

4. Material und Methoden

Die Grundkomponenten des zu entwickelnden Zementes sind unterschiedlicher chemischer Struktur. Basierend auf den Ergebnissen von Drews [24] konnten weiterführende Versuche auf dem darin beschriebenen Mischungsverhältnis zwischen Feststoffen und Polymeransatz durchgeführt werden. Der Polymeransatz wurde ebenfalls in seiner Zusammensetzung verändert.

Die Weiterentwicklung mit den daraus resultierenden Versuchen ist notwendig, da die Verarbeitbarkeit bis heute nicht zufriedenstellend den Anforderungen eines einsetzbaren Knochenzementes entsprechen. Die Konsistenz der angerührten Masse muss cremig, das heißt die Komponenten müssen leicht mischbar sein. Die Verarbeitungszeit (Topfzeit) soll lang genug sein, sodass ausreichend Zeit zur Verfügung steht, die Komponenten vollständig miteinander zu mischen, die chemische Reaktion einzuleiten und um den Zement an die entsprechende Stelle applizieren zu können.

Die Verarbeitbarkeit ist an die Anwendungsbedingungen gebunden und kann unter anderem durch die Zusammensetzung und die Rührtechnik eingestellt werden.

4.1. Grundkomponenten des experimentellen Knochenzementes

Der zu prüfende Zementansatz besteht aus einer Flüssigkomponente und einem Feststoffanteil. Im Hinblick auf eine gewebe- und anwenderfreundliche Zusammensetzung und daraus resultierende günstige Verarbeitungsmöglichkeiten, wurde der Lösungsmittelansatz modifiziert.

Acetessigsäureethylester (AEE) als alleinige Trägerkomponente reichte jedoch nicht aus, sodass der Einsatz von 96%igem Ethanol (EtOH) als weitere flüssige Lösungsmittelphase erfolgte. Damit war es möglich, eine gleichermaßen klare, durchscheinende, honigartige sowie klebrige Konsistenz des Polymeransatzes zu erreichen.

Die Flüssigkomponente stellt hierbei das säurezahlmodifizierte (SZ62) PMMA als Pulverzusatz gelöst in einem Gemisch aus AEE und 96%igem EtOH dar.

Der Pulveranteil beträgt hierbei 30%. AEE und 96%iges EtOH stehen im gleichen Verhältnis zueinander. Die Flüssigkomponente variiert hinsichtlich ihrer Zusammensetzung nicht.

Die Feststoffkomponente besteht aus Biokeramiken und weiteren Zusätzen. Die Feststoffkomponente variiert und ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

Polymer	→ mod. PMMA (SZ62)
Lösungsmittel	→ AEE + (EtOH) 96%
Zusätze	→ Keramiken: GB14, Tetracalciumphosphat (TETRA) → CZP Calciumzirkonphosphat ($\text{CaZr}_4(\text{PO}_4)_6$), Zinkoxid (ZnO), Titandioxid (TiO_2), Natriumfluorid (NaF)

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Feststoffkomponenten

Probenansatz	Flüssigkomponente PMMA-KSM Pulver (30%-Ansatz gelöst i. AEE und 96%iges EtOH)	GB14 50- 200 μm	TETRA 90-160 μm	CZP 3.12 μm	CZP 2.24 μm	ZnO	NaF	TiO ₂
M1	x	x	x	x		x		
M2	x	x	x	x				
M3	x	x	x		x			
M4	x	x	x			x		x
M5	x		x			x		x
M6	x	x		x		x		x
M7	x	x		x		x	x	x

4.1.1. säurezahlmodifiziertes Polymethacrylat (PMMA)

Das Polymer des Methacrylsäuremethylesters (PMMA) ist ein durchsichtiges, farbloses, festes Produkt. Sein spezifisches Gewicht beträgt $1,1 \text{ g/cm}^3$. Da PMMA nur 2% Wasser bis zu seiner Sättigung aufnimmt, verändert sich die Form bei Wasserlagerung nur unwesentlich. Weiterhin weist es eine hohe Beständigkeit gegenüber Säuren und Laugen auf [29].

Für die Untersuchungen stand ein durch Co-Polymerisation aus MMA und Ethylmethacrylat (EMA) hergestelltes säurezahlmodifiziertes PMMA (PMMA SZ62) zur Verfügung [18].

In der Polymerkette ist eine variable Anzahl von Carboxylgruppen vorhanden, die als SZ beschrieben werden.

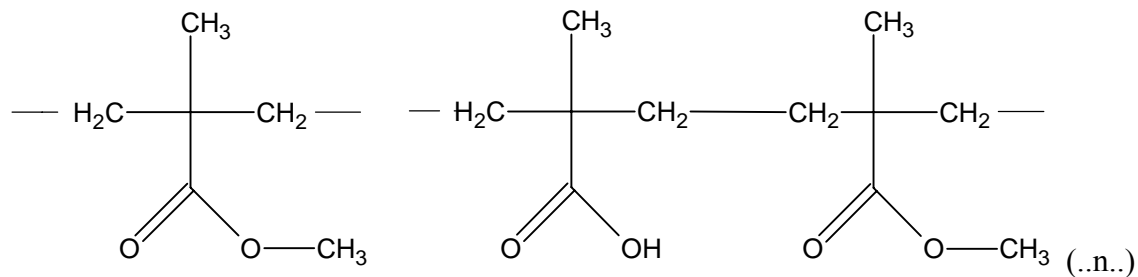


Abb. 3: Strukturformel PMMA und Summenformel SZ-modif. PMMA

SZ-modifiziertes PMMA enthält durch die Carboxylgruppen negative Ladungsschwerpunkte. Es handelt sich um ein Polymerisat. So kann die durch Polymerisation bedingte Schrumpfung bei der Zementherstellung vernachlässigt werden. Allerdings muss das Material in einem Lösungsmittel gelöst werden [13].

4.1.2. Lösungsmittel

4.1.2.1. Acetessigsäureethylester (AEE)

AEE ist auch unter der Bezeichnung Acetessigester bekannt. Es handelt sich um eine beständige Flüssigkeit mit großer Bedeutung in seiner Eigenschaft als Lösungsmittel. Es kann einerseits durch die *Claisen*-Kondensation von Essigsäureethylester, andererseits durch die Addition von Ethanol an Diketen gewonnen werden.

AEE ist farblos, flüssig und hat einen angenehmen apfelartigen Geruch. Der Siedepunkt liegt bei 180,4°C. AEE ist in Wasser kaum lösbar, ist jedoch mit einer Mehrzahl von organischen Lösungsmitteln mischbar. Die Löslichkeit in Wasser beträgt 125g/l bei 16°C (Hoechst AG 1994).

Zur Toxikokinetik und zum Metabolismus von AEE sind nur wenige Daten vorhanden. Es kann angenommen werden, dass der Ester vom Körper aufgenommen wird und dann durch Esterasen zu einem erheblichen Teil in Acetessigsäure und Ethanol gespalten und letztlich zu Kohlendioxid (CO₂) und Wasser verstoffwechselt wird. Toxische Wirkungen sollten, wenn überhaupt, vom ungespaltenen Ester oder aber von sehr hohen Dosen des Stoffes ausgehen. Da die bei der Spaltung des Esters entstehenden Ethanolmengen bei mäßiger Exposition mit AEE weit unterhalb des toxischen Bereiches für Ethanol liegen und AEE das natürliche Zwischenprodukt des normalen Fettsäureabbaus ist, kann AEE als toxisch irrelevant angesehen werden [42].

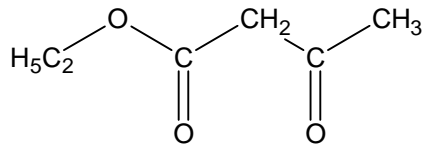


Abb. 4: Strukturformel von AEE [37]

4.1.2.2. Ethanol (EtOH)

Alkohol ist ein Detergenzium. Es besteht sowohl zu Wasser als auch zu Fetten eine Affinität. Für die Untersuchungen wurde 96%iges EtOH verwendet. Es handelt sich um eine leicht flüchtige, durchsichtige und klare Flüssigkeit. EtOH ist als Endprodukt der alkoholischen Gärung allgemein bekannt. Der Siedepunkt liegt bei 78 °C.

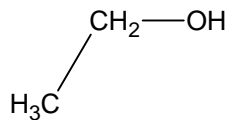


Abb. 5: Strukturformel von EtOH

Tabelle 4: Lösungsmittelvergleich von AEE und EtOH

	AEE	EtOH
Summenformel	CH ₂ -CO-CH ₂ -COOC ₂ H ₅	C ₂ H ₅ -OH
Siedepunkt K in °C	180.4	78
Löslichkeit in Wasser	schwer löslich	löslich
Viskosität	mittel	niedrig
Dichte ρ in g/l	1.02	>1

4.1.3. Zusätze

4.1.3.1. Keramiken

Keramiken sind nichtmetallische anorganische Werkstoffe. Aufgrund der Vielzahl der Neuentwicklungen bleibt die Definition sehr allgemein. Dentalkeramische Massen zählen mit wenigen Ausnahmen zu den Materialien im herkömmlichen Sinne (Porzellane, Töpfereiprodukte) [69]. Keramische Massen haben sich über Jahrzehnte klinisch und materialtechnisch in der Medizin und Zahnmedizin bewährt. In der Medizin findet sich eine Vielzahl von Anwendungen, beispielweise als Formkörper, wie künstliche Hüftgelenkspfannen bzw. -köpfe oder als Füllstoff in Pulver- oder Splitterform. Im zahnmedizinischen Bereich spielen (voll)-keramische Restaurationen aufgrund ihrer

unübertroffenen Ästhetik und Haltbarkeit beispielsweise in Form von Kronen, Teilkronen, Inlay- oder Brückenkonstruktionen eine bedeutende Rolle. Die Bioverträglichkeit der keramischen Massen steht inzwischen außer Frage [22, 71, 88].

Für die Untersuchungen standen zwei verschiedene Keramiken zur Verfügung. Hierbei handelte es sich um Tetracalciumphosphat (TETRA) und die bioaktive Glaskeramik GB14 (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Summenformeln der eingesetzten Biokeramiken

Keramik	Summenformel
Tetracalciumphosphat (TETRA)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3\text{O}$
GB14 Ca-lässige Glaskeramik	$\text{Ca}_2\text{NaK}(\text{PO}_4)_2$

4.1.3.1.1. Tetracalciumphosphat (TETRA)

TETRA ist in Wasser schwer löslich, wird jedoch langsam unter Bildung von HA zersetzt [19]. Wird TETRA mit Phosphorsäure gemischt, entsteht ebenfalls HA. HA ist der anorganische Bestandteil von Knochen und Zähnen [17].

TETRA findet ebenfalls Anwendung als Füllmaterial für Knochendefekte und Knochentaschen [56]. Es ist biokompatibel und osteoinduktiv [111].

4.1.3.1.2. GB14

GB14 ist ein bioaktives Knochenersatzmaterial, das zügig resorbiert werden kann [8]. Auf der Grundlage der raschen Resorption wird von einem schnellen Um- bzw. Einbau des Hartgewebematerials in den Knochen und einem natürlichen und stabilen Verbund zwischen Implantat und Knochen ausgegangen. Nach Implantation in das Gewebe zeigt GB14 eine gute Gewebsverträglichkeit [8].

4.1.4. weitere anorganische Zusatzkomponenten:

4.1.4.1. Zinkoxid (ZnO)

ZnO wird durch die Verbrennung von metallischem Zink hergestellt. Reines ZnO ist ein feines, weißes Pulver [95]. Wird ZnO erhitzt, so färbt es sich reversibel gelb [84]. ZnO findet allgemein Verwendung z.B. als Beschwerungsmittel für Weichgummi und als Füllstoff und

Pigment für Malerfarben [45]. Im medizinischen Bereich wird ZnO bei der Salbenherstellung und als Streumittel verwendet [6, 43]. In Wasser ist ZnO praktisch unlöslich [19], bei Raumtemperatur werden nur 0.00016g/l gelöst [36].

In der Zahnmedizin findet ZnO ebenfalls Anwendung. Hierbei als provisorisches Verschluss-, Unterfüllungs-, Aufbau-, sowie Befestigungsmaterial und auch, wenn heutzutage seltener, als Material für indirekte Überkappungen in Form einer Zinkoxid-Eugenol-Anmischung [10, 70]. ZnO wird wie Aluminiumoxid (Al_2O_3) und Magnesiumoxid (MgO) als Komplexbildner, Netzworkebildner oder als Zwischenoxid bezeichnet [86].

Für die Hydrophilie und die damit verbundene Wasserempfindlichkeit sind die im Polymeransatz in einer Vielzahl vorhandenen polaren Gruppen verantwortlich [32]. Werden oxidische Pigmente eingesetzt, ist es möglich, die polaren Gruppen zu binden und damit die Hydrophilie der Polymermatrix herabzusetzen. Funke et al. setzen ZnO als aktives Pigment ein, um dieses Ergebnis zu erreichen [33]. ZnO reagiert mit den sauren Gruppen der Matrix unter Bildung unlöslicher Zinksalze und so entsteht eine wasserbeständige Verbindung.

4.1.4.2. Calciumzirkonphosphat (CZP)

CZP ist ein pulverförmiger, fester, weißer Stoff. Es wurde als Röntgenopaker ausgewählt. Damit soll bei radiologischen Kontrollen ein entsprechender Kontrast erreicht werden.

4.1.4.3. Titandioxid (TiO_2)

Bei TiO_2 handelt es sich um eine pulverförmige, chemisch sehr stabile Verbindung. Diese wird als biologisch unbedenklicher Füllstoff eingesetzt.

4.1.4.4. Natriumfluorid (NaF)

Der Einsatz von NaF hat folgenden Hintergrund. Fluorid (F^-)-Ionen, die in wässrigen Elektrolyten entstehen, können die TiO_2 -Schichten auf der Implantatoberfläche anlösen und damit die Haftung verbessern. Möglicherweise könnte die Einlagerung bei der HA - Bildung erfolgen und so der Knochen stabilisiert werden.

4.2. Vorversuche

4.2.1. Mischungsverhältnisse

Das Mischen zählt zu den mechanischen Grundoperationen des Vereinigens von Stoffen mit dem Ziel des gleichmäßigen Vermengens verschiedener Stoffe unter Einwirkung mechanischer Werkzeuge [105].

Für die Qualität des Endproduktes sind die Ausgangsstoffe der limitierende Faktor. Die Ausgangsstoffe müssen das gegenseitige Ineinanderdringen ermöglichen. Dabei handelt es sich um ein disperses System:

- disperse Phase (verteilt vorliegender Stoff; im Fall einer Lösung das Gelöste)
- Dispersionsmittel (Mittel, in welchem die disperse Phase verteilt vorliegt; im Fall einer Lösung das Lösungsmittel) [39].

Abweichend von der bei Drews [24] verwendeten Flüssigkomponente, kamen AEE und 96%iges EtOH als Lösungsmittel zur Anwendung. Mit beiden Lösungsmitteln wurde ein 30%iger Polymeransatz angemischt. Dabei standen die Komponenten in folgendem Verhältnis:

Tabelle 6: Komponentenverhältnis PMMA SZ62 - AEE - 96%iges EtOH

Komponente	Anteil
PMMA-KSM-Pulver (SZ62)	24g
AEE	28ml
EtOH (96%ig)	28ml

Das Verhältnis von AEE zu 96%igem EtOH beträgt 1 : 1.

Der anfangs eher klumpig wirkende Ansatz entwickelte sich innerhalb von 24 Stunden zu einer viskösen, durchscheinenden, honigartigen Flüssigkeit. Dabei war es erforderlich, den

Ansatz über die gesamte Zeit in Bewegung zu halten. Mit Hilfe eines Schüttelautomaten, in welchem das Gefäß sicher eingefasst wurde, konnte dies optimal erreicht werden.

Versuche, die Flüssigkomponente hinsichtlich ihres Alkoholgehaltes, bzw. der prozentualen Verhältnisse zwischen den einzelnen Komponenten zu variieren, zeigten im Vorfeld keine Verbesserungen der Verarbeitungseigenschaften. Durch EtOH als zusätzliches Lösungsmittel können die Eigenschaften, entsprechend der eingangs erwähnten Anforderungen, zufriedenstellend eingestellt werden. Der o.g. Ansatz stellte somit die Ausgangsbasis dar.

4.2.2. Portionieren der Komponenten

Das Auswiegen der festen Komponenten erfolgte mit der elektronischen Laborwaage vom Typ Sartorius mit einer Genauigkeit von $\pm 1\mu\text{g}$. Die Flüssigkomponenten wurden mit Messzylindern abgemessen.

Der angemischte Polymeransatz wurde für die Versuche mit einer Kunststoffspritze, mit einer Skaleneinteilung von 0,1 – 2,0ml portioniert.

4.2.3. Probekörperform

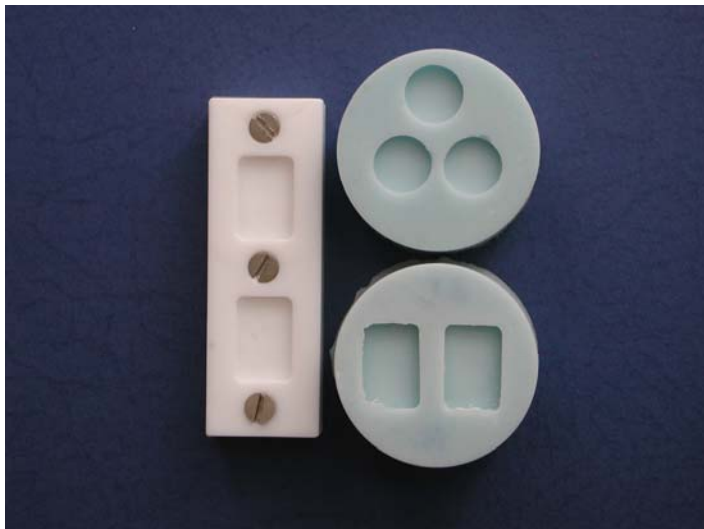


Abb. 6: verwendete Teflonform/Silikonformen

Die in Abb. 6 dargestellte Teflonform -weiß- (Abmessung: 15,3mm x 10,3mm x 2,0mm) wurde zur Probekörperherstellung für die Biegebruchfestigkeitsuntersuchungen verwendet. Alternativ wurden Silikonformen -blau- mit den gleichen Abmessungen verwendet. Die in Abb. 6 dargestellte Silikonform eignete sich ebenfalls sehr gut zur Probekörperherstellung, da

die zu untersuchenden Probenansätze im gemischten Zustand von beiden Materialien nicht gebunden werden, und sich so leicht aus den Formen lösen lassen. Die Abmessungen entsprechen denen der Teflonform. Der Vorteil der Verfahrensweise bestand in der einheitlichen Größe aller Proben und der damit erreichbaren Vergleichbarkeit im Dimensionsverhalten. Durch die Wahl der eckigen Probenformen konnte das Dynstat-Meßgerät für den Vier-Punkt-Biegeversuch eingesetzt werden.

4.2.4. Probekörper



Abb. 7: fertige Probekörper

Dargestellt sind die fertigen Probekörper. Die eckigen Probekörper mit den o.g. Abmessungen wurden für die Biegebruchfestigkeitstestungen und nach deren Bruch für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verwendet. Die runden Probekörper wurden für die Zellkulturtestung benutzt.

4.2.5. Umgebungsbedingungen

Alle Versuche fanden unter Normalbedingungen statt. Die Raumtemperatur lag bei 23°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

4.3. Biegeprüfung im Dynstat-Gerät (DIN 51453)

Alle Werkstoffe müssen bei Belastung verschiedenen Kräften standhalten. Man kann diese nach Zug, Druck und Biegung unterscheiden. Dabei stellt die Biegung eine Kombination von Zug- und Druckspannung dar.

Zur Ermittlung der Biegebruchfestigkeit eines Probekörpers, wird dieser mit kontinuierlich steigender Kraft bis zum Bruch gebogen. So beeinflusst nicht nur die Werkstoffgruppe, sondern auch die Oberflächenbeschaffenheit die Biegebruchfestigkeit. Ein Bruch ist eine makroskopische Trennung des Körpers als Folge der Überwindung der Bindungskräfte zwischen den Atomen, Ionen oder Molekülen [12].

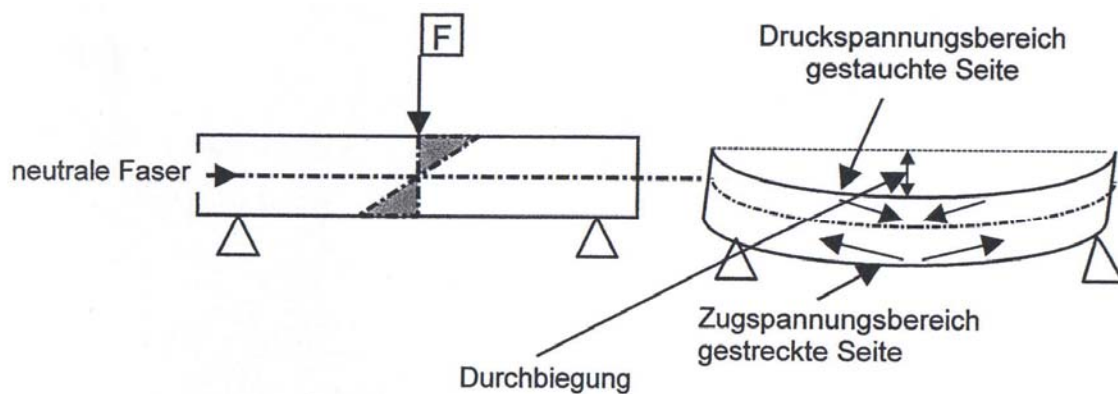


Abb. 8: Durchbiegung eines Werkstoffes

4.3.1. Probekörper

Das Pulver und die Flüssigkomponente werden auf einer Glasplatte angemischt. Zum Vermischen wurde ein Kunststoffspatel verwendet. Zunächst wurde der Pulveranteil sorgfältig miteinander vermengt. Bei allen Versuchen wurde das Pulver wie geliefert verwendet. Anschließend wurde der Pulveranteil schrittweise in den Polymeransatz gerührt. Das geschah durch zunächst kreisende und anschließend ausstreichende Bewegungen mit einem Spatel. Die Mischzeit betrug für alle Proben zwischen 20s und 30s.

Das angemischte Material hatte dabei jeweils eine cremig-klebrige Konsistenz. Das Einbringen in die Formen geschah pro Prüfkörper in mehreren Portionen. Leichte Überschüsse konnten mit einem mit Aqua bidest. befeuchteten Spatel abgestrichen werden. Die Probenoberfläche war glatt, jedoch nicht ganz eben.

Mit der Prüfkörperform war es möglich, gleichzeitig zwei Probekörper herzustellen. Zum Abbinden wurden die so vorbereiteten Anmischungen in 37°C Aqua dest. gelagert. Bereits nach 10 min zeigte sich bei allen Probekörpern eine Initialfestigkeit und Formstabilität. Nach 15 min konnten die Probekörper aus der Form entfernt werden.

4.3.2. Probenkontrolle

Die weitere Lagerung der Probekörper erfolgte unter den o.g. Bedingungen. Eventuell vorhandene Grate wurden vor der weiteren Prüfung mit einem Metallspatel entfernt.

Alle Prüfkörper wurden auf äußerliche Unregelmäßigkeiten wie Verunreinigungen, Blasen, Risse, Beschädigungen oder Porositäten untersucht. Fehlerhafte Probekörper wurden verworfen.

4.3.3. Dynstat-Gerät

Das Dynstat-Gerät (nach Schob, Nitsche und Salewski) wurde für den Biegeversuch herangezogen [83]. Der Biegebruchversuch mit dem Dynstat-Gerät ist ein Vier-Punkt-Biegeversuch. Der Prüfkörper wird zwischen den Biegeauflagen und dem Biegeschneider so gestellt, dass er im Belastungs Augenblick von vier Kraftangriffsstellen belastet wird [1]. Die größte Durchbiegung wird in der Mitte zwischen den Angriffspunkten gemessen.

Die Aufbringung der Biegebelastung auf die Probe erfolgt im Dynstat-Gerät durch das Auslenken eines Pendelgewichtes. Dabei bilden Probekörper und Pendel im unbelasteten Zustand eine senkrechte Achse. Mit zunehmender Auslenkung des Pendelgewichtes erfolgt die Biegebelastung des Probekörpers als Bindeglied zwischen Pendel und Antriebswelle. Die Belastung erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 15°/min. Das Biegemoment wird durch einen Schleppzeiger markiert. Das Biegemoment kennzeichnet den Wert, bei welchem der Probekörper nach einer gewissen Durchbiegung zerbricht.

Das Biegemoment (M_b) wird in Joule [Nm] abgelesen. Ein Joule ist die Arbeit, die verrichtet wird, wenn sich der Angriffspunkt einer Kraft von 1 N in Richtung der Kraft um 1 m verschiebt. Die Dimension der Biegebruchfestigkeit ist N/mm^2 .

4.3.4. Biegebruchfestigkeit

Der Wert der Biegebruchfestigkeit vergleicht zwei mechanische Momente im Augenblick des Bruchereignisses. Es wird das Biegemoment (M_b), das von außen durch das Prüfgerät auf den Probekörper aufgebracht wird, mit dem Widerstandsmoment (W), das der Probekörper durch den Querschnitt seiner geometrischen Form entgegensetzt, verglichen.

4.3.4.1. Biegemoment

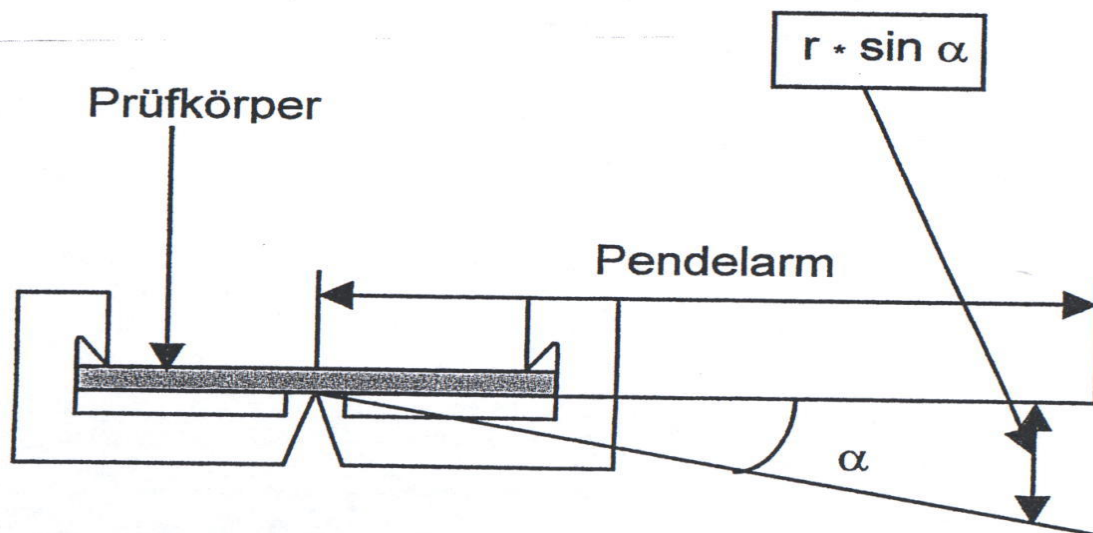


Abb. 9: Ansicht des eingespannten Prüfkörpers

$$M_b = G \cdot r \cdot \sin \alpha$$

G = Pendelgewicht in kg

r = Pendellänge in mm

α = Pendelwinkel

Unter Berücksichtigung des Pendelgewichtes kann der Wert des Biegemoments direkt auf der Skala des Dynstat-Gerätes abgelesen werden.

4.3.4.2. Widerstandsmoment (W)

Das Widerstandsmoment eines Prüfkörpers wird wesentlich von dessen Querschnittsgestaltung bestimmt. Für rechteckige Querschnitte gilt:

$$W = \frac{h^2 \cdot b}{6}; \quad h = \text{Höhe des Probekörpers [mm]} \\ B = \text{Breite des Probekörpers [mm]}$$

Die Biegebruchfestigkeit stellt die mechanische Spannung (Kraft/Fläche) dar und ergibt sich als Quotient aus Biegemoment und Widerstandsmoment, dabei gibt der Index „b“ die Belastungsrichtung (b = biegend) und der Index „B“ das resultierende Ergebnis (B = Bruch) an [73].

$$\sigma_{bB} = \frac{\text{Biegemoment}}{\text{Widerstandsmoment}} = \frac{M_b}{W} = \frac{M_b}{(h \cdot b)/6}$$

4.3.4.3. Probekörper

Von jeder zu untersuchenden Materialkombination wurden 10 Probekörper hergestellt. Alle Probekörper wurden 24 Stunden und eine Woche in Aqua bidest. bei 37°C gelagert. Die Lagerung bei 37°C sollte die natürlichen Bedingungen simulieren. Herstellung und Lagerung aller Prüfkörper erfolgten unter gleichen Laborbedingungen.

Da die Biegebruchfestigkeit von Oberflächendefekten abhängig ist [34] wurden bei allen Probekörpern die Oberflächen mit 1000er-Siliziumcarbon (SiC)-Schmirgelpapier geglättet. Die Höhe und Breite zur Berechnung des Widerstandsmomentes wurden mit einer elektronischen Mikrometerschraube auf 0,01mm gemessen. Alle Prüfkörper wurden erst unmittelbar vor der Prüfung vermessen.

4.4. Druckspannung/Härte

Die Härte ist definiert als der Widerstand, den ein Körper dem Eindringen eines anderen, härteren entgegensetzt. Die älteste Härteprüfmethode, ist die nach *Mohs* (Ritzhärte).

Am gebräuchlichsten sind heute Eindruck-Härteverfahren, bei denen als Maß für die Härte die bleibende Verformung in der Materialoberfläche genommen wird, die ein Prüfkörper in

festgelegter Zeit bei bestimmter Belastung erzeugt [28]. Dafür werden unterschiedliche Eindringkörper für verschiedene Prüflasten verwendet, die abhängig von Härte, Größe und Struktur der Probe sowie der Messbarkeit des Eindrucks gewählt werden. Aufgrund der Form und der geringen Größe von (zahn)–ärztlichen Werkstücken, werden kleine Lasten bevorzugt. Die Eindruckhärteprüfung erlaubt eine weitgehend zerstörungsfreie Bestimmung der Festigkeit an der Oberfläche der Materialien.

Die Bewertung der Härte erfolgt anhand der Tiefe des Eindruckes. Damit eine Vergleichbarkeit der Werte gewährleistet werden kann, wird die aufgewendete Kraft (F) mit der Fläche (A_0) des hinterlassenen Eindrucks ins Verhältnis gesetzt.

$$\text{Härte} = F \text{ [N]} / A_0 \text{ [mm}^2\text{]}$$

Somit stellt der Härtewert eine Druckgröße dar, d.h. je größer dieser Wert, desto größer ist der Widerstand des Werkstoffes.

Für die Prüfung wurde das Kegelfließpunktmessgerät (MLW Prüfgerätewerk Medingen) verwendet. Dieses Gerät funktioniert nach den Hebelgesetzen, wobei durch Gewichte an einem Hebelarm ein Eindringkörper mit definierter Oberfläche einen Druck auf den zu testenden Werkstoff, in einer definierten Zeit, ausübt.

Der Druckstempel hat einen Durchmesser (d) von 1,95mm. Es handelt sich hierbei um einen Stahlzylinder. Die Gewichte wurden variiert. Bei der ersten Messung wurde ein 0,75kg-Gewicht verwendet, bei der zweiten Messung ein 1,25kg-Gewicht. Die Eindruckzeit betrug jeweils 30s. Die Eindringtiefe wurde auf der Messskala in μm abgelesen und der Differenzwert zwischen der ersten und zweiten Messung ermittelt.

Die Messung erfolgte an den nach 24h und nach einer Woche in Aqua bidest. gelagerten Probekörpern.

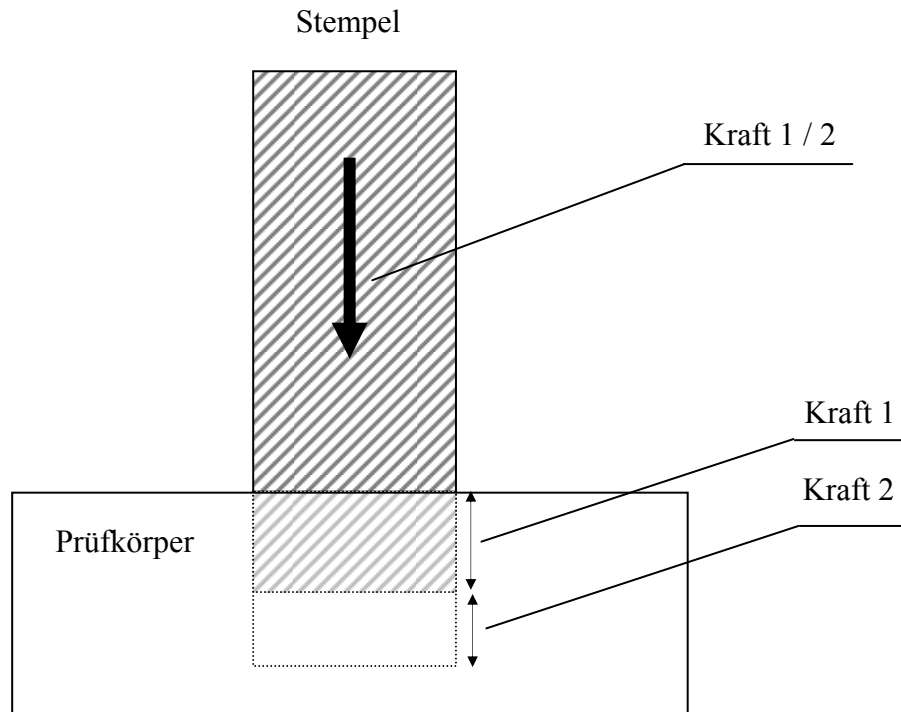


Abb. 10: Prinzip der Druckspannungsprüfung

4.5. Verfahren zur Werkstoffanalytik

Mikroskopische und submikroskopische Betrachtungen bzw. Analysen führen zu einem besseren Verständnis der Struktur- und Eigenschaftswchselbeziehungen. Mit Hilfe dieser Methoden können werkstoffkundliche Kenngrößen genauer beschrieben werden.

4.5.1. Durchlichtmikroskopie

Das Lichtmikroskop dient zur Betrachtung eines Objektes mit sichtbarem Licht. Je nach entsprechender Vergrößerungseinstellung, können mit Hilfe dessen Strukturen dargestellt und beurteilt werden. Eine spezielle Probenvorbehandlung entfällt.

4.5.2. Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Durch die REM können die Oberflächentopographie und die Porengröße eines Werkstoffes oder festen biologischen Materials beurteilt werden. Die Bruchhälften des Biegebruchfestigkeitsversuches wurden entsprechend vorbehandelt und

rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Beurteilung der Probekörper erfolgte an unterschiedlichen Stellen (Oberfläche, Bruchkante). Damit war es möglich, einen Einblick in die Struktur des experimentellen Knochenzementes zu bekommen, sowie die Homogenität zu beurteilen. Durch REM-Aufnahmen ist es möglich, Oberflächen und Bruchkanten hinsichtlich ihrer Oberflächenbeschaffenheit und Porosität zu beurteilen.

Die Einschätzung der Porenanzahl und -größe spielte hierbei eine übergeordnete Rolle.

4.5.2.1. Vorbereitung der Proben

Alle Proben wurden 24 Stunden und eine Woche in einem Aqua-bidest.-Bad mit einer konstanten Temperatur von 37°C gelagert. Die Bruchhälften des Vier-Punkt-Biegeversuches wurden für die REM-Aufnahmen verwendet und entsprechend vorbehandelt. Die Probekörperhälften wurden auf speziellen Probhaltern befestigt und entsprechend den Herstellerangaben mit Gold besputtert. Dazu wurde das Cool Sputtergerät SCD 005 Bal-Tec verwendet. Hierdurch erhält man leitende Oberflächen auf REM-Proben.

Für die REM-Aufnahmen wurde das RE-Mikroskop *Amray 1810* verwendet.

4.5.3. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet sich an, wenn Strukturen auf undurchlässigen Feststoffen beurteilt werden sollen.

Durch die Fluoreszenzmethode (Lumineszenzmethode) können Substrate durch Fluoreszenz bei Be- oder Durchstrahlung mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden. Die Objekte leuchten in den Farben des Spektrums vor einem dunklen Hintergrund auf [2]. Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können, nach entsprechender Vorbehandlung, die Zellkerne und das Aktinskelett der Zellen auf den Probekörpern sichtbar gemacht und so eine Einschätzung über deren Bioverträglichkeit abgegeben werden.

Die Fluoreszenzdokumentation erfolgte, nachdem die Probekörper fünf Wochen mit den Zellen inkubiert wurden.

Es erfolgte eine Doppelfärbung von F-Aktin (rot) und Kernen (blau). Dabei wurden die Probekörper mit den adhärenierten Zellen mit Alexa Fluor 546 Phalloidin versetzt, welches Aktin-filamente rot anfärbte. DAPI = 4',6 Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid (Vysis Inc., Downers Grove, IL) wurde zur Anfärbung der Zellkerne eingesetzt (Blau-Violett-färbung). Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der selektiv an DNA bindet und stark

fluoreszierende Farbkomplexe bildet. Das Vorgehen erfolgt entsprechend den Herstellerangaben.

4.6. Biokompatibilitätstestung

Unter Biokompatibilität oder biologischer Verträglichkeit versteht man die Abwesenheit von sämtlichen Materialeigenschaften durch welche biologische Systeme, Organe oder deren Träger geschädigt oder beeinträchtigt werden. Dazu zählen toxische, kanzerogene, mutagene, sensibilisierende u.ä. Eigenschaften, deren pauschaler Ausschluss aufgrund einer einzigen, einfachen Untersuchung, z.B. in einem Zellkultursystem, nicht möglich ist [73]. Dabei stellt der Zellkulturtest eine wichtige erste Stufe des in-vitro-screening-Testverfahrens dar und schafft somit die Voraussetzungen für weiterführende Prüfungen.

Zur Überprüfung der Bioverträglichkeit wurden Zellkulturtests durchgeführt. Dabei war zwischen Direktauflage-Tests und Eluat-Tests zu unterscheiden.

Bei der Direktauflage-Testung werden die Zellen direkt auf das zu untersuchende Material (Prüfkörper) gegeben, wonach im zeitlichen Zusammenhang die Untersuchung erfolgt.

Bei der Eluat-Testung wird zunächst durch eine Art Auslaugung des zu untersuchenden Prüfkörpers, eine Lösung (Eluat) hergestellt. Dieses Eluat wird anschließend zur Untersuchung verwendet. Der schematischen Darstellung der nachfolgenden Abbildung ist die Vorgehensweise zu entnehmen.

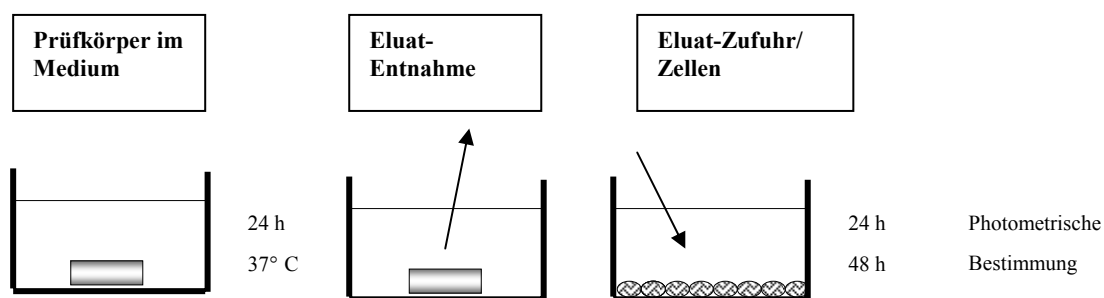


Abb. 11: Prinzip des Eluat-Testes

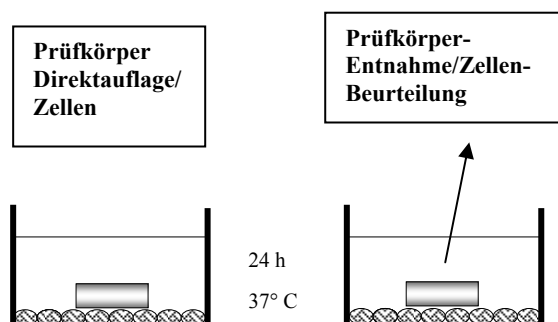


Abb. 12: Prinzip des Direktauflage-Testes

Zellen wachsen, verbrauchen Nutrienten und geben gleichsam Abfallprodukte ab, sodass alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel erforderlich ist. Um eine Kontamination der Zellkultur (z.B. durch Bakterien, Hefen oder Pilzsporen) zu verhindern, müssen Verhaltensregeln und Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden [49]. Grundsätzlich wird steril in einer Laminarbox gearbeitet. Das gesamte Instrumentarium und die Medienflaschen werden vor der Benutzung mit einer Gasflamme abgeflammt bzw. mit Ethanol desinfiziert, um die Gefahr einer Kontamination einzuschränken. Die Medien werden nach ihrer Kühlung im Wasserbad bei 37°C erwärmt, um den Zellen sofort nach Zugabe des Mediums ein optimales Milieu zu gewährleisten.

Ist die gesamte Kulturfläche mit einem Zellrasen bedeckt (Konfluenz), muss eine Trypsinierung durchgeführt werden, d.h. die Zellen werden von einer Kulturflasche in eine andere überführt. Dabei erfolgt eine Verdünnung (Split 1:100). Dieser Vorgang wird als Passage bezeichnet. Das Ernten der Zellen für die eigentliche Versuchsdurchführung geschieht folgendermaßen: Die Zellen werden nach Absaugen des Mediums 10 min mit 1,5ml 0,05% Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) in Phosphat Buffered Saline (PBS) bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Die optimale Temperatur liegt, je nach Zelllinie zwischen 36-37°C, der optimale pH-Wert bei 7,2-7,4. Die Luftfeuchtigkeit muss ausreichend und konstant gehalten werden. EDTA unterbricht die intrazellulären Desmosomen und erleichtert somit die Vereinzelung von Zellen. Die EDTA-Lösung wird abgesaugt und durch eine 0,02%-ige Trypsin-Lösung ersetzt. Eine gleichfalls 10-minütige Inkubation unterbindet die Zelladhärenz. Die Zellen lösen sich ab und sind leicht zu suspendieren. Die Trypsinaktivität wird durch das dem Medium zugegebene Serum (FKS = fetales Kälber-Serum) inhibiert.

Zur Kultivierung der Zellen werden Kunststoff-Kulturschalen verwendet. Die Zellen gedeihen in einem Spezialmedium (DMEM = Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium + 10% FKS).

Für die Zellkulturvorversuche wurden kleine kreisrunde Prüfkörper mit einem Durchmesser von 1cm und 1mm Höhe nach oben angegebenen Vorgaben hergestellt. Die Probekörper wurden zunächst in EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend auf dem Boden von 24-Wellkulturplatten fixiert. Dafür wurde ein lichthärtendes Adhäsiv verwendet. Hier handelte es sich um *Heliobond*® (1g Lösung enthalten 0.6000g Bis-GMA und 0.400g 3,6-Dioxaoctamethylendimethacrylat), als lichthärtenden Haftvermittler für adhäsive Restaurationen im Bereich der Zahnheilkunde. Die Probekörper wurden mit UV-Licht

($\lambda=470\text{nm}$) am Boden der Zellkulturplatten anpolymerisiert. Im zweiten Versuch wurden die Probekörper mit *Histoacryl*®, einem Gewebekleber, am Boden fixiert. Zusätzlich zu den Wells in denen sich die Prüfkörper befanden, existierten Kontrollwells ohne Probekörper.

In beiden Varianten zeigte sich weder bei den mit Adhäsiv oder mit *Histoacryl*®, noch bei den unfixierten Probekörpern Zellwachstum. Schon nach kurzer Zeit starben die Zellen ab. Im Kontrollwell (ohne Prüfkörper) hingegen waren Zellwachstum und Zellteilung zu beobachten. Vorerst wurde auf die zusätzliche Sterilisation der verwendeten Pulverkomponenten verzichtet, da durch den Alkoholgehalt der Flüssigkomponente von Keimfreiheit der Proben ausgegangen wurde. Es konnte jedoch kein Zellwachstum beobachtet werden. Dabei stellte sich die Frage, ob Kontamination der Probekörper zum Zelltod geführt hatte und/oder die Waschung mit Ethanol unzureichend war. Um das zu beurteilen, wurden die abgebundenen Prüfkörper vor Zugabe der Zellen in einem Heißluftautoklaven bei 180°C für zwei Stunden autoklaviert. Die Probekörper wurden nun unfixiert steril in die Wells eingebracht und anschließend mit Zellen versetzt. Da das zu untersuchende Material in den menschlichen Knochen eingebracht werden soll und dort zur Fixierung von Endoprothesen eingesetzt wird, lag es nahe für die Zellkulturtests primäre humane Osteoblasten zu verwenden. Hierbei konnte sowohl in den Kontrollwells, als auch in den Wells mit den autoklavierten Probekörpern Zellwachstum und Zellteilung beobachtet werden. Entsprechend wurden die weiteren Versuche mit zuvor autoklavierten Probekörpern durchgeführt.

Allerdings blieb festzuhalten, dass beim Einbringen einer Substanz in den Körper, diese nicht erst nach der Aushärtung einer Keimreduktion bzw. Autoklavierung unterzogen werden dürfte. Aus diesem Grund wurden Zelluntersuchungen mit Probekörpern, die nach ihrer Herstellung zur Keimreduktion in den Kulturtestwells bei 37°C über Nacht in einem α -MEM beinhaltenden Medium gelagert wurden, durchgeführt. Es handelte sich dabei um ein 2x höher als normales α -MEM-stock-konzentriertes Antibiotika-Medium (43,4ml α -MEM + 1,6ml Penicillin/Streptomycin). Damit wurde in diesem Experiment versucht, auf Sterilisation der vorbereiteten Probekörper zu verzichten und die Bedingungen den natürlichen Gegebenheiten besser anzupassen.

Doch auch hier zeigten sich nur unbefriedigende Ergebnisse. Da jedoch die Keimfreiheit eine unabdingbare Voraussetzung für die (Ein-)Heilung des Implantats und die schnelle Rehabilitation des Patienten ist, erfolgten schlussfolgernd aus den zuvor gewonnenen Ergebnissen, alle Versuche mit bereits **zuvor** sterilisierten Ausgangsmaterialien. Dabei wurden die drei verschiedenen Pulveransätze in den Glasgefäßen verschlossen und bei 121°C

und 2 bar Formalin-gassterilisiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte ebenfalls unter sterilen Bedingungen. Die Sterilisation der Pulverkomponenten beeinflusst nicht die werkstoffkundlichen Eigenschaften. Das Anmischen der Ansätze erfolgte mit einem sterilen Kunststoffspatel. Die angerührte Masse wurde dann in die ebenfalls keimfreie Spritze eingefüllt. Eine definierte Menge (0,2ml) wurde pro Well appliziert und mit einem sterilen Teflonstempel in die Form gepresst. Durch diese Verfahrensweise adhärierte die Masse ausreichend fest am Boden der Zellkulturplatten.

Als Kulturmedium wurde entweder α MEM oder DMEM/HAM's F 12-Medium (1:1) + 10% hitzeinaktiviertes FKS + 100 U Penicillin/Streptomycin + 2.5% HEPES + 52mg/l Ascorbinsäure (-2phosphat) + 230mg/l Calciumchlorid + 10mM β -Glycerolphosphat + 10^{-7} M Dexamethason Einsatz. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Für die Biokompatibilitätstests wurden primäre humane Osteoblasten der 4. und 5. Passage verwendet.

Die Flüssigkomponente wurde aufgrund ihres Alkoholgehaltes als keimreduziert bzw. keimfrei angesehen und wie hergestellt verarbeitet. Die Zellkulturtests erfolgten in 96-Well- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten der Firma Nunc®.

4.6.1. Reduktion mit alamarBlue™ / Proliferationstest mit Saos-2-Zellen (ATCC: HTB-85)

AlamarBlue™ ist ein sicherer, ungiftiger, wässriger und indigoblauer Farbstoff. AlamarBlue™ wird zur Bewertung von Zellebensfähigkeit und Zellwachstum eingesetzt.

Wie auch bei der Verwendung von Tetrazoliumsalz (MTT-Test = 3-(4,5)dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid) stellt die alamarBlue™ -Methode das reduzierende Milieu von wachsenden Zellen dar. Die Benutzung von alamarBlue™ erlaubt eine kontinuierliche Überwachung der Zellen in der Kultur. AlamarBlue™ verändert nicht die Lebensfähigkeit. Die Zellen können nach der Beurteilung wieder der Zellkultur zugeführt oder für weitere histologische Untersuchungen benutzt werden. Das ist ein großer Vorteil gegenüber der nur einzeitigen Bewertungsmöglichkeit des MTT-Tests. Er stellt so eine Alternative zum MTT-Test dar. Dabei können die Zellwachstumsmessungen spektralphotometrisch durch Messung der Absorption der mit alamarBlue™ versetzten Zellkulturmedien in zwei Wellenlängen (570nm und 595nm) gemessen werden. Alternativ können die Zellwachstumsmessungen ebenfalls fluorometrisch erfolgen. Die Standardmethode stellt jedoch die spektralphotometrische Messmethode dar.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Bei den Saos-2-Zellen handelt es sich um eine humane Osteoblastenzelllinie. Der Proliferationstest mit Saos-2-Zellen gibt an, ob Zellen proliferieren, in ihrem Wachstum gehemmt oder behindert werden. Es wurden 96-Well-Kulturplates verwendet. Da das innere Milieu von proliferierenden Zellen reduzierter ist, als das von nicht- wachsenden Zellen, zeigen insbesondere die Verhältnisse von NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN und H/NAD einen Anstieg während des Wachstums. Komponenten wie Tetrazoliumsalz und alamarBlue™ können durch diese metabolischen Zwischenprodukte reduziert werden. So ist es möglich, das Zellwachstum anhand ihrer Reduktion in Verbindung mit einer messbaren Farbveränderung darzustellen und kontinuierlich zu beurteilen [11].

4.6.2. Zytotoxizitätstest mit primären humanen Osteoblasten

Bei diesem Verfahren ist die Fläche größer, es wurden 24-Well-Kulturplatten verwendet. Mit Hilfe dieses Tests wird ermittelt, ob der zuvor subkonfluente Zellrasen durch die Auflage der Probekörper beeinflusst wird.

Primäre humane Osteoblasten wurden in Zellkulturplatten mit einer Dichte von $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ausgesät und im Brutschrank bis zu einem subkonfluenten Wachstum (80%) kultiviert. Ab einer Konfluenz von 80% wurden sterile, 3x mit PBS gespülte Prüfkörper, die etwa 10% der Kultivierungsfläche bedecken, auf die Zellen aufgebracht. Das Medium wurde alle 2-3 Tage vollständig gewechselt. Vor der Applikation der Prüfkörper und bei jedem Medienwechsel wurde die Zellaktivität in jeder Kultur über alamarBlue™-Test bestimmt. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Um Änderungen in der Matrixproduktion nachzuweisen, wurden die Zellen nach etwa 14 Tagen fixiert und gebildete, kalzifizierte Matrix durch Silberfärbung nach Von Kossa gefärbt.

Das Zellkulturmedium wurde während des Versuchsverlaufs gesammelt und bei -80°C gelagert. Mittels spezieller ELISA-Testkits können in den Überständen Marker für die induzierte Apoptose und die Synthese des Granulozyt-Makrophagen-Kolonie- stimulierenden Faktor (GM-CSF), der induzierend auf hämatopoetische Zellen als Vorläufer der Osteoklasten wirkt, bestimmt werden [55].

4.6.3. Osteoblastäre Eigenschaften

Humane Osteoblasten (HOS) wurden aus trabekulärem Knochen der Tibeakondyle isoliert und vor dem Versuch auf osteoblastäre Eigenschaften, wie die Synthese von Alkalischer Phosphatase und kalzifizierender Matrix getestet.

4.6.4. Nachweis Alkalischer Phosphatase (ALP)

Die ALP ist ein Hydrolase-Enzym, welches in Zellen und Körperflüssigkeiten vorkommt. Wie sämtliche Enzyme, wird es im Körper in kleinen Mengen benötigt, um spezifische chemische Reaktionen zu triggern. Die ALP ist für die Abspaltung von Phosphatgruppen in verschiedenen Molekülgruppen, einschließlich Nukleotiden, Proteinen und Alkaloiden, verantwortlich. Diese Abspaltung ist als Dephosphorylierung bekannt. ALP ist in alkalischer Umgebung besonders effektiv und in Osteoblasten, Nieren, Leber und Darmepithel besonders angereichert. Eine hohe Aktivität von ALP ist ein kennzeichnendes Merkmal mineralisierender Gewebe. Die Bedeutung der ALP zeigt sich gleichermaßen darin, dass dieses Enzym bei defekter Knochenbildung fehlt, in regenerierenden Knochen (nach Fraktur) oder bei erhöhter Osteoblastenaktivität (Rachitis) im Gewebe und im Blutplasma in erhöhter Konzentration vorhanden und während der Embryonalentwicklung erst nach Einsetzen der ersten Verknöcherung nachweisbar ist. Die Anwendung erfolgt entsprechend den Herstellerangaben.

Vorgehensweise des Nachweises:

1. AP-Nachweis

erfolgte durch Inkubation mit der Reaktionslösung:

- 25ml 0,1 M Acetat-Puffer (pH 9,4)
- 25mg Echtblauansatz
- 12,5 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat

Die Ergebnisse werden fotodokumentiert.

2. AP-Aktivitätsbestimmung

durch eine AP-Kinetikmessung mit entsprechendem AP-Substrat. Das Vorgehen erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben. Die Messung geschieht spektralphotometrisch bei $\lambda=405\text{nm}$ gegen Blindwert und Standart.

4.6.5. Darstellung der extrazellulären Matrix

Tierzellen sind umgeben von einer komplex zusammengesetzten Substanz, der sog. extrazellulären Matrix. Im Bindegewebe, Knorpel und Knochen ist die extrazelluläre Matrix besonders ausgeprägt. Die extrazelluläre Matrix erfüllt unterschiedliche Aufgaben. Sie stellt eine mechanische Verbindung zwischen den Zellen her. Außerdem bildet sie Strukturen mit

besonderen mechanischen Eigenschaften, wie z.B. Knorpel, Knochen etc., bildet Filtereinrichtungen, trennt Zellen und Gewebe voneinander und stellt Leitbahnen dar, an denen sich die Zellen orientieren.

4.6.6 .Von Kossa-Färbung

Mit Hilfe der Von Kossa-Färbung wird die extrazelluläre Matrix und deren Mineralisierung dargestellt. Dabei wird das Mineral braun-schwarz angefärbt. Das Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Ergebnisse wurden fotodokumentiert.

4.7. Statistische Bewertung der Untersuchungsergebnisse

4.7.1. Die Varianzanalyse

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte über das Programm SPSS für Windows®, Version 12.0.

Die Quantile wurden innerhalb der deskriptiven Statistik bestimmt. Der Wert x , der mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit p nicht überschritten wird, heißt Quantil x_p . Das Quantil $x_{0,5}$ entspricht dem Median- oder Zentralwert. Dabei ist der Medianwert der Wert, der mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.5 nicht überschritten wird. Er ist dadurch charakterisiert, dass er aufsteigend geordnete Messwerte in zwei gleich große Teile teilt, sodass ober- und unterhalb des Medianwertes jeweils 50% der gemessenen Werte liegen. Das Quantil $x_{0,25}$ wird auch als unteres Quantil bezeichnet. $x_{0,75}$ entspricht dem oberen Quantil. Der Medianwert hat gegenüber dem Mittelwert den Vorteil der Unempfindlichkeit gegenüber Extremwerten.

Die statistischen Ergebnisse wurden graphisch über Box-Whisker-Plots dargestellt. Damit kann die Häufigkeitsverteilung in jeder Versuchsreihe überschaubar dargestellt werden.

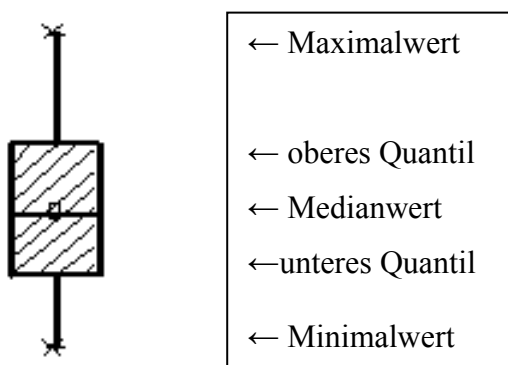


Abb. 13: graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse im Box-Whisker-Plot

Der arithmetische Mittelwert \bar{x} , die Standardabweichung s und der Varianzkoeffizient v ($v = s/\bar{x}$) fanden als tabellarische Werte Anwendung.

Die Messwerte sollten normal verteilt sein und unabhängig voneinander liegen, dann kann die Varianzanalyse vorgenommen werden. Über den Kolmogorov-Smirnov-Test wurde die Normalverteilung der Messwerte durch SPSS nachgewiesen.

Die Unabhängigkeit der Messwerte ergab sich aus dem Versuchsaufbau. Nach Feststellung der Normalverteilung erfolgte die Varianzanalyse durch den Anova-Test. Das Signifikanzniveau lag bei 0.05. Nach Durchführung eines Paarvergleiches resultierte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ein p-Wert, der die Nullhypothese (H_0 : beide Stichproben verhalten sich gleich) bestätigt ($p > 0.05$) oder im umgekehrten Fall die Nullhypothese ablehnt ($p \leq 0.05$). In diesem Fall war das Testergebnis signifikant.

4.7.2. allgemeine Fehleranalyse

Bei allen Versuchen sind die Vorgehensweisen entsprechend den allgemeinen und speziellen Vorgaben durchzuführen. Insbesondere bei den Zellkulturtests können persönliche Fehler und veränderte Umgebungsbedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Zur Zählung der Zellzahl wurde eine *Neubauer* Zählkammer verwendet. Die Vitalfärbung mit Trypan blau erlaubt eine Bestimmung der lebenden und abgestorbenen Zellen. Geschädigte Zellen ohne perforierte Zellmembran werden in diesem Verfahren als lebend gezählt. Bei der vermeintlich gezählten Zellzahl handelt es sich nicht um einen Absolutwert.