungsspitzen innerhalb des Knochens [3] vorzubeugen. Idealerweise sollte die Aktivität der knochenbildenden Zellen stimuliert werden [7] und die Abbauprodukte der Knochenersatzwerkstoffe gleichzeitig als Ausgangsstoff für die an der Osteoneogenese beteiligten Zellen dienen [3] ohne diese zu schädigen. Wünschenswert sind ebenfalls eine ausreichende Verarbeitungszeit [7], sowie die Möglichkeit der Sterilisation. Die Resorption von Knochenersatzmaterialien sollte nur mit der Geschwindigkeit erfolgen, mit der der ortständige Knochen aufgefüllt, bzw. unter physiologischen Bedingungen remodelliert wird [3]. Zu schnell abbaubare Knochenersatzmaterialien wie beispielsweise Calciumsulfate induzieren oftmals entzündliche Reaktionen, die die Knochenheilung vermindern. Zu langsamer Abbau kann zu einer Beendigung des Umbauvorgangs mit Verbleib des Fremdkörpers im Körper führen [10]. Die Resorption ist allerdings nur eingeschränkt zu fordern, da in einzelnen medizinischen Fachbereichen wie der plastischen Chirurgie oder Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie unter Umständen keine Resorption der Materialien erwünscht ist.

Keiner der sich in Gebrauch befindlichen Knochenersatzstoffe ist in der Lage alle geforderten Eigenschaften zu erfüllen. Immer noch gilt autologe Spongiosa wegen ihrer in der Regel hervorragenden Eigenschaften im Bezug auf Osteoinduktivität, Osteoconductivität, Formbarkeit, Formstabilität und HLA-Kompatibilität als der „Goldene Standard“ [3]. Allerdings muss dessen Gewinnung über einen Zweiteingriff erfolgen, der nicht ohne Konsequenzen für den Patienten ist und mit

Komplikationen wie Blutung, Schmerz oder Infektion behaftet sein kann [1, 3, 11, 12].

Eine der gebräuchlichsten Alternativen für die Füllung von Knochendefekten aufgrund von Zysten, Tumoren oder angeborenen Defekten stellen Calcium-Phosphat-Keramiken aus Hydroxylapatit (HA) oder Tricalciumphosphat (TCP) dar, da sie eine gute Biokompatibilität, fehlende Toxizität und die Möglichkeit der sterilen Applikation bieten [10]. Ihre Nachteile liegen aber in der eingeschränkten Adaptationsfähigkeit, den mangelhaften Resorptionseigenschaften (TCP zu schnell, HA zu langsam) und der Notwendigkeit einer Stabilisierung durch abstützende Osteosynthesen [3] begründet. Andere Ersatzwerkstoffe wie Polymere weisen beispielsweise neben guten mechanischen und resorptiven Eigenschaften, Unklarheiten im Bezug auf den Verbleib der Abbauprodukte und die Reaktionen des Körpers auf die Residuen auf [1, 3].

Zemente auf der Basis von Calcium-Phosphaten (CaPs) stellen einen viel versprechenden Knochenersatzwerkstoff dar. Sie bestehen aus knochenverwandten Calciumphosphatsalzen, die mit einer wässrigen Phase angemischt werden und nach Einbringen in den Defekt in situ aushärten [1, 13]. Die Abbindereaktion der im chirurgischen Einsatz befindlichen CPC erfolgt in gewebeverträglichen Temperatur-/ pH-Wert-Bereichen [1, 7]. Als Hauptprodukt resultiert nanokristallines Hydroxylapatit (HA), das große Ähnlichkeit mit dem im Knochen vorkommenden Apatit aufweist. Die freie Formbarkeit der applizierbaren Zementpaste führt zu einer nahezu perfekten Anpassung an die Defektmorphologie [14]. Calciumphosphat-Zemente (CPC) sind osteokonduktiv und werden langsam durch Osteoklasten resorbiert und durch einwachsenden Knochen ersetzt [15], sodass ein bindegewebiger Ersatz oder ein inertes Verbleiben des Implantats am Anwendungsort ausbleibt. Diese Eigenschaft ist durch die mikroporöse Struktur von CPC bedingt. Es konnte gezeigt werden, dass CPC von hohem Nutzen im medizinischen und zahnmedizinischen Bereich sind. Hier kommen sie als endodontische Füllmaterialien [16, 17], als Knochenersatz bei parodontalen Knochendefekten [18] und als Bindemittel für nicht abbindende Calciumphosphat-Implantatwerkstoffe [19] zur Anwendung. CPC sind attraktiv für

orthopädische Anwendungen, da sie formbar und teilweise mit minimalinvasiven Techniken applizierbar sind [20]. Allerdings begrenzt die relativ niedrige Festigkeit und das spröde Verhalten die Anwendungsbreite auf den nicht lasttragenden Bereich [20, 21].

Zur Zeit sind eine Reihe formbarer CPC aus reinem Calciumphosphat [22-26] oder in Kombination mit anderen Materialien wie Gelatine [27], Cellulose [28], Fibrinkleber [29] oder Polymeren [30] bekannt, die alle innerhalb von Minuten in situ aushärten. Allerdings sind die Resorptionsraten und Resorptionsmuster oftmals unbefriedigend und führen zum Einwachsen von Bindegewebe und zu sekundärer Instabilität [10]. Im Rahmen der Weiterentwicklung von CPC werden den Zementen zunehmend funktionelle Zusätze, wie z. B. Polysaccharide, Antibiotika oder biologisch aktive Peptide (Wachstumsfaktoren) beigelegt. Ziel ist es, Zementeigenschaften wie Osteoinduktivität, Infektionsresistenz, Auswaschresistenz, mechanische Festigkeit oder Geschwindigkeit der Abbindezeit zu verbessern und der jeweiligen Anwendung anzupassen. In der Literatur wird auf den Einfluss funktioneller Zusätze in Form von Wachstumsproteinen wie z. B. Bone Sialo Protein (BSP) [31] oder Transforming Growth Factor (TGF) [32, 33] auf die Materialeigenschaften der CPC eingegangen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen verschiedener Aminosäuren (AS) und Proteine auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von CPC im Hinblick auf ihre klinische Verwendbarkeit zu untersuchen. Hierzu wurden drei unterschiedliche Zementtypen, bestehend aus mechanisch aktiviertem α/β -Tricalciumphosphat sowie aus einer äquimolaren Mischung von Tetracalciumphosphat/Monetit unter Beimengung der Aminosäuren Glycin, L-Alanin, L-Serin, L-Threonin, L-Valin, L-Aspartat, L-Arginin, L-Prolin sowie der Proteine Albumin und Fibrinogen untersucht. Ermittelt wurde der Einfluß der Modifikationen auf die Abbindezeit (ST), die Druck- (CS) bzw. Zugfestigkeit (DTS), sowie die Zetapotentiale suspendierter Zementpartikel. Eine Festigkeitssteigerung der modifizierten Zemente im Vergleich zum Wert des reinen Zementes wurde in einem zweiten Schritt durch Untersuchung der Mikrostruktur, der Reaktionsprodukte und der Dichte/Porosität untersucht.

2 Kenntnisstand

2.1 Werkstoffe auf Calcium-Phosphat Basis

Knochenersatzwerkstoffe auf der Basis von Calcium-Phosphaten gehören zu den anorganischen Werkstoffen und müssen von Glaskeramiken (Biogläser) auf der Basis von SiO_2 abgegrenzt werden. Sie können in Keramiken und Zemente unterteilt werden, deren Ausgangssubstanzen und Produkte oftmals gleich sind. Die große Ähnlichkeit in Aufbau und Verhalten von Calcium-Phosphat-Keramiken und CPC führt zu Überschneidungen der Eigenschaften. Somit erklären sich auch unscharfe Formulierungen, die die Bildung von Biokeramiken bei Raumtemperatur aus einer Reihe von Calcium-Phosphat-Verbindungen bestätigen [14]. Grundsätzlich werden Keramiken durch Hochtemperaturesinterung geformt und weisen größere, über Sinterhalse verbundene Partikel auf, wohingegen Zemente über Lösungs- und Fällungsreaktionen bei Raum- oder Körpertemperatur entstehen und kleinere, miteinander verfilzte Partikel aufweisen.

2.1.1 Calcium-Phosphat-Keramik

Die als Knochenersatzmaterialien eingesetzten Calcium-Phosphat-Keramiken werden aus biologisch oder synthetisch gewonnenem Hydroxylapatit $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ und/oder Tri-Calcium-Phosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ hergestellt, die in einem Hochtemperaturprozess (1000 - 1500 °C) gesintert werden [1]. Sie können als kompakte bis hoch poröse Körper mit bis zu 85% Porosität vorliegen [1]. Keramiken aus biologischen Ausgangsmaterialien bilden interkonnektierende Porensysteme, die bei genügend großem Porendurchmesser vollständig von Knochengewebe durchwachsen werden können. Bei synthetisch gewonnenen pulverförmigen Ausgangsmaterialien müssen diese durch spezielle Verfahren erzeugt werden. Wird die Mindestporengröße unterschritten oder besteht keine Verbindung zwischen den Poren, bleibt lediglich die Möglichkeit des Anwachsens von neuem Knochengewebe [1].

HA-Keramik wird nur sehr langsam oder gar nicht abgebaut [1, 9, 34] und besteht aus dichten polyedrischen Körnern (1-5 μm Durchmesser), die an den

Grenzflächen kristalline Defekte aufweisen. TCP-Keramik ist dagegen löslich und wird biologisch schnell abgebaut [3, 35]; hierbei weist die α -Kristallmodifikation (α -TCP) einen schnelleren Abbau als die β -Variante (β -TCP) auf. Die resorptiven Eigenschaften der Calcium-Phosphat-Keramiken sind folglich in Bezug auf die Förderung der knöchernen Reparatur unzureichend [3]. Eine sichere Voraussage, ob bei Massivimplantaten in der Folge einer Durchbauung des Defekts eine Wiederherstellung der knöchernen Kontinuität eintreten wird, ist nicht möglich [3].

Kennzeichnend für Calcium-Phosphate in keramischer Form ist die Ausbildung eines Interfaces zwischen Werkstoff und Körpergewebe, über das funktionelle Kräfte vom Gewebe auf den Ersatzwerkstoff übertragen werden können [36]. Allerdings sind die mechanischen Eigenschaften ungenügend, sodass diese Implantate immer auf zusätzliche abstützende Osteosynthesen angewiesen sind. Keramiken aus HA kommen klinisch als feste, nicht formbare Körper in Gestalt von Blöcken, Zylindern, Granulaten, und Pulvern zur Anwendung [1]. Durch die geringe Formbarkeit erweist sich die Defektfüllung als technisch schwer realisierbar. HA-Keramik wurde aber auch zur Beschichtung von Metalloberflächen herangezogen [37]. Hierbei zeigte sich, dass sie die Knochenbildung an der Oberfläche begünstigte [37] und so die Zeit bis zur maximalen Belastbarkeit verkürzt wurde.

2.1.2 Zemente

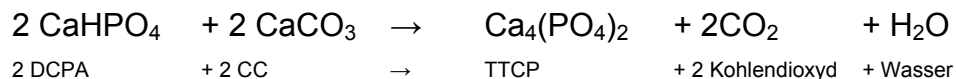
Calcium-Phosphat-Zemente sind aus einer oder mehreren Pulverkomponenten und einer flüssigen Phase zusammengesetzt. Nach dem Anmischen entsteht eine frei formbare Paste, die nach Applikation in situ abbindet und sich der jeweiligen Knochendefektform nahezu perfekt anpasst [1, 14]. Unterschieden werden nach dem Endprodukt der Abbindereaktion zwei verschiedene Zementtypen: 1. HA-bildende Zemente entstehen bei einem pH-Wert der Zementpaste >4.2 und 2. Bruschit-Zemente, wenn durch Zusatz saurer Calcium-Phosphate oder Phosphorsäure ein pH-Wert der Paste < 4.2 eingestellt wird. Es entsteht jeweils ein mikroporöses, nicht keramisches Reaktionsprodukt mit niedriger Kristallinität [22, 38]. Die mechanischen Festigkeiten von CPC sind geringer als die bei

keramischen Werkstoffen gleicher Basis [14]. Die Reaktionsprodukte sind bedingt durch den Lösungs-/Präzipitationsprozess nanokristallin mit hoher spezifischer Oberfläche.

2.1.3 Herstellung der Zementausgangsstoffe

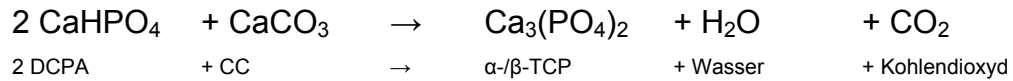
Grundsätzlich sind zwei Herstellungsarten zu unterscheiden. Einige CaPs werden durch Reaktion fester Stoffe bei hohen Temperaturen ($T > 1000 \text{ °C}$) gebildet, während andere durch Präzipitation aus einer übersättigten Lösung ($\text{Ca(OH)}_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ -System) bei Umgebungstemperaturen hervorgehen [39]. Somit handelt es sich bei ersteren um gesinterte, gemahlene CaP-Keramiken, bei den zweiten um gemahlene und gefällte CaPs. Beide werden als Ausgangsstoffe für Zementsysteme verwendet.

Tetracalciumphosphat wird durch Sinterung äquimolarer Mischungen aus DCPA und Calciumcarbonat (CC) bei 1500 °C für 4-6 h und anschließender Abschreckung auf Zimmertemperatur in einem Exsikkator [40] erhalten nach der Reaktionsgleichung:



Abweichungen dieser Parameter sind möglich und beschrieben [21, 41, 42].

Tricalciumphosphat (Whitlockit) kommt in einer α - und β -Variante vor, die beide die gleiche Summenformel $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ aufweisen. Sie entstehen z. B. durch reaktive Sinterung einer Mischung aus 2 mol DCPA und 1 mol Calciumcarbonat für 6 h [43] gemäß Formel (2) oder aus HA und Calciumhydrogenphosphat [44]. α -TCP wird bei Temperaturen über 1100 °C – 1200 °C , β -TCP im Temperaturbereich zwischen 800 °C und 1100 °C – 1200 °C bevorzugt gebildet [45].



DCPA wird bei Raumtemperatur nur in geringen Mengen präzipitiert. Es wird beispielsweise durch Erhitzen von Di-Calcium-Phosphat-Dihydrat (DCPD) auf Temperaturen von 120-170 °C [39] unter Abspaltung von 2H₂O erhalten.

In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und den eingebrachten CaPs kann sich eine Vielzahl verschiedener Calcium-Phosphat-Verbindungen (Tabelle 1) bilden. Übersichtsartikel über die Vielfalt der Zusammensetzungen von CPC finden sich in der Literatur [14, 38, 39, 46, 47].

Tabelle 1: Darstellung einiger Calcium-Phosphat-Salze mit Summenformel, Calcium-Phosphatverhältnis und Löslichkeitsprodukt.

CaP	Summenformel	Ca/P	Log (LP) bei 37 °C
Calciumhydrogenphosphatdihydrat (DCPD, Brushit)	CaHPO ₄ 2H ₂ O	1,0	6,63 [18]
Calciumhydrogenphosphatanhydrid (DCPA, Monetit)	CaHPO ₄	1,0	7,04 [31]
Octacalciumphosphat (OCP)	Ca ₈ (HPO ₄) ₂ (PO ₄) ₄ 5H ₂ O	1,33	95,9 [41]
α-Tricalciumphosphat (α-TCP, α-Whitlockit)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	25,5
β-Tricalciumphosphat (β-TCP, β-Whitlockit)	Ca ₃ (PO ₄) ₂	1,5	29,5 [19]
Fluorapatit (FA)	Ca ₅ (PO ₄) ₃ F	1,67	-
Hydroxylapatit (HA)	Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH	1,67	58,6 [12]
Tetracalciumphosphat (TTCP)	Ca ₄ (PO ₄) ₂ O	2,0	37,4 [30]

2.2 Chemie der Calcium-Phosphat-Zemente (CPC)

2.2.1 Löslichkeit und Abbindereaktion

Die Chemie der Abbindereaktion ist bei vielen Zement-Systemen (CPC, Gips) ähnlich und kann durch die Löslichkeit der Edukte und Produkte erklärt werden [14]. So gehen die Zementedukte nach Mischung mit einem wässrigen Elektrolyt in Lösung, und bilden eine an Calcium und Phosphat übersättigte Phase im Bezug auf das Reaktionsprodukt. Durch den anschließend resultierenden Fällungsprozess entsteht der Zement. Der Grad an Stabilität und Löslichkeit der verschiedenen Calcium-Phosphat-Verbindungen wird als Löslichkeitsprodukt (LP) angegeben und ist für einige CaPs in Tabelle 1 dargestellt. Es ist die treibende Kraft für die Reaktionsmechanismen, die dem Abbindeverhalten von Calcium-Phosphat-Zementen zugrunde liegen [14]. Das Löslichkeitsprodukt ergibt sich aus der Summenformel der Verbindung, z. B. für HA durch:

$$LP (HA) = (Ca)^5 (PO_4)^3 (OH)$$

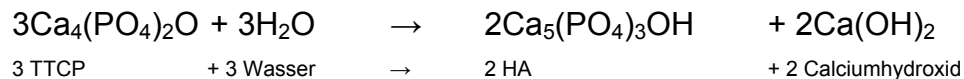
Das Löslichkeitsprodukt verändert sich in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Die Darstellung der Veränderung des LP als Kurve, in Abhängigkeit des pH-Wertes bei konstanter Temperatur, wird als Löslichkeits-Isotherme bezeichnet. Betrachtet man verschiedene Löslichkeits-Isothermen bei 37°C, so stellt man fest, dass HA im pH-Bereich > 4,2 die geringste Löslichkeit unter den Calcium-Phosphat-Salzen aufweist, was dazu führt, dass andere Calcium-Phosphat-Salze die Tendenz zeigen sich zu lösen und als HA geringer Kristallinität auszufallen [43]. Dies erklärt, warum Hydroxylapatit den mineralischen Hauptbestandteil des physiologisch und pathologisch calcifizierten Hartgewebes im Körper bildet [14, 39]. Bei pH-Werten von < 4.2 resultiert Calciumhydrogenphosphatanhydrid (DCPA, Monetit), da es in diesem pH-Bereich das thermodynamisch stabilste Calciumphosphat darstellt. Aufgrund der sehr geringen Kristallbildungsrate von DCPA wird in sauren Zementen allerdings das Dihydrat DCPD (Bruschart) als Produkt gebildet. Betrachtet man die Löslichkeitsisothermen von Zementssystemen, deren Edukt aus zwei CaPs besteht, die im Überschuss vorhanden sind und deren Löslichkeitsrate größer ist als die Bildungsrate des

resultierenden Zementes (HA oder DCPD), bleibt die Zusammensetzung der Lösung nahe dem singulären Punkt (SP) [14]. Dieser markiert den Schnittpunkt zweier Löslichkeits-Isothermen, an dem die Lösung im Hinblick auf beide Verbindungen gesättigt ist [14].

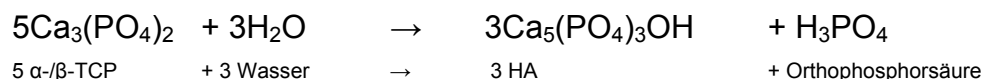
Die Bildung von Zementstrukturen steht direkt mit der Löslichkeitsrate an der Partikeloberfläche der Ausgangsstoffe in Beziehung. Die Größe, Form und spezifische Oberfläche der Zementpartikel hat einen großen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit sowie die mechanischen Eigenschaften des Zements [48]. Zu große Eduktpartikel können als unverbrauchte Eduktreste im HA eingeschlossen werden [21]. Zemente aus kleinen Partikeln binden hingegen schneller ab und werden besser umgesetzt [43]. Bei Verwendung mehrkomponentiger Pulvermischungen ist eine definierte Einstellung der Lösungsraten der Einzelkomponenten nötig, um eine kongruente Löslichkeit und definierte Bedingungen für die Präzipitation des Reaktionsprodukts zu bewirken. Beispielsweise muss für eine äquimolare Mischung aus Tetracalciumphosphat und Calciumhydrogenphosphat ein Aspektverhältnis der Partikelgrößen von etwa 10:1 durch Mahlung erreicht werden, um abbindefähige Zementformulierungen mit annähernd physiologischem pH-Wert zu erhalten [49]. Die Mahlung der CaPs erfolgt trocken oder bei kleineren Partikelgrößen in Suspension (Ethanol), die die Bildung von Agglomeraten durch elektrostatische Abstoßung verhindert [48]. Das Mahlen von CaPs führt über eine Vergrößerung der spezifischen Partikeloberfläche zu einer höheren Löslichkeitsrate. Die thermodynamische Löslichkeit (Löslichkeitsprodukt) bleibt hierbei zunächst weitgehend unverändert. Darüber hinaus führt langes Mahlen bei kristallinen Stoffen zu einer plastischen Verformung der Partikel mit Auswirkung auf die Kristallinität in Form von Gefügedefekten bis hin zu einer Phasenumwandlung in einen amorphen Zustand. CaPs in einem solchen amorphen Zustand zeigen eine stark erhöhte thermodynamische Löslichkeit. Darüber hinaus führt ein lang andauernder Malprozess zu einer mechanischen Aktivierung der Zementpartikel. Hierbei kommt es durch Versetzungen in der Kristallgitterstruktur zu einer starken Zunahme der Bildungsenthalpie ΔH . Dieser Energieeintrag in das Zementpulver kann durch Differentielle Thermokalorimetrie und Thermogravimetrie ermittelt

werden. So kann z.B. aus kristallinem β -TCP, welches durch seine thermodynamische Stabilität in wässriger Elektrolytlösung bei physiologischer Temperatur keine Hydrolyse und Umwandlung zu HA zeigt, nach Mahlung für 24 h ein abbindungsfähiger teils amorpher β -TCP-Zement mit klinisch akzeptablen Abbindezeiten hergestellt werden [50, 51].

Ziel der Formulierung abbindungsfähiger CPC ist die Bildung von knochenähnlichem Apatit. HA ist die in ihrer Stöchiometrie dem humanen Knochen ähnlichste CaP-Verbindung, und weist ein Calcium-Phosphat-Verhältnis von $5:3 = 1,67$ auf, welches dem Verhältnis von biologischem Apatit von 1,6 (im altersabhängigen Mittel) sehr nahe kommt [1]. Die Ausgangsmischung der Zemente sollte folglich das Calcium-Phosphat-Verhältnis von 1,67 aufweisen und während der Reaktion ausreichende Mengen an gelöstem $\text{Ca}(\text{OH})_2$, H_3PO_4 und H_2O bereitstellen. Alle CaPs außer TTCP haben ein geringeres Calcium-Phosphat-Verhältnis als HA [14] (vgl. Tabelle 1). Dies hat zur Folge, dass TTCP mit seinem Calcium-Phosphat-Verhältnis von 2.0 bei der Einzelreaktion zu HA basisches Calciumhydroxid an die Lösung abgibt [39]:

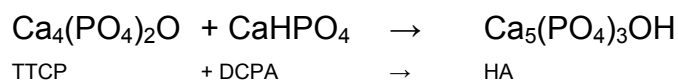


Alle anderen CaPs wie beispielsweise α -TCP setzen bei der hydrolytischen Einzelreaktion zu HA dreiwertige Orthophosphorsäure in das Lösungsmedium frei [39]:



Die resultierende pH-Wert-Verschiebung der Reaktionsumgebung führt zu einer veränderten Löslichkeit der CaPs, welche die Reaktionskinetik verändert und sogar stoppen kann [39]. Mischungen aus TTCP mit anderen CaPs, die zusammengesetzt der Stöchiometrie von HA entsprechen, ergeben keine sauren

oder basischen Nebenprodukte [14, 39]. Es konnte gezeigt werden, dass CPC-Mischungen auf TTCP verzichten können, wenn das niedrige Calcium-Phosphat-Verhältnis durch Zugabe von Calciumhydroxid ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) und Calciumcarbonat (CaCO_3) auf 1,67 erhöht wird [39]. Auf diese Weise wird auch die Akkumulation von Phosphorsäure als Nebenprodukt verhindert und diese in HA umgewandelt [39]. Zur Herstellung abbindungsfähiger CPC eignen sich eine Reihe von CaPs, unter anderem α -TCP, β -TCP und Mischungen aus TTCP mit anderen CaPs. TTCP-DCPA-Zemente härten z.B. schon bei Zugabe von Wasser in wünschenswerter Zeit bei Körper- oder Umgebungstemperatur und neutralem pH-Wert aus [13, 39].



Andere Mischungen wie z. B. TTCP + OCP, α -TCP, oder β -TCP ergeben mit reinem Wasser keine abbindungsfähigen Zemente. Grund hierfür ist der geringe Abstand ihrer singulären Punkte zur HA-Isotherme, wodurch der Grad der Übersättigung der Lösungen im Hinblick auf HA zu gering ist [14]. Wird diesen eine Phosphatlösung beigemischt, können sie dennoch abbinden. Dies lässt sich erklären, wenn man die Versorgung mit hohen Phosphatkonzentrationen im Lösungsmedium als einen Schlüsselfaktor der Reaktion zu HA versteht.

Wenn Wasser als Lösungsmedium für das TTCP- und DCPA/DCPD-Zementensystem dient, kann die für eine rasche Bildung von HA benötigte Phosphatkonzentration, welche für die Aushärtung des Zements in 30 min verantwortlich ist, durch die hohe Löslichkeit von TTCP bei neutralen und sauren Bedingungen aufgebracht werden [43]. Dies stellt einen weiteren Grund für TTCP als wesentlichen Bestandteil von CPC dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe ausreichend löslicher, calciumfreier Salze der Phosphorsäure (z. B. Na_3PO_4 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4) in Form von $\sim 0,2$ mol/l Natrium-Phosphat-Lösung die Bildung von HA aus TTCP-freien Mischungen sowie CaPs (wie z. B. β -TCP) ermöglicht. Gleichzeitig nehmen die Phosphatkonzentration und die Bildungsrate von HA zu [43]. Die Benutzung von konzentrierter Phosphatlösung zeigte ebenso eine Verkürzung der Abbindezeit bei TTCP-DCPA- und TTCP-DCPD-Mischungen

[1, 52, 53] von 30 min auf 8-5 min. Eine Sonderstellung nehmen die sauren CaPs DCPA und DCPD ein. Betrachtet man die Löslichkeits-Isothermen von DCPA und DCPD, so wird klar, dass eine Erhöhung des pH-Wertes ab ca. pH 8,5 ihre Löslichkeit steigert und somit auch die in Lösung befindliche Phosphatkonzentration zunimmt. Voraussetzung ist die Benutzung einer Lösung mit pH-Wert über dem pK_{s3} (12,7) des Phosphats [43].

2.2.2 Abbindezeiten und mechanische Festigkeit

Tabelle 2: Übersichtstabelle unterschiedlicher Zementzusammensetzungen mit Reaktionsprodukt, Abbindezeit und Festigkeit.

Zementzusammensetzung	Reaktionsprodukt	Abbindezeit (min)	CS (MPa)	DTS (MPa)	Quelle
TTCP/DCPA + Aqua dest.	HA	30	66,1 ± 5,0	-	[14, 41, 42]
TTCP/DCPA/0,25% P-Lösung	HA	5 bis 8	66,1 ± 5,0	-	[14, 52, 54, 55]
β-TCP mechanisch aktiviert	HA	5	51,0 ± 6,9	5,9 ± 2,3	[50]
TTCP/DCPA + Wasser	HA	9 bis 3	62,5 ± 5,0 bis 113,2 ± 16,0	-	[56]
β-TCP / MCPM+0.5molare Na-Citratlösung	Bruschat	3.5 bis <1.5	16.6 ± 1.0 bis 25.7 ± 5.2	-	[56]
TTCP/DCPA äquimolar + Na-P + 500nM Na-Zitrat	HA	-	184,0 ± 19,3	-	[57]

Abbindezeit

Die Abbindereaktion ist eine Kombination aus temperaturabhängigen Lösungs- und Fällungsprozessen [39, 58], die in einer ein- bzw. mehrstufigen Reaktion bei Raumtemperatur oder Körpertemperatur unter Phasenumwandlung zum Abbinden des Zementes führt [39]. Ihre Geschwindigkeit hängt nicht von der Menge der Edukte ab, sondern von der spezifischen Partikelgröße der Edukte sowie der Diffusionsstrecke, die von den Calcium- und Phosphat-Ionen zurückgelegt werden müssen [14]. Für einen HA bildenden α-TCP-Zement konnte

gezeigt werden, dass die Abbindereaktion initial durch die spezifische Oberfläche (Korngröße) des Pulvers kontrolliert wird, während nach 16 h Reaktionsdauer die Diffusion der Ionen durch die hydratisierte Schicht der Partikel der die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmende Schritt ist [59].

Die Bildungsrate von Hydroxylapatit in wässriger Lösung ist gering ($2.7 \times 10^{-7} \text{ mol Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH min}^{-1} \text{ m}^{-2}$ [60]), sodass in der Regel Abbindebeschleuniger wie Alkaliphosphate oder Phosphorsäure dem Zement zugegeben werden, um klinisch akzeptable Abbindezeiten im Minutenbereich zu ermöglichen [55, 61, 62]. Im Gegensatz hierzu ist die Bildungsrate von Brushit nahezu drei Größenordnungen schneller ($3.32 \times 10^{-4} \text{ mol DCPD min}^{-1} \text{ m}^{-2}$ [63]), was die Verwendung von Abbindeverzögerern (Pyrophosphate, Sulfate oder Citrate) notwendig macht [64]. Ebenso sind pH-Wert und Temperatur für die Bildungsgeschwindigkeit und das Abbindeprodukt von Bedeutung (s.o.) [65-68].

Mechanische Festigkeit

Calcium-Phosphat-Zemente (CPC) sind spröde Werkstoffe die eine geringe Biegefestigkeit aufweisen. Ihre Festigkeit resultiert (wie bei Gips [69]) aus der Verfilzung der sich während der Abbindereaktion bildenden Kristallite [1, 43]. Somit führt eine geringe Kristallinität zu niedrigeren Druck-/Zugfestigkeitswerten [43]. Weitere Faktoren für die mechanische Stabilität von CPC sind Partikelgröße, Mikroporosität, Dichte, Konversion und beigefügte Zusätze [70, 71]. Mit abnehmender Partikelgröße und höherer Härtungstemperatur nimmt die Festigkeit zu [1]. Die optimale Festigkeit von CPC nach Abbinden wird nach einigen Stunden bis Tagen erreicht, da die Sedimentationsprozesse (Konversion) am Ende der Härtungsphase noch nicht vollständig abgeschlossen sind.

Die Porosität und Dichte der Zemente ist entscheidend für ihre mechanische Festigkeit und deren Abbauverhalten. Eine hohe Porosität verschlechtert die mechanische Belastbarkeit, beschleunigt aber gleichzeitig die Biodegradierbarkeit [1]. Es besteht eine direkte Proportionalität zwischen Festigkeit, Dichte und Porosität bei CPC [72]. Die Druck- und Zugfestigkeitswerte von CPC können durch uni- bzw. biaxiläre oder isostatische Kompression der Zementpaste

während der Abbindereaktion gesteigert werden [72, 73]. Schon ein sehr kleiner Vorverdichtungsdruck kann die Zug- und Druckfestigkeit von Zementen im Vergleich zu einfach angemischten Zementen merklich steigern [21]. Die Festigkeitssteigerung nimmt jedoch nicht linear mit zunehmendem Druck zu, sondern ebbt mit steigendem Druck kontinuierlich ab [54]. Ein Verdichtungsdruck über 100 MPa verringert die Porosität nur noch geringfügig und verbessert die Zugfestigkeit unwesentlich [72]. Der Grad der Reaktion und die Kristallinität des resultierenden Apatits blieb von der Vorverdichtungskraft unbeeinflusst [21]. Die Dauer der Verdichtung zeigt keinen Effekt [54]. Ein Druck von 0,7 MPa wurde in verschiedenen Studien eingesetzt und als klinisch erreichbar betrachtet [22, 52]. Die Vorverdichtung der Zementpaste führt über das Abpressen von Reaktionsflüssigkeit zu einer Steigerung des Pulver-/Flüssigkeitsverhältnisses, bis die Zementpaste nicht mehr frei formbar ist. Mit steigendem Pulver-/Flüssigkeitsverhältnis von 2 bis 4 nehmen die DTS-Werte signifikant zu [74]. Allerdings zeigen sich ab dem klinisch empfohlenen Anwendungsbereich zwischen 3,3-4 keine weiteren signifikanten Unterschiede [54]. Ebenso verursacht die Vorkomprimierung ein Auspressen von Zementflüssigkeit, was in einer niedrigeren Porosität resultiert. Es ist zu vermuten, dass die Porosität durch das Wasser im Zement verursacht wird oder durch Schrumpfung während der Abbindephase [21]. Der Effekt, dass eine Ausdehnung eines Zementes, dessen Edukte dichter als dessen Produkt sind, mit einem Verlust an Porosität einhergeht, wurde in einigen Zementssystemen benannt [75, 76].

Mit zunehmendem Verdichtungsdruck auf die Zementpaste bleibt die spezifische Oberfläche sowie der Umsetzungsgrad des Reaktionsprodukts unverändert. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Löslichkeit von TTCP-DCPA-Zement nicht von Änderungen der Porosität durch Vorverdichtung beeinflusst wird [21]. Allerdings nimmt die Festigkeit und der Weibull-Modul zu, die Porosität und Ausdehnung der Hohlräume ab [21]. Mit abnehmender Porosität nimmt die Anzahl der Poren mit einem Volumen über den Partikelgrößen der Reaktanden wiederum zu. Verantwortlich hierfür sind das Wasser (Lösungsmittel) und die Reaktionsschrumpfung [21]. Ein weiterer Effekt der Vorverdichtung ist die Verringerung von herstellungsbedingten Defekten in Form von Luftblasen.

Die Stabilität der Knochenkortikalis liegt bei 90–209 MPa [77]. Die für CPC ermittelten Druckfestigkeiten von 20-83 MPa und Zugfestigkeiten von 8-10 MPa [13, 22, 52, 54, 72, 78] erlauben somit lediglich den Einsatz zur Defektauffüllung in nicht belasteten Knochenbereichen [7, 14]. Bruschitbildende Zemente sind mechanisch weniger belastbar als HA-Zemente. Die in der Literatur beschriebenen Druckfestigkeiten bewegen sich im Bereich um 1-60 MPa [79]. Diese Werte wurden jedoch oftmals an Prüfkörpern ermittelt, deren Festigkeiten aufgrund der Herstellungsvorschriften (Vorkomprimierung, Trocknung) im klinischen Gebrauch nicht erreichbar sind. Die Steigerung der Zementfestigkeit ist somit notwendig, um einen Einsatz von CPC in mäßig kraftbelasteten Bereichen des Skelettsystems zu ermöglichen. Der entscheidende Faktor hierbei ist die durch die flüssige Phase verursachte Mikroporosität des Zementgefüges, die in exponentieller Abhängigkeit von der erreichten Festigkeit steht.

Die Mikrostruktur von TTCP-DCPA-Zement wurde im Zeitraum der Abbindereaktion rasterelektronenmikroskopisch untersucht [22]. Hierbei zeigten sich nach einer Aushärtungszeit von einer Stunde Umrisse von Eduktpartikeln und das Vorhandensein amorpher Teilchen in den Eduktzwischenräumen. Bei höherer Vergrößerung wiesen diese eine blumenblattähnliche kristalline Struktur auf, und führten zur Vernetzung der Partikel. Mit zunehmender Aushärtedauer nahm die Menge und Kristallinität der in den Partikelzwischenräumen vorhandenen Materie zu. Abgebundene Zemente zeigen in Bereichen hoher Materialdichte stengelförmige, dicht gepackte und parallel angeordnete Kristallite von 0,05 μm Breite und ca. 1 μm Länge, die den Großteil der Kristallite ausmachen. Aber auch geringe Mengen an plättchenförmigen Kristallen sind vorhanden. Die an Hohlräume grenzenden Kristalle weisen einen radialen, gut voneinander abgrenzbaren Aufbau auf. Aufgrund der geringen Größe der Kristallite erscheint die Zementmatrix bei geringer Vergrößerung amorph. Die Festigkeit von Zement ist in hohem Maße anfällig auf Lagerungsbedingungen der Zementedukte [54], da sich bei Feuchtigkeitzutritt eine HA-Schicht um die Partikel bilden kann, die die Reaktivität herabsetzt [21].

2.3 Biologische Aspekte

2.3.1 Einfluss physiologischer Bedingungen auf CPC

Viele der derzeit gebräuchlichen Implantatmaterialien zeigen mit der Zeit eine Abnahme der mechanischen Festigkeit durch Hydrolyse und Repräzipitation [80]. Im Bezug auf CPC muss hierbei zwischen Brushit-Zementen und HA-Zementen unterschieden werden. Brushit wird bei pH-Werten $< 4,2$ gebildet, ist unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch resorbierbar und verliert dadurch rasch seine Festigkeit [56]. Es folgt eine Umsetzung von Brushit zu HA. Durch in vitro Studien an Brushit-Zementkörpern mit verschiedenen Immersionsflüssigkeiten konnte gezeigt werden, dass sich ihr Abbauverhalten am Implantationsort nicht allein durch Lösungsprozesse im Serum erklären lässt, sondern eine komplexe Interaktion zwischen physiologischen Prozessen wie z. B. ein osteoklastischer Abbau stattfinden muss [81].

Dies steht in Gegensatz zur Stabilitätszunahme von Körpern aus HA, bei denen es in simuliertem Blutplasma und verschiedenen Geweben, durch Abscheidung einer Präzipitatschicht an der Oberfläche zu einer Steigerung von Gewicht und Zugfestigkeit um den Faktor 1,5 kam [80]. Es bildete sich durch Austausch von PO_4 durch CO_3 eine gleichmäßig dicke Schicht aus Typ-B-Carbonat-HA, die kompakter als der porösere CPC ist. Hierbei spielt offenbar das Lagerungsgewebe und die Liegedauer keine Rolle [23, 80]. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich aus CPC gebildeter HA unter in vivo Bedingungen allein durch den Kontakt mit physiologischen Flüssigkeiten nicht auflöst und sich möglicherweise eine Verstärkung des Interfaces zwischen Zement und Knochen durch die Ablagerung ergibt [80]. Eine Auflösung von HA ist lediglich durch zellvermittelte Resorption möglich [56].

2.3.2 Biokompatibilität

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass CPC in vielen Anwendungsbereichen besser abschneiden als andere Werkstoffe, und eine gute Biokompatibilität im Bezug auf Hart- und Weichgewebe aufweisen. Entscheidend hierfür ist, dass ihre Ausgangszusammensetzung fast ausschließlich aus

körperähnlichen Calcium-Phosphat-Salzen besteht und ihre Abbauprodukte keine körperfremden, pathogenen Produkte hervorbringen. Darüber hinaus verhalten sich HA-Zemente pH-Wert neutral [14] [39]. Im Gegensatz dazu stehen die Brushit-Zemente, da diese pH-Werte von $< 4,2$ zur Bildung benötigen, sowie bei der späteren Degradation Säure abgeben, könnten sie eventuell primär eine Gewebereaktion auslösen. Die Biokompatibilität von Brushit-Zementen konnte allerdings in verschiedenen in vitro und in vivo Studien nachgewiesen werden [82]. Ebenso konnte für die bei der Reaktion anderer CPC-Systeme resultierende pH-Wert-Abweichung keine zellschädigende Wirkung nachgewiesen werden [17, 43]. Des Weiteren konnte klinisch nachgewiesen werden, dass sich CPC osteokonduktiv verhalten [83] und TTCP-DCPA-Zement ohne Volumenverlust durch Knochen ersetzt wird [15, 84].

Vorraussetzung für eine gute Osseointegration ist ein guter Kontakt zwischen Implantat und Knochen. Hierbei zeigt sich der Vorteil der freien Formbarkeit von CPC im Vergleich zu vorgefertigten Materialien in Gestalt von Zylindern, Keilen oder Granulat. Diese ermöglichen nur eine verminderte Kontaktfläche und führen zu einem geringeren Knocheneinbau mit dem Risiko der Instabilität sowie Ausbildung einer Pseudoarthrose [10]. Die freie Formbarkeit der applizierbaren Zementpaste führt zu einer guten Anpassung an die Defektmorphologie mit mikroskopischer Anbindung an die Defektoberfläche, die die Bildung von Bindegewebe am Knochen-Implantat-Interface reduziert [42]. Der so entstehende enge Kontakt von Knochen und Zement fördert die Umwandlung des CPC in Knochen. Bei in vitro Studien zur Eignung von CPC als Wurzel-Kanal-Füller zeigte sich ein Einwachsen von HA-Kristalliten in mikroskopische Kanalwandspalten. In vivo wurde eine fast perfekte Anpassung der Zemente an die Zahnstruktur nach dreimonatiger Liegedauer belegt [85, 86].

2.3.3 Resorbierbarkeit

Im Gegensatz zu höherkristallinen HA-Keramiken, die schwer oder gar nicht resorbierbar sind [1, 3, 34, 87], können HA-Zemente in vivo umgeformt werden [88]. Eine Erklärung für das bessere Resorptionsverhalten von Zementen gegenüber Keramiken gleicher Basisverbindung kann durch die Beschaffenheit

des mikrostrukturellen Gefüges gegeben werden. Bei der keramischen Hochtemperaturesinterung werden Kristallite von 1-5 μm Durchmesser fest miteinander verbunden was in einer Oberfläche von $< 1 \text{ m}^2/\text{g}$ resultiert. Bei der Abbindereaktion von Zementen wird hingegen ein mikroporöses Netzwerk aus sich verfilzenden Kristalliten im Submikrometer-Bereich gebildet. Hierbei resultiert zum einen eine größere Oberfläche von bis zu $100 \text{ m}^2/\text{g}$, die für Lösungsvorgänge zur Verfügung steht und zum anderen Mikropartikel, die eine phagozytierbare Größe aufweisen und während der Lösungsvorgänge durch die geringere innere Festigkeit leichter freigesetzt werden können [21]. Somit können Osteoklasten das Implantat mit der Zeit resorbieren. Die Zementoberfläche von für drei Monate im menschlichen Körper implantierten Proben war im Vergleich zu kürzer implantierten Proben deutlich verändert. Es zeigten sich viele $10 \mu\text{m}$ große runde Vertiefungen und Erosionen auf der Oberfläche, die möglicherweise Orte der osteoklastischen Interaktion mit dem Gewebe sind [41].

Im Gegensatz zu HA-Keramiken stehen Keramiken aus TCP, deren zu schneller Abbau zu starken entzündlichen Reaktionen bzw. bindegewebiger Einscheidung des eingebrachten Materials mit mangelnder Knochenneubildung in der Folge führt [3]. β -TCP wird aufgrund seiner Porosität im Knochengewebe nach acht Wochen durchwachsen und resorbiert, α -TCP zeigt einen noch schnelleren Abbau. Die Platzhaltefunktion von TCP ist somit durch die mangelnde Volumenbeständigkeit nicht ausreichend gewährleistet [45]. Ein weiterer Nachteil von TCP ist die Ablagerung von TCP-Partikeln in den Lymphknoten.

Der aus äquimolarer Mischung von TTCP und DCPA gebildete HA wird ohne Volumenverlust oder Schädigung des lokalen Gewebes osteoklastisch resorbiert und von Knochengewebe ersetzt [14, 15]. Er weist eine dem körpereigenen Apatit ähnlich niedrige Kristallinität auf, was zu einem resorptiven Verhalten der Osteoklasten führt, das normalerweise gegenüber körpereigenem Knochen gezeigt wird [41]. Da HA nur unter stark sauren Bedingungen gut löslich ist, kann dieser in vivo nur von Osteoklasten oder anderen säurebildenden Zellen abgebaut werden. In physiologischen Flüssigkeiten wie Speichel, Liquor cerebrospinalis oder Blut herrscht hingegen ein neutrales Milieu, das keine Auflösung ermöglicht. Des Weiteren sind diese Flüssigkeiten in Hinsicht auf HA übersättigt [14]. Im

Gegensatz hierzu erweist sich Brushit-Zement unter physiologischen Bedingungen löslich und degradiert unter Abgabe von Säure. Es konnte gezeigt werden, dass die alleinige Gegenwart von Blutserum nicht ausreichend für eine vollständige Auflösung ist, und vermutlich enzymatische und zelluläre Aktivitäten für die Umsetzung zu knocheneigenem HA nötig sind [81].

2.3.4 Anwendungsbereich

Neuere CPC bieten sich zur Rekonstruktion im kraniofazialen Bereich z. B. von ausgeräumten Knochen- bzw. Schädelhöhlen, zwischen Knochentransplantaten oder zur alleinigen Wiederherstellung kleinerer Defekte an [78]. Weiterhin können Defekte aufgrund von Zysten, Wurzelspitzenresektion (WSR) oder Konturdefiziten aufgefüllt werden. In der HNO kommen Zemente zur Fixation von Hörelektroden zum Einsatz [78]. Die Maximale Defektgröße zur Versorgung mit CPC wurde auf 5 cm Durchmesser oder 25 cm² Kontaktfläche begrenzt [78, 89]. Da CPC im formbaren Zustand durch Flüssigkeiten ausgewaschen werden können, ist eine extreme Trockenlegung des Op-Gebietes notwendig [78]. Es konnte gezeigt werden, dass TTCP-DCPA-Zement zur Rekonstruktion humaner Knochendefekte von Schädelbasis und Schläfenbein universell einsetzbar ist [90], und nach Liegezeiten von zwei Jahren in subokzipitalen Cranioectomie-Defekten die Unversehrtheit des Schädelknochens wieder hergestellt wurde. Hierbei verringerten sich die postoperativen Komplikationen. Weitere erfolgreiche Anwendungen wie z. B. an Mittelohr [86], Schädelbasis und Gesichtsknochen sind in der Literatur bekannt [14]. Einzige Kontraindikation für die Anwendung des Werkstoffes ist eine bereits existierende Infektion am Anwendungsort.

Untersuchungen von CPC als Beschichtungsmaterial für Metallimplantate erbrachten eine, im Vergleich zu reinen Metallimplantaten, erhöhte Knochenreaktion, sowie eine leichte Erhöhung der Verbundfestigkeit von Knochen und Implantat [37]. Unterschiede in der Degradierbarkeit und im Verbund mit dem Knochen konnten beobachtet werden. Der Haupteffekt von HA-Beschichtungen von Metallimplantaten liegt in der Reduktion der Zeitspanne, in der das Implantat nicht belastbar ist. Der Anstieg der Scherfestigkeiten auch nach drei Monaten legt eine längere Knochenheilung von fünf oder mehr Monaten nahe [37].

2.4 Funktionelle Zusätze

Funktionelle Zusätze können die Eigenschaften von CPC modifizieren, sowie neue Eigenschaften hinzufügen. So kann, wie oben in Kapitel 2.2.2 beschrieben, der Abbindevorgang durch Zugabe von Alkaliphosphaten bzw. Phosphorsäure für Apatit-Zemente beschleunigt [55, 61, 62] oder durch Zugabe von Pyrophosphaten, Sulfaten oder Citraten (bei Bruschi-Zementen) verzögert [64] werden. Ebenso kann die Viskosität der CPC-Paste, die z. B. als Wurzelfüller unter Verwendung einer Spritze mit stumpfer Kanüle appliziert wurde [91], modifiziert werden. Natrium-Phosphate in der flüssigen Phase erlauben ein Abbinden ohne Temperaturzunahme, bei minimaler pH-Wert-Änderung [7]. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von CPC könnte ihre Nutzung als Träger von medizinischen Wirkstoffen darstellen, die den Wirkstoff kontrolliert freisetzen und sich danach auflösen. Wachstumsfaktoren fördern die Bildung von Osteoblasten und somit den knöchernen Umbau. Bei Gebrauch von CPC mit biofunktionellen oder modifizierenden Zusätzen ist das Wissen über die Freisetzungskinetik der biologisch wirksamen Stoffe und die resultierenden Materialeigenschaften des Zements von größter Bedeutung. Eine Übersicht über einige Zementmodifikationen und den daraus resultierende Änderungen der Zementeigenschaften sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Übersichtstabelle einiger Zementmodifikationen und den daraus resultierenden Änderungen der Zementeigenschaften [92].

Zementzusammensetzung	Additive	Eigenschaften	Referenz
TTCP/TCPA	Na / P	Effektiver Abbindebeschleuniger mit weiter Verbreitung in Zementformulierungen	[61]
α -TCP + 2% HA Mineralisationskeime	In situ Polymerisationssystem aus Acrylamid/Ammonium Polyacrylaten	Bildung eines ionisch kreuzgebundenen Materials	[93]
MCPM / CaO / DCPD / Ca(OH) ₂	Phosphoryliertes Chitosan	Steigerung der CS, Verlängerung der Abbindezeit	[94]
β -TCP / H ₃ PO ₄	Sulfat-, Pyrophosphat, und Citrationen	Abbindeverzögerer für Bruschi bildende Zemente, teilweise Inhibierung der Reaktion bei HA-Zementen	[64, 95]
α -TCP / TTCP / TCPA	Citrat, Acetat, Lactat	Abbindeverzögerer, leichte Verbesserung der Injizierbarkeit und Festigkeit	[96-99]
α -TCP	Gelatine	Steigerung der CS und Bildung von Makroporen mit 20-100 μ m Durchmesser	[100]
β -TCP / HA	Hydroxypropylmethyl Zellulose	Verbesserte Injizierbarkeit, Verhindert Filtrationsprozesse durch Steigerung der Viskosität	[101]
TTCP / DCPA	Manitol Kristalle	Bildung von Makroporen nach Durchsickern von Kristalliten	[102]
α -TCP	Natriumdodecylphosphat	Bildung von Makroporen durch Luftblasenzutritt	[103]
TTCP / DCPA	Na-Citrat	Verflüssiger für injizierbare Zemente	[20]
α -TCP + 2% HA	Verschiedene organische und anorganische Additive wie z. B. Aggar, Gelatine, Casein, Alginat, Natriumdodecylsulfat, Glutradialdehyd	Abbindeinhibitor mit Carbonaten, Pyrophosphaten und Magnesiumionen; erhebliche Verlangsamung der Abbinde Reaktion mit organischen Additiven	[104]

2.4.1 Zeta-Potential

Das Zetapotential der Partikeloberfläche erlaubt die Einordnung der elektrostatischen Stabilisierung eines Partikels in flüssigen Medien. Je nach Ladung ergeben sich durch elektrostatische Wechselwirkung unterschiedlich starke Abstoßungs- oder Anziehungskräfte, die die Agglomeration, Adsorption oder die rheologischen Eigenschaften von Pulversuspensionen erklären. Die Änderung der Oberflächenladung suspendierter Zementpartikel nach Zugabe von Additiven kann veränderte Materialeigenschaften wie die Reaktivitätsänderung von Zementedukten und des mikrostrukturellen Aufbaus der daraus resultierenden Zemente erklären. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass sich durch Beimengung von Gentamycin zu einer Mischung aus TTCP und DCPA eine starke Änderung der Zetapotentiale der Ausgangsstoffe bei gleichzeitiger Verflüssigung der Zementpaste ergaben [48]. Die veränderte Mikrostruktur des abgebundenen Zements wird darauf zurückgeführt, dass die höhere elektrostatische Abstoßungskraft von HA für die Änderung der Morphologie des sich bildenden Setzproduktes verantwortlich ist. Die Größe und Dauer der gemessenen Änderungen der Oberflächenladung von Partikeln können sowohl Informationen über den Ionenaustausch zwischen Oberfläche und Hydrathülle der Partikel, als auch über die Präzipitation von neuem Material liefern [48].

Zetapotentiale wurden auch dazu benutzt die Adsorption von Proteinen an HA zu untersuchen [48]. Sie spielen eine große Rolle bei der Interaktion von Medikamenten mit verschiedenen Materialien. Dies gilt insbesondere für die Freisetzungskinetik von Medikamenten [48], sowie die rheologischen Eigenschaften der Zementpasten während des Abbindeprozesses. Bei der Bestimmung der Zetapotentiale von Proteinen ist zu beachten, dass sich die Oberflächenladung nicht aus der im Regelfall bekannten AS-Sequenz und den einzelnen Oberflächenladungseigenschaften ihrer AS ableiten lässt, da sich durch ihre dreidimensionale Struktur nicht alle Gruppen an der Oberfläche befinden, und gleichermaßen an der Bildung des Zetapotentials beteiligen. Für die Bildung der Oberflächenladung von Proteinen spielt also die Ionisation der außen liegenden AS eine primäre Rolle [105]. Da die dreidimensionale Struktur von Proteinen vom

pH-Wert der Umgebung beeinflusst werden kann, ist das Zetapotential von Proteinen vom pH-Wert des Mediums abhängig.

2.4.2 Kohäsion

Ein Problem bei der klinischen Verwendung von CPC stellt die mangelhafte Kohäsion der unreaktierten Zementpaste in einer flüssigen Umgebung dar. In der Praxis zeigte sich, dass es bei nicht optimal erreichbarer Trockenlegung des Operationsgebietes zur Auswaschung der noch nicht abgebundenen Zementpaste durch Zutritt von Gewebeflüssigkeit kommt [42, 78]. Durch Einbringen von modifizierter Zellulose verbessert sich die Kohäsion und damit die Auswasch- sowie Infektionsresistenz des Zements [42, 83]. Eine der charakteristischsten Eigenschaften von Polysacchariden ist die Fähigkeit, je nach Polymerisationsgrad und Konformation, visköse Lösungen zu bilden [42]. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Carboxymethylcellulose (CMC), Alginat und Chitosan sind Derivate der Zellulose, dem am häufigsten vorkommendem Polysaccharid. Sie sind nicht toxisch, biokompatibel und kommen häufig in der Chirurgie, Pharmazie oder in biomedizinischen Applikationen zur Anwendung. Die Anwendung einer wässrigen Lösung mit 2-4 Gew.% von modifizierter Zellulose erbrachte eine deutliche Verkürzung der Zeit, die der CPC für die Ausbildung der Auswaschresistenz benötigt, ohne die Biokompatibilität oder andere Eigenschaften zu beeinträchtigen [42]. Anstelle von 25-30 min bei Mischung mit reinem Wasser war die Auswaschresistenz nach lediglich 2 min gegeben.

Allerdings können Polysaccharidzusätze auch negative Materialeigenschaften hervorrufen. So führt die Beimengung von HPMC oder CMC im Gegensatz zu Chitosan zu einer signifikanten Verlängerung der Abbindezeit von 30 auf 60 min. Eine Aushärtung erfolgt erst durch langsam einwärts diffundierendes Wasser [14]. Die Zugabe von phosphathaltigen Lösungen kann der verlängerten Abbindezeit durch Polysaccharide entgegenwirken [74], um akzeptable Abbindezeiten einzustellen. Die Zugabe von Chitosanlactat und Chitosanacetat hatte eine deutliche Verschlechterung der Zug- und Druck-Festigkeit zur Folge [42]. Alle Zemente mit und ohne Polysaccharidbeimengung wurden innerhalb von 24 h zu

HA umgewandelt [42], ohne dass sich Unterschiede im Ausmaß der HA-Konversion oder Kristallinität zeigten. Ebenso kann eine Steigerung der Kohäsion bzw. Viskosität auch Nachteile mit sich bringen, z.B. wenn der CPC im Zuge einer Vertebroplastie oder Wurzelkanalbehandlung durch eine Injektionskanüle appliziert werden soll. Untersuchungen zeigen, dass durch Zugabe von Natriumsalzen α -hydroxylierter Säuren wie Lactat, Malat, Tartrat und Citrat das Zetapotential der Zemente verändert. Hieraus ergaben sich deutliche Festigkeitssteigerungen von 38 MPa auf 99 MPa was darauf zurückgeführt wird, dass die Steigerung der Partikelabstoßung einen verminderten Flüssigkeitsbedarf für die Herstellung der Zementpaste bewirkt, wodurch Mikroporositäten, die durch das Volumen des Wassers gebildet werden, reduziert werden. Diese Reduktion an Porosität geht mit einer Steigerung der mechanischen Festigkeit einher [92].

2.4.3 CPC als Drug delivery Systeme

CPC wurden auf ihre Tauglichkeit als Trägersubstanz für Medikamente wie beispielsweise Antibiotika und deren kontrollierte Abgabe getestet. Im Gegensatz zu Polymethylmetacrylat (PMMA), das derzeit als Trägermaterial verwendet wird und chirurgisch wieder entfernt werden muss, ist CPC resorbierbar und benötigen somit keinen Zweiteingriff [24]. Verschiedene Antibiotika (Vancomycin, Amoxicillin, Gentamycin) wurden zu diesem Zweck auf ihre Wechselwirkungen mit TTCP-DCPA-Zement untersucht. Es ergaben sich z. T. nur leichte, aber, wie bei Gentamycin, auch gravierende Abweichungen der Zetapotentiale, mit mehr als verdoppelter Abbindezeit, Verflüssigung der Zementpaste, Abnahme der Druck- und Zugfestigkeiten und mikrostrukturelle Veränderungen der Zemente [48]. CPC wurde ebenfalls als „drug delivery system“ für Gentamycinsulfat (GS) vorgeschlagen [44]. GS wird normal über einen Zeitraum von 7-10 Tagen verschrieben, was eine kontrollierte Freisetzung des wirksamen Stoffes voraussetzt. Es weist einen positiven Einfluss auf die Materialeigenschaften von CPC auf und wird als voll wirksames Antibiotikum freigesetzt.

2.4.4 Funktionelle Proteine

In einigen Studien wurde die Kombinierbarkeit von CPC mit Wachstumsfaktoren bewiesen [106]. Durch ihre konstante Temperatur während der Applikation haben

sie den Vorteil funktionsfähige organische Moleküle sowie lebende Zellen inkorporieren zu können [32]. Proteinen wie bone sialoprotein (BSP), Dentinphosphophoryn (DPP), Osteocalcin (OC), Osteopontin (OPN), etc. wird eine regulierende Rolle bei der Mineralisation von Knochen und Dentin zugeschrieben [31, 107]. Allen gemeinsam ist ihr saurer Charakter mit Calcium und HA bindenden Eigenschaften. Dies lässt sich durch das gehäufte Vorkommen von Sequenzen saurer AS (Aspartat und Glutamat) erklären. Es wurde gezeigt, dass Poly-Glutamat im Gegensatz zu Poly-Aspartat oder Poly-Lysin die Bildung von HA induziert.

BSP induziert im Gegensatz zu Osteopontin die Bildung von HA [31, 107]. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass BSP ein ein- bis mehrfach vorkommendes Glutamatmotiv aufweist, das in Osteopontin nicht vorkommt. Das Kristallwachstum von HA erfolgt entlang der Kollagenachse, an die sich BSP längs anlagert. Osteocalcin besitzt ebenfalls einen hohen Gehalt an Glutamat, der für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen und HA verantwortlich ist [7]. Bei Zugabe von Osteocalcin kann es allerdings durch Inhibition der Kristallisation zur partiellen Bildung von nanokristallinen Partikeln kommen. Dies führt zu einem ungleichmäßigen Gefüge durch größere und kleinere Kristallite und somit zur Störung der Mikrostruktur mit Verringerung der Festigkeit [7]. Vermutlich führt eine Erhöhung der Osteocalcinkonzentration zur Bildung von einheitlichen Nanokristalliten, die mit einer besseren Festigkeit einhergeht. Osteocalcin ist ein interessanter Kandidat für das Zuschneiden der Mikrostruktur des Zementes und der Interaktion mit den Knochenzellen. Osteocalcin interagiert mit Kollagen, und bildet Komplexe mit Osteopontin [7].

Bei der Dentinbildung herrscht eine andere Proteinverteilung mit vermehrtem Vorkommen von DPP (150 kDa, 40% Asp., 50% Ser.) [31]. Da dieses Protein keine Polyglutamatsequenzen aufweist, wird vermutet, dass seine Wirkung auf die HA-Mineralisation über Serinsequenzen, welche einen hohen Grad an Phosphorylierung mit hoher negativer Ladungsdichte aufweisen, oder seine Aspartatsequenzen vermittelt wird [31].

Die Beimengung des homodimeren Proteins Transforming-Growth-Faktor- β_1 (TGF- β_1) zu CPC stimuliert nachweislich die Differenzierung von Praeosteoblasten zu Osteoblasten [32], steigert somit das Knochenwachstum, und beschleunigt die Zementdegradation [33]. Die Druckfestigkeit des beschriebenen Zements zeigte zunächst bessere Werte als die proteinfreier Mischungen. Über den Zeitraum von 24 h bis acht Wochen, nahm die zusätzliche Druckfestigkeit wieder ab [33]. Die Freisetzung von TGF- β_1 erfolgte zu 0,5% innerhalb der ersten vier Stunden und bis zu 1% nach 48 Stunden. In den folgenden acht Wochen konnte lediglich die zusätzliche Freisetzung von 0,1% TGF- β_1 nachgewiesen werden [33]. Die Freisetzungskinetik von TGF- β_1 zeigt, dass die Freisetzung an der Oberfläche [39] erfolgt. Die Dichte und Porosität ist hingegen irrelevant. Eine Fragmentstelle führt zur erneuten Freisetzung aus der neuen Oberfläche. Bei CP-Keramiken wurde gezeigt, dass TGF- β_1 adsorbiert und anschließend wieder eluiert wird [33].

Für Kollagen I Fasern, die mit CPC gemischt wurden, konnte eine Verbesserung der pastösen Eigenschaft beobachtet werden, was zu einer verbesserten Verarbeitbarkeit bei der Applikation führt [7]. Allerdings resultierte ebenso eine leichte Abnahme der Druckfestigkeit. Die Beobachtungen legen somit nahe, dass Proteine in mineralisierten Geweben auf vielfältige Weise Einfluss auf Bildung und Eigenschaften von HA nehmen können.

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Zemente

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden ein zweikomponentiger Zement aus TTCP und DCPA, sowie zwei einkomponentige Zemente aus mechanisch aktiviertem α -TCP bzw. β -TCP verwendet.

TTCP-DCPA-Zement

Zur Herstellung des TTCP-DCPA-Zement wurde kommerziell erhältliches DCPA (Mallinckrodt Baker No. 1430-07, Griesheim, Deutschland) in 96 %igem Ethanol für 24 h bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 250 U/min in einer Kugelmühle (PM400, Fa. Retsch, Haan) vermahlen. TTCP wurde gemäß Reaktionsformel (1) aus einer äquimolaren Mischung DCPA und Calciumcarbonat (Merck, Darmstadt, Deutschland) in Anlehnung an Brown et al. [40] durch achtzehnstündiges Erhitzen auf 1500 °C und anschließendes Abschrecken auf Zimmertemperatur in einem Exsikkator hergestellt. Anschließend wurde der TTCP-Sinterkuchen mit einem Mörser zerstoßen, durch ein 355 μ m Sieb gesiebt, in der Kugelmühle trocken auf eine mittlere Korngröße von etwa 15 μ m gemahlen und mittels Röntgendiffraktometrie (XRD) auf seine Reinheit überprüft. Die so erhaltenen Grundkomponenten wurden in einem äquimolaren Verhältnis aus 72,9 Gew.% TTCP und 27,1 Gew.% DCPA in einer Kugelmühle eine Stunde lang gemischt, 1.00 g einer Mischung aus Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und Natriumdihydrogen-phosphat (NaH_2PO_4) im Molaritätsverhältnis 2:1 zugegeben und anschließend trocken gelagert.

Mechanisch aktivierte TCP Zemente

Die Herstellung von α -/ β -TCP erfolgte durch Mischung von Calcium-Carbonat (1 mol) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und DCPA (2,15 mol) (Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland) mit 350 ml Isopropanol. Nach zweistündigem Rühren wurde die Suspension über eine Glasfritte (Porengröße 4) abfiltriert und anschließend in einem Vakuumtrockenschrank (Typ. VT 6060 M-BL, Heraeus

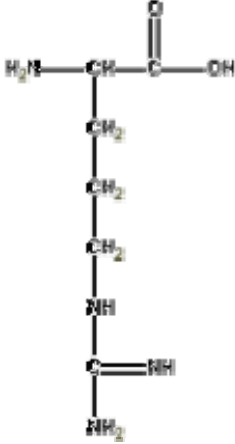
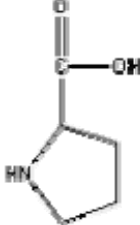
Instruments, Hanau, Deutschland) bei 60 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Sinterung von α -TCP erfolgte bei 1400 °C für 5 h und die von β -TCP bei 1050 °C für 24 h, wobei die Aufheizphase mit einer Temperatursteigerung von 15 °C/min durchgeführt wurde α -TCP wurde anschließend auf Zimmertemperatur abgeschreckt um die Bildung von β -TCP zu vermeiden. Die Mahlung erfolgte nach Zerkleinerung des Sinterkuchens mittels Mörser und Aussieben des Sinterguts durch ein Sieb der Maschengröße 355 μ m in einer Kugelmühle (PM400 Retsch, Deutschland) bei 250 U/min durch 200 Kugeln mit je 10 mm Durchmesser für 125 g Zement in 99 %igem Ethanol. α -TCP wurde für 1 h, β -TCP für 24 h bis zu einer Partikelgröße von 8 μ m bzw. 3 μ m gemahlen.

3.1.2 Flüssige Phase

Als flüssige Phase wurde Aqua ad iniectabilia für den TTCP-DCPA-Zement und eine 2,5 Gew.%ige Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung für α -/ β -TCP verwendet. Die Lösungen wurden jeweils mit einer bestimmten Menge an kommerziell erhältlicher Aminosäure oder Protein (Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) modifiziert und mit Hilfe eines Ultraschallbades (Sonore, Fa. Brandelin, Berlin, Deutschland) gelöst. Die verwendeten Zusätze sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Darstellung der verwendeten Zusätze in Form von Aminosäuren und Proteine

Zusatz	Strukturformel	Bestell-Nr.	Bemerkung	IP
Glycine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	G-7126	neutral	5,97
L-Alanine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	A-7469	neutral	6,0
L-Serine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	S-4311	neutral	5,68
L-Threonine	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	T-8625	neutral	5,64
L-Valin	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	V-0500	neutral	5,96
L-Aspartat	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	A-9256	sauer	2,77

Zusatz	Strukturformel	Bestell-Nr.	Bemerkung	IP
L-Arginine		A-8094	basisch	11,15
L-Proline		P-5607	heterocyclisch	6,3
Albumin, Bovine	-	A-4503	Initial fraction by cold alcohol precipitation	pH-Wert abhängig
Fibrinogen, Sheep	-	F-9754	Fraction 1	pH-Wert abhängig

3.1.3 Pastenformung

Die für einen Probenkörper benötigte Zementpulvermenge wurde mit einer digitalen Laborwaage (Genauigkeit 0,01 g, Fa. Sartorius, Göttingen) abgewogen, und mit Hilfe eines Plastiktrichters (65 mm x 22 mm) in einen puderfreien Fingerling (Fa. Suzuki Latex, USA) gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der benötigten Menge an flüssiger Phase mit einer Pipette (100 - 1000 µl, Genauigkeit ± 1 µl, Fa. Eppendorf, Hamburg). Die TTCP-DCPA-Mischung wurde mit Aqua ad injectabilia in einem Pulver-/Flüssigkeitsverhältnis vom 3,3 g/ml, α-/β-TCP im Verhältnis 2,4 g/ml mit Natrium-Phosphat-Lösung angemischt, wobei die flüssige Phase die jeweils angegebene Art und Menge an Zusatz (Angaben in Gew.%) enthielt.

Nach Verschluss des Fingerlings mit einer Klammer mit Hartgummibügelgreifbacken (Quick-Grip, Fa. McMaster-Carr, USA) wurde die Zementmasse für 15 s auf einem Vibrationsmischer (Maxi Mix II, Typ 37600, Fa. Thermodyne, Iowa, USA) angemischt, und danach gemäß der jeweiligen Messmethode weiter verwendet.

3.2 Charakterisierungsmethoden

3.2.1 Initiale Abbindezeit

Die Messung der initialen Abbindezeit erfolgte über den Gillmore-Nadel-Test gemäß ASTM-Norm [108]. Die Abbindezeit eines Zementes ist definiert durch die Zeitspanne zwischen Anmischen und Aushärtung. Die Aushärtung wird über eine Penetrationsmethode bestimmt. Die hierzu eingesetzte zylindrische Gillmore-Nadel G1 hat ein Gewicht von 113,389 g (1/4 pound), und einen Durchmesser von 2,117 mm (1/12 inch). Die Durchführung der Messung erfolgte in einer auf 37 ± 1 °C temperierten Feuchtigkeitskammer, bei einer Luftfeuchtigkeit von mehr als 90 %, um ein Verdampfen der flüssigen Phase des Zementes während der Abbindereaktion zu vermeiden. Zur Vermeidung von Kondenswasser an Gillmorenadel und Probenform wurden diese auf Temperaturen von 37 ± 1 °C beheizt. Der Zement gilt als abgebunden, wenn die Nadel nicht mehr in die Oberfläche eindringt. Die Beurteilung erfolgte optisch mit dem unbewaffneten Auge. Nach Beendigung der Messungen wurden die Eindrücke in die Zementoberfläche mit einer Lupe bei 5-10facher Vergrößerung nochmals beurteilt. Die feste und flüssige Phase wurde wie oben beschrieben gemischt, und anschließend in eine Edelstahlprobenform mit einer mittigen Bohrung von 12 x 3 mm eingebracht. Die Zementoberfläche wurde mit einer Glasplatte homogen flach abgestrichen und in der Feuchtigkeitskammer durch wiederholtes Absenken der Gillmore-Nadel im Intervall von 30 s auf die jeweilige initiale Abbindezeit hin untersucht.

3.2.2 Druck- und Zugfestigkeit

Zur Herstellung der Probenkörper wurde Zementpaste nach den oben genannten Spezifikationen und Verfahren angemischt. Hierbei kamen für die Druckkörper

0,8 g Zement mit 242 μl (TTCP-DCPA) bzw. 333 μl (α -/ β -TCP) flüssiger Phase, und für die Zugkörper 0,2 g Zement mit 60 μl (TTCP-DCPA) bzw. 83 μl (α -/ β -TCP) flüssiger Phase zur Anwendung. Für die Herstellung der Probenkörper wurden zylindrische Edelstahlprobenformen mit 19 mm Außendurchmesser und einer Länge von 37 mm verwendet, die eine mittige Bohrung mit Innendurchmesser von $6 \pm 0,013$ mm entlang der Längsachse aufweisen und auf einer Seite zur Vereinfachung der Zementapplikation die Form eines Trichters aufweisen. Von beiden Seiten können 16 mm bzw. 25,4 mm lange Metallstempel mit einem Durchmesser von $5,975 \pm 0.013$ mm eingebracht werden. Nach Anmischen und Einbringen des Zements in die Probenform wurde durch die Metallstempel für 10 s ein Vorverdichtungsdruck von 9 MPa mit Hilfe einer Zementverdichtungsapparatur appliziert. Anschließend wurden die so in die Probenformen eingebetteten Prüfkörper bei konstantem Druck von 0,7 MPa für eine Stunde in eine Feuchtigkeitskammer (Fa. GLF, Burgwedel, Deutschland oder gleichwertige) mit mehr als 90 % Luftfeuchtigkeit bei 37 ± 1 °C gelagert. Nach Ausbettung der Prüfkörper unter Zuhilfenahme einer Druckpresse erfolgte deren Lagerung für 23 h in einer gesättigten CP-Lösung in der oben genannten Feuchtigkeitskammer. Die Probenkörper wurden anschließend mittels einer Universal-Materialprüfmaschine 1445 (Fa. Zwick, Ulm) auf ihre Druck-/ und Zugfestigkeit geprüft. Die Messparameter sind in Tabelle 5 dargestellt. Nach Vermessung der Prüfkörperlänge auf $\pm 0,05$ mm mit einem digitalen Messschieber wurden die Druckprüfkörper aufrecht stehend zwischen zwei planen Edelstahlstempeln platziert. Die Zugprüfkörper wurden auf ihrer Mantelfläche liegend zwischen den Stempeln positioniert.

Tabelle 5: Druck-/Zugfestigkeit Messparameter

Parameter	Druck	Zug
Vorkraft	5 N	3 N
Vorkraftzeit	5 s	5 s
Kraft 1	5000 N	1000 N
Geschwindigkeit bis Kraft 1	1 mm/min	10 mm/min
Bruchabschaltsschwelle	60% von F-max	60 % von F-max

Die Druckfestigkeit (CS) wurde nach der Gleichung:

$$CS \text{ [MPa]} = F \text{ [N]} / r^2\pi \text{ [mm}^2\text{]}$$

die diametrale Zugfestigkeit (DTS) nach der Gleichung:

$$DTS \text{ [MPa]} = F \text{ [N]} / rd\pi \text{ [mm}^2\text{]}$$

berechnet, wobei F die Kraft bei Versagen des Prüfkörpers, r der Radius (3mm) und d die Höhe des Zylinders ist.

3.2.3 Zetapotential

Die Bestimmung der Partikelladung erfolgte mit einem Zetasizer (Zetasizer 3000, Fa. Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, Deutschland). Als flüssige Phase diente Reinstwasser (RW) mit 5 Gew.% Beimengung der jeweiligen Aminosäure bzw. 0,1 Gew.% Albumin oder 0,01 ‰ Fibrinogen, in welcher unter Zuhilfenahme eines Ultraschallbades (Sonore, Fa. Brandelin, Berlin, Deutschland) die jeweiligen Zement-Bestandteile suspendiert wurden. Die Zementkonzentration wurde zunächst anhand der Trübung abgeschätzt und später mit der kcps-/Fringemodell-Angabe des Messprogramms auf seine Verwendbarkeit/Messbarkeit überprüft. Hierbei liegen die Idealwerte laut Hersteller um 100-1000 kcps und die Werte für das Fringemodell bei $\pm 1/10^2$.

Am Anfang jedes Messtages wurde der Zetasizer mit einer Standardlösung mit einem definierten Potential von 50 +/- 5 mV auf seine Funktionstüchtigkeit überprüft. Zwischen jeder Messung wurde die Messkammer mit Reinstwasser gespült, und auf die Abwesenheit von Verunreinigungen vermessen. Die Probenflüssigkeiten sowie die Zwischenspülungen wurden mit einer Glasspritze in die Quarzkapillare (size flow cell) injiziert und bei 25,0 °C je mindestens zwanzig mal gemessen, wobei zwischenzeitlich die Proben erneut injiziert wurden. Die ermittelten Werte wurden an verschiedenen Tagen auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft.

3.2.4 pH-Wert Messung

Die pH-Wert-Bestimmung der Zetapotential-Suspensionen erfolgte direkt im Anschluss an die Zetapotentialmessung mit den für die Zetamessung verwendeten Suspensionen. Sie wurde mit einer kombinierten pH-Messelektrode (Mettler Delta 345, Fa. Mettler Toledo GmbH, Gießen) unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührgerät (Typ: Ica-Combimag-RCO, IKA Werke, Janke & Kumkel KG, Breisgau, Deutschland) durchgeführt. Die Eichung erfolgte mit Hilfe von drei unterschiedlichen Eichlösungen (pH-Werte: 7, 9, 11). Vor jeder Messung wurde die Elektrode mit destilliertem Wasser gereinigt.

3.2.5 Mikrostrukturelle Untersuchung

Die mikrostrukturelle Darstellung der Zementoberfläche erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop (DSM 940, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Zur Beurteilung wurden Fragmente der Druck- und Zugprüfungskörper herangezogen, die mit leitfähiger Masse auf einem Probenhalter fixiert und mit Gold bedampft wurden. Die Bruchflächen wurden mit 1000- bis 10000-facher Vergrößerung beurteilt. Hierfür wurden Beschleunigungsspannungen von 5-25 kV und ein Arbeitsabstand von 16-19 mm gewählt.

3.2.6 Infrarot-Spektrometrie

Die Zementproben wurden analog zu den Zug-/Druckprüfkörpern hergestellt und nach 24 h in einem Mörser unter Zuhilfenahme von aqua dest. pulverisiert. Anschließend erfolgte die Trocknung in einem Trockensterilisationsschrank (Modell 500, Fa. Memmert, Schwabach, Deutschland) bei 80 °C. Je 200 mg CPC Pulver wurde mit 80 mg KBr gemischt und zu transparenten Plättchen gepresst. Die Infrarot-Spektrometrie-Messungen (IR) erfolgten durch $n = 200$ Einzelmessungen zwischen 4000 und 400 cm^{-1} mit einer Auflösung von 2 cm^{-1} in einem IR-Spektrometer (System 320 FT-IR Spectrometer, Fa. Nicolet Instruments, Offenbach a. M., Deutschland). Anschließend wurden die restlichen Pulverproben auf Filterpapier mit Wasser gefiltert, im Trockensterilisationsschrank bei 80 °C erneut getrocknet und nochmals wie oben beschrieben vermessen.

3.2.7 Röntgendiffraktometrie

Die Phasenanalyse der Zemente wurde nach Abbindereaktion durchgeführt. Hierzu wurde dem unreaktierten Zement eine dem Mischungsverhältnis entsprechende Menge der Aminosäuren Glycin, L-Alanin, L-Serin, L-Threonin, L-Valin, L-Aspartat, L-Arginin, L-Prolin sowie der Proteine Albumin und Fibrinogen beigemischt und mit der wässrigen Phase zum Abbinde gebracht. Zur Phasenanalyse der abgebundenen Zemente wurden je 2 g Zement nach oben genannter Spezifikation auf einer Glasplatte angemischt und in einem geschlossenen Plastikgefäß für 22 h bei 37 °C gelagert. Nach anschließender Mahlung in einem Mörser mit Alkohol, wobei durch Wasserentzug eine Beendigung der Reaktion erreicht wird, wurde die Probe bei 80 °C für 24 h in einem Trockenschrank getrocknet. Die röntgendiffraktometrische Untersuchung erfolgte mit einem Diffraktometer (D5005, Fa. Siemens, Karlsruhe, Deutschland) bei folgenden Parametern:

Kathodenspannung:	40 kV
Kathodenstrom:	50 mA
Winkelbereich 2Θ :	20-40°
Schrittweite:	0,02°
Messgeschwindigkeit:	0,1 sec/stp

3.2.8 Bestimmung der Dichte

Die Probenkörper zur Dichteprüfung entsprechen denen der Zug- und Druckprüfkörper. Die Prüfkörper wurden mit einem digitalen Messschieber auf $\pm 0,05$ mm vermessen, und nach Trocknung mittels einer Feinwaage (Explorer, Ohaus GmbH, Giessen, Deutschland)) gewogen. Die Dichte (ρ) berechnet sich nach:

$$\rho = m / \pi (d / 2)^2 l$$

wobei m für die Masse, d für den Durchmesser und l für die Länge des Prüfkörpers steht. Die ermittelten Werte der Dichten wurden zur besseren Übersichtlichkeit in g/cm^3 umgerechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Initiale Abbindezeiten

Tabelle 6: Initiale Abbindezeiten des biphasischen TTCP-DCPA-Zementes.

FUNKTIONELLER ZUSATZ		INITIALE ABBINDEZEIT VON TTCP-DCPA-ZEMENT (n=3)
-		4 min
Glycin	10%	3 min
Glycin	20%	3 min
Alanin	10%	3 min
Alanin	20%	3 min
Serin	10%	5 min
Threonin	10%	7,5 min
Valin	10%	5 min
Aspartat	10%	übersättigt
Arginin	10%	9 min
Prolin	10%	4 min
Albumin	10%	9 min
Albumin	20%	5 min
Albumin	30%	4 min
Fibrinogen	10%	4 min
Fibrinogen	20%	3 min

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse der Gillmore-Nadel-Versuche für TTCP-DCPA-Zement. Sie wurden aus $n = 3$ ermittelt und als Mittelwerte dargestellt. Hierbei zeigten sich für TTCP-DCPA-Zement im Vergleich zum Reinzement ($ST_{\text{ohne Zusatz}} = 4 \text{ min}$) z. T. gleiche, leicht verkürzte aber auch unterschiedlich stark verlängerte Abbindezeiten. Eine leichte Verkürzung der Abbindezeiten um eine Minute ergab sich für Glycin und Alanin ($ST = 3 \text{ min}$). Keine Abweichung konnte bei Prolin festgestellt werden. In ansteigender Reihenfolge konnten für Serin ($ST = 5 \text{ min}$), Threonin ($ST = 7,5 \text{ min}$) und Arginin ($ST = 9 \text{ min}$) eine Verlängerung der Abbindezeiten beobachtet werden. Bei Variation der Konzentration einzelner AS-Zusätze zeigte sich keine Veränderung. Bei den Protein-Zusätzen zeigte Albumin 10% eine Verlängerung der Abbindezeit um mehr als das doppelte ($ST = 9 \text{ min}$) was bei Steigerung der Konzentration auf

30% wieder auf den Reinwert des Zements (ST = 4 min) zurückging. Bei Fibrinogen wurde hingegen mit steigender Konzentration eine Verkürzung der initialen Abbindezeiten von 4 min auf 3 min Minuten beobachtet.

In Tabelle 7 sind die Abbindezeiten der monophasischen Zemente α -TCP und β -TCP dargestellt. Für α -TCP (ST_{ohne Zusatz} = 4,5 min) zeigte sich bei Zugabe von Glycin, Serin, Threonin, Prolin, Albumin und Fibrinogen eine Verkürzung der initialen Abbindezeit um 0,5-2,5 min. Bei Alanin zeigte sich eine leichte Verlängerung. Eine deutliche Verlängerung wurde durch Arginin (ST = 18 min) erzielt. Valin 10% und Aspartat 10% konnten in der für α -/ β -TCP verwendeten Natrium-Phosphat-Lösung nicht vollständig gelöst werden.

Tabelle 7: Initiale Abbindezeiten der monophasischen Zemente aus mechanisch aktiviertem TCP.

FUNKTIONELLER ZUSATZ		INITIALE ABBINDEZEIT VON α -TCP (n=3)	INITIALE ABBINDEZEIT VON β -TCP (n=3)
-		4,5 min	2 min
Glycin	10%	2 min	2 min
Glycin	20%	2,5 min	2 min
Alanin	10%	5 min	2 min
Serin	10%	2,5 min	2 min
Threonin	10%	2,5 min	2 min
Valin	10%	übersättigt	übersättigt
Aspartat	10%	übersättigt	übersättigt
Arginin	10%	18 min	12 min
Prolin	10%	4 min	2 min
Albumin	10%	3,5 min	3 min
Albumin	20% *	3 min	3 min
Fibrinogen	10%	3 min	2 min

* **Albumin 20% wurde im Mischungsverhältnis 3,5 g/ml angerührt.**

Bei β -TCP (ST_{ohne Zusatz} = 2 min) konnten gleich lange Abbindezeiten für Glycin, Alanin, Serin Threonin, Prolin und Fibrinogen beobachtet werden. Albumin (ST = 3 min) zeigte eine leichte Verlängerung, Arginin (ST = 12 min) eine deutliche Verlängerung der initialen Abbindezeit. Bei den monophasischen TCP-Zementen zeigte sich keine konzentrationsabhängige Veränderung der initialen Abbindezeit.

Die Werte für Albumin 20% müssen wegen ihres höheren Mischungsverhältnisses von 3,5 g/ml kritisch betrachtet werden.

Bei der Durchführung der Gillmore-Nadel-Versuche zeigte sich in der Regel eine gut zu bewerkstellende Ausbettung der abgebundenen Zementproben aus der Edelstahlprobenform. Bei Albumin konnte jedoch bei allen Zementen schon während des Abbindevorgangs eine oberflächliche Zerklüftung beobachtet werden, die mit einem festeren Sitz in der Probenform und Zerbrechen bei Ausbetten einherging. Dieser Effekt wurde mit steigender Albuminkonzentration deutlicher.

4.2 Druck- und Zugfestigkeiten

Die Druck- und Zugfestigkeitswerte wurden jeweils durch $n = 5$ Messungen ermittelt, und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die Auswirkung der Zusatz-Konzentration auf die Zementfestigkeit wurde durch Variation einiger Zusatzkonzentrationen untersucht. Vielfach war jedoch keine Betrachtung möglich, da sich die Zusätze im untersuchten Konzentrationsintervall als nicht löslich erwiesen.

Reinphasiger TTCP-DCPA-Zement (Tabelle 8) zeigt eine Druckfestigkeit von 83 ± 10 MPa und eine Zugfestigkeit von $8 \pm 0,9$ MPa. Wurden Proteine zugesetzt, verringerten sich die Werte mit zunehmender Konzentration bis zu $55,6 \pm 2,4$ MPa bzw. $6,8 \pm 0,6$ MPa für Albumin (30%). Fibrinogen zeigt im Vergleich zu Albumin einen geringeren Festigkeitsverlust und liegt bei 10%iger Lösung noch im Bereich der Reinphase. Die DTS Werte verhalten sich analog. Die Zugabe von AS ergab teils unveränderte (Serin 5%, Prolin 10%), aber auch deutlich höhere Festigkeitswerte. So konnten für Valin, Arginin, Threonin, Serin, Alanin und Glycin höhere Druckfestigkeiten ermittelt werden. Die höchsten Werte lagen bei $133,4 \pm 4,2$ MPa für Glycin 20% oder $115,2 \pm 10,3$ MPa für Alanin 10%.

4 Ergebnisse

Tabelle 8: Ermittelte Festigkeitswerte für TTCP-DCPA-Zement mit Aqua ad injectabilia bei einem PL-Verhältnis von 3,3 g/ml

TTCP-DCPA			
ZUSATZ		DRUCKFESTIGKEIT (CS) [MPa]	ZUGFESTIGKEIT (DTS) [MPa]
-		83 ± 10	8 ± 0,9
Glycin	10%	107,8 ± 9,4	8,9 ± 0,3
Glycin	20%	133,4 ± 4,2	6,9 ± 1,2
Alanin	10%	115,2 ± 10,3	10,12 ± 1,8
Alanin	20%	übersättigt	übersättigt
Serin	10%	83,5 ± 5,2	10,3 ± 2,1
Threonin	10%	112,8 ± 5,5	7,5 ± 0,2
Valin	10%	93,1 ± 1,8	11,1 ± 1,3
Aspartat	10%	übersättigt	übersättigt
Arginin	10%	97,4 ± 10,9	8,7 ± 0,6
Prolin	10%	81,0 ± 3,3	11,9 ± 1,1
Albumin	10%	62,2 ± 10,5	8,4 ± 1,0
Albumin	20%	59,2 ± 6,6	7,0 ± 1,3
Albumin	30%	55,6 ± 2,4	6,8 ± 0,6
Fibrinogen	10%	83,86 ± 12,2	10,3 ± 2,1
Fibrinogen	20%	75,26 ± 6,9	8,9 ± 0,6

Tabelle 9: Druckfestigkeit von TTCP-DCPA-Zement nach Modifikation der flüssigen Phase mit unterschiedlichen Konzentrationen an Serin; PL-Verhältnis jeweils 3,3 g/ml

ZUSATZ		DRUCKFESTIGKEIT (CS) [MPa]
Serin	5%	82,2 ± 9,6
Serin	10%	83,5 ± 5,2
Serin	20%	86,6 ± 7,8
Serin	30%	90,12 ± 5,7
Serin	40%	115,1 ± 4,6

Bei Erhöhung der Konzentrationen einzelner AS konnte eine simultane Vergrößerung ihrer Auswirkung auf die CS-Werte verzeichnet werden. Dieser Effekt wurde zur Verdeutlichung für die CS-Werte von Serin (5-40 %ige Lösungen) genauer betrachtet (Tabelle 9). Im Vergleich zeigen die DTS Werte nach Zusatz höherer Aminosäure-Konzentrationen keine Proportionalität.

Tabelle 10: Ermittelte Festigkeitswerte für α -TCP-Zement bei einem PL-Verhältnis von 2,4 g/ml; als flüssige Phase wurde 2,5% Na_2HPO_4 -Lösung mit Zusatz verschiedener Aminosäuren bzw. Proteine verwendet

α -TCP			
ZUSATZ		DRUCKFESTIGKEIT (CS) [MPa]	ZUGFESTIGKEIT (DTS) [MPa]
-		64,1 ± 3,0	8,4 ± 1,3
Glycin	10%	30,2 ± 2,5	4,8 ± 0,6
Glycin	20%	44,2 ± 4,5	4,9 ± 0,9
Alanin	10%	54,9 ± 2,3	7,5 ± 0,9
Alanin	20%	übersättigt	übersättigt
Serin	10%	61,7 ± 6,7	6,5 ± 0,7
Threonin	10%	43,1 ± 2,8	6,6 ± 0,4
Valin	10%	übersättigt	übersättigt
Aspartat	10%	übersättigt	übersättigt
Arginin	10%	24,8 ± 3,3	4,3 ± 0,6
Prolin	10%	51,7 ± 5,5	7,2 ± 0,7
Albumin	10%	28,7 ± 0,5	6,0 ± 0,4
Albumin	20%	26,1 ± 3,9	6,3 ± 0,5
Fibrinogen	10%	41,0 ± 4,4	6,3 ± 0,4

In Tabelle 10 sind die DTS und CS von α -TCP dargestellt. Die Festigkeiten des Zements ohne Modifikation liegen bei $64,1 \pm 3$ MPa (CS) und $8,4 \pm 1,3$ MPa (DTS). Bei Zugabe von AS zeigte sich eine unterschiedlich starke Verringerung der CS-/DTS-Werte bis auf $24,8 \pm 3,3$ MPa bzw. $4,3 \pm 0,6$ MPa für Arginin 10%. Einzige Ausnahme ist Serin mit unveränderten Werten. Die durch AS hervorgerufenen Änderungen der CS- und DTS-Werte verhalten sich weitgehend kongruent. Bei Steigerung der Konzentration von Glycin zeigte sich für die DTS ebenfalls eine Steigerung, wobei die Werte insgesamt trotzdem geringer ausfallen als für den nicht modifizierten Zement. Bei Zugabe der Proteine zeigt sich ebenfalls eine Verringerung der Werte. Im Gegensatz zu den Zug-Werten, die ein einheitliches Niveau ergeben, zeigen die Druckwerte eine stärkere Abnahme für Albumin ($28,7 \pm 0,5$ MPa) als für Fibrinogen ($41,0 \pm 4,4$ MPa). Die Änderung der Konzentration von Albumin zeigt keinen Einfluss auf die Festigkeiten.

Tabelle 11: Ermittelte Festigkeitswerte für β -TCP-Zement bei einem PL-Verhältnis von 2,4 g/ml; als flüssige Phase wurde 2,5% Na_2HPO_4 Lösung mit Zusatz verschiedener Aminosäuren bzw. Proteine verwendet

β -TCP			
ZUSATZ		DRUCKFESTIGKEIT (CS) [MPa]	ZUGFESTIGKEIT (DTS) [MPa]
-		$51,8 \pm 4,1$	$6,0 \pm 1,4$
Glycin	10%	$35,0 \pm 1,5$	$4,8 \pm 1,1$
Glycin	20%	$51,1 \pm 6,3$	$5,96 \pm 1,22$
Alanin	10%	$44,9 \pm 8,1$	$5,6 \pm 1,0$
Alanin	20%	übersättigt	übersättigt
Serin	10%	$53,4 \pm 6,1$	$5,1 \pm 0,9$
Threonin	10%	$37,34 \pm 2,7$	$6,0 \pm 0,8$
Valin	10%	übersättigt	übersättigt
Aspartat	10%	übersättigt	übersättigt
Arginin	10%	$45,1 \pm 5,6$	$5,9 \pm 0,6$
Prolin	10%	$54,4 \pm 6,8$	$6,2 \pm 0,8$
Albumin	10%	$38,2 \pm 1,0$	$4,6 \pm 0,4$
Albumin	20%	$23,3 \pm 4,0$	$3,9 \pm 0,8$
Fibrinogen	10%	$36,1 \pm 4,8$	$4,5 \pm 1,0$

Die Werte für β -TCP sind in Tabelle 11 wiedergegeben. Der unmodifizierte Zement weist eine Druckfestigkeit von $51,8 \pm 4,1$ MPa und eine Zugfestigkeit von $6,0 \pm 1,4$ MPa auf. Tendenziell zeigen sich hier wie bei den α -TCP-Zementen geringere Festigkeiten nach Beimengung von AS und Proteinen. Bei den AS zeigen sich keine Veränderungen für Glycin 20%, Serin 10%, Prolin 10%. Für Glycin 10%, Alanin 10%, Threonin 10%, Arginin 10%, wurden geringere Werte bis $35,0 \pm 1,5$ MPa (CS) und 4,8 MPa (DTS) für Glycin 10% gemessen. Die Änderung der Konzentration bei einer AS (hier Glycin 10% und 20%) zeigt eine Abnahme der Festigkeit. Bei Zugabe von Proteinen zeigten sich ebenfalls niedrigere Festigkeitswerte bis zu $26,1 \pm 4,4$ MPa (CS) für Albumin 20%. Die Änderung der Proteinkonzentration erbrachte eine zusätzliche Festigkeitserniedrigung bei den CS-Werten. Die CS- und DTS-Werte verhalten sich weitgehend proportional zur Konzentration der Aminosäuren.

4.3 Zetapotentiale

Die Zetapotentiale wurden jeweils mindestens zwanzigmal gemessen und der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse (Tabelle 12) wurden mit jeweils neu angesetzten Lösungen auf ihre Richtigkeit überprüft. Alle ermittelten Zetapotentiale liegen im negativen Bereich zwischen $-3,0 \pm 1,1$ mV und $-35,1 \pm 1,1$ mV. Für α -/ β -TCP sowie TTCP-DCPA sind die Zetapotentiale mit Arginin am höchsten.

Tabelle 12: Ermittelte Zetapotentiale der Zemente in Aminosäure- und Proteinlösungen

Suspensions- medium	Zeta-Potential [mV]			
	α -TCP	β -TCP	DCPA	TTCP
Reinstwasser	$-17,4 \pm 1,3$	$-5,7 \pm 0,5$	$-18,8 \pm 0,5$	$-11,6 \pm 1,6$
Glycin	$-23,9 \pm 2,3$	$-19,6 \pm 0,7$	$-23,5 \pm 0,6$	$-17,5 \pm 0,9$
Alanin	$-16,2 \pm 1,0$	$-4,4 \pm 0,7$	$-23,1 \pm 1,3$	$-5,8 \pm 1,3$
Serin	$-21,7 \pm 0,9$	$-5,0 \pm 0,9$	$-20,8 \pm 0,9$	$-7,9 \pm 1,6$
Threonin	$-20,6 \pm 0,9$	$-3,9 \pm 0,4$	$-21,0 \pm 0,4$	$-4,6 \pm 0,4$
Valin	$-12,8 \pm 1,4$	$-3,3 \pm 0,7$	$-20,8 \pm 0,7$	$-5,0 \pm 1,1$
Aspartat	$-7,4 \pm 1,2$	$-15,3 \pm 1,4$	$-10,5 \pm 1,3$	$-4,7 \pm 0,9$
Arginin	$-29,4 \pm 1,1$	$-23,3 \pm 0,8$	$-24,1 \pm 1,1$	$-35,1 \pm 1,1$
Prolin	$-14,1 \pm 1,3$	$-3,0 \pm 0,5$	$-17,8 \pm 0,9$	$-13,6 \pm 2,5$
Albumin	$-25,0 \pm 0,8$	$-21,7 \pm 0,6$	$-21,4 \pm 0,4$	$-26,9 \pm 1,3$
Fibrinogen	$-23,5 \pm 0,7$	$-21,4 \pm 1,0$	$-23,4 \pm 1,1$	$-17,1 \pm 1,2$

4.4 pH Werte

Die pH-Werte der Zetapotential-Suspensionen sind in Tabelle 13 dargestellt. Sie liegen im Bereich von pH 4,6 (DCPA mit Aspartat) bis pH 9,49 (β -TCP mit Arginin). Alle pH-Werte sind im basischen Bereich, bezogen auf den IP der jeweiligen AS. Somit liegen die Carboxyl-Gruppen freier AS hier in deprotonierter Form vor.

Tabelle 13: pH-Werte der Zetapotentialmesslösungen

Zusatz (IP)	pH-Wert nach Zusatz von				
	rw	α -TCP	β -TCP	DCPA	TTCP
Glycin (5,97)	5,98	8,08	8,3	7,5	8,3
Alanin (6,00)	7,1	7,77	7,90	7,38	8,06
Serin (5,68)	7,61	7,28	7,4	6,95	7,59
Threonin (5,64)	6,6	7,92	8,04	8,05	8,06
Valin (5,96)	6,5	7,7	7,9	7,53	8,35
Aspartat (2,77)	3,0	5,93	6,2	4,6	6,35
Arginin (11,15)	9,49	9,44	9,49	9,5	9,48
Prolin (6,3)	6,5	8,83	8,88	7,75	9,15
Albumin (*)	5,3	7,8	7,9	6,8	8,43
Fibrinogen (*)	8,31	9,27	9,36	9,51	8,03

* Werte nicht ermittelbar

4.5 Mikrostruktur

Die mikrostrukturelle Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskop wurde für TTCP-DCPA-Zemente mit 10%iger Alanin-, Albumin-, Fibrinogen-, Glycin-, und Serin-Lösung, sowie 20%iger Glycin-Lösung durchgeführt. Mit Zusatz von Alanin (Abbildung 1) zeigt sich eine grob strukturierte Bruchfläche mit aufgelagert erscheinenden Zementpartikeln (1-2 μ m Durchmesser). Des Weiteren können durchgängig Mikroporositäten von ca. 1 μ m Durchmesser, sowie zahlreiche Mikrorisse beobachtet werden. Bei 10000facher Vergrößerung (Abbildung 2) ist die Feinstruktur des Zements als schroffe aber verbundene Oberfläche zu sehen.

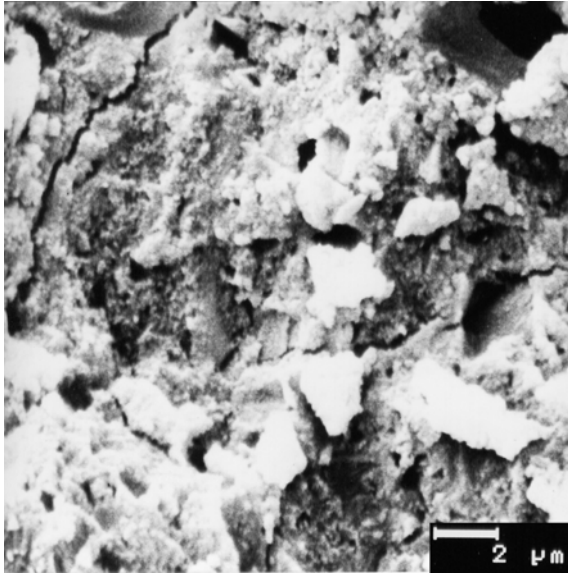


Abbildung 1: TTCP-DCPA-Zement mit Alanin 10%, 15kV, 17mm, 5000x

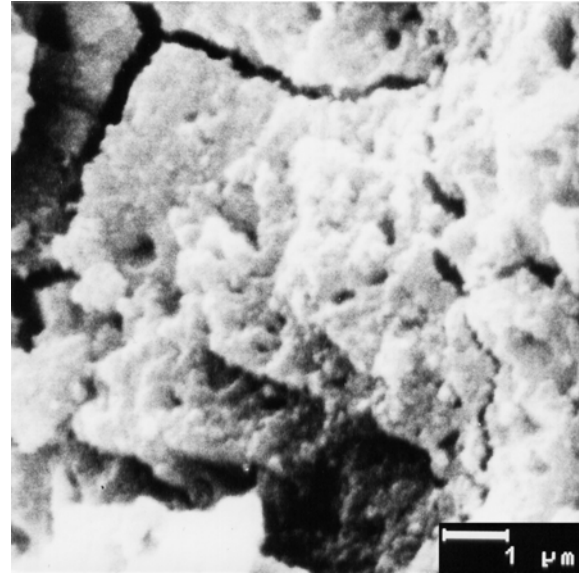


Abbildung 2: TTCP-DCPA-Zement mit Alanin 10%, 20kV, 17mm, 10000x

Die Zugabe von 10%iger Albumin-Lösung zeigt schon bei geringer Vergrößerung das Vorkommen von großen bis zu 10 µm langen und 4 µm breiten Rissen im Gefüge (Abbildung 3). Bei weiterer Vergrößerung werden Mikroporositäten von 5 – 2 µm Durchmesser deutlich sichtbar. Die Feinstruktur in Abbildung 4 weist eine filigrane, kristalline Struktur aus einzelnen nadelförmigen ca. ½ µm großen Kristalliten auf.

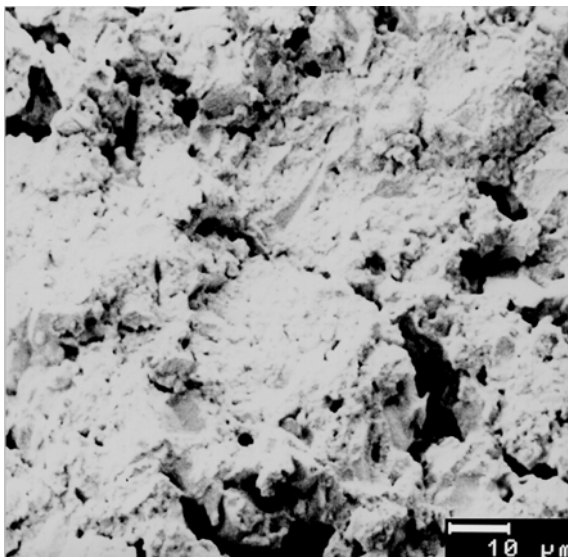


Abbildung 3: TTCP-DCPA-Zement mit Albumin 20%, 15kV, 16mm, 1000x

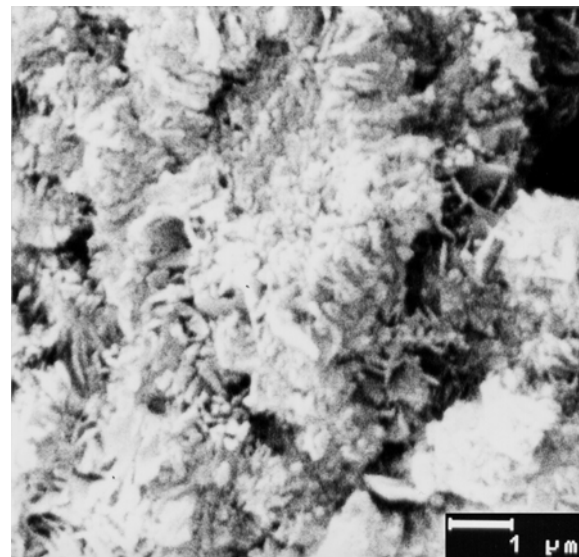


Abbildung 4: TTCP-DCPA-Zement mit Albumin 20%, 20kV, 16mm, 10000x

Die Modifikation mit 10 %iger Fibrinogen-Lösung erzeugt eine in sich verbunden wirkende Oberfläche mit körnigen Arealen. Bei mittlerer bis hoher Vergrößerung (Abbildung 5) zeigten sich kleine mikroporenfreie Bereiche die klar von den porösen Arealen abgrenzbar sind. Insgesamt kann eine vergleichsweise hohe Anzahl an 1 -2 μm großen Mikroporen festgestellt werden, die einen schwammartigen Eindruck aufweisen. In kleineren planen Bereichen sind bei 10000facher Vergrößerung Mikrorisse zu erkennen (Abbildung 6).

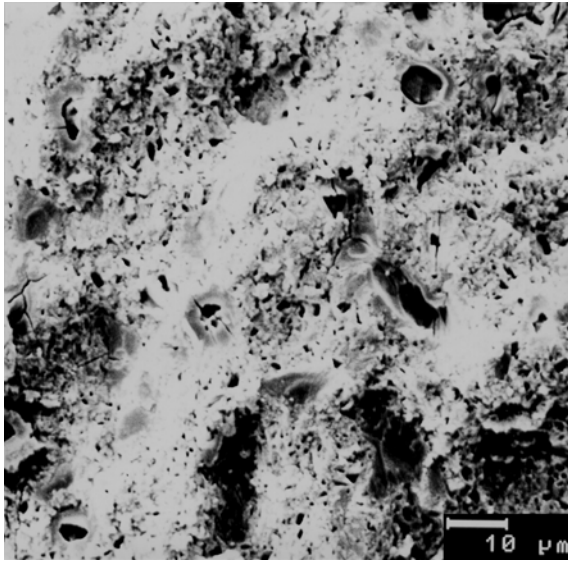


Abbildung 5: TTCP-DCPA-Zement mit Fibrinogen 10%, 10kV, 16mm, 1000x

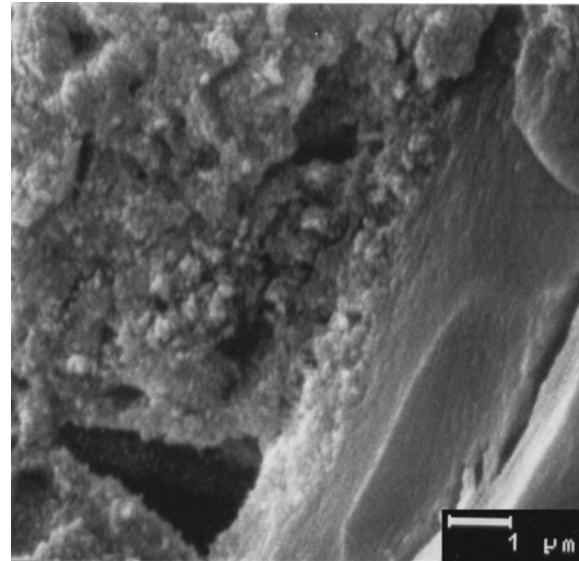


Abbildung 6: TTCP-DCPA-Zement mit Fibrinogen 10%, 20kV, 16mm, 10000x

Mit 10%iger Glycin-Lösung (Abbildung 7 bis Abbildung 9) treten bei 1000facher Vergrößerung Areale mit glattem bzw. porösem Erscheinungsbild auf, wobei die mittlere Porengröße um 2 μm liegt. Des Weiteren zeigten sich Risse von 1 μm Breite, die sich über lange Strecken fortsetzen und sowohl durch die glatten als auch die porösen Areale ziehen. Die Feinstruktur bei 10000facher Vergrößerung weist eine korallenähnliche, nadelförmige Struktur mit Kristalliten von weniger als $\frac{1}{4}$ μm Größe auf (Abbildung 9).

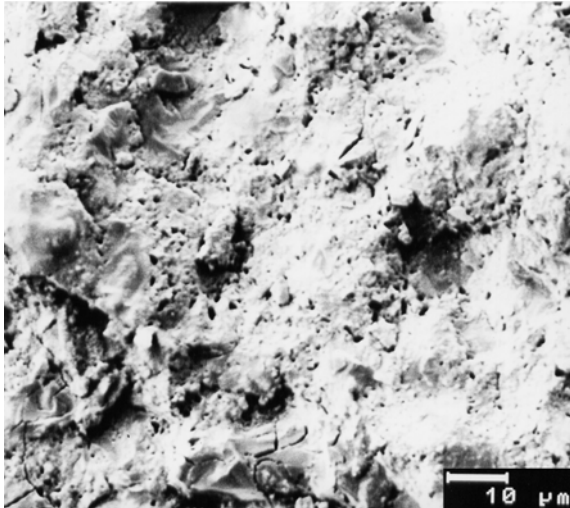


Abbildung 7: TTCP-DCPA-Zement mit Glycin
10%, 5kV, 19mm, 1000x

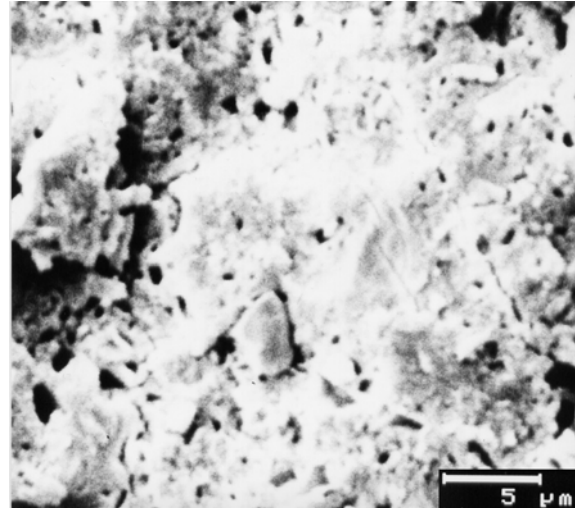


Abbildung 8: TTCP-DCPA-Zement mit Glycin
10%, 10kV, 19mm, 3000x

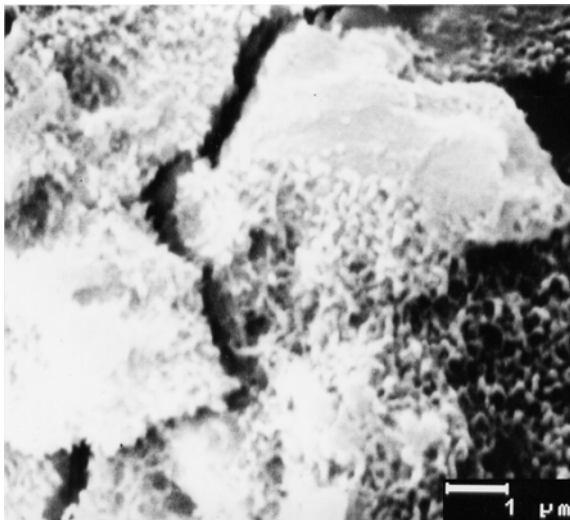


Abbildung 9: TTCP-DCPA-Zement mit Glycin
10%, 20kV, 19mm, 10000x

20%ige Glycin-Lösung (Abbildung 10 bis Abbildung 12) verursacht ähnlich wie 10%ige Glycin-Lösung die Bildung von Bereichen mit teils mehr und teils weniger stark ausgeprägt löchrigem Erscheinungsbild. Es kommen auch hier Risse vor, die durch beide Bereiche ziehen. Bei zunehmender Vergrößerung zeigt sich für die 20%ige Lösung allerdings eine körnchenartige Oberfläche mit blumenkohlähnlicher Struktur. Die einzelnen Verbundkörnchen weisen einen Durchmesser von ca. $\frac{1}{4}$ - 1 µm auf.

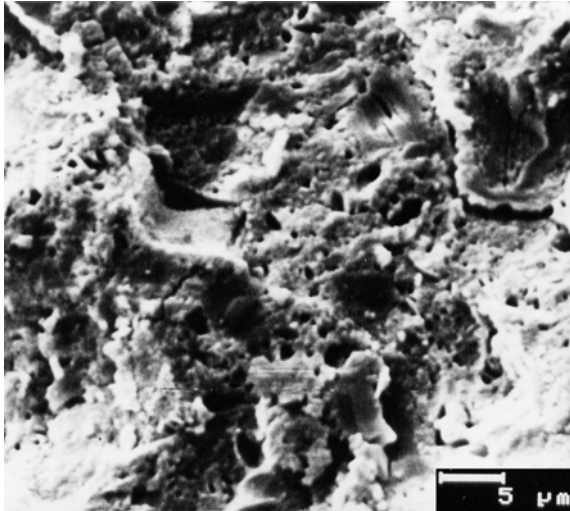


Abbildung 10: TTCP-DCPA-Zement mit Glycin
20%, 10kV, 18mm, 2000x

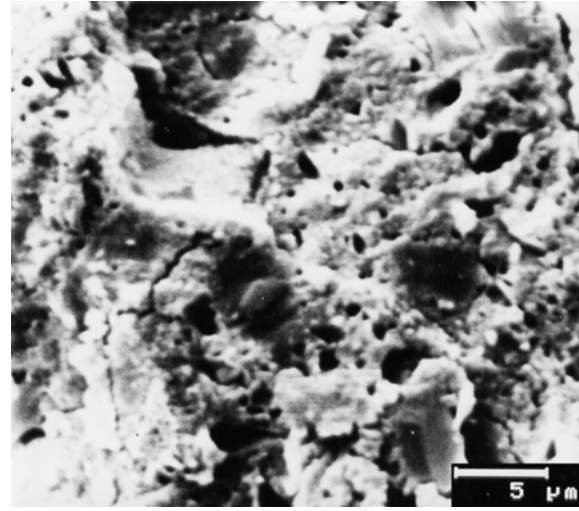


Abbildung 11: TTCP-DCPA-Zement mit Glycin
20%, 10kV, 18mm, 3000x

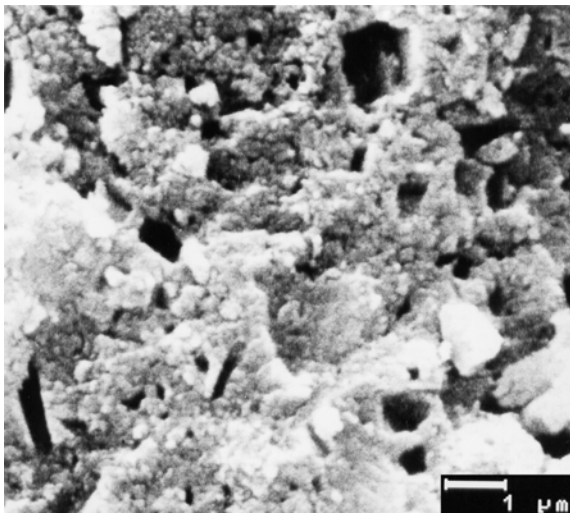


Abbildung 12: TTCP-DCPA-Zement mit Glycin
20%, 25kV, 18mm, 10000x

TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Serin-Lösung (Abbildung 13 bis Abbildung 15) weist eine sehr kompakt wirkende porenarme Feinstruktur auf. Die verbleibenden Poren haben einen Durchmesser von 1 – 2 µm. Bei starker Vergrößerung zeigt sich die Oberfläche partiell glatt und schollenartig bzw. blumenkohlähnlich mit vereinzelt Mikrorissen. Insgesamt erweist sich der Zement als wesentlich geschlossener und kompakter.

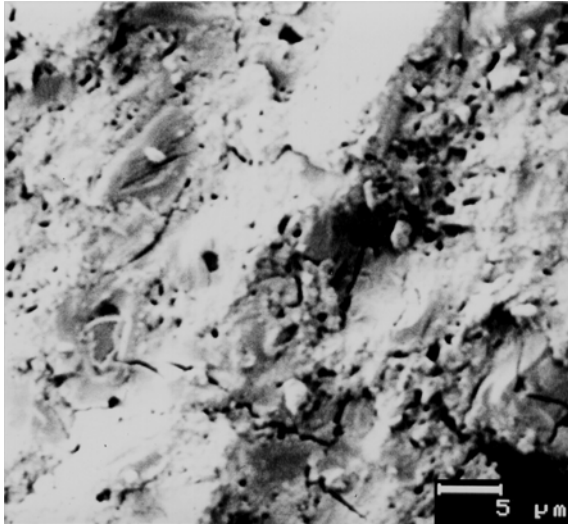


Abbildung 13: TTCP-DCPA-Zement mit Serin 10%, 5kV, 16mm, 2000x

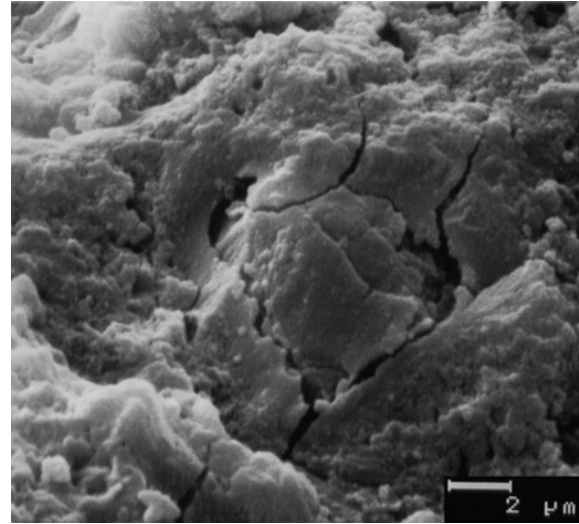


Abbildung 14: TTCP-DCPA-Zement mit Serin 10%, 20kV, 16mm, 5000x

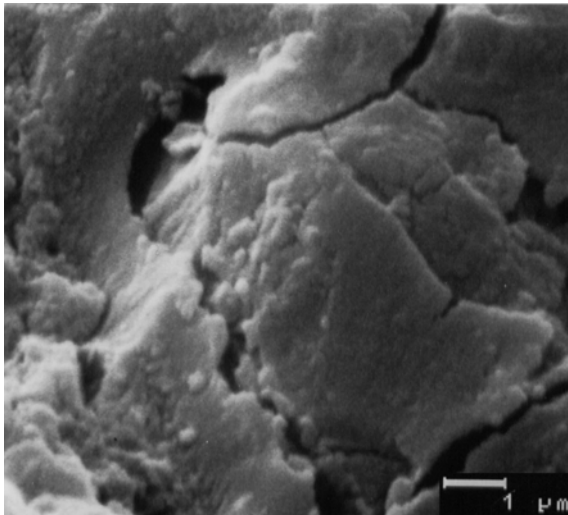


Abbildung 15: TTCP-DCPA-Zement mit Serin 10%, 20kV, 16mm, 10000x

4.6 Infrarotspektroskopie

Die IR-Analysen wurden für abgebundenen TTCP-DCPA-Zement mit Zusatz von 10%iger Albumin-Lösung, 10%iger Glycin-Lösung und 10%iger Serin-Lösung durchgeführt. In Abbildung 16 bis Abbildung 18 sind die IR-Messergebnisse im Wellenzahlbereich von $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ gegen die Transmission aufgetragen, wobei jeweils die abgebundenen Zementproben (24 h) vor und nach Filterung mit aqua destillata in einem Wellendiagramm gegenübergestellt sind.

Eine Erniedrigung der Transmission im Bereich oberhalb von 1500 cm^{-1} lässt sich über das Vorhandensein von Valenzschwingungen erklären, im Bereich darunter über das Vorhandensein von Deformationsschwingungen. Die für die hier angestellte Betrachtung wichtigsten Gruppenwerte sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Gruppenspezifische Transmissionsschwächung im Bezug auf die Wellenzahl (cm^{-1})

Gruppe	Wellenzahlbereich in cm^{-1}
O-H	3450 cm^{-1}
C-H	3000 cm^{-1}
N-H, CO_2	2400 cm^{-1}
C=O	1600 cm^{-1}
P=O / PO_4	1200 cm^{-1}
O-P-O	600 cm^{-1}

In Abbildung 16 sind die Infrarot-Spektrogramme von TTCP-DCPA-Zement mit Zusatz von 10%iger Albumin-Lösung dargestellt. Die gewaschene Probe zeigt im Vergleich zur Probe direkt nach Aushärtung im Bereich der OH-Banden (3450 cm^{-1}) eine größere Extinktion. Bei den CH- und NH-Banden ist eine deutliche Zunahme der Transmission nach Filterung zu erkennen. Die restlichen Banden zwischen 1400 cm^{-1} und 500 cm^{-1} lassen sich zum größten Teil auf Phosphat-Schwingungen zurückführen.

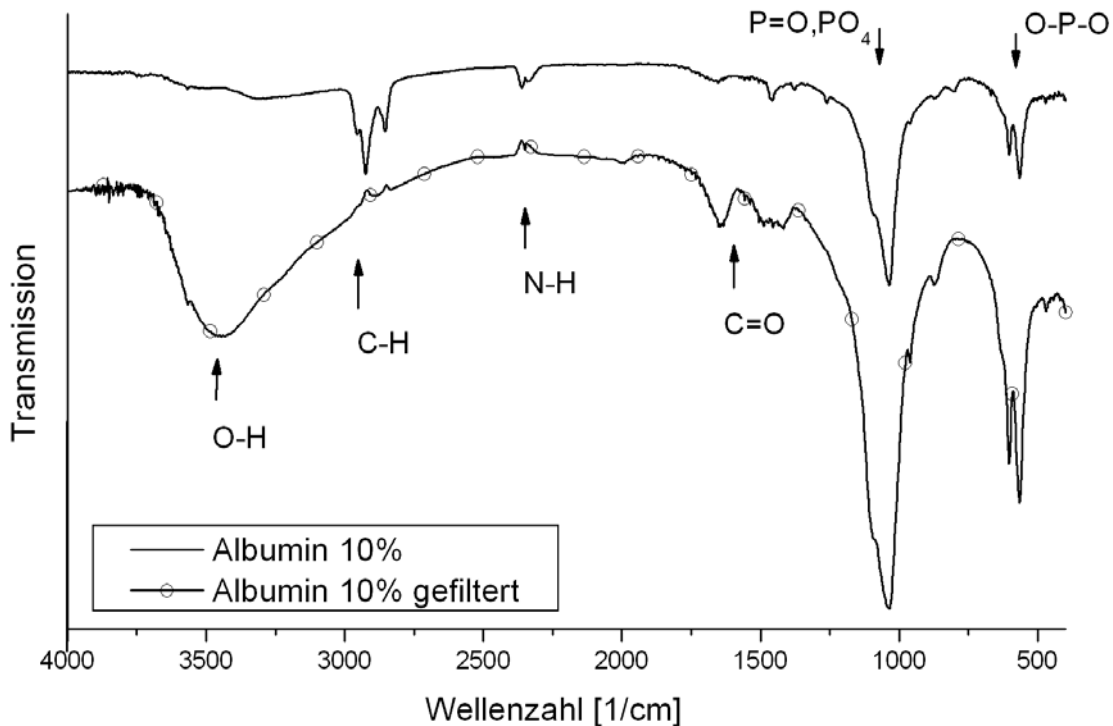


Abbildung 16: IR-Spektrogramme von abgebundenem TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Albumin-Lösung vor und nach Waschen mit aqua destillata.

Die in Abbildung 17 und Abbildung 18 dargestellten IR-Spektrogramme von TTCP-DCPA-Zement mit Zusatz von 10%iger Glycin- und Serin-Lösung zeigen im Bereich der OH-Banden eine relativ gleichmäßige Extinktion. Die CH-Bande weist lediglich für gefilterten TTCP-DCPA-Zement mit Zusatz von 10%iger Glycin-Lösung eine leichte Abweichung in Form einer erhöhten Extinktion auf. Die restlichen Banden weisen eine gute Übereinstimmung ohne durch Waschen bedingte Abweichungen ihrer Transmission auf.

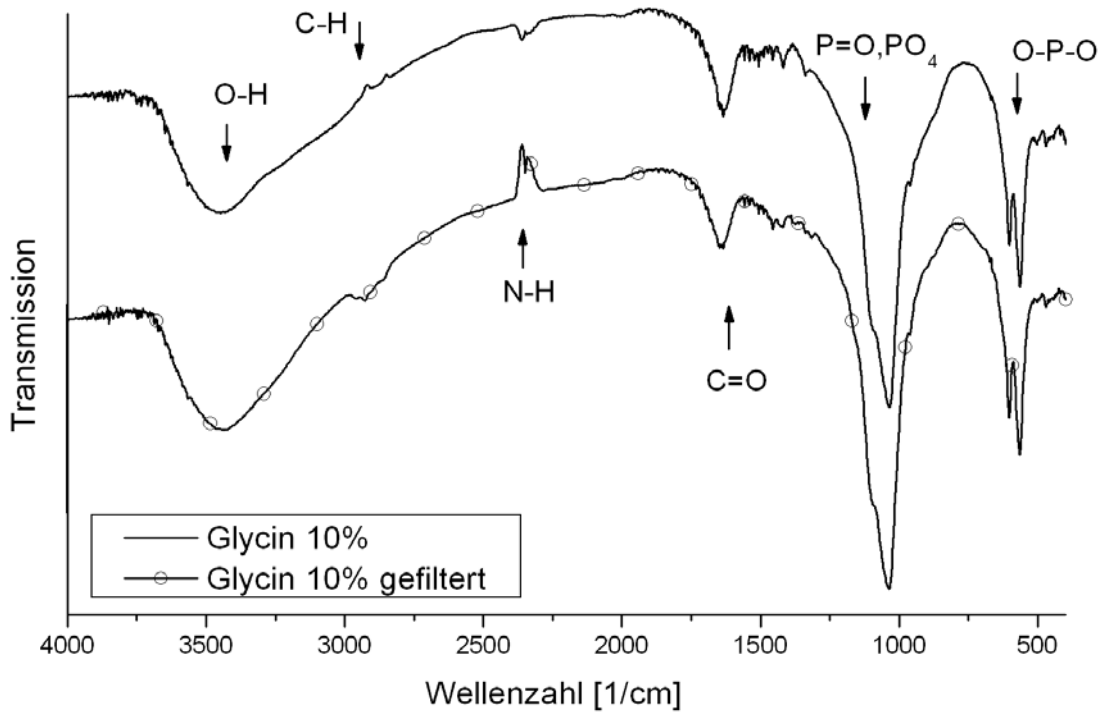


Abbildung 17: IR-Spektrogramm von abgebundenem TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Glycin-Lösung vor und nach Waschen mit aqua destillata.

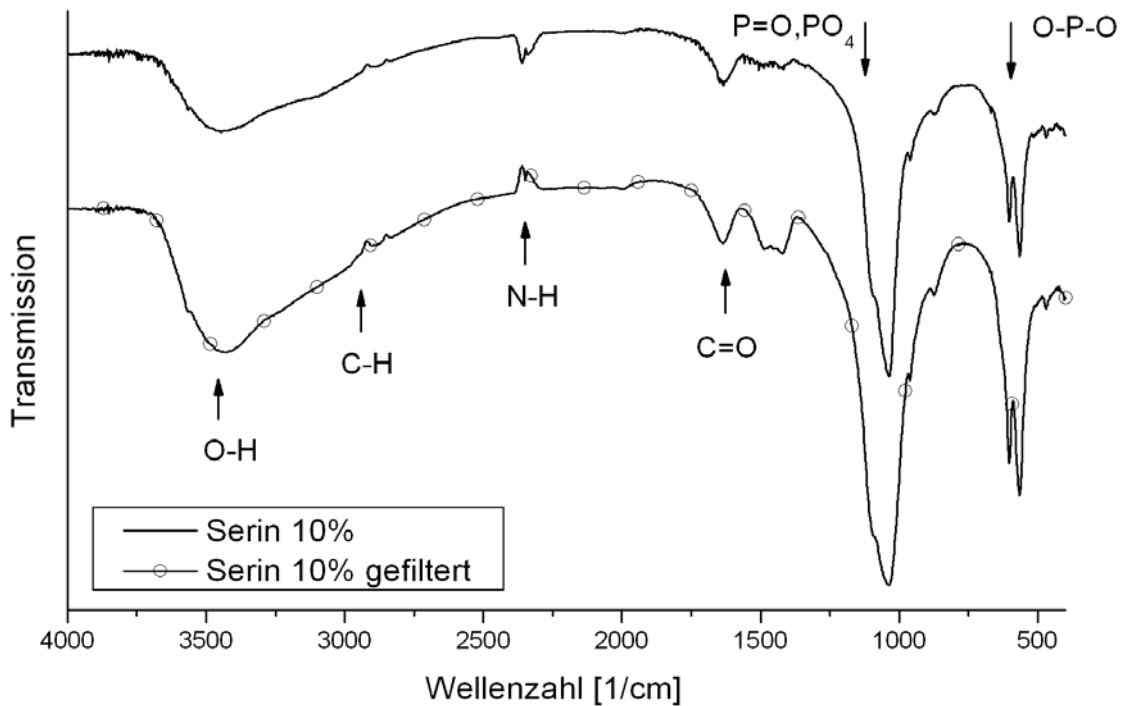


Abbildung 18: IR-Spektrogramm von abgebundenem TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Serin-Lösung vor und nach Waschen mit aqua destillata.

4.7 Phasenanalyse durch Röntgendiffraktometrie

Die Phasenanalyse durch XRD wurde für TTCP-DCPA-Zemente mit Zusatz von Albumin (10%), Glycin (10% und 20%) und Serin (10%) nach dem Abbindeprozess durchgeführt. In Abbildung 19 sind die Röntgendiffraktogramme der abgebundenen Zemente dargestellt. Die charakteristischen Beugungsreflexe für den reinphasigen TTCP-DCPA-Zement sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Analyse der reagierten Zemente zeigt durchgängig das gleiche Beugungsmuster, welches durch TTCP und kristallines HA hervorgerufen wird. Weitere Reflexe wie beispielsweise die von DCPA und AS sind nicht nachweisbar.

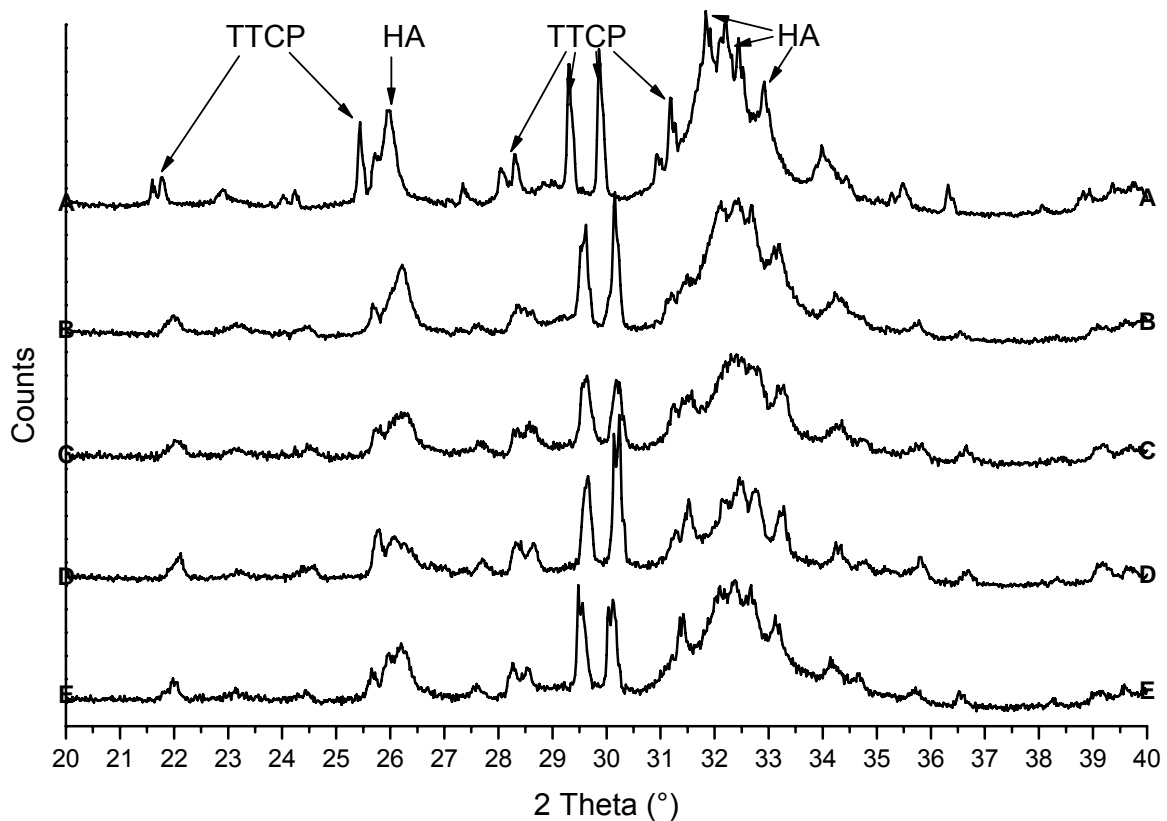


Abbildung 19: XRD-Analyse von TTCP-DCPA-Zementen nach der Abbindereaktion. (A) TTCP-DCPA-Zement ohne Zusatz, (B) TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Albumin-Lösung, (C) TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Glycin-Lösung, (D) TTCP-DCPA-Zement mit 20%iger Glycin-Lösung, (E) TTCP-DCPA-Zement mit 10%iger Serin-Lösung

4.8 Dichte

Die Bestimmung der Zementdichten erfolgte für Alanin (10%), Albumin (10%), Glycin (10% und 20%) sowie Serin (10%). Jeweils drei Prüfkörper wurden in Analogie zur Druck- und Zugprobenherstellung angefertigt und vermessen. Die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Zementdichten sind in Tabelle 15 dargestellt. Sie liegen zwischen $2,045 \pm 0,007$ (Albumin 10%) und $2,122 \pm 0,009$ g/mm (Glycin 20%).

Tabelle 15: Zementdichten der untersuchten Zementmischungen

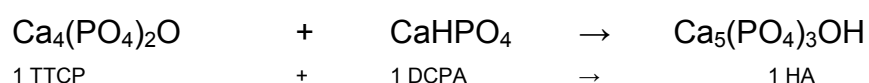
ZUSATZ		DICHTE \pm STANDARDABW. [g/cm ³]
Alanin	10%	$2,077 \pm 0,028$
Albumin	10%	$2,046 \pm 0,007$
Glycin	10%	$2,068 \pm 0,008$
Glycin	20%	$2,101 \pm 0,038$
Serin	10%	$2,058 \pm 0,012$

5 Diskussion

Zementeigenschaften, beispielsweise Abbindezeit, mechanische Festigkeit, Umsetzungsrate, und Dichte sind für Calciumphosphat-Zemente durch Modifikation mit Additiven einstellbar [1, 14, 20, 33]. Anforderung an alle Zusätze ist eine hohe Biokompatibilität zur Vermeidung von Abwehrreaktionen oder Schädigung des Organismus durch toxische oder kanzerogene Stoffe. Die im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Zusatzstoffe in Form einzelner Proteine und Aminosäuren kommen dieser Forderung als körpereigene Grundbausteine nach und verfügen sowohl über Biokompatibilität als auch Bioreaktivität [109]. Ziel der Arbeit war es, aufzuklären, ob und auf welche Weise einzelne Aminosäuren und Proteine Einfluss auf physikalische und chemische Eigenschaften von CPC im Hinblick auf ihre klinische Verwendbarkeit nehmen. Entsprechende Modifikationen sind bisher nicht literaturbekannt. Veröffentlichte Arbeiten beschränkten sich auf die Wechselwirkung von körpereigenen Knochenmatrixproteinen (BMP), deren Teilabschnitte, AS-Sequenzen sowie Tertiärstrukturen auf die physikalisch-chemischen Eigenschaften von CPC sowie die CaP-Mineralisation und gehen nur am Rande auf die Wechselwirkung von Aminosäuren mit der Zementmatrix ein [31, 107]. Zementwerkstoffe waren zwei einkomponentige Pulver aus mechanisch aktiviertem α - bzw. β -Tricalciumphosphat, die nach Zusatz einer wässrigen Phase zu nanokristallinem, calciumarmen Hydroxylapatit abbinden:



Alternativ wurde ebenfalls eine zweikomponentige Pulvermischung aus basischem Tetracalciumphosphat und saurem Calciumhydrogenphosphat verwendet.



Die repräsentative Auswahl der Aminosäuren setzt sich aus neutralen, sauren und heterocyclischen AS zusammen. Die Proteine Albumin und Fibrinogen wurden als Modellproteine gewählt, da sie während des Operationsablaufs am Zielort im Knochen in großer Menge vorkommen. Die Zemente wurden mit den in der flüssigen Phase gelösten AS und Proteinen zur Reaktion gebracht, und die Auswirkung auf Abbindezeit, Druck- und Zugfestigkeit, sowie auf die Partikelladung ermittelt. Die Konzentration der Zusätze wurde in einzelnen Fällen variiert um konzentrationsabhängige Veränderungen der Materialeigenschaften aufzuzeigen. Bei auffälligen Veränderungen der Materialeigenschaften wurden die Proben zur Ursachenbestimmung einer Phasenanalyse durch IR-Spektrometrie und XRD-Analyse unterzogen, sowie die Dichte der hierbei resultierenden Zemente bestimmt.

5.1 Abbindezeiten

Die Ermittlung der initialen Abbindezeiten erfolgte nach der Gillmore-Nadel-Methode in Anlehnung an die ASTM-Norm [108] , da sie als standardisiertes Verfahren in der Mehrzahl der vorliegenden Calcium-Phosphat-Zement-Studien zur Ermittlung der Abbindezeiten herangezogen wurde und durch die geringe Anzahl an frei wählbaren Messparametern eine gute Vergleichbarkeit der hier ermittelten Ergebnisse ermöglicht. Die optische Beurteilung der Eindringtiefe der Gillmore-Nadel stellt allerdings eine stark subjektive Komponente dar, die einen qualitativen Vergleich der Ergebnisse zwischen verschiedenen Anwendern einschränkt. Als objektivere Methoden sind Ultraschallverfahren sowie AC-Impedanz-Spektroskopie in der Literatur beschrieben. Beide Verfahren sind jedoch kostenintensiv und aufwändig und wurden deshalb zugunsten der Gillmore-Methode verworfen.

Die Abbindezeit eines Zements spielt für den Operationsablauf sowie das Handling eine wichtige Rolle. Eine lange Abbindephase verzögert den zügigen Operationsablauf durch eine Wartephase, und führt infolge zu einer verlängerten Narkosezeit mit erhöhten Risiken für den Patienten. Eine zu kurze Abbindezeit kann dazu führen, dass die Zementpaste nicht rechtzeitig in die Kavität

eingebraucht werden kann und somit strukturelle Schwachstellen resultieren bzw. eine Applikation unmöglich wird. Den hier verwendeten Zementen (TTCP-DCPA, α -TCP, β -TCP) wurde in fester oder flüssiger Form Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und/oder Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4) als Abbindebeschleuniger zugegeben um klinisch akzeptable Abbindezeiten im Bereich 5-10 min einzustellen. Eine Modifikation mit Aminosäuren oder Proteinen ergab in dieser Arbeit überwiegend nur geringe Änderungen der Abbindezeit um +/- 1 min, was aufgrund des Messverfahrens vernachlässigbar ist und für den klinischen Gebrauch keine Rolle spielt. Die größte Veränderung der Abbindezeit wurde mit Arginin als Zusatz, unabhängig von der Art der Zementmatrix, festgestellt. So verlängerte die Anwesenheit von Arginin (10%) die Abbindezeit bei α -TCP um 13,5 min, bei β -TCP um 10 min und bei TTCP-DCPA Zement um 5 min. Albumin (10%) verlängerte die Abbindezeit bei TTCP-DCPA um 5 min, zeigte bei den restlichen CPC aber keine relevanten Zeiteffekte. Threonin 10% verursachte eine Verlängerung der Abbindezeit bei TTCP-DCPA um 3,5 min und eine Verkürzung bei α -TCP um 2 min. Weitere Verkürzungen konnten für α -TCP durch Glycin 10-20%, Serin 10%, Albumin 10% und Fibrinogen 10% festgestellt werden. Die Variation der AS-Konzentrationen einiger Proben zeigte bei den monophasischen TCP-Zementen keine oder nur geringe ($\leq 0,5$ min) Veränderung der Abbindezeit. Bei TTCP-DCPA wurde für die Modifikation mit Aminosäuren keine Konzentrationsabhängigkeit der Effekte beobachtet. Für die Proteinzusätze Albumin und Fibrinogen konnte bei TTCP-DCPA-Zementen hingegen gezeigt werden, dass die Verlängerung der initialen Abbindezeit mit steigender Konzentration des Zusatzes wieder abnimmt.

Erklärbar wird der Effekt von Arginin auf die Abbindezeit der Zemente durch die Struktur der Verbindung. Arginin weist als einzige im Rahmen dieser Arbeit verwendete AS eine zweite Aminogruppe auf, reagiert basisch im wässrigen Milieu und führt zu einer Aufladung der Zementpartikel in wässriger Phase. Offensichtlich führt der basische Charakter von Arginin zu einer verlangsamten Lösungskinetik der Zementedukte, was auf die im basischen Bereich geringere Löslichkeit von Calcium-Phosphat-Salzen zurückgeführt werden kann. Ähnliche Effekte wurden auch für Citrate bzw. Citronensäure beobachtet [20, 99]. Aufgrund

des niedrigen pH-Wertes der Säure (pH 1,32) werden hier die CaP-Partikel im Zement während der initialen Abbindereaktion schnell bis zum Verbrauch der kompletten Säure gelöst, wodurch die Konzentration an Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen in der Lösung drastisch erhöht wird. Dies geht einher mit einer für die Bildung von HA vorteilhaften Erhöhung der CaP-Sättigung [110]. Dieser Effekt ist allerdings nicht auf alle organischen Säuren übertragbar, da Acetat beispielsweise keinen vergleichbaren Effekt aufweist [99].

5.2 Festigkeit

Die mechanische Stabilität ausgehärteter CPC beruht auf der dreidimensionalen Verfilzung des Zementprodukts; als festigkeitsbeeinflussende Parameter wurden in der Vergangenheit die Porosität der Zementmatrix und der Umsetzungsgrad erkannt. Die Festigkeitswerte von Zementen sind von großer Bedeutung für die klinische Verwendbarkeit von CPC, da sie unter anderem die Eignung für eine Verwendung in lasttragenden Bereichen determinieren. Hierbei ist die Stabilität der Knochenkortikalis von 90–209 MPa [77] als Orientierungsgröße zu beachten. Die von CPC erreichten und in der Literatur beschriebenen Festigkeiten von 20–83 MPa [54] ermöglichen derzeit lediglich den Einsatz im gering belasteten Bereich ohne zusätzliche Verstärkung mittels Plattenosteosynthese [3]. Eine Erhöhung der DTS und CS würde zu einer Verbesserung der Zementeigenschaften führen, und die Indikationsbreite für die Anwendung von CPC erweitern.

Die Herstellung der hier verwendeten Festigkeitsprüfkörper in einer von L.C. CHOW 2000 vorgeschlagenen Apparatur folgte einem standardisierten Verfahren durch definierte Verdichtung der Zementpaste [54]. Allerdings wurde der Zementanmischvorgang in abgeänderter Form durchgeführt, um die Anmischzeit für die hier verwendeten, schnell abbindenden Zemente zu verkürzen und eine ausreichende Durchmischung von flüssiger und fester Phase zu gewährleisten. Durch dieses Verfahren können viele der bis dato variabel gehandhabten Messparameter vereinheitlicht und durch Verminderung von Beschädigungen der Probenkörper zuverlässigere Ergebnisse erzielt werden. Negativ fiel auf, dass

durch gelegentlich auftretendes Verkeilen der Metallstempel in der Edelstahlprobenform eine unbekannte Größe mitspielen kann, die zu verminderten Festigkeitswerten durch geringere Vorverdichtung bzw. Beschädigung der Prüfkörper beim Ausbetten führt. Die anschließende Festigkeitsprüfung mittels Universal-Materialprüfmaschine ist als Standardverfahren in Gebrauch und wurde mit in der Literatur beschriebenen Verfahren [54] und den dabei üblichen Messparametern durchgeführt.

Bei der Beurteilung der Festigkeitsergebnisse muss beachtet werden, dass durch die Vorkomprimierung der Prüfkörper während der Herstellung eine Porositätsreduktion durch Abpressen von Flüssigkeit resultiert. Dies führt zu höheren Festigkeiten als es bei der einfachen Applikation von Zementpaste in einem Defekt möglich ist. Dieser Effekt wirkt sich bei den Druckprüfkörpern aufgrund ihrer größeren Höhe stärker aus als bei Zugprüfkörpern.

Für die monophasischen TCP-Zemente konnte durch Zusatz der hier verwendeten AS keine Verbesserung der Druck- und Zug-Festigkeit erzielt werden, da neben einigen unveränderten Ergebnissen die Mehrzahl der Werte eine Verschlechterung bis auf ca. die Hälfte der Ausgangswerte erbrachte. Die Zugabe von Proteinen zeigte ebenfalls eine Schwächung der Festigkeitswerte. Die Variation der Konzentrationen von Glycin zeigte für α -/und β -TCP bei Steigerung der Konzentration eine Verbesserung der Festigkeiten, die aber insgesamt unterhalb der erreichbaren Werte der reinphasigen Zemente liegen.

Der zweikomponentige TTCP-DCPA-Zement wies bei den Druck- und Zug-Werten teilweise sehr viel bessere Eigenschaften auf. Die Zugabe von Glycin verbesserte beispielsweise die Druckfestigkeit des Zements von 83 ± 10 MPa auf $133,4 \pm 4,2$ MPa, was dem Wunsch nach einer höheren Stabilität des Knochenersatzzements nachkommt. Die Zugabe von Proteinen führte zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten und konzentrationsabhängigen Schwächung der Zementfestigkeiten. Die Einflussnahme der Konzentration von AS auf den monophasischen Zement wurde für Serin in einem erweiterten Konzentrationsbereich eindeutig aufgezeigt, wobei sich eine

konzentrationsabhängige Verbesserung der Festigkeiten bis $115,1 \pm 4,6$ MPa (CS) ergab.

In einer aktuellen Studie von Gbureck et al. wurden CS-Werte von 131-153 MPa durch Zugabe von Tri-Na-Citrat zu einem vergleichbaren TTCP-DCPA-Zement mit einem vergleichbaren Messverfahren ermittelt [20]. Dies sind die derzeit höchsten gefundenen und veröffentlichten CS-Werte bei CPC [20]. Die hier ermittelten CS-Werte von $133,4 \pm 4,2$ MPa des TTCP-DCPA Zements mit Glycin als Zusatz sind somit ebenfalls im Bereich der besten ermittelten Zementfestigkeiten. Für den TTCP-DCPA-Zement konnte im Gegensatz zu α -/ und β -TCP eine deutliche Verbesserung der Zementfestigkeit auf 160% des Ausgangswertes für Reinzement durch Zusatz von AS erreicht werden.

Zu erwarten war eine simultane Verbesserung bzw. Verschlechterung der Druck- und Zugwerte in Kombination eines Zements mit einem Zusatz. Dies konnte jedoch nicht bei allen Festigkeitswerten gezeigt werden. Da Zemente prinzipiell druckfeste Werkstoffe sind, ist die CS bei der Bewertung der Materialeigenschaften stärker zu gewichten als die DTS oder Biegefestigkeiten. Aus diesem Grund wurde auch bei der zusätzlich angestellten Betrachtung der Konzentrationsabhängigkeit von Serin und TTCP-DCPA-Zement auf die Bestimmung der DTS verzichtet.

5.3 Wechselwirkung Aminosäuren - Zementpartikel

Die Bestimmung des Zeta-Potentials erfolgte zur Ursachenbestimmung der durch AS und Proteinzusätze induzierten Veränderungen der CPC-Eigenschaften im Bezug auf Materialeigenschaften wie Abbindezeit, Festigkeit (DTS und CS) sowie die mikrostrukturelle Beschaffenheit. Zementzusätze sind in der Lage die Viskosität der flüssigen Zementphase sowie die Benetzbarkeit und Oberflächenladung der Zementpartikel durch Adsorption von Ionen an die Zementpartikeloberflächen um einige Größenordnungen zu verändern. Dieses Verhalten kann durch das Zetapotential der Partikeloberfläche beurteilt werden. Eine hohe Oberflächenladung (Zetapotential) verbessert die Dispersion von sehr

feinen Partikeln als Resultat der höheren wechselseitigen Abstoßungskräfte in der flüssigen Phase. Für Trinatrium-Citrat konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die Adsorption von Citrat-Ionen an Zementpartikel ein Anstieg der Oberflächenladung von -2 bis -10 mV (Werte mit reinem Wasser) auf ca. -45 bis -50 mV resultiert. Dies führte zu einer Erniedrigung der Viskosität, die eine komplette Injektion des Zementes durch eine feine Injektionsnadel ermöglicht, sowie eine höhere Verdichtung der Zementpartikel zulässt [20]. Die Möglichkeit einer erhöhten Verdichtung führt über eine Verringerung der Porosität zu einer Steigerung der Zementstabilität. Ebenso führt eine erhöhte Abstoßung der suspendierten Zementpartikel zu einer verlängerten Abbindereaktion.

Die Überprüfung der Zusammenhänge der Zetapotentialwerte mit den Ergebnissen aus Abbindezeit und Festigkeit erfolgte durch Gegenüberstellung der Maximal- und Minimalwerte, der Reihenfolge der Wertezunahmen und der Größenzunahme der Werte-Änderungen. Es konnte gezeigt werden, dass sich Zetapotentiale von suspendierten CPC-Partikeln durch Zugabe von AS- und Proteinzusätzen verändern. Die hier ermittelten Änderungen der Zementpartikelladungen durch AS und Proteine erreichen jedoch nicht die Höhe der Werte, die durch Trinatrium-Citrat in Verbindung mit TTCP-DCPA-Zement erreicht wurden. Lediglich der Zusatz Arginin, der in Verbindung mit allen hier verwendeten Zementen die höchsten Zetapotentiale hervorrief, erklärt über eine größere Partikelabstoßung die längsten hier gemessenen Abbindezeiten. Die ermittelten Partikelladungen der restlichen Proben konnten keine deutliche Ursache für die Veränderung der Materialeigenschaften aufzeigen.

Die Ursache für beobachtete Änderungen des Zeta-Potentials ist durch die Adsorption geladener Aminosäure-Ionen an den Zementpartikeloberflächen begründet. Die Ladung der Aminosäure wiederum resultiert aus der Protonierung (Deprotonierung) relevanter Amino- bzw. Carboxylatgruppen. Das Ausmaß dieser De-/Protonierung kann über den pH-Wert der Elektrolytlösung bestimmt werden. Die Bestimmung der pH-Werte der Suspensionen für die Zeta-Potential-Messungen ergab für alle AS-Proben Werte, die basischer als die isoelektrischen Punkte der hier verwendeten AS sind. Der isoelektrische Punkt ist definiert als der

Punkt, an dem die Zahl der positiven und negativen Ladungen einer AS gleich ist. Dies bedingt, dass alle AS in deprotonierter Form vorliegen. Somit kann es zu Wechselwirkungen der COO^- - und NH_2 -Gruppen des konstanten AS-Teils mit Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen kommen. Da sich diese Tatsache auf alle hier verwendeten AS in gleicher Weise auswirkt, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Effekte aller AS-Zusätze auf Materialeigenschaften der CPC im gleichen Maße widerspiegeln.

Die Tertiärstruktur von Proteinen zeigt in Abhängigkeit des pH-Wertes unterschiedliche Konformationen und somit ungleiche aktive Oberflächenladungen. Dieser Sachverhalt, sowie die Tatsache, dass sich CPC-Pasten im Laufe ihres Abbindevorgangs im Bezug auf den pH-Wert verändern, macht Aussagen über Auswirkungen von Proteinen auf CPC weitgehend unmöglich. Somit bleiben die pH-aktiven Gruppen entscheidend für die Interpretation von proteininduzierten Veränderungen der CPC-Materialeigenschaften.

Die infrarotspektrometrische Untersuchung wurde durchgeführt um festzustellen, ob AS- und Proteinzusätze im Kristallgitter des Reaktionsprodukts als fester Bestandteil eingelagert sind oder als ungebundene Additive in der Zementmatrix vorliegen und sich folglich mit Wasser auswaschen lassen. Die in Tabelle 14 aufgeführten Wellenbereiche mit zugehörigen chemischen Gruppen geben die für die Interpretation der Messung relevanten chemischen Teilgruppen an. Hierbei kommen Hydroxylgruppen sowohl in AS als auch mengenmäßig überwiegend in Wasser/ Restwasser vor. C-C-Schwingungen und stickstoffhaltige Gruppen sind lediglich in AS und Proteinzusätzen enthalten, während phosphathaltige Gruppen den Zement repräsentieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Bande bei TTCP-DCPA-Zement mit Albuminzusatz (Abbildung 16) im Bereich der CH- und NH-Schwingung nach Filtrierung eine deutlich geringere Absorption als vorher zeigte. Dies zeigt, dass Albumin nicht als eingelagerter Bestandteil des Zementkristallgitters vorliegt. Die geringere Transmission im Bereich der OH-Bande der filtrierte Probe kann auf einen höheren Restfeuchtigkeitsgehalt des gefilterten IR-Prüfkörpers zurückgeführt werden. Die IR-Spektrogramme von

TTCP-DCPA-Zement mit Glycin (Abbildung 17) und Serin (Abbildung 18) zeigen im Bereich der CH-Bande keine aussagekräftige Abweichung. Im Bereich der NH-Bande kann jedoch ein erhöhter Strahlendurchgang des IR-Lichtes nach Filtration gemessen werden, was zeigt, dass die hier verwendeten AS-Zusätze auswaschbar sind, und somit nicht als fest eingelagerter Bestandteil des Zementgitters vorliegen. Dies geht konform mit Untersuchungen aus der Literatur, bei denen für Citrat als Additiv ebenfalls gezeigt werden konnte, dass dieses als nicht gebundener Bestandteil vorliegt und ausgewaschen werden kann [20].

5.4 Mikrostruktur

Die XRD-Analyse wurde als standardisiertes Messverfahren [20, 54] gewählt, um den Einfluss der AS und Proteinzusätze auf die Umsetzungsrate der hier verwendeten Zemente zu untersuchen. Die Diffraktogramme nach Abbinden der Zemente zeigen ein einheitliches Beugungsmuster. DCPA als Edukt ist weitgehend verbraucht, es lassen sich jeweils nicht reagiertes TTCP und HA als Reaktionsprodukt nachweisen. Es sind keine weiteren Beugungsreflexe für AS oder Proteine erkennbar und lassen somit keine weiteren Schlüsse auf etwaige Veränderungen zu. Vergleichbare Ergebnisse werden auch für mechanisch aktivierte TCP-Zemente erhalten. Neben dem nicht abreagierten Edukt, ist nur HA als weitere kristalline Phase in vergleichbarer Konzentration nachzuweisen. Folglich lässt sich feststellen, dass die verwendeten AS und Proteinzusätze keinen wesentlichen Einfluss auf die Umsetzungsrate der Zementabbindereaktion nehmen.

Die mikrostrukturelle Untersuchung der Festigkeitsprüfkörper erfolgte zur Ursachenbestimmung der ermittelten unterschiedlichen Festigkeitswerte. Da TTCP-DCPA-Zement in Kombination mit den zugesetzten Stoffen die größten Veränderungen in der Festigkeit zeigte, wurden einige Proben dieses Zements mittels Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Zur Auswahl kamen die beiden Proben mit Proteinzusatz (Albumin 10% und Fibrinogen 10%), sowie Proben mit den AS-Zusätzen (Alanin 10%, Glycin 10%, Glycin 20% und Serin 10%), die die höchsten Festigkeitswerte aufwiesen.

Die REM-Bilder zeigen deutlich, dass sich in Gegenwart von AS-Zusätzen Unterschiede im mikrostrukturellen Aufbau der Proben ergeben. Ihr Erscheinungsbild reicht von spitzkantigen, zerklüfteten Oberflächen (Ala 10%), über nadelförmig, koralline Strukturen (Albumin 20%, Glycin 10%), schwammartig porös (Fib. 10%, Gly. 20%) bis hin zu einem vergleichsweise glatten, porenarmen und schollenartigen Erscheinungsbild (Serin 10%). Bei allen Proben sind mehr oder weniger häufig Mikroporositäten mit unterschiedlichem Durchmesser im Bereich von 1 μm bis 5 μm (Albumin 10%) zu sehen.

Anhand der TTCP-DCPA-Prüfkörper mit Glycin 10% und 20% konnte gezeigt werden, dass sich der mikrostrukturelle Aufbau durch Variation der Zusatzkonzentration ändert. Glycinproben zeigen bei 10%iger Konzentration eine feinnadelartige Struktur und eine Festigkeit von $107,8 \pm 9,4$ MPa (CS) und $8,9 \pm 0,3$ MPa (DTS). Bei 20%iger Konzentration ist die Feinstruktur weniger filigran, und zeigt eher größere und kompakte Einzelpartikel. Die CS und DTS liegen hier bei $133,4 \pm 4,2$ MPa und $6,9 \pm 1,2$ MPa.

Ein weiterer Zusammenhang konnte mit der Probenkörperdichte aufgezeigt werden. Die Bestimmung der Dichte wurde durchgeführt um zu klären, ob sie ursächlich für die Festigkeitsveränderung der CPC nach Zugabe von AS und Proteinen ist. Hierbei kamen einige TTCP-DCPA-Zementprobenkörper zum Einsatz die aufgrund ihrer großen Zunahme an Festigkeit nach Zugabe von AS und Proteinen auffielen. Es zeigte sich bei Vergleich der Dichte mit den Druckfestigkeitswerten eine geringfügige Zunahme der Dichte bei steigender Festigkeit (Tabelle 16). Die Porosität der Zemente wurde unter Annahme einer konstanten Festkörperdichte von 2.80 g/cm^3 abgeschätzt und variierte bei den dargestellten Additiven zwischen 25.0 und 26.9%.

Tabelle 16: Vergleich der Dichte, Porosität und Festigkeit von TTCP-DCPA-Zementen mit Zusatz. Die Porosität wurde mit einer geschätzten Festkörperdichte der Zementmatrix von 2.80 g/cm^3 berechnet.

Zusatz	Dichte [g/cm ³]	Porosität [%]	Festigkeit (CS) [MPa]
Glycin 20%	$2,101 \pm 0,038$	25.0	$133,4 \pm 4,2$
Alanin 10%	$2,077 \pm 0,028$	25.8	$115,2 \pm 10,3$
Glycin 10%	$2,068 \pm 0,008$	26.1	$107,8 \pm 9,4$
Serin 10%	$2,058 \pm 0,012$	26.5	$83,5 \pm 5,2$
Albumin 10%	$2,046 \pm 0,007$	26.9	$62,2 \pm 10,5$

Im Rahmen dieser Gegenüberstellung wurde der Druckfestigkeit (CS) ein höherer Stellenwert als der DTS eingeräumt, da Zemente vor allem druckfeste Werkstoffe sind, und eine vergleichsweise geringe Zug- und Biegefestigkeit aufweisen. Die Zugabe von Tri-Na-Citrat in einer Studie von GBURECK et al. [20] erbrachte für einen vergleichbaren TTCP-DCPA-Zement und bei vergleichbarer Versuchsdurchführung eine Dichte von $2,119 \pm 0,055 \text{ g/cm}^3$ bei einer CS von $131,3 \pm 8,8 \text{ MPa}$. Diese Werte liegen in einem vergleichbaren Verhältnis und einer entsprechenden Größenordnung wie die hier aufgezeigten Werte für die Modifikation mit 20% Glycin, und untermauern somit die hier erhaltenen Ergebnisse.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen von Aminosäuren (AS) und Proteinen auf die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Calciumphosphat-Zement in Hinblick auf ihre klinische Verwendbarkeit zu untersuchen. Im Rahmen der Arbeit wurden ein zweikomponentiger Zement bestehend aus Tetracalciumphosphat (TTCP) und Calciumhydrogenphosphat (Monetit, DCPA), sowie zwei einkomponentige Zemente aus mechanisch aktiviertem α -Tricalciumphosphat (α -TCP) bzw. β -Tricalciumphosphat (β -TCP) verwendet. Die Zemente wurden mit verschiedenen Aminosäuren und Proteinen durch Zusatz zur flüssigen Zementphase modifiziert. Untersuchte Qualitätsparameter waren die Abbindezeit nach Gillmore, die mechanische Stabilität sowie die Phasenzusammensetzung nach Aushärtung und Änderungen der Oberflächenladung und des pH-Werts der Zementpartikel nach Modifikation.

Die Abbindezeit wurde mittels der Gillmor-Nadel-Methode untersucht. Hierbei zeigten sich teilweise deutlich verlängerte Abbindephasen wie z.B mit Arginin (ST = 18 min) auf das Vierfache des Zementnormwertes. Eine Abhängigkeit der Abbindezeit von der Konzentration konnte nur für TTCP-DCPA-Zement mit Proteinen nachgewiesen werden. Untersuchungen der Partikelladung der Zementbestandteile über das Zeta-Potential ergaben für Arginin in Verbindung mit allen Zementen die höchsten Potentiale von bis zu $-35,1 \pm 1,1$ mV, was über die verstärkten Abstoßungskräfte der CPC-Partikel die Verlängerung der Abbindezeiten erklärt. Die Bestimmung der pH-Werte der suspendierten Zementpartikel in Aminosäurelösungen ergab für alle Proben basischere pH-Werte als die jeweiligen isoelektrischen Punkte der Aminosäuren. Dies bedingt, dass alle Verbindungen in deprotonierter Form vorliegen.

Die Ermittlung der Druck- und Zugfestigkeit der Zemente erfolgte im standardisierten Verfahren nach Verdichtung der Zementpaste. Die Druckfestigkeit (CS) der unmodifizierten Zemente lag bei $64,1 \pm 3,0$ MPa (α -TCP), $51,8 \pm 4,1$ MPa (β -TCP) und 83 ± 10 MPa (TTCP-DCPA). Es zeigte sich, dass Albumin und Fibrinogen zu einer Verringerung der Zementstabilität führen. Die

Zugabe von Aminosäuren zu α - und β -TCP Zementen erbrachte gleichbleibende bzw. verringerte Festigkeiten. Bei TTCP-DCPA-Zement verursachte die Modifikation mit einigen Aminosäuren höhere Festigkeiten bis $133,4 \pm 4,2$ MPa (CS) durch 20% Glycin Zusatz, erklärbar durch eine höhere Dichte und damit geringere Porosität der Zementmatrix. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der TTCP-DCPA-Zementtextur zeigten zusätzlich eine Veränderung des mikrostrukturellen Aufbaus der Zementmatrix. Durch infrarotspektrometrische Untersuchung der abgebundenen Zemente konnte gezeigt werden, dass alle Aminosäuren als chemisch nicht gebundene Additive in der Zementmatrix vorliegen und sich mit Wasser auswaschen lassen. Eine Umsetzung der Zementreaktanden zu nanokristallinem Hydroxylapatit konnte durch die röntgendiffraktometrische Untersuchung für alle Formulierungen gezeigt werden.

Die Verbesserungen der Zementeigenschaften einiger Proben sind im Bezug auf den klinischen Einsatz interessant, da sich so die Indikationsbreite der verstärkten CPC erweitern ließe, beispielsweise auf gering kraft-belastete Defekte im Bereich der oberen Extremitäten oder der Halswirbelsäule. Weiterführende Untersuchungen müssten sich vor allem mit dem Mechanismus der beobachteten Zementverstärkung beschäftigen. Hierfür müssten oberflächensensitive Verfahren zur Charakterisierung der Wechselwirkung von Zementpartikel und Aminosäure, beispielsweise Festkörper -NMR, zum Einsatz kommen.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. Bone substitutes. *Orthopade* 2003;32(1):2-10.
- [2] Hildebrant H. *Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch*. 1994;257.
- [3] Rueger JM. Bone substitution materials. Current status and prospects. *Orthopade* 1998;27(2):72-9.
- [4] Flatley TJ, Lynch KL, Benson M. Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine. *Clin Orthop* 1983(179):246-52.
- [5] Ducheyne P. Bioglass coatings and bioglass composites as implant materials. *J Biomed Mater Res* 1985;19(3):273-91.
- [6] Gross U, Strunz V. The interface of various glasses and glass ceramics with a bony implantation bed. *J Biomed Mater Res* 1985;19(3):251-71.
- [7] Knepper-Nicolai B, Reinstorf A, Hofinger I, Flade K, Wenz R, Pompe W. Influence of osteocalcin and collagen I on the mechanical and biological properties of Biocement D. *Biomol Eng* 2002;19(2-6):227-31.
- [8] Hench LL, Ethridge EC. *Biomaterials, an interfacial approach*. Academic Press, New York 1982.
- [9] Holmes R, Mooney V, Bucholz R, Tencer A. A coralline hydroxyapatite bone graft substitute. Preliminary report. *Clin Orthop* 1984(188):252-62.
- [10] Niedhart C, Maus U, Redmann E, Siebert CH. In vivo testing of a new in situ setting beta-tricalcium phosphate cement for osseous reconstruction. *J Biomed Mater Res* 2001;55(4):530-7.
- [11] Gerngross H, Burri C, Kinzl L, Merk J, Muller GW. Complications at removal sites of autologous cancellous bone transplants. *Aktuelle Traumatol* 1982;12(3):146-52.
- [12] Kurz LT, Garfin SR, Booth RE, Jr. Harvesting autogenous iliac bone grafts. A review of complications and techniques. *Spine* 1989;14(12):1324-31.
- [13] Brown WE, Chow LC. A new calcium phosphate, water-setting cement. *Cements Research Progress, American Ceramic Society, Westerville, Ohio* 1986:352-79.
- [14] Chow LC. Calcium-Phosphat-Zement: Eigenschaften und Verwendungen. *Biomaterialien* 2001;2(1):11-18.
- [15] Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Sisson GA. Experimental hydroxyapatite cement cranioplasty. *Plast Reconstr Surg* 1992;90(2):174-85; discussion 86-91.
- [16] Chohayeb AA, Chow LC, Tsaknis PJ. Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer-filler material. *J Endod* 1987;13(8):384-7.
- [17] Sugawara A, Nishiyama M, Kusama K, Moro I, Nishimura S, Kudo I, Chow LC, Takagi S. Histopathological reactions of calcium phosphate cement. *Dent Mater J* 1992;11(1):11-6.
- [18] Lu JH, Siew C, Robinson PJ. New attachment following the use of a novel calcium phosphate system. *J Dent Res* 1988;67:1913.
- [19] Hanker J, Lupton C, Fredtel S, Gimmara B, Chow LC. Calcium phosphate binders for hydroxyapatite particles for bone repair. *J Dent Res* 1987;249:1744.

- [20] Gbureck U, Barralet J, Spatz K, Liam M, Thull R. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials* 2004;25:2187-95.
- [21] 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.
- [22] Fukase Y, Eanes ED, Takagi S, Chow LC, Brown WE. Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements. *J Dent Res* 1990;69(12):1852-6.
- [23] 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(5205):1796-9.
- [24] Ohura K, Bohner M, Hardouin P, Lemaitre J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of, and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res* 1996;30(2):193-200.
- [25] Knaack D, Goad ME, Aiolova M, Rey C, Tofighi A, Chakravarthy P, Lee DD. Resorbable calcium phosphate bone substitute. *J Biomed Mater Res* 1998;43(4):399-409.
- [26] Ikenaga M, Hardouin P, Lemaitre J, Andrianjatovo H, Flautre B. Biomechanical characterization of a biodegradable calcium phosphate hydraulic cement: a comparison with porous biphasic calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res* 1998;40(1):139-44.
- [27] Gerhart TN, Renshaw AA, Miller RL, Noecker RJ, Hayes WC. In vivo histologic and biomechanical characterization of a biodegradable particulate composite bone cement. *J Biomed Mater Res* 1989;23(1):1-16.
- [28] Dupraz A, Delecrin J, Moreau A, Pilet P, Passuti N. Long-term bone response to particulate injectable ceramic. *J Biomed Mater Res* 1998;42(3):368-75.
- [29] Ono K, Yamamuro T, Nakamura T, Kokubo T. Mechanical properties of bone after implantation of apatite-wollastonite containing glass ceramic-fibrin mixture. *J Biomed Mater Res* 1990;24(1):47-63.
- [30] Peter SJ, Miller ST, Zhu G, Yasko AW, Mikos AG. In vivo degradation of a poly(propylene fumarate)/beta-tricalcium phosphate injectable composite scaffold. *J Biomed Mater Res* 1998;41(1):1-7.
- [31] Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J* 1996;317 (Pt 1):59-64.
- [32] Blom EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, Kurashina K, van Waas MA, Burger EH. Transforming growth factor-beta1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res* 2000;50(1):67-74.
- [33] Blom EJ, Klein-Nulend J, Wolke JG, van Waas MA, Driessens FC, Burger EH. Transforming growth factor-beta1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics. *J Biomed Mater Res* 2002;59(2):265-72.
- [34] Renooij W, Hoogendoorn HA, Visser WJ, Lentferink RH, Schmitz MG, Van leperen H, Oldenburg SJ, Janssen WM, Akkermans LM, Wittebol P. Bioresorption of ceramic strontium-85-labeled calcium phosphate implants

- in dog femora. A pilot study to quantitate bioresorption of ceramic implants of hydroxyapatite and tricalcium orthophosphate in vivo. *Clin Orthop* 1985(197):272-85.
- [35] Jain AK, Panchagnula R. Skeletal drug delivery systems. *Int J Pharm* 2000;206(1-2):1-12.
- [36] Klein CP, Patka P, Hollander WA. Comparisson between Hydroxyapatite and beta-Whitlockite Macroporous Ceramics Implanted in Dogs Femur. *CRC Handbook of Bioactive Ceramics* 1990;2:53-60.
- [37] Klein CP, Patka P, Wolke JG, de Blieck-Hogervorst JM, de Groot K. Long-term in vivo study of plasma-sprayed coatings on titanium alloys of tetracalcium phosphate, hydroxyapatite and alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 1994;15(2):146-50.
- [38] Chow LC. Development of self-setting calcium phosphate cements. *J Ceramic Soc Jpn* 1991;99:954-64.
- [39] Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens MC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part II: Precipitate formation during setting reactions. *J Mater Sci Med* 1999;10(3):177-83.
- [40] Brown WE, Epstein EF. Crystallography of Tetracalcium Phosphate. *J Res Nat Bur Stand* 1965;69(A):547-51.
- [41] Takagi S, Chow LC, Markovic M, Friedman CD, Costantino PD. Morphological and phase characterizations of retrieved calcium phosphate cement implants. *J Biomed Mater Res* 2001;58(1):36-41.
- [42] Cherng A, Takagi S, Chow LC. Effects of hydroxypropyl methylcellulose and other gelling agents on the handling properties of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1997;35(3):273-7.
- [43] Takagi S, Chow LC, Ishikawa K. Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements. *Biomaterials* 1998;19(17):1593-9.
- [44] Bohner M, Lemaître J, Merkle HP, Gander B. Control of gentamicin release from a calcium phosphate cement by admixed poly(acrylic acid). *J Pharm Sci* 2000;89(10):1262-70.
- [45] GKH F. Kalzium-Phosphat Keramiken in der Zahnmedizin. Quintessenz Verlag GmbH, Berlin 1987.
- [46] Chow LC, Markovic M, Takagi S. "Calcium phosphate cements" in *Cements research progress 1997*. The Am Ceram Soc 1998:215-38.
- [47] Chow LC, Takagi S. "Calcium phosphate cements" in *Cements research progress 1994*. The Am Ceram Soc 1996:189-201.
- [48] Gbureck U, Probst J, Thull R. Surface properties of calcium phosphate particles for self setting bone cements. *Biomol Eng* 2002;19(2-6):51-5.
- [49] Hofmann M. Physikalische Charakterisierung von Calciumphosphat-Pulvern zur Einstellung von Prozessparametern für die Herstellung von Knochenzement. Dissertation, Universität Würzburg 2003.
- [50] Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R. Mechanical activation and cement formation of beta-tricalcium phosphate. *Biomaterials* 2003;24(23):4123-31.
- [51] Gbureck U, Hofmann M, Barralet J, Grover L, Thull R. Thermodynamic study of formation of amorphous β -tricalcium phosphate for calcium phosphate cements. *Key Engin. Mater* 2004;254-56: 49-52.

- [52] Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y. Properties and mechanisms of self-setting calcium phosphate cements. *J Mater Sci Med* 1995;6:528-33.
- [53] Chow LC, Takagi S, Ishikawa K. Formation of hydroxyapatite in cement systems. Boca Raton: CRC Press 1994:127-37.
- [54] 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):511-7.
- [55] Fulmer MT, Brown PW. Effects of Na₂HPO₄ and NaH₂PO₄ on hydroxyapatite formation. *J Biomed Mater Res* 1993;27(8):1095-102.
- [56] Gbureck U, Barralet JE, Grover LM, Hofmann M, Thull R. Mechanische Festigkeit und Porosität von Calciumphosphat-Zementen. *Biomaterialien* 2003;4(4):258-63.
- [57] Barralet J, Grover L, Hofmann M, Gbureck U. High Strength Apatitic Cement by Modification with α -hydroxy acid salts. *Advanced Materials* 2003;15(24):2091-94.
- [58] Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens MC, Planell JA, Best SM. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: Solution chemistry. *J Mater Sci Med* 1999;10(3):169-76.
- [59] Ginebra MP, Fernandez E, Driessens FC, Planell JA. Modeling of the Hydrolysis of α -Tricalcium Phosphate. *J. Am. Ceram. Soc.* 1999; 82(10):2808-12.
- [60] Zawacki SJ, Koutsoukos PB, Salimi NH, Nancollas GH. The growth of calcium phosphates: in: Davis JA, Hayes KF (eds): *Geochemical processes at mineral surfaces*,. Am Chem Soc Symp Series 1996;323:650-62.
- [61] Ishikawa K, Miyamoto Y, Takechi M, Ueyama Y, Suzuki K, Nagayama M, Matsumura T. Effects of neutral sodium hydrogen phosphate on setting reaction and mechanical strength of hydroxyapatite putty. *J Biomed Mater Res* 1999;44(3):322-9.
- [62] Chow LC, Markovic M, Takagi S. Formation of hydroxyapatite in cement systems: Effects of phosphate, Phosphorous, Sulfur and Silicon and the related Elements. 1999;146:129-32.
- [63] Hassan KAR. The microelectrophoretic behaviour of sparingly soluble salts. MS thesis. Suny, Buffalo 1984.
- [64] Bohner M, Merkle HP, Landuyt PV, Trophardy G, 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(2):111-6.
- [65] Andrianjatovo H, Jose F, Lemaître J. Effect of beta-TCP granularity on setting time and strength of calcium phosphate hydraulic cements. *J Mater Sci Med* 1996;7:34-39.
- [66] Fernandez E, Gil FJ, Ginebra MP, Driessens MC, Planell JA, Best SM. Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO₄- α -Ca₃(PO₄)₂ system: pH, workability and setting times. *J Mater Sci Med* 1999;10(4):223-30.
- [67] Ginebra J, Fernandez E, Driessens FC, Boltong MG, Muntasell J, Font J, Planell JA. The effect of temperature on the behaviour of an apatitic calcium phosphate cement. *J Mater Sci Med* 1995;6(857-860).

- [68] Ginebra MP, Fernandez E, De Maeyer EA, Verbeeck RM, Boltong MG, Ginebra J, Driessens FC, Planell JA. Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J Dent Res* 1997;76(4):905-12.
- [69] Fernandez E, Gil FJ, Best SM, Ginebra MP, Driessens FC, Planell JA. Improvement of the mechanical properties of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: compressive strength and microstructural development. *J Biomed Mater Res* 1998;41(4):560-7.
- [70] Sanin N, Takagi S, Chow LC, Matsuya S. Particle size effects on pH and strength of calcium phosphate cements. *J Dent Res* 1991;70:567.
- [71] Sanin N, Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Eanes ED. Effects of additives on setting reaction of calcium phosphate cement. *J Dent Res* 1992;71:188.
- [72] Ishikawa K, Asaoka K. Estimation of ideal mechanical strength and critical porosity of calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res* 1995;29(12):1537-43.
- [73] Li J, Alatlí-Kut I, Hermansson L. High-strength dental gypsum prepared by cold isostatic pressing. *Biomaterials* 1993;14(15):1186-7.
- [74] Chow LC, Markovic M, Takagi S, Cherng A. Injectable calcium phosphate cements -Effects of cement liquid on the physical properties of the cement. *Innovation and Technology in Biology and Medicine (France)* 1997;18(Spec. Iss. Griboi 97):11-14.
- [75] Elliott JC. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. Amsterdam: Elsevier 1994:63.
- [76] Barralet J, Akao M, Aoki H. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. *J Biomed Mater Res* 2000;49(2):176-82.
- [77] Reilly DT, Burstein AH. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. *J Biomech* 1975;8(6):393-405.
- [78] Pistner H, Reuther J, Reinhart E, Kubler N, Priessnitz B. New hydroxylapatite cement for craniofacial surgery. *Mund Kiefer Gesichtschir* 1998;2 Suppl 1:S37-40.
- [79] Pittet C, Lemaitre J. Mechanical characterization of brushite cements: A Mohr circles approach. *J Biomed Mater Res* 2000;53(6):769-80.
- [80] Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Ishikawa Y, Eanes ED, Asaoka K. Behavior of a calcium phosphate cement in simulated blood plasma in vitro. *Dent Mater* 1994;10(1):26-32.
- [81] Grover LM, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro ageing of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials* 2003;24(23):4133-41.
- [82] 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(11):2197-203.
- [83] Ishikawa K, Takagi S, Chow LC, Suzuki K. Reaction of calcium phosphate cements with different amounts of tetracalcium phosphate and dicalcium phosphate anhydrous. *J Biomed Mater Res* 1999;46(4):504-10.
- [84] Chow LC, Takagi S, Costantino PD, Friedman CD. Self-setting calcium phosphate cements. *Mater Res Symp Proc* 1991;179:3-24.
- [85] Krell KF, Wefel JS. A calcium phosphate cement root canal sealer--scanning electron microscopic analysis. *J Endod* 1984;10(12):571-6.
- [86] Kveton JF. Obliteration of the eustachian tube using hydroxyapatite cement: a permanent technique. *Laryngoscope* 1996;106(10):1241-3.

- [87] Holmes RE, Bucholz RW, Mooney V. Porous hydroxyapatite as a bone graft substitute in diaphyseal defects: a histometric study. *J Orthop Res* 1987;5(1):114-21.
- [88] Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials* 2000;21(12):1283-90.
- [89] Friedman CD, Costantino PD, Synderman CH, Chow LC, Takagi S. Reconstruction of the frontal sinus and frontofacial skeleton with hydroxyapatite cement. *Arch Facial Plast Surg* 2000;2(2):124-9.
- [90] Kamerer DB, Hirsch BE, Snyderman CH, Costantino P, Friedman CD. Hydroxyapatite cement: a new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery. *Am J Otol* 1994;15(1):47-9.
- [91] Sugawara A, Chow LC, Takagi S, Chohayeb H. In vitro evaluation of the sealing ability of a calcium phosphate cement when used as a root canal sealer-filler. *J Endod* 1990;16(4):162-5.
- [92] Barralet JE, Tremayne M, Lilley KJ, Gbureck U. Modification of Calcium Phosphate Cement with alpha-Hydroxy Acids and Their Salts. *Chem. Mater.* 2005;17:1313-19.
- [93] dos Santos LA, Carrodeguas RG, Boschi AO. Dual-setting calcium phosphate cement modified with ammonium polyacrylat. *Artificial organs* 2003;27(5):412-18.
- [94] Wang X, Ma J, Wang Y, He B. Structural characterization of phosphorylated chitosan and their applications as effective additives of calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2001;22:2247-55.
- [95] Bohner M, Lemaitre J, Ring TA. Effect of sulfate, pyrophosphate, and citrate ions on the physicochemical properties of cement made of beta-tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. *J Am Ceram Soc* 1996;79(6):1427-34.
- [96] Sarda S, Fernandez E, Nilson M, Balcells M, Planell JA. Kinetic effect of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water reducing agent. *J Biomed Mater Res* 2002;61:652-9.
- [97] Leroux L, Hatim Z, Freche M, Lacout JL. Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 1999;25(2 Suppl):31S-34S.
- [98] Sarda S, Fernandez E, Llorens J, Martinez S, Nilsson M, Planell JA. Rheological properties of an apatitic bone cement during initial setting. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(10-12):905-9.
- [99] Tenhuisen K, Brown PW. The effect of citric and acetic acids on the formation of calcium deficient hydroxyapatite at 38°C. *J Mater Sci Mater Med* 1994;5:291-8.
- [100] Fujishiro Y, Takahashi K, Sato T. Preparation and compressive strength of alpha-tricalcium phosphate / gelatine composite cement. *J Biomed Mater Res* 2001;54:525-30.
- [101] Weiss P, Gauthier O, Bouler JM, Grimandi G, Daculsi G. Injectable bone substitute using a hydrophilic polymer. *Bone* 1999;25(2 Suppl):67S-70S.
- [102] Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12(2):135-9.

- [103] Sarda S, Nilsson M, Balcells M, Fernandez E. Influence of surfactant molecules as air-entraining agent for bone cement macroporosity. *J Biomed Mater Res A* 2003;65(2):215-21.
- [104] Ginebra J, Boltong MG, Fernandez E, Planell JA, Driessens FC. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:612.
- [105] Brown WR, P.M. W. The osmotic pressure of electrostatically stabilized colloid dispersions. *Journal of Colloid and Interface science* 1996;184:241-50.
- [106] Nimni ME. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 1997;18(18):1201-25.
- [107] Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(18):8562-5.
- [108] ASTM-Standard C266-99: Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gilmore needles. ASTM International 2002.
- [109] Urban&Fischer. *Lexikon der Zahnmedizin und Zahntechnik* Urban & Fischer, 1999 (888 pp.).
- [110] Van der Houwen J, Valsami-Johnes E. The application of calcium phosphate precipitation chemistry to phosphorous recovery: the influence of organic ligands. *Environ Technol* 2001;22:1325-35.

Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr.-Ing. R. Thull für die Überlassung des Promotionsthemas und der Möglichkeit die Abteilungslaboratorien jederzeit benutzen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gehört Herrn Priv.-Doz. Dr. U. Gbureck für die stets präsente und engagierte Betreuung, mit der er mich durch alle Phasen dieser Arbeit führte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. T. Holste für die Übernahme des Koreferates.

Meinen Eltern, Frau Dr. Francesca Rösch-Tozzi und Herrn Dr. Dieter Rösch, danke ich für alle Unterstützung bis zum heutigen Tag.

Ebenso danke ich Herrn Ferdinand Zimmermann für die wertvolle Hilfestellung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, die mich im Rahmen meiner Arbeit unterstützt haben.

Curriculum Vitae

Persönliches

30.07.1975

Philipp Armin Rösch
geboren in Ulm
ledig

Mutter: Dr. Francesca Rösch-Tozzi
Zahnärztin für Kieferorthopädie

Vater: Dr. Dieter Rösch
Zahnarzt für Kieferorthopädie

Geschwister: Dr. Ellen Rupprecht
Zahnärztin für Kieferorthopädie

Schulbildung

1982-1984

Waldorfschule Ulm

1984-1987

Grundschule Ulm-Wiblingen

1987-1996

Gymnasium Ulm-Wiblingen

06 / 1996

Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1996-1997

Universitätsklinik Ulm
internistische Notfallaufnahme

<u>Studium</u>	
10 / 1997	Universität Würzburg Beginn des Studiums der Zahnmedizin
10 / 1998	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
04 / 2000	Zahnärztliche Vorprüfung
11 / 2002	Zahnärztliche Prüfung
01 / 2003	Approbation als Zahnarzt
<u>Promotion</u>	
01 / 2003	Aufnahme einer experimentellen Dissertation an der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg
<u>Berufliche Tätigkeit</u>	
09 / 2003 – 09 / 2004	Vorbereitungsassistent in einer oralchirurgischen Praxis
seit 10 / 2004	Weiterbildungsassistent zum Fachzahnarzt für Oralchirurgie

Philipp Rösch

