

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Volkmar Jansson

Weiterentwicklung eines Perfusionskammer-Systems zur in-
vitro Untersuchung der Zytotoxizität degradierbarer metallischer
Knochenersatzwerkstoffe

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der
Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Czehner

aus Graz/Österreich

München 2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Bernd Wegener

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Piltz
Priv. Doz. Dr. Christian Prall

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung 12.11.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Therapie größerer Knochendefekte	5
1.1.1	Knochenersatz	5
1.1.2	Wichtige Anforderungen degradierbarer bzw. resorbierbarer Knochenersatzwerkstoffe.....	7
1.1.3	Resorbierbare und degradierbare Knochenersatzwerkstoffe.....	10
1.2	Zellkultur.....	15
1.2.1	2D –Zellkultur („Monolayer“).....	15
1.2.2	3D-Zellkultur – Tissue Engineering	16
1.2.3	Zell-Perfusionssystem	17
2	Aufgabenstellung	19
3	Material und Methode	20
3.1	Materialentwicklung und Versuchsmetalle	20
3.2	Versuchsaufbau	22
3.2.1	Perfusionskultur.....	22
3.2.2	Zellen.....	22
3.2.3	µ-Slides	24
3.2.4	Pumpe: Shear Stress (Schubspannung) + Parameter:.....	26
3.2.5	Kammer.....	29
3.2.6	pH-Wert.....	29
3.2.7	Aufbau des Verteilungssystems	30
3.2.8	Versuchsprotokoll – in vitro Zytotoxizitäts-Tests	36
3.3	Laborwerterhebung und Auswertung	39
3.3.1	WST-1 – Cell –Proliferationstest (Roche)	39
3.3.2	Pico Green DNA-Assay.....	40
3.3.3	Zellzahl	41
3.3.4	Statistische Methodik für Laborwerte	41
4	Ergebnisse.....	43
4.1	Zu testendes Material – Metalle	43
4.2	Vorversuche	44
4.3	In vitro Zytotoxizitäts-Test	45
4.3.1	Auswertung von Pico Green und WST-1	45
4.3.2	Auswertung der Zellzahl.....	57
5	Diskussion	69
5.1	Perfusionssystem und Parameter	69

5.2	Zytotoxizitätstests in vitro	71
5.2.1	Eisen (Fe).....	71
5.2.2	Silber (Ag)	73
5.2.3	Phosphor (P) 0,6% - FeP = Eisen-Eisenphosphit mit einem Fe ₃ P-Anteil von 0,6 %	76
5.2.4	Silizium (Si)	78
5.2.5	Wolfram (W)	80
6	Zusammenfassung	82
7	Anhang	85
7.1	Abkürzungsverzeichnis	85
7.2	Abbildungsverzeichnis	85
7.3	Literaturverzeichnis	87
8	Lebenslauf	96
9	Danksagung.....	97

1 Einleitung

1.1 Therapie größerer Knochendefekte

Der Ersatz großer Knochendefektzonen in Folge von komplizierten Frakturen, Pseudoarthrosen, infektbedingtem Knochenverlust oder in der revisionsendoprothetischen Versorgung stellt, trotz intensiver klinischer und wissenschaftlicher Bemühung nach wie vor ein ungelöstes klinisches Problem dar. Größere Defektzonen können auch im Rahmen einer Therapie von Knochenzysten und Knochentumoren entstehen. Gesunder Knochen besitzt ein hohes regeneratives Potenzial. Trotzdem führt dieses Potenzial bei großen Knochendefekten im Gegensatz zu kleinen Defekten oft zu keiner adäquaten Heilung [1].

Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts entstanden die ersten wissenschaftlichen Grundlagen zum Verständnis der Knochenregeneration, beschrieben durch Ollier [2]. Auch Axhausen beschäftigte sich umfangreich mit diesem Thema, ins besonders mit der Zwei-Phasen-Theorie [3-5]. Die Knochenregeneration verläuft in zwei osteogenetischen Phasen. Die erste Phase geht von präexistenten Zellen, den Osteoblasten aus und setzt bereits in den ersten Tagen ein. Die zweite Phase geht vom unspezifischen Bindegewebe aus, verläuft metaplastisch und kann mehrere Wochen andauern [6]. Als eine der Grundlagen zum Verständnis des Knochens wird auch das Wolff'sche Gesetz herangezogen. Es besagt, dass sich Gewebe entsprechend ihrer funktionellen Belastung differenzieren [7-11]. In den darauffolgenden Jahren fanden unzählige Untersuchungen im Bereich der Knochenregeneration, Knochentransplantation sowie in der Werkstoff- und Implantatentwicklung statt, wobei das Problem der Therapie großer Knochendefekte bis heute nicht zufriedenstellend gelöst werden konnte.

1.1.1 Knochenersatz

In der Humanmedizin werden traditionell Metallimplantate aus Stahl oder Titan verwendet, um z.B. Frakturen zu stabilisieren oder Korrekturosteotomien durchzuführen [12, 13]. Diese konventionell verwendeten metallischen Implantatmaterialien sind in ihrem mechanischen Verhalten deutlich steifer und starrer als Knochengewebe und übernehmen die lasttragende Funktion [13]. Die höhere Bruchfestigkeit und Steifigkeit dieser Implantate im Verhältnis zum kortikalen Knochen führt zu einer verminderten Weiterleitung der Druckbelastung, was das Bild der sog. Belastungsabschirmung (stress-shielding) zur Folge hat. Es kommt zu einer Beeinträchtigung der Osteosynthese im neu zu bildenden Knochen, da die physiologische Kraftdurchleitung unter Belastung Großteils nicht durch den sich regenerierenden Knochen geht, sondern durch das rigide Implantat. Dies führt zu einem bevorzugten Brechen des Knochens bei großer Belastung. Nach dem oben erwähnten Wolff'schen Gesetz fehlt dem

Knochen damit der physiologische Reiz, der mechanische Stimulus für den aktiven Knochenaufbau, sich der höheren Belastungen anzupassen. Die Veränderung der Knochenstruktur kann dabei soweit verändert bzw. geschwächt sein, dass er nach Entfernung des Implantats (Platten, Schrauben, etc.) erneut unter geringer Belastung bricht [13-17].

Gegenwärtig stehen in der orthopädisch-traumatologischen Chirurgie jedoch zahlreiche Knochenersatzwerkstoffe zur Verfügung, welche zur Überbrückung großer Knochendefekte ebenfalls eingesetzt werden können [18].

Es werden resorbierbare von nicht-resorbierbaren Implantaten unterschieden. Zu der Gruppe der **nicht resorbierbaren** (permanenten) Implantate zählt man massive Implantate wie z.B. Nägel, Platten und Schrauben. Diese verhindern ein Einwachsen des Knochens in die Materialstruktur und verbleiben unverändert im Körper bzw. werden im Zuge einer zweiten Operation wieder entfernt [19]. Für den Ersatz größerer Gelenke wie dem Knie- oder auch dem Hüftgelenk müssen die verwendeten Implantate über eine ausreichende Stabilität verfügen und verbleiben nach der Operation im Körper. Nur im Falle eines Implantatversagens (Lockerung, Bruch) oder einer Entzündungsreaktion muss das Material operativ entfernt oder ersetzt werden. Für diesen, vor allem orthopädischen Anwendungsbereich, ist der Markt mit einer Vielzahl von etablierten nicht resorbierbaren Implantatwerkstoffen abgedeckt. Hier kommen vor allem Metalle, Keramiken und Polymere zum Einsatz [20]. *Metallische Implantate* zeichnen sich vor allem durch eine hohe Festigkeit und Korrosionsbeständigkeit aus. Das ist auch der Grund weshalb sie sich so gut in lasttragenden Bereichen etabliert haben. Diese Implantate bestehen meist aus Titanlegierungen, Kobalt-Chrom-Legierungen oder Edelstahl [20]. *Polymere* sind aufgrund ihrer guten Formbarkeit im Bereich von Gelenkverbindungen etabliert und führen hier zu einer verbesserten Lastverteilung vom Implantat zum Knochen. Zusätzlich ermöglichen sie eine reibungsarme lasttragende Gelenkbewegung [20]. *Keramiken* finden ihren Einsatz seit über 40 Jahren als Gelenkersatz, welcher auf ihrer hohen Verschleißbeständigkeit beruht. Zu ihnen zählen unter anderem Aluminiumoxid (Al_2O_3) und Zirkonoxid (ZrO_2) [20].

Alternativ gibt es **resorbierbare** Implantate. Diese Implantate bleiben für einen bestimmten Zeitraum im Körper. Der Körper baut das Material im Laufe der Zeit immer weiter ab, während es durch neues körpereigenes Gewebe ersetzt wird. Damit entfällt die zweite Operation zur herkömmlichen Implantatentfernung und ihre damit verbundenen Risiken, wie Nachblutungen, Hämatombildung, Refraktur und auch Wundheilungsstörung [21-24]. Ein weiteres Problem der oben genannten nicht resorbierbaren Implantate kann die Entfernung selbst sein [19]. In diesem Fall drohen zusätzliche Gewebsverluste, Schmerzen und eine Behinderung des Heilungsprozesses. Somit könnte der Einsatz von resorbierbaren

Knochenersatzmaterialien sowohl für den Patienten als auch das Gesundheitssystem von Vorteil sein [25]. Folge dessen stellt diese Implantatgruppe nur einen temporären Knochenersatz dar [26].

Resorbierbare Implantate finden ihre Anwendung klinisch z.B. als Schrauben, Vliese bzw. sogenannte Scaffolds. Diese dienen als Trägerstruktur, ermöglichen ein Einwachsen der Knochen in das Implantatmaterial und werden mit der Zeit vollständig resorbiert. Hierbei ist das osteoinduktive rekombinante menschliche knochenmorphogenetische Protein 2 (rhBMP2) zu erwähnen. Das Protein rhBMP2 wird als osteogenes Differenzierungsmittel verwendet und fördert die schnelle Heilung von geschädigtem Knochengewebe. Dabei wird zum Beispiel ein Vlies (InductOS, Medtronic, Schweiz), das mit dem BMP beträufelt ist, in den Defekt eingebracht [27-29]. Diese Technik wird überwiegend bei Pseudarthrosen angewendet, z.B. an der Wirbelsäule oder der Tibia [30, 31].

1.1.2 Wichtige Anforderungen degradierbarer bzw. resorbierbarer Knochenersatzwerkstoffe

In den letzten Jahren wurde eine Bandbreite an alternativen Materialien, resultierend aus allogenen und synthetischen Materialien, entwickelt. Die Erwartungen an einen Knochenersatzwerkstoff sind eine gute biologische Verträglichkeit und größtmögliche mechanische Belastbarkeit. Er sollte außerdem die Knochenbildung sowie das Knochenwachstum fördern und einfach in der Anwendung sein. Um einen Knochenersatzwerkstoff im Rahmen einer operativen Nutzung heranziehen zu können, muss eine Sterilisierbarkeit gegeben sein, die seine strukturellen Eigenschaften nicht negativ beeinflusst [26, 32, 33].

Das ideale synthetische Knochenersatzmaterial sollte ein passendes Umfeld für die Gewebeentwicklung bereitstellen. Es ist beabsichtigt, die Adhäsion sowie das Wachstum und die Differenzierung der Zellen als auch das Knochenwachstum, die *in vivo* Vaskularisierung und die Osteointegration mit dem „Empfängerknochen“ zu begünstigen [34].

Kombiniert man biologische Elemente, wie mesenchymale Stammzellen oder Osteoblasten mit einem synthetischen Knochenersatzmaterial, so gilt es, diese Charakteristika zu verstärken, um möglicherweise den Knochenheilungsprozess zu fördern [34-39]. Zudem sollen keine lokalen und systemischen toxischen Reaktionen ausgelöst werden, die dem Gesamtorganismus schaden. Darunter versteht man z.B. immunologische Reaktionen, Nekrosen, karzinogene Effekte oder metabolische Veränderungen, die als toxische Effekte von Biomaterialien zusammengefasst werden können [40-42].

1.1.2.1 **Biologische Verträglichkeit bzw. Biokompatibilität**

Wintermantel et. al. beschreibt Biokompatibilität als die Verträglichkeit zwischen einem biologischen und einem technischen System. Das Ziel ist eine klinisch erwünschte Wechselwirkung, welche die Anpassung der chemischen, physikalischen, biologischen und morphologischen Oberfläche des Implantats oder des Werkstoffes an das Empfängergewebe zur Folge hat [43].

Schenk et al. unterscheiden demnach 6 verschiedene Grade der biologischen Verträglichkeit [44]:

1. Knochenimplantate, welche als **inkompatibel** beschrieben werden, führen zur Freisetzung von toxischen Substanzen oder Antigenen im Organismus. Dies ruft wiederum eine Immunreaktion hervor und kann zu Allergien, Fremdkörperreaktionen, Entzündungsreaktionen, Nekrosen oder Abstoßungsreaktionen führen.
2. **Biokompatibel** sind Werkstoffe, die Substanzen in einer für den Organismus nicht-toxischen Konzentration freisetzen, aber dennoch zu schwachen Fremdkörper- und Immunreaktionen führen können.
3. Als **bioinert** wird ein Werkstoff charakterisiert, wenn er keine toxischen Elemente freisetzt und somit auch keine Fremdkörperreaktion provoziert bzw. hervorruft.
4. Knochenimplantate, die als **bioaktiv** bezeichnet werden, führen zu einer positiven Interaktion mit dem Organismus. Eine gezielte Gewebsdifferenzierung ist möglich und als Folge davon entsteht Adhäsion von Knochen entlang der Grenzfläche zwischen Empfängergewebe und Implantat.
5. Werkstoffe mit **osteokonduktiven** Eigenschaften, stellen eine Leitschiene für den einwachsenden Knochen dar, dies jedoch nur in osteogener Umgebung.
6. **Osteoinduktiv** wirkende Materialien ermöglichen die Stimulation einer heterotopen Knochenneubildung. Induktive Implantate fördern die Knochenneubildung. Diese Ossifikation erfolgt im Rahmen von Substanzfreisetzungen, ausgehend vom Implantat, was zu einer Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen führt. Über die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen entwickeln sich auf diese Weise Osteozyten, was schlussendlich zur Knochenbildung führt [43, 44].

Inkompatible, biokompatible und bioinerte Werkstoffe zeigen in ihrer Gesamtheit keine positiven Interaktionen mit dem Organismus. Bioaktive induktive und osteokonduktive

Werkstoffe zeigen demgegenüber eindeutig Merkmale, die eine Knochenregeneration positiv beeinflussen.

1.1.2.2 Mechanische Belastbarkeit

Die mechanische Stabilität ist neben der Biokompatibilität ein weiterer wesentlicher Anspruch an einen Knochenersatzwerkstoff. Als Voraussetzung sind besondere mechanische Eigenschaften erforderlich. Es stehen schon zahlreiche resorbierbare Osteosynthesewerkstoffe zur Verfügung, welche alleine oder auch in Kombination mit anderen Substanzen Verwendung finden. Das Problem von fast allen bereits eingesetzten degradierbaren Implantaten ist hauptsächlich die mechanische Stabilität, da sie zumeist aus Polymeren oder Polymer-basierten Kompositen bestehen. Diese kommen mittlerweile schon bei kleineren Knochendefekten mit guter Heilung zum Einsatz, wie z.B. Poly-D-Lactid und Polyglycolid. Aufgrund der bislang unzureichenden Primärstabilität ist dies bei der Überbrückung großer, lasttragender Knochendefekte noch nicht adäquat gelungen [18, 26, 45]. Als Implantate mit höherer Festigkeit gibt es bereits degradierbare Schrauben aus Magnesium [46, 47].

Optimal wäre ein Implantat mit einer sofortigen postoperativen Übernahme der Last mit der Stabilität des ursprünglichen Knochengewebes. Das Material sollte mit einer Geschwindigkeit, welche näherungsweise der autologen Knochenneubildung entspricht, resorbiert werden bzw. degradieren. Der neugebildete Knochen müsste in weiterer Folge die mechanische Stabilisierung eigenständig übernehmen [48, 49].

Die Zielstellung bei der Versorgung eines großen Knochendefekts bzw. eines großen knöchernen Substanzverlustes ist, den Defekt solange stabil zu ersetzen, bis neu gebildeter, körpereigener Knochen in der Lage ist, die mechanische Funktion der Lastübertragung wieder selbstständig wahrzunehmen [48].

Zusammenfassend wäre somit ein Werkstoff erwünscht, welcher osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften in sich vereint. Er darf keine lokalen und systemischen toxischen Reaktionen auslösen, die dem Gesamtorganismus schaden. Die Resorption oder Degradation sollte näherungsweise der Geschwindigkeit der autologen Knochenneubildung entsprechen. Somit könnte der neue Knochen im optimalen Fall umgehend die Last des Körpers übernehmen [48, 49].

1.1.3 Resorbierbare und degradierbare Knochenersatzwerkstoffe

Durch ein permanentes Implantat können bei dem Patienten lebenslange Probleme entstehen. Dazu zählen unter anderem langfristige endotheliale Dysfunktionen und chronische Entzündungen mit lokalen Reaktionen [50]. Somit könnten durch die Verwendung eines resorbierbaren Implantats negative Langzeitfolgen reduziert bzw. ausgeschlossen werden, da bei dieser Gruppe von Implantaten die Implantatentfernung nach einer Zeit der Heilung nicht mehr erforderlich ist. Außerdem bleibt dem Patienten ein neuerliches OP-Risiko erspart. Durch das Vermeiden einer weiteren OP und die damit verbundenen Kosten ist auch ein ökonomischer Vorteil für das Gesundheitssystem darzustellen [13].

In der Chirurgie besteht ein hoher Bedarf an Knochenersatzmaterialien. Dieser kann häufig nicht ausreichend aus autologen Quellen gedeckt werden. Andere Transplantationsmaterialien allopathen oder xenogenen Ursprungs, bergen jedoch Risiken für Resorptions- und immunologische Abstoßungsreaktionen und haben zusätzlich noch ein hohes Risiko für übertragbare Infektionen. Anorganische Ersatzmaterialien zeigen wiederum Probleme hinsichtlich Materialermüdung, Korrosion, Degradation und Ablagerungen innerhalb des Gewebes [51-54].

Degradierbare Knochenersatzwerkstoffe unterliegen einer chemischen oder physikalischen Zersetzung, welche keine direkte biologische Reaktion benötigt. Hingegen werden resorbierbare Materialien durch eine biologische Reaktion aktiv vom Körper aufgelöst [45].

Die Hauptanforderungen an degradierbare Knochenersatzwerkstoffe sind die biologische Verträglichkeit und die mechanische Belastbarkeit. Sie werden ebenfalls durch ihre Degradationseigenschaften charakterisiert. Im optimalen Fall sollte ein idealer Knochenersatzwerkstoff sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften in sich vereinen. Neben diesen Anforderungen benötigt man auch eine einfache intraoperative Handhabung, Kosteneffektivität, eine strukturelle Ähnlichkeit zu Knochen und eine einfache Sterilisierbarkeit des Werkstoffes, ohne dabei deren wünschenswerte Eigenschaften zu verändern bzw. zu verschlechtern [1, 26].

Bezüglich Knochentransplantationen ist **autologes** Knochengewebe nach derzeitigem Stand der Literatur der Goldstandard. Diese besitzen alle erforderlichen osteogenen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften, die man für eine gute Heilung benötigt [55, 56]. Der Knochen wird meist aus dem Beckenkamm, dem Tibiakopf oder als Fibulatransplantat entnommen. Es handelt sich dabei um spongiösen und kortikalen Knochen [26]. Die verfügbaren Größen, Formen und auch die Anzahl an autologen Knochentransplantaten sind stark limitiert. Zudem gibt es eine bisweilen beträchtliche Morbidität im Zusammenhang mit der Gewinnung der Transplantate [57-59].

Aufgrund dieser Limitationen wurde der Focus auf die Suche nach einer adäquaten Alternative gelegt. Infolge dessen entstand eine große Bandbreite von verschiedenen **allogenen, xenogenen und synthetischen** Materialien, welche schon im klinischen Gebrauch sind. Sie haben den entscheidenden Vorteil, dass sie in unbegrenzter Menge zur Verfügung stehen. Naheliegende Bedenken äußern sich aufgrund der nachteiligen Denaturierung bei der Verarbeitung, welche zu einer reduzierten osteogenen Potenz führt und somit zu der fehlenden Osteoinduktivität.

Synthetische Knochenersatzmaterialien („synthetic bone graft substitutes“ = BGS) offerieren hingegen eine potenziell limitationslose Versorgung, ohne Risiko einer potenziellen Krankheitsübertragung oder Immunantwort. Sie bieten ebenfalls ein Optimum an osteokonduktiven Eigenschaften [60-62].

1.1.3.1 Synthetische Knochenersatzwerkstoffe

Bei den synthetisch resorbierbaren Implantatmaterialien sind Polymere (z.B. Polyglykolsäure, Polylaktidsäure, Polydioxanon) und Keramiken (Tricalciumphosphat, Hydroxyapatit, Calcit) etabliert.

Eine bereits sehr breite klinische Anwendung als zugelassene Medizinprodukte finden **synthetisch resorbierbare Polymere** [12, 63-67]. Sie sind klinisch als Osteosynthesematerial, Ankersysteme zur Stabilisierung in der Schulter- und Kreuzbandchirurgie oder Membranen für die Pharmakotherapie – *Drug Delivery* – (Geistlich, Baden-Baden, Deutschland und Novocart, Melsungen, Deutschland) etabliert und werden ebenfalls im wissenschaftlichen Bereich als Scaffold eingesetzt [12, 68-71]. *Poly-D-Lactid*, *Polyglycolid* und das *Polyactidglycolid* sind makromolekulare Verbindungen, die sowohl in hochkristalliner Form als auch in amorpher Form vorliegen können. Sie sind die wichtigsten Vertreter der Polymere [26, 72, 73].

Polymere besitzen aufgrund ihrer Grundstruktur nur eine geringe Primärsteifigkeit. Daher sind ihre lastaufnehmenden Anwendungsmöglichkeiten gegenwärtig auf Schrauben, Pins und Platten beschränkt [45, 63, 74]. Außerdem waren Fremdkörperreaktionen bei einigen Polymeren zu beobachten, was gegen eine gute Biokompatibilität spricht [75]. Bei der Degradation einiger Polymere entsteht ein saures Milieu, was als Grund für die Entzündungsreaktionen nach Implantationen diskutiert wird [63]. Ein saurer pH-Wert fördert des Weiterem die Aktivierung der Osteoklasten, welche den Knochenabbau fördern [76]. Durch die Beimengung von basischen Salzen (z.B. Kalziumkarbonat) konnte eine wesentliche Verbesserung der Biokompatibilität erreicht werden [63, 77]. Problematisch ist jedoch, dass Polymere bei Röntgenuntersuchungen nicht sichtbar sind. Erst durch eine zusätzliche Beimengung von Tetraalkaliumphosphat kann die Dichte und die damit

einhergehende Sichtbarkeit erhöht werden. Durch das hinzugefügte Tetrakalziumphosphat entsteht bei dessen Abbau ein leicht basisches Milieu. Der erhöhte pH-Wert wirkt sich wiederum positiv auf die Biokompatibilität aus [78].

Resorbierbare Osteosynthesysteme auf Polymerbasis sind auf Grund ihrer geringen mechanischen Stabilität nur für gering Belastete Frakturen im Hand- und Fußbereich einsetzbar. Sie bieten keine Alternative zu den nicht resorbierbaren, permanenten Materialien zur Behandlung von Frakturen an langen Röhrenknochen [13, 79, 80].

Als weitere Alternative stehen **keramische Werkstoffe** und **Biogläser** zur Verfügung. Aufgrund ihrer niedrigen mechanischen Belastbarkeit werden resorbierbare keramische Werkstoffe wie Calciumverbindungen und Bioglas [81, 82] nur als Füllstoff bei Knochentransplantationen, zur Therapie von Knochendefekten in Form von Gewebstücken und als Beschichtungsmaterial in der Endoprothetik eingesetzt [63]. Biogläser werden unter anderen auch in Form von Pasten oder als Granulat zur Therapie von Knochendefekten verwendet. Sie dienen dem Knochen als eine Art Brücke zwischen den einzelnen Knochenfragmenten und erzielen dadurch eine verbesserte Defektheilung [63, 82]. Sie bestehen vorzugsweise aus Calciumoxid, Siliziumoxid oder Phosphorpentoxid [83]. Zudem wird Bioglas als resorbierbares Trägermaterial im Tissue Engineering verwendet und wird klinisch hauptsächlich zur Reparatur von Haut, Knorpel oder Blutgefäßen genutzt [82]

Bei den keramischen Werkstoffen kommen überwiegend *Hydroxylapatit* und *Tricalciumphosphat* zum Einsatz. Diese Stoffe sind Substanzen, die auch im Knochen in kristallinen Verbindungen vorkommen. Beide Stoffe können sowohl biologisch als auch synthetisch gewonnen werden. Natürliche Vorkommen sind z.B. Korallen [45]. Eine gute Biokompatibilität ohne toxische oder immunologische Nebenwirkungen, ist bei Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat gewährleistet. Sie besitzen zudem auch gute osteokonduktive Eigenschaften. Häufig dienen keramische Werkstoffe als Trägermaterial für eine gesteuerte Freisetzung von bestimmten Wirkstoffen. Diese Werkstoffe sind aufgrund ihrer fehlenden plastischen Eigenschaften nur limitiert anwendbar, was die Auffüllung von komplexen dreidimensionalen Defekten technisch schwierig gestaltet [45, 63, 82, 84].

Eine weitere Gruppe von resorbierbaren Implantaten stellen **Kompositwerkstoffe** dar. Sie können sowohl organische als auch anorganische Bestandteile beinhalten. Kompositwerkstoffe bestehen aus einer Kombination von zwei oder mehr Einzelkomponenten, wie z.B. keramischen Werkstoffen mit natürlichen Polymeren kombiniert [85]. Das führt dazu, dass die Materialeigenschaften sehr stark von den Einzelkomponenten abhängig sind. Kompositwerkstoffe sind aufgrund der zu verwendenden Materialgruppen

nicht für lasttragende Funktionen geeignet. Das liegt an der unzureichenden mechanischen Stabilität der Werkstoffe [45].

Von einigen Arbeitsgruppen wird intensiv an degradierbaren Implantaten für lasttragende Knochendefekte gearbeitet. Eine zukünftige zusätzliche Alternative könnten auch **Metall-Keramik-Komposite** darstellen [86].

Neben den Polymeren, Keramiken und Kompositwerkstoffen wurden vorrangig die beiden Metalle Magnesium und Eisen für die Eignung als Implantatmaterial untersucht. Verarbeitet zu Schäumen bieten die beiden Metalle Eigenschaften, die den mechanischen Eigenschaften von kortikalem Knochen ähneln [63].

1.1.3.2 Degradierbare metallische Legierungen

In der Vergangenheit war die Zielsetzung, eine möglichst hohe Korrosionsfestigkeit der Legierungen zu erreichen.

Degradierbare metallische Legierungen rücken als interessante Materialalternative für Knochenersatzwerkstoffe zunehmend in den Focus. Sie besitzen eine deutlich höhere lasttragende Eigenschaft als die gängigen degradierbaren Knochenersatzstoffe wie z.B. anorganische Calciumphosphatzemente, keramische Werkstoffe und Biogläser. Die mechanische Stabilität metallischer Legierungen ist hierbei von Vorteil [87].

Aktuell wird bei der Entwicklung von Implantaten das Augenmerk auf den Abbaumechanismus der Legierungen gelegt. Das Ziel ist, eine gewünschte und steuerbare Korrosion zu erhalten [46, 48, 87]. Zusätzlich soll der Werkstoff konnektierend und offenporig sein. Diesbezüglich hat sich eine Porenweite von 100 – 500 µm für eine gute Vaskularisierung bzw. für das Einwachsen der Osteonen als günstig erwiesen [88, 89]. Das Ziel, den E-Modul der Legierung dem des spongiösen Knochens anzunähern, um eine mechanische Stimulation und somit das Einwachsen des neu gebildeten Knochen zu ermöglichen, stellt eine große Herausforderung dar [90-95].

Für Witte et. al. ist das Erdalkalimetall **Magnesium** von wesentlicher Bedeutung. Für ihn steht die Beurteilung der Toxizität sowie die Änderungen des lokalen pH-Wertes und dessen lokale Phänomene aufgrund der Degradation im Focus [46, 63].

Derzeit werden Magnesium-basierte zelluläre Legierungen vor allem in der Kardiologie und der Unfallchirurgie klinisch eingesetzt [96-100]. Früh wurde klar, dass sich Magnesium sehr spröde verhält, limitierte mechanische Eigenschaften aufweist und zu schnell im Körper degradiert [97]. Da Magnesium ein hohes elektrochemisches Potential besitzt, wird das

Korrosionsverhalten durch eine Vielzahl von Umgebungsbedingungen beeinflusst – dadurch wird es schwer einschätzbar [101]. Zusätzlich werden bei der Korrosion Magnesiumionen freigesetzt [63, 98]. In einer Studie mit Meerschweinchen konnte jedoch kein allergisches Potential auf die Ionen nachgewiesen werden [102]. Durch die schnelle Korrosion von Magnesium werden große Mengen an Gasblasen erzeugt. Diese wiederum schränken die Anwendung in intraossären Bereichen stark ein. Die Korrosionsgeschwindigkeit konnte durch eine Modifikation der Legierungen mit u.a. seltenen Erden erheblich gesenkt werden [87]. Es erfolgte der Nachweis, dass eine stimulierende Wirkung auf die Osteogenese durch eine im Knochen platzierte Magnesiumplatte erzielt wurde [87].

Von Heublein et al. wurde im Jahr 2000 begonnen, die Charakteristiken der Degradation von Magnesiumimplantaten zu untersuchen. Ziel war die Entwicklung kardiovaskulärer Stents. Seither wurden 3 Generationen eines absorbierbaren Metallstents durch BIOTRONIK erzeugt, mit denen im Vergleich zu herkömmlichen, permanenten Stents gleichwertige Resultate erzielt wurden [97, 99, 103-105]. Vor kurzer Zeit wurde das erste Produkt für den orthopädischen Gebrauch entwickelt. Die MAGNEZIX –Schraube (Synthelix, Hannover, Deutschland) ist eine Fraktur-Kompressions-Schraube mit dem Prinzip einer Herbert-Schraube, welche Anfang 2013 CE-zugelassen wurde. Die Schraube hat ein Gewicht von etwa 150 mg und besteht aus einem Magnesiumanteil von mehr als 90 Prozent. Die Schraube wird mit einem pulvermetallurgischen Prozess hergestellt, hat eine Korngröße von unter 10 µm. Die oben genannte H₂-Gas Bildung konnte durch eine geringe Degradationsrate auf ein Minimum reduziert werden. MAGNEZIX besitzt osteokonduktive Eigenschaften [106-108]. Die Schraube wird durch Korrosion im Körper abgebaut. Dadurch entsteht ein basisches Milieu um das Implantat herum, welches antiinfektiös wirkt [109, 110].

Zukünftig steht wohl ein größeres Angebot an MAGNEZIX-Kompressionsschrauben zur Verfügung, außerdem wird zur Zeit an Magnesium-Pins und an Implantaten für die PIP-Athrodese gearbeitet [111, 112].

Trotz der Weiterentwicklungen in den letzten Jahren sind einige auf Magnesium basierende Implantate noch mit Problemen behaftet. Das Sortiment dieser Art von Implantaten ist immer noch limitiert, v.a. durch die vergleichsweise hohen Korrosionsraten und durch den Verlust der mechanischen Integrität bei pH-Levels zwischen 7,4 und 7,6 [113]. Aufgrund dessen bieten Magnesiumimplantate bei der Versorgung von **lasttragenden** Knochendefekten noch keine adäquate Alternative.

Damit die lasttragende Funktion des Implantats und eine Versorgung von größeren Knochensubstanzverlusten gewährleistet werden können, wird eine deutlich langsamere korrosionsbedingte Abbaugeschwindigkeit gewünscht. Durch das Aufweisen einer

langsameren Degradation im physiologischen Milieu erscheinen Legierungen beispielsweise auf Eisenbasis vielversprechend [114]. Im Gegensatz zu Magnesium werden beim Abbau von Eisen keine Gasblasen gebildet. Dadurch können mögliche Gasembolien vermieden werden, was einen wesentlichen Vorteil für interossäre Implantate bedeuten könnte [114].

Um strukturelle Unterstützung bei der Ausfüllung knöcherner Defekte gewährleisten zu können, kommen routinemäßig Knochentransplantate zur Anwendung.

1.2 Zellkultur

Für das Verstehen von molekularen und zellbiologischen Vorgängen bei der Knochenregeneration bildet die Zellkultur eine geeignete Voraussetzung. Eine Zellkultur, welche aus dem Ursprungsgewebe isoliert wird und danach in Kultur genommen wird, bezeichnet man als Primärkultur. Die Kultivierung dieser Zellen ist nur über eine kurze Zeitspanne möglich. Man betrachtet die Primärkultur nur so lange als solche, bis sie zum ersten Mal subkultiviert wird.

Sekundärkulturen sind sogenannte Subkulturen. Diese bilden die Zelllinien. Das sind Zellen einer Gewebeart, die sich im Laufe einer Zellkultur teilen bzw. fortpflanzen können [115, 116]. Für die kultivierten Zellen ist es wichtig, in einer möglichst ursprungsnahen Umgebung zu wachsen, um ihre organotypischen Eigenschaften zu erhalten.

Ein dreidimensionales Gerüst bieten Biomaterialien. Hiermit ist es möglich ein Gewebe zu formen oder ein Gewebswachstum zu unterstützen. Es können, unter anderem, autologe isolierte Knorpelzellen in einer resorbierbaren Faserstruktur verteilt werden und dabei ein neues Gewebe ausbilden. Die benötigten Zellen werden mittels einer Biopsie gewonnen. Um jedoch eine ausreichende Menge an autologen Zellen zu erhalten, müssen diese vermehrt werden. Benötigt man jedoch eine relative hohe Zelldichte in den Kulturen, ist wiederum eine sogenannte Perfusionstechnik erforderlich, um die speziellen Kulturbedingungen sowohl zu simulieren als auch zu stabilisieren [53].

1.2.1 2D –Zellkultur („Monolayer“)

Die konventionelle, zweidimensionale Zellkultur besteht meist aus einer Glas- oder Plastikunterlage. Trotz der meist hydrophoben Oberfläche dieser Unterlagen zeigen viele Zellen eine hohe Affinität. Für Zellen mit minderer Adhärenzfähigkeit gibt es Unterlagen mit speziellen Beschichtungen. Diese enthalten als Komponenten extrazelluläre Matrix wie Fibronectin und Laminin [115, 116].

Auf dieser Unterlage breiten sich adhärente Zellen als einzellige Schicht aus und wachsen zu einem Zellrasen heran, einem sogenannten „Monolayer“. Die Teilungsfähigkeit der Zellen

nimmt ab, sobald der Zellrasen sehr dicht wird und die Zellen konfluent sind. Sie wachsen nicht übereinander weiter, da die Zell-Zell-Interaktion gestört ist, die Zellen nicht mehr adhären können und nicht mehr adäquat mit Medium bzw. Nahrung in Kontakt kommen. Diese Form der Zellkultur stellt die reale Situation im Gewebe bzw. in den Organen nur sehr unzureichend dar. Die Zellen verlieren die Fähigkeit zur Synthese bestimmter Enzyme, wie auch die Zell-zu-Zell Kommunikation. Dadurch gehen ihre gewebetypischen Merkmale und ihre ursprüngliche Zellarchitektur sehr schnell verloren [117, 118].

Um eine aussagekräftige Information aus den *in vitro* Testungen bezüglich der *in vivo* Situation zu gewinnen, versucht man dreidimensionale Strukturen zu etablieren. Im menschlichen Körper wachsen die Zellen in Zellverbänden, welche sich nicht flach, sondern dreidimensional darstellen. Aufgrund dessen lassen sich Experimente in einer Monolayer-Kultur nur eingeschränkt auf den lebenden Organismus übertragen.

2D-Zellkulturen haben sich jedoch in den letzten Jahren aufgrund vergleichsweise schneller und kostengünstiger zellbiologischer Analyse bewährt. Für Ergebnisse mit höherem Informationsgehalt und Schlussfolgerungen über die Interaktion der Zellen stellt eine Monolayer-Kultur jedoch keine ausreichende Grundlage dar. Zellen die auf einer 2D-Substratplatte migrieren, haben eine andere Form bzw. eine andere Verteilung der transmembranären Adhäsionsproteine im Vergleich mit gleichartigen Zellen in einem 3D-System [119-121]. Eine zweidimensionale Zellkultur hilft eine Basisaussage über das Verhalten der Zelle zu treffen, jedoch gibt sie keine Aussage über das Verhalten der Zelle im Gewebe oder in einer Struktur.

1.2.2 3D-Zellkultur – Tissue Engineering

Im Bereich der Biomedizin ist das Tissue Engineering ein sich schnell entwickelndes Wissenschaftsfeld [122]. Im Allgemeinen versteht man unter Tissue Engineering ein, interdisziplinäres Forschungsgebiet, welches sich zur Aufgabe macht, einen künstlichen Gewebeersatz aus vitalen Komponenten zu erstellen. Die Entwicklung bioartifizieller, dreidimensionaler Konstrukte aus autologen Zellen, zellulärer Matrix und Biomaterialien steht hierbei im Vordergrund [53, 123]. Zellen interagieren innerhalb eines Gewebes mit ihren Nachbarzellen, wie auch mit der extrazellulären Matrix, über mechanische und biomechanische Brücken. Zell-Zell und Zell-Extrazelluläre Matrix Interaktionen können sich in einem dreidimensionalen Kommunikationsnetzwerk ausbilden, welches die Spezifität und die Homöostase des Gewebes aufrechterhält [124]. Dadurch entsteht eine Annäherung der *in vitro*-Situation an die *in vivo*-Verhältnisse. Mit der 3D-Zellkultur versucht man die *in vivo*-Situation möglichst realitätsgetreu wiederzugeben. Außerdem besteht hiermit die Möglichkeit, ein biologisches System von Zellen und Organismus naturgemäß nachzustellen

und der wissenschaftliche Stellenwert von zellbasierten Tests wird darüber hinaus ebenfalls verbessert [125]. Gegenwärtig werden dreidimensionale Zellkulturen schon in einem breiten Spektrum in biologischen Studien eingesetzt. Vor allem zur Testung von Zelladhäsion, Zellmigration und epithelialer Morphogenese. 3D Zellkulturen gewähren tiefere Einblicke in die Zelladhäsion wie auch in die Zellmigrationsmechanismen [121].

Knöcherne Gewebegeneration erfordert die Interaktion von drei grundlegenden biologischen Elementen: Zellen, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren und ein Gerüst aus extrazellulärer Matrix. Die 3D-Zellkultur eröffnete neue Möglichkeiten zur *in vitro* Züchtung artifizierender autologer Knochenersatzmaterialien aus einer kleinen Anzahl vitaler autologer Zellen. Mit therapeutischen Lösungsansätzen für die gewebe-technisierte Reparatur von Knochendefekten wird versucht, den natürlichen Prozess der Knochenheilung nachzuahmen. Die Zellen werden unter geeigneten Kulturbedingungen isoliert, vermehrt und expandiert. Die Zellen müssen fähig sein, sich in Osteoblasten zu differenzieren, induktiv zu wachsen und Differenzierungsfaktoren zu bilden, um die zelluläre Anlagerung, Migration und Proliferation zu unterstützen. Mit Hilfe dieser 3D-Gewebe-technik können je nach Bedarf, definierte, dreidimensionale gewebe- und organotypische Strukturen für spätere *in vivo* Implantation geformt und hergestellt werden [126-128].

1.2.3 Zell-Perfusionssystem

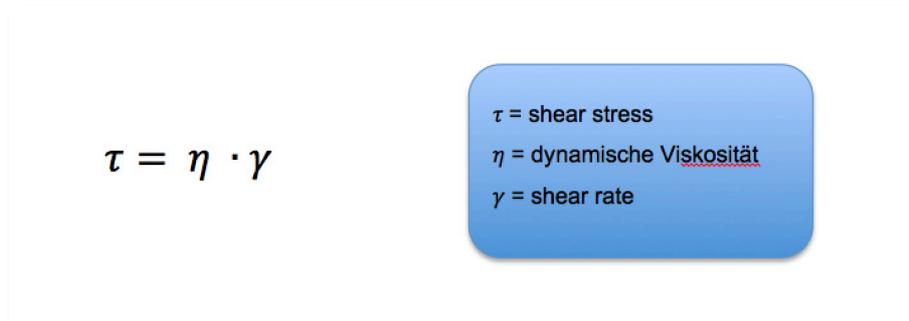
Wie oben beschrieben, können in einem statischen Milieu einer Kulturschale fast unbegrenzt Zellen vermehrt werden. Dies reicht jedoch für die Generierung von komplexen Geweben in dreidimensionalen Trägern nicht aus. Das statische Milieu führt zu einer fehlerhaften Umverteilung des Mediums und so zu einer schlechten Sauerstoff- und Nährstoffverteilung. Diese Umstände beeinflussen die Differenzierung der Zellen und es entstehen permanent schädliche Stoffwechselmetabolite. Die Metabolite werden in einem statischen System nicht kontinuierlich entfernt [116].

Ein **Perfusionssystem** dient dazu, das zu untersuchende Material kontinuierlich zu umfließen und konstant mit Wirkstoffen, Nahrung oder Puffer zu versorgen. Wichtig ist vor allem der Abtransport potentiell entstandener Abbauprodukte. Im Rahmen dieses Perfusionssystems gibt es die Möglichkeit verschiedene Parameter zu beeinflussen. Diese Parameter beeinflussen ihrerseits wieder die Zellen im System. In diesem Zusammenhang sind der Shear Stress, der Perfusionsdruck, die Flussrate, die Beschaffenheit des Materials, der Gesamtwiderstand, das Medium mit den verwendeten Zusätzen (Puffer...) und die Zusammensetzung der Atmosphäre von Bedeutung. Es existieren zusätzlich auch Systeme, die eine mechanische Belastung wie Druck, Kontraktilität und Zug simulieren.

1.2.3.1 Shear Stress

Shear Stress ist die Kraft, die tangential zur Oberfläche wirkt und eine Deformation der Zellschicht verursacht [129]. Flüssigkeiten haben für den Transport von chemischen und biochemischen Elementen einen wichtigen Stellenwert in der Biologie [130]. In der Morphogenese, erleben muskuloskelettale Zellen intrazellulären Zug und es wirken kontraktile Kräfte in mikroskopischen Skalen. Ebenfalls sind Zellen extrazellulären Kräften wie z.B. statischen Kräften, die durch extrazelluläre Matrix hervorgerufen werden oder aus dem mikroskopischen Fluss resultieren, ausgesetzt. Deshalb ist der biologische Fluss entscheidend für viele Aspekte des Zellverhaltens und verantwortlich für physikalische Stimuli und Signalübertragungswege [129, 131].

Biomechanische Kräfte, darunter der Shear Stress, beeinflussen die Genexpression von Zellen. Das Shear Stress Responde Element (SSRE) taucht in der Promotor-Region vieler Gene auf und hat großen Einfluss auf die Entwicklung der Zelle [132]. Die Shear Rate beschreibt das Geschwindigkeitsprofil des verwendeten Mediums. Shear Stress und Shear Rate stehen in folgenden Bezug zueinander.

$$\tau = \eta \cdot \gamma$$


τ = shear stress
 η = dynamische Viskosität
 γ = shear rate

Formel 1: Berechnung des Shear Stress in Abhängigkeit zur Shear Rate (Quelle -ibidi, Martinsried, Germany)

2 Aufgabenstellung

Bei dieser Arbeit handelt es sich um ein Teilprojekt in einem vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördertes Forschungsprojekt. Im Rahmen des Innovations-Wettbewerbs zur Förderung der Medizintechnik sollen degradierbare Knochenersatzimplantate für lasttragende Defekte entwickelt werden. Dazu gab es bereits Vorversuche, bei denen die Legierungen definiert wurden. Diese verschiedenen Legierungen werden nun auf ihre Zytotoxizität überprüft. Die zu testenden Legierungen entstanden in den Vorversuchen des Gesamtprojekts und werden vom Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung (IFAM) aufbereitet.

Dieses Projekt ist eine interdisziplinäre Gemeinschaftsarbeit nachstehender Institute.

1. Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum der Universität, Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation, Marchioninistraße 15, 81377 München
2. Fraunhofer-Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM), Institutsteil Dresden, Winterbergstraße 28, 01277 Dresden
3. Fraunhofer-Institut für Keramische Technologien und Systeme (IKTS) Institutsteil Dresden, Winterbergstraße 28, 01277 Dresden
4. Ludwig-Maximilian-Universität München, Klinikum der Universität, Anatomische Anstalt II, Pettenkoferstraße 11, 80336 München
5. InnoTERE GmbH, Meißner 191 Straße, 01445 Radebeul

Ziel dieses Teil-Projekts ist die Etablierung eines Systems zur zytotoxikologischen Testung von degradierbaren Metallen. Die Voraussetzung dafür sind konstante Versuchsbedingungen, die durch klar festgelegte und vor allem messbare Versuchsparameter hergestellt werden, um eine gleichmäßige Belastung der Zellen in den Versuchsansätzen zu gewährleisten.

Die Aufgabe im Rahmen dieses Projektes ist, eine zellbiologische Testung vorzunehmen und in diesem Zusammenhang ein Testsystem zu etablieren, in welchem man die mechanischen Parameter genau definieren kann. Im Vordergrund steht dabei die Evaluierung eines Testsystems zur Beurteilung der Zytotoxizität mit einer konstanten Flussrate und die Entwicklung eines praktikablen, preiswerten und reproduzierbaren Test-Setups. Das System soll eine konstante Flussrate, die mit jener im Knochen vergleichbar ist, gewährleisten. Zusätzlich soll sich auch die mechanische Belastung der Zellen gleichbleibend verhalten.

Damit könnten die Ergebnisse möglichst realitätsnah dargestellt werden und sind jederzeit reproduzierbar.

Das neu entwickelte, auf die Versuchsbedingungen angepasste Perfusionssystem, hat zur Aufgabe, ein *in vivo* System möglichst realitätsnah *in vitro* nachzustellen, um die Auswirkung auf die verschiedenen Zellgruppen möglichst organismusnah nachzustellen und überprüfen zu können. Im anschließenden Versuch wird die Auswirkung der Metalle auf die verschiedenen Zellgruppen bezüglich Zellproliferation, Zellviabilität, Zelltoxizität und Zellzahl getestet.

3 Material und Methode

3.1 Materialentwicklung und Versuchsmetalle

Aufgabe dieses Teilabschnittes ist die Testung der Zytotoxizität.

Die Metalle werden vom Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und angewandte Materialforschung (IFAM) gefertigt und bezüglich ihrer Materialeigenschaften charakterisiert. Für die Untersuchung der Zytotoxizität werden tablettenförmige Proben mit einer durchschnittlichen Oberfläche von $194,14 \text{ mm}^2$ (von $149,218 \text{ mm}^2$ bis $211,01 \text{ mm}^2$) hergestellt. Sie wiegen im Durchschnitt $0,877438 \text{ g}$ (von $0,437 \text{ g}$ bis $1,129 \text{ g}$). Die Ausmessung und Berechnung der Masse und der Oberfläche wird durch Errechnung Umfang, Höhe und Radius und einer Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) ermittelt. Die Herstellung erfolgt durch ein pulvermetallurgisches Sinterverfahren (Fraunhofer IFAM). Die Desinfektion wird bei 180°C im Heißluftsterilisator für 30 Minuten erreicht.



Abbildung 1: Metallplättchen auf einer Waagschale in der Präzisionswaage (Sartorius, Deutschland)

3.2 Versuchsaufbau

3.2.1 Perfusionskultur

Um eine möglichst aussagekräftige Information der *in vivo* Situation zu erhalten, wurde eine Perfusionszellkultur mit definierten Parametern entwickelt. Damit konnte der Einfluss verschiedener, eisenbasierter Legierungen unter permanenten Abtransport der gelösten Korrosionsprodukte untersucht werden.

3.2.2 Zellen

Vorversuch:

Um den Einfluss der Metalllegierungen auf verschiedene Zellarten zu untersuchen, wurde als Modell eine statische Monolayerkultur etabliert. In den Vorversuchen fiel die Entscheidung auf eine stabile und robuste Zelllinie, die humanen Fibroblastenzelllinie HFIB (Provitro GmbH, Berlin, Deutschland).

Fibroblasten sind sehr widerstandsfähig und lassen sich gut in der Zellkultur kultivieren, was für die Untersuchung der Praktikabilität des Systems von Vorteil ist.

Hauptversuch:

Im Hauptversuch kommen folgende vier Zelllinien zur Anwendung:

1. Osteoblasten der Zelllinie HOB (Provitro, Berlin, Deutschland),
2. Osteosarkomzellender Zelllinie MG-64(CLS-Cell Lines Services, Eppelheim, Deutschland),
3. Humane mesenchymale Stammzellen der Zelllinie HMSC (Lonza, Verviers, Belgien) und
4. Fibroblasten der Zelllinie HFIB (Provitro, GmbH, Berlin, Deutschland).

10 Tage vor dem Versuchstag erfolgt das Auftauen der Zellen. Die Osteoblasten und die humanen mesenchymalen Stammzellen werden in den Passagen 5 bis 7 in den Versuch gebracht, da bei höheren Passagen die Gefahr der Dedifferenzierung besteht. Die Fibroblasten werden in den Passagen 5 bis 10, die Osteosarkomzellen in den Passagen 25 bis 30 etabliert, entsprechend Standard Operating Procedure des Labors (SOP).

Im Inkubator erfolgt die Kultivierung der Zellen bei 37°C Atmosphärentemperatur mit 9,5% Sauerstoff und 5% CO₂-Begasung.

Für die Fibroblasten, Osteoblasten und Osteosarkomzellen kommt ein Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Medium; Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) zur Anwendung. Es werden 500ml DMEM- Medium unter Zusatz von 50 ml 10% fetalem Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich) und 3 ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) vermischt. Die humanen mesenchymalen Stammzellen werden in einem Alpha MEM-Medium (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich) aufgetaut. Dieses Medium enthält zusätzlich Nucleoside und wird zur Kultivierung von Stammzellen empfohlen (SOP). Nach 3 - 4 Tagen erfolgt der erste Mediumwechsel. Nach dem genannten Zeitraum werden alle Zelllinien mit DMEM-Medium kultiviert. Der Mediumwechsel wird zweimal wöchentlich vorgenommen.

Fibroblasten werden gemäß SOP bei 80% Konfluenz und die HMSCs bei 70% Konfluenz passagiert,. Dies erfolgt mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland).

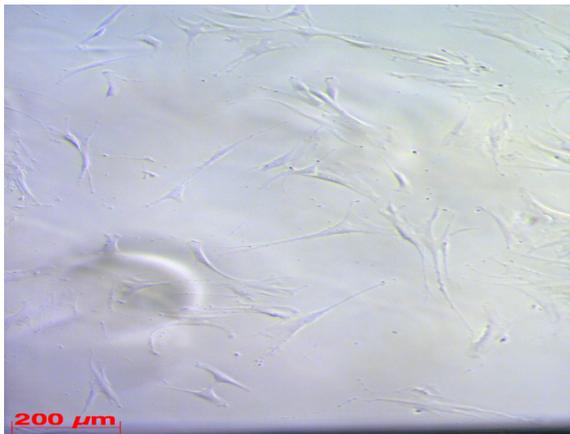


Abbildung 4: Humane mesenchymale Stammzellen

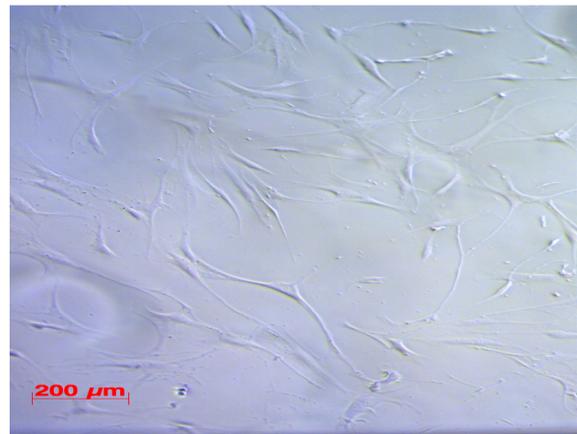


Abbildung 5: Osteoblasten

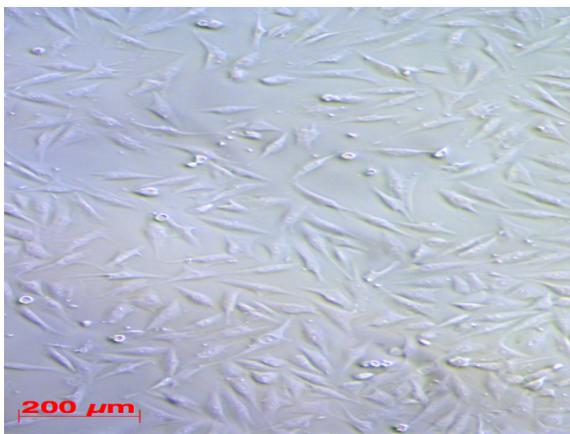


Abbildung 6: Osteosarkomzellen

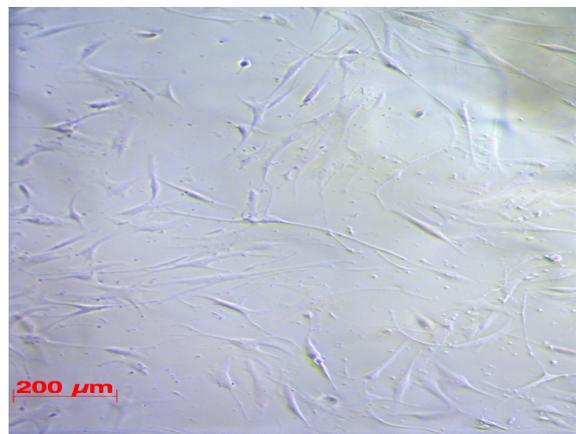


Abbildung 7: Fibroblasten

3.2.3 μ -Slides

Vorversuch:

Die μ -Slides I Luer (ibidi, Martinsried, Deutschland) sind für Zellkulturen konstruiert, die unter Perfusion und verschiedenen Durchflussbedingungen kultiviert werden. Durch ihre spezielle Konstruktion ist es möglich, den Durchfluss, das Volumen, die Shear Rate und den Shear Stress zu variieren. Der Boden der Slides weist eine sehr niedrige Doppelbrechung und eine Autofluoreszenz auf, welche vergleichbar mit Glas ist.

Die oben genannten Zellen werden in μ -Slides gesetzt. Es werden 5 verschiedene Ausführungen des μ -Slides produziert, welche sich lediglich in der Kanalhöhe sowie dem Kanalvolumen unterscheiden. Von diesen 5 Slides kommen, aufgrund des Volumens und des damit zusammenhängenden Shear Stress, nur zwei für die folgenden Testungen in Frage. Diese zwei Slides werden im Vorversuch evaluiert. Die Etablierung eines Slides folgt im Hauptversuch: „ μ -Slide I^{0.2}Luer“ und „ μ -Slide I^{0.4}Luer“.

Als allgemeine Regel gilt: Niedrige Kanäle eignen sich eher für Strömungsanwendungen. Hohe Kanäle eignen sich eher für die statische Zellkultur (ibidi). Die Entscheidung fiel aufgrund der eigenen Erfahrungen in den Vorversuchen auf den μ -Slide I^{0.2}Luer.

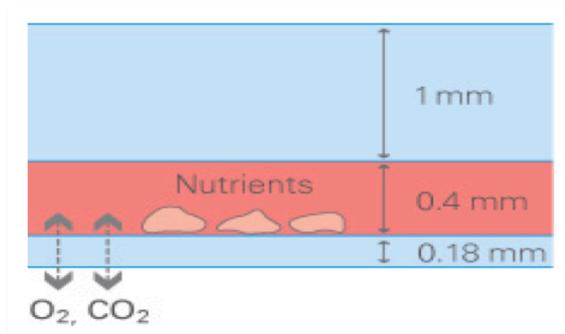


Abbildung 8: Der Gasaustausch findet hauptsächlich über den Plastikboden statt, was zur Folge hat, dass die Slides nicht direkt aufliegen dürfen (Quelle – ibidi, Martinsried, Germany)

Im Vorversuch kamen unterschiedliche Zellzahlen zur Kultivierung der Slides zur Anwendung: 5.000, 10.000, 20.000 Zellen wurden jeweils auf 2,5 cm² Wachstumsfläche für vier Tage kultiviert.

Hauptversuch

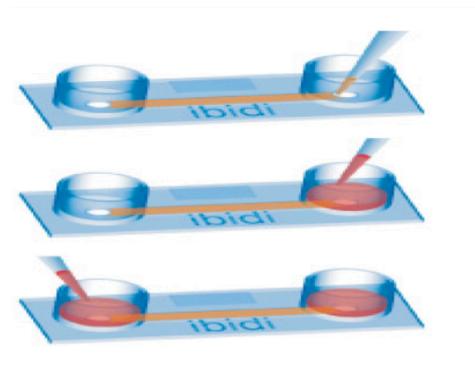
Wie oben beschrieben, wurde die Zellzahl auf 10.000 pro 50 μ l festgelegt. Mit dieser definierten Menge wird das μ -Slide I^{0.2}Luer befüllt. Ihre Höhe beträgt 200 μ m und ihr Kanalvolumen somit 50 μ l. Nach der Kultivierung erfolgt die Fixierung in speziellen Halterungen.



Abbildung 9: Die μ -Slides sind in den Halterungen fixiert. Die Halterungen haben am Boden eine Öffnung um die Zellatmung in den Kanälen zu garantieren.

Kultivieren der μ -Slides:

Die μ -Slides werden mit kontinuierlichem Fluss mit den Zellen gefüllt, ohne Überstand in den seitlichen Reservoirs.



1. Schritt: Befüllen des Slides mit einer Zellsuspension
2. Schritt: Ein Reservoir mit zellfreiem Medium befüllen
3. Schritt: Befülle das zweite Reservoir mit der selben Menge an zellfreiem Medium

Abbildung 10: Kultivierung mittels Befüllung eines μ -Slide mit Zellen (ibidi, Martinsried, Germany)

Die Zellen benötigen drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Begasung in einem Inkubator um adhären zu werden. Die Sterilität wird durch 2 Abdeckkappen über den Reservoirs gewährleistet. Nach dem Adhären der Zellen erfolgt die Befüllung der Reservoirs mit 60 μ l Medium pro Öffnung.

Generelle Maße:

Anzahl der Kanäle:	1
Kanallänge:	50 mm
Kanalbreite:	5,0 mm
Volumen pro Reservoir:	60 μ l
Wachstumsfläche:	2,5 cm ² pro Kanal

Tabelle 2: Maße des μ -Slide LueribiTreat

3.2.4 Pumpe: Shear Stress (Schubspannung) + Parameter:



Abbildung 11: Das System besteht aus: der Pumpe selbst (re.), einem Computer für das Pump Control System (li.), einer Trockenflasche (gelb), Luft-Zufuhr-Schläuchen und einem elektrischen Verbindungskabel

Gearbeitet wird mit einer Air-Pressure-Pump (ibidi GmbH, Martinsried). Das Pumpsystem gewährleistet den kontinuierlichen Fluss im System, um den physiologischen Fluss im spongiösen Knochen nachzustellen [133].

Die Flussrate wird mit 0,09 ml/min gewählt. Das System ermöglicht dann die Modifikation und berechnet daraus automatisch die dazugehörigen Parameter, wie z.B. Shear stress und Shear rate (Schubspannung und Durchflussmenge). Shear Rate und Shear Stress bleiben konstant. Der Perfusionsdruck ist variabel und passt sich den Konditionen und der gewünschten Flussrate an.

Zusätzlich anzugeben sind: Viskosität, verwendeter Luer-Slide und der Kalibrierungsfaktor.

$$\eta = v \cdot \rho = \frac{1}{\Phi}$$

η = dynamische Viskosität
 v = kinetische Viskosität
 ρ = Dichte
 Φ = Fluidität

Formel 2: Die Berechnung der dynamischen Viskosität erfolgt gemäß dieser Formel. (ibidi, Martinsried, Germany)

Für den Versuch ergibt sich daraus die Viskosität des Nährmediums, welche bei 37°C Außentemperatur und 10%-igen Serum 0,007 (dyn*s)/cm² beträgt [134].

$$\tau \left[\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2} \right] = \eta \left[\frac{\text{dyn} \cdot \text{s}}{\text{cm}^2} \right] \cdot 512,9 \cdot \Phi \left[\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right]$$

Formel 3: Die Berechnung des Shear Stress für das verwendete μ -Slide Luer^{0.2} mit einer Viskosität von $\eta = 0.0072 \text{ dyn s/cm}^2$ ergibt sich anhand dieser Formel (ibidi, Martinsried, Germany)

Vorversuch:

In Abhängigkeit des verwendeten Systems und des daraus resultierenden Widerstands ist der Kalibrierungsfaktor unterschiedlich. Der Kalibrierungsfaktor wird mittels Zeitmessung bestimmt und ist abhängig von der gemessenen Flussrate und dem Gesamtwiderstand im System, welcher nicht direkt zu bestimmen ist. (siehe Ergebnisse).

$$\text{Calibration factor} = \frac{\text{Given Flowrate} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right)}{\text{Measured Flowrate} \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right)}$$

Formel 4: Berechnung des Kalibrierungsfaktors mittels der gewünschten Flussrate und der tatsächlich gemessenen Durchflussrate.

Hauptversuch:

Der Kalibrierungsfaktor wurde mit 0,32 berechnet. Der Fluss im System ist unidirektional und wird durch positiven (+) Druck in der Pumpe erzeugt.

Es werden die gewünschten Parameter eingestellt – Flussrate mit 0.09 ml/min. Diese soll den physiologischen Fluss im spongiösen Knochen nachstellen. Der Perfusionsdruck, der Shear Stress und die Shear Rate werden durch das System berechnet. Die Flussrate wird konstant gehalten. Dies kann durch das Perfusionssystem gewährleistet werden, welches über einen Barometer verfügt, der den Druck kontinuierlich misst und reguliert.

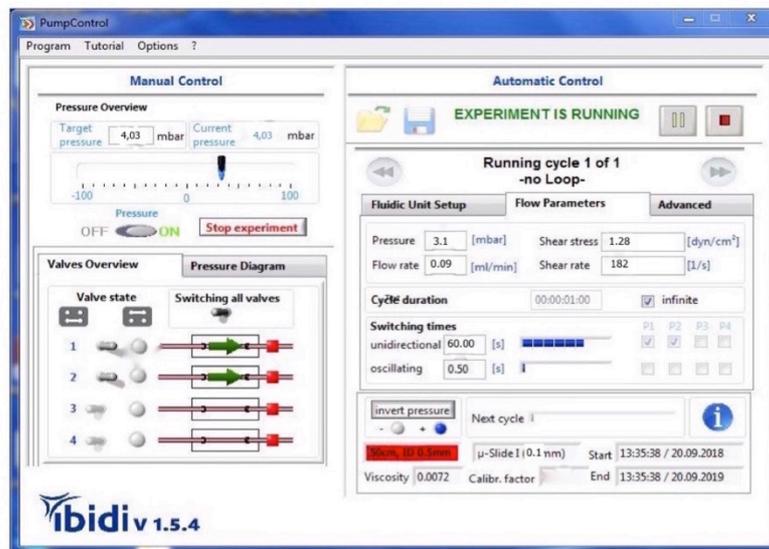
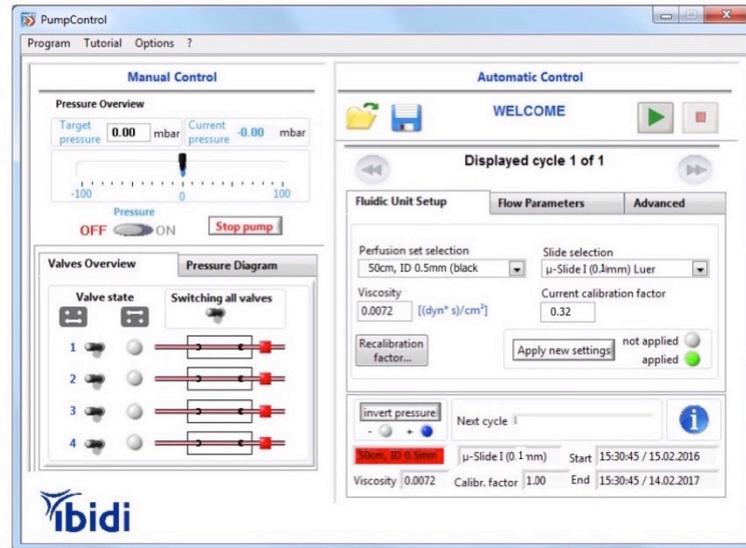


Abbildung 12 : PumpControl System – Einstellungen der Parameter

3.2.5 Kammer

In den vorgeschalteten Kammern sollte eine gleichmäßige Metallkonzentration erreicht werden, um diese mit einem einen konstanten Fluss über die μ -Slides fließen zu lassen. Der konstante Fluss wird mittels der Pumpe und den nötigen Verzweigungen erreicht.

Im Organismus besteht ein permanenter Blut- und Lymphstrom, der zum einen die Ernährung der Zellen und zum anderen den Abtransport von schädigenden Stoffen gewährleistet. Daher entspricht ein direkter Kontakt zwischen Implantatmaterial und Zelle nur sehr eingeschränkt den realen *in vivo* Bedingungen. Um diese Situation *ex vivo* nachzustellen wird eine Kammer vor die oben genannten, mit Zellen besiedelten Slides, geschaltet. Ziel ist die realitätsnahe Abbildung des Abtransports von Korrosionsrückständen in der Perfusionskultur.

Das zu testende Metall wird in der Kammer der Firma Minucells und Minutissue GmbH (Bad Abbach, Deutschland) platziert und dort in Lösung gebracht. Dadurch kann eine direkte Kontamination der Zellen mit dem Metall vermieden werden. Durch das Perfusionssystem entsteht dabei ein kontinuierlicher unidirektionaler Abstrom dieser Lösung. Damit wird eine kontrollierte Exposition der Zellen mit den Korrosionsprodukten gewährleistet.



Abbildung 13: Darstellung der Kammer. In der Einsenkung wird das Metallplättchen der zu testenden Legierung platziert und kontinuierlich von DMEM-Medium mit einem unidirektionalem Fluss umspült. Der Zu- und Abstrom des Mediums erfolgt über die seitlichen Schläuche (in diesem Bild nicht sichtbar)

3.2.6 pH-Wert

Im Versuch werden zwei pH-Werte getestet und die Ergebnisse des Zellwachstums miteinander verglichen. Verwendet wurde der pH 7,4 und pH 5.5. Der saure pH von 5,5 wird verwendet, um entzündetes Gewebe zu simulieren. In Vorversuchen der Forschungsgruppe wurde dabei bereits eine erhöhte Degradationsgeschwindigkeit festgestellt [135]. Die

Ursache dafür ist eine erhöhte Löslichkeit der eisenhaltigen Abbauprodukte im sauren Milieu. Die gewünschten pH-Werte werden mittels unterschiedlicher CO₂-Begasung im Inneren des Inkubators erreicht:

- pH-Wert 7,4: 37°C Umgebungstemperatur, 9,5% Sauerstoff, **5% CO₂-Begasung**
- pH-Wert 6,5: 37°C Umgebungstemperatur, 9,5% Sauerstoff **20% CO₂-Begasung**

3.2.7 Aufbau des Verteilungssystems

Vorversuch:

3.2.7.1 Konfigurierung der Pumpe und des Stecksystems

Die Einstellung der Flussrate und deren Parameter ist abhängig vom Gesamtwiderstand, welcher durch den Aufbau des Stecksystems beeinflusst wird. Um die geforderten Bedingungen bzw. die gewünschte Flussrate zu erhalten, wurde das Material in diversen Kombinationen getestet. Der Kalibrierungsfaktor erfolgt mittels Zeitmessung.

Abkürzungen	Bedeutung
M	Luer Connector Male
Y	Y Tube Fitting 1,6mm
0.5T	Silicone Tubing 0,5mm
0.8T	Silicone Tubing 0,8mm
1.6T	Silicone Tubing 1,6mm
F	Luer Lock Connector Female

Tabelle 3: Legende für die Abkürzungen der Stecksysteme des Vorversuchs

Folgende Steck-Kombinationen kamen in den Vorversuchen zum Einsatz:



Abbildung 14: Y Tube Fitting, Luer Connector Male, Luer Lock Connector Female (von li. nach re. – Quelle:ibidi)

1 Pumpe, 16 Zellslices + 2 Kammern 10 ml Spritzen:

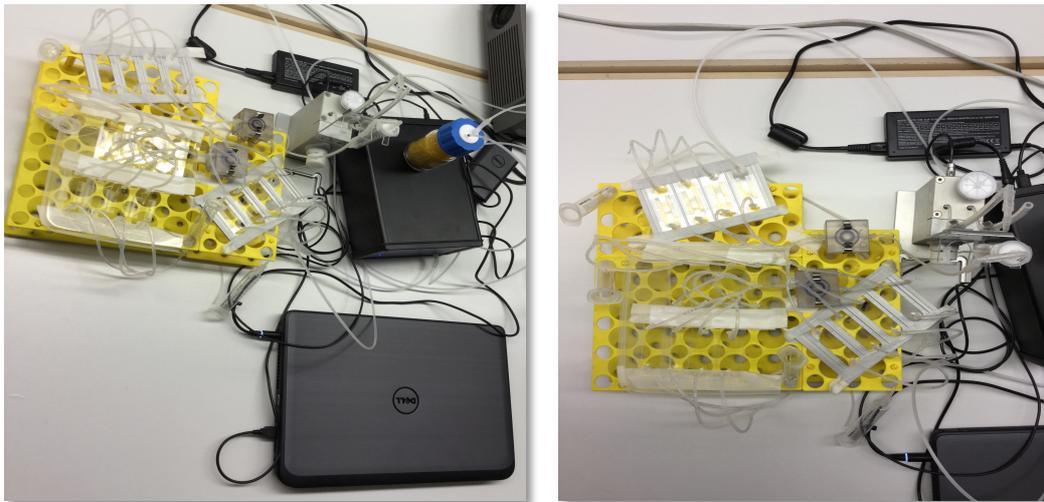


Abbildung 15: Aufbau des Vorversuchs mit 10ml Reservoirspritzen zur Erkenntnisgewinnung der gewünschten Parameter

1.) 10ml Spritze → F → 50cm 0.5T → M → F → 1,5cm 1.6T → Y → (2x) 8cm 0.5T → M → Kammer → M → 3cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 9cm 1.6T → M → Slides → M → 15cm 1.6T → Y → 2cm 1.6T → Y → 6cm 1.6T → Spritze 10ml

2.) 10ml Spritze → F → 50cm 0.5T → M → F → 1,5cm 1.6T → Y → (2x) 8cm 0.5T → M → Kammer → M → 3cm 0.5T → F → M → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6 → Y → 9cm 1.6T → M → Slides → M → 15cm 1.6T → Y → 2cm 1.6T → Y → 6cm 1.6T → Spritze 10ml

3.) 10ml Spritze → F → 50cm 0.5T → M → F → 1,5cm 1.6T → Y → (2x) 8cm 0.5T → M → Kammer → M → 3cm 0.5T → F → M → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6 → Y → 9cm 1.6T → M → Slides → M → 15cm 1.6T → Y → **1,5cm 1.6T** → Y → 6cm 1.6T → Spritze 10ml

1 Pumpe, 16 Slides + 2 Kammern + **50ml** Spritzen am Anfang (höhere Drucksäule!)

4.) 50ml Spritze → F → 50cm 0.5T → M → F → 1,5cm 1.6T → Y → (2x) 8cm 0.5T → M → Kammer → M → 3cm 0.5T → F → M → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 9cm 1.6T → M → Slides → M → 15cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 6cm 1.6T → 20ml Spritze

5.) 50ml Spritze → F → 50cm 0.5T → M → F → 1,5cm 1.6T → Y → (2x) 8cm 0.5T → M → Kammer → M → 3cm 0.5T → F → M → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6 → Y → 9cm 1.6T → M → Slides → M → 15cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → M → F → 5,5cm 0.5T → F → 50ml Spritze

6.) 50ml Spritze → F → 50cm 0.5T → M → F → 1,5cm 1.6T → Y → (2x) **5cm 0.8T** → M → Kammer → M → **2cm 1.6T** → F → M → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6 → Y → **9cm 0.8T** → M → Slides → M → **13,5cm 0.8T** → Y → 1,5cm 1.6T → Y → 1,5cm 1.6T → M → F → 5,5cm 0.5T → F → 50ml Spritze

3.2.7.2 Testung des Stecksystems

Um die Dichtigkeit des Systems zu gewährleisten, wurde ein Testlauf mit Trypanblau gefärbtem Wasser durchgeführt. Leckagen wurden geschlossen.

In einem weiteren Vorversuch wurde die Gleichmäßigkeit des Durchflusses der einzelnen Slides mit dem finalen Aufbau des Stecksystems getestet. Hierbei endet das System in einzelnen offenen Falcons (siehe Abb. 16 und Abb. 17). Nach 2 Stunden Testdurchlauf wurde die entstandene Wassersäule in den Falcons ermittelt und miteinander verglichen.

Um die Sterilität im Hauptversuch zu gewährleisten, wurde ein viertägiger Probedurchlauf gestartet. Das System wurde dreimal täglich mit frischem DMEM-Medium aufgefüllt. Am vierten Tag erfolgte die Untersuchung der kultivierten μ -Slides unter dem Mikroskop auf Bakterien.

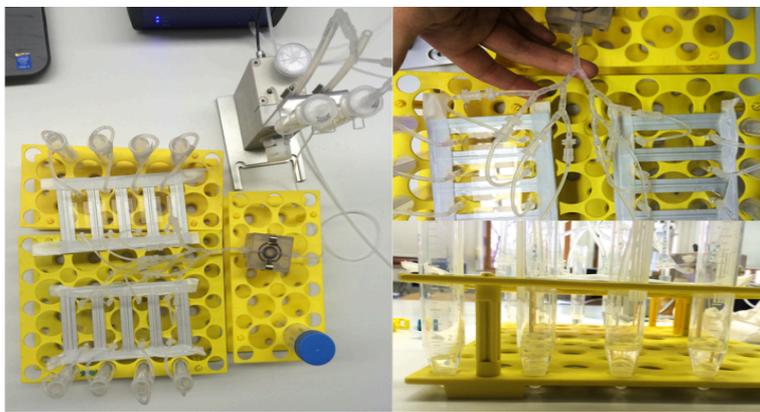


Abbildung 16: Vorversuch zur Testung der Gleichmäßigkeit des Durchflusses mit Wasser. In den Falcons ist die entstehende Wassersäule zu sehen.

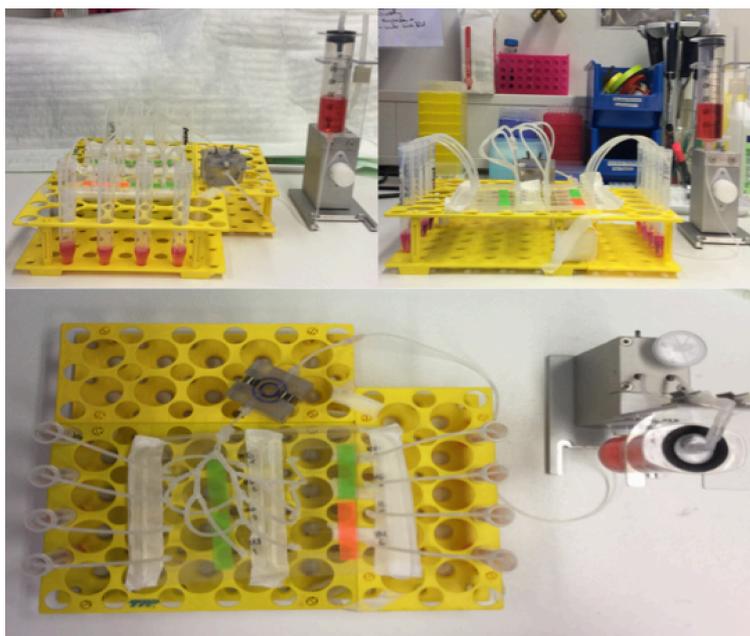


Abbildung 17: Vorversuch mit offenen Endschläuchen. Getestet wurde das System auch mit dem finalen Aufbau und dem verwendeten DMEM-Medium.

Hauptversuch:

3.2.7.3 Verwendetes Material und Versuchszubehör

Geräte und Zubehör	Verbrauchsmaterial
• ibidi Pumpe	• 50 ml Spritzen (Auffangbehälter)
• ibidi Perfusionsreservoir (Spritze 50ml)	• Skalpell
• ibidi Luer Lock Connector Female	• 16 Slides - μ -Slide I 0.2 Luer ibiTreat: #1.5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized
• ibidi Luer Connector Male	• 20ml Spritzen
• ibidi Y Tube Fitting 1.6 mm	• Sterile Handschuhe
• ibidi Silicone Tubing 0.5 mm ID: 5 m, sterilized	• Steriles Abdecktuch
• ibidi Silicone Tubing 0.8 mm ID: 5 m, sterilized	• 1L Eppendorf Gefäß
• ibidi Silicone Tubing 1.6 mm ID: 5 m, sterilized	• Abfallgefäß
• Falcon-Ständer	
• μ -Slide-Halterung	

Tabelle 4: Zubehör und Material des Versuchs

Reagenzien und Lösungen
• 80%-igen Alkohol
• Fibroblastenmedium (DMEM + Zusätze)
• PBS

Tabelle 5: Im Versuch benötigte Flüssigkeiten

Vorbereitung:

- Die Schläuche werden auf eine definierte Länge gebracht
- Folgende Schlauchdurchmesser sowie Längen wurden benötigt:

ibidi Silicone Tubing 0.5 mm (1x:50cm; 2x: 3cm; 4x: 8cm)

ibidi Silicone Tubing 0.8 mm (2x: 5cm; 16x: 9cm; 16x: 13,5cm)

ibidi Silicone Tubing 1.6 mm (7x: 1,5cm)

3.2.7.4 Zusammensetzung der Einzelteile des Systems

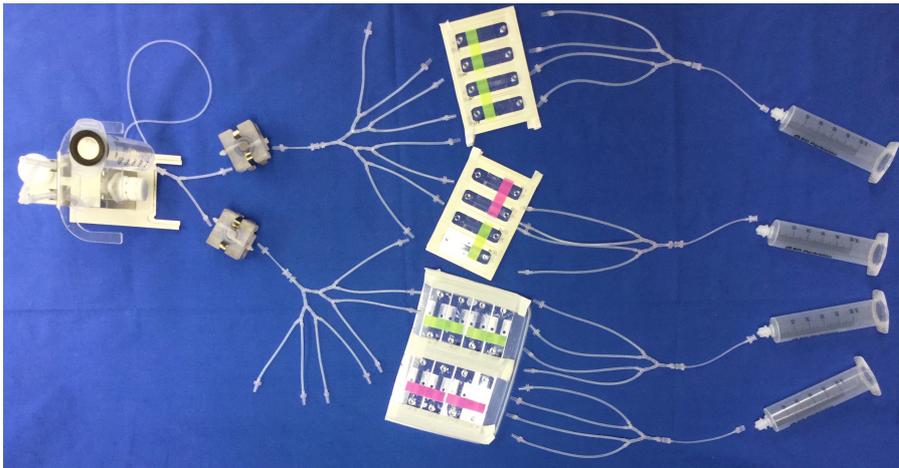


Abbildung 18: Das System mit all seinen Einzelteilen in Perfusionsrichtung aufgelegt.

Das System unterteilt sich in eine Zuleitung, eine Versuchskammer, ein μ -Slide-System und eine Ableitung.

Eine neue SOP wurde angefertigt, diese gewährleistet den sachgerechten Aufbau zu jederzeit:

Schritt 1: Zuleitung zur Kammer

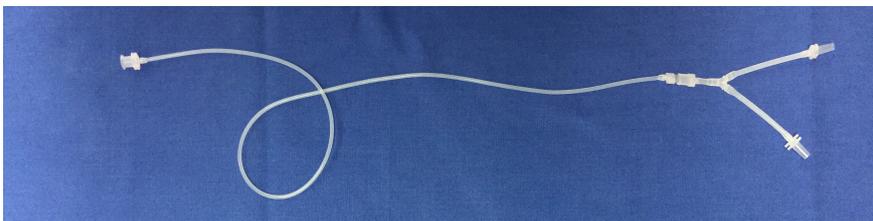


Abbildung 19: Female Connector \rightarrow 50cm 0.5 Tubing \rightarrow Male Connector \rightarrow Female Connector \rightarrow 1,5 cm 1.6 Tubing \rightarrow Y-Tube \rightarrow 2x 5cm 0.8 Tubing \rightarrow 2x Male Connector

Schritt 2: Verbindung zwischen Metallkammer und μ -Slides (ab diesem Punkt wird alles zweifach benötigt, da zwei Kammern angeschlossen werden):

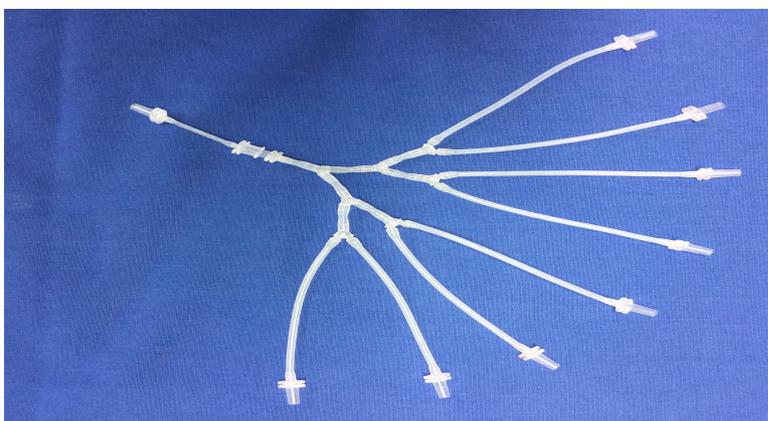


Abbildung 20: Links zu sehen ist der Einzelanschluss für die Kammer.
Male Connector \rightarrow 3cm 0.5 Tubing \rightarrow Female Connector \rightarrow Male Connector \rightarrow 1,5cm 1.6 Tubing \rightarrow Y Tube \rightarrow 2x 1,5cm 1.6 Tubing \rightarrow 2x Y Tube \rightarrow 4x 1,5cm 1.6 Tubing \rightarrow 4x Y Tube \rightarrow 8x 9cm 0.8 Tubing \rightarrow 8x Male Connector

Schritt 3: Ableitung von den μ -Slides zum Auffangreservoir (die Ableitung wird viermal benötigt, da 16 Slides angeschlossen werden).

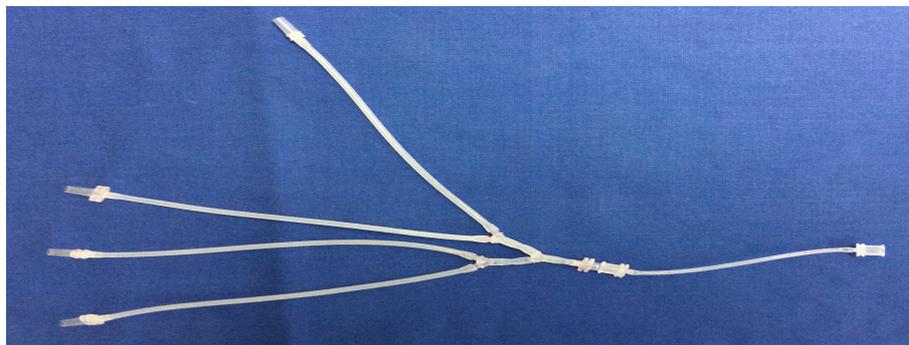


Abbildung 21: Anschluss an 4 Zellslides.

4x Male Connector \rightarrow 4x 13,5cm 0.8 Tubing \rightarrow 2x Y Tube \rightarrow 2x 1,5cm 1.6 Tubing \rightarrow Y Tube \rightarrow 1,5cm 1.6 Tubing \rightarrow Male Connector \rightarrow Female Connector \rightarrow 8cm 0.5 Tubing \rightarrow Female Connector

Schritt 4: Desinfektion der einzelnen Elemente des Stecksystems mit 80 % – igem Alkohol.

Schritt 5: Träger der Versuchsslides

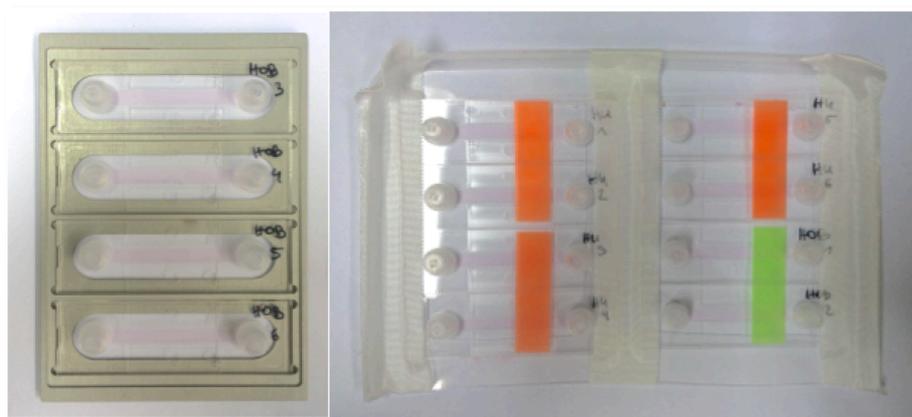


Abbildung 22: Befestigung der kultivierten und beschrifteten Zell-Slides an den Slide-Halterungen

Schritt 6: Zusammenschluss des Stecksystems mit der Perfusionsspritze, den Metall-Kammern, den Zell-Slides und den Abwurfspritzen.

Es wird ausgehend vom Abwurfreservoir begonnen (entgegen der Flussrichtung des Perfusionssystems):

1. Die "Ableitung" mit der "Ausgangsseite" der Slides verbinden
2. 50 ml Auffangspritzen am Ende der Ableitung anbringen
3. Das in Schritt 2 angefertigte "Verbindungsstück" wird an die "Eingangsseite" der μ -Slides angebracht
4. Befüllung mit dem Metall und Verschluss der Kammer

5. Das in Schritt 2 angefertigte "Verbindungsstück" wird an den Deckel der Kammerangeschlossen
6. Die "Zuleitung" wird an der untere Öffnung der Kammerangebracht, so dass im Perfusionssystem ein Fluss von unten über das Metall nach oben entstehen kann
7. Anschluss der "Zuleitung" an die ibidi-Reservoirspritze
8. Befüllung des Systems mit DMEM-Medium



Abbildung 23: Finaler Aufbau des Perfusionssystems

3.2.8 Versuchsprotokoll – in vitro Zytotoxizitäts-Tests

Versuchsablauf- Hauptversuch:

Die Versuchsdauer beträgt pro Ansatz 5 Tage.

Tag 0:

Die Arbeiten finden an einer Sicherheitswerkbank statt.

Die Osteoblasten (HOB), die Osteosarkomzellen (MG), die Fibroblasten (HU) und die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) werden eine Woche vor Versuchsbeginn aufgetaut und in Kultur genommen. Zur Bestimmung der Zellzahl kommt eine Lösung aus Trypsin/EDTA zum Einsatz. 10 000 Zellen in 50 µl ergeben eine Konfluenz von ca. 60 %. Pro

Versuchsansatz werden 16 μ -Slides etabliert, je 8 Slides pro Metallkammer. Pro Zelllinie wird ein zusätzlicher μ -Slide kultiviert, welcher als d0 Kontrollgruppe dient.

Nach Bestimmung der Zellzahl, wird die vorab definierte Menge im Zell-Medium-Gemisch in die μ -Slides gefüllt. Diese werden anschließend an einer speziellen Halterung mit offenem Boden befestigt.

Die Zellen kommen für drei Stunden in einen Inkubator mit einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre bei 37° C Lufttemperatur mit 9,5 % Sauerstoff und 5 % CO₂-Begasung. Dadurch wird den Zellen ein definiertes Milieu gewährleistet, durch welches sie die Möglichkeit haben eine Adhärenz aufzubauen. Der Adhärenz-Status wird unter dem Mikroskop kontrolliert. Es folgt, nach der Adhäsion der Zellen, die Markierung der Zelllinien und die Dokumentation mittels Fotos.

Das Stecksystem wird mit 80 %-igen Alkohol desinfiziert und anschließend mit PBS gereinigt. Dann wird das System wie oben beschrieben zusammengebaut und für vier Tage im Inkubator platziert.

Es folgt, das Anschließen des Perfusionssystems an die Air-Pressure-Pump und das starten des Systems mit den in den Vorversuchen evaluierten Einstellungen.

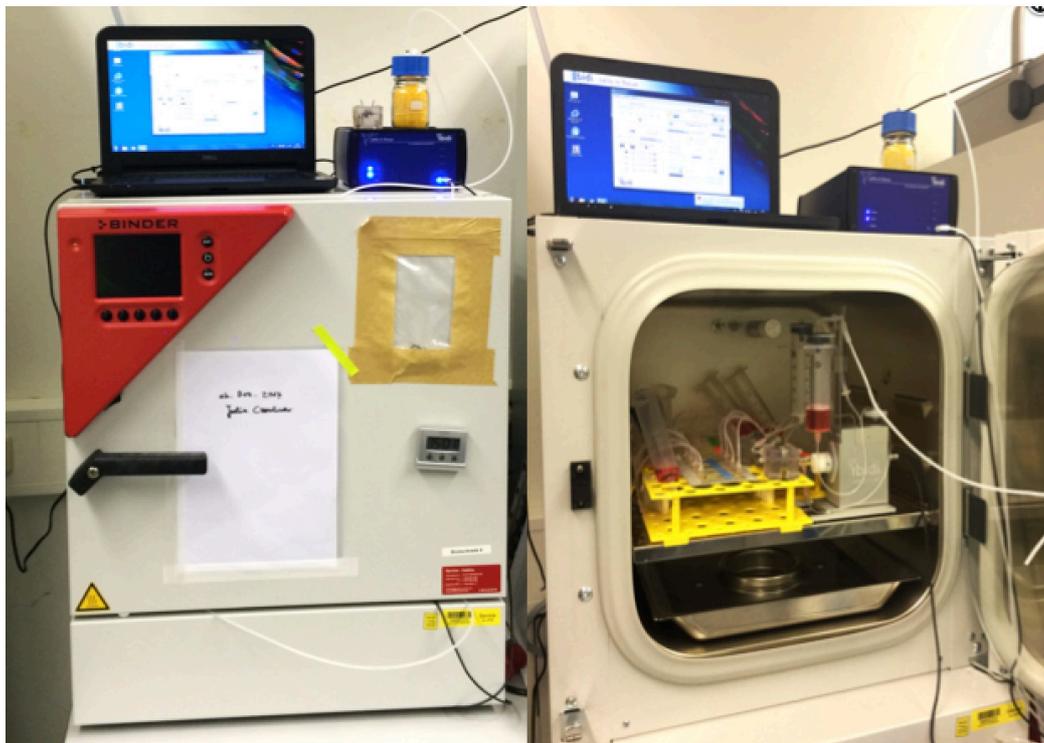


Abbildung 24: Die Air-Pressure-Pump und der Laptop mit dem ControlSystem befinden sich außerhalb des Inkubators (li. + re.). Das Perfusionssystem mit angeschlossener Pumpe und Mediumreservoir befindet sich im Inkubator (re.).

Im Laufe des Versuchs werden zwei pH-Werteinstellungen getestet. Diese sind mit folgenden Einstellungen im Inkubator zu erreichen:

- Neutraler pH-Wert (7,4): 37° C Umgebungstemperatur, 9,5 % Sauerstoff und 5 % CO₂-Begasung
- Saurer pH-Wert (6,5): 37° C Umgebungstemperatur, 9,5 % Sauerstoff und 20% CO₂-Begasung

Zur Ermittlung der d0-Referenzwerte wird ein WST-1 Test und ein PICO Green Assay durchgeführt. Diese Tests erfolgen an Tag 0 (als Referenzwert) und am Tag 4. Der Beginn erfolgt mit dem WST-1 Test, da dieser zwei Stunden Inkubationszeit benötigt.

Tag 1 – 3:

An diesen Tagen erfolgt eine tägliche Fotodokumentation zur Überprüfung der Zellzahl. Die Reservoirs werden zu den gegebenen Zeiten mit DMEM-Medium aufgefüllt:

- 08:15 Uhr
- 16:30 Uhr
- 00:30 Uhr

Tag 4:

Abbau und Reinigung des Stecksystems, sowie letzte Fotodokumentation. Es folgen der WST-1 Test und der PICO Green Assay.

3.3 Laborwerterhebung und Auswertung

3.3.1 WST-1 – Cell –Proliferationstest (Roche)

Durch die Bestimmung der Viabilität wird die Funktionsfähigkeit der Zellen gemessen. Mit diesem Test ist es möglich, das Zellwachstum zu quantifizieren. Der WST-1 Test ist ein kolorimetrischer Test, der die Anzahl der Zellen analysiert, welche in der Lage sind, Tetrazolium-Salze in Formazan umzusetzen. Dazu benötigen die Zellen eine intakte Atmungskette mit einem intaktem mitochondrialem Succinat-Tetrazolium Dehydrogenase System. Die Dehydrogenase bewirkt die Umsetzung des schwach hellroten Tetrasoliumsalses in das dunkelrote Formazan. Dieser Farbumschlag bzw. die Absorptionsrate wird mit Hilfe eines Microplate Readers (Synergy HT, Bio-Tek, USA) analysiert. Die gemessene Absorptionsrate korreliert direkt mit der Anzahl der lebensfähigen Zellen.

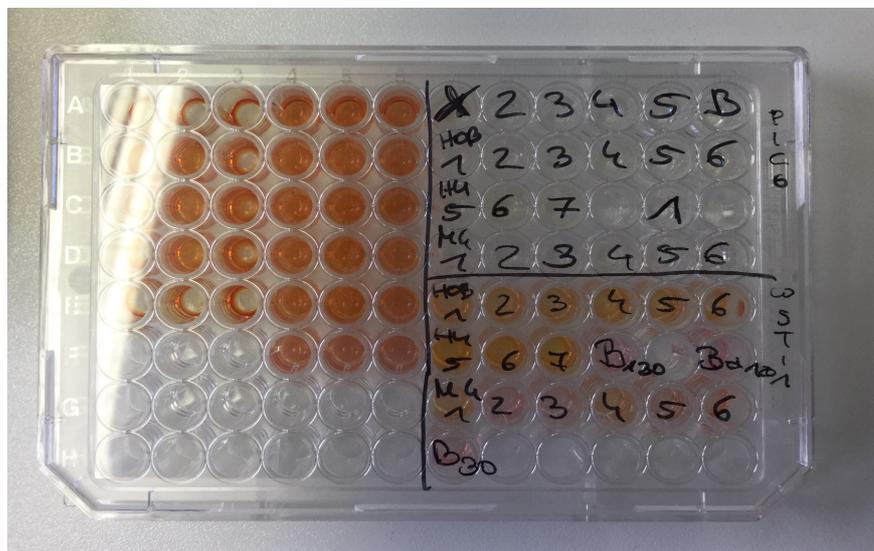


Abbildung 25: 96-Wellplatte mit Beschriftung für den WST-1 Test

Ablauf des WST-1 Tests:

Das Medium der Zellen wird aus den μ -Slides entnommen und jedem μ -Slide werden 70 μ l WST-1 Tetrazoliumsals-Lösung (70 μ l Medium mit 10 % WST-1 Reagenz) hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit von 120 Minuten in einem Inkubator mit 37°C wird die Lösung aus den Slides abgezogen und in eine 96-Well-Platte übertragen.

Die 96-Well-Platte wird mit der bereits inkubierten WST-1-Lösung in den Microplate (ELISA) – Reader gegeben. Das Programm „Gen 5“ (Biotek, Winooski, USA) bestimmt die Absorptionsrate bei 450 nm.

Die erste WST-1 Auswertung erfolgt am Tag 0 mit den Kontrollslides und die zweite Auswertung am Tag 4 mit den Slides aus dem Versuch.

3.3.2 Pico Green DNA-Assay

Pico Green ist ein Quantifikationstest für DNA.

Das Pico Green Reagenz ist ein asymmetrischer Nukleinsäure-Cyanin-Farbstoff zur Quantifizierung von Doppelstrang-DNA. Freier Farbstoff fluoresziert nicht, doch nach der Bindung an dsDNA weist er eine >1000-fache Fluoreszenz-Anreicherung auf.

Pico Green ist 10.000-fach sensitiver als UV-Absorptionsmethoden und hoch selektiv für dsDNA, ssDNA und RNA. Es hat ein Exzitationsmaximum (die Frequenz mit dem Maximum an Absorption) bei 480 nm und ein Emissionsmaximum (Frequenz bei der die maximale Anzahl/Leistung der ausgesendeten Teilchen erreicht wird) bei 520 nm.

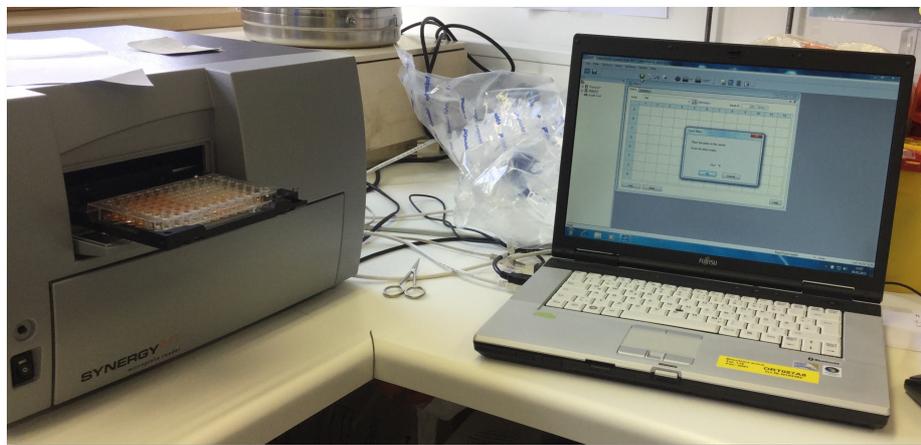


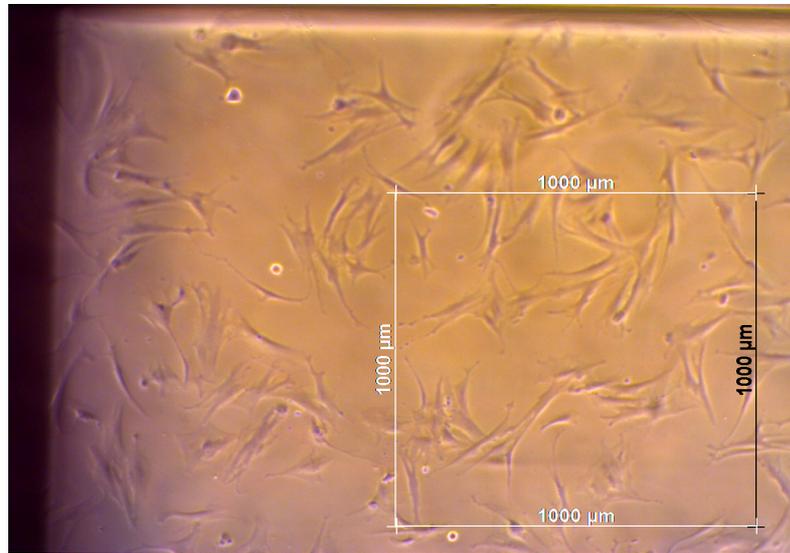
Abbildung 26: Elisa-Reader mit einer 96-Wellplatte für den WST-1 bzw. den Pico Green Test (li.). Der Computer, mit dem verwendeten „Gen 5“-Program (re.).

Ablauf des Pico Green Assay's im Versuch:

Lyse-Puffer wird in ein Wasserbad gestellt und das Medium aus den Slides entfernt. Es werden 70µl Lyse-Puffer in die Slides pipettiert. Nach 5 Minuten Einwirkphase erfolgt die Entfernung der Lösung. Für die Testung kommen 5 definierte Standards, ein blank, Fluoreszenz-Farb-TE-Puffer Mischung und die Lyse-Lösung aus den Slides zum Einsatz. Pro zu testenden Slide werden 80µl TE-Puffer, 20µl Lyse-Proben-Mischung bzw. Standards bzw. Lyse-Puffer (blank) verwendet und in eine 96 Well-Platte pipettiert. 100µl Farblösung werden hinzugegeben und die Well-Platte im Elisa-Reader platziert. Die Berechnung für die Auswertung erfolgt via Computerprogramm „Gen 5“.

3.3.3 Zellzahl

Mit Hilfe einer standardisierten Fläche von $1 \mu\text{m}^2$ wird die Zellzahl ermittelt und die Anzahl auf die Gesamtwachstumsfläche umgerechnet. Die gesamte Fläche beträgt $2,5 \text{ cm}^2$.



Berücksichtigt werden jene Zellen, welche sich mit ihrem Zellkörper innerhalb der markierten Fläche befinden oder die Markierungslinie berühren.

Abbildung 27: Fotodokumentation mit standardisierter Zählfläche

3.3.4 Statistische Methodik für Laborwerte

In der vorliegenden Arbeit sollen mehrere Gruppen, von Metallen und Zelllinien, auf Unterschiede untersucht und überprüft werden. Im Modell dieser Auswertung vergleicht man je nach Fragestellung 4 (verwendete Zellgruppen) bzw. 5 (verwendete Metalle) Gruppen miteinander.

Die ANOVA-Analyse bietet die Möglichkeit mehrere Gruppen miteinander zu vergleichen. Sie ist eine Modifizierung des t-Tests (welcher jedoch nur 2 Gruppen vergleichen kann). Im konkreten Fall dieser Arbeit unterscheiden sich die Mittelwerte der Zellen innerhalb der verschiedenen Metalle und der pH-Werte. Es wird untersucht, ob diese Unterschiede signifikant sind. Bei dieser Varianzanalyse werden die gesamten Werte innerhalb einer Gruppe wie auch zwischen den Gruppen betrachtet. Die Varianz zwischen den Gruppen, wird auch als systemische Varianz bezeichnet. Sie beschreibt die Abweichung der Gruppenmittelwerte vom Gesamtmittelwert aller Gruppen. Die Varianz innerhalb der Gruppe betrachtet die Abweichung der einzelnen Messwerte innerhalb der Gruppe vom Gruppenmittelwert und wird als unsystemische oder nicht erklärbare Varianz bezeichnet. Aus diesen beiden Komponenten ergibt sich die Varianz der gesamten Betrachtung.

Für die Auswertung der Zellzahlen sowie der Tests Pico Green und WST-1 wurde wie folgt vorgegangen.

Für jede Zellgruppe j wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt t die Differenz zu Baseline mit folgender Formel berechnet.

Mit dieser berechneten Differenz zum Startzeitpunkt wurde ein **gepaarter t-Test** durchgeführt. Mithilfe dieses Testes soll untersucht werden, ob die errechneten Differenzen zu Baseline statistisch signifikant sind und somit eine Verschlechterung/Verbesserung beobachtet werden kann. Für die Auswertung werden die errechneten Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie die p-Werte des Tests herangezogen. Es wird ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ angenommen.

Mit dem gepaarten t-Test wird folgende Null-Hypothese getestet

$$H_0: \mu_T = \mu_u$$

im Vergleich zu der Alternativ Hypothese

$$H_1: \mu_T \neq \mu_u$$

in welcher μ_T den Beobachtungszeitpunkt t darstellt und μ_u den Ausgangswert zu Baseline. Der Test wird auf den Differenzen durchgeführt. Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn der p-Wert des gepaarten t-Test kleiner als das zweiseitige Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ ist.

4 Ergebnisse

4.1 Zu testendes Material – Metalle

Erfasst wurde das Gewicht und die Oberfläche der Metallplättchen um anschließend Berechnungen zur Korrosionsrate durchzuführen.

pH 7,4:

Metall:	Masse in g	Oberfläche in mm ²
FeAg OZS (1)	0,474	168,24
FeAg OZS (2)	0,574	184,73
FeAg OZS (3)	0,461	172,17
Fe0.5Si (1)	0,786	192,56
Fe0.5Si (2)	0,838	195,03
Fe0.5Si (3)	0,946	203,64
Fe9.3W (1)	1,085	202,07
Fe9.3W (2)	0,960	198,17
Fe9.3W (3)	1,003	202,65
Fe0.5Si0.6P (1)	0,956	204,10
Fe0.5Si0.6P (2)	0,954	198,17
Fe0.5Si0.6P (3)	0,907	195,84
Fe0.6P (1)	0,953	199,05
Fe0.6P (2)	1,023	201,35
Fe0.6P (3)	1,053	204,24

Tabelle 6: Gewicht gerundet auf 10^{-3} und Oberfläche der Festkörper

pH 6,4:

Metall:	Masse in g	Oberfläche in mm ²
FeAg OZS (4)	0,458	167,38
FeAg OZS (5)	0,970	174,59
FeAg OZS (6)	0,437	168,48
Fe0.5Si (4)	1,129	211,01
Fe0.5Si (5)	0,888	200,94
Fe0.5Si (6)	0,950	203,87
Fe9.3W (4)	1,010	199,33
Fe9.3W (5)	1,015	204,01
Fe9.3W (6)	1,031	203,447

Fe _{0.5} Si _{0.6} P (4)	1,013	203,45
Fe _{0.5} Si _{0.6} P (5)	0,917	203,20
Fe _{0.5} Si _{0.6} P (6)	0,822	196,65
Fe _{0.6} P (5)	1,085	208,743
Fe _{0.6} P (6)	1,094	208,01
Fe _{0.6} P (7)	0,998	149,22

Tabelle 7: Gewicht gerundet auf 10^{-9} und Oberfläche der Festkörper

4.2 Vorversuche

Das neu entwickelte, auf die Versuchsbedingungen angepasste Perfusionssystem, hat zur Aufgabe, ein *in vivo* System möglichst realitätsnah *in vitro* nachzustellen. Das gelingt durch die Vorschaltung des Legierungsmetalls, welches somit in Lösung geht und die nachgeschalteten Zellen mit den abgelösten Korrosionsbestandteilen umspült. Das dient dazu, die Auswirkung auf die verschiedenen Zellgruppen möglichst organismusnah nachzustellen und überprüfen zu können.

Die Entscheidung fiel auf den μ -Slide I Luer^{0.2}. Aufgrund des erhöhten Gesamtwiderstands (im Perfusionssystem) und der damit verbundenen geringeren Durchflussrate wurden die „ μ -Slide I 0.2 Luer ibi Treat: #1.5 polymer coverslip, tissue culture treated, sterilized“ (Ibidi, Martinsried, Deutschland) verwendet. Diese hat zum Vorteil, dass durch einen geringeren Durchfluss, kleinere Mengen an Medium verwendet werden können. Zudem ist diese Größe an Slides für bewegte Anwendungen besser geeignet als für statische Versuche. Hierfür würde man einen μ -Slide I 0.4-0.8 bevorzugen.

Um die gewünschte Adhärenz der Zellen zu erhalten wurden 10 000 Zellen pro 50 μ l als Ausgangswert festgelegt. Mit 10 000 Zellen kam es zu einer adäquaten Adhärenz von ca. 70%. Bei einer Zellzahl von weniger als 10 000 (5 000 und 7500) kam es zu keiner adäquaten Besiedelung, bei 20 000 Zellen war die Besiedelung am Nährboden der Slides zu dicht, was zu einem verfrühten Absterben der Zellen führte. Somit hat sich diese Zellzahl im Vergleich zu den anderen als vorteilhaft erwiesen.

Um Komplikationen im Hauptversuch zu vermeiden, wurde das Perfusionssystem auf seine Sterilität und auf die Gleichmäßigkeit des Durchflusses überprüft. Nach vier Kontrolltagen erfolgte die Untersuchung der μ -Slides unter dem Mikroskop. Es konnten keine Anzeichen auf Bakterien nachgewiesen werden.

Bei der Kontrolle auf die Gleichmäßigkeit des Durchflusses der einzelnen Slides im System konnte eine nahezu gleichwertige Perfusion dargestellt werden.

	Gemessener Wasserstand:
Falcon 1:	1,5 ml
Falcon 2:	1,35 ml
Falcon 3:	1,35 ml
Falcon 4:	1,35 ml
Falcon 5:	1,3 ml
Falcon 6:	1,4 ml
Falcon 7:	1,3 ml
Falcon 8:	1,25 ml

Tabelle 8: Ergebnisse zur Messung der Gleichmäßigkeit der Perfusion der einzelnen μ -Slides nach 2Stunden

Um das Pumpsystem mit den oben angegebenen Parametern betreiben zu können wurde der Kalibrierungsfaktor mit 0.32 berechnet.

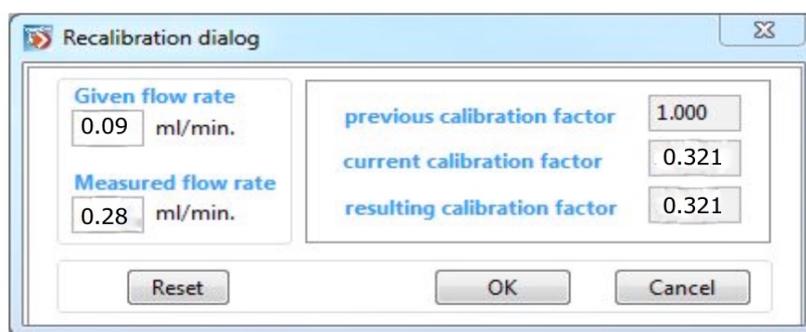


Abbildung 28: Eingabe der vorgegebenen Flussrate und der tatsächlich gemessenen Flussrate im Pump-Control-System mit automatischer Berechnung des Kalibrierungsfaktors.

4.3 In vitro Zytotoxizitäts-Test

4.3.1 Auswertung von Pico Green und WST-1

In den Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe, konnte der WST-1 Test nicht ausgewertet werden, da das Reagenz oxidierte. Dieses Problem trat in diesem Versuchsaufbau nicht auf, da das Medium nicht in den Kontakt mit dem WST-1 Test kam.

Zur Auswertung der Zellzahl sowie der Tests Pico Green und WST-1 wurde wie folgt vorgegangen.

Für jede Zelllinie j wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt t die Differenz zur Baseline mit folgender Formel berechnet.

Mit dieser berechneten Differenz zum Startzeitpunkt wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Mit Hilfe dieses Testes soll untersucht werden, ob die errechneten Differenzen zur Baseline statistisch signifikant sind und somit ein Anstieg/Abfall beobachtet werden kann. Für die Auswertung werden die errechneten Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie die p-Werte des Tests herangezogen. Es wird ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ angenommen.

4.3.1.1 pH 6

FeAg

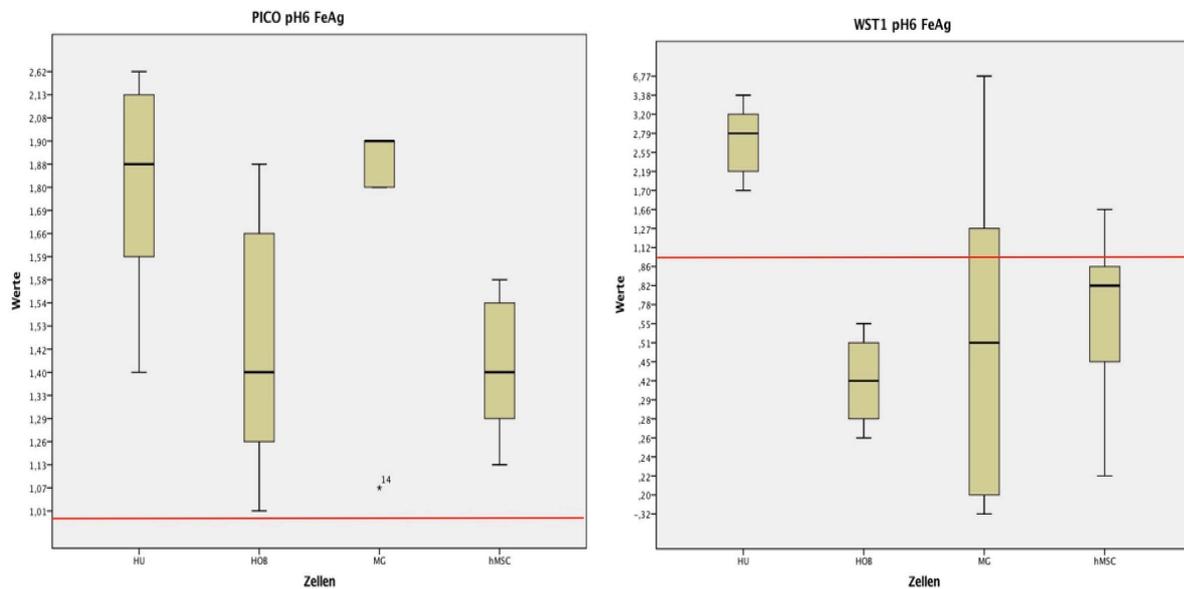


Abbildung 29: Darstellung der Zellaktivität sowie der Zellviabilität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeAg bei pH 6. Die rote Linie markiert den Ausgangswert. Die Zellaktivität steigt über die Versuchsdauer bei allen Zellgruppen an, jedoch sinkt die Zellviabilität mit Ausnahme der HU leicht ab.

Im Pico Green ist bei den Fibroblasten (HU) ein Anstieg von 0.9 (SD: 0.45) zu verzeichnen. Dieser Unterschied ist bei einem p-Wert von 0.0039 statistisch signifikant. Beim WST-1 zeigt sich eine statistisch signifikante Veränderung von +1.6 im Vergleich zu Tag 0 (SD: 0.63, $p = 0.0014$)

Osteoblasten (HOB) zeigen bei dem WST-1 im Vergleich von Tag 4 zu Tag 0 eine statistische signifikante Veränderung um -0,6 bei einer Standardabweichung von 0.13, diese Veränderung ($p=0.0001$). Bei dem Pico Green steigert sich der Wert zur Baseline um +0.4 (SD: 0.32) und ist ebenfalls signifikant ($p = 0.0206$).

Bei den Osteosarkomzellen (MG) verändert sich der Wert bei PICO Green um +0.7 (SD: 0.33) im Vergleich zur Baseline und ist statistisch signifikant ($p = 0.0027$). Osteosarkomzellen (MG) zeigen im WST-1 keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Tag 0 (MW: 0.5, SD: 2.63, $p = 0.6317$).

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zeigen einen Anstieg um +0.4 (SD: 0.17) im Pico Green, dieser ist statistisch signifikant ($p = 0.0025$). Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) zeigen im Mittelwert eine Verringerung, von -0.2 im Vergleich zur Baseline (SD: 0.49) jedoch ist hier der Unterschied bei WST-1 statistisch nicht signifikant ($p = 0.3643$).

FeP

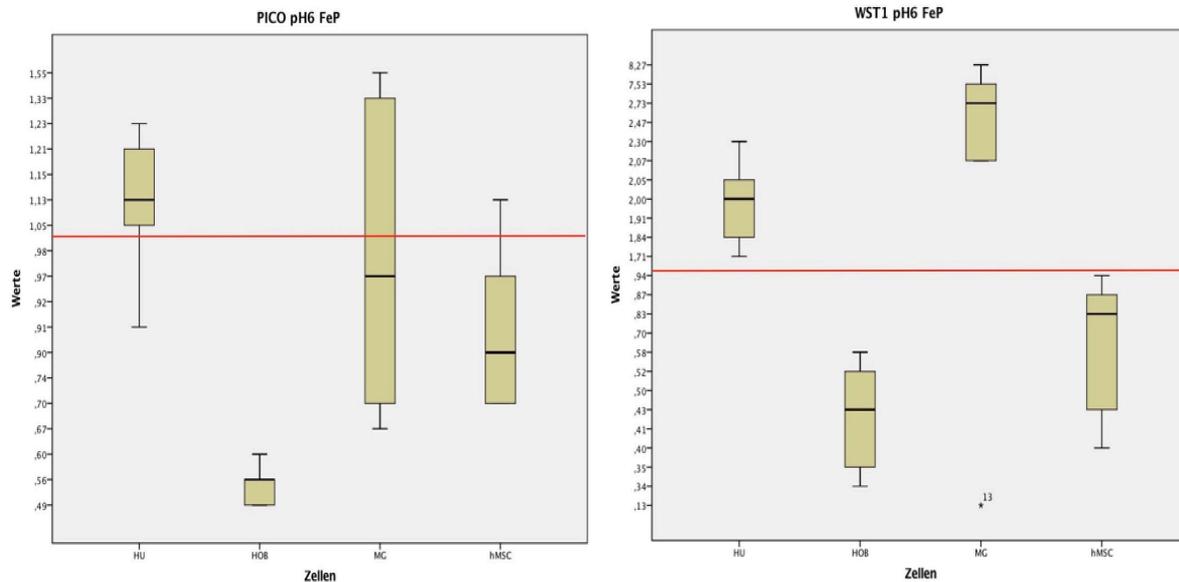


Abbildung 30: Darstellung der Zellviabilität sowie der Zellaktivität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeP bei pH 6. Die Zellvitalität hat sich über die Versuchszeit gering verändert mit Ausnahme der HOB. Hier kam es zu einem signifikanten Abfall im Bezug zum Ausgangswert. Die Zellviabilität hat bei den HU und MG geringfügig zugenommen und ist bei den hMSC abgenommen.

Fibroblasten (HU) zeigen im WST-1 einen Anstieg von +1.0 im Vergleich zu Baseline (SD: 0.20), dieser ist auch hier signifikant ($p = 0.0001$). Bei Pico Green sieht man einen minimalen Anstieg gegenüber Tag 0 (MW: 0.1, SD: 0.12). Dieser ist jedoch sehr gering und der Unterschied ist somit nicht signifikant ($p = 0.1.13$).

Bei dem WST-1 Test zeigt sich für die Osteoblasten (HOB) eine statistisch signifikante Veränderung (MW: -0.5, SD: 0.10 und $p = <0.0001$.) welche auch deutlich bei Pico Green zu sehen ist, bei einer identischen Veränderung (MW: -0.5, SD: 0.05, $p = <0.0001$)

Bei Pico Green Zeigt sich bei den Osteosarkomzellen (MG) keine Veränderung gegenüber Tag 0 (M: 0, SD: 0.35, $p = 0.8601$). Die Osteosarkomzellen (MG) steigen beim WST-1 im Lauf der Zeit an, jedoch ist der Wert an Tag 4 im Vergleich zu Tag 0 nicht signifikant (MW: 2.9, SD: 3.26, $p = 0.0840$).

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen einen minimalen Abfall im Pico Green im Vergleich zu Tag 0 (MW: -0.1, SD: 0.18), dieser ist nicht signifikant ($p = 0.1071$). Beim WST-1 ist der Unterschied hingegen statistisch signifikant und zeigt eine Verringerung gegenüber Tag 0 (MW: -0.3, SD: 0.23, $p = 0.0230$).

FeSi

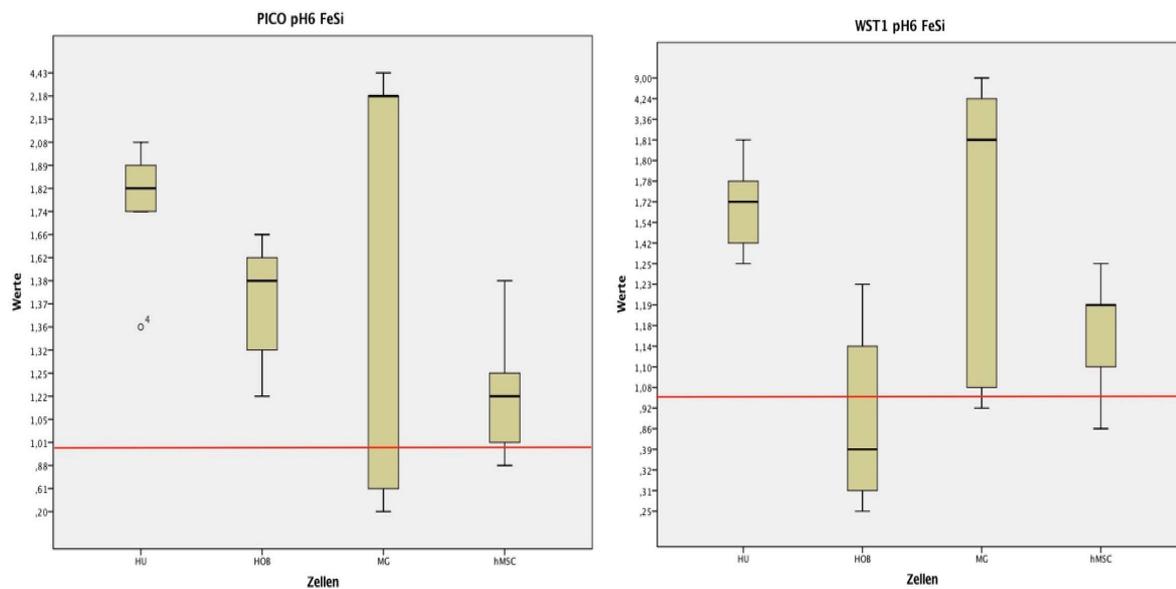


Abbildung 31: Darstellung der Zellviabilität sowie der Zellaktivität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeSi bei pH 6. Die Zellvitalität ist über den Versuchszeitraum in allen Zelllinien angestiegen. Das gleiche gilt für die Zellviabilität, mit der Ausnahme der HOB.

Testet man die Fibroblasten (HU) Zellen mit WST-1, sieht man hier einen Anstieg von +0.6 (SD: 0.23) beim Vergleich zur Baseline, dieser Unterschied ist bei einem p-Wert vom 0.0014 statistisch signifikant. Bei Pico Green sieht ebenfalls einen Anstieg von +0.8 im Vergleich zur Baseline (SD: 0.24). Auch hier ist der Unterschied signifikant ($p=0.0005$).

Der Anstieg im Pico Green ist bei den Osteoblasten (HOB) statistisch signifikant ($p = 0.0019$; MW: +0.4, SD: 0.18). Die Zellen der Osteoblastenzelllinie (HOB) zeigen bei im WST-1 Test eine Verringerung von -0.4 (SD: 0.45) auf. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0.0844$).

Bei den Osteosarkomzellen (MG) sieht man zwar eine Steigerung von +2.4 im WST-1 beim Vergleich von Tag 4 zu Tag 0, jedoch ist dieser Unterschied aufgrund der weiten Streuung der Werte nicht signifikant (SD: 3.04, $p = 0.1108$). Gleiches gilt für Pico Green. Man kann zwar einen Anstieg von +1.0 (SD: 1.49) erkennen, im Vergleich zur Baseline ist jedoch auch bei diesem Unterschied keine Signifikanz nachzuweisen ($p=0.1776$).

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen für WST-1 und bei Pico Green nur eine geringe Steigerung gegenüber der Baseline. Der Unterschied ist in beiden Fällen nicht signifikant (MW: +0.1, SD: 0.14, $p = 0.0728$ bei WST-1 und MW: 0.1, SD: 0.19, $p = 0.1310$ bei Pico Green).

FeSiP:

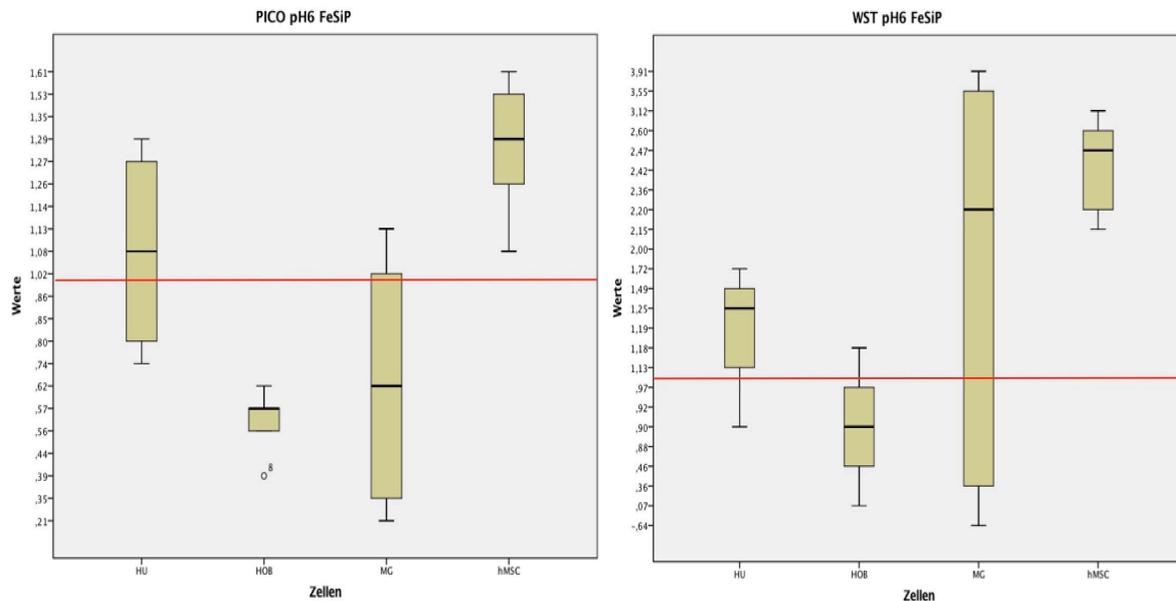


Abbildung 32: Über den Versucheszeitraum gibt es keine signifikante Veränderung der Zellvitalität. Ein geringfügiger Anstieg der Aktivität ist bei den HU und hMSC zu verzeichnen, ein Abfall bei den HOB und MG. Die Zellviabilität hat mit Ausnahme der HOB zugenommen.

Die Zellen der Fibroblasten (HU) zeigen einen Anstieg im WST-1 im Vergleich zur Baseline, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (MW: 0.3, SD: 0.29, $p = 0.0630$). Während die Veränderung bei Pico um +0.8 im Vergleich zum Ausgangswert ist (SD: 0.18) und diese Verbesserung auch signifikant ist ($p = 0.0001$).

Betrachtet man das Ergebnis von den Osteoblasten (HOB) bei dem Pico Green Test, sieht man eine Veränderung von +0.3 (SD: 0.26) bei dem Vergleich zur Baseline. Bei einem p-Wert von 0.0486, ist dieser Unterschied signifikant. Bei WST-1 verringert sich der Anteil der Osteoblasten (HOB) um -0.3 (SD: 0.41), jedoch ist die Veränderung statistisch nicht signifikant ($p = 0.1872$).

Bei Pico Green ist bei den Osteosarkomzellen (MG) nur eine geringe Veränderung von -0.1 (SD: 0.29) zu erfassen, diese ist im Vergleich zu Tag 0 nicht signifikant ($p = 0.6367$). Die Werte der Osteosarkomzellen (MG) steigen im WST-1 Test um +0.9 (SD: 1.78) jedoch ist, wie auch schon zuvor, die Streuung bei dem Vergleich zur Baseline zu groß. Es besteht kein signifikantes Ergebnis ($p = 0.2583$).

Beim WST-1 Test der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), verändert sich der Wert am Tag 4 um +1.5 im Vergleich zu Tag 0 (SD: 0.35). Dieser Unterschied ist signifikant ($p = 0.0001$). Für Pico Green ist ein Anstieg um +0.3 (SD: 0.20) im Vergleich zur Baseline abzulesen. Der Unterschied ist bei $p = 0.0188$ statistisch signifikant.

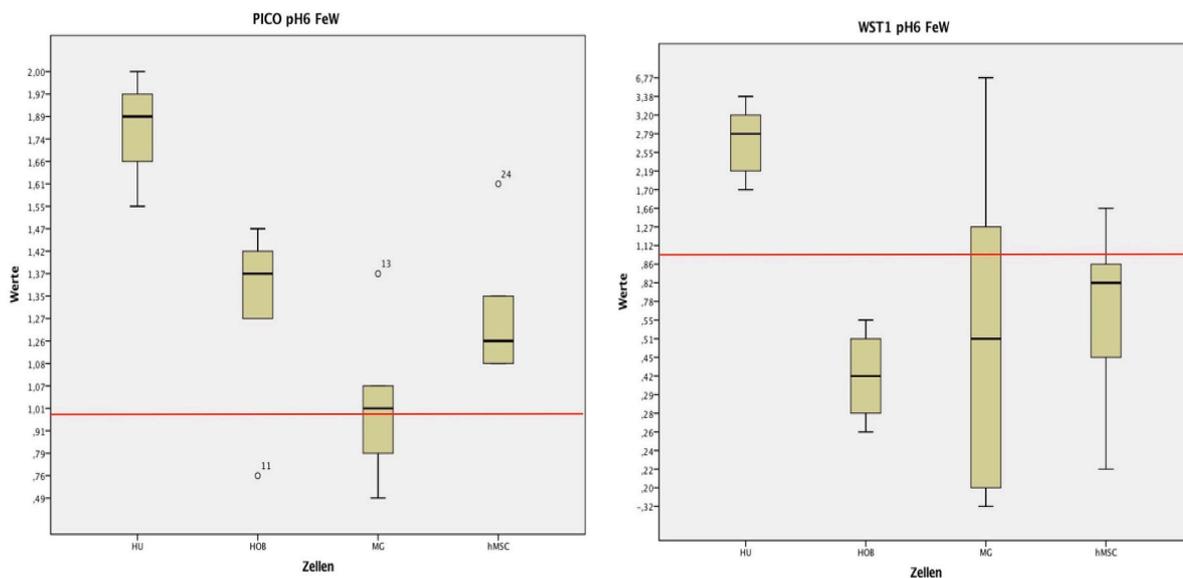
FeW:

Abbildung 33: Die Zellvitalität steigt über die Versuchsdauer bei allen Zellgruppen an, jedoch steigt die Zellviabilität nur bei HU an.

Bei dem Pico Green, zeigt sich kein Anstieg bei den Fibroblasten (HU) (MW: 0.0, SD: 0.25, $p = 0.8754$). Sie steigern sich im WST-1 im Verlauf der Beobachtung um +1.6 (SD: 0.63, $p = 0.0014$) und sind signifikant im Vergleich zum Startwert.

Bei den Osteoblasten (HOB) ist beim WST-1 ein Anstieg von +0.6 (SD: 0.13) statistisch signifikant im Vergleich zur Baseline ($p = 0.0001$). Bei Pico Green hingegen zeigt sich ein Abfall, auch dieser ist statistisch signifikant (MW: -0.5, SD: 0.08, $p < 0.0001$).

Testet man die Osteosarkomzellen (MG) mit Pico Green zeigt sich ein Abfall von -0.3 im Vergleich zu Tag 0, dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant (SD: 0.38, $p = 0.0867$). Im WST-1 Test ist ein Anstieg zu verzeichnen von +0.5 (SD: 2.63), dieser Unterschied ist im Vergleich von Tag 4 zu Tag 0 statistisch nicht signifikant ($p = 0.6317$).

Bei humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) kann man einen leichten Abfall im WST-1 über die Beobachtungszeit hinweg betrachten, jedoch ist hier der Vergleich der Werte zu den Zeitpunkten statistisch nicht signifikant (MW: -0.2, SD 0.49, $p = 0.3643$). Im Pico Green sieht man hier einen statistisch signifikanten Anstieg im Vergleich zu Tag 0 (MW: 0.3, SD: 0.19, $p = 0.0069$).

4.3.1.2 pH 7

FeAg:

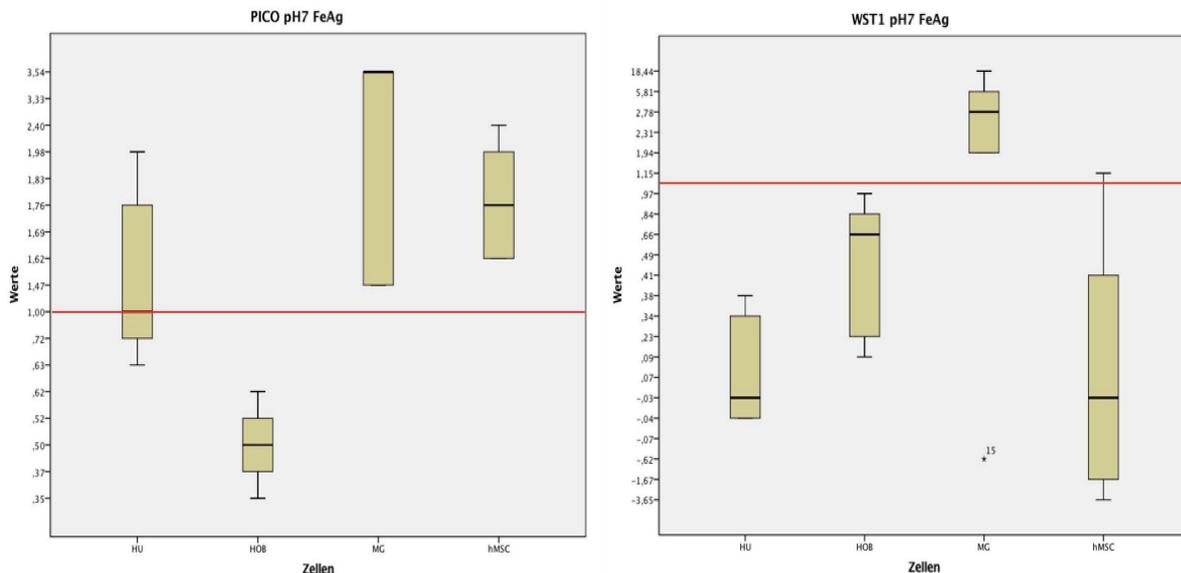


Abbildung 34: Darstellung der Zellvitalität sowie der Zellviabilität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeP bei pH 7. Zu einem Anstieg der Zellvitalität und der Zellviabilität über den Versuchszeitraum kommt es nur bei den MG. Bei den anderen getesteten Zelllinien kommt es zu einer Abnahme der Zellviabilität.

Bei pH7 zeigen die Osteoblasten (HOB) beim Pico Green Test eine Verringerung des Ausgangswertes, dieser ist im Vergleich zu Baseline Signifikant unterschiedlich (MW: -0.5, SD: 0.10, $p = 0.0001$). Die Osteoblasten (HOB) bei WST-1 zeigen einen signifikanten Abfall von -0.5 (SD: 0.35, $p = 0.0234$) im Vergleich zu Baseline.

Auch bei den Fibroblasten (HU) sieht man beim WST-1 im Vergleich von Tag 4 zu Tag 0, dass sich der Wert signifikant verringert (MW: -0.9, SD: 0.2, $p = 0.0001$). Bei Pico Green hingegen kommt es zu einem Anstieg der Werte, dieser ist nicht signifikant (MW: +0.2, SD: 0.56, $p = 0.4589$).

Bei den Osteosarkomzellen (MG) sieht man einen deutlichen Anstieg der Werte im Pico Green im Vergleich zum WST-1. Der Unterschied bei WST-1 ist jedoch aufgrund der großen Streuung bei WST-1 nicht signifikant (MW: +4.1, SD: 6.85, $p = 0.2015$). Für Pico Green zeigt sich ein signifikanter Unterschied (MW: +1.8, SD: 1.04, $p = 0.0080$).

Bei den humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigt sich im Pico Green ein Anstieg gegenüber der Baseline, dieser Unterschied ist statistisch signifikant (MW: 0.9, SD: 0.30, $p = 0.0009$). Beim WST-1 Test ist ein deutliches Absinken der Werte zu erkennen (MW: -1.6, SD: 1.75), der Unterschied zur Baseline ist nicht signifikant ($p = 0.0713$).

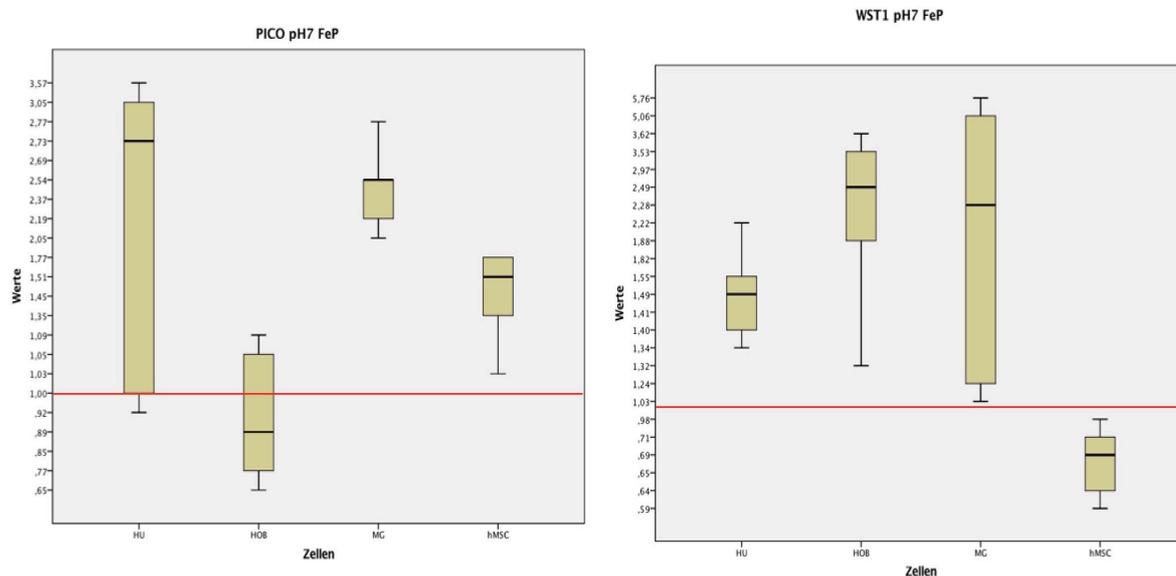
FeP:

Abbildung 35: Darstellung der Zellviabilität sowie der Zellaktivität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeP bei pH 7. Die Zellvitalität lässt bei allen Zelllinien über die Versuchsdauer einen Anstieg verzeichnen, mit der Ausnahme der HOB, welche sich im Bereich des Ausgangswertes einpendeln. Die Zellviabilität steigt ebenfalls mit Ausnahme der hMSC.

Bei WST-1 zeigen die Fibroblasten (HU) einen Anstieg zur Baseline von 0.6 (SD: 0.33). Dieser Anstieg ist statistisch signifikant ($p = 0.0081$). Bei Pico Green zeigt sich, dass die Werte im Vergleich zur Baseline ebenfalls signifikant ansteigen (MW: +1.3, SD: 1.10 $p = 0.0320$).

Bei den Osteoblasten (HOB) ist im Pico Green ist ein minimaler Abfall im Mittel zu erkennen (-0.1, SD: 0.17), dieser ist nicht signifikant ($p = 0.1512$). Im WST-1 zeigt sich bei den Osteoblasten (HOB) ein Anstieg im Vergleich zu Tag 0 der statistisch signifikant ist (MW:1.5, SD: 0.91, $p = 0.0095$).

Wie auch schon zuvor sieht man bei den Osteosarkomzellen (MG) im WST-1 Test eine deutliche Steigerung der Werte gegenüber des ursprünglichen Ausgangswertes, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (MW: 2.0, SD:2.01, $p = 0.0607$). Im Pico Green ist ebenfalls ein Anstieg der Werte zu verzeichnen, welcher signifikant im Vergleich zu Tag 0 ist (MW: 1.4, SD: 0.26, $p < 0.0001$).

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen einen statistisch signifikanten Abfall im WST-1 im Vergleich zur Baseline auf (MW: -0.3, SD: 0.14; $p = 0.0037$). Im Pico Green ist ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen (MW: 0.5, SD:0.28, $p = 0.0082$).

FeSi:

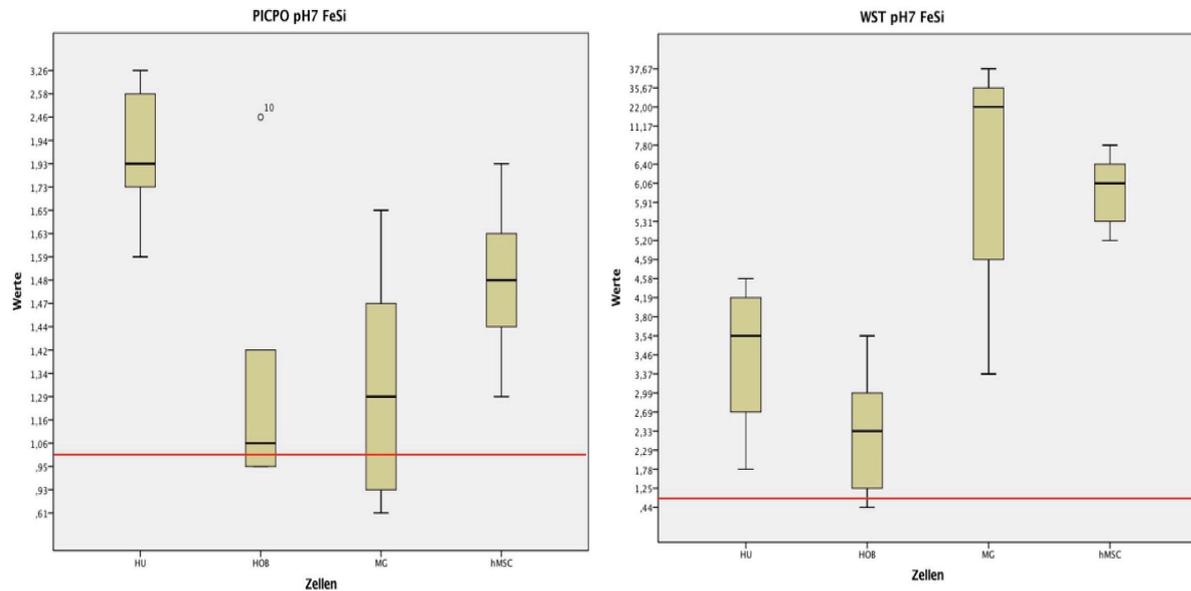


Abbildung 36: Darstellung der Zellvitalität sowie der Zellviabilität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeSi bei pH 7. Die Zellviabilität und die Zellvitalität steigen über die Versuchsdauer bei allen Zellgruppen an.

Die Werte der Fibroblasten (HU) steigen signifikant im WST-1 (MW: +2.4, SD: 1.03, $p = 0.0022$). Gleiches gilt für Pico Green (MW: +1.1, SD: 0.65, $p = 0.0079$).

Pico Green zeigt, dass sich die Werte der Osteoblasten (HOB) im Vergleich zur Baseline etwas steigern, dieser Unterschied ist nicht signifikant (MW: 0.3, SD: 0.6, $p = 0.2802$). Im WST-1 zeigen die Osteoblasten (HOB) ebenfalls einen statistisch nicht signifikanten Anstieg der Werte (MW: 1.1, SD: 1.13, $p = 0.0568$).

Osteosarkomzellen (MG) zeigen mit +18.1 beim WST-1 Test einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Baseline (SD: 15.15; $p = 0.0329$). Bei Pico Green hingegen ist der Anstieg nur minimal (+0.2) im Vergleich zur Baseline (SD: 0.38) und ist statistisch nicht signifikant ($p = 0.2711$).

Bei den humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) steigen die Werte im Pico Green Test im Vergleich zur Baseline statistisch signifikant an (MW: 0.5, SD: 0.22, $p = 0.0018$). Auch im WST-1 Test ist eine statistische Veränderung zu vermerken, welche mit einem Anstieg der Werte einhergeht. (MW: +5.1, SD: 0.94, $p < 0.0001$).

FeSiP:

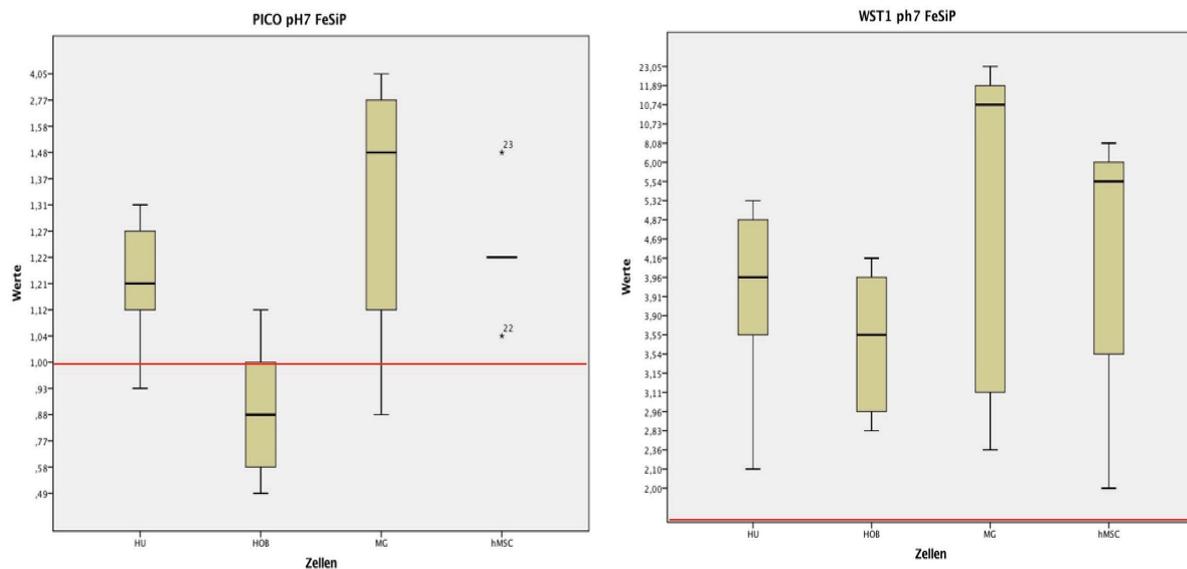


Abbildung 37: Darstellung der Zellvitalität sowie der Zellviabilität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeSiP bei pH 7. Die Zellaktivität steigt, mit Ausnahme der HOB, über die Versuchsdauer bei allen getesteten Zelllinien an. Die Zellviabilität steigt bei allen Zelllinien signifikant an.

Fibroblasten (HU) erzielen im Pico Green einen minimalen Anstieg von 0.2 (SD: 0.14), dieser Unterschied ist signifikant im Vergleich zu Tag 0 ($p = 0.0327$). Bei WST-1 ist die Steigerung der Werte für die Fibroblasten (HU) deutlich ersichtlicher und im Vergleich zur Baseline signifikant (MW: +3.1, SD:1.16, $p = 0.0013$).

Bei den Osteoblasten (HOB) ist im Pico Green ein minimales Absinken der Werte bei den zu erkennen. Der Unterschied zum Ausgangswert ist nicht signifikant (MW: -0.2, SD: 0.24, $p = 0.1070$). Im WST-1 kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Werte, dieser ist als signifikant zu werten (MW: +2.5, SD:0.58, $p = 0.0001$).

Die Osteosarkomzelllinie (MG) steigt in den Werten des Pico Green gegenüber der Baseline, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (MW: +1.0, SD: 1.22, $p = 0.1104$). Im WST-1 lässt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Tag 0 bei den Osteosarkomzellen (MG) feststellen (MW: 9.3, SD: 7.49, $p = 0.0285$).

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) weisen, wie die Fibroblasten (HU), einen minimalen Anstieg gegenüber der Baseline auf. Der Unterschied im Vergleich zu Tag 0 ist signifikant (MW: +0.2, SD: 0.14, $p = 0.0108$). Bei WST-1 ist der Anstieg deutlich höher (MW: 4.1, SD: 2.10) und ist im Vergleich zur Baseline signifikant ($p = 0.0049$).

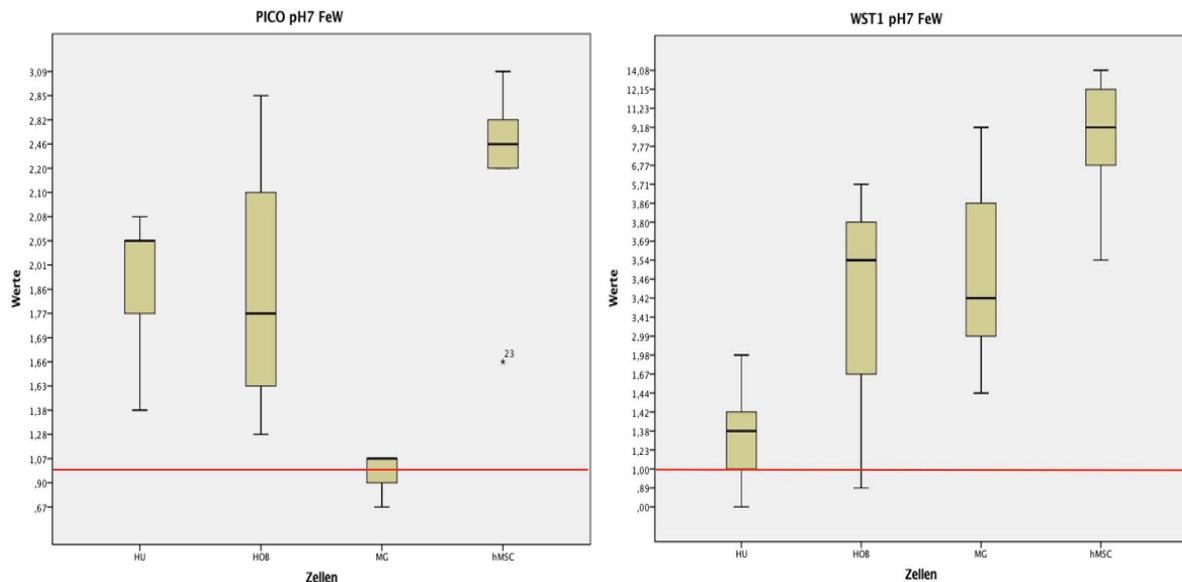
FeW:

Abbildung 38: : Darstellung der Zellvitalität sowie der Zellviabilität mittels PICO Green Assay und WST-1 für FeSiP bei pH 7. Die Zellvitalität und die Zellviabilität steigen über die Versuchsdauer bei allen Zellgruppen an.

Fibroblasten (HU) zeigen einen nicht signifikanten Anstieg der Werte gegenüber dem Tag 0 im WST-1 (MW: +0.2, SD: 0.66, $p = 0.5624$). Im Pico Green ist ein signifikanter Anstieg gegenüber der Baseline zu erfassen (MW: 0.9, SD 0.27, $p = 0.0005$).

Testet man die Osteoblasten (HOB) mit Pico Green ist ein deutlicher Anstieg der Werte gegenüber der Baseline zu erkennen, dieser Unterschied ist statistisch signifikant (MW: 0.6, SD: 0.54, $p = 0.0094$). Bei WST-1 steigen die Werte der Osteoblasten (HOB) ebenfalls deutlich (MW: +2.2, SD: 1.71). Der Unterschied ist im Vergleich zur Baseline signifikant ($p = 0.0255$).

Testet man die Veränderung von Osteosarkomzellen (MG) mit Pico Green sieht man keine signifikante Veränderungen gegenüber Tag 0 (MW: -0.0, SD: 0.16, $p = 0.6972$). Im WST-1 ist hingegen ein signifikanter Anstieg der Werte zu verzeichnen (MW: +3.1, SD: 2.65, $p = 0.0368$).

Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen bei dem WST-1 Test einen signifikanten Anstieg der Werte im Vergleich zur Baseline (MW: 8.3. SD: 3.91, $p = 0.0036$). Bei dem Pico Green Test ist der Anstieg nicht ganz so hoch, ist jedoch ebenfalls signifikant im Vergleich mit der Baseline (MW: 1.4, SD: 0.50, $p = 0.0008$).

4.3.2 Auswertung der Zellzahl

4.3.2.1 pH 6

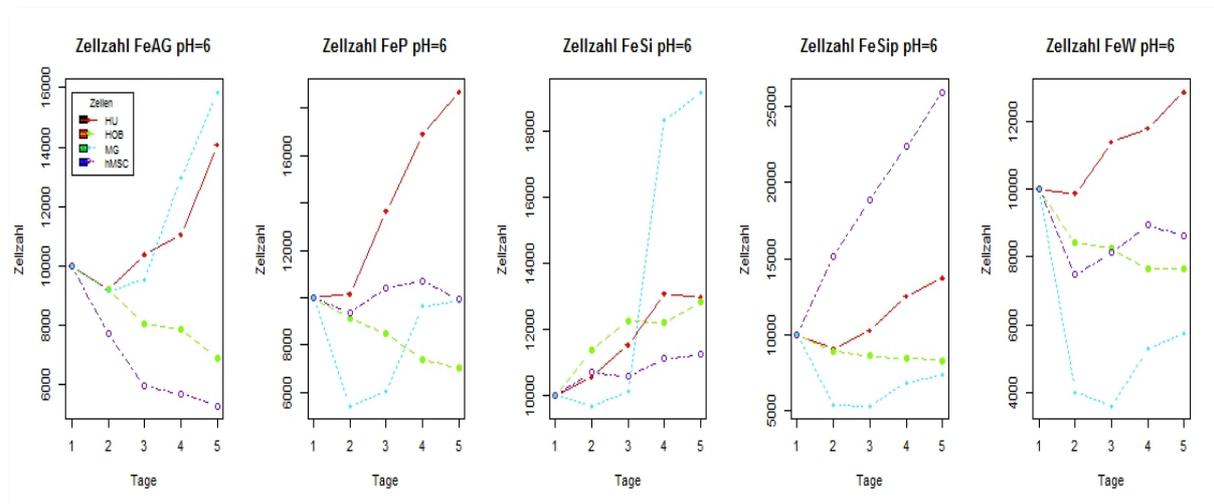


Abbildung 39: Darstellung des Zellwachstumsverlaufs bei den getesteten Legierungen bei saurem pH-Wert.

Bei den **Fibroblasten (HU)** lässt sich im sauren Milieu bei den getesteten Legierungen und der gesamten Versuchsdauer in allen beobachteten Zellkulturen eine deutliche Vermehrung der Zellzahl feststellen. Für die **Osteoblasten (HOB)** zeigt sich bei den Metallen FeAg, FeP, FeSiP und FeW ein Abfall der Zellzahl, mit Ausnahme des Metalls FeSi. Hier ist ein Anstieg der Zellzahl nachzuweisen. Die Zelllinie der **Osteosarkomzellen (MG)** zeigt einen Anstieg der Zellzahl beim Metall FeAg und FeSi. bei FeP ist zunächst ein Rückgang der Zellzahl zu erkennen, der sich jedoch gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wieder auf dem Niveau des Ausgangswerts mit 10 000 Zellen befindet. Auch bei den Metallen FeSiP und FeW verringert sich die Zellzahl zunächst, steigen jedoch bei FeP wieder an, bleiben aber unter dem Ausgangswert. Bei den **hMSCs** kommt es zu einem Absinken der Zellzahl bei den Metallen FeAg und FeW. Bei FeP verbleibt die Zellzahl auf der Höhe des Ausgangswerts. Bei FeSiP und FeSi, ist ein stetiger Anstieg der Zellzahl in der Beobachtungszeit zu verzeichnen.

Bei der Entwicklung der Zellzahl in **FeAg**, bei einem pH-Wert von 6, zeigt sich für die Zellen folgender Trend:

Im zeitlichen Verlauf ist bei den Osteoblasten (HOB), in den ersten Tagen kein signifikanter Unterschied zur Baseline in Bezug auf die Zellzahl zu erkennen (siehe z.B.: Tag 4 - eine Veränderung im Mittel von -835 zu Baseline SD: 1092.8 und einem zugehörigen p-Wert von 0.1202). Erst an Tag 5 zeigt sich eine signifikante Veränderung bei der Zellzahl (-1870 im Vergleich zur Baseline SD: 1560, p-Wert: 0.0324). Bei den Fibroblasten (HU) zeigt sich erst ein Abfall der Zellzahl im Vergleich zur Baseline (-804 und SD: 929.60, p-Wert: 0.0878) jedoch ist hier ab dem dritten Tag eine Erholung mit einem Anstieg zu beobachten (367, SD:

1745.1 p-Wert 0,6299) der sich bis Tag 5 fortsetzt und sich signifikant im Vergleich zur Baseline verhält (4077, SD: 2536.4, $p = 0.0110$). Für die Osteosarkomzellen (MG) zeigt sich erst ein nicht signifikanter Abfall im Vergleich zu Tag 0 (-862, SD: 4275.6, $p = 0.6424$ an Tag 2; -466, SD: 2829.7, $p = 0,7036$ an Tag 3). Ab Tag 4 ist ein signifikanter Anstieg zu erkennen (+2949, SD: 2141,8, $p = 0.0198$). Der Trend der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigt schon zu Beginn eine Verminderung der Zellzahl an. An allen Messzeitpunkten bei dem Metall FeAg ist die Zellzahl der hMSC im Vergleich zur Baseline signifikant abgefallen (z.B.: Tag 3 -4070, SD: 1495.5 und einen p-Wert von 0.0010).

Bei **FeP** zeigt sich folgende Entwicklung in der Zellzahl:

Osteoblasten (HOB) zeigen über die Versuchsdauer einen Abfall der Zellzahl im Vergleich zu Tag 0. Dieser Trend zieht sich über alle Zeitpunkte hinweg. Während der Unterschied von Tag 3 zu Tag 0 noch nicht signifikant ist (MW: -1539, SD: 1587.7 und $p = 0.0636$) zeigt sich, dass sich die Anzahl der Zellen ab Tag 4 im Vergleich zu Tag 0 signifikant unterscheidet (MW: -2593, SD: 621,26 und $p = 0.0002$). Fibroblasten (HU) haben zu Beginn eine leicht erhöhte Anzahl an Zellen (MW: +161.4, SD: 1191,2 $p = 0.7534$). Diese steigt mit dem Verlauf der Messzeitpunkte auch bis Tag 5 an und unterscheidet sich signifikant im Vergleich zu der Zellzahl an Tag 0 (MW: +8681, SD: 1581,4, $p < 0.0001$). Bei den Osteosarkomzellen (MG) ist an Tag 1 eine signifikante Verringerung der Zellzahl zu beobachten (MW: -4577, SD: 3217.0, $p = 0.0176$). Dies ist auch noch an Tag 3 zu erkennen, ist aber bereits nicht mehr signifikant im Vergleich zu Tag 1 ist (MW: -3979, SD: 5332,3, $p = 0.1271$). Bis zu Messzeitpunkt 5 hat sich die Zellanzahl den Wert von Tag 1 angenähert (MW: -163, SD: 8103,5 und p-Wert: 0.9626). Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen über den kompletten Verlauf keine statistisch signifikante Veränderung, die Anzahl der Zellen bewegt sich um den Ausgangswert mit einer maximalen negativen Abweichung im Mittel von -631 (SD: 1079.4, $p = 0.2114$) und einer maximalen Abweichung von +694,8 (SD: 3832,9, $p = 0.6756$).

FeSi

Im Verlauf der Versuchsdauer ist ein Wachstum der Zellzahl zu erkennen. Dieses ist bis Tag 5 nie signifikant im Vergleich zu Tag 0 (MW: +2829, SD: 5197.7, $p = 0.2400$). Auch bei den Fibroblasten (HU) kommt es, wie man auf der Abbildung 39 erkennen kann, zu keinem signifikanten Anstieg über die Messzeitpunkte. An Tag 2 ist das Wachstum nur gering ausgeprägt (MW: 551.5, SD: 739,72 und $p = 0.1274$), steigt jedoch über die Versuchsdauer und zeigt sich letztendlich signifikant (Tag 4: MW: 3074, SD: 2078,2, $p = 0.0152$), auch wenn die Zellzahl zu Tag 5 einmal leicht abfällt (MW: 2986, SD: 2537.6, $p = 0.0345$). Die Osteosarkomzellen (MG) zeigen in der Abbildung 39. nach Tag 3 einen deutlichen Anstieg in

der Zellzahl (MW: 9199, SD: 9740,4). Wie zu erkennen ist, ist hier jedoch die Standardabweichung um den Mittelwert des Vergleichs zur Baseline so groß, dass dieser nicht signifikant ist. Zieht man hier die Werte der beiden Extrema hinzu, sieht man deutlich, dass ein großer Unterschied in der Zellzahlveränderung zu erkennen ist. Während das Minimum der Änderung an Tag 0 -714 ist, ist das Maximum der Zellen +25909 im Vergleich zu Tag 0. Für die Osteosarkomzellen (MG) zeigt sich über die Versuchsdauer ein Anstieg der Zellzahl. Vergleicht man diesen mit dem Mittelwert, ergibt sich keine signifikante Änderung. An Tag 5 erreicht der Zuwachs sein Maximum. Zu messen ist +1257 Zellen bei einer Standardabweichung von 1903,7. Bei einem p-Wert von 0.1667 ist der Unterschied wie beschrieben nicht signifikant. Bei den humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) steigt die Zellzahl ebenfalls über die Beobachtungszeit an. Die Änderung im Vergleich zu Tag 0 unterscheidet sich hierbei nicht signifikant (z.B.: Tag 3: MW +8889, SD: 14129 und $p = 0.1839$). An Tag 5 kann weiterhin ein Zellwachstum zu erkennen (MW: +15972, SD: 16111), dieses ist jedoch für diesen Beobachtungszeitpunkt nicht signifikant im Vergleich zu Tag 0.

FeSiP

In der Abbildung 39 ist für die Osteoblasten (HOB) ein Abfall der Zellzahl über die Beobachtungszeitpunkte hinweg zu verzeichnen. An Tag 2 ist der Vergleich zur Baseline noch nicht signifikant (MW: -1096, SD: 1780,7 und $p = 0.1918$). Jedoch sinkt über die Zeit die Anzahl der Zellen weiter, so dass an Tag 5 der Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert signifikant ist (MW: -1714, SD: -1312,6, $p = 0.0240$). Bei den Fibroblasten (HU) ist am Tag 1 ein leichter Abfall zu verzeichnen, der Unterschied ist nicht signifikant (MW: -960, SD: 1414,3, $p = 0.1574$). Nach diesem Zeitpunkt beginnt die Zellzahl zu steigen. Ab Tag 3 steigt die Zellzahl über den Ausgangswert. An Tag 4 erkennt man einen Unterschied von +2505 bei einer SD von 3759,7 Zellen. Dieser Anstieg ist im Vergleich zum Mittelwert an Tag 0 nicht signifikant. Erst am letzten Tag unterscheiden sich die Anzahl der Zellen signifikant vom Ausgangswert (MW: +3709, SD: 3126,7). Bei den Osteosarkomzellen (MG) zeigt sich ab dem ersten Messzeitpunkt eine signifikante Verringerung der Zellzahl im Vergleich zum Ausgangswert (MW: -4640, SD: 1533,0, $p = 0,0007$ an Tag 2; MW: -4718, SD: 2184,9, $p = 0,032$ an Tag 3). Jedoch erholt sich die Anzahl der Zellen wieder und steigt im Verlauf an. Der Unterschied an Tag 5 ist nicht signifikant. Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), zeigen im zeitlichen Verlauf in FeSiP einen deutlichen Anstieg in der Zellzahl über die gesamte Versuchsdauer. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied bei dem Vergleich zu Tag 1 zu erkennen (z.B.: Tag 3 MW: +8889, SD: 14129, $p = 0.1839$). Am letzten Tag kann man einen weiteren Anstieg beobachten, der im Vergleich zur Baseline auch hier knapp nicht signifikant ist (MW: +15972, SD: 16111, $p = 0.0595$).

FeW

Die Zellzahl der Osteoblasten (HOB) nimmt über die Versuchsdauer ab. Über alle fünf Beobachtungszeitpunkte ist der Unterschied im Vergleich zur Baseline signifikant (z.B.: Tag 3: MW: -2372, SD 1446.3, $p = 0.0102$). Für die Fibroblasten (HU) zeigt sich laut Graph erst ein kleiner Abfall der Zellzahl, dieser steigt jedoch über die Versuchsdauer wieder an. An Tag 4 gibt es hier ein Plus von 1785 im Mittel (SD: 21567,7), dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p = 0.0984$). An Tag 5 zeigt sich ein weiterer Anstieg der Zellzahl, der Unterschied ist im Vergleich zur Baseline signifikant (MW: +2852, SD: 2519.5 und $p = 0.0393$). Bei Osteosarkomzellen (MG) zeigt sich ein Abfall der Zellzahl über die Versuchsdauer. Bereits an Tag 3 ist ein Unterschied von -6401 im Vergleich zu Tag 1 nachzuweisen (SD: 912,67), bei einem p -Wert von <0.001 ist dieser Unterschied signifikant. Zwar erholt sich die Zellzahl in den letzten beiden Beobachtungszeitpunkten, der Unterschied bleibt jedoch weiterhin signifikant (MW: - 4282, SD: 3446.6 und $p = 0.0287$). Bei humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) ist ein ähnlicher Trend wie bei den Osteosarkomzellen (MG) zu erkennen. Anfangs kommt es zu einer Verringerung der Zellzahl. Der Unterschied an Tag 3 ist signifikant im Vergleich zu Tag 1 (MW: -1884, SD: 1429.1, $p = 0.0232$). Auch hier kommt es anschließend zu einem Anstieg der Zellzahl, dieser ist jedoch im Vergleich zu Tag 0 nicht signifikant (MW: -1367, SD: 2406,2, $p = 0.2229$).

4.3.2.2 pH 7

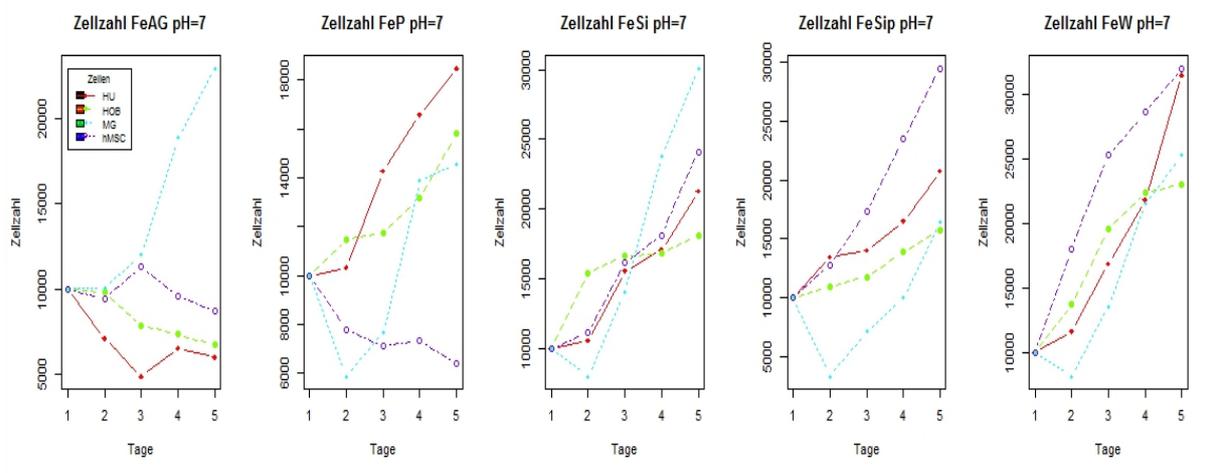


Abbildung 40: Darstellung des Zellwachstumsverlaufs bei den getesteten Legierungen bei neutralem pH-Wert.

Im neutralen Milieu ($\text{pH}=7,4$) zeigt sich ein ähnlicher Verlauf in Bezug auf die Entwicklung und den Anstieg der Zellzahl der Fibroblasten (HU). Nur bei FeAg erfolgt ein Abfall der Zellzahl. Bei den **Osteoblasten (HOB)** ist ein vergleichbarer Verlauf zu erkennen. Auch hier kommt es nur bei dem Metall FeAg zu einem Abfall der Zellzahl. Bei der **Osteosarkomzelllinie (MG)** ist ein Ansteigen der Zellzahl über die Versuchszeit bei jeder Metallgruppe zu erkennen. Für die **humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC)** Zellen wird ein Absinken der Zellzahl bei FeAg und FeP verzeichnet. Bei den Metallen FeSi, FeSiP und FeW kommt es auch hier zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl.

Bei **FeAg** zeigt sich bei den Osteoblasten (HOB) erst ein leichter Abfall der Zellzahl zu Beginn (MW: -184, SD: 1301.5, $p = 0.7433$), welcher sich über die Beobachtungszeitpunkte weiter verringert. Ab Tag 3 ist ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Baseline zu erkennen. Am Größten ist dieser am letzten Tag mit einem Unterschied von -3297 (SD: 922,87), dieser ist bei $p = 0.0003$ signifikant. Bei den Fibroblasten (HU) verringert sich die Zellzahl bis Tag 3 deutlich (Tag 3: MW: -5134, SD: 753.99, $p < 0.0001$), um dann zu Tag 5 hin leicht wieder anzusteigen (MW: -3985, SD: 1590.6, $p = 0.0017$). Im Vergleich zu den Baseline-Werten ist der Abfall der Zellzahl zu jedem Zeitpunkt signifikant. Die Zellzahl der Osteosarkomzelllinie (MG) steigt in dem Metall FeAg. An Tag 3 zeigt sich ein Anstieg von +2024 (SD: 2296.1) welcher noch nicht signifikant ist ($p = 0.0833$). Zum Ende der Beobachtungszeit ist ein Plus von 12928 Zellen zu messen (SD: 7439.7), welches im Vergleich zur Baseline betrachtet signifikant ist ($p = 0.0080$). Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) zeigen im Verlauf kaum eine Änderung und schwanken um den Ausgangswert bis sie gegen Ende der Beobachtungszeit leicht absinken (MW: -1273, SD: 2441,6). Bei den humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) ergibt sich keine signifikante Veränderung zur Baseline ($p = 0.2577$).

FeP

In diesem Metall ist bei den Osteoblasten (HOB) ein Anstieg der Zellzahl über die gesamte Beobachtungszeit zu erkennen. Betrachtet man jedoch die dazugehörigen Werte und den Vergleich zur Baseline, kommt es bis Tag 5 zu keiner signifikanten Veränderung. Das Ergebnis an Tag 5 ist bei einem p-Wert von 0.0060 signifikant (MW: +5784, SD: 5849,2). Bei den Fibroblasten (HU) zeigt sich zu Beginn ein Anstieg der Zellzahl, dieser ist ab dem Beobachtungszeitpunkt Tag 3 im Vergleich zum Ausgangswert signifikant (MW: +4273, SD: 3190,5, $p = 0.0219$). Der Anstieg führt sich bis Tag 5 fort und bleibt signifikant (MW: 9467, SD: 6499,7, $p = 0.0242$). Betrachtet man den Graphen in der Abbildung 40 FeP, erkennt man bei den Osteosarkomzellen (MG) einen deutlichen Abfall der Zellzahl zu Beginn, dieser Abfall unterscheidet sich signifikant von dem Ausgangswert (MW: -4122, SD: 3709.3, $p = 0.0471$). Ab Tag 3 kommt es zu einem Anstieg der Zellzahl. Jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant im Vergleich zur Baseline (MW: 4564, SD: 7746.0, $p = 0.2086$). Für die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), tritt zu Beginn ein Abfall der Zellzahl ein, welcher sich signifikant im Vergleich zur Baseline unterscheidet (MW: -2228, SD: 1297.2, $p = 0.0084$). Im weiteren Verlauf sinkt die Zellzahl weiter ab. Am Tag 5 ist der Unterschied signifikant im Vergleich zur Baseline (MW: -3602, SD: 804.1, $p = 0.0001$).

FeSi

Bei FeSi zeigt der Trend ein Wachstum bei allen Zelllinien. Bei den Osteoblasten (HOB) ist dieser Anstieg ab Tag 2 signifikant. Der maximale Anstieg ist an Tag 5 erreicht (MW: 8125, SD: 4919,9 und $p = 0.0099$). Für die Fibroblasten (HU) ist der Anstieg erst gering (Tag 2: MW: 554.8, SD 2955.0 $p = 0.6649$), steigt jedoch ebenfalls stetig bis Tag 5 an, wo man im Vergleich zur Baseline einen signifikanten Anstieg der Zellzahl erkennen kann (MW :11264, SD: 6988.0 und $p = 0.0109$). Bei den Osteosarkomzellen (MG) ist der Anstieg zu keinem Zeitpunkt signifikant. Zwar erreichen die Zellen am letzten Beobachtungstag ein Plus von 20107 Zellen im Vergleich zur Baseline, dieser Wert hat jedoch eine sehr große Standardabweichung (SD: 24457) und ist somit nicht signifikant zur Baseline ($p = 0.1002$). Für die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) bestätigt sich der Trend, wie zuvor, ab Tag 3 ist hier ein signifikanter Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Baseline zu verzeichnen (MW: 6145, SD: 3855.2, $p = 0.0114$). Der Unterschied bleibt bis Tag 5 signifikant (MW: 14111, SD: 7511.2, $p = 0.0058$).

FeSiP

Bei FeSiP zeigt sich ein Zellzahlanstieg über die Versuchsdauer hinweg

Für Osteoblasten (HOB) ist dieses Wachstum zu keinem Zeitpunkt signifikant im Vergleich zum Ausgangswert gestiegen. So zeigt sich am Tag 5 ein Anstieg um 5707 (SD: 5478.8), dieser ist bei $p = 0.0512$ nicht signifikant. Bei den Fibroblasten (HU) zeigt sich gleich zu Beginn, ein signifikanter Anstieg der Zellen im Vergleich zur Baseline (Tag 2: MW: +3457, SD: 2631.7, $p = 0.0235$). Das Wachstum bleibt im Vergleich zur Baseline über die Versuchsdauer signifikant im Vergleich zur Baseline (MW: 10741, SD: 5163.7, $p = 0.0054$). Bei den Osteosarkomzellen (MG) ist zum ersten Mal ein Abfall der Zellzahl zu erkennen, an Tag 2 unterscheidet sich dieser signifikant im Vergleich zur Baseline (MW: -6639, SD: 1485.5, $p = 0.0001$). Im Verlauf erholen sich diese Werte wieder und ab Tag 4 ist ein Anstieg der Zellzahl zu erkennen (MW: +32.7, SD 2367.0, $p = 0.9743$). Am letzten Beobachtungszeitpunkt ist der Anstieg signifikant im Vergleich zur Baseline (MW: 6456, SD: 5895.4, $p = 0.0437$). Bei den humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) ist von Beginn an einen Anstieg zu erkennen. Dieser ist am Ende bei einem Plus von 19444 (SD: 14195) signifikant im Vergleich zur Baseline ($p = 0.0177$).

FeW

Für Osteoblasten (HOB) ist die Zellzahl zu Beginn im Vergleich zur Baseline signifikant angestiegen (MW: 3690, SD: 1932.5, $p = 0.0054$). Der Anstieg bleibt bis zum Ende der Versuchsdauer signifikant (MW: 13001, SD: 3889.6 und $p = 0.0004$). Bei den Fibroblasten (HU) ist der Anstieg der Zellzahl zu jedem Messzeitpunkt signifikant (MW: 21544, SD: 4489,3, $p = 0.0001$). Bei den Osteosarkomzellen (MG) ist anfangs ein leichter Abfall der Zellzahl zu verzeichnen (MW: -1884, SD: 4288.5, $p = 0.3310$). Ab Tag 3 ist ein Anstieg zu erkennen. Am Tag 5 kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Baseline (MW: 158326, SD: 11937 und $p = 0.0255$). Die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) ab Versuchsbeginn einen signifikanten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Baseline (MW: +8028, SD: 6307,3, $p = 0.02963$). Am Tag 5 ist ein Plus von 22056 zu verzeichnen (SD: 9323,8), welches weiterhin signifikant ist ($p = 0.0021$).

4.3.2.3 pH 6 Zellen

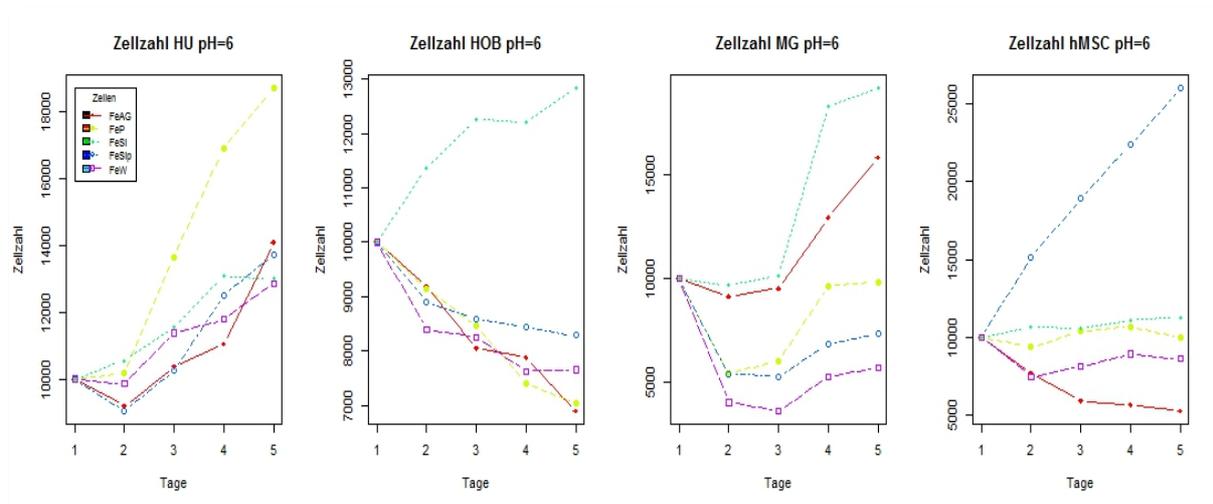


Abbildung 41: Darstellung des Zellwachstums der getesteten Zellreihen bei den verschiedenen Metall-Legierungen bei einem pH-Wert von 6.

Betrachtung der einzelnen Verläufe der Zellen innerhalb der verschiedenen Metalle, ergeben sich im sauren Milieu ($\text{pH}=6$) folgende Beobachtungen:

Bei der Zelllinie der **Fibroblasten (HU)** zeigt sich bei allen Metallgruppen ein Anstieg der Zellzahl. Während sich die Zellen in den Metallen FeAg, FeSi, FeSiP und FeW über die Versuchsdauer ähnlich entwickeln, ist der Anstieg der Zellzahl bei dem Metall FeP am eindrucklichsten. Der Unterschied zwischen FeP und FeAg ist bei einem höheren Mittelwert für FeP ($p < 0.01$) signifikant. Die Mittelwerte der Fibroblasten bei den anderen Metallgruppen unterscheiden sich nicht signifikant.

Bei den **Osteoblasten (HOB)** kommt es bei fast allen Metallgruppen zu einem Absinken der Zellzahl, mit Ausnahme des Metalls FeSi, hier ist ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Das Ergebnis der ANOVA zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den Zellzahlen in den Metallen FeAg und FeSiP ($p < 0,01$). Der Mittelwert im Metall FeSiP ist signifikant höher, als jener im Vergleich mit FeAg. Die Mittelwerte bei den anderen Metallen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Osteosarkomzellen (MG) zeigen bei den Metallen FeAg und FeSi einen kontinuierlichen Anstieg der Zellzahl über die Beobachtungszeit. Die Metalle FeP, FeSiP und FeW weisen zu Beginn einen raschen Absturz der Zellzahl auf, gefolgt von einem anschließenden Anstieg ab dem 3. Tag. Bei FeP nähern sich die Zellen wieder dem Ausgangswert von 10.000 Zellen an. Bei den beiden anderen Metallen bleibt die Zellzahl deutlich unter diesem Wert. Die Mittelwerte für die drei Metalle FeP, FeSiP und FeW ist signifikant niedriger im Vergleich zu FeAg ($p = 0,04$; $p < 0,01$; $p < 0,01$). Der Mittelwert für FeSi im Vergleich zu FeAg höher, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant ($p = 0,20$).

hMSC (humane mesenchymale Stammzellen) zeigen im sauren Milieu einen deutlichen Zellanzahlanstieg bei dem Metall FeSiP. Hier steigt die Zellzahl über die gesamte Versuchsdauer stetig an. Die Zellen im Medium der Metalle FeP und FeSi verbleiben um den Ausgangswert von 10 000. Bei FeAg und FeW sinkt die Zellzahl über die Beobachtungszeit. Die Auswertung mit Hilfe der ANOVA, zeigt für alle Metallgruppen, einen angestiegenen Mittelwert der hMSC im Vergleich zum Metall FeAg. Für das Metall FeSiP ist dieser Unterschied signifikant ($p < 0,01$). Die anderen Metallgruppen weisen keinen signifikanten Unterschied auf.

4.3.2.4 pH 7

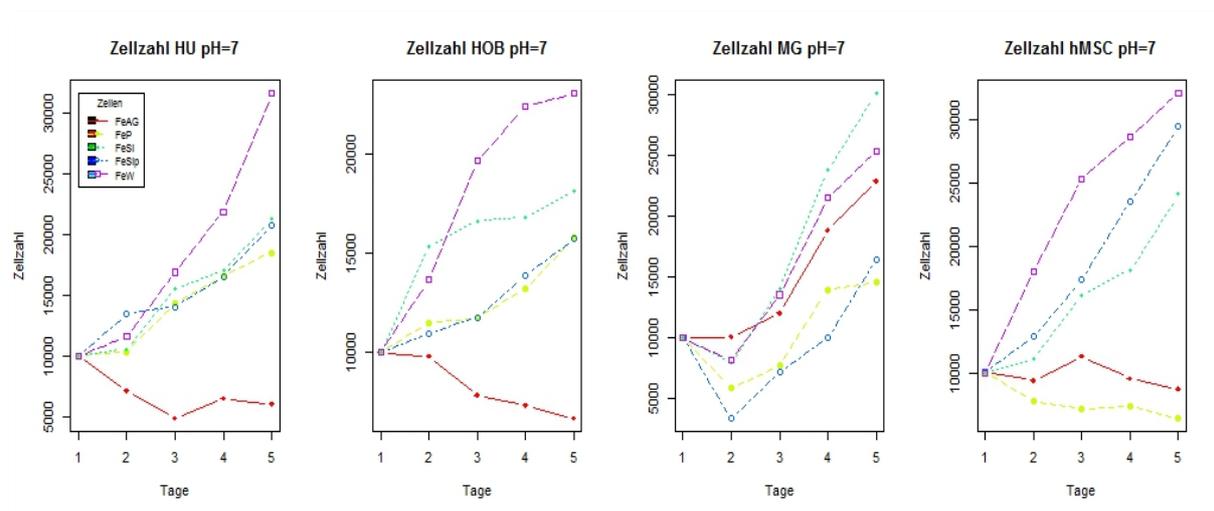


Abbildung 42: Darstellung des Zellwachstums der getesteten Zellreihen bei den verschiedenen Metall-Legierungen bei einem pH-Wert von 7.

In einem neutralen Milieu bei pH 7 lassen sich für die Zellen folgende Aussagen treffen.

Die **Fibroblasten (HU)** entwickeln sich in den Metallgruppen FeP, FeSi, FeSiP und FeW ähnlich. Die Zellzahl nimmt über die Versuchsdauer bei allen Metallen signifikant zu, mit der Ausnahme des Metalls FeAg. Hier sinkt die Zellzahl über den Beobachtungszeitraum ab. Die Auswertung zeigt hier, signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Metallen zu FeAg ($p < 0,01$).

Wie auch schon bei den Fibroblasten, kann bei den **Osteoblasten (HOB)** bei allen Metallgruppen, bis auf das Metall FeAg, ein Anstieg der Zellzahl verzeichnet werden. Die höchste Zellzahl konnte bei dem Metall FeW festgestellt werden. Der Anstieg der Zellzahl ist bei FeP und FeSi nahezu identisch. Auch hier zeigt die Auswertung mithilfe der ANOVA, dass die Unterschiede, welche bereits in der Abbildung 42 erkennbar sind, signifikant gegenüber dem Metall FeAg sind ($p = 0,03$ und $p < 0,01$). Dabei weisen die Zellen im Metall FeSi und FeW einen deutlich höheren Mittelwert und somit ausgeprägtes Wachstum auf.

Bei den **Osteosarkomzellen (MG)** findet sich ein Anstieg der Zellzahl über den Beobachtungszeitraum in allen Metallgruppen. In den Metallen FeP, FeSi, FeSiP und FeW lässt sich ein leichtes Absinken der Zellzahl bis Tag 2 feststellen, gefolgt von einem Anstieg der Zellzahl über den des Ausgangswerts. Im Verlauf zeigen FeAg, FeSi und FeW ein Wachstumsverhalten auf. Das Ergebnis der ANOVA zeigt, dass sich die Unterschiede in den Mittelwerten zwischen FeAg und FeSi bzw. FeW nicht signifikant unterscheiden ($p = 0,19$ und $p = 0,60$). Bei den Metallen FeP und FeSiP sind die Mittelwerte im Vergleich zu FeAg signifikant kleiner. ($p = 0,02$ und $p < 0,01$).

Bei **hMSC (humane mesenchymale Stammzellen)** zeigt sich, dass sich die Zellzahl sich bei dem Metall FeAg um den Ausgangswert bewegt, jedoch mit einer Tendenz zur Verringerung. Im Metall FeP sinkt die Zellzahl über die Zeit der Beobachtung ab. Die drei restlichen Metalle zeigen einen Anstieg der Zellzahl. Der größte Anstieg der Zellzahl lässt sich im Metall FeW erkennen. FeSi und FeSiP weisen einen vergleichbaren Verlauf auf. Die Analyse zeigt keinen signifikanten Unterschied der Mittelwerte von FeAg und FeP. Für FeSi und FeSiP zeigt ein signifikanter Anstieg der Mittelwerte im Vergleich zu FeAg. ($p = 0,06$ und $p = 0,01$). Auch für das Metall FeW zeigt die ANOVA einen signifikanten Anstieg ($p = <0,01$) im Vergleich zu FeAg.

4.3.2.5 Vergleich des Zellverhaltens in den verschiedenen Metallen und pH-Werten

Das Zellverhalten wird in den Metallen und den verschiedenen pH-Werten geprüft. Folgendes Ergebnis wurde für die getesteten Zellreihen festgestellt:

Fibroblasten (HU)

Ändert sich der pH-Wert von 6 auf 7,4 beim Metall FeAg so verringert sich die Zellzahl im Mittel. Dieser Unterschied der Fibroblasten (HU) Zellen bei pH=6 zu pH=7 ist signifikant ($p = 0,02$). Bei FeP lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden pH-Werten feststellen ($p = 0,77$). Auch die Analyse der Zellzahl bei dem Metall FeSi ergibt keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,10$). Ändert sich der pH-Wert von 6 auf 7,4 so steigt die Zellzahl der Fibroblasten in dem Metall FeSiP signifikant an ($p = 0,02$). Die Zellzahländerung bei dem Metall FeW ist nicht signifikant ($p = 0,09$).

Osteoblasten (HOB)

Beim Metall FeAg ist der Unterschied der Zellzahlen zwischen den verschiedenen pH-Werten nicht signifikant ($p = 0,78$). Für die anderen Metalle zeigt sich ein signifikant höherer Anstieg der Zellenzahl bei einem pH-Wert von 7,4 im Vergleich mit den Werten des pH 6 ($p = 0,01$ bis $p = 0,02$).

Osteosarkomzellen (MG)

Bei einem pH-Wert von 7,4 steigt in dem Metall FeAg und FeW die Anzahl der Zellen signifikant im Vergleich zum pH-Wert von 6 ($p = 0,07$ und $p = 0,04$). In den Metallen FeP, FeSi und FeSiP sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den beobachteten pH-Werten zu erkennen ($p = 0,08$; $p = 0,16$, $p = 0,26$).

Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)

Vergleicht man die Zellen in einem neutralen pH (7,4) mit jenen in einem sauren Milieu (6), zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Zellzahl in Kombination mit den Metallen FeAg und FeW ($p = 0,03$ und $p = 0,02$). Zu einer signifikanten Abnahme der Zellzahl kommt es hingegen bei dem Metall FeP ($p = 0,02$). Kein signifikanter Unterschied findet sich bei der Zellzahl der Metalle FeSi und FeSiP ($p = 0,09$ und $p = 0,89$).

Zusammenfassung der Ergebnisse:

Legierung Eisen/Silber: **FeAg**

Sowohl bei neutralem, als auch bei saurem pH-Wert kommt es zu einer erheblichen Abnahme der Zellzahl, der Zellviabilität und der Zellvitalität, mit Ausnahme der Osteosarkomzellen (MG). Diese weisen in beiden pH-Werten einen Zellzuwachs auf, mit außerdem gesteigerter Zellaktivität und Viabilität. Im pH 7 kommt es hier sogar zu einer Verdoppelung der Zellzahl.

Legierung Eisen/Phosphor: **FeP**

In der Perfusionskultur mit neutralem pH-Wert konnte ein ausgeprägtes Zellwachstum in fast allen Zelllinien, mit steigender Zellviabilität und Zellvitalität verzeichnet werden, mit Ausnahme der hMSCs. Bei saurem pH-Wert kam es nur bei den Fibroblasten (HU) zu einem Anstieg der Zellzahl, Zellviabilität und Zellaktivität. Bei den restlichen Zelllinien kam es zu einem Abfall der Zellzahl mit einer Abnahme der Zellvitalität. Somit scheint die Legierung vorzugsweise bei neutralem pH-Wert eine gute Zellverträglichkeit in allen getesteten Zelllinien aufzuweisen.

Legierung Eisen/Silizium: **FeSi**

Im neutralen pH-Wert ist in der Perfusionskultur mit FeSi in allen Zelllinien ein starker Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen, welcher sich mindestens verdoppelt. Auch bei der Zellvitalität ist ein starker Anstieg bis auf das 4-fache des Ausgangswertes zu messen. Bei pH 6 kommt es nur zu einem minimalen Anstieg der Zellzahl, mit Ausnahme der

Osteosarkomzellen. Diese verdoppeln sich fast über die Versuchsdauer, dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der Zellaktivität und -Viabilität. Der minimale Anstieg der restlichen Zelllinien spiegelt sich ebenfalls in Zellviabilität und Zellaktivität wider.

Legierung Eisen/Silizium/Phosphor: **FeSiP**

Im neutralen pH-Wert ist bei allen Zelllinien ein Wachstum zu verzeichnen, welches bei den hMSC am stärksten zur Ausprägung kommt. Die Ergebnisse der Zellaktivität und Zellviabilität korrelieren mit dem gezeigten Zellwachstum. In der Perfusionskultur mit saurem pH-Wert kommt es zu einem leichten Abfall der Zellzahl mit Ausnahme der Fibroblasten (HU – welche sich auf Höhe des Ausgangswertes befinden) und den hMSCs (welche sich sogar verdoppelt haben). Bei der Verdoppelung der Fibroblasten kam es korrelierend zu Zellzahl auch zu einem Anstieg der Zellviabilität als auch Aktivität. Die Ergebnisse der restlichen Zelllinien verhalten sich ebenfalls entsprechend ihres aufgezeigten Wachstums.

Legierung Eisen/Wolfram: **FeW**

In der Perfusionskultur mit FeW kommt es bei neutralem pH-Wert zu einem starken Anstieg des Zellwachstums bei allen Zelllinien. Die Anzahl der hMSC und der Fibroblasten (HU) hat sich über die Versuchsdauer sogar verdreifacht, gefolgt von Osteosarkomzellen und Osteoblasten welche 2,5-fach angestiegen sind. Dieselben Ergebnisse sind auch für die Zellviabilität und die Zellaktivität nachzuweisen.

Im sauren pH-Wert kommt es, nur bei den Fibroblasten (HU), zu einem leichten Anstieg der Zellzahl mit gesteigerter Zellviabilität und Zellaktivität. Bei den restlichen Zelllinien ist ein Abfall der Zellzahl mit korrelierender Abnahme der Zellaktivität als auch Zellviabilität zu verzeichnen. Bei den restlichen Zelllinien liegt die Zellviabilität am Ende der Versuchszeit unter dem Ausgangswert.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation ist, ein Testsystem zu etablieren, welches ermöglicht die *in vivo* Bedingungen im Körper *in vitro* realitätsnah nachzustellen und damit die Zytotoxizität degradierbarer metallischer Werkstoffe zu untersuchen, die zum Einsatz als Knochenersatzmaterial evaluiert werden sollen.

Um die mechanischen Eigenschaften und das Degradationsverhalten von Eisenimplantaten zu verbessern, wurden Legierungselemente hinzugefügt. In dem neu entwickelten Perfusionssystem stehen die Zelllinien nicht in direktem Kontakt zum Werkstoff und können so auf ihre zytotoxische Wirkung realitätsnah untersucht werden, da ein Abtransport gelöster Degradationsprodukte erfolgt. Die Zellen werden mit dem inkubierten Medium, welches die Korrosionsprodukten der Metalle enthält, umspült und sind somit dem oben beschriebenen Shear Stress ausgesetzt. Im Fokus stand die Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Legierungselementen auf die biologische Verträglichkeit in Bezug auf ihre Verwendung als degradierbarer Knochenersatz. Zusätzlich wurden die Möglichkeiten der Modifikation der Umgebungsbedingungen evaluiert.

Mit einem pulvermetallurgischen Ansatz wurden Fe-Ag-, Fe-P-, Fe-W-, Fe-Si-P- und Fe-Si-Proben hergestellt, die hinsichtlich ihrer Zytotoxizität und Auswirkung auf die Zellviabilität und -aktivität getestet wurden.

5.1 Perfusionssystem und Parameter

Die Perfusionskultur ermöglicht *in vitro* einen möglichst physiologischen Blutfluss des spongiosen Knochens nachzustellen. Durch festgesetzte Parameter sind die Ergebnisse jederzeit wieder rekonstruierbar.

Über die ersten Erkenntnisse der Zirkulation des Blutes im Knochen wurde im Jahr 1678 berichtet. 1757 konnten erstmals feine Blutgefäße mittels Gefäßinjektionen nachgewiesen werden. Dies führte zu der Theorie, dass der Knochen eine zweifache Blutversorgung besitzt [136]. Diese Theorie wurde später verifiziert [137, 138]. Mehrere Studien konnten bereits seit 1876 eine gute Durchblutung des Knochens nachweisen [139-141]. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass der Blutfluss zum Knochen zwischen adultem und wachsendem Individuum unterschiedlich ist [142]. Der Blutfluss in einem Organsystem wird durch den vasomotorischen Tonus vieler kleiner Arterien und Arteriolen den Umgebungsbedingungen angepasst. Die Blutzirkulation im Knochen unterliegt der Kontrolle des neuronalen, metabolischen und humoralen Systems [139, 141, 143-146]. Die Blutgefäße des Knochens

können aktiv auf Veränderungen durch humorale und neurogene Stimuli als auch physiologischen Stress mit Vasokonstriktion und –dilatation reagieren [147].

Bis dato gibt es noch keine ausreichende Evaluation des interossären Flusses im Knochen. Wir gehen davon aus, dass im Knochen kein gerichteter Fluss herrscht und vermuten einen Fluss von 0.09ml/min im unbewegten Zustand.

Die Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe fanden gemäß den Standards in einem Monolayer statt. Für die biologische Beurteilung von Medizinprodukten auf *in vitro* Zytotoxizität gibt es die Europäische Norm EN ISO 10993-5, welche entsprechend des Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO) im Deutschen Institut für Normung e.V. (DIN) als europäische Norm den Charakter einer Deutschen Norm hat und Anwendung für die Testung von permanenten Implantaten findet [148]. Diese Norm besteht nicht für resorbierbare und degradierbare Medizinprodukte, sodass nur begrenzte Gültigkeit, für die in unserem Versuch verwendeten degradierbaren Werkstoffe herrscht. Ein direkter Kontakt zwischen Zelle und degradierbaren Implantatwerkstoff entspricht nur eingeschränkt den realen *in vivo* Bedingungen. Der permanente Blut- und Lymphstrom im Organismus führt zum Einen zur Ernährung der Zellen und zum Anderen zum Abtransport der potenziell schädlichen Korrosionsrückstände. Dies hat vermutlich zur Folge, dass die lokale Konzentration der Metallimplantatwerkstoffe dadurch deutlich niedriger ist als in einem Monolayer-System. Die Konzentration ist aber fortan nicht mehr exakt definierbar.

In den vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Verwendung eines Perfusionssystems für die Zellkultur einen wesentlichen Einfluss auf die Beurteilung der Zellzytotoxizität hat [149]. Allerdings hat das damals verwendete System methodische Schwächen. Es kam zum direkten Kontakt zwischen dem zu untersuchenden Metall mit den Zellen und dem darüber hinweg perfundierenden Zellkulturmedium, da der zu untersuchende Werkstoff auf dem Grund der Perfusionskammer gelagert wurde [150]. Das hat in einigen Bereichen extrem hohe lokale Werkstoffkonzentrationen zur Folge. In anderen Bereichen ist diese sehr viel niedriger. Zudem ist eine kontinuierliche und vor allem definierte Perfusion nicht zu erreichen. Ziel war es daher ein Perfusionssystem für die Zytotoxizitätsuntersuchungen zu etablieren, welches eine definierte mechanische Belastung und eine definierte Perfusion gewährleistet. Zudem sollte eine fortwährende mikroskopische Einsicht in die Kammer gewährleistet sein, um nicht wie bislang zur Beurteilung des Zellwachstums den Versuchsansatz auflösen zu müssen. Aus diesem Grund beabsichtigten wir die Entwicklung eines eigenen Systems für die Abbildung möglichst realer Bedingungen und rekonstruierbaren Ergebnissen. Aktuell zeigt sich eine allgemeine Tendenz zu Perfusionssystemen, für welche es jedoch noch keine eigene Norm gibt. Der biologische Zu- und Abfluss im Körper mit Blut- und Lymphkreislauf wird somit nicht ausreichend

berücksichtigt. Aus diesem Grund war es im Rahmen dieser Dissertationsarbeit die Aufgabe, ein Perfusionssystem zu konstruieren, mit welchem die biologische Realität besser simuliert werden kann.

Da sich durch die Bewegung im Körper auch der Blutfluss im Knochen ändert und der Blutfluss im Knochen nicht unidirektional ist, wäre es für zukünftige Versuche wichtig einen variablen Fluss bzw. einen Pendelfluss in Betracht zu ziehen.

5.2 Zytotoxizitätstests in vitro

In den vorangegangenen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurden bezüglich den Zytotoxizitätstests mit reinem Eisen im Monolayer keine brauchbaren Ergebnisse erzielt, da die Fibroblasten innerhalb von 24 Stunden gänzlich abstarben. Im Tierversuch wurde im Vergleich zum vorhergegangenen in-vitro-Perfusionstest eine geringere Degradation der getesteten Metalle nachgewiesen. Ein Einwachsen von Knochen konnte erreicht werden, entsprach aber in der Quantität nicht den Erwartungen [150]. Dies führte dazu die Werkstoffe zu modifizieren.

Daher wurden die Umgebungsbedingungen wie auch die Metalllegierungen modifiziert und erneut hinsichtlich Ihrer Zytotoxizität zu getestet. Getestet wurden fünf verschiedene Legierungen.

5.2.1 Eisen (Fe)

Das Basismaterial der Legierungen besteht aus Eisen. Nach Aluminium ist Eisen das zweithäufigste Metall der Erdkruste und für nahezu alle Säugetiere ein essenzielles Spurenelement [151]. Der Körper eines Menschen enthält durchschnittlich 3,8 g Eisen beim Mann und 2,2 g Eisen bei der Frau. Eisen spielt eine wichtige Rolle im menschlichen Stoffwechsel. Es wird über die Nahrung aufgenommen - die basale Eisen-Absorption beträgt ca. 1 mg pro Tag [152, 153]. Das Spurenelement ist an der Aktivierung, dem Transport und der Lagerung von molekularem Sauerstoff sowie für die Reduktion von Ribonukleotiden und Stickstoff beteiligt. Eisen ist darüber hinaus ein wesentlicher Bestandteil für die Reparatur von Lipid-, Protein-, DNA-Schäden [154, 155]. Zwischen drei und fünf Gramm Eisen befinden sich im menschlichen Organismus [152, 156]. Ungefähr zwei Drittel befinden sich als Hämeisen in den Erythrozyten und 15–25 % des Eisens in den Speicherformen Hämosiderin und Ferritin. Die restliche Menge verteilt sich im Myoglobin. In gebundener Form an Transferrin oder in Cytochromkomplexen [157, 158]. Der Großteil des Speichereisens befindet sich in der Leber und im retikuloendothelialen Retikulum [157].

Der menschliche Organismus besitzt keine regulierte Ausscheidung von Eisen und steuert den Eisenhaushalt somit ausschließlich über die Resorption [152, 156]. Täglich gehen 1–2 mg des Spurenelements mit der Abstoßung von Epithelien, mit Galle und Schweiß sowie mit dem Urin verloren [152, 156, 159-161].

Eine zu hohe Eisenaufnahme (Abbau degradierbarer Eisenimplantate, Nahrung etc.) kann aufgrund dieser Tatsache nicht durch eine gesteigerte Ausscheidung kompensiert werden. Erhöhte Ferritinspiegel ($>200 \mu\text{g/ml}$) stellen einen eigenständigen Risikofaktor für die Atherosklerose dar und können das Risiko für Myokardinfarkte verdoppelt [162, 163].

Die Verwendung von Eisen als Biomaterial in der Medizin bietet eine geeignete Alternative, vor allem in Bezug auf Tragen höherer Lasten. Zunächst wurden abbaubare Implantate auf Eisenbasis für die Verwendung in kardiovaskulären Stents untersucht. Obwohl die Analyse der Zytotoxizität von Metallionen eine verminderte Biokompatibilität zeigt [164], konnten bei *in-vitro*-Experimenten keine Abnahmen der Stoffwechselaktivität aufgrund des Vorhandenseins von reinem Eisen (Fe) nachgewiesen werden [50]. In *in-vivo*-Experimenten wurden die implantierten Stents aus Eisen überwiegend resorbiert und hinterließen bei Blutuntersuchungen keine ausgeprägten Entzündungsreaktionen und Serumspiegel [165]. Getestet wurden kleinere Stents (Maus) und größere Stents (Schwein) im Tiermodell. Dabei waren keine Anzeichen für toxische Abbauprodukte zu finden. Jedoch waren Eisenablagerungen in lokalen Zellarealen und auch in Zellen abseits des Implantats nachzuweisen. Die Abbaugeschwindigkeit wurde als relativ gering eingestuft [165-169]. Verschiedene Legierungen mit reinem Eisen wurden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität untersucht und zeigten keine nachteiligen Auswirkungen [170]. Generell wurden Implantate aus abbaubarem Eisen in der Orthopädie weniger diskutiert, sind aber aufgrund der reduzierten Korrosion und der höheren mechanischen Festigkeit attraktiv geworden. Dies spielt vor allem eine Rolle, wenn als tragende Implantate zelluläre Metalle (im Vergleich zum vollgedichteten Material grundsätzlich geringerer Festigkeit) verwendet werden sollen [171]. Bei Eisen ist somit vor allem die relativ geringe Korrosionsrate und die Zytotoxizität *in vivo* zu beachten. Die meisten Eisenlegierungen haben ein relativ hohes Elastizitätsmodul (bis zu 211 GPa), was sie als Ersatzmaterial für mechanisch hoch belasteten Knochen sehr interessant macht, da dabei eine hohe Festigkeit erreicht wird [92, 172, 173].

Ein allgemeines Problem abbaubarer Biometalle ist das Auftreten toxischer Partikel oder Ionen, die entzündliche Reaktionen hervorrufen. Diese zytotoxische Reaktion von Metallionen in Knochenmarkszellen wurde von mehreren Gruppen fokussiert untersucht [174, 175]. Die ersten *in-vivo*-Untersuchungen mit reinem Eisen zeigten relativ niedrige Korrosionsraten [167]. Eisen ist von seiner Abbaucharakteristik somit gut als langsam resorbierbarer Werkstoff geeignet, zeigt aber eine hohe lokale Toxizität. Kombiniert man

Eisen mit Werkstoffen geringerer Toxizität, sollte eine Verbesserung der Zellwachstumsrate erreicht werden. Das Legieren der Metalle hat jedoch erheblichen Einfluss auf den Abbau. Eisen-Mangan-Legierungen wurden beispielsweise zum Erlangen einer höheren Korrosionsrate im Vergleich zu reinem Eisen entwickelt [176].

In der gemeinsamen vorhergegangenen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass ein direkter Kontakt zwischen degradierbarem Eisen und Fibroblasten umgehend zum Zelltod führt. Der indirekte Kontakt über das inkubierte Medium lässt jedoch ein Zellüberleben zu [149].

5.2.2 Silber (Ag)

Im Allgemeinen tritt ein Abbau von Metallen *in vivo* aufgrund verschiedener Korrosionsprozesse auf, wobei die Hauptprozesse Oberflächenkorrosion, interkristalline Korrosion und Lochfraßkorrosion sind [177]. Somit wird die Korrosion durch verschiedene Legierungselemente gefördert. Für die Verwendung in abbaubaren Implantaten müssen solche Elemente biokompatibel sein. Darüber hinaus tritt Kontaktkorrosion auf, wenn zwei Elemente mit großen Potenzialunterschieden in direktem Kontakt stehen. Durch Kontaktkorrosion kann die Korrosionsgeschwindigkeit in metallischen Legierungen beeinflusst werden. Dabei bildet das edlere Metall die Kathode, was zum anodischen Abbau des anderen unedleren Metalls führt. Für eine hohe Korrosionsneigung ist dabei ein möglichst großer Unterschied der Potenzialdifferenzen erwünscht. Aus dieser Sicht ist Silber (Ag) aufgrund seiner Potenzialdifferenz von 1,32 V zu Eisen von großem Interesse. Wegen dieser Differenz der Standardpotentiale wurde Silber (+0,88 V) in Erwägung gezogen, da es mit Eisen (-0,44 V) eine ausreichende Kontaktkorrosion vermuten lässt [149]. Da Silber (Ag) und Eisen (Fe) nicht unlöslich sind, können Silber-Partikel als lokale Korrosionsstellen wirken, was zu verstärkter intergranulärer Korrosion führt [149].

Silber führt zu einer vermehrten Festigkeit des Metalls durch Ausbildung von Metallstegen bei der Wärmebehandlung des Materials [178]. Zusätzlich führt die Zugabe von Silber zu der Legierung zu einer Abnahme der Dichte von 82–83 %. Darüber hinaus ist bekannt, dass Silber (Ag) antiseptische Eigenschaften aufweist. Diese Eigenschaft macht Silber vor allem für den Kliniker sehr wünschenswert. Die Implantation eines Fremdkörpers ist häufig der Ausgangspunkt einer postoperativen Sepsis. Die antiseptische Eigenschaft könnte auch den Einsatz bei entzündlichen Knochenkrankungen ermöglichen, beispielsweise bei Osteomyelitis oder Spondylodizitis [149].

In Bezug auf die Zytotoxizität gibt es in der Literatur keine einheitliche Aussage. Für den Organismus ist Silber in kleinen Mengen unkritisch, in größeren Konzentrationen sind jedoch zytotoxische Effekte zu erwarten [179, 180]. Der Nutzen dieser Eigenschaft liegt auch in der Möglichkeit, Medizinprodukte (z. B. Katheter), chirurgische Implantate (z. B. Endoprothesen)

und auch Kleidungsstücke eine antimikrobielle Wirkung zu verleihen [181-187]. Speziell in der Tumororthopädie wird Silber für die Beschichtung von Mega-Endoprothesen verwendet und ist in dieser Implantatform kommerziell erhältlich [188, 189].

Infektionen mit multiresistenten Bakterien sind zu einem ernststen Problem in der Arthroplastik geworden. Mehrere Studien betreffend der antibakteriellen Aktivität gegen multiresistente Bakterien (MRSA, MRSE, S. Epidermidis etc.) mit metallischen Silberpartikeln wurden durchgeführt [190, 191]. Das verwendete Nano-Silber zeigte eine hohe antibakterielle Aktivität gegenüber den Bakterien inklusive MRSA und MRSE, wohingegen Antibiotikumimplantate keine Aktivität gegen MRSA und MRSE aufwiesen. Es konnten auch keine Unterschiede bei der *in vitro* Toxizität zwischen Silber und der Kontrolle aufgezeigt werden. Nano-Silber war frei von jeglicher *in vitro* Zytotoxizität und zeigte eine hohe Effektivität gegen multiresistente Bakterien [192]. Auch Gosheger et al. untersuchten mit Silber beschichtete Implantate und stellten einen Rückgang der Infektionen fest. Er hat im Tiermodell (Ratten) Silber-beschichtete und mit hoch resistenten Keimen (MRSA) besetzte Materialien implantiert. Dabei konnte eine deutlich geringere Virulenz der Keime nachweisen. Ziel seiner Studie war es, die *in vivo* antimikrobielle Effektivität sowie mögliche Nebenwirkungen Silber-beschichteter Megaprothesen zu untersuchen. In den Versuchen wurden Ratten mit Silber-beschichteten Implantaten und einer Titan-Kontrollgruppe endoprothetisch versorgt sowie mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte die Gruppe mit dem Silber-beschichteten Implantat eine signifikant kleinere Infektionsrate. Auch die gemessenen Entzündungsparameter im Blut waren signifikant geringer. Die Silberkonzentration im Blut war zwar erhöht, es konnten jedoch keine pathologischen Veränderungen der Parameter dargestellt und auch keine organischen Nebenwirkungen nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte eine deutlich geringere Virulenz der Keime ohne toxikologische Nebenwirkungen nachgewiesen werden [179].

Aus den genannten Gründen wurden Silberpartikel schon in den Vorversuchen der gemeinsamen Arbeitsgruppe eingesetzt. In Bezug auf die erwartete Erhöhung der Korrosionsrate konnte jedoch kein signifikanter Effekt der Silberpartikel festgestellt werden. Das war überraschend, ein Grund dafür könnte der relativ kleine Silberanteil in der Legierung gewesen sein [149].

Auch in Betrachtung der Zytotoxizität zeigten die Zelltoxizitätsuntersuchungen in den Vorversuchen ernüchternde Ergebnisse. Es war zu erkennen, dass im Monolayer ein Absterben der Zellen innerhalb weniger Tage bzw. Stunden stattfand. Unter dem Abtransport der gelösten Elemente im Perfusionssystem war ein Zellwachstum möglich, welches sogar eine Erhöhung der Zellzahl möglich machte [135].

Darüber hinaus wurde Silber aufgrund seiner bakteriotoxischen Eigenschaften verwendet. Um die Infektionsrate von Standardprothesen in einem Versuchsaufbau zu verringern, wurden versilberte Prothesen verwendet [179]. In dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass trotz steigendem Blut-Serum-Spiegel von Silber keine zytotoxische Wirkung nachweisbar war. Auch in der Umgebung der versilberten Prothesen wurden keine Fremdkörpergranulome beobachtet [193]. In der vorangegangenen Arbeit konnte jedoch gezeigt, dass das Zellwachstum der Fibroblasten unabhängig von der Zellkulturmethode sehr gering ausgeprägt war. Um die zytotoxische Wirkung von Silber zu verringern, wurde die Konzentration überprüft, es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen 1% und 5% Silber festgestellt werden [135]. Im Gegensatz dazu hatten Harges et al. Hinweise auf ein normales Wachstum von Osteoblasten einer Osteosarkom-Zelllinie in Gegenwart einer geringen Silberkonzentration zeigen können [180]. Dieses Ergebnis könnten durch die pathologischen Eigenschaften von Osteosarkomzellen beeinflusst werden, weshalb möglicherweise eine eingeschränkte Vergleichbarkeit mit gesunden Zellen besteht. Diese Theorie konnte nun auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestärkt werden. In den aktuellen Untersuchungen zeigte die Hinzulegung von Silber bei neutralem als auch bei saurem pH-Wert einen erheblichen Einfluss auf die Zellproliferation, die Zellviabilität und die Zellteilungsaktivität. Mit Ausnahme der Osteosarkomzellen (MG) wurden bei pH 7 ausschließlich negative Wachstumsergebnisse erzielt. Bei saurem pH-Wert wirkte Silber nur gering toxisch auf die Fibroblasten, die Teilungsaktivität war zwar vermindert, jedoch war über die Versuchsdauer ein geringes Zellwachstum nachzuweisen. Betreffend der Toxizität von Silber, ist zu erkennen, dass es sich in den verwendeten Mengen, sowohl negativ auf das Zellwachstum als auch auf die Zellviabilität auswirkt. Das führt dazu, dass Silber als Legierungspartner für Implantate kritisch bedacht werden muss, da es in den in vitro Versuchen toxische Nebenwirkungen aufweist. Offensichtlich ist die bakteriozytotoxische Wirkung auch auf Fibroblasten und andere Zellen des Bindegewebes beeinträchtigt. Im simulierten entzündeten Gewebe, mit saurem pH-Wert, konnte jedoch ein geringer Anstieg der Zellzahl und der Zellaktivität bei Fibroblasten festgestellt werden. Die Zellaktivität ist bei allen Zelllinien sogar leicht angestiegen, was auf eine geringere zytotoxische Wirkung von Silber im entzündeten Gewebe schließen lässt.

Aufgrund dieser Tatsachen scheint Silber kein geeignetes Material im Hinblick auf Proliferation, Biokorrosion und Biokompatibilität des Implantatmaterials zu sein.

5.2.3 Phosphor(P) 0,6% - FeP = Eisen-Eisenphosphit mit einem Fe₃P-Anteil von 0,6 %

Auch Phosphor kommt als essentielles Spurenelement im Körper vor und ist nach Calcium das mengenmäßig häufigste Mineral im Körper [194-196]. Daher sollte Phosphor auch keine negative Auswirkung auf die Proliferation der Zellen haben. Phosphor ist sehr reaktionsfreudig und kommt in der Natur nur in gebundener Form vor.

Für den Organismus ist Phosphat das häufigste intrazelluläre Anion. Für die intrazelluläre Energiefreisetzung ist Phosphat in Form von Adenosintriphosphat (ATP) notwendig. Im menschlichen Körper kommt eine Menge von ca. 700 Gramm Phosphor vor. 85% der Gesamtmenge befindet sich als Calciumhydroxylapatit in mineralisierter Form im Skelettsystem. Die restlichen Vorkommen von Phosphat befinden sich intrazellulär und weniger als 1% extrazellulär [152, 162, 163, 194, 197, 198].

Ca. 800 mg Phosphor werden täglich über die Nahrung aufgenommen, jedoch in gleicher Menge auch wieder ausgeschieden. Freies, organisches Phosphat wird vorrangig über einen aktiven, Natrium abhängigen Transport und einen passiven parazellulären Prozess, abhängig von Konzentrationsgradienten über den Darm resorbiert [162, 199]. Die Ausscheidung des Phosphates erfolgt zu 60-80% über die Niere und zu 20-40% über den Darm [152, 162, 163, 194, 200]. Das im Darm ausgeschiedene Phosphat besteht zu ca. 80% aus nicht-resorbierten Anteilen [163].

Unverhältnismäßig große Aufnahmen, Knochenresorptionsstörung, gehemmte renale Ausscheidung, eine Umverteilung zwischen intra- und extrazellulär sowie durch Medikation kann eine Hyperphosphatämie hervorgerufen werden [197]. Erhöhte Messwerte können ebenso bei Erkrankungen wie koronaren Herzerkrankungen oder Arteriosklerose auftreten [201, 202].

Phosphor weist vorteilhafte Eigenschaften bei der Implantatherstellung auf. Im Allgemeinen tritt ein Abbau von Metallen in vivo aufgrund verschiedener Korrosionsprozesse auf, wobei die Hauptprozesse Oberflächenkorrosion, interkristalline Korrosion und Lochfraßkorrosion sind [177]. Somit wird die Korrosion durch verschiedene Legierungselemente gefördert bzw. gehemmt. Für die Verwendung in abbaubaren Implantaten müssen solche Elemente biokompatibel sein. Durch die Legierung von Phosphor mit Eisen sollte es zu einer Erhöhung der Korrosionsrate durch Korngrenzenkorrosion kommen [135]. In den Vorversuchen der gemeinsamen Arbeitsgruppe keine korrosionshemmenden Wirkungen von Phosphor auf die Abbaurate gefunden [135, 150]. In der vorangegangenen Arbeit der Arbeitsgruppe wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen der Abbaurate beobachtet. Phosphor beeinträchtigt als Legierungselement mit Eisen zum Abbau von Implantaten die

Korrosionseigenschaften nicht, aber die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften ist signifikant [150].

Es ist bekannt, dass das Legieren mit geringen Mengen Phosphor in pulvermetallurgischen Stählen die Spannungskorrosionsbeständigkeit, aber auch die Sinterdichte pulvermetallurgischer Komponenten erhöht [203]. Phosphor sollte somit in der Legierung mit Eisen vor allem eine festigkeitssteigernde Wirkung haben. Die Festigkeit von reinen Eisenimplantaten kann bei gleichbleibender Dichte durch die Zulegierung von Phosphor signifikant erhöht werden [91]. Phosphor hat einen signifikanten Einfluss auf die Mikrostruktur und es senkt die Liquidustemperatur. Es besitzt eine relativ hohe Löslichkeit in Eisen und bewirkt eine Erhöhung der Festigkeit durch Mischkristallbildung [149]. Aufgrund der hohen Löslichkeit wird beim Flüssigphasensintern eine schnelle Verdichtung unterstützt und so die Sinterdichte und -festigkeit erhöht [135, 204]. Aufgrund der deutlich erhöhten Dichte wurde das Element Phosphor als Legierungspartner für die Implantatwerkstoffe ausgewählt.

Bezüglich der Zytotoxizität konnte schon in den Vorversuchen ein gutes Wachstum in der statischen Zellkultur nachgewiesen werden, welches jedoch gegen Ende des Versuchs abnahm. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die kontinuierliche Anreicherung von potenziell Material aufgrund fehlender Extraktion zu vermehrten zytotoxischen Reaktionen geführt hat [135].

Unter der dynamischen Untersuchung im Perfusionssystem ist ein deutliches Zellwachstum darstellbar, wie auch in den Vorversuchen der Arbeitsgruppe gezeigt wurde.

Wir konnten zeigen, dass der Legierungspartner FeP ein langsames, aber kontinuierliches Zellwachstum, bei neutralem pH-Wert, bei Fibroblasten (HU) und Osteoblasten (HOB) hervorruft. Dieses Ergebnis lässt sich auch in der Viabilität und der Teilungsaktivität der beiden Zelllinien widerspiegeln. Die Osteosarkomzellen (MG) weisen initial einen Abfall der Zellzahl auf. Diese steigt nach dem zweiten Versuchstag, ebenso wie bei den Fibroblasten (HU) und Osteoblasten (HOB), wieder an. Auch dieser Wert ist mit der Aussage der Viabilität und der Teilungsaktivität vergleichbar. Nur die humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) fallen in der Zellzahl auf fast die Hälfte des Ausgangswertes ab mit einer ebenso fallenden Zellviabilität. Im sauren pH-Wert ist ein Anstieg der Fibroblasten (HU), bei ebenso erhöhter Viabilität und Teilungsrate nachzuweisen. Bei diesen Umgebungsbedingungen, welche einer Entzündungsreaktion im Gewebe nahekommen, bleibt das Zellwachstum der humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) konstant und das der Osteosarkomzellen (MG), nach Initialen Abfall, ebenfalls konstant auf dem des Ausgangswertes. Die Anzahl der Osteoblasten (HOB) ist um ein Drittel abgesunken.

Phosphor scheint somit ein geeignetes Legierungselement bei Defekten ohne Entzündungsreaktion zu sein. Phosphor hat keine negativen Auswirkungen auf die Abbaurate oder die Zytotoxizität bei neutralem pH-Wert, sondern fördert das Zellwachstum mit zusätzlich gesteigerter Zellaktivität und Zellviabilität. Im entzündeten Gewebe wäre diese Legierung initial nicht zu empfehlen, da es bei den Osteoblasten (HOB) zu einem Abfall der Zellzahl, Zellviabilität und Zellaktivität über die Versuchsdauer kommt. Auf die restlichen Zelllinien ist kein negativer Einfluss bezüglich der gemessenen Faktoren zu verzeichnen.

5.2.4 Silizium (Si)

Silizium ist ein Halbmetall und das nach Sauerstoff am häufigsten vorkommende (elektropositivste) Metall in der Erdkruste [159, 163]. Silizium hat eine sehr hohe Affinität zu Sauerstoff und kommt aus diesem Grund vorwiegend als Silikat (SiO_4) vor [159]. Es ist von seiner Beschaffenheit sehr spröde und wird deshalb in andere Metalle eingearbeitet, um sie widerstandsfähiger zu machen.

Es sind ca. 1–2g Silizium im menschlichen Organismus vorhanden, wobei die Menge mit zunehmendem Lebensalter abnimmt. Es akkumuliert hauptsächlich im Bindegewebe, wobei Knochen den höchsten Siliziumgehalt aufweisen [159, 163, 196]. Das hohe Vorkommen an Silizium in bindegewebsartigen Strukturen liegt an seinem integralen Bestandteil von Glycosaminoglycanen [159, 196, 205, 206].

Silizium wird vom menschlichen Organismus durch Absorption über Lebensmittel als auch in geringen Mengen durch Resorption über die Atemluft aufgenommen [159]. Das über die Nahrung zugeführte, organische Silizium, wird im Verdauungstrakt hydrolytisch gespalten und im Dünndarm absorbiert. Durch welchen Mechanismus das Silizium in die Enterozyten aufgenommen wird, ist unklar [163, 206]. Die Absorptionsrate ist von der Bindungsart und vom Ballaststoffgehalt der Nahrung abhängig. Die Resorptionsquote aus der Nahrung ist aufgrund des hohen Ballaststoffgehalts in siliziumreicher Nahrung mit 4 % sehr gering [159, 163].

Ausgeschieden wird das resorbierte Silizium größtenteils über die Niere in Form von Magnesiumorthosilikat [163, 206]. Die Siliziumhomöostase wird durch die renale Ausscheidung reguliert (durchschnittlich 9 mg/Tag) und ist abhängig von der intestinalen Resorption [159, 163].

In Studien wurde Silizium eine positive Einflussnahme auf die Stabilität und die elektrochemischen Eigenschaften von Eisenlegierungen nachgewiesen (FeSi). Die Form, in welcher das Silizium in der Legierung verarbeitet wird, ist von Bedeutung [207]. Binäre FeSi -

Legierungen sind sehr resistent gegen Korrosion in Säuren und finden daher industrielle Anwendung in der chemischen und galvanischen Industrie [208].

FeSi

In der eigenen Arbeit mit der Legierung FeSi ist das Silizium nicht homogenisiert. Das Silizium ist in Partikelform in der Legierung vorhanden. Das führt wiederum dazu, dass an gewissen Stellen ein größerer Anteil als 0,5 % Silizium vorhanden sind.

Die Zugabe von Silizium führt, wie auch bei Silber, zu einer verringerten Dichte im Vergleich zu den reinen Eisen-Proben. Zusätzlich wurde Silizium aufgrund einer erhöhten lokalen Korrosion als Legierungselement ausgewählt [135].

Bei neutralem pH-Wert ist bei dieser Legierung ein stark gesteigertes Zellwachstum bei allen Zelllinien zu verzeichnen. Die Osteosarkomzellen haben sich verdreifacht, die humanen mesenchymalen Stammzellen, die Fibroblasten und die Osteoblasten sich verdoppelt. Dieses Ergebnis wird durch den WST-1 Test und dem PICO Green Assay bestätigt. Ein ähnliches Ergebnis ist bei pH 6 zu verzeichnen. Die Zellen konnten jedoch nicht so stark expandieren wie bei neutralem pH-Wert. Sie sind im Durchschnitt nur auf ein Viertel des Ausgangswertes angestiegen, mit Ausnahme der Osteosarkomzellen. Diese haben sich beinahe verdoppelt. Die Ergebnisse der zusätzlichen Tests unterstützen diese Aussage.

Zusammenfassend scheint Silizium ein geeignetes Legierungselement zu sein. Es wäre außerdem denkbar diese Legierung in entzündeter Umgebung einzusetzen. Hier ist in allen der getesteten Zellreihen eine Zunahme der Zellzahl bei saurem pH-Wert zu verzeichnen.

Aus Gründen der Herstellbarkeit wird leider der Ansatz des Zumischens von Silizium als Implantatwerkstoff nicht weiter verfolgt [135].

FeSiP

Das Zumischen von Silizium wurde vor dem Hintergrund einer erhöhten lokalen Korrosion durchgeführt, während Phosphor vor allem einen Festigkeitssteigernden Effekt haben soll [135].

Die Legierung FeSiP ist im Gegensatz zur oben genannten Legierung FeSi homogenisiert und somit wärmebehandelt. Die Silizium- und Phosphoratome konnten durch die Hitze in das Eisen diffundieren und sich gleichmäßig verteilen. Die Atome liegen zwischen den Eisenatomen. Die 0,5% Silizium sind somit nicht, wie bei der FeSi-Legierung, nur an der Oberfläche verteilt.

In dieser Arbeit war für FeSiP ebenfalls eine starke proliferative Aktivität nachweisbar. Im neutralen Milieu hat sich die Zellzahl der humanen mesenchymalen Stammzellen verdreifacht und die Zahl der restlichen Zelllinien im Durchschnitt verdoppelt. Bei sauren Umgebungsbedingungen stieg die Zellzahl der humanen mesenchymalen Stammzellen auf das 2,5-fache an. Das Zellwachstum bei den Osteoblasten, Fibroblasten und Osteosarkomzellen war größtenteils konstant bzw. wich minimal vom Ausgangswert ab.

Aus diesen Ergebnissen ist zu erkennen, dass FeSiP eine geeignete Legierung zu sein scheint. Sie weist positive Wachstumsverläufe im neutralen pH-Wert auf und keine negativen im sauren pH-Wert. Dadurch könnte diese Legierung auch bei vorhandenen Entzündungsprozessen zum Einsatz kommen.

5.2.5 Wolfram (W)

Wolfram ist ein natürlich vorkommendes Element und tritt in Form von Mineralien in Felsen und Böden auf, jedoch nicht als reines Metall. Es kann jedoch nach chemischer Bearbeitung als reines Metall oder in Legierungen verwendet werden. Legierungen mit Wolfram sind charakteristischerweise stark und flexibel, robust gegenüber Korrosion und haben eine gute elektrische Leitfähigkeit [209, 210].

Im Tiermodell wurde festgestellt, dass Wolfram auf natürlichem Weg peroral (Nahrungsaufnahme, Trinkwasser, Luft) oder durch dermalen Kontakt in den Körper gelangt. Ein großer Teil des aufgenommenen Wolframs tritt ins Blut über und wird anschließend wieder mit dem Urin ausgeschieden. Die orale Aufnahme von Wolfram führt ebenfalls nur zu einer geringen Resorption in den Körper, da es hauptsächlich durch das Verdauungssystem ausgeschieden wird. Die nicht ausgeschiedenen Wolframverbindungen gehen in die Erythrozyten über und werden in weiterer Folge in Knochen, Nägel, Haaren und der Niere abgelagert [211].

Die Toxizität von Wolfram wurde ebenfalls intensiv in Tierstudien untersucht, da es vor allem bei „Hartmetall-Betrieben“ zu einem vermehrten Vorkommen von Atemwegserkrankungen (Lungenfibrose, Lungenkrebs), sensorischen und neurologischen Defiziten sowie zu einer erhöhten Mortalität kam [212-217]. Dies ist jedoch nicht auf die alleinige Exposition von Wolfram zurückzuführen, sondern auf das ebenfalls anwesende Cobalt sowie andere Metalle (z. B. Nickel) [218, 219].

Wolfram wurde von Peuster et al. ebenfalls auf seine Eignung als kardiovaskuläres Bioimplantat getestet. Untersucht wurden Spiralen aus dem Metall auf ihre *in vivo* und *in vitro* Eigenschaften. Die Korrosionsgeschwindigkeit zeigte sich ausgeprägt langsam, trotzdem konnte eine Zunahme der Konzentration in der Lösung nachgewiesen werden. Es wurden

glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten untersucht, welche jeweils gutes Wachstum vorwiesen. Auch im Tierversuch mit Kaninchen konnten keine pathologischen Reaktionen vorgezeigt werden [220-222]. In In-vivo-Experimenten wurden die implantierten Stents aus Eisen oder Wolfram überwiegend resorbiert und hinterließen bei Blutuntersuchungen keine ausgeprägten Entzündungsreaktionen und Serumspiegel [165, 222, 223]. Verschiedene Legierungen wurden hinsichtlich ihrer Zytotoxizität bereits untersucht und zeigten keine nachteiligen Auswirkungen [170].

Wolfram hat sich als Legierungspartner im neutralen Umgebungsmilieu als ein erfolgversprechendes Element gezeigt. Bei allen Zelllinien war ein ausgeprägtes Zellwachstum mit stark gesteigener Viabilität und Teilungsrate zu verzeichnen. Im Vergleich zum Ausgangswert hat sich die Zellzahl bei zwei der Zelllinien verdoppelt und bei den anderen beiden sogar verdreifacht. Bei saurem pH-Wert stellt sich sowohl die Zellzahl als auch die Viabilitätsergebnisse bei den HOB, den MG und den humanen mesenchymalen Stammzellen um einiges schlechter dar und sinken im Vergleich zum Ausgangswert.

Zusammenfassend würde sich die Legierung aus Sicht der zytotoxischen Eigenschaften für den Gebrauch als Implantatwerkstoff eignen, auch bei entzündeten Umgebungsbedingungen.

6 Zusammenfassung

Ziel des Gesamtprojektes war die Entwicklung eines Zell-Perfusions-Systems zur Testung eines degradierbaren zellularen Knochenersatzmaterials auf der Basis eines Metalls. Das Testsystem sollte die *in vivo* Bedingungen möglichst naturnah darstellen und vor allem zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Zusätzlich sollten die modifizierten Legierungen aus den Vorversuchen auf Ihre Zytotoxizität getestet werden.

Zur Überprüfung der Zytotoxizität verwendeten wir in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe eine statische und eine dynamische Monolayerkultur in Form einer Perfusionskammer. Die Perfusionskammer stellt eine sinnvolle Weiterentwicklung der gegenwärtig für Biomaterialien geltenden Normen dar, weil sie den Abtransport der während der Degradation freiwerdender Partikel berücksichtigt. Der direkte Kontakt zwischen Werkstoff und Zelle entspricht nur eingeschränkt den *in vivo* Bedingungen. Nach Einbringen der Implantate in den Organismus führt ein ständiger Blutstrom einerseits zur Ernährung der Zellen und andererseits zum Abtransport der potenziell schädigenden Korrosionsbestandteile. Damit kann die lokale Konzentration der Implantatwerkstoffe deutlich gesenkt werden, ist aber auch nicht mehr exakt zu definieren. Um diese Situation besser simulieren zu können, untersuchten wir in einer eigens für diese Versuche spezifizierten Perfusionszellkultur den Einfluss der Werkstoffe, wenn die gelösten Bestandteile stetig abtransportiert werden. In den Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Perfusionskammern unabdingbar ist, da statisch einschichtige Zelltests starke Unterschiede zum realistischeren dynamischen Perfusionskammersystem bringen. Zusätzlich wurden mit Tierversuchen mit Schafen durchgeführt. In der postoperativen Auswertung des Tierversuchs konnte die gute Integration des Implantates gezeigt werden (FeP). Eine Entzündungs- oder Immunreaktion konnte nicht aufgezeigt werden, jedoch entsprach das Einwachsen des Knochens nicht dem gewünschten Ergebnis woraufhin die Legierungen in diesem Projekt noch einmal modifiziert und zytologisch getestet wurden.

In der bisherigen Literatur gibt es bereits mehrere Arbeiten auf der Basis von Magnesium. Magnesiumlegierungen wurden anfangs als Stents im kardiovaskulären System eingesetzt, später auch als Knochenersatzmaterial bzw. Osteosynthesematerial bei nicht lasttragenden Defekten. Hier konnte gezeigt werden, dass Magnesium sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein erfolgversprechender Ansatz ist. Diverse Legierungen wurden entwickelt und erprobt. Sie zeigten eine gute biologische Verträglichkeit, ein zügiges Einwachsen mit guten osteokonduktiven Eigenschaften und eine rasche Korrosion der Implantate. Für große knöcherne und lasttragende Defekte degradieren Magnesiumlegierungen aber zu schnell und verlieren dadurch ihre Festigkeit.

Eisenbasierte Legierungen, welche ebenfalls erstmalig bei Gefäß-Stents eingesetzt wurden, zeigten ebenfalls eine gute biologische Verträglichkeit und eine deutlich langsamere Degradation. Aus diesem Grund rückten Eisenlegierungen in den Mittelpunkt unserer Implantatentwicklung. Zusätzlich erfüllt Eisen als körpereigenes Element mit langsamer Degradationsgeschwindigkeit und hoher Festigkeit viele gewünschten Anforderungen, die an größere Knochenersatzmaterialien im lasttragenden Bereich gestellt werden. Bei der Verwendung von Eisenlegierungen als Grundwerkstoff für Metallimplantate sind einige Aspekte zu beachten. Um als tragende Implantate eingesetzt zu werden, ist eine hohe Festigkeit erforderlich. Um die Festigkeit von zellulären Metallen zu erhöhen, muss entweder die Strukturdichte (Gesamtmasse pro Volumen) oder die Festigkeit des Grundwerkstoffes erhöht werden. Da die Korrosionsraten bei Eisen eher gering sind, sollte die Strukturdichte klein gehalten werden, um die zu resorbierende Gesamtmasse zu reduzieren. Aus dem genannten Grund ist die Festigkeitssteigerung des Grundwerkstoffes unerlässlich.

Zusammenfassend konnte in den Vorversuchen der gemeinsamen Arbeitsgruppe festgestellt werden, dass für fast alle getesteten Werkstoffe, mit Ausnahme von Phosphor, eine zytotoxische Situation nach ihrer Auflösung in einer statischen Zellkultur resultierte. Ein anderes Verhalten zeigte sich in der dynamischen Zellkultur. Durch den Abtransport der Lösungsprodukte, analog der *in vivo* zu erwartender Situation, nimmt die Toxizität der untersuchten Werkstofflegierungen ab. Im Hinblick auf die Zielrichtung des Projektes, der Entwicklung eines degradierbaren Knochenersatzmaterials muss jedoch auch die geringe Perfusion im kortikalen Knochen geachtet werden. Deswegen sollte auch der direkte Kontakt zwischen Werkstoff und Zelle von dieser zumindest toleriert werden. Daraus leitet sich in den Vorversuchen ab, dass die Legierung aus Eisen (Fe) und Phosphor (P) aus den untersuchten Werkstoffen das größte Potenzial für die Einführung als Implantatwerkstoff hat. Um diese problematisch geringe Perfusion im Knochen besser darstellen zu können wurde in dieser Arbeit die Bedingungen in Bezug darauf untersucht und ein neu angepasstes Perfusionssystem entwickelt.

Dabei zeigten sich von den untersuchten Legierungspartnern Phosphor, Silizium, Silizium-Phosphor und Wolfram als die erfolgversprechendsten Elemente bei neutralem pH-Wert, während Silber deutlich schlechtere Ergebnisse in Bezug auf das Zellwachstum und die Zellviabilität aufweist.

Insbesondere Phosphor ist aufgrund seiner vorteilhaften Wirkung auf die Sinterdichte ein geeignetes Legierungselement für den Einsatz in pulvermetallurgischen Werkstoffen. Somit kann die mechanische Festigkeit signifikant verbessert werden. Weiterhin wurden bei der Legierung FeP keine nachteiligen Auswirkungen auf die Zellproliferation in neutralem pH-Wert festgestellt. Bei saurem pH-Wert, welcher eine Entzündung simuliert, ist die

Proliferation geringer. Es kommt vor allem bei den Osteoblasten zu einem Abfall der Zellzahl und auch der Zellaktivität, was eine Erklärung für das geringe Einwachsen des Knochens im Tierversuch sein könnte.

Silber gilt als antiseptisches Agens. Es wird bereits in der Endoprothetik als silberbeschichtetes Implantat eingesetzt, um bei bzw. nach bakteriellen Infektionen eine antiseptische Situation zu erhalten. Das rechtfertigte die Untersuchung einer Legierung mittels Eisen zum Einsatz als Knochenersatzstoff. In unserem Perfusionssystem kommt es unter dem Einfluss von legiertem Eisen und Silber (FeAg) zu einem Abfall der Zellzahl und Zellviabilität mit Ausnahme der Osteosarkomzellen (MG) unabhängig vom pH-Wert. Die Wirkung von Silber scheint demnach, auch bei geringer Perfusion, nicht nur antibakteriell, sondern auch zytotoxisch zu sein.

Zusammenfassend scheinen bezüglich der Zytotoxizitätstests vor allem die Legierungen **FeSi, FeSiP und FeW** interessante Kandidaten für neue biologisch abbaubare Materialien in tragenden Implantaten für orthopädische Indikationen zu sein, insbesondere im Zusammenhang mit der Verarbeitung von zellulären Materialien mit geringer Steifigkeit und ausreichender Festigkeit. Hervorzuheben ist hier die Legierung FeSi, die als einzige Legierung keinen Abfall der Zellzahl und sogar einen leichten Anstieg der Zellaktivität bei allen Zelllinien bei saurem pH-Wert zu verzeichnen hat. Somit könnte diese Legierung auch in einer entzündeten Umgebung eingesetzt werden.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Fe	Eisen
Si	Silizium
Ag	Silber
P	Phosphor
W	Wolfram
HU	Fibroblasten
HOB	Osteoblasten
MG	Osteosarkomzellen
hMSC	humane mesenchymale Stammzellen
SOP	Standard Operating Procedure
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
MW	Mittelwert
SD	Standardabweichung

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Präzisionswaage (Sartorius, Deutschland)	21
Abbildung 2: Metallplättchen.....	22
Abbildung 3: Metalle nach dem Versuchsdurchlauf mit Korrosionserscheinungen	22
Abbildung 4: Humane mesenchymale Stammzellen (hMSC)	24
Abbildung 5: Osteoblasten (HOB)	24
Abbildung 6: Osteosarkomzellen (MG)	24
Abbildung 7: Fibroblasten (HU)	24
Abbildung 8: Gasaustausch um Slide.....	25
Abbildung 9: μ -Slides in der Halterung	26
Abbildung 10: Kultivierung der μ -Slides.....	26
Abbildung 11: Perfusionspumpe und PumpControl-System	27
Abbildung 12: PumpControl-System mit Einstellung der Parameter	29
Abbildung 13: Kammer	30
Abbildung 14: Luer Connectoren	31
Abbildung 15: Aufbau Vorversuche	32
Abbildung 16: Aufbau Vorversuche - Durchflussmessung	33
Abbildung 17: Aufbau Vorversuche	33

Abbildung 18: Aufbau: Gesamtheit der Stecksysteme	35
Abbildung 19: Aufbau: Stecksystem 1	35
Abbildung 20: Aufbau: Stecksystem 2	35
Abbildung 21: Aufbau: Stecksystem 3	36
Abbildung 22: Aufbau: Befestigung der Slides	36
Abbildung 23: Aufbau: Gesamtbild	37
Abbildung 24: Perfusionssystem mit Inkubator	38
Abbildung 25: WST-1: 96-Wellplatte	40
Abbildung 26: ELISA- Reader.....	41
Abbildung 27: Standardisierte Zählfläche	42
Abbildung 28: Berechnung des Kalibrierungsfaktors	46
Abbildung 29: FeAg pH6: Auswertung Pico Green und WST-1	48
Abbildung 30: FeP pH6: Auswertung Pico Green und WST-1	49
Abbildung 31: FeSi pH6: Auswertung Pico Green und WST-1.....	50
Abbildung 32: FeSiP pH6: Auswertung Pico Green und WST-1	51
Abbildung 33: FeW pH6: Auswertung Pico Green und WST-1	52
Abbildung 34: FeAg pH7: Auswertung Pico Green und WST-1	53
Abbildung 35: FeP pH7: Auswertung Pico Green und WST-1	54
Abbildung 36: FeSi pH7: Auswertung Pico Green und WST-1	55
Abbildung 37: FeSiP pH7: Auswertung Pico Green und WST-1	56
Abbildung 38: FeW pH7: Auswertung Pico Green und WST-1	57
Abbildung 39: Verlaufsdarstellung Zellwachstum pH6 - Legierungen	58
Abbildung 40: Verlaufsdarstellung Zellwachstum pH7 - Legierungen	62
Abbildung 41: Verlaufsdarstellung Zellwachstum pH6 - Zellgruppen	65
Abbildung 42: Verlaufsdarstellung Zellwachstum pH7 - Zellgruppen	66

7.3 Literaturverzeichnis

1. Giannoudis, P.V., H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: an update*. Injury, 2005. **36 Suppl 3**: p. S20-7.
2. Ollier, L., *Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux* 1867, Paris: Victor Masson et fils.
3. Axhausen, W., [*Bone regeneration--a biphasic process*]. Zentralbl Chir, 1952. **77**(11): p. 435-42.
4. Axhausen, W., [*Osteogenesis of the free transplanted periosteum*]. Zentralbl Chir, 1952. **77**(1): p. 27-36.
5. Axhausen, W., *The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historial and experimental study*. J Bone Joint Surg Am, 1956. **38-a**(3): p. 593-600.
6. Amprino, R., et al., *Skeletanatomie (Röntgendiagnostik) Teil 1 / Anatomy of the Skeletal System (Roentgen Diagnosis)*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
7. Wolff, J., *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. 1892, Berlin: Hirschwald.
8. Wolff, J., *The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870*. Clin Orthop Relat Res, 2010. **468**(4): p. 1056-65.
9. Wolff, J., *Concerning the interrelationship between form and function of the individual parts of the organism. By Julius Wolff, 1900*. Clin Orthop Relat Res, 1988(228): p. 2-11.
10. Newman, E., A.S. Turner, and J.D. Wark, *The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models*. Bone, 1995. **16**(4 Suppl): p. 277s-284s.
11. Auer, J.A., et al., *Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use*. BMC Musculoskelet Disord, 2007. **8**: p. 72.
12. Rehm, K.E., H.J. Helling, and C. Gatzka, *Neue Entwicklungen beim Einsatz resorbierbarer Implantate*. Orthopäde Vol. 26. 1997: Springer Berlin Heidelberg. 489-497.
13. Hofmann, G.O., *Biodegradable implants in traumatology: a review on the state-of-the-art*. Arch Orthop Trauma Surg, 1995. **114**(3): p. 123-32.
14. Hidaka, S. and R.B. Gustilo, *Refracture of bones of the forearm after plate removal*. J Bone Joint Surg Am, 1984. **66**(8): p. 1241-3.
15. Cowin, S.C., *Bone remodeling of diaphyseal surfaces by torsional loads: theoretical predictions*. J Biomech, 1987. **20**(11-12): p. 1111-20.
16. Wang, J., *Spatial orientation of the microscopic elements of cortical repair bone*. Clin Orthop Relat Res, 2000(374): p. 265-77.
17. Hofmann, G., *Biologisch abbaubare Knochenimplantate*. Spektrum der Wissenschaft, 1997. **2**(1997): p. 46-51.
18. Schieker, M. and W. Mutschler, [*Bridging posttraumatic bony defects. Established and new methods*]. Unfallchirurg, 2006. **109**(9): p. 715-32.
19. Krettek, C. and P. Mommsen, [*Implant removal after intramedullary osteosyntheses. Literature review, technical details, and tips and tricks*]. Unfallchirurg, 2012. **115**(4): p. 299-314.
20. Ratner, B.D., et al., *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2004: Elsevier.
21. Husain, A., et al., *Removal of intramedullary nails from the femur: a review of 45 cases*. Journal of orthopaedic trauma, 1996. **10**(8): p. 560-562.
22. Miller, R., et al., *Removal of intramedullary rods after femoral shaft fracture*. Journal of orthopaedic trauma, 1992. **6**(4): p. 460-463.
23. Wu, C.-C. and C.-H. Shih, *Refracture after removal of a static-locked femoral nail: A case report*. Acta Orthopaedica Scandinavica, 1995. **66**(3): p. 296-298.
24. Boerger, T., G. Patel, and J. Murphy, *Is routine removal of intramedullary nails justified?* Injury, 1999. **30**(2): p. 79-81.
25. Staiger, M.P., et al., *Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review*. Biomaterials, 2006. **27**(9): p. 1728-1734.

26. Heinemann, S., et al., [*Resorbable bone substitution materials: An overview of commercially available materials and new approaches in the field of composites*]. *Orthopade*, 2011. **40**(9): p. 761-73.
27. Youn, Y.H., et al., *Simple and facile preparation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 immobilized titanium implant via initiated chemical vapor deposition technique to promote osteogenesis for bone tissue engineering application*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2019. **100**: p. 949-958.
28. Kim, M.J., et al., *BMP-2 peptide-functionalized nanopatterned substrates for enhanced osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells*. *Biomaterials*, 2013. **34**(30): p. 7236-46.
29. Tsuji, K., et al., *BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing*. *Nat Genet*, 2006. **38**(12): p. 1424-9.
30. Bessa, P.C., M. Casal, and R.L. Reis, *Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts)*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008. **2**(1): p. 1-13.
31. McKay, W.F., S.M. Peckham, and J.M. Badura, *A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft)*. *International Orthopaedics*, 2007. **31**(6): p. 729-734.
32. Friedlaender, G.E., D.M. Strong, and K.W. Sell, *Studies on the antigenicity of bone. II. Donor-specific anti-HLA antibodies in human recipients of freeze-dried allografts*. *J Bone Joint Surg Am*, 1984. **66**(1): p. 107-12.
33. Boyce, T., J. Edwards, and N. Scarborough, *Allograft bone. The influence of processing on safety and performance*. *Orthop Clin North Am*, 1999. **30**(4): p. 571-81.
34. Connolly, J.F., *Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair*. *Clin Orthop Relat Res*, 1995(313): p. 8-18.
35. Attawia, M.A., et al., *Proliferation, morphology, and protein expression by osteoblasts cultured on poly(anhydride-co-imides)*. *J Biomed Mater Res*, 1999. **48**(3): p. 322-7.
36. Connolly, J.F., et al., *Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions*. *Clin Orthop Relat Res*, 1991(266): p. 259-70.
37. Muschler, G.F. and R.J. Midura, *Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications*. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(395): p. 66-80.
38. Pountos, I., et al., *Efficacy of minimally invasive techniques for enhancement of fracture healing: evidence today*. *Int Orthop*, 2010. **34**(1): p. 3-12.
39. Fleming, J.E., Jr., C.N. Cornell, and G.F. Muschler, *Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering*. *Orthop Clin North Am*, 2000. **31**(3): p. 357-74.
40. Black, J., *Systemic effects of biomaterials*. *Biomaterials*, 1984. **5**(1): p. 11-8.
41. Bauer, T.W. and S.T. Smith, *Bioactive materials in orthopaedic surgery: overview and regulatory considerations*. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(395): p. 11-22.
42. Hallab, N., J.J. Jacobs, and J. Black, *Hypersensitivity associated with metallic biomaterials*, in *Biomaterials Engineering and Devices: Human Applications*. 2000, Springer. p. 15-23.
43. Wintermantel, E. and S.W. Ha, *Medizintechnik: Life Science Engineering*. 2009: Springer.
44. Schenk, R., *Bone response to grafts and implants*. *Perspectives on biomaterials, materials science monographs*, 1986. **33**: p. 121-136.
45. Schnurer, S.M., et al., [*Bone substitutes*]. *Orthopade*, 2003. **32**(1): p. 2-10.
46. Witte, F., *The history of biodegradable magnesium implants: a review*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(5): p. 1680-92.
47. Witte, F., *Reprint of: The history of biodegradable magnesium implants: A review*. *Acta Biomater*, 2015. **23 Suppl**: p. S28-40.
48. Claes, L.E., *Mechanical characterization of biodegradable implants*. *Clin Mater*, 1992. **10**(1-2): p. 41-6.
49. Hofmann, G.O. and L.E. Claes, *Biodegradable implants in orthopaedic surgery*. *Clin Mater*, 1992. **10**(1-2): p. 1.
50. Moravej, M., et al., *Electroformed pure iron as a new biomaterial for degradable stents: in vitro degradation and preliminary cell viability studies*. *Acta Biomater*, 2010. **6**(5): p. 1843-51.

51. Bujia, J., et al., *Züchtung menschlichen Knorpelgewebes in einer dreidimensionalen Perfusionskulturkammer: Charakterisierung der Kollagensynthese.*, in *Laryngo-Rhino-Otol.* 1995, Georg Thieme Verlag Stuttgart: New York. p. 559-563.
52. Laishes, B.A. and G.M. Williams, *Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology.* *In Vitro*, 1976. **12**(12): p. 821-32.
53. Sittinger, M., *Tissue Engineering. Artificial Tissue Replacement Containing Vital Components*, in *Laryngo Rhino Otol.* 1995, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York. p. 695-699.
54. Hammer, C. and J. Bujia, *Immunologie vitaler und konservierter Transplantate.*, in *Laryngo Rhino Otol.* 1992, Georg Thieme Verlag Stuttgart: New York. p. Suppl. 2: 3-26.
55. Hennig J, Schieker M, and S. H, *Cell seeding chamber for bone graft substitutes.* *Biomed Tech (Berl)*, 2012. **7**.
56. Calori, G.M., et al., *The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs?* *Injury*, 2011. **42 Suppl 2**: p. S56-63.
57. St John, T.A., et al., *Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting.* *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 2003. **32**(1): p. 18-23.
58. Lichte, P., et al., *Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence.* *Injury*, 2011. **42**(6): p. 569-73.
59. Gazdag, A.R., et al., *Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications.* *J Am Acad Orthop Surg*, 1995. **3**(1): p. 1-8.
60. Bucholz, R.W., *Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes.* *Clin Orthop Relat Res*, 2002(395): p. 44-52.
61. Burg, K.J., S. Porter, and J.F. Kellam, *Biomaterial developments for bone tissue engineering.* *Biomaterials*, 2000. **21**(23): p. 2347-59.
62. Greenwald, A.S., et al., *Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications.* *J Bone Joint Surg Am*, 2001. **83-A Suppl 2 Pt 2**: p. 98-103.
63. Witte, F., T. Calliess, and H. Windhagen, *[Biodegradable synthetic implant materials : clinical applications and immunological aspects].* *Orthopade*, 2008. **37**(2): p. 125-30.
64. Buijs, G.J., B. Stegenga, and R.R. Bos, *Efficacy and safety of biodegradable osteofixation devices in oral and maxillofacial surgery: a systematic review.* *J Dent Res*, 2006. **85**(11): p. 980-9.
65. Simamora, P. and W. Chern, *Poly-L-lactic acid: an overview.* *J Drugs Dermatol*, 2006. **5**(5): p. 436-40.
66. Bergsma, E.J., et al., *Foreign body reactions to resorbable poly (L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures.* *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 1993. **51**(6): p. 666-670.
67. Böstman, O., et al., *Degradable polyglycolide rods for the internal fixation of displaced bimalleolar fractures.* *International orthopaedics*, 1990. **14**(1): p. 1-8.
68. Jansson, V., et al., *[A new resorbable bone-cartilage replacement transplant. Results of an animal experiment study].* *Orthopade*, 2000. **29**(2): p. 151-7.
69. Muller, P.E., et al., *Repair of osteochondral defects in the knee by resorbable bioimplants in a rabbit model.* *Acta Orthop*, 2006. **77**(6): p. 981-5.
70. Prokop, A., et al., *Biodegradable implants for Pipkin fractures.* *Clin Orthop Relat Res*, 2005(432): p. 226-33.
71. Mueller, M.B., et al., *Biomechanical evaluation of different suture anchors for the stabilization of anterior labrum lesions.* *Arthroscopy*, 2005. **21**(5): p. 611-9.
72. Epple, M., *Biomimetic Bone Substitution Materials*, in *Handbook of Biomineralization.* 2008, Wiley-VCH Verlag GmbH. p. 81-95.
73. Gerlach, K.L., *[Resorbable polymers as osteosynthesis material].* *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2000. **4 Suppl 1**: p. S91-102.
74. Bostman, O.M., *Osteolytic changes accompanying degradation of absorbable fracture fixation implants.* *J Bone Joint Surg Br*, 1991. **73**(4): p. 679-82.
75. Hoffmann, R., et al., *Eine klinische Klassifikation über Fremdkörperreaktionen auf biodegradierbare Implantate.* *Biodegradierbare Implantate und Materialien.* Springer, Berlin, 1998: p. 238-251.

76. Arnett, T.R., *Extracellular pH regulates bone cell function*. J Nutr, 2008. **138**(2): p. 415s-418s.
77. Schiller, C. and M. Epple, *Carbonated calcium phosphates are suitable pH-stabilising fillers for biodegradable polyesters*. Biomaterials, 2003. **24**(12): p. 2037-43.
78. Chang, P., *Polymer implant materials with improved X-ray opacity and biocompatibility*. Biomaterials, 1981. **2**(3): p. 151-5.
79. Janning, C., *Auswirkungen eines Magnesiumkorrosionsproduktes (Mg(OH)₂) aus degradierbaren Magnesiumimplantaten auf den umliegenden, spongiösen Knochen im Kaninchenmodell*. 2008, Tierärztliche Hochschule: Hannover.
80. Gogolewski, S., *Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery*. Injury, 2000. **31 Suppl 4**: p. 28-32.
81. Barrère, F., C.A. van Blitterswijk, and K. de Groot, *Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics*. International journal of nanomedicine, 2006. **1**(3): p. 317.
82. Hench, L.L., *The story of Bioglass*. J Mater Sci Mater Med, 2006. **17**(11): p. 967-78.
83. Arcos, D., I. Izquierdo-Barba, and M. Vallet-Regi, *Promising trends of bioceramics in the biomaterials field*. J Mater Sci Mater Med, 2009. **20**(2): p. 447-55.
84. Daculsi, G., et al., *In vivo cell interactions with calcium phosphate bioceramics*. J Submicrosc Cytol Pathol, 1988. **20**(2): p. 379-84.
85. Damien, C.J. and J.R. Parsons, *Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications*. J Appl Biomater, 1991. **2**(3): p. 187-208.
86. Imgrund, P. and S. Hein, *Metall-Keramik-Komposite für degradierbare und lasttragende Implantate*. Fraunhofer Ifam.
87. Witte, F., et al., *In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response*. Biomaterials, 2005. **26**(17): p. 3557-63.
88. Pilliar, R.M., *Powder metal-made orthopedic implants with porous surface for fixation by tissue ingrowth*. Clin Orthop Relat Res, 1983(176): p. 42-51.
89. Flatley, T.J., K.L. Lynch, and M. Benson, *Tissue response to implants of calcium phosphate ceramic in the rabbit spine*. Clin Orthop Relat Res, 1983(179): p. 246-52.
90. Wadley, H., *Cellular Metals Manufacturing*. . Advanced Engineering Materials, 2002: p. 726-733.
91. Wegener, B. and P. Quadbeck, *Degradable iron and iron based alloys as orthopaedic biomaterial*. . Materials Science and Engineering: B, 2011.
92. Knauss, P., *[Material properties and strength behavior of the compact bone tissue at the coxal human-femur (author's transl)]*. Biomed Tech (Berl), 1981. **26**(12): p. 311-5.
93. Prendergast, P.J., R. Huiskes, and K. Soballe, *ESB Research Award 1996. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces*. J Biomech, 1997. **30**(6): p. 539-48.
94. Tagil, M. and P. Aspenberg, *Impaction of cancellous bone grafts impairs osteoconduction in titanium chambers*. Clin Orthop Relat Res, 1998(352): p. 231-8.
95. Tagil, M. and P. Aspenberg, *Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo*. J Orthop Res, 1999. **17**(2): p. 200-4.
96. Witte, F., et al., *Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling*. J Biomed Mater Res A, 2007. **81**(3): p. 757-65.
97. Heublein, B., et al., *Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology?* Heart, 2003. **89**(6): p. 651-6.
98. Witte, F., et al., *Biodegradable magnesium scaffolds: Part 1: appropriate inflammatory response*. J Biomed Mater Res A, 2007. **81**(3): p. 748-56.
99. Zartner, P., et al., *First successful implantation of a biodegradable metal stent into the left pulmonary artery of a preterm baby*. Catheter Cardiovasc Interv, 2005. **66**(4): p. 590-4.
100. Agarwal, S., et al., *Biodegradable magnesium alloys for orthopaedic applications: A review on corrosion, biocompatibility and surface modifications*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2016. **68**: p. 948-63.
101. Martinez Sanchez, A.H., et al., *Mg and Mg alloys: how comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? A review*. Acta Biomater, 2015. **13**: p. 16-31.

102. Witte, F., et al., *Evaluation of the skin sensitizing potential of biodegradable magnesium alloys*. J Biomed Mater Res A, 2008. **86**(4): p. 1041-7.
103. Zheng, Y.F., X.N. Gu, and F. Witte, *Biodegradable metals*. Materials Science and Engineering: R: Reports, 2014. **77**: p. 1-34.
104. Di Mario, C., et al., *Drug-eluting bioabsorbable magnesium stent*. J Interv Cardiol, 2004. **17**(6): p. 391-5.
105. Erbel, R., et al., *Temporary scaffolding of coronary arteries with bioabsorbable magnesium stents: a prospective, non-randomised multicentre trial*. Lancet, 2007. **369**(9576): p. 1869-75.
106. Revell, P.A., et al., *The Effect of Magnesium Ions on Bone Bonding to Hydroxyapatite Coating on Titanium Alloy Implants*. Key Engineering Materials, 2004. **Volumes 254-256**: p. 447-450.
107. Liu, C.C., J.K. Yeh, and J.F. Aloia, *Magnesium directly stimulates osteoblast proliferation*. J Bone Miner Res, 1988.
108. Zreiqat, H., et al., *Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants*. J Biomed Mater Res, 2002. **62**: p. 175-84.
109. Zeng, J.e.a., *Short-term effect of magnesium implantation on the osteomyelitis modeled animals induces by staphylococcus aureus*. . J Mater Sci: Mater Med, 2013. **24**: p. 2405–2416
110. Robinson, D.e.a., *In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus*. Acta Biomaterialia, 2010. **6**: p. 1869–1877
111. Ezechieli, M., et al., *Biomechanical characteristics of bioabsorbable magnesium-based (MgYREZr-alloy) interference screws with different threads*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2014.
112. Ezechieli, M., et al., *Biodegradation of a magnesium alloy implant in the intercondylar femoral notch showed an appropriate response to the synovial membrane in a rabbit model in vivo*. J Biomater Appl, 2014. **29**(2): p. 291-302.
113. Kannan, M.B. and R.K. Raman, *In vitro degradation and mechanical integrity of calcium-containing magnesium alloys in modified-simulated body fluid*. Biomaterials, 2008. **29**(15): p. 2306-14.
114. Zhang, E., H. Chen, and F. Shen, *Biocorrosion properties and blood and cell compatibility of pure iron as a biodegradable biomaterial*. J Mater Sci Mater Med, 2010. **21**(7): p. 2151-63.
115. Lindl, T.B., J., *Zell- und Gewebekultur*. Vol. 3. 1994, Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag.
116. Minuth, W., R. Strehl, and K. Schumacher, *Von der Zellkultur zum Tissue engineering*. 2001, Berlin: Pabst Science Publishers. 236.
117. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(10): p. 839-45.
118. Bissell, M.J., A. Rizki, and I.S. Mian, *Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function*. Curr Opin Cell Biol, 2003. **15**(6): p. 753-62.
119. Meshel, A.S., et al., *Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(2): p. 157-64.
120. Walpita, D. and E. Hay, *Studying actin-dependent processes in tissue culture*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(2): p. 137-41.
121. Cukierman, E., et al., *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1708-12.
122. Bruder, S.P. and B.S. Fox, *Tissue engineering of bone. Cell based strategies*. Clin Orthop Relat Res, 1999(367 Suppl): p. S68-83.
123. Langer, R., *Tissue engineering*. Mol Ther, 2000. **1**(1): p. 12-5.
124. Bissell, M.J., et al., *The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 537-46.
125. Marx, U.S., V., *Drug Testing in vitro: Breakthroughs and Trends in Cell Culture Technology*. Wiley-VHC, 2006.

126. Williams, D., *Engineering a concept: the creation of tissue engineering*. Med Device Technol, 1997. **8**(10): p. 8-9.
127. Bonassar, L.J. and C.A. Vacanti, *Tissue engineering: the first decade and beyond*. J Cell Biochem Suppl, 1998. **30-31**: p. 297-303.
128. Bruder, S.P., N. Jaiswal, and S.E. Haynesworth, *Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation*. J Cell Biochem, 1997. **64**(2): p. 278-94.
129. Freund, J.B., et al., *Fluid flows and forces in development: functions, features and biophysical principles*. Development (Cambridge, England), 2012. **139**(7): p. 1229-1245.
130. Cartwright, J.H.E., O. Piro, and I. Tuval, *Fluid dynamics in developmental biology: moving fluids that shape ontogeny*. HFSP Journal, 2009. **3**(2): p. 77-93.
131. Mammoto, T. and D.E. Ingber, *Mechanical control of tissue and organ development*. Development, 2010. **137**(9): p. 1407-1420.
132. Nagel, T., et al., *Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(2): p. 885-891.
133. McCarthy, I., *The physiology of bone blood flow: a review*. JBJS, 2006. **88**(suppl_3): p. 4-9.
134. Wang, C., H. Lu, and M.A. Schwartz, *A novel in vitro flow system for changing flow direction on endothelial cells*. J Biomech, 2012. **45**(7): p. 1212-8.
135. Quadbeck, P., *Schlussbericht: Entwicklung und Testung biodegradabler, offenzelliger Knochenersatz-Implantate aus Magnesium*. DegraMag., 2008.
136. Wilson, J.W., *Blood supply to developing, mature and healing bone.*, in SUMNER-SMITH, G: *Bone in clinical orthopedics*. 2002: Stuttgart, New York. p. 22-116.
137. Rhinelander, F.W., *The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture*. J Bone Joint Surg Am, 1968. **50**(4): p. 784-800.
138. Brookes, M. and R.G. Harrison, *The vascularization of the rabbit femur and tibio-fibula*. J Anat, 1957. **91**(1): p. 61-72.
139. Cumming, J.D. and M.E. Nutt, *Bone-marrow blood flow and cardiac output in the rabbit*. J Physiol, 1962. **162**: p. 30-4.
140. Shim, S.S., *Physiology of blood circulation of bone*. J Bone Joint Surg Am, 1968. **50**(4): p. 812-24.
141. Azuma, H., *Intraosseous Pressure as a Measure of Hemodynamic Changes in Bone Marrow*. Angiology, 1964. **15**(9): p. 396-406.
142. Morris, M.A. and P.J. Kelly, *Use of tracer microspheres to measure bone blood flow in conscious dogs*. Calcif Tissue Int, 1980. **32**(1): p. 69-76.
143. Trotman, N.M. and W.D. Kelly, *The effect of sympathectomy on blood flow to bone*. Jama, 1963. **183**: p. 121-2.
144. Tondevold, E. and J. Bulow, *Bone blood flow in conscious dogs at rest and during exercise*. Acta Orthop Scand, 1983. **54**(1): p. 53-7.
145. Brinker, M.R., et al., *Pharmacological regulation of the circulation of bone*. J Bone Joint Surg Am, 1990. **72**(7): p. 964-75.
146. Kelly, P.J., R.J. Montgomery, and J.T. Bronk, *Reaction of the circulatory system to injury and regeneration*. Clin Orthop Relat Res, 1990(254): p. 275-88.
147. Gross, P.M., M.L. Marcus, and D.D. Heistad, *Measurement of blood flow to bone and marrow in experimental animals by means of the microsphere technique*. J Bone Joint Surg Am, 1981. **63**(6): p. 1028-31.
148. Standardization), E.K.f.N.E.C.f., *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten, in Teil 5: Prüfungen auf in-vitro-Zytotoxizität*. 1999, Beuth Verlag GmbH; DIN Deutsches Institut für Normung e.V: Berlin. p. 1-7.
149. Wegener, B., et al., *Microstructure, cytotoxicity and corrosion of powder-metallurgical iron alloys for biodegradable bone replacement materials*. Materials Science and Engineering: B, 2011. **176**(20): p. 1789-1796.
150. Wegener, B., *Entwicklung eines degradierbaren offenporigen eisenbasierten Knochenersatzwerkstoffes*. 2014.

151. Saller, R., *Eisen-ein zweischneidiges Schwert? Systematischer Review zur klinischen Bedeutung eines essenziellen Spurenelements*. Schweizer Zeitschrift GanzheitsMedizin, 2007. **19**(2): p. 69-103.
152. Niestroj, I., *Praxis der Orthomolekularen Medizin*. 2000, Stuttgart: Hippokrates Verlag GmbH.
153. Cook, J.D., *Adaptation in iron metabolism*. Am J Clin Nutr., 1990. **51**(2): p. 301-308.
154. Mueller, P.P., et al., *Control of smooth muscle cell proliferation by ferrous iron*. Biomaterials, 2006. **27**(10): p. 2193-200.
155. Fontecave, M. and J. Pierre, *Iron: Metabolism, toxicity and therapy*. Biochimie, 1993. **75**: p. 767-773.
156. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 7. 2003, Heidelberg: Springer Verlag.
157. Heeney, M.M. and N.C. Andrews, *Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview*. Hematol Oncol Clin North Am, 2004. **18**(6): p. 1379-403, ix.
158. Harrison, P.M. and P. Arosio, *The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1275**(3): p. 161-203.
159. Biesalski, H.K., J. Köhrle, and K. Schümann, *Vitamine, Spurenelemente und Mineralstoffe*. 2002, Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag.
160. Leitzmann, C., et al., *Ernährung in Prävention und Therapie*. 2005, Stuttgart: Hippokrates Verlag.
161. Wenzel, K.G., *Spurenelemente Fe1-Fe3 in Spurenelemente*. 2009, Pro BUSINESS Verlag.
162. Biesalski, H.K., et al., *Ernährungsmedizin*. 1999, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
163. Elmadfa, I. and C. Leitzmann, *Ernährung des Menschen*. Vol. 4. 2004, Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer.
164. Hallab, N.J., et al., *Concentration-and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts*. Journal of biomedical materials research, 2002. **60**(3): p. 420-433.
165. Peuster, M., et al., *A novel approach to temporary stenting: degradable cardiovascular stents produced from corrodible metal-results 6-18 months after implantation into New Zealand white rabbits*. Heart, 2001. **86**(5): p. 563-9.
166. Hermawan, H., D. Dube, and D. Mantovani, *Developments in metallic biodegradable stents*. Acta Biomater, 2010. **6**(5): p. 1693-7.
167. Peuster, M., et al., *Long-term biocompatibility of a corrodible peripheral iron stent in the porcine descending aorta*. Biomaterials, 2006. **27**(28): p. 4955-62.
168. Peuster, M., et al., *Are resorbable implants about to become a reality?* Cardiol Young, 2006. **16**(2): p. 107-16.
169. Mueller, P.P., et al., *Histological and molecular evaluation of iron as degradable medical implant material in a murine animal model*. J Biomed Mater Res A, 2012. **100**(11): p. 2881-9.
170. Liu, B. and Y.F. Zheng, *Effects of alloying elements (Mn, Co, Al, W, Sn, B, C and S) on biodegradability and in vitro biocompatibility of pure iron*. Acta Biomater, 2011. **7**(3): p. 1407-20.
171. Stephani, G., et al., *Iron based cellular structures—status and prospects*. Advanced Engineering Materials, 2006. **8**(9): p. 847-852.
172. Song, G., *Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys*. Corrosion Science, 2007. **49**(4): p. 1696-1701.
173. Yusop, A.H., et al., *Porous biodegradable metals for hard tissue scaffolds: a review*. Int J Biomater, 2012. **2012**: p. 641430.
174. Thompson, G.J. and D.A. Puleo, *Effects of sublethal metal ion concentrations on osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells*. Journal of applied biomaterials, 1995. **6**(4): p. 249-258.
175. Puleo, D.A. and W.W. Huh, *Acute toxicity of metal ions in cultures of osteogenic cells derived from bone marrow stromal cells*. Journal of Applied Biomaterials, 1995. **6**(2): p. 109-116.
176. H. Hermawan, et al., Powder Met. , 2008. **51**: p. 38–45.

177. Jacobs, J.J., J.L. Gilbert, and R.M. Urban, *Corrosion of metal orthopaedic implants*. Jbjs, 1998. **80**(2): p. 268-282.
178. Quadbeck, P., J. Kaschta, and R.F. Singer, *Superalloy IN625 with Cellular Microstructure – Fabrication Route and Mechanical Properties*. Advanced Engineering Materials, 2004. **6**(8): p. 635-639.
179. Gosheger, G., et al., *Silver-coated megaendoprostheses in a rabbit model--an analysis of the infection rate and toxicological side effects*. Biomaterials, 2004. **25**(24): p. 5547-56.
180. Harges, J., et al., *The influence of elementary silver versus titanium on osteoblasts behaviour in vitro using human osteosarcoma cell lines*. Sarcoma, 2007. **2007**: p. 26539.
181. Tweden, K.S., et al., *Biocompatibility of silver-modified polyester for antimicrobial protection of prosthetic valves*. J Heart Valve Dis, 1997. **6**(5): p. 553-61.
182. Bosetti, M., et al., *Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity*. Biomaterials, 2002. **23**(3): p. 887-92.
183. Greil, J., et al., *Analysis of the acute cytotoxicity of the Erlanger silver catheter*. Infection, 1999. **27 Suppl 1**: p. S34-7.
184. Hachem, R.Y., et al., *Evaluation of the silver iontophoretic catheter in an animal model*. Biomaterials, 2003. **24**(20): p. 3619-22.
185. Wack, C. and H. Niedermeier, *Die In-situ-Rekonstruktion nach bakterieller Infektion der infrarenalen Aorta*. Gefässchirurgie, 2003. **8**(4): p. 317-321.
186. Debus, E., et al., *Der dorsale Obturatorbypass–eine sichere Möglichkeit zur Ausschaltung der Leistenregion beim Protheseninfekt*. Gefässchirurgie, 2001. **6**(3): p. 158-163.
187. Bechert, T., et al., *The Erlanger silver catheter: in vitro results for antimicrobial activity*. Infection, 1999. **27**(1): p. S24-S29.
188. Funovics, P.T. and M. Domikus, *Modular tumor prostheses of the humerus*. Der Orthopäde, 2010. **39**(10): p. 968-979.
189. Ascherl, R., *Infektionsmanagement bei Megaimplantaten*. Der Orthopäde, 2010. **39**(10): p. 980-993.
190. Alt, V., et al., *Nanopartikuläres Silber*. Der Orthopäde, 2004. **33**(8): p. 885-892.
191. Deitch, E.A., et al., *Silver nylon cloth: in vitro and in vivo evaluation of antimicrobial activity*. Journal of Trauma, 1987. **27**(3): p. 301-304.
192. Alt, V., et al., *An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement*. Biomaterials, 2004. **25**(18): p. 4383-91.
193. Harges, J., et al., *Lack of toxicological side-effects in silver-coated megaprotheses in humans*. Biomaterials, 2007. **28**(18): p. 2869-75.
194. Dietl, H. and G. Ohlenschläger, *Handbuch der Orthomolekularen Medizin*. 2003, Stuttgart: Haug Verlag.
195. Domke, A., et al., *Verwendung von Mineralstoffen in Lebensmitteln ñ Toxikologische und ernährungsphysiologische Aspekte*, in *BfR Wissenschaft*. 2004, Bundesinstitut fuer Risikobewertung: Berlin. p. 323.
196. Schmidt, E. and N. Schmidt, *Orthomolekulare Prävention und Therapie in Leitfaden Mikronährstoffe*. 2004, Urban & Fischer Verlag: Munich.
197. Hruska, K.A., et al., *Hyperphosphatemia of chronic kidney disease*. Kidney Int, 2008. **74**(2): p. 148-57.
198. Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference, I., *The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health, in Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride*. 1997, National Academies Press (US) National Academy of Sciences.: Washington (DC).
199. Hahn, A., A. Ströhle, and M. Wolters, *Ernährung. Physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie*. 2006, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
200. Eschenbruch, B., *Wasser und Mineralstoffe in der Ernährungsmedizin*. 1994, Frankfurt am Main: Umschau Zeitschriftenverlag Breidenstein GmbH.
201. Foley, R.N., et al., *Serum phosphorus levels associate with coronary atherosclerosis in young adults*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(2): p. 397-404.

202. Kawagishi, T., et al., *High-resolution B-mode ultrasonography in evaluation of atherosclerosis in uremia*. *Kidney Int*, 1995. **48**(3): p. 820-6.
203. Molinari, A., *Unravelling corrosion in P-enriched stainless steel*. Metal Powder Report, 1999. **54**(4): p. 30-35.
204. Narasimhan, K.S., *Sintering of powder mixtures and the growth of ferrous powder metallurgy*. *Materials Chemistry and Physics*, 2001. **67**(1-3): p. 56-65.
205. Goldstein, A.S., et al., *Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds*. *Biomaterials*, 2001. **22**(11): p. 1279-88.
206. Kasper, H., *Ernährungsmedizin und Diätik*. Vol. 10. 2004, Munich: Urban & Fischer Verlag.
207. Wolff, U., et al., *Stability and electrochemical properties of passive layers on Fe-Si alloys*. *Corrosion Science*, 2000. **56**(12): p. 1195-1201.
208. Kelsall, G.H. and R.A. Williams, *Electrochemical Behavior of Ferrosilicides (Fe x Si) in Neutral and Alkaline Aqueous Electrolytes I. Thermodynamics of Systems at 298 K*. *Journal of the Electrochemical Society*, 1991. **138**(4): p. 931-940.
209. Wiberg, E., *Lehrbuch der anorganischen Chemie*. 1958: De Gruyter & Company.
210. Greenwood, N.N., A. Earnshaw, and K. Hückmann, *Chemie der elemente*. Vol. 1. 1988: Vch Weinheim.
211. Kazantzis, G., *Thallium*. *Handbook on the Toxicology of Metals*, 2007: p. 827-837.
212. Bech, A., *Hard metal disease and tool room grinding*. *Occupational Medicine*, 1974. **24**(1): p. 11-16.
213. Bech, A., M. Kipling, and J. Heather, *Hard metal disease*. *Occupational and Environmental Medicine*, 1962. **19**(4): p. 239-252.
214. Jordan, C., et al., *Memory deficits in workers suffering from hard metal disease*. *Toxicology letters*, 1990. **54**(2-3): p. 241-243.
215. Moulin, J., et al., *Lung cancer risk in hard-metal workers*. *American Journal of Epidemiology*, 1998. **148**(3): p. 241-248.
216. Wild, P., et al., *Lung cancer mortality in a site producing hard metals*. *Occupational and environmental medicine*, 2000. **57**(8): p. 568-573.
217. Coates, E. and J.H. Watson, *Diffuse interstitial lung disease in tungsten carbide workers*. *Ann Intern Med*, 1971. **75**(5): p. 709-716.
218. Davison, A., et al., *Interstitial lung disease and asthma in hard-metal workers: bronchoalveolar lavage, ultrastructural, and analytical findings and results of bronchial provocation tests*. *Thorax*, 1983. **38**(2): p. 119-128.
219. Harding, H., *Notes on the toxicology of cobalt metal*. *British journal of industrial medicine*, 1950. **7**(2): p. 76.
220. Peuster, M., et al., *Composition and in vitro biocompatibility of corroding tungsten coils*. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2003. **65**(1): p. 211-6.
221. Peuster, M., C. Fink, and C. von Schnakenburg, *Biocompatibility of corroding tungsten coils: in vitro assessment of degradation kinetics and cytotoxicity on human cells*. *Biomaterials*, 2003. **24**(22): p. 4057-61.
222. Peuster, M., et al., *Degradation of tungsten coils implanted into the subclavian artery of New Zealand white rabbits is not associated with local or systemic toxicity*. *Biomaterials*, 2003. **24**(3): p. 393-9.
223. PEUSTER, M., et al., *Dissolution of tungsten coils leads to device failure after transcatheter embolisation of pathologic vessels*. *Heart*, 2001. **85**(6): p. 703-704.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt vor allem Herrn PD. Dr. med. B. Wegener für die freundliche, umfassende sowie stets motivierende Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die schnelle tatkräftige Unterstützung. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Stunden der Korrektur meines Manuskriptes. Ohne die Bemühungen, das Verständnis und die Geduld von Herrn PD. Dr. med. B. Wegener hätte diese Arbeit nicht in dieser Form durchgeführt werden können.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Bärbel Schmitt, der nervenstarken MTA im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der orthopädischen Klinik und Poliklinik an der LMU, bedanken. Sie hat mich in die Kunst der Laborarbeit eingeführt und mich tatkräftig bei meinen Versuchen unterstützt.

Für die Unterstützung an der statistischen Auswertung möchte ich Maximilian Siebold danken, der mir stets mit viel Geduld und umfangreichen fachlichen Ratschlägen zur Seite stand.

Den größten Dank gebührt meinen Eltern, Andreas und Waltraud, die stets an mich geglaubt und gefördert haben. Sie haben mir das Medizinstudium und meinen beruflichen Weg erst ermöglicht. Ein großer Dank geht auch an meine kleinen Geschwister, Laura und Paul, die mich, trotz vieler verpasster Geburtstage, immer unterstützt haben. Meinen Großeltern, Johanna und Josef, kommt noch ein besonderer Dank zu. Sie haben mir seit meiner Kindheit beigebracht, immer an meine Träume zu glauben und diese vor allem auch umzusetzen und zu leben.

Ohne meine liebevolle Familie und deren unermüdliche Unterstützung wäre es mir nicht möglich gewesen, die vorliegende Studie umzusetzen. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Czechner, Julia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Weiterentwicklung eines Perfusionskammer-Systems zur in- vitro Untersuchung der Zytotoxizität degradierbarer metallischer Knochenersatzwerkstoffe

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 15.11.2020

Ort, Datum

Julia Czechner

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand