

**Aus der Klinik und Poliklinik für
Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie
der
Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A.C. Kübler

***In vitro* Untersuchung von 3D-pulvergedruckten
Monetit-Strukturen**

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

vorgelegt von

Dr. med. dent. Christoph Hans Jahn

aus Kempten

Würzburg, Juni 2014

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. U. Klammert

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. Groll

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2015

Der Promovend ist Arzt

Für
meine geliebte Frau Ann-Katrin,
meine wunderbaren Kinder Marie, Moritz und Felix,
meine lieben Eltern und Großeltern

Abkürzungen

AAA-Knochen	Autolysierter Antigenextrahierter Allogener Knochen
AP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CAD	Computer Aided Design
CAM	Computer Aided Manufacturing
CaSO ₄	Calciumsulfat
CNC	Computerized Numerical Control
Coll1a1	Kollagen 1 Alpha 1
CS	Compressive Strength
CT	Computer Tomographie
DVT	Digitale Volumen Tomographie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HA	Hydroxylapatit
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
Ocn	Osteocalcin
Opu	Osteopontin
PAA	Polyacrylic Acid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	Polycaprolacton
PLA	Poly lactid Acid
Runx2	Runt-Related Transcription Factor 2

SBF	Simulated Body Fluid
STL	Standard Triangulation Language
TCP	Tricalciumphosphat
TRAP	Tartratresistente Saure Phosphatase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WST	Water Soluble Tetrazolium

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des 3D-Pulverdruck-Verfahrens	9
Abb. 2	Zellkulturträger aus Brushit und Monetit	16
Abb. 3	24-Well-Platte mit Monetit-Scaffolds sowie Kontrollträgern aus Titan und Kupfer jeweils bedeckt mit Kulturmedium	21
Abb. 4	Extinktion als Maß für die Zellviabilität der MC3T3-E1-Kulturen auf den Monetit-, Titan- und Kupferträgern	28
Abb. 5	Aktivität der alkalischen Phosphatase der MC3T3-E1-Kulturen auf den Monetit-, Titan- und Kupferträgern	29
Abb. 6	Konzentration von Osteocalcin im frischen Kulturmedium sowie im verbrauchten Medium der MC3T3-E1-Kulturen auf den Monetit- und Titanträgern	30
Abb. 7	Darstellung der pH-Werte im frischen Kulturmedium sowie im verbrauchten Medium der MC3T3-E1-Kulturen auf den Monetit-, Titan- und Kupferträgern	32
Abb. 8	Darstellung der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen im frischen Medium sowie im verbrauchten Kulturmedium der MC3T3-E1-Kulturen auf den Monetit-, Titan- und Kupferträgern	33
Abb. 9	Darstellung der Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen im frischen Medium sowie im verbrauchten Kulturmedium der MC3T3-E1-Kulturen auf den Monetit-, Titan- und Kupferträgern	35
Abb. 10	Lichtmikroskopische Aufnahme eines Monetit-Scaffolds	36
Abb. 11	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monetit-Scaffolds	37
Abb. 12	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Monetit-Scaffolds	37

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Anforderungen an Materialien zum Knochenersatz	4
Tab. 2	Löslichkeitsprodukte von Calciumphosphaten	5
Tab. 3	Übersicht über die verbreitetsten Rapid-Prototyping-Verfahren	7
Tab. 4	Übersicht unterschiedlicher Materialsysteme zur Fertigung von im 3D-Pulverdruck-Verfahren hergestellter Trägermaterialien zur Knochenregeneration	8
Tab. 5	Mechanische Eigenschaften und Phasenzusammensetzung der durch 3D-Pulverdruck gefertigten Calciumphosphat-Strukturen aus Brushit und Monetit	15

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Rekonstruktion knöcherner Defekte	1
1.2	Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphatbasis	4
1.3	3D-Pulverdruckverfahren	6
1.4	3D-Pulverdruck von Calciumphosphaten	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Herstellung des Ausgangspulvers	13
2.2	Druckerflüssigkeit	13
2.3	Herstellung der Monetit-Scaffolds im 3D-Pulverdruck-Verfahren	13
2.4	Zellkulturtechnik	16
2.4.1	Nährmedien, Zusätze und Puffer	16
2.4.2	Materialien und Geräte	17
2.4.3	Zellkultivierung auf den Monetit-, Titan- und Kupfer-Scaffolds	18
2.5	Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Assay	21
2.6	Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP)	22
2.7	Bestimmung von Osteocalcin	23
2.8	Chemische Analyse des Zellkulturmediums	24
2.9	Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie	24
2.10	Statistik	25
3	Fragestellung	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Zellviabilität (WST-1)	27
4.2	Aktivität der alkalischen Phosphatase	28
4.3	Osteocalcinnachweis	29

4.4	Chemische Analyse des asservierten Kulturmediums	31
4.4.1	pH-Wert	31
4.4.2	Calcium-Ionenkonzentration	32
4.4.3	Phosphat-Ionenkonzentration	34
4.5	Licht- und Rasterelektronenmikroskopie	35
5	Diskussion	38
5.1	Knochenersatzmaterialien	38
5.2	Methodik und eigene Ergebnisse	40
5.3	Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur	44
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	55

1 Einleitung

1.1 Rekonstruktion knöcherner Defekte

Die Rekonstruktion von knöchernen Substanzdefekten ist bis zum heutigen Tag eine fachübergreifende Herausforderung, welche je nach Region auf eine funktionelle bzw. ästhetische Rehabilitation des Patienten abzielt. Auf dem Gebiet der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie haben knöcherne Defekte und Substanzverluste einen hohen klinischen Stellenwert. Ursachen sind vor allem benigne und maligne Raumforderungen, Traumata, Entzündungen und Alveolarkammatrophie (vor allem nach Zahnverlust). Die Größe des zu rekonstruierenden Defekts kann dabei nur wenige Millimeter bis einige Dezimeter betragen. So stellt die horizontale und/oder vertikale Augmentation des Kieferkamms z.B. nach Zahnverlust andere Anforderungen an ein Knochenersatzmaterial als die Rekonstruktion des gesamten Unterkiefers, beispielsweise nach Unterkieferteilresektion im Rahmen der ablativen Tumorchirurgie. Außer nach ihrer Größe lassen sich Defekte auch hinsichtlich ihrer funktionellen Belastung einteilen. In kraftbelasteten Arealen (z.B. dem Skelett des Bewegungsapparates) kommen ausschließlich hochfeste, in der Regel metallische Materialien wie Titan oder Cobalt-Chrom-Legierungen zum Einsatz. Diese Implantate müssen dabei langfristig sowohl statischen als auch dynamischen Belastungen standhalten. Bei nicht kraftbelasteten Defekten ist zu unterscheiden, ob ein „Knochenersatz“ im Sinne einer Platzhalterfunktion ausreichend ist, oder ob eine echte „Knochenregeneration“ erwünscht ist. Dabei kommen zum „Knochenersatz“ vorwiegend nicht degradierbare Werkstoffe zum Einsatz. Ziele sind unter anderem eine dauerhafte Stützung des bedeckenden Weichgewebes mit Verbesserung der Oberflächenkontur und Schutz der bedeckten Strukturen, beispielsweise des Gehirns im Falle einer Cranioplastik.

Die „Knochenregeneration“ erfordert Werkstoffe, die einerseits das unerwünschte Einwachsen von Bindegewebe verhindern, andererseits aber das Einwachsen von Knochengewebe aus dem Implantatlager ermöglichen beziehungsweise fördern. Sie sollten idealerweise vollständig durch vitalen Knochen ersetzt werden, was eine grundsätzliche Degradierbarkeit voraussetzt [33].

Solche Materialien werden als Knochenimplantate (allogene, xenogene und alloplastische Knochenersatzmaterialien, s.u.) oder Knochentransplantate (autologe, vitale Knochenzellen) bezeichnet. Aufgrund ihrer Eigenschaften sollen sie die Knochenregeneration bzw. -heilung fördern oder induzieren [38]. Dabei muss mindestens einer der folgenden Mechanismen ermöglicht werden: Osteokonduktion, Osteoinduktion oder Osteogenese [14]. Das ideale Material zur Rekonstruktion knöcherner Defekte erfüllt dabei alle drei Kriterien.

Der Begriff der Osteokonduktion beschreibt die Eigenschaft eines Materials, als Leitschiene zu dienen. Entlang dieser kann Knochengewebe aus der Umgebung, dem sogenannten Lagergewebe, in den Defekt hineinwachsen. Dabei wird das Knochenersatzmaterial möglichst vollständig degradiert (auf zellulärer Ebene) und/oder hydrolytisch aufgelöst. Knochen ummauerte (osseointegrierte), nicht degradierte Materialanteile könnten unter Umständen das knöcherne Regenerat in seiner Stabilität schwächen.

Ein osteoinduktives Material fördert die Knochenneubildung über Faktoren (z.B. morphogene Proteine wie BMPs), die eine Differenzierung und Stimulierung knochenbildender Zellen aus dem umliegenden Gewebe induzieren.

Osteogenese kann nur stattfinden durch die Verpflanzung vitaler knochenbildender Zellen oder deren Vorläuferzellen [38], welche im Empfängerlager Knochengewebe bilden.

Als Goldstandard ist nach wie vor die autologe Knochentransplantation anzusehen [14]. In Rahmen dieser sind alle drei Mechanismen – Osteokonduktion, Osteoinduktion und Osteogenese – möglich. Weitere Vorteile sind die fehlende Antigenwirkung und die hohe therapeutische Sicherheit.

Nachteilig können sich die Entnahmemorbidität, die unter Umständen limitierte Verfügbarkeit, eine spenderregionabhängige Transplantatresorption sowie die begrenzte Modellierbarkeit des Transplantates auswirken [32].

Allogene (von Individuen gleicher Spezies) und xenogene (von Individuen anderer Spezies) Knochenersatzmaterialien zeichnen sich zwar durch eine praktisch unbegrenzte Verfügbarkeit aus und haben osteokonduktive sowie teilweise osteoinduktive Eigenschaften, jedoch haben sie den Nachteil einer möglichen immunologischen Unverträglichkeit und das Risiko einer Infektionsübertragung [38].

Alloplastische (voll-/teilsynthetische) Knochenersatzmaterialien bilden hinsichtlich ihrer chemischen Entität die heterogenste Gruppe. Sie bestehen meist aus vollsynthetischen oder teilsynthetischen Biomaterialien und gehören überwiegend der Substanzklasse der Calciumphosphate an. Die häufigsten Vertreter sind Hydroxylapatit (HA) $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, Tricalciumphosphat (α -/ β -TCP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ oder biphasische Calciumphosphate. Als weitere Substanzklasse wären die Biopolymere zu nennen, beispielsweise Polylactid, Polyglycolid oder Polycaprolacton. In der Regel weisen all diese Substanzen nur osteokonduktive Eigenschaften auf.

Wünschenswert wäre daher die Entwicklung von alloplastischen Knochenersatzmaterialien, welche aufgrund osteokonduktiver und osteoinduktiver Eigenschaften eine ähnliche therapeutische Sicherheit wie autologe Knochentransplantate aufweisen. Sie sollten *in vivo* abbaubar sein, um vollständig durch regenerierten Knochen ersetzt werden zu können. Da eine rein osteoklastäre Degradation, welche nur an der Kontaktfläche zwischen Ersatzmaterial und Osteoklast stattfindet, nicht ausreicht, sollten die Materialien auch bei physiologischem Milieu thermodynamisch löslich sein. Gleichzeitig sollten die Abbauprodukte als Substrat für die Osteoblasten während der Knochenneusynthese fungieren [51]. Eine alleinige Osseointegration dieser Materialien wäre zumindest in kraftbelasteten Defekten nicht erwünscht. Dies würde zu einer biomechanischen Schwächung des rekonstruierten Knochenareals führen, da die Materialien am aktiven Boneremodelling nicht teilnehmen würden. Im Idealfall sollte das Material in der gleichen Geschwindigkeit resorbiert werden, in welcher die Knochenregeneration stattfindet. Nach vollständiger Resorption des Knochenersatzmaterials wäre ein kompletter Ersatz durch vitalen Knochen in der gleichen Form und Dimension wünschenswert (*Restitutio ad integrum*). Dieser wiederum könnte gemäß des Wolff'schen Gesetzes am Boneremodelling, welches durch biomechanische Kräfte induziert wird, teilnehmen [70]. Ein ideales Material wäre dabei unbegrenzt verfügbar und ließe sich zu jeder beliebigen dreidimensionalen Form verarbeiten.

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Anforderungen an ein solches Knochenersatzmaterial.

Obligate Eigenschaften	Allgemeine Eigenschaften
Keine lokale oder systemische Toxizität	Uneingeschränkte Verfügbarkeit
Gute Biokompatibilität	Lagerungsfähigkeit
Nicht kanzerogen	Kostengünstige Herstellung
Chemische Stabilität	
Histokompatibilität	
Sterilisierbarkeit	
Wünschenswerte biomechanische, biochemische und morphologische Eigenschaften	
Biomechanische und morphologische Eigenschaften wie Elastizitätsmodul, Biege- und Kompressionsfestigkeit, Makro- und Mikromorphologie entsprechend dem zu ersetzenden Knochengewebe; ggf. präfabrizierbare Makromorphologie	
Osteokonduktion und/oder Osteoinduktion	
Biodegradierbarkeit analog zur Knochenneubildung	
Osseointegration	
Einfache Anwendbarkeit	

Tab.1: Anforderungen an Materialien zum Knochenersatz [15]

1.2 Knochenersatzmaterialien auf Calciumphosphatbasis

Die Werkstoffklasse der Calciumphosphate stellt wohl die am häufigsten verwendete Stoffklasse für alloplastische Knochenersatzmaterialien dar. Alle Substanzen sind dabei letztlich Salze der Orthophosphorsäure (H_3PO_4). Der mineralische Anteil der Knochensubstanz besteht ebenfalls aus Calciumphosphaten, was die gute Biokompatibilität dieser Ersatzmaterialien erklärt. Diese anorganische Phase des Knochens wird hauptsächlich aus Hydroxylapatit (HA) gebildet. Es wird im Organismus von Osteoblasten aus Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen synthetisiert. Einzelne Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen können im Kristallgitter durch Natrium-, Magnesium-, Fluorid-, Chlor- und Carbonat-Ionen ersetzt sein. Im Knochengewebe kommen außerdem noch in geringen Mengen weitere Calciumphosphate wie Brushit oder Calciumpyrophosphat vor [13]. Dies ist die Ursache des niedrigeren Ca/P-Verhältnis des biologischen Hydroxylapatits (1,5-1,67) im Vergleich zu stöchiometrischem Hydroxylapatit (1,67;

siehe Tabelle 2). HA besitzt aufgrund seiner hohen Kristallinität und Gefügedichte unter physiologischen Bedingungen eine sehr geringe Löslichkeit (siehe Tabelle 2) [40].

Material	Summenformel	Verhältnis Ca/P	log (LP) bei 25°C
Dicalciumphosphat Dihydrat (Bruscht)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0	6,59
Dicalciumphosphat Anhydrat (Monetit)	CaHPO_4	1,0	6,90
α -Tricalciumphosphat	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	25,5
β -Tricalciumphosphat	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5	28,9
Hydroxylapatit	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1,67	58,4

Tab. 2: Löslichkeitsprodukte (LP) von Calciumphosphaten [13]

Lediglich an der direkten Grenzfläche zu osteoklastären Zellen kann durch deutliche Herabsetzung des pH-Wertes eine Degradation von HA erfolgen.

Calciumphosphate eignen sich vor allem für den Ersatz funktionell nicht belasteter Strukturen, da sie eine geringe mechanische Stabilität, insbesondere eine schlechte Biegefestigkeit, aufweisen. Sie finden daher vor allem im craniofacialen und maxillofacialen Bereich sowie auch in der Orbitaregion Anwendung [12, 37]. Hydroxylapatit, Tricalciumphosphat (α -/ β -TCP) und biphasisches Calciumphosphat (Hydroxylapatit + β -TCP) können in unterschiedlichen Applikationsformen angewendet werden. Man unterscheidet Pulver, Granula, gesinterte Formkörper, Pasten oder *in situ* härtende Zemente [10, 21, 54]. Die einzelnen Darreichungsformen unterscheiden sich dabei wesentlich in ihren Materialeigenschaften. Pulver und Granula sind mechanisch wenig stabil, da sie nur durch das Blutkoagel, bedeckendes Gewebe, Titanmeshes oder Membranen stabilisiert werden [1]. Dem stehen die Vorteile eines raschen Einwachsens von Knochengewebe aus dem Lagergewebe (Osteokonduktion) und ein gutes Resorptionsverhalten gegenüber. Gesinterte Formkörper zeichnen sich zwar durch eine sehr hohe Kompressionsfestigkeit aus, lassen sich dem Knochendefekt jedoch nicht optimal in Form und Größe anpassen und sind aufgrund ihrer geringen Porosität sowie ihrer hohen Gefügedichte nahezu nicht degradierbar [17]. Calciumphosphatzemente sind sowohl ausreichend gut degradierbar und mechanisch stabil als auch, je nach

Defektsituation, frei formbar. Hierbei wird eine aus verschiedenen Calciumorthosphosphaten bestehende Pulverphase mit einer wässrigen Elektrolytlösung zu einer Paste vermengt. Diese Paste ist formbar und bindet unter physiologischen Bedingungen ab [17, 55]. Die unterschiedlichen Löslichkeitsprodukte der Reaktanden, in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur, führen letztendlich zu einer Übersättigung der pastösen Emulsion und zur Ausfällung des Reaktionsprodukts und damit zum Abbinden des Zements. Dabei entsteht bei einem pH-Wert $> 4,2$ Hydroxylapatit. Bei Werten $< 4,2$ wird Brushit ausgefällt. Da der physiologische pH-Wert zwischen 7,35 und 7,45 liegt, ist die Mehrzahl der Calciumphosphat-Zemente HA-bildend. Geometrisch anspruchsvolle Defekte lassen sich jedoch aufgrund der zunächst pastösen Phase und der anspruchsvollen Handhabung unbefriedigend rekonstruieren. Die Rekonstruktionsergebnisse sind dabei stark von den Fähigkeiten und der Erfahrung des Operateurs abhängig. Die Entwicklung präfabrizierter Festkörper aus Calciumphosphatzement zielt darauf ab, alle erwünschten positiven Materialeigenschaften in sich zu vereinen. Gefordert sind ausreichende mechanische Stabilität, gutes Resorptionsverhalten und eine exakte Anpassung an die Defektsituation.

Bewährt hat sich hierbei die Herstellung von Festkörpern im Rapid-Prototyping-Verfahren, speziell im 3D-Pulverdruck.

1.3 3D-Pulverdruckverfahren

Das 3D-Pulverdruckverfahren wird den Rapid-Prototyping-Verfahren zugeordnet, welche neuerdings auch als „Solid Freeform Fabrication“ bezeichnet werden. Dieser Begriff umschreibt eine heterogene Gruppe von Herstellungsprozessen dreidimensionaler Formkörper, die zunächst als CAD-Modelle am Computer entworfen werden. Hierbei erfolgt die Zerlegung entsprechender Volumenmodelle in einzelne Schichten. Diese einzelnen Schichten werden anschließend durch das jeweilige Verfahren hergestellt und miteinander verbunden. Das Rapid-Prototyping unterscheidet sich dabei grundsätzlich von subtraktiven CAD-CAM-Techniken, wie z.B. dem Herausfräsen von Modellen aus Blöcken in CNC-Fräsen. Mittels Rapid-Prototyping-Verfahren können so auch komplexe geometrische Formen wie z.B. Hohlräume oder

Unterschnitte in einem Modell umgesetzt werden. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der verbreitetsten Verfahren.

Rapid-Prototyping-Verfahren	
Stereolithografie	Schichtweise Fotopolymerisation eines flüssigen Monomers (z.B. Epoxydharze, Acrylate) mittels Laser
Selektives Lasersintern	Schichtweises Aufschmelzen eines thermoplastischen Pulvers (z.B. Kunststoffe, Metalle, Keramiken) mittels Laser
Laminatverfahren	Einzelne Schichten werden meist mittels Laser ausgeschnitten und miteinander verklebt (z.B. Papier, Kunststoffe)
Extrusionsverfahren	Aufschmelzen einzelner Schichten aus thermoplastischem Material (z.B. Kunststoffe) aus einer beheizten Düse
3D-Druck-Verfahren	Einzelne Schichten werden durch Einspritzen eines flüssigen Binders in ein Pulverbett (z.B. Kunststoffe, Keramiken) mittels Tintenstrahltechnologie generiert

Tab. 3: Übersicht über die verbreitetsten Rapid-Prototyping-Verfahren [19, 35]

In der Vergangenheit wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen die Eignung des 3D-Pulverdruckverfahrens zur Herstellung von Knochenersatzmaterialien bzw. von entsprechenden Formkörpern untersucht. Hierbei kamen unterschiedliche Materialsysteme zum Einsatz (siehe Tabelle 4). Die Verfestigung der Strukturen basierte bei fast allen Ansätzen auf einer Polymerquellung, lediglich *Khalyfa et al.* nutzten eine hydraulische Zementabbindereaktion [31].

Studie	Pulver und Partikelgröße	Binder	Verbindungsmechanismus	Nachbehandlung für mehr Stabilität
Lama et al. [38]	Stärke-basiertes Polymer: 50% Maisstärke ~ 10 µm, 30% Dextran > 100 µm, 20% Gelatine > 100 µm	Destilliertes Wasser	Polymerquellung	Trocknung 1h 100 °C, Infiltration mit 75% PLA und 25% PCL CS < 2 MPa
Pister et al. [50]	ZnO / MgO / PAA < 125 µm	wässrig: 85% Wasser, 10% Propanol, 5% Glycerol	Reaktion von PAA mit ZnO unter Bildung von Zn/Mg Carboxylaten	CS = 20,3 MPa
Giordano et al. [22]	PLA 75–150 µm	100% Chloroform	Polymerquellung	keine
Huang et al. [26]	PLA < 150 µm	Ethanol / Aceton	Polymerquellung	keine
Seitz et al. [56]	HA mit Polymer-Zusätzen	Polymer-basiert	Polymerquellung	Sinterung 2h 1250 °C CS = 0,6-2,2 MPa
Peters et al. [49]	TCP < 63 µm	Polymer-basiert	Polymerquellung	Sinterung > 1000 °C
Khalyfa et al. [31]	30% Tetracalciumphosphat und (A) 70% TCP (B) 70% CaSO ₄ x 2H ₂ O	25% Zitronensäure	Hydraulische Zementabbindereaktion	1) Sinterung 2) Polymerinfiltration CS = 0,1-4 MPa
Gbureck et al. [18]	TCP < 100 µm	10-30% Phosphorsäure	Hydraulische Zementabbindereaktion	Immersion in 20% Phosphorsäure CS = 25-45 MPa

Tab. 4: 3D-Pulverdruck von Formkörpern zur Knochenregeneration. Übersicht bisheriger Studien, welche sich hinsichtlich der Materialsysteme, Mechanismen der Verfestigung sowie der Nachbehandlung unterscheiden. Mit Calciumphosphaten arbeitende Ansätze sind dunkelgrau hinterlegt [33].

Basierend auf der Technologie des Tintenstrahldrucks werden einzelne Schichten generiert, indem ein flüssiger Binder oder Reaktand mittels Druckkopf in ein glatt ausgestrichenes Pulverbett appliziert wird. Je nach Materialsystem kommt es entweder zum Verquellen bzw. Verkleben der Pulverpartikel oder Pulver und Reaktand verbinden sich in einer chemischen Reaktion. Auf diese Weise entsteht eine Schicht in der

xy-Ebene. Anschließend wird der Bauraum mit dem Druckobjekt um die entsprechende Schichtstärke (z.B. 100-200 μm) in der z-Ebene abgesenkt. Eine neue Pulverschicht wird mit einer Walze in der gewünschten Schichtstärke ausgestrichen. Es folgt der additive Druck der nächsten Schicht. Um einen Verbund der einzelnen Schichten untereinander zu gewährleisten, muss das Auftragen der neuen Schicht noch während des Abbindevorganges der alten Schicht erfolgen. Der Abbindevorgang darf also nicht zu schnell ablaufen. Andererseits sollte das Abbinden auch nicht zu lange dauern, da sich ansonsten der Binder bzw. der flüssige Reaktand durch Kapillarkräfte im Pulverbett ausbreiten würde. Dies würde zu Verformungen und Dimensionsungenauigkeiten des Druckobjektes führen. Das das Druckobjekt umgebende, nicht abgebundene Pulver erfüllt bis zur Verfestigung des Formkörpers eine Stützfunktion. Somit können beispielsweise auch Hohlräume oder Unterschnitte ohne Einarbeitung von Stützstrukturen (z. B. Streben) erzeugt werden. Auch hierin unterscheidet sich der Pulverdruck von anderen Rapid-Prototyping-Verfahren, wie etwa der Stereolithografie. Allerdings müssen bei hohlen oder anderen komplexen geometrischen Strukturen entsprechende Öffnungen zum späteren Austreiben des überschüssigen Pulvers eingeplant werden.

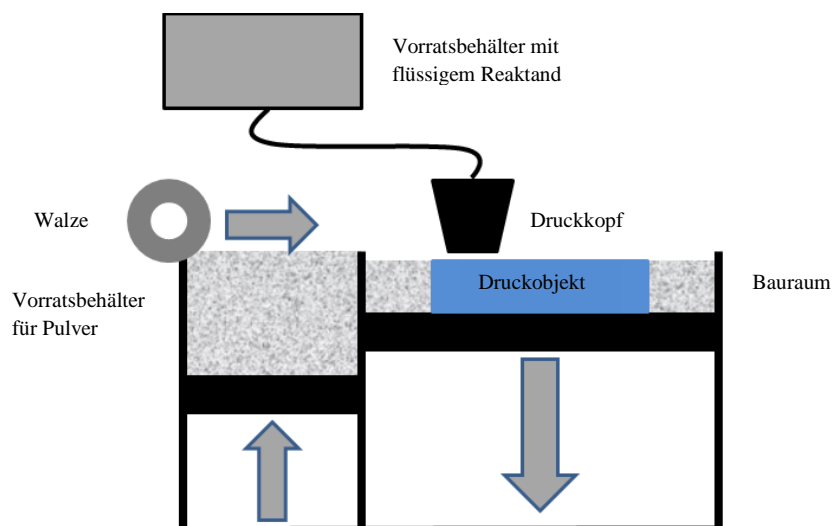


Abb. 1: Schematische Darstellung des 3D-Pulverdruck-Verfahrens [49].

Ist das Objekt fertig gestellt, wird es aus dem Drucker entnommen und Pulverreste werden mittels Luftbläser und Pinsel entfernt [43, 56]. Zur Verbesserung der Stabilität

bzw. der mechanischen Eigenschaften erfolgt in der Regel eine Nachbehandlung der Objekte, welche verfahrensabhängig ist (siehe Tabelle 4).

Für optimale Druckergebnisse ist eine gute Streichfähigkeit des Pulvers Voraussetzung, denn nur dann können möglichst gleichmäßige und dünne Schichten aufgetragen werden. Die Streichfähigkeit wird durch die Partikelgröße, -form und -größenverteilung im Pulver bestimmt [9]. Dabei ist entscheidend, dass die Partikelgröße möglichst zwischen 20-50 μm liegt, wobei keine Pulverpartikel kleiner als 5 μm vorkommen sollten. Dies könnte zur Bildung von Agglomeraten in einer Dimension von 1-2 mm führen, worunter wiederum die Dimensionstreue leiden würde [18].

Die verwendete Binderflüssigkeit muss mittels Tintenstrahldruckkopf applizierbar sein, sie darf demnach eine gewisse Viskosität und Oberflächenspannung nicht überschreiten [72]. Die Aushärtung sollte erst nach Kontakt mit dem Pulver, dann aber zügig ablaufen, um die Diffusion in die Umgebung möglichst gering zu halten. Durch Kapillarkräfte wird stets Binderflüssigkeit in das das Druckobjekt umgebende Pulver laufen. Dies ist einerseits erwünscht, da sich die einzelnen Schichten sonst miteinander nicht verbinden könnten. Andererseits kommt es hierdurch aber auch zum Anhaften von Pulverpartikeln am Bauteil. Dieser Umstand ist verantwortlich für die Rauigkeit der Objekte und verschlechtert die angestrebte Dimensionstreue.

Wie bereits geschildert, können im 3D-Pulverdruck beliebige Formen unter Verzicht auf jegliche Stützstrukturen generiert werden.

Es ist damit möglich, Binnenstrukturen im Objekt wie kommunizierende Makroporen und Kanäle zu erzeugen. Solche Strukturen könnten die Zelleinsprossung aus dem Implantatlager erleichtern und die Vaskularisierung im Rahmen des Ab- und Umbauprozesses des Knochenersatzmaterials fördern [20]. Ein weiterer elementarer Vorteil des Druckverfahrens ist die Verarbeitung bei Raumtemperatur. Je nach verwendetem Materialsystem kann sogar auf eine thermische Nachbehandlung zur Verbesserung der Stabilität der Druckobjekte verzichtet werden. Insbesondere bedarf es bei Ausnutzung einer Zementabbindereaktion im 3D-Pulverdruck-Verfahren keiner nachträglichen Sinterung der Grünlinge. Daraus resultieren günstige Materialeigenschaften wie höhere Mikroporosität und thermodynamische Löslichkeit im Vergleich zu gesinterten Keramiken. Die Möglichkeit der Verarbeitung bei Raumtemperatur erlaubt außerdem grundsätzlich das Eindringen von thermosensiblen

Substanzen. Bei Verwendung mehrerer Druckköpfe kann dies sogar orts aufgelöst erfolgen.

So wurden bereits Antibiotika, Proteine (BMPs, VEGF) und vitale Zellen mittels 3D-Pulver-Druck-Verfahren prozessiert [5, 6, 68, 71, 74]. Weiterhin steht eine große Varianz an verwendeten Pulver-Binder-Kombinationen zur Verfügung (siehe Tabelle 4), die das Verfahren für unterschiedlichste Fragestellungen interessant machen. In Abhängigkeit von der Größe des Bauraumes kann eine Vielzahl kleinerer Objekte (z.B. Zellkulturträger wie im eigenen Versuch) in einem Arbeitsgang relativ schnell (im Bereich von Minuten) gefertigt werden. Möglich ist aber auch die Herstellung größerer, geometrisch komplexer Objekte. Als Beispiel seien individuelle, defektspezifische Implantatkörper zur Rekonstruktion großer Knochendefekte genannt. Hierzu können patientenspezifische CT-/DVT-Daten (DICOM-Datensatz) eingelesen werden, woraufhin ein für die spezifische Defektsituation angefertigtes Knochenimplantat im CAD/CAM-Verfahren konstruiert und gedruckt werden kann [28, 49].

Nachteilig erweist sich eine systemimmanente Rauigkeit der Objekte, die durch das Herstellungsverfahren verursacht wird. Verantwortlich hierfür ist, wie bereits erläutert, die zeitliche Latenz bis zur Abbindereaktion bzw. Verklebung der Pulverpartikel mit dem Binder, wodurch es zur Diffusion des Binders in die Umgebung und infolgedessen zum Anhaften von Pulverpartikeln außerhalb der Objektgrenzen kommt.

1.4 3D-Pulverdruck von Calciumphosphaten

Die in dieser Arbeit untersuchten Scaffolds wurden in einem Verfahren hergestellt, das die chemische Abbindereaktion von Calciumphosphatzementen mit der Technik des 3D-Pulverdrucks kombiniert. Die Verfestigung der Calciumphosphat-Partikel erfolgt also nicht durch Quellung zugesetzter Polymere wie in anderen Ansätzen (siehe Tabelle 4), sondern durch eine hydraulische Zementabbindereaktion. Dabei besteht die Pulverphase aus α - und β - Tricalciumphosphat in einer Korngröße von 20-50 μm und als flüssiger Reaktand dient Phosphorsäure in einer Konzentration von 20%. Diese Parameter haben sich in umfangreichen Versuchen im Vorfeld als am geeignetsten erwiesen [18]. Das sich in der Abbindereaktion bildende Calciumhydrogenphosphat-Dihydrat (Bruschit) verfügt nach entsprechender Nachhärtung (Immersion der Strukturen in 20% Phosphorsäure, siehe Kapitel 2.3) über Festigkeiten, die eine

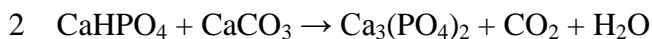
nachträgliche Sinterung zur Verfestigung verzichtbar machen. *Gbureck et al.* konnten zeigen, dass komplexe 3-dimensionale Objekte mit diesem Verfahren herstellbar sind. Die Druckfestigkeit der Prüfkörper ist abhängig von der Konzentration der Phosphorsäure (0,9 MPa beim Verdrucken 5%iger H_3PO_4 ; 8,7 MPa beim Verdrucken 30%iger H_3PO_4). Gleichzeitig verändert sich durch die unterschiedlichen Konzentrationen auch die Dichte ($1,37 \text{ g/cm}^3$ bei 5%iger H_3PO_4 ; $1,63 \text{ g/cm}^3$ bei 30%iger H_3PO_4) und Porosität (53% bei 5%iger H_3PO_4 ; 41% bei 30%iger H_3PO_4) der Druckobjekte. Phosphorsäure-Konzentrationen jenseits der 30% lassen sich aufgrund der zunehmenden Viskosität nicht über die Tintenstrahl-Druckköpfe prozessieren. Eine weitere Erhöhung der Druckfestigkeit (bis auf 22,3 MPa) kann durch einen Nachbearbeitungsschritt erreicht werden, in dem die Objekte für 3x60 Sekunden in einem 20%igen Phosphorsäurebad nachgehärtet werden. Auch die Porengröße (Reduktion von $26,6 \mu\text{m}$ auf $12,5 \mu\text{m}$) und Porosität (Reduktion von 45,5% auf 29,3%) des Materials werden durch diesen Arbeitsschritt beeinflusst. Entfernt man das im Brushit enthaltene Hydrationswasser durch einen entsprechenden thermischen Behandlungsschritt (z.B. durch Autoklavieren bei $134 \text{ }^\circ\text{C}$ für 2 Stunden), erhält man eine neue Calciumphosphatphase, nämlich Calciumhydrogenphosphat Anhydrat (Monetit). Dieses weist eine im Vergleich zu Brushit geringere Druckfestigkeit von 15,3 MPa und eine größere Porosität (von 43,8%) auf. Der Monetitanteil im Druckobjekt liegt bei 63%, als weitere Calciumphosphatphasen liegen β -TCP (26%) und α -TCP (11%) vor.

Es wurde gezeigt, dass mit diesem Verfahren dimensionstreue geometrische Formkörper mit ausreichender mechanischer Festigkeit und gutem Degradationsverhalten hergestellt werden können [18]. Die Pulverphase lässt sich in einer Schichtdicke von $\geq 100 \mu\text{m}$ austreichen und ist dabei gut streichfähig. Durch das Verdrucken von 20%iger Phosphorsäure ließen sich Implantate mit ausreichender Kompressionsfähigkeit bei möglichst großer Porosität herstellen. Die Abbindereaktion war ausreichend schnell, so dass sich einerseits die einzelnen gedruckten Schichten gut miteinander verbinden konnten und andererseits der Präzisionsverlust durch das Verlaufen des flüssigen Reaktanden in das umgebende Pulver akzeptabel war [18].

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung des Ausgangspulvers

Zur Herstellung des biphasischen Tricalciumphosphatpulvers (α -TCP / β -TCP) wurden Pulvermischungen aus Calciumcarbonat (CaCO_3 , Merck, Darmstadt) mit Dicalciumphosphat Anhydrat (CaHPO_4 , Monetit) (Merck, Darmstadt) gesintert. Die Reaktion erfolgte nach der Gleichung:



292,4 g (2,15 mol) Dicalciumphosphat Anhydrat und 100,1 g (1,00 mol) Calciumcarbonat wurden im Pflugscharmischer (M5R, Gebrüder Lödige, Paderborn) für 1 h vermengt und anschließend für 5 h bei 1400 °C (α -TCP) bzw. bei 1100 °C (β -TCP) gesintert. Um eine thermische Zersetzung der metastabilen α -TCP Phase im Temperaturbereich von 800-1200 °C zu verhindern, wurden die Sinterkuchen umgehend an der Luft abgeschreckt. Mit Hilfe eines Mörsers wurden die Sinterkuchen zerkleinert und auf eine Korngröße von $<160 \mu\text{m}$ gesiebt. Anschließend wurden sie mit dem Achatmahlwerkzeug (Becher 500 ml, 4 Kugeln á 30 mm, Befüllung mit 125 g Pulver) in einer Kugelmühle (PM400, Retsch, Haan) gemahlen (10 min bei 200 min^{-1} , minütlicher Drehrichtungswechsel).

Nach dem Mahlvorgang wurde das Pulver in Duranglasflaschen gefüllt und sterilisiert (200 °C trockene Hitze, 2 h).

2.2 Druckerflüssigkeit

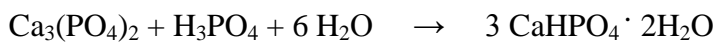
Als flüssige Phase in den Druckköpfen wurde 20%ige Phosphorsäure verwendet. Die Konzentration von 20% erfüllt dabei am besten druckrelevante Parameter wie Viskosität und Reaktivität [18].

2.3 Herstellung der Monetit-Scaffolds im 3D-Pulverdruck-Verfahren

Zum Drucken der Bruschtscaffolds (Vorstufe der Monetitscaffolds) im 3D-Druckverfahren wurden der Bauraum sowie das Pulverreservoir des Druckers (Z-Printer

310, Z-Corporation, Rockhill, USA), nach vorheriger Desinfektion der relevanten Innenflächen mit 70%igem Ethanol, vollständig mit Ausgangspulver (siehe 2.1) befüllt. Das Pulver wurde geglättet und leicht manuell verdichtet. Die flüssige Phase wurde in eine handelsübliche Tintenstrahl-Druckpatrone (Hewlett-Packard C4800A) gefüllt, nachdem die Tinte entfernt und die Patrone sorgfältig mit Aqua dest. gereinigt und mit 70%igem Ethanol desinfiziert wurde.

Die Abbindereaktion des Druckobjekts erfolgte in der Bildung von Dicalciumphosphat Dihydrat (Bruschit) gemäß der Gleichung:



Es wurden folgende Druckparameter eingestellt: Schichtdicke 125 µm, Skalierung $x=y=z=1$. Der Druck erfolgte bei Raumtemperatur. Nach dem Druck wurden die Träger aus dem Pulverbett des Druckers entnommen und überschüssiges TCP-Pulver mittels Druckluft entfernt. Zur Erhöhung der Umsatzrate von TCP zu Bruschnit wurden die Träger 3mal in 20%iger Phosphorsäure für jeweils 60 Sekunden nachgehärtet [18]. Dieser Vorgang verbessert, wie in Kapitel 1.4 beschrieben, die mechanischen Eigenschaften (Kompressionsfähigkeit) sowie die Struktur (Porosität und Porengröße) des Materials.

Die Entnahme der Scaffolds aus dem Drucker sowie die Handhabung im Rahmen der Nachhärtung erfolgten mit sterilen Instrumenten. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur getrocknet. Überschüssige Phosphorsäure wurde durch Spülen der Scaffolds mit DPBS-Puffer eliminiert, gefolgt von erneuter Trocknung bei Raumtemperatur. Zur hydrothermalen Umwandlung von Bruschnit zu Monetit wurden die Bruschnit-Träger bei 134 °C für 2 Stunden autoklaviert. Dies führt zu einer hydrothermalen Modifikation des Dicalciumphosphat Dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Bruschnit) zu Dicalciumphosphat Anhydrat (CaHPO_4 , Monetit) durch Entfernen des freien Hydratationswassers. Die durch diesen Vorgang induzierten Veränderungen der Materialeigenschaften von Bruschnit und Monetit sind in Tabelle 5 dargestellt.

Eigenschaften	Brusshit	Monetit
Druckfestigkeit in [MPa]	23,4 ± 3,3	15,3 ± 1,1
Biegefestigkeit in [MPa]	3,3 ± 1,2	2,7 ± 0,3
Porosität [%]	38,8	43,8
Zusammensetzung	51% Brusshit, 12% Monetit, 26% β -TCP, 11% α -TCP	63% Monetit, 26% β -TCP, 11% α -TCP

Tab. 5: Mechanische Eigenschaften und Phasenzusammensetzung der durch 3D-Pulverdruck gefertigten Calciumphosphat-Strukturen (Brusshit). Die Prüfkörper wurden mit 20%iger H_3PO_4 gedruckt und 3x60 sec in 20%iger H_3PO_4 nachgehärtet. Durch Autoklavieren (bei 134 °C, für 2 h) entsteht wasserfreies Calciumhydrogenphosphat (Monetit) [18].

Die Trägerstrukturen wurden am Computer mit dem CAD Programm „Think3 Design Xpressions“ (think3, Cincinnati, USA) entworfen. Es wurde eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Höhe von 2 mm gewählt, um eine gute Passung in einer 24-Well-Zellkulturplatte zu gewährleisten. Die Übertragung an den Drucker erfolgte im STL-Datenformat. Die Objekte wurden mit einer Dimensionstreuung von $\pm 200 \mu m$ gedruckt.

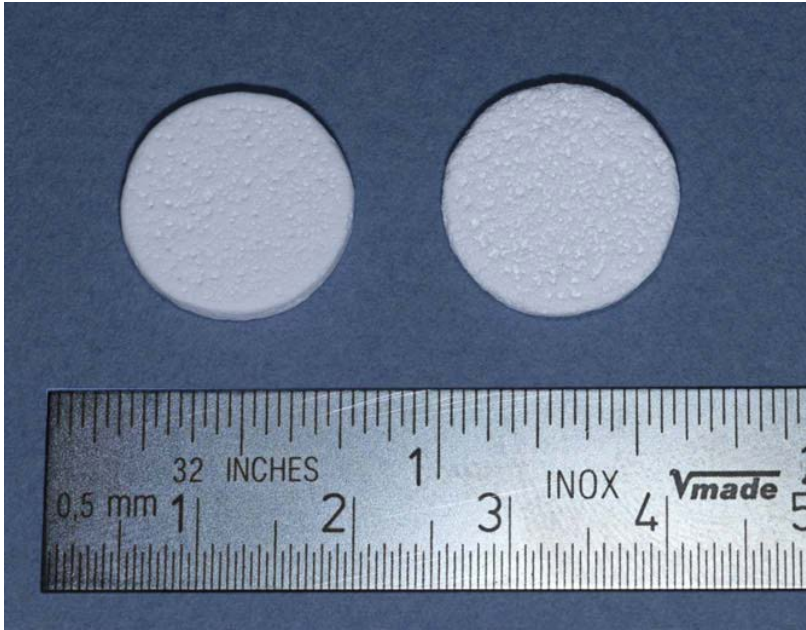


Abb. 2: Zellkulturträger aus Bruschit (links) und Monetit (rechts). Die Unterschiede in der Porosität sind bereits makroskopisch sichtbar.

2.4 Zellkulturtechnik

2.4.1 Nährmedien, Zusätze und Puffer

MEM α -Medium

Fertiges Flüssigmedium (ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside, mit L-Glutamin, GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe), dem 10% FCS und 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung beigemischt wurden. Die Lagerung fand bei 4 °C statt. Es diente als Nährmedium für die MC3T3-E1-Zellen.

FCS

Fetales Kälberserum (steril filtriert, PAN, Aidenbach). Es wurde nach Aliquotierung in 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei -20 °C gelagert. Nach 30minütiger Inaktivierung im Wasserbad bei 56 °C wurde es dem MEM α -Medium in einer 10%igen Konzentration [v/v] beigefügt.

Penicillin-/Streptomycin-Lösung

10 mg Streptomycin und 10.000 Units Penicillin je 100 ml enthaltende, gebrauchsfertige Antibiotikalösung (steril filtriert, PAN, Aidenbach), die bei -20 °C gelagert wurde. Sie wurde dem MEM α -Medium in 1%iger Konzentration zugesetzt [v/v].

DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered Saline) - Puffer

Zum Entfernen von Mediumresten aus Zellkulturflaschen und zum Reinigen und Spülen von Zellkulturen verwendeter, gebrauchsfertiger Puffer (ohne Mg^{2+} , ohne Ca^{2+} , steril filtriert, PAN, Aidenbach).

Accutase

Zum Ablösen von Zellen aus Zellkulturgefäßen und von Trägermaterialien verwendete gebrauchsfertige Lösung (in DPBS mit 0,5 mM EDTA, PAA, Cölbe). Accutase besitzt Protease- und Kollagenase-Aktivität. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Steril filtrierte, bei -20°C gelagerte Lösung zur Herstellung des Einfriermediums (Sigma, Taufkirchen).

2.4.2 Materialien und Geräte

Materialien:

Natriumlaurylsulfat	SDS Ultra Pure (Roth, Karlsruhe)
Universalreiniger	Extran MA 03 alkalisch (Merck, Darmstadt)
Isopropanol	99,9% (Roth, Karlsruhe)
Petrischalen	Falcon-Standard-Petrischale, Polystyrol, Durchmesser: 35 und 100 mm (Becton Dickinson, Heidelberg)
Kulturflaschen	Easy Flask, 200 ml (Hartenstein, Würzburg)

Zentrifugenröhrchen	50 ml, Polypropylen, Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg)
Pipettenspitzen	Hartenstein, Würzburg
Kryo-Röhrchen	2 ml, Polypropylene (Hartenstein, Würzburg)
Zählröhrchen	Hartenstein, Würzburg
Mikrotiterplatten	24 well und 96 well, Polystyrol (Costar)
Neutralrot	0,5%ige Lösung in Acetatpuffer, pH 5,2 (Sigma, Steinheim)
Glycerogelatine	Sigma, Steinheim

Geräte:

Brutschrank	HERACell (Heraeus, Hanau)
Sterilbank	HERASafe KS 12 (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge	Universal 320R (Hettich, Tuttlingen)
Photometer	Tecan Rainbow, Software: easy WIN basic (Tecan, Crailsheim)
Lichtmikroskop	Olympus CK 40 (Olympus, Hamburg)
Elektronenmikroskop	FEI, Quanta 200, Tschechische Republik
Pipetten	Research (Eppendorf, Hamburg),
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 102 H (Bandelin, Berlin)

2.4.3 Zellkultivierung auf den Monetit-, Titan- und Kupfer-Scaffolds

Ernten und Einfrieren von Zellen

Das Einfriermedium wurde hergestellt aus 90% Nährmedium sowie 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, steril filtriert, Sigma, Taufkirchen) und in 50 ml-Zentrifugenröhrchen bei -20 °C gelagert. Das Medium wurde vollständig abgesaugt, die Zellkulturen einmal mit PBS gespült, mit Trypsin überschichtet und 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen

mit 10 ml Nährmedium überführt und zentrifugiert (1000 min^{-1} , 5 min, Raumtemperatur). Nach Abnehmen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des Sedimentes in 10 ml Nährmedium und erneutes Zentrifugieren (Waschvorgang). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1 ml Nährmedium aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 ml Einfriermedium wurden die Kryo-Röhrchen zunächst in einer Isopropanol-Box bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für ein bis zwei Wochen vorgekühlt und anschließend in einem Flüssigstickstofftank ($-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert.

Auftauen von Zellen

Verwendung fanden nur Zellen, die nicht länger als ein Jahr bei $-196 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert waren. Die aufzutauenden Kryo-Röhrchen wurden vom Flüssigstickstoff in ein $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ Wasserbad überführt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde dann in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben, 10 ml Nährmedium zugefügt und zentrifugiert (1000 min^{-1} , 5 min, Raumtemperatur). Nach einem Waschvorgang zur Eluierung des restlichen Einfriermediums wurden die Zellen resuspendiert und nach einer Zellzählung zum Anlegen neuer Kulturen verwendet.

Zellzählung

Die Konzentrationsbestimmung von Zellsuspensionen erfolgte mit dem „CASY 1 Cell-Counter and Analyzer System, Modell TTC“ (Schärfe Systeme, Reutlingen). Die Zellen wurden in einem schwachen Elektrolyten (Aqua isotona III, Beckman Coulter, Krefeld) suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine $150 \text{ }\mu\text{m}$ -Messkapillare gesaugt. Die Bestimmung erfolgte nach den Prinzipien der Widerstandsmessung (intakte Zellen fungieren als elektrische Isolatoren) und Pulsflächenanalyse. Es wurde ein Messbereich zwischen 0 und $30 \text{ }\mu\text{m}$ vorgewählt und das Messfenster für lebende Zellen, orientierend an der Normalverteilung der Zellgröße, zwischen $12 \text{ }\mu\text{m}$ und $30 \text{ }\mu\text{m}$ festgelegt. Je Probe wurden automatisch vier Einzelmessungen mit Volumina von je $200 \text{ }\mu\text{l}$ durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet. Mittels Auswertungssoftware „CASYstat“ (Schärfe Systeme, Reutlingen) wurde der Verdünnungsfaktor eingerechnet und die Zellzahl pro 1 ml unverdünnter Suspension angegeben.

Aussaat und Kultivierung

Als Zellkultur für die *in vitro*-Studie wurde eine murine Fibroblasten-Linie MC3T3-E1 (DSMZ, Braunschweig) verwendet, welche Potenz zur osteogenen Differenzierung aufweist. Diese wurde aus fetalen Mäusecalvariae isoliert und ist immortal [36, 60]. Die Zellen wurden in Standard-24-Well-Platten kultiviert. Die Zellkulturträger (Monetit, Titan und Kupfer) waren so dimensioniert, dass sie möglichst passgenau den Boden der 24-Well-Platten bedeckten. Dabei dienten die Titanträger bei bekannter Zytokompatibilität als Positivkontrolle. Die Kupferträger dienten bei bekannter Zytotoxizität als Negativkontrolle [25, 57, 59]. Die Geometrie entsprach weitestgehend denen der Monetit-Träger (Durchmesser: 15 mm, Dicke: 1 mm). Die Herstellung erfolgte durch Stanzen von Reintitan- und Kupferblechen.

Die Aufbereitung der Kontrollträger erfolgte durch schrittweises Einlegen für jeweils 10 Minuten im Ultraschallbad bei 40 °C in 20%ige Natriumarylsulfat-Lösung, 5%ige Extranlösung und 99,9%ige Isopropanollösung. Zwischen jedem Reinigungsbad wurden die Träger 10 Minuten mit Reinstwasser gewaschen. Abschließend wurden sie getrocknet und für 2 Stunden bei 134 °C autoklaviert.

Die gefrorenen Zellpellets wurden nach dem Auftauen mit PBS gewaschen und in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension nach Zellzählung auf eine Konzentration von 5×10^4 /ml verdünnt. Die 24-Well-Platten wurden jeweils mit 1 ml Zellsuspension beimpft und insgesamt 12 Tage im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Nährmedium wurde an Tag 3, 5, 7, 9 und 12 gewechselt. Im Anschluß an die pH-Messung im verbrauchten Medium wurde selbiges bis zur Elektrolytbestimmung eingefroren.



Abb. 3: 24-Well-Platte mit Monetit-Scaffolds (links) sowie Kontrollträgern aus Titan (mittig) und Kupfer (rechts), jeweils bedeckt mit Kulturmedium.

2.5 Bestimmung der Zellviabilität mittels WST-1-Assay

Als Nachweis für das Vorhandensein vitaler Zellen auf den Scaffolds diente der WST-1-Assay. Bei WST-1 (4-[3-(Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) handelt es sich um ein rotes Tetrazolium-Salz. Es wird durch das mitochondriale Enzym NADH-Dehydrogenase zu gelbem Formazan reduziert. Dieser Farbumschlag erlaubt eine fotometrische Quantifizierung der Enzymaktivität (Absorptionsmaximum von Formazan bei 450 nm) [48]. Da die Anzahl vitaler Zellen einer Kultur proportional zur Menge des gebildeten Formazans ist, kann man von der Extinktion auf die Viabilität einer Zellkultur bzw. indirekt auf die Anzahl metabolisch aktiver Zellen schließen.

Das alte Medium wurde abgesaugt und 1000 µl frisches Medium und 50 µl WST-1-Reagenz (gebrauchsfertig in PBS gelöst, Roche Diagnostics, Mannheim) in die Wells gegeben. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde im Brutschrank. Um eine gute Durchmischung des gebildeten Formazans mit dem Medium zu gewährleisten, wurden die 24-Well-Platten für eine Minute auf ein Schüttelgerät gegeben. Anschließend wurden je 2-mal 100 µl der Lösung auf eine 96-Well-Platte pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 440 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt (Zweifachbestimmung). Bei jeder Messung wurde der Leerwert

mitbestimmt (Wells ohne Zellen, mit Trägerstruktur, 1000 µl Medium, 50 µl WST-1-Reagenz) und von den Messwerten subtrahiert.

2.6 Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP)

Die Alkalische Phosphatase ist ein membranständiges Enzym, welches in der Lage ist, Phosphorsäureester zu hydrolysieren. Es können beim Menschen verschiedene, teils gewebespezifische Isoenzyme differenziert werden. Im Knochengewebe lassen sich drei osteoblastäre Isoformen nachweisen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisation. *In vitro* ist die AP ein typischer Marker der osteoblastären Differenzierung und wird von osteoblastären Zellen bereits in einer frühen Phase der Zellkultur gebildet.

Auch die Aktivität der Alkalischen Phosphatase lässt sich photometrisch bestimmen. Dabei wird der Umsatz von p-Nitrophenylphosphat und Wasser zu p-Nitrophenol und Phosphat gemessen. Diese Reaktion führt zu einer Gelbfärbung der Lösung, die sich bei einer Wellenlänge von 405 nm (= Absorptionsmaximum von p-Nitrophenol) fotometrisch quantifizieren lässt. Dabei gilt: Je größer die Enzymmenge ist, desto stärker sind auch der Gelbumschlag und die Extinktion. Zur Bestimmung der AP-Aktivität einer Zellkultur wurde eine Standard-Eichgerade herangezogen, welche mit ansteigenden Konzentrationen von p-Nitrophenol-Lösungen (0 bis 200 mM) erstellt wurde.

Die bei -20 °C eingefrorenen Zellpellets wurden aufgetaut, in 1000 µl PBS resuspendiert und gevortext. Jeweils 200 µl der Zellsuspension wurden in ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt, mit 400 µl des zuvor angesetzten Lysepuffers gemischt und danach für 1 h bei 37 °C auf einem Schüttelgerät (GLW, Würzburg) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Beifügen von 400 µl 50 mM NaOH beendet. Nach Abzentrifugieren von Zellfragmenten (5 min, 11000 min⁻¹, RT, Heraeus Biofuge 13) folgte die fotometrische Messung der optischen Dichte (Gelbfärbung) bei einer Wellenlänge von 405 nm auf 96-well Mikrotiterplatten (Zweifachbestimmung mit 2x200 µl). Bei jeder Messung wurde eine Leerwertbestimmung durchgeführt, dabei wurden 200 µl PBS statt des Zell-Lysats verwendet. Die entsprechenden Leerwerte wurden von den Messwerten abgezogen.

Lysierungspuffer: 2 mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Merck, Darmstadt) gelöst in
0,75 M 2-Amino-2-Methyl-1-propanol (Sigma, Taufkirchen)

2.7 Bestimmung von Osteocalcin

Bei Osteocalcin handelt es sich um ein von Osteoblasten synthetisiertes Peptidhormon. Dieses besitzt die Fähigkeit, an die extrazelluläre nichtkollagene Knochenmatrix zu binden. Durch die Bindung von Calciumionen an γ -Carboxyglutamylreste kann es die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen einleiten. Osteocalcin ist ein Marker der fortgeschrittenen osteoblastären Differenzierung.

Der Osteocalcin-Nachweis erfolgte aus dem Zellkulturmedium, welches im Rahmen der Mediumwechsel alle 2 Tage asserviert wurde. Dazu wurden jeweils 500 μ l Medium aus den Wells abpipettiert, in Probengefäße überführt und bei -20 °C für 2-3 Wochen bis zur gemeinsamen Messung gelagert. Die Osteocalcin-Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines gebrauchsfertigen ELISA-Kit (Metra Osteocalcin Kit Osteomedical GmbH, Bünde).

Zunächst wurde mit Hilfe der im Kit enthaltenen Standards und der Kontrollwerte eine Standardkurve entsprechend der Herstellerangabe erstellt.

Zur Bestimmung der Osteocalcinkonzentrationen wurden je 25 μ l des Zellkulturmediums in 2 Wells (Doppelbestimmung) einer 96 Mikrotiterplatte pipettiert. Außerdem wurden Leerwertbestimmungen mit Zellkulturmedium durchgeführt.

Die Wells wurden anschließend mit je 25 μ l der im Kit enthaltenen Osteocalcin-Standards mit aufsteigenden Osteocalcinkonzentrationen (0, 4, 8, 16, 32, 100 ng/ml) beschickt. Außerdem wurden je 2 weitere Wells mit den im Kit enthaltenen Osteocalcinkontrollen (Konzentration zwischen 4, 7 - 11,5 ng/ml bzw. 20,2-30,4 ng/ml) befüllt. Anschließend wurden 125 μ l anti-Osteocalcin Antikörper zugegeben und die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit je 200 μ l Waschpuffer, der zuvor in einem Verhältnis von 1:10 mit destilliertem Wasser angesetzt wurde. Es folgte die Zugabe von je 150 μ l Enzymkonjugat und eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h. Nach dreimaligem Waschvorgang und Zugabe der p-Nitrophenylphosphatlösung folgte eine weitere Inkubation für 35-40 min. Um die Reaktion zu beenden, wurden je 50 μ l

20%ige NaOH in die Wells gegeben. Die Bestimmung der optischen Dichte erfolgte dann bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.8 Chemische Analyse des Zellkulturmediums

Zur Abschätzung der Löslichkeit des Monetit-Trägermaterials unter Zellkulturbedingungen wurde das verbrauchte Zellkulturmedium bei jedem Mediumwechsel gesammelt. Das Medium wurde bei -20 °C gelagert. Nach Abschluß der Versuchsreihen wurde zur Bestimmung des pH-Wertes sowie der Konzentration an freien Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen das asservierte Medium wieder aufgetaut. Die Messung des pH-Wertes wurde mit einem pH-Meter (Level 1 WTW, Weilheim; Elektrode ebenfalls WTW, Weilheim) durchgeführt. Die Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen-Konzentration wurde mittels ionenselektiver Elektroden (Perkin Elmer) im Zentrallabor des Institutes für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg gemessen.

2.9 Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie

Um das Zellwachstum und die Zellmorphologie zu dokumentieren, wurden während der Kultivierung von 12 Tagen die Monetit-Träger mit einem Lichtmikroskop untersucht. Dazu wurden die zelltragenden Monetit-Scaffolds nach zweimaligem Waschen mit 2 ml PBS für 30 Sekunden in Fixierlösung fixiert und mehrmals mit Aqua dest. gespült. Es folgten die Zugabe von 1 ml Färbeansatz und die 15-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte wiederholtes Spülen mit Aqua dest. und Gegenfärbung mit 1 ml Neutralrot. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. wurde die Eindeckung mit Glycerogelatine und einem Deckgläschen durchgeführt. Es folgte die fotografische Dokumentation der Färbeergebnisse.

Außerdem wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. Dazu wurden die Zellen mit PBS gespült und mit kaltem Glutaraldehyd fixiert. Nach vier weiteren Spülvorgängen mit PBS wurden die Zellen mit Aceton ansteigender Konzentration schrittweise dehydriert und nach einer kritischen Punkttrocknung mit Gold bedampft.

Materialien und Geräte:

Lichtmikroskop	Olympus CK 40 (Olympus, Mikroskopie, Hamburg)
Fixierlösung:	25 ml Citratlösung (Sigma Diagnostics, Taufkirchen) 65 ml Aceton (Merck, Darmstadt) 8 ml Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
Färbeansatz (Sigma):	500 µl alkalische FRV-Lösung 500 µl Natriumnitrit-Lösung 22,5 ml Aqua dest. 500 µl alkalische Naphtol AS-BI-Lösung
Neutralrot	0,5%ige Lösung in Acetatpuffer, pH 5,2 (Sigma, Steinheim)
Elektronenmikroskop	FEI, Quanta 200, Tschechische Republik
Glutaraldehyd	6% in PBS (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Aceton	30%, 50%, 75%, 90% und 100% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Kritische Punkttrocknung	CPD 030 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein)
Goldbedampfung	K550 (EMITECH, Kent, UK)

2.10 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm „SPSS 14.0.1“ (SPSS Inc., Chicago, USA). Bei normal verteilten Daten wurde die einfache Anova-Analyse angewandt. Bei den Daten ohne Normalverteilung wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Zytokompatibilität eines im 3-D-Pulverdruckverfahren hergestellten Scaffolds aus anhydriertem Calciumhydrogenphosphat (Monetit) *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurde das Proliferations- und Differenzierungsverhalten der mesenchymalen Zelllinie MC3T3-E1 betrachtet. Als Parameter dienten die Viabilität der Zellkulturen sowie die Expression typischer osteoblastärer Markerproteine über einen Zeitraum von 12 Tagen. Darüber hinaus sollten die Konzentration freier Elektrolyte sowie der pH-Wert im verbrauchten Kulturmedium untersucht werden, um das Hydrolyseverhalten der Scaffolds im physiologischen Milieu abschätzen zu können.

4 Ergebnisse

4.1 Zellviabilität (WST-1)

In den Monetitkulturen zeigte sich eine kontinuierliche Zunahme der Zellviabilität, jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau als in der Positivkontrolle (Titanträger). Die fotometrisch bestimmte Absorption lag im Mittel 31% unter der von Titan am 12. Tag.

Bei der Bestimmung der Zellvitalität und Zellproliferation mittels des WST-1-Assay wurde auf den Titanträgern eine stetige Zunahme über einen Zeitraum von 12 Tagen ermittelt. Jedoch war diese nicht linear, sondern zeigte an Tag 7 ein höheres Niveau als an Tag 9 und 12.

Aufgrund der Zytotoxizität der Negativkontrolle (Kupfer) war kein wesentlicher Anstieg der Zellviabilität über die gesamte Kultivierungsdauer zu verzeichnen. Sie lag an Tag 12 etwa bei 24% im Vergleich zu Monetit und bei 8% im Vergleich zu Titan (siehe Abbildung 4).

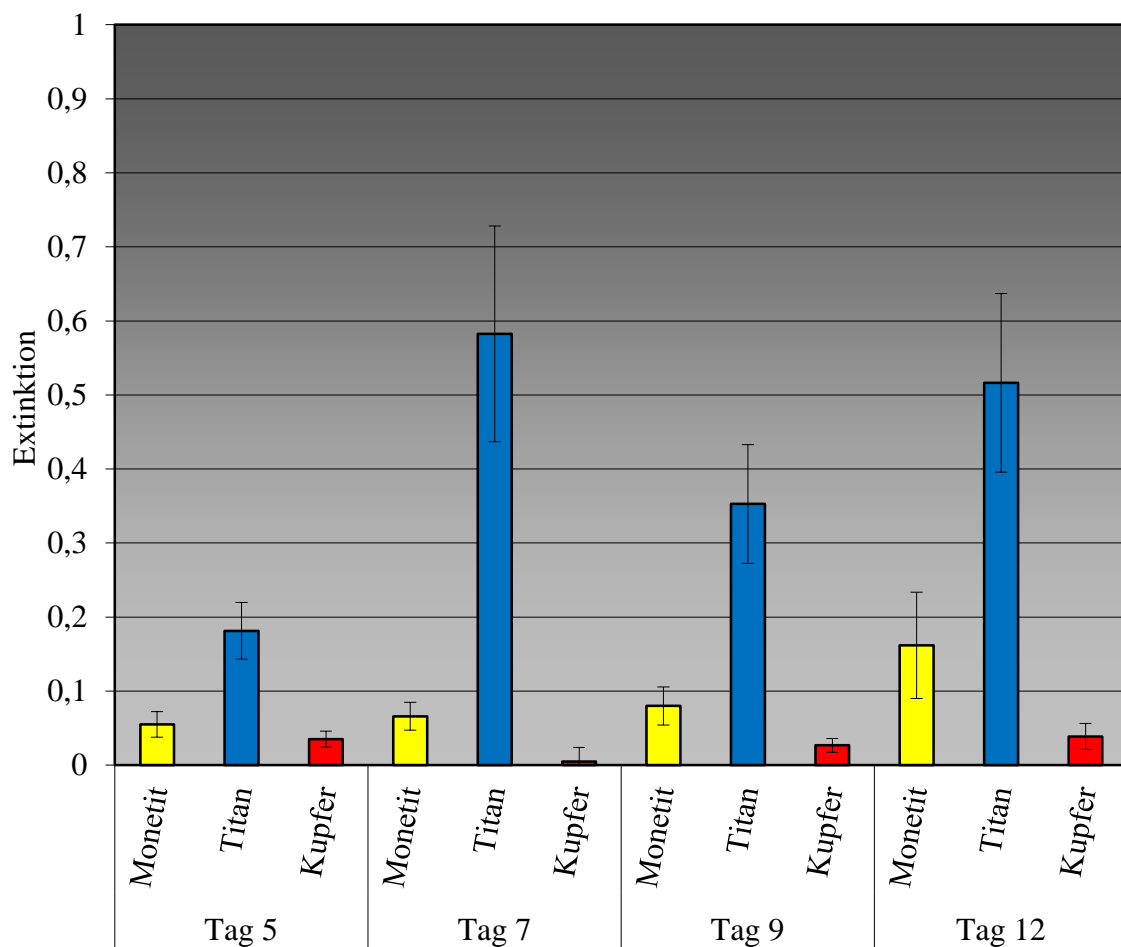


Abb. 4: Extinktion als Maß für die Zellviabilität (WST-1). Mittelwert von $n = 24 \pm 1$ SD. Die Unterschiede zwischen Monetit und den Kontrollen (Titan bzw. Kupfer) waren jeweils signifikant ($p < 0,05$).

4.2 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Auf den Titanträgern zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Enzymaktivität bis zum 9. Tag, anschließend kam es zu einem Abfall an Tag 12.

Auch auf den Monetitträgern ließ sich eine stetige Zunahme der Enzymaktivität bis zum 12. Tag nachweisen, sie blieb jedoch stets signifikant unter dem Niveau der Positivkontrolle. Im Vergleich zu Titan lag die gemessene Aktivität im Monetitansatz am Tag 12 bei 42%. Bis Tag 9 war die Aktivität der alkalischen Phosphatase unter der Nachweisgrenze.

In den Kulturen der Negativkontrolle Kupfer konnte zu keinem Zeitpunkt AP-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5).

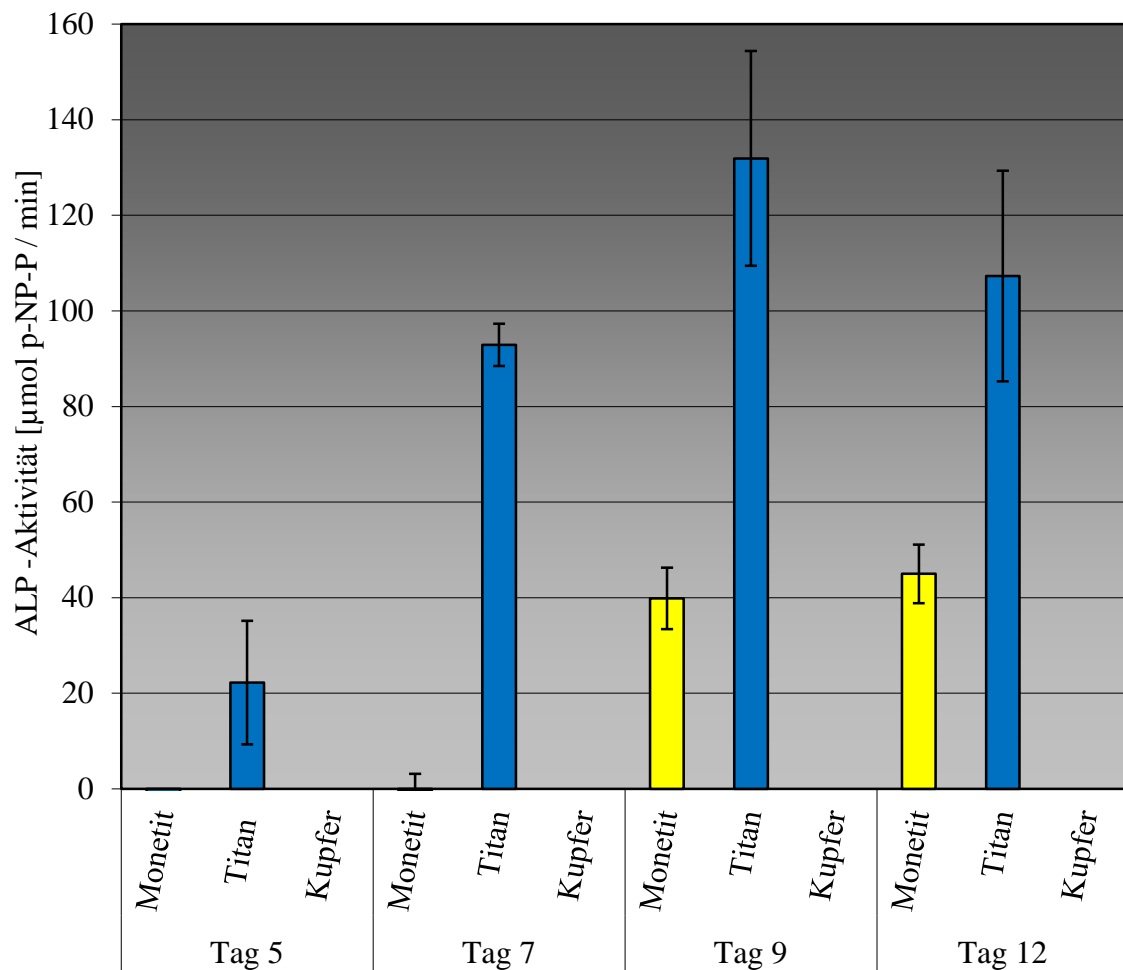


Abb. 5: Aktivität der alkalischen Phosphatase als Maß für die zunehmende osteoblastäre Differenzierung der MC3T3-E1-Kulturen. Mittelwerte von $n = 24 \pm 1$ SD. Die Unterschiede zwischen Monetit und Kontrollen (Titan bzw. Kupfer) waren jeweils signifikant ($p < 0,05$).

4.3 Osteocalcinnachweis

Aufgrund des fehlenden Zellwachstums erfolgte in den Kupfer-Kontrollkulturen keine Osteocalcinbestimmung. In den beiden anderen Gruppen (Monetit und Titan) wurden über den Verlauf von 12 Tagen jeweils gleichbleibende Werte ermittelt. Dabei betragen die Messwerte der Monetitkulturen stets 60-65% der Messwerte der Titankontrollen. Da diese Ergebnisse sehr auffällig waren und zunächst nicht erklärt werden konnten, wurde im Nachgang eine Osteocalcin-Bestimmung im reinen Nährmedium (MEM α -Medium, 10% FCS und 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung) ohne Zellen und ohne

Trägermaterial vorgenommen. Die hierbei gemessenen Werte lagen im Bereich der Messungen in den Titankulturen (siehe Abbildung 6).

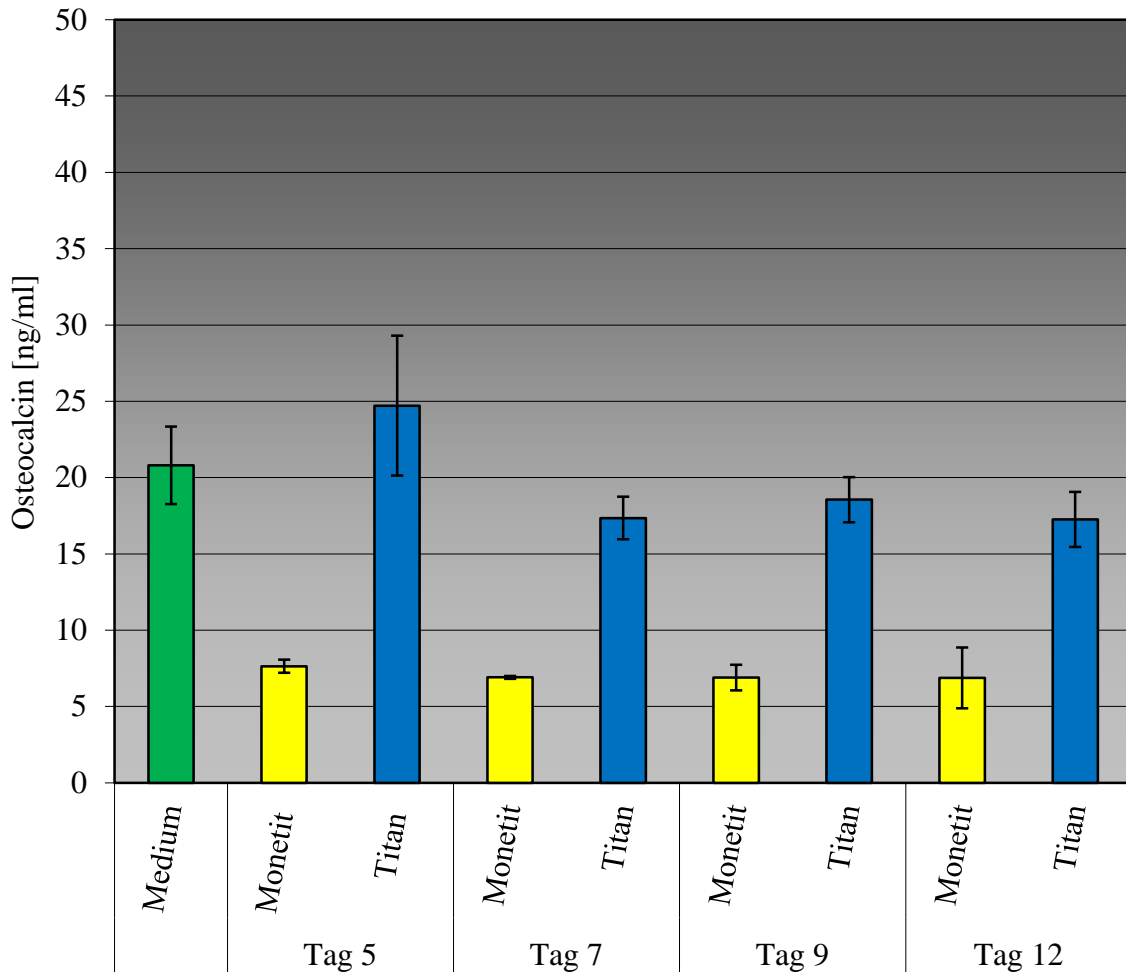


Abb. 6: Konzentration von Osteocalcin im frischen Kulturmedium (grün: keine Träger, keine Zellen) sowie im verbrauchten Medium der Monetit- und Titankulturen. Mittelwerte von $n = 24 \pm 1$ SD. Es zeigten sich weitestgehend gleichbleibende Meßwerte im zeitlichen Verlauf. Bei den Titan-Kulturen lagen diese in der Größenordnung des frischen Nährmediums, bei der Monetitkultur signifikant darunter ($p < 0,05$).

4.4 Chemische Analyse des asservierten Kulturmediums

4.4.1 pH-Wert

Die gemessenen pH-Werte im Kulturmedium der beiden Kontrollgruppen Titan und Kupfer zeigten keine signifikanten Unterschiede zum pH-Wert des frischen Kulturmediums. Im Mittel konnte im Medium der Titanträger ein pH-Wert von 7,96, der Kupferträger von 8,06 und im frischen Kulturmedium von 8,00 gemessen werden. Im Medium der Monetitkulturen war der pH-Wert zu Beginn der Kultivierung mit 7,63 zunächst signifikant erniedrigt. Im weiteren Verlauf der Kultivierung stieg er auf ein normales Niveau von pH 7,99 an Tag 12 an. Stärkere Schwankungen des pH-Wertes bzw. unphysiologische Veränderungen waren nicht zu beobachten (siehe Abbildung 7).

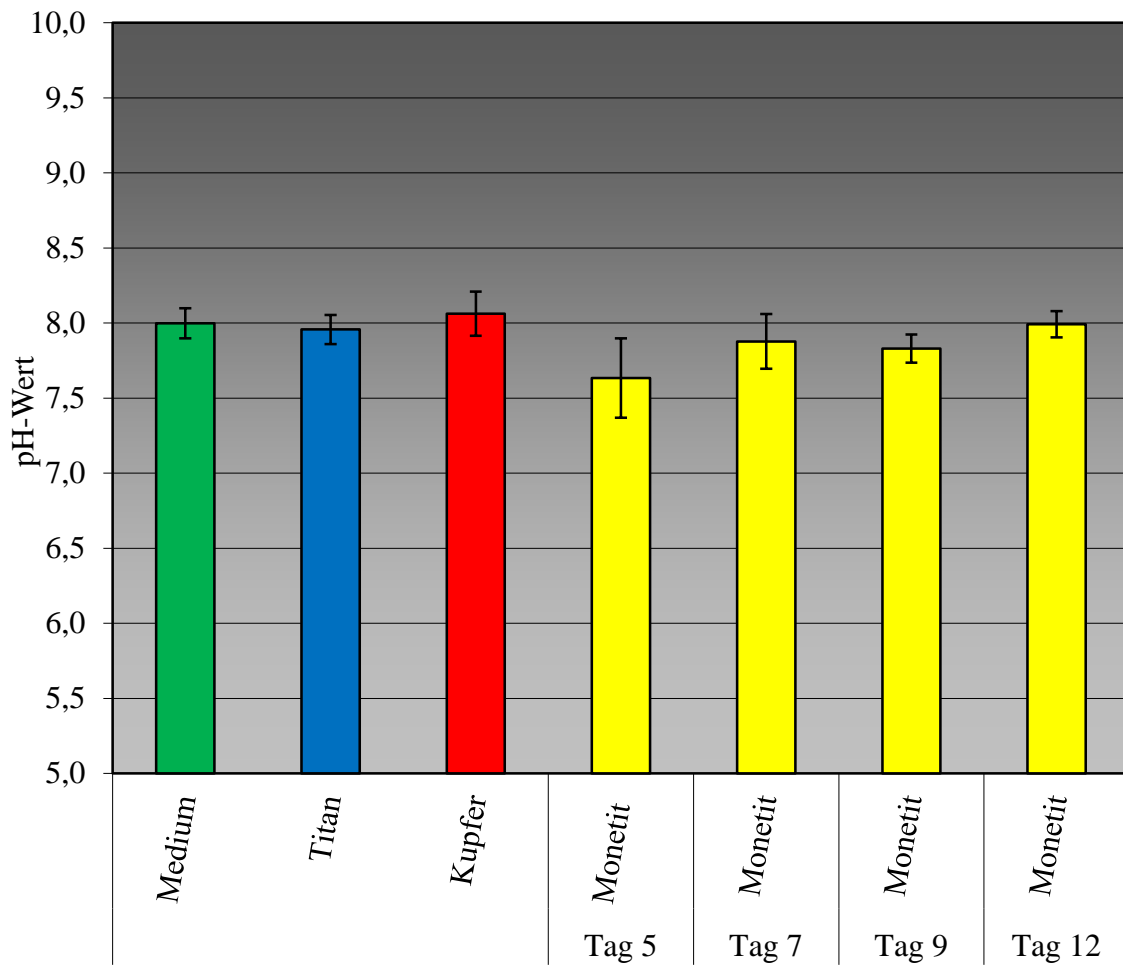


Abb. 7: Darstellung der pH-Werte im frischen Kulturmedium (grün: keine Träger, keine Zellen) sowie im verbrauchten Medium der Zellkulturen auf den Monetit-, Kupfer- und Titanscaffolds. Mittelwert von $n = 24 \pm 1$ SD. Die Werte in den Titan- und Kupferkulturen waren konstant und sind deshalb nur einfach dargestellt. Am 5. Tag zeigte sich ein signifikant reduzierter pH-Wert in den Monetitkulturen ($p < 0,05$), der sich im weiteren Verlauf an den pH-Wert des frischen Mediums bzw. des Mediums der Titankulturen annäherte.

4.4.2 Calcium-Ionenkonzentration

Es wurden die Konzentrationen der freien Ca^{2+} -Ionen in frischem Nährmedium und im verbrauchten Medium der Titan-, Kupfer- und Monetitkulturen gemessen. In den Monetitkulturen wurde gegenüber den drei anderen Gruppen eine signifikant niedrigere Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen. Bei letzteren lagen die Ca^{2+} -Konzentrationen im gleichen Bereich. Auffällig war weiterhin ein kontinuierlicher Anstieg der Ca^{2+} -

Konzentration im Medium der Monetitkulturen während des Versuchsverlaufs von 39% an Tag 5 auf 54% an Tag 12. Im Gegensatz hierzu zeigten die Kulturmedien der anderen zwei Versuchsgruppen keinerlei Veränderung im Verlauf (siehe Abbildung 8).

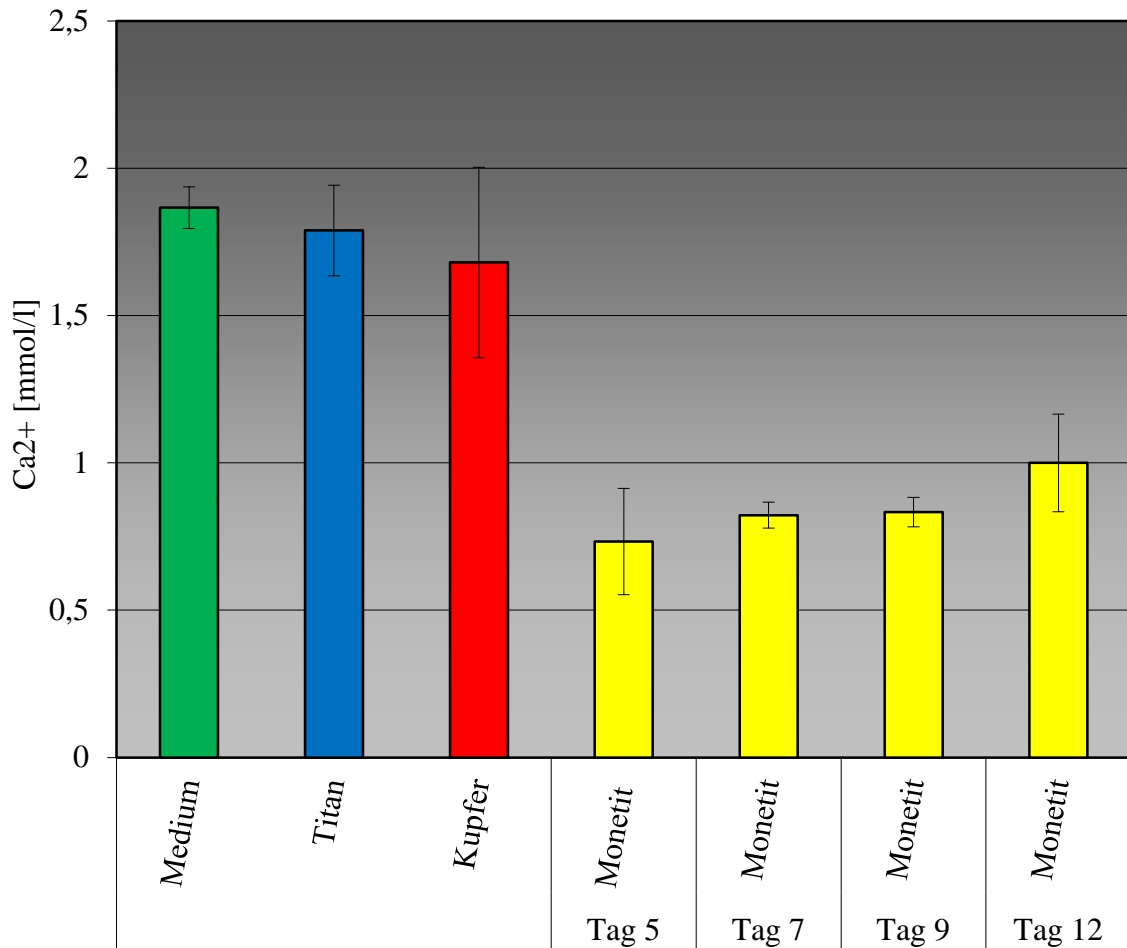


Abb. 8: Darstellung der Konzentration freier Ca²⁺-Ionen im frischen Medium sowie im verbrauchten Kulturmedium der Zellkulturen auf den Monetit-, Kupfer- und Titanscaffolds. Mittelwert von $n = 24 \pm 1$ SD. Die Werte in den Titan- und Kupferkulturen waren konstant und sind deshalb nur einfach dargestellt. Es zeigte sich eine im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant reduzierte Ca²⁺-Ionen-Konzentration der Monetitkulturen ($p < 0,05$), die im zeitlichen Verlauf jedoch ansteigend war.

4.4.3 Phosphat-Ionenkonzentration

Es wurden die Konzentrationen der freien PO_4^{3-} -Ionen in frischem Nährmedium und im asservierten Medium der Titan-, Kupfer- und Monetitkulturen gemessen. Dabei war die Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen im Monetitmedium im Vergleich zu den Kontrollmedien (Titan und Kupfer), sowie im Vergleich zu frischem Nährmedium signifikant erhöht. Die PO_4^{3-} -Ionen-Konzentration lag im frischen Medium im Mittel bei 1,11 mmol/l. Die Konzentrationen im Titan- und Kupfermedium waren im Verlauf nahezu konstant und lagen im Mittel bei 1,02 mmol/l (Titan) und 0,91 mmol/l (Kupfer). Es zeigte sich über die Kultivierungsdauer eine kontinuierliche Abnahme der PO_4^{3-} -Konzentration im Monetitmedium von 250% an Tag 5, bis auf 177% an 12. Tag. Die Konzentrationen in den zwei Kontrollgruppen blieben konstant (siehe Abbildung 9).

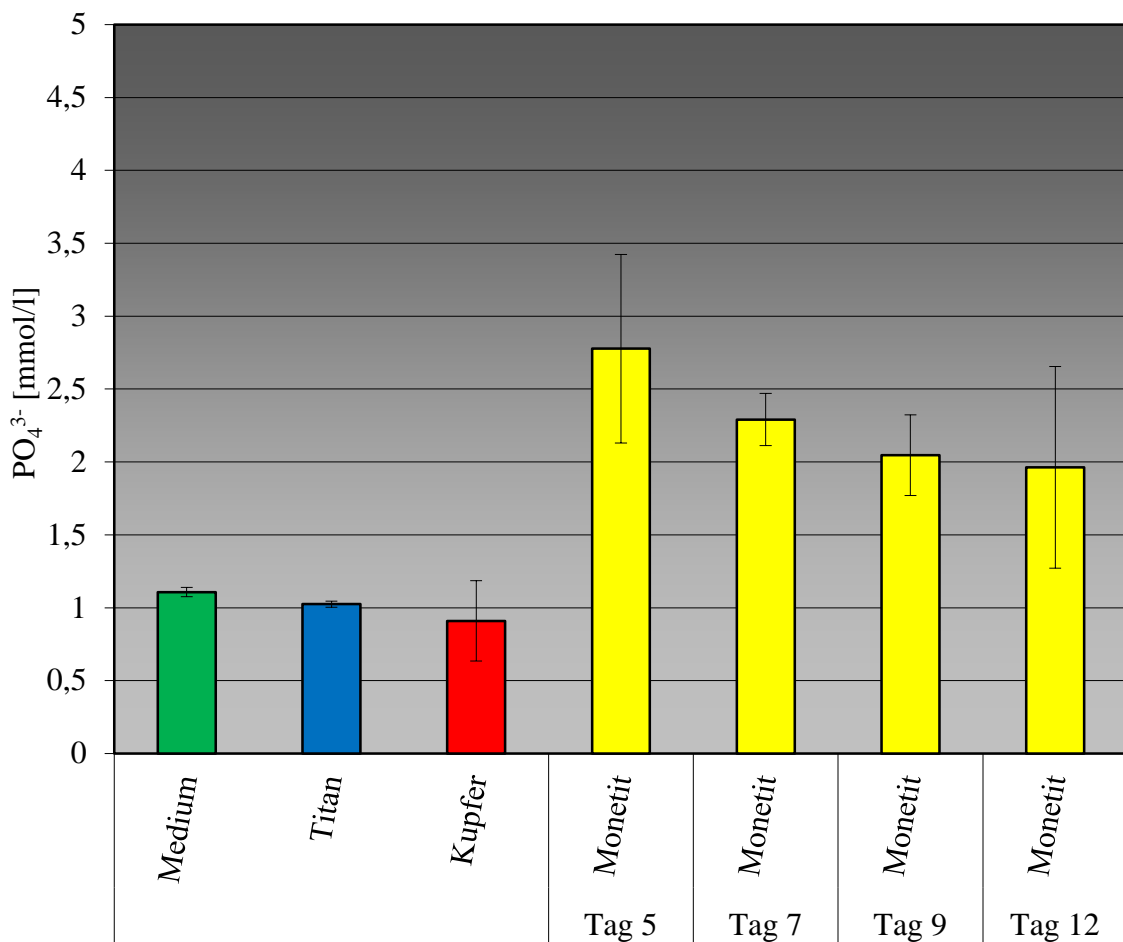


Abb. 9: Darstellung der Konzentration freier PO₄³⁻-Ionen im frischen Medium sowie im verbrauchten Kulturmedium der Zellkulturen auf den Monetit-, Kupfer- und Titanscaffolds. Mittelwerte von $n = 24 \pm 1$ SD. Die Werte in den Titan- und Kupferkulturen waren konstant und sind deshalb nur einfach dargestellt. Es zeigte sich eine im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöhte PO₄³⁻-Ionenkonzentration der Monetitkulturen ($p < 0,05$), die im zeitlichen Verlauf jedoch abfallend war.

4.5 Licht- und Rasterelektronenmikroskopie

Zur orientierenden Darstellung des Zellwachstums auf den Monetit-Trägern wurden im Verlauf der 12 tägigen Kultivierung lichtmikroskopische Kontrollen nach Anfärben der Zellen mit Neutralrot durchgeführt. Nach 12 Tagen zeigte sich ein mäßig dichter Zellrasen auf den Scaffolds, wohingegen bei den Titan-Trägern bereits makroskopisch ein dichter zellulärer Film zu erkennen war. Lichtmikroskopische Darstellungen waren

aufgrund der fehlenden Transluzenz der Kontroll-Träger nicht möglich. Der visuelle Eindruck der Zelldichte im Rahmen der Lichtmikroskopie ließ sich mit den Ergebnissen aus dem WST-1-Zellviabilitätstest in Einklang bringen. Jedoch war aufgrund der Dreidimensionalität der Monetit-Träger eine Quantifizierung der Zellen nicht möglich, da diese in multiplen Fokusebenen lagen (siehe Abbildung 10).

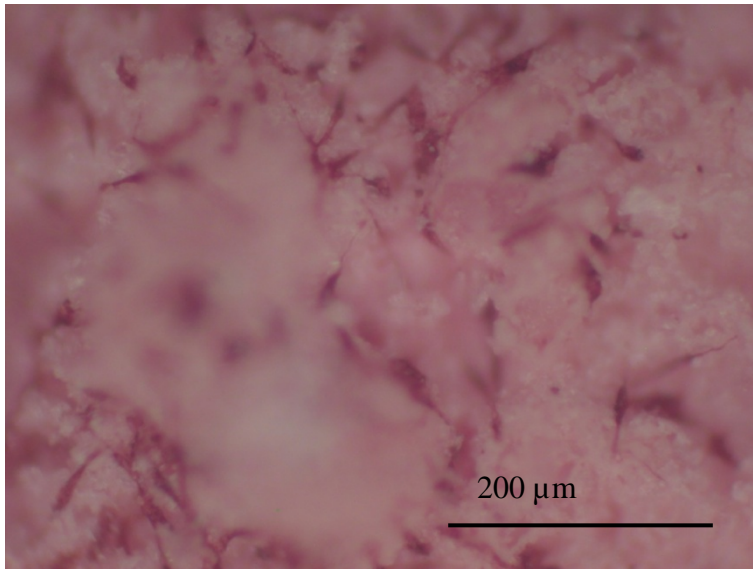


Abb. 10: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Monetit-Scaffolds bei 20-facher Vergrößerung nach einer Kultivierung von 7 Tagen und Färbung mit Neutralrot. Es lassen sich Zellen mit osteoblastärer Morphologie sowie die poröse Struktur des Kulturträgers erkennen.

Zur genaueren Darstellung der Zellmorphologie bzw. der besiedelten Scaffoldoberfläche wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Hierbei ließen sich detailliertere Eindrücke von der Rauigkeit des Trägermaterials sowie von der typischen osteoblastären Zellmorphologie gewinnen (siehe Abbildung 11 und 12).

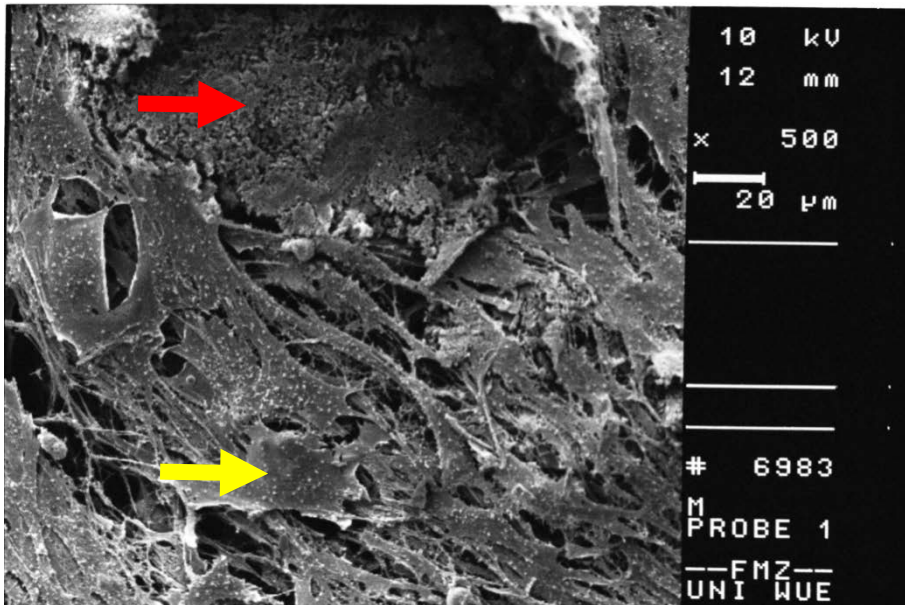


Abb. 11: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (500-fache Vergrößerung) eines Monetit-Scaffolds nach einer Kultivierung von 9 Tagen. Neben den adhärennten Zellen (gelber Pfeil), ist auch die raue Oberflächenstruktur der Scaffolds (roter Pfeil) gut zu erkennen.

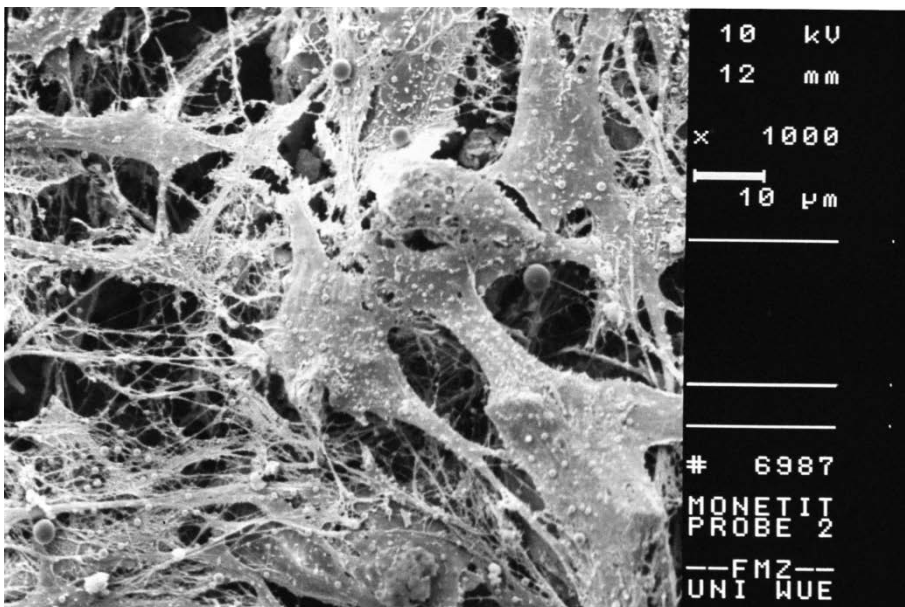


Abb. 12: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (in 1000-facher Vergrößerung) eines Monetit-Scaffolds nach einer Kultivierung von 12 Tagen. Es lässt sich ein dichter Rasen von Zellen mit typischer osteoblastärer Morphologie erkennen.

5 Diskussion

5.1 Knochenersatzmaterialien

Im Gebiet der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, aber auch in anderen Fachdisziplinen, besteht ein großer Bedarf an defektspezifisch präfabrizierten, alloplastischen Knochenimplantaten zur funktionellen und ästhetischen Rehabilitation. Autologer Knochen stellt zwar für viele Defektsituationen den Goldstandard dar, die Verfügbarkeit ist aber limitiert und die notwendige Entnahmeoperation besitzt eine häufig nicht unerhebliche Morbidität [14, 32]. Xenogene und allogene Knochenersatzwerkstoffe sind im Hinblick auf einen möglichen Pathogentransfer und immunologische Reaktionen nicht unbedenklich [38]. Daher gibt es große Bestrebungen, alloplastische Materialien zu entwickeln, die eine ähnliche therapeutische Breite wie autologer Knochen besitzen und dabei unbegrenzt verfügbar sind. Solche Implantate müssen je nach Indikation verschiedenste Aufgaben erfüllen. So soll im ersatzstarken Lager, wie beispielsweise ein Zystektomiedefekt im Kiefer, das Einwachsen von Weichgewebe in den Defekt verhindert werden und das Material gleichzeitig als osteokonduktive Matrix für den einsprossenden Knochen dienen. Dabei sollte das Implantat möglichst einen Verbund mit dem umgebenden Implantatlager eingehen, also bioaktiv sein. Gleichzeitig wäre es erforderlich, dass es in gleicher Geschwindigkeit durch Hydrolyse und Resorption degradiert wird, wie neuer Knochen entlang und im Implantatkörper gebildet wird. Außerdem wäre es wünschenswert, dass die Abbauprodukte als Substrat für die Knochensynthese dienen.

Bei anderen Defektklassen, z.B. Kalottendefekten nach Trauma, steht eher die Rekonstruktion des Volumens bzw. der äußeren Kontur, der Schutz des darunterliegenden Gewebes (Gehirn) und die Weichteilstütze im Vordergrund. Dies erfordert ein volumenstabiles und möglichst wenig degradierbares Material, zumal es sich bei dieser Defektregion um ein relativ ersatzschwaches Lager handelt.

Großes Potential im Hinblick auf die der jeweiligen Situation angepassten Materialeigenschaften besitzt die Substanzklasse der Calciumphosphate. Aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zur mineralischen Phase des Knochens haben sie schon jetzt einen hohen klinischen Stellenwert als Knochenersatzmaterial [3]. Dabei sind sie in unterschiedlichen Applikationsformen (Pulver, Granula, gesinterte Formkörper, *in situ*

härtende Zemente) verfügbar. Diese unterscheiden sich wesentlich in ihren Eigenschaften wie mechanischer Stabilität, Volumenstabilität, Degradierbarkeit und Ersatz durch Knochengewebe sowie der plastischen Anpassung an die Defektsituation. Keine dieser Applikationsformen kann alle Vorteile in sich vereinen. Hohe Stabilität geht dabei mit einer reduzierten Degradierbarkeit und dem Ersatz durch ein knöchernes Regenerat einher und umgekehrt. Zemente sind zwar im nicht kraftbelasteten Defekt ausreichend mechanisch stabil, die Modellierbarkeit stößt aber in der klinischen Anwendung bei geometrisch komplexen und großen Defekten an ihre Grenzen. Insbesondere für derartig große und geometrisch komplexe Defekte wäre ein präfabriziertes, defektspezifisches Implantat wünschenswert.

Mit dem 3D-Pulverdruck-Verfahren, einer etablierten Rapid-Prototyping-Technologie, lassen sich individuell gefertigte Konstrukte aus verschiedenen Calciumphosphatzementen, unter anderem aus Monetit, schnell und kostengünstig herstellen. Mit diesem Verfahren können anhand von CT- oder DVT-Datensätzen des Patienten die für den jeweiligen Defekt erforderlichen Implantate am Computer konstruiert (CAD) und anschließend passgenau fabriziert werden (CAM) [34].

Monetit stellt dabei aufgrund seiner Eigenschaften ein vielversprechendes Material dar. Es ist im physiologischen Milieu *in vitro* und *in vivo* gut degradierbar, ausreichend mechanisch stabil und porös [18]. Im Vergleich zu HA ist ein kompletter Abbau im physiologischen Milieu möglich. Im Gegensatz dazu kann HA lediglich osteoklastär degradiert werden. Diese säurekatalysierte Degradation ist somit auf die unmittelbare Kontaktfläche (Implantat-Osteoklast) beschränkt, findet also nur oberflächlich statt [41]. Bruschit ist grundsätzlich thermodynamisch gut löslich. Jedoch kommt es dabei *in vivo* zur Präzipitation von schwer löslichem HA. Daher ist Bruschit *in vivo*, im Vergleich zu Monetit, insgesamt weniger gut löslich [4], jedoch immer noch um Größenordnungen besser als HA.

Physiologisch findet sich Monetit während des Knochenheilungsprozesses im Frakturkallus und in der mineralischen Knochenphase [42, 46]. Seine gezielte Anwendung als Knochenersatzmaterial ist jedoch noch nicht sonderlich verbreitet [61].

5.2 Methodik und eigene Ergebnisse

Ziel der *in vitro* Studie war es, die Zytokompatibilität von im 3D-Pulverdruckverfahren hergestellten Matrizen aus Dicalciumphosphat Anhydrat (CaHPO_4 , Monetit) zu untersuchen. Zellkulturuntersuchungen von Materialien im Hinblick auf ihre Zytokompatibilität gelten als eine gut etablierte Methode und sind Grundvoraussetzung für *in vivo* Untersuchungen [29, 51].

Im Rahmen der Zellkulturversuche traten methodische Schwierigkeiten auf, die das Handling der ausgesiedelten Zellen erschwerten sowie verschiedene Standard-Untersuchungsverfahren behinderten. So stellte sich heraus, dass beim Ablösen der Zellen von den Scaffolds auch mehr oder weniger große Partikel des Trägermaterials suspendierten. Diese Partikel verfälschten entweder die Ergebnisse der Zellzählung im Zellzählgerät oder blockierten deren Messkapillare. Daher konnte diese Art der Bestimmung der Zellproliferation nicht angewendet werden. Da die Fragmentierung der Scaffolds beim Versuch des Ablöses der Zellrasen von der Oberfläche her stattfand, muss davon ausgegangen werden, dass nur ein Teil der Zellen suspendiert wurde, während ein nennenswerter Anteil von Zellen an den Partikeln adhärierte.

Somit musste von einer direkten Zellzahlbestimmung abgesehen und auf eine indirekte Methode ausgewichen werden. Hierfür bot sich der WST-1-Test an, welcher in einer unberührten Zellkultur durchgeführt werden kann. Ein Ablösen des Zellrasens war also nicht erforderlich, vielmehr konnte das Substrat direkt zur Zellkultur gegeben und die Metabolisierung fotometrisch im Kulturmedium bestimmt werden.

Man muss jedoch berücksichtigen, dass die so ermittelten Ergebnisse sowohl von der Zellproliferation als auch von der Stoffwechselaktivität der Zellen beeinflusst werden. Daher ist in der vorliegenden Arbeit von der Viabilität der Zellkulturen die Rede.

Um die Zellverträglichkeit der Monetitträger qualitativ besser bewerten zu können, wurden Zellkulturen auf geometrisch identischen Trägern aus Titan (bekanntermaßen gute Kompatibilität mit osteoblastären Zellen) und Kupfer (zytotoxisch) etabliert. Unter Berücksichtigung entsprechender Vergleichswerte konnte Monetit im WST-1-Test eine gute Zytokompatibilität bescheinigt werden. Die im Vergleich zu Titan schlechteren Ergebnisse sind sehr wahrscheinlich auf die veränderte chemische Zusammensetzung des Zellkulturmediums der Monetitkulturen zurückzuführen (siehe unten).

Die Messungen der Enzym-Konzentration der alkalischen Phosphatase in den Zellkulturen erlauben eine Beurteilung der Zelldifferenzierung in Richtung des Zielgewebes (Knochen) [27]. Die verzögerte Nachweisbarkeit in den Monetitkulturen, verglichen mit Titan, steht in Einklang mit der reduzierten Zellviabilität (WST-1). Die Ergebnisse sind nachvollziehbar, denn eine osteoblastäre Differenzierung der Zellen setzt einen konfluenten Zellrasen mit interzellulären Kontakten voraus [11]. Diese Bedingung war auf den Titanscaffolds zu einem früheren Zeitpunkt erfüllt und erklärt damit die stets höheren Messwerte der Alkalischen Phosphatase. In den Negativkontrollen (Kupfer) waren nahezu kein Zellwachstum und auch keine Zelldifferenzierung nachweisbar.

Die gleichbleibenden Messwerte der Osteocalcinbestimmung im Kulturmedium waren zunächst überraschend, konnten dann aber bei genauer Betrachtung und Durchführung zusätzlicher Messungen plausibel erklärt werden. Die Wahl einer Kultivierungsdauer von 12 Tagen wurde primär anhand der Proliferationsgeschwindigkeit der Zellkultur auf den Titanträgern getroffen. Gegen Ende der Kultivierungsdauer, mit Erreichen der Zellkonfluenz, wurde zumindest eine beginnende Osteocalcinsynthese erwartet.

Die Literatur beschreibt jedoch meist erst nach 14 Tagen Kultivierungsdauer einen Anstieg dieses Markers in osteoblastären Zellkulturen [47, 58]. Es ist also anzunehmen, dass in keiner Kultur, entsprechend dem relativ frühen Differenzierungsstadium der Zellen, eine messbare Osteocalcinsynthese stattfand. Anzunehmen ist, dass der gleichbleibende Osteocalcinnachweis allein durch den 10%igen Anteil von FCS (enthält Osteocalcin) im Nährmedium zustande kam.

Die gleichbleibenden, jedoch niedrigeren Konzentrationen von Osteocalcin in den Monetitkulturen (60-65% im Vergleich zu Titan) sind vermutlich der Adsorption des Proteins an der rauen Oberfläche der Monetitträger geschuldet.

Der pH-Wert sämtlicher asservierten Nährmedien lag stets in einem physiologischen Bereich (pH 7-8). Der anfänglich signifikant erniedrigte pH-Wert der Monetitkulturen (7,63 an Tag 5) normalisierte sich im weiteren Verlauf. Ursächlich für diesen Sachverhalt sind vermutlich im Monetitträger enthaltene nicht abgebundene Reaktanden (Phosphorsäure), welche im Versuchsverlauf aus den Scaffolds ausgewaschen und im Rahmen des Mediumwechsels entfernt wurden.

Eine weitere mögliche Ursache für die dargestellte pH-Wertänderung ist das differenzierte Hydrolyseverhalten der Monetit-Scaffolds im Kulturmedium über den zeitlichen Verlauf der Kultivierung. Bei den Monetitträgern handelt es sich, wie in Tabelle 5 dargestellt, nicht um monophasische Strukturen, sondern neben Monetit sind auch Anteile von α - und β -Tricalciumphosphat vorhanden. Reines Monetit ist zwar deutlich besser löslich als α - und β -Tricalciumphosphat (siehe Tabelle 2), jedoch hydrolysieren auch diese beiden Calciumphosphatphasen in flüssiger Umgebung. Es konnte gezeigt werden, dass in MEM α -Medium ausgelagertes Monetit zunächst durch Hydrolyse gut in Lösung geht, sich dann aber im Verlauf eine Schicht aus schwerlöslichem Hydroxylapatit (HA) auf den Monetitstrukturen repräzipitiert. Infolgedessen wird die weitere Hydrolyse der Strukturen stark verlangsamt [62, 67]. Ein gleichartiger Effekt wurde auch bei Auslagerung von Monetit in destilliertem Wasser gezeigt [40, 44].

Anhand des beschriebenen Sachverhaltes lassen sich nun die gemessenen Veränderung der Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen im Versuchsverlauf und infolge dessen die Veränderung des pH-Werts im Medium gut erklären: Die anfänglich stärkere Hydrolyse (vor allem des reinen Monetit-Anteils der Träger) führt zu einer Erhöhung der PO_4^{3-} -Ionenkonzentration und damit zum pH-Abfall. Bedingt durch den regelmäßigen Mediumwechsel zusammen mit der beschriebenen Repräzipitation von HA auf der Oberfläche der Monetitträger nähern sich die Meßwerte denen des frischen Nährmediums bzw. denen der Kontrollkulturen sukzessive an.

Dieser Umstand ist auch als Ursache für die dargestellten Konzentrationsänderungen der Ca^{2+} -Ionen und PO_4^{3-} -Ionen im Medium während der Kultivierung anzusehen. Die im Versuchsverlauf stetig ansteigende Ca^{2+} -Konzentration steht dabei in direktem Zusammenhang mit der Abnahme der PO_4^{3-} -Ionenkonzentration im Nährmedium. Die Konzentrationen beider Elektrolyte verhalten sich dabei, über die Versuchsdauer gesehen, nahezu gegenläufig. Freie Ca^{2+} -Ionen des frischen Nährmediums präzipitieren dabei mit den vermehrt in Lösung gegangenen PO_4^{3-} -Ionen aus den Trägermaterialien unter Bildung einer schwerlöslichen HA-Schicht auf der Trägeroberfläche (siehe oben). Durch diesen Ausfällungsprozess kommt es nun zu einer Abnahme der Konzentration

freier Ca^{2+} -Ionen im Kulturmedium. Im weiteren Verlauf der Kultivierung wurden dem System durch den regelmäßigen Mediumwechsel stets freie Ca^{2+} -Ionen zugeführt, wohingegen die Menge der in Lösung gehenden PO_4^{3-} -Ionen durch die verminderte Hydrolyse des Monetits abnahm. Daraus resultierte ein Anstieg der gemessenen Ca^{2+} -Ionenkonzentration sowie eine abnehmende PO_4^{3-} -Ionen-Konzentration im verbrauchten Kulturmedium während der Kultivierung.

Zusätzlich führt der Umsatz von Monetit (CaHPO_4) zu schwerlöslichem calciumdefizitärem Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ [$0 < x < 1$]) im Rahmen des Hydrolyse-Repräzipitationsprozesses zu stöchiometrischen Verschiebungen, die ebenfalls in einer Zunahme freier PO_4^{3-} -Ionen und einer Abnahme freier Ca^{2+} -Ionen münden.

Diese Elektrolytkonzentrations- und pH-Wertänderungen sind eine plausible Erklärung für die verzögert einsetzende Zellproliferation und -differenzierung auf den Monetitträgern im Vergleich zur Positivkontrolle Titan. Es ist in der Literatur beschrieben, dass unterschiedliche Konzentrationen freier Elektrolyte in einer Zellkultur zu einer Herauf- oder Herunterregulierung der Expression osteogenetischer Gene in Zellen führen können [62, 69, 73]. Wang *et al.* beschreiben die Expression von mRNA für Alkalische Phosphatase und Kollagen Typ I auf vier verschiedenen Zellkulturträgermaterialien aus Calciumphosphat. Untersucht wurden reines HA, ein biphasischer Calciumphosphatträger-1 (HA/TCP: 70/30), ein biphasischer Calciumphosphatträger-2 (HA/TCP: 35/65) und reines TCP. Dabei konnte in den Zellkulturen der HA-Träger und des Träger-1 eine signifikant höhere Expression der o.g. mRNA nachgewiesen werden. Die Autoren machen hierfür die unterschiedliche chemische Zusammensetzung des Kulturmediums aufgrund des Hydrolyseverhaltens der Materialien verantwortlich [69]. Diese Problematik gilt jedoch nur für die Zellkultur als geschlossenes System ohne kontinuierlichen Mediumaustausch. Es ist davon auszugehen, dass diese Beeinträchtigung *in vivo*, in einem gut vaskularisierten Implantatlager, keine oder zumindest eine geringere Rolle spielt. Durch den kontinuierlichen Abtransport von Metaboliten und Elektrolyten über das Lymph- und Blutkreislaufsystem ist *in vivo* mit weitgehend konstanten Elektrolytkonzentrationen und pH-Werten zu rechnen [2, 63]. Diese These wird durch zwischenzeitlich publizierte

in vivo Studien mit dem Material Monetit unterstützt. Hierauf wird nachfolgend eingegangen.

Die verzögert einsetzende Zellproliferation und -differenzierung könnte, neben den beschriebenen Elektrolyt- und pH-Wert-Änderungen im Nährmedium, als weitere Ursache die, im Vergleich zur glatten Oberfläche der Positivkontrolle Titan, poröse und raue Oberflächenstruktur der Monetitträger haben. Es ist bekannt, dass die Oberflächeneigenschaften eines Materials großen Einfluß auf die Zellproliferation und -differenzierung haben [11, 52, 53]. Die verschiedenen Strukturparameter, wie Makro- und Mikroporositäten, Porengröße, Porenkonnektivität und -permeabilität, sind von entscheidender Bedeutung für die osteokonduktiven Eigenschaften von Knochenersatzmaterialien [7, 16, 30, 45]. Sie beschleunigen durch Vergrößerung der Oberfläche die Resorption (durch Osteoklasten und Makrophagen) und die chemische Lösung des Materials durch Hydrolyse. Dies geschieht optimalerweise in der gleichen Geschwindigkeit, in der neue Knochensubstanz gebildet wird. Des Weiteren erlauben diese Porositäten das Einwachsen von Knochengewebe und damit die Integration des Implantats im Implantatbett [7, 16, 45]. Es bedarf weiterer Untersuchungen zu der Frage, in wie weit die Strukturparameter von Monetit sich auf die Zellproliferation und -differenzierung in der Zellkultur auswirken. Dies ist insbesondere im Vergleich zu gängigen Knochenersatzmaterialien interessant.

5.3 Ergebnisse im Kontext aktueller Literatur

Die Literaturrecherche ergab eine überschaubare Anzahl an Studien, die sich mit dem Material Monetit als Knochenersatzmaterial befassen. Bei den im Folgenden vorgestellten Untersuchungen handelt es sich hauptsächlich um *in vivo* Untersuchungen oder kombinierte *in vivo/in vitro* Studien, die das Degradationsverhalten des Materials, dessen osteokonduktive Eigenschaften sowie dessen Zytokompatibilität zur Fragestellung haben. Die *in vitro* Untersuchungen beschäftigen sich zum einen ebenfalls mit den Fragen der Zytokompatibilität und der osteoklastären Degradierbarkeit des Monetits und zum anderen mit dem passiven Hydrolyseverhalten in flüssigen Medien. Alle diskutierten Studien datieren nach der Publikation der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe.

Touny et al. analysierten das Hydrolyseverhalten von Monetizementen mit und ohne Chitosanzusatz in MEM α -Zellkulturmedium und in SBF-Lösung (simulated body fluid) [67]. Chitosan ist ein Polymer, welches mit dem Monetizement gemischt wurde, um die mechanischen Eigenschaften des Materials zu verbessern. Die Monetizemente wurden jeweils für 7 Tage bei 37 °C, in MEM α -Zellkulturmedium und in SBF-Lösung eingelegt und inkubiert. In beiden Flüssigkeiten kam es zur Hydrolyse der Zemente. Mittels Röntgendiffraktometrie konnte gezeigt werden, dass sich in beiden Medien auf der Oberfläche der Monetitstrukturen eine Schicht aus Hydroxylapatit gebildet hatte. Die Geschwindigkeit, mit der sich diese Hydroxylapatitablagerung ausbildete, war in der SBF-Lösung größer als im MEM α -Zellkulturmedium. Diese dünne HA-Schicht führte zu einer Änderung der Hydrolysekinetik der Zementstrukturen, da die Löslichkeit von HA um Größenordnungen unter der von Monetit liegt [13]. Der Zusatz von Chitosan bewirkte keine Änderung der Hydrolysekinetik. Wie oben bereits ausgeführt, kann der von *Touny et al.* herausgearbeitete Sachverhalt gut mit den eigenen Ergebnissen in Einklang gebracht werden.

Eine weitere Studie beschäftigt sich mit der Hydrolyse und der osteoklastären Degradation von Calciumphosphatzementen aus Monetit, Bruschi, Struvit und calciumdefizitärem Hydroxylapatit *in vitro* [23]. Im Gegensatz zur passiven hydrolytischen Spaltung stellt die osteoklastäre Degradation einen zellvermittelten, aktiven Abbauvorgang dar. Durch Schaffung eines lokal begrenzten (parazellulären), extrem sauren Milieus können somit auch thermodynamisch praktisch nicht lösliche Calciumphosphate, wie etwa HA degradiert werden. Diese Art von Degradation kann allerdings nur an der direkten Kontaktzone zwischen Osteoklast und Materialoberfläche stattfinden.

Die jeweiligen Zellkulturträger (\varnothing 6 mm, Dicke 2 mm) wurden indirekt durch Ausgießen von Silikonformen mit dem jeweiligen Calciumphosphatzement hergestellt. Das Autoklavieren der Bruschiträger bei 121°C für 20 Minuten ergab durch Dehydratation Monetit [23]. Es folgte die 13-tägige Inkubation der Scaffolds in Zellkulturmedium zur Untersuchung des Hydrolyseverhaltens. Anschließend wurde die Konzentration freier Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen im Medium an verschiedenen Tagen bestimmt. In der gleichen Studie wurden RAW 264.7 Makrophagen für die gleiche Versuchsdauer auf den jeweiligen Materialien kultiviert. Die Bestimmung von Zellzahl,

Zellviabilität sowie der Konzentration freier Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen im Medium fand in analogen Intervallen statt.

Im Gegensatz zum eigenen Versuchsansatz konnte offensichtlich eine Zellzählung mittels Zellzähler durchgeführt werden. Die Zellviabilität wurde in gleicher Weise durch den WST-1-Assay quantifiziert. Die Zellzahl und -viabilität auf den Monetitträgern nahm bis Tag 10 kontinuierlich zu, blieb jedoch unter dem Niveau von Bruschit und HA. Diese Beobachtungen decken sich mit dem Ergebnis der eigenen Versuchsreihe. Die Differenzierung der Makrophagen zu osteoklastären Zellen wurde durch den Nachweis von TRAP-Aktivität auf den Trägeroberflächen gezeigt.

Im ersten Versuchsansatz konnte eine geringfügige passive Hydrolyse für Monetit über die Inkubationsdauer nachgewiesen werden. Die gemessene Ca^{2+} -Ionenkonzentration lag dabei aber nur leicht über der Konzentration des Nährmediums, jedoch mit einem nicht signifikanten Peak an Tag 13.

Im Gegensatz dazu nahm die Ca^{2+} -Ionenkonzentration in der Osteoklastenkultur kontinuierlich bis Tag 10 zu und korrelierte dabei zeitlich mit der Zellanzahl und -viabilität, die an Tag 10 ebenfalls maximal war. Diese Konzentrationszunahme ist auf die aktive Degradation des Materials durch die osteoklastären Zellen zurückzuführen. Die Studie zeigt insgesamt eine gute Biokompatibilität und die osteoklastäre Degradationsfähigkeit des Calciumphosphats Monetit auf.

Umfangreiche biologische Untersuchungen zu den Werkstoffen Monetit und Bruschit wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe um *Tamimi* angestellt. Diese kultivierten zunächst *in vitro* osteogene Zellen (isoliert aus der Tibia von Mäusen) auf Zellkulturträgern aus beiden Werkstoffen. Zur Herstellung scheibenförmiger Zellkulturträger mit einer Höhe von 2 mm und einem Durchmesser von 10 mm, wurde ein Buschitzement in Teflonformen appliziert. Das Autoklavieren der Bruschitträger bei 121 °C für 20 Minuten führte zur hydrothermalen Umwandlung von Bruschit zu Monetit. Über den Nachweis der Genexpression osteogener Marker im zeitlichen Verlauf (mRNA von Runx2, Osteopontin, Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen 1a1) wurde der Beleg für Zellproliferation und osteogene Zelldifferenzierung erbracht. Im direkten Vergleich zu Bruschit zeigte das Genexpressionsmuster der Monetitkulturen einen früheren bzw. stärker ansteigenden Verlauf, was die Autoren auf

größere Verschiebungen von pH-Wert und Elektrolytkonzentrationen im Nährmedium der Bruschitkulturen im Vergleich zu den Monetitkulturen zurückführen [62]. Im Rahmen einer Untersuchung *in vivo* wurden Versuchskörper aus Monetit bzw. Bruschit in ein orthotopes Implantatlager (Tibiaplateau von Kaninchen) eingebracht. Die Implantate hatten eine Dimension von 4 mm Höhe und 3 mm Durchmesser und waren als einseitig geschlossene Hohlzylinder konstruiert. Hergestellt wurden sie ebenfalls durch die Applikation des Calciumphosphatzements in entsprechende Teflonformen. Das Autoklavieren der Bruschitzylinder führte wiederum zur hydrothermalen Modifikation in Monetit. Die histologische Untersuchung nach 4-wöchiger Standzeit zeigte eine gute Osseointegration beider Materialien. Die Implantate aus Monetit wiesen eine nicht signifikant höhere Knocheneinsprossung an der Implantatoberfläche auf, was von den Autoren auf die höhere Porosität, Porengröße sowie Interkonnektivität der Poren zurückgeführt wird [62]. Kritisch zu beurteilen ist die geringe Fallzahl dieser *in vivo* Untersuchung (n = 3). Allerdings unterstützt diese Studie die Ergebnisse anderer Untersuchungen [4, 18], wonach Monetit *in vitro* zwar etwas schlechter löslich ist als Bruschit, *in vivo* aber ein umgekehrter Sachverhalt vorzuliegen scheint. Als Ursache für dieses Phänomen kommt am ehesten der Abtransport gelöster Elektrolyte im gut perfundierten Implantatlager in Frage, wodurch die Präzipitation einer schwer löslichen Apatitschicht auf dem Versuchskörper (wie *in vitro*) verhindert wird [64].

In einer weiteren *in vivo* Studie untersuchten *Tamimi et al.* die Knochenregenerationsrate nach Augmentation artifizieller Calvariadefekte bei Kaninchen mit Monetitgranula [65]. Unter Zuhilfenahme eines Trepanbohrers setzten sie jeweils einen bikortikalen Defekt (Ø 10mm) im Os parietale auf beiden Seiten der Calvaria. Die Defekte der einen Seite wurden mit 0,2–1 mm großen Monetitgranula aufgefüllt, die Gegenseite (Kontrollgruppe) wurde nicht augmentiert. Anschließend erfolgte der Wundverschluss durch eine Periost- und eine Hautnaht. Das Periost wurde nicht lokal reseziert.

Das Monetitgranulat wurde aus Bruschitgranulat durch hydrothermale Konversion hergestellt. Die Bruschitgranula wurden durch das Mahlen und anschließende Sieben (Porengröße: 0,2 und 1 mm) von Bruschitblöcken gewonnen. Jeweils 6 Tiere wurden nach 4 bzw. 8 Wochen geopfert und die Defektareale histologisch untersucht. Nach 4 Wochen konnte in den augmentierten Defekten das Einwachsen von Knochengewebe

aus den Defekträndern beobachtet werden. In der Kontrollgruppe war nahezu keine Knochenregeneration nachweisbar. 8 Wochen nach Implantation zeigte sich eine komplette Durchbauung der mit Monetitgranula rekonstruierten Defekte mit unreifem Geflechtknochen. Nicht resorbiertes Monetit war innerhalb des regenerierten Knochens komplett osseointegriert. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte nur eine inkomplette Durchbauung der Defekte. Das bedeckende Weichgewebe war in die Kavitäten eingewachsen und hatte damit die Knochenregeneration weitestgehend verhindert. Nach 8 Wochen waren in der Studiengruppe 53% des Defektvolumens durch regenerierten Knochen ersetzt. In der Kontrollgruppe lag dieser Wert bei 32%. Die Autoren bescheinigen somit den Monetitpartikeln gute osteokonduktive Eigenschaften. Ebenso zeigte sich ein gutes Resorptionsverhalten dieses Materials *in vivo*. Resorbiertes Material wurde zügig durch sich regenerierenden Knochen ersetzt [65].

Im Rahmen einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde eine vertikale Augmentation der Calvaria von Kaninchen vorgenommen [64]. Hierzu wurden Monetitblöcke mit einer Dicke von 2 mm und einem Durchmesser von 9 mm im Sinne einer Onlay-Plastik aufgelagert. Die Versuchskörper wurden mittels 3-D-Pulverdruck, analog zu den Scaffolds unserer Versuchsreihe, hergestellt. Die Kontrollgruppe bildeten autologe Knochentransplantate gleichen Durchmessers, die mittels Trepanbohrung aus der dorsalen Calvaria während desselben Eingriffs gewonnen wurden. Die Fixation sämtlicher Augmentate (Versuchskörper und Kontrollkörper) erfolgte mittels Osteosyntheseschrauben. In den histologischen Nachuntersuchungen zeigten die autologen Transplantate eine gute Osseointegration, jedoch insbesondere am Rand eine resorptionsbedingte Ausdünnung im Vergleich zur ursprünglichen Transplantatdicke. Ebenso konnte innerhalb des Transplantats eine hohe Osteoklastenaktivität und infolgedessen ein hoher Grad an Resorptionen nachgewiesen werden. Die Monetitimplantate waren gut osseointegriert und es ließ sich Knochengewebe sowohl auf der Implantatoberfläche als auch im Inneren der durch Resorption entstandenen Lakunen histologisch darstellen. Histomorphometrisch zeigte das Monetitimplantat mit einem Restvolumen von $91,3\% \pm 13,1\%$ eine höhere Volumenstabilität im Vergleich zum autologen Knochentransplantat ($60,1\% \pm 6\%$). Jedoch war der Volumenanteil an vitalem Knochen mit $43,4\% \pm 8,1\%$ signifikant geringer. Die Onlayplastiken zeigten je nach Lokalisation zur Linea Media ein unterschiedliches Resorptions- und

Knochenregenerationsverhalten, sodass eine direkte Messung und Vergleich der absoluten Dicke der Augmentate nicht sinnvoll erschien. Vielmehr wurden die Abstände von der Calvariainnenseite zur cranialsten Knochengewebsformation in den Implantaten/Transplantaten gemessen und diese miteinander ins Verhältnis gesetzt. Diese Verhältnisse wurden dann in Abhängigkeit zum jeweiligen Abstand zur Linea Media graphisch dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied der gewonnenen vertikalen Knochenhöhe zwischen Monetit und den autologen Knochentransplantaten gab. Die zuvor in anderen Studien gezeigten osteokonduktiven Eigenschaften des Materials sowie dessen Resorption *in vivo* [8, 18, 24, 65] werden somit erneut bestätigt.

Die erste Studie mit klinischen Versuchen am Menschen wurde 2010 ebenfalls von der Arbeitsgruppe um *Tamimi* publiziert [63]. Hierbei wurde das Resorptionsverhalten von Monetitgranulat im Rahmen der Socketpreservation nach Zahnextraktion untersucht. Zur Herstellung des Monetitgranulats wurde zunächst aus einem Bruschitzement ein Block gegossen. Dieser wurde zermahlen und anschließend gesiebt, wodurch man ein Bruschitgranulat mit einer Partikelgröße von 2-200 μm erhielt. Durch Autoklavieren für 20 Minuten bei 121 °C dehydrierte das Bruschitgranulat zu Monetitgranulat. Als Vergleichsmaterial diente ein kommerzielles bovines Hydroxylapatit. Im Rahmen der Studie wurden zunächst parodontal geschädigte, nicht erhaltungswürdige Zähne auf beiden Seiten des Ober- bzw. Unterkiefers zeitgleich extrahiert. Anschließend wurden die Extraktionsalveolen seitenspezifisch mit jeweils einem der beiden Materialien aufgefüllt. Im Rahmen der geplanten Folgeoperation (Insertion dentaler Implantate) wurde die Knochenneubildung zunächst klinisch beurteilt. Bereits hier zeigten sich nicht resorbierte Granula des bovinen Materials, die im Sinne einer knöchernen Einscheidung osseointegriert waren. In den mit Monetit augmentierten Alveolen konnten klinisch keine Reste des Ersatzmaterials nachgewiesen werden, die Alveolen waren vollständig durch ein knöchernes Regenerat aufgefüllt. Anschließend wurden während der Präparation des Implantatbetts mittels Trepanbohrungen Knochenzylinder aus den Regeneraten gewonnen, um die Knochenregeneration auch histologisch zu beurteilen. Dabei zeigte sich eine gute knöcherne Konsolidierung bei beiden Materialien. Das Monetitgranulat wurde aber wesentlich besser resorbiert und war kaum noch nachweisbar. Der gebildete Knochen stellte sich histologisch in ähnlicher

Morphologie wie der umgebende Knochen dar. Hingegen wurden die HA-Partikel zwar gut osseointegriert, jedoch in geringerem Umfang degradiert. Die Knochenregeneration ermöglichte jedoch in allen Fällen eine Insertion dentaler Implantate und eine anschließende prothetische Versorgung der Patienten. Die Resorptionskinetik von Monetit erwies sich *in vivo* als dahingehend günstig, als dass die Regeneration des Knochens in zeitlichem Einklang mit der Degradation der Monetitpartikel stand.

In einer weiteren Untersuchung der Arbeitsgruppe um *Tamimi* wurde in Analogie zu einer früheren Studie [64] nun die vertikale Calvaria-Augmentation mit 3 mm (n = 8) bzw. 4 mm (n = 8) dicken Monetitblöcken (Ø 9 mm) vorgenommen [66]. Die Herstellung der Blöcke erfolgte wiederum analog zu dem Herstellungsverfahren unserer Arbeitsgruppe. Bruschitblöcke wurden mittels 3-D-Pulverdruck generiert und anschließend durch Autoklavieren bei 121 °C für 30 Minuten zu Monetitblöcken dehydriert.

Histologisch zeigte sich eine gute Oberflächenbedeckung aller Monetitblöcke mit neu gebildetem Knochen an den lateralen Flächen bis zur cranialen Kante. Die Blöcke waren dimensionsstabil. An der Kontaktfläche der Blöcke zum Lagerknochen bestand ein enger Kontakt und es war eine osteokonduktive Knocheneinsprossung bis zu einer Höhe von 3 mm bzw. 4 mm zumindest an den Implantataußenkanten erkennbar. Die Höhe der Knocheneinsprossung in der Binnenstruktur der Blöcke zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 mm und 4 mm Blöcken.

Anzeichen für Nekrosen, Osteolysen oder Fremdkörperreaktionen waren nicht zu verzeichnen.

Die 3 mm Blöcke zeigten mit einem Knochenregenerat von 40 Volumen% ein nicht signifikant höheres Knochenvolumen im Vergleich zu den 4 mm Blöcken mit 37%. Verantwortlich für die prozentual höhere Knochenregeneration in dünneren Onlayaugmentaten scheint die Lage zum durchbluteten Implantatbett zu sein. Betrachtet man das regenerierte Knochenvolumen in 2 mm dicken Monetitblöcken einer frühen Arbeit [64], so zeigen diese mit 43% einen tendenziell noch höheres Knochenvolumen innerhalb des Augmentats.

Für sich betrachtet sind diese Ergebnisse sehr vielversprechend, obgleich die Übertragbarkeit auf den Menschen bzw. auf eine andere Defektsituation (z.B. vertikaler Kieferkammdefekt) begrenzt sein dürfte.

Einen völlig differenten Versuchsansatz *in vivo* wählten *Habibovic et al.*, die Monetit- und Bruschitblöcke (11,5x8x10 mm) mit sechs röhrenförmigen Makroporositäten (\emptyset 2,5 mm) heterotop in die paraspinale Muskulatur von Ziegen (n = 11) implantierten [24]. Die Herstellung der Blöcke erfolgte wiederum analog zu dem Herstellungsverfahren unserer Arbeitsgruppe. Zunächst wurden Bruschitblöcke mittels 3-D-Pulverdruck im CAD/CAM-Verfahren hergestellt und anschließend durch hydrothermale Behandlung im Autoklaven bei 134 °C zu Monetitblöcken dehydriert.

Die Explantation und histologische Untersuchung erfolgte nach 12 Wochen. Neben einer deutlichen Resorption der Implantate, welche jedoch zwischen den Tieren erheblich variierte, berichten die Autoren von einer ektope Knochenneubildung bei 73% der Monetitimplantate und bei 45% der Bruschitimplantate. Die volumenmäßig größten Knochenregenerate zeigten sich dabei innerhalb der röhrenförmigen Makroporositäten in kurzer Distanz zum Röhreneingang (1-2 mm), eben dort, wo auch die Resorption am ausgeprägtesten war. Aufgrund der Ergebnisse schreiben die Autoren den beiden Calciumphosphaten osteoinduktive Eigenschaften zu. Diese Interpretation muss allerdings kritisch hinterfragt werden, zumal ein derartiger Sachverhalt bisher weder für Monetit bzw. Bruschit noch für andere Calciumphosphate nachgewiesen wurde. Eine plausible Ursache für die beobachtete ektope Knochenneubildung in diesem Versuch wäre die intraoperative Freisetzung osteogener Zytokine bzw. Verschleppung osteogener Zellen in das heterotope Implantatlager. Im Rahmen der Studie wurde nämlich ein synchroner Zweiteingriff in der gleichen anatomischen Region durchgeführt. Bruschitblöcke wurden, im Sinne einer Onlayplastik, auf zuvor dekortizierten Knochen (Processus transversus des L4-Wirbels) fixiert. Es ist zu vermuten, dass hierbei Knochenspäne mit vitalen Zellen im OP-Gebiet verteilt bzw. entsprechende Zytokine freigesetzt wurden.

Betrachtet man die Ergebnisse der vorgestellten Studien, so wurde eine Reihe von Fakten herausgearbeitet, die sich mit den eigenen Ergebnissen decken.

In allen *in vitro* Zellkulturstudien wird dem Material Monetit eine hervorragende Zytokompatibilität bescheinigt [23, 62]. Die Zellen proliferierten und osteogene Zellen zeigten ein Differenzierungsverhalten in Richtung des Zielgewebes (Knochen) [62]. Osteoklastäre Zellen waren sogar in der Lage, das Material *in vitro* zu degradieren [23].

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von *Großardt et al.* [23] im Hinblick auf das passive Hydrolyseverhalten von Monetit korrelieren jedoch schlecht mit dem gemessenen Konzentrationsverlauf von Ca^{2+} -Ionen im Nährmedium der eigenen Untersuchungen. Obwohl die Ca^{2+} -Ionen-Konzentration auch in diesem Versuch über die Kultivierungsdauer nicht signifikant zunimmt, ist dies nicht so ausgeprägt wie in der eigenen Versuchsreihe. Jedoch zeigen *Touny et al.* [67], dass Monetit im Zellkulturmedium hydrolytisch degradiert wird und es durch eine Ausfällungsreaktion zur Ausbildung einer HA-Schicht auf dem Trägermaterial kommt, was zu einer Abnahme der hydrolytischen Degradation führt. Diese Ergebnisse wiederum unterstützen die dargestellten Interpretationen zur Ursache der gemessenen Ionenverschiebungen im Nährmedium über die Kultivierungsdauer.

Weiterhin darf man annehmen, dass unter anderem die durch unsere Arbeitsgruppe bestätigte gute Zytokompatibilität des Monetits *in vitro* weitere Arbeitsgruppen zu den vorgestellten *in vivo* Studien motivierte [62, 63, 64, 65, 66]. In allen Arbeiten wird beobachtet, dass Monetit als Knochenersatzmaterial eine gute Biokompatibilität ohne Zeichen von Nekrosen, Osteolysen oder Fremdkörperreaktion aufweist. Das Material wird gut osseointegriert, die Resorptionskinetik ist günstig und steht in zeitlichem Einklang mit der Knochenregeneration auf der Oberfläche und innerhalb der Binnenstruktur der jeweiligen Prüfkörper. Die osteokonduktiven Eigenschaften sind somit als gut zu bezeichnen.

Osteoinduktive Eigenschaften des Materials wie von *Habibovic et al.* postuliert [24], sind zumindest fraglich.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Zytokompatibilität von im 3D-Pulverdruckverfahren hergestellten Zellkulturträgern aus Dicalciumphosphat Anhydrat (CaHPO_4 , Monetit) *in vitro* zu untersuchen. Dieses Material lässt sich der Substanzklasse der Calciumphosphate zuordnen, welche aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zur mineralischen Phase des Knochens einen hohen Stellenwert als Knochenersatzmaterial besitzen.

Die Trägerstrukturen wurden mittels CAD-CAM Technologie im 3D-Pulverdruckverfahren fabriziert. Dabei wurde auf ein entsprechend adaptiertes Zementssystem zurückgegriffen, bestehend aus Tricalciumphosphatpulver und Phosphorsäure. Die primär aus Dicalciumphosphat Dihydrat (Bruschiit) bestehenden Konstrukte wurden anschließend durch Autoklavieren hydrothermal in Monetit umgewandelt.

Die Kombination einer bei Raumtemperatur ablaufenden Zementabbindereaktion mit einem generativen Fertigungsverfahren wie dem Pulverdruck ermöglichte die Herstellung monolithischer Formkörper ohne thermische Verfestigung (Sinterung). Daher kann eine im Vergleich zu gesinterten Formkörpern gute thermodynamische Löslichkeit und somit gute Biodegradierbarkeit erwartet werden.

Zur Evaluierung der Zytokompatibilität des pulvergedruckten Materials wurde nach Besiedlung mit osteoblastären Zellen deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten *in vitro* untersucht. Die Zellviabilität, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase sowie die Konzentration von Osteocalcin dienten als Parameter. Weiterhin wurden die Konzentration freier Elektrolyte und der pH-Wert im Nährmedium zur Evaluierung der Löslichkeit der Träger *in vitro* herangezogen. Anhand licht- und rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen erfolgte eine qualitativ-morphologische Einschätzung des Zellwachstums.

Die Untersuchungen zeigen eine gute Zytokompatibilität des Trägermaterials aus Monetit. Die im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen etwas erniedrigten Werte lassen sich durch die im Nährmedium festgestellten Elektrolytverschiebungen erklären, welche durch die thermodynamische Löslichkeit von Monetit zustande kommen. Diese Problematik der Zellkultur als geschlossenem System sollte jedoch *in vivo* bei stetigem Flüssigkeits- und Metabolitenaustausch keine Rolle spielen. Die Ergebnisse liefern

einen Beitrag zur Erarbeitung neuartiger Knochenzemente, insbesondere aus Monetit. Klinisch interessant erscheint die verfahrensbedingte Möglichkeit, die Anforderungen nach guter Degradierbarkeit, präoperativer Fabrizierung und individueller Formgebung (z.B. passend zu einem individuellen Defekt) miteinander kombinieren zu können.

7 Literaturverzeichnis

- 1 **Aaboe M, Schou S, Hjorting-Hansen E, Helbo M, Vikjaer D (2000)**
Osseointegration of subperiosteal implants using bovine bone substitute and various membranes.
Clin Oral Implants Res 11:51-58
- 2 **Barralet J, Akao M, Aoki H (2000)**
Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats.
J Biomed Mater Res 49:176-182
- 3 **Bohner M (2000)**
Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements.
Injury 31 Suppl 4:37-47
- 4 **Bohner M, Gbureck U (2008)**
Thermal reactions of brushite cements.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 84:375-385
- 5 **Boland T, Mironov V, Gutowska A, Roth EA, Markwald RR (2003)**
Cell and organ printing 2: fusion of cell aggregates in three-dimensional gels.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 272:497-502
- 6 **Boland T, Xu T, Damon B, Cui X (2006)**
Application of inkjet printing to tissue engineering.
Biotechnol J 1:910-917
- 7 **Chang BS, Lee CK, Hong KS, Youn HJ, Ryu HS, Chung SS, Park KW (2000)**
Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations.
Biomaterials 21:1291-1298
- 8 **Constantz BR, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, Mckinney L, Goodman SB, Gunasekaren S, Delaney DC, Ross J, Poser RD (1998)**
Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites.
J Biomed Mater Res 43:451-461

- 9 Curodeau A, Sachs E, Caldarise S (2000)**
Design and fabrication of cast orthopedic implants with freeform surface textures from 3-D printed ceramic shell.
J Biomed Mater Res 53:525-535
- 10 Dorozhkin SV, Epple M (2002)**
Biological and medical significance of calcium phosphates.
Angew Chem Int Ed Engl 41:3130-3146
- 11 Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K (2009)**
Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behavior.
J Biomed Mater Res A 89:510-520
- 12 El Deeb M, Holmes RE (1989)**
Zygomatic and mandibular augmentation with proplast and porous hydroxyapatite in rhesus monkeys.
J Oral Maxillofac Surg 47:480-488
- 13 Elliott JC (1994)**
Structure and Chemistry of apatites and other calcium orthophosphates.
Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo
- 14 Elsalanty ME, Genecov DG (2009)**
Bone grafts in craniofacial surgery.
Craniofacial Trauma Reconstr 2:125-134
- 15 Friesen K (2006)**
Proliferations-, Differenzierungs- und Adhäsionsverhalten osteogener Zelllinien auf unterschiedlichen Knochenersatzmaterialien.
Dissertation, Poliklinik für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde der Universität Düsseldorf
- 16 Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G (1998)**
Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth.
Biomaterials 19:133-139

- 17 Gburek U (2004)**
 Injizierbare Calciumphosphat-Zemente als Knochenersatzwerkstoff in niedrig belasteten Bereichen des Skelettsystems.
 Habilitationsschrift, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg
- 18 Gburek U, Hölzel T, Klammert U, Würzler K, Müller FA, Barralet JE (2007)**
 Resorbable Dicalcium Phosphate Bone Substitutes Prepared by 3D Powder Printing.
 Adv Funct Mater 17:3940-3945
- 19 Gebhardt A (2004)**
 Grundlagen des Rapid Prototyping-Eine Kurzdarstellung der Rapid Prototyping Verfahren.
<http://www.rtejournal.de/ausgabe1>
- 20 Gebhardt A (2007)**
 Rapid Prototyping – Rapid Tooling- Rapid Manufacturing.
 Carl Hanser, München
- 21 Gerlach KL, Niehues D (2007)**
 Treatment of jaw cysts with a new kind of nanoparticulate hydroxylapatite.
 Mund Kiefer Gesichtschir 11:131-137
- 22 Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ (1996)**
 Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing.
 J Biomater Sci Polym Ed 8:63-75
- 23 Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U (2010)**
 Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells.
 Tissue Eng Part A 16:3687-3695

- 24 Habibovic P, Gbureck U, Doillon CJ, Bassett DC, Van Blitterswijk CA, Barralet JE (2008)**
Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants.
Biomaterials 29:944-953
- 25 Hendrich C, Geyer M, Scheddin D, Schutze N, Eulert J, Thull R (1996)**
A new osteoblast cell culture system for the testing of biomaterials in accordance with relevant standards.
Biomedizinische Technik 41:278-283
- 26 Huang W, Zheng Q, Sun W, Xu H, Yang X (2007)**
Levofloxacin implants with predefined microstructure fabricated by three-dimensional printing technique.
Int J Pharm 339:33-38
- 27 Hutmacher DW (2000)**
Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage.
Biomaterials 21:2529-2543
- 28 Ibrahim D, Broilo TL, Heitz C, De Oliveira MG, De Oliveira HW, Nobre SM, Dos Santos Filho JH, Silva DN (2009)**
Dimensional error of selective laser sintering, three-dimensional printing and PolyJet models in the reproduction of mandibular anatomy.
J Craniomaxillofac Surg 37:167-173
- 29 Jalota S, Bhaduri SB, Tas AC (2006)**
In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP) whiskers.
J Biomed Mater Res A 78:481-490
- 30 Karageorgiou V, Kaplan D (2005)**
Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis.
Biomaterials 26:5474-5491

- 31 Khalyfa A, Vogt S, Weisser J, Grimm G, Rechtenbach A, Meyer W, Schnabelrauch M (2007)**
Development of a new calcium phosphate powder-binder system for the 3D printing of patient specific implants.
J Mater Sci Mater Med 18:909-916
- 32 Khan SN, Cammisa FP, Jr., Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM (2005)**
The biology of bone grafting.
J Am Acad Orthop Surg 13:77-86
- 33 Klammert U (2011)**
Einführung biodegradierbarer Calcium- und Magnesiumphosphatzemente in das 3D-Pulverdruckverfahren.
Habilitationsschrift, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie Universität Würzburg
- 34 Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rodiger J, Meyer-Marcotty P, Kübler AC (2010)**
3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects.
J Craniomaxillofac Surg 38:565-570
- 35 Klarner M (2009)**
3D-Pulverdruck von Calciumphosphat-Keramiken mit polymeren und anorganischen Bindersystemen.
Dissertation, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg
- 36 Kodama HA, Amagai Y, Koyama H, Kasai S (1982)**
A new preadipose cell line derived from newborn mouse calvaria can promote the proliferation of pluripotent hemopoietic stem cells in vitro.
J Cell Physiol 112:89-95
- 37 Kruger E, Krumholz K (1984)**
Results of bone grafting after rigid fixation.
J Oral Maxillofac Surg 42:491-496

- 38 Kübler, NR (1997)**
Osteoinduktion und -reparation.
Mund Kiefer Gesichtschir 1:2-25
- 39 Lama CXF, Moa XM, Teoha SH, Hutmacher DW (2002)**
Scaffolddevelopment using 3Dprinting with astarch-basedpolymer.
Materials Science and Engineering 20:49–56
- 40 Lebugle A, Sallek B, Tai AT (1999)**
Surface modification of monetite in water at 37 degrees C: characterisation by XPS.
J Mater Chem 9:2511-2515
- 41 Legeros RZ (1991)**
Calcium phosphates in oral biology and medicine.
Monogr Oral Sci 15:1-201
- 42 Lenart G, Bidlo G, Pinter J (1972)**
Some basic problems in the examination of the calcium hydrogen phosphates of bone.
Clin Orthop Relat Res 83:263-272
- 43 Leukers B, Gulkan H, Irsen SH, Milz S, Tille C, Schieker M, Seitz H (2005)**
Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing.
J Mater Sci Mater Med 16:1121-1124
- 44 Martin RI, Brown PW (1998)**
Hydrolysis of CaHPO₄ in sodium fluoride solutions at 37.4 degrees C.
Caries Res 32:365-377
- 45 Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R, Quarto R (2006)**
Role of scaffold internal structure on in vivo bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics.
Biomaterials 27:3230-3237
- 46 Muenzenberg KJ, Gebhardt M (1973)**
Brushite octacalcium phosphate, and carbonate-containing apatite in bone.
Clin Orthop Relat Res 90:271-273

- 47 Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990)**
Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix.
J Cell Physiol 143:420-430
- 48 Peskin AV, Winterbourn CC (2000)**
A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1).
Clinica Chimica Acta 293:157-166
- 49 Peters F, Groisman D, Davids R, Hänel T, Dürr H, Klein M (2006)**
Comparative Study of patient individual implants from b-tricalcium phosphate made by different techniques based on CT data.
Materwiss Werksttech 37:457-461
- 50 Pfister A, Walz U, Laib A, Mülhaupt R (2005)**
Polymer Ionomers for Rapid Prototyping and Rapid Manufacturing by Means of 3D Printing.
Macromol Mater Eng 290:99-113
- 51 Pieters IY, Van Den Vreken NM, Declercq HA, Cornelissen MJ, Verbeeck RM (2010)**
Carbonated apatites obtained by the hydrolysis of monetite: influence of carbonate content on adhesion and proliferation of MC3T3-E1 osteoblastic cells.
Acta biomaterialia 6:1561-1568
- 52 Rea SM, Best SM, Bonfield W (2004)**
Bioactivity of ceramic-polymer composites with varied composition and surface topography.
J Mater Sci Mater Med 15:997-1005
- 53 Rea SM, Brooks RA, Schneider A, Best SM, Bonfield W (2004)**
Osteoblast-like cell response to bioactive composites-surface-topography and composition effects.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 70:250-261

- 54 Rosen PS, Reynolds MA, Bowers GM (2000)**
The treatment of intrabony defects with bone grafts.
Periodontol 2000 22:88-103
- 55 Schmitz JP, Hollinger JO, Milam SB (1999)**
Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review.
J Oral Maxillofac Surg 57:1122-1126
- 56 Seitz H, Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C (2005)**
Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 74:782-788
- 57 Shimijo N, Kondo C, Yamashita K, Hoshino T, Hayakawa T (2007)**
Cytotoxicity analysis of a novel titanium alloy in vitro: Adhesion, spreading and proliferation of human gingival fibroblasts.
Biomed Mater Eng 17:127-135
- 58 Stein GS, Lian JB, Gerstenfeld LG, Shalhoub V, Aronow M, Owen T, Markose E (1989)**
The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to cellular proliferation.
Connect Tissue Res 20:3-13
- 59 Stiehler M, Lind M, Mygind T, Baatrup A, Dolatshahi-Pirouz A, Li H, Foss M, Besenbacher F, Kassem M, Bunger C (2008)**
Morphology, proliferation, and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured on titanium, tantalum, and chromium surfaces.
J Biomed Mater Res A 86:448-458
- 60 Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S (1983)**
In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria.
J Cell Biol 96:191-198
- 61 Takagi S, Chow LC, Ishikawa K (1998)**
Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements.
Biomaterials 19:1593-1599

- 62 Tamimi F, Le Nihouannen D, Eimar H, Sheikh Z, Komarova S, Barralet J (2012)**
The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: brushite vs. monetite.
Acta biomaterialia 8:3161-3169
- 63 Tamimi F, Torres J, Bassett D, Barralet J, Cabarcos EL (2010)**
Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients.
Biomaterials 31:2762-2769
- 64 Tamimi F, Torres J, Gbureck U, Lopez-Cabarcos E, Bassett DC, Alkhraisat MH, Barralet JE (2009)**
Craniofacial vertical bone augmentation: a comparison between 3D printed monolithic monetite blocks and autologous onlay grafts in the rabbit.
Biomaterials 30:6318-6326
- 65 Tamimi F, Torres J, Kathan C, Baca R, Clemente C, Blanco L, Lopez Cabarcos E (2008)**
Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules.
J Biomed Mater Res A 87:980-985
- 66 Torres J, Tamimi F, Alkhraisat MH, Prados-Frutos JC, Rastikerdar E, Gbureck U, Barralet JE, Lopez-Cabarcos E (2011)**
Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria.
J Clin Periodontol 38:1147-1153
- 67 Touny AH, Dawkins H, Zhou H, Bhaduri SB (2011)**
Hydrolysis of monetite/chitosan composites in alpha-MEM and SBF solutions.
J Mater Sci Mater Med 22:1101-1109
- 68 Vorndran E, Klammert U, Ewald A, Barralet JE, Gbureck U (2010)**
Simultaneous Immobilization of Bioactives During 3D Powder Printing of Bioceramic Drug-Release Matrices.
Adv Funct Mater 20:1585-1591

- 69 Wang C, Duan Y, Markovic B, Barbara J, Howlett CR, Zhang X, Zreiqat H (2004)**
Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions.
Biomaterials 25:2507-2514
- 70 Wolff J (1892)**
Das Gesetz der Transformation der Knochen.
August Hirschwald, Berlin
- 71 Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2005)**
Ink jet printing of viable mammalian cells.
Biomaterials 26:93-99
- 72 Xue CH, Shi MM, Chen HZ, Wu G, Wang M (2006)**
Preparation and application of nanoscale microemulsion as binder for fabric inkjet printing. Colloids and Surfaces.
Physiochem Eng Aspects 287:147-152
- 73 Yefang Z, Hutmacher DW, Varawan SL, Meng LT (2007)**
Comparison of human alveolar osteoblasts cultured on polymer-ceramic composite scaffolds and tissue culture plates.
Int J Oral Maxillofac Surg 36:137-145
- 74 Yoo J, Cho K, Bae WS, Cima M, Suresh S (1998)**
Transformation-toughened ceramic multilayers with compositional gradients.
J Am Ceram Soc 81:21-32

Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. A.C. Kübler, Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, möchte ich für die Überlassung des Themas der Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem langjährigen Freund und Kollegen Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Uwe Klammert für die dieser Arbeit zugrundeliegende Idee, für die unermüdliche Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und deren Auswertung, die geduldige Korrekturarbeit sowie für die Übernahme des Referates.

Besonders danken möchte ich Frau M. Schleyer für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente im Labor.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. J. Groll für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ich danke meiner geliebten Frau Ann-Katrin für die immerwährende Unterstützung, Motivation, und Hilfestellung. Sowie das Ermöglichen der unzähligen Labor- und Schreibtischstunden.

Meinen wunderbaren Kindern, dass es sie gibt.

Meiner Familie und Freunden für alles und nicht zuletzt für das geduldige Gegenlesen und die Anmerkungen zu dieser Arbeit.

Lebenslauf

Dr. Christoph Hans Jahn

Daten zur Person

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1985-1986 Montessori Grundschule in Bonn

1986-1989 Konrad-Andenauer-Grundschule Kempten

1989-1998 Allgäu-Gymnasium Kempten

1998 Allgemeine Hochschulreife: Gesamtnote 2,0

Zivildienst

01.09.1998-30.09.1999 Verein für Körperbehinderte Allgäu, Kempten

Universitätsausbildung

WS 99/00-WS 01/02 Studium der Zahnmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg

SS 02-SS 04 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg

Dezember 2004 Zahnärztliche Prüfung: Gesamtergebnis „gut“ und Approbation als
Zahnarzt

Oktober 2007 Promotion zum Dr. med. dent.

Dezember 2009 Ärztliche Prüfung: Gesamtergebnis „sehr gut“ und Approbation als
Arzt

Seit April 2007 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Mund-Kiefer- und
plastische Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Würzburg

Januar 2013 Anerkennung als Fachzahnarzt für Oralchirurgie