

12. Zusammenfassung und Ausblick

Die moderne Ära der Untersuchung von Biomineralisationsvorgängen begann in den dreißiger Jahren, in denen Methoden wie die Röntgenbeugung eingeführt wurden. Verbesserte optische Mikroskope und histologische Techniken eröffneten einen besseren Zugang zu den Zellen und zum Gewebe [Lowenstam & Weiner 89].

Neuartige Methoden zur Untersuchung von mineralischen Ablagerungen in lebendem Gewebe, wie sie hier eingesetzt wurden, eröffnen einen noch tieferen Einblick bis in atomare Dimensionen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Beispiele aus der belebten Natur untersucht, indem unter anderem mit ausgefeilten Methoden der Synchrotron-Strahlung Informationen bezüglich Zusammensetzung, Kristallinität und Calciumphosphat-Phase verschiedener Proben gewonnen wurden. Hierbei wurden zwei Beispiele für Biomineralisationsvorgänge untersucht: Die Knochenmineralisation als „gewollte“ Biomineralisation und am Beispiel der Chondrocalcinose des Kniegelenksmeniskus ein Beispiel für „ungewollte“, pathologische (ektopische) Mineralisationsvorgänge.

Die Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien ergab, daß bezüglich Kristallinität und Zusammensetzung kein Unterschied verschiedener humaner Knochenproben erkennbar waren (vgl. Abb. 6.5). Sämtliche untersuchten Knochenproben zeigten ausnahmslos apatitische Calciumphosphate. Es konnten weder Anhaltspunkte für eine amorphe Calciumphosphat-Phase gefunden werden [Blumenthal et al. 75] noch für DCPD und OCP [Posner 85], [Legros et al. 87]. Thermogravimetrische und infrarotspektroskopische Ergebnisse ergaben darüber Aufschluß, daß die *Spongiosa*-Proben (schwammartiger Knochen im Inneren des *Femurs*) mit 26 bis 34 Gew.-% den geringsten Apatitgehalt aufwiesen. Tumor-befallener Knochen war dagegen hoch mineralisiert (68 Gew.-%), junger neu gebildeter *Callusknochen* lag mit 44 Gew.-% Mineralphase dazwischen.

Der Carbonatgehalt der Knochenproben schwankte zwischen 1 und 5 Gew.-%. Dabei wies wiederum der Tumorknochen den höchsten Carbonatgehalt auf.

Durch die geringe Anzahl der Proben ist jedoch die Aussagekraft dieser Meßreihe gering. Fest steht, daß die Mineralphase des Knochens aus nanometergroßen *Dahlit*-Blättchen besteht, deren Ausdehnung sich kaum unterscheidet [Posner 85].

Die in dieser Meßreihe gleichzeitig untersuchten Proben verschiedener Knochenersatzmaterialien zeigten strukturell große Unterschiede zu den Knochenproben. Einzig „Kieler Knochenspan“ wies ähnlich kleine Kristallite mit einem ähnlichen Carbonatgehalt wie nativer Knochen auf. Da die organische Matrix durch die Herstellungsweise des „Kieler Knochenspans“ nicht vollständig entfernt werden konnte [Boyde & Jones 96], wird das Material wegen Immunantwort des umgebenden Gewebes und neuerer Gefahren (BSE) heute nicht mehr eingesetzt. Das Knochenersatzmaterial Endobon[®] wies die höchste Kristallinität aller untersuchten Knochenersatzmaterialien dieser Reihe auf. Dies ist durch den Herstellungsprozeß (Sintern aus bovinen Knochen bei bis zu 1100°C) bedingt. Durch die Herstellungsweise aus Knochen ist jedoch die Porosität ähnlich der von nativem Knochen, was die Zellmigration, die Vaskularisierung und die Versorgung der Zellen fördern sollte; gleichzeitig entstand jedoch durch den Sinterungsprozeß alkalisches Calciumoxid, welches auch bei pH-Wert-Verläufen in Wasser (pH 9.8-10) erkennbar war. Der hochkristalline Apatit ist thermodynamisch wesentlich stabiler als die nanokristallinen Carbonatapatite, daher ist ein *remodeling* des Endobon[®] stark behindert [Linhart et al. 00]. Das Knochenersatzmaterial Algipore[®] wies eine niedrigere Kristallinität und –bedingt durch seine Herstellungsweise– einen geringen (1 Gew.-%) Carbonatgehalt auf. Beide Eigenschaften sollten sich positiv auf eine Resorbierbarkeit des Materials auswirken. Da das Material hydrothermal aus Algen hergestellt wurde, weist Algipore[®] außerdem eine Porosität auf, die die Zellversorgung fördern kann. Infrarot-Spektren des Materials zeigen außerdem Reste von Ammoniumsalzen im Kristall.

Pathologische Mineralisationsvorgänge in Kniegelenksmenisken werden hauptsächlich durch die polarisationsmikroskopische Analyse von Kristallen im *Synovialfluid* (Kniegelenksflüssigkeit) nachgewiesen. Weisen diese Kristalle die Eigenschaft der Doppelbrechung auf, so geht die Diagnostik von dem Vorhandensein von Calciumpyrophosphat-dihydrat- (CPPD-) Kristallen aus [Maddison et al. 98].

Die Untersuchung der schon mit bloßem Auge sichtbaren Kristallakkumulationen in humanen Kniegelenksmenisken zeigte dagegen eine amorphe Phase in frischem Meniskusgewebe (Abb. 7.4), welche mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie als eine carbonathaltige apatitische Phase identifiziert werden konnte (Abb. 7.5 ff.). Röntgenpulverdiffraktometrische Untersuchungen an Kristallablagerungen von im Exsikkator über P₄O₁₀ getrockneten Menisken zeigte die erwartete CPPD-Phase (Abb. 7.10). Erst nach dem Trocknen der Menisken konnten auch langgezogene,

blättchenförmige Kristallite im Rasterelektronenmikroskop beobachtet werden (Abb. 7.11). Röntgenbeugungsmessungen an den Glührückständen von Kniegelenksmenisken (800°C) zeigten neben dem erwarteten β -Calciumpyrophosphat auch Tetra-calciumphosphat (TTCP) und Tricalciumphosphat (TCP), was auf das Vorhandensein von aciden Hydrogenphosphat-Gruppen hinweisen kann. Pyrophosphat ist ein bekannter Inhibitor der Calciumphosphat-Kristallisation und verhindert das Auskristallisieren apatitischer Produkte aus amorphen Calciumphosphaten [Termine et al. 70]. Aus schwach alkalischen Lösungen gefällte Calciumpyrophosphate sind ebenfalls zunächst röntgenamorph und gehen bei Erhitzen auf 700°C in kristallines β -Calciumpyrophosphat über. Dies weist ebenfalls darauf hin, daß die Kristallablagerungen im humanen Meniskusgewebe anfänglich aus einer amorphen Phase bestehen.

Zur Simulation dieser hier untersuchten Mineralisationsvorgänge ist es nötig, homogene Bedingungen für die Kristallisation zur Verfügung zu stellen. Gleich einem biologischen System, welches durch enzymatische Regulation, Membranpumpen, Diffusion und Komplexbildung die äußeren Bedingungen (Ionenkonzentration, pH-Wert) konstant hält (vgl. Abb. 4.2), müssen auch unter Laborbedingungen diese Werte gleichermaßen konstant bleiben.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde 1978 die *Constant Composition* (CC)-Technik entwickelt [Tomson & Nancollas 78], welche es erlaubte, durch automatische Titration von Calcium- und Phosphat-Lösung, gesteuert durch den pH-Wert, die Kristallisation von Calciumphosphaten unter definierten Bedingungen zu simulieren. Diese dort simulierten Kristallisationsvorgänge erfolgten jedoch im Sinne einer schnellen Kristallisation, d.h. einer Fällung, und entsprachen so nicht den Vorgaben der langsamen Kristallisation, welche die Biologie vorgibt.

Die Verbindung einer langsamen Doppeldiffusionstechnik in Membranen (Gelatine [Kniep & Busch 96] oder Polyglycolid [Schwarz & Epple 98]) mit der CC-Technik führte zur Entwicklung der *Constant Composition Double Diffusion* (CCDD)-Anlage, welche beide Vorteile miteinander verband. Zwei thermostatisierte Diffusionsgefäße, zwischen die eine beliebige Membran eingebaut werden konnte, erlaubte Diffusionsversuche unter konstanten Bedingungen. Mittels einer Calcium-Elektrode und zweier pH-Metern, welche bei Bedarf Peristalticpumpen ansteuerten, die KOH, Calcium- oder Phosphat-Lösung zutitrierten, konnten die Ionenkonzentrationen in beiden Dif-

fusionsgefäßen konstant gehalten werden (siehe Abb. 9.1). Durch geeignete Programmierung konnte erreicht werden, daß die Phosphat-Konzentration durch die Calcium-Elektrode mit gesteuert werden konnte.

In einer ersten großen Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener Faktoren (pH-Wert, Fluorid-Gehalt, Konzentration) auf die Morphologie von Fluorapatit-Kristallen, hergestellt durch Diffusion von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ und KF in eine Polyglycolid-Tablette untersucht. Dabei galt es, die Frage zu klären, welcher Faktor Einfluß auf die Bildung von Hantelaggregaten hat, die sich im Verlauf der Kristallisation zu Kugeln schließen [Knip & Busch 96], [Schwarz & Epple 98]. Die Bildung dieser Hantelaggregate wurde gleichermaßen Matrixeffekten [Busch 98] und intrinsischen elektronischen Effekten [Busch et al. 99] zugeschrieben.

Neben den Hantelaggregaten, die sich hauptsächlich auf der Oberfläche der Phosphat-Seite bildeten, zeigten sich innerhalb der Tablette noch Kugelaggregate und hexagonale Stäbchen (vgl. Abb. 9.18 ff). Die Kugelaggregate waren dabei wesentlich kleiner als die auf der Oberfläche zu Hanteln ausgefächerten hexagonalen Stäbchen, so daß davon ausgegangen werden muß, daß diese Morphologien einen anderen Ursprung haben, beispielsweise gemäß Abbildung 9.33 aus kleinen, verzweigten Keimkristallen. Andere Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Kugelaggregate aus flachen Keimkristallen über eine „Schüsselform“ zu den glatten Spärolithen kristallisieren können (Vgl. Abb. 9.22). Wird die Kristallisation durch niedrigere pH-Werte behindert, so entstehen kleinere Kugelaggregate und kleinere Hanteln. Bei höheren pH-Werten sind sowohl größere Kugeln im Inneren der Tablette als auch größere Hanteln außen auf der Tablettenoberfläche erkennbar (vgl. Tabelle 9.7).

Der Einfluß der Fluorid-Konzentration zeigte den Effekt auf die Hantelbildung. Wurde reines Hydroxylapatit ohne Fluoridzugabe kristallisiert, so bildeten sich große Kugeln, bestehend aus ineinander verwobenen, blättchenförmigen HAP-Aggregaten, die im weiteren Verlauf der Kristallisation die gesamte Tablettenoberfläche bedeckten. Geringe Fluorid-Zugabe führte zu sehr dünnen, stäbchenförmigen Kristalliten, die durch die Tablettenoberfläche zu brechen schienen. Ebenfalls traten erste, unregelmäßige Kugelaggregate auf der Oberfläche auf, die sich bei höherer Fluoridzugabe vergrößerten und bis ins Innere der PGA-Tablette erstreckten. Erst bei einem Fluoridgehalt, der der stöchiometrischen Formel für Fluorapatit entspricht, konnte Hantelbildung und die Bildung von regelmäßigen, hexagonalen Kristallen beobachtet werden. Dies

führt zu dem Schluß, daß Fluorid einen markanten Einfluß auf die Morphologie, Regelmäßigkeit und Kristallinität von Fluorapatit-Kristallen hat.

Erhöht man die Konzentration der Diffusionslösungen auf den 1.5-fachen Wert, so erstrecken sich die hexagonalen FAP-Kristalle, die zunächst nur im Tabletteninneren gefunden wurden, bis auf die Oberfläche der Polymertablette. Diese hexagonalen Kristalle verzweigen, zeigen jedoch kein Motiv der Hantelbildung. Die Kugelaggregate zeigten sich nur noch im Tabletteninneren und waren wesentlich kleiner. Bei zweifacher Standardkonzentration wurden neben ausgebildeten Hanteln auch Halbkugelaggregate mit tropfenförmigen Hohlräumen gefunden, die denen in einer Gelatinematrix diffundierten und in der Mitte zerteilten Kugelaggregaten ähnelten [Busch 98]. Jedoch zeigten sich keine Anhaltspunkte dafür, daß diese Aggregate (Abb. 9.28 B-D) aus einer zerteilten Kugel entstammten. Vielmehr ist von einem beschleunigten Hantelwachstum auszugehen, welches sich bei einem 3-Tage-Diffusionsversuch unter denselben Bedingungen bestätigte.

Allgemein können zur FAP-Diffusion in Polyglycolid folgende Aussagen getroffen werden:

1. Neben Hantelaggregaten können auch große, hexagonale Kristalle sowie glatte und kleinere Kugelaggregate beobachtet werden. Dies führt zu der Aussage, daß nicht zwangsweise eine Hantelbildung erfolgen muß.
2. Die Hantelaggregate weisen ein Verhältnis von Länge zu Durchmesser von etwa 5:1 auf. Jedoch sind die Längen und Durchmesser nicht immer gleich.
3. Die Tatsachen, daß ähnliche Hantelaggregate sowohl in ganz anderen Systemen ohne Polyglycolid oder Kollagen gefunden wurden (z.B. Carbonatapatit nach Konversion aus CO_3ACP , vgl. Abb. 10.22 A) als auch FAP-Hantelaggregate in weiter Entfernung von der Diffusionsmatrix beobachtet werden konnten, weisen darauf hin, daß ein Matrixeffekt weitgehend ausgeschlossen werden kann. Vielmehr erfolgt diese Bildung von Hantelaggregaten durch stark verlangsamte Kristallisationsphänomene, z.B. durch Diffusion. Desweiteren können Kristalldefekte für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden.

Weiterhin können über die Polyglycolid-Matrix folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Matrix zeigt markante Ähnlichkeiten mit einer Kollagenmatrix bezüglich Interdiffusionsexperimenten und Kristallisationsphänomenen und ist dabei wesentlich besser definierbar.
2. Die polyanionische Struktur des Polyesters fördert zunächst die Kristallisation auf der Phosphat-Seite der Polyglycolid-Oberfläche, da Calcium-Ionen leichter durch die Matrix diffundieren können.
3. Es gibt nach Beobachtung und Durchführung vieler Diffusionsversuche keinen Anhaltspunkt für ein Kristallwachstum aus den Poren des Polyglycolids. Einige Anhaltspunkte können auf das Gegenteil hinweisen: Eher war Kristallitbildung *um* die Poren *herum* beobachtbar.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß sich die *CCDD*-Anlage nicht nur dazu eignet, Biomineralisationsvorgänge wie die FAP-Bildung zu untersuchen, sondern auch, um pathologische Mineralisationsvorgänge, beispielsweise unter dem Einfluß von Cholesterin, zu untersuchen. Inhibitionsphänomene wie beispielsweise durch Magnesium konnten bestätigt werden, indem eine drastische Morphologieänderung durch die Zugabe von Magnesium erreicht werden konnte. Dies macht es möglich, andere Inhibitoren zu untersuchen und auf ihre Wirksamkeit, z.B. bei der Vermeidung von Arteriosklerose, zu testen.

Polyglycolid wird schon seit den siebziger Jahren als Biomaterial eingesetzt. Seine Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit machen es möglich, es als chirurgisches Nahtmaterial einzusetzen [Gerngroß & Becker 94]. In mechanisch stabilisierter Form wird es auch als Knochenschraube verwendet. Das poröse Polyglycolid, welches in einer Festkörperreaktion aus Natriumchloracetat hergestellt werden kann [Epple & Herzberg 98] (vgl. Abb. 8.5), sollte die Zellversorgung fördern. Um eine Acidose durch die entstehenden sauren Degradationsprodukte zu vermeiden, wurden schon diverse Versuche unternommen, mittels Calciumphosphaten (HAP oder TCP) einen Pufferungseffekt zu erreichen [Mikos et al. 93]. Aufgrund der Ergebnisse der Knochenuntersuchungen wurde ein neues Calciumphosphat entwickelt, welches wesentlich nanokristalliner ist und thermodynamisch instabiler als der Knochenapatit. Dies sollte die Bioresorption unterstützen. Das Calciumphosphat wurde so modifiziert, daß die sauren Degradationsprodukte abgefangen werden können und –auch in reinem

Wasser– der pH-Wert im physiologischen Bereich verbleibt (vgl. Abb. 10.14). Die Zellkulturtestung auf Biokompatibilität, wobei Maus-Osteoblasten im Zellnährmedium α -MEM auf Polyglycolid-Calciumphosphat-Komposite aufgebracht wurden, zeigte proliferierende Zellen, die mineralisierte Kollagenfasern bildeten.

Die in diesem Zusammenhang entwickelten amorphen carbonathaltigen Calciumphosphate wurden weiter untersucht und die Herstellung verfeinert. Der Carbonatgehalt ließ sich bei der Herstellung variieren. Bei hohen Carbonatgehalten zeigte sich bei der Konversion dieser amorphen carbonathaltigen Calciumphosphate in wäßriger Lösung das Auskristallisieren von Calcit. Diese Kristallisation konnte im Zellnährmedium α -MEM behindert, im Verbund mit Polyglycolid im Komposit sogar ganz unterdrückt werden.

Diese Konversionsphänomene in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung im Vergleich mit α -MEM wurden auch anhand von Brushit untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß sich in physiologischer Carbonatlösung ein Gemisch aus OCP und zunächst nanokristallinem HAP bildete, welches im weiteren Verlauf Carbonat aufnahm, während die Röntgenpulverdiffraktogramme keine Veränderung mehr zeigten. Die thermische Analyse zeigte im Verlauf dieser Reaktion innerhalb von 120 Stunden sinkende Wassergehalte. Erwartungsgemäß sank der Kristallwassergehalt bis auf ein Minimum, welches auf okkludiertes Wasser zurückzuführen ist. Der Anteil des Reaktionswassers aus aciden Hydrogenphosphat-Gruppen sank ebenfalls, jedoch nie bis auf den Nullwert. Dies läßt darauf schließen, daß ein gewisser Gehalt acider HPO_4^{2-} -Gruppen die stabilste Phase darstellt.

Im Zellnährmedium entstand kein carbonathaltiges Calciumphosphat, sondern OCP, welches im physiologischen pH-Bereich die stabilste Phase darstellt. Während die Umkristallisation im Carbonatlösung nach 24 Stunden beendet war, benötigte sie in serumfreien Zellnährmedium 144 Stunden und in serumhaltigen α -MEM 270 Stunden. Diese Unterschiede, sowohl bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit als auch bezüglich der entstehenden Calciumphosphat-Phasen, konnten ebenfalls mit der Ermittlung des analytischen Ca/P-Verhältnisses bestätigt werden.

Die Arbeit zeigt die Gewinnung von Erkenntnissen über Biomineralisationsphänomene und Versuche der Simulation der zuvor gewonnenen Kenntnisse. Bezüglich der Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien zeigen die Ergebnisse

interessante Anhaltspunkte. Jedoch führt erst eine große Studie an Knochenproben zu statistisch einwandfreien Ergebnissen. Beispielsweise könnten bestätigende Untersuchungen darüber angestellt werden, ob die hohe Mineralisierung typisch für Tumorknochen ist.

Die Aufklärung der Zusammensetzung der Kristalle chondrocalcinotischer Menisken zeigt neue Ansätze, dieses pathologische Mineralisationsphänomen zu untersuchen. Amorphe und nanokristalline Materialien reagieren empfindlich auf die Behandlung mit ionisierenden Medien. Neue Methoden müssen gefunden werden, die Kristallablagerungen aus Gewebeproben zu entfernen, ohne daß diese dabei eine Veränderung erleiden. In einer größeren Studie könnten diese Methoden eruiert werden und würden die so gewonnenen Ergebnisse außerdem statistisch belegen.

Die Simulation von Biomineralisationsvorgängen des FAP und des HAP konnten erfolgreich mittels der CCDD-Anlage durchgeführt werden. Obwohl es durch eine geeignete Programmierung möglich wurde, auch den Phosphat-Gehalt im Diffusionsgefäß zu kontrollieren, ist diese Lösung auf Dauer unbefriedigend. In naher Zukunft soll eine Fluorid-Elektrode den F^- -Gehalt kontrollieren. Eine Möglichkeit der *in situ*-Steuerung der Phosphat-Gehalte kann beispielsweise die Kontrolle über optische Methoden, beispielsweise mittels eines optischen Sensors im Infrarot-Bereich (z.B. 1036 cm^{-1} , vgl. z.B. Abb. 3.9) darstellen.

Ein unumstößlicher Beweis dafür, daß kein Matrixeffekt für die Bildung der Hantelaggregate verantwortlich ist, steht noch aus. Andere Matrices, z.B unpolare Polymere oder flüssige, gering polare Medien getrennt durch zwei Membranen an beiden Diffusionsgefäßen sollten untersucht werden. Bei geeigneter Wahl der Geometrie (Entfernung zwischen den beiden Diffusionsgefäßen) sollte es so möglich sein, Kristallisationsphänomene inmitten dieses Mediums zu beobachten. Dadurch wäre auch die Möglichkeit gegeben, mittels einer Mikrosonde die pH-Wert-Änderung direkt am Ort der Kristallisation zu messen. Da die ionenselektiven Elektroden extrem empfindlich gegenüber organischen Verunreinigungen reagieren, können so auch organische Kristallisationsinhibitoren in diese flüssigen Matrix eingebracht werden, ohne daß sie mit einer ionenselektiven Elektrode in Berührung kommen.

Die Biokompatibilität von Polyglycolid mit Carbonat-ACP konnte gezeigt werden. Die geringe Stabilität und die schnelle Degradation des porösen Polyglycolids erschweren einen klinischen Einsatz in Zukunft. Daher sollten höhere Homologe der Poly-

ester erprobt und eingesetzt werden. Durch ihre unterschiedliche Degradationskinetik ist es dann wiederum nötig, andere Calciumphosphate zu verwenden. Erste Erfahrungen mit Polylactid zeigten, daß die Degradation dieses Polymers so langsam verläuft, daß auf keinem Fall ein so leicht lösliches ACP eingesetzt werden kann wie bei den PGA-Kompositen. Vielmehr sollte hier ein nanokristalliner Apatit mit geringem Carbonatgehalt, im neutralen pH-Bereich gefällt, eingesetzt werden. Dazu wurde eine kontinuierliche Calciumphosphat-Fällungsanlage erdacht und optimiert [Tadič 00].

Die Konversion von Brushit in Zellnährmedien führte zum Entstehen von OCP. Im carbonathaltigen Medium entstand ein OCP/HAP-Gemisch. OCP stellt offensichtlich im biologischen Milieu die stabilste Phase dar. Die Inhaltsstoffe des α -MEM verhinderten eine Inklusion von CO_3^{2-} -Ionen. Im Sinne der Grundlagenforschung und im Interesse der Entwicklung neuartiger Biomaterialien sollten solche Konversionsmechanismen weiter beobachtet werden.

Im Ganzen zeigt die Arbeit nicht nur das große und komplexe Gebiet der Biomineralisation, sondern auch, wie viel intensive Forschung seit den frühen 50er Jahren auf dem Gebiet der Calciumphosphate durchgeführt wurde und wie wenig oftmals bekannt ist. Acht Calciumphosphat-Phasen bilden die Grundlage des Biomaterials Calciumphosphat, wovon 6 (HAP, FAP, CIAP, OCP, DCPD, DCPA, ACP) in wäßriger Lösung entstehen können; die anderen beiden (TCP, TTCP) sind nur durch Herstellung aus der Hitze bekannt. Nimmt man dazu noch das Gebiet der Pyrophosphate und die zahlreichen Defektapatite, Carbonatapatite, alkalihaltigen Apatite hinzu, so wird das System schnell unübersichtlich. Gerade diese Vielfalt jedoch erlaubte es der Natur, für jeden Organismus und für jede Bedingung, die die Umwelt vorgab, ein optimales Material zu entwickeln. Die Untersuchung und Simulation dieser Phänomene steht erst am Anfang und doch zeigen die Ergebnisse, welch spannendes und neues Feld sich vor dem Forscher auftut und welche Möglichkeiten es gibt, die Kristallisation neu zu entdecken.

13. Summary

In the thirties, the modern era of biomineralization studies was founded by the introduction of new methods like x-ray diffraction.

A better access to the observation of cells and tissues was opened by improved optical microscopes and histological techniques [Lowenstam & Weiner 89].

New methods for examination of mineral deposition in living tissues used here provide a closer look down into atomic dimensions.

In the present work, a deeper knowledge of living nature was gained by the use of sophisticated methods as synchrotron radiation. Thereby, data about composition, crystallinity and the calcium phosphate phase could be collected. Two examples for biomineralization were examined: bone mineralization as "wanted" crystallization and, by the examination of chondrocalcinosis of knee menisci, "unwanted" pathologic (ectopic) mineralization.

The examination of bone and bone substitution materials showed no difference between the various bone samples as regards to crystallinity and composition (see figure 6.5). All examined bone samples without exception showed an apatitic calcium phosphate phase. Neither an amorphous phase [Blumenthal et al. 75] nor any other calcium phosphate phases like DCPD or OCP could be found [Posner 85], [Legros 87]. The results of thermogravimetric and infrared spectroscopic measurements disclosed that the samples of *spongius* bone contained the smallest amount of apatite (26-34 wt.%), the so-called *Tumor-bone* (spongius bone with bone-cancer) was highly mineralized (68 wt.% calcium phosphate), and young, newly formed *callus* bone had a 44 wt% mineral content.

The carbonate content of the bone samples varied between 1 and 5 wt.%. Again, the tumor-bone showed the highest content.

The small amount of samples reduces the significance of this series. It is, however a well-established fact that bone mineral consists of nanometer-sized platelets comparable to *Dahlite* (carbonated apatite) crystals which vary only slightly in their dimensions [Posner 85].

The simultaneous examination of bone substitution materials showed structurally remarkable structural differences to the bone samples. Only "Kiel bone" had small

crystallites and a carbonate content similar to native bone. The organic matrix could not be fully removed by extraction with $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ [Boyde & Jones 96]. Because of adverse reaction of the surrounding tissue and new potential dangers (BSE), this material is not in use any more.

The bone replacement material Endobon[®] showed the highest crystallinity among the examined samples due to its production process (sintering of bovine bone at 1100°C). The porosity of Endobon[®] is similar to native bone, therefore it can stimulate cell migration, vascularisation and cell supply. Simultaneously, calcium oxide is formed by the sintering process. This causes an alkaline burst around the implant. The highly crystalline apatite is thermodynamically much more stable than the nanocrystalline carbonated apatite in bone. Due to this fact, the biological remodeling of Endobon[®] is slow [Linhart et al. 00].

The bone substitution material Algipore[®] showed a smaller crystallinity and, because of the hydrothermal synthesis out of *algae*, a small carbonate content and a porosity which can support cell supply. Infrared spectra of this substance also showed a small ammonia content in the material.

Pathological mineralization in menisci of the knee joint was mainly found by polarization microscopy of crystals in the synovial fluid. The property of double refraction of these crystals is presently explained by the consistence of calciumpyrophosphate-dihydrate (CPPD) [Maddison et al. 98].

Crystal agglomerations in chondrocalcinotic menisci, visible to the bare eye (see fig. 7.4), showed an amorphous phase by x-ray diffraction. By x-ray absorption spectroscopy, this phase was identified as a carbonate-containing apatitic phase (fig. 7.5). Powder diffraction experiments with crystals from menisci dried in a desiccator with P_4O_{10} showed the expected CPPD phase (fig. 7.10). After drying of the menisci, elongated platelet-like crystals could be observed by SEM (fig. 7.11). X-ray powder diffractograms of the solid residues of the menisci after heating them in an oven overnight at 800°C showed the expected β -calcium pyrophosphate as well as tetracalciumphosphate (TTCP) and tricalciumphosphate (TCP). This can be a clue to the presence of acidic HPO_4^{2-} -groups. Pyrophosphate is known as an inhibitor of calcium phosphate crystallization and therefore hinders the crystallization of apatitic products from amorphous calcium phosphates [Termine et al. 70]. Calcium pyrophosphates precipitated from slightly basic solutions are also amorphous and convert to crystal-

line β -Calcium pyrophosphate under the influence of the mother liquid. This is also an indication for the theory that the depositions in chondrocalcinotic menisci are consisting of an amorphous phase.

For the simulation of such mineralization events as examined here it is necessary to provide homogeneous crystallization conditions. Like in a biological system in which by enzymatic regulation, mediation of transmembrane processes, interdiffusion and complexation, the crystallization conditions (pH-value, ionic concentrations) are maintained constant (see fig. 4.2). This constancy must also be provided under laboratory conditions.

To reach this target the "Constant composition" technique was developed in 1978 [Tomson & Nancollas 78]. By automatic titration of calcium and phosphate solutions by two mechanically coupled burettes, controlled by the pH value, the crystallization of calcium phosphates under constant conditions could be simulated. The crystallization experiments examined here were conducted under fast precipitation conditions. These experiments are different from real conditions of biology, where slow controlled crystallization occurs as a rule.

The connection between a slow double diffusion technique in membranes (collagen [Kniep & Busch 96] or polyglycolide [Schwarz & Epple 98] and the CC-technique led to the development of the *Constant Composition Double Diffusion* method. Two thermostatted glass vessels and any membrane clamped in between them allowed diffusion experiments under constant conditions. A calcium ion-selective electrode and two pH-meters which control peristaltic pumps can add KOH, Calcium- or Phosphate-solution if the concentrations in the vessels are decreasing. The ionic concentration in the vessels could be kept constant by this method. By suitable programming a control of the phosphate concentration by means of the Ca-electrode could be achieved.

In an experimental series, the influence of different factors (pH, F-content, concentration) on the morphology of fluoroapatite crystals, made by interdiffusion of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KH_2PO_4 and KF into a polyglycolide pellet, was examined. The aim was to find out which factor influences the formation of dumbbell-like aggregates [Kniep & Busch 96], [Schwarz & Epple 98]. The formation of this morphology was both interpreted as being caused by a matrix effect [Busch 98] as well as by intrinsic electronic effects [Busch et al. 99].

Dumbbell-like aggregates, which were formed on the surface of the pellet on the phosphate side, were not the only type of aggregate to be seen. Spherical aggregates and hexagonal rods were also found inside the pellet (see fig. 9.18). The spherical aggregates inside the polymer pellet were much smaller than the aggregates which had already started to become dumbbell-like shaped on the surface. Thus, these morphologies must be of another origin, for instance like those shown in figure 9.33 based on small branched-out nuclei. Other examinations showed that these spheres can grow out of flat round nuclei by forming a bowl-like shape during the crystallization (see fig. 9.22). When the crystallization had been constrained by a small pH value, smaller spheres and dumbbells were formed. High pH values led to bigger spheres inside the pellets and bigger dumbbells on the outside.

The fluoride concentration caused the biggest effect on the formation of the above-mentioned aggregates. Pure hydroxyapatite crystallized without fluoride, showing big spherulitic aggregates consisting of interwoven platelet-like HAP crystals and covering the whole surface during the crystallization (see fig. 9.30). Small fluoride content led to very thin rod-like crystals which seemed to break through the surface of the pellet (see fig. 9.31). First irregular spherical aggregates could be seen on the surface which increased with higher fluoride content; then, the spheres could also be observed inside the pellet. Only at a fluoride content which matched the stoichiometric formula of fluoroapatite, the forming of dumbbell-like aggregates and regular hexagonal rods were observed. This led to the conclusion that fluoride has an essential influence on the morphology, regularity and crystallinity of the FAP aggregates.

An increase of the concentration by 1.5 times caused the growth of hexagonal FAP rods, which initially could only be seen inside the polymer and subsequently on the surface of the pellet as well. These hexagonal crystals are branching out but do not show any inclination to form dumbbell-like crystals. The spherical aggregates were visible only inside the pellet and much smaller. Experiments with doubled standard concentration showed dumbbell-like crystals on the surface after three days and hemispheric aggregates with a drop-like cavity after 7 days. These aggregates showed a similarity to spherical aggregates formed by interdiffusion in a gelatinous matrix and cut in the middle [Busch 98]. However, there were no clues that these aggregates originated from cut spheres (fig. 9.28 B-D). It rather resembled an accelerated dumbbell growth.

The following statements can be made about the interdiffusion of FAP into polyglycolide:

1. In addition to the dumbbell-like aggregates also big hexagonal rods and spherical aggregates could be observed. This led to the conclusion that the formation of dumbbell-like crystals does not automatically take place.
2. The dumbbell-like aggregates show a length-diameter proportion of 5:1, but the lengths and diameters are not always the same.
3. Similar dumbbell-like aggregates were found in other systems, e.g. carbonated apatites after conversion from amorphous carbonated calcium phosphate (see fig. 10.22 A). Dumbbell-like FAP-aggregates were also found far away from the polyglycolide surface. This leads to the assumption that a matrix effect can be excluded. Crystal defects and the remarkably lowered crystallization speed caused by interdiffusion could be responsible for this morphology.

The following statements can be made for the polyglycolide matrix:

1. With regard to the interdiffusion experiments and the crystallization phenomena, the polyglycolide matrix shows a high similarity to a collagen matrix and moreover is better definable.
2. The polyanionic structure of the polyester initially supports the crystallization onto the surface of the phosphate side of the pellet. The calcium ions are diffusing faster through the polymer.
3. After carrying out numerous interdiffusion experiments there is no support of the statement of crystal growth out from the pores of the polymer. The scanning electron micrographs rather reveal the opposite phenomenon: crystallization did not occur *in*, but *around* the pores.

In following experiments it was shown that the *CCDD*-device can also be used for the simulation of pathological mineralization phenomena. The influence of cholesterol and magnesium was examined. A dramatic change of crystal morphology could be observed after magnesium was added. This shows the possibility for the examination

of other inhibitors and the testing of substances preventing diseases such as arterosclerosis.

Since the seventies, polyglycolide has been used as biomaterial. The biocompatibility and bioresorbability of this polymer opens the possibility for the use as a suture material in surgery [Gerngroß & Becker 94]. Mechanically reinforced, it is used as bone screw material. Porous polyglycolide, which can be synthesized in a solid-state reaction from sodium chloroacetate [Epple & Herzberg 98] (see fig. 8.5), supports the cell supply. To avoid acidosis caused by the acidic degradation products of the bioresorbable polymer, several experiments were carried out to neutralize the released protons by calcium phosphates (HAP or TCP) [Mikos et al. 93]. After examination of the bone samples, a new calcium phosphate phase was developed. This carbonated calcium phosphate is nanocrystalline; it is, therefore, less thermodynamically stable than bone apatite. This would support a biological resorption. The mixture of the calcium phosphate and the porous polyglycolide was modified in a way that the acidic degradation products could be buffered. The pH value of the new composite material was within the physiological area even in pure water (see fig. 10.14). The biocompatibility test with murine osteoblasts in α -MEM medium showed proliferating cells forming extracellular matrix [Linhart et al. 01].

The amorphous carbonated calcium phosphate, which was developed in connection with the biocompatibility experiments, was examined and a variety of samples were synthesized. The carbonate content could be adjusted by the synthesis conditions. The conversion of amorphous carbonated calcium phosphates with high carbonate contents in pure water showed calcite crystallization. This crystallization speed could be slowed down in α -MEM; in the polyglycolide composite it was completely inhibited.

These conversion phenomena in α -MEM compared to physiological sodium carbonate solution were also examined with respect to brushite. In physiological Na_2CO_3 -solution, a mixture of OCP and HAP originated from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. At first, nanocrystalline HAP was formed, which later on converted into a HAP/OCP mixture. Subsequently, an uptake of carbonate ions could be observed, although there was no visible change in the powder diffractograms. Thermal analysis showed a decreasing water content within 120 hours. The crystal water content decreased to a minimum, which can be explained by the existence of occluded water. The content of

reaction water (resulting from the decomposition of acidic HPO_4^{2-} groups) decreased as well, but it was always observable. This leads to the assumption that a small content of acidic hydrogen phosphate groups in this calcium phosphate may be the most stable phase.

No carbonated apatite was formed by conversion from brushite in cell nutrition medium, except for OCP, which is the most stable phase in the physiological pH-range. The conversion was completed within 24 hours in α -MEM without fetal bovine serum. The reaction in a serum-containing medium was completed within 270 hours. These differences of the crystallization kinetics could also be confirmed by measuring the analytical Ca/P-relation.