

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Vorversuche

#### 5.1.1. Lösungsmittel für die Zusätze

Die Polymerbasis bildet das säurezahlmodifizierte PMMA-SZ62. PMMA-SZ62 liegt in Pulverform vor. Zusätzliche Lösungsmittel sind notwendig, um die Verbindung zwischen Keramiken und Zusätzen herzustellen.

Ausgehend vom Lösungsmittelansatz von Drews [24] sollten verschiedene Ansätze hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit überprüft werden. Dabei sollte günstiger Weise der Anteil des AEE durch eine zusätzliche, möglichst wasserlösliche und selbstverständlich mit AEE vollständig mischbare Komponente, reduziert bzw. ergänzt werden. In dieses Lösungsgemisch soll das Polymer vollständig eingebracht werden können. Überprüft wurde zunächst die Durchführbarkeit des Lösungsvorganges und die Verarbeitung. Als zusätzliche Lösungsmittel standen EtOH (reinst) und 96%iges EtOH zur Verfügung. Beide Varianten lassen sich vollständig mit AEE mischen.

Die Ansätze AEE/EtOH (reinst bzw. 96%) standen im 50:50-, 70:30- und 30:70-Verhältnis. Den Ansätzen wurde eine definierte Menge des Polymer-SZ62 zugesetzt und die Löslichkeit bewertet. Der 50:50 Ansatz mit 96%igem EtOH, erwies sich als absolut verarbeitungsfreundlich und wurde für die weiteren Versuche eingesetzt.

Das SZ-modifizierte PMMA wurde in den 50:50 Ansatz von AEE und 96%iges EtOH eingestreut, mit einem Glasstab verrührt und anschließend 24 Stunden geschüttelt. Daraus ergab sich eine gleichermaßen klare, durchscheinende, honigartige, sowie klebrige Konsistenz des Polymeransatzes. Dieser Ansatz ist unter Luftabschluss und bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar.



Abb. 14: Polymeransatz in Spritze nach 24-stündiger Mischung

### 5.1.2. Auswahl des Verhältnisses von Feststoff zu Polymeransatz

Aufgrund der Tatsache, dass die Untersuchungsergebnisse von Drews [24] bereits die Möglichkeit der Verarbeitung und Einbringung von Biokeramiken und ZnO bewiesen hatten, wurden weitere Modifikationen vorgenommen, um die Verarbeitbarkeit, aber auch möglicherweise die Osteoinduktivität positiv zu beeinflussen.

Ausgehend von der bereits vorliegenden Rezeptur mit folgender Zusammensetzung:

Tabelle 7: Grundkomponentenzusammensetzung lt. Drews [24]

	Keramik 1	Keramik 2	Zusätze	Polymer
	GB14	TETRA	ZnO	SZ-62 gelöst in AEE (30%)
Menge	0,24g	0,24g	0,12g	0,2ml

wurden Überlegungen angestellt, Zusatzkomponenten zuzufügen, bzw. den Zinkoxidanteil zu reduzieren oder vollständig darauf zu verzichten.

ZnO wird in der Literatur, hinsichtlich seiner Bioverträglichkeit kontrovers diskutiert. Allerdings wurde in Studien von Dong, X. et al. [23, 44, 51] gezeigt, dass das  $Zn^{2+}$ -Kation als äußerst osteoinduktiv angesehen werden kann.

Die Biokeramiken GB14 und TETRA sollten entweder in gleichen Anteilen oder einzeln die Grundkomponente darstellen. Dabei liegt die Korngröße von GB14 immer bei 50-200 $\mu$ m und die von TETRA bei 90-160 $\mu$ m. Die weiteren Zusätze variierten hinsichtlich ihrer

---

Kombination untereinander. Von Kalziumzirkonphosphat CZP kamen zwei verschiedene Korngrößen zum Einsatz.

Versuche im Vorfeld die Komponenten zu mahlen - beispielsweise mit einer Achatmühle - zeigten keine wesentlichen Vorteile, sodass auf diese Vorbereitung verzichtet wurde.

Aus allen Mischungsversuchen konnte eindeutig festgestellt werden, dass durch das Hinzufügen von ZnO eine bessere Initialfestigkeit erreicht werden konnte. Durch die Zugabe von Kalziumzirkonphosphat wird eine etwas höhere Geschmeidigkeit beim Rühren der Ansätze erreicht.

Die Beurteilung der Verarbeitung und Mischbarkeit kann aus Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Variantenzusammensetzung und Verarbeitung

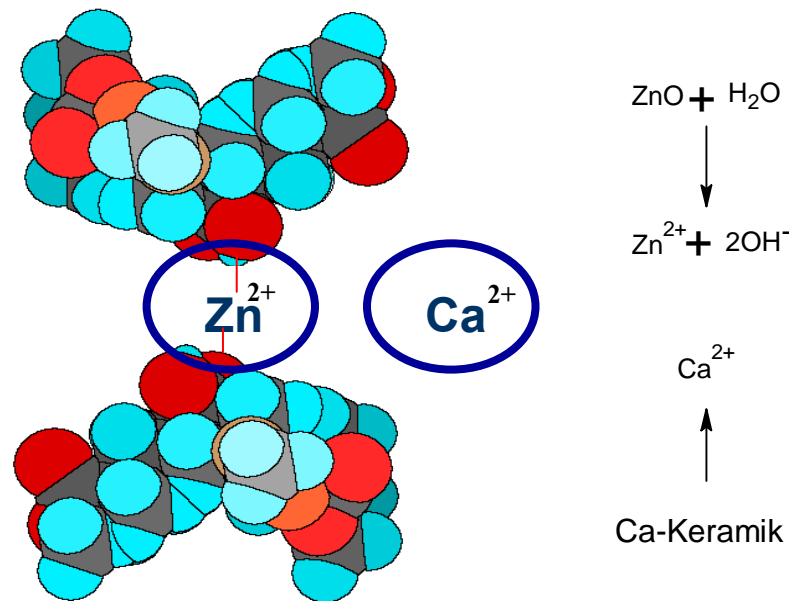
Variante	Keramik GB14 (g)	Keramik TETRA (g)	Zusätze (g)	Polymeransatz (ml)	Qualität des Produkts
M1	0.24	0.24	<b>CaZr<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b> (3.12µm): 0.24  <b>ZnO:</b> 0.12	0.2	-leichtes Rühren -cremig -nach 10min formstabil -klebt unter feuchten Bedingungen
M2	0.24	0.24	<b>CaZr<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b> (3.12µm): 0.3	0.2	-leichtes Rühren -etwas weniger cremig als Nr. 1. -formstabil nach Wasserkontakt -nach ca. 10min noch leicht elastisch
M3	0.24	0.24	<b>CaZr<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b> (2.24µm): 0.3	0.2	-Verarbeitung ähnlich Nr. 2
M4	0.2	0.2	<b>TiO<sub>2</sub>:</b> 0.2 <b>ZnO:</b> 0.2	0.2	-Verarbeitung s.o. -schnellere Formstabilität (nach ca. 2min Wasserlagerung) -klebt an Metall
M5	-	0.2	<b>TiO<sub>2</sub>:</b> 0.3 <b>ZnO:</b> 0.3	0.2	-Verarbeitung wie Nr.4 -sehr schnell formstabil
M6	0.2	-	<b>CaZr<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b> (3.12µm): 0.2 <b>TiO<sub>2</sub>:</b> 0.2 <b>ZnO:</b> 0.2	0.2	-sehr gut verarbeitbar -wie Nr.4
M7	0.2	-	<b>CaZr<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub></b> (3.12µm): 0.2 <b>TiO<sub>2</sub>:</b> 0.1 <b>ZnO:</b> 0.2 <b>NaF:</b> 0.1	0.2	-sehr gut verarbeitbar -wie Nr.4

### 5.1.3. Abbindereaktion

Die Abbindereaktion läuft in zwei Teilschritten ab. Während der initialen Phase kommt es zu einer Anreicherung von freien Kationen und zur Diffusion von Wasser in den Zement. Im Verlauf der zweiten Reaktion kommt es durch die weitere Wasserdiffusion zu einer Lösungsreaktion der Keramikpartikel. Das Abbinden ist vom Zink-Ionen- und vom Kalzium-Ionengehalt abhängig. Die Abbindereaktion läuft umso schneller ab, je höher der Gehalt an Zink-Ionen ist.

Die Abbindezeit liegt zwischen 5 und 15min. Die Viskosität ist vom Pulver-Flüssigkeitsverhältnis abhängig.

Die Abbildung 15 zeigt schematisch den sich bildenden Komplex zwischen  $Zn^{2+}$ -Ionen und den  $COOH^-$ -Gruppen des SZ-Acrylates.



**Abb. 15:** SZ –Acrylat als organische Komponente, schematische Darstellung der initialen Phase

Die Zementationsreaktion wird durch die Bildung von  $Zn^{2+}$ -Ionen entsprechend der Reaktionsgleichung:  $ZnO + H_2O \rightarrow Zn^{2+} + 2OH^-$  (1)



initiiert. Im weiteren Verlauf kommt es durch die Einbindung von  $Ca^{2+}$ -Ionen, entsprechend Gleichung 2, zu einer Verfestigung. Die  $Ca^{2+}$ -Ionen werden aus den beigemischten Keramiken freigesetzt.

#### 5.1.4. Auswertung der Vorversuche

Durch Zugabe von Kalziumzirkonphosphat (CZP), Titandioxid ( $TiO_2$ ) und Natriumfluorid (NaF) soll folgendes erreicht werden:

- 
- CZP könnte als Röntgenkontrastmittel wirken. Durch die partielle Löslichkeit werden Kalzium-Ionen freigesetzt, die sowohl die initiale Phase als auch den Prozess der Osteosynthese unterstützen.
  - $\text{TiO}_2$  soll den ZnO-Anteil reduzieren und eine Füllstofffunktion erfüllen. Die Biokompatibilität von  $\text{TiO}_2$  wird höher als die von ZnO bewertet.
  - NaF wurde nur in der Testphase verwendet, um über in Lösung gehende Fluorid-Ionen das Titan aktivieren zu können und so den Haftmechanismus zu verstärken.

Allerdings ergab sich, dass die Zugabe von NaF nicht sinnvoll ist, da Kalzium-Ionen aus der Keramik freigesetzt werden. Kalzium- und Fluorid-Ionen bilden  $\text{CaF}_2$  und diese Verbindung ist wiederum schwer löslich, was eine negative Beeinflussung der Initialfestigkeit zur Folge hatte.

Bei allen Variationen ist die Applikation mit Hilfe einer Spritze möglich. Es wurden 5ml-Kunststoffspritzen verwendet.

Die Initialfestigkeit bzw. eine Formstabilität bei Lagerung unter feuchten Bedingungen ist nach ca. 15-20min erreicht.

### ***5.2. Reproduzierbarkeit der Zusammensetzung***

Alle Rezepturen wurden bereits so gewählt, dass ein leichtes Vermischen der Komponenten erfolgen konnte. Die Ansätze M1 bis M7 haben jedoch bezogen auf den Polymeransatz unterschiedliche Masseprozentage.

In den Ansätzen waren folgende Parameter konstant:

Menge Polymer	→	0.2ml
Korngröße GB14	→	50-200 $\mu\text{m}$
Korngröße TETRA	→	90-160 $\mu\text{m}$
Korngröße CZP	→	3.12/2.24 $\mu\text{m}$

**Tabelle 9: Zusammensetzung der experimentellen Zemente mit reproduzierbaren Rezepturen, Angaben in w% vom Feststoffanteil**

									Pulver/ Flüssigkeitsverhältnis	
M1	28.57% GB14 0.24g	+	28.57% TETRA 0.24g	+	28,57% CZP(3.12µm) 0.24g	+	14.29% ZnO 0.12g		4.2/1	
M2	30.77% GB14 0.24g	+	30.77% TETRA 0.24g	+	38.46% CZP(3.12µm) 0.3g				3.7/1	
M3	30.77% GB14 0.24g	+	30.77% TETRA 0.24g	+	38.46% CZP(2.24µm) 0.3g				3.7/1	
M4	25% GB14 0.2g	+	25% TETRA 0.2g	+	25% TiO <sub>2</sub> 0.2g	+	25% ZnO 0.2g		4/1	
M5	25% TETRA 0.2g	+	37.5% TiO <sub>2</sub> 0.3g	+	37.5% ZnO 0.3g				4/1	
M6	25% GB14 0.2g	+	25% CZP(3.12µm) 0.2g	+	25% TiO <sub>2</sub> 0.2g	+	25% ZnO 0.2g		4/1	
M7	25% GB14 0.2g	+	25% CZP(3.12µm) 0.2g	+	12.5% TiO <sub>2</sub> 0.1g	+	25% ZnO 0.2g	+	12.5% NaF 0.1g	4/1

### 5.3. Werkstoffkundliche Eigenschaften

#### 5.3.1. Ergebnis des Vier-Punkt-Biegeversuches

Jeweils 10 Probekörper der Variationen M1, M2, M3, M4, M5, M6 und M7 wurden hergestellt. Als Form diente für alle die Teflonform mit den Maßen 15 x 10 x 2 mm.

Der Vier-Punkt-Biegeversuch wurde mit den in Aqua bidest (37°C) gelagerten Probekörpern durchgeführt. Die Testung erfolgte jeweils nach einer Wasserlagerung von 24 Stunden sowie einer Woche.

Die Lagerungsbedingungen können einen entscheidenden Einfluss auf die Biegebruchfestigkeit haben [63]. Zudem sollten die natürlichen Bedingungen in gewissem Maß simuliert werden.

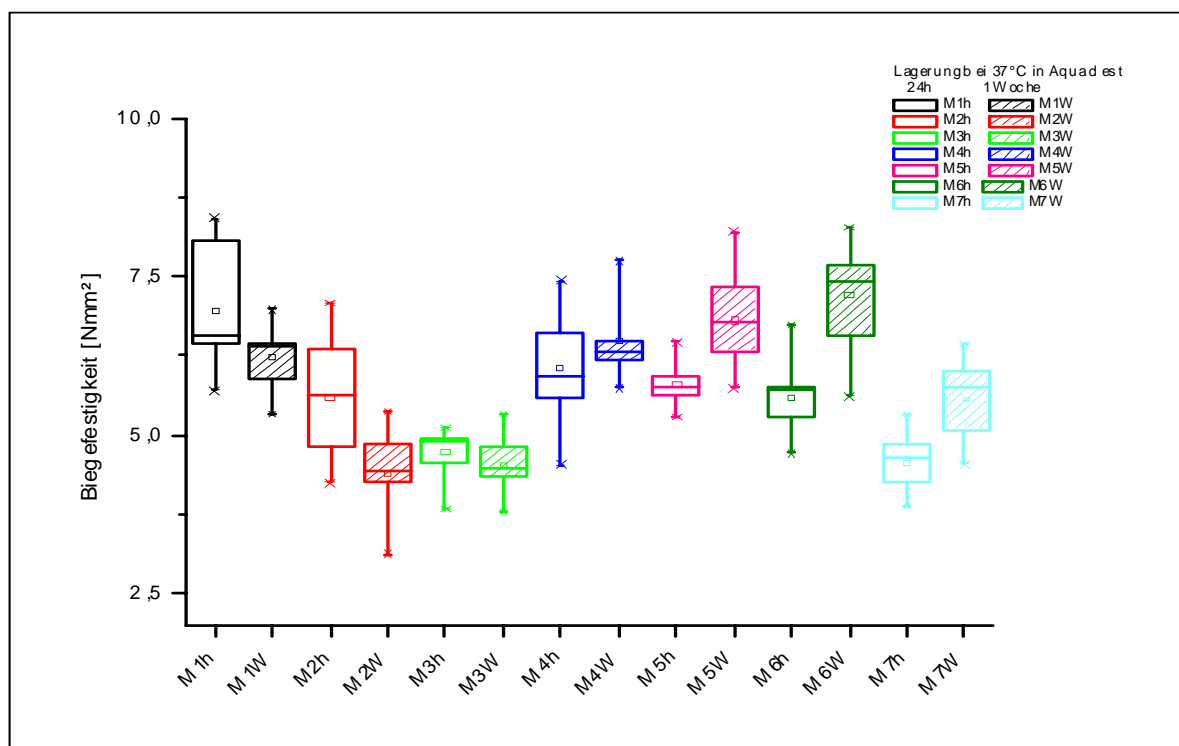


Abb. 16: Biegebruchfestigkeit der PK M1-M7 nach 24-stündiger und 1-wöchiger Lagerung in 37 °C Aqua bidest. (n=10)

In obiger Abbildung sind die Ergebnisse der Biegebruchfestigkeit der Probekörper M1 bis M7 nach 24-stündiger, sowie nach 1-wöchiger Lagerung in 37°C warmem Aqua bidest. dargestellt. Von jeder Variation wurden 10 Probekörper im Vier-Punkt-Biegebruch-Test untersucht.

Die Biegebruchfestigkeit der Probekörper M1 und M2 sinkt nach einer Woche Wasserlagerung im Vergleich zur 24-Stunden Lagerung. Bei M3 und M4 bleiben die Werte nahezu stabil. Ein Anstieg der Biegebruchfestigkeit ist bei den Probekörpern M5, M6 und M7 nach einer Woche im Vergleich zu 24 Stunden zu erkennen.



### 5.3.2. Ergebnis der Druckspannungsprüfung

Die Druckspannung der Probekörper (pro Variante 10 Stück) wurde mit dem Kegelfließpunktmessgerät, an je einer Bruchhälfte des Biegebruchfestigkeitsversuchs, ebenfalls nach 24 Stunden und nach einer Woche an den in Aqua bidest. (37°C) gelagerten Probekörpern untersucht.

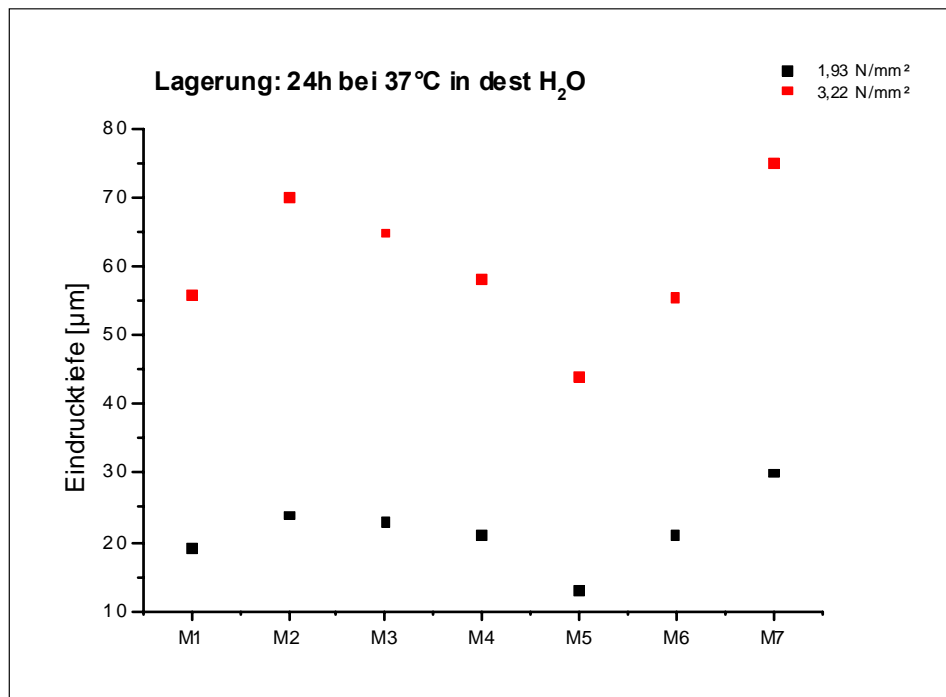


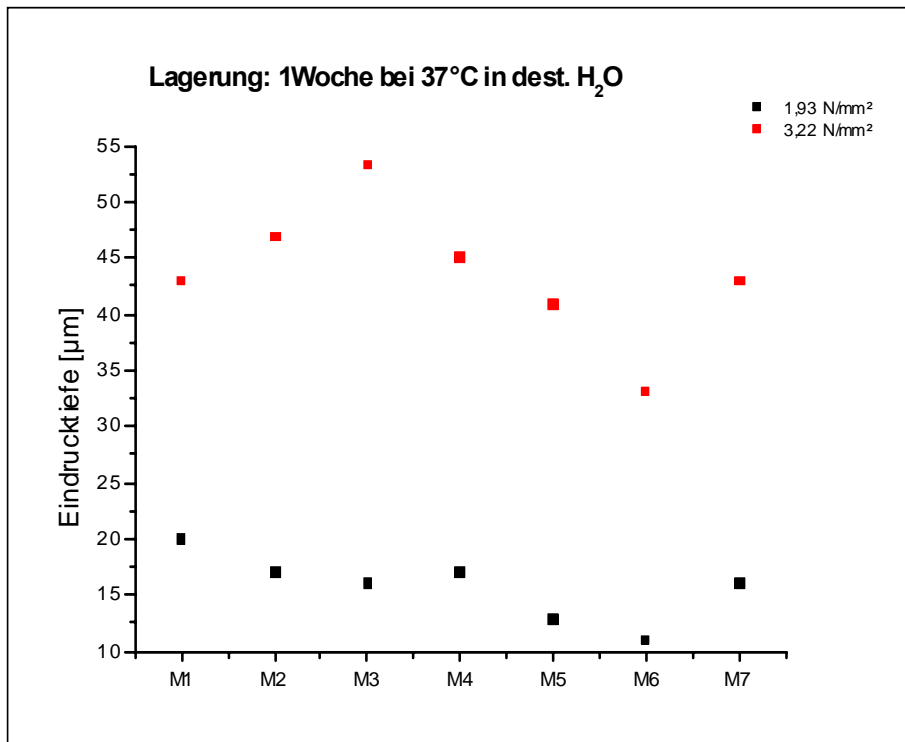
Abb. 17: Druckspannung der verschiedenen Probekörper nach 24h-Lagerung in 37°C Aqua bidest. (n=10)

Die Druckspannungswerte der Proben M1-M7 nach 24-stündiger Lagerung variierten. Die geringste Stabilität gegenüber der Belastung bei 3.22 N/mm<sup>2</sup> zeigten die Bruchhälften von M7 und M2 mit Eindrucktiefen von 75µm bzw. 70µm. Die niedrigsten Werte und damit die größte Stabilität für diese Gruppe erreichten M5 und M7 mit 44µm bzw. 56µm.

Die Ergebnisse der übrigen Bruchhälften lagen innerhalb dieser Ober- und Untergrenzen.

Bei einer Belastung von 1.93 N/mm<sup>2</sup> war die Verteilung ähnlich. Wiederum ergeben sich für M7 und M2 die höchsten Werte. M7 lag bei 30µm und M2 bei 24µm Eindrucktiefe. Die niedrigsten Werte wurden bei M5 mit 13µm und die Bruchhälfte von M1 mit 19µm gemessen. Die übrigen Werte lagen hier wiederum innerhalb dieses Bereiches.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Ansätze M2 und M7 weicher sind als die übrigen Ansätze.



**Abb. 18: Druckspannung der verschiedenen Probekörper nach 1 Woche Lagerung in 37°C Aqua bidest. (n=10)**

Nach einwöchiger Lagerung der Bruchhälften in Aqua bidest. bei einer Temperatur von 37°C war im Vergleich zu den Werten nach 24-stündiger Lagerung eine etwas abweichende Verteilung erkennbar. Bei einer Belastung von 3.22 N/mm<sup>2</sup> ergeben sich für die Bruchhälften der Proben von M3 mit 53μm und M2 mit 47μm Eindrucktiefe die geringste Stabilität, wohingegen die Proben M5 mit 41μm und M6 mit 33μm Eindrucktiefe die höchste Stabilität aufwiesen.

Die übrigen Ergebnisse lagen innerhalb der oberen und unteren Grenze.

Bei der Belastung von 1.93 N/mm<sup>2</sup> wurden für M1 mit 20μm und M4 mit 17μm Eindrucktiefe die höchsten Werte gemessen. Die Untergrenze bildeten M5 mit 13μm und M6 mit 11μm Eindrucktiefe. Die übrigen Werte lagen innerhalb dieses Bereiches.

Im direkten Vergleich der Ergebnisse der 24-Stunden bzw. einer Woche Aqua bidest. - Lagerung, ist eine deutliche Verfestigung nach längerer Lagerung erkennbar.

### ***5.3.3. Auswertung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen***

Bedingt durch die Probekörperform kam es während der Aushärtung des Zementbreies zur Ausbildung unterschiedlicher Struktureigenschaften. Die Unterseite der Proben lag dabei mehr oder weniger fest der Probekörperform an, wohingegen die Oberfläche frei aushärtete und eher dem Wasserzutritt ausgesetzt war, dadurch existieren drei strukturell unterschiedliche Bereiche (Oberseite, Zwischenbereich, Unterseite). Der Zwischenbereich entspricht der späteren Bruchkante.

Die Poren, die hauptsächlich innerhalb des Probekörpers (entsprechend Bruchkante) zu erkennen waren, zeigten eine unterschiedliche Variationsbreite. Diese war abhängig von der Materialzusammensetzung. Bei allen Bruchflächen waren eine Vielzahl von Poren erkennbar. Diese unterschieden sich in Form und Größe. Das Phänomen setzte sich zur Oberfläche hin in unterschiedlichem Ausprägungsgrad fort. Die Bruchfläche war rau und porös (siehe Abb. 19/20)

Bei keinem der Probekörper kam es zu einem sauberen und glatten Bruch. In den höheren Auflösungen ist ein sehr stark ausgeprägtes Relief zu erkennen. Die Poren sind mehr oder weniger gleichmäßig verteilt und setzen sich durch alle Variationen fort.

Es wird eine Porenstrukturgröße von  $> 75\mu\text{m}$  gefordert. Die Porengröße der einzelnen Mischungsansätze variierte zwischen  $50\text{-}250\mu\text{m}$ .

Als Beispiel ist die Übersicht des Probekörperbruchstückes M4 nach einem Tag und nach einer Woche Wasserlagerung mit 10-facher Vergrößerung, sowie die Bruchkante desselben Probekörpers mit 155-facher Vergrößerung in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt. Die Oberfläche des Probekörpers M4 zeigte nach einer Woche Wasserlagerung deutlich mehr Poren als nach 24-stündiger Lagerung. Die Poren innerhalb der Bruchkante schienen nach einer Woche gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt. Die Porengröße reichte hierbei bis zu  $250\mu\text{m}$ .

Sämtliche REM-Aufnahmen von M1 bis M7 sind im Anhang zu finden.

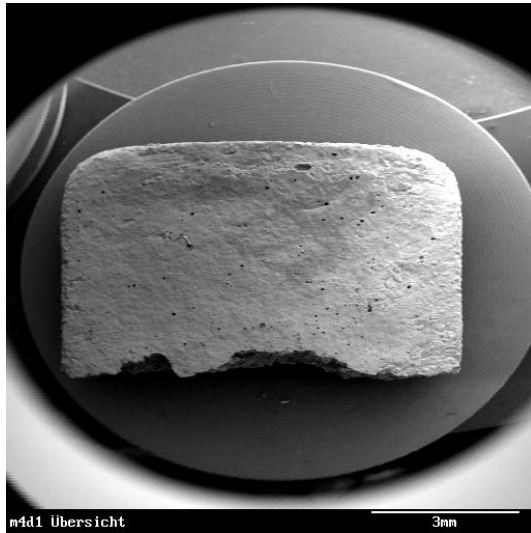


Abb. 19: PK M4 REM-Aufn. 10-fach (1Tag)

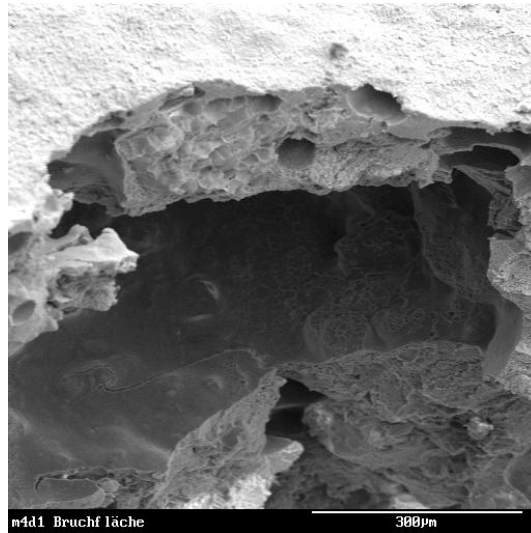


Abb. 20: PK M4 REM-Aufn. 155-fach (1Tag)

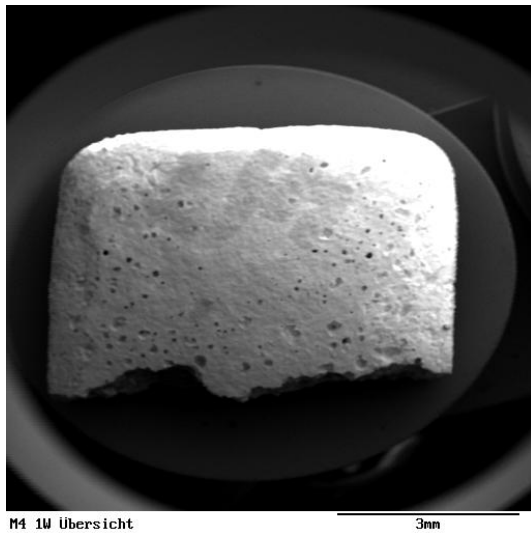


Abb. 21: PK M4 REM-Aufn. 10-fach (1Woche)

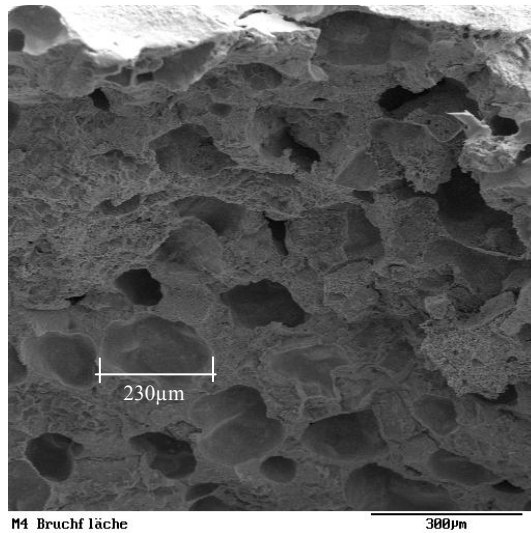


Abb. 22: PK M4 REM-Aufn. 155-fach (1Woche)

### 5.3.4. Ergebnisse der Zellkulturtests

Die Zellkulturtests sind in Eluat-Tests und Direktauflagetests zu unterscheiden.

#### 5.3.4.2. Zahl der abgestorbenen primären humanen Osteoblasten (24h-Eluate)

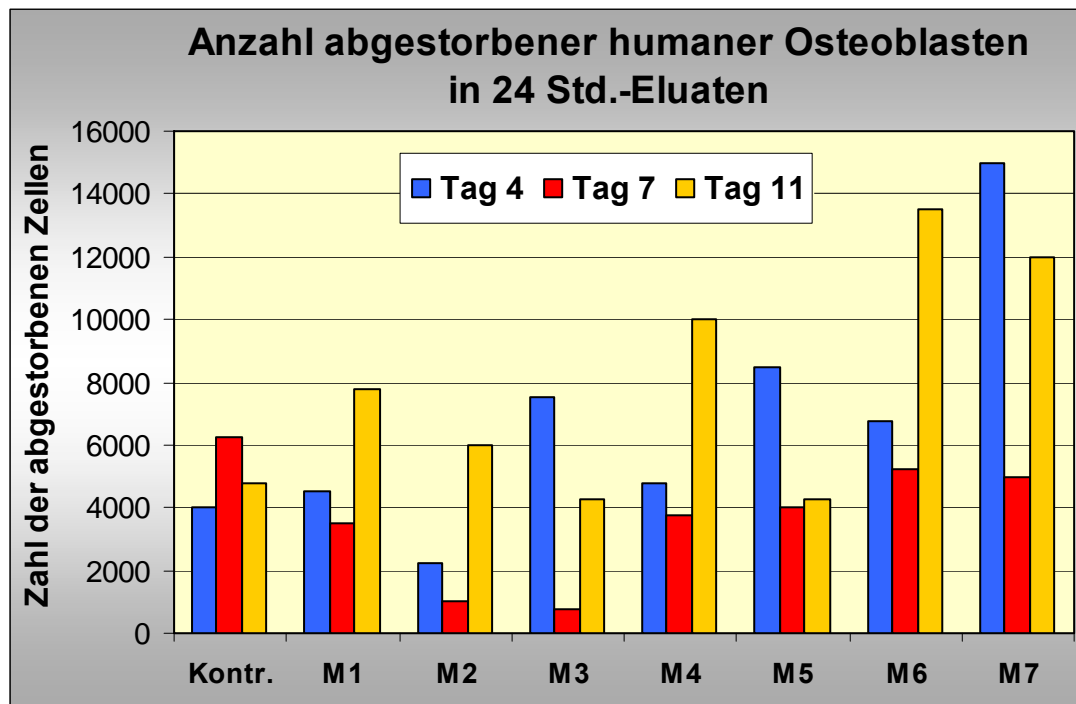


Abb. 23: Anzahl der abgestorbenen humanen Osteoblasten nach 4-, 7-, bzw. 11-tägiger Inkubation in 24h-Eluaten der PK M1-M7

In Abb. 23 ist die Anzahl der abgestorbenen humanen Osteoblasten im 24-Stunden-Eluat der Variationen M1 bis M7 nach 4, 7 und 11 Tagen dargestellt. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch betrachtet, mit Trypan blau versetzt und anschließend ausgezählt.

Die Kontrolle zeigte am Tag 4 eine mittlere Anzahl von abgestorbenen Osteoblasten. Am Tag 7 war ein Anstieg erkennbar. Ein schwacher Abfall war an Tag 11 zu verzeichnen. Die Zahl der abgestorbenen Zellen lag bei Versuchsende (Tag 11) etwas über dem Wert zu Beginn der Zählung.

Die höchste Anzahl von abgestorbener Zellen war bei M7 am Tag 4 erkennbar. Am Tag 7 war jedoch bei dieser Probe der im Vergleich zu den übrigen Varianten stärkste Abfall der Anzahl zu erkennen. Am Tag 11 kam es nochmalig zu einem Anstieg, jedoch überschritt die Anzahl der abgestorbenen Zellen nicht den Wert, der zu Beginn ermittelt wurde. Die Anzahl der abgestorbenen Zellen lag am 7. Tag sogar unter der für die Kontrolle ermittelten Ergebnisse.

Die Probe M3 hatte zwar zu Beginn eine höhere Anzahl als die Kontrolle, verzeichnete aber an Tag 7 einen sehr starken Abfall. Am 11. Tag war ein Anstieg zu erkennen, dieser lag dennoch unter der Anzahl der abgestorbenen Zellen der Kontrolle.

### 5.3.4.3. Zahl der abgestorbenen primären humanen Osteoblasten (48h-Eluate)

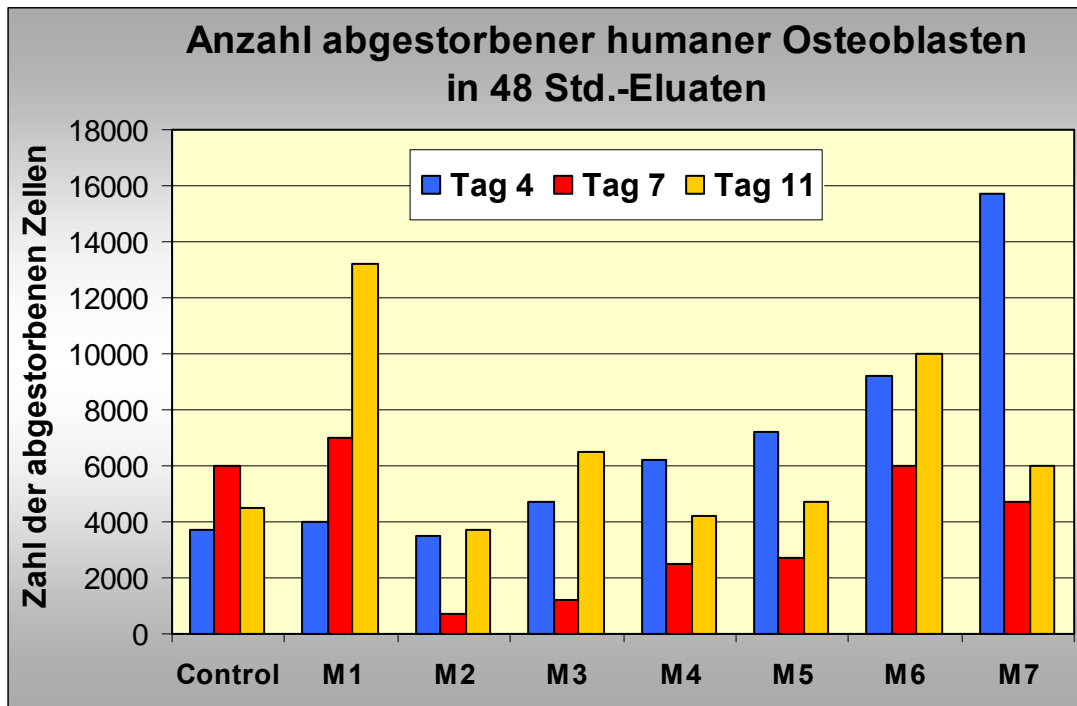


Abb. 24: Anzahl der abgestorbenen humanen Osteoblasten nach 4-, 7-, bzw. 11-tägiger Inkubation in 48h-Eluaten der PK M1-M7

In Abb. 24 ist die Anzahl der abgestorbenen Osteoblasten im 48-Stunden-Eluat der Proben M1- M7 nach 4, 7 und 11 Tagen dargestellt.

Zu Beginn war die Zahl der abgestorbenen Osteoblasten in der Kontrolle relativ gering. Im Verlauf konnte ein leichter Anstieg beobachtet werden. Am Tag 11 kam es zu einem schwachen Abfall. Im 48-Stunden-Eluat fand sich die höchste Anzahl von abgestorbenen Osteoblasten bei Probe M7.

Bei allen Kombinationen (außer M1) des experimentellen Knochenzementes kam es bei der 2. Zählung an Tag 7 zu einem Abfall der Anzahl der abgestorbenen Zellen. Am Tag 11 ist jedoch wieder ein Anstieg zu verzeichnen. Den höchsten Wert zeigte M1. Der im Vergleich stärkste Abfall war bei M7 zu verzeichnen.

#### 5.3.4.4. ALP-Aktivität (24h- und 48h-Eluate)

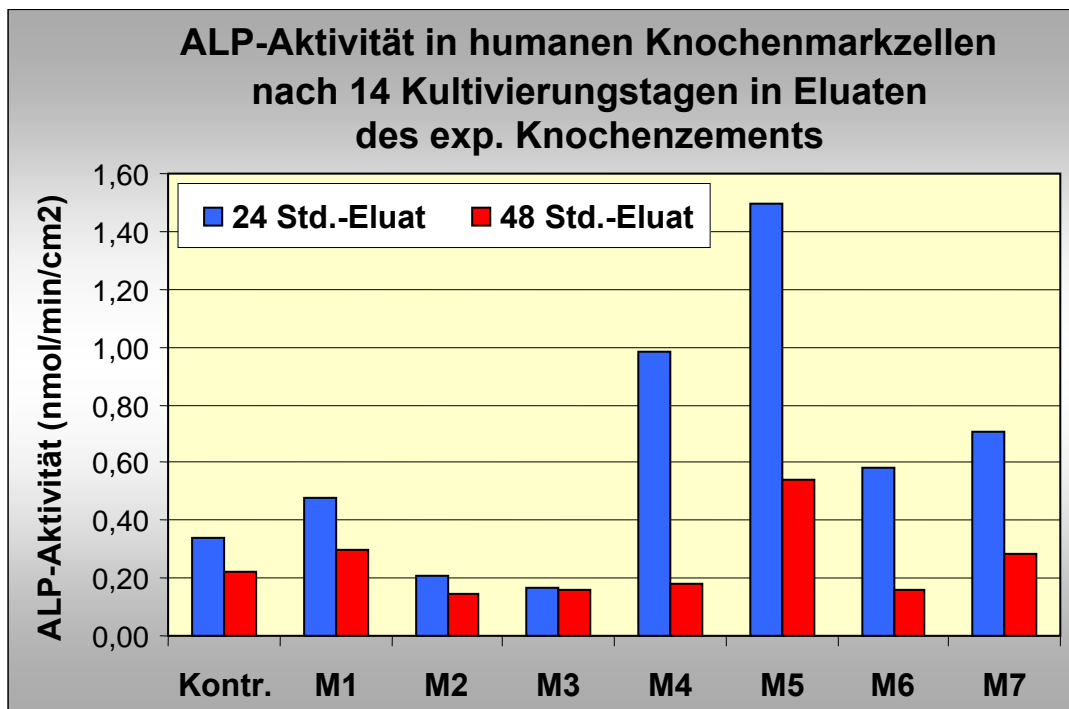


Abb. 25: ALP-Aktivität der primären humanen Osteoblasten nach einer 14-tägigen Kultivierung in 24h- bzw. 48h-Eluaten der PK M1-M7

Die Ergebnisse der ALP-Aktivität in den Zellen nach Kultivierung mit den Eluaten von M1-M7 sind aus Abbildung 25 zu entnehmen. Beim ALP-Test handelt es sich um einen Enzymaktivitätstest. Die Aktivität der AP ist ein Marker osteoblastärer Aktivität. Sind knochenartige Zellen vorhanden, steigt die ALP-Aktivität. Reduziert sich der Wert, so sind entweder nur noch wenige Zellen vorhanden oder die Zellen haben ihre osteoblastären Eigenschaften verloren.

Bei der Kontrolle war nach 48 Stunden ein leichter Abfall zu verzeichnen. Beim Ausgang (24h) zeigten M4 und M5 die höchste Aktivität. M1 entsprach nahezu der Kontrolle. M4 und M5 hatten insgesamt den größten Abfall zu verzeichnen. M2 und M3 blieben in ihren Werten während des gesamten Zeitraums nahezu stabil.

### 5.3.4.5. ALP-Aktivität (Direktauflagetest)

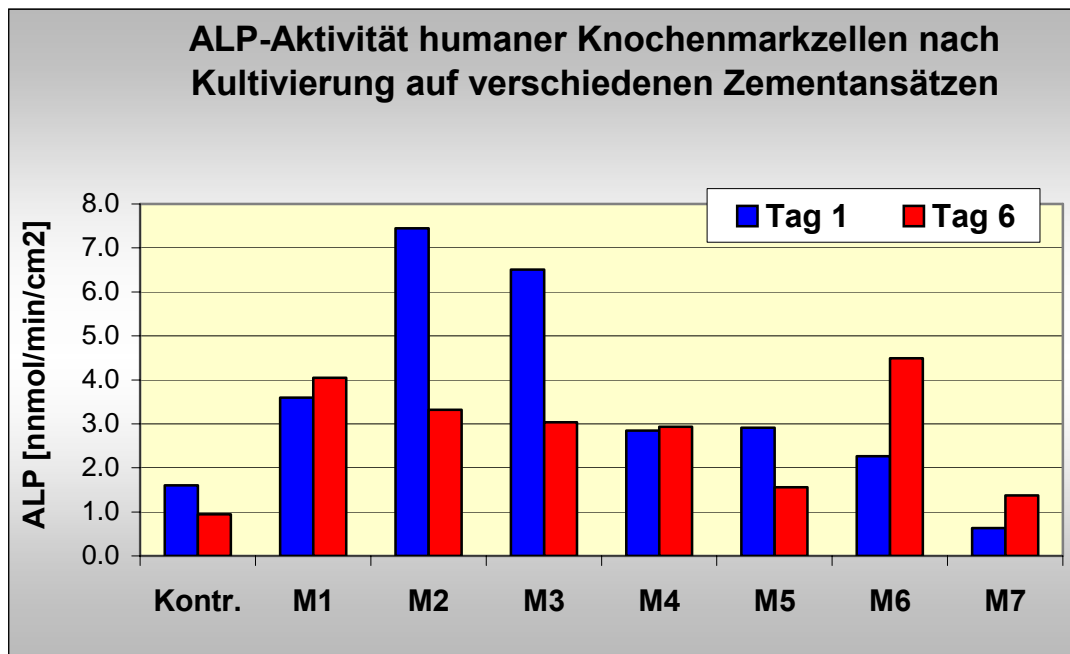


Abb. 26: ALP-Aktivität von primären humanen Osteoblasten nach einer 1- bzw. 6-tägigen Kultivierung mit ganzen PK (M1-M7)

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse des ALP-Testes von humanen Osteoblasten in direktem Kontakt mit den Probekörpern M1-M7 zusammengefasst.

Die Messung erfolgte nach einem Tag und nach sechs Tagen, jeweils unter gleichen Bedingungen. Bei der Kontrolle war nach sechs Tagen ein leichter Abfall erkennbar. M1, M4, M6 und M7 ließen über die gesamte Zeit einen Anstieg erkennen. Bei den übrigen Probekörpern war ein Abfall zu verzeichnen. Am deutlichsten war dieser bei M2 zu beobachten.

Bis hierhin wurden alle Untersuchungen an sieben verschiedenen Variationen des experimentellen Knochenzementes vorgenommen. Für weiterführende Testungen hinsichtlich der Biokompatibilität wurden, insbesondere aus Kostengründen und Zeitersparnis, drei favorisierte Varianten ausgewählt. Die Auswahl erfolgte aufgrund der bereits erbrachten Ergebnisse. Dabei wurden die werkstoffkundlichen Parameter, wie Biegebruchfestigkeit, Druckspannung und verarbeitungstechnische Vorteile, aber auch die vorangegangenen Biokompatibilitätstestungen beachtet.

Die Kombinationen M1, M3 und M4 sollten fortführenden Zytotoxizitätstests zugeführt werden. Die Variationen sind in Tabelle 10 zusammengefasst:



Tabelle 10: Zusammenfassung der Eigenschaften M1, M3 und M4

Experimenteller Knochenzement	Biegebruchfestigkeit	Druckspannung	ALP	abgestorbene Zellen	Porengröße ( $\mu\text{m}$ )	Verarbeitung
	( $\text{N}/\text{mm}^2$ ) 24h / 1Woche	( $\mu\text{m}$ ) 24h/1Woche				
M1	7 / 6	35 / 25	++	-	100-150	+++
M3	5 / 4.5	50 / 40	+	-	100-z.T.250	++
M4	6 / 6.5	35 / 25	+	--	50-z.T.300	++

Der Tabelle 10 sind die Durchschnittswerte als Ergebnisse der Biegebruchfestigkeit, der Druckspannung, des MTT-Tests, des ALP-Tests, die Anzahl der abgestorbenen Zellen, die Porengröße, sowie die Bewertung der Verarbeitbarkeit zu entnehmen.

#### 5.3.4.6. Zytotoxizitätstest mit Saos-2 –Zellen

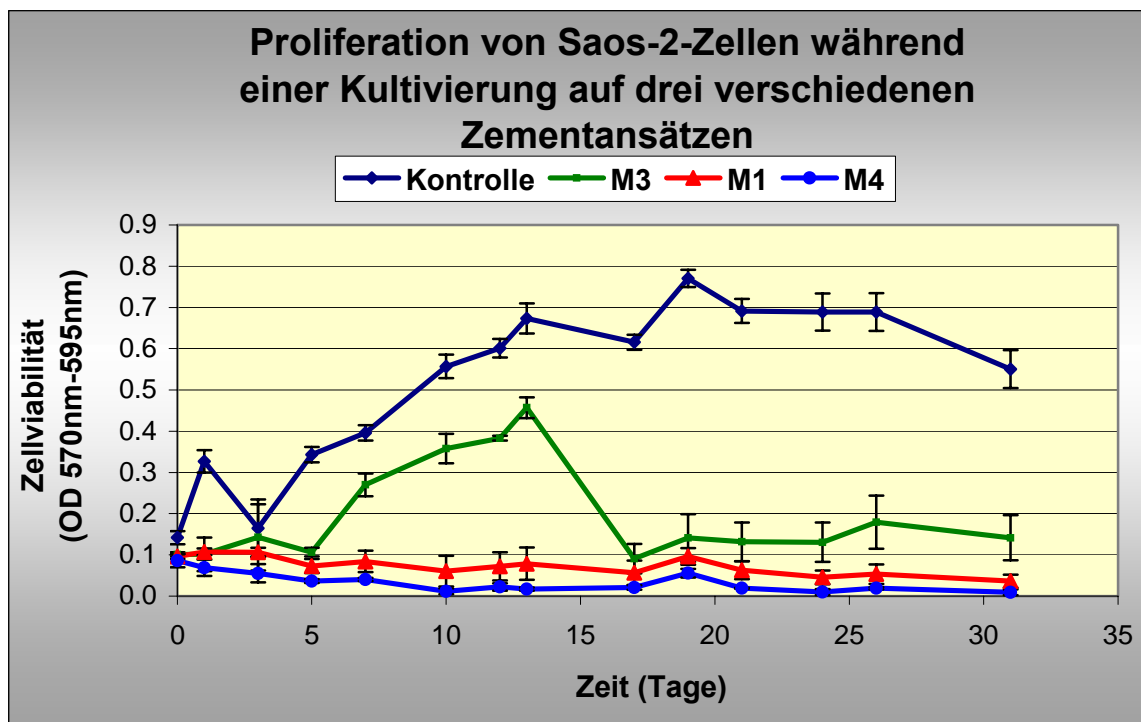


Abb. 27: Proliferationsverhalten von Saos-2-Zellen nach einer 31-tägigen Kultivierung auf den PK M1, M3 und M4

Der Abbildung 27 ist das Proliferationsverhalten der Saos2-Zellen, nach einer Co-Kultivierung mit M1, M3 und M4, zu entnehmen. Die Beobachtung erfolgte über einen Zeitraum von 31 Tagen. Bei der Kontrolle war zunehmendes Wachstum und die Ausbildung einer konfluenten Zellschicht zu erkennen. In Bezug zur Kontrolle änderte sich die Menge der zugesetzten Zellen bei M1 und M4 nur unwesentlich.

Über einen Zeitraum von 15 Tagen zeigte M3 einen der Kontrolle nahezu entsprechenden Wachstumsverlauf, wenn auch in der Anfangsphase von einer geringeren Zellzahl auszugehen ist. Es ist ein kontinuierlicher Anstieg zu verzeichnen. Am Tag 14 kam es zu einem deutlichen Abfall. Hierfür können verschiedene Faktoren verantwortlich sein.

Im Vergleich zur Kontrolle hatten die Zellen durch die eingebrachten Probekörper ein wesentlich geringeres Platzangebot. Durch die Oberflächenbeschaffenheit (Rauheit, Porosität) der Probekörper könnten Zellen in die Probekörper eingedrungen sein, bzw. unterhalb des Probekörpers nicht zur Untersuchung herangezogen werden und so das Ergebnis falsch negativ beeinflusst haben. Die Auslaugung des Materials übte möglicherweise ebenfalls einen Einfluss aus. Wie aus Abbildung 27 zu entnehmen ist, ist durchaus ein kontinuierliches Wachstum nachweisbar. Allerdings sind insgesamt weitere Untersuchungen erforderlich.

#### 5.3.4.7. Zytotoxizitätstest (Direktaufлагetest)

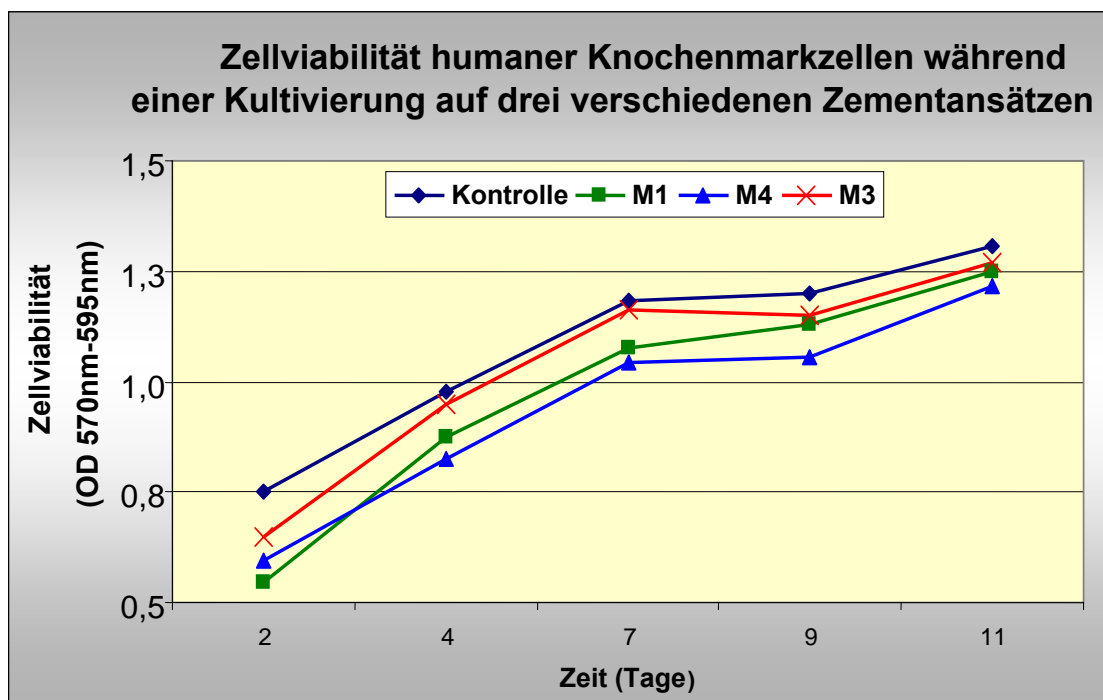


Abb. 28: Proliferationsverhalten von primären humanen Osteoblasten nach einer 11-tägigen Kultivierung auf den PK M1, M3 und M4

In der Abb. 28 ist der Wachstumsverlauf der Zellen, die subkonfluent ausgesät wurden dargestellt. Die eingebrachten PK's (M1, M3 und M4) bedeckten dabei 10% der Oberfläche. Es handelte sich um einen Direktaufлагetest.

Im direkten Vergleich mit der Kontrolle waren keine deutlichen Unterschiede erkennbar. Die Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von 12 Tagen.

Bei allen Variationen war ein kontinuierlicher Anstieg erkennbar. Das lässt auf Zellwachstum und keinerlei negative Beeinflussung der Osteoblasten durch die Probekörper schließen.

In den Abbildungen 29 bis 32 sind die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Ergebnisse des Direktaufagetestes dargestellt. Der dunkle Schatten an der oberen bzw. unteren Bildkante ist der Probekörper. Bei allen Variationen ist Zellwachstum bis dicht an den Probekörper heran zu beobachten. Es zeigen sich sogar vereinzelt „Knochenknötchen“, welche die Vorstufe der eigentlichen Knochenbildung darstellen.

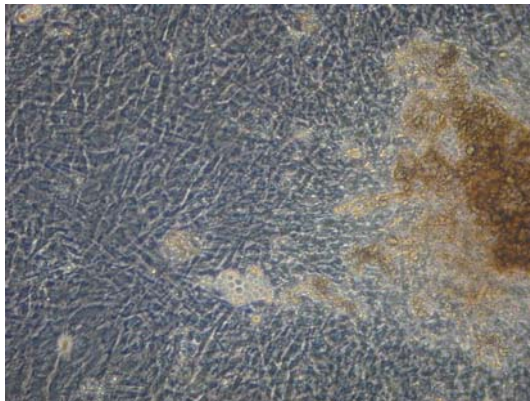
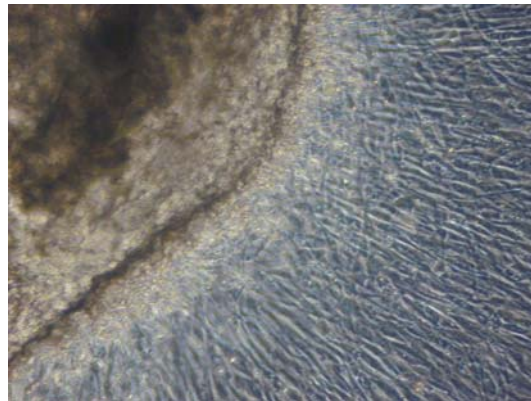


Abb. 29 : Kontrolle (20-fach)



In Abbildung 29 ist deutlich ein konfluenter Zellrasen mit der Ausbildung von sog. „Knochenknötchen“ als Zeichen der Vorstufe der Knochenbildung zu sehen.

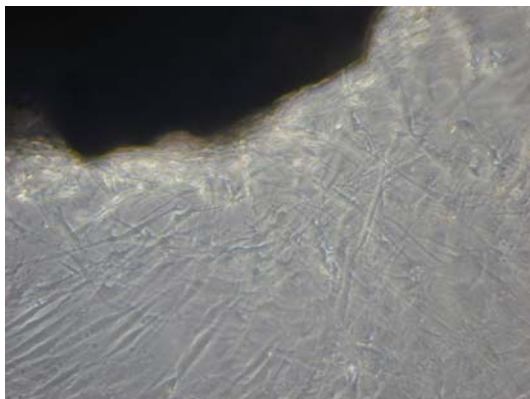
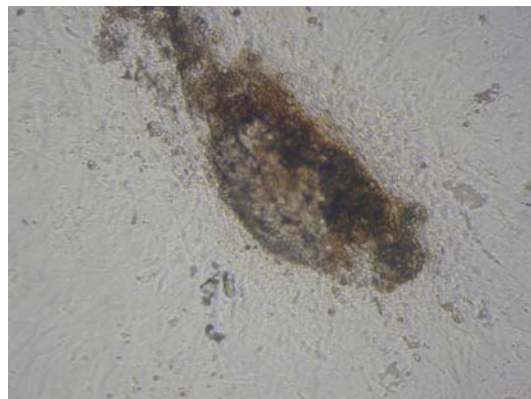
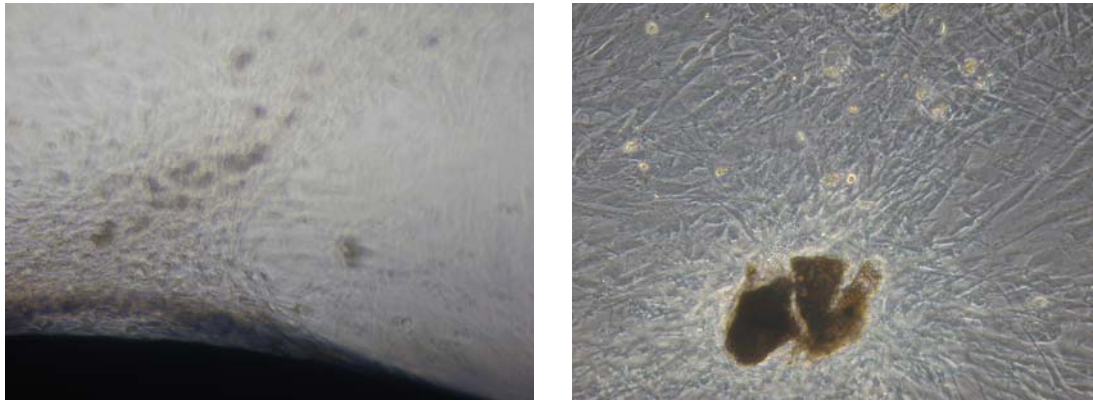


Abb. 30: M1(20-fach)/Ostnodule

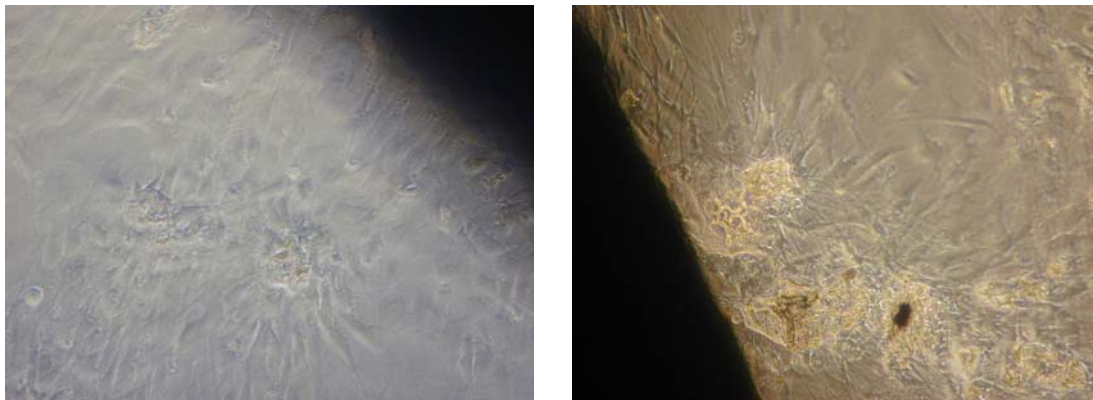


Hier kann ein dichtes Zellwachstum bis an den Rand des Probekörpers M1 (dunkler Schatten, links oben im Bild) beobachtet werden. Etwas weiter vom Probekörper entfernt, in der selben Variante, ist auch hier die Vorstufe der Knochenbildung rechts im Bild erkennbar.



**Abb. 31: M3 (20-fach)/Ostnodule**

Die Abbildung 31 lässt ebenfalls Zellwachstum bis dicht an den Probekörper M3 (dunkler Schatten, links unten im Bild) erkennen. Ein „Knochenknötchen“ in derselben Variante zeigt auch hier die Vorstufe der Knochenbildung und gutes Zellwachstum.



**Abb. 32: M4 (20-fach)/Ostnodule**

Die Abbildung 32 zeigt gleichermaßen dicht bis an den Probekörper M4 (dunkler Schatten rechts oben und links unten) heran, dass Zellwachstum stattfindet. In der rechten Abbildung kann die Ausbildung der „Knochenknötchen“ bis dicht an den Probekörper heran, erkannt werden.

### 5.3.5. Fluoreszenzmikroskopieauswertung

Die Probekörper M1, M3 und M4 wurden über einen Zeitraum von fünf Wochen mit Zellen inkubiert. Um die Biokompatibilität nachzuweisen, wurden die Probekörper entsprechend den Herstellerangaben für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

Die adhärirten Zellen können als Zeichen für die Biokompatibilität angesehen werden. Durch die Doppelfärbung von F-Aktin (rot) und Kernen (blau), können die Zellbestandteile sichtbar gemacht werden. Sind derartige Farbanteile vorhanden, kann von Zellkernen und Aktinskelett, als Viabilitätsmerkmal ausgegangen werden. Die Probekörper der Variationen M1, M3 und M4 wurden fluoreszenzmikroskopisch bewertet.

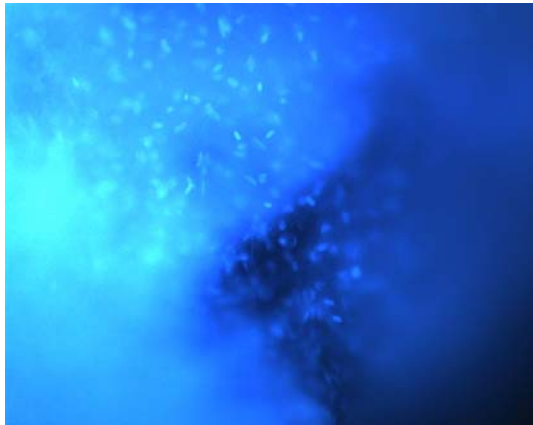


Abb. 33: M1 Zellkerne



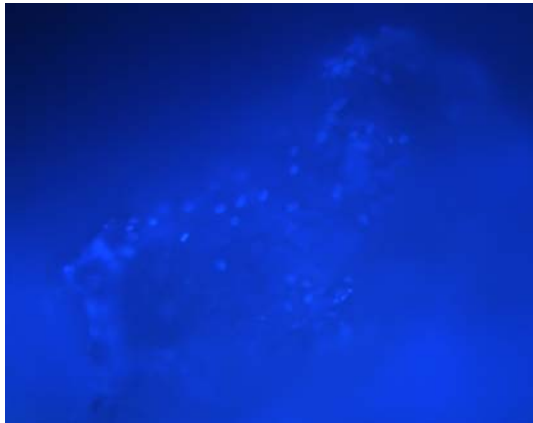
Abb. 34: M1 Aktinskelett

Die Abbildung 33 lässt als absolutes Viabilitätsmerkmal sehr gut die leuchtend royalblau/violett dargestellten Zellkerne erkennen. Das Aktinskelett ist als spinnwebartige, purpurrote Struktur in Abbildung 34 zu sehen. Hierbei handelt es sich um die fluoreszenzmikroskopische Darstellung von M1.

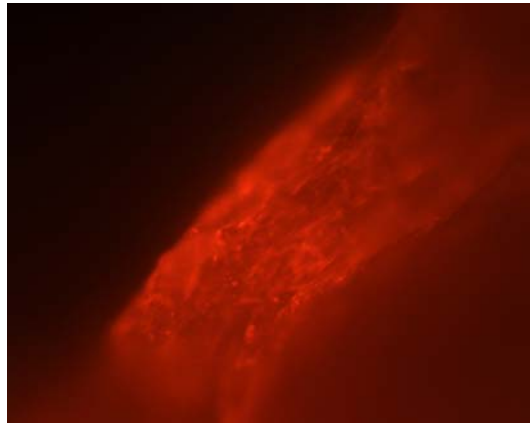


Abb. 35: M1

Die Abbildung 35 zeigt leuchtend-grün ebenfalls die Zellkerne von M1.



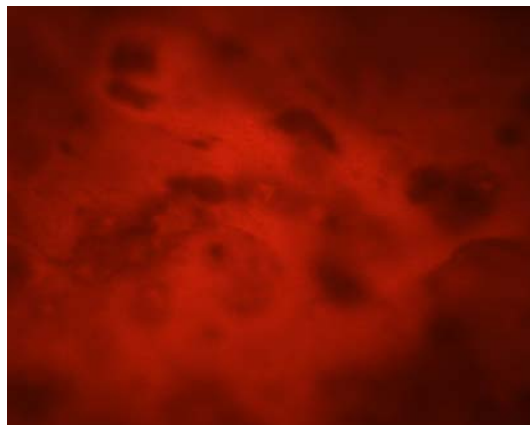
**Abb. 36: M3 Zellkerne**



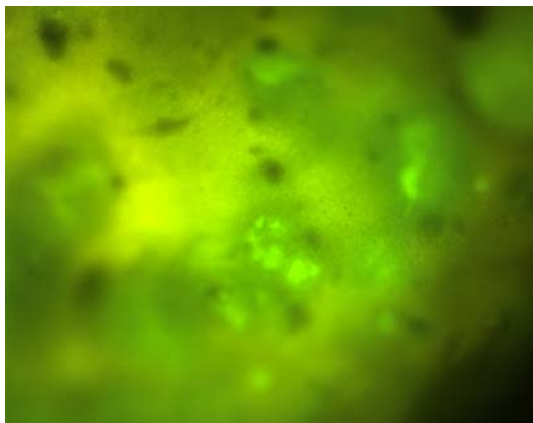
**Abb. 37: M3 Aktinskelett**



**Abb. 38: M4 Zellkerne**



**Abb. 39: M4 Aktinskelett**



**Abb. 40: M4**

Bei allen Variationen sind Zellkerne (royalblau/violett bzw. leuchtend-grün) und ein mehr oder weniger stark ausgebildetes Aktinskelett (purpurrot) sichtbar. M1, M3 und M4 sind ähnlich zu bewerten.