

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

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. Kübler

Zytokompatibilität von Brushit
Ein im 3D-Pulverdruckverfahren hergestelltes
Zellkulturträgermaterial

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

vorgelegt von
Boris Kraski
aus Ulm

Würzburg, September 2012

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr. Uwe Klammert
Korreferent: Prof. Dr. Jürgen Groll
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2013

Der Promovend ist Zahnarzt

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Knochengewebe	1
1.2	Knochendefekte und deren Therapie	3
1.3	Calciumphosphate (CaP) als Knochenersatzmaterialien	6
1.4	3D-Pulverdruck	8
1.5	Einführung eines Pulver-Binder-Systems auf Calciumphosphatbasis	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Zellkulturtechnik	11
2.1.1	Nährmedien, Zusätze und Puffer	11
2.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.1.3	Zell-Linie	13
2.1.4	Konservieren von Zellen in Flüssigstickstoff	13
2.1.5	Zellzählung	14
2.2	Herstellen der Trägerstrukturen mittels 3D-Pulverdruck	15
2.3	Kontrollträger aus Titan und Kupfer	16
2.4	Quantifizierung der Zellviabilität mittels WST-1-Assay	18
2.5	Bestimmung der Alkalische-Phosphatase-Aktivität	19
2.6	Osteocalcin-Bestimmung	20
2.7	Chemische Analyse des Zellkulturmediums	20
2.8	Visualisierung der Zellen	21
2.9	Statistik	22
3	Fragestellung	23

4	Ergebnisse	24
4.1	Pulverdruck der Trägerstrukturen	24
4.2	Zellviabilität	24
4.3	Aktivität der alkalischen Phosphatase	25
4.4	Osteocalcin-Bestimmung	27
4.5	Chemische Analyse des Zellkulturmediums	28
4.6	Mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums	31
5	Diskussion	32
5.1	Knochendefekte und Knochenersatz	32
5.2	Rapid Prototyping Verfahren	34
5.3	3D - Pulverdruck von Brushit	35
5.4	Zellkulturen	37
5.5	Zellviabilität	38
5.6	Vergleich der Alkalische-Phosphatase-Aktivität	39
5.7	Osteocalcin Nachweis	40
5.8	Chemische Analyse des Zellkulturmediums	40
6	Zusammenfassung	42
7	Literaturverzeichnis	43

Abkürzungen

ALP	Alkalische Phosphatase
CAD	Computer Aided Design
CAM	Computer Aided Manufacturing
CPC	Calciumphosphatzemente
CT	Couputertomographie
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
(D)MEM	(Dulbecco´s) Modified Eagles Medium
(D)PBS	(Dulbecco´s) Phosphate-Buffered Saline
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FDM	Fused Deposition Modelling
HA	Hydroxylapatit
NAD ⁺ , NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert, reduziert)
NaOH	Natriumhydroxid
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SLS	Selektives Lasersintern
TCP	Tricalciumphosphat

Abbildungen

Abb. 1	Bruschi-Scaffold	16
Abb. 2	24 well Platte mit Bruschi-Trägern, sowie Kontroll-Trägern aus Titan und Kupfer	18
Abb. 3	Zellvitalität der MC3T3-E1 Zelllinie	25
Abb. 4	Aktivität der Alkalischen Phosphatase der MC3T3-E1 Zelllinie	26
Abb. 5	Osteocalcinkonzentration im Zellkulturmedium	27
Abb. 6	pH-Werte des Zellkulturmediums	28
Abb. 7	Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen im Zellkulturmedium	29
Abb. 8	Konzentration an freien PO_4^{3-} -Ionen im Zellkulturmedium	30
Abb. 9A	Lichtmikroskopische Aufnahme der Bruschi-Scaffolds	31
Abb. 9B	Elektronenmikroskopisches Bild der Zellkulturen nach 12 Tagen Kultivierung	31

1 Einleitung

1.1 Knochengewebe

Knochengewebe ist eine hochdifferenzierte Form des Bindegewebes mit mechanischen (Stützgewebe) und metabolischen Aufgaben (Speicherung von Mineralien, insbesondere von Calcium- und Phosphationen). Außerdem ist Knochen Träger des blutbildenden roten Knochenmarkes. Knochen entwickelt sich aus dem Mesenchym, dem embryonalen Bindegewebe, welches aus dem Mesoderm, dem mittleren Keimblatt hervorgeht [55].

Makroskopisch besteht jeder Knochen aus der Spongiosa und der Kompakta. Die Spongiosa, ein schwammartiges Trabekelwerk, ist von der Kompakta umschlossen. Das Knochenmark füllt die Hohlräume zwischen den Trabekeln der Spongiosa. Jeder Knochen ist von Bindegewebsschichten umgeben. Das Endost bedeckt sämtliche inneren, das gefäßführende Periost die äußeren Knochenoberflächen [55].

Ultrastrukturell kann man Geflechtknochen und Lamellenknochen unterscheiden. In ersterem sind die Kollagenfibrillen geflechtartig verwoben. Sie strahlen in das Periost sowie in ansetzende Bänder und Sehnen als Sharpey'sche Fasern ein. Geflechtknochen besitzt eine besondere Zug- und Biegefestigkeit. Im Lamellenknochen besitzen sowohl Spongiosa als auch Kompakta eine lamellär organisierte extrazelluläre Matrix mit unterschiedlicher Geometrie. Die Spongiosa besteht aus flächigen Lamellen, die überwiegend parallel zur Oberfläche des Trabekels ausgerichtet sind. Die Lamellen in der Kompakta sind dagegen konzentrisch um kleine Blutgefäße herum angeordnet (Havers-Kanal), wodurch sogenannte Osteone entstehen. Überall dort, wo rasch Knochengewebe gebildet wird, also während der Osteogenese und bei der Frakturheilung, entsteht zunächst Geflechtknochen. Dieser wird natürlicherweise zu biomechanisch höherwertigem Lamellenknochen umgebaut.

Zu den knochenspezifischen Zellen gehören die Osteoblasten, die die Knochenmatrix bilden und zu Osteozyten differenzieren können, sowie die knochenabbauenden Osteoklasten. Erstere gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor, die unter dem Einfluss lokaler Wachstumsfaktoren (z.B. bone morphogenetic proteins) und verschiedener Hormone über verschiedene Zwischenstufen ausdifferenzieren. Die

Osteoblasten regulieren unter anderem die Synthese von Kollagen, die Mineralisation und den Osteoklastenhaushalt [55]. Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die aus Zellen des mononukleären Phagozytensystems hervorgehen. Aktive Osteoklasten liegen der mineralisierten Matrix direkt an. Durch Protonenpumpen können sie die Knochenhartsubstanz mittels Säure auflösen, die organischen Bestandteile werden enzymatisch gespalten. Die so aufgelöste Knochensubstanz wird von den Osteoklasten resorbiert und an die Blutbahn abgegeben.

Durch das Zusammenwirken beider Zellpopulationen wird der Knochen während des Wachstums ständig umgebaut (Remodelling), um seine definitive Form zu erhalten. Dabei wird auch der unreife Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt. Dieser kontinuierliche Umbau von Knochengewebe findet auch nach Abschluß des Wachstums statt, im Jahresdurchschnitt betrifft dies etwa 10% des gesamten Skeletts [55]. Dies dient der optimalen Anpassung des Knochens an veränderliche biomechanische Erfordernisse und ist erkennbar an der Ausrichtung der Spongiosatrabekel entlang der Druck- und Zugspannungslinien, den sogenannten Trajektorien (Wolffsches Gesetz [104]). Gesteuert werden diese Umbauvorgänge durch lokal wirksame Zytokine (z.B. TGF- β), systemische Hormone (z.B. PTH, Calcitonin, GH, Steroide) und die Knochenzellen selbst aufgrund ihrer mechanorezeptiven Eigenschaften [53,66].

Das nicht-zelluläre Kompartiment des Knochens enthält zu 50% Mineralien und zu je 25% organische Verbindungen und Hydratationswasser. Der Mineralanteil setzt sich aus anorganischem Phosphat (etwa 50%) und Calcium (etwa 35%) zusammen. Weitere anorganische Bestandteile sind Karbonat (6%), Nitrat, Eisen, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenstoffe [6,82]. Die Mineralien kommen als Apatitkristalle vor, wobei Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ dominiert. In geringer Menge kommen noch weitere Calciumphosphat-Phasen wie Bruschit oder Calciumpyrophosphat vor [18]. Hydroxylapatit ist ein länglicher, hexagonaler Kristall. Aufgrund der Affinität zu Kollagen lagern sich die Kristalle an der Oberfläche und im Inneren der Fibrillen longitudinal an. Dadurch entsteht eine Verbundstruktur aus druckfesten Mineralkristallen und zugfesten Kollagenfibrillen [53].

Der organische Anteil der Matrix besteht zu etwa 90% aus Typ-1-Kollagen und aus verschiedenen nichtkollagenen Proteinen, wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonektin,

Bone Sialoprotein, α_2 -HS-Glycoprotein und Serumproteine (Albumin, α_1 -Antitrypsin, Transferrin, Haptoglobin, Immunglobuline) [53].

1.2 Knochendefekte und deren Therapie

Knochendefekte im Bereich des Gesichtschädels lassen sich nach ihrer Ursache wie folgt einteilen [22]:

- traumatogen (z.B. Defektfrakturen)
- aufgrund ablativer Tumorthherapie (z.B. Unterkieferresektion)
- infolge anderer Raumforderungen bzw. deren Entfernung (z.B. Kieferzysten)
- Atrophie (z.B. Alveolarfortsatzatrophie infolge von Zahnverlust)
- infolge von Infektionen (z.B. Osteomyelitis, Parodontitis)

Die daraus resultierenden Defektarten lassen sich unterscheiden in [22]:

- Kontinuitätsdefekte
- höhlenartige, d.h. weitgehend knöchern begrenzte Defekte
- horizontale und vertikale Alveolarkammdefekte

Knochengewebe besitzt grundsätzlich die Fähigkeit zur Heilung bzw. Selbstregeneration. In vielen klinischen Situationen reicht dieses Potential jedoch nicht aus, beispielsweise bei Überschreiten einer kritischen Defektgröße. Dann kann der Einsatz von Transplantaten oder Implantaten erforderlich werden, um ein Einwachsen konkurrierender Gewebe (meist Bindegewebe) in den Defekt zu verhindern und die verlorengangene biologische Funktion wieder herzustellen [1].

Im Bereich des Gesichtschädels kann sich die Therapiebedürftigkeit eines Knochendefektes ergeben:

- aufgrund mangelnder Stabilität der vorhandenen Strukturen unter funktioneller Belastung (z.B. nach Unterkieferresektion)
- zur Verbesserung der Abstützung der bedeckenden Weichteile und Konturgebung der äußeren Schädelform (z.B. nach ablativer Tumorchirurgie, bei entwicklungsbedingten oder traumatogenen Formabweichungen)

- zur Auffüllung größerer gekammerter (zystischer) Knochendefekte zur Prophylaxe von Komplikationen (z.B. Infektionen, pathologische Frakturen)
- zur Ermöglichung einer (implantat-) prothetischen Rehabilitation

Zur Therapie von Knochendefekten stehen in Abhängigkeit von der Art des Defektes sowie dessen Größe verschiedene Transplantate (d.h. autologer Ersatz) sowie heterologe, xenogene oder alloplastische Knochenersatzmaterialien (KEM) zur Verfügung. Für die Auswahl eines geeigneten Transplantates oder Ersatzmaterials ist weiterhin die biologische Kompetenz der Empfängerregion zu berücksichtigen. So entscheidet beispielsweise nicht nur die Länge eines Unterkieferkontinuitätsdefektes über die Wahl eines freien oder gefäßgestielten Knochentransplantates, sondern auch eine etwaige Kompromittierung des Implantatlagers, z.B. infolge von Bestrahlung im Rahmen einer Tumortherapie [22,80,83,84]. Auch die Art und Beschaffenheit des angrenzenden bzw. bedeckenden Weichgewebes kann ausschlaggebend für die Wahl eines bestimmten Transplantates oder KEM sein.

Die kleinste Größe eines intraossären Defektes, der nicht spontan während der Lebenszeit eines Individuums abheilt (bei Nichtvorhandensein lokal oder systemisch kompromittierender Konditionen), ist definiert als Defekt kritischer Größe (critical size defect, CSD) [1]. Diese maximale Größe knöchern begrenzter Defekte ist speziesabhängig und beträgt beim Menschen etwa 1,5-2cm im Durchmesser. Wird diese Defektgröße überschritten, kann nicht mit einer spontanen knöchernen Ausheilung gerechnet werden, da das intraossäre Blutkoagel zerfällt bzw. sich verflüssigt und somit die Bildung eines suffizienten Kallusgewebes unterbleibt [89]. In derartigen Fällen besteht die Indikation zur Auffüllung des Defektes mit dem primären Ziel, das Koagel zu stabilisieren und somit den Grundstein für die darauffolgende Ossifizierungskaskade zu legen.

Die klinisch in der Regel am einfachsten zu handhabende Defektsituation ist eine höhlenartige (zystische) Läsion, da der Defekt nahezu allseitig von Knochengewebe umgeben ist. Der Goldstandard zur Auffüllung größerer zystischer Defekte besteht in der Verwendung von autologem spongiösem Knochen, vorzugsweise vom Beckenkamm [7,80,83,84]. Vorteile der autologen Knochentransplantation sind eine hohe therapeutische Sicherheit, da nicht mit immunologischen Phänomenen oder

unspezifischen Fremdkörperreaktionen zu rechnen ist. Nach biologischer Integration einschließlich entsprechender Umbauvorgänge findet sich im ehemaligen Defekt vitales sowie strukturell und funktionell vollwertiges Knochengewebe. Nachteile sind in erster Linie die limitierte Verfügbarkeit sowie eine entsprechende Entnahmemorbidity. Diese Einschränkungen können grundsätzlich durch den Einsatz körperfremder KEM umgangen werden.

Diese Materialien können allogener (z.B. humaner aufbereiteter Spenderknochen) [89,108], xenogener (z.B. tierische Kollagenpräparate, mineralische Präparate tierischen Ursprungs) [22] oder alloplastischer (synthetischer) Herkunft sein und kommen bevorzugt in nicht kraftbelasteten Defektregionen zum Einsatz. Sie sollen vorrangig als poröse Leitstruktur für einwachsenden Knochen aus der Umgebung dienen (Osteokonduktion). Da allogene und xenogene Materialien aufgrund möglicher immunologischer Phänomene sowie wegen der potentiellen Gefahr eines Pathogentransfers (z.B. Viruspartikel) problematisch sein können, liegt der Focus von Forschung und Entwicklung vorwiegend auf dem Einsatz synthetischer Materialien. Diese stammen aus unterschiedlichen Werkstoffklassen wie Calciumphosphat-Keramiken und -Zementen, Biogläsern [37] oder resorbierbaren Polymeren [100].

<i>Vorteile</i>	<i>Nachteile</i>
autogenes Knochentransplantat	
<ul style="list-style-type: none"> - keine Immunreaktion - osteokonduktiv - osteoinduktiv (begrenzte Menge an Wachstumsfaktoren) - osteogen (Transplantation vitaler Zellen) 	<ul style="list-style-type: none"> - limitierte Verfügbarkeit - Entnahmemorbidität - Komplikationen (Infektionen, Blutverlust, Nervverletzungen, Hämatome, Frakturen)
allogene und xenogene KEM	
<ul style="list-style-type: none"> - osteokonduktiv - praktisch unlimitierte Verfügbarkeit 	<ul style="list-style-type: none"> - mögliche Immunreaktion - möglicher Pathogentransfer - u.U. inkonstante Zusammensetzung und damit unterschiedliches biologisches Verhalten
alloplastische (synthetische) KEM	
<ul style="list-style-type: none"> - unlimitierte Verfügbarkeit - osteokonduktiv - Osteoinduktivität realisierbar durch Zusatz von Wachstumsfaktoren - Grundsätzlich freie Wahl von Mikro- und Makrogeometrie sowie Degradation 	<ul style="list-style-type: none"> - mögliche Fremdkörperreaktionen - teilweise keine oder nur unvollständige Degradation je nach Zusammensetzung

Tabelle 1: Einteilung von Knochenersatzmaterialien nach ihrer Herkunft. Die jeweils wichtigsten Vor- und Nachteile sind aufgeführt [3,5,8,16,21,22,77,86,90,98,105].

1.3 Calciumphosphate (CaP) als Knochenersatzmaterialien

Bei der Entwicklung synthetischer KEM werden aufgrund der chemischen Ähnlichkeit mit der mineralischen Knochenphase vorwiegend Materialien favorisiert, die eine Calciumphosphat-Chemie aufweisen [34]. Dabei basieren die meisten kommerziellen Produkte auf Hydroxylapatit sowie α - oder β -Tricalciumphosphat. Andere CaP-Phasen wie Brushit spielen eine untergeordnete Rolle. Die Materialien werden als keramische (monolithische) Implantate, Pulver / Granulate oder formbare Zemente eingesetzt. Daneben finden sie mitunter Anwendung als Beschichtung auf metallischen Implantaten [19,46,47].

Ein entscheidender Nachteil keramischer Formkörper (Hydroxylapatit-Keramik) besteht in der hohen Kristallinität und Gefügedichtigkeit, einhergehend mit einer sehr geringen chemischen Löslichkeit im physiologischen Milieu [46]. Möglich ist allenfalls eine osteoklastäre, säurekatalysierte Auflösung an der Implantatoberfläche. Insofern kommen derartige Materialien praktisch ausschließlich als permanente Implantate zum Einsatz, eine knöcherne Regeneration unterbleibt also. Andererseits bieten keramische Formkörper den Vorteil einer hohen Formstabilität am Anwendungsort.

Im Gegensatz hierzu werden partikulierte KEM, also Granulate oder Pulver, am Anwendungsort lediglich durch koaguliertes Blut vernetzt und weisen somit eine sehr geringe mechanische Festigkeit bzw. Formstabilität auf. Dafür gestatten sie eine gewisse Modellierbarkeit am Anwendungsort. Bedingt durch ihre wesentlich größere Makroporosität im Vergleich zu keramischen Formkörpern gestatten Granulate ein deutlich besseres Einwachsen von Nachbargewebe (idealerweise Knochen) in den augmentierten Defekt (Osteokonduktion). Geht dies mit einer vollständigen Degradation der Materialien einher, besteht die Möglichkeit einer kompletten knöchernen Regeneration des ehemaligen Defektes. Andernfalls werden die Partikel vom einwachsenden Knochengewebe gewissermaßen eingemauert. Es resultiert dann ein sogenanntes osseokeramisches Regenerat [36], welches, je nach Anwendungsort, eine durchaus suffiziente Biofunktionalität (z.B. Stützen von Weichgeweben) aufweisen kann.

Die Werkstoffklasse der Calciumphosphat-Zemente vereint Vorteile von partikulierten KEM und monolithischen Formkörpern, indem sie eine freie Formbarkeit am Anwendungsort und eine (zumindest initial) hohe Formstabilität gewährleistet. Die freie Modellation im Operationssitus kann jedoch bei komplexen Defektgeometrien oder in ästhetisch anspruchsvollen Regionen problematisch sein. Im Gegensatz zu den Keramiken, die durch Sinterung hergestellt werden, binden Zemente bei Raumtemperatur ab und gestatten somit auch den Zusatz thermolabiler Wirkstoffe zur Zementmatrix [61,65].

Grundsätzlich bestehen Knochenzementsysteme aus Calciumorthophosphaten, die phasenrein oder als Mischung verschiedener CaP-Phasen vorliegen. Nach Anmischung einer Paste mit einem wässrigen Elektrolyten kommt es zur Abbindereaktion, bei der je nach vorliegendem Milieu unterschiedliche Endprodukte entstehen können. Bei

physiologischer Temperatur bildet sich bei $\text{pH} > 4,2$ nanokristalliner Hydroxylapatit, bei $\text{pH} < 4,2$ entsteht Brushit. Im Gegensatz zu ersterem besitzt Brushit eine gute chemische Löslichkeit im physiologischen Milieu [26].

Für größere, geometrisch komplexe und im Schädelbereich damit ästhetisch meist auch anspruchsvolle Defekte sind Materialien wünschenswert, welche die Vorteile der verschiedenen Werkstoffklassen (monolithische Keramiken einerseits, Zemente andererseits) vereinen. Zu fordern sind präformierte, defektspezifische Formkörper, welche eine hohe Porosität aufweisen und grundsätzlich degradierbar sein sollen. Auch eine direkte Modifizierbarkeit mit (thermosensiblen) Wirkstoffen während der Herstellung wäre wünschenswert. Die Herstellung solcher präformierten Implantate kann bei Raumtemperatur mit Hilfe bestimmter Rapid-Prototyping Verfahren, insbesondere dem 3D-Pulverdruck, erfolgen.

1.4 3D-Pulverdruck

Beim 3D-Pulverdruck handelt es sich um ein jüngeres Rapid Prototyping Verfahren, welches die Herstellung geometrisch komplexer Strukturen mit einer Auflösung bzw. Präzision im Zehntelmillimeter-Bereich gestattet. Grundsätzlich gehören Rapid Prototyping Techniken zu den generativen Fertigungsverfahren, bei denen durch das Aufeinanderfügen einzelner Schichten dreidimensionale Formkörper hergestellt werden können [29].

Beim 3D-Pulverdruck wird dabei ein Bindemittel bzw. ein flüssiger Reaktand über einen Druckkopf zweidimensional in der x-y-Ebene auf eine Pulverschicht gesprüht. Dabei kommt es zur orts aufgelösten Verklebung der einzelnen Partikel. Nach Fertigstellung solch einer zweidimensionalen Schicht erfolgt die Bedeckung selbiger mit frischem Pulver und der Vorgang wiederholt sich in gleicher Art und Weise (Realisierung der z-Achse). Durch Angleichen der Druckparameter (z.B. Geschwindigkeit) an das Abbindeverhalten der Materialien können sich die einzelnen Schichten miteinander vereinigen. Somit wird die Herstellung einer dreidimensionalen Geometrie realisiert. Die Formgebung wird dabei über Computerdatensätze gesteuert. Ein virtuelles 3D-Modell wird mit mathematischen Methoden in einzelne Schichten zerlegt, die anschließend durch den Prototypen physikalisch abgebildet werden.

Zur kommerziellen Nutzung des Verfahrens werden Polymer-modifizierte Gipspulver oder Cellulosepulver verwendet, die nach Besprühen mit der Binderlösung anquellen und die Struktur verfestigen [45,54].

Bemühungen zur Herstellung Calciumphosphat-basierter Strukturen, bestehend aus Hydroxylapatit [91] oder Tricalciumphosphat [72], basieren vielfach auf einem quellfähigen Polymer als Binder. Dieser muß nach dem Druckvorgang dem Bauteil entzogen und selbiges durch Sinterung verfestigt werden, verbunden mit starken Schrumpfungen des Formkörpers [91].

Alternativ kann durch Auswahl geeigneter Reaktanden auch eine Aushärtung des Bauteils durch eine chemische Reaktion zwischen Binderflüssigkeit und Pulver während des Druckvorgangs stattfinden. Diesbezüglich wurden experimentell eine Reihe verschiedener Materialsysteme in den Pulverdruck eingeführt, beispielsweise Zinkoxid / Magnesiumoxid für Polyacrylsäurebinder [73] oder Polymilchsäure (PLA) mit Chloroform [32]. Durch Einführung spezieller Reaktanden in den Pulverdruck konnte schließlich die Herstellung Calciumphosphat-basierter Strukturen durch eine hydraulische Zementabbindereaktion realisiert werden [28,42,51]. Diese bietet den Vorteil, daß eine Verfestigung des Formkörpers durch eine Sinterung nicht erforderlich ist, was wiederum eine wesentlich bessere dimensionale Präzision aufgrund der fehlenden Schrumpfung sowie die grundsätzliche Verarbeitbarkeit thermolabiler Substanzen bei Raumtemperatur ermöglicht.

1.5 Einführung eines Pulver-Binder-Systems auf Calciumphosphatbasis

Die in den eigenen Versuchen zur vorliegenden Arbeit eingesetzten Reaktanden gehen auf umfangreiche Vorarbeiten des Lehrstuhls für Funktionswerkstoffe in Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg zurück [27,28,39]. Hierbei wurde ein spezielles Pulver-Binder-System entwickelt, welches hydraulisch in einer Zementabbindereaktion zur Verfestigung Calciumphosphat-basierter Strukturen führt. Voraussetzung hierfür ist die Einstellung eines sauren pH-Wertes (<4,2) während der Abbindereaktion [9,48,58]. Daher kommt als Reaktand neben dem Tricalciumphosphatpulver als flüssige Phase Phosphorsäure zum Einsatz. In der Abbindereaktion bildet sich Dicalciumphosphat Dihydrat (Bruskit).

Um den Druckvorgang in angemessener Zeit und mit hinlänglicher geometrischer und dimensionaler Präzision zu gewährleisten sowie um wünschenswerte physikalische Eigenschaften der Objekte zu realisieren, müssen verschiedene Parameter optimal eingestellt sein. Hierzu zählen die Zusammensetzung und der Mahlgrad des Pulvers, die Konzentration des flüssigen Reaktanden und damit letztlich auch die Geschwindigkeit der Abbindereaktion.

Das Pulver muß eine gute Streichfähigkeit zu dünnen, 100-200 µm dicken Schichten besitzen. Diese dürfen beim Ausstreichen weder einreißen noch eine inhomogene Dickeverteilung aufweisen. Die Streichfähigkeit des Pulvers ist in erster Linie abhängig von dessen Mahlgrad. Zudem muß die Schüttdichte des Pulvers für das Drucken von Bauteilen mit hoher Dichte möglichst hoch, sowie die Agglomeratbildung möglichst gering sein. Dies wurde durch die Verwendung von Korngrößen im Bereich von 20-50µm erreicht. Kleinere Körnungen sind problematisch, da sie einerseits schlecht streichfähig sind und andererseits zur Verklumpung beim Drucken führen. Die Konzentration der Phosphorsäure wurde mit 20% so gewählt, daß einerseits eine ausreichend hohe Kompressionsfestigkeit und andererseits eine möglichst große Porosität der Formkörper realisiert werden kann. Beachtet werden muß bei der Einstellung des flüssigen Reaktanden auch dessen Viskosität, die für das Druckverfahren (Versprühen mittels Druckkopf) geeignet sein muß. Ein weiteres wichtiges Kriterium ist eine ausreichend schnelle Abbindereaktion, da es sonst aufgrund der Kapillarkräfte im Pulverbett zu einem Verlaufen der Flüssigkeit und damit zu einem Präzisionsverlust kommt. Die Abbindereaktion darf aber auch nicht zu schnell erfolgen, da ansonsten in Abhängigkeit von der Objektgröße eine Fusion der einzelnen Schichten miteinander unterbleibt.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkulturtechnik

2.1.1 Nährmedien, Zusätze und Puffer

MEM α -Medium

Fertiges Flüssigmedium (ohne Ribonukleoside und Desoxyribonukleoside, mit L-Glutamin, GIBCO BRL (Life Technologies, Karlsruhe), dem vor Verwendung 10% FCS und 1% Penicillin-/Streptomycin-Lösung zugesetzt wurden.

FCS

Fetales Kälberserum (steril filtriert, PAN, Aidenbach), das nach Aliquotierung bei -20°C gelagert wurde. Es wurde dem MEM α -Medium nach 30minütiger Inaktivierung im Wasserbad bei 56°C in einer 10%igen Konzentration beigefügt.

Penicillin-/Streptomycin-Lösung

Gebrauchsfertige Antibiotikallösung (steril filtriert, PAN, Aidenbach), die 10mg Streptomycin und 10.000 Units Penicillin je 100ml enthält und nach Aliquotierung bei -20°C gelagert wurde. Sie wurde dem Nährmedium in 1%iger Konzentration zugesetzt [v/v].

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

Gebrauchsfertiger Puffer (ohne Mg^{2+} , ohne Ca^{2+} , steril filtriert, PAN, Aidenbach), der zum Entfernen von Mediumresten aus Zellkulturflaschen und zum Reinigen und Spülen von Zellkulturen verwendet wurde.

NaCl	120mM
KCl	2,7mM
Phosphatpuffersalze (Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)	10mM
pH bei 25°C	7,4

Accutase

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

DMSO (Dimethylsulfoxid)

Dient zur Herstellung des Einfriermediums, Lagerung bei -20°C (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

2.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Brutschrank	HERACell (Heraeus, Hanau)
Sterilbank	HERASafe KS 12 (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge	Hettich Universal 320R
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)

Verbrauchsmaterialien

Petrischalen	Falcon-Standard-Petrischale, Polystyrol, d=35 und 100mm (Becton Dickinson, Heidelberg)
Kulturflaschen	Easy Flask, 200ml (Hartenstein, Würzburg)
Zentrifugenröhrchen	50ml, Polypropylen, Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg)
Pipettenspitzen	Hartenstein, Würzburg
Kryo-Röhrchen	2ml, 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

2.1.3 Zell-Linie

MC3T3-E1 murine Fibroblasten Linie mit Potenz zur osteogenen Differenzierung *in vitro*, isoliert aus fetaler Kalvaria, immortal, (DSMZ, Braunschweig)
Es wurden die laborinternen Passagen 2 bis 4 verwendet.

2.1.4 Konservieren von Zellen in Flüssigstickstoff

Ernten und Einfrieren von Zellen

Nach vollständigem Absaugen des Mediums wurden die Zellkulturen einmal mit PBS gespült, mit Accutase bedeckt und für 10min im Brutschrank inkubiert. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50ml Zentrifugenröhrchen mit 10ml Nährmedium überführt und zentrifugiert (1000min^{-1} , 5min, RT). Danach Abnehmen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 10ml Nährmedium und erneutes Zentrifugieren (Waschvorgang). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 1ml Nährmedium aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Danach Zugabe von 1ml Einfriermedium, Überführung der Kryo-Röhrchen in eine Isopropanol-Box bei -

80°C für eine Woche und schließlich Lagerung in einem Flüssigstickstofftank bei -196°C.

Auftauen von Zellen

Die Kryo-Röhrchen wurden vom Flüssigstickstoff zum Auftauen in ein 37°C Wasserbad überführt. Anschließend wurde die aufgetaute Zellsuspension in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben, 10ml Nährmedium zugefügt und bei RT zentrifugiert (1000min^{-1} , 5min). Es folgte ein Waschvorgang zum Entfernen des restlichen Einfriermediums. Anschließend wurden die Zellen in Medium resuspendiert und nach einer Zellzählung zum Anlegen neuer Kulturen verwendet.

2.1.5 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellkonzentration in Suspensionen wurde mit dem Casy 1 Cell Counter und Analyser System, Modell TTC (Innovatis AG, Reutlingen) durchgeführt. Dazu werden die Zellen in einer Elektrolytlösung (Aqua isotona III, Beckmann Coulter, Krefeld) suspendiert und mit konstanter Geschwindigkeit durch die 150µm-Messkapillare des Cell Counter Systems gesaugt. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte nach dem Stromausschlußverfahren und anhand einer Pulsflächenanalyse. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran stellen elektrische Isolatoren dar, während bei avitalen Zellen mit defekter Zellmembran der elektrische Widerstand sinkt. Vitale Zellen werden mit ihrer tatsächlichen Größe gemessen, während bei avitalen Zellen nur das Zellmatrixvolumen bestimmt wird. Somit ist eine Differenzierung beider möglich [33].

Zur Konzentrationsbestimmung einer Zellsuspension (Stammsuspension) wurden 10µl dieser Suspension in ein Zellzählröhrchen mit 990µl A. isotona gegeben, gründlich gemischt und der Messung zugeführt. Entsprechend der Größe der verwendeten MC3T3-E1 - Zellen wurde ein Messbereich zwischen 0 und 30µm voreingestellt und das Messfenster für vitale Zellen zwischen 12 und 30µm festgelegt. Je Probe wurden automatisiert 3 Einzelmessungen mit Volumina von je 200µl durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Durch die verwendete Software CASYstat (innovatis AG,

Reutlingen) wurde der Verdünnungsfaktor eingerechnet und die Zellzahl pro 1ml unverdünnter Zellsuspension angegeben.

2.2 Herstellen der Trägerstrukturen mittels 3D-Pulverdruck

Die Herstellung der Scaffolds erfolgte bei Raumtemperatur im 3D-Pulverdruckverfahren. Hierzu wurde ein handelsübliches Pulverdruckgerät (Z 310, Z-Corporation, Burlington, USA) verwendet [107].

Eine Modifizierung des kommerziellen, mit Gipspulver und einem speziellen Binder arbeitenden Systems erfolgte hinsichtlich der eingesetzten Reaktanden wie folgt: Phosphorsäure mit einer Konzentration von 20% wurde als flüssiger Binder auf Tricalciumphosphatpulver, welches die feste Phase darstellte, gedruckt. Das Tricalciumphosphatpulver wurde zu 45% aus α -TCP und zu 55% aus β -TCP eingestellt.

In der darauf folgenden hydraulischen Abbindereaktion kommt es innerhalb von Sekunden zur Bildung von Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Bruskit), entsprechend der folgenden Gleichung:



Die relative schnelle Abbindereaktion ermöglicht die schichtweise Kreation solider Strukturen. Der Druck erfolgte in einer Schichtdicke von 100 μm . Unmittelbar nach dem Druckvorgang wurden die Strukturen aus dem Pulverbett entnommen, überschüssiges Pulver verblasen und die Strukturen durch Einlegen in 20%ige Phosphorsäurelösung für 1h nachgehärtet. Nach Endhärtung der Trägerstrukturen wurden diese durch Einlegen in 70% Ethanol für 8h sterilisiert. Nach Lufttrocknung unter der Sterilbank konnten die Scaffolds schließlich in der Zellkultur eingesetzt werden.

Die Herstellung des Tricalciumphosphatpulvers erfolgte durch Sinterung von Pulvermischungen von Calciumhydrogenphosphat (DCPA, Baker, Griesheim) und Calciumcarbonat (Merck, Darmstadt). Zur Herstellung der Pulvermischung wurden die entsprechenden Mengen Calciumhydrogenphosphat und Calciumcarbonat in 400ml

Isopropanol mindestens 1h mit einem Magnetrührer dispergiert; anschließend wurde die Dispersion in einem Rotationsverdampfer eingedampft. Die Sinterkuchen wurden nach Ablauf der Sinterdauer an Luft abgeschreckt. Der abgekühlte Sinterkuchen wurde jeweils mit dem Mörser zerkleinert und manuell auf eine Korngröße $< 160\mu\text{m}$ gesiebt. Die Pulver wurden im folgenden mit Achat-Mahlwerkzeugen in einer Kugelmühle aufgemahlen.

Das Makrodesign der Trägerstrukturen erfolgte mit dem CAD Programm Think3 Design Xpressions (think3, Cincinnati, USA). Die Scaffolds wurden zylindrisch mit einem Durchmesser von 15mm und einer Höhe von 2mm konstruiert, um eine gute Passung in 24 well-Zellkulturplatten zu gewährleisten (Abb. 1). Die Übertragung an den Drucker erfolgte im STL-Datenformat. Die Fabrizierung erfolgte mit einer Präzision von $\pm 200\mu\text{m}$.



Abb. 1:
Bruschi-Scaffold

2.3 Kontrollträger aus Titan und Kupfer

Zur Bewertung der Ergebnisse der einzelnen Zellkulturversuche wurden Positiv- und Negativkontrollen etabliert. Hierzu wurden die Zellen in gleicher Weise auf Titan- (Positivkontrolle) sowie auf Kupfer- (Negativkontrolle) Träger ausgesät (Abb. 2). Die Kontrollträger verfügten über eine den Bruschi-Scaffolds entsprechende Geometrie (gleicher Durchmesser, herstellungsbedingt geringere Dicke). Die Wahl fiel auf die

genannten Materialien wegen deren bekannter ausgeprägter Zytokompatibilität (Titan) bzw. Zytotoxizität (Kupfer) in Bezug auf Knochenzellen [93,96].

Die Fertigung der Kontrollträger erfolgte am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe in der Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg durch Stanzen entsprechender Bleche (Reintitan und Kupfer) mit der Stärke von 1mm.

Die Reinigung der Kontrollträger vor Einsatz im Zellkulturversuch erfolgte durch sukzessives Einlegen in verschiedene Reinigungslösungen (20%ige Natriumlaurylsulfat-Lösung, 5%ige Extranlösung und 99,9%ige Isopropanollösung) für jeweils 10 Minuten. Der Behälter mit Reinigungsmittel und Trägern befand sich in einem Ultraschallbad mit 40°C warmem Wasser. Nach jeder Reinigungslösung erfolgte ein 10minütiger Waschvorgang in Reinstwasser. Anschließend wurden die Kontrollträger luftgetrocknet, eingeschweißt und für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

Materialien:

Natriumlaurylsulfat	SDS Ultra Pure (Roth, Karlsruhe)
Universalreiniger	Extran MA 03 alkalisch (Merck, Darmstadt)
Isopropanol	99,9% (Roth, Karlsruhe)

Geräte:

Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 102 H (Bandelin, Berlin)
------------------	---



Abb. 2:

24 well Platte mit Bruscht-Trägern (links) sowie Kontroll-Trägern aus Titan (mittig) und Kupfer (rechts), jeweils bedeckt mit Medium

2.4 Quantifizierung der Zellviabilität mittels WST-1-Assay

WST-1 (4-[3-(Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) ist ein Tetrazolium-Salz, das durch die NADH-Dehydrogenase (mitochondriales Enzym) durch Öffnen des Tetrazol-Ringes zu Formazan reduziert wird. Bei dieser Reduktion kommt es zu einer Farbänderung von Hellrot nach Dunkelrot, die eine photometrische Quantifizierung der Enzymaktivität gestattet (Absorptionsmaximum von Formazan bei 440nm). 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 [71].

Nach Absaugen des alten Mediums wurden 1000µl frisches Medium und 50µl WST-1-Reagenz (gebrauchsfertig in PBS gelöst, Roche Diagnostics, Mannheim) in die Wells gegeben und für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. 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 100µl der Lösung auf eine 96-Well-Platte pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 440nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm bestimmt (Zweifachbestimmung). Bei jeder Messung wurde der Leerwert mitbestimmt (Wells ohne Zellen, mit Trägerstruktur, 1000µl Medium, 50µl WST-1-Reagenz) und von den Messwerten subtrahiert.

2.5 Bestimmung der Alkalische-Phosphatase-Aktivität

Die Alkalische Phosphatase ist ein membranständiges, Phosphorsäureester hydrolysierendes Enzym. Beim Menschen unterscheidet man verschiedene, teils gewebespezifische Isoenzyme. Im Knochengewebe existieren drei osteoblastäre Isoformen, die eine wichtige Rolle bei der Knochenmineralisation zu spielen scheinen. *In vitro* gilt die ALP als typischer Marker im osteoblastären Differenzierungszyklus, welcher bereits in einem frühen Zellkulturstadium von osteoblastären Zellen gebildet wird [56].

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase kann photometrisch, über den Umsatz von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol (Absorptionsmaximum bei 405nm), bestimmt werden. Zur Bestimmung der ALP-Aktivität einer Zellkultur wurde eine Standard-Eichgerade herangezogen, welche mit ansteigenden Konzentrationen von (0 bis 200mM) p-Nitrophenol-Lösungen erstellt wurde.

Die bei -20°C gelagerten Zellpellets wurden aufgetaut, in 1000µl PBS resuspendiert und gevortext. 200µl der Zellsuspension wurden in ein neues Reaktionsgefäß (1,5ml) gegeben, mit 400µl des zuvor angesetzten Lysepuffers gemischt und danach für 1h bei 37°C auf einem Schüttelgerät (GLW, Würzburg) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Beifügen von 400µl 50mM NaOH beendet. Es folgte das Abzentrifugieren von Zellfragmenten (5min, 11000min⁻¹, RT, Heraeus Biofuge 13). Die Bestimmung der optischen Dichte (Gelbfärbung) erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 405nm auf 96-well Mikrotiterplatten (Zweifachbestimmung mit 2x200µl). Außerdem wurde bei jeder Messung eine Leerwertbestimmung durchgeführt, bei der 200µl PBS statt des Zell-Lysats verwendet wurden. 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)

2.6 Osteocalcin-Bestimmung

Osteocalcin ist ein von Osteoblasten sezerniertes Peptidhormon, welches an die extrazelluläre nichtkollagene Knochenmatrix bindet. Es kann über γ -Carboxyglutamylreste Kalziumionen binden und dadurch die Bildung von Hydroxylapatit-Kristallen einleiten. In der Zellkultur gilt Osteocalcin als fortgeschrittener osteoblastärer Differenzierungsmarker [36].

Die Osteocalcin-Bestimmung erfolgte aus dem verbrauchten Zellkulturmedium im Rahmen des Mediumwechsels alle 2 Tage. Dazu wurden jeweils 500 μ l Medium aus den Wells entnommen, in Probengefäße überführt und bei -20°C für 2-3 Wochen bis zur gemeinsamen Messung gelagert. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe eines gebrauchsfertigen ELISA-Kit (Metra Osteocalcin Kit Osteomedical GmbH, Bünde) entsprechend den Herstellerangaben. Hierzu wurde zunächst mit Hilfe der im Kit enthaltenen Standards und der Kontrollwerte eine Standardkurve erstellt. Die Ermittlung der Osteocalcinkonzentrationen der Proben erfolgte unter Verwendung von je 25 μ l des Zellkulturmediums (Zweifachbestimmung). Außerdem wurden Leerwertbestimmungen mit Zellkulturmedium durchgeführt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450nm.

2.7 Chemische Analyse des Zellkulturmediums

Um die Löslichkeit des Bruschi-Trägermaterials unter Zellkulturbedingungen beurteilen zu können, wurde bei jedem Mediumwechsel das verbrauchte Zellkulturmedium asserviert und bei -20°C gelagert. Am Ende einer Versuchsreihe wurde das Medium aufgetaut und zur Bestimmung des pH-Wertes sowie der Konzentration an freien Ca^{2+} und PO_4^{3-} Ionen verwendet. Die Messung des pH-Wertes wurde mit einem pH-Meter (Level 1 WTW, Weilheim; Elektrode ebenfalls WTW, Weilheim) durchgeführt. Die Bestimmung der Konzentration an Ca^{2+} und PO_4^{3-} -Ionen erfolgte mittels ionenselektiver Elektroden (Perkin Elmer) im Zentrallabor des Institutes für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg.

2.8 Visualisierung der Zellen

Um das Zellwachstum und die Zellmorphologie zu dokumentieren, wurden die mit Zellen besiedelten Trägermaterialien unter einem Lichtmikroskop untersucht. Dazu wurden die Bruschi-Scaffolds nach zweimaligem Waschen mit 2ml PBS für 30 Sekunden mit Fixierlösung überschichtet und mehrmals mit Aqua dest. gespült. Es folgte die Zugabe von 1ml Neutralrot für wenige Sekunden. Nach gründlichem Spülen mit Aqua dest. erfolgte die Eindeckung mit Glycerogelatine und einem Deckgläschen sowie die fotografische Dokumentation.

Weiterhin erfolgten rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der zelltragenden Strukturen. Dazu wurden diese mit PBS gespült und mit eiskaltem Glutaraldehyd fixiert. Nach vier weiteren Spülvorgängen mit PBS wurden die Strukturen mit Aceton ansteigender Konzentration (30%,...,100%) schrittweise dehydriert und nach einer Kritische-Punkt-Trocknung mit Gold bedampft.

Materialien:

Fixierlösung	25ml Citratlösung (Sigma Diagnostics, Taufkirchen) 65ml Aceton (Merck, Darmstadt) 8ml Formaldehyd (Merck, Darmstadt)
Neutralrot	0,5%ige Lösung in Acetatpuffer, pH 5,2 (Sigma, Steinheim)
Glutaraldehyd	6% in PBS (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Aceton	30%, 50%, 75%, 90% und 100% (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Geräte:

Lichtmikroskop	Olympus CK 40 (Olympus, Mikroskopie, Hamburg)
Kritische Punkttrocknung	CPD 030 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein)
Goldbedampfung	K550 (EMITECH, Kent, UK)
Elektronenmikroskop	FEI, Quanta 200, Tschechische Republik

2.9 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

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, eine im 3D-Pulverdruckverfahren hergestellte Trägerstruktur auf Calciumphosphat-Basis (Bruskit) hinsichtlich ihrer Biokompatibilität *in vitro* zu untersuchen. Als Reaktanden zur Herstellung der Strukturen wurden Tricalciumphosphat (Pulver) und Phosphorsäure (Binder) in das Verfahren eingeführt, welche in einer hydraulischen Abbindereaktion zu Calciumhydrogenphosphat Dihydrat (Bruskit) umgesetzt wurden.

Zunächst sollte festgestellt werden, in wieweit das Pulverdruckverfahren zur Fabrizierung einer hohen Stückzahl von Zellkultur-Trägern mit konstanten Materialeigenschaften geeignet ist.

Die Zytokompatibilität der Strukturen sollte anhand der mesenchymalen Zelllinie MC3T3-E1 untersucht werden. Zellproliferation und die Expression typischer osteoblastärer Markerproteine dienten hierbei als Parameter. Weiterhin sollte das Zellkulturmedium hinsichtlich freier Elektrolyte und pH untersucht werden, um die Löslichkeit des Trägermaterials im physiologischen Milieu zu evaluieren.

4 Ergebnisse

4.1 Pulverdruck der Trägerstrukturen

Vor Beschickung des Pulverdruckers mit Reaktanden wurde der Bauraum des Druckers desinfiziert. Anschließend erfolgte die Befüllung mit dem sterilisierten Tricalciumphosphat-Pulver.

Als Druckkopf dienten handelsübliche Tintenstrahldruckpatronen (HP, Palo Alto, Kalifornien, USA), welche zunächst entleert, mehrfach mit A. dest. gespült, mit 70% Ethanol desinfiziert und schließlich mit der Phosphorsäure befüllt und in das Gerät eingesetzt wurden. Limitiert durch das Reservoir des Druckkopfes konnten bis zu 60 Scaffolds in einem Druckvorgang gefertigt werden. Die Druckvorgänge nahmen etwa 12 Minuten in Anspruch und verliefen in der Regel kontinuierlich und problemlos. Die Geometrie der gedruckten Strukturen und deren Oberflächenbeschaffenheit waren hinlänglich konstant.

In umfangreichen Vorversuchen, die nicht Bestandteil dieser Arbeit waren, konnte eine Druckfestigkeit der Strukturen von $23,4 \pm 3,3$ MPa, eine Biegefestigkeit von $3,3 \pm 1,2$ MPa und eine Porosität von 38,8% bei einer mittleren Porengröße von $12,5\mu\text{m}$ erzielt werden.

4.2 Zellviabilität

Auf den Kontrollträgern aus Titan (Positivkontrolle) zeigte sich erwartungsgemäß im Verlauf der Kultivierung ein deutlicher Anstieg der Zellviabilität. Allerdings waren die Werte bei Titan an Tag 7 höher als an den Tagen 9 und 12. Die Zellkulturen auf den Bruschi-Scaffolds zeigten einen kontinuierlichen Anstieg während der Kultivierung über 12 Tage. Die ermittelten Werte blieben aber signifikant unter den jeweiligen Werten von Titan, an Tag 12 etwa 53%. Aufgrund seiner Zytotoxizität blieben bei Kupfer (Negativkontrolle) die Werte erwartungsgemäß auf einem sehr niedrigen Niveau und zeigten im Verlauf keinen signifikanten Anstieg (siehe Abb. 3).

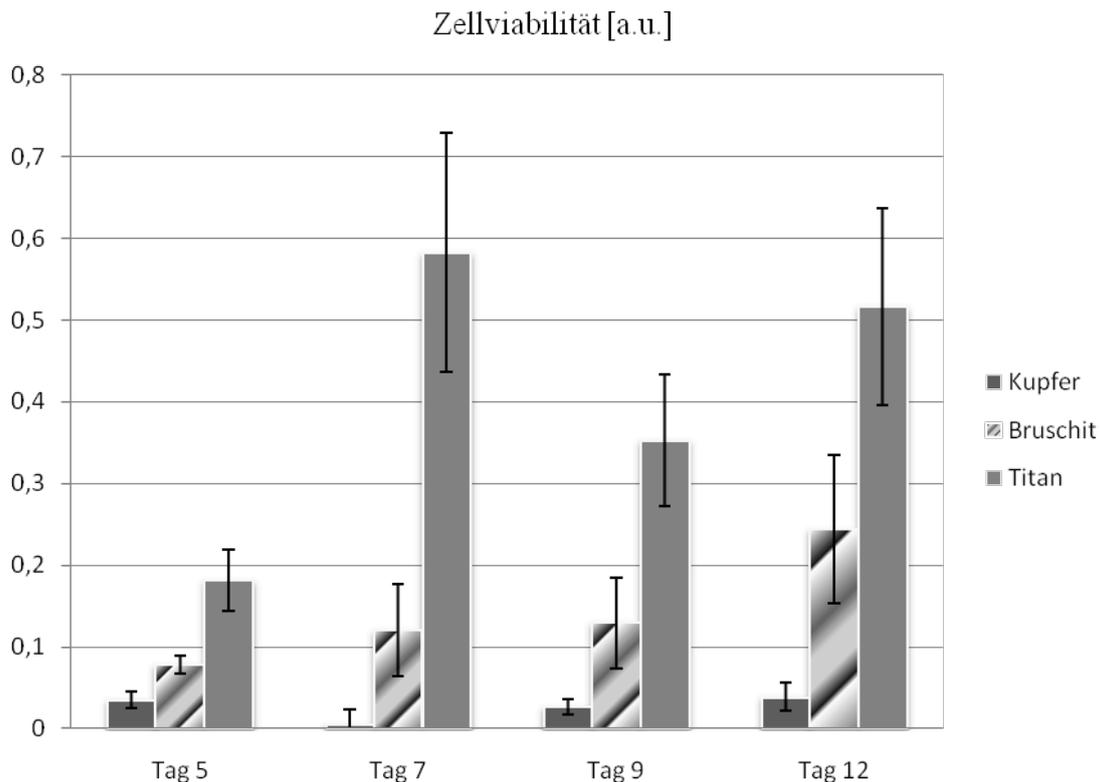


Abb. 3: Zellvitalität (WST-1) der MC3T3-E1 Kulturen auf Brushite-Scaffolds, verglichen mit Titan (Positivkontrolle) und Kupfer (Negativkontrolle). Die jeweiligen Unterschiede zwischen Brushit, Titan und Kupfer waren an den einzelnen Tagen signifikant ($p < 0,05$). Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert von 24 Einzelergebnissen ± 1 SD.

4.3 Aktivität der alkalischen Phosphatase

Der Verlauf der ALP-Aktivität zeigte ein ähnliches Bild: Ein kontinuierlicher Anstieg bei den Titan-Kulturen (Positivkontrolle) bis zu einem Maximum am 9. Tag, gefolgt von einer Abnahme der Aktivität an Tag 12. Bei den Brushit-Kulturen war ein kontinuierlicher Anstieg der Aktivität von Tag 7 bis Tag 12 zu beobachten, die gemessenen Werte blieben jedoch signifikant unter den Werten der Titan-Kulturen. Die ALP-Aktivität bei Brushit betrug an Tag 12 rund 51% der ALP-Aktivität der Titan-Kulturen. Bei Kupfer konnte im gesamten Versuchsverlauf keinerlei ALP-Aktivität nachgewiesen werden (siehe Abb. 4).

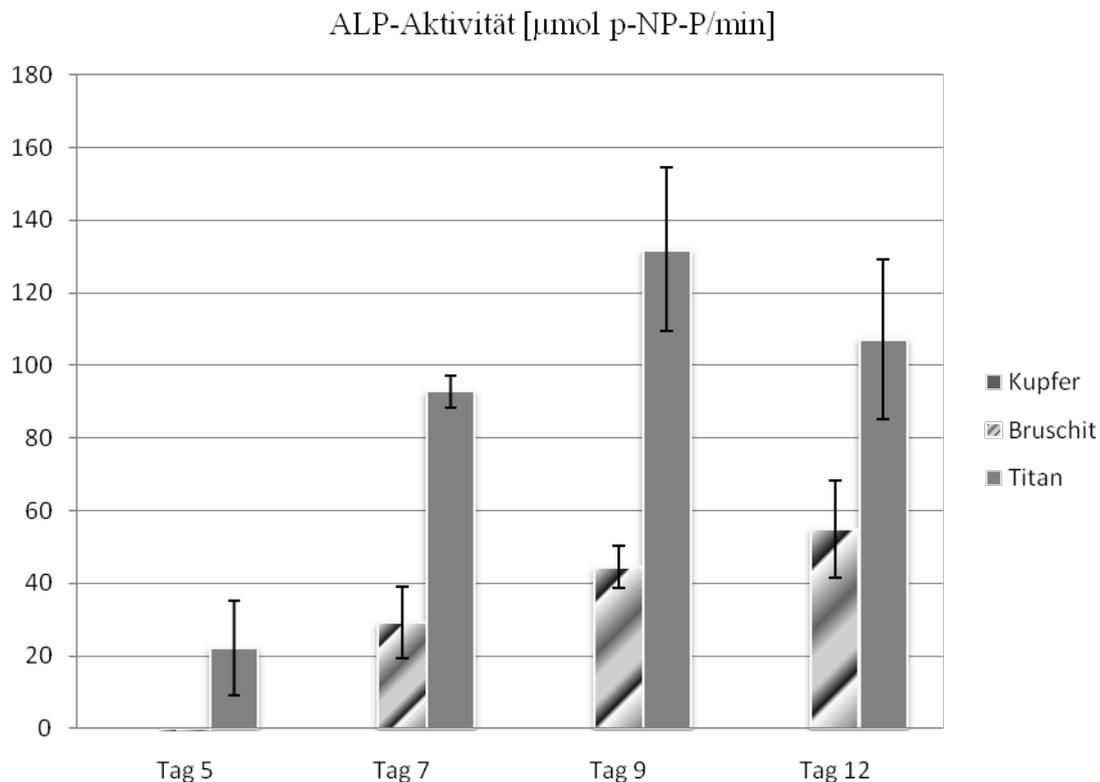


Abb. 4: Aktivität der Alkalischen Phosphatase der MC3T3-E1 Kulturen auf Bruschit-Scaffolds verglichen mit Titan (Positivkontrolle) und Kupfer (Negativkontrolle). Die jeweiligen Unterschiede zwischen Bruschit, Titan und Kupfer waren an den einzelnen Tagen signifikant ($p < 0,05$). Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert von 24 Einzelergebnissen \pm 1 SD.

4.4 Osteocalcin-Bestimmung

Die Messungen der Osteocalcinkonzentration im Kulturmedium mittels ELISA ergaben bei Bruschit im Versuchsverlauf bis zum 12. Tag konstante Werte, die signifikant unter denen von Titan lagen. Aufgrund dieser auffälligen Konstellation wurden im Nachgang Osteocalcin-Bestimmungen von jeweils frischem MEM-Medium und MEM mit FCS-Zusatz durchgeführt. Während bei reinem MEM kein Osteocalcin nachgewiesen werden konnte (nicht abgebildet), wurden bei MEM + FCS Konzentrationen gemessen, die im Bereich der Titan-Kulturen lagen. Die Osteocalcinkonzentration der Zellkultur auf den Bruschit-Scaffolds war signifikant niedriger, zwischen 35-40% im Vergleich zum

reinen Zellkulturmedium. Die Osteocalcinkonzentration der Kupfer-Kontrollkulturen wurde nicht untersucht (siehe Abb. 5).

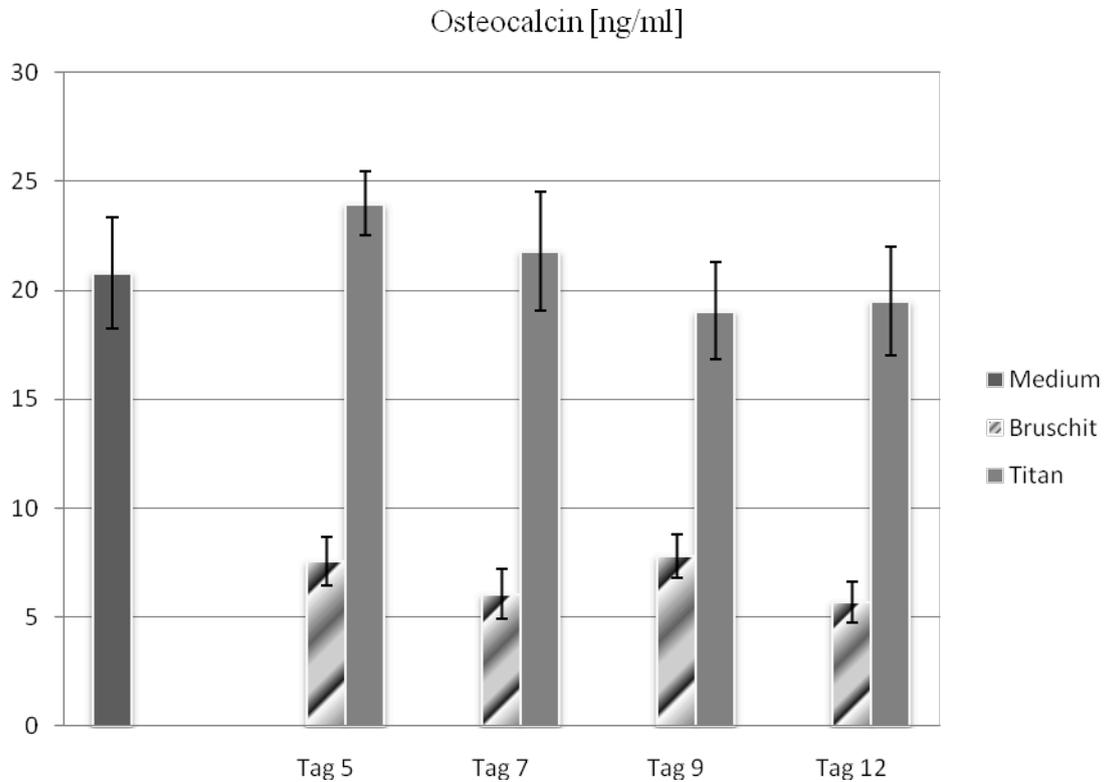


Abb. 5: Osteocalcinkonzentration im Zellkulturmedium. Größenordnungsmäßig ähnliche Werte bei den Titankulturen im Verlauf, in etwa auf dem Niveau des frischen Zellkulturmediums. Im Gegensatz dazu signifikant ($p < 0,05$) reduzierte Werte bei den Bruschit-Kulturen, welche aber im Verlauf ebenfalls auf annähernd gleichem Niveau lagen. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert von 24 Einzelergebnissen ± 1 SD.

4.5 Chemische Analyse des Zellkulturmediums

Während bei den Titan- und Kupfer-Kontrollkulturen der pH-Wert des Mediums im Verlauf der Versuchsdauer größenordnungsmäßig konstant blieb und im Bereich von frischem Nährmedium lag, war bei den Bruschit-Kulturen an allen Versuchstagen ein signifikant erniedrigter pH-Wert des Mediums im Bereich von 7,3 bis 7,5 zu messen.

Die Unterschiede an den einzelnen Versuchstagen innerhalb der Bruschit-Gruppe waren nicht signifikant (siehe Abb. 6).

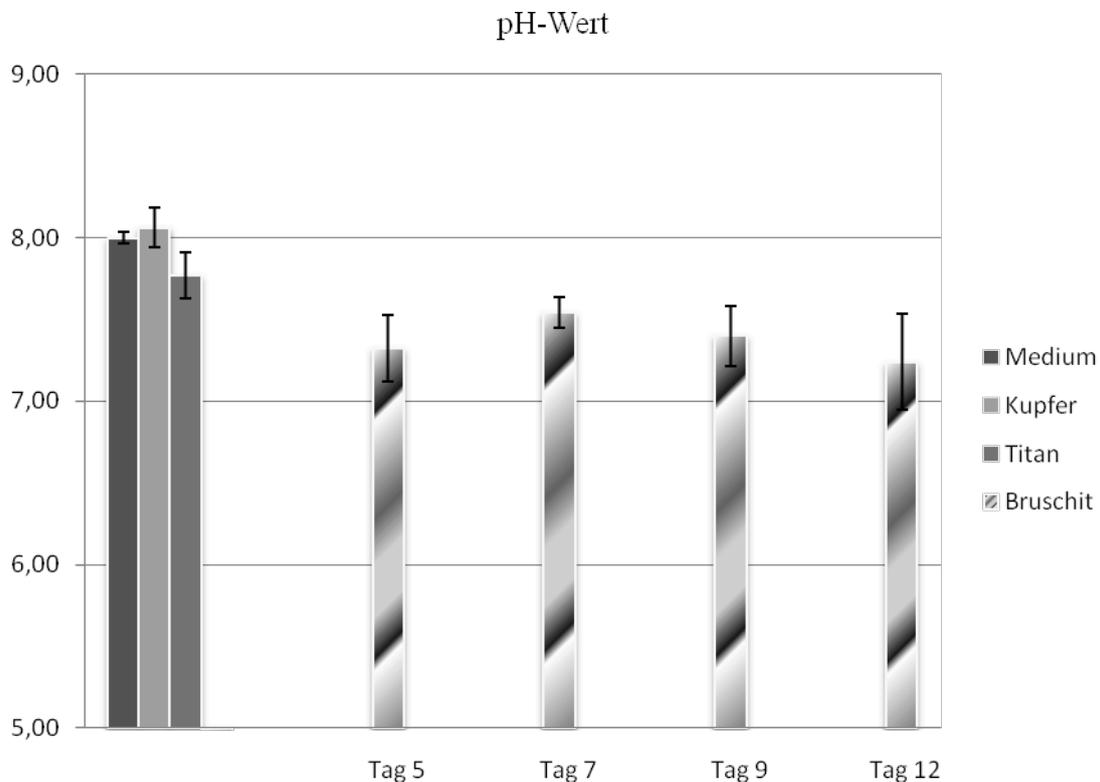


Abb. 6: pH-Werte des Zellkulturmediums im Verlauf. Zur besseren Übersicht und aufgrund der geringen Schwankung sind die Werte von frischem Medium, Titan und Kupfer jeweils nur einfach dargestellt. Der pH-Wert des Mediums der Bruschit-Kulturen war signifikant niedriger ($p < 0,05$) als der der Kontrollen, mit praktisch gleichbleibendem Niveau im Verlauf. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert von 12 Einzelergebnissen ± 1 SD.

Die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen war im Medium der Bruschit-Kulturen an allen Tagen signifikant niedriger als im reinen Zellkulturmedium. Außerdem war im Medium der Bruschit-Kulturen ein kontinuierlicher und teils signifikanter Abfall der Ca^{2+} -Ionenkonzentration im Verlauf zu beobachten. So betrug die Ca^{2+} -Konzentration an Tag 5 rund 60% der Konzentration im frischen Medium, an Tag 12 waren es nur noch 40% (siehe Abb. 7).

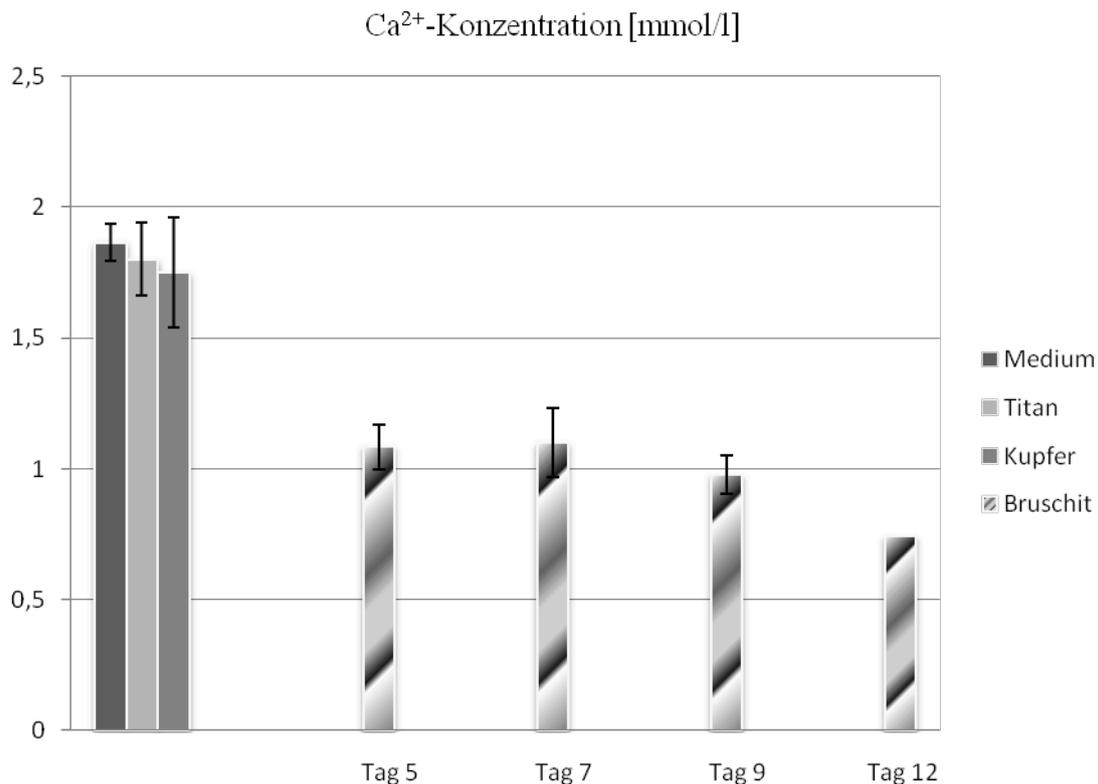


Abb. 7: Konzentration an freien Ca²⁺-Ionen im Zellkulturmedium. Das Medium der Bruschit-Kulturen zeigt eine signifikant niedrigere ($p < 0,05$) Konzentration an Ca²⁺-Ionen verglichen mit dem reinen Zellkulturmedium sowie dem Medium der Titan- und Kupfer-Kulturen. Es zeigte sich eine Abnahme der Messwerte von Tag 7 bis Tag 12. An Tag 12 ist die Reduktion verglichen mit den Vortagen signifikant ($p < 0,05$). Die Messwerte der Kontrollen sind nur einmal abgebildet, da sie im Verlauf praktisch konstant blieben. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert von 12 Einzelergebnissen ± 1 SD.

Die Konzentration an freien PO₄³⁻-Ionen war im Medium der Bruschit-Kulturen an allen Tagen signifikant höher als im reinen Zellkulturmedium. Außerdem war im Medium der Bruschit-Kulturen ein kontinuierlicher und teils signifikanter Anstieg der PO₄³⁻-Ionenkonzentration im Versuchsverlauf zu beobachten. So betrug die PO₄³⁻-Konzentration an Tag 5 rund das 5-fache der Konzentration im frischen Medium, an Tag 12 war es bereits das 8-fache (siehe Abb. 8).

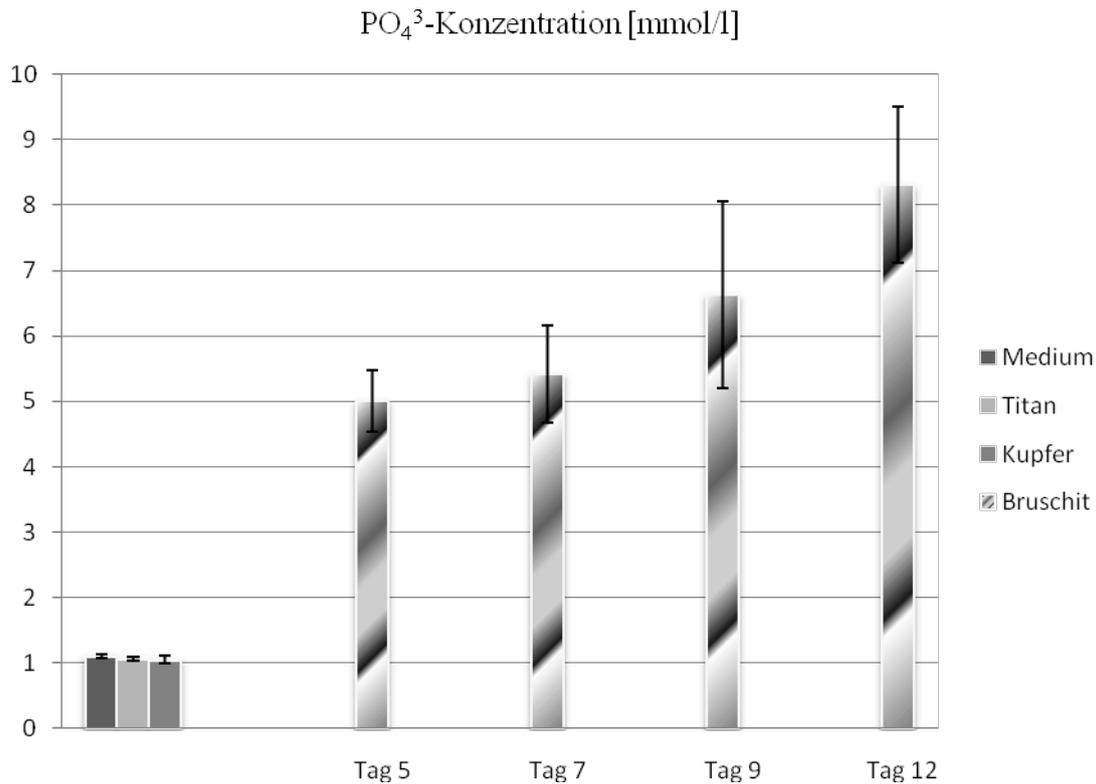


Abb. 8: Konzentration an freien PO₄³⁻-Ionen im Zellkulturmedium. Das Medium der Bruschit-Kulturen zeigte eine signifikant höhere ($p < 0,05$) Konzentration an PO₄³⁻-Ionen verglichen mit dem reinen Zellkulturmedium sowie dem Medium der Titan- und Kupfer-Kulturen. Es zeigte sich ein Anstieg der Messwerte von Tag 5 bis Tag 12, an Tag 9 und Tag 12 jeweils signifikant über den jeweiligen Vortagen. Die praktisch konstant bleibenden Messwerte der Kontrollen sind nur einmal abgebildet. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert von 12 Einzelergebnissen \pm 1 SD.

4.6 Mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums

Das Zellwachstum auf den Bruschit-Scaffolds wurde während des laufenden Versuchs lichtmikroskopisch kontrolliert, nachdem die Trägerstrukturen einschließlich der Zellen fixiert und mit Neutralrot angefärbt wurden. Es konnte über die Kultivierungsdauer von 12 Tagen eine zunehmende Zelldichte auf der Scaffold-Oberfläche beobachtet werden. Aufgrund der Dreidimensionalität der Struktur musste dabei im Auflicht kontinuierlich

durchfokussiert werden. Dabei konnte zwar ein Eindruck über das Zellwachstum erlangt werden, eine quantitative Betrachtung sowie eine genaue Beurteilung der Zellmorphologie ließ sich hiermit aber nicht erzielen. Nach 12 Tagen Kultivierung war auf den Brushit-Scaffolds ein dichter Zellrasen gewachsen. Auf den Titan-Trägern dagegen war der Zellrasen konfluent, was bereits auch makroskopisch als dichter Film erkennbar war.

Rasterelektronenmikroskopisch konnten die raue Oberfläche der Trägerstruktur und die Zellen mit typischer osteoblastärer Morphologie sichtbar gemacht werden.

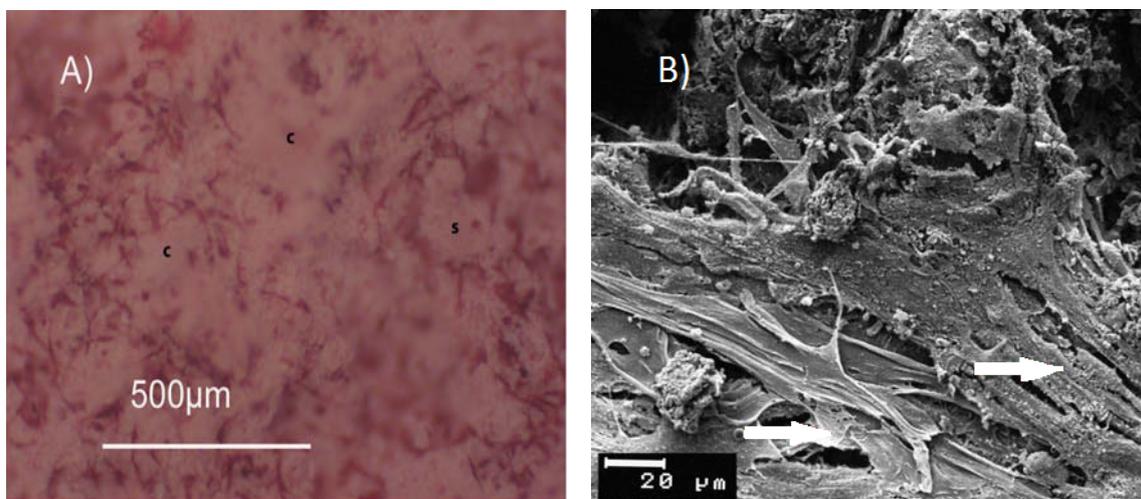


Abb. 9: Lichtmikroskopische Aufnahme der Brushit-Scaffolds nach einer Woche in Kultur, angefärbt mit Neutralrot (A). Erkennbar sind die poröse Trägerstruktur (s) mit Kavitäten (c) und den adhären Osteoblasten. Elektronenmikroskopisches Bild der Zellkulturen nach 12 Tagen Kultivierung (B). Zu sehen sind die raue zelltragende Trägerstruktur im Hintergrund und die zellulären Elemente mit typischer osteoblastärer Morphologie im Vordergrund (Pfeile).

5 Diskussion

5.1 Knochendefekte und Knochenersatz

Ossäre Defekte im Kiefer- und Schädelbereich haben eine hohe Prävalenz wie auch eine außerordentliche klinische Relevanz. Sie entstehen im Rahmen von dentoalveolären Erkrankungen bzw. Eingriffen (z.B. Zystektomien) bis hin zu ausgedehnten pathologischen Prozessen wie z.B. Osteomyelitiden oder Tumoren. Große Defekte mit Kontinuitätsunterbrechung oder völligem Verlust einzelner Knochenbereiche müssen aus Gründen der Stabilität und Funktionalität sowie der Ästhetik rekonstruiert werden. Wesentlich häufiger ist jedoch die Rekonstruktion bzw. Auffüllung kleinerer Defekte erforderlich, um funktionellen und ästhetischen Anforderungen (z.B. im Rahmen einer implantat-prothetischen Versorgung) gerecht zu werden.

Für die Rekonstruktion dieser heterogenen Defekte stehen Materialien unterschiedlicher Substanzklassen und Herkunft zur Verfügung [79]. Man unterscheidet hierbei autologe Knochentransplantate von allogenen und xenogenen Knochenaufbereitungen sowie die alloplastischen bzw. synthetischen Knochenersatzmaterialien. Neben einer Reihe allgemeiner Eigenschaften sollte ein idealer Werkstoff zur Rekonstruktion bzw. zum Ersatz von Knochengewebe drei biologischen Anforderungen gerecht werden: Er sollte osteogen, osteoinduktiv und osteokonduktiv wirksam sein [23].

Diese Voraussetzungen erfüllen bis heute nur frische, autologe Knochentransplantate. Die höchste osteogenetische Potenz hat die zellreiche Spongiosa [87,88]. Während der Osteogenese wird aus überlebenden Präosteoblasten und Osteoblasten des frischen Autotransplantats neuer Knochen gebildet. Außerdem differenzieren sich mesenchymale Vorläuferzellen des Transplantates sowie des Lagergewebes unter dem Einfluss freigesetzter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, insbesondere bone morphogenetic proteins (BMPs), in knochenbildende Zellen. Dieser Vorgang wird mit dem Begriff Osteoinduktion umschrieben [99]. Daneben kommt es zum Einwachsen von Knochen aus dem Empfängerlager in das Transplantat (Osteokonduktion) [15]. Letztendlich wird das (freie) Knochentransplantat hierbei vollständig durch neuen vitalen Knochen ersetzt. Ungeachtet weiterer Vorteile, aber auch Nachteile (siehe 1.2, Tab.1) bietet autologer Knochen eine hohe therapeutische Sicherheit. Daher wird er

nach wie vor bevorzugt zur Rekonstruktion ganzer Skelettabschnitte [38], zur Auffüllung größerer Defekte [80] sowie bei kompromittierter Situation des Implantatlagers [92] eingesetzt.

Für eine Vielzahl zumeist kleinerer Defekte bzw. Indikationen (z.B. Auffüllen von Zystektomiehöhlen, Sinusboden-Elevation, ggf. laterale Augmentation kleinerer Alveolarkammdefekte) ist die hohe regenerationsfördernde Potenz eines autologen Knochentransplantates oft nicht erforderlich. In diesen Situationen ist es meist ausreichend, dem einwachsenden Knochen eines regenerationsfreudigen Lagergewebes eine suffiziente Leitstruktur zur Verfügung zu stellen, um osteokonduktive Vorgänge zu ermöglichen. Die Ermöglichung dieser Osteokonduktion (angio-ossäre Leitschienenfunktion) gilt als Grundvoraussetzung für einen Knochenersatzwerkstoff. Für diese Funktion wird eine stabile und offenporige Matrixstruktur benötigt. Praktisch alle kommerziellen Knochenersatzpräparate bedienen sich dieses Prinzips, unabhängig von ihrer Herkunft.

Um die bekannten Einschränkungen und Nachteile autologer und allogener Knochentransplantate [3,16,21,77,90,98,105] zu umgehen, aber auch um die Herstellung defektspezifischer, größerer und geometrisch komplexer Implantatstrukturen zu ermöglichen [94], muss auf alloplastische (synthetische) Werkstoffe zurückgegriffen werden. Diese bieten zusätzlich den Vorteil konstanter und möglichst steuerbarer Materialeigenschaften.

Die weitaus meisten alloplastischen Knochenersatzmaterialien stammen aus der Substanzklasse der Calciumphosphate, welche der mineralischen Komponente von Knochen sehr ähnlich sind [34]. Weit verbreitete Verbindungen sind Tricalciumphosphate (TCP) und Hydroxylapatit (HA), welche sich vornehmlich durch ihre chemischen Löslichkeiten im physiologischen Milieu unterscheiden [19,46,47].

Gängige Applikationsformen sind Granulate, Blöcke sowie pastenartige, in situ härtende Zemente [19,46,47]. Die Applikation erfolgt zumeist durch direktes Einbringen in den Defekt, wodurch auch die Formgebung erfolgt. Die meisten kommerziellen Zemente sind Apatit-bildend wie beispielsweise Norian-SRS[®] [2,11,76] oder Bone Source[®] [4,25]. Zwar ist die Löslichkeit dieser Produkte besser als die von gesinterten Apatitkeramiken, liegt aber dennoch deutlich unter der Löslichkeit anderer Calciumphosphatzemente wie Bruschit. Hierzu existiert derzeit ein einziges

kommerzielles Produkt (ChronOs Inject[®]) [13]. Je nach klinischer Zielsetzung sollen die Materialien entweder möglichst volumenstabil bleiben und eine hohe Standzeit aufweisen (d.h. möglichst geringfügig oder nicht abgebaut werden), oder aber vollständig durch Knochengewebe ersetzt werden. Letzteres setzt eine gute Degradierbarkeit voraus. Da jedoch ein säurekatalysierter osteoklastärer Abbau des alloplastischen Materials lediglich an der Fremdkörperoberfläche stattfinden kann, ist eine gute thermodynamische Löslichkeit im physiologischen (feuchten) Milieu eine entscheidende Voraussetzung für einen vollständigen knöchernen Ersatz. Selbstverständlich muss in diesem Fall das Lagergewebe auch eine entsprechende Eignung aufweisen im Sinne einer hohen regenerativen Potenz.

Neben der grundlegenden Eigenschaft des Degradationsverhaltens stellt auch die Möglichkeit der Formgebung ein entscheidendes Kriterium dar, insbesondere wenn großvolumige, geometrisch komplexe und ästhetisch relevante (z.B. Gesichtsschädelbereich) Defekte rekonstruiert werden sollen. In situ härtende Zemente können dieser Anforderung nur bedingt gerecht werden, da die direkte Modellation im OP-Situs äußerst anspruchsvoll sein kann. Alternativ kann unter Umständen eine präoperative indirekte Modellation anhand eines anatomischen Schädelmodells erfolgen. Wünschenswert wäre jedoch in bestimmten Situationen die direkte Herstellung einer individuellen Implantatstruktur mit einem generativen Fertigungsverfahren, welches ohne thermischen Prozess (Sinterung) auskommt und somit die Löslichkeit nicht beeinträchtigt.

5.2 Rapid Prototyping Verfahren

Rapid Prototyping Technologien erfahren seit den 1980er Jahren eine zunehmende Verbreitung, vorwiegend im Rahmen industrieller Anwendungen. Sie zählen zu den generativen Fertigungsverfahren. Hierbei werden vorhandene Konstruktionsdaten nach virtueller Modellerstellung (CAD, Computer Aided Design) über einen technischen Produktionsvorgang (CAM, Computer Aided Manufacturing) in ein Werkstück umgesetzt. Für biomedizinische Anwendungen relevante und bereits mit Erfolg angewandte Verfahren sind die Stereolithographie [12,30], das selektive Lasersintern [50], das Fused Deposition Modelling [110] und der 3D-Pulverdruck [91]. Durch diese

Verfahren können Materialien verschiedenster Substanzklassen wie Metallpulver (Aluminium, Titan und Cobalt-Chrom), photosensitive oder thermoplastische Kunststoffe, biologisch resorbierbare Polymere oder Zemente und Keramiken verarbeitet werden. Die Formgebung erfolgt nicht durch Substanzabtrag wie etwa bei Dreh- oder Fräsprozessen, sondern durch das Aneinanderfügen von Volumenelementen. Für diese Art von Fertigungstechnologie muss ein vollständiges 3D-CAD-Volumenmodell vorliegen. Dieses kann im medizinischen Bereich unter anderem auf Grundlage eines CT- oder MRT-Datensatzes erfolgen. Die Konstruktionsdaten werden in einzelne Schichten zerlegt und im STL-Format (Stereolithography Files) an den Prototyper gesandt [111,112]. Dieser generiert Schicht für Schicht, so dass nach und nach ein dreidimensionales Werkstück entsteht. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Rapid Prototyping Verfahren durch die Art der Schichtgenerierung, durch das verarbeitbare Material sowie durch das Prinzip der Verbindung der einzelnen Schichten miteinander.

Der Vorteil von Rapid Prototyping Technologien gegenüber anderen Fertigungsverfahren wie z.B. Formguß oder substanzabtragenden Verfahren besteht zum einen in der leichteren Herstellung komplizierter Geometrien wie etwa Hohlräume oder Unterschnitte. Basierend auf entsprechenden Schnittbilddaten von Patienten wird somit die Herstellung individueller, komplexer Implantatstrukturen ermöglicht. Zum anderen kann mittels Rapid Prototyping eine schnelle Fertigung von Formkörpern mit definierten und reproduzierbaren Eigenschaften in einer hohen Stückzahl erfolgen. Der letztere Ansatz erscheint insbesondere zur Herstellung von Konstrukten für das Tissue engineering sehr vielversprechend und sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

5.3 3D - Pulverdruck von Brushit

Calciumhydrogenphosphat Dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Brushit) ist als Werkstoff für Knochenersatzmaterialien von hohem Interesse, da es sich um ein im physiologischen Milieu gut lösliches Calciumphosphat handelt und damit je nach Indikation eine Alternative zu den schwer löslichen Hydroxylapatit-Zementen bzw. Keramiken darstellt. Ist das umgebende wässrige Milieu untersättigt an Calcium- und Phosphat-

Ionen, erfolgt eine Hydrolyse des Zementes. Dies stellt im physiologischen Milieu den Hauptabbauvorgang dar. Es kann jedoch zu einer lokalen Überschreitung des Löslichkeitsproduktes der genannten Ionen kommen, was dann eine Phasenumwandlung in thermodynamisch stabileres Hydroxylapatit zur Folge hat [78]. Grover et al. haben *in vitro* das Degradationsverhalten von Bruschit-Zementen in bovinem Serum untersucht. Dabei ergab sich unter dynamischen Bedingungen bei täglichem Wechsel der Auslagerungsflüssigkeit ein Masseverlust des Bruschit-Zementes von 60-70% [35]. Wen et al. berichteten ebenfalls über die chemische Löslichkeit sowie über die Osteokonduktivität von Bruschit-Zementen [103]. Auch konnte die Degradation von im 3D-Pulverdruckverfahren hergestellten Versuchskörpern aus Bruschit bereits *in vivo* gezeigt werden [70].

Als injizierbarer Zement besitzt Bruschit eine Marktzulassung und wird klinisch erfolgreich eingesetzt [13]. Um eine direkte und frei wählbare Formgebung zu gewährleisten, wurde das Material in das 3D-Pulverdruckverfahren eingeführt [28]. Im Rahmen der eigenen Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit das mittels Rapid Prototyping prozessierte Material biokompatible Eigenschaften aufweist. Als Modell wurde die Zellkultur gewählt, wobei die Zellen zweidimensional auf der Materialoberfläche ausgesät werden sollten. Hierzu wurden zunächst Zellkulturträger (sogen. Scaffolds) etabliert, welche verfahrensbedingt in beliebiger (großer) Stückzahl hergestellt werden konnten und über gleichbleibende chemische, physikalische und geometrische Eigenschaften verfügten.

Igawa et al. stellten defektspezifische Knochenimplantate im 3D-Pulverdruckverfahren her und implantierten diese in Hundeschädel [40]. Die Knochenimplantate wurden mit Hilfe von CT-Datensätzen passgenau zu den Knochendefekten konstruiert und gedruckt. Nach der Implantation wurden erneut CT-Aufnahmen angefertigt, welche die gute Passgenauigkeit demonstrierten. Histologische Untersuchungen zeigten osteokonduktive Vorgänge an den Implantaträndern. Die Implantatstrukturen in dieser Studie bestanden jedoch nicht aus Bruschit, sondern wurden aus α -Tricalciumphosphatpulver und einer Mischung aus Natriumchondroitinsulfat und Dinatriumsuccinat als flüssiger Binder gefertigt.

Um in den eigenen Versuchen eine Kontamination der Zellkulturen zu vermeiden, musste die möglichst sterile Präparation der Reaktanden sowie die aseptische Prozessierung im Pulverdruckgerät beachtet werden. Letztere Anforderung konnte durch Oberflächendesinfektion der relevanten Geräteteile des Druckers (z.B. Bauraum) jedoch nur bedingt realisiert werden. Für eine mögliche spätere Herstellung von Implantatstrukturen zum Einsatz im Menschen wäre eine vollständig sterile Prozesskette zu fordern. Dieser Aufwand war jedoch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht zu realisieren und auch nicht erforderlich. Stattdessen wurden Kontaminationen durch Autoklavieren des Ausgangspulvers sowie durch Entnahme der Scaffolds aus dem Drucker mit sterilen Instrumenten weitgehend vermieden. Weiterhin wurden die Matrizes vor Verwendung in der Zellkultur durch Einlegen in 70% Ethanol desinfiziert. Unter den genannten Maßnahmen kam es praktisch zu keiner bakteriellen Kontamination oder Pilzbesiedelung. Als alternatives Sterilisationsverfahren käme auch eine Gammabestrahlung in Betracht, wobei der entsprechende erhöhte technische Aufwand bei der Anwendung als Humanimplantat gerechtfertigt wäre. Einfachere (thermische) Sterilisationsverfahren wie z.B. Autoklavieren kommen nicht in Frage, da es hierbei zu Verschiebungen im Kristallgefüge der Zemente kommt (z.B. hydrothermale Umwandlung von Brushit zu Monetit) [40], was wiederum die physikochemischen Eigenschaften des Materials verändert. Auch eine denkbare direkte Ausstattung der Matrizes mit zumeist thermosensiblen biologischen Wirkstoffen (z.B. Wachstums- und Differenzierungsfaktoren) [102] würde durch ein thermisches Sterilisationsverfahren konterkariert.

5.4 Zellkulturen

Um eine erste Beurteilung der Biokompatibilität des neuartigen pulvergedruckten Trägermaterials mit Kalziumphosphatchemie (Brushit) zu ermöglichen, kamen Zellkulturen zum Einsatz. Die Aussagekraft von Zellkulturversuchen besitzt jedoch methodisch bedingte Einschränkungen, denn untersucht wird lediglich das Verhalten von Zellen des Lagergewebes (in diesem Fall Knochen) *in vitro*. Der Begriff Biokompatibilität ist aber weit umfassender, denn hier kommen auch andere Aspekte wie beispielsweise Organtoxizität, Kanzerogenität, Akkumulation oder Allergisierung

zum Tragen. Dennoch ist die Untersuchung der Zytokompatibilität *in vitro* eine wichtige und etablierte Methoden, um neuartige Biomaterialien auf ihre grundsätzliche Eignung zu testen [14,41,97].

Entsprechend dem erhofften Einsatzgebiet des zu untersuchenden Materials, nämlich die Rekonstruktion bzw. Regeneration von Knochengewebe, wurde für die *in vitro* Untersuchungen die Zell-Linie MC3T3-E1 verwendet. Hierbei handelt es um mesenchymale Zellen mit osteoblastärer Potenz, welche aus muriner fetaler Kalvaria isoliert wurden [43]. Die Verwendung einer solchen immortalisierten Zell-Linie bietet gegenüber der Verwendung primärer Zellen den Vorteil der unlimitierten Verfügbarkeit und der schnellen Anzucht und kommt somit den Anforderungen umfangreicher und reproduzierbarer Zellkulturversuche entgegen. Wesentliche Spezies-spezifische Eigenschaften bzw. Unterschiede gegenüber Osteoblasten humaner Herkunft sind nicht bekannt. Daher dürften Probleme der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf humanes Gewebe nicht zu erwarten sein.

Als Parameter der Zytokompatibilität wurde die Viabilität der Zellkulturen sowie die Aktivität bzw. Produktion zweier typischer osteoblastärer Proteine, alkalische Phosphatase und Osteocalcin, untersucht. Um die Ergebnisse besser einordnen zu können, wurden in allen Versuchen Materialien mit bekanntermaßen sehr guten zytokompatiblen (Titan) bzw. zytotoxischen (Kupfer) Eigenschaften als Positiv- bzw. Negativkontrolle mit untersucht.

5.5 Zellviabilität

Die Viabilität einer Zellkultur gilt als Maß für die Anzahl stoffwechselaktiver Zellen. Somit kann im zeitlichen Verlauf indirekt auf die Zellproliferation und damit auf die generelle Zytokompatibilität eines Trägermaterials geschlossen werden. Eine direkte Zellzählung (z.B. mittels Zählkammer oder Zellzähler) erwies sich in den eigenen Versuchen als unpraktikabel, da partikuläre Bestandteile der grundsätzlich in Wasser löslichen Matrices zu falschen Messwerten führten oder die Kapillare des Zellzählers verlegten. Eine zuverlässige Methode der Separierung von vitalen Zellen und Calciumphosphat-Fragmenten im Lösungsmittel (Medium bzw. Waschpuffer) konnte nicht etabliert werden. Daher wurde auf einen Zellviabilitäts-Assay (WST-1)

zurückgegriffen, der den Vorteil einer direkten Bestimmung in der Zellkultur ohne vorherige Präparation der Zellen hat.

Die Ergebnisse der Versuche lassen auf eine gute Zytokompatibilität der pulvergedruckten Bruschit-Matrizes schließen, da die Messwerte deutlich über denen der Negativkontrolle (Kupfer-Träger) liegen und im zeitlichen Verlauf gemäß einer entsprechenden Zellproliferation ansteigen. Allerdings lagen die Messwerte unter denen der entsprechenden Positivkontrollen (Titan-Träger). Selbiges Material verfügt bekanntermaßen über eine ausgezeichnete Biokompatibilität gegenüber Knochengewebe [68,96]. Die Ursache für die geringere Viabilität der Bruschit-Zellkulturen gegenüber den Positivkontrollen liegt vermutlich in den löslichkeitsbedingten Elektrolytverschiebungen des Zellkulturmediums (s.u.) begründet. Die rauen Oberflächeneigenschaften der Bruschit-Matrizes (im Vergleich zum glatten Titan) sollten jedenfalls der osteoblastären Proliferation und Differenzierung zuträglich sein [75,100]. Die grundsätzlich gute Zytokompatibilität verschiedener (meist injizierbarer) Calciumphosphatzemente wurde in einer Vielzahl von Studien gezeigt [52, 74].

5.6 Vergleich der Alkalische-Phosphatase-Aktivität

Zur Abschätzung einer regelhaften osteoblastären Differenzierung der Zellkulturen wurde die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase herangezogen, da es sich hierbei um einen frühen Marker des osteoblastären Differenzierungszyklus handelt [59,67,95]. Auch die meisten vergleichbaren Studien nutzen diesen Marker zur Beurteilung der osteoblastären Differenzierung *in vitro* [57,69].

Der langsamere bzw. verzögerte Anstieg der Enzymaktivität in den Bruschit-Kulturen verglichen mit den Positivkontrollen (Titan) entspricht sehr wahrscheinlich der verzögerten Zellproliferation (Zellviabilität), da der osteoblastäre Differenzierungszyklus erst ab einer bestimmten Zelldichte mit Ausbildung von interzellulären Kontakten in Gang gesetzt wird [17]. Auch andere Untersuchungen zeigen, dass Calciumphosphate grundsätzlich der osteoblastären Differenzierung *in vitro* zuträglich sind [20,63,64,106]. Da im eigenen Versuch die gemessenen ALP-Aktivitäten der Zellkulturen nicht auf andere Parameter wie etwa Zellzahl, Protein- oder

DNA-Gehalt bezogen wurden, kann keine Aussage hinsichtlich einer besseren oder schlechteren Differenzierung im Vergleich zu Titan getroffen werden. Es gibt jedoch keinen Anhalt für eine Beeinträchtigung der osteoblastären Differenzierung durch den pulvergedruckten Bruschi-Zement.

5.7 Osteocalcin Nachweis

Verglichen mit der ALP wird dieser Marker zu einem späteren Zeitpunkt des osteoblastären Differenzierungszyklus *in vitro* exprimiert [17]. Im Gegensatz zur ALP handelt es sich nicht um ein membranständiges Enzym, dessen Aktivität durch Zugabe des Substrates gemessen wird. Vielmehr wird das Protein von den Zellen an das Medium abgegeben und darin direkt gemessen.

Die Osteocalcin-Messwerte der Titankulturen zeigten sich über die gesamten 12 Versuchstage konstant und legten damit einen systematischen Fehler im Versuchsaufbau nahe. Selbiger konnte schließlich mit dem Medium zugesetzten FCS identifiziert werden, welches Osteocalcin enthält. Andererseits konnte bis einschließlich Versuchstag 12 auch keine Konzentrationserhöhung festgestellt werden, da dieser Marker meist erst nach 2 Wochen in Kultur in nennenswertem Umfang gebildet wird [59,67]. Die Osteocalcin-Messwerte der Bruschi-Kulturen waren ebenfalls konstant, jedoch auf deutlich niedrigerem Niveau im Vergleich zu Titan. Die Ursache hierfür liegt höchstwahrscheinlich in einer Adsorption des Proteins an der rauen und porösen Oberfläche des Trägermaterials. Villareal et al. wiesen eine erhöhte Proteinadsorption auf nicht gesinterten Bruschi-Oberflächen nach [101], was den vermuteten Sachverhalt unterstützt.

Zusammenfassend muss die Bestimmung dieses Markers im Rahmen des vorliegenden Versuchsaufbaus als nicht durchführbar beurteilt werden.

5.8 Chemische Analyse des Zellkulturmediums

Im Verlauf der 12 Versuchstage nahm die Konzentration an freien Ca^{2+} -Ionen im Medium der Bruschi-Kulturen ab, während die Konzentration an freien PO_4^{3-} -Ionen gegenläufig zunahm. Diese Beobachtung lässt sich gut mit der hohen

thermodynamischen Löslichkeit von Brushit erklären. Da in der Kultur kein kontinuierlicher Flüssigkeits- und Elektrolytaustausch stattfindet, sondern das Kulturmedium im zweitägigen Intervall gewechselt wird, entsteht zwischenzeitlich eine an Calcium und Phosphat übersättigte Lösung. Dies führt zu einer Präzipitation von geringer löslichem Calciumphosphat. Die damit einhergehenden stöchiometrischen Veränderungen führen im Medium zu einem Anstieg von freien PO_4^{3-} - Ionen sowie zu einem Abfall von freien Ca^{2+} -Ionen, da auch die im frischen Zellkulturmedium enthaltenen Calcium-Ionen präzipitieren.

Die pH-Werte sämtlicher Kulturmedien lagen zu keinem Zeitpunkt außerhalb eines physiologischen Bereiches von 7-8. Der Medium-pH der Brushit-Kulturen war grundsätzlich erniedrigt. Dies könnte einerseits an herstellungsbedingt in den Trägern verbliebener Phosphorsäure liegen. Allerdings wurden die Matrizes vor den Zellkulturversuchen ausgiebig gespült, um derartige Einflüsse zu vermeiden. Im Versuchsverlauf wäre dann auch ein pH-Anstieg in Folge der Medienwechsel zu erwarten. Andererseits kann aber auch von einer Freisetzung saurer Valenzen im Rahmen der Hydrolyse von Brushit ausgegangen werden.

Die Veränderungen des pH-Wertes sind jedenfalls nicht erheblich und wären bei einer Anwendung in vivo in noch weit geringerem Ausmaß zu erwarten, da hier im Gegensatz zur Zellkultur ein kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch und damit der Abtransport saurer Valenzen zur Verfügung steht.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung einer im 3D-Pulverdruckverfahren fabrizierten Trägerstruktur auf Calciumphosphat-Basis (Brusit) als Zellkultur-Scaffold untersucht. Dazu wurden die Konstrukte *in vitro* mit osteoblastären Zellen besiedelt und deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten über eine Kultivierungsdauer von 12 Tagen analysiert.

Als Parameter dienten hierbei die Zellviabilität, die Aktivität des osteoblastären Enzyms Alkalische Phosphatase sowie die Mediumkonzentration von Osteocalcin. Des Weiteren wurde der pH-Wert des Kulturmediums sowie die Konzentrationen der freien Elektrolyte Ca^{2+} und PO_4^{3-} untersucht.

Die Ergebnisse belegen eine gute Zytokompatibilität des Trägermaterials. Diese äußerte sich in einer progredienten Proliferation phänotypisch osteoblastärer Zellen (gemäß Rasterelektronenmikroskopie). Die Zellen exprimierten das osteoblastentypische Enzym Alkalische Phosphatase, welches als früher Differenzierungsmarker gilt. Die Analyse der Osteocalcinproduktion führte aufgrund methodischer Probleme nicht zu verwertbaren Ergebnissen. Die Untersuchung des verbrauchten Zellkulturmediums ergab keine unphysiologischen Schwankungen des pH-Wertes. Jedoch konnten signifikante Veränderungen der Konzentration an freien Ca^{2+} und PO_4^{3-} -Ionen im Medium festgestellt werden. Diese sind auf die Löslichkeit des Trägermaterials im physiologischen Milieu zurückzuführen.

Zusammenfassend konnte mittels vorliegender *in vitro* Versuche eine geeignete Zytokompatibilität des untersuchten Materials herausgearbeitet werden. Für mögliche klinische Anwendungen zum Knochenersatz sind weitergehende Untersuchungen, insbesondere osteokonduktiver Eigenschaften im orthotopen Implantatlager im Rahmen von *in vivo* Untersuchungen, erforderlich.

7 Literaturverzeichnis

- 1 **Aaboe M, Pinholt EM, Hjortinghansen E (1995)**
Healing of experimentally created defects – a review.
Brit J Oral Maxillofac Surg 33: 312-318
- 2 **Babu S, Seidman TD (2004)**
Ossicular reconstruction using bone cement.
otology & neurotology 25: 98-101
- 3 **Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS (1995)**
Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity: a statistical evaluation.
Spine 20: 1055-1060
- 4 **Baroud G, Matsushita C, Samara M, Beckman L, Steffen T (2004)**
Influence of oscillatory mixing on the injectability of three acrylic and two calcium-phosphate bone cements for vertebroplasty.
J Biomed Mater Res 68B: 105-111
- 5 **Behrens P, Wolf E, Bruns J (2000)**
In-vitro Anzüchtung humaner autogener osteoblastärer Zellen auf natürlichem Knochenmineral.
Orthopädie 29: 129-134
- 6 **Benninghoff A, Drenckhahn D, Kugler P (2008)**
Allgemeine Gewebelehre, Knochengewebe
In: Drenckhahn D. (Hrsg.): Benninghoff, Anatomie. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie
17. Auflage Urban & Fischer: 133-149
- 7 **Block MS, Kent JN (1993)**
Maxillary sinus grafting for totally and partially edentulous patients.
J American Dental Ass 124: 139-143
- 8 **Block MS, Kent JN (1997)**
Sinus augmentation for dental implants: The use of autogenous bone.
J Oral and Maxillofacial Surg 55: 1281-1286

- 9 Boudeville P, Serraj S, Leloup JM, Margerit J, Pauvert B, Terol A (1999)**
Physical properties and self-setting mechanism of calcium phosphate cements from calcium bis-dihydrogenphosphate monohydrate and calcium oxide.
J Material Science 10: 99-109
- 10 Cacaci C (2007)**
Knochenersatzmaterialien in der Implantologie.
Teamwork 1/2007: 22-29
- 11 Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M, Delli-Santi M, Fennell C, Leinberry C, Husband J, Ladd A, Seitz WR, Constanz B (2003)**
Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures - A randomized study.
J Bone Joint Surg Am 85A: 2127-2137
- 12 Choi JW, Wicker R, Lee SH, Choi KH, Ha CS, Chung I (2009)**
Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithographie.
J Mater Proc Technol 209: 5494-5503
- 13 Chu TMG, Halloran JW, Hollister SJ, Feinberg SE (2001)**
Hydroxyapatite implants with designed internal architecture.
Journal of Materials Science-Materials 12: 471-478
- 14 Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, Henderson SA, Marsh DR (2007)**
In vitro testing of advanced JAX™ bone void filler system: species differences in the response of bone marrow stromal cells to beta tri-calcium phosphate and carboxymethylcellulose gel.
J Mater Sci Mater Med 18: 2283-2290
- 15 Cornell CN, Lane JM (1998)**
Current understanding of osteoconduction in bone regeneration.
Clin Orthop Relat Res 355: 267-273
- 16 Dodd CAF, Fergusson CM, Freedman L, et al. (1988)**
Allograft versus autograft bone in scoliosis surgery.
J Bone Joint Surg Br 70: 431-434

- 17 Dos Santos EA, Farina M, Soares GA, Anselme K (2009)**
Chemical and topographical influence of hydroxyapatite and b-tricalcium phosphate surfaces on human osteoblastic cell behaviour.
J Biomed Mater Res 89A: 510-520
- 18 Elliott JC (1994)**
Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates.
Amsterdam – London – New York – Tokyo: Elsevier
- 19 Epple M, Dorozhkin SV (2002)**
Biological and medical significance of calcium phosphates.
Angew Chem Int Ed 41: 3130-3146.
- 20 Ewald A, Helmschrott K, Knebl G, Mehrban N, Grover LM, Gbureck U (2011)**
Effect of cold-setting calcium- and magnesium phosphate matrices on protein expression in osteoblastic cells.
J Bio Mat Res 96B: 326-332
- 21 Foitzik C, Findeisen O (2004)**
Knochen versus Knochenersatz.
Oralchirurgie Journal 2/2004: 12-18
- 22 Foitzik C, Merten HA (2000)**
Restitutio ad integrum – Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau
Knochenersatz- und Knochenaufbaumaterialien in der Implantologie und bei der Behandlung von Kieferknochendefekten
Spitta Verlag, Sonderdruck aus Innovationen für die Zahnheilkunde: 8-41
- 23 Friedlaender GE (1987)**
Current concepts review bone grafts the basic science rationale for clinical applications.
J Bone Joint Surg 69: 786-790
- 24 Friedlander GE, Strong DM, Tomford W, Mankin HJ (1999)**
Longterm follow-up of patients with osteochondral allografts. A correlation between immunologic responses and clinical outcome.
Orthop Clin North Am 30: 583-588

- 25 Friedman CD, Costantino PD, Takagi S, Chow LC (1998)**
BoneSource (TM) hydroxyapatite cement: A novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction.
J Biomed Mater Res 43: 428-432
- 26 Gbureck U (2004)**
Injizierbare Calciumphosphat-Zemente als Knochenersatzwerkstoff in niedrig belasteten Bereichen des Skelettsystems.
Habilitationsschrift 2004 am Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe in Medizin und Zahnheilkunde der Universität Würzburg: 10-12
- 27 Gbureck U, Hoelzel T, Doillon, CJ, Mueller FA, Barralet JE (2007)**
Direct Printing of Bioceramic Implants with Spatially Localized Angiogenic Factors.
Adv Mat 19: 795-802
- 28 Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzler K, Müller FA, Barralet JE (2007)**
Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes made by 3D powder printing.
Adv. Funct. Mater 17: 3940-3945
- 29 Gebhardt A (2000)**
Rapid Prototyping - Werkzeuge für schnelle Produktentstehung.
Fachhochschule Aachen, University of applied Sciences
Hanser, München - Wien 2000
- 30 Gebhardt A (2007)**
Generative Fertigungsverfahren: Rapid Prototyping – Rapid Tooling – Rapid Manufacturing.
Carl Hanser 2007
- 31 Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E (2005)**
Bone substitutes: An update
Inj Int J Care Inj 36: 20-27
- 32 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 Biomat Sci -Polymer Ed 8: 63

- 33 Glauner B (2006)**
Stromausschlussverfahren – Standardisierung der Vitalitätsbestimmung.
Biospektrum 12: 394-395
- 34 Gross KA, Berndt CC (2002)**
Biomedical application of apatites, Phosphates: Geochemical, Geobiological,
and Materials Importance Reviews In Mineralogy & Geochemistry 48: 631-672
- 35 Grover LM, Knowles JC, Fleming GJP, Barrelet JE (2003)**
In vitro dissolution of Brushite cement.
Biomaterials 24: 4133-4141
- 36 Günther KP, Scharf HP, Pesch HJ, Puhl W (1998)**
Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen.
Orthopädie 27: 105-117
- 37 Hench LL (1973)**
Ceramics, glasses, and composites in medicine.
Med Instrum 7: 136-144
- 38 Hidalgo DA (1989)**
Fibula free flap – a new method of mandible reconstruction.
Plastic an Reconstructive Surgery 84: 71-79
- 39 Hoelzel T (2005)**
Rapid-Prototyping von Calciumphosphat-Strukturen über eine Zement-
Abbindereaktion.
Diplomarbeit 2005: 17-19
- 40 Igawa K, Mochizuki M, Sugimori O, Shimizu K, Yamazawa K,
Kawaguchi H, et al. (2006)**
Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-
dimensional ink-jet printer.
J Artif Org 9: 234-240
- 41 Jalota S, Bhaduri SB, Tas AC (2006)**
In vitro testing of calcium phosphate (HA, TCP, and biphasic HA-TCP)
whiskers.
J Biomed Mater Res 78A: 481-490

- 42 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
- 43 Kodama H, Amagai Y, Kasai S (1980)**
Establishment of cell lines MC3T3 from mouse calvaria.
J Phys Soc Jpn 42: 223
- 44 Krüger E, Krumholz K (1984)**
Results of bone-grafting after rigid fixation.
J Oral Maxillofac Surg 42: 491-496
- 45 Lam CXF, Mo XM, Teoh SH, Hutmacher DW (2002)**
Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer.
Mater Sci & Eng C-Biomimetic Supramol Systems 20: 49-56
- 46 LeGeros RZ (1991)**
Calcium phosphates in oral biology and medicine.
Karger, Basel.
- 47 LeGeros RZ (1994)**
Hydroxyapatite and related materials (Eds. P.W. Brown, B. Constantz), CRC,
Boca Raton, FL, 3-28
- 48 Lemaitre J, Munting E, Mirtchi AA (1992)**
Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements.
Rev Stomatol Chir Macillofac 93: 163-165
- 49 Lenárt G, Bibló G, Pintér J (1972)**
Some basic problems in the examination of the calcium hydrogenphosphates of bone.
Clin Orthop Rel, 83: 263-272
- 50 Leong KF, Cheah CM, Chua CK (2003)**
Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.
Biomaterials 24: 2363-2378

- 51 Leukers B, Gulkan H, Irsen SH et al. (2005)**
Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing.
J Mater Sci: Mater Med 16: 1121-1124
- 52 Liu H, Li H, Cheng WJ, Yang Y, Zhu MY, Zhou CR (2008)**
Novel injectable calcium phosphate/chitosan composites for bone substitute materials.
Acta Biomater 2: 557-565
- 53 Löffler G, Petrides PE (1997)**
Stoffwechsel spezifischer Gewebe
In: Löffler G, Petrides PR: Biochemie und Pathobiochemie
5. Auflage Springer Verlag: 731-1089
- 54 Lowmunkong R, Sohmura T, Takahashi J, Suzuki Y, Matsuya S (2007)**
Transformation of 3DP gypsum model to HA by treating in ammonium phosphate solution
J Biomed Mater Res B 80: 386
- 55 Lüllmann-Rauch R (2003)**
Knochen
In: Lüllmann-Rauch (Hrsg.): Histologie
Thieme Verlag 2003: 122-140
- 56 Magnusson P, Larsson L, Magnusson M, Davie MWJ, Sharp CA (1999)**
Isoforms of Bone Alkaline Phosphatase: Characterization and Origin in Human Trabecular and Cortical Bone.
J Bone Mineral Res 14: 1926-1933
- 57 Midy V, Dard M, Hollande E (2001)**
Evaluation of the effect of three calcium phosphate powders on osteoblast cells.
J Mat Sci Mat Med 12: 259-265
- 58 Mirtchi AA, Lemaitre J, Munting E (1989)**
Calcium phosphate cements – action of setting regulators on the properties of the beta-tricalcium phosphate – monocalcium phosphate cements.
Biomaterials 10: 634-638

- 59 Moreau JL, Xu HHK (2009)**
Mesenchymal stem cell proliferation and differentiation on an injectible calcium phosphate- Chitosan composite scaffold.
Biomat 30: 2675-2682
- 60 Muenzbert K, Gebhardt M (1973)**
Brushite, octocalcium phosphate and carbonate- containing apatite in bone.
Clin Orthop Rel 90: 271-273
- 61 Obadia L, Amador G, Daculsi G, Bouler JM (2003)**
Calcium-deficient apatite: influence of granule size and consolidation mode on release and in vitro activity of vancomycin.
Biomaterials 24: 1265-1270
- 62 Ooms EM, Wolke JGC, van de Heuvel MT, Jeschke B, Jansen JA (2003)**
Histological evaluation of the bone response to calcium phosphate cement implanted in cortical bone.
Biomaterials 24: 989-1000
- 63 Oreffo ROC, Driessens FCM, Planell JA, Triffitt JT (1998)**
Effects of novel calcium phosphate cements on human bone marrow fibroblastic cells.
Tissue Eng 4: 293-303
- 64 Oreffo ROC, Driessens FCM, Planell JA, Triffitt JT (1998)**
Growth and differentiation of human bone marrow osteoprogenitors on novel calcium phosphate cements.
Biomat 19: 1845-1854
- 65 Otsuka M, Matsuda Y, Suwa Y, Fox J, Higuchi W (1994)**
A novel skeletal drug delivery system using a self-setting calcium phosphate cement. 2. Physicochemical properties and drug release rate of the cement-containing indomethacin.
J Pharm Sci 83: 611-615
- 66 Owen M (1978)**
Histogenesis of bone cells.
Calcif Tissue Res 25: 205-207

- 67 Owen TA, Aronow M, Barone LM, Bettencourt B, Stein GS, Lian JB (1991)**
Pleiotropic effects of Vitamin D on osteoblast gene expression are related to the proliferative and differentiated state of bone cell phenotype: dependency upon basal levels of gene expression, duration of exposure, and bone matrix competency in normal rat osteoblast cultures.
Endocrinology 128: 1496-1504
- 68 Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwins 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 Phys 143: 420-430
- 69 Panzavolta S, Torricelli P, Sturba L, Bracci B, Giardino R, Bigi A (2008)**
Setting properties and in vitro bioactivity of strontium-enriched gelatin-calcium phosphate bone cements.
J Bio Mat Res 84A: 965-972
- 70 Penel G, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaître J, Leroy G (1999)**
Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model.
Bone 25: 81-84
- 71 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
- 72 Peters F, Groisman D, Davids R, Hanel T, Durr H, Klein M (2006)**
Comparative Study of patient individual implants from beta-tricalcium phosphate made by different techniques based on CT data,
Materialwiss Werkstofftech 37: 457

- 73 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
- 74 Rao S, Ushida T, Tateishi T, Okazaki Y, Asao S (1996)**
Effect of Ti, Al, and V on the relative growth rate of fibroblasts (L929) and osteoblasts (MC3T3-E1) cells.
Biomed Mater Eng 6: 79-86
- 75 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 70B: 250-261
- 76 Robinson CM, Page RS (2003)**
Severely impacted valgus proximal humeral fractures - Results of operative treatment.
J Bone Joint Surg Am 85A: 1647-1655
- 77 Ross N, Tacconi L, Miles JB (2000)**
Heterotopic bone formation causing recurrent donor site pain following iliac crest bone harvesting.
Brit J Neurosurg 14: 476-479
- 78 Rosseau S, Lemaitre J, Bohner M, Frei C (2002)**
Long term ageing of brushite cements in physiological conditions: An in vitro study.
Griboi, Shanghai, 2002
- 79 Sailer HF, Weber FE (2000)**
Bone substitute materials.
Mund Kiefer Gesichtschir 4 Suppl1: 384-391
- 80 Salyer KE, Taylor DP (1987)**
Bone grafts in craniofacial surgery.
Clin Plast Surg 14: 27-35

- 81 Sandhu HS, Grewal HS, Parvataneni H (1999)**
Bone grafting for spinal fusion.
Orthop Clin North Am 30: 685-698
- 82 Schiebler TH (1996)**
Knochen und Knochenverbindungen.
In: Schiebler T.H. (Hrsg.): Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie
4. Auflage Springer: 191-217
- 83 Schmelzeisen R, Schliephake H (1998)**
Interdisciplinary microvascular reconstruction of maxillary, midfacial and skull
base defects.
J Craniomaxillofac Surg 26: 1-10
- 84 Schmelzeisen R, Schön, R (1998)**
Microvascular reanastomosed allogeneous iliac crest transplants for the
reconstruction of bony defects of the mandible in miniature pigs.
Int J Oral Maxillofac Implants 27: 377-385
- 85 Schmitt SC (2005)**
Besiedelung verschiedener Biomaterialien mit Osteoblasten aus dem Unterkiefer
von Schafen.
Dissertation.
Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 2005: 9
- 86 Schratt HE, Regel G, Kiesewetter B, Tscherne H (1996)**
HIV-Infektion durch Kältekonservierte Knochentransplantate.
Unfallchirurg 99: 679-684
- 87 Schweiberer L (1971)**
Der heutige Stand der Knochentransplantation.
Chirurg 42: 252-257
- 88 Schweiberer L, Eitel F, Betz A (1982)**
Spongiosatransplantation.
Chirurg 53: 195-200

- 89 Schwenger N, Ehrenfeld M (2000)**
Zahnärztliche Chirurgie: Zysten des Kiefers und der Weichteile
In: Schwenger N., Ehrenfeld M. (Hrsg.): Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Thieme Verlag Stuttgart Band 3: 89-103
Thieme Verlag Stuttgart Band 2: 275-286
- 90 Seiler JG, Johnson J (2000)**
Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications.
J South Orthop Assoc 9: 91-97
- 91 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 (Appl Biomater) 74B: 782-788
- 92 Shaha AR, Cordeiro PG, Hidalgo DA, Spiro RH, Strong EW, Zlotolow I,
Huryn J, Shah JP (1997)**
Resection and immediate reconstruction in the management of the
osteoradionecrosis of the mandible.
Head and Neck Journal 19: 406-411
- 93 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.
Bio-Med Mater Eng 17: 127-135
- 94 Siebert H, Schleier P, Beinemann J, Fried W, Zenk W, Schumann D (1995)**
Evaluation of individual ceramic implants made of Bioverit with CAD/CAM
technology to reconstruct multidimensional craniofacial defects of the human
skull.
Mund Kiefer Gesichtschir 10: 185-191
- 95 Stein GS, Lian JB, Gerstenfeld LG, Shalhoub V, Aronow M, Owen TA,
Markose E (1989)**
The onset and progression of osteoblast differentiation is functionally related to
cellular proliferation.
Connect Tissue Res 20: 3-13

- 96 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 chromical surfaces.
J Bio Mater Res 86A: 448-458
- 97 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 Bio 96: 191-198
- 98 Summers BN, Eisenstein SM (1989)**
Donor site pain from the ilium: a complication of lumbar spine fusion.
J Bone Joint Surg Br 71: 677-680
- 99 Urist MR (1965)**
Bone: formation by autoinduction.
Science 150: 893-899
- 100 Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P (1992)**
Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters.
J Mater Sci Mater Med 3: 432-446
- 101 Villarreal DR, Sogal A, Ong JL (1998)**
Protein adsorption and osteoblast responses to different calcium phosphate surfaces.
J Oral Implant 24: 67-73
- 102 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
- 103 Wen CY, Qin L, Lee KM, Chan KM (2009)**
The Use of Brushite Calcium Phosphate Cement for Enhancement of Bone-Tendon Integration in an Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Rabbit Model.
J Bio Mat Res Part B: Appl Biomater 89B: 466-474

- 104 Wolff J, Bergmann G, Duda G (1892)**
Die Spannungstrajektorien der graphischen Statik
In: Wolff J, Bergmann G (Hrsg.), Duda G (Hrsg.): Das Gesetz der Transformation der Knochen.
Reprint: Pro Business, Berlin 2010: 16-20
- 105 Younger EM, Chapman MW (1989)**
Morbidity at bone graft donor sites.
J Orthop Trauma 3: 192-195
- 106 Yuasa T, Miyamoto Y, Ishikawa K, Takechi M, Momota Y, Toh T (2000)**
Effect of apatite cements on human osteoblasts in vitro.
Bioceramics 192-1: 845-848
- 107 Z Corporation (2009)**
Funktionsweise des 3D-Drucks - Die Vision, die Innovation und die Technologien hinter dem Tintenstrahl-3D-Druckverfahren.
Z Corporation 2009: 1-15
- 108 Zbořil V, Pazdera J, Mofka V (2003)**
Bone defects of the facial skeleton – Replacement with Biomaterials
Biomedical Papers 147: 51-56
- 109 Zeeck A, Fischer SC, Grond S, Papastavrou I (2003)**
Säuren und Basen; Derivate anorganischer Säuren
In: Zeeck A. (Hrsg.): Chemie für Mediziner.
5. Auflage Urban & Fischer: 98,267-271
- 110 Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH (2002)**
Fused deposition modelling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications.
Biomaterials 23: 1169-1185
- 111 Zhang Y, Hao L, Savalani MM, Harris RA, Di Silvio L, Tanner KE (2009)**
In vitro biocompatibility of hydroxyapatite-reinforced polymeric composites manufactured by selective laser sintering,
J Biomed Mater Res 91A: 1018-102

- 112 Zhao DS, Moritz N, Laurila P, Mattila R, Lassila LV, Strandberg N, Mäntylä T, Vallittu PK, Aro HT (2009)**
Development of a multi-component fiber-reinforced composite implant for load-sharing conditions.
Med Eng Phys 31: 461-469
- 113 Zimmermann R, Gabl M, Lutz M, Angermann P, Gschwentner M, Pechlaner S (2003)**
Injectable calcium phosphate bone cement Norian SRS for the treatment of intra-articular compression fractures of the distal radius in osteoporotic women.
Arch Orthop Trauma Surg 123: 22-27

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander Kübler möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit sowie für die Bereitstellung seines Labors zur Durchführung der Experimente danken.

Besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Uwe Klammert für die Idee der Arbeit und für die geduldige Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für die Übernahme des Referates.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau Margit Schleyer für die Unterstützung und ihren Rat bei allen Arbeiten im Labor.

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