

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

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

**3D-Pulverdruck von Zellkulturträgern
mit Magnesium-Phosphat-Chemie**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der**

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andreas Rudolf Fuchs

aus Würzburg

Würzburg, März 2012

Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. U. Gbureck

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.04.2013

Der Promovend ist Zahnarzt.

Meinen Eltern

Inhalt

1 Einleitung.....	1
1.1 Knochenersatzmaterialien	1
1.1.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien	1
1.1.2 Autologer Knochen.....	3
1.1.3 Allogener und xenogener Knochen	5
1.1.4 Alloplastische Materialien.....	6
1.2 Rapid Prototyping	7
1.2.1 Begriffsbestimmung.....	7
1.2.2 Rapid Prototyping Verfahren	8
1.2.3 3D-Pulverdruck.....	9
1.3 Bone Morphogenetic Proteins: BMPs.....	11
1.3.1 Aufbau der BMP-Familie.....	12
1.3.2 BMP-induzierte Knochenneubildung	12
2 Material und Methode.....	15
2.1 Evaluation von Magnesium-Phosphat-Zement als Trägermaterial.....	15
2.1.1 Präparation der Reaktanten	15
2.1.2 Druckersystem und Druckvorgang	16
2.1.3 Zellkultur	18
2.1.4 Zellviabilität	20
2.1.5 Chemische Analyse des Kulturmediums.....	21
2.1.6 Rasterelektronenmikroskopie	21

Inhalt

2.2 Evaluation der biologischen Wirksamkeit von BMP-2.....	22
2.2.1 Rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2)	22
2.2.2 Zellbasiertes Nachweisverfahren der biologischen Wirksamkeit von BMP-2.....	22
2.2.3 Nachweis der biologischen Wirksamkeit gedruckter BMP-2-Lösungen.....	25
2.3 Untersuchung von mit BMP-2 gedruckten Magnesium-Phosphat-Matrizes.....	29
2.3.1 Pulverdruck der Strukturen	29
2.3.2 Eluierung von BMP-2 aus den Strukturen	31
2.3.3 Zellkultur und Testverfahren	32
3 Fragestellung	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Evaluation von Magnesium-Phosphat-Zement als Trägermaterial.....	35
4.1.1 Zellviabilität	35
4.1.2 Chemische Analysen des Kulturmediums.....	37
4.1.2.1 pH-Wert.....	37
4.1.2.2 Konzentration freier Magnesium-Ionen	39
4.1.2.3 Konzentration freier Phosphat-Ionen.....	40
4.1.2.4 Konzentration freier Calcium-Ionen.....	42
4.1.3 Rasterelektronenmikroskopie	43
4.2 Evaluation der biologischen Wirksamkeit von BMP-2.....	45
4.2.1 Zellbasiertes Nachweisverfahren der biologischen Wirksamkeit von BMP-2.....	45
4.2.2 Nachweis der biologischen Wirksamkeit gedruckter BMP-2-Lösungen.....	46
4.2.2.1 Zellviabilität	46
4.2.2.2 Proteingehalt.....	48
4.2.2.3 Aktivität der Alkalischen Phosphatase	50
4.3 Untersuchung von mit BMP-2 gedruckten Magnesium-Phosphat-Matrizes.....	53

Inhalt

5 Diskussion.....	56
5.1 Herstellung von Formkörpern zur Knochenregeneration mittels 3D-Pulverdruck.....	56
5.2 Struvit als Trägersystem.....	58
5.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften.....	59
5.2.2 Biokompatibilität	60
5.3 3D-Pulverdruck bioaktiver Substanzen.....	63
5.3.1 3D-Pulverdruck von BMP-2.....	65
6 Zusammenfassung	67
7 Literatur.....	69
8 Anhang.....	79
8.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien.....	79
8.2 Abkürzungen.....	82

1 Einleitung

1.1 Knochenersatzmaterialien

Knöcherne Defekte im Gesichtsschädelbereich haben vielfältige Ursachen wie z.B. Traumata, angeborene Fehlbildungen oder Atrophien durch mangelnde Beanspruchung, etwa in Folge von Zahnverlust. Häufig führt auch die Therapie einer anderen Pathologie zu einer knöchernen Defektsituation, beispielsweise die Resektion eines bösartigen Tumors oder die Entfernung einer Knochenzyste. In diesen Situationen ist vielfach die Wiederherstellung bzw. der Ersatz des verlorengegangenen Knochens von hoher klinischer Bedeutung, da in den meisten Fällen der Wunsch nach funktioneller wie auch ästhetischer Rehabilitation besteht. Die hierfür verwendeten Materialien unterscheiden sich in ihren biologischen, physikochemischen und geometrischen Eigenschaften teils erheblich. Es handelt sich im Einzelnen um autologe, allogene oder xenogene Knochentransplantate sowie um alloplastische (synthetische) Knochenersatzmaterialien.

1.1.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Das ideale Knochenersatzmaterial sollte grundsätzlich alle Vorteile autologen Knochens aufweisen, ohne dessen Nachteile in Kauf nehmen zu müssen. Die Anforderungen bzw. Funktionen der Materialien können dabei je nach spezieller Defektsituation variieren. Im Allgemeinen sollten die Werkstoffe eine Reparatur des Knochens initiieren, diese unterhalten und letztlich das Remodelling zu funktionell höherwertigem Lamellenknochen ermöglichen. Derartige Werkstoffe kann man daher auch als „Knochenregenerationsmaterialien“ einstufen. Im Gegensatz zu permanenten Implantaten sollen sie verlorengegangenes Knochengewebe nur temporär bis zur knöchernen Restitution ersetzen. Neben der reinen knöchernen Rekonstruktion erfüllen diese Materialien häufig auch eine mechanische Schutzfunktion für die von ihnen bedeckten anatomischen Strukturen. Zum anderen werden angrenzende Weichgewebe (z.B. Haut oder Mundschleimhaut) durch Knochenersatzmaterialien gestützt, wodurch diese auch eine wichtige kontur- bzw.

formgebende Funktion haben können. Um diese Aufgaben möglichst gut zu erfüllen, müssen Knochenersatzmaterialien ganz bestimmte biologische, chemische und physikalische Eigenschaften besitzen. Eine elementare Anforderung ist die gute Biokompatibilität, welche auch für mögliche Degradationsbestandteile zu fordern ist. Das bedeutet, dass die Materialien Wachstums- und Differenzierungsvorgänge des Zielgewebes im Implantatlager nicht beeinträchtigen dürfen. Sie sollten keine oder allenfalls geringe bzw. vorübergehende Entzündungs- oder Fremdkörperreaktionen hervorrufen. Ihre Antigenität sollte somit möglichst gering sein. Darüber hinaus dürfen sie weder mutagen oder kanzerogen wirken, noch eine lokale oder systemische Toxizität besitzen. In ihren biomechanischen Eigenschaften wie Elastizitätsmodul, Biege- und Kompressionsfestigkeit sowie in ihren strukturellen Eigenschaften, wie etwa einer interkonnektierenden Porosität, sollten die Materialien dem zu ersetzenden Knochen ebenso entsprechen. Weiterhin wäre eine unlimitierte Verfügbarkeit, ausreichende Sterilisations- und Lagerfähigkeit sowie gleichbleibende Materialeigenschaften zu fordern [1,2].

Unter den zuvor genannten chemischen und physikalischen Charakteristika ist die Festigkeit des Knochenersatzes von entscheidender Bedeutung für seine klinische Anwendung in der Defektregion. Implantatlager können eingeteilt werden in funktionell kraftbelastete Regionen sowie in unter physiologischen Bedingungen nicht- kraftbelastete Regionen. Die Wiederherstellung kraftbelasteter Knochendefekte erfordert meistens den Einsatz hochfester metallischer Werkstoffe wie z.B. Titan. Dies gilt sowohl für vorübergehende (z.B. Stabilisierung langer Röhrenknochen), als auch für permanente (z.B. Gelenkprothesen) knöcherne Defektversorgungen. Zweck dieser Art von Rekonstruktionen ist es, dauerhafte Stabilität zu gewährleisten und eine gewisse Volumenkonstanz zu garantieren. Nicht-kraftbelastete Defekte, wie sie häufig im Bereich des Neurokraniums oder des Gesichtsschädels zu finden sind, erfordern hingegen weniger Festigkeit. Primäres Ziel ist hier weniger die rein mechanische Stabilität. So dienen Knochenersatzmaterialien in derartigen Defekten unmittelbar nach ihrer Implantation zunächst als Koagelstabilisator, der eine physiologische Wundheilung sichert. Durch ihr eigenes Volumen fungieren sie darüber hinaus als Weichgewebstütze für angrenzende Gewebe, wie z.B. die keratinisierte Gingiva, und sollen eine gesteuerte Regeneration des Gewebes ermöglichen: Während Angio- und Osteogenese in das Implantat hinein aktiv gefördert werden sollen, soll das unerwünschte Einwachsen bindegewebiger Strukturen in den Defekt unterdessen verhindert werden.

Vor allem großvolumige Defekte, Defekte mit komplexer Geometrie oder Defekte mit hohen ästhetischen Anforderungen machen eine präzise Formgebung und Konturierung des Implantatwerkstoffes erforderlich. Dies kann grundsätzlich entweder präoperativ oder intraoperativ im Defektsitus erfolgen. Als intraoperativ anpassbare Knochenersatzmaterialien kommen meist präfabrizierte Formkörper, Granulate oder selbsthärtende Zemente zum Einsatz. Die Indikation für derartige Werkstoffe ist aber gerade bei besonders großen und komplexen Defekten oft stark limitiert. Präoperativ angepasste Formkörper können z.B. mit Rapid Prototyping Verfahren schnell und individuell für die jeweilige Indikation hergestellt werden [3].

Eine weitere wichtige Anforderung an Knochenersatzmaterialien wird deutlich, wenn man sich die vorherrschende Situation bei knöchernen Kontinuitätsdefekten wie z.B. nach einer Unterkieferresection vor Augen führt. Das Implantat hat hier nur im Randbereich Kontakt zum orthotopen Knochenlager. Der weitaus größere Teil der Implantatoberfläche wird von Muskel- oder Narbengewebe bedeckt, welches als eher ersatzschwach einzustufen ist. Auch in diesen Bereichen muss die Ossifikation von statten gehen. Ein solches Implantat sollte deshalb als poröse Leitschiene für einwachsenden Knochen dienen (Osteokonduktion), sowie möglichst auch die knöcherne Regeneration aktiv fördern (Osteoinduktion). Parallel hierzu sollte der in der Entstehung befindliche Knochen vor interferierenden Geweben wie z.B. Bindegewebe abgeschirmt werden, damit ideale Voraussetzungen für die Knochenregeneration gegeben sind. Knochenersatz soll zwar temporär als Platzhalter dienen, aber genauso ist es auch erforderlich, dass er unter physiologischen Bedingungen degradierbar ist, um dem wachsenden Knochenregenerat ausreichenden Platz zu schaffen. Idealerweise sind die Geschwindigkeiten von Biodegradierung und Knochenwachstum dabei gleich groß [4].

1.1.2 Autologer Knochen

Noch heute gilt autologer Knochen in vielen Defektsituationen als der Goldstandard zur Knochenrekonstruktion, da er die höchste biologische Wertigkeit unter den zur Verfügung stehenden Materialien besitzt [5]. Im Rahmen der autologen Knochentransplantation wird

körpereigenes Gewebe von einer Spenderregion an eine Empfängerregion verpflanzt. Dabei kann es sich um multiple kleine Knochenspäne (meist Spongiosa) bis hin zu großen vollschichtigen (sog. bikortikalen) Transplantaten handeln. Abhängig von ihrer Größe können diese frei oder vaskularisiert übertragen werden.

Das autologe Knochentransplantat besitzt als körpereigenes Gewebe die gleiche Antigenität wie das Empfängerlager und ruft somit weder eine immunologische Reaktion noch eine Fremdkörperreaktion hervor. Entzündliche Komplikationen mit der Gefahr der Transplantatabstoßung treten daher mit geringerer Häufigkeit auf. Autologer Knochen wirkt nicht nur osteokonduktiv als poröse Leitschiene für einwachsendes Knochengewebe aus dem Empfängerlager, sondern stellt auch vitale osteogene Zellen (mesenchymale Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten) sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (PDGF, BMP) zur Verfügung. Somit besitzt autologer Knochen auch osteoinduktive (BMP) und osteogene (vitale Zellen) Eigenschaften. Das Ausmaß der beiden letztgenannten Aspekte ist aus verschiedenen Gründen jedoch begrenzt. Bei nicht vaskularisierten Transplantaten fallen aufgrund der anfänglich reinen Versorgung *per diffusionem* die meisten transplantierten Zellen der Nekrose anheim. Zum Anderen ist auch der Gehalt an humoralen Faktoren wie BMPs limitiert. Da autogene Transplantate weder toxisch, kanzerogen, mutagen oder antigen sind, besitzen sie eine maximale Biokompatibilität. Ihre biologischen und biomechanischen Eigenschaften gleichen denen des zu ersetzenden Knochens. Somit kommen autologe Transplantate bevorzugt bei großen Defekten oder bei kompromittiertem Empfängerlager zum Einsatz [6].

Körpereigener Knochen besitzt auf der anderen Seite jedoch nur eine limitierte Verfügbarkeit und ist darüber hinaus auch nur begrenzt lagerbar. Zur Transplantatgewinnung muss meist ein zweites Operationsareal eröffnet werden, womit sowohl verlängerte Operationszeiten als auch Komplikationen am zweiten Operationssitus einhergehen können [7]. Diese sog. „Donor-site-morbidity“ gilt als größter Nachteil der autogenen Knochentransplantation. Sie umfasst u.a. chronische Schmerzen [8], Hämatome [1], Nervenläsionen [9], oberflächliche und tiefe Infektionen [10] sowie Frakturen und Herniationen [11,12]. Weiterhin kann es insbesondere bei nicht vaskularisierten Transplantaten zu Resorptionserscheinungen kommen [13]. Weitere Einschränkungen für die Transplantation autologen Knochens können bestimmte Allgemeinerkrankungen (z.B. Osteoporose, Arteriosklerose), das Patientenalter (Kinder), das

Vorliegen eines Polytraumas (starkes Operations- und Gewebetrauma), sowie eine ungünstige Prognose der Grunderkrankung (Onkologie) sein [14].

Trotz der hohen Erfolgsrate bzw. Sicherheit der autologen Knochentransplantation bestehen also auch vielfältige Einschränkungen. Daher wurde seit jeher nach alternativen Materialien zur Rekonstruktion knöcherner Defekte gesucht. Idealerweise sollten diese die therapeutische Sicherheit von autogenem Knochen mit den Kriterien einer unbegrenzten Verfügbarkeit sowie konstanten Materialeigenschaften vereinen.

1.1.3 Allogener und xenogener Knochen

Als Alternative zu autologen Knochentransplantaten kann die Verwendung allogener oder xenogener Materialien erwogen werden. Unter einer allogenen Transplantation versteht man die Verpflanzung von Gewebe von einem Individuum auf ein anderes Individuum der gleichen Spezies, während bei einer xenogenen Transplantation Gewebe von einer Spezies auf eine andere Spezies transplantiert wird [13].

Allogene (homologe) Transplantate stammen von Knochen- bzw. Multiorganspendern und haben den Vorteil einer nahezu unbegrenzten Verfügbarkeit. Darüber hinaus können sie in Knochenbanken gelagert werden. Sie besitzen vornehmlich osteokonduktive Eigenschaften und können, je nach Art der Aufbereitung, durch die enthaltenen Wachstumsfaktoren ggf. auch osteoinduktiv wirken. Die Entnahmemorbidity seitens des Empfängers entfällt im Vergleich zu einer autologen Transplantation [11].

Aufgrund der immunologischen Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger ist mit immunologischen Reaktionen (host vs. graft) zu rechnen. Da im Unterschied zur Transplantation lebenswichtiger Organe wie etwa Herz oder Niere hier eine immunsuppressive Therapie nicht zu rechtfertigen ist [15], müssen die Transplantate einer speziellen Aufbereitung zur Entfernung antigener Strukturen unterzogen werden. Je konsequenter diese vorgenommen wird (z.B. thermische oder chemische Behandlung, Gammastrahlensterilisation), desto größer ist gleichzeitig der Verlust osteoinduktiver Eigenschaften [16,17]. Weiterhin besteht ein potenzielles Risiko der Übertragung infektiöser

Pathogene. Hierbei kann es sich vornehmlich um Viren (z.B. HBV, HCV, HIV) oder um Prionen (z.B. vCJK) handeln. Auch hierdurch sind spezielle Aufbereitungsmethoden zur Eliminierung der Infektiosität erforderlich [18].

Xenogene Transplantate sind meist bovinen Ursprungs (z.B. Bio-Oss®) oder stammen von Algen (z.B. Algipore®), Korallen oder Schalentieren (Chitosan) [19,20,21]. Die Vor- und Nachteile sowie die sich daraus ergebenden Konsequenzen gleichen weitestgehend denen der allogenen Transplantate, nur dass sich die Immunsysteme von Donorspezies und Empfängerspezies noch deutlicher unterscheiden und die hervorgerufene Abstoßungsreaktion dementsprechend noch stärker ausfallen könnte [1]. Daher bedürfen auch diese Werkstoffe vor dem klinischen Einsatz einer Aufbereitung: Durch thermische Behandlung der Materialien bei Temperaturen von mehreren 100°C oder durch chemische Reinigungsverfahren wird deren organische Matrix und somit die antigen wirksamen Strukturen beseitigt [22].

Trotz seiner praktisch uneingeschränkten Verfügbarkeit ist allogener und xenogener Knochenersatz aufgrund des Restrisikos eines Pathogentransfers sowie wegen möglicher immunologischer Phänomene nicht unproblematisch. Bei entsprechender Aufbereitung bietet er andererseits kaum Vorteile gegenüber synthetischen Materialien. Aus diesem Grund konzentrieren sich gegenwärtig die meisten Forschungsanstrengungen bezüglich neuer Knochenersatzmaterialien auf die Entwicklung geeigneter synthetischer (alloplastischer) Werkstoffe.

1.1.4 Alloplastische Materialien

Unter einer Alloplastik versteht man den Gewebeersatz durch synthetisches Fremdmaterial. Alloplastischer Knochenersatz entstammt überwiegend aus den Werkstoffklassen der Metalle, Polymere und Keramiken oder besteht als Komposit aus einer Mischung der vorgenannten Werkstoffklassen. Innerhalb der jeweiligen Klassen kann man darüber hinaus teilweise verschiedene Anwendungsformen unterscheiden: Feste, vorgefertigte Formkörper und Granulate, oder (halb-) flüssige Zemente, Pasten oder Gele, die erst intraoperativ angemischt werden und somit frei formbar sind. Diese alloplastischen Ersatzmaterialien können den sog.

Biomaterialien zugeordnet werden, welche temporär oder dauerhaft in den Körper implantiert werden um die Funktion biologischer Strukturelemente zu ersetzen. Nach ihrer biologischen Aktivität lassen sie sich in biotolerant, bioinert, bioaktiv und bioresorbierbar unterteilen. Als biotolerant bezeichnete Werkstoffe rufen im Empfängerlager eine physiologische Reaktion im Sinne einer bindegewebigen Einscheidung hervor (z.B. PMMA). Bioinerte Ersatzmaterialien sind charakterisiert durch eine hohe Bioverträglichkeit. Es kommt zu keiner Reaktion des Empfängergewebes auf das Ersatzmaterial (z.B. medizinischer Stahl). Bioaktive Werkstoffe gehen einen direkten Verbund mit dem ortständigen Knochen ein. Eine Biodegradation erfolgt gar nicht oder nur in geringem Maße (z.B. partikuläres Hydroxylapatit). Bioresorbierbare Materialien schließlich werden vom Empfängerlager vollständig resorbiert und durch vitalen ortständigen Knochen ersetzt [23,24].

Bereits kleinste Unterschiede in der kristallinen Struktur und in der chemischen Zusammensetzung von Allografts können einen großen Einfluss auf deren klinische Eigenschaften haben. Aufgrund ihrer definierten physiko- und kristallchemischen Eigenschaften werden deshalb heute meist Materialien synthetischen Ursprungs eingesetzt [25]. Um im Sinne der Osteokonduktivität als poröse Leitschiene für osteogene Zellen und für die Angiogenese wirken zu können, sollte das Ersatzmaterial von interkonnektierenden Poren mit einem Porendurchmesser von mindestens 100 µm durchsetzt sein. Weiterhin sollte es resorbierbar sein, damit funktionell belastbarer Knochen an deren Stelle treten kann. Die Resorption sollte hierbei möglichst zeitlich der Knochenneubildung angepasst sein [26,27].

1.2 Rapid Prototyping

1.2.1 Begriffsbestimmung

Unter Rapid Prototyping versteht man die computergestützte Fertigung dreidimensionaler Bauteile auf der Basis eines dreidimensionalen Datensatzes. Diese Technologie ermöglicht die schnelle und zumeist präzise Herstellung von Formkörpern (Prototypen oder größere Serien) mithilfe einer Vielzahl von Fertigungsverfahren [28]. Im Gegensatz zu substanzabtragenden Verfahren (z.B. Fräsen) wird das Material hierbei punktuell, linienförmig oder flächig solange aneinandergesetzt, bis ein dreidimensionales Werkstück

erzeugt worden ist. Auf begrenzende Flächen wie etwa die Wände einer Negativform beim Gussverfahren kann dabei verzichtet werden [29].

1.2.2 Rapid Prototyping Verfahren

Obwohl eine Vielzahl von Rapid Prototyping Verfahren zur Verfügung steht, ist der Verfahrensablauf bei allen prinzipiell gleich. Man kann ihn in drei Hauptarbeitsschritte untergliedern: Datenaufbereitung, maschinelle Umsetzung und Nachbearbeitung.

Am Anfang der Verfahrenskette steht der dreidimensionale Datensatz. Dieser kann auf verschiedene Weisen generiert werden, beispielsweise konstruktiv durch CAD (Computer Aided Design), durch Computertomografien oder mittels 3D-Scans (Streifenlichtscanner) [30]. Dieser Datensatz muss nun in das Rapid Prototyping-Format STL (Standard Triangulation Language) konvertiert werden. Anschließend erfolgt mittels einer geeigneten Software die Zerlegung in horizontale Schichten (Slicing). Diese werden an die Rapid Prototyping Maschine übersendet, die dann sequenziell auf deren Basis den gewünschten Formkörper herstellen kann [31]. Abhängig vom jeweiligen Rapid Prototyping Verfahren folgen auf den Bauprozess diverse manuelle Nachbearbeitungsschritte wie Reinigung, Entfernung etwaiger Stützstrukturen, Entgratung und Nachinfiltration.

Dieses konstruktive Grundprinzip lässt sich durch verschiedene physikalische Verfahren umsetzen, von denen die wichtigsten nachfolgend kurz dargestellt werden:

Die relativ weit verbreitete Stereolithographie (SL) stellt ein Rapid Prototyping Verfahren dar, bei dem die Bauteile aus einem flüssigen Monomer (z.B. Acrylat) erzeugt werden, welches durch ultraviolette Strahlung lokal vernetzt und somit verfestigt wird [32]. Beim Fused Deposition Modelling (FDM) werden vorgefertigte Bauteile wie z.B. Polymerstränge mittels einer beheizten Düse aufgeschmolzen und in dieser Form auf das Bauteil aufgebracht [33]. Beim Laminate Object Manufacturing (LOM) werden vorgefertigte Folien aus unterschiedlichsten Materialien wie Polyester, Kunststoff oder Keramik mit einer bis zu 230°C warmen Walze Schicht für Schicht auf eine Bauplattform aufgeklebt und anschließend mittels Laser, Messer oder Fräse entsprechend der Schichtinformation konturiert [32].

Selektives Laser Sintern (SLS) beinhaltet die schichtweise An- oder Aufschmelzung von Granulaten oder Pulvern mittels Laser- oder Elektronenstrahlung, welche nach ihrer Abkühlung zu einem festen Körper erstarren [34]. Dasselbe Prinzip wie beim SLS liegt dem Selektiven Laser Melting (SLM) zu Grunde, mit dem Unterschied, dass es sich bei dessen Ausgangsstoffen nicht um Granulate, sondern um einkomponentige Metallpulver aus z.B. Titan- oder Aluminiumlegierungen handelt [35]. Beim 3D-Pulverdruck wird ein flüssiges Bindemittel bzw. ein flüssiger Reaktant auf ein Pulver gespritzt und führt hier durch Verkleben bzw. durch eine chemische Reaktion zur Entstehung eines Formkörpers. Generative Verfahren, bei denen die Bauteile weder aus Feststoffen noch aus Flüssigkeiten, sondern aus Gasen erzeugt werden, sind Laser Chemical Vapor Deposition (LCVD) und das Aerosoldrucken. Die LCVD nutzt zwei Laserstrahlen als externe Energiequellen, um reaktionsfähige Gase (z.B. aluminium- und sauerstoffhaltige Gase) zu einer Reaktion anzuregen. Dabei werden feste Stoffe (z.B. Aluminiumoxid) abgeschieden. Beim Aerosoldruck werden Feststoffe mit einem maximalen Durchmesser von 200 nm in einer feinstzerstäubten Trägerflüssigkeit gelöst. Durch ein Düsensystem werden diese dann auf ein Substrat gedruckt [30,32].

1.2.3 3D-Pulverdruck

Die Grundlage für den dreidimensionalen Pulverdruck bildet die Tintenstrahltechnologie. Zu unterscheiden sind hierbei kontinuierlich arbeitende Systeme (Continuous Ink Jet Verfahren, CIJ) von den sogenannten Drop-on-Demand (DoD) Verfahren. Bei CIJ-Systemen wird ein aus vielen Einzeltropfen bestehender Tintenstrahl generiert. Es trifft aber nur ein Teil der Tropfen auf das zu bedruckende Medium. An den auszusparenden Stellen werden die nicht benötigten Tropfen durch Anlegen einer Spannung abgelenkt. DoD-Systeme hingegen setzen Tropfen nur dann frei, wenn sie auch tatsächlich für den Druck benötigt werden [36]. Die wichtigsten Vertreter der DoD-Technologie sind das Bubble-Jet und das Piezo-Verfahren. Beim Bubble-Jet Verfahren wird die Druckflüssigkeit innerhalb des Druckkopfes vor der Düse auf ca. 300°C erhitzt. Dies führt zum Entstehen einer Dampfblase (Bubble), die ein definiertes Volumen an Druckflüssigkeit verdrängt, welches dann explosionsartig aus der Düse freigesetzt wird. Beim Piezo-Verfahren sitzt vor der Düse ein sog. Piezo-Aktor, der je

nach angelegter Spannung seine Form verändert und auf diese Weise ein gewisses Flüssigkeitsvolumen verdrängt, das anschließend aus der Düse heraus geschleudert wird [37].

Beim Pulverdruck wird die Flüssigkeit aus den Tintenstrahldruckköpfen auf ein glatt ausgestrichenes Pulverbett appliziert. Nachfolgend kommt es zum Verkleben der Pulverpartikel oder zu einer chemischen Reaktion zwischen Pulver und Binderflüssigkeit. Dieser Vorgang führt zur Bildung von einzelnen Schichten. Entscheidend für den Verbund der einzelnen Schichten miteinander und somit für die Entstehung des Bauteils sind geeignete Eigenschaften von Pulver und Binderflüssigkeit. Wichtige Parameter sind beispielsweise die Geschwindigkeit der Abbindereaktion bzw. der Trocknung der Flüssigkeit, die Kapillareigenschaften des Pulverbettes sowie die Viskosität der Druckflüssigkeit [38].

Nachteilig an 3D-Pulverdruck-Verfahren ist, abhängig vom verwendeten Materialsystem, die geringe primäre Festigkeit der Bauteile. Diese müssen daher häufig nachbearbeitet werden, z.B. durch Infiltration mit Polymeren. Die Bauteile können zudem Rauigkeiten oder Ungenauigkeiten an der Oberfläche aufweisen, die auf einer Verklebung umliegender Pulvers mit dem Bauteil beruhen. Weiterhin sind die Düsen der Drucker im Allgemeinen recht störungsanfällig, was in einer hohen Ausfallrate resultiert.

Ein Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit zur Verarbeitung vielfältiger Pulver bzw. Materialsysteme wie beispielsweise Stärke [39], Polylaktid [40,41] oder mineralische Zemente [42,43]. Weiterhin besteht die Möglichkeit, fast jede Form und Geometrie zu realisieren, auch solche mit Überhängen, Unterschnitten oder offenen Hohlräumen. Dies sollte besonders vorteilhaft sein für die Herstellung von osteokonduktiven Matrices zum Knochenersatz: Durch systematische Erzeugung innerer Strukturen wie interkonnektierender Makroporen im Größenbereich von wenigen 100 μm sowie von kanalartigen Hohlräumen können sowohl die Vaskularisierung als auch die Ansiedlung ortsständiger osteogener Zellen ermöglicht bzw. gefördert werden [32]. Zusätzliche Möglichkeiten eröffnet die Verwendung von mehreren Druckköpfen: Zum Einen können durch den ortsaufgelösten Einsatz unterschiedlicher Binder in verschiedenen Bereichen des Bauteils unterschiedliche Eigenschaften erzielt werden [37]. Zum Anderen ermöglicht die Verwendung mehrerer Druckköpfe die simultane und lokal gesteuerte Zugabe von Additiven. Denkbare Kandidaten hierfür sind Pharmaka (z.B. Antibiotika) oder bioaktive Proteine (z.B. BMP, VEGF) [44,45].

Auch vitale Zellen wurden bereits mit der Pulverdruck-Technologie unter Beibehaltung ihres Differenzierungsgrades prozessiert [46,47].

1.3 Bone Morphogenetic Proteins: BMPs

Die Erforschung der BMPs geht zurück bis in die 1960er Jahre, als Urist durch die Injektion von entmineralisiertem Knochenpulver in das Muskelgewebe von Kaninchen eine ektopy Knochenbildung induzieren konnte [48]. In den Folgejahren konnten aus der demineralisierten organischen Knochenmatrix die verantwortlichen Proteine isoliert und charakterisiert werden. BMPs wirken osteoinduktiv, da sie sowohl im orthotopen als auch im heterotopen Lager durch die Stimulierung geeigneter Zielzellen (z.B. mesenchymale Stammzellen) die Neubildung von Knochengewebe induzieren können [49].

Mittlerweile sind die Proteine gentechnologisch herstellbar und es existieren seit wenigen Jahren auch kommerziell erhältliche Produkte, die für bestimmte klinische Indikationen zugelassen sind. So erteilte die Europäische Kommission z.B. 2002 erstmals die Marktzulassung für InductOs® (Wyeth, Madison, NJ, USA/Leiderdorp, Niederlande), einem Präparat, das BMP-2 und einen resorbierbaren Kollagenschwamm als Trägermaterial enthält. Zugelassen ist InductOs® für die Versorgung offener Tibia-Frakturen (ergänzend zur Standardbehandlung) und bei degenerativen Bandscheibenschäden im Rahmen von anterioren lumbalen Spondylodesen als Alternative zu autologem Knochen [50,51].

Nach intensiver wissenschaftlicher Bearbeitung stehen heute weniger die BMPs selbst im Fokus der Forschung, sondern vielmehr die Suche nach geeigneten Trägermaterialien (carrier), die die kontrollierte Freisetzung der Proteine mit physiologisch sinnvollem Zeitablauf gestatten [52].

1.3.1 Aufbau der BMP-Familie

BMPs sind homodimere Moleküle. Derzeit sind ca. 20 verschiedene BMPs identifiziert, die allesamt osteoinduktive Eigenschaften aufweisen und aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologie im Bereich des C-terminalen Endes der TGF- β Superfamilie zugeordnet werden können [53,54]. Dies trifft jedoch nicht für das BMP-1 zu, welches eine Prokollagen-C-Protease ist und somit weder osteoinduktiv wirksam, noch ein Mitglied der TGF- β Superfamilie ist. Einige BMPs wie BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 oder BMP-7 sind in der Lage, *in vitro* verschiedene pluripotente mesenchymale Stammzelllinien zur Differenzierung zu osteoblastären Zelllinien zu stimulieren [55] und *in vivo* die Knochenneubildung zu induzieren. Von allen bekannten BMPs besitzen BMP-2 und BMP-7 die größte osteoinduktive Potenz, wobei die des BMP-7 noch von der des BMP-2 übertroffen wird [56,57]. Neben der Lokalisation in der organischen Knochenmatrix finden sich verschiedene BMPs auch in vielen anderen Geweben wie Milz, Kolon- und Lungengewebe, Gehirn, Leber, Herz, Niere, Dünndarm, Prostata, Pankreas, Ovarien und Plazenta. Neben der Regulierung von Knochen- und Knorpelwachstum sind sie auch an Prozessen wie Organogenese und Embryogenese beteiligt [58,59]. So modulieren z.B. BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-6 und BMP-7 die Proliferation, Apoptose und Interaktion von Epithel- und Mesenchymzellen während der Organogenese, etwa von Lunge, Niere oder Auge [60,61].

1.3.2 BMP-induzierte Knochenneubildung

Die Osteoinduktion durch BMPs erfolgt hauptsächlich nach dem Prinzip der enchondralen Ossifikation. Nur selten induzieren BMPs ohne den Umweg über das Knorpelstadium die direkte Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu osteogenen Zellen (desmale Ossifikation). Die enchondrale Ossifikation beschreibt einen mehrtägigen Prozess, der mit der Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen (Chemotaxis) aus dem umliegenden Geweben (Periost, Bindegewebe, Skelettmuskulatur) beginnt. Diese werden zunächst durch mitogene Signale zur Proliferation angeregt. Nach ca. 5 Tagen beginnt deren Differenzierung zu Chondroblasten, sodass an Tag 7 bereits Chondrozyten samt von ihnen gebildeter

Knorpelmatrix beobachtet werden können. Im Anschluss bewirkt nun eine vermehrte Kapillareinsprossung eine Hypertrophie der Chondrozyten und deren Kalzifizierung. Gleiches geschieht mit der chondralen Matrix (Tag 9). An Tag 10-12 schließlich erscheinen die ersten Osteoblasten und sorgen durch die Sekretion und Mineralisation von Extrazellulärmatrix für das Auftreten erster Knochenformationen. Im Folgenden beginnen mit dem Erscheinen von Osteoklasten Umbauvorgänge im neugebildeten Knochen, die als Remodelling bezeichnet werden (Tag 14-21) und von einer Angiogenese und der Bildung von hämatopoetischem Knochenmark begleitet werden. Erfolgt die Osteogenese ektopisch bzw. wird der neugebildete Knochen biomechanisch nicht beansprucht, kommt es nachfolgend zur Atrophie des Knochenmarks und zur Resorption der mineralisierten Substanz [62,63].

Die Signaltransduktion von BMPs auf ihre Zielzellen erfolgt über die Bindung an homodimere transmembranöse Rezeptoren. Die für die Ligandenbindung verantwortliche extrazelluläre Domäne (cysteinreich und glykolysiert) ist über einen kurzen transmembranösen Abschnitt mit der intrazellulären Domäne verbunden, welche Serin/Threonin-Kinase-Aktivität besitzt [64,65]. Man kann dabei zwei strukturell ähnliche Rezeptortypen unterscheiden: Typ I und Typ II Rezeptoren, die durch Bildung eines heteromeren Komplexes für die Signalübertragung sorgen [66,67]. Bisher sind 12 Typ I und 7 Typ II Rezeptoren identifiziert worden [68]. Die Bindung von BMPs erfolgt mit unterschiedlicher Affinität an jeweils drei relevante Rezeptor-Subtypen der Typ I und Typ II Rezeptoren. Es sind dies im Einzelnen die Typ I Rezeptoren Actin receptor-like kinase 2 (ALK 2), BMPR-IA (ALK 3), BMPR-IB (ALK 6) und die Typ II Rezeptoren Activin type II receptor (ActR-II), ActR-IIB, BMPR-II. Neben den genannten Rezeptoren sind auf der Zelloberfläche auch noch andere Proteine lokalisiert, die Liganden der TGF- β -Familie binden und so die Signaltransduktion verstärken [69,57].

Bindet nun ein BMP-Agonist an die extrazelluläre Domäne eines Typ II Rezeptors, so bildet dieser mit einem Typ I Rezeptor einen ternären (aus drei Grundeinheiten bestehenden) Komplex aus. Der aktivierte Typ II Rezeptor phosphoryliert daraufhin den Typ I Rezeptor durch die Übertragung von Serinresten [70]. Dieser aktivierte heteromere Komplex aus Ligand, Typ I und Typ II Rezeptor phosphoryliert mit seiner Serin/Threonin-Kinase-Domäne sogenannte Smads. Diese sind zytoplasmatische Signalmoleküle, welche in Zellen als Transkriptionsfaktoren fungieren [71,72].

Durch Unterschiede in Funktion und Aufbau kann man die Smads in drei Untergruppen aufteilen: Die signalübertragenden R-Smads (receptor regulated Smads), deren assoziierte Co-Smads (common mediator Smads) und inhibierende I-Smads (inhibitory Smads). Zur Gruppe der R-Smads gehören Smad1, 2, 3, 5, 8, Co-Smad ist das Smad7 und I-Smads sind die Smads6 und 7 [73,74]. Direktes Substrat des Liganden-Rezeptor Komplexes sind die R-Smads. Sind sie einmal durch Phosphorylierung aktiviert, bilden sie mit Co-Smads heteromere Komplexe, die dann in den Nucleus eindringen und die Transkription steuern können [75,67]. Eine Regulation der Signaltransduktion vom Rezeptorkomplex über die Smads findet durch die I-Smads statt. Sie sind durch Beeinflussung der Rezeptorkomplexe, der R- und Co-Smads, sowie als Co-Repressor der Translation in der Lage, die Signalweiterleitung auf verschiedene Weisen zu unterbinden [76,57]. Smad1, Smad5 und Smad8 werden von Typ I BMP-Rezeptoren phosphoryliert, während Rezeptoren vom Typ II mit Smad2 und Smad3 interagieren [58,57]. Aktivierte Smads können entweder direkt die Genexpression steuern oder als Co-Aktivatoren anderer Transkriptionsfaktoren wirken [77].

Neben ihrer physiologischen Funktion als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren im Rahmen der Osteogenese sind BMPs auch an einer Reihe pathologischer Prozesse beteiligt. Als eindrucksvolles Beispiel seien hier die sog. heterotopen Ossifikationsstörungen genannt. Dies sind unphysiologische, nicht neoplastische Verknöcherungen innerhalb von mesenchymalem Weichgewebe. Bei der autosomal-dominant vererbten Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) kommt es zu postnatal einsetzenden progressiven heterotopen Knochenneubildungen im Muskel- und Bindegewebe. Die Verknöcherungen können spontan und ohne Fremdeinwirkung auftreten oder aber bereits durch Bagatelltraumen der Weichgewebe (z.B. intramuskuläre Injektion) initiiert werden. Bereits in der Kindheit beginnend, kommt es im weiteren Verlauf zu Verknöcherungen und Versteifungen des Bewegungsapparates. Bei terminalem Befall der Atemmuskulatur kommt es meist zu einer letalen restriktiven Ventilationsstörung. Als Ursache der FOP konnten verschiedene Mutationen des für den BMP-Rezeptor ALK 2 kodierenden Gens identifiziert werden. Diese führen zu einer Aktivierung der intrazellulären Smad-Signalkaskade auch ohne Rezeptor-Liganden-Bindung. Eine wirksame Therapie im Sinne einer Vermeidung der Ossifikationen besteht derzeit nicht [78,79].

2 Material und Methode

2.1 Evaluation von Magnesium-Phosphat-Zement als Trägermaterial

2.1.1 Präparation der Reaktanten

Durch Vermischung von Magnesium Hydroxid ($\text{Mg}(\text{OH})_2$) und Magnesium Hydrogen Phosphat Trihydrat ($\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) in angemessener Stöchiometrie und anschließender Sinterung bei 1100°C für fünf Stunden wurde Farringtonit Pulver ($\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$) hergestellt. Der gesinterte Farringtonit-Kuchen wurde mit Mörser und Pistill zerkleinert, 20 Minuten bei 200 min^{-1} in einer Kugelmühle fein gemahlen und anschließend mit einem Sieb mit einer Porengröße von $355 \mu\text{m}$ gesiebt. In einem weiteren Schritt wurde das so hergestellte Pulver mit 20% Di-Ammoniumhydrogenphosphat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, DAHP), welches ebenfalls auf eine Partikelgröße $< 355 \mu\text{m}$ gesiebt war, in einem Pflugscharmischer vermischt.

Die Binderflüssigkeit wurde durch Mischung von $0,75 \text{ M}$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (DAHP) und $0,75 \text{ M}$ $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Ammoniumdihydrogenphosphat, ADHP) hergestellt. Die Aushärtung der gedruckten Objekte erfolgte nach der folgenden Gleichung:



Geräte:

- Kugelmühle PM400 (Retsch, Haan, Deutschland)
- Pflugscharmischer M5R (Lödige, Paderborn, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- ADHP (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- DAHP (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (Fluka, Seelze, Deutschland)
- $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.1.2 Druckersystem und Druckvorgang

Die Strukturen wurden bei Raumtemperatur mit einem kommerziellen 3D-Pulverdruck-System hergestellt. Basierend auf der 3DP (Three-Dimensional Printing) Technologie des Massachusetts Institute of Technology konvertiert die System Software des ZPRINTER 310™ die in 3D CAD (Computer Aided Design) erstellten drei-dimensionalen Entwürfe in einzelne Schnitte bzw. Schichten mit einer Stärke zwischen 0,075 und 0,2 mm und sendet diese an den Drucker.

Im Inneren des Druckers gibt es zwei Behälter: Den Zufuhr-Behälter und den Bauraum. Weiterhin finden sich eine Walze und die Druckereinheit, die zusammen auf einem Schlitten montiert sind, der horizontal über den Bauraum bewegt wird. Die einzelnen Schichten werden sukzessive gedruckt und miteinander vereinigt. Zu Beginn des Druckprozesses befindet sich der mit Pulver gefüllte Zufuhr-Behälter in seiner untersten Position, während sich der Bauraum in seiner obersten Position befindet (siehe Abb. 1a). Der Bauraum wird nun um 0,075-0,2 mm abgesenkt, während der Zufuhr-Behälter um denselben Betrag angehoben wird (siehe Abb. 1b). Die Walze schiebt nun eine Schicht Pulver entsprechender Dicke aus dem Zufuhr-Behälter in den Bauraum (siehe Abb. 1c) und streicht diese glatt (siehe Abb. 1d). Nun kann eine Schicht des Druckobjekts erzeugt werden, indem ein flüssiger Reaktant mittels Druckkopf auf die Pulverschicht aufgebracht wird (siehe Abb. 1e). An den Stellen, an denen das Pulver in Kontakt mit dem flüssigen Reaktanten kommt, kommt es zur Aushärtung infolge einer Zementabbindereaktion. Hierbei kommt es auch zur Verfügung der einzelnen Schichten miteinander. Daraufhin hebt sich der Zufuhr-Behälter wieder um eine Schichtdicke und der Bauraum senkt sich entsprechend ab (siehe Abb. 1f). Der Druckprozess kann sich auf diese Weise so lange wiederholen, bis das gesamte Bauteil gedruckt ist (siehe Abb. 1g-i).

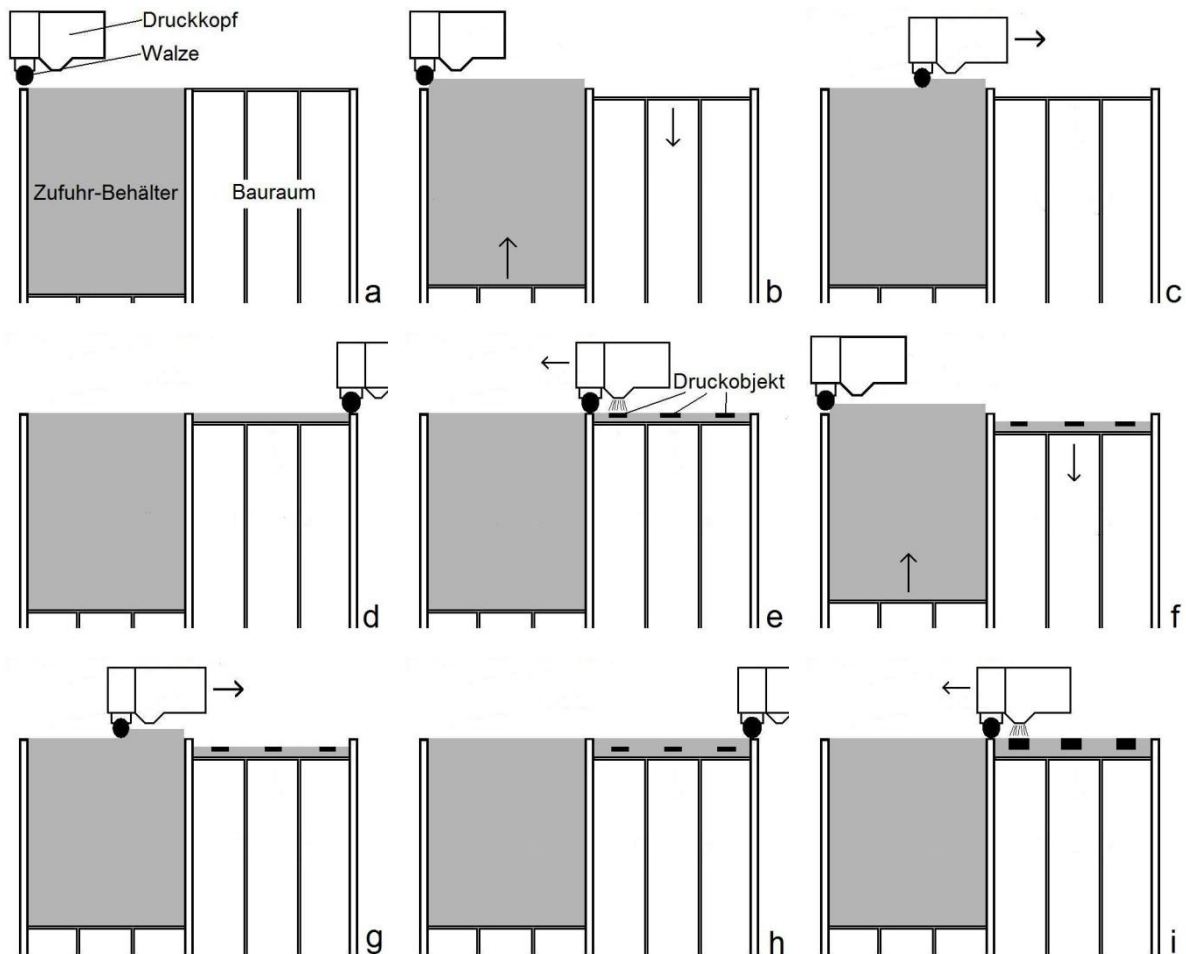


Abb. 1 a-i: Schematische Darstellung des Druckprozesses

Der Drucker verfügt über vier Druckköpfe mit den Positionen Weiß, Gelb, Magenta und Cyan. In jeder dieser Positionen befindet sich die gleiche Patrone. Die einzelnen Farbkanäle unterscheiden sich durch die maximal applizierbare Menge an Druck-Flüssigkeiten (Binder sowie Farbe bzw. Additive), der sog. Bindersättigung. Der weiße Druckkanal ist dem flüssigen Reaktanten vorbehalten, da hier die größte Menge an Flüssigkeit abgegeben werden kann. Über den gelben Kanal kann die zweitgrößte Flüssigkeitsmenge appliziert werden, weshalb er in der vorliegenden Arbeit für die Prozessierung der BMP-2-Lösungen genutzt wurde.

Das nicht bedruckte Pulver übernimmt während des Druckprozesses eine Stützfunktion. Das überschüssige Pulver wird mittels Pinsel und Luftbläser entfernt und das Bauteil getrocknet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Testzylinder und Zellkultur-Druckobjekte (Scaffolds) computerunterstützt entworfen (STL Daten) und hatten für die Versuche zur Untersuchung der Zytokompatibilität und der chemischen Löslichkeit eine zylindrische Form mit einem Durchmesser von 15 mm und einer Höhe von 2 mm. Der Druck erfolgte mit einer Genauigkeit von +/- 200 µm. Die Schichtdicke betrug 125 µm und es wurde ein Binder/Volumen-Verhältnis von 0,371 verwendet. Nach dem Druck wurden die Druckzylinder bei Raumtemperatur für 24 Stunden luftgetrocknet und anschließend durch Eintauchen in die Binderflüssigkeit nachgehärtet. Zum Abschluss wurden die Zylinder dreimalig mit Aqua dest. abgespült, um nicht abgebundene Reaktanten zu entfernen. Danach erfolgte die Sterilisierung durch Eintauchen in 70%iges Ethanol und erneute Lufttrocknung.

Geräte:

- ZPRINTER 310 (Z-Corporation, Burlington, USA)

Verbrauchsmaterialien:

- Druckerpatrone HP 11Druckkopf C4810A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- Pulver und Binder (Eigenherstellung, siehe 2.1.1)
- BMP-2-Lösungen (Physiologisch-Chemisches Institut II der Universität Würzburg siehe 2.2.1)
- Aqua destillata (Universitätsversorgung Würzburg)
- Ethanol (Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg)

2.1.3 Zellkultur

Humane osteoblastäre Zellen (vom Osteosarkom stammende Zelllinie MG63) wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), das mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und 1% Penicillin und Streptomycin (P/S) supplementiert war, bei 37°C in einer angefeuchteten 5%igen CO₂ Atmosphäre kultiviert.

Neben den Struvit-Zellkultur-Scaffolds mit einer zylindrischen Geometrie von 15 mm Durchmesser und 2 mm Höhe wurden Standard-Positivkontrollen (Titan) und Standard-

Negativkontrollen (Kupfer) etabliert. Diese wiesen dieselben geometrischen Abmessungen auf. Struvit-Scaffolds sowie Kontroll-Träger wurden jeweils in den Kavitäten von 24-Well-Platten platziert. Die Kontroll-Exemplare (Titan, Kupfer) wurden zuvor mit Ultraschall und Detergenzien (Extran, Isopropanol, SDS) gereinigt und für 2 Stunden bei 134°C autoklaviert. Als weitere Positivkontrollen diente der blanke Zellkultur-Kunststoff der 24-Well-Platten (Polystyrol; PS) ohne jegliche Proben. Die Zellen wurden nach dem Auftauen einmal in Medium gewaschen, in Medium suspendiert und schließlich in einer Konzentration von $5,0 \times 10^4$ Zellen (2 ml/Well) ausgesät. Sie wurden in der Folge 10 Tage lang kultiviert, wobei das Medium alle zwei Tage gewechselt und hinsichtlich pH-Wert und freier Elektrolyte untersucht wurde. Im selben Intervall erfolgte auch die Bestimmung der Zellviabilität der Kulturen.

Geräte:

- Absaugpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)
- Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Kühlzentrifuge Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Sterilarbeitsbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Ultraschallbad (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Zellzähler Casy 1 (Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- 24-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Kupfer-Stanzplättchen (Eigenanfertigung der Abteilung für FMZ der Universität Würzburg)
- Petrischalen Easy Grio (Becton Dickinson, Plymouth, England)
- Pipettenspitzen (Sarstedet, Nümbrecht, Deutschland)
- Titan-Stanzplättchen (Reintitan, Eigenanfertigung der Abteilung für FMZ der Universität Würzburg)
- Zählgefäße (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Zellkultur-Flaschen EasyFlasks (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zentrifugenröhrchen CellStar Tubes 50 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Extran MA03 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- FKS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- P/S (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- SDS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

2.1.4 Zellviabilität

Die Zellviabilität (Zellebensfähigkeit) reflektiert die Menge vitaler und stoffwechselaktiver Zellen. Zu ihrer Bestimmung wurde in dieser Arbeit das WST-1 Kit (Water Soluble Tetrazolium) verwendet. In stoffwechselaktiven Zellen wird das nur schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene Disulfonat) durch die intakte Succinat-Tetrazolium-Reduktase enzymatisch in das dunkelrote Formazan umgesetzt. Der Farbumschlag ist hierbei proportional zur Anzahl der viablen Zellen einer Kultur und die Extinktion kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 440 nm gemessen werden.

Nach 15-minütiger Inkubation der Zellen mit dem WST-Reagenz (1:10 in frischem DMEM verdünnt) bei 37°C wurden je 100 µl des Überstandes in die Kavitäten einer 96-Well-Platten überführt (Doppelbestimmungen). Die optische Dichte des Überstandes wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 440 nm (Messfilter: 440 nm, Referenzfilter: 690 nm) quantifiziert.

Geräte:

- Photometer Tecan Spektra Rainbow (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- 96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- WST-1 Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

2.1.5 Chemische Analyse des Kulturmediums

Zur Abschätzung des chemischen Verhaltens und der Löslichkeit der Scaffolds unter Zellkultur-Bedingungen wurde der Medium-Überstand alle 2 Tage im Rahmen des Mediumwechsels gesammelt und bei -20°C asserviert. Im Anschluss wurden die Konzentrationen von freiem Calcium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}) und Phosphat (PO_4^{3-}), sowie der pH-Wert im Überstand bestimmt. Die Messung der jeweiligen Elektrolyt-Konzentrationen wurde mit Hilfe kommerzieller Komplex-bildender Testsysteme (COBAS INTEGRA), die auch in der klinischen Diagnostik (Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg) angewandt werden, durchgeführt. Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter (pH Level 1) in Kombination mit der pH-Elektrode SenTix 61 bestimmt.

Geräte:

- Elektrolyt-Analysesystem Cobas Integra (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- pH-Elektrode SenTix 61 (WTW, Weilheim, Deutschland)
- pH-Meter inoLab (WTW, Weilheim, Deutschland)

2.1.6 Rasterelektronenmikroskopie

Um sowohl Zellwachstum als auch Zellmorphologie zu visualisieren wurden die zelltragenden Scaffolds rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die zelltragenden Scaffolds wurden hierfür zunächst in PBS gespült und mit eiskalten Glutaraldehyd (6% in PBS) fixiert. Nach vier Waschvorgängen in PBS wurden die Proben schließlich in aufsteigenden Konzentrationen von Azeton (30%, 50%, 75%, 90% und fünfmal in 100%) dehydriert. Nach darauf folgender Kritischen-Punkt-Trocknung wurden die Proben mit Gold beschichtet und per Rasterelektronenmikroskopie bei verschiedenen Vergrößerungen analysiert.

Geräte:

- Critical Point Dryer CPD 030 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein)
- Gold-Sputter-Coater K 550 (EMITEC, Ashford, England)
- Rasterelektronenmikroskop Quanta 200 (FEI, Brno, Tschechien)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- Azeton (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.2 Evaluation der biologischen Wirksamkeit von BMP-2

2.2.1 Rekombinantes humanes BMP-2 (rhBMP-2)

Das verwendete rhBMP-2 wurde unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise vom Physiologisch-Chemischen Institut II der Universität Würzburg unter Leitung von Prof. Dr. W. Sebald zur Verfügung gestellt. In seiner Aminosäuresequenz entspricht es dem natürlich vorkommenden Protein. Die Morphogene wurden in einem bakteriellen Expressionssystem (*Escherichia coli*) hergestellt [80]. Die Proteine wurden nach Lyophilisierung bei -80°C gelagert. Vor Verwendung erfolgte die Rehydrierung in Aqua ad iniectabilia unter Einstellung der gewünschten Konzentration. Im Folgenden ist vereinfachend von BMP-2 die Rede.

2.2.2 Zellbasiertes Nachweisverfahren der biologischen Wirksamkeit von BMP-2

Zum Nachweis der biologischen Wirksamkeit von BMP-2 wurde ein zellulärer Transdifferenzierungs-Assay verwendet. Hierzu kamen murine C2C12 Myoblasten zum Einsatz. Sie wurden 1977 erstmals von Yaffe und Saxel durch wiederholte selektive Passage von Myoblasten aus dem Oberschenkel von C3H-Mäusen gewonnen. Auf ihrer Oberfläche besitzen sie BMP-Rezeptoren vom Typ I und II. In normaler Zellkultur ohne äußere Einflüsse differenzieren C2C12 Zellen nach Erreichen der Zell-Konfluenz zu Myozyten. Hierbei bilden sie nur extrem wenig bzw. nicht nachweisbare Mengen osteoblastärer Marker. Bindet jedoch BMP-2 an die membranständigen Rezeptoren, so transdifferenzieren die Zellen ab einem Schwellenwert dosisabhängig zu einem osteoblastären Phänotyp und exprimieren osteoblastäre Marker, insbesondere die Alkalische Phosphatase (ALP). Bereits ab einem Schwellenwert von 100 ng/ml (= 4,61 nM) BMP-2 sollte laut Literatur eine leicht erhöhte

ALP-Aktivität feststellbar sein. Ab BMP-2-Konzentrationen von 300 ng/ml (= 13,81 nM) findet sich eine deutlich erhöhte ALP-Aktivität [81]. Um dies im Vorfeld der Versuche zu validieren und um einen sinnvollen Konzentrationsbereich für die im Druck eingesetzten BMP-2-Lösungen zu ermitteln, wurden entsprechende Versuche durchgeführt.

Damit der zu erwartende Schwellenwert möglichst sicher bestimmt bzw. bestätigt werden konnte, sollte die ALP-Aktivität der C2C12 Zellkulturen nach Inkubation mit BMP-2-Lösungen in elf verschiedenen Konzentrationen gemessen werden. Ausgehend von einer deutlich über dem zu erwartenden Schwellenwert (100-300 ng/ml = 4,61-13,83 nM) liegenden Ausgangskonzentration (500 nM = 13110 ng/ml; siehe Tab. 1) wurden die anderen Konzentration durch eine Verdünnung von jeweils 1:2 hergestellt (Verdünnungsreihe). Ausgangs- sowie Folgekonzentrationen wurden so gewählt, dass ein Anstieg der ALP-Aktivität ab dem Schwellenwert im Verlauf gut zu erkennen sein sollte.

Tab. 1: Umrechnungstabelle für die einzelnen BMP-2-Konzentrationen nM zu ng/ml
(1 M = 26,22 g/ml)

BMP-2-Konzentrationen					
nM	500	250	125	75,5	37,75
ng/ml	13110	6555	3277,5	1638,75	819,38
nM	9,44	4,72	2,36	1,18	0,59
ng/ml	204,84	102,42	51,21	25,6	12,8

Hierzu wurden je $5,0 \times 10^4$ Zellen pro well in 100 µl Wachstumsmedium (DMEM, 10% FKS, 1% P/S) auf 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Umstellung auf 100 µl des Differenzierungsmediums (DMEM, 5% FKS, 1% P/S) und der Start einer Verdünnungsreihe:

In Spalte 1 der 96-Well-Platte wurden zu den 100 µl Differenzierungsmedium 100 µl einer 500 nM BMP-2-Lösung pipettiert. Nach sorgfältiger und behutsamer Durchmischung der BMP-2-Lösung mit dem Differenzierungsmedium wurden daraufhin 100 µl dieser Mischung aus Spalte 1 in Spalte 2 überführt. Diese wurden wiederum vermischt und der Vorgang wurde so lange fortgesetzt bis in Spalte 11 eine BMP-2-Konzentration von 0,59 nM vorlag. Spalte 12 blieb als Negativkontrolle frei von BMP-2.

Die Zellkulturen wurden daraufhin 72 Stunden lang mit dem Differenzierungsmedium und BMP-2 inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase bestimmt.

Das Enzym (ALP) spaltet Monophosphorsäureester von primären und sekundären Alkoholen und Phenolen ab. Bei der biochemischen Bestimmung der Enzymaktivität dient p-Nitrophenylphosphat (PNPP) als Substrat. Das anionische Spaltprodukt p-Nitrophenolat besitzt aufgrund seiner mesomeren Grenzstrukturen eine charakteristische gelbe Farbe und lässt sich daher photometrisch leicht quantifizieren.

Die Bestimmung der Aktivität der Alkalische Phosphatase wurde wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurde das mit unterschiedlichen BMP-2-Konzentrationen dotierte Differenzierungsmedium aus den Wells der inkubierten Zellkulturen abgesaugt und diese daraufhin einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde in jedes Well 100 µl alkalischer Lysispuffer 1 (0,1 M Glycin, $1,0 \times 10^{-3}$ M Magnesiumchlorid, $1,0 \times 10^{-3}$ M Zinkchlorid und 1%, Nonidet P40 Substitut) gegeben, von welchem die Zellen 60 Minuten unter Schütteln (Thermomixer 5436) lysiert wurden. In jedes Well wurde nun auf die lysierte Suspension 100 µl einer Mischung von alkalischem Lysispuffer 2 (0,1 M Glycin, $1,0 \times 10^{-3}$ M Magnesiumchlorid, $1,0 \times 10^{-3}$ M Zinkchlorid) und PNPP (20 mg PNPP pro ml Wasser) im Verhältnis 10:1 gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation erfolgte die photometrische Auswertung bei einer Wellenlänge von 405 nm (Messfilter: 405 nm, Referenzfilter: None).

Geräte:

- Absaugpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)
- Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Kühlzentrifuge Universal 320R (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Multi-Channel-Pipette Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Photometer Tecan Spektra Rainbow (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Sterilarbeitsbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Zellzähler Casy 1 (Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- 96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Petrischalen Easy Grip (Becton Dickinson, Plymouth, England)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zählgefäße (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Zellkultur-Flaschen Easy Flasks (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zentrifugenröhrchen CellStar Tubes 50 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- BMP-2-Lösungen (siehe 2.2.1)
- DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- FKS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Nonident P40 Substitut (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- PNPP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- P/S (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Zinkchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2.2.3 Nachweis der biologischen Wirksamkeit gedruckter BMP-2-Lösungen

Um zu überprüfen, ob die biologische Wirksamkeit von BMP-2 nach der Prozessierung durch einen Pulverdrucker noch gegeben ist, wurden BMP-2-Lösungen verschiedener Konzentrationen (0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 5 μM) zunächst über die Reinigungsfunktion des Druckers mit einer Druckerpatrone gedruckt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie deutlich über dem Schwellenwert für die Induktion von ALP in C2C12 Zellen liegen (100 ng/ml = 4,61 nM, siehe 2.2.2). Die handelsübliche Druckerpatrone wurde dabei nach Entfernung der Druckertinte und mehrmaliger gründlicher Spülung mit Aqua dest. mit 2 ml der zu untersuchenden BMP-2-Lösung gefüllt. Diese wurde daraufhin, entsprechend eines regulären Druckvorganges, einmal komplett gedruckt und mit einer sterilen Petrischale unterhalb des Druckkopfes wieder aufgefangen. Als Referenz zu den gedruckten Lösungen dienten entsprechende nicht-gedruckte BMP-2-Lösungen aus dem gleichen Versuchsansatz.

Geräte:

- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 μl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- ZPRINTER 310 (Z-Corporation, Burlington, USA)

Verbrauchsmaterialien:

- Druckerpatrone HP 11Druckkopf C4810A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)
- Petrischalen Easy Grip (Becton Dickinson, Plymouth, England)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- Aqua dest. (Universitätsversorgung Würzburg)
- Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- BMP-2-Lösungen (siehe 2.2.1)

Der Nachweis der biologischen Wirksamkeit erfolgte wie oben beschrieben anhand der C2C12 Zellkulturen. Es wurden $5,0 \times 10^4$ Zellen in 200 μl Wachstumsmedium in 96-Well-Platten ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation und darauffolgender Umstellung auf 180 μl des Differenzierungsmediums wurden nun in jedes Well 20 μl von BMP-2 Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen hinzugegeben. Es wurden die Konzentrationen 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 5 μM untersucht. Von jeder Konzentration kamen gedruckte Proteinlösungen sowie nicht-gedruckte Kontrolllösungen zum Einsatz. Als Negativkontrollen dienten Wells, welchen 20 μl 0,00 μM BMP-2 (Aqua ad iniectabilia) zugesetzt wurde. Es folgte die Inkubation der Zellkultur mit den BMP-2-Lösungen für 72 Stunden. Im Anschluss daran wurden die 96-Well-Platten verschiedenen Tests zugeführt: Eine Platte diente der Bestimmung der Zellviabilität, eine Platte der Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen und drei Platten der Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase. Insgesamt wurden drei unabhängige Versuchsansätze (Druck mit Zell-Assay) durchgeführt. Dabei wurde jede Proteinlösung achtfach bestimmt.

Geräte:

- Absaugpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)
- Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Kühlzentrifuge Universal 320R (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Multi-Channel-Pipette Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Sterilarbeitsbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Zellzähler Casy 1 (Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- 96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Petrischalen Easy Grip (Becton Dickinson, Plymouth, England)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zählgefäße (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Zellkultur-Flaschen Easy Flasks (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zentrifugenröhrchen CellStar Tubes 50 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- BMP-2-Lösungen (siehe 2.2.1)
- DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- FKS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- P/S (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mittels WST-1 Kit analog zu der auch unter 2.1.4 beschriebenen Vorgehensweise. Im Unterschied dazu wurden jedoch die Zellkulturen primär in 96-Well-Platten angelegt, sodass die Kultivierung, die WST-Reaktion sowie die photometrische Auswertung in denselben Kulturgefäßen durchgeführt werden konnten.

Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurde analog zu dem unter 2.2.2 beschriebenen Protokoll gemessen.

Zusätzlich wurde der Proteingehalt der Zellen nach Lowry bestimmt. Die Methode nach Lowry dient der Bestimmung der Syntheseleistung von Zellkulturen durch eine quantitative Erfassung des Gesamtproteingehalts der Zellen. Hierbei bildet das Protein mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex, indem im Rahmen der sog. Biuret-Reaktion Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden. Daraufhin reduziert Cu^+ das gelbe Folin-Ciocalteau-Reagenz zu Molybdänblau, dessen Extinktion wiederum photometrisch bei 750 nm bestimmt werden

kann [82]. Die Quantifizierung des Proteingehalts erfolgt anhand einer Eichgeraden, die aus sieben Proben bekannter Proteinkonzentration (Standards) und einem Leerwert erstellt wird.

Zur Vorbereitung wird hierzu zunächst das Differenzierungsmedium aus den 72 Stunden lang inkubierten 96-Well-Platten vorsichtig mit einer sterilen Pipette abgesaugt. Die Kavitäten werden daraufhin zwei Mal mit je 200 μl PBS gewaschen. Jedes Well wird nun noch einmal mit 100 μl PBS überschichtet, welches diesmal allerdings in den Wells verbleibt. Anschließend wird jedem Well noch 10 μl 20 % Natriumhydroxid (NaOH) zugegeben und die 96-Well-Platte wird mit MT-Folie versiegelt und für eine Stunde bei 80°C inkubiert. Nach 10-minütiger Abkühlung wird zur Neutralisation in jedes Well 10 μl 20 % Salzsäure (HCl) pipettiert und vermischt.

Die eigentliche Proteinbestimmung beginnt mit der Herstellung des Arbeitsreagenz, eines Leerwertes und der Standards: Für das Arbeitsreagenz werden 20 μl Reagenz S zu je 1,0 ml Reagenz A gemischt. Für den Leerwert werden 100 μl PBS, 30 μl 20 % NaOH und 30 μl 20% HCl gemischt. Die Standards wurden aus einer Stammlösung mit 1,42 mg/ml Protein hergestellt. Insgesamt werden sieben Standards mit Proteinkonzentrationen von 1000, 800, 600, 400, 200, 100 und 50 $\mu\text{g/ml}$ durch Verdünnung mit PBS erstellt.

Nun werden je 20 μl des Leerwerts, der Standards und der zu messenden Proben in je eine Kavität einer 24-Well-Platte pipettiert. Zum Leerwert, den Standards und den Proben werden jetzt jeweils 100 μl Arbeitsreagenz und darauf folgend jeweils 800 μl Reagenz B pipettiert. Jedes Well wird fünf Sekunden lang gemischt und reagiert 15 Minuten lang während ein Farbumschlag nach Blau einsetzt.

Der Reaktionsansatz wird nun für die photometrische Auswertung wiederum in eine 96-Well-Platte überführt: Je 200 μl des Leerwerts und der Standards werden aufsteigend nach ihrer Konzentration in Spalte 1 der 96-Well-Platte überführt, beginnend mit dem Leerwert in Well A1 und endend mit einer Proteinkonzentration von 1000 $\mu\text{g/ml}$ in Well H1. Dieses Pipettierschema ermöglicht die automatische Erstellung einer Eichgeraden durch die Tecan-Software. Spalte 2 der 96-Well-Platte bleibt frei. In die Spalten 3-12 können nun je 200 μl der zu untersuchenden Proben in je eine Kavität der 96-Well-Platte pipettiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Doppelbestimmungen jeder Probe vorgenommen. Es folgt die Messung der Extinktion am ELISA Reader bei 750 nm.

Geräte:

- ELISA-Reader Spectrafluor plus (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Heißluftschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland)
- Multi-Channel-Pipette Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Photometer Tecan Spektra Rainbow (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 μ l (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Vortexgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

Verbrauchsmaterialien:

- 24-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- 96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- MT-Abdeckfolie (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- 20% Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 20% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- DC Protein-Assay mit Reagenz S, -A und -B (BIO-RAD, München, Deutschland)
- Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Nonident P40 Substitut (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- PNPP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Zinkchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2.3 Untersuchung von mit BMP-2 gedruckten Magnesium-Phosphat-Matrizes

2.3.1 Pulverdruck der Strukturen

Die verwendeten Struvit-Matrizes wurden analog zu dem unter 2.1.1 beschriebenen Verfahren unter Verwendung der dort aufgeführten Reaktanten mittels 3D-Pulverdruck hergestellt. Zusätzlich sollte auch noch eine 25 μ M BMP-2-Lösung in die Zylinder-Strukturen gedruckt werden. Die Konzentration wurde hierbei sehr weit über dem Schwellenwert für die Induktion von ALP in C2C12 Zellen (100 ng/ml = 4,61 nM) gewählt. Damit sollte einem

möglichen Wirksamkeitsverlust bzw. Mengenverlust während des Druckprozesses sowie der (unvollständigen) Freisetzung der Proteine aus den Matrices Rechnung getragen werden. Für den Druck der Proteine wurde der Druckkanal „Gelb“ gewählt und mit 1,5 ml der 25 μM BMP-2-Lösung (in Aqua ad iniectabilia gelöst) gefüllt, welche parallel mit dem Binder in die Strukturen gedruckt wurde. Software-bedingt erfolgte der Farbübertrag vom Computermodell auf die gedruckte Struktur lediglich in einer 0,88 mm dicken Schicht der Strukturoberfläche. Um eine gleichmäßige Einbringung von Additiven auch in den inneren Bereichen der gedruckten Strukturen zu gewährleisten, war es erforderlich, die Strukturen entsprechend eines Zwiebschalenmodells mit Schichtdicken $< 0,88$ mm aufzubauen. Die Praktikabilität wurde in entsprechenden Versuchsreihen durch Frau Dr. rer. nat. Elke Vorndran, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde, anhand von gedruckten Farbstofflösungen sowie Lösungen von Vancomycin gezeigt.

Insgesamt wurden vier Strukturen gedruckt, welche computerunterstützt entworfen (STL Daten) wurden und eine kubische Form mit einer Länge und Breite von je 11 mm und einer Höhe von 3 mm hatten. Der Druck erfolgte mit einer Genauigkeit von ± 200 μm . Die Schichtdicke betrug 125 μm und es wurde ein Binder/Volumen-Verhältnis von 0,371 verwendet. Mittels des gelben Druckkanals wurden 31 nl der jeweiligen BMP-Lösung pro mm^3 (der Struktur) in die Struktur eingedruckt. Nach Abschluss des Druckprozesses wurden die kubischen Strukturen direkt aus dem Pulverbett entnommen und nach zehnmütiger Lufttrocknung vorsichtig abgeblasen.

Geräte:

- ZPRINTER 310 (Z-Corporation, Burlington, USA)

Verbrauchsmaterialien:

- Druckerpatrone HP 11Druckkopf C4810A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)
- Druckerpatrone HP 11Druckkopf C4838A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- BMP-2-Lösungen (siehe 2.2.1)
- Pulver und Binder (Eigenherstellung siehe 2.1.1)

2.3.2 Eluierung von BMP-2 aus den Strukturen

Der qualitative Nachweis des BMP-Eintrags in die Struvit-Strukturen sollte durch Eluieren des Wirkstoffes aus den Strukturen durch Einlegen in Aqua dest. erfolgen. Das Wirkstoffeluat sollte anschließend anhand des etablierten Zellkulturmodells auf seine biologische Wirksamkeit hin untersucht werden.

Um eine möglichst große aktive Oberfläche für die Freisetzung von BMP-2 aus den Matrizes zur Verfügung zu stellen, wurden die kubischen Matrizes zunächst zerkleinert. Mehrere Vorversuche hatten jedoch gezeigt, dass ein zu starker Mahlgrad dazu führt, dass sich bei Suspension des Pulvers in Aqua dest. bereits nach kurzer Zeit eine kompakte Schicht Pulver am Boden der Wells sammelt und aushärtet. Dies würde allerdings zu einer Verkleinerung der aktiven Oberfläche führen. Aus diesem Grund wurde aus den Strukturen unter sterilen Kautelen mittels Skalpell und Pinzette eine Art „Granulat“ mit Korngrößen im Bereich von 0,5-2 mm hergestellt und in sterilen Petrischalen gesammelt. Im Rahmen der Zubereitung des Granulats fiel als Nebenprodukt eine nicht unbeträchtliche Menge an Partikeln an, welche deutlich kleiner als 0,5 mm waren. Diese Partikel, nachfolgend als „Staub“ bezeichnet, wurden gesondert untersucht.

Das Granulat und der Staub jedes der vier Strukturen wurden daraufhin in je eine Kavität einer 24-Well-Platte gefüllt und im Anschluss mit 2 ml Aqua dest. überschichtet. Die Proteine sollten nun innerhalb der nächsten 48 Stunden aus dem Granulat bzw. Staub eluiert werden. Konstantes Schwenken auf einem Schütteltisch sollte eine gleichmäßige Benetzung der Partikel gewährleisten.

Die Eluate, welche aus den Granulaten bzw. Stäuben der mit 25 μM BMP-2-Lösung gedruckten Struvit-Strukturen gewonnen wurden, werden nachfolgend als „Granulat-Eluate“ und „Staub-Eluate“ bezeichnet.

Granulat-Eluate und Staub-Eluate wurden nach 48 Stunden auf dem Schüttler in 2 ml Einweg-Spritzen überführt. Es folgte die Steril-Filtration mittels FP 30/0,2 CA-S Filtereinheiten.

Geräte:

- Chirurgisches Einmal-Skalpell Cutfix Stainless No.10 (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
- Chirurgische Pinzette (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Schütteltisch Mini Rocker MR1 (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
- Sterilarbeitsbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- 24-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Filtereinheiten FP 30/0,2 CA-S (Schleicher und Schüll, Dassel, Deutschland)
- Petrischalen Easy Grip (Becton Dickinson, Plymouth, England)
- Spritzen BD Discardit II (Beckton Dickinson, New Jersey, USA)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen, Deutschland)

2.3.3 Zellkultur und Testverfahren

Es wurden eine 96-Well-Platte mit einer Konzentration von $5,0 \times 10^4$ Zellen pro Well angelegt und im Folgenden wie unter 2.2.3 beschrieben kultiviert. Nach der Umstellung auf 180 µl Differenzierungsmedium wurden 20 µl der jeweiligen Eluate zu den Kulturen hinzugegeben. Hierbei wurden acht 20 µl Stichproben von jedem der vier Granulat-Eluate bzw. der vier Staub-Eluate auf eine 96-Well-Platte überführt. In den Spalten 1-8 fanden sich somit je acht Stichproben der jeweiligen Eluate. Weiterhin wurden acht Positiv- (je 20 µl der beim Druck nicht verbrauchten 25 µM BMP-2-Lösung; Spalte 9) und acht Negativkontrollen (je 20 µl Aqua ad iniectabilia; Spalte 10) angelegt. Nach 72-stündiger Inkubation wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (siehe 2.2.2) bestimmt.

Geräte:

- Absaugpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)
- Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Kühlzentrifuge Universal 320R (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Multi-Channel-Pipette Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Photometer Tecan Spektra Rainbow (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
- Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Sterilarbeitsbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)
- Zellzähler Casy 1 (Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien:

- 96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
- Petrischalen Easy Grip (Becton Dickinson, Plymouth, England)
- Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zählgefäße (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
- Zellkultur-Flaschen Easy Flasks (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Zentrifugenröhrchen CellStar Tubes 50 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Chemikalien und Medien(-zusätze):

- Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- FKS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Nonident P40 Substitut (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- PNPP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- P/S (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Staub- und Granulat-Eluate (Eigenherstellung siehe 2.3.2)
- WST-1 Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- Zinkchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, erstmals im 3D-Pulverdruckverfahren hergestellte keramische Strukturen mit Magnesiumammoniumphosphatchemie (Struivit) auf ihre Zytokompatibilität *in vitro* zu untersuchen. Hierzu wurde eine Zelllinie mit osteoblastärer Differenzierung verwendet, deren Zellviabilität als Parameter diente. Zusätzlich sollte *in vitro* das chemische Verhalten bzw. die Löslichkeit der Matrices im physiologischen Milieu evaluiert werden. Hierzu wurden Veränderungen des pH-Werts sowie die Konzentration freier Elektrolyte gemessen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob es möglich ist, Bone Morphogenetic Protein-2 im Pulverdruckverfahren unter Beibehaltung seiner biologischen Aktivität zu prozessieren. Hierzu diente ein zellulärer Transdifferenzierungs-Assay. Nach der Evaluation gedruckter BMP-2-Lösungen sollte in einem weiteren Schritt die Beibehaltung der biologischen Wirksamkeit nach Durchlaufen der gesamten Prozesskette, d.h. Eindringen und anschließender Freisetzung des Wirkstoffs aus der keramischen Matrix, *in vitro* untersucht werden. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase diente hierbei als Parameter.

4 Ergebnisse

4.1 Evaluation von Magnesium-Phosphat-Zement als Trägermaterial

4.1.1 Zellviabilität

Innerhalb des Versuchs-Zeitraums von 10 Tagen nahm die Zellviabilität in den Struvit-Zellkulturen bis Tag 8 kontinuierlich zu. An Tag 8 erreichte sie 163% des Ausgangswertes von Tag 2. Von Tag 8 zu Tag 10 folgte ein geringer Abfall der Viabilität der Kulturen um 14%. Die Positivkontrollen (Titan und Polystyrol) zeigten ebenso einen kontinuierlichen Anstieg von Tag 2 bis Tag 8 mit einem merklichen Abfall am 10. Tag um bis zu 50% bei Polystyrol und 34% bei Titan (siehe Abb. 2 und 3). Die Zellviabilität der Struvit-Scaffolds war zu jedem Messzeitpunkt signifikant geringer als die der Positivkontrollen aus Titan und Polystyrol (siehe Tab. 2). Gemessen an Polystyrol, welches regelmäßig die höchste Zellviabilität zeigte, wiesen die Struvit-Scaffolds an Tag 2 nur 35%, an Tag 4 45%, an Tag 6 40%, an Tag 8 35% und an Tag 10 60% der Viabilität von Polystyrol auf. Gegenüber den Negativkontrollen aus Kupfer, welche im Versuchsverlauf wie erwartet praktisch kein Zellwachstum zeigten, wiesen die Struvit-Scaffolds zu jedem Zeitpunkt eine signifikant höhere Zellviabilität auf.

Ergebnisse

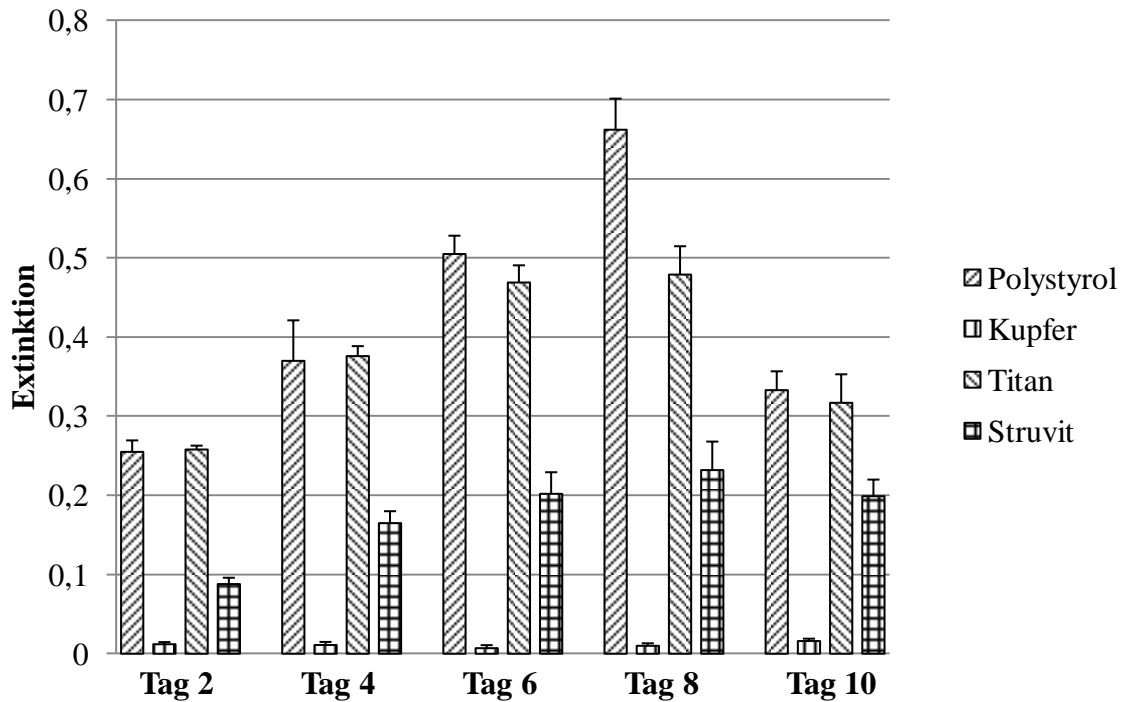


Abb. 2: Darstellung der Zellviabilität von mit verschiedenen Scaffolds inkubierten Zellkulturen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen anhand der Extinktion (Fehlerbalken: 1 SD)

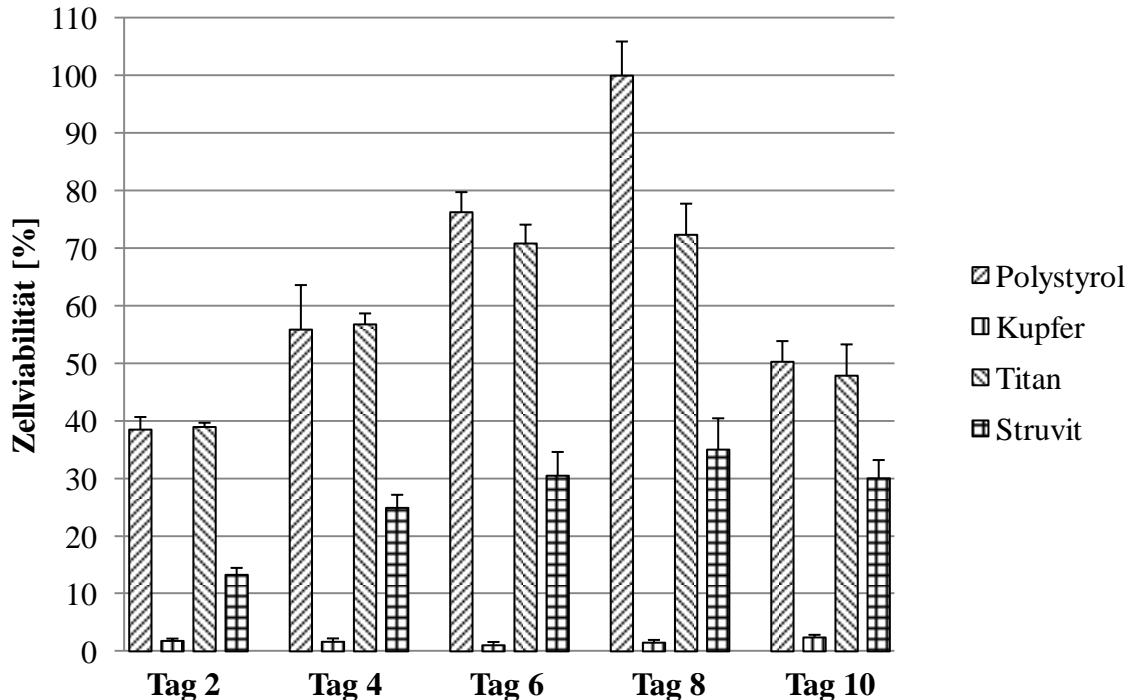


Abb. 3: Prozentuale Darstellung der Zellviabilität von mit verschiedenen Scaffolds inkubierten Zellkulturen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen. Als 100% wurde der höchste gemessene Wert gesetzt: Polystyrol an Tag 8. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 2: Signifikanzniveaus der Zellviabilität von mit Struvit-Scaffolds inkubierten Zellkulturen im Vergleich mit den Kontrollgruppen an verschiedenen Tagen, t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**)

WST-1	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10
	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit
Kupfer	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Titan	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Polystyrol	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

4.1.2 Chemische Analysen des Kulturmediums

4.1.2.1 pH-Wert

Die pH-Werte des Struvit-Zellkultur-Mediums lagen während allen Messungen im Bereich von 7,77 bis 8,03 und somit zu keinem Zeitpunkt außerhalb einer physiologischen Bandbreite (siehe Abb. 4). Sie bewegten sich in derselben Größenordnung wie die pH-Werte der Medien der Titan- (7,72-7,97) und Polystyrol-Zellkulturen (7,72-7,98). Die Unterschiede waren hierbei teilweise signifikant, teilweise nicht (siehe Tab. 3). Abgesehen von der Kupfer-Gruppe waren die pH-Werte aller anderen Gruppen, vermutlich bedingt durch den Zellmetabolismus, leicht unter denen von frischem Kulturmedium (pH 8,03).

Ergebnisse

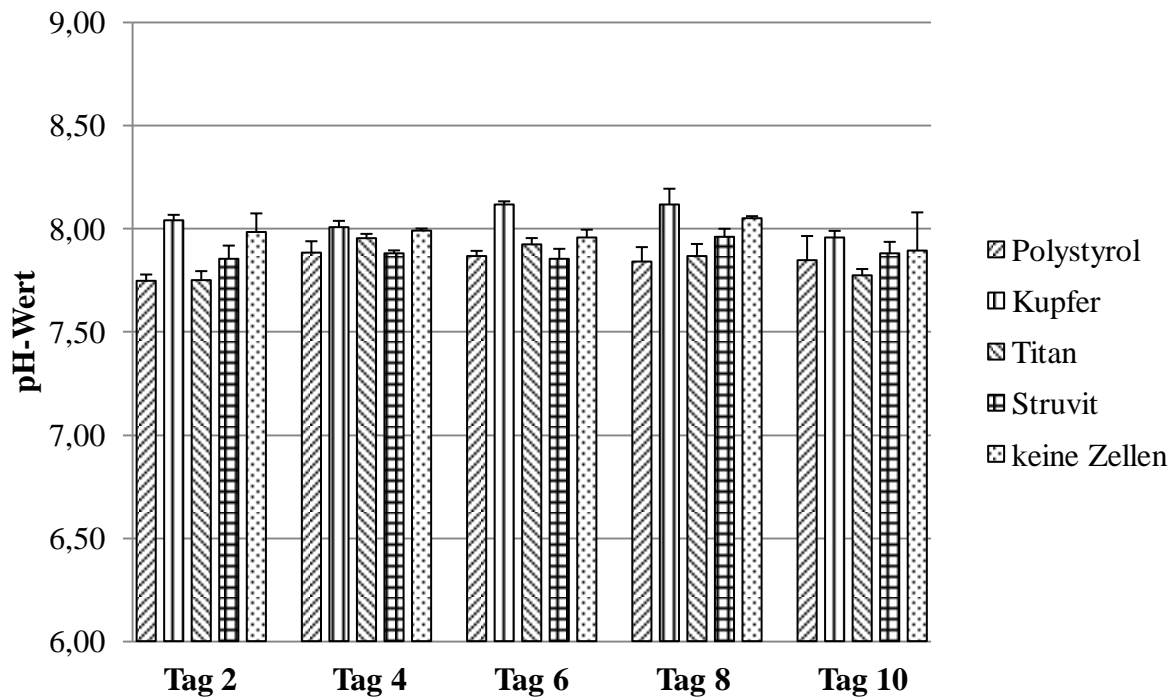


Abb. 4: Darstellung des pH-Werts im Zellkulturmedium von mit verschiedenen Scaffolds inkubierten Zellkulturen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 3: Signifikanzniveaus der pH-Werte von mit Struvit-Scaffolds inkubierten Zellkulturen im Vergleich mit den Kontrollgruppen an verschiedenen Tagen, t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

pH-Wert	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10
	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit
Kupfer	0,002	0,252	< 0,001	0,004	0,067
Titan	0,042	0,349	0,06	0,023	0,019
Polystyrol	0,032	0,52	0,675	0,011	0,566

4.1.2.2 Konzentration freier Magnesium-Ionen

Die Konzentration freier Magnesium-Ionen (Mg^{2+}) war im Struvit-Zellkultur-Medium zu jedem Zeitpunkt signifikant erhöht (siehe Tab. 4). Die Magnesium-Werte der Positiv- (Titan, Polystyrol) und Negativkontrollgruppen (Kupfer) änderten sich im Verlauf von 10 Tagen allenfalls geringfügig, wohingegen sie innerhalb der Struvit-Kulturen am Anfang (Tag 2) fast um das 8,6-fache anstiegen (bezogen auf frisches Kulturmedium). An den darauffolgenden Tagen war ein kontinuierlicher und signifikanter Abfall zu verzeichnen. An Tag 10 entsprach die Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen der Struvit-Kulturen etwa dem 7,1-fachen Wert der Kontrollgruppen. Dies entspricht einer Abnahme der Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen um rund 23% von Tag 2 bis Tag 10. Einen niedrigeren, aber ähnlichen zeitlichen Verlauf der Magnesium-Konzentration zeigten die Kontrollen ohne Zellen (Struvit-Träger mit Medium) (siehe Abb. 5).

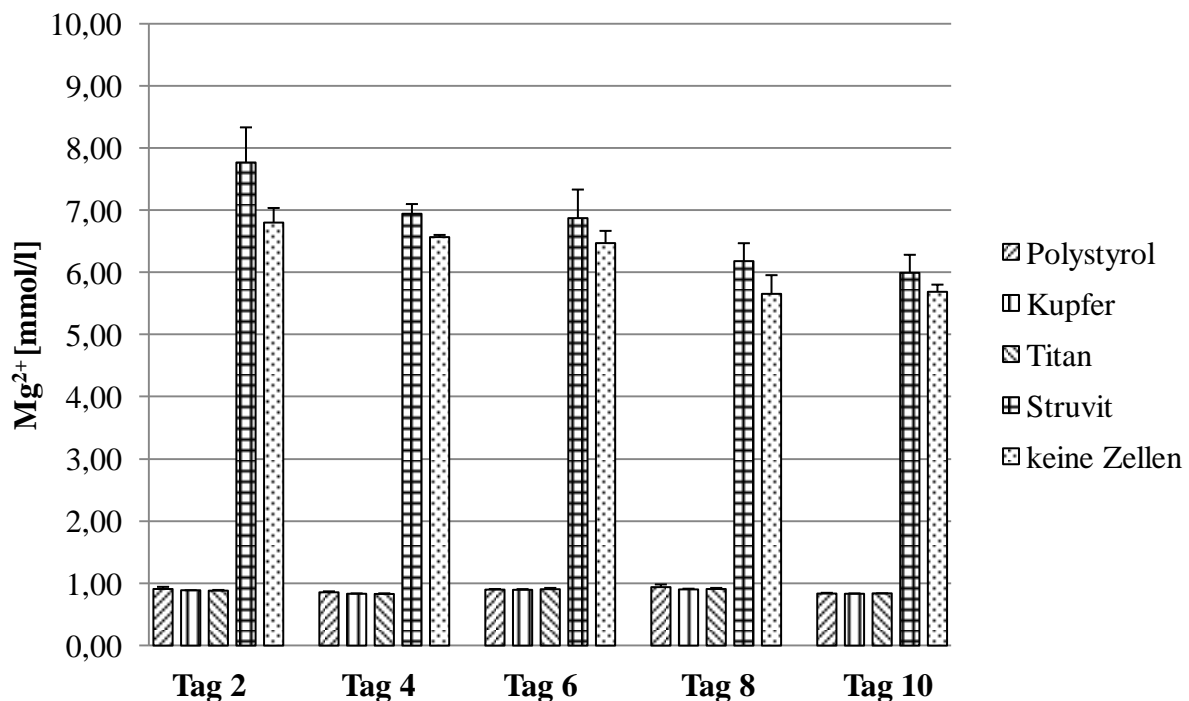


Abb. 5: Darstellung der Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen im Zellkulturmedium von mit verschiedenen Scaffolds inkubierten Zellkulturen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 4: Signifikanzniveaus der Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen von mit Struvit-Scaffolds inkubierten Zellkulturen im Vergleich mit den Kontrollgruppen an verschiedenen Tagen, t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

Mg^{2+}	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10
	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit
Kupfer	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Titan	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Polystyrol	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

4.1.2.3 Konzentration freier Phosphat-Ionen

Analog zu den Konzentrationen freier Magnesium-Ionen zeigten sich auch bei der Bestimmung des Gehalts an freien Phosphat-Ionen (PO_4^{3-}) in den Struvit-Kulturen deutliche Veränderungen. Während die Phosphat-Werte der Kontrollgruppen im Verlauf von 10 Tagen praktisch konstant blieben, waren die Konzentrationen in den Struvit-Kulturen stets signifikant erhöht (siehe Tab. 5). Sie erreichten an Tag 2 den 7,5-fachen Wert der Kontrollgruppen und sanken zu den folgenden Messzeitpunkten bis Tag 10 wieder kontinuierlich und signifikant ab (5,7-facher Wert der Kontrollen an Tag 10). Dies entspricht in Analogie zu den Mg^{2+} -Messwerten ebenfalls einer Reduktion der Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen von knapp 24% von Tag 2 bis Tag 10. Auch hier zeigte sich ein analoger Verlauf der Kontrollen ohne Zellen (Struvit-Träger mit Medium) auf etwas niedrigerem Niveau (siehe Abb. 6).

Ergebnisse

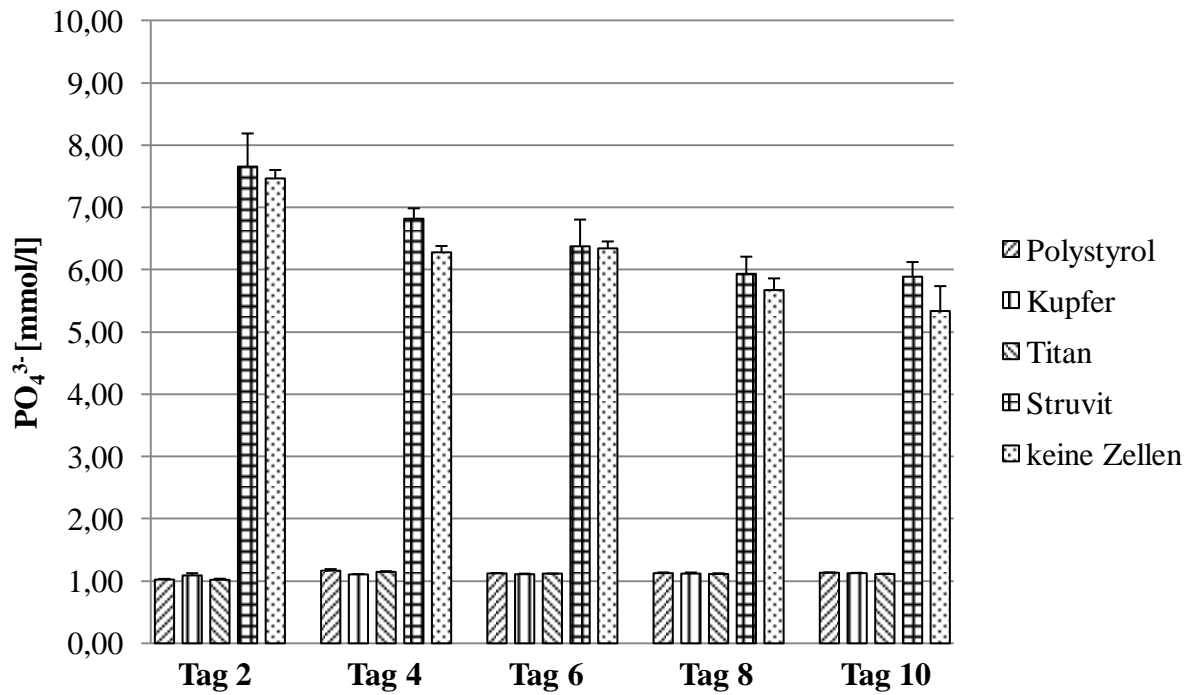


Abb. 6: Darstellung der Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen im Zellkulturmedium von mit verschiedenen Scaffolds inkubierten Zellkulturen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 5: Signifikanzniveaus der Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen von mit Struvit-Scaffolds inkubierten Zellkulturen im Vergleich mit den Kontrollgruppen an verschiedenen Tagen, t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

PO_4^{3-}	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10
	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit
Kupfer	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Titan	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Polystyrol	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

4.1.2.4 Konzentration freier Calcium-Ionen

Im Gegensatz zu Magnesium- und Phosphat-Ionen lag bei der Konzentration freier Calcium-Ionen (Ca^{2+}) eine umgekehrte Situation vor. Zwar blieben auch hier die Ca^{2+} -Werte der Kontrollgruppen im Versuchsverlauf annähernd auf gleichem Niveau, jedoch waren die Ca^{2+} -Konzentrationen der Struvit-Kulturen demgegenüber signifikant erniedrigt (siehe Tab. 6). In den Struvit-Kulturen war sie an Tag 2 um fast 50 % gegenüber den Kontrollgruppen erniedrigt und zeigte in den folgenden Tagen einen leichten, aber signifikanten Anstieg auf 60% am 10. Tag (siehe Abb. 7).

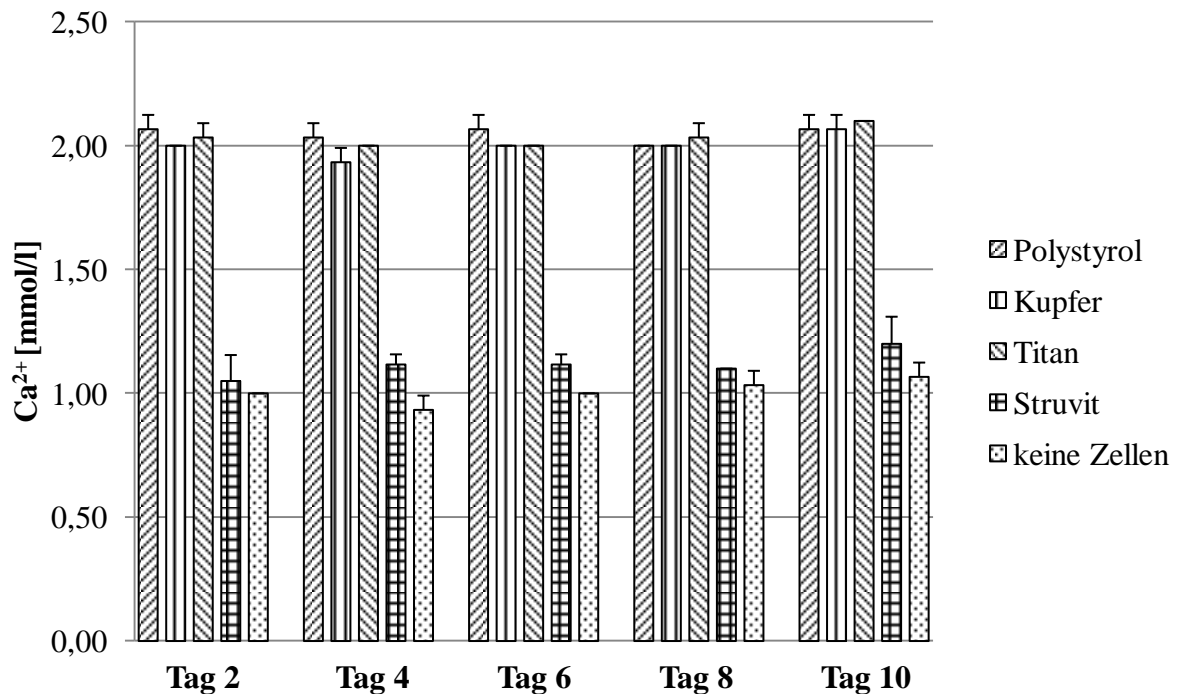


Abb. 7: Darstellung der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen im Zellkulturmedium von mit verschiedenen Scaffolds inkubierten Zellkulturen nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 6: Signifikanzniveaus der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen von mit Struvit-Scaffolds inkubierten Zellkulturen im Vergleich mit den Kontrollgruppen an verschiedenen Tagen, t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

Ca^{2+}	Tag 2	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 10
	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit	Struvit
Kupfer	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Titan	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Polystyrol	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

4.1.3 Rasterelektronenmikroskopie

Bei den rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen präsentierten die Struvit-Matrizes eine aufgeraute Oberfläche. Diese wurde durch polygonale Kristalle mit stumpfen Ecken und Kanten hervorgerufen (siehe Abb. 8: Native Struvit-Matrix direkt nach dem Pulverdruck).

Nach Verwendung im Zellkulturversuch zeigten die oberflächlichen Kristalle Zeichen der Auflösung wie z.B. eine „Ausfransung“ der Kanten. In Abb. 9 ist eine Zell-tragende Matrix nach zehntägiger Kultivierung mit Zellen osteoblastärer Morphologie im Vordergrund zu erkennen.

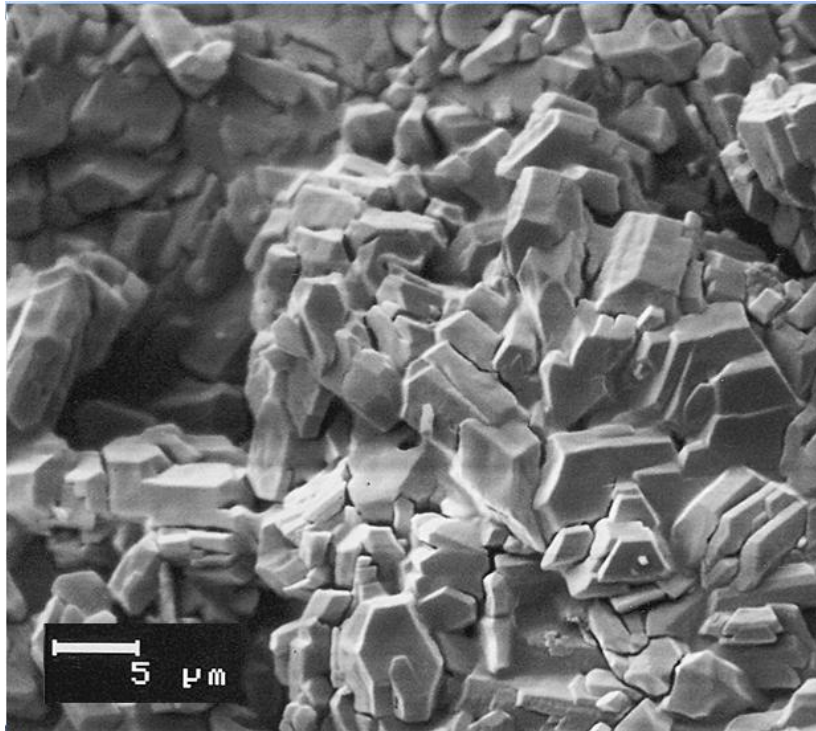


Abb. 8: REM-Aufnahme der Oberfläche eines mittels 3D-Pulverdruck hergestellten Struvit-Zellkulturträgers mit polygonaler Kristallit-Struktur.

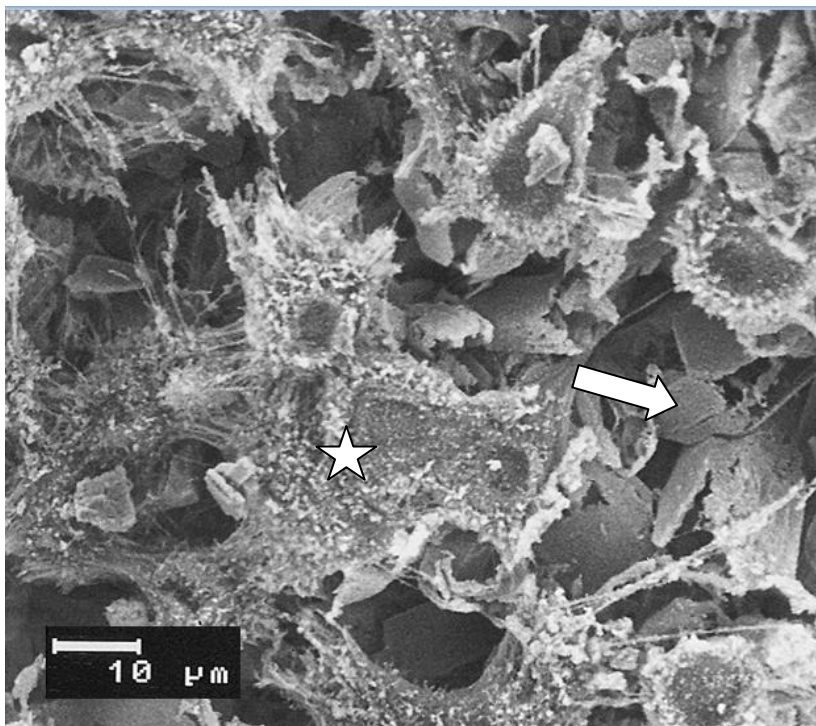


Abb. 9: REM-Aufnahme eines mit osteoblastären Zellen bewachsenen Struvit-Scaffolds. Deutlich zu erkennen ist die kristalline Struktur der Struvit-Matrix im Hintergrund (Pfeil) sowie adhärenzte osteoblastäre Zellen im Vordergrund (Stern).

4.2 Evaluation der biologischen Wirksamkeit von BMP-2

4.2.1 Zellbasiertes Nachweisverfahren der biologischen Wirksamkeit von BMP-2

Um den Schwellenwert für die BMP-2-induzierte Expression von ALP durch C2C12 Zellen im eigenen Versuchsaufbau zu bestätigen und somit einen sinnvollen Konzentrationsbereich für die folgenden Experimente zu ermitteln, wurden die Zellkulturen mit BMP-2-Lösungen absteigender Konzentrationen inkubiert: Die Konzentrationen halbierten sich hierbei, beginnend mit 500 nM auf 250 nM, auf 125nM, usw., bis zu einer Konzentration von 0,59 nM. Bei sämtlichen Versuchen wurden Negativkontrollen (0,00 μ M BMP-2) mit untersucht. Dementsprechend zeigte sich bereits bei orientierender Betrachtung eine abgestufte Gelbfärbung der verschiedenen Wells. Die intensivste Färbung fand sich in Spalte 1 und die schwächste Färbung in den Spalten 11 und 12, wobei die Farbintensität von Spalte 1 nach Spalte 12 kontinuierlich abnahm.

Die photometrische Auswertung der Proben ergab entsprechende, von der jeweiligen BMP-2-Konzentration abhängige Extinktionswerte (siehe Abb. 10). Diese waren im Mittel bei einer BMP-2-Konzentration von 500 nM am höchsten ($OD\ 2,001 \pm 0,136$) und nahmen mit fallender BMP-2-Konzentration kontinuierlich ab bis hin zum niedrigsten Wert, der sich in der Negativkontrollgruppe ohne BMP-2 fand ($OD\ 0,106 \pm 0,004$). Ein erster deutlich wahrnehmbarer Anstieg der ALP-Aktivität zwischen 2,36 nM und 4,72 nM (ca. 100 ng/ml; siehe Tabelle 1) um 24% wird gefolgt von weitaus größeren Steigerungen der Extinktionen bei zunehmender BMP-2-Konzentration (bis zu 92,8% zwischen 18,86 nM und 37,75 nM). Bei noch höheren BMP-2-Konzentrationen nimmt die Steilheit des Anstiegs der ALP-Aktivität merklich ab (nur noch 7,9% zwischen 250 nM und 500 nM).

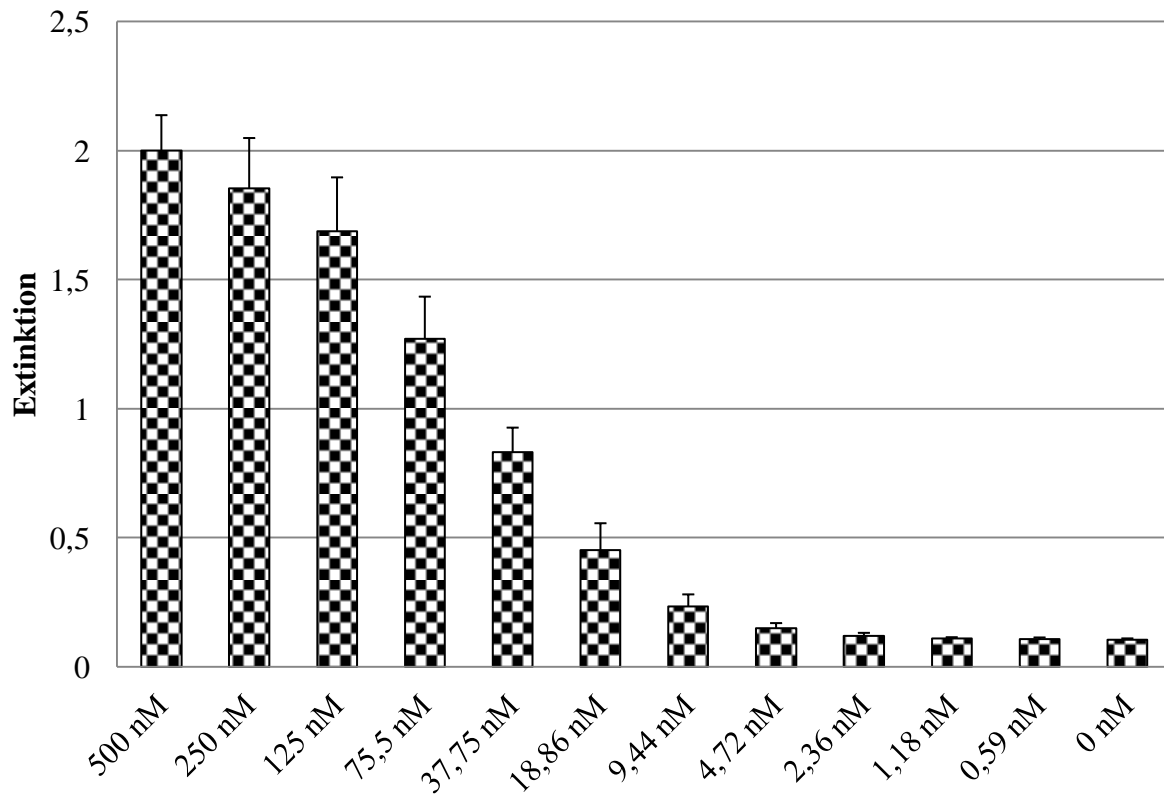


Abb. 10: Darstellung der ALP-Aktivität der Zellkulturen nach Inkubation mit BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen anhand der Extinktion. Zu erkennen ist eine dosisabhängige ALP-Induktion ab einer Schwellendosis von etwa 10-20 nM sowie eine Saturierbarkeit im oberen Dosisbereich (Fehlerbalken: 1 SD)

4.2.2 Nachweis der biologischen Wirksamkeit gedruckter BMP-2-Lösungen

4.2.2.1 Zellviabilität

Ein deutlicher Farbumschlag der mit WST-1-Reagenz inkubierten Zellkulturen im Sinne einer hohen Zellviabilität konnte bereits nach wenigen Minuten festgestellt werden. Hierbei wurde insgesamt eine recht homogene Rotfärbung aller Wells beobachtet. Sichtbare Unterschiede im Färbeverhalten wurden weder zwischen gedruckten und nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen gleicher Konzentration, noch zwischen verschiedenen BMP-2-Konzentrationen beobachtet.

Die photometrische Auswertung bestätigte diese Beobachtung weitestgehend (siehe Abb. 11). Die höchste Extinktion fand sich bei gedruckten BMP-2-Lösungen mit einer Konzentration

von 1 μM ($\text{OD } 0,799 \pm 0,230$) und die niedrigste bei nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen von 1 μM ($\text{OD } 0,586 \pm 0,142$). Da jedoch die Streuung der einzelnen Messwerte relativ hoch war (gemäß der hohen Standardabweichung), kann bei diesem Wertepaar (1 μM) von einem (statistisch signifikanten) Ausreißer ausgegangen werden. Ansonsten unterschieden sich die korrespondierenden Zellkulturen (Inkubation mit gedruckten/nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen gleicher Konzentration) bezüglich ihrer Viabilität nicht signifikant voneinander (siehe Tab. 8). Auch zu den Kontrollgruppen, die ohne BMP-2 inkubiert wurden, bestanden bis auf zwei Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 7).

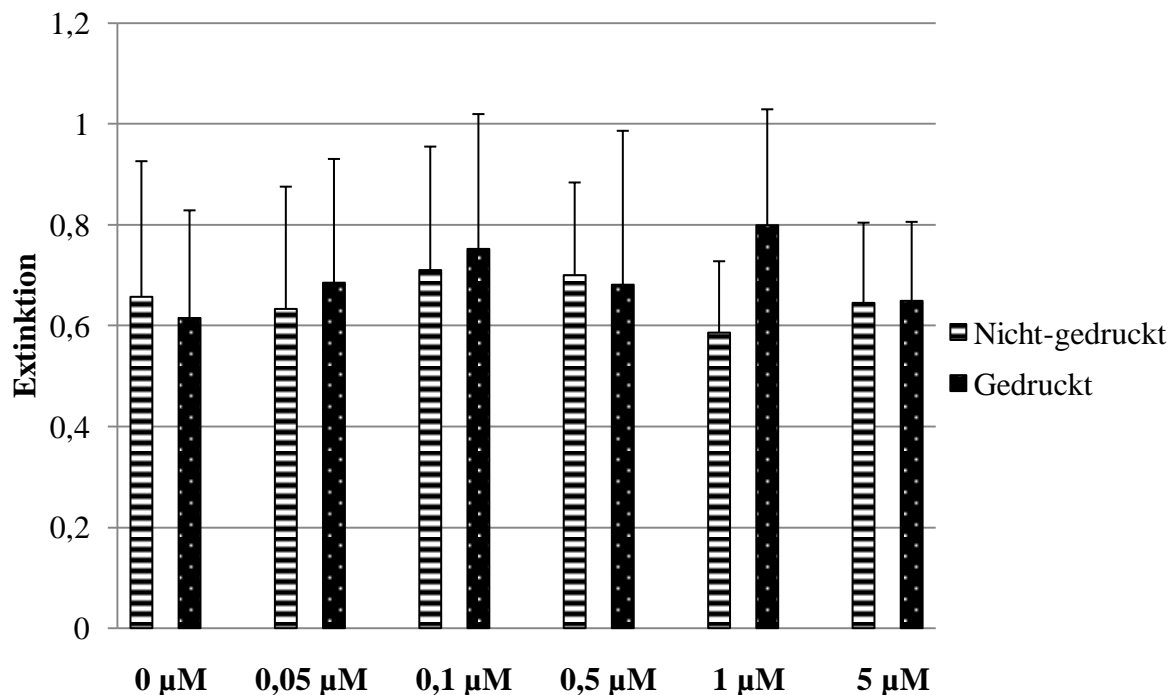


Abb. 11: Darstellung der Zellviabilität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 7: Signifikanzniveaus der Zellviabilität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden im Vergleich zu den Kontrollgruppen (0 μ M). Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

Nicht-gedruckt					
	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M
0 μ M	0,869	0,359	0,621	0,571	0,934
Gedruckt					
	0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M
0 μ M	0,161	0,04	0,338	0,023	0,845

Tab. 8: Signifikanzniveaus der Zellviabilität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen inkubiert wurden. Gegenübergestellt werden jeweils nicht-gedruckte und gedruckte Lösungen gleicher BMP-2-Konzentration. Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

		Gedruckt				
		0,05 μ M	0,1 μ M	0,5 μ M	1 μ M	5 μ M
Nicht-gedruckt	0,05 μ M	0,332				
	0,1 μ M		0,439			
	0,5 μ M			0,877		
	1 μ M				< 0,001	
	5 μ M					0,893

4.2.2.2 Proteingehalt

In Analogie zum WST-1-Test konnten bei der Proteinbestimmung nach Lowry keine signifikanten Unterschiede der korrespondierenden Zellkulturen (Inkubation mit gedruckter/nicht-gedruckter BMP-2-Lösung gleicher Konzentration) festgestellt werden. Die sehr schwache Signifikanz bei 0,5 μ M ist sicherlich als Ausreißer zu werten.

Die höchste Proteinkonzentration wurde in den Zellkulturen ermittelt, die mit 5 μ M BMP-2-Lösung inkubiert wurden (siehe Abb. 12). Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den

Ergebnisse

einzelnen Lösungen jedoch eher gering. Gegenüber den Kontrollgruppen (0,00 μM) unterschieden sich die mit den verschiedenen BMP-2-Lösungen behandelten Zellkulturen teils signifikant, teils nicht signifikant (siehe Tab. 9). Insgesamt zeigen die Ergebnisse keinen einheitlichen Trend bzgl. der Abhängigkeit des Proteingehaltes von der Konzentration sowie der Prozessierung (gedruckt/nicht-gedruckt) der BMP-2-Lösungen, zumal die Einzelwerte zum Teil beträchtlich streuten (siehe Tab. 10).

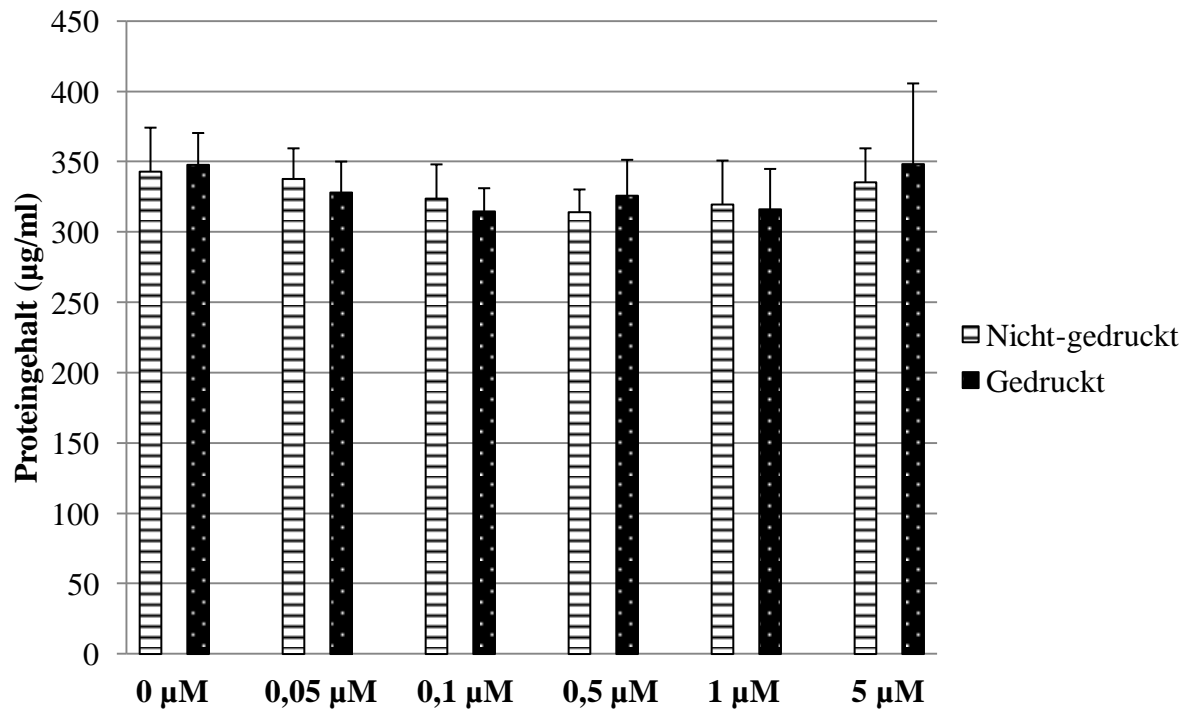


Abb. 12: Darstellung des Proteingehalts von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden (Fehlerbalken: 1 SD).

Tab. 9: Signifikanzniveaus des Proteingehalts von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden im Vergleich zu den Kontrollgruppen (0 μM). Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

Nicht-gedruckt					
	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM
0 μM	0,688	0,04	0,001	0,001	0,348
Gedruckt					
	0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM
0 μM	0,003	< 0,001	0,002	<0,001	0,146

Tab. 10: Signifikanzniveaus des Proteingehalts von Zellkulturen, die mit nicht gedruckten- und mit gedruckten BMP-2-Lösungen inkubiert wurden. Gegenübergestellt werden jeweils nicht-gedruckte und gedruckte Lösungen gleicher BMP-2-Konzentration. Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

		Gedruckt				
		0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM
Nicht-gedruckt	0,05 μM	0,068				
	0,1 μM		0,205			
	0,5 μM			0,044		
	1 μM				0,789	
	5 μM					0,503

4.2.2.3 Aktivität der Alkalischen Phosphatase

Bei orientierender Betrachtung zeigte sich bereits nach wenigen Minuten ein gelber Farbumschlag. Analog zu der zur Validierung des Testsystems angelegten Verdünnungsreihe (4.2.1) nahm die Intensität der Gelbfärbung von niedriger- (0,05 μM) zu hoher BMP-2-Konzentration (5 μM) kontinuierlich zu. Im Vergleich von gedruckten und nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen derselben Konzentration fiel auf, dass die Kulturen mit gedruckten BMP-2-

Lösungen eine geringere Farbintensität aufwiesen als die Kulturen mit nicht-gedruckten Lösungen.

Die photometrische Auswertung zeigte einen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen der Aktivität der ALP und der eingesetzten BMP-2-Konzentration (siehe Abb. 13). Im niedrigen Konzentrationsbereich (Inkubation der Zellkulturen mit 0,05 μM sowie mit 0,1 μM BMP-2-Lösungen) lagen die gemessenen Extinktionen auf gleicher Höhe wie bei den Kontrollen (0,00 μM Lösung). Ab 0,5 μM kam es zu einem dosisabhängigen Anstieg der Extinktion. Die Zunahme der Messwerte war jeweils hochsignifikant (siehe Tab. 11), allerdings bei großer Streuung der einzelnen Messwerte (hohe Standardabweichung). Die Extinktion war in den Zellkulturen, welche mit gedruckten BMP-2-Lösungen inkubiert wurden, jeweils deutlich niedriger als in den korrespondierenden Kulturen mit nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen gleicher Konzentration. Für 0,5 μM bei 34%, für 1 μM bei 62% und für 5 μM bei 88% (siehe Abb. 14). Diese Unterschiede waren teilweise signifikant (0,5 μM und 1 μM), teilweise nicht signifikant (0,05 μM , 0,1 μM und 5 μM), siehe Tab. 12.

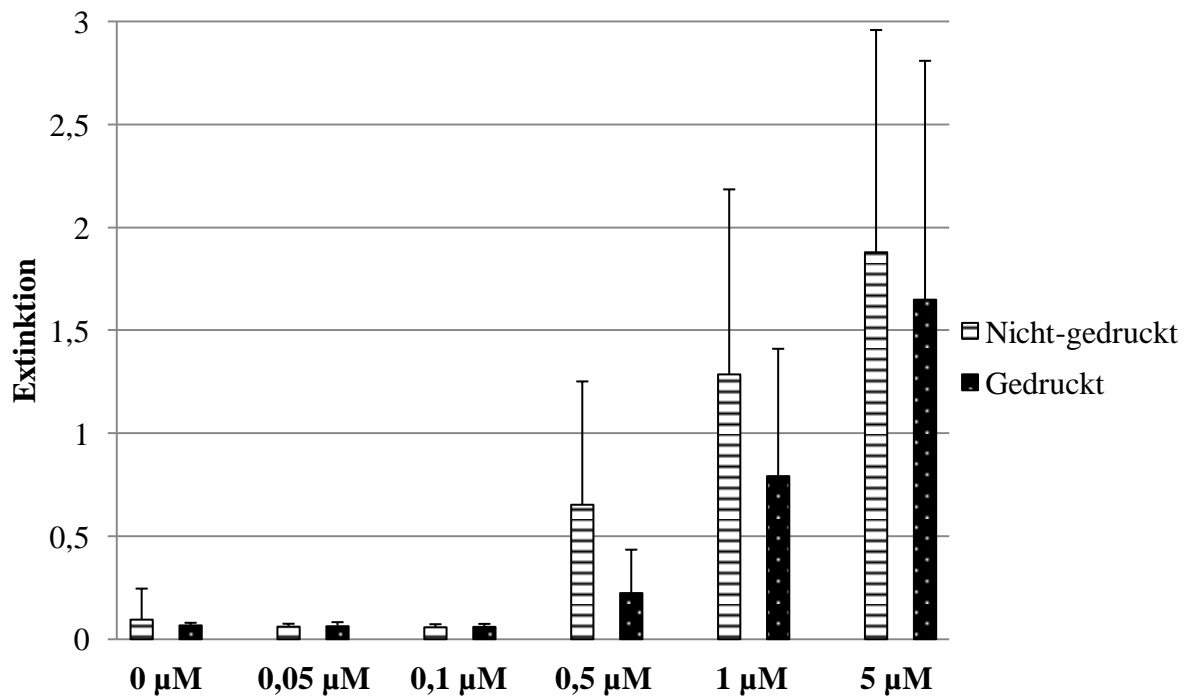


Abb. 13: Darstellung der ALP-Aktivität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden. (Fehlerbalken: 1 SD)

Ergebnisse

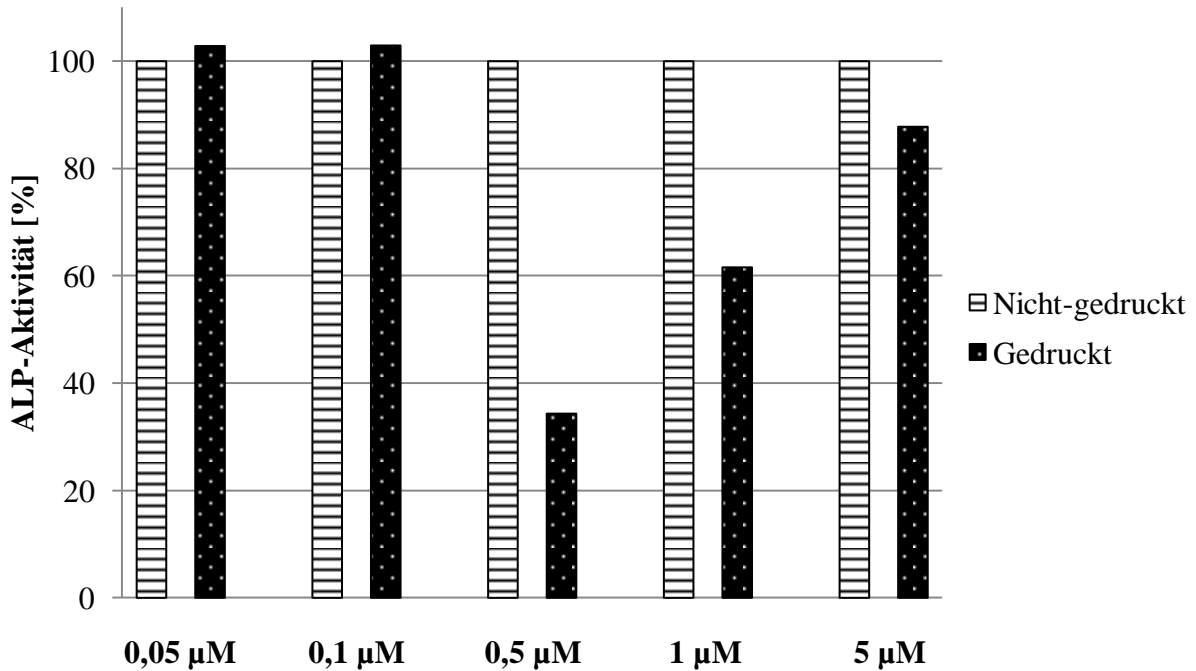


Abb. 14: Prozentuale Darstellung der ALP-Aktivität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden. Mit nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen inkubierte Kulturen wurden jeweils = 100% gesetzt.

Tab. 11: Signifikanzniveaus der ALP-Aktivität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten und mit gedruckten BMP-2-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden im Vergleich zu den Kontrollgruppen (0 µM). Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

Nicht-gedruckt					
	0,05 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM
0 µM	0,292	0,009	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Gedruckt					
	0,05 µM	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	5 µM
0 µM	0,029	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

Tab. 12: Signifikanzniveaus der ALP-Aktivität von Zellkulturen, die mit nicht-gedruckten- und mit gedruckten BMP-2-Lösungen inkubiert wurden. Gegenübergestellt werden jeweils nicht-gedruckte und gedruckte Lösungen gleicher BMP-2-Konzentration. Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

		Gedruckt				
		0,05 μM	0,1 μM	0,5 μM	1 μM	5 μM
Nicht-gedruckt	0,05 μM	0,873				
	0,1 μM		0,496			
	0,5 μM			< 0,001		
	1 μM				< 0,001	
	5 μM					0,137

4.3 Untersuchung von mit BMP-2 gedruckten Magnesium-Phosphat-Matrizes

Bei denjenigen Zellkulturen, die mit 25 μM BMP-2-Lösungen inkubiert wurden (Positivkontrollen) zeigte sich bereits nach eher kurzer Zeit (weniger als eine Minute) ein deutlicher gelber Farbumschlag. Die mit Aqua dest. inkubierten Zellkulturen (Negativkontrollen) zeigten keinerlei Farbumschlag. Bei Zellkulturen, die mit den Proben (Granulat-Eluate sowie Staub-Eluate) inkubiert wurden, zeigte sich auch nach längerer Wartezeit (10 Minuten sowie 30 Minuten) keine deutliche Farbreaktion.

Die niedrigsten Extinktionswerte zeigten erwartungsgemäß die Negativkontrollen (siehe Abb. 15 und 16). Um einige Größenordnungen höhere Extinktionswerte wurden bei den Positivkontrollen erreicht. Die ALP-Aktivität derjenigen Zellkulturen, die mit den Granulat-Eluaten inkubiert wurden, lag für alle vier untersuchten Scaffolds signifikant höher als die ALP-Aktivität der Negativkontrollen, die lediglich mit einer entsprechenden Menge Aqua dest. inkubiert wurden. Die Signifikanzniveaus waren hierbei mehr oder weniger stark ausgeprägt (siehe Tab. 13). Bei denjenigen Zellkulturen, die mit den Staub-Eluaten inkubiert wurden zeigte sich zumeist (bis auf Struktur 4) keine signifikante Erhöhung der ALP-Aktivität gegenüber den Negativkontrollen.

Ergebnisse

Zur besseren Veranschaulichung wurde in Abb. 16 lediglich der Messbereich der Proben bzw. der Negativkontrolle wiedergegeben.

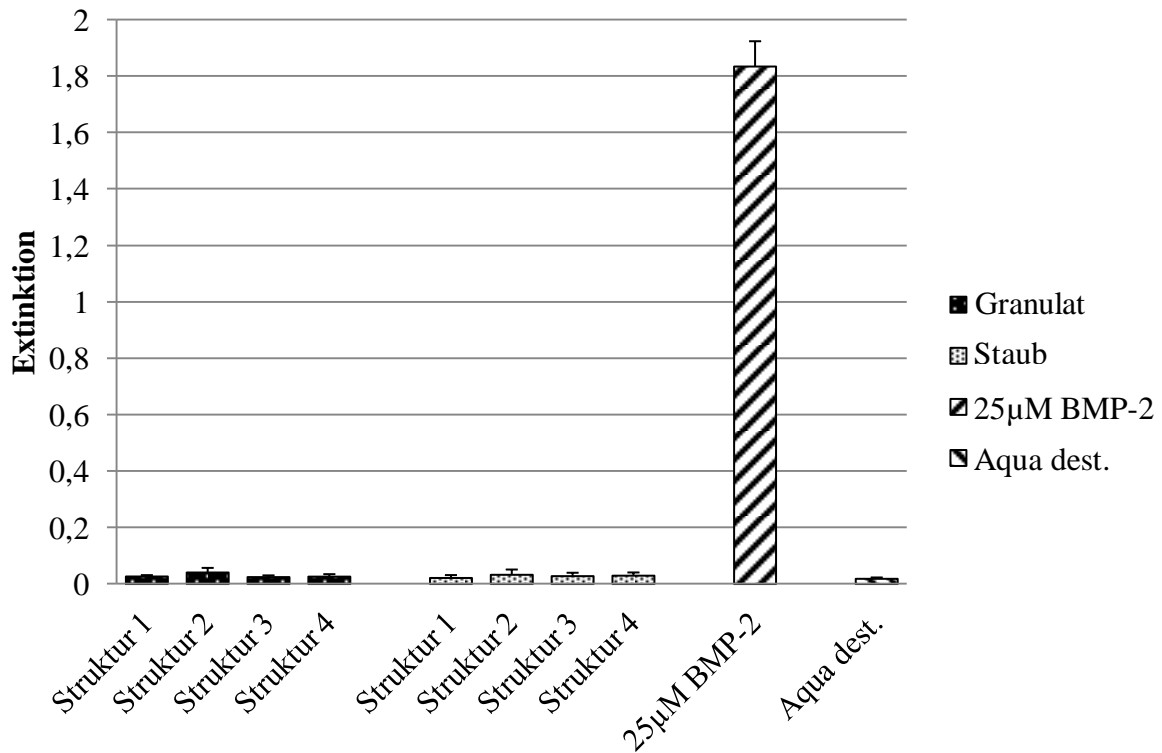


Abb. 15: Darstellung der ALP-Aktivitäten von Zellkulturen, die mit Granulat-Eluaten und mit Staub-Eluaten (jeweils aus mit BMP-2 gedruckten Struvit-Strukturen 1-4 hergestellt) inkubiert wurden. Zum Vergleich wurden Kontrollgruppen (Inkubation mit 25 µM BMP-2-Lösung sowie mit Aqua dest.) herangezogen (Fehlerbalken: 1 SD).

Ergebnisse

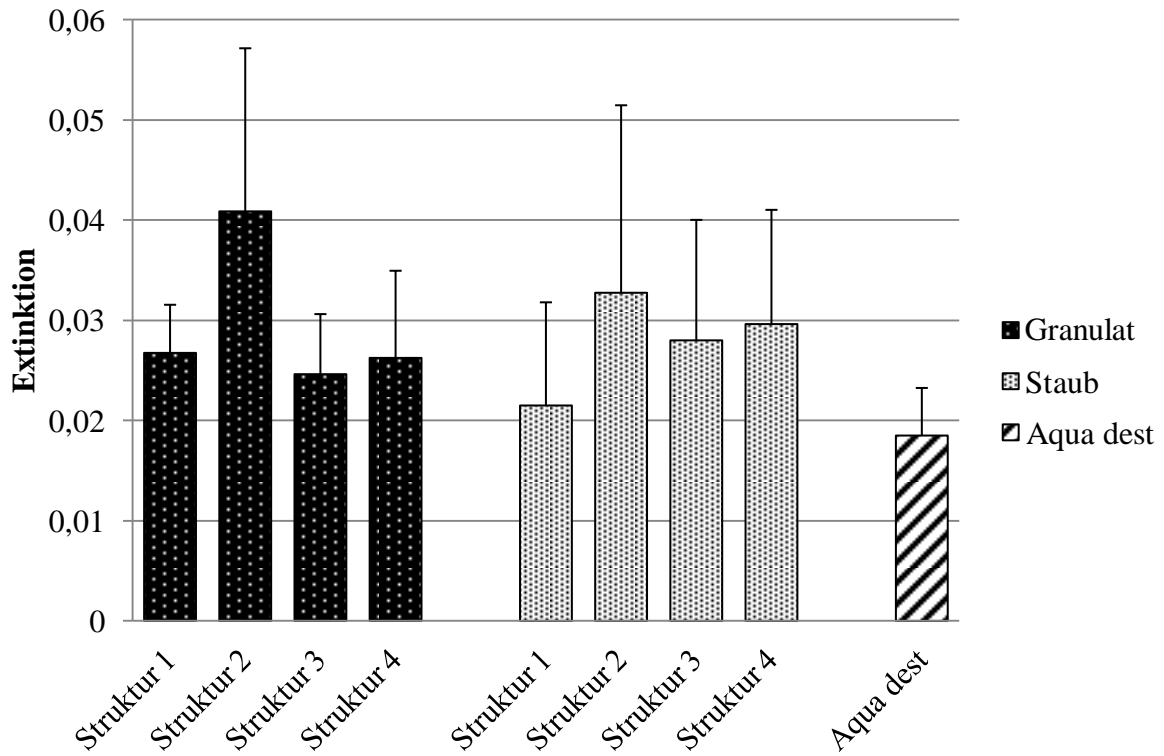


Abb. 16: Ausschnitt aus Abb. 15: Die Skalierung der x-Achse wurde an die niedrigeren Extinktionswerte der Proben angepasst. Die Positivkontrolle (25 μ M BMP-2) wird nicht dargestellt. (Fehlerbalken: 1 SD)

Tab. 13: Signifikanzniveaus der ALP-Aktivitäten von Zellkulturen, die mit Granulat-Eluaten und mit Staub-Eluaten (jeweils aus mit BMP-2 gedruckten Struvit-Strukturen 1-4 hergestellt) inkubiert wurden gegenüber den Kontrollgruppen. t-Test für unabhängige Stichproben, $p < 0,05$ signifikant (**fett**).

	Granulat			
	Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3	Struktur 4
Aqua dest.	0,004	0,002	0,044	0,044
25 μ M BMP	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
	Staub			
	Struktur 1	Struktur 2	Struktur 3	Struktur 4
Aqua dest.	0,467	0,056	0,057	0,023
25 μ M BMP	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

5 Diskussion

5.1 Herstellung von Formkörpern zur Knochenregeneration mittels 3D-Pulverdruck

Zur Herstellung von Formkörper (Scaffolds) im Rahmen des Tissue Engineering von Knochen spielen Rapid Prototyping Verfahren eine zunehmende Rolle, da sie die Fertigung dreidimensionaler Strukturen mit praktisch frei wählbarer Geometrie und in unbegrenzter Stückzahl ermöglichen. Hierbei ist insbesondere das 3D-Pulverdruckverfahren aufgrund technologiebedingter Vorteile vielversprechend.

Ein Verzicht auf Stützstrukturen ermöglicht eine relativ schnelle und wenig nachbearbeitungsintensive Fabrikation von Druckobjekten. Da die ganze Prozesskette bei Raumtemperatur stattfindet, ist grundsätzlich die gleichzeitige Einbringung thermosensitiver Substanzen möglich. Anderen Rapid Prototyping Verfahren, wie beispielsweise die Stereolithographie oder das Selektive Laser Sintering, sind auf höhere Prozessierungstemperaturen angewiesen, was zur Deaktivierung derartiger Substanzen führt. Kommerziell erhältliche Pulver-Binder-Systeme kommen vorwiegend im technischen Modellbau zum Einsatz und verwenden im Allgemeinen Gips- oder stärkehaltige Materialien und einen wässrigen Binder. Es wurde bereits eine Vielzahl von Materialsystemen beschrieben, die u.a. zur Fertigung von Strukturen zur Hartgewebsregeneration eingesetzt werden können. So z.B. ein 3D-Pulverdrucksystem, das auf einem Pulvergemisch aus Maisstärke (50%), Dextran (30%) und Gelatine (20%) beruht, welches mit destilliertem Wasser zum Abbinden gebracht wird [39]. Andere Verfahren zielen darauf ab, Biokeramiken aus Gipskörpern herzustellen, die zuvor im 3D-Pulverdruckverfahren generiert wurden. Durch Immersion der Gipskörper mit einer Ammonium-Phosphat-Lösung werden sie anschließend in Hydroxylapatit umgewandelt [83]. Weitere Studien konnten zeigen, dass der Pulverdruck auch mit verschiedenen anderen (Bio-) Materialien durchgeführt werden kann. Beispielfhaft sei hier eine Pulvermischung aus Polyacrylsäure und Zinkoxid bzw. Zinkoxid/Magnesium angeführt, welche mit einem wässrigen Binder zum Abbinden gebracht wurde. Das Endprodukt der Abbindereaktion war hier Zink-Polycarboxylat [38]. Weiterhin dienen häufig Polylaktid-Pulver unterschiedlicher Partikelgröße als Grundlage für den 3D-Pulverdruck. Dabei konnten mit Chloroform als Binder Testobjekte mit einer Zugfestigkeit von bis zu $17,40 \pm 0,71$ MPa hergestellt werden [40]. In einer anderen Studie wurde ein Gemisch aus

Ethanol und Azeton (20:80) als Binder eingesetzt. Zusätzlich wurde hier das Breitband-Antibiotikum Levofloxacin (LVFX) in die Testobjekte gedruckt. Bei der Binderzusammensetzung wurde hierbei der Tatsache Rechnung getragen, dass PLA in Azeton löslich ist, während LVFX in Ethanol gelöst werden kann [41].

Aufgrund ihrer chemischen Ähnlichkeit zur mineralischen Phase des Knochens sind in jüngerer Vergangenheit verstärkt Calciumphosphate auf ihre Eignung als Ausgangspulver im 3D-Pulverdruck untersucht worden [43,44,84,85]. Diese wurden entweder in reiner Form oder mit beigemischten Polymeren gedruckt. Die Grundlage hierfür bildete ein biphasisches α/β -Tricalciumphosphat-Pulver ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TCP), welches während des Druckprozesses mit einem flüssigen Binder aus 20%iger Phosphorsäure (H_3PO_4) zu einer Matrix aus Dicalciumphosphat Dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, DCPD, Bruscht) abbindet. Auf diese Weise konnten 3D-Objekte mit einer Genauigkeit von $\pm 200 \mu\text{m}$ hergestellt werden, deren Druckfestigkeiten durch Nachbehandlung (Einlegen in Phosphorsäurelösung) auf bis zu 22 MPa gesteigert werden konnten [43]. Darüber hinaus wurden ebenso verschiedene Kombinationen von Pulvern und anorganischen Binderflüssigkeiten für den 3D-Pulverdruck untersucht. Getestet wurde ein mit Hydroxymethylpropylzellulose modifiziertes Tricalciumphosphat-Pulver mit Wasser als Binder, ein Calciumphosphat-Pulver mit Phosphorsäure verschiedener Konzentrationen als Binder und ein Pulvergemisch aus Tetracalciumphosphat/Dicalciumphosphat/Tricalciumphosphat mit Zitronensäure als Binder. Mit allen drei Methoden gelang die Herstellung von phasenreinem β -Tricalciumphosphat mit hoher Genauigkeit und definierter Geometrie [85]. Durch Beimischung von Polymeren zu den Reaktanten wurde verschiedentlich versucht, die Eigenschaften der Formkörper (z.B. mechanische Festigkeiten) oder aber prozesstechnische Limitationen (z.B. die räumliche Auflösung) zu verbessern. So konnte etwa durch Ummantelung eines Hydroxylapatit Grundpulvers mit Maltodextrin die Festigkeit der gedruckten Hydroxylapatit-Matrizes erhöht werden [86].

Hinsichtlich ihrer Verarbeitung lassen sich synthetische Knochenersatzmaterialien in zwei Kategorien einteilen: Manche Materialien können präoperativ vorgefertigt bzw. geformt werden, während andere intraoperativ zubereitet werden müssen. Solche intraoperativen Modifikationen müssen regelmäßig bei der Verwendung von Knochentransplantaten oder dem Einsatz von Calciumphosphat- bzw. Acryl-Zementen vorgenommen werden. Damit verbunden sind häufig eine Reihe von Problemen bei der Applikation: Da es für den Operateur intraoperativ nur sehr schwer oder gar nicht möglich sein kann, den Defekt

vollständig zu beurteilen und das Implantat dementsprechend zu konturieren, ist das ästhetische Ergebnis bei einer solchen Operation nicht immer völlig zufriedenstellend. Ein weiteres Risiko stellt das exotherme Abbinde-Verhalten von Acryl-Zementen dar, welches im Gewebe zu Entzündungen, Infektionen, Nekrosen und schließlich auch zur Abstoßung des Implantats führen kann. Der 3D-Pulverdruck bietet eine Möglichkeit all diese Nachteile zu umgehen. Die Passgenauigkeit und mechanischen Eigenschaften solcher präoperativ hergestellten Implantate wurden bereits anhand von Calciumphosphat- (Bruschi-) Formkörpern untersucht. Nach artifizieller Setzung mehrerer kranio-fazialer Defekte an einem menschlichen Schädel wurden anhand von CT-Datensätzen des Schädels mittels 3D-Pulverdruck Bruschi-Implantate hergestellt und diese mittels Osteosynthese-Platten in die jeweiligen Defekte inseriert. Alle Implantate zeigten hierbei eine sehr gute Passung und nur minimale Konturabweichungen [3].

5.2 Struvit als Trägersystem

Werkstoffe mit einer Magnesiumammoniumphosphat-Chemie sind erst seit kurzem Gegenstand der Erforschung als potenzielles Trägersystem für Zellen und/oder biologisch aktive Substanzen. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten zu Knochen wurden bisher vornehmlich Calciumphosphat-Werkstoffe für diese Aufgaben präferiert. Die Verarbeitung der Calciumphosphate im 3D-Pulverdruck mit Phosphorsäure als flüssigem Reaktanten bedingt jedoch eine saure Abbindereaktion. Diese kann zur Denaturierung funktionsfähiger Proteine führen und schränkt somit die Möglichkeiten der direkten Modifizierung der Trägerstrukturen mit biologisch aktiven Substanzen (z.B. Proteine wie BMPs) erheblich ein.

Die Suche nach einem bei neutralem pH abbindenden, im 3D-Pulverdruck prozessierbaren mineralischen Zementsystem führte zu Magnesiumammoniumphosphat (Struvit). Im Zusammenhang mit Knochenersatz sind zu dieser mineralischen Formulierung bisher nur wenige Studien veröffentlicht worden [87,88,89,90].

5.2.1 Physikalische und chemische Eigenschaften

Für die Verarbeitung im 3D-Pulverdruck wurde das Farringtonit-Ausgangspulver bereits im Vorfeld der vorliegenden Studie bezüglich Abbindezeit, Füllichte und Streichbarkeit optimiert [91].

Die Ausgangs-Pulver müssen zwei grundlegende Voraussetzungen erfüllen, um eine gute Prozessierbarkeit im 3D-Pulverdruck zu gewährleisten: Zum einen müssen sie sich in dünnen, möglichst ebenen Schichten mit einer Dicke von 100-200 μm ausstreichen lassen und zum anderen müssen sie bereits während des Druckvorgangs mit der verwendeten Binderlösung abbinden und sich verfestigen [44].

Die Dicke der Pulverschicht und deren Fähigkeit zur Bildung glatter Oberflächen wird ganz entscheidend beeinflusst von der durchschnittlichen Größe der Pulverpartikel bzw. von der Größenverteilung verschiedener Partikelfractionen. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass die ideale Partikelgröße von Pulvern für den 3D-Pulverdruck im Bereich von 20-50 μm liegt [43], wobei Fractionen von Partikeln mit einer Größe $< 5 \mu\text{m}$ nicht vorhanden sein sollen [92]. Andernfalls besteht die Gefahr der Bildung stabiler, bis zu 1-2 mm großer Agglomerate, welche die Herstellung exakt definierter Druckobjekte unmöglich machen.

Die Aushärtung der festen Pulverphase mit dem flüssigen Binder noch während des Druckprozesses wird durch die Geschwindigkeit der Abbindereaktion des Zements bestimmt. Läuft sie zu schnell ab, können sich die einzelnen gedruckten Schichten nicht miteinander verbinden. Läuft sie zu langsam ab, so entstehen allenfalls ungenaue Druckobjekte: Da das Pulverbett Kapillarkräfte auf die Binderflüssigkeit ausübt, hat diese die Tendenz, sich innerhalb des Zementpulvers auszubreiten. Bindet der Zement also zu langsam ab, kann die Binderflüssigkeit über die vorher definierten Objektgrenzen hinaus in das Pulverbett hinein verlaufen. Abhilfe kann hierbei durch die Beimischung eines Polymers zum Ausgangs-Pulver geschaffen werden. Bei Kontakt des Polymers mit der Binderflüssigkeit kommt es zu dessen Quellung. Dies verhindert dann die weitere Ausbreitung der Binderflüssigkeit innerhalb des Pulvers. Der gleiche Effekt könnte auch durch eine Steigerung der Abbindereaktion durch die Beimischung von Binder in Pulverform zum Ausgangspulver erreicht werden.

Die diesbezüglich als optimal erachteten Eigenschaften des Farringtonit-Pulvers wurden in Vorversuchen ermittelt [91]. Um eine hohe Maßhaltigkeit zu gewährleisten wurde das Pulver nach dem 20minütigen Mahlvorgang mit einem Pulver bestehend aus 20% Di-Ammoniumhydrogenphosphat vermischt. Im Vergleich zu reinem Farringtonit wurden auf diese Weise nicht nur die Dimensionstreue, sondern auch die Verarbeitbarkeit deutlich verbessert. Im Gegenzug verschlechterten sich jedoch die mechanischen Eigenschaften der Druckobjekte gegenüber nicht-modifiziertem Pulver.

Gedruckte Biokeramiken sind sowohl als direkter Knochenersatz in lasttragenden und unbelasteten Bereichen, als auch als Trägersystem für Tissue Engineering-Maßnahmen von großem Interesse. Hierbei ist es von großer Bedeutung, dass das eingesetzte Knochenersatzmaterial den von extern einwirkenden Kräften widerstehen kann. Auch in Bereichen, die nicht direkt lasttragend sind, sollte es zumindest dem Druck des umgebenden Weichgewebes standhalten können. Die mechanischen Eigenschaften wie z. B. die Druckfestigkeit werden dabei ganz entscheidend von der Konversionsrate des Zements beeinflusst [42]. Die Konversionsrate von Struvit-Zementen direkt nach dem Druck erwies sich als relativ gering. Dies belegten sowohl Ergebnisse der Röntgendiffraktometrie als auch die schwache Druckfestigkeiten der Proben, welche wiederum im Rahmen von Vorversuchen dieser Arbeitsgruppe ermittelt wurden (in dieser Arbeit nicht näher ausgeführt). Diese Erkenntnisse bestätigten auch tierexperimentelle Studien. Nach 15-monatiger Implantation von Struvit-Matrizes in heterotopes Muskelgewebe zeigte sich ein bis zu 95%iger Verlust ihrer mechanischen Stabilität, welcher mit der Auflösung des Zements und einer Änderung in seiner Phasenzusammensetzung einherging [89]. Eine Verbesserung der mechanischen Eigenschaften der Druckobjekte wurde durch die Verbesserung der Konversionsrate des Zements angestrebt. Zu diesem Zwecke wurden die Scaffolds eine Stunde lang in die Binderlösung eingetaucht und somit nachgehärtet. Längere Nachhärungszeiten führten hierbei nicht zu einer weiteren Verbesserung der Druckfestigkeit.

5.2.2 Biokompatibilität

Die *in vitro* Zellkultur stellt eine etablierte Methode zur Testung neuer Biomaterialien auf deren Zytokompatibilität hin dar. So können erste wichtige Informationen über relevante

biologische Eigenschaften eines Materials gesammelt werden, ohne gleich auf aufwändige Modelle wie etwa Versuchstiere zurückgreifen zu müssen. Selbstverständlich sind die so gewonnenen Ergebnisse nur bedingt auf eine klinische Situation übertragbar [93]. In der vorliegenden Arbeit dienten humane osteoblastäre MG63 Zellen als solches Testsystem. Hierbei zeigten die mit Struvit-Scaffolds inkubierten Zellkulturen zu jedem Zeitpunkt eine relativ hohe Zellviabilität. Diese stieg innerhalb der ersten acht Tage kontinuierlich an, fiel in den letzten zwei Tagen jedoch geringfügig ab. Diese Entwicklung verlief bei den Positivkontrollen zeitlich in analoger Weise, wenn auch stets auf einem signifikant höheren Niveau als bei den Struvit-Proben. Dies lässt den Schluss zu, dass gedruckte Struvit-Scaffolds *in vitro* gegenüber Reintitan und Polystyrol eine etwas verminderte Zytokompatibilität aufweisen. Dies könnte zum einen in der Oberflächenbeschaffenheit der Scaffolds begründet sein, oder an der veränderten Konzentration der freien Elektrolyte liegen. Hierbei war besonders die deutliche Erhöhung der Konzentrationen von freien Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen, aber auch die (nicht ganz so starke) Reduktion der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen bemerkenswert. Ein ähnliches Ergebnis wurde bereits in einer früheren Studie mit ähnlichem Versuchsaufbau beobachtet, welche die Calciumphosphate Bruschit und Monetit auf deren Biokompatibilität untersuchte. Es zeigte sich auch hier, ebenso wie für Struvit in dieser Arbeit, eine signifikant erniedrigte Zellviabilität für Bruschit und Monetit gegenüber den Positivkontrollen aus Titan [84]. Diese *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse sollten bei einer Anwendung *in vivo* jedoch eher vernachlässigbar sein: Ein ausreichend vaskularisiertes Transplantatlager ermöglicht hier jederzeit einen suffizienten Flüssigkeitsaustausch. Überflüssige Elektrolyte können schnell abtransportiert und fehlende Elektrolyte bereitgestellt werden. Die Abnahme der Zellviabilität der Zellkulturen in den letzten beiden Tagen dürfte in der Zellkultur selbst begründet sein. Nach Erreichen eines konfluenten Stadiums kommt es zu Kontaktinhibition und Apoptose eines Teils der Zellen.

Die Analyse des pH-Wertes des Medium-Überstandes der Struvit Kulturen zeigte zu keinem Zeitpunkt unphysiologische Werte. Sie bewegten sich an allen Versuchstagen in einer Spanne von 7,77 bis 8,03, die ungefähr auch den pH-Werten der Positivkontrollen entsprach. Auch für Bruschit und Monetit fanden sich ähnliche pH-Werte innerhalb der physiologischen Bandbreite [84]. Die pH-Werte der Bruschit-Kulturen waren jedoch immer signifikant niedriger als die von reinem Zellkultur-Medium (ohne Scaffold), der Positiv- bzw. Negativkontrolle. Bei den Monetit-Kulturen war dies nur am Anfang des Experiments der Fall. Struvit-Kulturen zeigten in den vorliegenden Versuchen hingegen entweder einen nicht-

signifikant niedrigeren (Tag 2 und 10) oder sogar einen signifikant höheren (Tag 4, 6 und 8) pH-Wert als die Positivkontrollen. Die unter neutralem pH ablaufende Degradation von Struvit sollte ein grundsätzlicher Vorteil für dessen Verwendung als Biomaterial sein.

Der Vorteil einer neutralen Abbindereaktion stellte sich im Rahmen früherer Versuche der eigenen Arbeitsgruppe heraus: Es wurde hierbei die Möglichkeit untersucht, mittels 3D-Pulverdruck BMP-2-Lösungen verschiedener Konzentrationen in Brushit-Matrizes zu drucken. Brushit bildet sich durch einen Lösungs-/Präzipitations-Prozess bei Zugabe von sauren Calciumphosphaten oder Phosphorsäure als Binder zu Calciumphosphat-Pulver bei einem pH-Wert $< 4,2$ [94]. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, den Eintrag von BMP-2 in die Brushit-Matrizes bzw. die Freisetzung biologisch aktiver Proteine aus den Matrizes nachzuweisen. In Elutionsversuchen wurden mit BMP-2-Lösungen gedruckte Brushit-Matrizes für eine Woche in PBS ausgelagert, um die enthaltenen Proteine freizusetzen. Der Überstand an PBS wurde innerhalb der ersten 12 Stunden im Abstand von 60 Minuten und darauffolgend im Abstand von 24 Stunden abgenommen, asserviert und auf das Vorhandensein von BMPs untersucht. Es konnten keine nennenswerten Mengen des Proteins nachgewiesen werden. Auch Zellkultur-Versuche mit C2C12-Zellen als Indikatorsystem lieferten keine befriedigenden Ergebnisse. Nach Inkubation der C2C12-Zellkulturen mit Brushit-Scaffolds wurden diese auf die Aktivität der ALP untersucht. Es zeigten sich gegenüber den mit BMP-2-Lösungen inkubierten Positivkontrollgruppen stets signifikant niedrigere Ergebnisse. Gegenüber den mit Aqua ad iniectabilia inkubierten Negativkontrollen wichen die Ergebnisse in der Regel nicht signifikant ab. Um eine vermehrte Induktion der ALP-Aktivität in den Zellkulturen durch die Brushit-Scaffolds zu bewirken, wurden neben der Erhöhung der BMP-2-Konzentrationen der gedruckten Lösungen, verschiedene Nachbearbeitungsschritte auf ihre Wirksamkeit getestet. Hierfür wurden zum einen die Brushit-Matrizes nach dem Druck in BMP-2-Lösungen eingelegt oder mit diesen besprüht. Zum anderen wurde versucht durch „Waschen“ der gedruckten Brushit-Scaffolds z.B. in DMEM oder PBS überschüssige Phosphorsäure aus diesen zu entfernen. Alle oben genannten Versuche führten zu keiner nennenswerten Erhöhung der ALP-Aktivität. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der Denaturierung des BMP-2 beim Kontakt mit Phosphorsäure während des Drucks bzw. während des Abbindevorgangs.

Die im Medium-Überstand der Struvit-Kulturen beobachtete Elektrolyt-Verschiebung äußerte sich in einer teilweise bis zu 8,6-fachen Erhöhung der Konzentration freier Mg^{2+} -Ionen, in einer bis zu 7,5-fachen Erhöhung der Konzentration freier PO_4^{3-} -Ionen und in einer Reduktion

der Konzentration freier Ca^{2+} -Ionen um beinahe 50% in der Spitze. Auch bezüglich der Ionen-Konzentrationen von freien Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen fanden sich für die Calciumphosphate Brushit und Monetit Werte, wie sie in den eigenen Versuchen mit Struvit zu beobachten waren. Sowohl in den Monetit-, als auch in den Brushit-Kulturen, waren die Konzentrationen freier Ca^{2+} -Ionen gegenüber reinem Zellkultur-Medium zu jedem Zeitpunkt signifikant erniedrigt. Die Konzentrationen freier PO_4^{3-} -Ionen waren jedoch signifikant erhöht [84]. Die für Struvit beobachtete Elektrolyt-Verschiebung ist mit großer Wahrscheinlichkeit das Resultat der hohen Löslichkeit der pulvergedruckten Struvit-Scaffolds. Calciumphosphate weisen eine geringere Löslichkeit auf als Magnesiumphosphate und deshalb werden freie Calcium-Ionen, die Bestandteil des Mediums sind, von den im Überschuss vorhandenen Phosphat-Ionen präzipitiert. Dies erklärt sowohl die erniedrigte Calcium-Konzentration am Anfang des Versuches, als auch deren allmählichen Anstieg nachdem die Phosphat-Konzentration am Ende des Versuches mehr und mehr gesunken war. Die Abnahme der anfangs sehr hohen Konzentrationen freier Mg^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen kann wiederum auf die Entfernung unreaktierten Magnesiumammoniumphosphat-Pulvers im Rahmen der Medien-Wechsel im Abstand von zwei Tagen zurückgeführt werden.

5.3 3D-Pulverdruck bioaktiver Substanzen

Besonders für die Rekonstruktion großer Knochendefekte oder bei der Anwendung im ersatzschwachen Lager sind resorbierbare Knochenersatzmaterialien, die gleichzeitig als Trägermaterial (carrier) für bioaktive Substanzen fungieren, von großem Interesse. Denkbare Substanzen hierfür sind beispielsweise Antibiotika, Knochenmorphogene (BMP) oder andere Signalmoleküle wie Gefäßwachstumsfaktoren (VEGF). Die meisten derzeit verfügbaren Rapid Prototyping Verfahren zur Herstellung individueller dreidimensionaler Objekte beinhalten jedoch oft einen thermischen Prozessschritt [32], der das Einfügen hitzelabiler bioaktiver Substanzen unmöglich macht. Der 3D-Pulverdruck hingegen ermöglicht die Herstellung biologisch aktiver Knochenersatzmaterialien in nur einem einzigen Schritt bei Raumtemperatur und bietet somit die Option zum direkten Eintrag thermolabiler Bioaktiva wie etwa Proteine.

Trotzdem birgt auch dieses Herstellungsverfahren einige Probleme in Form von chemischen und physikalischen Noxen in sich, die die biologische Aktivität der Additive nach dem Druckprozess stark vermindern können. Beim Durchlaufen des Druckkopfes werden hohe Scherkräfte auf die Substanzen ausgeübt, die deren molekulare Struktur beeinflussen können. Weiterhin stellen der hohe Druck und die hohe Temperatur während des Druckprozesses ein Problem dar. Sie können zum teilweisen Verdampfen der gedruckten Flüssigkeit bzw. zur Denaturierung der darin gelösten Proteine führen. Andere etwaige Komplikationen ergeben sich aus einem Kontakt von gedruckter Lösung und Binder. Besonders bei sauren Binderflüssigkeiten kann es bei einer Vermischung der beiden Flüssigkeiten während des Drucks oder in der Abbindephase des Zements zu Einbußen bzw. zum Verlust der biologischen Aktivität der Additive kommen [44]. Als Beispiel für ein Druckverfahren mit saurem Binder kann der 3D-Pulverdruck von Bruschi-Matrizes angeführt werden [43]. Das vorübergehend saure Umfeld, das durch die Binderflüssigkeit (Phosphorsäure) hervorgerufen wird, kann sich hierbei als nachteilig erweisen, wenn säurelabile Additive mit verarbeitet werden sollen. Dies deckt sich mit Beobachtungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in unserer Arbeitsgruppe beim Druck von BMP-2-Lösungen in Bruschi-Matrizes gemacht wurden.

Um den 3D-Pulverdruck zur Herstellung von Trägermaterialien zu nutzen, die der Freisetzung von Medikamenten dienen, war es zunächst nötig die prinzipielle Möglichkeit einer Applikation von anderen Substanzen (außer dem Binder) zu zeigen. Hierfür wurden zunächst noch keine biologisch aktiven Substanzen gedruckt, sondern lediglich Färbelösungen [95]. In der Folge gelang es, das Breitband-Antibiotikum Levofloxacin (LFVX; Fluorchinolon) mittels 3D-Pulverdruck in Scaffolds auf Polylaktid-Basis zu prozessieren. Durch unterschiedliche Deposition des LFVX wurde eine nicht-lineare Freisetzung des Wirkstoffs von bis zu 100 Tagen erreicht. Allen untersuchten Testzylindern war eine anfänglich hohe LFVX-Freisetzung (burst-release) gemein, die daraufhin aber unterschiedlich stark abnahm [41]. Eine Deposition biologisch aktiver Substanzen in keramische Matrizes auf Calciumphosphat-Basis (Bruschi) ist ebenso beschrieben. Hierfür wurde simultan zur Binderflüssigkeit (Phosphorsäure) u.a. das Antibiotikum Vancomycin (Glykopeptid) in die Matrizes gedruckt. Die Vancomycin-Lösungen wurden entweder homogen, in Depot-Form, graduiert oder als Depot mit einer Polymer-Barriere in die Scaffolds gedruckt. Auch hier wurde ein partieller Verlust an biologischer Aktivität nach dem Druckprozess festgestellt, der sich für Vancomycin aber auf lediglich 1% belief. Da es für ein Trägermaterial bioaktiver

Substanzen von Vorteil ist, wenn es seinen Wirkstoff konstant über einen möglichst langen Zeitraum freisetzt, wurde darüber hinaus noch die Freisetzungskinetik von Vancomycin bestimmt. Wurde dem Ausgangspulver Hydroxypropylmethylzellulose beigemischt, konnte bei graduerter Beladung der Scaffolds eine beinahe lineare Freisetzung des Wirkstoffs über einen Zeitraum von elf Tagen erreicht werden [44].

5.3.1 3D-Pulverdruck von BMP-2

Zur Aufrechterhaltung ihrer biologischen Wirksamkeit müssen mittels 3D-Pulverdruck prozessierte Wirkstoffe den Druckvorgang unbeschadet überstehen. Inwieweit diese Voraussetzungen für wässrige BMP-2-Lösungen gegeben sind, sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Als Testsystem hierfür diene vor allem die ALP-Aktivität von mit gedruckten BMP-2-Lösungen inkubierten C2C12-Zellkulturen. Zellviabilität und Proteinkonzentration wurden zur Validierung des Testsystems ebenso bestimmt um zu zeigen, dass eine veränderte ALP-Aktivität nicht durch Unterschiede in der Zellviabilität bzw. der Proteinkonzentration der Zellen begründet war. Die biologische Aktivität des BMP-2 nach dem Druck stellt sich differenziert dar: Gedruckte und nicht-gedruckte Lösungen bis zu einer Konzentration von 0,1 μM unterscheiden sich in ihrer ALP-Aktivität nicht signifikant voneinander. Dies dürfte jedoch darin begründet sein, dass hier in beiden Fällen noch keine ausreichende Menge BMP-2 an die Rezeptoren der Zellen binden konnte um ALP in einem nachweisbaren Umfang zu induzieren. Zwar haben die Versuche im Rahmen der Verdünnungsreihe bestätigt, dass eine messbare Steigerung der ALP-Aktivität bereits ab BMP-2-Konzentrationen von 4,72 nM nachgewiesen werden kann, jedoch war in diesem Fall das applizierte Volumen an BMP-2 deutlich geringer (20 μl vs. 100 μl). Die gemessenen Werte dürften hier wohl eher auf eine basale Aktivität von Alkalischer Phosphatase zurückzuführen sein, welche die C2C12-Zellen aufweisen und die nicht durch BMP-2 induziert ist. Ab Konzentrationen von 0,5 μM ist die ALP-Aktivität gedruckter gegenüber nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen jedoch durchgehend signifikant niedriger. Allerdings wird die Differenz in der ALP-Aktivität zwischen gedruckten- und nicht-gedruckten Lösungen mit zunehmender BMP-2-Konzentration immer geringer: Die gedruckten 0,5 μM BMP-2-Lösungen wiesen lediglich 34% der biologischen Aktivität ihrer nicht-gedruckten Kontrolle auf. Dieser Wert konnte durch weitere Erhöhung der BMP-2-

Konzentration auf 88% bei 5 μM gesteigert werden. Bei dieser Konzentration ist die ALP-Aktivität der gedruckten BMP-2-Lösungen schließlich nicht mehr signifikant niedriger als die der nicht-gedruckten. Es ist daher anzunehmen, dass sich die biologische Aktivität gedruckter BMP-2-Lösungen mit steigender Konzentration immer weiter an die Aktivität nicht-gedruckter BMP-2-Lösungen annähern wird. Ob eine weitere Steigerung der BMP-2-Konzentration im Hinblick auf eine eventuelle spätere therapeutische Anwendung jedoch sinnvoll ist, scheint eher fraglich. So wurde in der Literatur bereits ein gewisses Sättigungsverhalten von BMP-2 *in vivo* beschrieben: Werden bei sehr hohen BMP-2-Dosen bereits alle ortsständigen mesenchymalen Stammzellen zur Differenzierung angeregt, so ist eine weitere Steigerung der Osteogenese durch noch größere Mengen von BMP nicht mehr möglich [96]. Diese Erkenntnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenso bestätigt werden. Zwar stieg die ALP-Aktivität der C2C12 Zellen nach Inkubation mit den BMP-2-Lösungen ab einem Schwellenwert von 4,72 nM (ca. 100 ng/ml) [81] schnell und in großen Schritten (beinahe 93% Steigerung zwischen zwei Konzentrationen) an, jedoch flachte dieser rasante Anstieg bei höheren Konzentrationen zusehends ab (nur noch knapp 8% Steigerung zwischen den höchsten Konzentrationen). Der Verlust an biologischer Aktivität von gedruckten BMP-2-Lösungen gegenüber nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen ist wahrscheinlich auf die oben beschriebenen physikalischen Prozesse, besonders das Verdampfen von Flüssigkeit während des Druckprozesses, zurückzuführen. Die Viabilität aller Zellkulturen, egal ob sie mit gedruckten oder nicht-gedruckten BMP-2-Lösungen inkubiert wurden, unterschied sich nie signifikant von der Viabilität der Kontrollgruppe. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Messung der Menge des Proteingehalts der Zellen. Zwar liegen die Proteinkonzentrationen einiger Zellkulturen signifikant unter denen der Kontrollgruppe, doch trifft dies sowohl für gedruckte als auch für nicht-gedruckte BMP-2-Lösungen zu. Insgesamt konnten also zumeist keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Viabilität sowie des Proteingehalts der Zellkulturen, unabhängig von ihrer Inkubation mit gedruckter oder nicht-gedruckter BMP-2-Lösung festgestellt werden. Demgegenüber wurde gezeigt, dass eine grundsätzliche Verarbeitbarkeit von BMP-2-Lösungen durch das Pulverdruckverfahren unter geringem Verlust an biologischer Aktivität möglich ist.

6 Zusammenfassung

Die Rekonstruktion ausgedehnter knöcherner Defekte infolge verschiedenster Erkrankungen und deren Therapie besitzen einen großen klinischen Stellenwert. Gerade in der Schädel- und Gesichtsregion besitzen rekonstruktive Maßnahmen nicht nur unter funktionellen, sondern auch unter ästhetischen Gesichtspunkten eine hohe Relevanz. Das Ziel ist soweit möglich die völlige funktionelle und ästhetische Rehabilitation des Patienten. Der Goldstandard für die Versorgung vieler knöcherner Defekte ist das autologe Knochentransplantat, welches jedoch bedingt durch Entnahme und begrenzte Verfügbarkeit auch Einschränkungen besitzt. Daher existiert ein großer klinischer Bedarf an (synthetischen) Ersatzmaterialien.

In komplexen Defektsituationen ist es wünschenswert, auf individuelle, präfabrizierte und solide Implantatstrukturen zurückgreifen zu können. Diese sollten alle definierten Anforderungen an einen Knochenersatzwerkstoff erfüllen. Zur Herstellung solcher komplexer Strukturen, aber auch zur Fertigung einer hohen Stückzahl von Trägerstrukturen mit Verwendung im Tissue Engineering von Knochen, sind Rapid Prototyping Verfahren besonders geeignet. Die 3D-Pulverdrucktechnologie eröffnet vielfältige Möglichkeiten, da zum einen die Verarbeitung biokompatibler und biodegradierbarer Zemente mit knochenähnlicher Chemie möglich ist. Andererseits beinhaltet die Technologie keine thermischen Verfahrensschritte, sodass die grundsätzliche Prozessierbarkeit thermolabiler Substanzen (z.B. bioaktive Wirkstoffe mit Proteinstruktur) realisiert werden kann. Zudem kann der Eintrag der Wirkstoffe in eine dreidimensionale Matrix in orts aufgelöster Weise erfolgen.

Calciumphosphate sind aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit der mineralischen Phase des Knochens die dominierenden Substanzen im Bereich der mineralischen Knochenzemente. Als alternative Materialien sind die Magnesiumphosphate zunehmend in den Fokus gerückt. Insbesondere bei der Verarbeitung mittels 3D-Pulverdruck, bietet das bei neutralem pH abbindende Magnesiumammoniumphosphat-Zement-System (Struvit) Vorteile gegenüber dem im sauren Milieu abbindenden Calciumphosphat-Zement.

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals im 3D-Pulverdruckverfahren hergestellte Struvit-Matrizes auf ihre Eignung als Trägermaterial für Knochenzellen *in vitro* untersucht. Hierzu wurde die Zytokompatibilität sowie die chemische Löslichkeit von gedruckten Struvit-

Strukturen betrachtet. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob die biologische Funktion von BMP-2-Lösungen nach Durchlaufen des Druckprozesses erhalten bleibt und ob es möglich ist, BMP-2 unter Beibehaltung seiner biologischen Wirksamkeit direkt in Struvit-Matrizes zu drucken.

Als Reaktanten zur Herstellung der Struvit-Matrizes wurde modifiziertes Farringtonit-Pulver mit definierter Körnung sowie eine Binder-Lösung aus 0,75 M DAHP und 0,75 M ADHP verwendet.

Die untersuchten Zellkulturträger mit Magnesiumammoniumphosphatchemie zeigten eine ausreichende Zytokompatibilität *in vitro*. Das gegenüber den Positivkontrollen reduzierte zelluläre Proliferationsverhalten ist am ehesten auf eine teils erheblich veränderte Elektrolytzusammensetzung des Zellkulturmediums zurückzuführen, welche aus der hohen chemischen Löslichkeit von Struvit resultiert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass thermolabile Proteine wie BMP-2 im 3D-Pulverdruckverfahren unter weitgehender Beibehaltung ihrer biologischen Wirksamkeit *in vitro* grundsätzlich prozessierbar sind. Die Freisetzung direkt eingedruckter Proteine aus den Struvit-Matrizes blieb jedoch hinter den Erwartungen zurück.

Mit Struvit steht ein alternatives Zementsystem für den 3D-Pulverdruck zur Verfügung, welches spezifische Vorteile gegenüber den etablierten Calciumphosphaten bietet. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Ursache für die geringe BMP-Freisetzung aus den Matrizes zu ermitteln und die Vorteile der neutralen Abbindereaktion voll nutzen zu können.

7 Literatur

- 1 Garrel T, Gotzen L (1998):**
Allogene Knochentransplantation und Knochenbanking.
Unfallchirurg 101:713-27
- 2 Uchida A, Nade S, McCartney ER, Ching W (1985):**
Bone ingrowth into three different porous ceramics implanted into the tibia of rats and rabbits.
J Orthop Res 3:65-77
- 3 Klammert U, Gbureck U, Vorndran E, Rödiger J, Meyer-Marcotty P, Kübler AC (2010):**
3D powder printed calcium phosphate implants for reconstruction of cranial and maxillofacial defects.
J Craniomaxillofac Surg 38:565-70
- 4 Bagnall RD (1980):**
Implant biocompatibility.
Biomaterials 1:97-99
- 5 Bauer TW, Muschler GF (2000):**
Bone graft materials. An overview of the basic science.
Clin Orthop Relat Res 371:10-27
- 6 Foitzik C, Merten HA (2000):**
Knochenersatz- und Knochenaufbaumaterialien in der Implantologie und bei der Behandlung von Knochendefekten.
In: Restitutio ad integrum - Vom Knochenersatz zum Knochenaufbau, Heinenberg, B.-J., Editor, Spitta Verlag, Balingen:16-17
- 7 St John TA, Vaccaro AR, Sah AP, Schaefer M, Berta SC, Albert T, Hilibrand A (2003):**
Physical and monetary costs associated with autogenous bone graft harvesting.
Am J Orthop 32:18-23
- 8 Heary RF, Schlenk RP, Sacchieri TA, Barone D, Brotea C (2002):**
Persistent iliac crest donor site pain: independent outcome assessment.
Neurosurgery 50:510-16
- 9 Broecke DG van den, Schuurman AH, Borg ED, Kon M (1998):**
Neurotmesis of the lateral femoral cutaneous nerve when coring for iliac crest bone grafts.
Plast Reconstr Surg 102:1163-66
- 10 Miller SD, Moed BR, Chess JL (1993):**
Clostridium perfringens infection of an anterior iliac crest bone graft donor site. A case report.
Clin Orthop Relat Res 293:265-68

- 11 Grob D (1989):**
Autologous bone grafts: problems at the donator site.
In: Bone Transplantation, Aebi, M. und Regazzoni, P., Editors, Springer Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- 12 Ubhi CS, Morris DL (1984):**
Fracture and herniation of bowel at bone graft donor site in the iliac crest.
Injury 16:202-03
- 13 Lenzen C, Meiß A, Bull HG (1999):**
Aufbau des extrem atrophierten Ober- und Unterkiefers durch autologe Kalottenknochen- und Kiefertransplantate.
Mund Kiefer Gesichtschir 3:40-42
- 14 Horch HH (2007):**
Alloplastischer und allogener Knochenersatz.
In: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: Praxis der Zahnheilkunde, Urban und Fischer; 4. Aufl.:787-91
- 15 Burchardt H, Glowczewskie FP, Enneking WF (1983):**
The effect of Adriamycin and methotrexate on the repair of segmental cortical autografts in dogs.
J Bone Joint Surg Am 65:103-8
- 16 Endres S, Kratz M, Heinz M, Herzberger C, Reichel S, Garrel T, Gotzen L, Wilke A (2005):**
Biocompatibility testing of different sterilised or disinfected allogeneous bone grafts in comparison to the gold standard of autologous bone grafts - an "in vitro" analysis of immunomodulation.
Z Orthop Ihre Grenzgeb 143:660-68
- 17 Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW (2005):**
Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon.
J Craniofacial Surg 16:981-89
- 18 Rübsamen-Waigmann H (1997):**
Virussicherheit von Blutspenden und Knochen- und Knochentransplantaten.
In: Knochenersatzmaterialien und Wachstumsfaktoren.
Schnettler R und Markgraf E, Editors, Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York: 1-7
- 19 Baldini N, Sanctis M de, Ferrari M (2011):**
Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery.
Dental Materials 27:61-70
- 20 Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia L (2002):**
Natural coral exoskeleton as bone a graft substitute: a review.
Biomed Mater Eng 12:15-35

- 21 Kao ST, Scott DD (2007):**
A review of bone substitutes.
Oral Maxillofac Surg Clin North Am 19:513-21
- 22 Tadic D, Epple M (2004):**
A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone.
Biomaterials 25:987-94
- 23 Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J (2008):**
Bioceramics: Past, present and for the future.
J Eur Ceram Soc 28:1319-27
- 24 Osborn JF, Newesely H (1980):**
The material science of calcium phosphate ceramic.
Biomaterials 1:108-11
- 25 Horch HH, Pautke C (2006):**
Regeneration statt Reparatur: Eine kritische Bewertung des autogenen Knochentransplantates als "Goldstandard" bei der rekonstruktiven Chirurgie im Kieferbereich.
Mund Kiefer Gesichtschir 10:213-20
- 26 Bostrom MP, Lane JM, Berberian WS, Missri AA, Tomin E, Weiland A, Doty SB, Glaser D, Rosen VM (1995):**
Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing.
J Orthop Res 13:357-67
- 27 Spector M (1991):**
Charakterisierung biokeramischer Kalziumphosphatimplantate.
Hefte zur Unfallheilkunde 216:11-22
- 28 Conley JG, Marcus HL (1997):**
Rapid prototyping and solid free form fabrication.
J Manuf Sci Eng 119:811-16
- 29 Tay BY, Evans JRG, Edirisinghe MJ (2003):**
Solid freeform fabrication of ceramics.
Int Mater Rev 48:341-70
- 30 Poprawe R (2004):**
Rapid Prototyping, Rapid Tooling.
In: Lasertechnik für die Fertigung – Grundlagen, Perspektiven und Beispiele für den innovativen Ingenieur,
Springer, Berlin Heidelberg, 2006:225-51
- 31 Halloran JW (1999):**
Freeform fabrication of ceramics.
Brit Ceram T 98:299-303

- 32 Gebhardt A (2007):**
Generative Fertigungsanlagen für Rapid Prototyping, Direct Tooling und Direct Manufacturing.
In: Rapid Prototyping – Rapid Tooling- Rapid Manufacturing.
4. Aufl., Carl Hanser Verlag, München:77-229
- 33 Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH (2002):**
Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications.
Biomaterials 23:1169-85
- 34 Leong KF, Cheah CM, Chua CK (2003):**
Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs.
Biomaterials 24:2363-78
- 35 Lin CY, Wirtz T, LaMarca F, Hollister SJ (2007):**
Structural and mechanical evaluations of a topology optimized titanium interbody fusion cage fabricated by selective laser melting process.
J Biomed Mater Res A 83:272-79
- 36 Edirisinghe MJ (1998):**
Solid freeform fabrication methods for engineering ceramics.
Brit Ceram Proc 58:125-32
- 37 Pond SF (2000):**
Inkjet Technology and Product Development Strategies.
Torrey Pines Research, Carlsbad, California
- 38 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
- 39 Lam CXF, Mo XM, Teoh SH, Hutmacher DW (2002):**
Scaffold development using 3D printing with a starch based polymer.
J Mat Sci Eng 20:49-56
- 40 Giordano RA, Wu BM, Borland SW, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ (1996):**
Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing.
J Biomater Sci Polym Ed 8:63-75
- 41 Huang WD, Zheng QX, Sun WQ, Xu HB, Yang XL (2007):**
Levofloxacin implants with predefined microstructure fabricated by three-dimensional printing technique.
Int J Pharm 339:33-38

- 42 Gbureck U, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R (2003):**
Mechanical activation and cement formation of beta-tricalcium phosphate.
Biomaterials 24:4123-31
- 43 Gbureck U, Hölzel T, Klammert U, Würzler KK, Müller FA, Barralet JE (2007):**
Resorbable dicalcium phosphate bone substitutes prepared by 3D powder printing.
Adv Funct Mater 17:3940-45
- 44 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 20:1585-91
- 45 Yoo J, Cho K, Bae WS, Cima M, Suresh S (1998):**
Transformation-toughened ceramic multilayers with compositional gradients.
J Am Ceram Soc 81:21-32
- 46 Boland T, Wilson WC (2003):**
Cell and organ printing 1: protein and cell printers.
Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 272:491-96
- 47 Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T (2005):**
Ink jet printing of viable mammalian cells.
Biomaterials 26:93-99
- 48 Urist MR (1965):**
Bone: formation by autoinduction.
Science 150:893-99
- 49 Kim CS, Kim JI, Kim J, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Cho KS (2005):**
Ectopic bone formation associated with recombinant human bone morphogenetic
proteins-2 using absorbable collagen sponge and beta tricalcium phosphate as carriers.
Biomaterials 26:2501-07
- 50 Burkus JK, Gornet MF, Dickman CA, Zdeblick TA (2002):**
Anterior lumbar interbody fusion using rhBMP-2 with tapered interbody cages.
J Spinal Disord Tech 15:337-49
- 51 Govender S et al. (2002):**
Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures:
a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients.
J Bone Joint Surg Am 84-A:2123-34
- 52 Terheyden H, Jepsen S, Vogeler S, Tucker M, Rueger DC (1997):**
Recombinant human osteogenic protein 1 in the rat mandibular augmentation model:
differences in morphology of the newly formed bone are dependent on the type of carrier.
Mund Kiefer Gesichtschir 1:272-75

- 53 Kawabata M, Miyazono K (2000):**
Bone Morphogenetic Proteins.
In: Canalis, E. (Hrsg.) (ed.): Skeletal Growth Factors
Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia:269-90
- 54 Kingsley, D.M. (1994):**
The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms.
Genes Dev 8:133-46
- 55 Asahina I, Sampath T, Hauschka P (1996):**
Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells.
Exp Cell Res 222:38-47
- 56 Cunningham BW, Shimamoto N, Seftor JC, Dmitriev AE, Orbegoso CM, McCarthy EF, Fedder I.L, McAfee PC (2002):**
Osseointegration of autograft versus osteogenic protein-1 in posterolateral spinal arthrodesis: emphasis on the comparative mechanisms of bone induction.
Spine J 2:11-24
- 57 Hirata K, Tsukazaki T, Kadowaki A, Furukawa K, Shibata Y, Moriishi T, Okubo Y, Bessho K, Komori T, Mizuno A, Yamaguchi A (2003):**
Transplantation of skin fibroblasts expressing BMP-2 promotes bone repair more effectively than those expressing Runx2.
Bone 32:502-12
- 58 Chang H, Brown CW, Matzuk MM (2002):**
Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily.
Endocr Rev 23:787-823
- 59 Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH, Sampath TK (1994):**
Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: high affinity binding to basement membranes.
Biochem Biophys Res Commun 198:693-700
- 60 Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ (1995):**
A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye.
Genes Dev 9:2795-807
- 61 Vukicevic S, Helder MN, Luyten FP (1994):**
Developing human lung and kidney are major sites for synthesis of bone morphogenetic protein-3(osteogenin).
J Histochem Cytochem 42:869-75
- 62 Reddi AH (1994):**
Bone and cartilage differentiation.
Curr Opin Genet Dev 4:737-44

- 63 Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N (1987):**
Biologic principles of bone induction.
Orthop Clin North Am 18:207-12
- 64 Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P (1997):**
TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.
Nature 390:465-71
- 65 Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J (1994):**
Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.
Nature 370:341-47
- 66 Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J (1995):**
Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs.
Mol Cell Biol 15:3479-86
- 67 Nickel J, Dryer M, Sebald W (2002):**
Deciphering the binding code of BMP-receptor interaction.
In: Vukicevic S, Sampath KT (Hrsg.) (ed.): Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice., Birkhäuser Verlag, Basel: 61-85
- 68 Rüger DC (2002):**
Biochemistry of bone morphogenetic proteins.
In: Vukicevic S, Sampath KT eds., Bone morphogenetic proteins: from laboratory to clinical practice.
Birkhäuser Verlag, Basel, Boston:1-18
- 69 Derynck R, Feng XH (1997):**
TGF-beta receptor signaling.
Biochim Biophys Acta 133:F105-50
- 70 Massague J (1996):**
TGF-beta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins.
Cell 85:947-50
- 71 Attisano L, Wrana JL (1996):**
Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily.
Cytokine Growth Factor Rev 7:327-39
- 72 Korchynsky O, ten Dyke P (2002):**
Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation.
In: Vukicevic, S., Sampath, K.T. (Hrsg.) (ed.): Bone Morphogenetic Proteins. From Laboratory to Clinical Practice., Birkhäuser Verlag, Basel: 31-60
- 73 Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K (1997):**
Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily.
Nature 389:622-26

- 74 Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P (1997):**
Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling,
Nature 389:631-35
- 75 Massague J, Wotton D (2000):**
Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system.
EMBO J 19:1745-54
- 76 Bai S, Shi X, Yang X, Cao X (2000):**
Smad6 as a transcriptional corepressor.
J Biol Chem 275:8267-70
- 77 Derynck R, Zhang Y, Feng XH (1998):**
Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses.
Cell 95:737-40
- 78 Kaplan FS, Glaser DL, Hebel N, Shore EM (2004):**
Heterotopic ossification.
J Am Acad Orthop Surg 12:116-25
- 79 Ohte S, Shin M, Sasanuma H, Yoneyama K, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Maruki Y, Matsuoka M, Namba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Furuya H, Kamizono J, Kitoh H, Nakashima Y, Susami T, Haga N, Komori T, Katagiri T (2011):**
A novel mutation of ALK2, L196P, found in the most benign case of fibrodysplasia ossificans progressiva activates BMP-specific intracellular signaling equivalent to a typical mutation, R206H.
Biochem Biophys Res Commun 407:213-18
- 80 Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W (1996):**
Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity.
Eur J Biochem 237:295-302
- 81 Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T (1994):**
Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage.
J Cell Biol 127:1755-66
- 82 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951):**
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J Biol Chem 193:265-75
- 83 Lowmunkong R, Sohmura T, Takahashi J, Suzuki Y, Matsuya S, Ishikawa K (2007):**
Transformation of 3DP gypsum model to HA by treating in ammonium phosphate solution.
J Biomed Mater Res B Appl Biomater 80:386-93

- 84 Klammert U, Reuther T, Jahn C, Kraski B, Kübler AC, Gbureck U (2009):**
Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing.
Acta Biomater 5:727-34
- 85 Vorndran E, Klarner M, Klammert U, Grover LM, Patel S, Barralet JE, Gbureck U (2008):**
3D Powder Printing of β -Tricalcium Phosphate Ceramics Using Different Strategies
Adv Eng Mater 10:B67-B71
- 86 Chumnanklang R, Panyathanmaporn T, Sitthiseripratip K, Suwanprateeb J (2007):**
3D printing of hydroxyapatite: Effect of binder concentration in pre-coated particle on part strength.
J Mat Sci Eng C 27:914-21
- 87 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 Biomed Mater Res B Appl Biomater 96:326-32
- 88 Grossardt C, Ewald A, Grover LM, Barralet JE, Gbureck U (2010):**
Passive and active in vitro resorption of calcium and magnesium phosphate cements by osteoclastic cells.
Tissue Eng Part A 16:3687-95
- 89 Klammert U, Ignatius A, Wolfram U, Reuther T, Gbureck U (2011):**
In vivo degradation of low temperature calcium and magnesium phosphate ceramics in a heterotopic model.
Acta Biomater 7:3469-75
- 90 Klammert U, Vorndran E, Reuther T, Müller FA, Zorn K, Gbureck U. (2010):**
Low temperature fabrication of magnesium phosphate cement scaffolds by 3D powder printing.
J Mater Sci Mater Med 21:2947-53
- 91 Vorndran E (2011):**
Rapid-Prototyping hydraulisch härtender Calcium- und Magnesiumphosphatzemente mit lokaler Wirkstoffmodifikation.
Dissertation, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde der Universität Würzburg
- 92 Doernberg MC von, Rechenberg B von, Bohner M, Grünenfelder S, Lenthe GH van, Müller R, Gasser B, Mathys R, Baroud G, Auer J (2006):**
In vivo behavior of calcium phosphate scaffolds with four different pore sizes.
Biomaterials 27:5186-98
- 93 Wang Y, Zhang S, Zeng X, Ma LL, Khor K, Qian M (2008):**
Initial attachment of osteoblastic cells onto sol-gel derived fluoridated hydroxyapatite coatings.
J Biomed Mater Res A 84:769-76

- 94 Lemaitre J, Munting E, Mirtichi AA (1992):**
Setting, hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements.
Rev Stomatol Chir Maxillofac 93:163-65
- 95 Wu BM, Borland SW, Giordano RA, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ (1996):**
Solid free-form fabrication of drug delivery devices.
J Control Release 40:77–87
- 96 Würzler KK (2003):**
Aktuelle Aspekte zur Regeneration von Knochendefekten in ausgedehnten Defekten.
Habilitationsschrift, Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der
Universität Würzburg:119-21

8 Anhang

8.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Geräte:

Absaugpumpe (KNF Neuberger, Freiburg, Deutschland)

Brutschrank Hera Cell (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Chirurgisches Einmal-Skalpell Cutfix Stainless No.10 (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)

Chirurgische Pinzette (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland)

Critical Point Dryer CPD 030 (BAL-TEC, Balzers, Liechtenstein)

Elektrolyt-Analysesystem COBAS INTEGRA (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

ELISA-Reader Spectrafluor plus (Tecan, Crailsheim, Deutschland)

Gold-Sputter-Coater K550 (EMITEC, Ashford, England)

Heißluftschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland)

Kugelmühle PM400 (Retsch, Haan, Deutschland)

Kühlzentrifuge Universal 320R (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)

Multi-Channel-Pipette Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Pflugscharmischer M5R (Lödige, Paderborn, Deutschland)

pH-Elektrode SenTix 61 (WTW, Weilheim, Deutschland)

pH-Meter inoLab (WTW, Weilheim, Deutschland)

Photometer Tecan Spektra Rainbow (Tecan, Crailsheim, Deutschland)

Pipetten Eppendorf 10, 20, 100, 200 und 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Rasterelektronenmikroskop Quanta 200 (FEI, Brno, Tschechien)

Schütteltisch Mini Rocker MR1 (Peqlab, Erlangen, Deutschland)

Sterilarbeitsbank Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland)

Thermomixer 5436 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Ultraschall-Bad (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)

Vortexgerät Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA)

Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland)

Zellzähler Casy 1 (Schärfe Systeme, Reutlingen, Deutschland)

ZPRINTER 310 (Z-Corporation, Burlington, USA)

Anhang

Verbrauchsmaterialien:

24-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
96-Well-Platten (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)
Druckerpatrone HP 11Druckkopf C4810A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)
Druckerpatrone HP 11Druckkopf C4838A (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)
Filtereinheiten FP 30/0,2 CA-S (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland)
Kupfer-Stanzplättchen (Eigenanfertigung der Abteilung für FMZ der Universität Würzburg)
MT-Abdeckfolie (Tecan, Crailsheim, Deutschland)
Petrischalen Easy Grip (Becton Dickinson, Plymouth, England)
Pipettenspitzen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
Spritzen BD Discardit II (Becton Dickinson, New Jersey, USA)
Titan-Stanzplättchen (Reintitan, Eigenanfertigung der Abteilung für FMZ der Universität Würzburg)
Zählgefäße (Hartenstein, Würzburg, Deutschland)
Zellkultur-Flaschen EasyFlasks (Nunc, Roskilde, Dänemark)
Zentrifugenröhrchen CellStar Tubes 50 ml (Greiner, Frickenhausen, Deutschland)

Reagenzien:

20% Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
20% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
ADHP (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Aqua ad iniectabilia (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Aqua dest. (Universitätsversorgung Würzburg)
Azeton (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany)
DAHP (Merck, Darmstadt, Deutschland)
DC Protein Assay mit Reagenz S, -A und -B (BIO-RAD, München, Deutschland)
DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol (Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg)
Extran MA03 (Merck, Darmstadt, Deutschland)
FKS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Anhang

Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ (Fluka, Seelze, Deutschland)
Nonidet P40 Substitut (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
PNPP (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
P/S (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
SDS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
WST-1 Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
Zinkchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

8.2 Abkürzungen

3DP	Three-dimensional Printing
ActR	Activin type Receptor
ADHP	Ammoniumdihydrogenphosphat
ALK	Actin receptor-like Kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
CAD	Computer Aided Design
CIJ	Continuous Ink Jet
Co-Smad	Common Mediator Smad
CT	Computertomografie
DAHP	Di-Ammoniumhydrogenphosphat
DoD	Drop in Demand
FDM	Fused Deposition Modelling
FOP	Fibrodysplasia Ossificans Progressiva
FKS	Fetales Kälberserum
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
I-Smad	Inhibitory Smad
LCVD	Laser Chemical Vapor Deposition
LFVX	Levofloxazin
LOM	Laminate Object Manufacturing
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PLA	Poly lactid Acid
PNPP	P-Nitrophenylphosphat

PS	Polystyrol
P/S	Penicillin / Streptomycin
rhBMP-2	rekombinantes humanes BMP-2
R-Smad	Receptor regulated Smad
SD	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SL	Stereolithografie
SLM	Selektive Laser Melting
SLS	Selektive Laser Sintering
STL	Standard Triangulation Language
TGF-β	Transforming Growth Factor- β
vCJK	Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WST	Water Soluble Tetrazolium
XRD	X-Ray Diffraction

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Alexander C. Kübler möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas, die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit sowie die Erstellung des Referats danken.

Herrn Prof. Dr. Uwe Gbureck danke ich für die Erstellung des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Walter Sebald und Mitarbeitern danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Proteine.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Uwe Klammert für die Idee zu dieser Arbeit und die beständige Anleitung und Unterstützung.

Ebenso gebührt mein Dank Frau Margit Schleyer für die Einführung in die experimentelle Laborarbeit sowie Rat und Tat bei allerlei Fragestellungen.

Frau Dr. rer. nat. Elke Vorndran danke ich für die Hilfe bei der Benutzung des 3D-Pulverdruckers sowie die Beantwortung aller Fragen in diesem Zusammenhang.

Abschließend möchte ich mich noch ganz herzlich bei allen Freunden und Verwandten bedanken, die mir geholfen haben die ein oder andere „Durststrecke“ während der Entstehung dieser Arbeit zu überwinden.