

Aus der Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg
Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. dent. B. Klaiber

***In vitro*- Untersuchungen zur Biokompatibilität und antibakteriellen
Wirksamkeit von silber-dotierten Tricalciumphosphat-Zementen**

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

vorgelegt von

Daniel Hösl
aus Pressath

Würzburg, Juni 2010

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. U. Gbureck

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. A. Renk

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2010

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
1.1 Knochenersatzmaterialien	1
1.1.1 Geschichte	1
1.1.2 Einteilung.....	2
1.2 Biokompatibilität	5
1.3 Biokompatibilitätsprüfung.....	7
1.4 Zielsetzung	8
2. Kenntnisstand	9
2.1 Calciumphosphate (CaP).....	9
2.2 Calciumphosphatzemente	13
2.2.1 Hydroxylapatit-bildende Zemente	13
2.2.2 Bruschit-bildende Zemente.....	14
2.2.3 Calciumphosphatzemente als Depotsysteme.....	15
2.3 Silber	16
2.3.1 Aus der Geschichte des Elements Silber	16
2.3.2 Verwendung von Silber	16
2.3.4 Eigenschaften von Silber.....	18
3. Material und Methode	21
3.1 Material.....	21
3.1.1 Puffer und Medien	21
3.1.2 Verbrauchsmaterial	23
3.1.3 Geräte	24
3.1.4 Computerprogramme	25
3.1.5 Bakterienstämme	25
3.1.5.1 Staphylococcus aureus (RN 4220, gram ⁺)	26
3.1.5.2 Staphylococcus epidermidis (Stamm RP62A, gram ⁺).....	26
3.1.6 Osteoblastenzelllinie MG-63.....	27
3.1.7 Polystyrol als Referenzmaterial	27
3.2 Methode.....	28
3.2.1 Herstellung von Tricalciumphosphat.....	28
3.2.2 Herstellung von Calciumphosphat-Zementen.....	29

3.2.3	Herstellung der Prüfkörper	30
3.2.4	Röntgendiffraktometrie (XRD)	30
3.2.5	Anwendungsrelevante Eigenschaften	31
3.2.5.1	Initiale Abbindezeit nach Gilmore	31
3.2.5.2	Druckfestigkeit	32
3.2.6	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)	33
3.2.7	Vorbereitung der Prüfkörper für Bakterien- und Zellkulturversuche.....	34
3.2.8	Bakterienkultivierung	35
3.2.9	Zellkultivierung	36
3.2.10	WST-1 Zellaktivitätstest.....	37
3.2.11	Zellzahlbestimmung mit dem CASY-1 Zellanalysesystem.....	37
3.2.12	Elektronenmikroskopische Analyse der Oberflächen	38
3.2.12.1	Fixierung und Entwässern der besiedelten Prüfkörper	39
3.2.12.2	Kritisch-Punkt-Trocknung	39
3.2.13	Testalgorithmus und Plattenbelegung	40
3.2.14	Statistik und Berechnung.....	40
4.	ERGEBNISSE	41
4.1	Charakterisierung der Ausgangspulver	41
4.1.1	Röntgendiffraktometrische Analyse.....	41
4.1.2	Massenspektrometrische Analyse	43
4.2	Charakterisierung der Zemente	43
4.2.1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen.....	43
4.2.2	Röntgendiffraktometrische Analyse	45
4.2.3	Massenspektrometrische Analyse	47
4.2.4	Bestimmung der Abbinde- bzw. Verarbeitungszeiten	48
4.2.5	Druckfestigkeiten	49
4.3	Massenspektrometrische Analyse der Auslagerungsmedien	49
4.4	Auswertung der Bakterienversuche	55
4.4.1	Bestimmung der Zellaktivität	55
4.4.2	Massenspektrometrische Analyse der Bakterienmedien	57
4.4.3	Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Bakterien.....	58
4.5	Auswertung der Zellversuche	62
4.5.1	Bestimmung der Zellzahl	63

4.5.2 Bestimmung der zellulären Atmungsaktivität.....	66
4.5.3 Bestimmung der spezifischen Atmungsaktivität	68
4.5.4 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Zellen	70
5. DISKUSSION	72
6. ZUSAMMENFASSUNG	86
7. LITERATURVERZEICHNIS	87
8. ANHANG	99

Abkürzungen

Ag-Bruschi	Ag ⁺ -dotiertes Bruschi N1%
Ag-HA	Ag ⁺ -dotiertes Hydroxylapatit N1%
CaP	Calciumphosphat(e)
CPC	Calciumphosphat Zement (engl. Calcium Phosphate Cement)
CS	Druckfestigkeit (engl. compressive strength)
HA	Hydroxylapatit
KEM	Knochenersatzmaterial
PLR	Pulver / Flüssigkeits-Verhältnis (engl. powder liquid ratio)
REM	Rasterelektronenmikroskop
S.; Staph.	Staphylococcus
TCP	Tricalciumphosphat
XRD	Röntgendiffraktometrie (engl. X-Ray diffraction)
α-TCP	alpha-Tricalciumphosphat
β-TCP	beta-Tricalciumphosphat

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1 Knochenersatzmaterialien

1.1.1 Geschichte

Das Interesse an Frakturbehandlung und Knochenersatz reicht weit in die Menschheitsgeschichte zurück. So wurde in den peruanischen Anden ein 4000 Jahre alter Schädel gefunden, dessen frontaler Defekt mit einer 1mm dicken Goldplatte abgedeckt war ^[1]. Aus solchen und ähnlichen Funden lässt sich ableiten, dass in Mittel- und Südamerika die Allgemeinheit Implantate aus Flaschenkürbissen oder Nussschalen erhielten, während die gehobene Gesellschaft Gold- oder Silberimplantate eingesetzt bekam ^[2].

Die erste schriftliche Dokumentation einer Rekonstruktion stammt von Fallopius (1523 - 1562), der ebenfalls Gold als Knochenersatz verwendete ^[3]. Die erste dokumentierte xenogene Knochen transplantation wurde 1668 in Moskau durch Job Janszoon van Meekeren beschrieben ^[4]. Er führte eine erfolgreiche Rekonstruktion des Schädeldachs mit Hilfe eines Hundeknochens an einem russischen Soldaten durch. Bei der späteren Entfernung des Implantats zeigte sich bereits eine gute Einheilung des Knochen transplantates ^[5,6].

Experimentelle Untersuchungen mit der Frage nach geeigneten Knochenersatzmaterialien fanden ab Mitte des 19. Jahrhunderts statt. In zahlreichen Tierversuchen ^[7,8,9] wurde immer wieder versucht, den begrenzt zur Verfügung stehenden autologen Knochen durch Ersatzwerkstoffe zu ersetzen. So nahm z.B. Hamilton ^[10] desinfizierte Schwämme zur Defektdeckung, Gluck ^[11] Elfenbein, Dreesman ^[12] Gips und Tarsoly u. Tomory ^[13] versuchten, Eierschalen (Calciumcarbonate) zu verwenden.

Oiller war einer der Ersten, der 1867 in seinem Werk über Knochenregeneration die experimentell-wissenschaftlichen Grundlagen der Knochen transplantation formulierte und die Begriffe autogene, allogene und xenogene Transplantate (siehe Tabelle 1) einführte ^[14].

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurde von Barth das Verhalten von Knochenimplantaten histologisch untersucht ^[15,16]. Er war der Meinung, dass nach

einer Transplantation alle Knochenelemente abstarben und lediglich als Leitschiene für den vom Transplantatlager neugebildeten Knochen dienten. Er kreierte damit den Begriff des „schleichenden Ersatzes“ und der Leitschieneffunktion des Transplantates. Entsprechende Beobachtungen wurden unabhängig von Barth zeitgleich in den USA von Curtis gemacht ^[17], und Phemister bezeichnete später diese dynamischen Umbauvorgänge bei Knochenimplantationen als „Creeping Substitution“ ^[18]. Die Arbeit von Barth wurde dann von Axhausen und Lexer weitergeführt. In umfassenden Experimenten an Ratten, Hasen und Hunden konnten sie zeigen, dass Knochenneubildung vom Transplantat selbst ausging. Aufgrund histologischer Untersuchungen wiesen sie nach, dass autogene Knochenimplantate den allogenen überlegen sind und xenogene Implantate keinerlei regenerative Potenz besitzen ^[19,20,21,22,23].

Auch heute, 100 Jahre später, gilt der Einsatz von autogenen Knochenimplantaten als Knochenersatzmaterial (KEM) immer noch als Goldstandard.

1.1.2 Einteilung

Biomaterialien sind per definitionem „nicht-körper-eigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und ihre (Teil-) Funktionen ersetzen“ ^[24]. Die Verwendung von Biomaterialien zur Behandlung von skelettalen Defekten führt zum Begriff der Knochenersatzmaterialien, deren Gebrauch und Entwicklung in den letzten 3 Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen haben. Dies führte in den letzten Jahren zu einer starken Zunahme an erhältlichen Knochenersatzmaterialien. So ist der Bedarf an Knochen und Knochenersatzmaterialien ganz erheblich, da jährlich ca. 250.000 Knochenimplantationen allein in den USA durchgeführt werden ^[25].

Die Knochenersatzmaterialien werden terminologisch nach ihrer Herkunft unterschieden. Ferner lassen sie sich in biologische und synthetische Knochenersatzmaterialien einteilen ^[3]. Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über die Einteilung.

Autologer Knochen entstammt dem eigenen Körper. Er hat die größte Potenz zur knöchernen Regeneration eines Defektes und gilt deshalb als Goldstandard. Doch leider ist die Verfügbarkeit von autologem Material sehr begrenzt; es kann aus dem Kieferwinkel, der Kinnregion oder aus dem Beckenkamm, einer Rippe oder dem

Tabelle 1 a: Einteilung der Knochenersatzmaterialien (KEM) nach ihrer Herkunft
b: Einteilung der Knochenersatzmaterialien nach biologisch und synthetisch

a) Einteilung der Implantate bzw. Transplantate nach ihrer Herkunft	
Autolog	Vom selben Individuum stammend
Allogen	Von einem genetisch anderen Individuum der selben Art stammend
Xenogen	Von artfremder Herkunft
Alloplastisch	Körperfremd, synthetisch (z.B. Metalle, Kunststoffe, Keramik)

b) Biologische KEM	Synthetische KEM
Allogen: <ul style="list-style-type: none"> - Lyoknochen - Lyoknorpel - AAA-Knochen 	Keramisch: <ul style="list-style-type: none"> - Bioaktives Glas - Calciumzirkonium - β-Tricalciumphosphat - Hydroxylapatit - Glasionomere
Xenogen: <ul style="list-style-type: none"> - Hydroxylapatit - Kollagen - Calciumcarbonate - Perlmutter - Eierschale 	Polymere: <ul style="list-style-type: none"> - Polymethylmethacrylat - Polymilchsäure - Polyglykolsäure

Schienbein gewonnen werden. Die Entnahme in der erforderlichen Menge ist allerdings zeitaufwendig und bedingt größere chirurgische Eingriffe, die mit nicht unerheblichen Risiken verbunden sind. So ist evtl. ein Zweiteingriff notwendig, es kommt zu einem damit verbundenen postoperativen Schmerz, die Operationsdauer ist verlängert, das Infektionsrisiko an der Entnahmestelle erhöht, höhere Kosten entstehen und der Vorrat an autogenem Knochenmaterial ist begrenzt. Größere Knochendefekte, wie sie z.B. bei komplizierten und ausgedehnten Splitterbrüchen vorkommen, können auf diese Weise nicht versorgt werden ^[24,26].

Eine Alternative dazu ist die Verwendung von allogenen Knochenersatzmaterial. Dieses stammt von menschlichen Spendern, das von der Knochenbank bezogen

werden kann. Zur Anwendung kommen demineralisierter gefriergetrockneter Knochen (DFDBA, Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft) oder auch die nicht demineralisierte Form (FDBA, Freeze-Dried Bone Allograft), die aus Leichenspenderknochen gewonnen werden. Jedoch ist der Einsatz nicht routinemäßig, da gewisse Nachteile vorhanden sind. So besteht die Gefahr unter anderem im potentiellen Infektionsrisiko, insbesondere HCV und HIV. Die Vorteile bestehen in der idealen Leitstruktur des Materials für das Einwachsen des eigenen Knochens, auch Osteokonduktion genannt. Außerdem ist es osteoinduktiv, d.h. es regt die Knochenneubildung an. Desweiteren kann es auch bei größeren Defekten in Form von Knochenblöcken eingesetzt werden.

Xenogene Materialien sind pflanzlichen oder tierischen Ursprungs. Zu den bekanntesten Vertretern zählen das aus bovinem Knochen gewonnene Bio-Oss®, das equine Bio-Gen® sowie das aus Algen hergestellte Algipore®. Sie alle haben Hydroxylapatit (HA) als Basis. Durch bekannt werden der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) wurde die Sicherheit von Bio-Oss® diskutiert. Wissenschaftlich wird es aber als absolut sicher eingestuft. Xenogene Materialien zeichnen sich durch ihre hohe Osteokonduktivität aus.

Aufgrund der oben erwähnten Risiken haben bei der Behandlung entzündlicher, tumorbedingter, posttraumatischer oder angeborener Knochendefekte besonders in den letzten zwei Jahrzehnten neben der Nutzung der genannten Materialien auch synthetische (alloplastische) Knochenersatzmaterialien an Bedeutung gewonnen ^[27]. Sie sollen die Gefahr der Infektionen reduzieren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, ihre Eigenschaften den Erfordernissen der unterschiedlichen Einsatzgebiete anzupassen.

Die derzeit am häufigst verwendeten Materialien sind β -Tricalciumphosphat (β -TCP) und Hydroxylapatit ^[28,29,30]. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie synthetisch mit genau definierbaren physio- und kristallchemischen Eigenschaften herstellbar sind, eine gleichbleibende Chargenqualität (chemische Zusammensetzung und Reinheit) besitzen und so eine besser abschätzbare biologische Reaktion hervorrufen. Desweiteren sind sie immunologisch inert, atoxisch, nicht teratogen und nicht kanzerogen^[31]. Darüber hinaus zeichnen sie sich durch hohe Druck- und geringe Zugfestigkeit, ähnlich dem natürlichen Knochen aus ^[28]. Weitere Materialien sind Tricalciumphosphat (TCP) in Verbindung mit HA, Glaskeramik, Kalziumsulfat und

polymere Zucker. Sie alle sind rein osteokonduktiv und nicht osteoinduktiv.

Knochenersatzstoffe sind den Biomaterialien zugeordnet. Dieser Begriff umfasst eine Vielzahl von Werkstoffen, die in den Organismus implantiert werden, um biologische Strukturelemente zeitlich begrenzt oder dauerhaft in deren (Teil-) Funktionen zu ersetzen. Mit dem Einsatz von Biomaterialien für den Knochenersatz soll die Knochenheilung unter anderem hinsichtlich der Menge und Qualität des neu gebildeten Knochens, der Geschwindigkeit der Einheilung des Implantats sowie der mechanischen Belastbarkeit im Vergleich zum autogenen knöchernen Transplantat beeinflusst werden ^[32].

Eine notwendige Voraussetzung für die Anwendung eines Werkstoffes als Biomaterial ist seine Biokompatibilität.

1.2 Biokompatibilität

Biokompatibilität wird im Lexikon definiert als „Qualität der gegenseitigen Toleranz mit dem Leben“ und leitet sich aus dem Griechischen (bios = Lauf des Lebens) und dem Lateinischen (compatibilis = gegenseitig tolerant gegenüber) ab ^[33].

Die Biokompatibilität (Gewebeverträglichkeit) ist der Schlüssel zum Einsatz aller Werkstoffe in einer biologischen Umgebung ^[34] und beschreibt die Fähigkeit dieser Stoffe, durch aktive Wechselwirkung mit körpereigenen Proteinen und Zellen ein bestimmtes (erwünschtes) Funktionsergebnis in einem Empfängerorganismus zu erzielen ^[35]. Dabei werden die Strukturkompatibilität, die sich auf die mechanischen Eigenschaften bezieht, und die Oberflächenkompatibilität, die die chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberflächeneigenschaften des Implantats beeinflussen, betrachtet.

Auf dem speziellen Gebiet der Implantate im Knochenkontakt unterscheidet man noch folgende Grade der Kompatibilität:

Biotoleranz

Wenn ein Implantat nicht vom Organismus aufgelöst oder abgebaut werden kann, wird es durch eine Weichgewebsschicht abgekapselt. Direkt nach der Implantation lagern sich auf der Oberfläche körpereigene Serumproteine ab, die während der Adsorption eine Änderung ihrer Konformation bzw. ihres Oxidationszustandes

erfahren können. Dies führt zum Auftreten inflammatorischer Reaktionen und letztlich zu einer Distanzosteogenese. D.h. der Spalt zwischen Knochen und Implantat wird vom Körper nicht durch neugebildeten Knochen geschlossen. Als Beispiele sind hier Stahl oder Cobaltbasislegierungen zu nennen ^[36].

Bioinertheit

Ein Implantat wird nicht mehr als körperfremd identifiziert, wenn die Serumproteine während ihrer Adsorption keine Konformationsänderung erfahren. Es werden keine Reaktionen im umliegenden Gewebe ausgelöst und man spricht von einem bioinerten Material. Es kommt zu punktförmigen Verbindungen zwischen Metall und Knochen, einer sogenannten Kontaktosteogenese. Beispiele für bioinerte metallische Biomaterialien sind hier Titan und seine Legierungen ^[36].

Bioaktivität

Bei manchen Werkstoffen kommt es zu einer direkten chemischen Verbindung zwischen dem umliegenden Gewebe und der Implantatoberfläche. Es entsteht eine zugfeste Verbindung mit optimierten Integrationseigenschaften, eine sogenannte Verbundosteogenese. Solche Materialien wie etwa Hydroxylapatit oder Kollagen werden daher als bioaktive Substanzen bezeichnet ^[36].

Die Biokompatibilität eines Werkstoffes wird unter anderem durch die Freisetzung von Substanzen (Löslichkeit/Korrosion) aus eben diesem Werkstoff bestimmt.

Diese Substanzen können Zellen schädigen oder, indem sie die zelluläre Synthese bestimmter Proteine anregen (z.B. proinflammatorische Mediatoren wie die Interleukine 1 und 6), Entzündungen hervorrufen. Für das biologische Verhalten ebenso wichtig (z.B. für die Anlagerung von Zellen/Bakterien an Werkstoffoberflächen) ist die auf dem Werkstoff adsorbierte Proteinschicht bzw. die Interaktion des Werkstoffes mit der extrazellulären Matrix. Die Adsorption von Proteinen (in der Mundhöhle z.B. die Bildung einer Pellikel aus Speichelproteinen) wird durch die chemischen Eigenschaften der Werkstoffoberfläche ebenso beeinflusst wie durch die physikalischen (z.B. die Benetzbarkeit / Oberflächenspannung) ^[37].

Ebenso spielt heute die gezielte Beeinflussung des Stoffwechsels benachbarter

Zellen durch ein Biomaterial eine zunehmend wichtigere Rolle (bioaktive Stoffe). Dabei werden Werkstoffoberflächen speziell vorbehandelt, z.B. durch die Beschichtung einer Titanoberfläche mit Signalproteinen (z.B. BMP = Bone Morphogenetic Protein), um die Knochenanlagerung zu verbessern. Hinsichtlich der Knochenregeneration unterscheidet man osteokonduktive Werkstoffe (dienen als Gerüst zum Einwachsen von Vorläufer-Osteoblasten) von osteoinduktiven (induzieren die Bildung neuen Knochens durch Differenzierung pluripotenter lokaler Bindegewebszellen in knochenbildende Zellen) [37].

Um besonders bei den neu entwickelten Biomaterialien schädigende Auswirkungen des Materials auf das Gewebe und den Organismus bzw. das Versagen der gewünschten Materialfunktion zu vermeiden, ist eine exakte und verlässliche biologische Prüfung der Materialien auf ihre Zell- und Gewebeverträglichkeit eine unabdingbare Voraussetzung.

1.3 Biokompatibilitätsprüfung

Die Biokompatibilitätsprüfung umfasst verschiedene Testverfahren, die für die Zulassung eines Biomaterials für die klinische Anwendung entscheidend sind. Sie ist eine vorklinische Prüfung, d.h. erst wenn diese positiv bestanden ist, darf das entsprechende Biomaterial am Menschen angewendet werden. Die Prüfungen müssen nach genau festgelegten Normen (ISO 10993, EN 30993 u. DIN EN ISO 7405:1997) durchgeführt werden [38].

In der Regel erfolgt die Testung der Implantatwerkstoffe in der folgenden Reihenfolge:

- *In vitro*-Tests mit isolierten Zellen;
- Anwendung und Applikationstechnik an Tieren (*in vivo*-Tests);
- Klinische Studien am Menschen

In vitro-Tests, also die Durchführung von Zell-, Gewebe- und Organtests, werden grundsätzlich am Anfang einer Biokompatibilitätsbestimmung durchgeführt, bevor Tierversuche in Erwägung gezogen werden. Neuere Entwicklungen gehen dahin, eine zunehmende Anzahl von Parametern, die bisher nur in Tierversuchen zu ermitteln waren, in *in vitro*-Tests zu bestimmen. Dies erfordert umfangreiche Forschungen. Die klinischen Studien am Menschen stellen die letzte Teststufe dar, und ergeben erst den umfassenden Aufschluss über die Biokompatibilität des Implantatwerkstoffes im

Biosystem Mensch; denn nur in *in vivo*-Studien können alle möglichen Veränderungen im menschlichen Gewebe und Organismus, die durch den Werkstoff induziert wurden, festgestellt werden ^[39].

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Studie war es, die antibakterielle Wirksamkeit sowie die Biokompatibilität der Calciumphosphatzemente (CPC) Hydroxylapatit und Brushit, die mit 1% Silber dotiert waren, im Vergleich zu nicht silberdotierten CPC anhand verschiedener *in vitro*-Untersuchungen zu ermitteln.

Dazu wurden entsprechende Prüfkörper aus den zu untersuchenden Zementarten hergestellt und zunächst die Abbindezeit und Druckfestigkeit untersucht. Es sollte dadurch ermittelt werden, inwieweit der Zusatz von Silber diese Eigenschaften beeinflusst. Außerdem wurden mittels eines Massenspektrometers das Freisetzungsverhalten von Silber und Calcium aus den verschiedenen Prüfkörpern analysiert.

Anschließend wurde in Versuchen mit den Bakterienstämmen Staphylococcus (Staph.; S.) aureus und Staphylococcus epidermidis die antibakterielle Wirksamkeit der silberdotierten Zemente eruiert. Anhand der Ergebnisse sollte die Eignung der Zemente z.B. für die Vermeidung von postoperativen Infektionen bei Verwendung als Knochenersatzmaterial beurteilt werden.

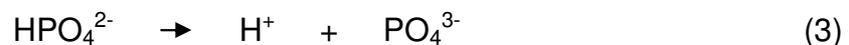
Die Biokompatibilität wurde in einer Osteoblasten-Zellkultur (Osteoblastenzelllinie MG-63) überprüft; dazu wurde auf den jeweiligen Oberflächen die Zellzahl und die Zellaktivität bestimmt. Mittels der Ergebnisse sollte die grundsätzliche Eignung der silberhaltigen Zemente zur Verwendung im menschlichen Organismus evaluiert werden.

Abschließend wurden sowohl von den reinen, unbewachsenen als auch von den mit Bakterien bzw. Zellen besiedelten Oberflächen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um die entsprechenden Besiedelungsdichten zu visualisieren.

2. KENNTNISSTAND

2.1 Calciumphosphate (CaP)

Knochenersatzmaterialien auf CaP-Basis leiten sich von der Orthophosphorsäure (H_3PO_4), einer dreibasigen, mittelstarken Säure ab. Unter Abspaltung von Wasserstoff kann sie in 3 Schritten dissoziiert werden (Gleichung 1-3):



Sie bildet dabei primäre (Dihydrogenphosphat), sekundäre (Hydrogenphosphat) und tertiäre Phosphate (Phosphat) ^[40]. Die Verbindungen mit Calcium lassen sich in verschiedenen Ca/P-Verhältnissen differenzieren. Mit Ausnahme von Fluorapatit gehören sie alle dem Dreistoffsystem $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ an. Die wichtigsten CaP der Orthophosphorsäure sind in Tabelle 2.1 beschrieben. Die Einteilung erfolgt nach stöchiometrischer Zusammensetzung anhand festgesetzter Ca/P-Verhältnisse von 0,5 – 2,0. Allgemein gilt: Je kleiner die Verhältnisse, desto saurer und besser wasserlöslich ist das Calciumphosphat ^[41]. Eine detaillierte Übersicht über die Herstellung und die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Verbindungen wird in der Literatur gegeben ^[40].

MCPM

Monocalciumphosphat- Monohydrat ist das am besten wasserlösliche und am stärksten saure Calciumphosphat. Es kann auch aus stark sauren Lösungen gefällt werden. Oberhalb von 100 °C wandelt es sich unter Abspaltung von Wasser in Monocalciumphosphat- Anhydrid um. Wegen seiner Azidität und hohen Löslichkeit ist MCPM nicht biokompatibel. Es kann deshalb nicht allein als Knochenersatzwerkstoff angewandt werden. In Kombination mit verschiedenen CaP, wie z.B. $\alpha\text{-TCP}$ ^[42] und $\beta\text{-TCP}$ ^[43] hingegen findet es Verwendung zur Herstellung von Bruschiit-bildenden Zementen als auch als Säuerungsmittel in Nahrungsmitteln ^[44].

Tabelle 2.1: Zusammensetzung und Löslichkeitsprodukte (LP) verschiedener Calciumphosphate. Die in Klammern aufgeführten Abkürzungen beziehen sich auf die englischen Trivialnamen

Verbindungen	Summenformel	Ca/P	Log(LP) bei 37 °C
Monocalciumphosphat Monohydrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$	0,5	löslich
Monocalciumphosphat Anhydrid (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0,5	löslich
Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (DCPD, Bruschit)	$\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0	6,63
Calciumhydrogenphosphat Anhydrid (DCPA, Monetit)	CaHPO_4	1,0	7,04
Octacalciumphosphat (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$	1,33	95,9
α-Tricalciumphosphat (α-TCP)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5
β-Tricalciumphosphat (β-TCP)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	29,5
Hydroxylapatit (OHAp)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1,67	58,6
Fluorapatit (Fap)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	1,67	---
Tetracalciumphosphat (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2,0	37,4

MCPA

Monocalciumphosphat Anhydrid wird entweder durch Ausfällung oder durch Erhitzung von MCPM über 100 °C gewonnen [45]. Ebenso wie MCPM ist es nicht biokompatibel und wird deshalb nur in der Düngemittelindustrie eingesetzt [46,44].

DCPD

Calciumhydrogenphosphat- Dihydrat (Bruschit) ist das CaP, welches am einfachsten synthetisiert werden kann. Es entwässert oberhalb von 80 °C leicht zu Dicalciumphosphat- Anhydrid. Weiterhin kann es durch Variation des pH-Wertes zu Veränderungen in der Kristallstruktur kommen. So kann es durch seine Metastabilität bei $\text{pH} < 6$ in Calciumhydrogenphosphat Anhydrid, bei pH zwischen 6 – 7 in Octacalciumphosphat und bei einem $\text{pH} > 7$ in Hydroxylapatit umgewandelt werden. *In vivo* kann es zu einer Umwandlung zu calciumarmen Hydroxylapatit [47] oder zu einem Abbau mit knöcherner Substitution kommen [48]. Man findet es ebenso in

geringen Mengen bei der Ausbildung eines Frakturkallus ^[49], im menschlichen Knochen ^[50] sowie in Nierensteinen ^[51,52]. Desweiteren wird es in der Chirurgie in Calciumphosphatzementen verwendet ^[47,48,52,53,54].

DCPA

Calciumhydrogenphosphat- Anhydrid (Monetit) kristallisiert oberhalb von 100 °C aus wässriger Lösung heraus. Verwendung findet es hauptsächlich in der Herstellung von Calciumphosphatzementen sowie als Calcium- und Phosphatzusatz in Lebensmitteln. In geringen Mengen konnte es im Frakturkallus sowie im Knochen nachgewiesen werden ^[49,50].

α-TCP

α-Tricalciumphosphat (α-TCP) besitzt die exakt gleiche chemische Zusammensetzung wie β-Tricalciumphosphat, aber eine davon verschiedene kristallographischen Struktur. Es gehört genauso wie β-TCP zu den high temperature CaP, welche durch einen Sinterprozess gewonnen werden. Die Herstellung erfolgt durch Sinterung eines DCPA / CaCO₃ – Gemisches im Verhältnis 2:1 nach der Reaktion:



Bei einer Sintertemperatur von über 1125 °C entsteht dabei die metastabile Hochtemperaturmodifikation α-TCP; dies ist leichter löslich als die β-Variante und besitzt eine höhere Reaktivität. Außerdem kann durch Einbringen in wässrige Elektrolyte calciumreduziertes Hydroxylapatit gewonnen werden, das eine geringere Löslichkeit zeigt als TCP ^[55]. Diese Eigenschaft wird zur Herstellung von apatitbildenden Calciumphosphatzementen auf Basis von α-TCP genutzt ^[56]. Desweiteren wird es auch als Düngemittel verwendet ^[44].

β-TCP

β-Tricalciumphosphat ist die Niedrigtemperaturvariante von TCP. Es wird durch Sinterung bei einer Temperatur 1000 – 1100 °C gewonnen. Durch einen erneuten Sinterprozess kann es reversibel in α-TCP umgewandelt werden. Aufgrund seiner

stabileren Phase bei Raumtemperatur, weist β -TCP eine geringere Löslichkeit als die α -Variante auf. Es kommt nur in Verbindung mit Magnesium als Mineral namens Whitlockit im Zahnstein, Blasensteinen und als Verkalkungen im Weichgewebe vor [57,58,59]; als reine Form wird es im menschlichen Körper nicht aufgefunden. In der Chirurgie kommt β -TCP sowohl als Reinform [60,61] als auch in Mischung mit Hydroxylapatit (biphasisches Calciumphosphat) [62] als Knochenersatzwerkstoff zum Einsatz. Die Degradation von β -TCP durch Osteoklasten und dessen Ersatz durch Knochen wurde tierexperimentell über einen Zeitraum von 1,5 Jahren beobachtet [63]. Neben der Verwendung als Biomaterial, wird es auch in der Industrie zur Herstellung von Tierfutterzusätzen und als Düngemittel verwendet [44].

Hydroxylapatit

HA stellt von allen Calciumphosphaten die am schlechtesten lösliche und daher stabilste Verbindung dar [64]. Es hat die höchste kristalline Struktur und ist das biokompatibelste CaP. Man kann es durch Mischung unterschiedlicher Calciumphosphate, z.B. Calciumhydrogenphosphat mit Calciumcarbonat und einer anschließenden Sinterung bei über 700 °C herstellen. Gesintertes HA weist dabei eine festere Kristallverbindung auf als durch eine Abbindereaktion entstandenes HA. In der Natur kommt rein stöchiometrischer HA nicht vor; allerdings besitzt es große Ähnlichkeiten zu dem in Zähnen und Knochen vorhandenen Hydroxylapatit. Aufgrund dessen wird HA häufig neben der Verwendung als KEM auch als biologisch aktive Oberflächenbeschichtung auf chirurgischen und zahnmedizinischen Implantaten eingesetzt [64,65].

TTCP

Tetracalciumphosphat ist das basischste CaP, wobei die Verbindung als Einzige ein höheres Ca/P-Verhältnis aufweist als Hydroxylapatit. Es wird in einer Festkörperreaktion von Calciumhydrogenphosphat und Calciumcarbonat, in äquimolaren Mengen, oberhalb von 1400 °C hergestellt [66]. Die Reaktion muss dabei in trockener Luft oder in Stickstoff von statten gehen; da TTCP in Gegenwart von Wasser instabil ist, würde es durch eine langsame Hydrolyse zu Hydroxylapatit und Calciumhydroxid zerfallen [40,67]. Verwendung findet TTCP vor allem zur Herstellung von CPC als Knochenersatzwerkstoff [68].

2.2 Calciumphosphatzemente

In den 1980ern wurde CPC erstmals von Brown und Chow ^[69] als neuartiges Biomaterial vorgestellt. Das erste kommerzielle CPC-Produkt wurde dann ca. 10 Jahre später für die Behandlung von maxillofacialen Defekten und Missbildungen ^[70], ebenso wie für die Behandlung von Knochendefekten ^[42] eingeführt. Heutzutage ist das Interesse an diesem Material immer noch ungebrochen, da es eine große Bandbreite an Möglichkeiten, vor allem als Knochenersatzmaterial bietet.

CPC entstehen durch das Anmischen einer wässrigen Lösung (z.B. dest. H₂O, Citratlösung u.a.) und einer oder mehrerer Calciumphosphatpulver. Man erhält eine frei formbare Paste, die innerhalb von wenigen Minuten abbindet. Dies ermöglicht es dem Behandler, nach dem Anmischen den CPC in einer angemessenen Zeit direkt an seinem Bestimmungsort, wo er *in situ* aushärtet, zu applizieren. Ein großer Vorteil besteht darin, dass man durch die freie Modellierbarkeit und hohe Anpassungsfähigkeit nicht auf die Defektform angewiesen ist. Allerdings ist die Defektgröße auf einen Bereich von weniger als 25 cm² limitiert ^[71].

Eine ausreichende Druckfestigkeit, osteokonduktive Wirkung, Ausbildung chemischer Verbindungen mit dem Knochen und die Ähnlichkeit zur mineralischen Komponente des Knochens zeichnen CPC hervorragend als Knochenersatzmaterial aus ^[72].

Abhängig von der Art des eingesetzten Ausgangswerkstoffs und dem pH-Wert der Zementpaste während des Abbindevorgangs, werden zwei Hauptgruppen von CPC differenziert. Zum einen entstehen im basischen oder neutralen Bereich (pH > 4,2) die Hydroxylapatit-Zemente, unterhalb dieses Wertes kommt es zur Ausbildung von Brushit-Zementen ^[73]. Aufgrund einer höheren Löslichkeitsrate als HA ist Brushit bereits unter physiologischen Bedingungen resorbierbar ^[74]. Grundsätzlich können alle Formulierungen, die zur Bildung von CPC führen, in Hydroxylapatit-bildende und Brushit-bildende Zemente eingeteilt werden.

2.2.1 Hydroxylapatit-bildende Zemente

Die Hydroxylapatit-bildenden Zemente können in zwei- und einkomponentige Zemente eingeteilt werden. Wie in Gleichung (5) und (6) dargestellt, benötigen erstere als Ausgangswerkstoffs für HA-Zemente fein gemahlene, basische

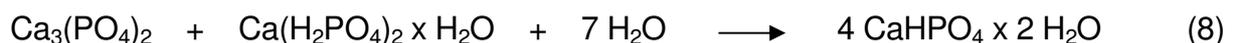
Tetracalciumphosphat (TTCP) oder Calciumoxid ^[75] in Verbindung mit leicht saurem Calcium-hydrogenphosphat-Anhydrid (DCPA), -Dihydrat (DCPD) oder Octacalciumphosphat (OCP) ^[76]. Als flüssige Phase kommt Wasser zur Verwendung. Die einkomponentigen Zemente hingegen können aus α -TCP hergestellt werden, die nach Gleichung (7) zu calciumarmen HA abbinden ^[77].



Für das TTCP + DCPA/DCPD – Zementssystem ist Wasser kein Bestandteil der Abbindereaktion, sondern lediglich ein Transportmedium, das nicht verbraucht wird. Da die Aushärtungszeit des Zementes bei Verwendung von Wasser ca. 30 min beträgt und für den klinischen Gebrauch daher zu lange dauern würde, können Abbindebeschleuniger wie Phosphorsäure oder Alkaliphosphate eingesetzt werden. Durch Verwendung von z.B. 0,25 mol Natriumphosphatlösung kann die Dauer der Abbindereaktion auf 5-8 min verkürzt werden ^[78]. Zudem kann durch Mahlung der Zementedukte und der dadurch entstehenden größeren Oberfläche, eine Steigerung der Löslichkeitsrate erreicht werden, was wiederum zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führt ^[79].

2.2.2 Bruschiit-bildende Zemente

Für die Bildung von Bruschiit ist ein pH-Wert unter 4,2 nötig. Durch die Verwendung von sauren Calciumphosphaten wie β -TCP und MCPM oder Phosphorsäure, kann dies erreicht werden. Die Abbindereaktion ist in Gleichung (8) und (9) dargestellt:



Da die Geschwindigkeit der Abbindereaktion bei Bruschiit im Vergleich zu Hydroxylapatit aufgrund der hohen Kristallwachstumsrate nur ca. 30–60 s beträgt, ist die Verwendung von Abbindeinhibitoren von Nöten. Durch den Einsatz von Citraten,

Pyrophosphaten oder Sulfaten ist dabei eine klinisch akzeptable Abbindezeit von 3-8 min zu erzielen ^[80]. Bruschnit-bildende Zemente sind unter physiologischen Bedingungen löslich und damit rein chemisch resorbierbar. Sie werden daher schneller degradiert als Hydroxylapatit-bildender Zement, dessen Abbau nur über die Osteoklasten erfolgt ^[81]. Ein Nachteil des Bruschnit ist dessen, vergleichend zu HA, geringe mechanische Belastbarkeit (Druckfestigkeit von Bruschnit ca. 15-25 MPa, von HA ca. 20-180 MPa) ^[82] sowie limitierte Injizierbarkeit, was eine breite Anwendung im klinischen Bereich verhindert.

2.2.3 Calciumphosphatzemente als Depotsysteme

Calciumphosphatzemente werden seit ihrer Entdeckung 1983 verwendet und haben sich aufgrund ihrer Biokompatibilität, Ostokonduktivität und Resorptionseigenschaften als hervorragendes Knochenersatzmaterial herausgestellt ^[83]. Durch zahlreiche Studien wurde gezeigt, dass CPC auch als sogenanntes *drug delivery system* zur kontrollierten Wirkstoff-Freisetzung eingesetzt werden kann. So wurden bereits therapeutische Peptide ^[84], Antibiotika ^[85,86], Antiinflammativa ^[87], Zytostatika ^[88] sowie Knochenwachstumsfaktoren ^[89] erfolgreich mit den Zementen kombiniert. Die Möglichkeit, CPC als Depotsystem zu nutzen, ist für den klinischen Bereich von großem Interesse; nicht zuletzt dadurch, dass injizierbare Calciumphosphatzemente durch minimal invasive Eingriffe appliziert werden können. So können sie z.B. sehr sinnvoll in der Behandlung von verschiedenen Krankheiten wie Knochentumoren, Osteoporose oder Osteomyelitis eingesetzt werden, die normalerweise einer langen und schmerzhaften Therapie bedürfen. Desweiteren können sie die Heilung von Knochenbrüchen beschleunigen und spielen außerdem eine große Rolle bei der Infektionsbekämpfung und -prophylaxe.

Anders als bei Calciumphosphat-Keramiken, bei denen lediglich die Oberfläche mit den verschiedenen Wirkstoffen beschichtet werden, können diese bei den Zementen in das ganze Materialvolumen eingefügt werden, indem sie einer der zwei Zementphasen beigemischt werden. Dies ermöglicht die Abgabe des Wirkstoffes über einen länger andauernden Zeitraum.

Allerdings beeinflusst der Zusatz von Wirkstoffen in den CPC die physikalisch-chemischen und mechanischen Eigenschaften ^[86,90,91,92,93]. So neigen generell mit

Antibiotika beladene Hydroxylapatit-Zemente zu einer verlängerten Abbindezeit und einer reduzierten mechanischen Belastbarkeit^[91,92,93]. In einem anderen Fall wird eine Verlängerung der Abbindezeit und der mechanischen Belastbarkeit von Bruschit-Zementen beschrieben^[86].

2.3 Silber

2.3.1 Aus der Geschichte des Elements Silber

Silber war neben Kupfer und Gold eines der bedeutendsten Metalle der Geschichte, das die Menschen benutzten. Als besonderes Edelmetall wurde es in der Geschichte sehr geschätzt. Die ersten Funde stammten aus der Zeit der Ägypter ca. 4000-5000 Jahre vor Christus. Die Assyrer kannten es als „sapru“, die Germanen verwendeten das Wort „salibra“, die Goten „silubr“ und die Römer nannten es „argentum“ (nach dem griechischen Wort „argyros“). Damals hielt man es sogar für wertvoller als Gold. Gewonnen wurde das Silber meistens aus den Minen in Laurion (etwa 50 Kilometer südlich von Athen).

In Europa wurden im Mittelalter Silbererzvorkommen in Böhmen, Sachsen, in der Slowakei und im Harz entdeckt, was die Prägung von Silbermünzen in Mitteleuropa ermöglichte. Da im Mittelalter das Silber der Mondgöttin Luna geweiht wurde, wurde für lange Zeit ein Halbmond als chemisches Symbol für Silber verwendet.

Seit Anfang des 16. Jahrhunderts brachten dann die Spanier erhebliche Mengen von Silber aus Amerika nach Europa, wodurch der Wert des begehrten Metalls drastisch sank.

Das chemische Symbol „Ag“ wurde schließlich 1814 von dem Chemiker J.J. Berzelius eingeführt.

Der deutsche Name „Silber“ stammt von dem althochdeutschen Wort „Silabar“ ab, was soviel bedeutet wie „licht-glänzend“^[94,95,96].

2.3.2 Verwendung von Silber

Silber ist heute das meist gebrauchte Edelmetall. Es wird seit Jahrhunderten für wertvolles und gutes Essbesteck, Tafelsilber und Kirchengesamtes verwendet. Silber

eignet sich vorzüglich für Schmuck, wurde aber auch in Form von Silbermünzen schon als Zahlungsmittel benutzt. Silber besitzt eine hohe elektrische und thermische Leitfähigkeit sowie eine ausgeprägte optische Reflexion. Dadurch ist es für Anwendungen in Elektrik, Elektronik und Optik bestens geeignet. Die Schwärzung der Silbersalze durch Licht wird beim Fotopapier genutzt und bildet seit etwa 1850 die Grundlage der Photographie. Silberlegierungen (mit Kupfer, Nickel, Zink, Zinn, Indium, etc.) werden in der Technik als Lötlegierungen (Hartlöten), als Leitmaterial und als Kontaktmaterialien verwendet. Zahnärzte verwenden eine Legierung aus Quecksilber und Silber (Amalgam) für Zahnfüllungen. Außerdem wird Silber in der Kosmetik und für Batterien sowie als Lebensmittelfarbstoff E 174 im Speisebereich verwendet. Aufgrund seiner antiseptischen, fungiziden und bakteriziden Wirkung findet Silber auch in der Medizin Anwendung ^[94,95,96].

Die medizinische Verwendung von Silber ist bereits uralt. So wurde Silber schon in der Antike zur beschleunigten Wundheilung, Infektionsbekämpfung und vor allem zur Haltbarmachung von Trinkwasser eingesetzt. Als sehr frühes Beispiel lässt sich die in China entwickelte Akupunktur erwähnen, bei der schon sehr bald und bis heute vornehmlich Silbernadeln eingesetzt werden. Auch andere Völker wussten bereits 1000 v. Chr. die schützenden Eigenschaften von Silber zu schätzen. So ist eine empirische Anwendung schon von den Griechen in der Antike, Alexander dem Großen, Cyrus und im Sanskrit überliefert ^[97].

Auch hierzulande nutzten bereits unsere Vorfahren die Wirkung des Silbers: Neben der medizinischen Verwendung gelangte Silber insbesondere zur Haltbarmachung von Lebensmitteln zum Einsatz. Anschauliches Beispiel hierfür ist die Silbermünze in der Milch, die zur Verlangsamung des Gärungsprozesses durch Reduktion der Milchsäurebakterien führt.

Die moderne Geschichte des Silbers in der medizinischen Anwendung beginnt Ende des 19. Jahrhunderts; 1869 berichtete der Wissenschaftler Ravelin über die antibakterielle Wirksamkeit von Silber schon in sehr niedriger Konzentration. Grundlegende Forschungsarbeiten wurden jedoch vor allem von dem Schweizer Botaniker C. von Nägeli (1817-1891) durchgeführt; Nägeli setzte sich als Erster ausführlich und wissenschaftlich mit dem antimikrobiellen Effekt des Silbers auseinander. Er belegte anhand von Versuchen, dass bereits geringe Spuren von Silber ausreichen, um Mikroorganismen abzutöten ^[98].

Der deutsche Gynäkologe Carl Sigmund Franz Credé (1819-1892) empfahl 1881, durch das Einträufeln von 1%iger Silbernitrat-Lösung in das Auge von Neugeborenen, einer möglichen eitrigen Bindehautentzündung durch die Übertragung von Gonokokken der Mutter vorzubeugen^[99].

2.3.4 Eigenschaften von Silber

Silber ist ein chemisches Element aus der elften Gruppe (Kupfergruppe) des Periodensystems und gehört zu den Edelmetallen. Seine natürlichen Isotope sind 107 (51,839 %) und 109 (48,161 %); außerdem sind zahlreiche künstliche Silber-Isotope mit Halbwertszeiten zwischen 0,22 s (^{124}Ag) und 418 a ($^{108\text{m}}\text{Ag}$) bekannt. In der Natur wird Silber auch in gediegener Form (Reinform) gefunden und tritt meist in Form von Körnern oder als drahtig verästeltes Geflecht in Hydrothermaladern auf. Das meiste Silber wird allerdings aus Silbererzen wie z.B. Argentit, Stromeyerit oder Miargyrit gewonnen. Als seltenes Element kommt es nur zu ca. 0,079 ppm in der Erdkruste vor.

Silber ist ein weiß glänzendes, polierfähiges, weiches und nach Gold das dehnbarste Edelmetall. Es kann aufgrund dieser Eigenschaften zu feinsten blaugrün durchschimmernden Folien mit einer Stärke von nur ca. 2,5 μm ausgehämmt und zu bis zu 2 Kilometer langen Drähten (Filigrandrähte) ausgezogen werden.

Unter Normaldruck liegt die Schmelztemperatur bei 961,93 °C, die Siedetemperatur bei 2212 °C, die Mohshärte beträgt 2,5 und die Dichte 10,49 g/cm³ (bei 20 °C). Außerdem besitzt es die beste elektrische und thermische Leitfähigkeit aller Metalle und hat das höchste Reflexions- und Absorptionsvermögen für Licht.

Das Metall kristallisiert im kubischen-flächenzentrierten Kristallsystem. Die kubische Form des Silbers ist 3C; daneben sind noch die polymorphen Formen 2H und 4H bekannt. Abbildung 2.1 zeigt eine Auswahl bekannter Kristallstrukturen und -kombinationen, die von Victor Mordechai Goldschmidt im „Atlas der Krystallformen“ (1923) veröffentlicht wurden:

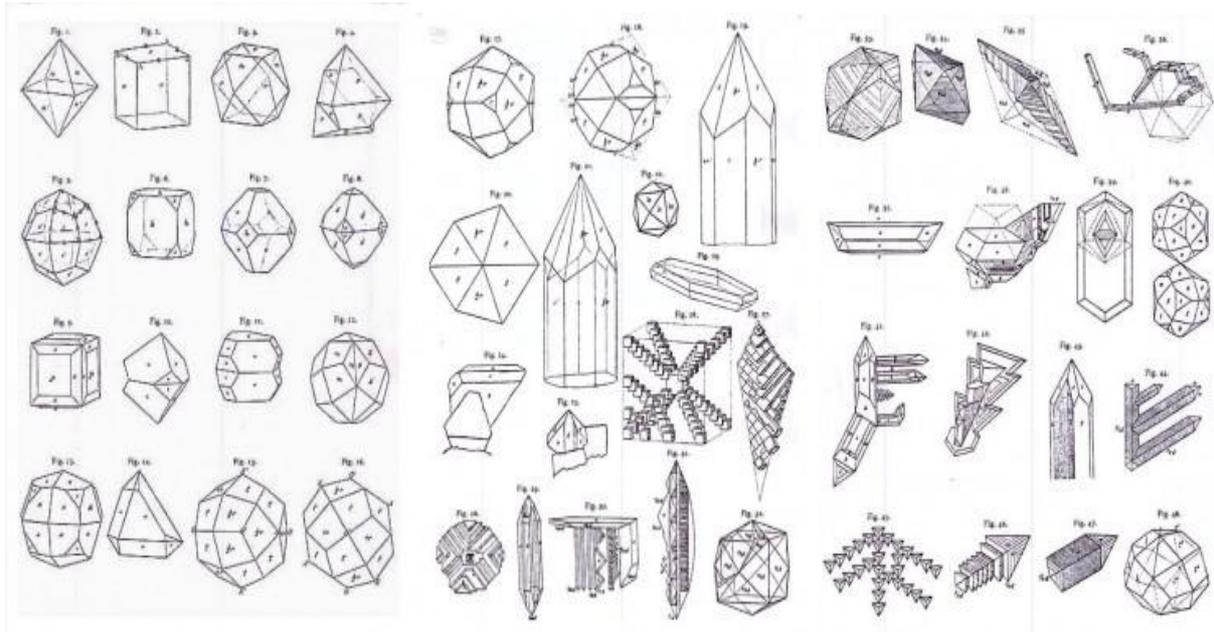
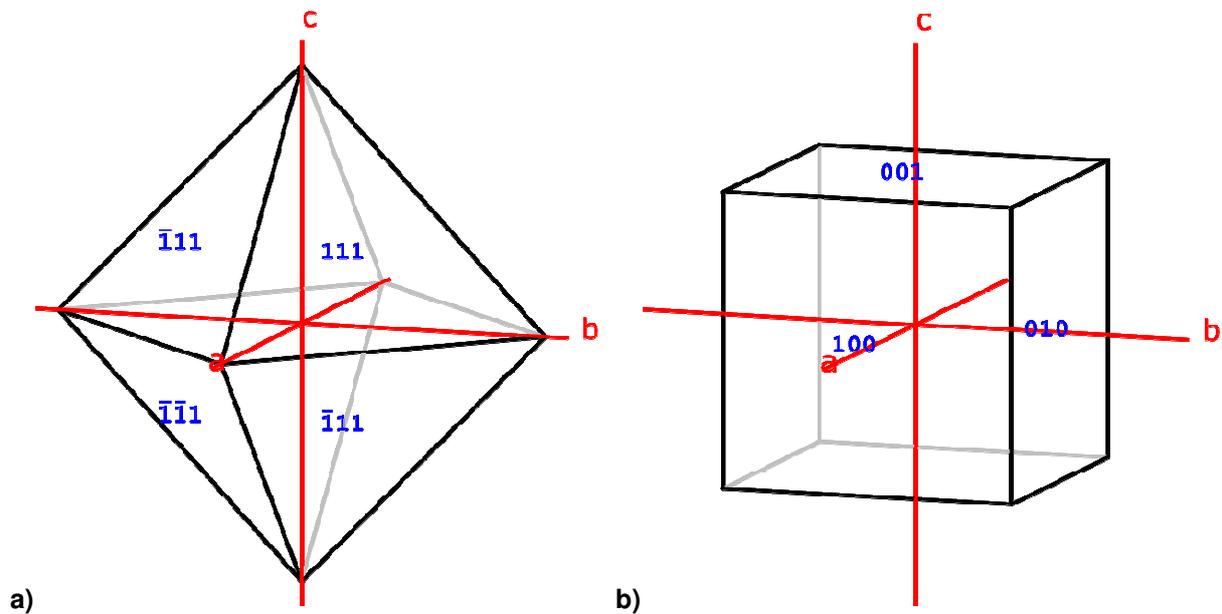


Abbildung 2.1: Kristallformen von Silber ^[100]

Mark Holtkamp (www.smorf.nl) entwickelte auf Basis der vorliegenden Skizzen eine Datenbank über die dreidimensionale Kristallstruktur verschiedener Mineralien. Abbildung 2.2 zeigt hier die am häufigsten auftretenden Kristallformen von Silber ^[101].



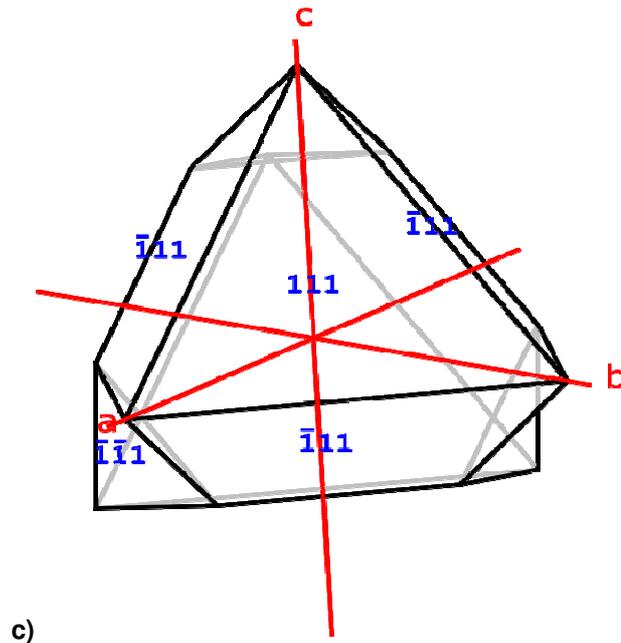


Abbildung 2.2 a-c: Varianten der dreidimensionalen Struktur des Silberkristalls (mit freundlicher Genehmigung von Mark Holtkamp)^[101]

Um die Festigkeit von Silber zu erhöhen, wird es meist mit anderen Metallen, wie z.B. Kupfer legiert. Dies ist heutzutage die wichtigste Silberlegierung. Ebenso lässt sich Silber auch mit Gold oder Palladium gut legieren. Einzig mit Cobalt und Eisen ist keine Silberlegierung möglich.

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Material

3.1.1 Puffer und Medien

Das Reinstwasser wurde aus der laboreigenen Wasseraufbereitungsanlage (USF PURELAB PLUS) entnommen.

PBS-Puffer

8,0 g Natriumchlorid NaCl, (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 , (Fa. Merck AG, Darmstadt)

1,1 g Dinatriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, (Fa. Merck AG, Darmstadt)

0,2 g Kaliumchlorid KCl, (Fa. Merck AG, Darmstadt)

ad 1000 ml Reinstwasser

autoklavieren bei 121 °C; 20 min

Foetal Bovine Serum (FCS)

EU approved origin (South America)

Mycoplasma and virus screened, performance tested,

inaktiviert durch 30 min Inkubation bei 56 °C

(Fa. Invitogen Life Technologies, Karlsruhe)

DMEM-Kulturmedium

440 ml Dulbecco's Mod Eagle Medium mit 0,11 g/l Na Pyr. mit Pyridoxine,
(Fa. Invitogen Life Technologies, Karlsruhe)

50,0 ml Foetal Bovine Serum (FCS), (Fa. Invitogen Life Technologies, Karlsruhe)

5,0 ml Penicillin-Streptomycin 10.000 IU/l - 10.000 IU/ml, (Fa. Invitogen Life Technologies, Karlsruhe)

5,0 ml Hepes Buffer (Solution 1M), (Fa. Invitogen Life Technologies, Karlsruhe)

LB (Luria Bertoni)- Medium

5,0 g BBL™ Yeast Extract, Hefeextrakt, (Fa. Becton, Dickinson & Company, USA)

10,0 g Bacto™ Tryptone (Pankreatisch abgebautes Casein), (Fa. Becton, Dickinson and Company, USA)

5,0 g Natriumchlorid NaCl, (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

ad 1000ml Reinstwasser

autoklavieren bei 121 °C, 20 min

LB (Luria Bertoni)- Medium mit Natriumnitrat

5,0 g BBL™ Yeast Extract, Hefeextrakt, (Fa. Becton, Dickinson & Company, USA)

10,0 g Bacto™ Tryptone (Pankreatisch abgebautes Casein), (Fa. Becton, Dickinson and Company, USA)

5,0 g Natriumnitrat NaNO₃ (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim)

ad 1000ml Reinstwasser

autoklavieren bei 121 °C, 20 min

Accutase

Zur enzymatischen Ablösung der Zellen von Zellkulturoberflächen

(Fa. PAA Laboratories, Cölbe)

Aceton

(Fa. Merck, Darmstadt)

Isoton-Pufferlösung

9,72 g/l Natriumsulfat, wasserfrei

4,00 g/l Natriumchlorid

1,00 g/l Dimethylolharnstoff

0,11 g/l Procainhydrochlorid

Die isotone, phosphatgepufferte Lösung wurde gebrauchsfertig geliefert. (Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld)

Proliferations-Reagent WST-1

Farbstoff WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat), angesetzt nach Angaben des Herstellers. (Fa. Roche Diagnostica, Mannheim)

WST-1 ist ein wasserlösliches Tetrazoliumsalz, welches zur Bestimmung der Zellaktivität dient. Es wird durch metabolisch aktive Zellen gespalten und in den Mitochondrien mittels Dehydrogenase zu farbigem Formazan umgewandelt. Es ist somit ein Marker für die Zellaktivität.

Chemikalien zur Zementherstellung

CaHPO₄: 136,06 g/mol Calciumphosphat Dibasic Anhydrous Powder (J.T. Baker, Best. Nr. 1430-07)

CaCO₃: 100,09 g/mol Calciumcarbonat (Merck, Best. Nr. 175091)

AgNO₃: 169,87 g/mol Silbernitrat (Merck, Best-Nr. 1.01512)

Ca(H₂PO₄)₂: 234,02 g/mol Calcium-bis-dihydrogenphosphat Monohydrat (MCPM) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Best-Nr. 307645)

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.1: Verbrauchsmaterialliste

Verbrauchsmaterial:	Herkunft:
24-Well-Zellkulturplatten	Fa. Nunc, Wiesbaden
96-Well-Zellkulturplatten	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Bechergläser	Fa. Schott, Mainz
Bruschit-Scaffolds	Eigene Produktion, FMZ
Combitips plus 10 ml	Fa. Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (12 mm)	Fa. Hartenstein, Würzburg
Einmalspitzen	Fa. Sarstedt, Nürnberg
Eppendorfcaps	Fa. Eppendorf, Hamburg
Eppendorfpipette	Fa. Eppendorf, Hamburg
Glasflaschen	Fa. Schott, Mainz
Glaskolben und –zylinder	Fa. Schott, Mainz

Glasschalen (rund, eckig)	Fa. Hartenstein, Würzburg
HA-Scaffolds	Eigene Produktion, FMZ
Kulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
Latexhandschuhe, puderfrei	Klinikum der Universität Würzburg
Magnetrührstäbchen	Fa. Hartenstein, Würzburg
Mörser, Pistill	Fa. Hartenstein, Würzburg
Pasteurpipetten	Fa. Scherf, Meiningen
Pinzette (gebogen, gerade)	Fa. Hartenstein, Würzburg
Pipettierhilfe Pipetus	Fa. Brand, Wertheim
PP-Röhrchen (10 ml, 40 ml)	Fa. Hartenstein, Würzburg
Schere	Fa. Hartenstein, Würzburg
Spatel	Fa. Hartenstein, Würzburg
Zählgefäße	Fa. Hartenstein, Würzburg

3.1.3 Geräte

Tabelle 3.2: Geräteliste

Geräte:	Herkunft:
Analysewaage	Fa. Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Autoklav Tuttnauer 3870 ELV	Fa. Systec, Wettenberg
Brutschrank IG 150	Fa. Jouan, Unterhaching
Critical Point Dryer CPD 030	Fa. Baltec, Witten
3D-Drucker Z-Printer 310	Fa. Z-Corporation, Erlangen
Drehschüttler	Fa. Labinco, Holland
Druckprüfmaschine Zwick 1440	Fa. Zwick-Roell, Ulm
Elisa Reader Spectraflour Plus	Fa. Tecan, Crailsheim
Goldbestäuber Emitech K550	Fa. Emitech, England
Heizofen	Fa. Memmert, Schwabach
ICP-MS	Fa. Varian Deutschland GmbH, Darmstadt
Kaffeemühle KSW 2669	Fa. Clatronic, Kempen
Kugelmühle PM 400	Fa. Retsch, Haan
Kühl-Gefrierkombination	Fa. Bosch, Heiligenstadt

Kryo-Einfriergerät	Fa. Nunc, Wiesbaden
Labormikroskop DMIL	Fa. Leica, Wetzlar
Magnetrührer	Fa. IKA Werke, Staufen
Multipipette	Fa. Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Rasterelektronenmikroskop DSM 940	Fa. Zeiss, Göttingen
Reinstwasseranlage	Fa. USF Pure Lab Plus, Ramsbach-Baumbach
Röntgendiffraktometer, Siemens 5005	Fa. Siemens, Karlsruhe
Sinterofen	Fa. Oyten Thermothechnik GmbH, Oyten
Sterilarbeitsbank	Fa. Heraeus, Hanau
Trockenschrank VT 6060 M-BL	Fa. Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Fa. Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Wasserbad	Fa. Memmert, Schwabach
Zellzähler, Typ CASY	Fa. Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge	Fa. Jouan, Unterhaching

3.1.4 Computerprogramme

Tabelle 3.3: Computerprogrammliste

Computerprogramme:	Herkunft:
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San Jose (USA)
Magellan 3	Tecan Deutschland, Crailsheim
Microsoft Office Vista 2007	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Origin Pro 8G	OriginLab Corporation, Northampton (USA)

3.1.5 Bakterienstämme

Staphylokokken sind ca. 1 µm große, grampositive, unbewegliche und sporenlose Bakterien, welche zur Familie der Micrococcaceae gehören. Sie wurden bereits vor über 120 Jahren von Ogston (1883) als eine Gruppe von Entzündungs- und

Eitererregern beschrieben ^[102]. Ihr Name leitet sich von der Erscheinungsform (*Staphyle* [Traube] und *Kokkos* [Kern]) ab. In der ursprünglich von *S. aureus*, *S. epidermidis* und *S. saprophyticus* vertretenen Gattung sind heute 36 verschiedene Arten bekannt ^[103]. Sie lassen sich nach ihrer Fähigkeit, Blutplasma zur Gerinnung zu bringen, in zwei Klassen unterteilen: Koagulase-positive und Koagulase-negative (KNS) Staphylokokken. Hauptvertreter der KNS sind *S. aureus* und *S. epidermidis*.

3.1.5.1 *Staphylococcus aureus* (RN 4220, gram⁺)

Bei bis zu zwei Drittel der gesunden Bevölkerung zählt *Staphylococcus aureus* zur normalen gesunden Haut- und Schleimhautflora. *S. aureus* unterscheidet sich von den anderen Staphylokokkenarten durch eine gelbfarbene Pigmentierung der Kolonien ^[104].

S. aureus ist die Ursache für ein breites Spektrum an Krankheiten, von harmlosen Wundinfektionen, lokalen Furunkeln und Abszessen bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen wie Endokarditis, Osteomyelitis, Sepsis oder dem "toxic shock syndrome" ^[105]. *S. aureus* bleibt trotz einer ganzen Reihe sehr wirksamer Medikamente einer der wichtigsten und vielseitigsten Erreger in der klinischen Medizin ^[105]. Dies resultiert einerseits aus seiner extremen Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen (z.B. Bildung von small-colony-variants (SCV) ^[106,107] und seiner großen pathogenen Vielseitigkeit, andererseits aus dem momentan immer größer werdenden Problem der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen bisher wirksame Antibiotika. Das Problem der Bildung von Multiresistenzen gegen Antibiotika stellt insbesondere im Krankenhaus für immunsupprimierte Patienten eine große Gefahr dar.

3.1.5.2 *Staphylococcus epidermidis* (Stamm RP62A, gram⁺)

Koagulase-negative Staphylokokken waren bisher als relativ harmlose Kommensale auf der Haut bekannt. Insbesondere *S. epidermidis* hat sich in den vergangenen zwei Jahrzehnten zunehmend neben *S. aureus* als humanpathogene Erreger etabliert. *S. epidermidis* stellt neben *S. aureus* einen Großteil der menschlichen Hautflora dar ^[108]. Man bezeichnet *S. epidermidis* als einen opportunistischen Keim, da er nur bei

einem immungeschwächten Wirt Infektionen auslösen kann. Tatsächlich besitzt *S. epidermidis* nur eine beschränkte Anzahl an Toxinen und Virulenzfaktoren. Die Pathogenität von *S. epidermidis* beruht in erster Linie auf der Fähigkeit, an künstlichen Oberflächen zu adhären, mehrschichtige Biofilme auszubilden und relativ schnell Antibiotikaresistenzen zu erwerben ^[109].

Sehr oft kann sich *S. epidermidis* bei beeinträchtigten Patienten zum primären Erreger entwickeln. So sind beispielsweise AIDS-Kranke, Krebs-Patienten oder Frühgeborene besonders gefährdet, da ihr Immunsystem künstlich unterdrückt oder noch nicht vollständig ausgebildet ist. Die Infektionen finden meist über intravenöse Katheter statt, die einen Zugang von der Haut zum Blutkreislauf ermöglichen ^[110,111]. Bereits am Katheter findet eine Biofilmbildung statt.

Jegliche Art von Dauerkathetern oder künstlichen Implantaten können von Infektionen durch *S. epidermidis* betroffen sein. In den meisten Fällen besteht die einzige wirksame Therapie darin, den infizierten Fremdkörper zu entfernen und durch einen neuen zu ersetzen ^[112].

3.1.6 Osteoblastenzelllinie MG-63

Die Osteosarkomzelllinie MG-63 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) bezogen. Erstmals beschrieben wurde sie 1977 ^[113]. Ursprung dieser stabilen, reproduzierbaren Zelllinie sind Zellen, die aus dem Osteosarkom eines 14-jährigen männlichen Kaukasiers isoliert wurden. In Kultur gebracht, wachsen die Zellen adhären und zeigen eine fibroblastoide Morphologie. Genetisch liegt eine Abweichung vom normalen Chromosomensatz vor. Die fungierenden Rezeptoren sind TGF- β (transforming growth factor) R I und TGF- β R II.

Die Zellkultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre unter einer 5%igen CO₂-Begasung. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Mod Eagle Medium verwendet.

3.1.7 Polystyrol als Referenzmaterial

Als Negativkontrolle wurde das Zellkultur-Polystyrol (Fa. Nunc, Dänemark) benutzt.

Diese Referenzoberfläche wurde direkt als Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen verwendet, welche gebrauchsfertig geliefert wurde. Auf der Polystyrol-Oberfläche konnte während der Zellversuche das Wachstum bzw. das Ablöseverhalten der Zellkulturen unter dem Mikroskop kontrolliert werden.

3.2 Methode

3.2.1 Herstellung von Tricalciumphosphat

Für die Herstellung der verschiedenen CaP wurden die oben aufgelisteten Chemikalien (siehe Kapitel 3.1.1) verwendet. Die folgende Tabelle zeigt die pulverförmigen Einzelkomponenten:

Tabelle 3.4: Konzentrationsverhältnisse der CaP

Summenformel:	CaHPO ₄	CaCO ₃	AgNO ₃
$\alpha/\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,15 mol (292,53 g)	1 mol (100,09 g)	
$\alpha/\beta\text{-Ca}_{2,97}\text{Ag}_{0,03}(\text{PO}_4)_2$	2,15 mol (292,53 g)	0,97 mol (97,09 g)	0,03 mol (5,1 g)

Herstellung von Ag⁺-dotiertem α/β -TCP (N1%)

Es wurde 97,09 g (0,97 mol) Calciumcarbonat, 292,53 g (2,15 mol) Calciumhydrogenphosphat sowie 5,1 g (0,03 mol) Silbernitrat abgewogen und in eine Duranflasche (Fa. Schott) gegeben. Anschließend wurde die Flasche zu gut dreiviertel mit bi-destilliertem Wasser aufgefüllt, ein Magnetfisch hinzugegeben und für ca. 2 h auf dem Magnetrührer gemischt. Danach wurde die Flüssigkeit in mehrere Nierenschalen überführt und ca. 12 h bei 100 °C im Trockenschrank (Fa. Heraeus) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Das so gewonnene Pulver wurde anschließend in einen Aluminium-Oxid-Sintertiegel gefüllt und im Sinterofen (Fa. Oyten) gesintert. Die Sinterung von α -TCP (Ag⁺-dotiert) erfolgte bei 1400 °C für 5 h und die von β -TCP (Ag⁺-dotiert) bei 1050 °C für ebenfalls 5 h. Die Aufheizphase wurde mit einer Temperatursteigerung von 25 °C/min (α -TCP) bzw. 10 °C/min (β -TCP) durchgeführt.

Die Abkühlung des Sinterkuchens wurde durch schrittweises Absenken des Sintertiegels aus dem Ofen (ca. 10 cm/0,5 h) beschleunigt.

Mit einem Mörser und Pistill wurde der vollständig abgekühlte Sinterkuchen nun grob zerkleinert und manuell auf eine Korngröße $<355 \mu\text{m}$ gesiebt.

Danach erfolgte die Mahlung der Pulver $<355 \mu\text{m}$ in der Planetenkugelmühle (Fa. Retsch), wobei die Mahlparameter für das Ag^+ -dotierte α - bzw. β -TCP unterschiedlich waren. 125 g des α -TCP wurden in einen 500 g Achatmahlbecher gegeben und bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 200 U/min, einer Mahlbecherfüllung mit 6 Achatkugeln ($d = 30 \text{ mm}$) sowie einem Wechsel der Rotationsrichtung nach jeweils einer Minute für 8 h gemahlen. Die entsprechende Menge β -TCP wurde bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 200 U/min, einer Mahlbecherfüllung mit 4 Achatkugeln ($d = 30 \text{ mm}$), einem minütlichem Wechsel der Rotationsrichtung sowie einer Mahldauer von 1 h gemahlen.

Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die verschiedenen Pulverzemente in feuchtigkeitsdicht verschließbaren PE-Gefäßen gelagert.

Herstellung von α -/ β -TCP

α - und β -TCP, die als Referenz für die Versuche benötigt wurden, wurde freundlicherweise von der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnheilkunde bereits fertig gesintert und gemahlen zur Verfügung gestellt. Sie werden entsprechend den oben beschriebenen Zementen hergestellt. Silber wird hier weggelassen, aber dafür 3 g (0,03 mol) CaCO_3 mehr verwendet.

3.2.2 Herstellung von Calciumphosphat-Zementen

Zur Herstellung von Bruschit bzw. Ag^+ -dotiertem Bruschit wurde zusätzlich Calciumbis-dihydrogenphosphat Monohydrat (MCPM) benötigt. Dabei wurden äquimolare Pulvermengen abgewogen (entsprechend 23,26 g β -TCP bzw. Ag^+ -dotiertem β -TCP und 17,56 g MCPM) und für eine Minute in einer elektrischen Kaffeemühle (Fa. ClaTronic) gemahlen.

Zur Fertigstellung der Prüfkörper wurde das Pulvergemisch mit einer Citronensäure (0,1 mol/l), die als Abbindeverzögerer fungiert, versetzt.

Zur Herstellung von Hydroxylapatit bzw. Ag⁺-dotiertem Hydroxylapatit wurde lediglich eine flüssige Phase zugesetzt. α-TCP bzw. Ag⁺-dotiertes α-TCP wurde dabei mit einer 2,5%-NA₂HPO₄-Lösung angemischt.

3.2.3 Herstellung der Prüfkörper

Die verschiedenen Prüfkörper wurden unter genauer Einhaltung des Pulver-Flüssigkeit-Verhältnisses von 3:1 als Rundproben (passend für die 24-Well-Zellkulturplatten) hergestellt. Dabei wurde 3 g Zementpulver auf einer Analysewaage abgewogen; mittels einer Pipette wurde 1ml entsprechender Flüssigkeit (siehe 3.2.2) zugesetzt und mithilfe eines Anrührspatels 30 s möglichst blasenfrei und homogen vermischt. Anschließend wurde der Zement zügig in eigens hergestellte Silikonformen gefüllt, in denen sich runde Aussparungen mit einem Durchmesser von ca. 15,2 mm und einer Höhe von ca. 0,25 mm befanden. Die so befüllten Silikonformen ließ man nun bei 37 °C im Wasserbad aushärten. Nach dem Abbinden wurden die einzelnen Prüfkörper mit einem Nassschleifpapier (1000-er Körnung) beschliffen, um eine möglichst gleichmäßig feine Oberfläche für die anschließenden biologischen Versuche zu erhalten.

3.2.4 Röntgendiffraktometrie (XRD)

Die Bestimmung der Phasenzusammensetzung für die Pulvermischungen α-/β-TCP, Ag⁺-dotiertes α-/β-TCP sowie für die abgebundenen Zemente HA, Ag-HA, Bruschit und Ag-Bruschit, welche vorher mittels Mörser und Pistill wieder zu einem Pulver gemahlen wurden, erfolgte mit einem Röntgendiffraktometer (Siemens 5005, Fa. Siemens Karlsruhe).

Das zu analysierende Pulver wurde mit leichtem Überschuss auf den Probenträger aufgetragen, mit einer Glasplatte komprimiert und geglättet, um eine möglichst homogene Oberfläche zu erzeugen. Der Probenträger wurde nun mittig in die Haltevorrichtung des Röntgendiffraktometers eingespannt.

Die Aufnahme des Beugungsmusters erfolgte mit der Cu K_α-Strahlung bei einer Beschleunigungsspannung von 40kV und einem Emissionsstrom von 40mA. Alle Diffraktogramme wurden im Winkelbereich von 20° bis 40° bei einer Schrittweite von

0,02° aufgenommen und mit den Referenzbeugungsmustern von α -TCP (PDF-Nr. 09-0359), β -TCP (PDF-Nr. 09-0169), Bruschit (PDF-Nr. 09-0077) und Hydroxylapatit (PDF-Nr. 09-0432) verglichen.

3.2.5 Anwendungsrelevante Eigenschaften

3.2.5.1 Initiale Abbindezeit nach Gilmore

Hydroxylapatit und Ag^+ -dotiertes Hydroxylapatit

Die Abbindezeit ist definiert durch die Zeitspanne zwischen Anmischen und Aushärtung eines Zements gemäß der ASTM-Norm ^[114]. Die Abbindezeit wurde durch die Penetrationsmethode nach Gilmore bestimmt. Die Durchführung der Messung erfolgte in einer Feuchtigkeitskammer, welche durch zwei angeschlossene Wasserbäder auf 37 ± 1 °C temperiert wurde und für eine relative Luftfeuchtigkeit von mehr als 90 % sorgte. Dadurch sollte ein Verdampfen der flüssigen Phase des Zementes während der Abbindereaktion vermieden werden. In der Mitte der Bodenplatte befand sich die drehbare Aufnahme der herausnehmbaren Probenform, welche eine plättchenartige Vertiefung (12 x 3 mm) für die Aufnahme der Zementpaste besaß. Zur Vermeidung von Kondenswasser an Gilmore-Nadel (Gewicht 113,398 g, Durchmesser 2,117 mm) und Probenform wurden diese auf eine Temperaturen von 37 ± 1 °C gebracht. Die feste und flüssige Phase wurden wie oben beschrieben (siehe 3.2.3) gemischt, und anschließend in die Probenform eingebracht. Die Zementoberfläche wurde mit einer Glasplatte homogen flach abgestrichen. In Zeitabständen von 30 s wurden manuell, durch Absenken der Nadel auf die Oberfläche, Abdrücke in die erhärtende Zementmatrix eingebracht. Sobald die Nadel nicht mehr in die Oberfläche eindrang, galt der Zement als abgebunden. Die Beurteilung erfolgte makroskopisch. Eine Nachbeurteilung der Impressionen der Zementoberfläche erfolgte im Mikroskop bei 5–10facher Vergrößerung.

Bruschit und Ag^+ -dotiertes Bruschit

Da die Abbindezeit von Bruschit-bildenden CPC nur im Sekundenbereich liegt, musste hier auf die Methode des Gilmore-Nadeltests verzichtet werden. Alternativ griff man auf die Bestimmung der Verarbeitungszeit zurück. Dafür wurden Bruschit

bzw. Ag^+ -dotiertes Bruschit mit der flüssigen Phase wie oben beschrieben zur Zementpaste angemischt und mit den Fingern zu einem Würfel geformt. Sobald die Struktur des Würfels nicht mehr verändert werden konnte, ohne dass Risse innerhalb des Würfels entstanden wären, galt der Zement als abgebunden.

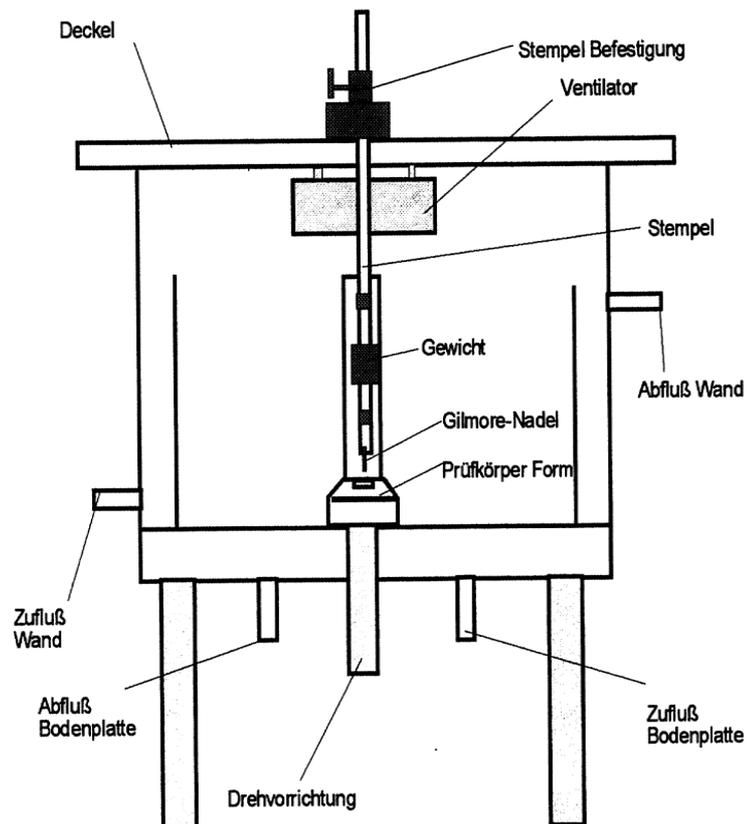


Abbildung 3.1: Feuchtigkeitskammer zur Bestimmung der Abbindezeiten

3.2.5.2 Druckfestigkeit

Zur Herstellung der Probenkörper wurde Zementpaste nach den oben genannten Spezifikationen und Verfahren angemischt. 3 g des Zementpulvers wurden mit der flüssigen Phase und einem Pulver / Flüssigkeits-Verhältnisses (PLR) von 3.0 auf einer Glasplatte vermengt. Die Paste wurde in eine Silikonform aus gleichen Teilen Dublisisil 15 A und Dublisisil 15 B (Dreve Dentamid GmbH, Unna) mit den Maßen 6 mm x 6 mm x 12 mm überführt. Nach Aushärtung (1 h) wurden die Probenkörper mit SiC-Schleifpapier (Körnung 800 μm) plan geschliffen, mit Wasser überschichtet und für

24 h in einem Wasserbad bei 37 °C ausgelagert.

Die Messung der Druckfestigkeit erfolgte anschließend an der statischen Druckprüfmaschine Zwick 1440 (Fa. Zwick-Roell, Ulm). Die Druckprüfkörper wurden dazu aufrecht stehend zwischen zwei planen Edelstahlstempeln platziert und in Richtung der Längsachse belastet. Die Prüfung erfolgte mit 1 mm/min Vorschub, 5 N Vorlast und bis zum Bruch der Prüfkörper oder wenn sich aufgrund mangelnder Härte eine Druckzunahme nicht mehr nachweisen ließ.

Die Druckfestigkeit (compressive strength, CS) wurde berechnet nach:

$$CS[\text{MPa}] = F_{\text{max}} / r^2\pi \text{ (mm}^2\text{)}$$

mit

F_{max} = Bruchkraft (N)

r = Probenkörperradius

3.2.6 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Messprinzip

Die induktiv gekoppelte Plasma - Massenspektrometrie (inductively coupled plasma –mass spectrometry) ist eine Technik, welche die gleichzeitige Bestimmung von nahezu allen Elementen des Periodensystems und ihrer Isotope erlaubt. Die Hauptvorteile dieser Technik bestehen aus der hohen Sensitivität und der geringen benötigten Probenmenge. Deshalb hat sich die ICP-MS Technik in den letzten Jahren zu einer der wichtigsten Methoden der Spurenanalytik entwickelt.

Das Verfahren der ICP-MS beruht auf der Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Plasma bei etwa 5.000 °C. Zur Erzeugung des Plasmas wird ein hochfrequenter Strom in ionisiertes Argon induziert. Anschließend werden die im Plasma generierten Ionen in Richtung des Analysators des Massenspektrometers durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Dort werden die einzelnen Elemente und deren Isotope messtechnisch erfasst. Der Messbereich liegt dabei zwischen 1 und 100 ppb.

Auslagerung der Proben und Durchführung

In der vorliegenden Arbeit sollte nun mittels der Massenspektrometrie analysiert

werden, welche Menge an Ag^+ und Ca^{2+} aus den verschiedenen Zementen freigesetzt wurden.

Um das Degradationsverhalten der Zemente zu analysieren, wurden die Prüfkörper in verschiedenen Medien (PBS, LB-Medium) ausgelagert. Pro Zementart und Medium wurden jeweils 3 frisch hergestellte Prüfkörper in 250 ml Glasflaschen (Fa. Schott) überführt und mit 30 ml des entsprechenden Mediums bedeckt. Nach 24 h wurde ein Teil des gebrauchten Mediums in 10 ml PP-Röhrchen abgefüllt, das übrige Medium mit Hilfe einer Pasteurpipette abgesaugt und wieder neues Medium hinzugegeben. Das Verfahren wurde 7 Tage lang täglich wiederholt.

Für die Analyse wurden von jeder Zementverbindung je 3 neue Prüfkörper (direkt nach der Herstellung), je 3 Prüfkörper, die in PBS ausgelagert wurden, als auch je 3 Prüfkörper, die in LB-Medium ausgelagert wurden, mittels einer 65%igen suprapuren Salpetersäure (Best.-Nr. 100441, Fa. Merck, Darmstadt) aufgelöst und mit Reinstwasser verdünnt.

Außerdem nahm man auch Messungen an den Ausgangspulvern (α -/ β -TCP sowie Ag^+ -dotiertes α -/ β -TCP), die ebenfalls vorher aufgelöst und verdünnt wurden, vor. Desweiteren wurden die Eluate (PBS, LB-Medium) und die auf den Prüfkörpern befindlichen Bakterienkulturen untersucht.

Die Ergebnisse wurden anschließend mittels OriginPro 8G graphisch dargestellt.

3.2.7 Vorbereitung der Prüfkörper für Bakterien- und Zellkulturversuche

Um eine Fremdkontamination durch andere Keime auszuschließen, mussten die verschiedenen Prüfkörper (je 180 Stück) vor Versuchsbeginn sterilisiert werden. Die HA- und Ag^+ -dotierten Hydroxylapatit (Ag-HA) -Prüfkörper wurden dafür in eine saubere Glasschale überführt und anschließend bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Da die Bruschit- und Ag^+ -dotierten Bruschit (Ag-Bruschit) -Prüfkörper bei einer Autoklavierung in Monetit umgewandelt werden würden, wurden diese mittels 70%igem Ethanol sterilisiert. Sie wurden dafür je in eine große Glasschale einzeln nebeneinander gelegt und für ca. 20 min mit 400 ml Ethanol bedeckt.

Da die Prüfkörper nach der Herstellung einen sauren pH-Wert von ca. 5,5-6,5 aufwiesen, wären sie für die nachfolgenden Bakterien- und Zellkulturversuche nicht geeignet gewesen. Deshalb mussten sie erst noch über mehrere Tage in einem

entsprechenden Medium ausgelagert werden, um ihren pH-Wert auf einen neutralen Wert anzuheben. Dafür wurden die nun sterilen Prüfkörper in den Glasschalen unter der Sterilbank mit autoklaviertem PBS-Medium (500 ml) vollständig bedeckt und nach jeweils 24 h das Medium gewechselt. Nach 7 Tagen stellte sich ein pH-Wert von ca. 7-7,5 ein. Danach wurde der Überstand mittels einer Pasteurpipette abgesaugt und die Prüfkörper nochmals autoklaviert (HA und Ag-HA) bzw. für 60 min sterilisiert, wobei sie nach 30 min gedreht wurden (Bruschit und Ag-Bruschit). Abschließend wurden sie einen Tag offen unter der Sterilbank zum Trocknen ausgelegt. Nach vollständiger Trocknung erfolgte die Lagerung in steril verschlossenen Glasschalen.

3.2.8 Bakterienkultivierung

Einfrieren der Keime zur Lagerung

Die Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* wurden bei -18 °C gelagert. Zuerst wurden einzelne Kolonien der Keime von einer Kulturplatte mit einer ausgeglühten Sonde abgeschabt. Diese Kolonien wurden dann im LB-Nährmedium 24 h bei 37 °C bebrütet. Danach wurden 0,3 ml der angesetzten Kulturen mit 0,7 ml Medium und 5% Glycerin in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und maximal 6 Monate bei -18 °C gelagert.

Herstellung der Übernacht-Kultur

Zur Kultivierung der Bakterien wurde pro Bakterienstamm je ein 10 ml PP-Röhrchen mit 10 ml LB-Medium und je eines mit 10 ml LB-Natriumnitrat-Medium befüllt. Daraufhin wurde jeweils 20 µl der entsprechenden Bakteriensuspension mittels einer Eppendorf-Pipette in die PP-Röhrchen hinzugegeben. Diese wurden nun für 24 h bei 37 °C im Schüttler bebrütet.

Herstellung der Vorkultur und Beimpfen der Prüfkörper

Dafür wurde in je ein 40 ml PP-Röhrchen pro Bakterienstamm 38 ml LB-Medium bzw. 38 ml LB-Natriumnitrat-Medium gefüllt und 2,7 ml der jeweiligen Übernacht-Kultur hinzupipettiert. Diese wurden wiederum für 2 h bei 37 °C im Schüttler bebrütet. Währenddessen wurden die 24-Well-Platten mit den Prüfkörpern bestückt. Pro

Oberfläche wurden 4 Prüfkörper eingelegt. Da jeder Stamm in zwei unterschiedlichen Medien getestet wurde, wurden dementsprechend pro Versuchsreihe 4 vorbereitete 24-Well-Platten benötigt.

Nach Beimpfung der Prüfkörper mit 1,5 ml der entsprechenden Bakteriensuspension wurden diese für weitere 24 h bei 37 °C im Schüttler bebrütet.

Zur Analyse der verschiedenen Struktur der Oberflächen sowie der Bakterien-Besiedelung der Prüfkörper wurden repräsentative Bilder mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops (REM) angefertigt.

3.2.9 Zellkultivierung

Die Kultivierung der Osteoblastenzelllinie MG-63 erfolgte bei einer Temperatur von 37 °C in 75 cm² großen Zellkulturflaschen (Falcon, Heidelberg) mit dem jeweils entsprechenden Medium (DMEM).

Für die nachfolgenden Versuchsansätze wurden Zellsuspensionen von 50.000 Zellen/ml benötigt. Hierzu wurde das DMEM-Medium in der Zellkulturflasche mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgezogen und die adhärenen Zellen zweimal mit je 10 ml PBS- Puffer gespült. Daran anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 2 ml Accutase und einer Inkubationszeit von 5 min enzymatisch abgelöst. Um die Wirkung von Accutase aufzuheben, wurden nach 5-7 min 10 ml Medium hinzupipettiert. Die gelösten Zellen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde homogenisiert und eine Zellzählung durchgeführt.

Um die gewünschten 50000 Zellen/ml zu erreichen, wurde die Suspension mit DMEM verdünnt. Nach einer erneuten Zellzählung wurde je 1 ml der Zellsuspension auf die Wells mit den entsprechenden Prüfkörpern verteilt.

Pro Messtag wurde jeweils eine Well-Platte für die Bestimmung der Zellzahl sowie für den WST-Zellaktivitätstest benötigt. Je Oberfläche wurden dabei vier Prüfkörper angesetzt.

Um hier ebenfalls die Struktur der unterschiedlichen Oberflächen sowie das Wachstumsverhalten der Zellen besser zu veranschaulichen, wurden zusätzlich Proben für die Rasterelektronenmikroskopie angesetzt.

3.2.10 WST-1 Zellaktivitätstest

Messprinzip

Dieser Versuch beruht auf der Umsetzung des Farbstoffes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolium]-1,3-Benzendisulfonat) durch die Succinatdehydrogenase in den Mitochondrien der stoffwechselaktiven Zellen zum farbigen Formazan.

Dieser Farbumsatz kann im ELISA-Reader (Fa. Tecan, Crailsheim) bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden. Je mehr vitale Zellen gewachsen sind, desto intensiver ist der Farbumschlag, bzw. desto höher ist die Extinktion. Diese ist proportional der Stoffwechselaktivität der Zellen.

Durchführung

Zur Durchführung des Tests wurde zunächst aus jeder Kavität der 24-Well-Platten das Medium vollständig abgezogen. Hiernach wurde jeweils 500 µl des 1:10 mit DMEM-Medium verdünnten WST-1 Reagents für die Zellkulturversuche bzw. 1:10 mit PBS verdünnten WST-1 Reagents für die Bakterienkulturversuche, den Prüfkörpern mittels einer Eppendorf-Pipettus hinzupipettiert und der Ansatz bei 37 °C für 30 min inkubiert. Als Leerwert dienten die entsprechenden WST-Lösungen.

Anschließend erfolgte die Übertragung von je 2 x 200 µl der Überstände direkt in die 96-Well-Platten. Die Überstände aus den Bakterientests wurden vorher für 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Die Intensität des Farbumschlags wurde im ELISA-Reader mit einem Messfilter von 450 nm und einem Referenzfilter von 690 nm ermittelt.

Die Bestimmung der Zellaktivität für die Zellkulturversuche erfolgte an den Messtagen 3, 5, 7 und 10.

Die Ergebnisse wurden mittels OriginPro 8G graphisch dargestellt.

3.2.11 Zellzahlbestimmung mit dem CASY-1 Zellanalysesystem

Messprinzip

Zur Bestimmung der Zellzahl kam der Zellzähler CASY-1, Modell TTC Cell Counter and Analyser (Schärfesystem GmbH, Reutlingen) zur Verwendung.

Das Messprinzip besteht in der Widerstandsmessung in Verbindung mit einer

Signalauswertung. Hierbei wird die Zellsuspension in eine Kapillare definierter Geometrie gesaugt, in der während der Messung über zwei Platinelektroden eine Spannung angelegt ist. Beim Durchtritt durch die Messkapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung.

Folglich ändert sich dadurch entlang der Kapillarstrecke der Widerstand, über den der Zellzähler die Zellzahl und das Volumen ermitteln kann.

Durchführung

Die Zellzahl wurde am Tag 3, 5, 7 und 10 nach Aussaat bestimmt.

Das vorgelegte Medium wurde zunächst abgezogen und die Zellschicht zweimal mit je 1 ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden je 500 µl Accutase zupipettiert und bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre für weitere 7 min inkubiert. Durch Zugabe von je 500 µl DMEM-Medium pro Well wurde die Reaktion zum Stoppen gebracht. Nach 20-maligem Aufziehen der Suspension mittels einer Eppendorf-Pipette zur Durchmischung wurden 100 µl in 10 ml sterile isotonische Lösung gegeben und im Zellzähler gemessen.

Die Ergebnisse wurden mittels OriginPro 8G graphisch dargestellt.

3.2.12 Elektronenmikroskopische Analyse der Oberflächen

Zur Beurteilung des Zementgefüges der verschiedenen Zemente sowie des Wachstums von Bakterien bzw. Osteoblasten auf den Prüfkörpern wurden mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops DSM 949 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) repräsentative Aufnahmen gemacht. Man verwendete dafür zum einen die durch die Druckfestigkeitsmessung zerbrochenen Prüfkörper und zum anderen die für die Rasterelektronenmikroskopie angesetzten Proben.

Da für eine Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop das zu untersuchende Objekt im Hochvakuum mit Elektronen beschossen wird, ist eine Reihe von Bedingungen einzuhalten. Das zu untersuchende Objekt darf weder beschädigt noch verunreinigt sein. Es darf zu keiner Formveränderung des Objekts oder Ausgasen kommen. Die Elektronen müssen auf eine elektrisch leitende Oberfläche auftreffen und dürfen nicht durch störende Aufladungen abgelenkt werden. Daher wurden die Zementkörper mit Gold beschichtet. Die Bakterien bzw. Osteoblasten wurden vor der

Beschichtung fixiert, entwässert und getrocknet.

3.2.12.1 Fixierung und Entwässern der besiedelten Prüfkörper

Die Fixierung der Bakterien erfolgte 24 h nach Beimpfen der Prüfkörper, die Fixierung der Osteoblasten 5 Tage nach deren Aussaat.

Dazu wurden die mit den Prüfkörpern bestückten 24-Well-Platten auf Eis gestellt und 3 x für je 1 min mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit 6,25%igem Glutaraldehyd in PBS auf Eis fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen bzw. Bakterien nochmals 5 x 5 min in PBS auf Eis gewaschen.

Die Dehydrierung der Proben erfolgte hierauf bei Raumtemperatur durch eine aufsteigende Acetonreihe. Dazu wurden die Prüfkörper in lösungsmittelbeständige Glasschalen überführt und 15 min in 30 %, 20 min in 50 %, 30 min in 75 % sowie 45 min in 90 % Aceton eingelegt. Zur vollständigen Entwässerung wurden die Präparate 5 x für 30 min in 100 % Aceton inkubiert. Bis zu Weiterverarbeitung wurden die Präparate bei Raumtemperatur in 100 % Aceton gelagert.

3.2.12.2 Kritisch-Punkt-Trocknung

Nach der Entwässerung folgte die Kritisch-Punkt-Trocknung der Prüfkörper mittels des Critical Point Dryer CPD C 30 (Fa. Bal-Tec). Dazu wurden die Präparate in eine auf ca. 9 °C gekühlte und mit 100% Aceton gefüllte Kammer eingebracht. Diese wurde verschlossen und mit flüssigem CO₂ aufgefüllt. Das Aceton wurde durch 10-maliges Ablassen und wieder Auffüllen durch flüssiges Kohlenstoffdioxid ersetzt.

Anschließend wurden die Präparate auf 40-42 °C erhitzt. Bei 31 °C war der kritische Punkt des CO₂ erreicht und es schlug spontan von der flüssigen in die gasförmige Phase um. Nachdem das Gas langsam abgelassen wurde, konnten die Prüfkörper entnommen werden und auf den Probenhaltern fixiert werden.

Nun folgte noch die bereits oben beschriebene Goldbedampfung im Goldbestäuber Emitech K550 (Fa. Emitech) für 2 x 4 min.

Anschließend wurden die Präparate im Rasterelektronenmikroskop bei einer Vergrößerung von 500 oder 1000 analysiert.

3.2.13 Testalgorithmus und Plattenbelegung

Mit den Osteoblasten wurde der WST-1-Zellaktivitätstest und die Ermittlung der Zellzahl durchgeführt. Es fanden pro Testart 2 Messreihen statt, die über einen Zeitraum von 10 Tagen kultiviert wurden. Die erste Messung wurde nach 3 Tagen vorgenommen, die folgenden an den Tagen 5, 7 und 10.

Während der Inkubationszeit wurde an jedem Tag ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die gesamten Testserien wurden in 24-Well-Zellkulturplatten angelegt; pro Zementart wurden jeweils vier Prüfkörper in die Platten eingelegt. Die Verteilung war so angelegt, dass jeweils 16 Kavitäten der 24-Well-Platten mit den entsprechenden Prüfkörpern belegt waren und 4 Kavitäten ohne Belegung als Polystyrolreferenz eingesetzt wurden.

Für die Bakterienversuche wurde lediglich der WST-1-Zellaktivitätstest angewandt. Pro Bakterienstamm (*S. aureus*, *S. epidermidis*) und Kulturmedium (LB-Medium, LB-Natriumnitrat-Medium) fanden je 2 Messreihen statt. Nach 24 h Inkubationszeit erfolgte die Messung.

Die Testserien wurden ebenfalls in 24-Well-Zellkulturplatten angelegt; dabei wurden pro Zementart jeweils 4 Prüfkörper in die Kavitäten eingelegt, sodass insgesamt 16 Wells belegt waren.

3.2.14 Statistik und Berechnung

Für alle Messwerte des WST-1 Zellvitalitätstests und der Zellzahlbestimmung wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Als Referenzwert wurde der jeweils höchste Mittelwert der Kontrolle herangezogen. Die Standardabweichungen wurden durch Fehlerbalken graphisch dargestellt.

Für die statistischen Berechnungen wurde die Microsoft Excel-Tabellenkalkulationssoftware verwendet. Die Diagramme wurden mit Origin Pro 8G erstellt.

4. ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Ausgangspulver

4.1.1 Röntgendiffraktometrische Analyse

Mittels der Röntgendiffraktometrie (XRD) wurden zuerst die Phasencharakteristika der verschiedenen Ausgangspulver im Winkelbereich 2-Theta von 20° bis 40° untersucht. Dabei wurde die Messung vor und nach der Mahlung in der Planetenkugelmühle durchgeführt und mit den entsprechenden Referenzbeugungsmustern verglichen.

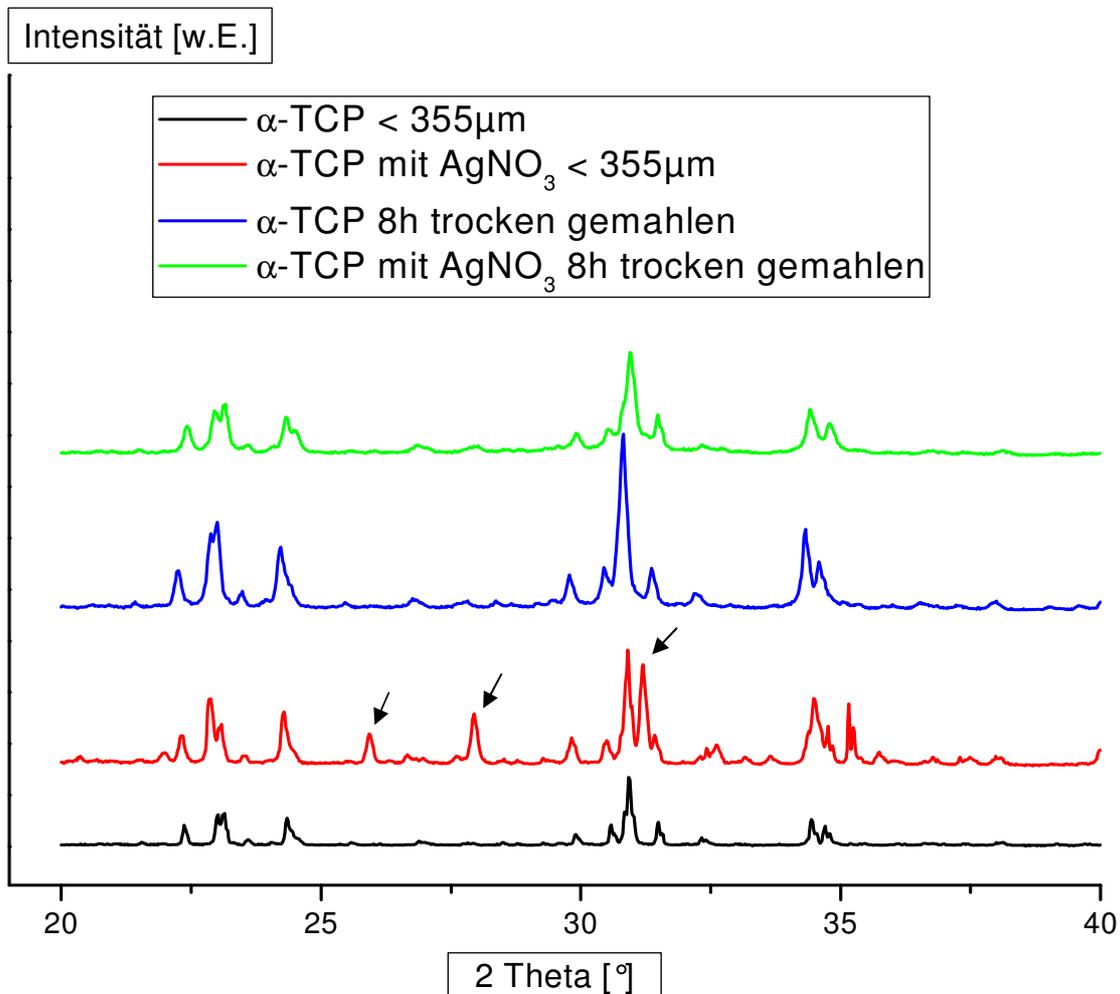


Abbildung 4.1: Röntgendiffraktogramme von α -TCP mit und ohne AgNO_3 , vor und nach der Mahlung in der Planetenkugelmühle. Die Beugungsreflexe entsprechen dem Referenzbeugungsmuster für α -TCP (PDF 029-0359). Die Pfeile weisen auf charakteristische Peaks von Whitlockit (PDF 09-0169) hin. Peaks für Silber waren nicht detektierbar.

In Abbildung 4.1 wurden die Diffraktogramme der α -TCP-Pulver mit und ohne AgNO_3 dargestellt. Es zeigte sich eine Deckungsgleichheit sämtlicher Peaks mit dem Referenzbeugungsmuster von α -TCP (PDF 029-0359), jedoch in einer unterschiedlichen Intensität. Lediglich α -TCP mit AgNO_3 vor der Mahlung zeigte zusätzlich charakteristische Beugungsreflexe für Whitlockit (gekennzeichnet durch Pfeile), die jedoch nach der Mahlung nicht mehr aufzufinden waren. Spuren von Silber konnten, wahrscheinlich aufgrund der zu geringen Konzentration, in keinem der Pulver nachgewiesen werden.

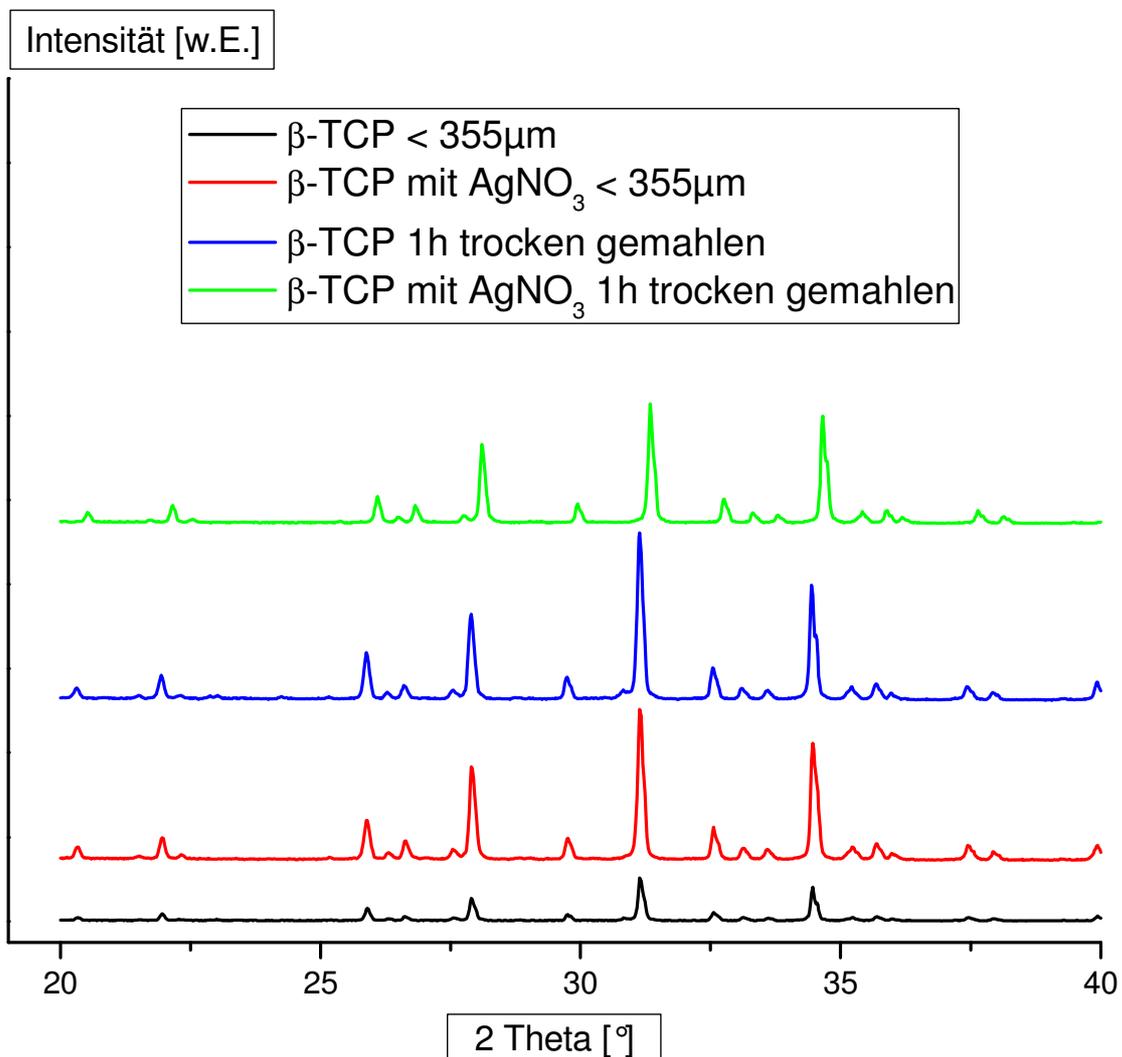


Abbildung 4.2: Röntgendiffraktogramme von β -TCP mit und ohne AgNO_3 , vor und nach der Mahlung in der Planetenkugelmühle. Die Beugungsreflexe entsprechen dem Referenzbeugungsmuster für β -TCP (PDF 09-0169). Peaks für Silber waren nicht detektierbar.

Auch bei den in Abbildung 4.2 dargestellten β -TCP-Pulvern mit und ohne AgNO_3 zeigten sich die typischen Beugungsreflexe, die mit dem Referenzbeugungsmuster

von β -TCP (PDF 09-0169) deckungsgleich waren. Ebenso konnten keine Unterschiede vor und nach der Mahlung festgestellt werden. Charakteristische Peaks für Silber waren hier ebenfalls nicht aufzufinden.

4.1.2 Massenspektrometrische Analyse

Anhand dieser Methode wurde untersucht, welche Mengen an Silber und Calcium in den Ausgangspulvern vorhanden sind. Dazu wurden jeweils ca. 200 mg in einer definierten Menge Salpetersäure aufgelöst und mit bi-destillierten Wasser für die massenspektrometrische Analyse verdünnt.

Tabelle 4.1: Massenspektrometrischer Nachweis von Ag^+ und Ca^{2+} nach Auflösung des Ausgangspulvers in 65%-iger Salpetersäure. Außerdem wurde das molare Verhältnis zwischen Silber und Calcium berechnet.

Ausgangspulver	Silbergehalt in $\mu\text{g/g}$	$\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+} \times 100$ (molares Verhältnis)
α -TCP	0,0135	1,6879E-06
β -TCP	0,0158	2,2687E-06
α -TCP mit AgNO_3	5061,0691	0,7829
β -TCP mit AgNO_3	6322,3609	0,7849

Die Analyse zeigte, dass die mit Silber versetzten Ausgangspulver eine deutliche Menge an Silber enthielten. Demgegenüber wies das reine α - bzw. β -TCP nur geringste Spuren dessen auf. Dementsprechend verhielt es sich bei dem Verhältnis $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$. Während die silberdotierten CaP ein Verhältnis von ca. 0,8 aufzeigten, lagen die Werte bei den reinen CaP bei ca. 2×10^{-6} .

4.2 Charakterisierung der Zemente

4.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde zunächst die Oberflächenbeschaffenheit der verschiedenen Zemente untersucht; die dafür hergestellten

Prüfkörper wurden dazu mit einer dünnen leitfähigen Goldschicht bedampft und anschließend im Rasterelektronenmikroskop ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.3 gezeigt.

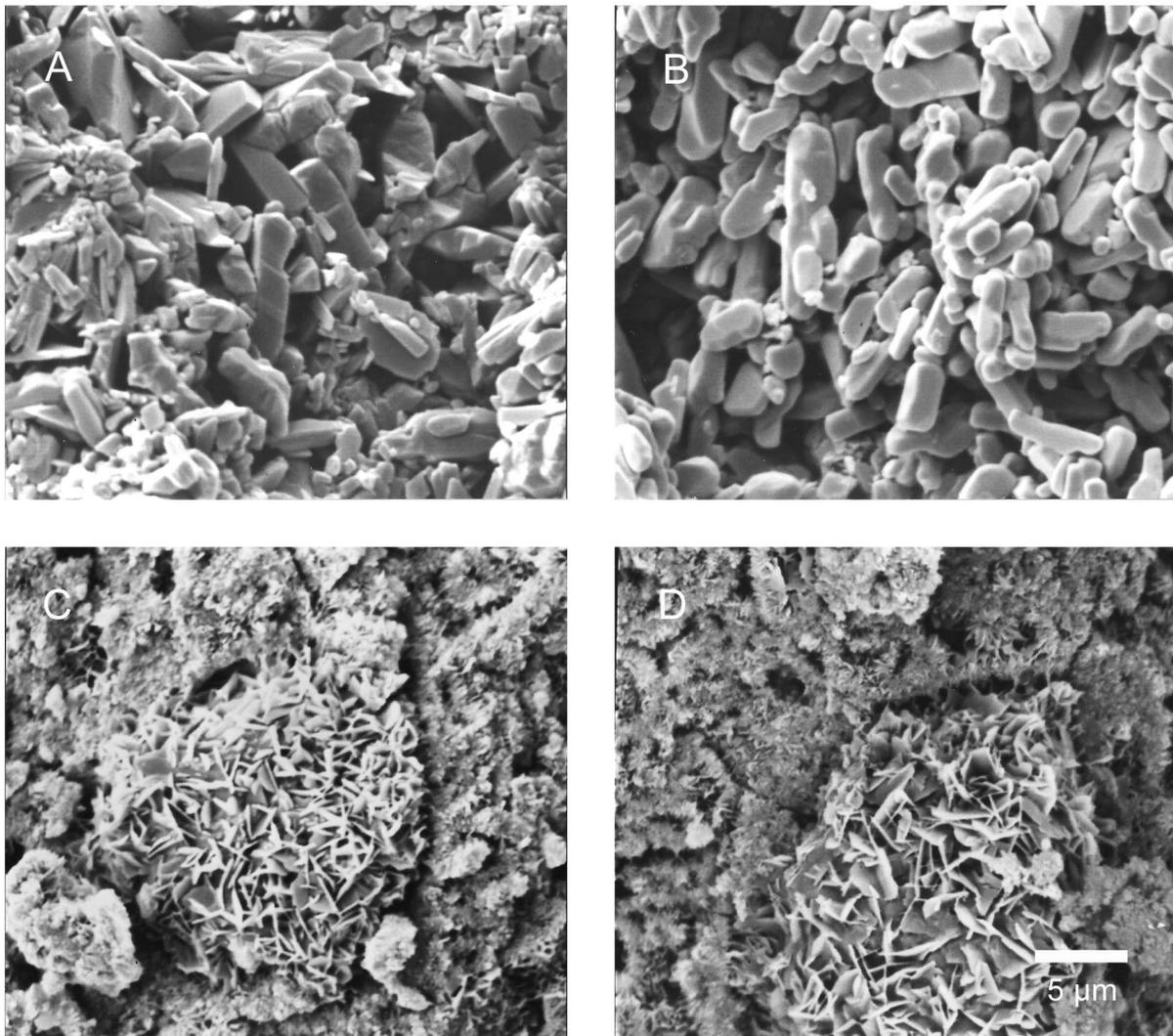


Abbildung 4.3: Oberflächenstruktur der verschiedenen Zemente bei 3000facher Vergrößerung. A: Bruschit, B: Ag-Bruschit, C: Hydroxylapatit, D: Ag-Hydroxylapatit. Eichstrich = 5 µm

Die Oberfläche von Bruschit (A) erwies sich als relativ grobkörnige und gleichmäßige Struktur; sie zeigte sowohl große längliche als auch kleinere Kristalle, tiefe Kerben und eine deutliche Porosität. Die Struktur von Ag-Bruschit (B) war mit der von Bruschit vergleichbar. Der Anteil der größeren Kristalle war hier minimal höher. Im Vergleich dazu erschien die Oberfläche von Hydroxylapatit (C) und Ag-Hydroxylapatit (D) wesentlich feiner, aber inhomogener. Die Kristalle waren deutlich kleiner als bei (Ag-)Bruschit und hatten eine samtartige Beschaffenheit. Auffallend waren außerdem die kleinen kristallinen Strukturansammlungen, die sich bei beiden

Oberflächen (C, D) fanden. Insgesamt war die Porosität bei Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit geringer. Zwischen diesen beiden Oberflächen gab es keinen Unterschied.

4.2.2 Röntgendiffraktometrische Analyse

Die Phasenanalyse für die (Ag)-Bruschit- und (Ag)-Hydroxylapatit-Zemente wurde auch hier wieder mittels dem XRD durchgeführt und mit den verschiedenen Referenzbeugungsmustern verglichen.

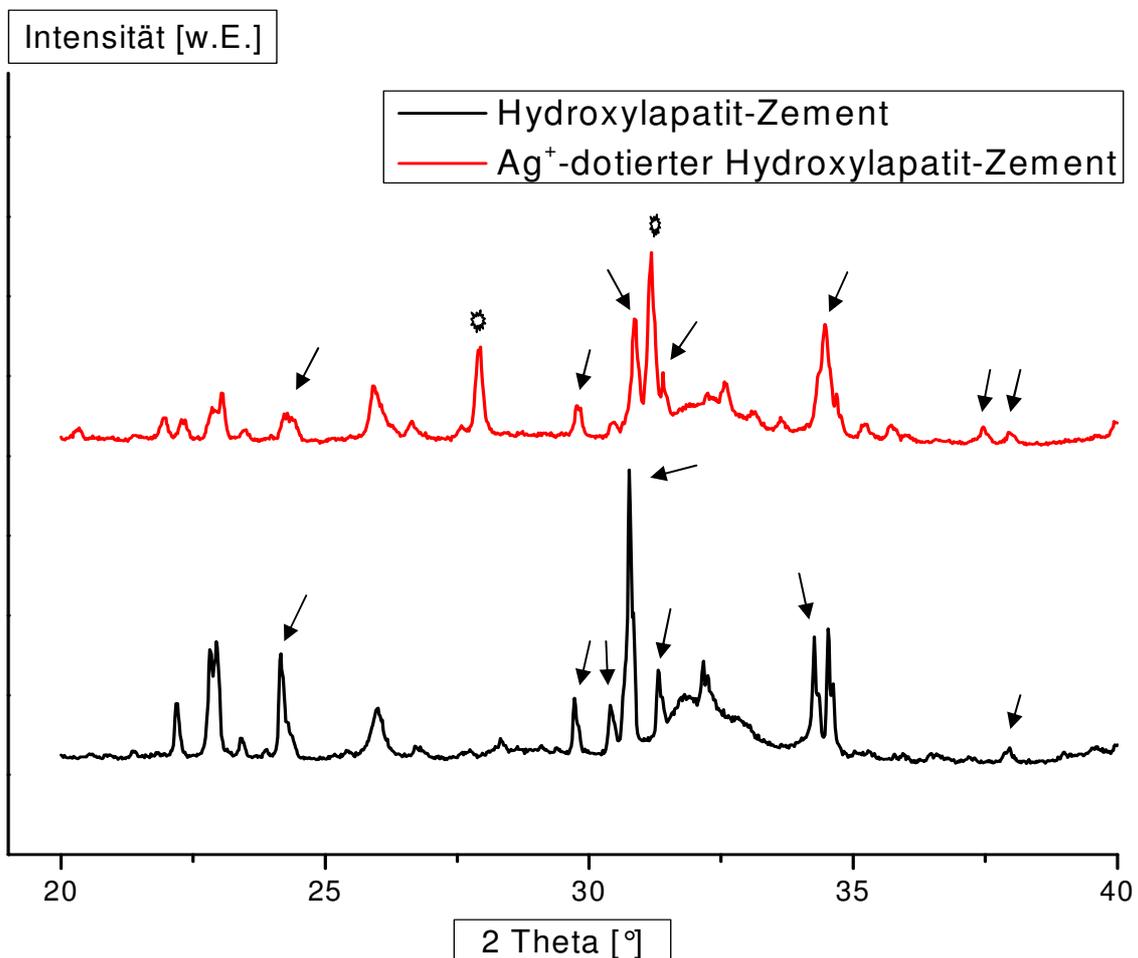


Abbildung 4.4: Röntgendiffraktogramme von Hydroxylapatit-Zement mit und ohne AgNO_3 nach 3 Tagen Aushärtung bei 37°C . Die Pfeile markieren die Peaks für α -TCP, die Sterne für Whitlockit. Die restlichen Peaks konnten dem Referenzbeugungsmuster von HA (PDF 09-0432) zugewiesen werden. Peaks für Silber waren nicht detektierbar.

In Abbildung 4.4 ist zu erkennen, dass sich Hydroxylapatit durch die Zugabe von Silber in seinen Beugungsreflexen etwas veränderte. Während bei HA neben den für

HA typischen Peaks auch noch charakteristische Peaks für das Edukt α -TCP detektiert wurden, konnten bei Ag-HA zusätzlich noch Spuren von Whitlockit nachgewiesen werden. Anzeichen von Silber waren nicht aufzufinden.

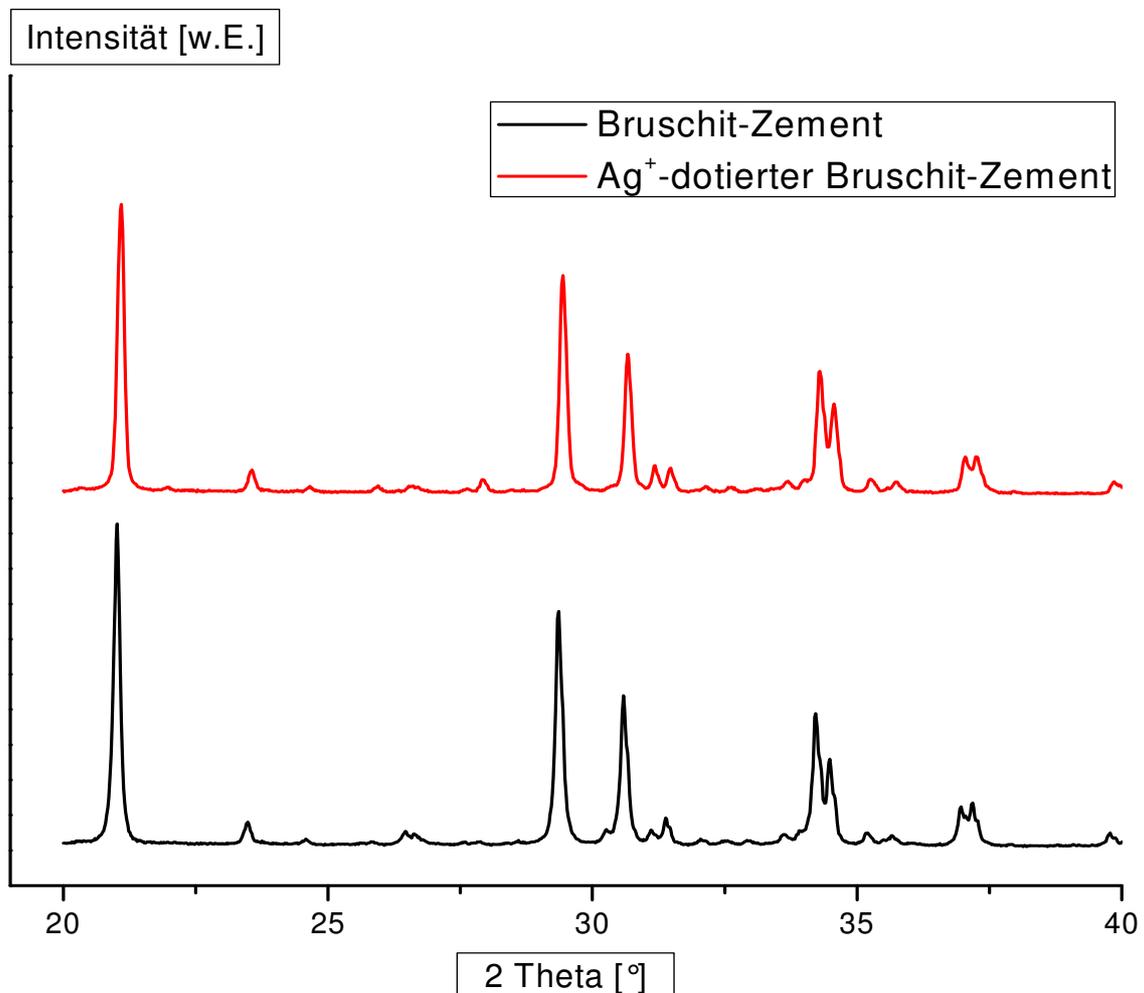


Abbildung 4.5: Röntgendiffraktogramme von Brushit-Zement mit und ohne AgNO_3 nach 3 Tagen Aushärtung bei 37 °C. Alle Beugungsreflexe entsprechen dem Referenzbeugungsmuster von Brushit (PDF 09-0077). Peaks für Silber waren nicht detektierbar.

Bei den Brushit- bzw. Ag-Brushit-Zementen (Abb. 4.5) fanden sich hingegen keinerlei Unterschiede; die Beugungsmuster wiesen nahezu identische Peaks auf und entsprachen dem der Referenz Brushit (PDF 09-0077). Silber war hier ebenfalls nicht nachweisbar.

4.2.3 Massenspektrometrische Analyse

Wie schon bei den Ausgangspulvern, sollte auch hier mittels des ICP-MS untersucht werden, welche Mengen an Silber und Calcium in den verschiedenen Prüfkörpern enthalten sind. Dazu wurden Prüfkörper direkt nach der Herstellung (roh), Prüfkörper, welche über 7 Tage in LB-Medium, als auch Prüfkörper, die über 7 Tage in PBS ausgelagert wurden, verwendet. Diese wurden ebenfalls in Salpetersäure gelöst und mittels bi-destillierten Wassers für die Messung verdünnt, die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 gezeigt.

Tabelle 4.2: Massenspektrometrischer Nachweis von Ag^+ und Ca^{2+} nach Auflösung der Prüfkörper in 65%-iger Salpetersäure. Außerdem wurde das molare Verhältnis zwischen Silber und Calcium berechnet.

Prüfkörper roh	Silbergehalt in $\mu\text{g/g}$	$\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+} \times 100$ (molares Verhältnis)
Bruschit	0,0019	2,1077E-07
Hydroxylapatit	0,0145	1,338E-06
Ag-Bruschit	4402,5887	0,6004
Ag-Hydroxylapatit	7553,3354	0,7496

Prüfkörper nach Auslagerung in PBS für 7d	Silbergehalt in $\mu\text{g/g}$	$\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+} \times 100$ (molares Verhältnis)
Bruschit	0,00144	1,7249E-07
Hydroxylapatit	0,01051	9,5669E-07
Ag-Bruschit	3277,1691	0,4327
Ag-Hydroxylapatit	4675,669	0,4692

Prüfkörper nach Auslagerung in LB-Medium für 7d	Silbergehalt in $\mu\text{g/g}$	$\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+} \times 100$ (molares Verhältnis)
Bruschit	0,0017	2,0605E-07
Hydroxylapatit	0,0097	8,5991E-07
Ag-Bruschit	3943,619	0,4962
Ag-Hydroxylapatit	5849,6073	0,5888

Der höchste Silbergehalt war bei den rohen Ag⁺-dotierten Prüfkörpern zu verzeichnen, wobei der Wert für Ag-Bruskit deutlich unter dem von Ag-HA lag, was auf die Herstellung der Prüfkörper zurückzuführen war. (Zur Herstellung von Ag-Bruskit wurden äquimolare Pulvermengen Ag⁺-dotiertem β-TCP und MCPM verwendet, was den geringeren Silbergehalt erklärt.)

Dies zeigte sich auch bei dem Verhältnis Ag⁺/Ca²⁺; während Ag-HA einen annähernd gleichen Wert wie bei dem Ausgangspulver (siehe Tab. 4.1) aufwies, war das Verhältnis bei Ag-Bruskit deutlich kleiner.

Die Werte für Bruskit und HA hingegen fielen vernachlässigbar gering aus.

Bei den Prüfkörpern, welche über 7 Tage in einem Medium ausgelagert wurden, zeigte sich, dass sich eine beträchtliche Menge an Silber (bis zu 1/3 des Ausgangswertes) über diesen Zeitraum aus den Zementen gelöst hatte. Dabei war festzustellen, dass sich in PBS mehr Silber aus den Prüfkörpern freigesetzt hatte als im LB-Medium.

Ebenso wurde das Ag⁺/Ca²⁺-Verhältnis dadurch kleiner, was darauf hindeutete, dass anteilmäßig mehr Silber als Calcium in das Medium abgegeben wurde.

Der Silbergehalt von Bruskit und HA war auch hier zu vernachlässigen, da nur geringste Spuren von Silber gemessen wurden.

4.2.4 Bestimmung der Abbinde- bzw. Verarbeitungszeiten

Wie schon unter 3.2.11.1 beschrieben, konnte aufgrund der kurzen Abbindezeit von Bruskit bzw. Ag-Bruskit, die nur im Sekundenbereich lag, der Gilmore-Nadeltest hier nicht angewandt werden. Man griff deshalb auf die Messung der Verarbeitungszeit zurück. Die Abbindezeit von HA und Ag-HA wurde mittels des Nadeltests ermittelt.

Tabelle 4.3: Abbinde- bzw. Verarbeitungszeiten

Zement	Verarbeitungs- / Abbindezeit
Bruskit	50 s
Ag-Bruskit	50 s
Hydroxylapatit	6 min
Ag-Hydroxylapatit	7 min

Tabelle 4.3 zeigt die Ergebnisse der Bestimmung der Abbinde- bzw. Verarbeitungszeiten für die verschiedenen Zemente. Sie wurden aus $n = 3$ ermittelt und als Mittelwerte dargestellt. Hierbei zeigte sich für Bruschit im Vergleich zu Ag-Bruschit eine gleichbleibende Verarbeitungszeit. Eine leichte Verlängerung der Abbindezeit um eine Minute ergab sich für Ag-Hydroxylapatit gegenüber HA.

4.2.5 Druckfestigkeiten

Die Druckfestigkeitswerte (CS) wurden jeweils durch $n = 5$ Messungen ermittelt, und sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Ziel der Messung war es, festzustellen, ob und inwieweit sich eine Variation der Zemente mit Silber auf die mechanische Belastung durch Druckkräfte auswirkt (siehe Tab. 4.4).

Tabelle 4.4: Druckfestigkeiten der Zemente

Zement	CS [MPa]	\pm
Bruschit	14,7	2,4
Ag-Bruschit	19,8	4,1
Hydroxylapatit	41,2	8,7
Ag-Hydroxylapatit	22,7	4,9

Bruschit wies eine Druckfestigkeit von $14,7 \pm 2,4$ MPa auf. Durch die Modifikation mit Silber veränderten sich die Druckfestigkeitswerte nicht signifikant; es kam zu einem Anstieg um ca. 5 MPa auf $19,8 \pm 4,1$ MPa.

Bei Hydroxylapatit hingegen kam es zu einer deutlichen Änderung der Druckfestigkeit. Durch die Modifikation mit Silber verringerte sich die Festigkeit von HA um fast die Hälfte von $41,2 \pm 8,7$ MPa auf nunmehr $22,7 \pm 4,9$ MPa bei Ag-Hydroxylapatit.

4.3 Massenspektrometrische Analyse der Auslagerungsmedien

Anhand der massenspektrometrischen Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Mengen an Silber und Calcium während des

Auslagerungsvorgangs aus den verschiedenen Zementverbindungen freigesetzt wurden. Dafür wurden jeweils 3 Prüfkörper in 30 ml entsprechendem Medium über einen Zeitraum von 7 Tagen gelagert. Als Medium kamen PBS und LB-Medium zum Einsatz. Der Mediumwechsel fand täglich statt. Das Eluat wurde nach jedem Wechsel für die ICP-Analyse in Probenröhrchen bis zur Messung bei 4 °C gelagert und für die Messung entsprechend verdünnt. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels Origin Pro 8 in verschiedenen Graphiken dargestellt (siehe Abb. 4.6).

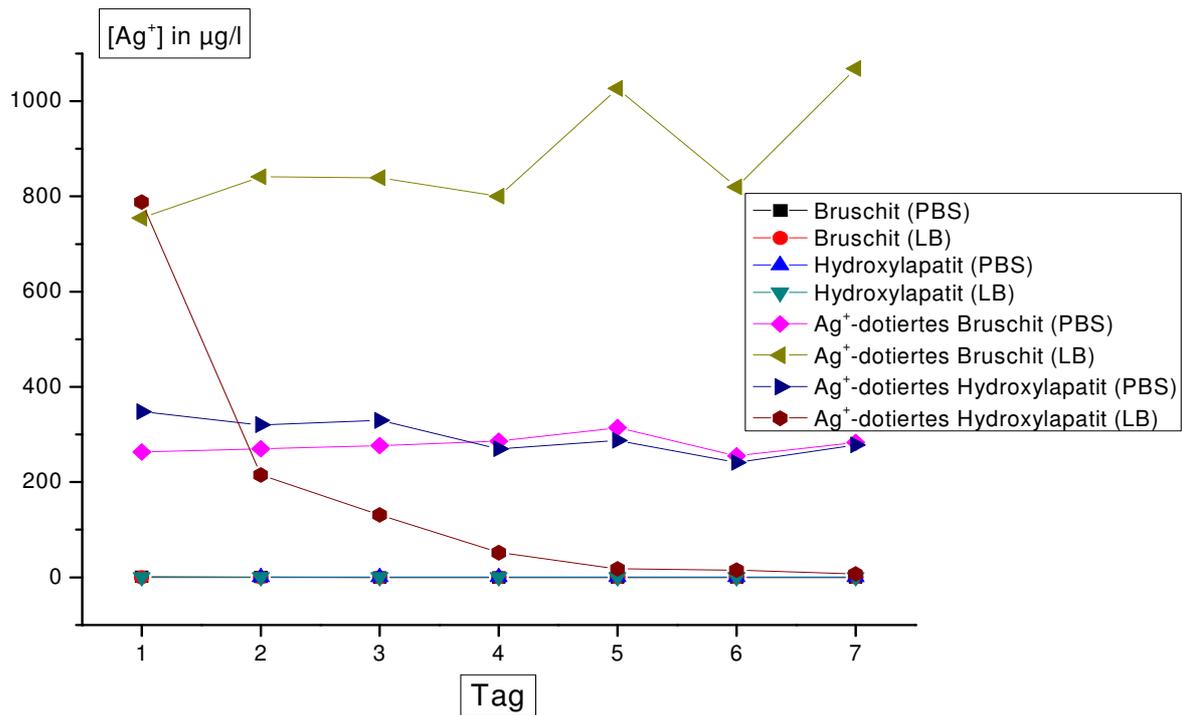
Die beiden Graphiken zeigen zum einen die Ag^+ -Konzentration des entsprechenden Auslagerungsmediums (Abb. 4.6 a), zum anderen die Absolutmasse Ag^+ , die aus den 3 Prüfkörpern während des Zeitraums freigesetzt wurde (Abb. 4.6 b).

Da die reinen Bruschit- und Hydroxylapatit-Prüfkörper kein bzw. nur geringste Spuren von Silber enthielten (siehe Kapitel 4.2.3), waren die Konzentrationswerte und Absolutmassen an Ag^+ vernachlässigbar gering (die Maximalwerte lagen knapp über Null).

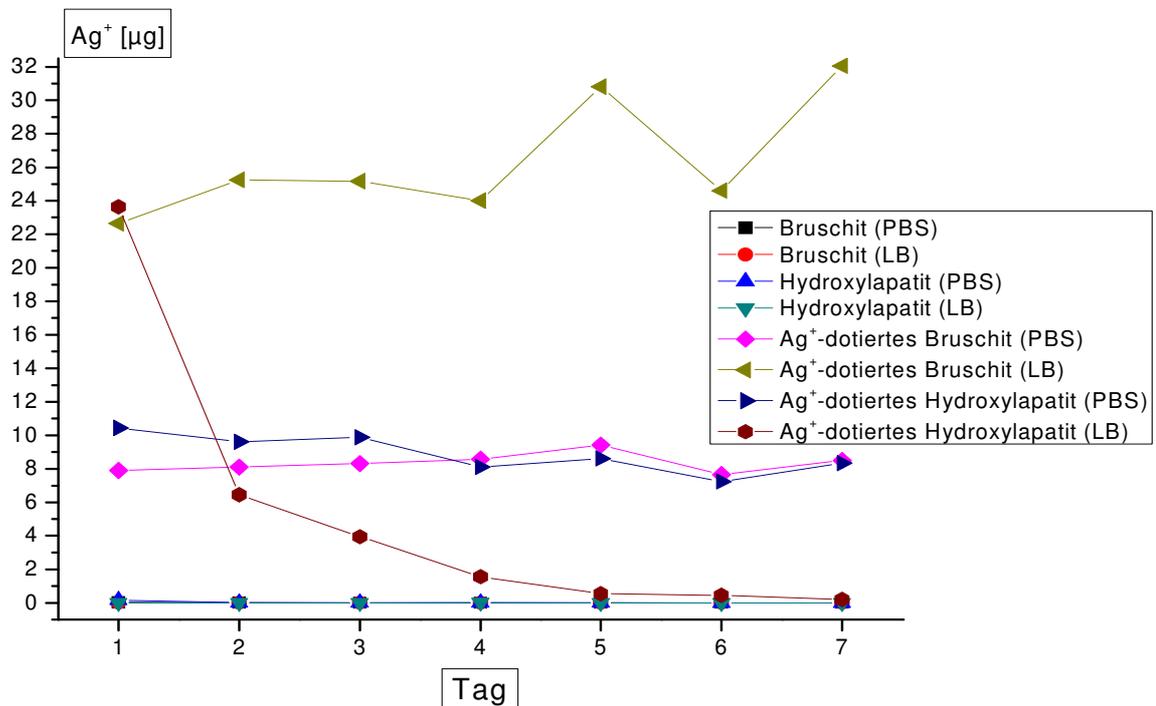
Bei Ag-Bruschit (LB) hingegen war kontinuierlich mit Abstand die höchste Freisetzung zu beobachten, wobei am Tag 5 und 7 eine deutliche Konzentrationsabweichung nach oben (Maximum: 1068,2 $\mu\text{g/l}$ bzw. 34,1 μg am Tag 7) zu erkennen war. Im Vergleich dazu war die Löslichkeitsrate von Ag-Bruschit in PBS im Durchschnitt um gut ein Drittel geringer.

Bei Ag-Hydroxylapatit verhielt es sich dagegen umgekehrt; während im PBS die Löslichkeit von Silber (Durchschnitt: ca. 250 – 350 $\mu\text{g/l}$ bzw. 8,5 – 10,5 μg) ähnlich den Werten von Ag-Bruschit (PBS) entsprach, zeigte es im LB-Medium nach einem anfänglichen Spitzenwert am 1. Tag (ähnlich Ag-Bruschit im LB-Medium), im weiteren Verlauf eine konstante Abnahme der Werte bis nahezu Null (7,1 $\mu\text{g/l}$ bzw. 0,2 μg).

4. Ergebnisse



a)



b)

Abbildung 4.6 a: Ag^+ -Konzentration des Auslagerungsmediums in Abhängigkeit von dem verwendeten Medium (PBS bzw. LB), freigesetzt aus 3 Prüfkörpern. Auf der Ordinate ist die freigesetzte Silber-Menge aufgetragen, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben. **b:** Absolutmasse Ag^+ , freigesetzt aus 3 Prüfkörpern in 30 ml des entsprechenden Auslagerungsmediums (PBS bzw. LB). Auf der Ordinate ist die freigesetzte Absolutmasse aufgetragen, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

4. Ergebnisse

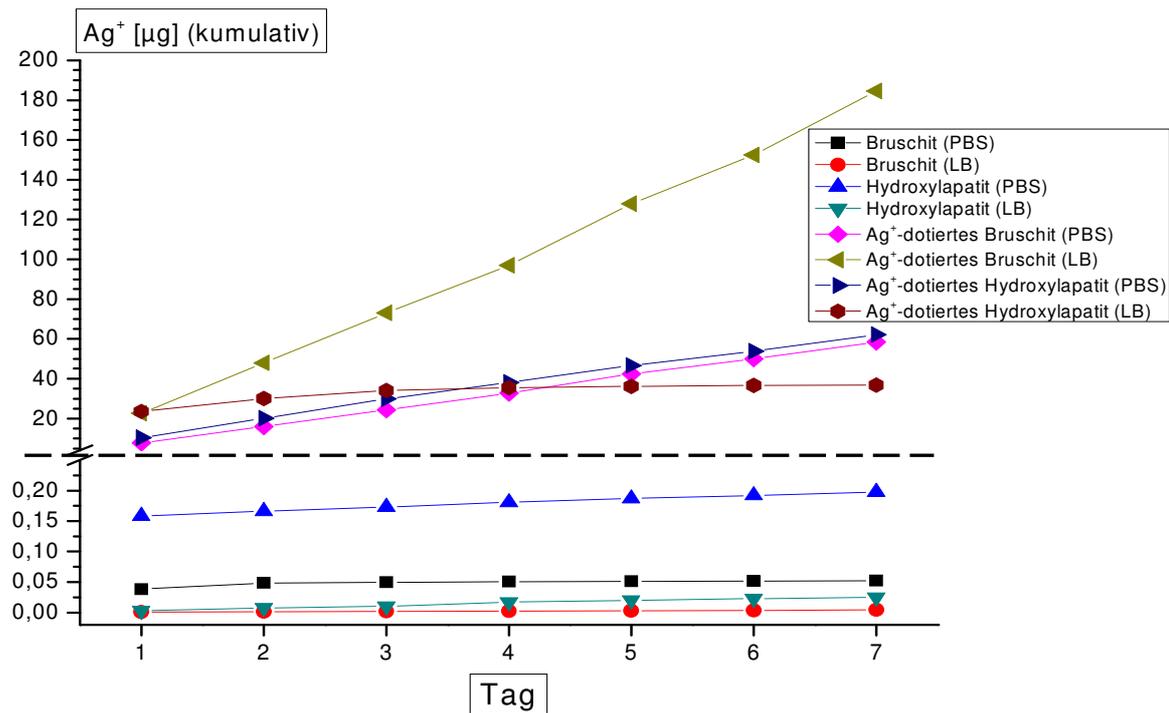


Abbildung 4.7: Kumulative Absolutmasse an Ag^+ , freigesetzt aus 3 Prüfkörpern in 30 ml des entsprechenden Auslagerungsmediums (PBS bzw. LB) über 7d. Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die freigesetzte Absolutmasse aufgetragen, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Ebenso wurde die kumulative Ag^+ -Absolutmasse dargestellt (Abb. 4.7). Hier war vor allem aufgrund der täglich großen Freisetzungsrates der Ag-Brushit-Prüfkörper im LB-Medium ein steiler Anstieg auf einen Höchstwert von $184,5 \mu\text{g Ag}^+$ nach 7 Tagen zu verzeichnen. Bei der Freisetzung von Silber aus den Ag-Brushit-Prüfkörpern im PBS-Medium konnte man einen vergleichsweise langsamen Anstieg der Konzentration feststellen; die Absolutmasse Ag^+ nach 7 Tagen betrug dann lediglich $58,5 \mu\text{g}$ und damit nur ein Drittel der freigesetzten Menge in LB.

Ag-Hydroxylapatit im PBS-Medium verzeichnete ebenso eine konstante langsame Erhöhung der Werte auf einen Höchstwert von $62,4 \mu\text{g}$, während sich die Ionenabgabe an das LB-Medium nach anfänglicher Zunahme bereits ab dem 3. Tag nahezu auf einen konstanten Wert einpendelte.

In der Abbildung wurden ebenfalls die Werte für die reinen Prüfkörper ohne Silber graphisch, unterstützt durch eine Achsenunterbrechung genau dargestellt, um die signifikanten Unterschiede zu den silberdotierten Oberflächen aufzuzeigen. Es zeigte sich, dass nur geringfügige Unterschiede des Freisetzungsverhaltens in den einzelnen Medien bestanden. Die Höchstwerte lagen dabei lediglich um ca. $0,19 \mu\text{g}$.

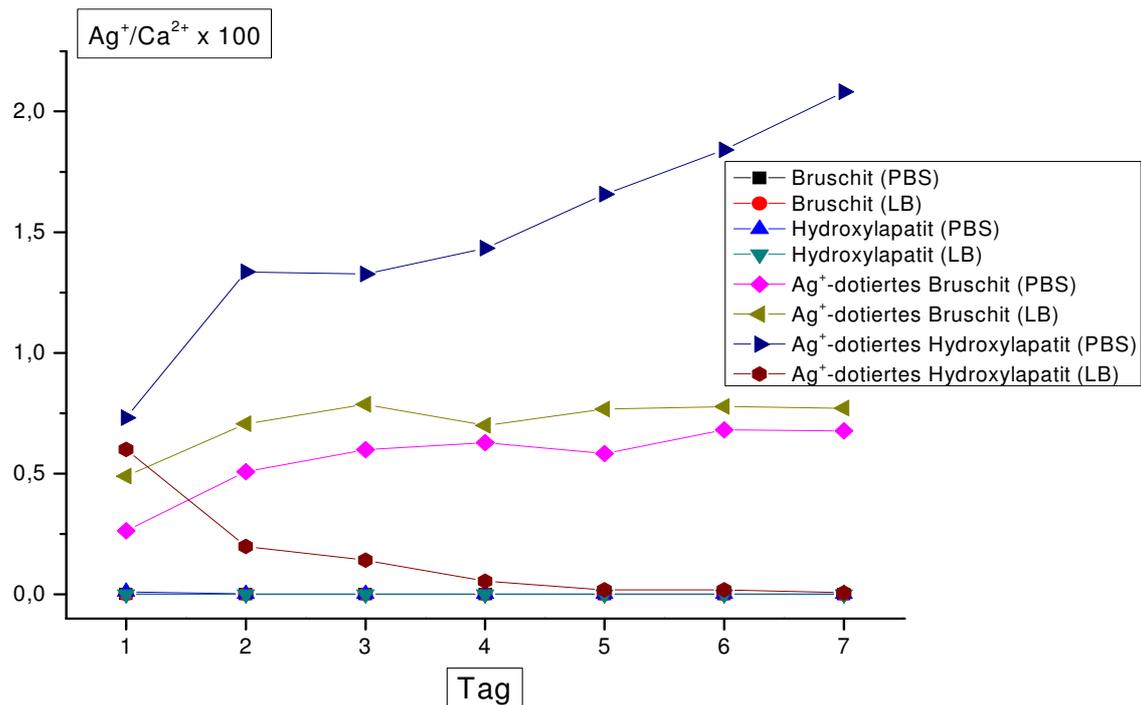


Abbildung 4.8: Molmassen-Verhältnis von Ag⁺/Ca²⁺ in %, freigesetzt aus 3 Prüfkörpern in Abhängigkeit von dem verwendeten Auslagerungsmedium (30 ml PBS bzw. LB). Auf der Ordinate ist das Molare Verhältnis aufgetragen, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Abbildung 4.8 zeigt das Molare Verhältnis zwischen den freigesetzten Ag⁺- und Ca²⁺-Ionen. Es wurde hier aufgezeigt, dass das Verhältnis bei den Ag-HA-Prüfkörpern im PBS-Medium mit Abstand am größten war und mit Fortschreiten des Versuches stetig anstieg (Maximum: 2,08 %); dies deutet darauf hin, dass sich aus diesen Oberflächen bei Zunahme der Auslagerungsdauer prozentual mehr Silber als Calcium herausgelöst hatte.

Genau umgekehrt verhielt es sich bei den Ag-HA-Prüfkörpern, die im LB-Medium ausgelagert wurden; nach einem anfänglichem Wert von 0,6 % an Tag 1, nahm das Verhältnis rapide ab und erreichte am Tag 7 nahezu den Wert Null; dies verdeutlichte, dass gegenüber Calcium fast kein Silber mehr an das Medium abgegeben wurde.

Die Ag-Bruschit-Zemente hingegen brachten graphisch relativ identische Ergebnisse, wobei die Werte für das LB-Medium ca. 0,1 - 0,2 % über dem vom PBS-Medium lag. Nach einer anfangs leichten Zunahme des Verhältnisses, pendelte es sich im weiteren Verlauf des Versuches (ab Tag 3) auf einen konstanten Wert von ca. 0,75 % (LB) bzw. 0,65 % (PBS) ein.

Die molaren Verhältnisse bei den silberlosen Prüfkörpern waren aufgrund der nur geringstfügigen Spuren von Silber vernachlässigbar.

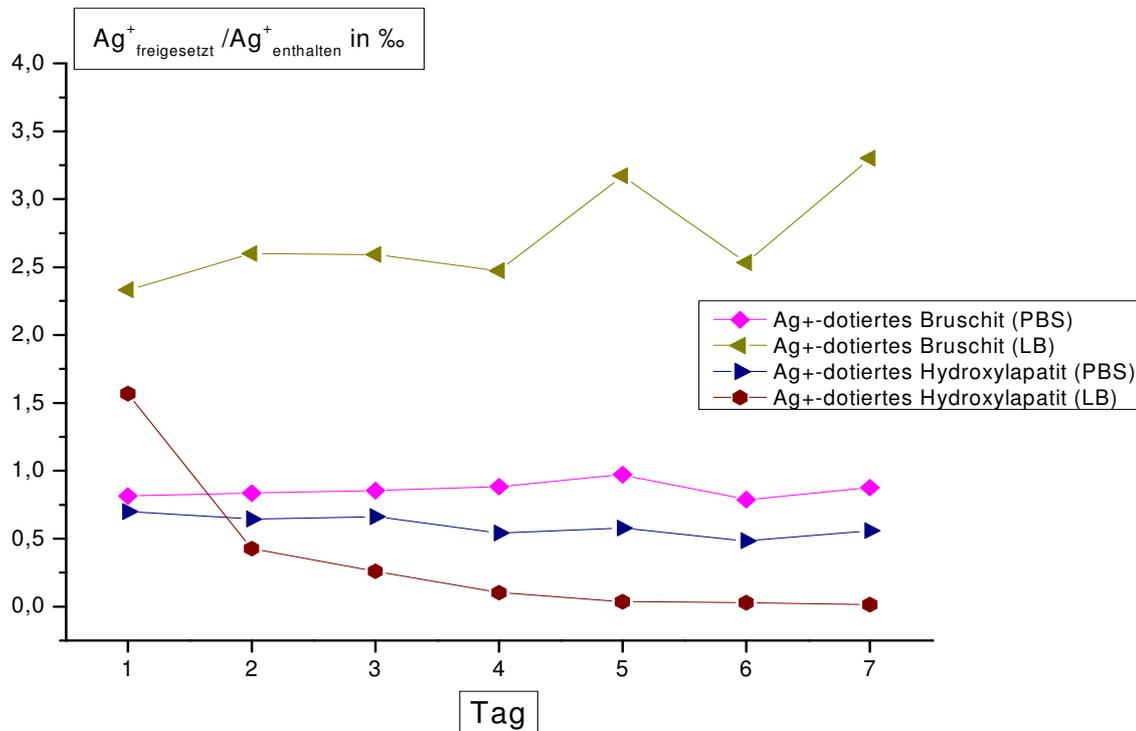


Abbildung 4.9: Verhältnis der aus den Prüfkörpern freigesetzten Ag^+ -Menge zu der in den Prüfkörpern vorhandenen Ag^+ -Menge, angegeben in ‰. Auf der Ordinate ist das Verhältnis (freigesetzt/enthalten) aufgetragen, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Anhand der Graphik in Abbildung 4.9 sollte nun das Verhältnis zwischen der an das entsprechende Medium abgegebenen Ag^+ -Menge und der in den Prüfkörpern enthaltenen Ag^+ -Menge (siehe Kapitel 4.2.3) veranschaulicht werden.

Es konnte vor allem bei den Zementen Ag-Bruschit und Ag-Hydroxylapatit, die beide jeweils in PBS ausgelagert worden waren, ein konstantes Verhältnis über den gesamten Zeitraum festgestellt werden; die Werte lagen dabei zwischen 0,49 ‰ und 0,7 ‰ bei Ag-HA und zwischen 0,79 ‰ und 0,97 ‰ bei Ag-Bruschit.

Die Verbindung Ag-Hydroxylapatit (LB) wies am Tag 1 wieder einen Spitzenwert von 1,57 ‰ auf und sank danach rapide auf einen Wert von 0,01 ‰ ab.

Bei Ag-Bruschit, welches ebenfalls in LB-Medium gewaschen wurde, stellte sich ein etwas höherer Wert ($\bar{\varnothing}$ ca. 2,5 ‰) als bei den vorangegangenen Zementen ein; lediglich an den Tagen 5 und 7 wichen die Werte davon nach oben ab (Maximum: 3,3 ‰).

4.4 Auswertung der Bakterienversuche

4.4.1 Bestimmung der Zellaktivität

Bei diesem Versuchsteil sollte das Wachstum und die Aktivität der Bakterienstämme *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf den unterschiedlichen Zementarten untersucht und miteinander verglichen werden. Die autoklavierten Prüfkörper wurden dazu 24 h mit den entsprechenden Bakterienkulturen im Schüttler bei 37 °C inkubiert und anschließend die Stoffwechselaktivität der Bakterien mit Hilfe des WST-1-Zellaktivitätstests ausgewertet; als Referenzwert diente dabei jeweils die nicht mit Silber versetzten Zemente Bruschit und Hydroxylapatit (100%-Wert).

Pro Zementart wurden vier Oberflächen herangezogen und davon jeweils der Mittelwert berechnet. Die Standardabweichungen wurden in der Graphik mittels Fehlerbalken dargestellt. Desweiteren kamen zwei verschiedene Medien zum Einsatz; LB- und LB-Natriumnitrat-Medium. Die beiden unterschiedlichen Medien sollten zur Klärung beitragen, ob die im LB-Medium enthaltenen Chlorid-Ionen evtl. zu einer Komplexbildung mit Silber-Ionen zu AgCl führen und dadurch Unterschiede in der antibakteriellen Wirksamkeit zu beobachten sind.

Es wurden für die vier verschiedenen Zementarten pro Mediumsorte jeweils zwei Versuchsreihen durchgeführt. In Abbildung 4.10 und 4.11 wird nun der Mittelwert der beiden Versuche präsentiert.

Im Anhang dieser Arbeit wurden noch 4 weitere Diagramme (Abb. 8.1 – 8.2) eingefügt, die die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wiedergeben.

Mit dem WST-1-Test wurde im LB-Medium (Abb. 4.10) bei beiden Bakterienstämmen auf den silberdotierten Bruschit-Zementen eine signifikant niedrigere mitochondriale Atmungsaktivität (*S. aureus*: 2,12 % und *S. epidermidis*: 6,86 %) ermittelt als auf den silberfreien Bruschit-Prüfkörpern (Referenz).

Im Gegensatz dazu wiesen die Ag-HA-Zemente bei *Staph. aureus* mit 97,14 % gegenüber der Referenz HA einen nahezu identischen Wert auf. Lediglich bei *Staph. epidermidis* zeigte sich mit 61,60 % eine signifikant niedrigere Atmungsaktivität.

4. Ergebnisse

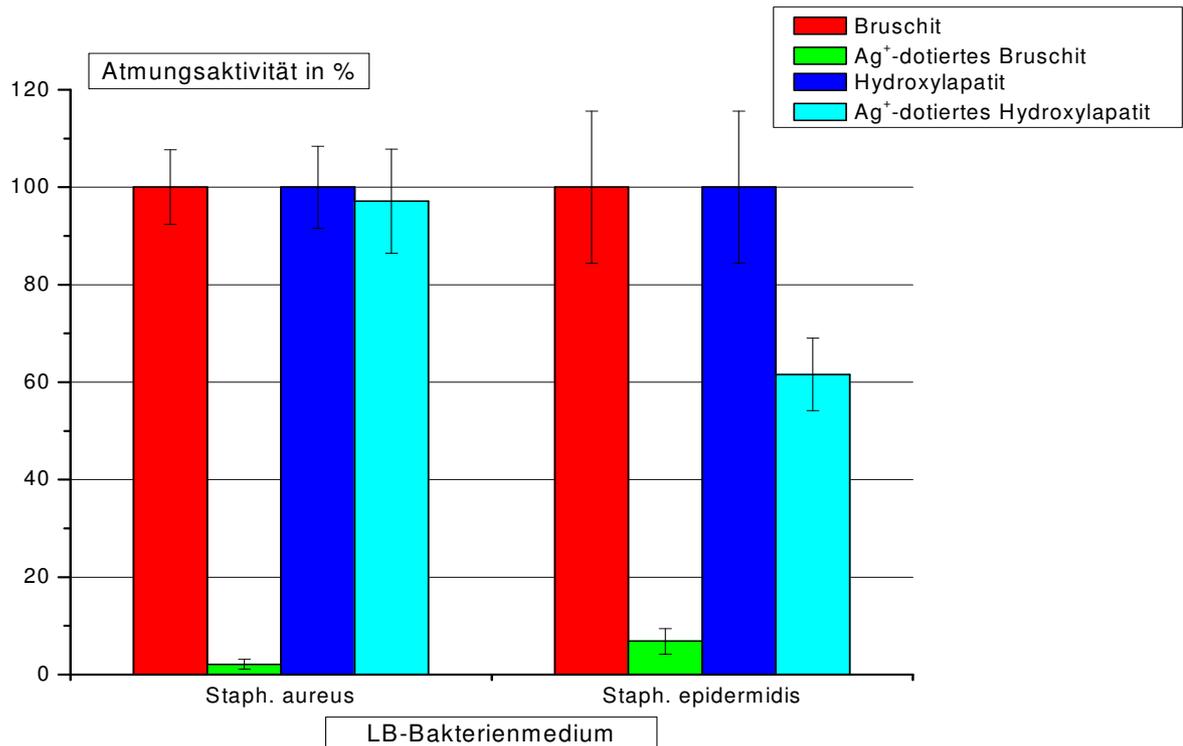


Abbildung 4.10: Relative Atmungsaktivität der Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf den vier verschiedenen Zementarten (n = 4 pro Oberfläche) ermittelt durch WST-1-Test. Als Medium wurde LB verwendet. Auf der Ordinate ist die relative Atmungsaktivität in % zu den nicht silberdotierten Zementen Bruschit bzw. HA (Referenz) dargestellt; auf der Abszisse sind die Bakterienstämme angegeben.

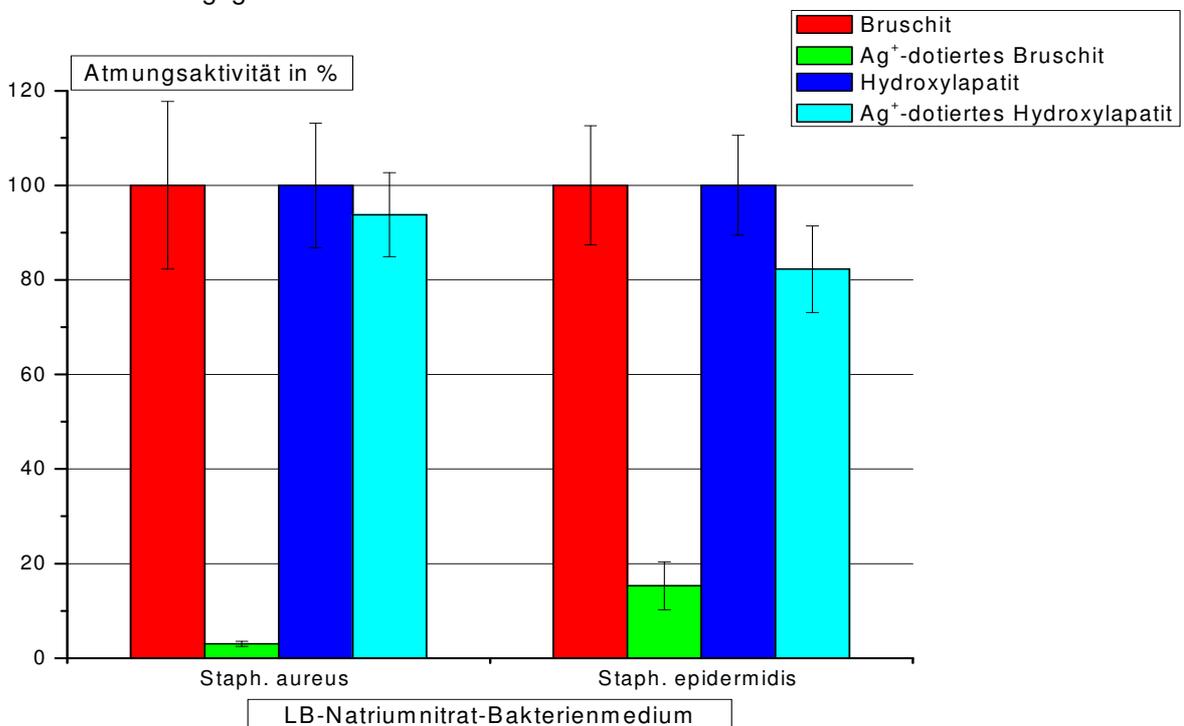


Abbildung 4.11: Relative Atmungsaktivität der Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf den vier verschiedenen Zementarten (n = 4 pro Oberfläche) ermittelt durch WST-1-Test. Als Medium wurde LB-Natriumnitrat verwendet. Auf der Ordinate ist die relative Atmungsaktivität in % zu den nicht silberdotierten Zementen Bruschit bzw. HA (Referenz) dargestellt; auf der Abszisse sind die Bakterienstämme angegeben.

Bei dem LB-Natriumnitrat-Medium (Abb. 4.11) zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Ag-Bruschi-Zemente konnten wiederum die signifikant niedrigste mitochondriale Atmungsaktivität aufweisen. Bei *S. aureus* wurde eine Aktivität von 2,98 % gegenüber der Referenz Bruschi ermittelt, bei *S. epidermidis* lag der Wert vergleichend zu dem LB-Medium etwas höher bei 15,31 %.

Ein gänzlich anderes Bild zeigte sich bei der Atmungsaktivität von Ag-HA; während diese Zementart mit 93,76 % bei *S. aureus* kaum ein Unterschied zur Referenz HA und dem Ergebnis mit dem LB-Medium zeigte, war bei *S. epidermidis* diesmal eine etwas höhere Aktivität (82,25 %) gegenüber dem LB-Medium erkennbar.

4.4.2 Massenspektrometrische Analyse der Bakterienmedien

Es wurde anhand der massenspektrometrischen Analyseverfahren untersucht, welche Mengen an Silber während der Inkubationsphase der Bakterien aus den verschiedenen Zementverbindungen an das entsprechende Medium abgegeben wurden. Als Medium kamen LB-Medium und LB-Natriumnitrat-Medium zum Einsatz. Dafür wurden je Zementart und Medium 4 Oberflächen für 24 h inkubiert. Der Überstand über den Prüfkörpern wurde anschließend mittels einer Eppendorf-Pipette vorsichtig abgezogen, für die ICP-Analyse in Probenröhrchen gesammelt, zentrifugiert und für die Messung entsprechend verdünnt. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels Origin Pro 8 in folgender Graphik (Abb. 4.12) dargestellt.

Die eindeutig höchste Löslichkeitsrate zeigte sich durchwegs bei dem Ag-Bruschi-Zement; während die Werte im LB-Medium nahezu identisch waren (*S. aureus*: 3,77 µg/ml und *S. epidermidis*: 3,44 µg/ml), konnte im LB-Natriumnitrat-Medium ein deutlicher Unterschied in der Silber-Freisetzung beobachtet werden. Dabei wurde im *S. aureus*-Medium ein mit 11,04 µg/ml mehr als doppelt so hoher Wert gemessen, als dies bei *S. epidermidis* mit 5,27 µg/ml der Fall war. Vergleichend war also der Silbergehalt in dem LB-Natriumnitrat-Medium höher.

Ag-Hydroxylapatit hingegen wies nur ein geringes Freisetzungsverhalten auf, wobei die Löslichkeit im *S. aureus*-Medium jeweils höher war (LB-Medium: 0,22 µg/ml, LB-Natriumnitrat-Medium: 0,26 µg/ml), als bei *S. epidermidis* (entsprechend 0,06 µg/ml bzw. 0,07 µg/ml). Es konnte aber auch hier eine geringfügig höhere Löslichkeit

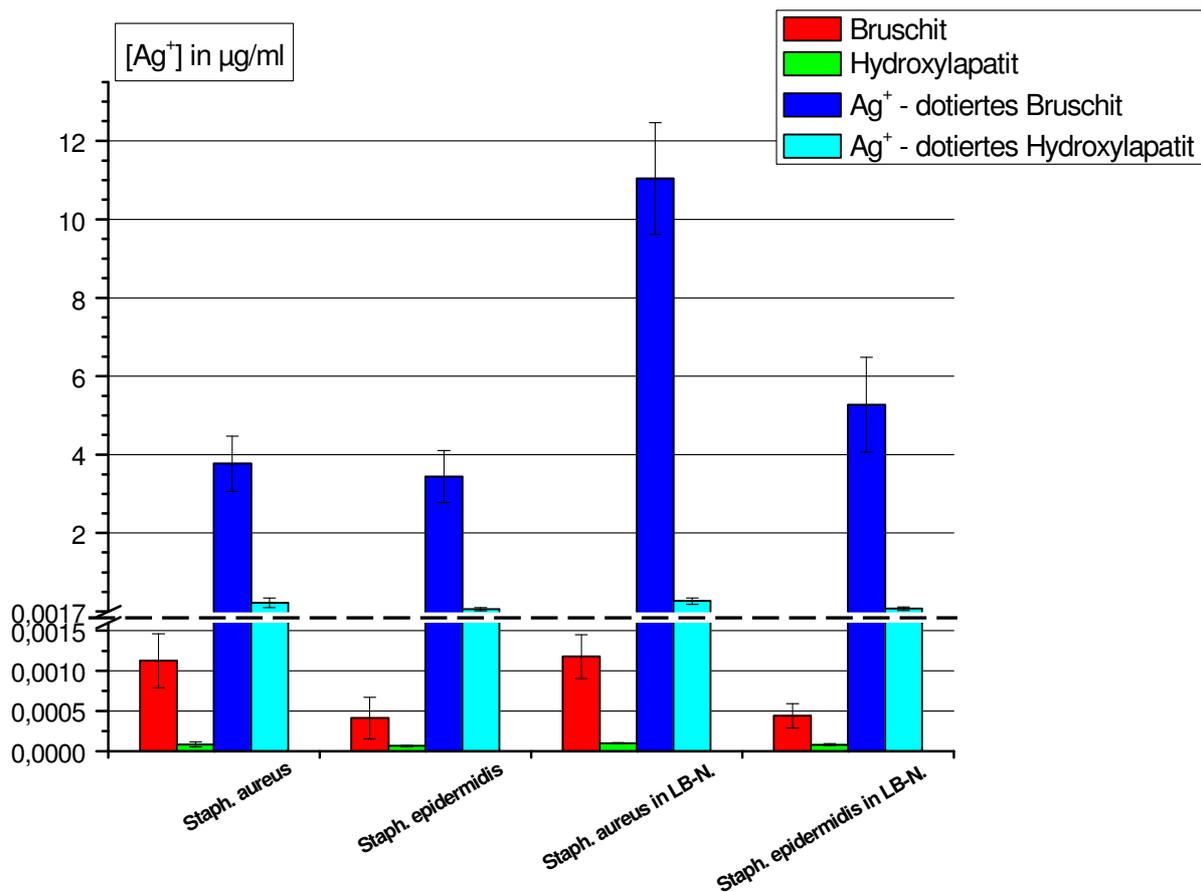


Abbildung 4.12: Ag⁺-Konzentration in den verschiedenen Bakterienmedien, mit welchen die Prüfkörper (n = 4 pro Oberfläche) für 24h bei 37 °C bebrütet wurden. Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die Ag⁺-Konzentration aufgetragen, auf der Abszisse sind die verschiedenen Bakterienkulturen angegeben.

im LB-Natriumnitrat-Medium festgestellt werden.

Die freigesetzte Menge an Silber bei Bruschit war erwartungsgemäß sehr gering. Trotzdem zeichnete sich hier wiederum die Tendenz zur größeren Löslichkeit im LB-Natriumnitrat-Medium und S. aureus-Medium ab.

Die Werte für Hydroxylapatit waren so vernachlässigbar gering, dass sie deshalb nicht näher erörtert wurden.

4.4.3 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Bakterien

Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sollte im folgenden Abschnitt die Besiedelung der verschiedenen Zementoberflächen mit den Bakterien Staphylococcus aureus und Staphylococcus epidermidis beurteilt werden. Die Keime wurden dafür nach einer 24-stündigen Inkubation auf den verschiedenen Prüfkörpern

durch die oben genannten Arbeitsschritte auf den Oberflächen fixiert und dann ausgewertet.

Abbildung 4.13 zeigt *Staphylococcus aureus* auf den verschiedenen Zementen und als Referenz auf Glas. Da die Aufnahme von Bruschit nochmals um den Faktor 2 gegenüber den anderen REM-Bildern vergrößert worden war, war hier deutlich die gleichmäßige dichte Besiedelung der Bruschit-Oberfläche mit den Bakterien zu erkennen (A). Ag-Bruschit war hingegen nur schwer zu beurteilen (B); bei genauerem Betrachten sah man allerdings ganz vereinzelt Bakterien zwischen den Oberflächenstrukturen.

Die Oberflächen von HA und Ag-HA wiesen wiederum, ähnlich zu Bruschit, einen dichten Bewuchs mit den Keimen auf (C, D), wobei die Besiedelung von Ag-HA nur geringfügig niedriger war.

Die Bakterien auf Glas wurden als Referenz zu den vorangegangenen Zementen analysiert (E). Auch hier sah man die gleichmäßige Ausbreitung auf der Oberfläche. Es zeigte sich jedoch eine etwas geringere Besiedelung als auf Bruschit, HA und Ag-HA, was an der glatten Oberfläche liegen kann.

Da die Größe von Bakterien nur ca. 0,8 – 1 μm beträgt, war eine genauere Beurteilung der Morphologie nicht weiter möglich. Die typische Anhäufung in Traubenform war vereinzelt bei allen Oberflächen, außer bei Ag-Bruschit, zu erkennen.

Staphylococcus aureus

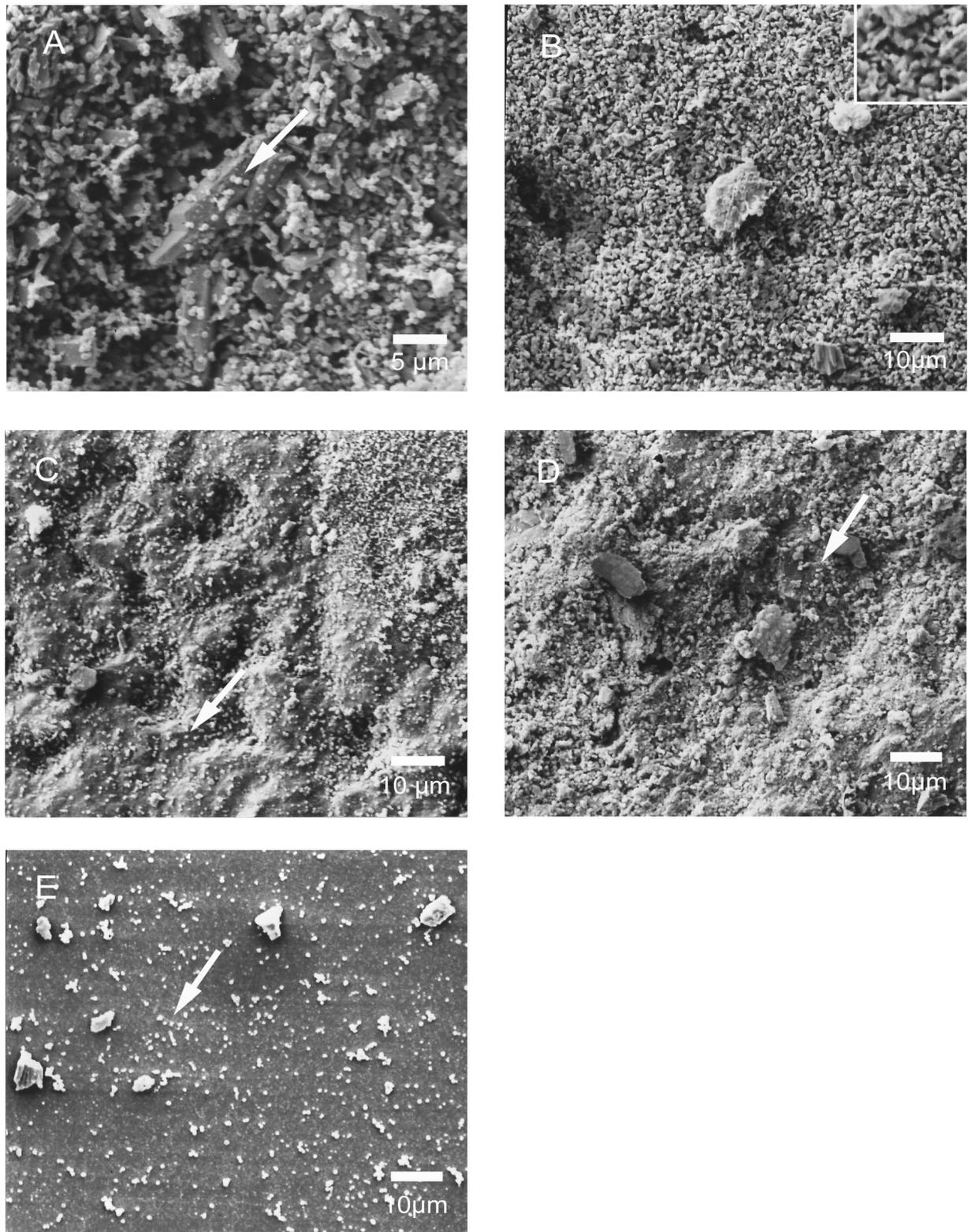


Abbildung 4.13: REM-Aufnahmen der verschiedenen Zemente und von Glas nach einer 24-stündigen Inkubation der Prüfkörper mit *Staphylococcus aureus*. Der Pfeil weist jeweils beispielhaft auf ein Bakterium hin. Der eingefügte Bereich rechts oben im Bild B ist ein Ausschnitt dessen mit einer ca. 2000fachen Vergrößerung.

A: Bruschit, B: Ag-Bruschit, C: Hydroxylapatit, D: Ag-Hydroxylapatit, E:Glas

Staphylococcus epidermidis

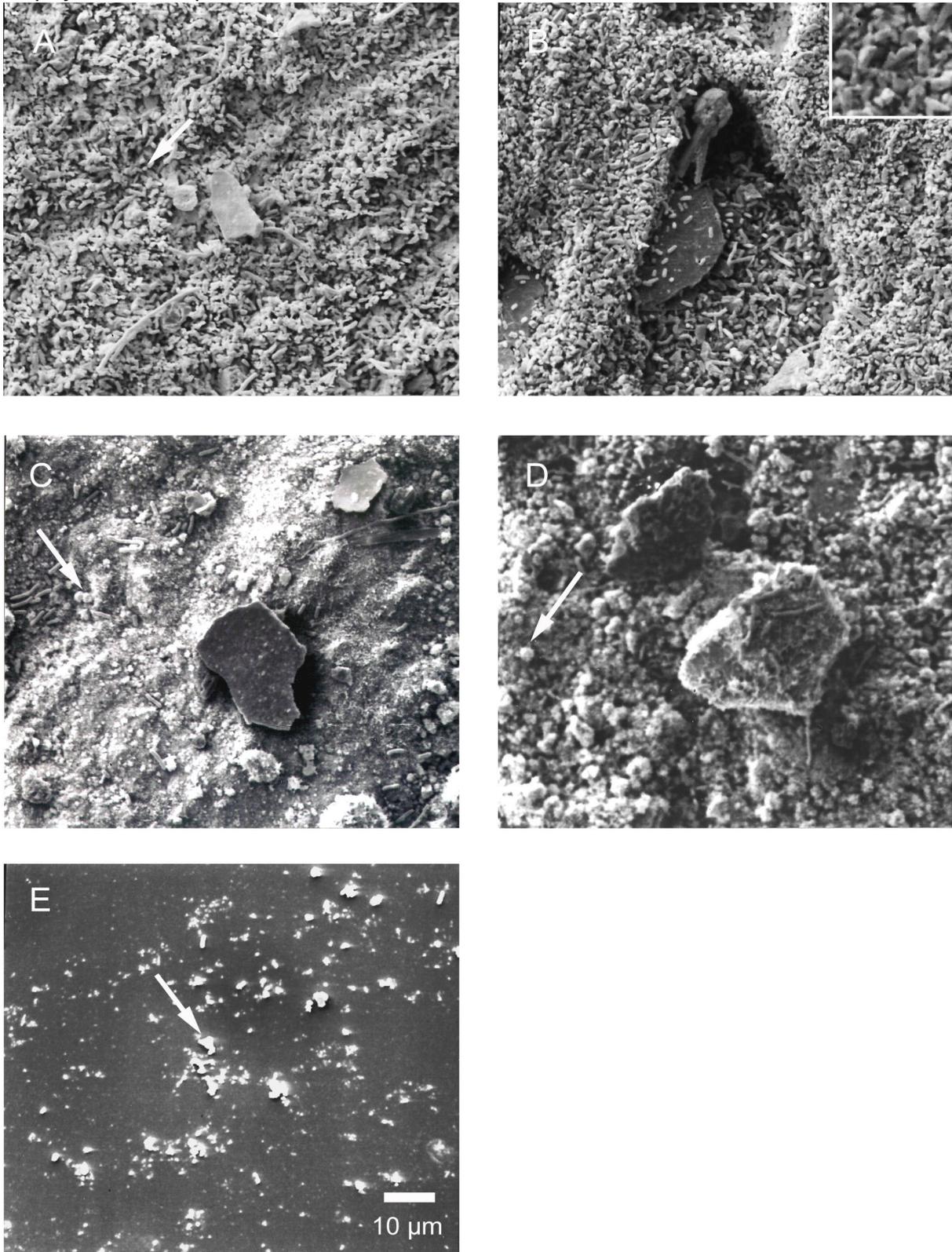


Abbildung 4.14: REM-Aufnahmen der verschiedenen Zemente und von Glas nach einer 24-stündigen Inkubation der Prüfkörper mit *Staphylococcus epidermidis*. Der Pfeil weist jeweils beispielhaft auf ein Bakterium hin. Der eingefügte Bereich rechts oben im Bild B ist ein Ausschnitt dessen mit einer ca. 2000fachen Vergrößerung.

A: Bruschit, B: Ag-Bruschit, C: Hydroxylapatit, D: Ag-Hydroxylapatit, E:Glas

Abbildung 4.14 zeigt *Staphylococcus epidermidis* auf den verschiedenen Zementen und als Referenz auf Glas. Auch hier war auf der Bruschit-Oberfläche eine deutliche gleichmäßige Ausbreitung von rundlichen, aber auch von länglichen Bakterien zu erkennen (A). Da die Staphylococci bekanntermaßen Kokken und daher rund sind, musste hier von einer Kontamination mit anderen Keimen ausgegangen werden. Auf der Oberfläche von Ag-Bruschit fanden sich vereinzelte runde und längliche Bakterien, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Oberflächenstruktur nur schwer davon zu unterscheiden waren (B).

HA und Ag-HA wiesen ebenfalls vereinzelte Anhäufungen von Bakterien auf (C, D). Die Oberflächen waren aber im Vergleich zu Bruschit nur dünn besiedelt.

Auf der Referenzoberfläche Glas konnten kleine rundliche, zu Haufen angeordnete Bakterien beobachtet werden (E).

Eine genauere Beurteilung der Morphologie der Bakterien war aufgrund der zu geringen Vergrößerung auch bei diesen REM-Aufnahmen nicht weiter möglich.

4.5 Auswertung der Zellversuche

Abschließend sollte die Biokompatibilität der Oberflächen anhand von Zellen der Osteoblastenzelllinie MG-63 auf den unterschiedlichen Zementoberflächen untersucht werden. Über einen 10-tägigen Kultivierungszeitraum erfolgten die Messungen an den Tagen 3, 5, 7 und 10 nach der Aussaat. Für die Auswertung wurden von jeder Zementart und pro Versuchstag jeweils vier Prüfkörper verwendet und davon der jeweilige Mittelwert berechnet. Es wurden die Versuchsreihen zweimal durchgeführt und davon nochmals der Mittelwert ermittelt. Die Standardabweichungen wurden in den Graphiken als Fehlerbalken dargestellt.

Mit Hilfe des CASY-1 Zellanalysesystems wurde die relative Anzahl der gewachsenen Zellen auf den unterschiedlichen Oberflächen ermittelt und mittels des WST-1-Zellaktivitätstests die mitochondriale Stoffwechselaktivität der Zellen analysiert.

Abschließend wurde durch das WST / Zellzahl – Diagramm die Zellaktivität der Einzelzelle auf den verschiedenen Oberflächen beurteilt.

4.5.1 Bestimmung der Zellzahl

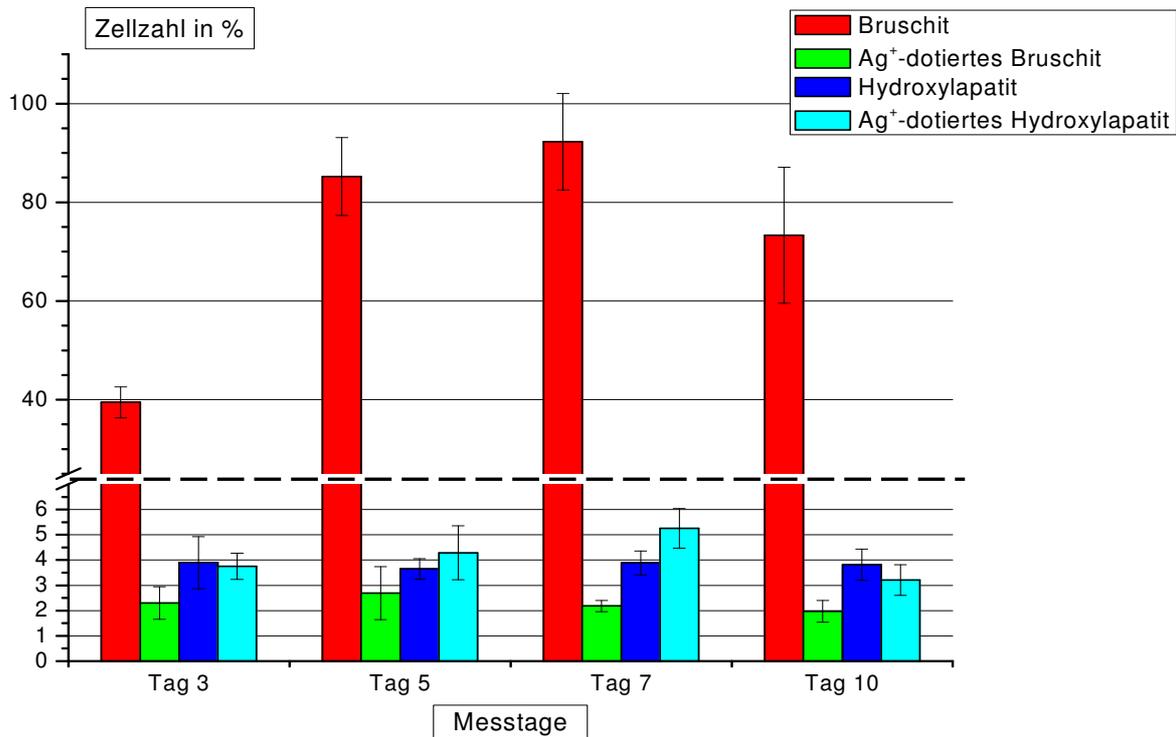


Abbildung 4.15: Relatives Zellwachstum humaner Osteoblasten (MG-63) auf den vier verschiedenen Zementoberflächen ($n = 4$ pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellzahl in %, bezogen zur Referenzoberfläche Bruschit am Tag des besten Wachstums (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Abbildung 4.15 zeigt die Zunahme der Zellzahl über 10 Tage. Zellen auf Bruschit wiesen im Vergleich zu den anderen drei Zementen das signifikant beste Wachstum auf; dabei kam es zu einem stetigen Anstieg bis zu Tag 7 und danach zu einer leichten Abnahme der Zellzahl am Tag 10.

Ähnliche Tendenz zeigte Ag-Hydroxylapatit, allerdings mit erheblich niedrigeren Wachstumszahlen.

Bei dem Ag-Bruschit-Zement kam es zu einem mäßigen Anstieg an den ersten beiden Messtagen (Maximum am Tag 5), danach jedoch wieder zu einem leichten Abfall der Zellzahl.

Durchgehend annähernd gleiche Zellzahlen wurden auf den Hydroxylapatit-Oberflächen beobachtet.

Mit den Abbildungen 4.16 a+b konnte das relative Wachstum der silberdotierten Bruschit- bzw. Hydroxylapatit-Zemente vergleichend zu ihren entsprechenden nicht silberhaltigen Zementen analysiert werden.

Bei den Bruschit-Oberflächen (Abb. 4.16 a) wurde das signifikant größte Zellwachstum festgestellt. Das Maximum wurde am Tag 7 erreicht und am letzten Messtag kam es zu einer Reduktion der Zellzahl.

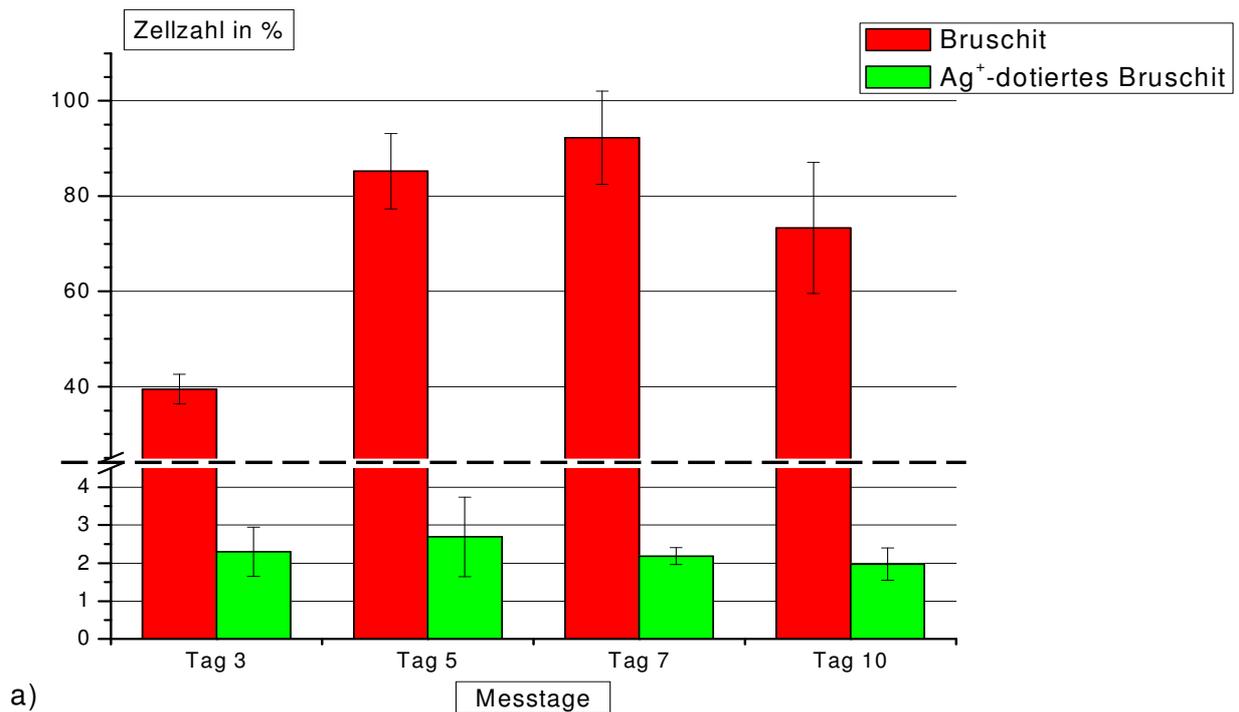
Das Zellwachstum auf Ag-Bruschit war deutlich reduziert, wobei ein leichter Anstieg bis zum Messtag 5 zu verzeichnen war. Danach fiel die Zahl unter das Niveau des ersten Wertes.

Es wurde weiterhin beobachtet, dass Hydroxylapatit (Abb. 4.16 b) eine nahezu konstante Zellzahl über den gesamten Versuchszeitraum hielt.

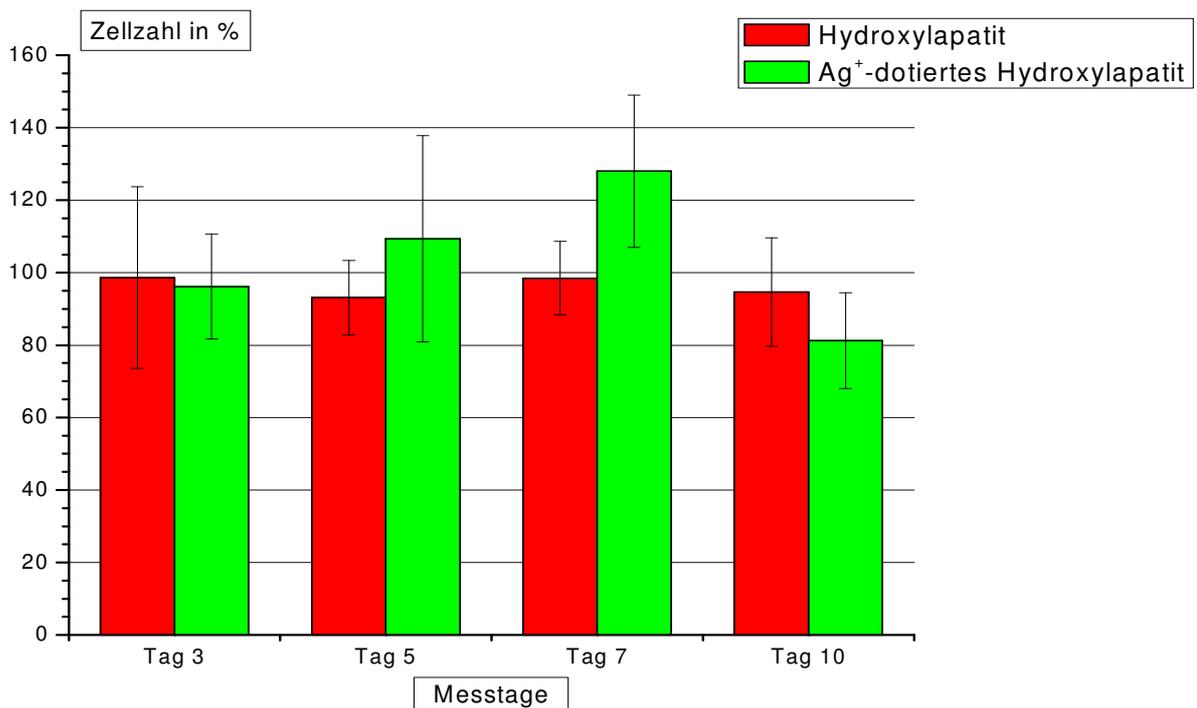
Die Zellzahlen der silberdotierten Hydroxylapatit-Prüfkörper übertrafen sogar an den Messtagen 5 und 7 (Maximum) die Werte von HA, es kam jedoch zu einem deutlichen Abfall der Zahlen am letzten Messtag.

Im Anhang finden sich noch weitere Diagramme (Abb. 8.3 – 8.5), die die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wiedergeben.

4. Ergebnisse



a)



b)

Abbildung 4.16 a): Relatives Zellwachstum humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Bruschit und Ag-Bruschit ($n = 4$ pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellzahl in %, bezogen zur Referenzoberfläche Bruschit am Tag des besten Wachstums (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

b): Relatives Zellwachstum humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit ($n = 4$ pro Oberfläche). Auf der Ordinate ist die relative Zellzahl in %, bezogen zur Referenzoberfläche Hydroxylapatit am Tag des besten Wachstums (Tag 3) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

4.5.2 Bestimmung der zellulären Atmungsaktivität

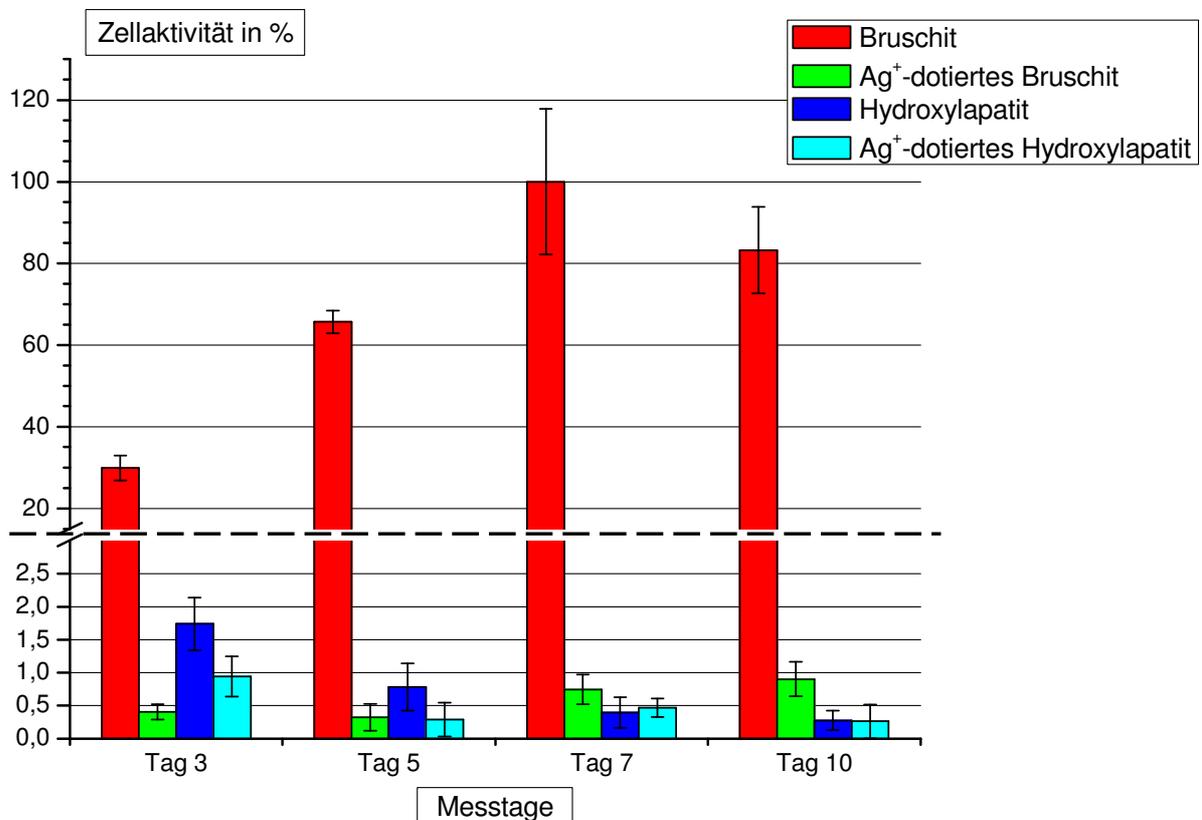
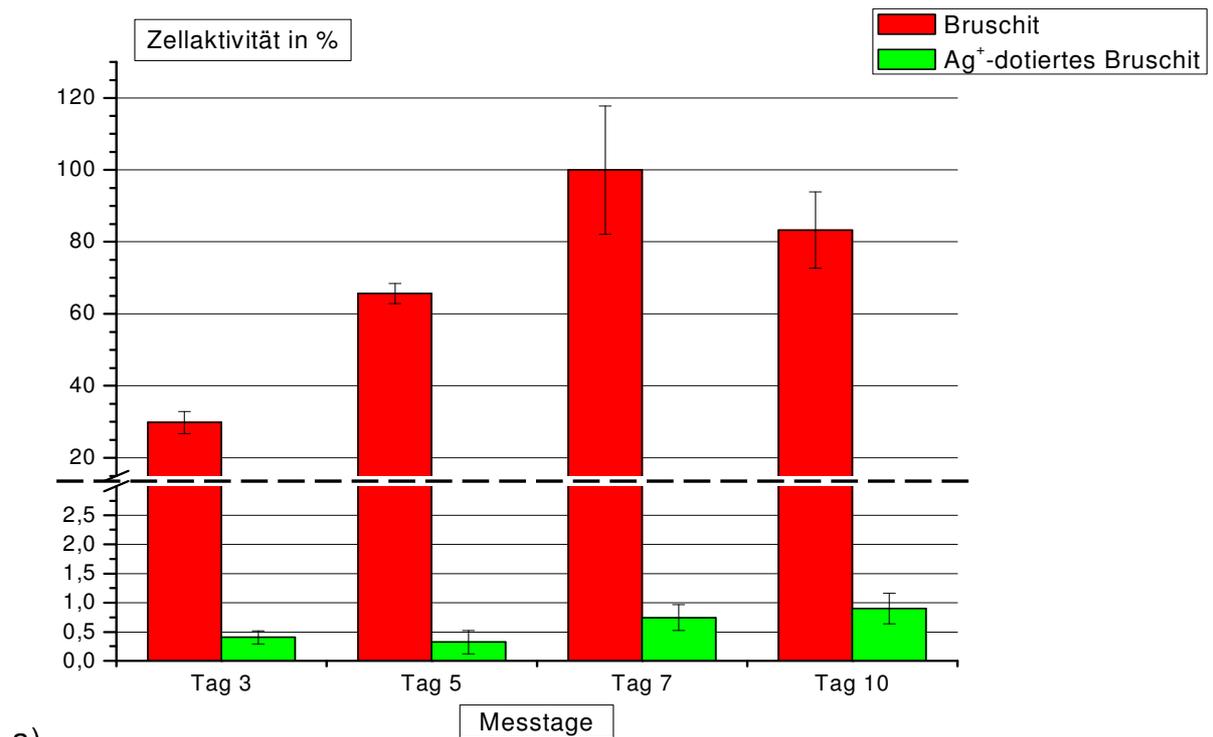


Abbildung 4.17: Relative Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den vier verschiedenen Zementoberflächen (n = 4 pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellaktivität in %, bezogen zur Referenzoberfläche Brushit am Tag der höchsten Aktivität (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

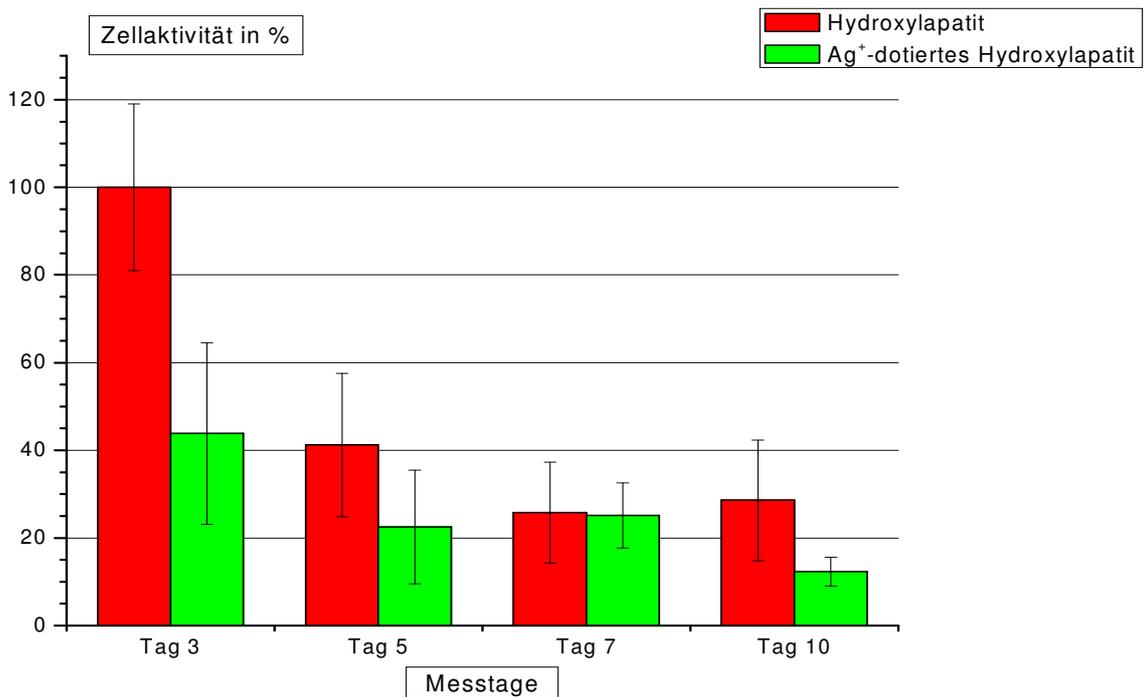
Auch bei der mitochondrialen Aktivität konnten bei den Brushit-Oberflächen die signifikant höchsten Werte ermittelt werden, mit einem konstanten Anstieg bis zum Tag 7 und einer Reduktion der Aktivität am letzten Messtag.

Die Oberflächen Ag-Brushit, Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit zeigten im Vergleich zu Brushit nur eine äußerst geringe Atmungsaktivität. Während HA und Ag-HA bereits an Tag 3 das Maximum erreicht hatten und anschließend eine nahezu stetige Abnahme der Werte bis zum 10. Messtag verzeichneten, wies Ag-Brushit nach einem anfänglichen Rückgang an Tag 5, eine mäßige Zunahme der Werte bis Tag 10 auf.

4. Ergebnisse



a)



b)

Abbildung 4.18 a: Relative Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Brushit und Ag-Brushit (n = 4 pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE**: Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellaktivität in %, bezogen zur Referenzoberfläche Brushit am Tag der höchsten Aktivität (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

b: Relative Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit (n = 4 pro Oberfläche). Auf der Ordinate ist die relative Zellaktivität in %, bezogen zur Referenzoberfläche Hydroxylapatit am Tag der höchsten Aktivität (Tag 1) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Es wurde in Abbildung 4.18 a+b ein separater Vergleich der silberdotierten Zemente Ag-Bruschit und Ag-Hydroxylapatit zu ihren jeweiligen silberlosen Referenzzementen dargestellt.

Dabei konnte bei Bruschit (Abb. 4.18 a) im Vergleich zu Ag-Bruschit eine um mehr als 100fach höhere mitochondriale Aktivität festgestellt werden. Auch in ihrem Aktivitätsverhalten zeigten sie sich unterschiedlich; während Bruschit eine rasche Zunahme der Werte bis zu einem Maximum am Tag 7 mit einem dezentem Rückgang am letzten Messtag aufzeigte, stiegen sie bei Ag-Bruschit, mit Ausnahme eines kleinen Einbruchs an Tag 5, bis zum Ende der Versuchsreihe an.

Bei den Oberflächen Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit (Abb. 4.18 b) konnte man hingegen einen anderen Trend erkennen. Auf beiden Zementarten zeigten die Aktivitäten ihr Maximum bereits an Messtag 3, wobei HA eine mehr als doppelt so hohe Zellaktivität erreichte. Im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführungen sanken die Werte schließlich auf ca. ein Drittel ihrer Ausgangswerte ab.

Die Diagramme der Einzelmessungen sind im Anhang gezeigt (Abb. 8.6 – 8.8).

4.5.3 Bestimmung der spezifischen Atmungsaktivität

Analysierte man die mitochondriale Atmungsaktivität der einzelnen Zelle auf den verschiedenen Oberflächen, so konnte man nur geringe Unterschiede zur Auswertung der gesamten Zellaktivität (Abb. 4.17) feststellen.

Im ersten Versuch (4.19 a) zeigte sich die höchste Aktivität pro Einzelzelle auf dem Bruschit-Zement. Die im Durchschnitt niedrigste Aktivität, bezogen auf die einzelne Zelle, wies hingegen die Ag-Hydroxylapatit-Oberfläche auf.

Auch beim Ag-Bruschit-Zement und Hydroxylapatit-Zement konnte nur eine schwache mitochondriale Aktivität der Einzelzelle nachgewiesen werden.

Auffallend war, dass Ag-Bruschit, HA und Ag-HA ihr Aktivitätsmaximum bereits an Messtag 3 erreicht hatten mit einer kontinuierlichen Reduktion bis zu Tag 10, während Bruschit das Maximum erst am letzten Messtag erzielte.

In der zweiten Versuchsreihe (Abb. 4.19 b) konnte wiederum die höchste Aktivität, bezogen auf eine einzelne Zelle, auf der Bruschit-Oberfläche nachgewiesen werden.

4. Ergebnisse

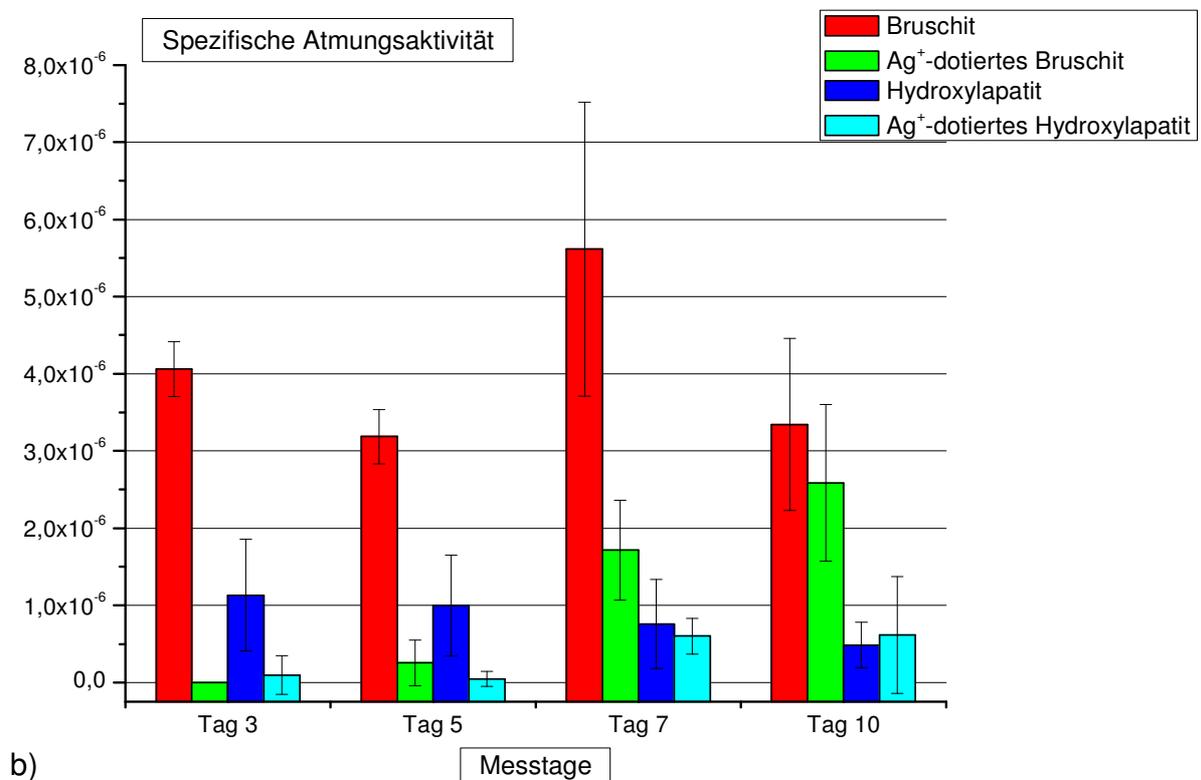
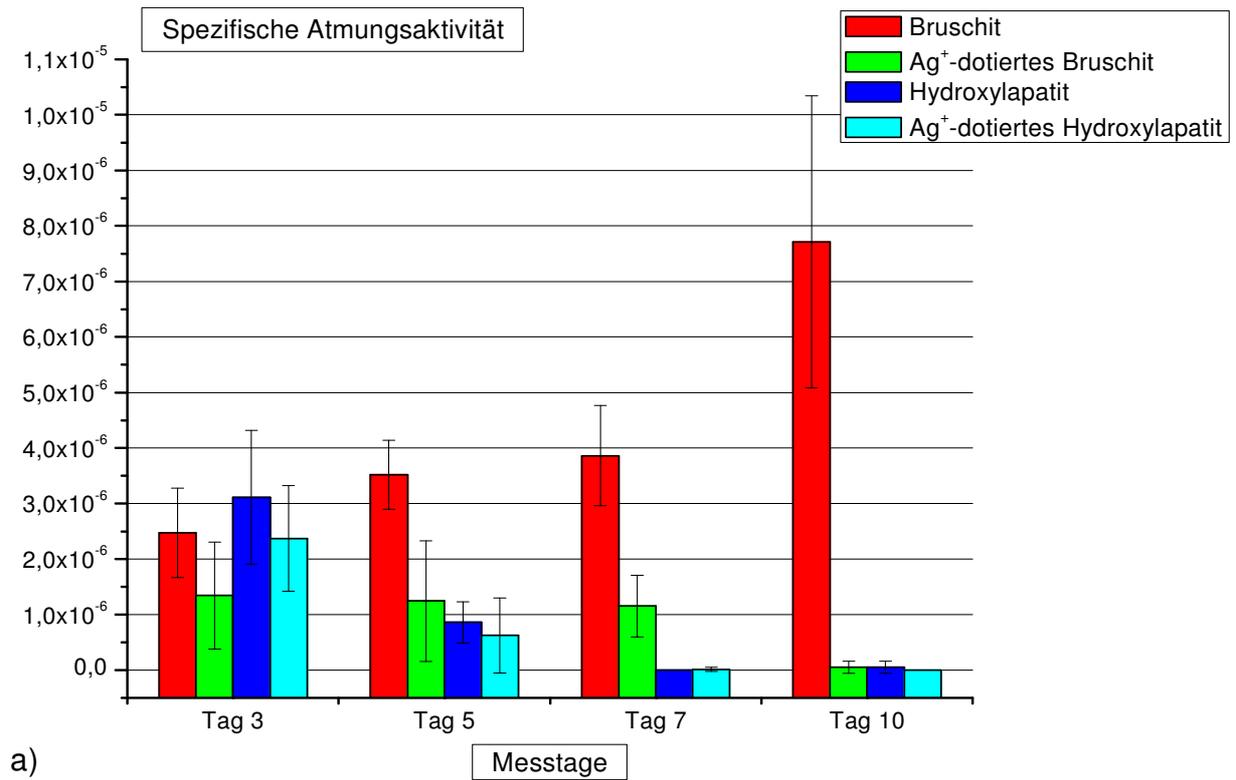


Abbildung 4.19 a+b: Erste (a) und zweite (b) Versuchsreihe; spezifische Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den vier verschiedenen Zementoberflächen (n = 4 pro Oberfläche) bezogen auf die Einzelzelle, ermittelt durch den Quotienten WST / Zellzahl. Auf der Ordinate ist der Wert des jeweiligen Quotienten dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Diesmal wurde das Maximum jedoch bereits an Tag 7 erreicht. Auch Ag-Hydroxylapatit zeigte abermals die im Durchschnitt niedrigste Aktivität.

Im Vergleich zur 1. Versuchsreihe wurde allerdings der Höchstwert bei Ag-Bruskit, HA und Ag-HA nicht am ersten Messtag erreicht, sondern erst an Tag 7 (HA) bzw. an Tag 10 für die silberdotierten Zemente.

Auffallend war hier, dass bei Ag-Bruskit ein steiler Anstieg der Einzelaktivität beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend konnte man feststellen, dass der Bruskit-Zement neben der höchsten Aktivität pro Einzelzelle auch die höchste Gesamtaktivität und größte Gesamtzahl zeigte. Auf der Ag-Hydroxylapatit-Oberfläche hingegen konnte die niedrigste Einzel- und Gesamtaktivität nachgewiesen werden, während die Werte für die Gesamtzellzahl im unteren Mittelfeld lagen.

4.5.4 Rasterelektronenmikroskopische Analyse der Zellen

Mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops wurden Aufnahmen von den mit Zellen bewachsenen Oberflächen angefertigt. Die Fixierung der Zellen erfolgte 5 Tage nach deren Aussaat.

Abbildung 4.20 zeigt das Wachstum der Osteoblasten auf den verschiedenen Zementoberflächen sowie als Referenz auf Glas. Auf der Bruskit-Oberfläche war dabei ein deutlicher Bewuchs mit etwa 30-40 µm großen Zellkörpern zu erkennen, die mit kurzen zytoplasmatischen Fortsätzen untereinander verbunden waren (A). Hingegen fand man auf der Ag-Bruskit-Oberfläche nur ganz vereinzelt einen Osteoblasten; Abbildung 4.20 B zeigt eine Zelle, die sich wahrscheinlich gerade in der Mitose befand (Pfeil).

Ebenso verhielt es sich bei den Hydroxylapatit- bzw. Ag-Hydroxylapatit-Zementen (C, D). Auch hier konnten nur sehr wenige Zellen auf den Oberflächen gefunden werden. Lediglich auf dem silberdotiertem Prüfkörper war es möglich, einen Osteoblasten rasterelektronenmikroskopisch darzustellen.

Auf der Referenzoberfläche Glas war indes wieder eine deutliche Besiedelung der Oberfläche mit Zellen auszumachen (E). Allerdings waren die Zellkörper mit einer Größe von ca. 20-30 µm kleiner und schmaler als auf Bruskit.

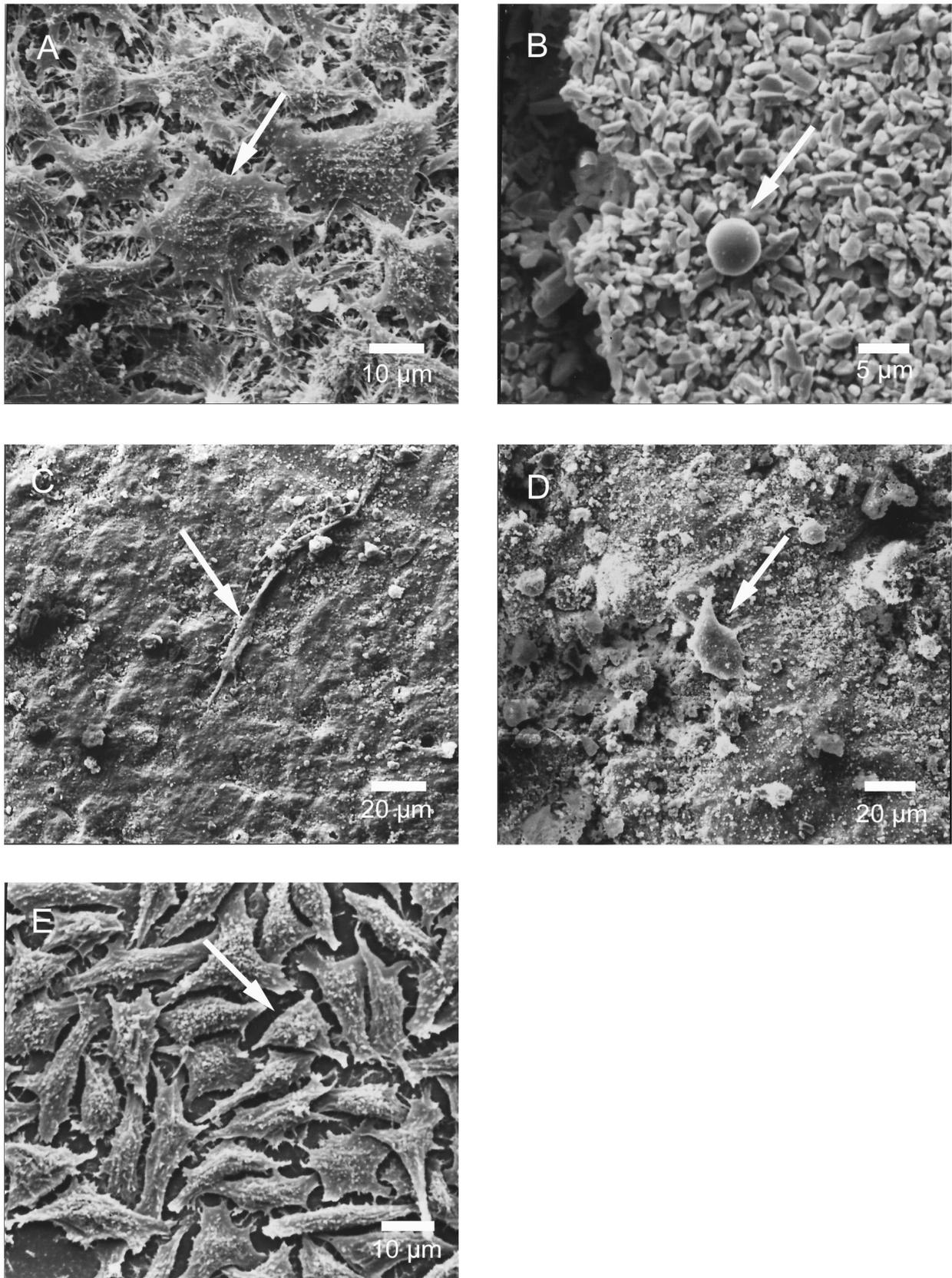


Abbildung 4.20: REM-Aufnahmen der verschiedenen Zemente und von Glas nach einer 5-tägigen Kultivierung der Oberflächen mit Osteoblasten der Zelllinie MG-63. Der Pfeil weist jeweils beispielhaft auf eine Zelle hin.

A: Bruschit, B: Ag-Bruschit, C: Hydroxylapatit, D: Ag-Hydroxylapatit, E:Glas

5. DISKUSSION

In den letzten Jahrzehnten wurden in vielen Bereichen der modernen Medizin zunehmend Biomaterialien zur Verbesserung der chirurgischen Eingriffe oder zum Ersatz von geschädigten Körperorganen eingesetzt. Defekte Gelenke wie Hüfte oder Knie werden durch künstliche Endoprothesen ersetzt, Knochenbrüche durch metallische Nägel, Schrauben und Platten repariert, defekte Herzklappen durch prothetische ersetzt oder z.B. verlorengegangene Zähne durch Implantate wiederhergestellt. Dies wirft allerdings die Frage der Biokompatibilität der verschiedenen Materialien auf, um unerwünschte Nebenwirkungen wie z.B. Toxizität, Entzündungen oder Allergien, möglichst zu vermeiden ^[57,115].

Calciumphosphate verfügen über eine ausgezeichnete Biokompatibilität, d. h. sie werden vom Körper gut angenommen und integriert; diese gute Verträglichkeit beruht auf dem Vorhandensein solcher CaP im Körper als Bestandteil von Knochen, aber auch in gelöster Form. Sie sind daher heute als Biomaterialien weit verbreitet, vor allem zur Hartgeweberegeneration im Bereich von Knochen oder Zahnersatz ^[116,117,118,119].

In Form von größeren Werkstoffen werden Calciumphosphate als künstliche Knochenersatzmaterialien zur chirurgischen Behandlung von Knochendefekten eingesetzt. Ein durch eine Tumorextraktion, einen komplizierten Knochenbruch oder eine Entzündung hervorgerufener Knochendefekt muss mit geeignetem Material aufgefüllt werden, um das Einwachsen von neuem Knochengewebe zu ermöglichen. Wenn dies nicht geschieht, kann Bindegewebe in den Defekt einwachsen, sodass die Knochenbildung unterbleibt. Das als "goldener Standard" bezeichnete Verfahren der Entnahme autologen Knochens, zumeist aus dem Hüftkamm, zieht zusätzliche Kosten, Risiken und Belastungen des Patienten nach sich und es bestehen Grenzen hinsichtlich der zur Verfügung stehenden Knochenmenge. Die teilweise ausgedehnten Entnahmedefekte schmerzen oft noch sehr lange und es besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko. Fremdmaterialien biologischer Herkunft (von humanen oder tierischen Spendern) werden wegen möglicher Infektionsgefahren kritisch diskutiert, und die Notwendigkeit für ein vollsynthetisches Material ist offenkundig ^[26].

Heute ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Calciumphosphaten zur Behandlung von Knochendefekten auf dem Markt ^[57,58,120]. Sie werden als formbare Zemente

bzw. Granulate, keramische Implantate und Beschichtungen auf metallischen Implantatwerkstoffen verwendet ^[57,58,121].

Die Beschichtung von metallischen Implantaten mit Calciumphosphat spielt eine große Rolle in der Medizin. Solche Implantate werden vor allem als Endoprothesen oder als Zahnimplantate im Kiefer verwendet. Neben einer Erhöhung der Oberflächenrauigkeit ermöglicht eine Beschichtung mit Calciumphosphaten, dass Knochen gut an die Calciumphosphatdeckschicht anwächst. Die Beschichtung wirkt somit wie eine Art Klebstoff zwischen Metall und Knochen ^[115,122].

Trotz der stetig voranschreitenden Forschungsentwicklungen und Verbesserungen im Bereich der Biomaterialien, kommt es trotz all dem zu einer steigenden Anzahl von Implantat-assoziierten bakteriellen Infektionen; dies ist eine der Hauptursachen der Revisionschirurgie ^[123]. Unzureichende Patientenresultate, eine verminderte Lebenserwartung des Implantates und zunehmende Implantat-Fehlresultate sind die Folge. Die Notwendigkeit einer Revisionschirurgie führt oft zu langwierigen post-operativen Behandlungen, die den Patienten physisch wie psychisch traumatisieren können. Desweiteren werden enorme Behandlungskosten, eine zunehmende Morbidität und abnehmende Patientenzufriedenheit verursacht ^[124].

Es ist bekannt, dass eine Infektion des Implantates mit einer Biofilmbildung, gekennzeichnet durch Mikrokolonien von Bakterien umhüllt von einer schützenden Polymer-Matrix, einhergeht. Ein Biofilm kann sich auf jeglicher künstlicher Implantat-Oberfläche bilden, die in einen menschlichen Körper eingebracht wurde sowie an Geweben, die an implantierte Oberflächen angrenzen. Die Bakterien, die im Biofilm heranwachsen, weisen dabei eine zunehmende Resistenz gegenüber antibakteriellen Agenzien auf, welche ein Scheitern der Behandlung von Implantat-assoziierten Infektionen durch systemische Antibiotikagaben hervorrufen. Außerdem kann es zu lokalen Knochendestruktionen führen ^[125,126]. Von daher ist die Prävention einer Bakterienbesiedlung und Biofilmbildung von besonderer Bedeutung.

Die Auswirkungen von Oberflächeneigenschaften auf die Bakterienhaftung hat eine durchaus beachtliche Aufmerksamkeit erlangt. So wurde bereits in zahlreichen Studien bewiesen, dass der Einsatz von antiseptischen Oberflächenbeschichtungen eine Methode zur Minimierung von Implantatinfektionen ist. Die kovalente Anbindung

von polykationischen Gruppen ^[127,128], die Imprägnierung bzw. Beladung mit Chitosan-Nanopartikeln oder Antibiotika ^[129,130] und die Beschichtung der Oberflächen mit quartären Ammoniumverbindungen ^[131], Jod ^[132], und Silber (Ag)-Ionen ^[133,134] sind Beispiele vorangegangener Implantatmodifikationen.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Calciumphosphatzemente (Broschit, Hydroxylapatit) mit 1 % Silber versetzt und dessen antibakteriellen Eigenschaften sowie dessen Biokompatibilität im Vergleich zu denen von unbeladenen Calciumphosphatzementen *in vitro* untersucht.

Um nähere Erkenntnisse über die chemischen und physikalischen Eigenschaften der verwendeten Zemente zu gewinnen, wurden zu Anfang entsprechende Untersuchungen mittels der Massenspektrometrie und Röntgendiffraktometrie sowie Tests zur Bestimmung der Druckfestigkeit und Abbindezeit durchgeführt.

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. Die in der Literatur beschriebenen Festigkeiten reichen von 20-83 MPa ^[135] und ermöglichen derzeit nur einen Einsatz im gering belasteten Bereich ^[32].

Die mechanischen Eigenschaften sind hierbei von verschiedenen Faktoren abhängig; dazu zählen unter anderem das Porenvolumen, das Mischungsverhältnis zwischen Calcium und Phosphat, das Verhältnis zwischen Pulver und Lösungsmittel, die Art des Lösungsmittels sowie die Art der Prüfkörperherstellung (kompressionsfrei oder mit Vorkompression). Gbureck et al. konnten z.B. einen Zusammenhang zwischen Vorkompression und Porenvolumen bei steigender Druckfestigkeit nachweisen. Ohne Vorverdichtung wurden geringere Festigkeiten aufgrund des höheren Porengehaltes in der abgebundenen Zementmatrix gemessen. Mit Vorkompression gelang es, die überschüssigen Flüssigkeitsanteile aus der Zementmatrix zu pressen, und eine geringere Porosität der abgebundenen Matrix einzustellen ^[82]. Ebenso sind die Verarbeitungsbedingungen, die während eines operativen Einbringens vorherrschen, ein wichtiges Kriterium für die Festigkeitswerte. Körperflüssigkeiten wie Sekret oder Blut wirken sich negativ auf die *in vitro* gemessenen Festigkeiten aus. Auch Lufteinschlüsse, z.B. bedingt durch eine

erschwerte Applikation der Knochenersatzmaterialien, ändern die Porosität des Werkstoffes und damit auch die theoretisch erzielbaren Festigkeiten *in vivo*. Der Gefahr einer Einblutung kann jedoch durch schnell abbindende Zemente entgegengesteuert werden.

Bei der Analyse der Druckfestigkeiten in der vorliegenden Arbeit konnte nun beim Ag-Bruschi-Zement gegenüber dem Bruschi-Zement sogar eine minimale Erhöhung durch den Silberzusatz festgestellt werden, während der Ag-HA-Zement im Vergleich zum HA-Zement knapp die Hälfte seiner Druckfestigkeit eingebüßt hatte (vgl. Tabelle 4.4).

Weitaus geringere Unterschiede gab es bei der Ermittlung der Abbinde- bzw. Verarbeitungszeit. 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 daher zu einer verlängerten Narkosezeit mit erhöhtem Risiko für den Patienten. Eine zu kurze Abbindezeit kann dazu führen, dass die Zementpaste nicht rechtzeitig in die Kavität appliziert werden kann und somit strukturelle Schwachstellen resultieren oder sogar eine Applikation unmöglich wird.

Die Modifikation mit Silber ergab in dieser Arbeit keine (Ag-Bruschi) bzw. nur geringe Änderungen der Abbindezeit um +1 min (Ag-HA), was aufgrund des Messverfahrens vernachlässigbar ist und für den klinischen Gebrauch keine Rolle spielt (vgl. Tabelle 4.3).

Bei der Untersuchung mittels der Röntgendiffraktometrie konnten die für die jeweiligen Zemente charakteristischen Peaks detektiert werden (vgl. Abb. 4.1, 4.2, 4.4 und 4.5). Silber konnte, wahrscheinlich aufgrund der geringen Konzentration, in keinem der Pulver nachgewiesen werden.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der Ausgangspulver α - bzw. β -TCP mit AgNO_3 konnte man ein molares Verhältnis von $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$ von je 0,78 % feststellen (vgl. Tabelle 4.1). Da jedoch dem Tricalciumphosphat bei der Herstellung 1 % Silber beigemischt wurde, müsste sich somit auch rein theoretisch ein molares Verhältnis von 1 % ergeben. Zu erklären ist dieser Silberverlust evtl. durch den Sintervorgang im Ofen während der Pulverherstellung; es ist zu vermuten, dass sich ein Teil des beigemischten Silbers durch die Hitzeentwicklung verflüchtigt haben könnte. Ebenso

könnte es möglich sein, dass ein Teil des Silbers bereits nach dem Zusammenmischen der einzelnen Pulverkomponenten beim Trocknen im Trockenschrank verdampft ist, da dieser nach der Trocknung des Pulvergemisches eine Schwarzfärbung im Inneren aufwies.

Vergleicht man nun die molaren Verhältnisse der Ausgangspulver mit den gemessenen Werten der daraus hergestellten Ag-Bruschit und Ag-Hydroxylapatit-Probenkörper, so konnte bei Ag-HA nur ein um ca. 0,04 % geringeres $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis von 0,74 % ermittelt werden, während Ag-Bruschit lediglich ein $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Verhältnis von 0,60 % aufzeigte (vgl. Tabelle 4.2). Der geringere Silbergehalt bei Ag-Bruschit ist allerdings durch die Zugabe von Calcium-bis-dihydrogenphosphat Monohydrat (MCPM) zu dem silberdotierten β -TCP plausibel zu erklären. Unterdessen könnte der Grund für das etwas niedrigere Verhältnis für Ag-HA bei der ICP-Messung liegen; zu nennen wäre zum einen etwaige Ungenauigkeiten bei der Verdünnung der Messproben oder zum anderen der Ca^{2+} -Gehalt in der Verdünnungslösung oder in der Messflüssigkeit (Standard der Fa. Merck).

Um zu klären, wieviel Silber bereits durch den Auslagerungsprozess eluiert wird, wurde jede der vier verschiedenen Zementarten über 7 Tage in PBS bzw. LB-Medium ausgelagert und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Sowohl Ag-Bruschit als auch Ag-HA in PBS (molares Verhältnis $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$ 0,43 % bzw. 0,46 %) gaben mehr Silber ab als in LB-Medium (0,49 % bzw. 0,58 %), wobei dieser Unterschied bei den silberdotierten Hydroxylapatit-Prüfkörpern deutlicher war (vgl. Tabelle 4.2). Erklären kann man dieses Phänomen evtl. dadurch, dass im PBS-Medium mehr Cl^- -Ionen enthalten sind und dadurch mehr Ag^+ in Form von AgCl ausgefallen ist.

Neben der Analyse der Probenkörper wurden auch die Auslagerungsmedien massenspektrometrisch untersucht (vgl. Tabellen 4.6 – 4.9). Anhand der Ergebnisse lässt sich erkennen, dass Ag-Bruschit und Ag-HA in PBS ein über die Auslagerungszeit konstantes Freisetzungverhalten von Silberionen darlegten. Ag-Bruschit in LB wies hingegen eine zwar nahezu konstante, aber im Vergleich doppelt bis dreifache Freisetzungsrates von Silber auf, während für Ag-HA in LB nur am ersten Auslagerungstag ein Spitzenwert gemessen wurde, der im weiteren Verlauf gegen Null abfiel.

Betrachtet man das molare Verhältnis $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$ der Auslagerungsmedien, so konnte ein über den Auslagerungszeitraum stetiger Anstieg der Werte von Ag-HA in PBS

beobachtet werden, d.h. es hatte sich aus diesen Oberflächen bei Zunahme der Auslagerungsdauer prozentual mehr Silber als Calcium herausgelöst; demgegenüber nahm das Verhältnis im LB-Medium stetig ab, was durch die sinkende Eluierung des Silbers erklärt werden kann. Ag-Bruschi zeigte hingegen sowohl in PBS als auch im LB-Medium ein anfänglich leicht steigendes und dann konstantes molares Verhältnis.

Bei der Analyse des Silbergehalts in den verschiedenen Bakterienkulturen bestätigten sich die Ergebnisse aus Tabelle 4.6 und 4.7. In den Bakterienkulturen gab Ag-Bruschi signifikant mehr Silberionen an das Medium ab als Ag-HA (vgl. Abb. 4.12). Auffallend war allerdings, dass im LB-Natriumnitrat-Medium durchwegs bei allen Zementarten mehr Silber freigesetzt wurde als im LB-Medium. Dies hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Vorhandensein von Bakterien.

Nach den chemisch-physikalischen Untersuchungen wurde nun die antibakterielle Wirksamkeit sowie die Zytokompatibilität der silberdotierten CPC im Vergleich zu den silberlosen Zementen analysiert. Für die Versuchsreihen wurden dafür Prüfkörper von den zu untersuchenden Zementarten hergestellt, für die Bakterientests 24 h in Zellkulturplatten mit den entsprechenden Bakterienmedien bebrütet und anschließend hinsichtlich ihrer mitochondrialen Atmungsaktivität eruiert. Bei den Zelltests wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen ebenfalls die Atmungsaktivität bestimmt sowie eine Ermittlung der Zellzahl durchgeführt.

Die medizinische Verwendung von Silber ist bereits uralt. So wurde Silber schon in der Antike zur beschleunigten Wundheilung, Infektionsbekämpfung und vor allem zur Haltbarmachung von Trinkwasser eingesetzt ^[97].

Seit Ende des 19. Jahrhunderts begann die moderne Geschichte des Silbers in der medizinischen Anwendung; die Wissenschaftler Ravelin und C. von Nägeli sowie der Gynäkologe Carl Sigmund Franz Credé waren Pioniere bei der Erforschung des antimikrobiellen Effekts von Silber ^[98,99].

Bis zum verbreiteten Aufkommen von chemisch hergestellten Antibiotika um 1930 war die Behandlung mit Silber und silberhaltigen Präparaten ein schulmedizinischer Grundpfeiler. Mit der Entdeckung des Penicillins und der in der Folge entwickelten Antibiotika verschwand Silber in seiner medizinischen Anwendung aus dem Blickfeld

der breiten Öffentlichkeit. Die Gründe waren zum einen die neuen und schnellen Resultate des Allzweckmittels Antibiotikum, zum anderen die Möglichkeit, große Mengen künstlicher Medikamente zu produzieren.

Anfangs der 1990er Jahre akzentuierte sich das Problem der Resistenzbildung gewisser Bakterienstämme gegen chemisch hergestellte Antibiotika. Im Zuge dieser Entwicklung gewinnt Silber als Ergänzung und Alternative heute wieder vermehrt an Bedeutung.

Die antibakteriellen Eigenschaften von Silber werden schon seit langem im biomedizinischen Bereich ausgenutzt. Die wesentlichen Merkmale von Silber sind dabei sein breites antimikrobielles Wirkspektrum, seine geringe Neigung zur Resistenzbildung, sowie seine Fähigkeit, eine polymikrobielle Besiedelung zu unterbinden^[136,137]. Aufgrund der niedrigen Resistenzbildungs-Neigung von silberhaltigen Produkten gegenüber Bakterien, eignet sich sowohl metallisches als auch ionisiertes Silber für den Einsatz in Biomaterialien^[138,139,140].

Für die antiseptische Wirkung des Silbers ist das einwertige Silberkation Ag^+ verantwortlich. Silberionen üben auf verschiedene Art und Weise gleichzeitig ihre letale Wirkung auf Mikroorganismen aus: sie gehen starke Verbindungen mit Schwefel-, Sauerstoff- und Stickstoffgruppen in den Zellwänden von Bakterien und Pilzen ein; diese sind wichtige Bestandteile von Enzymen, welche für den transmembranen Stoffwechsel sowie den Elektrolytentransport verantwortlich sind. Silberionen denaturieren Funktions- und Strukturproteine, die in Zellmembranen und im Zytoplasma enthalten sind. Sie interagieren mit der DNA, die dadurch ihre Fähigkeit zur Replikation einbüßt und reagieren mit der Zellmembran, die für die Zellatmung zuständig ist, so dass diese in ihrer Funktionsfähigkeit beeinträchtigt wird und destabilisieren schließlich die Zellwand, die ihre lebenswichtige Widerstandsfähigkeit verliert^[141,142].

Auf Grund der vielfachen Ansätze der Einwirkung von Silberionen auf die Bakterienzelle wird das Risiko der Resistenzentwicklung auf ein Minimum reduziert und Silber erweist sich zu 99,9% wirksam gegenüber Bakterien und Pilzen^[143].

Laut Literaturangaben reicht dabei schon eine Ag^+ -Konzentration von weniger als 35 $\mu\text{g/l}$ aus, um das Bakterienwachstum effektiv zu hemmen^[141]. Eine andere Quelle berichtet sogar nur von 2 $\mu\text{g/l}$ ^[144]. Viele Literaturangaben sind jedoch kritisch zu

hinterfragen, da der Einfluss des umgebenden Milieus nicht vernachlässigt werden darf. Die meisten Daten wurden unter wenig standardisierten Verhältnissen ermittelt und sind daher nicht direkt vergleichbar.

Wie schon erwähnt, wurde bereits in zahlreichen Studien die antimikrobielle Wirkung von Silber mehrfach untersucht; so zum Beispiel bei chronischer Osteomyelitis, bei Infektionen im Harntrakt, Infektionen bei zentralen Venenkathetern, bei Verbrennungen oder bei der Entwicklung von Dentalkeramiken oder Augenlinsen [140,145,146,147,148,149,150,151]. Auch in der Orthopädie kommen silberhaltige Materialien zum Einsatz; Collinge et al. beschrieben eine verminderte Infektionsrate bei silberbeschichteten externen Fixationsstiften. 36 Ag-beschichtete und 12 konventionelle Edelstahlstifte wurden dabei in den Beckenkamm von Schafen eingebracht und mit *Staphylococcus aureus* angeimpft. Nach 2,5 Wochen wurden die Pins entnommen, unter dem Rasterelektronenmikroskop begutachtet sowie die Insertionsstelle auf Entzündungen untersucht. Das Resultat war eine signifikante Reduktion der Bakterienzahl auf silberbeschichteten Pins [152]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Gosheger et al.; sie verglichen Titan-Megaprothesen mit Silberbeschichteten, indem sie Kaninchen ebenfalls mit *Staphylococcus aureus* infizierten. Die Silber-Gruppe zeigte auch hier eine signifikant geringere Infektionsrate (7% gegenüber 47%) im Vergleich zur Titan-Gruppe [153]. Eine zunehmende Rolle spielt Silber in der Notfall- und Intensivmedizin. So wurde von Guggenbichler et al. ein silberimprägnierter zentraler Venenkatheter (sog. „Erlanger Silberkatheter“) entwickelt, der eine katheterassoziierte Infektion oder Sepsis verhindern bzw. die Anzahl reduzieren soll. Dazu wurde eine randomisierte, vergleichende Untersuchung über einen Zeitraum von 2 Jahren durchgeführt. Die Bewertung der Zielvariable "katheterassoziierte Infektion" erfolgte anhand des mikrobiologischen Befundes (Blutkultur, Abstrich von der Kathetereintrittsstelle, Katheterspitze) und eines speziell entwickelten klinischen Scores. Aus diesen Daten konnte mit dem "Erlanger Silberkatheter" eine Reduktion der Katheterbesiedlung um 37,7% nachgewiesen werden. Das Auftreten einer schweren katheterassoziierten Infektion d. h. einer septischen Komplikation, konnte bei den Silberkathetern gegenüber der Kontrollgruppe um 71,3% reduziert werden [150]. Eine weitere Anwendung findet Silber im Bereich der Augenheilkunde; Nissen und Furkert untersuchten die antimikrobielle Wirksamkeit von silberbeschichteten Kontaktlinsen gegenüber

Pseudomonas aeruginosa bzw. *Staphylococcus aureus* im Vergleich zu unbeschichteten Kontaktlinsen. Auf den Linsen mit Silberbeschichtung war eine deutliche Keimzahlverminderung im Vergleich zu den unbeschichteten Linsen zu beobachten^[151].

Weiterhin wurden zahlreiche *in vitro*-Versuche mit antimikrobiellen Calciumphosphaten und Calciumphosphatzementen durchgeführt^[147,154,155,156,157,158,159]. Bei Kim et al. zum Beispiel wurden antibakterielle Keramiken, basierend auf Hydroxylapatit, mit verschiedenen Metallionen (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) beschickt und anschließend auf ihre antibakterielle Wirksamkeit gegenüber dem Bakterium *Escherichia coli* untersucht. Das Ergebnis war eine nahezu 100%ige Reduktion der Bakterienkolonien durch Ag^+HA ^[147]. Eine erst kürzlich erschienene Studie befasste sich mit einer neuartigen Beschichtungstechnologie von Calciumphosphat mit Silber (Ag-CaP), indem man eine thermische Spritztechnik anwendete. Es wurde dabei die antibakterielle Wirksamkeit sowie die Biokompatibilität dieser Beschichtung überprüft. Es zeigte sich eine vollkommene Wachstumshemmung sowohl gram negativer (*Escherichia coli*) als auch gram positiver Bakterien (*Staphylococcus aureus* und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*). Außerdem konnte eine signifikante Reduktion der Bakterienanheftung auf der Ag-CaP-Beschichtung gegenüber der CaP-Beschichtung nachgewiesen werden^[158].

In der vorliegenden Studie, die sich ebenfalls mit Calciumphosphatzementen befasste, wurden die antibakteriellen Eigenschaften von silberdotierten Bruschit- und Hydroxylapatit-Zementen gegenüber *Staph. aureus* und *Staph. epidermidis* mittels eines Atmungsaktivitätstests ermittelt (vgl. Abb. 4.10 u. 4.11). Es wurde festgestellt, dass Ag-Bruschit sowohl im LB- als auch LB-Natriumnitrat-Bakterienmedium eine signifikant höhere antibakterielle Wirksamkeit gegenüber den Bakterienstämmen aufwies als Ag-Hydroxylapatit. Bei Ag-HA zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen den beiden Bakterienstämmen; während bei *Staph. aureus* nur ein geringer Unterschied zu den silberlosen Zementen dargestellt werden konnte, konnte bei *Staph. epidermidis* jedoch eine deutliche bakterizide Wirkung nachgewiesen werden. Ein Grund für die geringere antibakterielle Wirksamkeit könnte das wesentlich geringere Freisetzungsverhalten von Ag-HA im LB-Medium sein (vgl. Abb. 4.6 u. 4.7); während Ag-Bruschit kontinuierlich mit Abstand die höchste Freisetzung

verzeichnete (im Durchschnitt 800 - 900 µg/l), wies Ag-HA nur am ersten Tag der Auslagerungszeit einen Spitzenwert von ca. 800 µg/l auf, der in den darauffolgenden Tagen rapide gegen Null steuerte. Dies könnte auch den signifikanten Mengenunterschied an Silber erklären, welches während der Inkubationsphase der Bakterien aus den verschiedenen Zementverbindungen an das entsprechende Medium abgegeben wurde (vgl. Abb. 4.12); während auch hier die eindeutig höchste Löslichkeitsrate durchwegs bei dem Ag-Bruschit-Zement zu verzeichnen war, offenbarte Ag-Hydroxylapatit hingegen nur ein geringes Freisetzungsverhalten. Des Weiteren gibt es trotz der Vielzahl an Studien, die die antimikrobielle Wirksamkeit von silberhaltigen Biomaterialien belegen, auch Untersuchungen, die dies widerlegen [160,161]. So präsentierten Cook et al. eine Studie, in der die antibakterielle Aktivität silberbeschichteter Nahtringe von Herzklappenprothesen versus unbeschichtete Nahtringe erforscht wurde. Überraschenderweise war der silberbeschichtete Nahtring mit mehr Bakterienkolonien (*Staph. epidermidis*) besiedelt als der Silberlose. Somit besteht ein berechtigter Zweifel an der Wirksamkeit der silber-modifizierten Herzklappenprothese, der Mechanismus ist hier aber noch nicht geklärt.

Neben der antibakteriellen Wirkung ist es jedoch auch von Bedeutung, die Zytotoxizität von Silber auf menschliche Zellen zu untersuchen.

Es wurde schon oft die Frage erhoben, warum Silber nicht den gleichen Effekt auf eukaryotische Zellen aufweist wie bei Prokaryoten. Da Silberionen sehr unspezifisch reagieren, ist das Wirkungsspektrum sehr breit und Mikroorganismen entwickeln kaum Abwehrmechanismen. Silberionen reagieren aber auch mit Proteinstrukturen höherer Säugerzellen. Diese sind jedoch ungleich größer als Bakterienzellen und viele lebenswichtige Funktionen wie die Energiegewinnung finden intrazellulär statt. Daher sind für eine Schädigung menschlicher Zellen oder Gewebe erheblich mehr Silberionen notwendig als für Bakterien. Dieser Unterschied eröffnet somit ein „therapeutisches Fenster“; dies bedeutet in der Praxis, diejenige Konzentration zu ermitteln, die antimikrobiell zwar gut wirksam ist, während sie für den Menschen bei topischer und systemischer Anwendung aber dennoch sehr gut verträglich ist [162].

Wird diese Konzentration jedoch überschritten, kann es je nach Dosis zu einer lokalen Toxizität bis hin zu systemischen Auswirkungen in Form von Argyrie, einer grau-blauen Verfärbung der Haut bzw. der Schleimhaut kommen. Diese Erkrankung

wurde hauptsächlich im 19. Jahrhundert beobachtet, vor allem bedingt durch die berufliche Exposition in Silberschmieden, im Bergbau oder bei Photographen. Sie kann aber auch durch silberhaltige Medikamente hervorgerufen werden. Laut Literaturangaben ist für das Auftreten einer systemischen Argyrie ein Gesamtsilbergehalt von ca. 4-6 g Silber im Körper erforderlich ^[153].

Es wurden daher zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit der Biokompatibilität und einer möglichen Zytotoxizität von silberhaltigen Biomaterialien befassten ^[134,153,154,155,156,163,164,165]. So berichteten zum Beispiel Tweden et al. von einem Biokompatibilitätsversuch, in dem Fibroblasten einem silberbeschichteten textilen Gewebe in einem Serumextrakt für 48 h ausgesetzt waren. Es zeigten sich dabei keinerlei Anzeichen einer Toxizität, solange die Silberkonzentration im Serumextrakt unter 1200 ppm blieb ^[164]. Chen et al. zogen ebenfalls Fibroblasten für die Zytotoxizitätsprüfung von silberbeladenen Hydroxylapatitbeschichtungen heran. Auch hier hatten die Beschichtungen bis zu einem Silbergehalt von 5 Gew.-% keine toxischen Auswirkungen auf die Zellen ^[154]. In weiteren Studien von Chen et al. wurde festgestellt, dass AgHA-Beschichtungen mit 1 Gew.-% Silber keinen toxischen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung von menschlichen embryonalen Gaumenmesenchymzellen (HEPM), einer osteoblastären Vorläuferzelllinie, ausüben ^[155,165]. Bosetti et al. führten *in vitro*-Untersuchungen durch, um die Zytokompatibilität, Zytotoxizität und Genotoxizität von silberbeschichteten externen Fixateuren zu erforschen. Sie verwendeten dabei humane periphere Blutlymphozyten sowie Fibroblasten und Osteoblasten. Die Analyse zeigte, dass Silber im Vergleich mit Edelstahl weder geno- noch zytotoxisch war. Bei der Zellkultivierung über 4 Tage wurde auf dem silberbeschichteten Material eine bessere Zellausbreitung sowie eine höhere Zellzahl im Vergleich zu dem unbeschichteten Material nachgewiesen ^[134]. Um die Biokompatibilität von AgHA-Probenkörpern zu erforschen, führten Rameshbabu et al. einen *in vitro*-Zelladhäsionstest mit Osteoblasten an den silberhaltigen Prüfkörpern durch. Je nach Silbergehalt (0,5, 1 und 1,5 Gew.-%) variierte die Dichte der Osteoblastenanlagerung an den Oberflächen, wobei die Osteoblastenausbreitung auf den 0,5% AgHA-Proben im Vergleich zu den anderen Konzentrationen signifikant größer war ^[163].

Demgegenüber gibt es allerdings auch Berichte, die eine Zytotoxizität von Silber

beschreiben. So wurde zum Beispiel über eine toxische Schädigung von Leber, Niere und dem Herzen berichtet ^[166]. Des Weiteren schilderten andere Autoren eine Proliferationshemmung von Keratinozyten und Fibroblasten nach einer Behandlung mit Silbersulfadiazin ^[167,168]. Sudmann et al. berichteten über eine 76-jährige Frau, welcher bei einem Hüftgelenkersatz ein silberimprägnierter Knochenzement implantiert wurde. 5 Jahre nach Einbringen der Prothese entwickelte sie neurologische Defizite mit sensomotorischen Ausfallserscheinungen auf der ipsilateralen Extremitätenseite. Die gemessene Silberkonzentration betrug 103 ppb in der Gelenkhöhle und 6,3 ppb im Blutserum ^[169]; diese lagen jedoch weit unter der in der Literatur angegebenen Silberkonzentration von 300 ppb im Blut, ab der toxische Nebeneffekte beschrieben wurden ^[164,170].

Die Ergebnisse all dieser Untersuchungen können jedoch nicht direkt miteinander verglichen werden, da jede einzelne Studie mit unterschiedlichen Silberkonzentrationen, mit verschiedenen Zelllinien und mannigfaltigen Untersuchungsparametern unter uneinheitlichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden.

Es war deshalb ein weiteres Anliegen dieser Studie, die Biokompatibilität der hier verwendeten Zemente in einer Osteoblasten-Zellkultur zu testen. Es erfolgte eine Zellkultivierung der humanen Osteoblasten MG-63 auf den zu analysierenden Zementen. Die *in vitro*-Kultivierung wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt, wobei an den Tagen 3, 5, 7 und 10 die Messungen vorgenommen wurden. Zum einen wurde die mitochondriale Aktivität der Zellen mittels WST-Test eruiert, zum anderen das Zellproliferationsverhalten mittels einer Zellzählung. Außerdem wurde über den Quotienten WST-Wert/Zellzahl die mitochondriale Aktivität der einzelnen Zelle errechnet.

Vergleicht man die Zellproliferation der vier verschiedenen Zementarten untereinander, so konnte das stärkste Wachstum auf der Oberfläche des Bruschit-Zements beobachtet werden (vgl. Abb. 4.15). Die Vermehrung der Osteoblasten war auf dieser Oberfläche signifikant größer als auf den anderen Zementen. Betrachtet man nur die Bruschit- und Ag-Bruschit-Prüfkörper miteinander, zeigte sich bei dem silberdotierten Zement eine deutliche Toxizität gegenüber den Osteoblasten (vgl. Abb. 4.16a). Stellt man hingegen nur die HA- und Ag-HA-Oberflächen gegenüber,

konnte auf dem silberhaltigen Zement eine etwas stärkere Proliferation der Zellen im Vergleich zu den HA-Zementen wahrgenommen werden (vgl. Abb. 4.16b). Allerdings ist sowohl auf den HA als auch Ag-HA-Oberflächen nur ein minimales Wachstum zu beobachten. Hier konnte jedoch kein eindeutiger zytotoxischer Effekt der silberdotierten HA-Zemente auf die verwendeten Osteoblasten nachgewiesen werden.

Bei der Auswertung der mitochondrialen Zellaktivität der gesamten Zellen auf einer Oberfläche konnte wiederum die mit Abstand höchste zelluläre Gesamtaktivität für den Bruschit-Zement ermittelt werden (vgl. Abb. 4.17). Vergleicht man auch hier die Bruschit- und Ag-Bruschit-Oberflächen separat miteinander, legte Bruschit eine signifikant höhere Aktivität an den Tag, während die silberhaltigen Bruschit-Zemente nur ein Hundertstel dessen aufwiesen (vgl. Abb. 4.18a). Bei den Oberflächen Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit konnte man hingegen ein Maximum bereits an Messtag 3 erkennen, wobei HA eine mehr als doppelt so hohe Zellaktivität erreichte (vgl. Abb. 4.18 b). Im weiteren Verlauf der Versuchsdurchführungen sanken die Werte schließlich auf ca. ein Drittel ihrer Ausgangswerte ab. Auch an dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass bei den HA- und Ag-HA-Zementen nur eine äußerst geringe mitochondriale Zellaktivität erreicht wurde.

Bei der Analyse der Atmungsaktivität der Einzelzelle konnte man geringe Unterschiede zur Auswertung der gesamten Zellaktivität feststellen (vgl. Abb. 4.19). Die Zellen auf den Bruschit-Zementen zeigten hier ebenfalls die höchste Aktivität. Auffallend war bei dieser Betrachtung allerdings, dass auch Zellen auf Ag-Bruschit an diversen Tagen eine hohe Atmungsaktivität darboten. Desweiteren konnte man den Daten entnehmen, dass die mitochondriale Aktivität der Einzelzelle auf den HA-Oberflächen durchwegs höher war als auf den Silberhaltigen.

Aufgrund der gewonnenen Daten konnte nun somit verdeutlicht werden, dass die Ag-Bruschit-Zemente eine deutliche Zytotoxizität aufwiesen und nicht biokompatibel waren, während den Ag-HA-Zementen keine toxischen Auswirkungen nachgewiesen werden konnte. Aber sowohl diese als auch die HA-Zemente zeigten in dieser *in vitro*-Studie nur eine eher geringe Biokompatibilität. Andere Studien belegen allerdings, dass HA bereits erfolgreich sowohl in *in vitro*-^[171,172,173] als auch in *in vivo*-Studien^[174,71] eingesetzt worden ist. Ein Grund für die geringe Biokompatibilität der HA- bzw. Ag-HA-Zemente könnte evtl. die hohe lokale Ca²⁺-

Konzentration in den Wells aufgrund der fehlenden Durchblutung gewesen sein. Da in dieser Untersuchung für Ag-HA ähnliche Werte wie für HA erzielt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass auch Ag-HA *in vivo* deutlich biokompatibler sein könnte. Dies muss jedoch erst noch in Tierversuchen genauer analysiert werden.

Letztendlich kann nun die Frage nach der antibakteriellen Wirksamkeit und der Biokompatibilität der untersuchten silberdotierten Zemente nicht befriedigend beantwortet werden. Einerseits zeigten sie zwar teilweise sehr gute antibakterielle Ergebnisse (Ag-Bruschit), andererseits war aber auf den silberhaltigen Oberflächen kaum Zellwachstum festzustellen. Da die Versuche lediglich einmal wiederholt wurden, sind sie nur bedingt aussagekräftig. Um verlässliche Aussagen treffen zu können, bedarf es deshalb weiterer *in vitro*-Untersuchungen, um die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen bzw. genauer abzuklären. Ziele nachfolgender Studien sollten deshalb sein, die antibakterielle Wirksamkeit und Biokompatibilität der Zemente bei verschiedenen Silberkonzentrationen zu analysieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Modifikation von Hydroxylapatit- und Bruschit-Zementen mit 1 % Silber. Ziel war es, den Zementen eine antibakterielle Wirksamkeit bei gleichzeitiger Biokompatibilität ohne Beeinträchtigung ihrer mechanischen Eigenschaften zu verleihen. Durch Mischung von silberdotiertem β -TCP mit Calcium-bis-dihydrogenphosphat Monohydrat (MCPM) bzw. von silberdotiertem α -TCP mit einer 2,5%- Na_2HPO_4 -Lösung entstanden Zementformulierungen, deren Silberfreisetzung, Druckfestigkeit, Abbindezeit sowie Phasenzusammensetzung bestimmt wurde. Desweiteren wurden *in vitro*-Untersuchungen zur Evaluation der Zytotoxizität mittels Osteoblasten sowie der antibakteriellen Eigenschaften mittels Staph. aureus und Staph. epidermidis durchgeführt.

Bei der massenspektrometrischen Analyse der Auslagerungsmedien legte Ag-Bruschit im LB-Medium mit kumulativ 184,5 μg nach 7 Tagen das höchste Freisetzungsverhalten im Vergleich zu Ag-Hydroxylapatit mit 36,8 μg an den Tag; außerdem konnte gezeigt werden, dass sich das molare Verhältnis von $\text{Ag}^+/\text{Ca}^{2+}$ von theoretisch 1 % bereits bei der Herstellung von Ag^+ -dotiertem α - bzw. β -TCP auf je 0,78 % reduziert hatte. Die Untersuchung der Phasenzusammensetzung der Zemente wies auf die für die Zemente charakteristischen Beugungsmuster hin. Peaks, die auf Silber hinweisen würden, konnten nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man die Druckfestigkeit, konnte der silberdotierte Bruschit-Zement eine leichte Steigerung um 5,1 MPa auf 19,8 MPa erfahren, während der Ag-Hydroxylapatit-Zement nahezu eine Halbierung seiner Festigkeit um 18,5 MPa auf 22,7 MPa erfahren musste.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse wies Ag-Bruschit einen signifikanten bakteriziden Effekt auf, führte aber auch zu einer Reduktion der Osteoblasten auf dieser Oberfläche. Ag-Hydroxylapatit zeigte hingegen nur eine geringe Wirkung gegen die Bakterien, während die Verbindung in dieser *in vitro*-Studie eher biokompatibel auf die Zellen wirkte.

Die in dieser Arbeit modifizierten Zemente sind aufgrund ihrer nicht einheitlichen Ergebnisse hinsichtlich der antibakteriellen Wirksamkeit sowie der wünschenswerten Biokompatibilität für den Einsatz als Knochenersatzmaterial noch nicht geeignet. Die von Ag-Bruschit freigesetzte bakterizide Silbermenge ist für eukaryotische Zellen zu hoch, sodass in weiterführenden Studien diese Freisetzung begrenzt werden müsste.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ Courville, C. B. (1959): Cranioplasty in prehistoric times. Bull Los Ang Neuro Soc 24: 1-8
- ² Sanan, A.; Haines, S. (1997): Repairing holes in the head: a history of cranioplasty. Neurosurgery 40: 588-603
- ³ Sailer, H. F.; Weber, F. E. (2000): Knochenersatzmaterialien. Mund Kiefer Gesichts Chir 4 (Suppl. 1): 384-391
- ⁴ Meekeren, J. J. (1682): Observationes medico chirurgicae, Ex Officina Henrici & Vidnare Theodori, Amsterdam
- ⁵ Boer, H. H. (1988) The History of Bone Grafts. Clinical orthopaedics and Related Research 226: 292-298
- ⁶ Haeseker, B. (1988): Mr. Job van Meekeren (1611-1666) and Surgery of the Hand. Plastic and Reconstructive Surgery 82: 539-546
- ⁷ Hunter, J. (1798): Experiments and observations on the growth of bones. Palmer FF (ed) Hunter's work. Logman, London
- ⁸ Troja, M. (1828): Neue Beobachtungen und Versuche über die Knochen. Übersetzt von Schönber A. von (1828). Pahn & Enke, Erlangen
- ⁹ Voetsch, A. (1847): Die Heilung der Knochenbrüche per primam intentionem. Winter, Heidelberg
- ¹⁰ Hamilton, D.J. (1881): On sponge-grafting. Edinb Med J 1881: 283. In: Zentralbl Chir (1982) 2: 280
- ¹¹ Gluck, T. (1891): Autoplastik-Transplantation. Implantation von Fremdkörpern. Verlag der Berl Med Ges, Berlin, XXI: 139-158
- ¹² Dreesmann, H. (1892): Über Knochenplombierungen. Bruns Beitr klein Chir 9: 804-810
- ¹³ Tarsoly, E.; Tomory, I. (1963): Über die Heilung von mit körperfremder Substanz ausgefüllten Knochenhöhlen im Tierexperiment. Acta Chir Hung IV: 267-373
- ¹⁴ Ollier, L. (1867): Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. Victor Masson et Fils, Paris
- ¹⁵ Barth, A. (1893): Über histologische Befunde nach Knochentransplantationen. Langenbecks's Archiv für klinische Chirurgie 46: 409-417
- ¹⁶ Barth, A. (1895): Histologische Untersuchungen über Knochenimplantationen. Beitr Pathol Anat Allg Pathol 17: 65-142
- ¹⁷ Curtis, B.F. (1893): Cases of bone implantation and transplantation for cyst of tibia, osteomyelitic cavities and ununited fractures. American Journal of Medical Science 106: 30

- ¹⁸ Phemister, D.B. (1914): The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* 19: 303
- ¹⁹ Axhausen, G. (1907): Histologische Untersuchungen über Knochentransplantationen am Menschen. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie* 91: 388-428
- ²⁰ Lexer, E. (1925): 20 Jahre Transplantationsforschung in der Chirurgie. *Archiv für klinische Chirurgie* 138: 251-302
- ²¹ Lexer, E. (1908): Über Gelenktransplantation. *Medizinische Klinik*, 4:815-823, see also *Clinical Orthopaedics and Related Research* 197: 4-10
- ²² Lexer, E. (1911): Über freie Transplantationen. *Langenbeck's Archiv für klinische Chirurgie* 95: 827-851
- ²³ Lexer, E. (1929): Knochenneubildung im Bindegewebe osteoblastischer Herkunft. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie* 217: 1-32
- ²⁴ Rueger, J.M.(1996): Knochenersatzmaterial. State of the art und: Wohin gehen wir ? *Unfallchirurg* 99: 228-236
- ²⁵ Heary, R.F.; Schlenk, R.P.; Sacchieri, T.A.; Barone, D.; Brotea, C. (2002): Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment. *Neurosurg* 50: 510-516
- ²⁶ Claes, L.; Hoellen, I.; Ignatius, A. (1997): Resorbierbare Knochenzemente. *Orthopäde* 26: 459-462
- ²⁷ Hertz, A. und Bruce, I.J. (2007): Inorganic materials for bone repair or replacement applications. *Nanomed* 2: 899-918
- ²⁸ Misch, C. E.; Dietsh, F. (1993): Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent* 2(3): 158-67
- ²⁹ Frame, J.W. (1987): Hydroxyapatite as a biomaterial for alveolar ridge augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 16(6): 642-55
- ³⁰ Frame, J.W.; Brady, C.L. (1987): The versatility of hydroxyapatite blocks in maxillofacial surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg* 25(6): 452-64.
- ³¹ Horch, H.-H.; Sader, R.; Kolk, A. (2004): Synthetische, phasenreine Beta-Trikalziumphosphat-Keramik (Cerasorb) zur Knochenregeneration bei der rekonstruktiven Chirurgie der Kiefer. *Deutsche zahnärztliche Zeitschrift* 59: 680-686
- ³² Rueger, J.M. (1998): Knochenersatzmittel -Heutiger Stand und Ausblick-. *Orthopäde* 27: 72-79
- ³³ Schiffli, H.; Fischereeder, M.; Sitter, T. (1999): Biokompatibilität der Nierenersatztherapie. *Der Internist* 40: 37-48
- ³⁴ Shard, A.G.; Tomlins, P.E. (2006): Biocompatibility and the efficacy of medical implants. *Reg Med* 1: 789-800

- ³⁵ Ratner, B.D. (1993): New ideas in biomaterials science – a path of engineered biomaterials. *J Biomed Mater Res* 27: 837-850
- ³⁶ Heimke, G. (1990): *Osseo-integrated implants*, (Ed.: G. Heimke), CRC Press, Boca Raton
- ³⁷ Schmalz, G.; Arenholt-Bindslev, D. (2005): *Biokompatibilität zahnärztlicher Werkstoffe*. Urban & Fischer Verlag
- ³⁸ CompeDent Beteiligungsgesellschaft mbH (2009): *CompeDent.. der Zeit voraus; Zahntechnik aus Leidenschaft*. Online in Internet: URL: <http://www.compedent.de/compe/addons/glossar/glossar.html#b> [Stand: 29.5.2009]
- ³⁹ Wintermantel, E.; Ha, S.-W. (2008): *Medizintechnik – Life Science Engineering*. Springer Berlin Heidelberg: 59-96
- ⁴⁰ Elliott J.C. (1994): *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier, Amsterdam
- ⁴¹ Koutsoukos, P.; Amjad, Z.; Tomson, M.B.; Nancollas, G.H. (1980): Crystallization of Calcium Phosphates. A Constant Composition Study. *J. Am. Chem. Soc.*, 102: 1553-1557
- ⁴² Constantz, B.R.; Ison, I.C.; Fulmer, M.T.; Poser, R.D.; Smith, S.T.; Van Wagoner, M.; Ross, J.; Goldstein, S.A.; Jupiter, J.B.; Rosenthal, D.I. (1995): Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science*, 267: 1796-1799
- ⁴³ Lemaître, J.; Mirtchi, A.; Mortier, A. (1987): Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicates Industries*, 9-10: 141-146
- ⁴⁴ Windholz, M. (1983): *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 10. Auflage, Merck, Rahway, NJ
- ⁴⁵ Benard, J. (1958): *Combinaisons avec le phosphore*. In: Benard E, Bouissieres G, Brusset H et al. eds. *Nouveau traite de chemie minerale*. Paris: Masson. 4: 455-488
- ⁴⁶ Becker, P. (1989): *Fertilizer Science and Technology Series*, Marcel Dekker, New York, 6 ± 20
- ⁴⁷ Constantz, B.; Barr, B.; Ison, I. et al. (1998): Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J. Biomed Mater. Res. (Appl Biomater)* 43: 451-461
- ⁴⁸ Munting, E.; Mirtchi, A.; Lemaitre, J. (1993): Bone repair of defects filled with a phosphocalcic hydraulic cement: an in vivo study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4: 337-344
- ⁴⁹ Lenárt, G.; Bidló, G.; Pintér, J. (1972): Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates of bone. *Clin. Orthop Rel.* 83: 263-272
- ⁵⁰ Muenzenberg, K.; Gebhardt, M. (1973): Brushite, octocalcium phosphate, and carbonate-containing apatite in bone. *Clin Orthop Rel.* 90: 271-273

- ⁵¹ Werness, P.; Bergert, J.; Smith, L. (1981): Crystalluria. *J. Crystal Growth*. 53: 166-181
- ⁵² Thomas, J.; Thomas, E.; Fompeydie, D. et al. (1995): Lithiase urinaire de brushite. Particularites cliniques, biologiques, radiologiques, evolutives et therapeutiques. *J. Urologic*. 101: 139-152
- ⁵³ Khairoun, I.; Driessens, F.; Boltong, M.; Planell, J.; Wenz, R. (1999): Addition of cohesion promotors to calcium phosphate cements. *Biomaterials* 20: 393-398
- ⁵⁴ Boudeville, P.; Serraj, S.; Leloup, J.M.; Margerit, J.; Pauvert, B.; Terol, A. (1999): Physical properties and self- setting mechanism of calcium phosphate cements from calcium bisdihydrogenophosphate monohydrate and calcium oxide. *J Mater Sci: Mater Med* ;10(2): 99-109
- ⁵⁵ Fallschlüssel, G.K.H. (1987): Kalzium- Phosphat- Keramiken in der Zahnmedizin. Quintessenzverlag GmbH Berlin
- ⁵⁶ Bohner, M. (2000): Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury, Int J Care Injured*, 31: 37-47
- ⁵⁷ LeGeros, R.Z. (1991): Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine, Karger, Basel
- ⁵⁸ LeGeros, R.Z. (1994): Hydroxyapatite and Related Materials (Hrsg.: P. W. Brown, B. Constantz), CRC, Boca Raton, FL, 3 ± 28
- ⁵⁹ LeGeros, R.Z. (2001): *Kardiol.*, 90 (Suppl. 3): 116-124
- ⁶⁰ Lemaitre, J.; Munting, E.; Mirtchi, A.A. (1992): *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.*, 93: 163-165
- ⁶¹ Ohura, K.; Bohner, M.; Hardouin, P.; Lemaitre, J.; Pasquier, G.; Flautu, B. (1996): *J. Biomed. Mater. Res.* 30: 193-200
- ⁶² Daculsi, G.; Weiss, P.; Bouler, J.M.; Gauthier, O.; Millot, F.; Aguado, E. (1999): *Bone* , 25 (Suppl. 2): 59-61
- ⁶³ Merten, H.A.; Wiltfang, J.; Hönig, J.F.; Funke, M.; Luhr, H.G. (2000): Intraindividuellem Vergleich von α - und β -TCP- Keramik im Tierexperiment. *Mund-Kiefer- Gesichtschirurgie*, 4 (Suppl 2): 509-515
- ⁶⁴ Hench, L.L. (1998): *Bioceramics. Journal of the American Ceramic Society*, 81(7): 1705-1728
- ⁶⁵ Suchanek, W.; Yoshimura, M. (1998): Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.*, 13: 94-117
- ⁶⁶ Ciesla, K.; Rudnicki, R. (1987): Synthesis and transformation of tetracalcium phosphate in solid state. Part I. Synthesis of roentgenographically pure tetracalcium phosphate from calcium dibasic phosphate and calcite. *Polish J. Chem.* 61: 719-727

- ⁶⁷ Elliot, J.C. (1998): Les matériaux en phosphate de calcium. Aspects fondamentaux (Hrsg.: E. Brès, P. Hardouin), Saur Amps Medical, Montpellier
- ⁶⁸ Fernandez, E.; Gil, F.J.; Ginebra, M.P.; Driessens, F.C.M.; Planell, J.A.; Best, S.M. (1999): Calcium phosphate bone cement for clinical applications, Part I: solution chemistry. *Science J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 10: 169-176
- ⁶⁹ Brown, W.; Chow, L. (1985): Dental restorative cement pastes. US Patent No. 4518430
- ⁷⁰ Kamerer, D.B.; Hirsch, B.E.; Snyderman, C.H.; Costantino, P.; Friedman, C.D. (1994): Hydroxyapatite cement: a new method for achieving watertight closure in transtemporal surgery. *Am J Otol* 15: 47-49
- ⁷¹ Durham, S.R.; McComb, J.G.; Levy, M.L. (2003): Correction of large (>25 cm²) cranial defects with "reinforced" hydroxyapatite cement: technique and complications. *Neurosurgery*; 52(4): 842-845
- ⁷² Chow, L.C.; Marcovic, M.; Takagi, S. (1998): Calcium Phosphate Cements. In: *Cements Research Progress, 1997*, ed. L. J. Struble, pp. 215-238, Westerville, OH; The Am Ceram Soc
- ⁷³ Gbureck, U.; Grolms, O.; Barralet, J.E.; Grover, L.M.; Thull, R. (2003): Mechanical activation and cement formation of β -tricalcium phosphate, *Biomaterials* 2003; 24: 4123-4131
- ⁷⁴ Doi, Y.; Iwanaga, H.; Shibutani, T.; Moriwaki, Y.; Iwayama, Y. (1999): Osteoclastic response to various calcium phosphates in cell cultures. *J Biomed Mater Res.*, 58(3): 329-334
- ⁷⁵ Fukase, Y.; Eanes, E.D.; Takagi, S.; Chow, L.C.; Brown, W.E. (1990): Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements. *J Dent Res.*, 69(12): 1852-1856
- ⁷⁶ DeMaeyer, E.A.; Verbeeck, R.M.; Vercruyssen, C.W. (2000): Conversion of octacalcium phosphate in calcium phosphate cements. *J Biomed Mater Res.*, 52(1): 95-106
- ⁷⁷ Durucan, C.; Brown, P.W. (2000): Alpha – Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature. *J Mater Sci Mater Med.* 11 (6): 365-371
- ⁷⁸ Takagi, S.; Chow, L.C.; Ishikawa, K. (1998): Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements, *Biomaterials*, 19: 1593-1599
- ⁷⁹ Otsuka, N.; Matsuda, Y.; Suwa, Y.; Fox, J.L.; Higuchi, W.I. (1995): Effect of particle size of metastable calcium phosphates on mechanical strength of a novel self-setting bioactive calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res.*, 29(1): 25-32

- ⁸⁰ Bohner, M.; Merkle, H.P.; Landuyt, P.V.; Trophardy, G.; Lemaitre, J. (2000): Effect of several additives and their admixtures on the physico-chemical properties of a calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med*, 11(2): 111-6
- ⁸¹ Vereecke, G.; Lemaitre, J. (1990): Calculation of the solubility diagrams in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$. *J Cryst Growth*. 104(4): 820-832
- ⁸² Gbureck, U.; Barralet, J.E.; Grover, L.M.; Hofmann, M.; Thull, R. (2003): Mechanische Eigenschaften und Porosität von Calciumphosphat-Zementen. *Biomaterialien*.4 (4): 258-264
- ⁸³ Constantino, P.D.; Friedman, C.D.; Jones, K.; Chow, L.C.; Pelzer, H.J.; Sisson, G.A. (1991): *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 117: 379-384
- ⁸⁴ Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Suwa, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I. J. (1994): A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. III: Physicochemical properties and drug-release rate of bovine insulin and bovine albumin. *Pharm. Sci.* 83, 255-258
- ⁸⁵ Yu, D.; Wong, J.; Matsuda, Y.; Fox, J. L.; Higuchi, W. I.; Otsuka, M. (1992): Self-Setting Hydroxyapatite Cement: A Novel Skeletal Drug-Delivery System for Antibiotics. *J. Pharm. Sci.* 81: 529-531
- ⁸⁶ Bohner, M., Lemaître, J., Van Landuyt, P., Zambelli, P.-Y., Merkle, H.P., Gander, B. (1997): Gentamicin-loaded hydraulic calcium phosphate bone cement as antibiotic delivery system. *J. Pharm. Sci.* 86 (5): 565-572
- ⁸⁷ Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Suwa, Y.; Fox, J.L.; Higuchi, W.I.J. (1994): A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. IV: Effects of the mixing solution volume on the drug-release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement. *Pharm. Sci.*, 83: 259-263.
- ⁸⁸ Otsuka, M.; Matsuda, Y.; Suwa, Y.; Fox, J.L.; Higuchi, W.I.J. (1994): A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. V: Drug release behavior from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug *Pharm. Sci.*, 83: 1565-1568
- ⁸⁹ Kamegai, A.; Shimamura, N.; Naitou, K.; Nagahara, K.; Kanematsu, N.; Mori, M. (1994): Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/self-setting apatite cement composite as a delivery system. *Bio-Med. Mater. Eng.*, 4: 291-307.
- ⁹⁰ Bohner, M.; Lemaitre, J.; Merckle, H.P.; Gander, B. (2000): Control of gentamicin release from a calcium phosphate admixed poly(acrylic acid), *J Pharm Sci* 89 (10): 1262–1270
- ⁹¹ Takechi, M.; Miyamoto, Y.; Ishikawa, K.; Nagayama, M.; Kon M.; Asaoka K. et al. (1998): Effects of added antibiotics on the basic properties of anti-washout-type fast-setting calcium phosphate cement, *J Biomed Mater Res* 39 (2): 308–316

- ⁹² Ratier; Gibson, I.R.; Best, S.M.; Freche, M.; Lacout, J.L.; Rodriguez, F. (2001): Behaviour of a calcium phosphate bone cement containing tetracycline hydrochloride or tetracycline complexed with calcium ions, *Biomaterials* 22: 897–901
- ⁹³ Huang, Y.; Liu, C.S.; Shao, H.F.; Liu, Z.J. (2000): Study on the applied properties of tobramycin-loaded calcium phosphate cement, *Key Eng Mater* 192 (1): 853–860
- ⁹⁴ Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. Online im Internet URL: <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Silber&oldid=59795264> [Stand: 06.06.2009]
- ⁹⁵ Thieme Römpf Online. Online im Internet URL: <http://www.roempp.com/prod/index1.html> [Stand: 06.06.2009]
- ⁹⁶ Mineralienatlas. Online im Internet URL: <http://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/MineralData?mineral=Silber>
- ⁹⁷ Klasen, H. J. (2000): A historical review of the use of silver in the treatment of burns. Early uses. *Burns*; 26: 117-130.
- ⁹⁸ von Nägeli, C. W (1893): Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen. *Neue Denkschriften der schweizerischen naturforschenden Gesellschaft* 33: 1-51.
- ⁹⁹ Chemtrails-Info; Online im Internet URL: <http://www.chemtrails-info.de/kolloidales-silber/geschichte.htm> [Stand: 5.12.2009]
- ¹⁰⁰ Mineralienatlas. Online im Internet URL: <http://www.mineralienatlas.de/lexikon/index.php/Mineralienportrait/Silber/Charakteristika>
- ¹⁰¹ Smorf- crystal drawing program. Online im Internet, URL: <http://www.smorf.nl/frames360.html>
- ¹⁰² Ogston, A. (1883): Micrococcus poisoning. In: *J. Anat. Physiol.* 17: 24–58
- ¹⁰³ Götz, F.; Bannerman, T.; Schleifer, K.H. (2004): The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Dworkin, M. (Hrsg.) et al.: *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*. New York : Springer-Verlag, 3. Auflage, Ausgabe 3.16
- ¹⁰⁴ Wilkinson, B. J. and Holmes, K. M. (1979): *Staphylococcus aureus* cell surface: capsule as a barrier to bacteriophage adsorption. *Infect Immun* 23, 549-52.
- ¹⁰⁵ Lowy, F. D. (1998): *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339, 520-32.
- ¹⁰⁶ Vesga, O., Groeschel, M. C., Otten, M. F., Brar, D. W., Vann, J. M. and Proctor, R. A. (1996). *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis* 173, 739-42
- ¹⁰⁷ Brouillette, E., Martinez, A., Boyll, B.J., Allen, N.E. and Malouin, F. (2004): Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol* 41, 35-41.

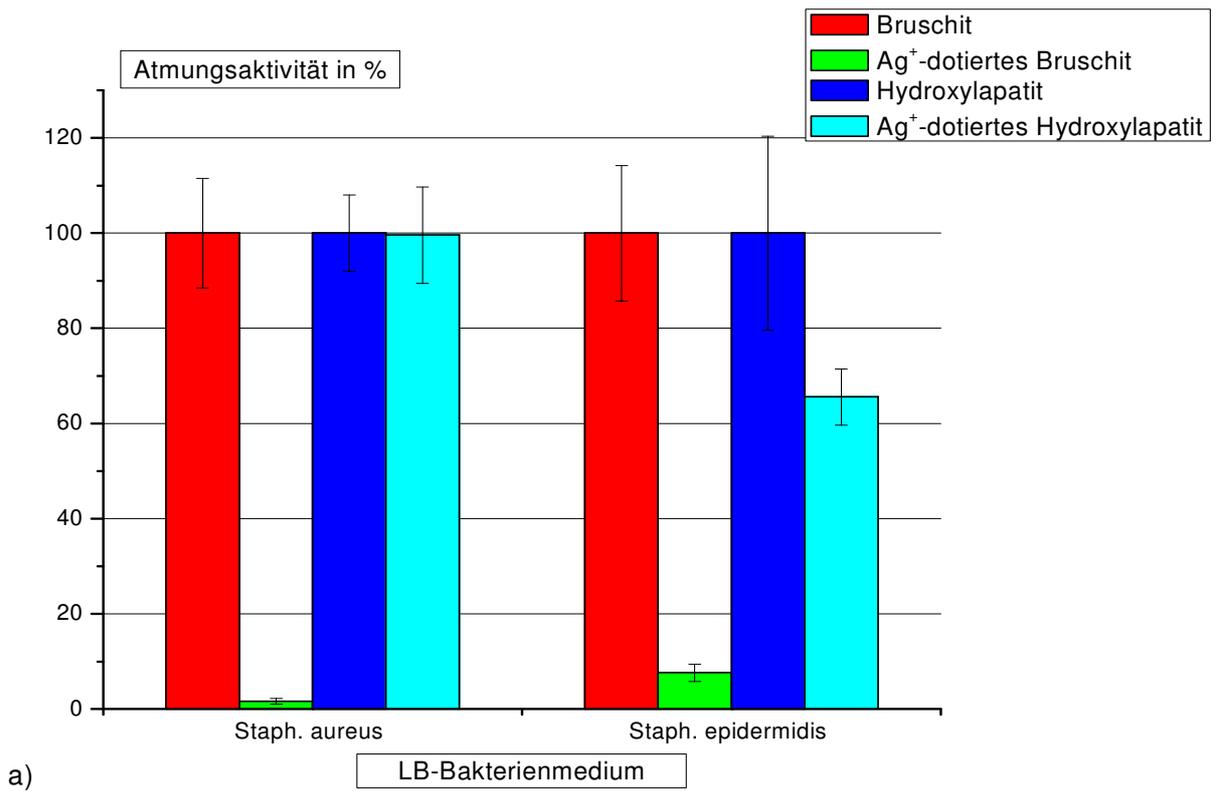
- ¹⁰⁸ Kloos, W.E. ; Bannerman, T.L. (1994): Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. In: Clin Microbiol Rev 7, Nr. 1, S. 117–140
- ¹⁰⁹ Vuong, C. ; Voyich, J.M. ; Fischer, E.R. ; Braughton, K.R. ; Whitney, A.R. ; DeLeo, F.R.; Otto, M. (2004): Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. In: Cell Microbiol 6, Nr. 3, S. 269–275
- ¹¹⁰ Domingo, P.; Fontanet, A. (2001): Management of complications associated with totally implantable ports in patients with AIDS. In: AIDS Patient Care STDS 15, Nr. 1, S. 7–13
- ¹¹¹ Tacconelli, E. ; Tumbarello, M. ; Pittiruti, M. ; Leone, F. ; Lucia, M.B. ; Cauda, R.; Ortona, L. (1997): Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. In: Eur J Clin Microbiol Infect Dis 16, Nr. 3, S. 203–209
- ¹¹² Hoyle, B.D.; Costerton, J.W. (1991): Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. In: Prog Drug Res 37, S. 91–105.
- ¹¹³ Billiau, A.; Edy, V.G.; Heremans, H.; Van Damme, J.; Desmyter, J.; Georgiades, J.A.; De Somer, P. (1977): Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG-63. Antimicrob Agents Chemother 12 (1): 11 – 15.
- ¹¹⁴ ASTM-Standard C266-99: Standard test method for time of setting of hydraulic cement paste by Gilmore needles. ASTM International 2002.
- ¹¹⁵ Wintermantel, E.; Ha, S.W. (2002): Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren, Springer, Heidelberg.
- ¹¹⁶ Daculsi, G.; Bouler, J.M.; LeGeros, R.Z. (1997): Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials; Int. Rev. Cytol., 172, 129 ± 191
- ¹¹⁷ Chow, L.C.; Eanes, E.D. (2001): Octacalcium Phosphate, Vol. 18, Karger, Basel
- ¹¹⁸ Constantz, B.R.; Ison, I.C.; Fulmer, M.T.; Poser, R.D.; Smith, S.T.; VanWagoner, M.; Ross, J.; Goldstein, S.A.; Jupiter, J.B.; Rosenthal, D.I. (1995): Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone Science, 267, 1796 ± 1799
- ¹¹⁹ Epple, M.; Rueger, J.M. (1999): Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten, Nachr. Chem. Techn. Lab., 47, 1405 ± 1410.
- ¹²⁰ LeGeros, R.Z.; LeGeros, J.P. (1997): Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren (Hrsg.: R. Schnettler, E. Markgraf), Thieme, Stuttgart, S. 180
- ¹²¹ Epple, M.; Dorozhkin S.V. (2002): Biological and medical significance of calcium phosphates, Angew Chem Int Ed; 41: 3130-3146
- ¹²² Williams, D.F. (1992): Medical and Dental Materials, Vol. 14, VCH, Weinheim
- ¹²³ Gristina, A.G. (1987): Biomaterial-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. Science; 237: 1588-1595

- ¹²⁴ Nasser, S. (1992): Prevention and treatment of sepsis in total hip replacement surgery. *Orthop Clin North Am*, 23: 265-277
- ¹²⁵ Costerton, J.W.; Ellis, B.; Lam, K.; Johnson, F.; Khoury, A.E. (1994): Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*; 38: 2803-2809
- ¹²⁶ Stoodley, P.; Kathju, S.; Hu, F.Z.; Erdos, G.; Levenson, J.E.; Mehta, N.; Dice, B.; Johnson, S.; Hall-Stoodley, L.; Nistico, L.; Sotereanos, N.; Sewecke, J.; Post, J.C.; Ehrlich, G.D. (2005): Molecular and imaging techniques for bacterial biofilms in joint arthroplasty infections. *Clin Orthop Relat Res*; 437: 31-40
- ¹²⁷ Cen, L.; Neoh, K.G.; Kang, E.T. (2004): Antibacterial activity of cloth functionalized with N-alkylated poly(4-vinylpyridine). *J Biomed Mater Res A*; 71: 70-80
- ¹²⁸ Tiller, J.C.; Liao, C.J.; Lewis, K.; Klibanov, A.M (2001): Designing surfaces that kill bacteria on contact. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98: 5981-5985
- ¹²⁹ Shi, Z.; Neoh, K.G.; Kang, E.T.; Wang, W. (2006): Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*; 27: 2440-2449
- ¹³⁰ Schmidmaier, G.; Lucke, M.; Wildemann, B.; Haas, N.P.; Raschke, M. (2006): Prophylaxis and treatment of implant-related infections by antibiotic-coated implants: A review. *Injury*; 37 (Suppl. 2): 105-112
- ¹³¹ Nohr, R.S.; Macdonald, J.G. (1994): New biomaterials through surface segregation phenomenon: New quarternary ammonium compounds as antibacterial agents. *J Biomater Sci Polym Ed*; 5: 607-619
- ¹³² Tyagi, M.; Singh, H. (1997): Preparation and antibacterial evaluation of urinary balloon catheter. *Biomed Sci Instrum*; 33: 240-245
- ¹³³ Ewald, A.; Glückermann, S.K., Thull, R.; Gbureck, U. (2006): Antimicrobial titanium/silver PVD coatings on titanium. *Biomed Eng Online*; 5: 22
- ¹³⁴ Bosetti, M.; Masse, A.; Tobin, E.; Cannas, M. (2002): Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials*; 23: 887-892
- ¹³⁵ Chow, L.C.; Hirayama, S.; Takagi, S.; Parry, E. (2000): Diametral tensile strength and compressive strength of a calcium phosphate cement: effect of applied pressure. *J Biomed Mater Res*; 53(5): 511-517
- ¹³⁶ Kramer, S.J.; Spadaro, J.A.; Webster, D.A. (1981): Antibacterial and osteoinductive properties of demineralized bone matrix treated with silver. *Clin Orthop Relat Res*; 161: 154-162
- ¹³⁷ Christina, A.G. (1987): Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science*; 237: 1588-1595

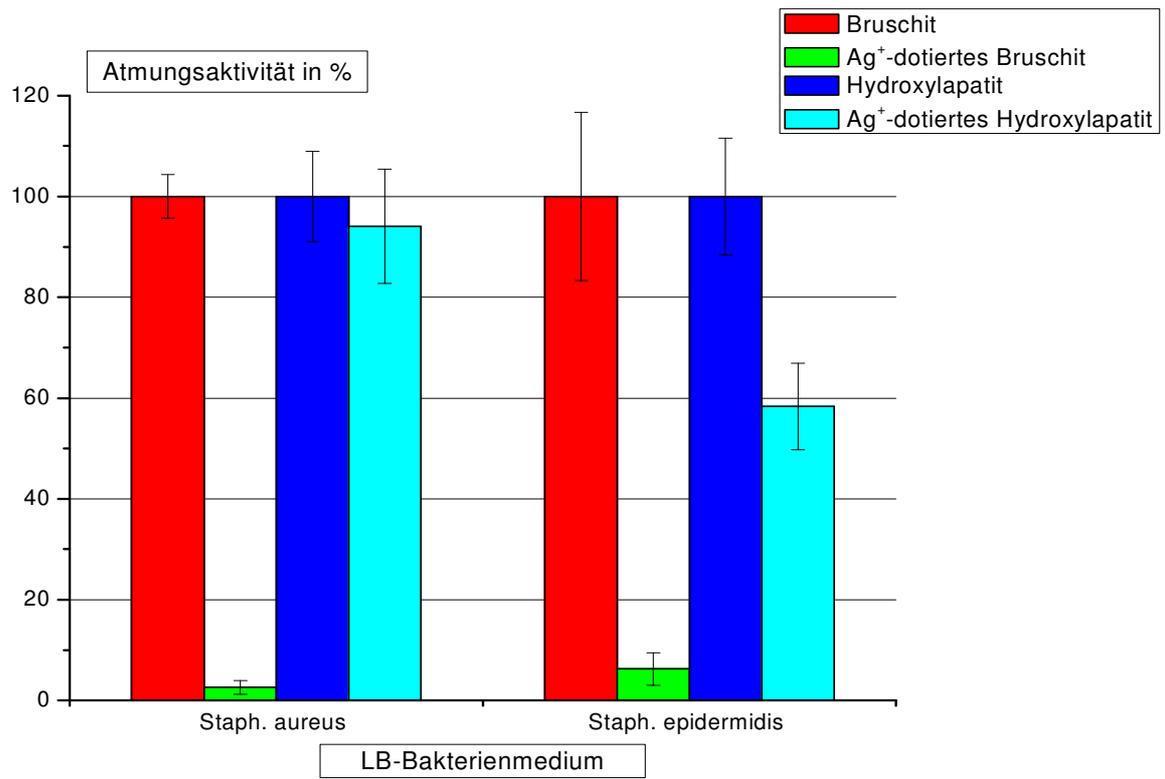
- ¹³⁸ Bellantone, M.; Coleman, N.J.; Hench, L.L. (2000): Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass. *J Biomed Mater Res A*; 51: 484-490
- ¹³⁹ Jansen, B.; Rinck, M.; Wolbring, P.; Strohmeier, A.; Jahns, T. (1994): In-vitro evaluation of the antimicrobial efficacy and biocompatibility of a silver-coated Central Venous Catheter. *J Biomater Appl*; 9: 55-70
- ¹⁴⁰ Bellantone, M.; Williams, H.D.; Hench, L.L. (2002): Broad-spectrum bactericidal activity of Ag(2)O-doped bioactive glass. *Antimicrob Agents Chemother*; 46:1940-1945
- ¹⁴¹ Chambers, C.W.; Proctor, C.M.; Kabler, P.W. (1962): Bactericidal effect of low concentrations of silver. *JA Water Works Assoc*; 54: 208-214
- ¹⁴² Thurman, R.B.; Gerba, C.H.B. (1989): The molecular mechanisms of copper and silver ion disinfection of bacteria and viruses. *Crit Rev Environ Control*; 18: 295-315
- ¹⁴³ Hollinger, M.A (1996): Toxicological aspects of topical silver pharmaceuticals. *Crit Rev Toxicol*; 26(3): 255-260
- ¹⁴⁴ Zimmermann, W. (1952): Oligodynamische Silberwirkung. Über den Wirkungsmechanismus. *Med. Microbiol. Immunol.*; 135: 403-413
- ¹⁴⁵ Adams, A. P.; Santschi, E. M.; Mellencamp, M. A. (1999): Antibacterial properties of a silver chloride-coated nylon wound dressing. *Vet Surg*; 28 (4): 219-25
- ¹⁴⁶ Reiche, T.; Lisby, G.; Jorgensen, S.; Christensen, A.B.; Nordling, J. (2000): A prospective, controlled, randomized study of the effect of a slow-release silver device on the frequency of urinary tract infection in newly catheterized patients. *BJU Int*; 85: 54-59
- ¹⁴⁷ Kim, T.N.; Feng, Q.L.; Kim, J.O.; Wu, J.; Wang, H.; Chen, G.C.; Cui, F.Z. (1998): Antimicrobial effects of metal ions (Ag⁺, Cu²⁺, Zn²⁺) in hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 9(3): 129-134
- ¹⁴⁸ Feng, Q.L.; Wu, J.; Chen, G.Q.; Cui, F.Z.; Kim, T.N.; Kim, J.O. (2000): A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*; 52: 662-668
- ¹⁴⁹ Kawashita, M.; Tsuneyama, S.; Miyaji, F.; Kokubo, H.; Kozuka, H.; Yamamoto, K. (2000): Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method. *Biomaterials*; 21: 393-398
- ¹⁵⁰ Böswald, M.; Lugauer, S.; Braun, G.G.; Martus, P.; Geis, C.; Scharf, J.; Bechert, T.; Greil, J.; Guggenbichler, J.P. (1999): Reduced rates of catheter-associated infection by use of a new silver-impregnated central venous catheter. *Infection*; 27 (Suppl 1): 56-60.
- ¹⁵¹ Nissen, S.; Furkert, F. H. (2000): Antimikrobielle Wirksamkeit einer Silberbeschichtung von Hydrogellinsen. *Ophthalmologe*; 97: 640-643

- ¹⁵² Collinge, C.A.; Goll, G.; Seligson, D.; Easley, K.J. (1994): Pin tract infections: silver vs. uncoated pins. *Orthopedics*. 17 (5): 445-448
- ¹⁵³ Gosheger, G.; Harges, J.; Ahrens, H.; Streitburger, A.; Buerger, H.; Erren, M.; Gonsel, A.; Kemoer, F.H.; Winkelmann, W.; von Eiff, C. (2004): Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model – an analysis of the infection rate and toxicological side effects. *Biomaterials*; 25: 5547-5556
- ¹⁵⁴ Chen, Y.; Zheng, X.; Xie, Y.; Ding, C.; Ruan, H.; Fan, C. (2008): Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings. *J Mater Sci Mater Med*; 19 (12): 3603-3609
- ¹⁵⁵ Chen, W.; Oh, S.; Ong, A.P.; Oh, N.; Liu, Y.; Courtney, H.S.; Appleford, M.; Ong, J.L. (2007): Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process. *J Biomed Mater Res A*; 82(4): 899-906.
- ¹⁵⁶ Song, W.-H.; Ryu, H.S.; Hong, S.-H. (2009): Antibacterial properties of Ag (or Pt)-containing calcium phosphate coatings formed by micro-arc oxidation. *J Biomed Mater Res A*; 88(1): 246-254.
- ¹⁵⁷ Aimanova, O.J.; LeGeros, R.Z.; Sinyayev, V.A. (2005): Antimicrobiologic property hydrated amorphous calcium phosphates containing silver. *Key Engineering Mater*; 284-286: 439-444
- ¹⁵⁸ Ando, Y.; Miyamoto, H.; Noda, I.; Sakurai, N.; Akiyama, T.; Yonekura, Y.; Shimazaki, T.; Miyazaki, M.; Mawatari, M.; Hotokebuchi, T. (2009): Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion. *Mater Sci Eng*;30 (1): 175-180
- ¹⁵⁹ Matsumoto, N.; Sato, K.; Yoshida, K.; Hashimoto, K.; Toda, Y. (2009): Preparation and characterization of β -tricalcium phosphate co-doped with monovalent and divalent antibacterial metal ions. *Acta Biomater*; 5 (8): 3157-3164
- ¹⁶⁰ Cook, G.; Costerton, J.W.; Darouiche, R.O. (2000): Direct confocal microscopy studies of the bacterial colonization in vitro of a silver-coated heart valve sewing cuff. *J Antimicrob Agents*; 13 (3): 169-173
- ¹⁶¹ Darouiche, R.O.; Meade, R.; Mansouri, M.; Radd, I.I. (1998): In vivo efficacy of antimicrobial-coated fabric from prosthetic heart valve sewing rings. *J Heart Valve Dis*; 7 (6): 639-646
- ¹⁶² Alt, V.; Bechert, T.; Steinrücke, P.; Wagener, M.; Seidel, P.; Dingeldein, E.; Domann, E.; Schnettler, R. (2004): An in vitro assesement of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials*; 25; 4383-4391
- ¹⁶³ Rameshbabu, N.; Sampath Kumar, T.S.; Prabhakar, T.G.; Sastry, V.S.; Murty, K.V.G.K.; Prasad Rao, K. (2007): Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization. *J Biomed Mater Res*, 80 (3): 581-591

- ¹⁶⁴ Tweden, K.S.; Cameron, J.D.; Razzouk, A.J.; Holmberg, W.R.; Kelly, S.J. (1997): Biocompatibility of silver-modified polyester for antimicrobial protection of prosthetic valves. *J Heart Valve Dis*; 6(5): 553-561.
- ¹⁶⁵ Chen, W.; Liu, Y.; Courtney, H.S.; Bettenga, M.; Agrawal, C.M.; Bumgardner, J.D.; Ong, J.L. (2006): In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating. *Biomaterials*; 27: 5512–5517
- ¹⁶⁶ AT Wan, RA Conyers, CJ Coombs and JP Masterton Determination of silver in blood, urine, and tissues of volunteers and burn patients, *Clinical Chemistry* 37: 1683-1687, 1991;
- ¹⁶⁷ Kuroyanagi, Y.; Kim, E.; Shioya, N.; FACS (1 991):Evaluation of a Synthetic Wound Dressing Capable of Releasing Silver Sulfadiazine. *J Burn Care & Res*; 12 (2): 106-115
- ¹⁶⁸ McCauley, R.L.; Linares, H.A.; Pelligrini, V.; Herndon, D.N.; Robson, M.C.; Heggors, J.P. (1989): In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J Surg Res*; 46 (3): 267-274
- ¹⁶⁹ Sudmann, E.; Vik, H.; Rait, M.; Todnem, K.; Andersen, K.J.; Julsham, K.; Flesland, O.; Rungby, J. (1994): Systemic and local silver accumulation after total hip replacement using silver-impregnated bone cement. *Med Prog Technol*; 20 (3-4): 179-184
- ¹⁷⁰ Brutel de la Riviere, A.; Dossche, K.M.; Birnbaum, D.E.; Hacker, R. (2000): First clinical experience with a mechanical valve with silver coating. *J Heart Valve Dis*; 9 (1): 123-129
- ¹⁷¹ Moore, D.C.; Frankenburg, E.P.; Goulet, J.A.; Goldstein, S.A. (1997): Hip screw augmentation with an in situ-setting calcium phosphate cement: an in vitro biomechanical analysis. *J Orthop Trauma*; 11(8): 577-583
- ¹⁷² Moore, D.C.; Maitra, R.S.; Farjo, L.A.; Graziano, G.P.; Goldstein, S.A. (1997): Restoration of pedicle screw fixation with an in situ setting calcium phosphate cement. *Spine*; 22(15): 1696-1705
- ¹⁷³ Stankewich, C.J.; Swiontkowski, M.F.; Tencer, A.F.; Yetkinler, D.N.; Poser, R.D. (1996): Augmentation of femoral neck fracture fixation with an injectable calcium-phosphate bone mineral cement. *J Orthop Res*; 14(5): 786-793
- ¹⁷⁴ Kopyloy, P.; Adalberth, K.; Jonsson, K.; Aspenberg, P. (2002): Norian SRS versus functional treatment in redisplaced distal radial fractures: a randomized study in 20 patients. *J Hand Surg*; 27 (6): 538-541



a)



b)

Abbildung 8.1 a+b: Erste (8.1 a) und zweite (8.1 b) Versuchsreihe. Relative Atmungsaktivität der Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf den vier verschiedenen Zementarten ($n = 4$ pro Oberfläche) ermittelt durch WST-1-Test. Als Medium wurde LB verwendet. Auf der Ordinate ist die relative Atmungsaktivität in % zu den nicht silberdotierten Zementen Bruschit bzw. HA (Referenz) dargestellt; auf der Abszisse sind die Bakterienstämme angegeben.

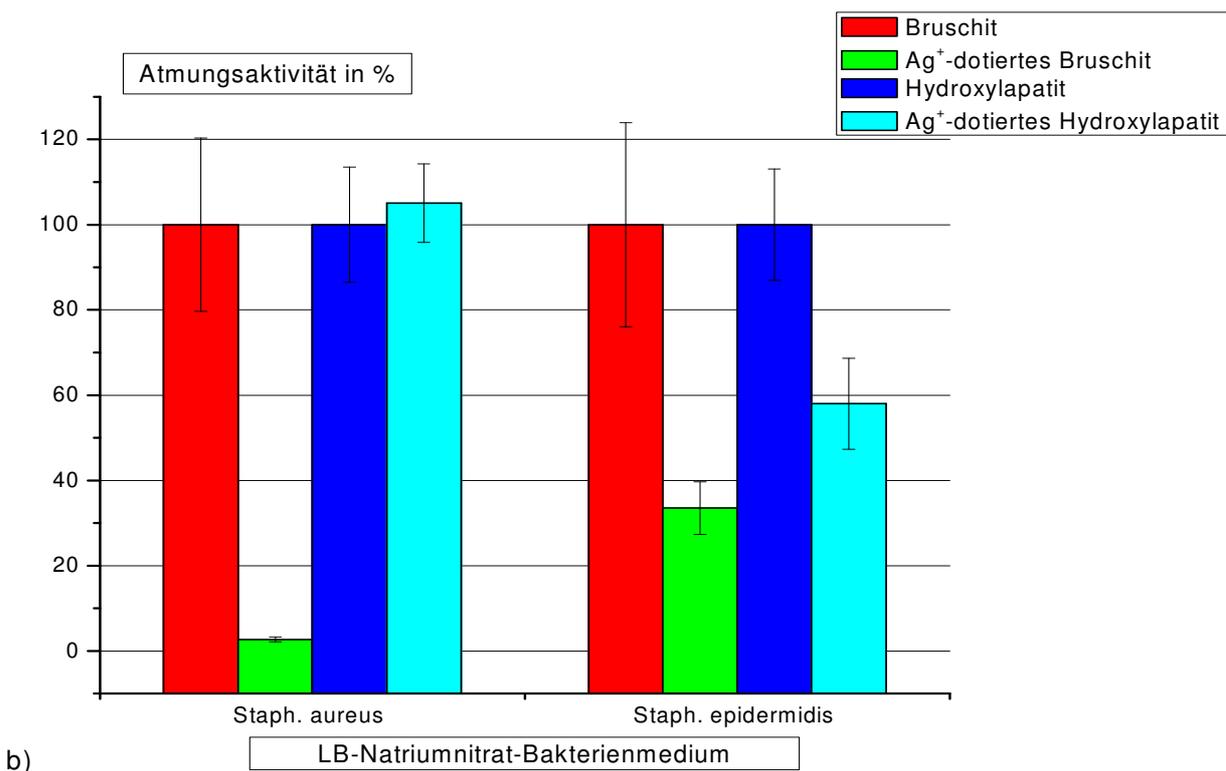
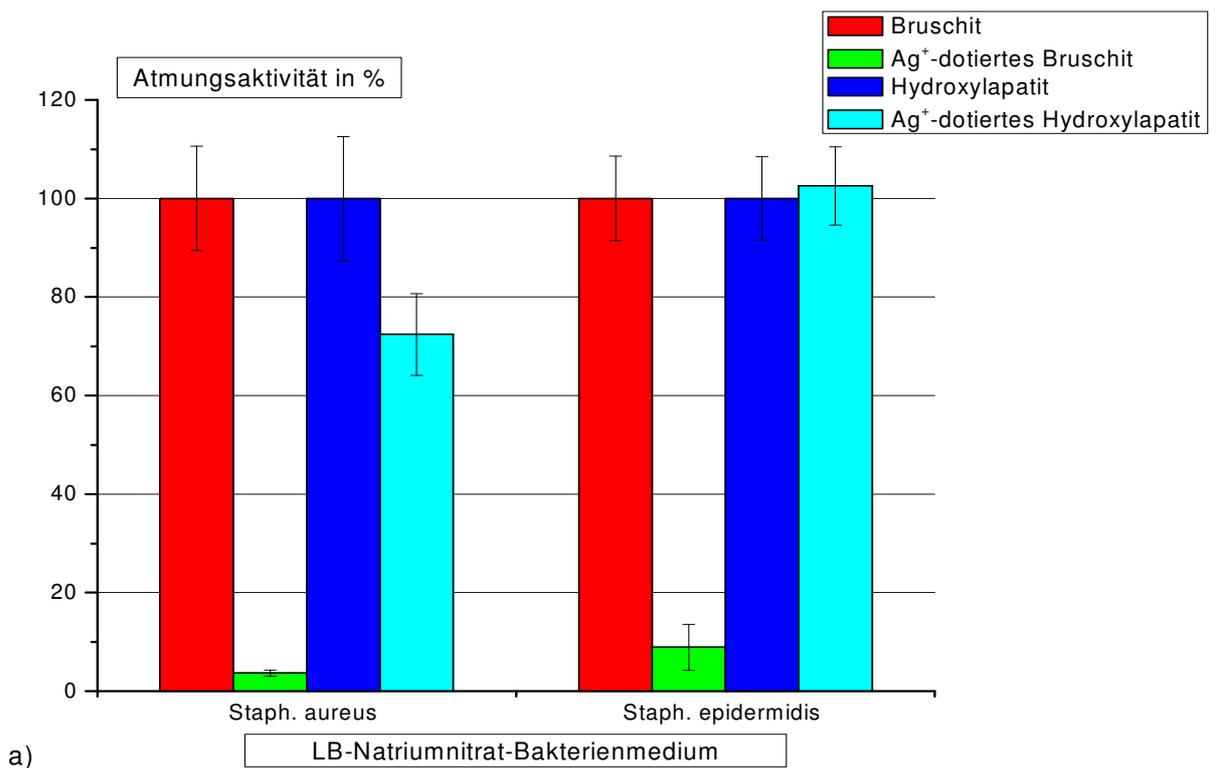


Abbildung 8.2 a+b: Erste (8.2 a) und zweite (8.2 b) Versuchsreihe. Relative Atmungsaktivität der Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* auf den vier verschiedenen Zementarten ($n = 4$ pro Oberfläche) ermittelt durch WST-1-Test. Als Medium wurde LB-Natriumnitrat verwendet. Auf der Ordinate ist die relative Atmungsaktivität in % zu den nicht silberdotierten Zementen Bruschit bzw. HA (Referenz) dargestellt; auf der Abszisse sind die Bakterienstämme angegeben.

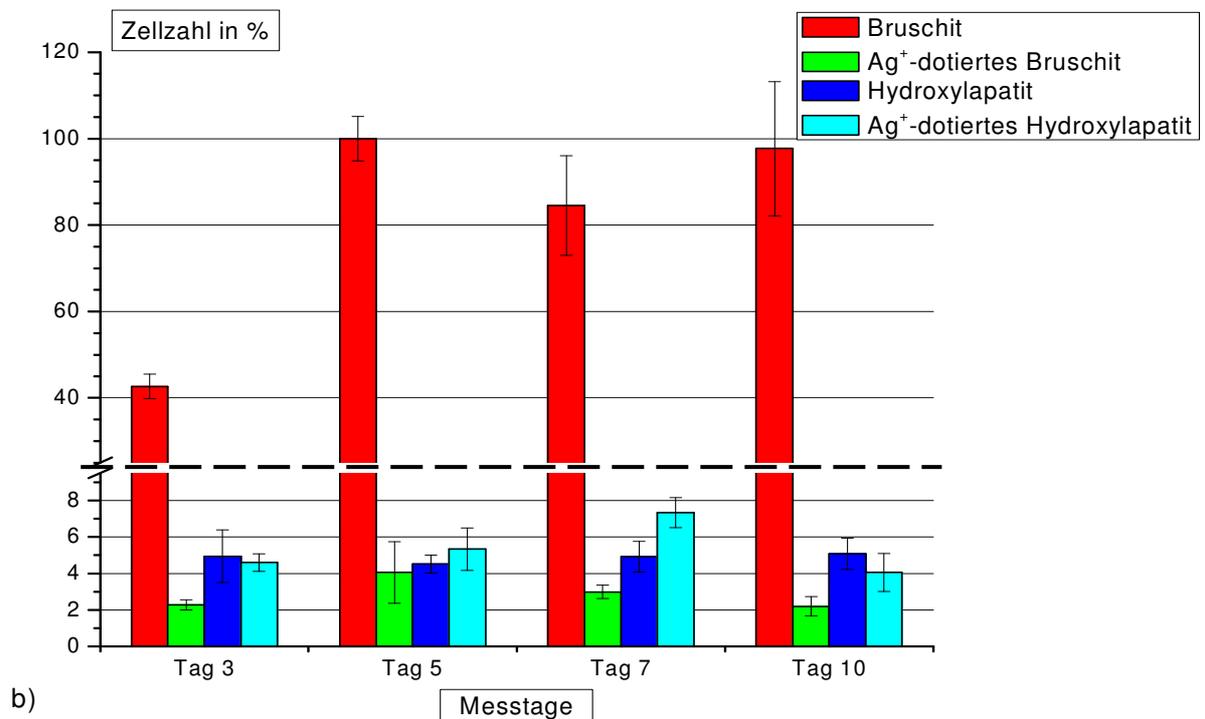
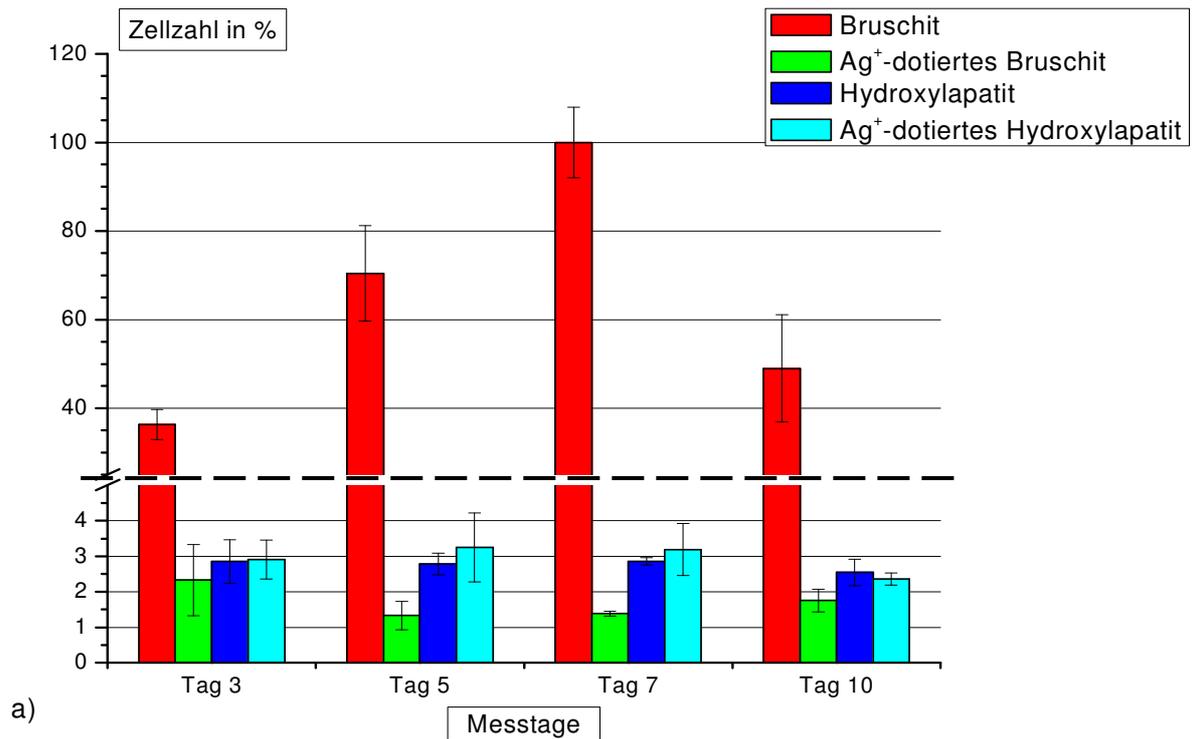


Abbildung 8.3 a+b: Erste (8.3 a) und zweite (8.3 b) Versuchsreihe. Relatives Zellwachstum humaner Osteoblasten (MG-63) auf den vier verschiedenen Zementoberflächen (n = 4 pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellzahl in %, bezogen zur Referenzoberfläche Bruschit am Tag des besten Wachstums (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

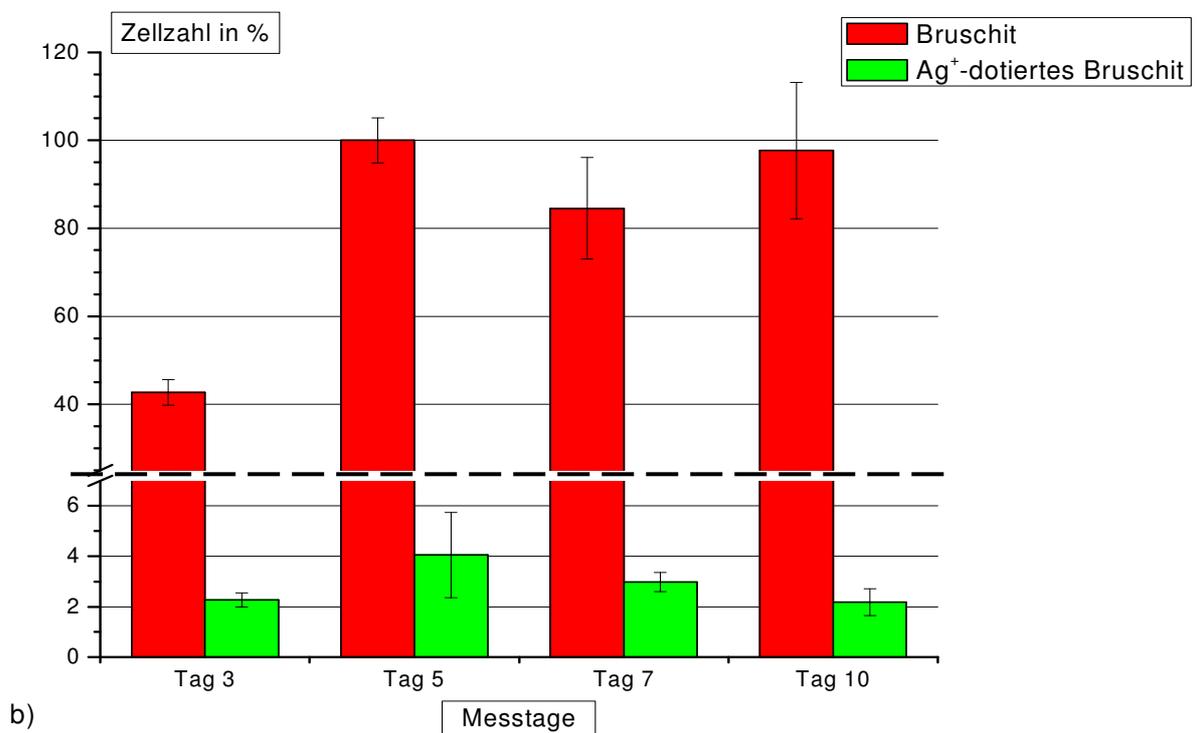
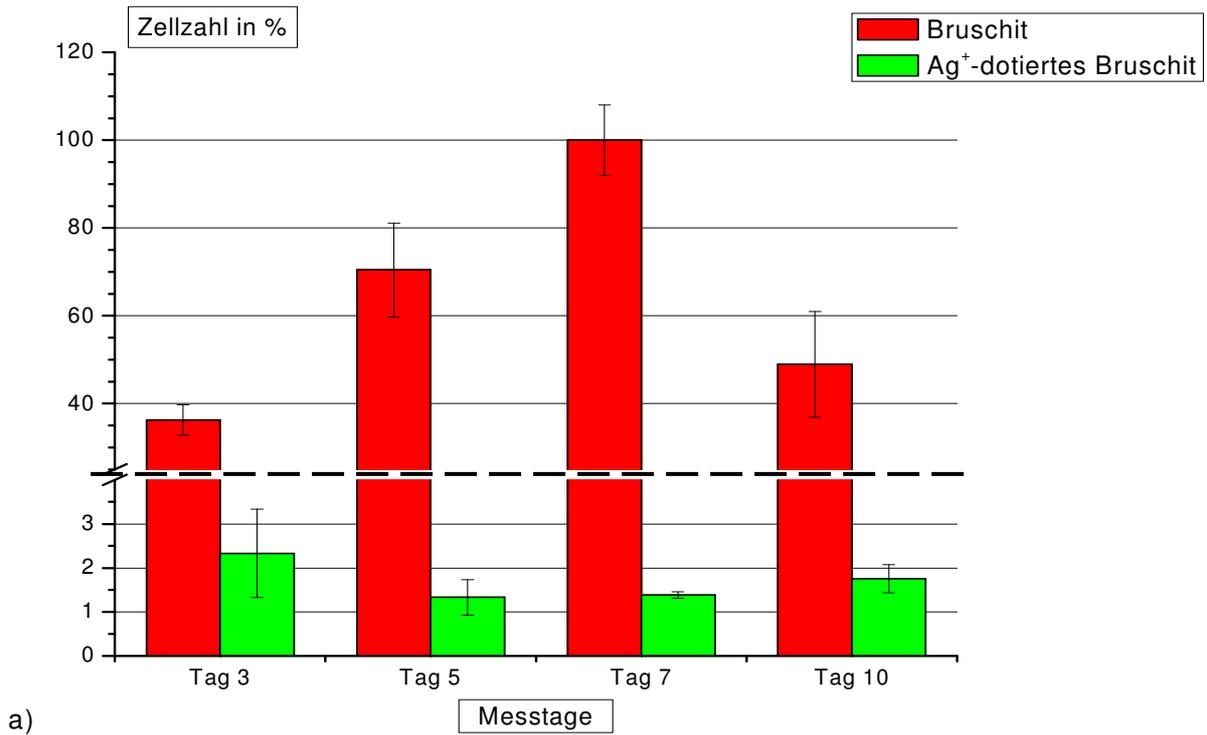
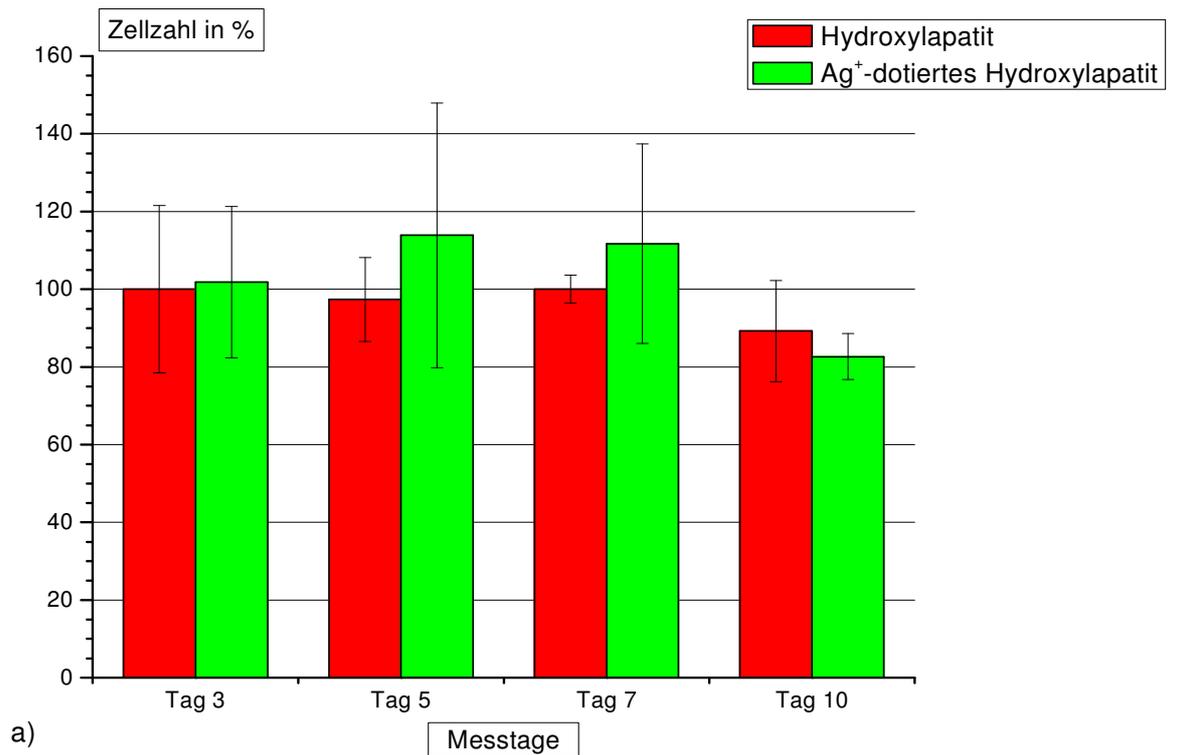
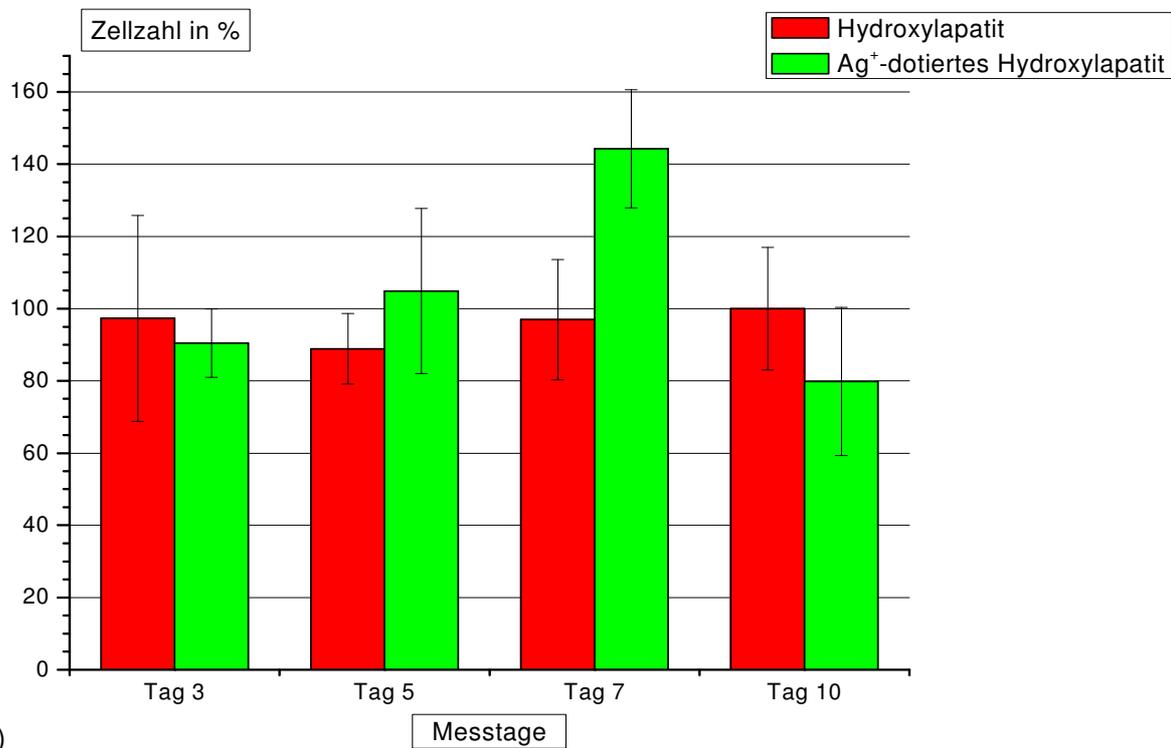


Abbildung 8.4 a+b: Erste (8.4 a) und zweite (8.4 b) Versuchsreihe. Relatives Zellwachstum humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Brushit und Ag-Brushit ($n = 4$ pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellzahl in %, bezogen zur Referenzoberfläche Brushit am Tag des besten Wachstums (Tag 7 [a], Tag 5 [b]) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

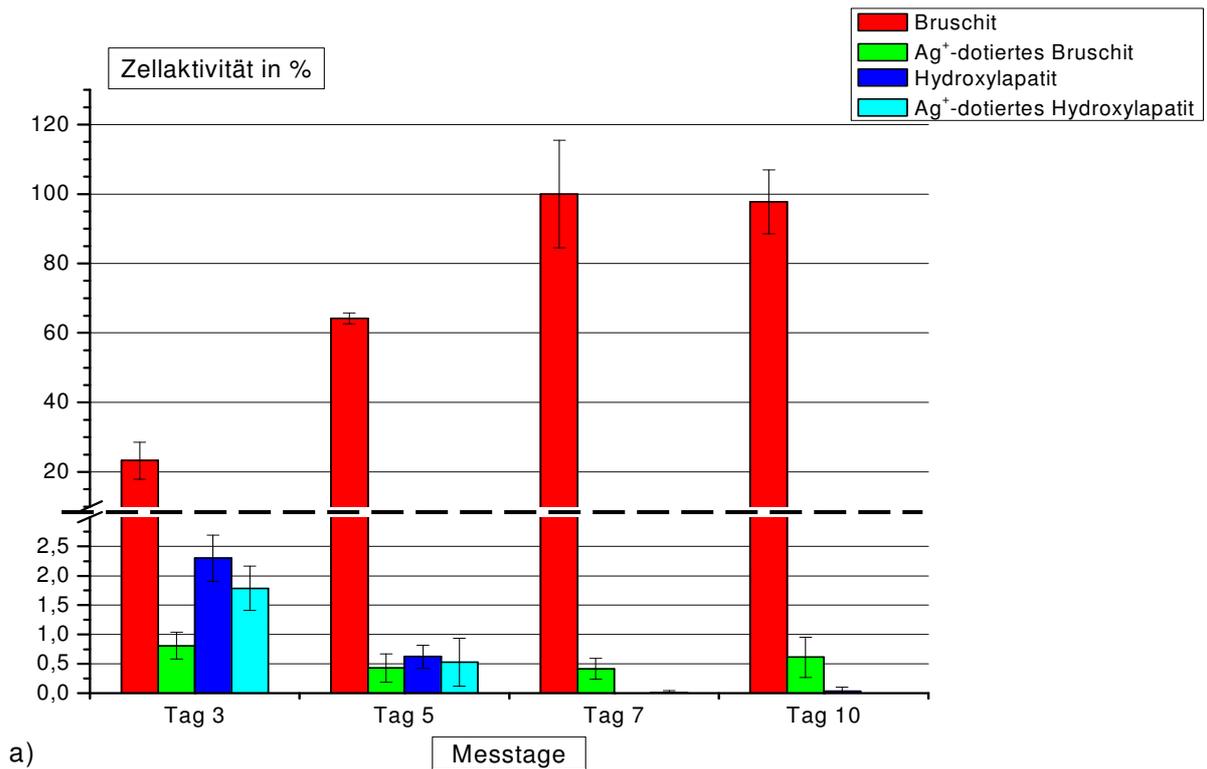


a)

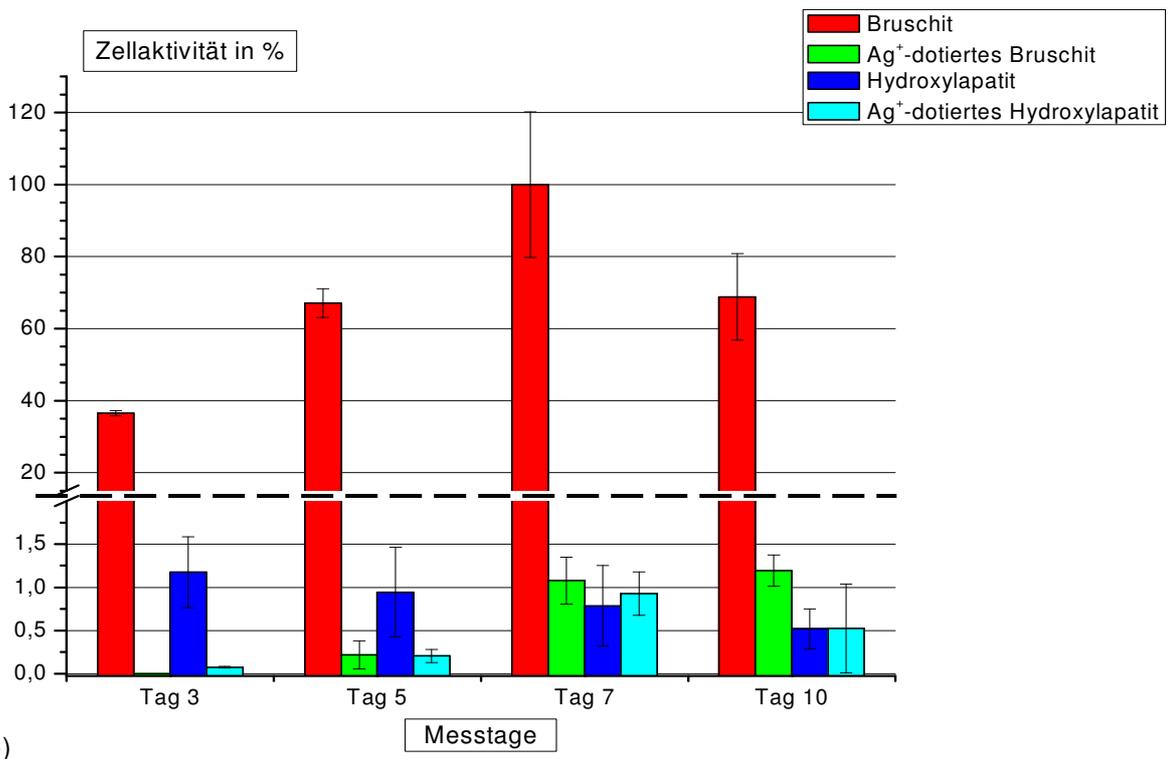


b)

Abbildung 8.5 a+b: Erste (8.5 a) und zweite (8.5 b) Versuchsreihe. Relatives Zellwachstum humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit (n = 4 pro Oberfläche). Auf der Ordinate ist die relative Zellzahl in %, bezogen zur Referenzoberfläche Hydroxylapatit am Tag des besten Wachstums (Tag 7 [a], Tag 10 [b]) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.



a)



b)

Abbildung 8.6 a+b: Erste (8.6 a) und zweite (8.6 b) Versuchsreihe. Relative Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den vier verschiedenen Zementoberflächen ($n = 4$ pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellaktivität in %, bezogen zur Referenzoberfläche Brushit am Tag der höchsten Aktivität (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

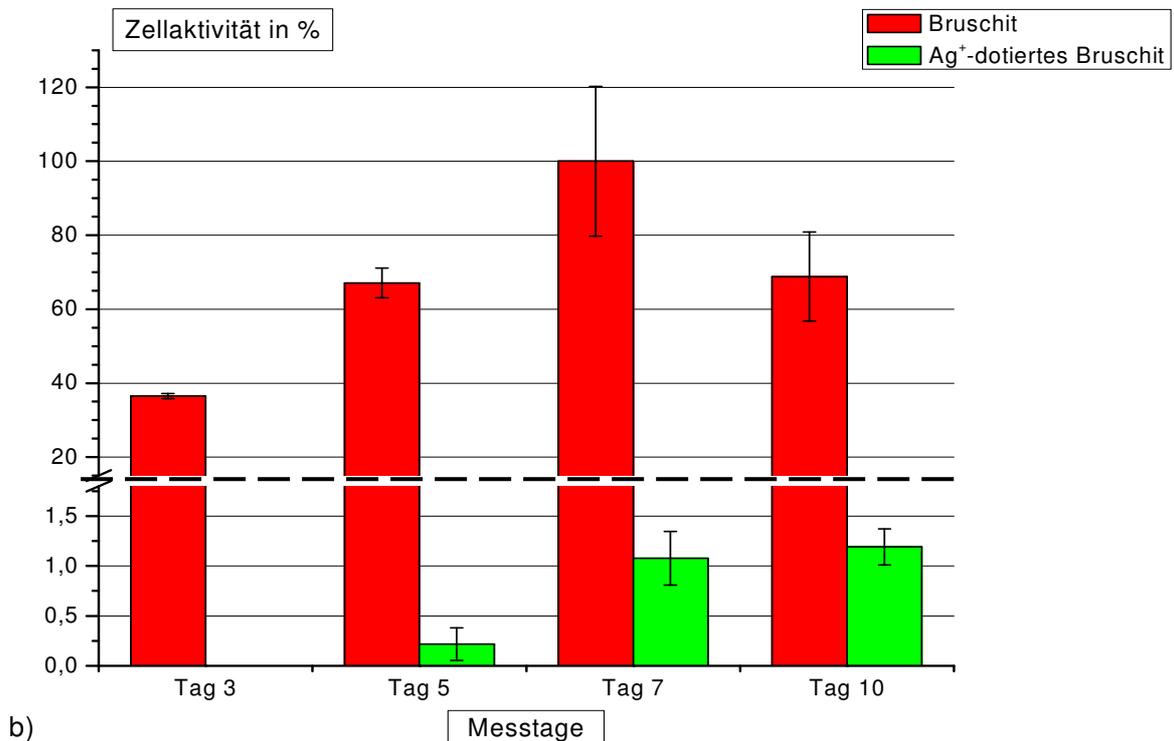
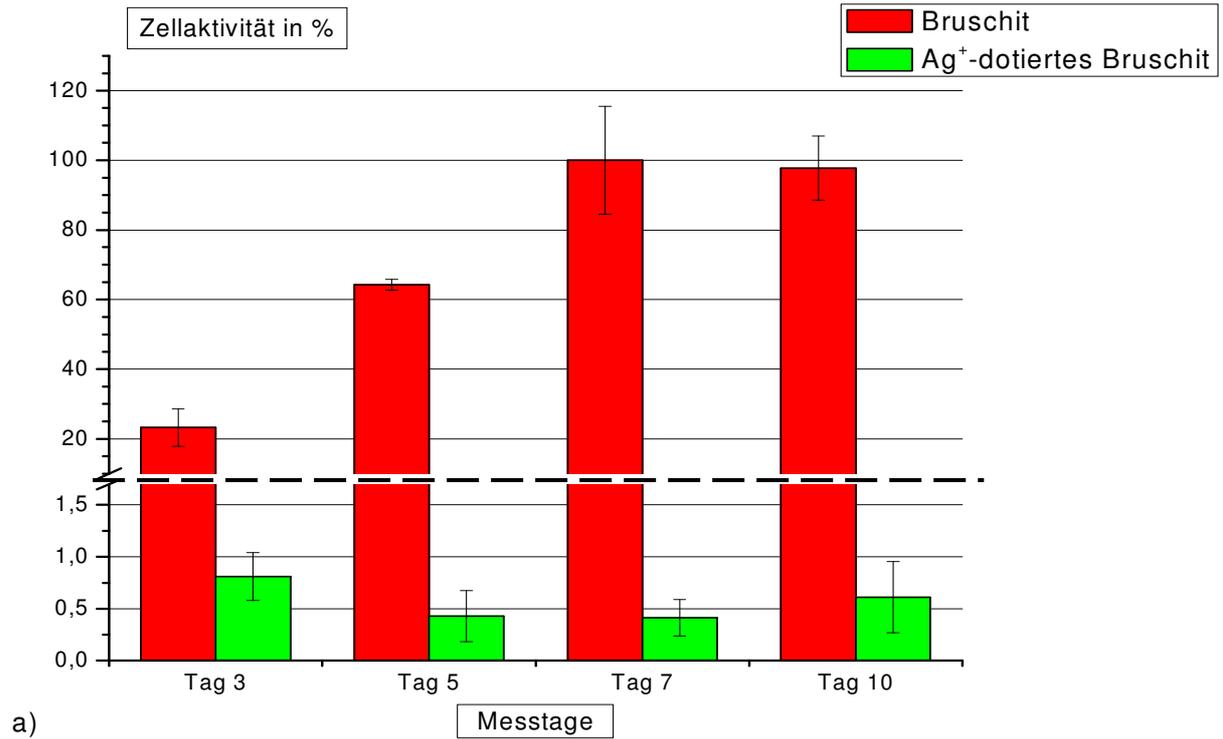


Abbildung 8.7 a+b: Erste (8.7 a) und zweite (8.7 b) Versuchsreihe. Relative Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Brushit und Ag-Brushit ($n = 4$ pro Oberfläche). Auf der Ordinate (**CAVE:** Achsenunterbrechung, gekennzeichnet durch eine horizontale gestrichelte Linie) ist die relative Zellaktivität in %, bezogen zur Referenzoberfläche Brushit am Tag der höchsten Aktivität (Tag 7) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

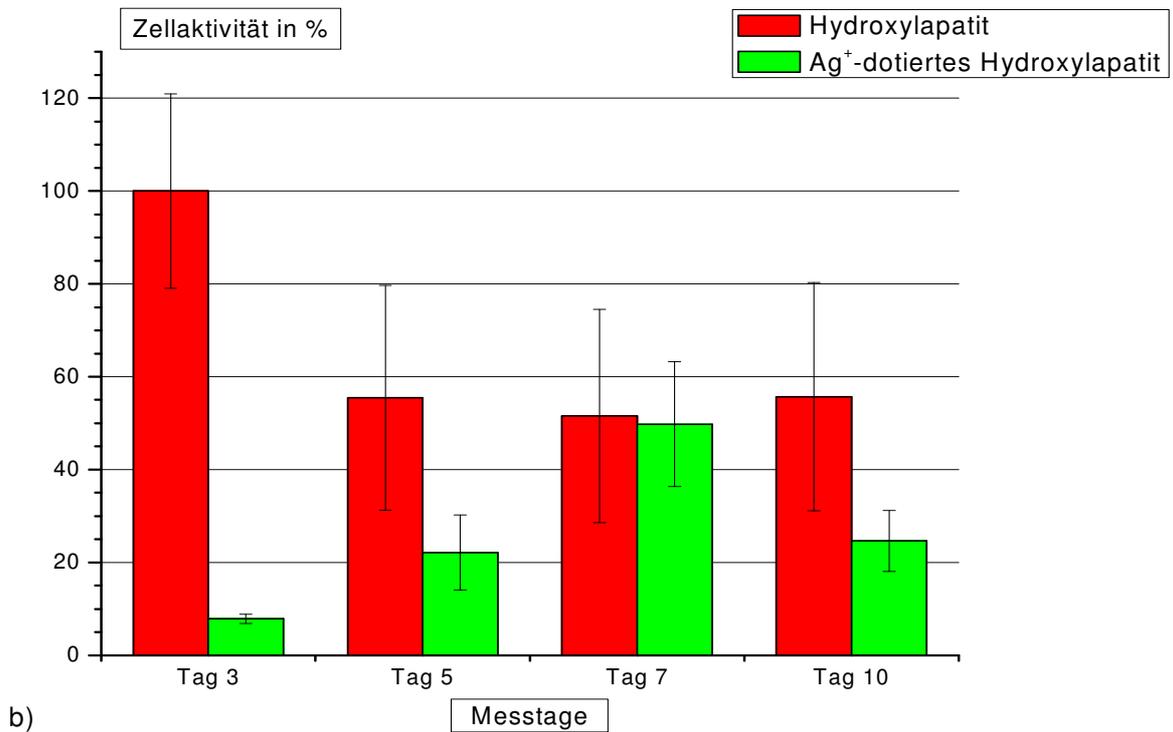
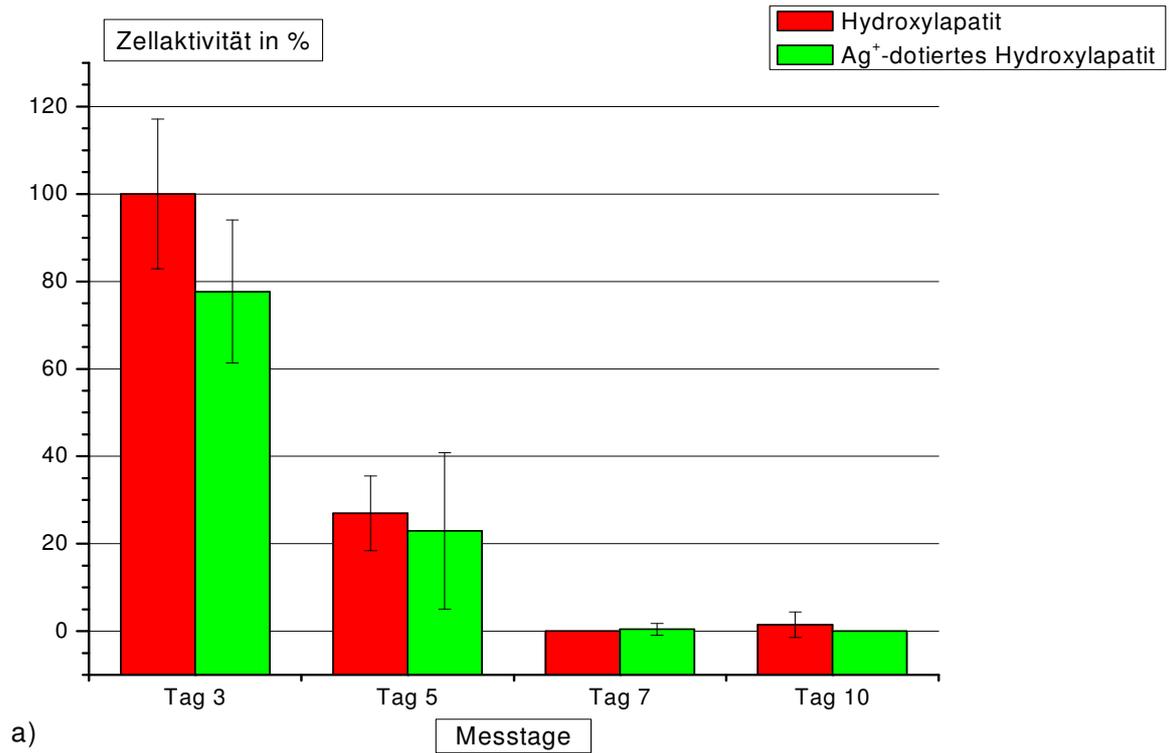


Abbildung 8.8 a+b: Erste (8.7 a) und zweite (8.7 b) Versuchsreihe. Relative Zellaktivität humaner Osteoblasten (MG-63) auf den Zementoberflächen Hydroxylapatit und Ag-Hydroxylapatit (n = 4 pro Oberfläche). Auf der Ordinate ist die relative Zellaktivität in %, bezogen zur Referenzoberfläche Hydroxylapatit am Tag der höchsten Aktivität (Tag 1) dargestellt, auf der Abszisse sind die Messtage angegeben.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Uwe Gbureck für die freundliche Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Promotionsthemas sowie für die intensive Betreuung während der Fertigstellung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. dent. Alfred Renk danke ich für die spontane und freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein ganz großes herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. rer. nat. Andrea Ewald für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung. Ihr unermüdliches Engagement, ihre Geduld bei all meinen Fragen sowie ihre konstruktiven Ratschläge und Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Dankeschön.

Besonders danken möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben und jederzeit hilfreich zur Seite standen.

Insbesondere möchte ich Frau Ursula Rummel und Frau Rita Schmid für die überaus freundliche Zusammenarbeit im Zelllabor sowie für die große Hilfsbereitschaft danken.

Ein ebenso großes Dankeschön gilt Frau Isabell Biermann für die immer freundliche Anleitung und Hilfe bei der Herstellung der Zemente, bei der Durchführung von Versuchen usw.

Frau Judith Friedlein möchte ich für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken.

Danke an alle weiteren Mitarbeiter der FMZ, die ich hier namentlich vergessen habe.

Mein allergrößter und herzlichster Dank gilt meiner Frau Tina Hösl, unseren beiden Töchtern Inka und Dana, meinen Eltern Rita und Dr. Georg Hösl sowie meinen Schwiegereltern Anni und Horst Priebe, durch deren aller Hilfe und Unterstützung mein Studium und das Erstellen dieser Arbeit überhaupt möglich wurde. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt, mir in schwierigen Lagen Mut zugesprochen, mir ständig den Rücken freigehalten und mich immerwährend in jeglicher Hinsicht unterstützt habt. Danke für die unendlich große Liebe, die ihr mir jeden Tag immer wieder neu entgegenbringt. An alle ein herzliches Vergelt's Gott.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Maximilian Hösl
Geburtstag: 01. April 1977
Geburtsort: Weiden i. d. Opf.
Familienstand: verheiratet, 2 Töchter
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1983 – 1987 Grundschule Pressath
1987 – 1997 Augustinus Gymnasium Weiden

Schulabschluss

6/1997 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

11/1997 – 8/1998 Grundwehrdienst im PzGrenBtl. 122 Oberviechtach

Hochschulausbildung

04/1999 – 09/1999 Studium der Mineralogie an der Universität zu Köln
04/2000 – 03/2003 Studium der Humanmedizin an der Universität
Erlangen
04/2003 – 11/2008 Studium der Zahnmedizin an der Universität
Würzburg

Studienabschluss

11/2008 Staatsexamen Zahnmedizin

Approbation als Zahnarzt

11/2008 Regierung von Unterfranken

Zahnärztliche Tätigkeit

seit 7/2009 Vorbereitungsassistent in der Praxis ZA Frank
Träger (Kemnath)